



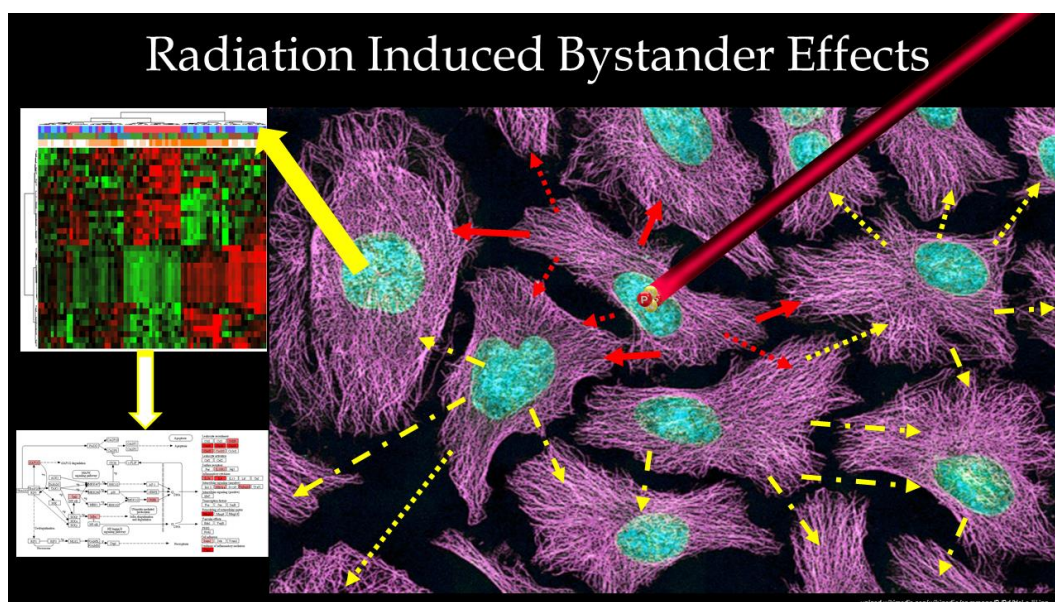
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ανάλυση μικροσυστοιχιών RNA για την ανίχνευση συστημικών
φαινομένων μετά από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία»**



Κωνσταντίνος Γελές

Πτυχιούχος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής (ΜΒΓ), Δημοκριτείου
Πανεπιστημίου Θράκης

ΑΘΗΝΑ 2017



HELLENIC REPUBLIC

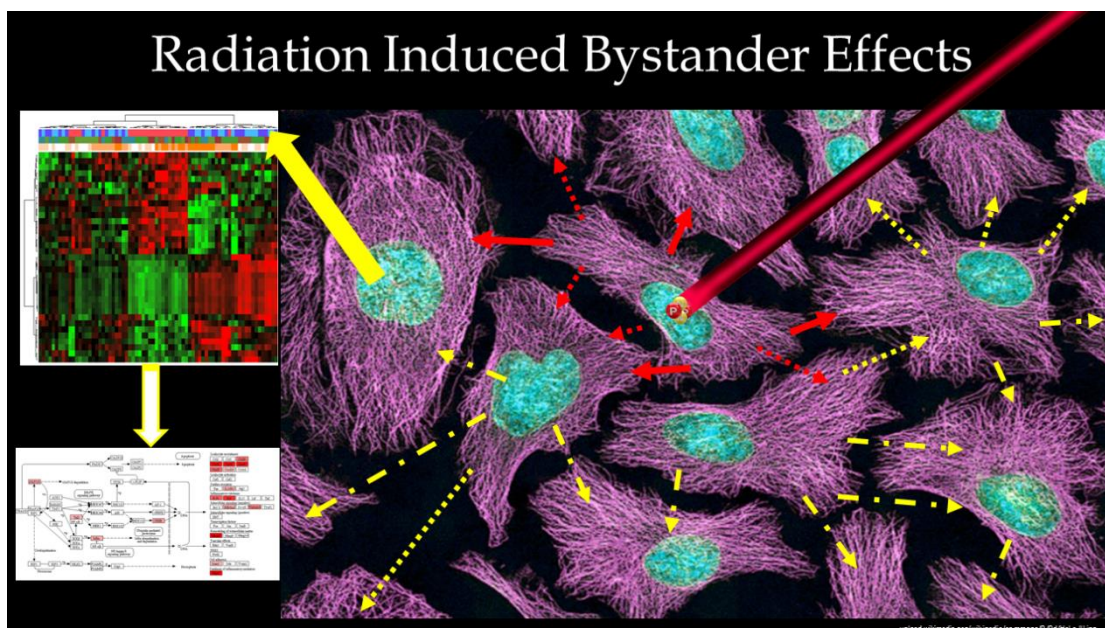
National and Kapodistrian
University of Athens

SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY

MASTER IN "BIOINFORMATICS"

Master Diploma Thesis

«RNA microarray analysis for the detection of systemic effects following
exposure to ionizing radiation»



Constantinos Yeles

Graduate Degree in Molecular Biology and Genetics, Democritus University of
Thrace

ATHENS 2017



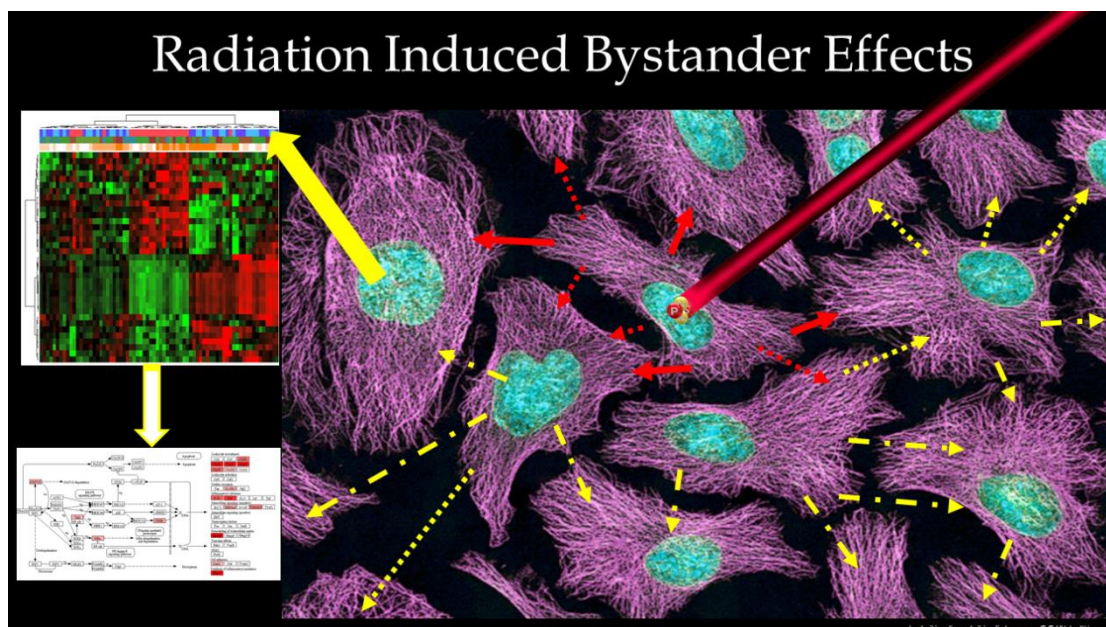
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ανάλυση μικροσυστοιχιών RNA για την ανίχνευση συστημικών
φαινομένων μετά από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία»**



Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Αναπληρωτής Καθηγητής Αλέξανδρος Γεωργακίλας (Επιβλέπων)
Τομέας Φυσικής,
Σχολή εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικής, Εθνικό Μετσόβιο
Πολυτεχνείο

Καθηγητής Κωνσταντίνος Ε. Βοργιάς
Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας,
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Επίκουρη Καθηγήτρια Βασιλική Α. Οικονομίδου
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εποχή μας η όλο και αυξανόμενη χρήση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε ιατρικές εφαρμογές για την διάγνωση και την θεραπεία παθήσεων έχει οδηγήσει στην μελέτη νέων φαινομένων επίδρασεών της στην έμβια ύλη. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία (ΙΑ) φέρει αρκετή ενέργεια ώστε να προκαλέσει την απελευθέρωση ηλεκτρονίων από άτομα ή μόρια με αποτέλεσμα τον ιοντισμό τους. Η δράση της κατηγοριοποιείται σε άμεση όπου προκύπτει από την απευθείας καταστροφή δεσμών και άλλων βλαβών λόγω της εναπόθεσης πρωτογενούς ενέργειας από τα φορτισμένα σωματίδια ή φωτόνια που μπορούν να ιοντίσουν άτομα και στην έμμεση, προκαλώντας δευτερογενώς την παραγωγή ηλεκτρονίων και άλλων δραστικών μορίων. Η ΙΑ είναι επιβλαβής και δυνητικά θανατηφόρα είτε με επιβλαβή επίδραση στους ιστούς σε υψηλές δόσεις είτε μέσω μεταλλάξεων στα σωματικά κύτταρα και την δημιουργία γενωμικής αστάθειας και δυνητικά καρκίνου. Εκτός από την καθαρή και λεγόμενη στοχευμένη επίδραση (targeted effect) της στα ακτινοβολημένα κύτταρα έχει βρεθεί ότι προκαλεί μη-στοχευμένα (non-targeted) φαινόμενα απόκρισης σε παρακείμενα υγιή κύτταρα, τα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης (bystander effects) που θεωρούνται μέρος των συστημικών δράσεων της ακτινοβολίας (Radiation Induced Bystander Effects). Από διάφορες ερευνητικές μελέτες έχειδειχθεί ότι παρατηρούνται βλάβες στα παρακείμενα κύτταρα παρόμοιες με τα ακτινοβολημένα, όπως γονιδιακή αστάθεια, σχηματισμός μικροπυρήνων, αλλαγές έκφρασης miRNA, επαγωγής βλαβών στο DNA και απόπτωση. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η έκκριση παραγόντων των ακτινοβολημένων κυττάρων συμβάλουν στην εκδήλωση οξειδωτικού στρες στα παρακείμενα κύτταρα. Μία σημαντική ανακάλυψη με βάση τα παραπάνω φαινόμενα είναι ότι δεν φαίνεται να επηρεάζουν με τον ίδιο τρόπο διαφορετικά είδη κυττάρων και ότι υπάρχει διαφορετική απόκριση ανάλογα με την υποκατηγορία ΙΑ που χρησιμοποιείται. Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η διαπίστωση της φύσης των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης που θεωρούνται μέρος των συστημικών δράσεων της ακτινοβολίας, μέσω της ανάπτυξης γενικευμένων υπολογιστικών μεθοδολογιών ανάλυσης δεδομένων μικροσυστοιχιών και της χρήσης αυτών σε βιοπληροφορικά εργαλεία λειτουργικής ανάλυσης εμπλουτισμού ώστε να οδηγηθούμε στην αναγνώριση των μοριακών σηματοδοτικών μονοπατιών καθώς και των λειτουργιών που ενέχονται στα παραπάνω φαινόμενα. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 7 σύνολα δεδομένων από το δημόσιο αποθετήριο δεδομένων γονιδιακής έκφρασης πειραμάτων υψηλής απόδοσης Gene Expression Omnibus (GEO) από τα οποία στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για τα παρακείμενα κύτταρα βρέθηκαν μόνο στα 4. Για την ανάλυση τους χρησιμοποιήθηκε η

γλώσσα προγραμματισμού R και βιοπληροφορικά πακέτα ανάλυσής διαφορικής γονιδιακής έκφρασης δεδομένων μικροσυστοιχιών του έργου ανάπτυξης ανοικτού κώδικα λογισμικού Bioconductor. Επίσης για την λειτουργική ανάλυση στατιστικού εμπλουτισμού χρησιμοποιήθηκαν οι διαδικτυακές πλατφόρμες BioInfoMiner και EnrichR. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν φανέρωσαν ήδη γνωστούς μηχανισμούς από την βιβλιογραφία και την διαφορετική απόκριση σε διαφορετικούς σωματιδιακούς τύπους ΙΑ. Ιδιαίτερα για τα σωματίδια άλφα και τα ιόντα άνθρακα, παρατηρήθηκαν διακριτοί μηχανισμοί απόκρισης των κυττάρων στα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης. Στα σύνολα δεδομένων που είχε χρησιμοποιηθεί ΙΑ σωματιδίων άλφα 0.5 Gy στις 0.5, 4 ώρες εξαγωγής του RNA μετά την ακτινοβόληση βρέθηκαν βιολογικές διεργασίες που έχουν σχέση με την απόκριση στο οξειδωτικό στρες και στην φλεγμονή μέσω μεταλλοθειονινών, κυτοκινών, χυμοκινών (MT1X..., CXCL8..., IL1B..., PTGS2), απόκριση στις πρωτεϊνικές βλάβες και στη ζέστη (HSPH1..., DNAJA1...), στην επαγωγή μηχανισμών επιδιόρθωσης του τραύματος και αρνητικής ρύθμισης του διπλασιασμού. Στο σύνολο δεδομένων που είχε χρησιμοποιηθεί ΙΑ ιόντων άνθρακα 0.12 Gy και 0.013 Gy στις 2, 6 ώρες εξαγωγής του RNA μετά την ακτινοβόληση βρέθηκαν βιολογικές διεργασίες που έχουν σχέση με την φλεγμονώδη απόκριση (PTGS2, IL1A, IL1B...) και επαγόμενοι αποπτωτικοί μηχανισμοί. Επίσης παρατηρήθηκε μεγάλη διαφορά στην επίδραση της ΙΑ σε φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια στις αναλύσεις των συνόλων με καρκινικά και αθανатоποιημένα κύτταρα κάτι που χρήζει περαιτέρω εξειδικευμένης πειραματικής μελέτης. Τέλος με συγκριτική ανάλυση μεταξύ της βιοπληροφορικής ανάλυσης αυτής της εργασίας και δημοσιευμένων εργασιών βιβλιογραφικής εξόρυξης κειμένου ταυτοποιήθηκαν γονίδια που εμπλέκονται με τα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης αναδεικνύοντας την αξιοπιστία των μεθόδων ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ιοντίζουσα ακτινοβολία, φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης επαγόμενα από επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας, Μεταγραφομική

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Βιοπληροφορική, ιοντίζουσα ακτινοβολία, μικροσυστοιχίες, παρακείμενα κύτταρα, συστημικά, φαινόμενα, φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης επαγόμενα από επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας, φλεγμονώδη απόκριση

ABSTRACT

Nowadays, the ever- increasing use of ionizing radiation in medical applications for the diagnosis and treatment of diseases has led to the study of new interaction phenomena effecting the living matter. Ionizing radiation carries sufficient energy to cause the release of electrons from atoms and molecules resulting in their ionization. Ionizing radiation effects are differentiated into direct, that results from the direct destruction of bonds and other damages due to the primary energy deposition of charged particles and photons that ionize atoms and indirect effects, that cause secondary production of electrons and other active molecules. Ionizing radiation is harmful and potentially lethal to living material in two different ways, either with a harmful effect on the tissues to high doses of either through mutations in somatic cells and cancer formation. Besides the targeted effect on the irradiated cells, it has been found that it causes non-targeted effects in nearby healthy cells, which are called radiation induced bystander effects. The study of these phenomena has been going on for two decades revealing a variety of biological characteristics. Two major signaling pathways have been shown to be involved in the above-mentioned phenomena and the communication occurs either by gap junctions or by factors secreted for intercellular communication. Various studies have shown that damage has been found in bystander cells similar to those irradiated such as genomic instability, micronuclei formation, changes in the expression of miRNA, damage in the DNA and apoptosis. A breakthrough discovery states that the above-mentioned phenomena do not affect different type of cells in the same way and that there is a different response depending on the subcategory of ionizing radiation used. The aim of this thesis is to establish the nature of these radiation induced bystander effects by developing statistical microarray data analysis techniques and their use in bioinformatics functional analysis tools that lead to the identification of the molecular pathways and their functions in these phenomena. For the analysis 7 different data sets from the database repository of high throughput gene expression data Gene Expression Omnibus (GEO) were used, 4 of which revealed statistically significant results. Programming language R and Bioconductor bioinformatics packages were used. For the functional analysis BioInfoMiner and EnrichR, which are online bioinformatics tools, were also used. The results revealed already known mechanisms in the literature and different responses to different classes of ionizing radiation. Particularly regarding α -particles and carbon-ions ionizing radiation distinct response mechanisms were observed in bystander cells. In the data sets that 0.5 Gy alpha particle ionizing radiation

was used, at 0,5 and 4 hours RNA extraction after the irradiation, we noticed a great response to oxidative stress and inflammation through metallothioneins, cytokines, chemokines (MT1X, CXCL2, IL1B, PTGS2), response to protein damage and heat (HSPH1, DNAJA1), induction of the wound repair mechanisms and negative regulation of replication. In the data sets that 0,12 Gy and 0,013 Gy carbon ion ionizing radiation was used at 2 and 6 hours RNA extraction after the irradiation, we noticed a response to inflammation (PTGS2, IL1A, IL1B) and many apoptotic pathways. We also noticed a large difference in radiation induced bystander effects according to the different type of cell. In normal bystander cells a response was observed. In cancer and immortalized cells there was no statistically significant differentiation in the expression of genes. These results revealed several mechanisms involved in basic response of bystander cells to the proximity effects that can be used to study and verify more specific bystander cell responses.

SUBJECT AREA: IONIZING RADIATION, RADIATION-INDUCED BYSTANDER EFFECTS, TRANSCRIPTOMICS

KEYWORDS: BIOINFORMATICS, IONIZING RADIATION, MICROARRAYS, BYSTANDER CELLS, BYSTANDER EFFECT, RADIATION, RADIATION-INDUCED BYSTANDER EFFECTS, INFLAMMATORY RESPONSE

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο της φοίτησης μου στο «ΜΔΕ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ» του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Για την ολοκλήρωση της θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τον Επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή (ΣΕΜΦΕ, ΕΜΠ) Αλέξανδρο Γεωργακίλα για την εμπιστοσύνη και εκτίμηση που μου έδειξε ώστε να ολοκληρωθεί αυτή η διπλωματική εργασία.

Τον Ερευνητή Β' Αριστοτέλη Χατζηγιάννου (Ε.Ι.Ε.) που με δέχθηκε στην ερευνητική του ομάδα βιοπληροφορικής και μου παραχώρησε δωρεάν τα δικαιώματα χρήσης της διαδικτυακής πλατφόρμας BioInfoMiner ώστε να πραγματοποιηθεί η παρούσα διπλωματική. Τον υποψήφιο διδάκτορα Ευστάθιο-Ιάσωνα Βλαχάβα για την καθοριστική του βοήθεια καθ' όλη την διάρκεια εκπαίδευσης μου με τη γλώσσα προγραμματισμού R και τα βιοπληροφορικά πακέτα. Επίσης, για την ουσιαστική συμβολή του στην πραγματοποίηση αυτής της διπλωματικής.

Την Ειδική Λειτουργική Επιστήμονα (Ε.Ι.Ε.) Όλγα Παπαδόδημα για την πολύτιμη καθοδήγησή της σε διάφορα ζητήματα που προέκυψαν.

Την ερευνητική ομάδα βιοπληροφορικής του κ. Χατζηγιάννου που αποτελείται από τους Διδάκτορες Ελευθέριο Πιλάλη, Μαριάνθη Λογοθέτη, τους Υποψήφιους Διδάκτορες Γεωργία Κοντογιάννη, Θεόδωρο Κουτσανδρέα, Ειρήνη Λιάμπα, Ιλόνια Μπινεμπασουμ, Μάκη Λαδουκάκη και τον Ειδικό Τεχνικό Επιστήμονα Κωνσταντίνο Βουτεκάκη, για την πολύτιμη βοήθεια τους σε κάθε ερώτηση που είχα κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας και για την φιλική ατμόσφαιρα που υπήρχε στο εργαστήριο.

Τον καθηγητή Κωνσταντίνο Ε. Βοργιά και την Επίκουρη Καθηγήτρια Βασιλική Α. Οικονομίδου που δέχτηκαν να είναι μέλη της Τριμελούς Επιτροπής αξιολόγησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Τους φίλους μου για την ηθική συμπαράσταση τους για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Τέλος την οικογένεια μου για την ηθική συμπαράσταση και οικονομική στήριξη καθ' όλη την διάρκεια της πραγματοποίησης και ολοκλήρωσης της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.1	Ιοντίζουσα ακτινοβολία	25
1.1.1	Περιβάλλον και ιοντίζουσα ακτινοβολία	25
1.1.2	Ιοντισμός	25
1.1.3	Δράσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας	26
1.1.4	Τύποι σωματιδίων ιοντίζουσας ακτινοβολίας	27
1.1.5	Θεραπευτική χρήση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας	28
1.1.6	Επιδράσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στην έμβια ύλη	29
1.2	Βιολογία Συστημάτων	32
1.2.1	Θεωρία Βιολογίας Συστημάτων	32
1.2.2	Κλάδοι Βιολογίας Συστημάτων	33
1.3	Συστημικά βιολογικά φαινόμενα	33
1.3.1	Ορισμός συστημικών φαινομένων	33
1.3.2	Καρκίνος και συστημικά φαινόμενα	33
1.3.3	Ανακάλυψη των συστημικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης επαγόμενων από ακτινοβολημένα κύτταρα με ιοντίζουσα ακτινοβολία	34
1.3.4	Κατηγοριοποίηση των τοπικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης που θεωρούνται μέρος των συστημικών δράσεων της ιοντίζουσας ακτινοβολίας	36
1.3.5	Διερεύνηση τοπικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ (radiation induced bystander effects)	36
1.3.6	Χρονική και χωρική μετάδοση τοπικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ	38
1.3.7	Κύριες οδοί σηματοδότησης των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ	39
1.3.8	Κυτταρικοί τύποι μελέτης των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ	40
1.3.9	Αναθεώρηση του τρόπου πρόκλησης αλλοιώσεων στα κύτταρα από τα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ	42
1.3.10	Επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ	43
1.3.11	Νέοι τομείς ερευνών των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ	47
1.3.12	Διερεύνηση στην μοντελοποίηση των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ	47
1.3.13	Μελέτη γονιδιακής έκφρασης των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ	48
1.4	Μέθοδοι Μικροσυστοιχιών – Τεχνικές Υψηλής Απόδοσης	49
1.4.1	Χρήση μεθόδων μικροσυστοιχιών	49
1.4.2	Πρόοδος των μεθόδων μικροσυστοιχιών	49
1.4.3	Εφαρμογές μικροσυστοιχιών	50
1.4.4	Μειονεκτήματα-Περιορισμοί Μικροσυστοιχιών	52
1.4.5	Μεθοδολογία μικροσυστοιχιών – Πειραματική διαδικασία	52
1.4.6	Μεθοδολογία μικροσυστοιχιών – Βιοπληροφορική ανάλυση	53

1.5	Οντολογίες γονιδίων.....	55
1.5.1	Gene Ontology Project.....	55
1.5.2	Σκοπός του Gene Ontology Project.....	55
1.5.3	Δομή οντολογίας γονιδίων	55
1.5.4	Παράδειγμα όρου βιολογικής διεργασίας της Gene Ontology	56
1.6	Gene Expression Omnibus (GEO)	57
1.6.1	Σκοπό της GEO	57
1.6.2	Δομή της GEO.....	57
1.7	Σκοπός Διπλωματικής εργασίας	58
1.	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	58
1.1	Αναζήτηση των συνόλων δεδομένων μικροσυστοιχιών	58
1.1.1	Εύρεση των συνόλων δεδομένων μικροσυστοιχιών	58
1.1.2	Αποτελέσματα αναζήτησης συνόλων δεδομένων μικροσυστοιχιών	59
1.2	Βιοπληροφορική ανάλυση συνόλων δεδομένων μικροσυστοιχιών	60
1.2.1	Λήψη των αρχείων των συνόλων δεδομένων	60
1.2.2	Μεθοδολογίες διόρθωσης υποβάθρου.....	62
1.2.3	Φιλτράρισμα εντάσεων ανιχνευτών.....	62
1.2.4	Διερευνητική ανάλυση δεδομένων (Exploratory Data Analysis).....	63
1.2.5	Σχηματισμός συγκρίσεων και ανάλυσή τους.....	63
1.2.6	Διάγραμμα ανάλυσης κυρίων συνιστωσών και πολυδιάστατης διαβάθμισης	65
1.2.7	Διάγραμμα Ηφαιστείου (volcano plot).....	65
1.2.8	Δενδρόγραμμα.....	66
1.2.9	Διάγραμμα Venn.....	66
1.2.10	Θερμικό Διάγραμμα ή Θερμικός Χάρτης (Heatmap)	66
1.3	Λειτουργική ανάλυση αποτελεσμάτων	67
1.3.1	Λειτουργική ανάλυση και ιεράρχηση γονιδίων με χρήση εργαλείου BioInfoMiner	67
1.3.2	Λειτουργική ανάλυση με χρήση εργαλείου EnrichR	68
2.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	69
2.1	Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE12435	69
2.1.1	Γενικές πληροφορίες GSE12435	69
2.1.2	Διόρθωση υποβάθρου, κανονικοποίηση και φιλτράρισμα εντάσεων.....	70
2.1.3	Διαγράμματα διερευνητικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE12435.....	72
2.1.4	Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια συνόλου δεδομένων GSE12435.....	74

2.1.5	Σύγκριση των αποτελεσμάτων Bystander vs Control και Irradiated vs Control GSE12435	78
2.2	Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE18760	79
2.2.1	Γενικές πληροφορίες GSE18760	79
2.2.2	Επεξεργασία δεδομένων του GSE18760	79
2.2.3	Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια συνόλου δεδομένων GSE18760	80
2.2.4	Σύγκριση των αποτελεσμάτων Bystander vs Control και Irradiated vs Control GSE18760	84
2.3	Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE21059	85
2.3.1	Γενικές πληροφορίες GSE21059	85
2.3.2	Επεξεργασία δεδομένων του GSE21059	86
2.3.3	Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια συνόλου δεδομένων GSE21059	86
2.3.4	Σύγκριση των αποτελεσμάτων Bystander vs Control και Irradiated vs Control GSE21059	92
2.4	Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE55869	94
2.4.1	Γενικές πληροφορίες GSE55869	94
2.4.2	Επεξεργασία δεδομένων του GSE55869	94
2.4.3	Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια συνόλου δεδομένων GSE55869	95
2.5	Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE25772	96
2.5.1	Γενικές πληροφορίες GSE25772	96
2.5.2	Επεξεργασία δεδομένων του GSE25772	97
2.5.3	Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια συνόλου δεδομένων GSE25772	97
2.6	Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE32091	99
2.6.1	Γενικές πληροφορίες GSE32091	99
2.6.2	Επεξεργασία δεδομένων του GSE32091	99
2.6.3	Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια συνόλου δεδομένων GSE32091	100
2.7	Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE8993	100
2.7.1	Γενικές πληροφορίες GSE8993	100
2.7.2	Επεξεργασία δεδομένων του GSE8993	101
2.7.3	Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια συνόλου δεδομένων GSE8993	102
2.8	Συγκριτική ανάλυση μεταξύ συνόλων δεδομένων	109
2.8.1	Επιλογή συνόλων δεδομένων για συγκριτική ανάλυση αποτελεσμάτων	109
2.8.2	Συγκριτική ανάλυση μεταξύ συνόλων δεδομένων GSE12435, GSE18760	110
2.8.3	Συγκριτική ανάλυση μεταξύ συνόλων δεδομένων GSE12435, GSE18760 και GSE21059	113
2.8.4	Συγκριτική ανάλυση για την εύρεση διαφορών μεταξύ Παρακειμένων και Ακτινοβολημένων κυττάρων μεταξύ συνόλων δεδομένων GSE12435, GSE18760 και GSE21059	120
3.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	121

3.1 Εισαγωγή	121
3.2 Διερεύνηση συγκριτικής ανάλυσης	121
3.2.1 Μελέτη των διαφορών πειραματικών διαδικασιών μεταξύ συνόλων δεδομένων	121
3.2.2 Κατηγοριοποίηση μεταξύ συνόλων δεδομένων.....	122
3.2.3 Μελέτη αποτελεσμάτων συνόλου δεδομένων GSE8993 (Ακτινοβολήση με ιόντα άνθρακα)	124
3.2.4 Μελέτη αποτελεσμάτων συνόλων δεδομένων GSE25772 και GSE32091 (μεταφορά μέσου καλλιέργειας για τον σχηματισμό παρακειμένων κυττάρων)	128
3.2.5 Μελέτη αποτελεσμάτων συνόλων δεδομένων GSE12435, GSE18760, GSE21059 και GSE55869 (συγκρίσεις διαφορετικών χρονικών στιγμών μετά από την ακτινοβολήση κυττάρων).....	129
3.2.6 Σύγκριση λιστών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ των συνόλων δεδομένων GSE18760, GSE12435 και GSE8993	134
3.2.7 Συγκριτική ανάλυση αποτελεσμάτων με βιβλιογραφική μελέτη	137
3.3 Συμπεράσματα	139
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	141
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	142
ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	162

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 3-1 Ιστόγραμμα συχνοτήτων των εντάσεων όλων των ανιχνευτών του συνόλου δεδομένων GSE12435. Οι τιμές των εντάσεων έχουν υποστεί μετασχηματισμό $\log_2$. Στο αριστερό ιστόγραμμα φαίνονται οι συχνότητες των ανεπεξέργαστων εντάσεων. Στο κεντρικό ιστόγραμμα φαίνονται οι συχνότητες μετά από κανονικοποίηση και στο δεξί μετά το φιλτράρισμα των εντάσεων. Παρατηρούμε ότι ακολουθούν θετικά ασύμμετρη κατανομή.70
- Σχήμα 3-2 Θηκόγραμμα δειγμάτων του συνόλου δεδομένων ως προς τις εντάσεις τους (έχουν υποστεί μετασχηματισμό $\log_2$). Στο πρώτο θηκόγραμμα φαίνονται οι τιμές των ανεπεξέργαστων εντάσεων. Στο δεύτερο διάγραμμα φαίνονται οι τιμές των εντάσεων μετά από κανονικοποίηση. Παρατηρούμε ότι μετά την κανονικοποίηση έχουν όλα τα δείγματα παρόμοια διάμεσο και το παρόμοιο ενδοτεταρτημοριακό εύρος.71
- Σχήμα 3-3 Διάγραμμα κύριων συνιστωσών του συνόλου δεδομένων GSE12435. Παρατηρούμε ότι τα δείγματα ίδιου βιολογικού replicate μεταξύ irradiated και bystander δεν έχουν μεγάλες διαφορές σε αντίθεση με τα control τους που παρουσιάζουν αρκετά μεγάλες, τουλάχιστον στα δείγματα 3 και 4.72
- Σχήμα 3-4 Διάγραμμα πολυδιάστατης διαβάθμισης του συνόλου δεδομένων GSE12435. Παρατηρούμε ότι όπως και στο παραπάνω διάγραμμα κύριων συνιστωσών τα δείγματα ίδιου βιολογικού replicate μεταξύ irradiated και bystander δεν έχουν μεγάλες διαφορές σε αντίθεση με τα control τους που έχουν αρκετά εμφανείς διαφορές στις 2 πρώτες διαστάσεις.72
- Σχήμα 3-5 Δενδρόγραμμα του συνόλου δεδομένων GSE12435 με χρήση της τεχνικής clustering average. Φαίνεται ότι η ομαδοποίηση γίνεται μεταξύ των irradiated με τα bystander ενώ τα control ομαδοποιούνται μόνα τους.73
- Σχήμα 3-6 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE12435. Παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ bystander και control δειγμάτων. Βρέθηκαν μόνο 5 στατιστικά σημαντικά υποεκφρασμένα γονίδια και 48 στατιστικά σημαντικά υπερεκφρασμένα.74
- Σχήμα 3-7 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Bystander vs Control GSE12435. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί

υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.75

Σχήμα 3-8 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE12435. Παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ irradiated και control δειγμάτων. Βρέθηκαν μόνο 11 στατιστικά σημαντικά υποεκφρασμένα γονίδια και 65 στατιστικά σημαντικά υπερεκφρασμένα.....76

Σχήμα 3-9 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Irradiated vs Control GSE12435. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.77

Σχήμα 3-10 Venn διάγραμμα μεταξύ των δύο λιστών διαφορικών εκφρασμένων γονιδίων του συνόλου δεδομένων GSE12435. Παρατηρούμε ότι από τα 53 και 76 διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια των συγκρίσεων Bystander vs Control και Irradiated vs Control 39 είναι κοινά. Αριστερά υποδεικνύονται τα 14 γονίδια που είναι διαφορετικά μεταξύ των συγκρίσεων Bystander vs Control και Irradiated vs Control. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.78

Σχήμα 3-11 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE18760. Παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ bystander και control δειγμάτων. Βρέθηκαν 424 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, από τα οποία 194 υποεκφρασμένα και 230 υπερεκφρασμένα.....80

Σχήμα 3-12 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Bystander vs Control GSE18760. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.81

Σχήμα 3-13 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE18760. Παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ irradiated και control δειγμάτων. Βρέθηκαν 481 στατιστικά σημαντικά

διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, από τα οποία 189 υποεκφρασμένα και 292 υπερεκφρασμένα.....82

Σχήμα 3-14 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Irradiated vs Control GSE18760. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.83

Σχήμα 3-15 Venn διάγραμμα μεταξύ των δύο λιστών διαφορικών εκφρασμένων γονιδίων του συνόλου δεδομένων GSE18760. Παρατηρούμε ότι από τα 424 και 481 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια των συγκρίσεων Bystander vs Control και Irradiated vs Control 339 είναι ίδια. Αριστερά υποδεικνύονται τα 14 κομβικά γονίδια που είναι διαφορετικά μεταξύ των συγκρίσεων Bystander vs Control και Irradiated vs Control όπως προέκυψαν από την λειτουργική ανάλυση του εργαλείου Bioninfominer. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.....84

Σχήμα 3-16 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE21059. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ bystander και control δειγμάτων που προέκυψε από δοκιμασία ANOVA για μία χρονική στιγμή (0.5h). Λήφθηκαν 1254 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια από όλες τις συγκρίσεις των διαφορετικών χρονικών στιγμών. Στη μισή ώρα μετά την ακτινοβολήση 786 ήταν υποεκφρασμένα και 468 υπερεκφρασμένα.86

Σχήμα 3-17 Ραβδόγραμμα πλήθους διαφορικών εκφρασμένων γονιδίων ως προς την χρονική στιγμή της σύγκρισης Bystander vs Control του συνόλου δεδομένων GSE21059. Με ανοικτό κυανό και πορτοκαλί παρουσιάζεται το πλήθος των διαφορικά υπο/υπερ-εκφρασμένων γονιδίων αντίστοιχα. Με πράσινο και κόκκινο παρουσιάζεται το υποσύνολο των διαφορικά υπο/υπερ-εκφρασμένων γονιδίων αντίστοιχα που ξεπερνάει τις τιμές απόλυτου Log2FoldChange >0.5 και κρίνεται ως βιολογικά σημαντικό.87

Σχήμα 3-18 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Bystander vs Control GSE21059 με δοκιμασία ANOVA. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός

των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους. Έχουν χρησιμοποιηθεί οι τιμές έκφρασης για την μισή ώρα μετά την ακτινοβολήση (αντιπροσωπευτικά όλων των χρονικών στιγμών).89

Σχήμα 3-19 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE21059. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Irradiated και control δειγμάτων που προέκυψε από δοκιμασία ANOVA για μία χρονική στιγμή (0.5h). Λήφθηκαν 2399 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια από όλες τις συγκρίσεις των διαφορετικών χρονικών στιγμών. Στη μισή ώρα μετά την ακτινοβολήση 1446 ήταν υποεκφρασμένα και 953 υπερεκφρασμένα.90

Σχήμα 3-20 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Irradiated vs Control GSE21059 με δοκιμασία ANOVA. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους. Έχουν χρησιμοποιηθεί οι τιμές έκφρασης για την μισή ώρα μετά την ακτινοβολήση (αντιπροσωπευτικά όλων των χρονικών στιγμών).91

Σχήμα 3-21 Venn διάγραμμα μεταξύ των δύο λιστών διαφορικών εκφρασμένων γονιδίων του συνόλου δεδομένων GSE21059. Παρατηρούμε ότι από τα 1254 και 2339 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια των συγκρίσεων Bystander vs Control και Irradiated vs Control αντίστοιχα, 1169 είναι ίδια. Αριστερά υποδεικνύονται τα 14 κομβικά γονίδια που είναι μοναδικά της σύγκρισης μεταξύ Bystander vs Control και Irradiated vs Control όπως προέκυψαν από την λειτουργική ανάλυση του εργαλείου BioInfoMiner.93

Σχήμα 3-22 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE55869. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Irradiated vs control (non-sham-irradiated) δειγμάτων για την χρονική στιγμή 4h.. Λήφθηκαν 47 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. 44 υποεκφρασμένα και 3 υπερεκφρασμένα95

Σχήμα 3-23 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE25772. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Irradiated vs control δειγμάτων για την χρονική στιγμή 4 ωρών μετά την ακτινοβολήση. Λήφθηκαν 271 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια από τα οποία 133 υποεκφρασμένα και 138 υπερεκφρασμένα.97

Σχήμα 3-24 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE25772. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Irradiated vs control δειγμάτων για την χρονική στιγμή 8 ωρών μετά την ακτινοβολήση. Λήφθηκαν 223 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια από τα οποία 116 υποεκφρασμένα και 107 υπερεκφρασμένα98

Σχήμα 3-25 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE25772. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Irradiated vs control δειγμάτων για την χρονική στιγμή 24 ωρών μετά την ακτινοβολήση. Λήφθηκαν 1977 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια από τα οποία 965 υποεκφρασμένα και 1012 υπερεκφρασμένα.98

Σχήμα 3-26 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE8993. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Bystander vs control (sham-irradiated) 0.12 Gy (microbeam 1c) δειγμάτων για την χρονική στιγμή 2 ωρών. Λήφθηκαν 1003 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. 578 υποεκφρασμένα και 425 υπερεκφρασμένα.102

Σχήμα 3-27 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE8993. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Bystander vs control (sham-irradiated) 0.12 Gy (microbeam 1c) δειγμάτων για την χρονική στιγμή 6 ωρών. Λήφθηκαν 796 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. 422 υποεκφρασμένα και 374 υπερεκφρασμένα102

Σχήμα 3-28 Πίνακας πλήθους στατιστικά σημαντικών γονιδίων σύγκρισης Bystander vs Control GSE8993103

Σχήμα 3-29 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Bystander vs Control GSE8993 στις 2h. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.104

Σχήμα 3-30 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Bystander vs Control GSE8993 στις 6h. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.105

Σχήμα 3-31 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE8993. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Irradiated vs control (sham-irradiated) 0.013 Gy (0.01D, broadbeam) δειγμάτων για την χρονική στιγμή 2 ωρών. Λήφθηκαν 1502 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. 703 υποεκφρασμένα και 799 υπερεκφρασμένα.106

Σχήμα 3-32 Πίνακας πλήθους στατιστικά σημαντικών γονιδίων σύγκρισης Irradiated vs Control GSE8993106

Σχήμα 3-33 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Irradiated vs Control GSE8993 στις 6h. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.107

Σχήμα 3-34 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Irradiated vs Control GSE8993 στις 6h. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.108

Σχήμα 3-35 Venn διάγραμμα σύγκρισης διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων που προέκυψαν από τις συγκρίσεις των Bystander vs Control των συνόλων δεδομένων GSE12435 και GSE18760. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.110

Σχήμα 3-36 Venn διάγραμμα σύγκρισης διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων που προέκυψαν από τις συγκρίσεις των Bystander vs Control των συνόλων δεδομένων GSE12435 και GSE18760. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.111

Σχήμα 3-37 Venn διάγραμμα σύγκρισης διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων που προέκυψαν από τις συγκρίσεις των Irradiated vs Control των συνόλων δεδομένων GSE12435 και GSE18760. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί

υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.112

Σχήμα 3-38 Venn διάγραμμα σύγκρισης διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων που προέκυψαν από τις συγκρίσεις των Bystander vs Control των συνόλων δεδομένων GSE12435, GSE18760 και GSE21059. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.113

Σχήμα 3-39 Πίνακας κοινών διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων (1 έως 8/26) μεταξύ των τριών συνόλων δεδομένων από την σύγκριση Bystander vs Control.114

Σχήμα 3-40 Πίνακας κοινών διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων (9 έως 16/26) μεταξύ των τριών συνόλων δεδομένων από την σύγκριση Bystander vs Control.114

Σχήμα 3-41 Θερμικό διάγραμμα 26 κοινών διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων από τις συγκρίσεις των Bystander vs Control από τα τρία σύνολα δεδομένων για το GSE21059. Έχει χρησιμοποιηθεί μέθοδος ομαδοποίησης Ward και μέτρησης αποστάσεων Euclidean. Με πράσινο παρατηρούμε ότι ομαδοποιούνται τα περισσότερα από τα Control.115

Σχήμα 3-42 Θερμικό διάγραμμα 26 κοινών διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων από τις συγκρίσεις των Bystander vs Control από τα τρία σύνολα δεδομένων για το GSE18760.. Έχει χρησιμοποιηθεί μέθοδος ομαδοποίησης Ward και μέτρησης αποστάσεων Euclidean. Με καφέ παρατηρούμε ότι ομαδοποιούνται μόνο τους τα Control.115

Σχήμα 3-43 Θερμικό διάγραμμα 26 κοινών διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων από τις συγκρίσεις των Bystander vs Control από τα τρία σύνολα δεδομένων για το GSE12435. Έχει χρησιμοποιηθεί μέθοδος ομαδοποίησης Ward και μέτρησης αποστάσεων Euclidean. Με καφέ παρατηρούμε ότι ομαδοποιούνται μόνο τους τα Control.116

Σχήμα 3-44 Θερμικό διάγραμμα 35/35 κομβικών γονιδίων από την σύγκριση των Bystander vs Control (GSE21059) για το 21059. Έχει χρησιμοποιηθεί μέθοδος ομαδοποίησης Ward και μέτρησης αποστάσεων Euclidean. Με ροζ παρατηρούμε ότι ομαδοποιούνται μόνο τους τα Control.117

Σχήμα 3-45 Θερμικό διάγραμμα 33/35 κομβικών γονιδίων από την σύγκριση των Bystander vs Control (GSE21059) για το GSE18760. Έχει χρησιμοποιηθεί μέθοδος ομαδοποίησης Ward και μέτρησης αποστάσεων Euclidean. Με ώχρα παρατηρούμε ότι ομαδοποιούνται μόνο τους τα Control.117

Σχήμα 3-46 Θερμικό διάγραμμα 34/35 κομβικών γονιδίων από την σύγκριση των Bystander vs Control (GSE21059) για το GSE12435. Έχει χρησιμοποιηθεί μέθοδος ομαδοποίησης Ward και μέτρησης αποστάσεων Euclidean. Με καφέ παρατηρούμε ότι ομαδοποιούνται μόνα τους τα Control.	118
Σχήμα 3-47 Venn διάγραμμα σύγκρισης διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων που προέκυψαν από τις συγκρίσεις των Irradiated vs Control των συνόλων δεδομένων GSE12435, GSE18760 και GSE21059. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.	119
Σχήμα 3-48 Venn διάγραμμα σύγκρισης μοναδικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων που προέκυψαν από τις συγκρίσεις των Bystander vs Control με τα Irradiated vs Control των συνόλων δεδομένων GSE12435, GSE18760 και GSE21059. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.	120
Σχήμα 4-1 Διάγραμμα Venn για την εύρεση των κοινών στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων των συγκρίσεων Bystander vs Control για τα σύνολα GSE18760, GSE12435 και GSE8993	134
Σχήμα 4-2 1 ^{ος} Πίνακας κοινών στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ των συνόλων δεδομένων GSE18760, GSE12435 και GSE8993 για την σύγκριση μεταξύ Bystander vs Control.....	135
Σχήμα 4-3 2 ^{ος} Πίνακας κοινών στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ των συνόλων δεδομένων GSE18760, GSE12435 και GSE8993 για την σύγκριση μεταξύ Bystander vs Control.....	135
Σχήμα 4-4 3 ^{ος} Πίνακας κοινών στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ των συνόλων δεδομένων GSE18760, GSE12435 και GSE8993 για την σύγκριση μεταξύ Bystander vs Control.....	136
Σχήμα 4-5 Πίνακας κοινών γονιδίων μεταξύ των συνόλων δεδομένων GSE18760, GSE12435, GSE8993 και GSE21059 για την σύγκριση μεταξύ Bystander vs Control.	137
Σχήμα 4-6 Λίστα γονιδίων βιβλιογραφικά συσχετισμένων με τα τοπικά φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης, που θεωρούνται μέρος των συστημικών δράσεων της ακτινοβολίας ³⁵	138

Σχήμα 4-7 Διαγράμματα Venn για την σύγκριση βιβλιογραφικά σχετιζόμενων γονιδίων με γονίδια που έχουν προκύψει από τις αναλύσεις εύρεσης στατιστικά σημαντικά, διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια μεταξύ Bystander vs Control που προέκυψαν από τα σύνολα δεδομένων GSE18760 & GSE12435.....138

Σχήμα 4-8 Διαγράμματα Venn για την σύγκριση βιβλιογραφικά σχετιζόμενων γονιδίων με γονίδια που έχουν προκύψει από τις αναλύσεις εύρεσης στατιστικά σημαντικά, διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια μεταξύ Bystander vs Control που προέκυψαν από τα σύνολα δεδομένων GSE8993.....139

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1-1: Πηγές ακτινοβολίας από το περιβάλλον	25
Εικόνα 1-2 Η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να παραχθεί από διάφορα σωματίδια όπως σωματίδια άλφα, σωματίδια B-, B+ , ατομικούς πυρήνες και με χρήση φωτονίων.....	27
Εικόνα 1-3 Οι βλάβες στο DNA που μπορούν να προκληθούν από την ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να είναι είτε άμεσες είτε έμμεσες. Όταν σωματίδια α ή β χτυπήσουν κατευθείαν στα άτομα του μπορούν να ‘σπάσουν’ τους δεσμούς μεταξύ των αζωτούχων βάσεων δημιουργώντας ‘κενά’ σημεία στην συνεχή αλυσίδα. Στην έμμεση δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας, σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου και υδρογόνου που επιδρούν στο DNA.	30
Εικόνα 1-4 Ανάλογα με την δόση και το σημείο που θα χτυπήσει η ιοντίζουσα ακτινοβολία δημιουργεί διαφορετικές αλλοιώσεις στη δίκλωνη έλικα του DNA. Σε αυτές εμπεριέχονται η διπλή θραύση της έλικας, η θραύση των υδρογονικών δεσμών, η απώλεια αζωτούχων βάσεων κλπ.	31
Εικόνα 1-5 Οι επιδράσεις των συστημικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειννίας της ΙΑ.....	35
Εικόνα 1-6 Πίνακας γονιδίων που έχουν συσχετισθεί με απόκριση στο οξειδωτικό στρες ⁹⁷	44
Εικόνα 1-7 Αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων λειτουργικής γονιδιωματικής GEO	57
Εικόνα 2-1 Σελίδα αναζήτησης συνόλων δεδομένων πειραμάτων μικροσυστοιχιών της βάσης λειτουργικής γονιδιωματικής GEO	59
Εικόνα 2-2 Πίνακας περιγραφής βασικών πληροφοριών για το κάθε σύνολο δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε. Περιγράφεται ο σωματιδιακός τύπος ιοντίζουσας ακτινοβολίας, ο χρόνος εξαγωγής του RNA από τα κύτταρα μετά την ακτινοβολήση τους, η δόση της ακτινοβολίας και τέλος η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για το κάθε πείραμα	60
Εικόνα 2-3 Κύριος σκελετός της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε για την βιοπληροφορική ανάλυση των συνόλων δεδομένων μικροσυστοιχιών	61
Εικόνα 2-4 Σελίδα εισαγωγής λιστών γονιδίων για την αναζήτηση κοινών σχέσεων, Venny. http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/	66
Εικόνα 2-5 Σελίδα εισαγωγής δεδομένων για την εύρεση οντολογιών Enrichr	69

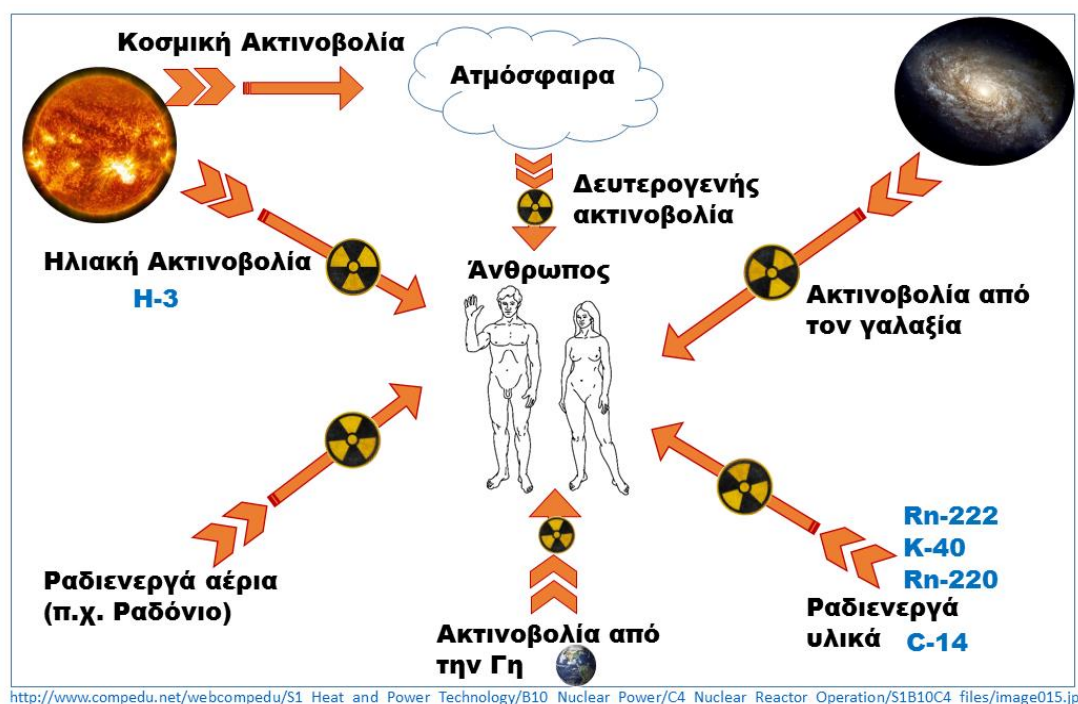
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιοντίζουσα ακτινοβολία

1.1.1 Περιβάλλον και ιοντίζουσα ακτινοβολία

Το γήινο περιβάλλον αποτελεί ένα μεγάλο πεδίο ακτινοβολίας που όχι μόνο περιέχει φυσικά ραδιενεργά ισότοπα αλλά δέχεται καθημερινά και μεγάλα ποσά κοσμικής ακτινοβολίας.

Στην εποχή μας η χρήση της ακτινοβολίας από διάφορα τεχνητά είδη πηγών έχει αυξήσει τα ποσοστά ακτινοβολήσης των ανθρώπων με δόσεις που φτάνουν ή και ξεπερνούν την μέση επιτρεπτή δόση ακτινοβολήσης ανά άτομο¹. Σήμερα, η βασικότερη αξιοποίηση της ακτινοβολίας περιλαμβάνει ιατρικές εφαρμογές, ιδιαίτερα στον τομέα διάγνωσης και θεραπείας. Για τον προσδιορισμό των βιολογικών μηχανισμών που επάγονται από την ακτινοβολήση ενός ατόμου είναι απαραίτητη η μελέτη των βιολογικών επιπτώσεων της ακτινοβολίας σε οργανισμούς μοντέλα και ιδιαίτερα στον άνθρωπο².



Εικόνα 1-1: Πηγές ακτινοβολίας από το περιβάλλον

1.1.2 Ιοντισμός

Ιοντισμός καλείται η διαδικασία στην οποία ένα άτομο ή ένα μόριο αποκτά αρνητικό ή θετικό φορτίο μέσω της οριστικής απομάκρυνσης ή πρόσδεσης ενός ηλεκτρονίου για το σχηματισμό ιόντος. Από την στιγμή την απομάκρυνσής του ηλεκτρονίου δεν ασκείται καμία ελκτική δύναμη από τον πυρήνα του ατόμου. Για την απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου χρειάζεται ενέργεια μεγαλύτερη από την αρνητική δυναμική του ενέργεια, η οποία ονομάζεται ενέργεια ιοντισμού. Με την απελευθέρωση του ηλεκτρονίου σχηματίζονται ένα κατιόν και ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο τα οποία ονομάζονται συνολικά ζεύγος ιόντων. Ο σχηματισμός ανιόντος προκύπτει όταν ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο συγκρούεται με ένα άτομο και στην συνέχεια παγιδεύεται στο ηλεκτροστατικό του πεδίο απελευθερώνοντας οποιαδήποτε διαφορά ενέργειας³.

1.1.3 Δράσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Ιοντίζουσα ακτινοβολία ορίζεται η ακτινοβολία που μεταφέρει αρκετή ενέργεια για την απελευθέρωση ηλεκτρονίων από άτομα ή μόρια αλλά και κάθε ακτινοβολία που έχει την ιδιότητα να προκαλεί ιοντισμό των ατόμων στο μέσο το οποίο διέρχεται. Αποτελείται από ενεργειακά φορτισμένα υποατομικά σωματίδια, ιόντα ή/και άτομα που κινούνται σε υψηλές ταχύτητες (μεγαλύτερες της ταχύτητας του φωτός) καθώς επίσης και από ηλεκτρομαγνητικά κύματα υψηλής ενέργειας που ανήκουν στο άκρο του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Διαιρείται σε διάφορες υποκατηγορίες ανάλογα με την φύση των σωματιδίων που δημιουργούν το φαινόμενο ιοντισμού και ανάλογα με την δράση της κατηγοριοποιείται σε άμεση και έμμεση¹.

Η άμεση δράση της προκύπτει από την άμεση καταστροφή δεσμών και άλλων βλαβών λόγω της εναπόθεσης πρωτογενούς ενέργειας από τα φορτισμένα σωματίδια ή φωτόνια που μπορούν να ιονίσουν άτομα και επομένως να προκαλέσουν δευτερογενώς την παραγωγή ηλεκτρονίων και άλλων δραστικών μορίων (έμμεση δράση). Στα σωματίδια που μπορούν να προκαλέσουν ΙΑ ανήκουν ατομικοί πυρήνες, ηλεκτρόνια, αντιηλεκτρόνια και ενεργειακά φορτισμένοι πυρήνες απογυμνωμένοι από τα ηλεκτρόνια τους. Όταν κινούνται σε σχετικιστικές ταχύτητες τα σωματίδια αυτά έχουν αρκετή κινητική ενέργεια για να προκαλέσουν ιοντισμό⁴. Η κοσμική ακτινοβολία αποτελείται κυρίως από σχετικιστικά πρωτόνια αλλά και από μεγαλύτερης μάζας πυρήνες όπως είναι τα ιόντα ηλίου και τα ιόντα υψηλού ατομικού αριθμού και ενέργειας (high atomic number and energy, HZE)⁵.

1.1.4 Τύποι σωματιδίων ιοντίζουσας ακτινοβολίας.



Εικόνα 1-2 Η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να παραχθεί από διάφορα σωματίδια όπως σωματίδια άλφα, σωματίδια B⁻, B⁺, ατομικούς πυρήνες και με χρήση φωτονίων.

Ως παράδειγμα ατομικού πυρήνα για την παραγωγή ΙΑ είναι τα σωματίδια άλφα που αποτελούνται από δύο πρωτόνια και δύο νετρόνια συνδεδεμένα με ένα πυρήνα, πανομοιότυπο με εκείνον του πυρήνα ηλίου. Παράγονται κατά την διαδικασία της διάσπασης «άλφα», αλλά γίνεται επίσης να παραχθούν και με άλλους τρόπους. Είναι μια ιδιαίτερα ιοντίζουσα μορφή ακτινοβολίας με μικρό βάθος διείσδυσης. Όταν ένα στοιχείο εκπέμπει ένα σωματίδιο α, ο μαζικός του αριθμός μειώνεται κατά 4 ενώ ο ατομικός του αριθμός κατά 2⁶. Λόγω της μικρής εμβέλειας της απορρόφησης και της αδυναμίας να διεισδύσουν στα εξωτερικά στρώματα του δέρματος, τα σωματίδια άλφα, δεν είναι γενικά επικίνδυνα για την ζωή εκτός εάν υπάρξει κατάποση ή εισπνοή⁷. Σε αυτές τις περιπτώσεις η βλάβη στα χρωμοσώματα από σωματίδια άλφα μπορεί να είναι 10 με 1000 φορές μεγαλύτερη από εκείνη που προκαλείται από μία ισοδύναμη ποσότητα γάμμα ή βήτα ακτινοβολίας. Στην ιατρική η ακτινοβολία των α σωματιδίων εμποδίζεται μέσω της χρήσης ειδικών φίλτρων, ώστε να μην προκληθεί βλάβη⁸.

Τα σωματίδια βήτα είναι ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας ή ποζιτρόνια υψηλής ταχύτητας που εκπέμπονται από ορισμένους τύπους ραδιενεργών πυρήνων όπως Κάλιο-40. Παράγονται μέσω διάσπασης β η οποία διαχωρίζεται σε δύο μορφές, β⁻ και β⁺ και ανάλογα με την μορφή της προκύπτει είτε ηλεκτρόνιο είτε ποζιτρόνιο. Η ακτινοβολία σωματιδίων βήτα παρουσιάζει μέση διεισδυτική δύναμη και ιοντίζουσα

δύναμη. Τα περισσότερα β σωμάτια (ανάλογα με το υλικό από το οποίο έχουν προκύψει) μπορούν να απορροφηθούν από μερικά χιλιοστά αλουμινίου⁹. Όταν διέρχεται από ύλη, ένα σωματίδιο β επιβραδύνεται από ηλεκτρομαγνητικές αλληλεπιδράσεις και μπορεί να εκπέμψει ακτινοβολία πέδησης X. Ακτινοβολία πέδησης X είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που παράγεται από την επιβράδυνση ενός φορτισμένου σωματιδίου, όταν αυτό εκτρέπεται από ένα άλλο φορτισμένο σωματίδιο, όπως συνήθως ενός ηλεκτρονίου από έναν ατομικό πυρήνα. Το κινούμενο σωματίδιο χάνει κινητική ενέργεια, η οποία μετατρέπεται σε φωτόνιο, ικανοποιώντας έτσι το νόμο της διατήρησης της ενέργειας¹⁰⁻¹².

Παρόλο που τα φωτόνια έχουν ουδέτερο φορτίο, μπορούν να προκαλέσουν ιοντισμό μέσω του φωτοηλεκτρικού φαινομένου και του φαινομένου Compton. Και στα δύο φαινόμενα η αλληλεπίδραση που θα δημιουργηθεί οδηγεί στην απελευθέρωση ενός ηλεκτρονίου, σχηματίζοντας ένα β-σωματίδιο που θα ιονίσει άλλα άτομα. Η ακτινοβολία φωτονίων ονομάζεται γ-ακτινοβολία εάν δημιουργείται από πυρηνική αντίδραση, υποατομική διάσπαση ή ραδιενεργή διάσπαση στον πυρήνα του ατόμου. Σε διαφορετική περίπτωση ονομάζεται ακτινοβολία X όταν δημιουργείται εκτός του πυρήνα. Οι ακτίνες X έχουν μικρότερη ενέργεια από τις γ αλλά και οι δύο έχουν εξαιρετικά υψηλή συχνότητα και αποτελούνται από υψηλής ενέργειας φωτόνια¹³. Αμφότερα τα δύο είδη ακτινοβολίας οδηγούν σε πολλαπλά προβλήματα υγείας λόγω της υψηλής δεισδυτικότητάς τους¹⁴.

1.1.5 Θεραπευτική χρήση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Θεραπευτικά στην ιατρική, η ΙΑ χρησιμοποιείται ως επαγωγέας αποπτωτικών μηχανισμών για την έμμεση ή την άμεση θανάτωση των καρκινικών κυττάρων (έμμεση μέσω της ενεργοποίησης διαφόρων μοριακών μηχανισμών απόπτωσης και άμεση μέσω επαγωγής θερμικού στρες). Η διεθνής μονάδα δόσης που χρησιμοποιείται από το 1975 στο σύστημα S.I. είναι το gray(Gy). $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$ και ορίζεται ως μονάδα η απορρόφηση και όχι η έκθεση στην ακτινοβολία επειδή η επίδραση της ακτινοβολίας στα σώματα εξαρτάται από την ενέργεια που απορρόφησαν και όχι από εκείνη στην οποία εκτέθηκαν¹⁵.

Η ΙΑ σωματιδίων β- χρησιμοποιείται κυρίως σε αντικαρκινικές θεραπείες (θεραπευτική ακτινολογία), όπως για οφθαλμολογικούς καρκίνους και οστεοσαρκώματα. Η ΙΑ σωματιδίων β+ (ποζιτρονίων) χρησιμοποιείται στη διαγνωστική νευρολογία και ογκολογία μέσω του τομογράφου εκπομπής ποζιτρονίων PET και SPECT^{16,17}. Οι

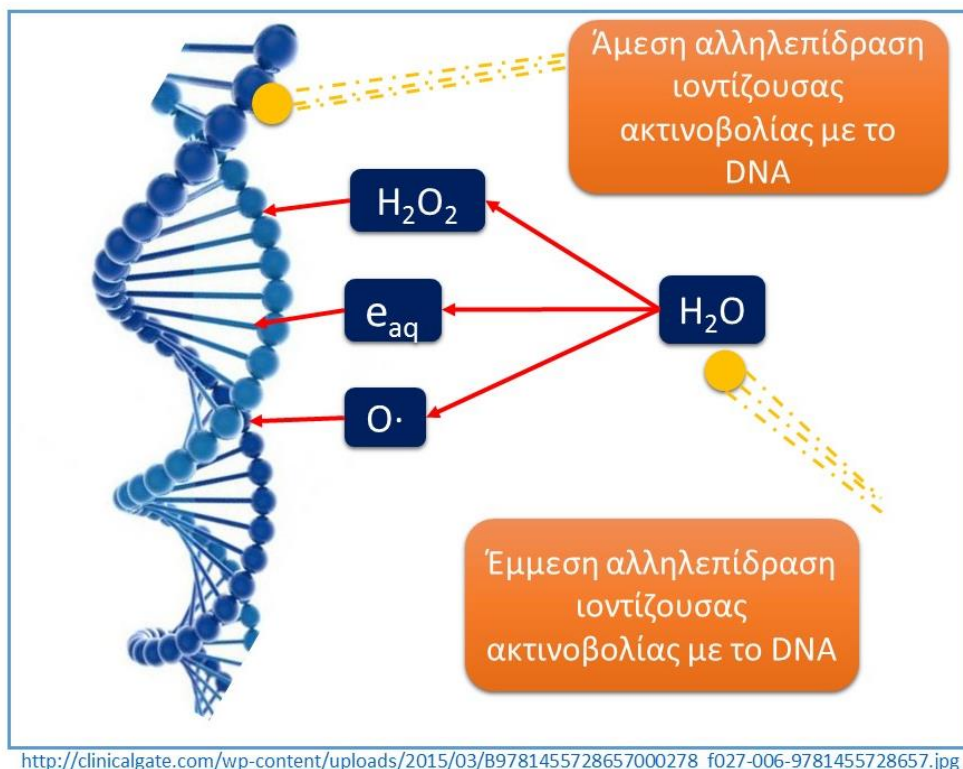
ακτίνες Χ χρησιμοποιούνται στην θεραπευτική ιατρική για την θεραπεία καρκίνου του δέρματος, εγκεφάλου, πνεύμονα, προστάτη κλπ¹⁸.

1.1.6 Επιδράσεις της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στην έμβια ύλη.

Είναι σαφές σύμφωνα με τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα ότι η ΙΑ είναι επιβλαβής και δυνητικά θανατηφόρα για την έμβια ύλη ενώ μπορεί να ωφελήσει σε ορισμένες περιπτώσεις για την θεραπεία του καρκίνου. Τα περισσότερα αποτελέσματα των ανεπιθύμητων επιπτώσεων της ακτινοβολίας στην υγεία μπορούν να χωριστούν στις παρακάτω κατηγορίες:

- Αιτιοκρατικά αποτελέσματα (επιβλαβείς επιδράσεις στους ιστούς) που οφείλονται κυρίως στη θανάτωση ή δυσλειτουργία των κυττάρων μετά από υψηλές δόσεις.
- Στοχαστικά αποτελέσματα όπως είναι ο καρκίνος σε άτομα που έχουν εκτεθεί λόγω μεταλλάξεων στα σωματικά τους κύτταρα ή λόγω κληρονομήσιμων ασθενειών στους απογόνους που έχουν προκύψει από μεταλλάξεις στα γαμετικά κύτταρα¹⁹.

Οι πιο κοινές επιπτώσεις ΙΑ είναι τα στοχαστικά αποτελέσματα (σχηματισμού καρκίνου) με λανθάνουσα περίοδο μερικών χρόνων ή και δεκαετιών μετά την έκθεση σε αυτή. Επίσης άλλες στοχαστικές επιπτώσεις είναι η τερατογένεση και οι καρδιακές παθήσεις^{14,20–22}.



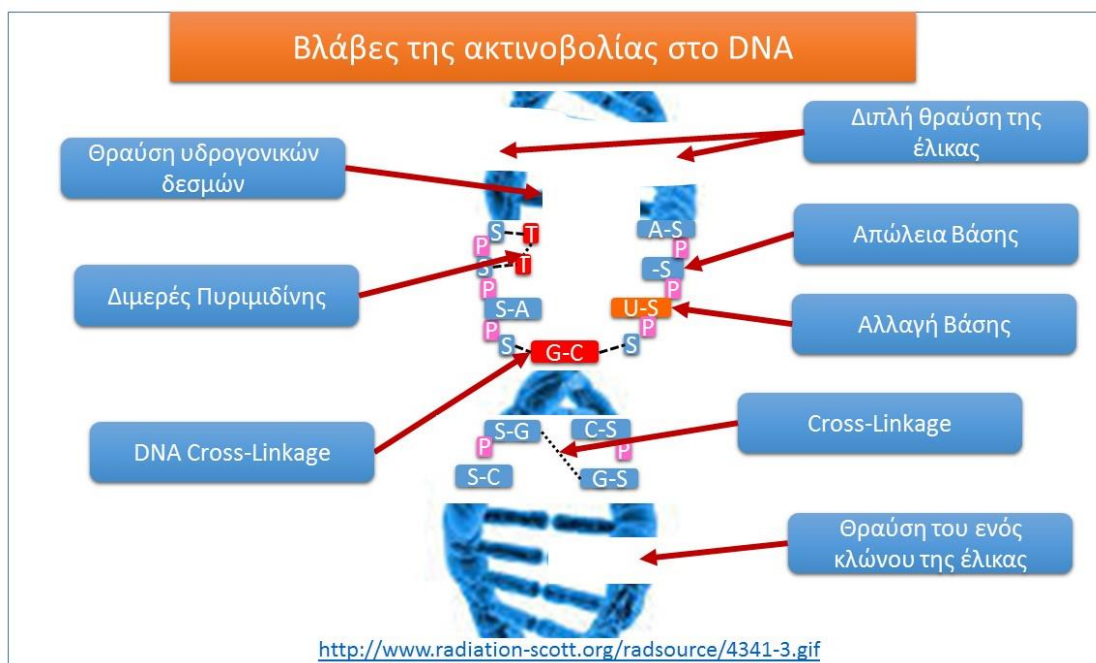
Εικόνα 1-3 Οι βλάβες στο DNA που μπορούν να προκληθούν από την ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να είναι είτε άμεσες είτε έμμεσες. Όταν σωματίδια α ή β χτυπήσουν κατευθείαν στα άτομα του μπορούν να ‘σπάσουν’ τους δεσμούς μεταξύ των αζωτούχων βάσεων δημιουργώντας ‘κενά’ σημεία στην συνεχή αλυσίδα. Στην έμμεση δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας, σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου και υδρογόνου που επιδρούν στο DNA.

Η ενέργεια που απορροφούν τα κύτταρα όταν εκτεθούν σε ΙΑ προκαλεί αλλοιώσεις στα μόρια τους που μπορεί να οδηγήσουν στην θραύση τους. Επειδή στα κύτταρα τα μόρια του ύδατος αποτελούν την συντριπτική πλειονότητα, όταν ακτινοβοληθούν υπάρχει μεγάλη πιθανότητα η ενέργεια της ακτινοβολίας, ή μέρος, να απορροφηθεί από μόρια ύδατος²³. Τότε, αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία φαινομένων θραύσης των μορίων νερού και τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών υδροξυλίου και υδρογόνου.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι εξαιρετικά δραστικές και αντιδρούν με παρακείμενα μόρια τα οποία μεταβάλλονται επίσης σε ελεύθερες ρίζες. Εάν αλληλεπιδράσουν με οργανικά μόρια τότε μπορούν να προκύψουν ελεύθερες ρίζες που αντιδρούν ευκολότερα με άλλα οργανικά μόρια με αποτέλεσμα τον συνεχή σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Θεωρείται ότι η ΙΑ έχει μικρή πιθανότητα να δράσει με ένα εξειδικευμένο μόριο του κυττάρου (πχ μόριο ενζύμου, μόριο DNA) σε σχέση με την πιθανότητα να αντιδράσει με κάποιο μόριο ύδατος, με αποτέλεσμα η πιθανότητα σχηματισμού ελευθέρων ριζών να είναι πολύ μεγαλύτερη²³. Έτσι οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με εξειδικευμένα μόρια

του κυττάρου και να προκαλέσουν αλλοιώσεις στην δομή του και κατ' επέκτασιν στην λειτουργία του.

Συμπερασματικά, ο κύριος μηχανισμός δράσης της ΙΑ, ειδικά ακτινοβολιών όπως Χ-, γ κλπ. βασίζεται στην απορρόφηση ενέργειας από μόρια ύδατος μέσα στο κύτταρο, προκαλώντας την διάσπαση χημικών δεσμών και τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών, με αποτέλεσμα την αλλοίωση της δομής και λειτουργίας των εξειδικευμένων μορίων του κυττάρου²⁴.



Εικόνα 1-4 Ανάλογα με την δόση και το σημείο που θα χτυπήσει η ιοντίζουσα ακτινοβολία δημιουργεί διαφορετικές αλλοιώσεις στη δίκλωνη έλικα του DNA. Σε αυτές εμπεριέχονται η διπλή θραύση της έλικας, η θραύση των υδρογονικών δεσμών, η απώλεια αζωτούχων βάσεων κλπ.

Οι σημαντικότερες αλλοιώσεις που μπορούν να προκαλέσουν πολλαπλές συνέπειες για ένα κύτταρο γίνονται είτε στο μόριο του DNA, είτε στις δομικές πρωτεΐνες/ένζυμα των μεμβρανών του. Το πιο ευπαθές τμήμα του DNA είναι οι αζωτούχες βάσεις της πυριμιδίνης(C,T). Ο λόγος είναι ότι αντιδρούν εύκολα με τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου προς το σχηματισμό ελεύθερων οργανικών ριζών. Ως αποτέλεσμα αυτού είναι η εμφάνιση κενών αζωτούχων βάσεων στο δίκλωνο μόριο του DNA ή και η συγκέντρωση μόνιμων αλλοιώσεων οι οποίες κληρονομούνται μέσω του αναδιπλασιασμού του μορίου DNA. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να προκύψουν χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, ελλείψεις κλπ^{25,26}.

Στην περίπτωση αλλοιώσεων σε πρωτεΐνες ή ένζυμα φαίνεται ότι το πιο ευπαθές τμήμα τους είναι ο πεπτιδικός δεσμός, ο οποίος είναι ευαίσθητος στη δράση των

ελεύθερων ριζών με αποτέλεσμα την αποκοπή ενός τμήματος της πρωτεΐνης και σε μετατροπή ή αδρανοποίηση της λειτουργίας της. Τα μη λειτουργικά μόρια πρωτεϊνών μπορούν να αποικοδομηθούν σχετικά γρήγορα από συγκεκριμένους μηχανισμούς του κυττάρου και στην συνέχεια να παραχθούν νέα φυσιολογικά προϊόντα από τους βιοσυνθετικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Αντίθετα, οι βλάβες του DNA, ενώ υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί για την αποκατάσταση των αλλοιώσεων, όπου δεν διορθωθούν θα έχουν πολύ μεγάλο αντίκτυπο στο κύτταρο²⁷.

Πρόσφατες ερευνητικές μελέτες^{28–30} έδειξαν ότι η ΙΑ δεν επηρεάζει μόνο τα κύτταρα που έχουν ακτινοβοληθεί αλλά και μη ακτινοβολημένα παρακείμενα κύτταρα (radiation induced bystander effects). Επίσης, παρατηρούνται φαινόμενα μη στοχευμένων επιδράσεων (non-targeted effects) σε κύτταρα άλλων οργάνων πολύ απομακρυσμένα από τα ακτινοβολημένα. Η παρατήρηση αυτών των συστημικών φαινομένων οδηγεί στην ανάπτυξη της έρευνας των επιδράσεων της ΙΑ σε περαιτέρω στάδια με μια διαφορετική οπτική, αυτή της συστημικής βιολογίας.

1.2 Βιολογία Συστημάτων

1.2.1 Θεωρία Βιολογίας Συστημάτων

Ένας πρόσφατος τομέας της Βιολογίας είναι η Βιολογία Συστημάτων που χρησιμοποιεί ως γενική ιδέα την εξήγηση διάφορων βιολογικών φαινομένων χρησιμοποιώντας τη θεωρία των συστημάτων. Η θεωρία συστημάτων είναι ένα διεπιστημονικό πεδίο που μελετά την φύση των συστημάτων, από το απλό στο σύνθετο. Στοχεύει στο να αναπτύξει διεπιστημονικά θεμέλια που εφαρμόζονται σε διάφορους τομείς, όπως η μηχανική, βιολογία, ιατρική και οι κοινωνικές επιστήμες³¹. Η χρήση αυτής της θεωρίας έχει δώσει νέες ιδέες για την κατανόηση των διάφορων δομών και λειτουργιών των κυττάρων και συνολικά του προς μελέτη οργανισμού. Σε αντίθεση με τον παλαιότερο τρόπο έρευνας μεμονωμένων βιομορίων, η μελέτη έχει μεταφερθεί σε ολόκληρες ομάδες βιομορίων, τα οποία βιομόρια αλληλεπιδρούν συνεργιστικά για την πραγματοποίηση διαφόρων βιολογικών λειτουργιών³² πχ. το σύστημα ουβικιτίνης- πρωτεασώματος.

Για την ανάλυση ενός βιολογικού φαινομένου η πειραματική διαδικασία που ακολουθούνταν μέχρι τώρα ήταν πολύ εξειδικευμένη σε συγκεκριμένες πτυχές του βιολογικού φαινομένου. Ως αποτέλεσμα αυτού, πολλές βιολογικές λειτουργίες παρέμεναν άγνωστες ή έχοντας διάσπαρτα ευρήματα χρησιμοποιούνταν μόνο υποθέσεις και θεωρίες οι οποίες οδηγούσαν σε λανθασμένα συμπεράσματα, λόγο

ελλιπών στοιχείων, με αποτέλεσμα την σπατάλη πόρων σε έρευνες που οδηγούσαν στην διάψευσή τους. Αυτό το κενό έλλειψης πληροφοριών ξεκίνησε να το καλύπτει η Βιολογία Συστημάτων. Οι τεχνολογίες που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια για τις ποσοτικές μετρήσεις βιολογικών παραγόντων έχουν εξελιχθεί σε ακρίβεια, ταχύτητα και πιστότητα συνδράμοντας στην ανάπτυξη της συστημικής βιολογίας. Με την χρήση μαθηματικών θεωριών και τη δημιουργία υπολογιστικών μοντέλων, η συστημική βιολογία δίνει λύσεις για το σύνολο των λειτουργιών ενός βιολογικού φαινομένου, οδηγώντας στην ενίσχυση ή την κατάρριψη παλαιότερων θεωριών όπως επίσης και στην ανακάλυψη νέων βιολογικών λειτουργιών³³.

1.2.2 Κλάδοι Βιολογίας Συστημάτων

Η Βιολογία Συστημάτων χρησιμοποιεί την γνώση διαφορετικών επιστημονικών πεδίων για τη δόμηση και την ενίσχυση ή την κατάρριψη θεωριών. Μέσω της αποτελεσματικής συνεργασίας επιστημόνων από τα πεδία της βιολογίας, των μαθηματικών, της φυσικής και της πληροφορικής, μπορεί να ολοκληρωθεί η έρευνα για κάθε βιολογικό ερώτημα. Η διαφορά έγκειται στο ότι δεν ερμηνεύεται το βιολογικό φαινόμενο με απλή συσχέτιση υποκατηγοριών, αλλά όλες οι πληροφορίες που παράγονται δομούν ένα βιολογικό σύστημα. Οι κλάδοι που συνεργάζονται στη Βιολογία Συστημάτων είναι η Γενωμική, η Επιγενετική, η Μεταγραφομική, η Πρωτεομική και η Μεταβολομική. Επιπρόσθετα, τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ένας τομέας της Συστημικής Βιολογίας που ασχολείται με τον καρκίνο, ο οποίος λειτουργεί με συγκεκριμένα δεδομένα και εργαλεία. Ως μακροπρόθεσμο στόχο έχει τη βελτίωση της διάγνωσης του καρκίνου, την καλύτερη ταξινόμηση του, την πιο εύστοχη προτεινόμενη θεραπεία του και τελικά την εξατομικευμένη θεραπεία ανάλογα με τον ασθενή³⁴.

1.3 Συστημικά βιολογικά φαινόμενα

1.3.1 Ορισμός συστημικών φαινομένων

Συστημικά φαινόμενα είναι οι επιδράσεις που συμβαίνουν σε συγκεκριμένο ιστό, όργανο, ή κάποια πιο εξειδικευμένη περιοχή ενός οργανισμού (π.χ. αμφιβληστροειδής του ματιού) και μπορούν να μεταδοθούν στους γειτονικούς ιστούς, όργανα κλπ. ή και σε όλο τον οργανισμό, επηρεάζοντας απομακρυσμένα όργανα ή ιστούς³⁵.

1.3.2 Καρκίνος και συστημικά φαινόμενα

Τις τελευταίες δεκαετίες η χρήση της ακτινοβολίας για την θεραπεία του καρκίνου έχει αναπτυχθεί και μελετηθεί αρκετά, εμφανίζοντας τις αρνητικές της επιδράσεις μέσω

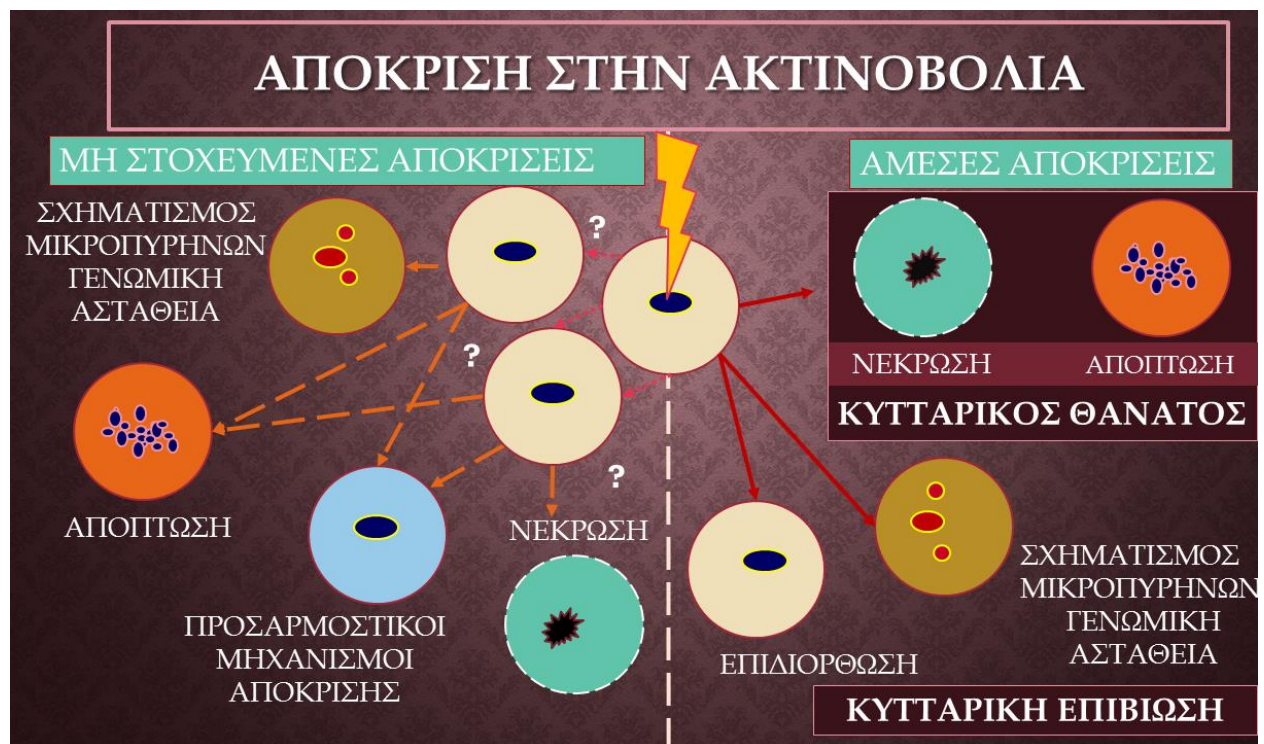
κάποιων συστημικών φαινομένων που θα αναλυθούν στην συνέχεια. Ο καρκίνος είναι μία συστημική νόσος που αναπτύσσεται σε τοπικό επίπεδο και διαθέτει την ικανότητα να κάνει μεταστάσεις σε διάφορα όργανα του σώματος. Η ακτινοθεραπεία έχει ως σκοπό να πετύχει την βέλτιστη δόση έτσι ώστε να καταστρέψει τα κύτταρα του όγκου αλλά και να έχει την ελάχιστη επίδραση στα γύρω φυσιολογικά κύτταρα. Επιδρά στο καρκίνο μέσω της μεταφοράς υψηλής ενέργειας ακτινοβολίας στα καρκινικά κύτταρα και δημιουργώντας θραύσεις στο DNA. Τις τελευταίες δεκαετίες χρησιμοποιούνται ακτινοβολίες υψηλής και χαμηλής γραμμικής μεταφοράς ενέργειας με διαφορετικού τύπου σωματίδια, για την θανάτωση των καρκινικών κυττάρων³⁶⁻³⁸. Ωστόσο, η χρήση της ακτινοβολίας για την θεραπεία του καρκίνου περιλαμβάνει την έκθεση φυσιολογικών κυττάρων σε τοξικές ακτινοβολίες όπως επίσης και σε δευτερογενείς παράγοντες που οδηγούν σε βιολογικές βλάβες. Έτσι σχηματίζονται φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης που θεωρούνται μέρος των συστημικών δράσεων της ακτινοβολίας (Radiation Induced Bystander Effects).

1.3.3 Ανακάλυψη των συστημικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης επαγόμενων από ακτινοβολημένα κύτταρα με ιοντίζουσα ακτινοβολία

Ο όρος «bystander effect», φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης, προέρχεται από την επιστημονική βιβλιογραφία που σχετίζεται με την γονιδιακή θεραπεία. Ειδικότερα ο όρος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1993 ως τοπικά φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης (local bystander effect), το οποίο φαινόμενο συσχετίστηκε με την ολική καταστολή του αναδιπλασιασμού καρκινικών κυττάρων, παρόλο που μόνο ένα μικρό ποσοστό από το συνολικό πληθυσμό τους ήταν ευαίσθητα στην αντικαρκινική θεραπεία³⁹. Όμως, ένα χρόνο πριν, το 1992 είχαν παρατηρηθεί φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης σε κύτταρα ωοθηκών ινδικών χοιριδίων, τα οποία είχαν ακτινοβοληθεί κατά την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου με σωματίδια άλφα με πολύ χαμηλή δόση ακτινοβολίας (0.31mGy). Το αποτέλεσμα ήταν να παρουσιαστούν αυξημένα ποσοστά ανταλλαγής αδελφών χρωματίδων στο 30% των κυττάρων, παρόλο που λιγότερο από το 1% των πυρήνων είχε χτυπηθεί από σωματίδια άλφα. Αυτή η ανακάλυψη υποδήλωσε την ύπαρξη έμμεσων δευτερογενών φαινομένων της ακτινοβολίας προς φυσιολογικά κύτταρα⁴⁰.

Επιστημονικές μελέτες προσδιόρισαν τη ύπαρξη παραγόντων που εκκρίνονται από τα ακτινοβολημένα κύτταρα, οι οποίοι συμβάλλουν στην εκδήλωση οξειδωτικού στρες στα περιβάλλοντα μη ακτινοβολημένα κύτταρα. Τα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης (bystander effects) που θεωρούνται μέρος των συστημικών δράσεων της

ακτινοβολίας, έχουν συνδεθεί με βιολογικά φαινόμενα όπως κυτταρικός θάνατος και απόπτωση⁴¹, οξειδωτικό στρες, αλλαγές έκφρασης microRNA, δημιουργία μικροπυρήνων⁴², γονιδιακή αστάθεια⁴³ και επαγωγή βλαβών του DNA⁴⁴. Έχουν παρατηρηθεί σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών πληθυσμών και βιολογικών παθολογικών σημείων (biological end point) (Βλάβες στο DNA, χρωμοσωμικές ανωμαλίες, κυτταρικός θάνατος, μεταλλάξεις)⁴⁵. Επίσης υπάρχουν αναφορές άλλων συνεπειών όπως, αυξημένος πολλαπλασιασμός των κυττάρων⁴⁶ και απελευθέρωση αναστολέων αυξητικών παραγόντων⁴⁷. Ακόμη έχει αναφερθεί ότι τα παρακείμενα κύτταρα είναι πιο ανθεκτικά στην ακτινοβολία από κύτταρα που δεν έχουν εκτεθεί σε τέτοια σήματα⁴⁸. Έτσι φαίνεται ότι υπάρχουν τόσο επιβλαβή όσο και προστατευτικά σήματα που επάγουν αυτά τα φαινόμενα στο γενικό πεδίο επιδράσεων. Παρατηρείται ότι αντικατοπτρίζουν την ισορροπία μεταξύ του είδους των σημάτων και των αποκρίσεων που προκαλούν στους κυτταρικούς πληθυσμούς, τα οποία μπορεί να επηρεάζονται τόσο από τον τύπο όσο και από τον γονότυπο των κυττάρων. Στις μέρες μας υπάρχει η διαπιστωμένη θεωρία σχετικά με τις πιθανές επιπτώσεις των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης για το ρόλο τους στην εμφάνιση, διατήρηση και ανθεκτικότητα του καρκίνου αν και δεν είναι επαρκώς κατανοητοί οι μηχανισμοί που έχουν ρόλο σε αυτά τα φαινόμενα.



Εικόνα 1-5 Οι επιδράσεις των συστημικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ

1.3.4 Κατηγοριοποίηση των τοπικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης που θεωρούνται μέρος των συστημικών δράσεων της ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Τα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης είναι πολύπλοκα, καθώς οι φυσικές και βιολογικές παράμετροι που τα χαρακτηρίζουν δεν έχουν ακόμη πλήρως προσδιοριστεί και επίσης φαίνεται να κατηγοριοποιούνται σε τρεις διαφορετικές κλάσεις φαινομένων. Οι κλάσεις αυτές διαφοροποιούνται ανάλογα με τον τύπο, την δόση ακτινοβολίας και εξαρτώνται από τον τρόπο έκθεσης στην ακτινοβολία.

Στην πρώτη κλάση ανήκουν τα τοπικά φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης (bystander effects) προκαλούνται από ακτινοβολία αρκετά χαμηλής δόσης και παρατηρούνται σε γειτονικά κύτταρα που δεν έχουν ακτινοβοληθεί. Στις χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας δεν μπορεί να γίνει μεγάλη απόθεση ενέργειας στα κύτταρα που έχουν ακτινοβοληθεί διαφοροποιώντας την απόκριση τους. Η έκθεση μπορεί να προέρχεται από φυσική περιβαλλοντική ακτινοβολία, σωματικό έλεγχο με ακτίνες Χ, έκθεση σε ραδιονουκλείδια για απεικόνιση ή θεραπευτικούς σκοπούς, ή επίσης έκθεση στην ακτινοβολία του διαστήματος.

Τα φαινόμενα της δεύτερης κλάσης χαρακτηρίζονται ως Abscopal. Ο όρος Abscopal χρησιμοποιείται για τα φαινόμενα που προκαλούνται από την ακτινοβολία σε μη ακτινοβολημένους ιστούς. Σε αυτά τα φαινόμενα δεν υπάρχουν περιορισμοί στην ποσότητα της δόσης ακτινοβολίας παρόλο που η έκθεση περιορίζεται σε συγκεκριμένο σημείο του ιστού. Παρατηρούνται επιδράσεις σε διαφορετικούς ιστούς που δύναται να μην έχουν άμεση επαφή με τον ακτινοβολημένο ιστό.

Η τρίτη κλάση περιλαμβάνει τα φαινόμενα που χαρακτηρίζονται ως 'cohort'. Αυτά τα φαινόμενα παρατηρούνται μετά από ολική ή μερική έκθεση σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας και θεωρείται ότι προκαλούν την έναρξη σηματοδότησης απόκρισης στην ακτινοβολία. Τα φαινόμενα cohort παρατηρούνται στην αξονική τομογραφία, ακτινοθεραπεία ή σε συμβάντα με υψηλή ακτινοβολία πχ. ακτινοβολία από έκρηξη πυρηνικού αντιδραστήρα⁴⁹.

1.3.5 Διερεύνηση τοπικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ (radiation induced bystander effects)

Αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για την διερεύνηση των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης. Στα περισσότερα *in vitro* πειράματα σε κυτταρικές σειρές έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα φορτισμένα σωματίδια, διαφόρων

τύπων ενέργειας, όπως σωματίδια α, ιόντα άνθρακα, σωματίδια β, κλπ. Για την ακτινοβολήση μόνο ενός κλάσματος των κυττάρων για την δημιουργία των συστημικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι τρόποι, όπως χρήση μιας ευρείας δέσμης σε δόσεις αρκετά χαμηλές έτσι ώστε να ακτινοβοληθεί ένα μόνο κλάσμα κυττάρων⁴⁰, μερική θωράκιση της καλλιέργειας των κυττάρων⁵⁰ ή χρήση μικροδέσμης ακτινοβολίας⁵¹.

Η ευρεία δέσμη σωματιδίων άλφα επιτρέπει την δημιουργία τυχαίων ακτινοβολημένων κυττάρων στην καλλιέργεια, όπου η ποσότητα τους μπορεί να διαμορφωθεί από την παρεχόμενη δόση. Μέσω της παραπάνω διαδικασίας λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με την εξάρτηση μεταξύ του ποσοστού ακτινοβολημένων κυττάρων και της δημιουργίας φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης⁴⁰.

Η χρήση της μερικής θωράκισης (μερική κάλυψη της καλλιέργειας με φύλλο αλουμινίου για την ύπαρξη μη ακτινοβολημένων κυττάρων) δίνει την δυνατότητα έρευνας όσον αφορά την απόσταση της διάδοσης του σήματος από ακτινοβολημένα προς μη ακτινοβολημένα κύτταρα⁵⁰.

Η πιο γνωστή προσέγγιση για την διερεύνηση των τοπικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης γίνεται με τη χρήση των μικροδεσμών ακτινοβολίας. Έτσι γίνεται ακριβή στόχευση περιοχής του κυττάρου προς ακτινοβολήση, όπως επίσης και συγκεκριμένης δόσης ακτινοβολίας ή σωματιδίων σε μεμονωμένα κύτταρα επιτρέποντας την εκτίμηση της βλάβης από κύτταρο σε κύτταρο, αποφεύγοντας στατιστικές αβεβαιότητες που περιέχονται στην χρήση ευρείας δέσμης ακτινοβολίας.

Με την χρήση της μικροδέσμης για την ακτινοβολήση του κυτταροπλάσματος γίνεται διερεύνηση για την επίδραση της στην επαγωγή των μεταλλάξεων. Εξαιτίας της μικρότερης θνησιμότητας των κυττάρων⁵², έχουν παρατηρηθεί περισσότερες μεταλλάξεις μετά την ακτινοβολήση του κυτταροπλάσματος με σωματίδια άλφα σε αντίθεση με την ακτινοβολήση του πυρήνα των κυττάρων. Επίσης οι τύποι των μεταλλάξεων είναι παρόμοιοι με αυτούς που παρατηρούνται σε μη ακτινοβολημένα κύτταρα και σε αυθόρμητες μεταλλάξεις, ενώ σχηματίζονται ως συνέπεια αυξημένων ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Διερευνώντας αυτό το φαινόμενο παρατηρήθηκε ότι δεν απαιτείται άμεση βλάβη στο DNA για να οδηγήσει σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες είτε στα ακτινοβολημένα κύτταρα είτε στα μη, υποδηλώνοντας την ύπαρξη κάποιου μηχανισμού ενίσχυσης της σηματοδότησης μεταξύ των παρακείμενων κυττάρων. Αυτό το φαινόμενο είναι σαφές παράδειγμα διακυτταρικής επικοινωνίας και επισημαίνει την ανάγκη

ανάλυσης του με διαφορετικό τρόπο από αυτόν που έχει ως κεντρική ιδέα το DNA ως βασικό μόριο στην ακτινοβιολογία⁵¹.

Ένας ακόμη τρόπος για την μελέτη των τοπικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης γίνεται με ραδιενεργά νουκλεοτίδια. Με αυτή τη τεχνική μπορούν να σχηματιστούν πληθυσμοί κυττάρων που περιέχουν σημασμένα και μη σημασμένα νουκλεοτίδια για την μελέτη των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης σε σχηματισμούς κυττάρων τριών διαστάσεων^{53,54}.

1.3.6 Χρονική και χωρική μετάδοση τοπικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ.

Η χρονική και χωρική μετάδοση των τοπικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης έχει ερευνηθεί για την αναγνώριση των σημάτων μετάδοσης και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν. Για την μελέτη της απόστασης διάδοσης των τοπικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης έχουν ακολουθηθεί διαφορετικές πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιώντας διαφορετικά πειραματικά συστήματα. Σε πειράματα μονής στιβάδας κυττάρων ινδικού χοιριδίου ανιχνεύθηκαν παρακείμενα κύτταρα που βρίσκονται μέχρι και 3mm μακριά από ακτινοβολημένα κύτταρα με ακτίνες Χ. Επιπλέον, η κατανομή καταστραμμένων κυττάρων δεν ήταν τυχαία αλλά έδειχνε στατιστικά σημαντική επίδραση ομαδοποίησης, υποδεικνύοντας αλυσιδωτές αντιδράσεις σημάτων που ενεργοποιούνται από τα παρακείμενα κύτταρα⁵⁵. Μετά από πειράματα σε μονή στιβάδα ανθρωπίνων ινοβλαστών, βρέθηκε να έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή της p21^{Waf1} πρωτεΐνης απόκρισης στο στρες σε παρακείμενα κύτταρα έως 100μm από το κέντρο ακτινοβολήσης με σωματίδια άλφα⁵⁶. Σε διαφορετική πειραματική διαδικασία δείχθηκε ότι είχε γίνει ομοιόμορφη επαγωγή των γ-H2AX foci έως και 7.5mm από τα ακτινοβολημένα κύτταρα⁵⁰. Σε διαφορετικά πειράματα με χρήση μικροδέσμης ακτινοβολίας σωματιδίων άλφα παρατηρήθηκε ότι υπήρχε επαγωγή τοπικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ, απόπτωσης και σχηματισμού μικροπυρήνων έως και 1mm μακριά από τα ακτινοβολημένα κύτταρα, σε ανασυσταθέν επιδερμικό ιστό⁵⁷.

Για την μελέτη της χρονικής μετάδοσης και απόκρισης των τοπικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης λίγα έχουν γίνει γνωστά γιατί προκύπτουν διαφορετικά δεδομένα ανάλογα με την πειραματική διαδικασία. Με χρήση ακτινοβολίας βαρέων ιόντων σε φυσιολογικά κύτταρα ανθρωπίνων ινοβλαστών παρατηρήθηκε ότι τα παρακείμενα κύτταρα παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p53 (Ser-

15) συγκριτικά με τα ακτινοβολημένα κύτταρα, που υποδηλώνει μία ετεροχρονισμένη απάντηση σε αυτά τα φαινόμενα. Η φωσφορυλίωση του καταλοίπου σερίνης 15 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53⁵⁸. Στον αντίποδα έρευνες έχουν δείξει ότι η επαγωγή γ-H2AX foci με χρήση ακτινοβολίας σωματιδίων άλφα συμβαίνει σε ελάχιστο χρονικό διάστημα (μερικά λεπτά) τόσο στα ακτινοβολημένα όσο και στα παρακείμενα κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα τοπικά φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης συμβαίνουν σχεδόν ταυτόχρονα με την ακτινοβολήση⁵⁰. Η συνέχιση συστηματικών μελετών για την περαιτέρω ανάλυση της χρονικής διάδοσης στα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης (bystander effects), που θεωρούνται μέρος των συστημικών δράσεων της ακτινοβολίας, θα φέρει απαντήσεις ως προς τα διάφορα στάδια που μετέχουν στη μετάδοση σήματος.

1.3.7 Κύριες οδοί σηματοδότησης των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ.

Δύο είναι οι κύριες οδοί κυτταρικής σηματοδότησης που έχουν αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης, μέσω των χασματοσυνδέσεων και μέσω εκκρινόμενων παραγόντων διακυτταρικής επικοινωνίας⁵⁹. Η διακυτταρική επικοινωνία μέσω χασματοσυνδέσεων ουσιαστικά είναι η άμεση σύνδεση μεταξύ κυττάρων και ρυθμίζεται από την έκφραση και φωσφορυλίωση της connexin43(GJA1)⁶⁰, υποδεικνύοντας ότι το μέγεθος του παράγοντα σηματοδότησης είναι σχετικά μικρό. Η δεύτερη οδός κυτταρικής σηματοδότησης βασίζεται στην ικανότητα των ακτινοβολημένων κυττάρων να εκκρίνουν εξωκυτταρικά στο μέσο της καλλιέργειας, παράγοντες σηματοδότησης χαμηλού μοριακού βάρους⁶¹. Οι δύο αυτοί μηχανισμοί δεν είναι αμοιβαία αποκλειόμενοι και είναι πιθανό να έχουν διαφορετικούς ρόλους στην απόκριση των σημάτων στα γειτονικά κύτταρα.

Ένας τρόπος για την διερεύνηση της διακυτταρικής επικοινωνίας έχει γίνει μέσω της μεταφοράς μέσου καλλιέργειας από ακτινοβολημένα κύτταρα σε μη, για την δημιουργία των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης^{62,63}. Όμως η επίδραση των σημάτων που εκφράζονται κατά την ακτινοβολήση ή σε μικρό χρόνο μετά, χάνεται με την χρήση αυτών των τεχνικών. Η συμμετοχή των χασματοσυνδέσεων στην διακυτταρική επικοινωνία έχει μελετηθεί χρησιμοποιώντας γενετικώς τροποποιημένα κύτταρα με μεταλλαγμένες πρωτεΐνες χασματοσυνδέσεων που έχουν ατελή λειτουργία ή με χρήση χημικών αναστολέων των χασματοσυνδέσεων. Ωστόσο οι αναστολείς είναι μη ειδικοί και μπορεί να έχουν άλλες επιπτώσεις στις κυτταρικές δομές επηρεάζοντας τη ρευστότητα της μεμβράνης και ενδεχομένως την προσβασιμότητα των υποδοχέων σε

παρακείμενα σήματα⁶⁴. Η έκθεση σε ακτινοβολία χαμηλής ή υψηλής γραμμικής μεταφοράς ενέργειας έχει δείχθει ότι επάγει την παραγωγή και σταθεροποίηση της connexin43(GJA1), υποστηρίζοντας ότι η απόκριση στο οξειδωτικό στρες είναι αλληλένδετη με τη διακυτταρική επικοινωνία⁶⁵.

Σε πειράματα μεταφοράς μέσου καλλιέργειας όπως και ταυτόχρονης καλλιέργειας διαφορετικών πληθυσμών κυττάρων έχει δείχθει η ύπαρξη υδατοδιαλυτών παραγόντων που απελευθερώνονται από τα ακτινοβολημένα κύτταρα και στην συνέχεια επάγουν διάφορες βιολογικές επιδράσεις στα παρακείμενα κύτταρα. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να απελευθερώνονται με διαφορετικούς τρόπους, όπως για παράδειγμα μέσω των εξωσωμάτων⁶⁶.

Έχει παρατηρηθεί ότι δεν υπάρχει άμεση σύνδεση μεταξύ δόσης και απόκρισης στην σηματοδότηση φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης^{40,67} κάτι που μπορεί να οφείλεται σε περιορισμένη παραγωγή σήματος από τα ακτινοβολημένα κύτταρα ή σε κορεσμό των υποδοχέων των γειτονικών μη ακτινοβολημένων κυττάρων. Παρόλη την εύρεση κάποιων τυπικών ορίων ακτινοβολίας για διαφορετικές αποκρίσεις στην σηματοδότηση φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης είναι πιθανή η συνεχής διαφοροποίηση και προσθήκη νέων ορίων⁴⁹. Πιθανά η πρωτογενής απόκριση που προκαλεί την ενεργοποίηση σηματοδότησης φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης με τα ακτινοβολημένα κύτταρα να συνδέεται είτε με την δόση (ποσό ενέργειας που εναποτίθεται), είτε με την χωρική και χρονική διάδοση της στα κύτταρα, επηρεάζοντας δυνητικά την ποιότητα και την ποσότητα του σήματος εκπομπής. Τα περισσότερα από τα μόρια που έχει δείχθει ότι έχουν κάποιο σημαντικό ρόλο στην επαγωγή απόκρισης σε παρακείμενα σήματα παρουσιάζουν κοινά με τις γενικές αποκρίσεις στο στρες που προκαλούνται από την επικοινωνία των κυττάρων, πράγμα που υποδηλώνει ότι η σηματοδότηση που προκαλείται δεν θα μπορούσε να προέρχεται αποκλειστικά από απόκριση στην ακτινοβολία³⁰.

1.3.8 Κυτταρικοί τύποι μελέτης των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ

Ένα ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί η εξάρτηση των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης από τον κυτταρικό τύπο. Έχει αναφερθεί ότι δεν δημιουργούν όλοι οι τύποι κυττάρων τοπικά φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης και ούτε όλοι οι τύποι κυττάρων ανταποκρίνονται σε αυτά. Ωστόσο είναι δύσκολο να απομονωθεί η συγκεκριμένη συμβολή του κάθε τύπου κυττάρων στα τοπικά φαινόμενα απόκρισης

λόγω γειννίαςσης. Η πολυπλοκότητα αυτή οφείλεται σε πολλούς παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση στα τοπικά φαινόμενα απόκρισης λόγω γειννίαςσης της ΙΑ. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν τον τύπο του κυττάρου, τη δόση, τον τύπο της ακτινοβολίας καθώς και το ρυθμό έκθεσης των κυττάρων σε αυτή. Έχει βρεθεί ότι τόσο τα καρκινικά κύτταρα^{54,68} όσο και τα φυσιολογικά κύτταρα⁶⁹ διαθέτουν την ικανότητα απόκρισης σε αυτά τα φαινόμενα. Επιπρόσθετα τα κύτταρα ενός καρκινικού όγκου που διαφέρουν στην φυσιολογία τους από αυτή των φυσιολογικών ομολόγων τους, παρουσιάζουν μία διαφοροποιημένη επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων με αποτέλεσμα την διαφορετική επαγωγή και διάδοση αυτών των σημάτων, κάτι το οποίο πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, πολυάριθμες μελέτες έχουν τονίσει ότι η ικανότητα των κυττάρων να προκαλούν αυτά τα φαινόμενα και να αποκρίνονται σε αυτά επηρεάζεται από γενετικούς παράγοντες⁷⁰⁻⁷³.

Μελέτη σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος που ακτινοβολήθηκαν με μικροδέσμη, έδωσαν ενδείξεις ότι υπήρξαν διαφορές ως προς την απόκριση του σήματος στα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειννίαςσης εξαιτίας του γονοτύπου⁷⁴. Επίσης ο ρόλος του γενετικού υποβάθρου αποδείχθηκε με χρήση κυττάρων μυελού των οστών από δύο αμιγή στελέχη ποντικού που ακτινοβολήθηκαν με ακτίνες Χ⁷⁵. Άλλες μελέτες έχουν δείξει την έλλειψη φαινομένων απόκρισης λόγω γειννίαςσης σε διάφορους τύπους κυττάρων(λεμφοβλάστες, κακοήγη γλοιώματα, κλπ.)⁷⁶. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να σχετίζεται με ελαττωμένη παραγωγή σήματος^{77,78}, ή σε έλλειψη απόκρισης στο σήμα των παρακείμενων κυττάρων^{79,80}. Τα παραπάνω παρουσιάζουν ότι οι παράγοντες που είναι σημαντικοί ενδέχεται να διαφέρουν ανάλογα με την κυτταρική σειρά και τις πειραματικές συνθήκες, κάτι που δημιουργεί μεγάλη δυσκολία στον χαρακτηρισμό της ικανότητας του συγκεκριμένου τύπου κυττάρων που δεν παράγουν σήματα ή να αποκρίνονται σε αυτά.

Οι συνήθεις κυτταρικοί τύποι που μελετώνται σε πειράματα φαινομένων απόκρισης λόγω γειννίαςσης είναι ινοβλάστες ή μονοκύτταρα κύτταρα. Τα μονοκύτταρα επιλέγονται επειδή μπορούν να αποτυπώσουν την συνολική βλάβη που προκαλεί η ακτινοβολία λόγω της αυξημένης ακτινοευαισθησία τους, ενώ οι ινοβλάστες είναι υπεύθυνοι για τις πιο συχνές έμμεσες βλάβες της ακτινοβολίας και είναι ένα αξιόλογο μοντέλο γήρανσης⁸¹⁻⁸³. Σχετικά λίγες μελέτες έχουν διερευνήσει το προφίλ απόκρισης σε ακτινοβολία σε άλλους ιστούς, παρόλο που είναι χαρακτηριστικοί στόχοι ακτινοθεραπείας^{84,85}. Ένα κοινό χαρακτηριστικό των πειραμάτων, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, είναι ότι παρουσιάζουν υψηλή μεταβλητότητα στο προφίλ έκφρασης

γονιδίων όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων, αλλά και μεταξύ των ίδιων κυτταρικών τύπων⁸⁶. Παρά αυτή τη μεταβλητότητα αρκετές μελέτες έχουν καταφέρει να βρουν ένα βασικό σύνολο γονιδίων απόκρισης σε αυτά τα φαινόμενα⁸⁷.

Με την διεξαγωγή ενός σημαντικού αριθμού πειραμάτων σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους για την ανάλυση συστημικών φαινομένων επαγόμενης γονιδιακής αστάθειας από την ακτινοβολία, επισημαίνεται ότι όταν οι ίδιοι τύποι κυττάρων ακτινοβοληθούν με διαφορετικούς τύπους ακτινοβολίας, εμφανίζουν διακριτές κυτταρογενετικές ανωμαλίες^{88,89}. Ωστόσο, ένα κοινό χαρακτηριστικό της πληθώρας μελετών είναι η έλλειψη στοιχείων για την σχέση δόσης – απόκρισης της ακτινοβολίας, παρόλο που έχει αναφερθεί ότι η γονιδιακή αστάθεια ξεκινάει να επάγεται από χαμηλές δόσεις χωρίς να αυξάνεται η έκφραση της σε υψηλότερες δόσεις⁹⁰.

Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί το ενδιαφέρον φαινόμενο της *in vivo* χρωμοσωμικής αστάθειας, όπου είναι πιθανόν να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεχνητών συνθηκών της καλλιέργειας και των κυττάρων που λαμβάνονται από τον ιστό στο κανονικό τους περιβάλλον. Ειδικότερα, όταν συγκρίθηκαν αιμοποιητικά κύτταρα από *in vivo* και *in vitro* πειράματα με ΙΑ, βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στην επαγωγή της χρωμοσωμικής αστάθειας. Στα *in vivo* δεδομένα εμφανίστηκαν πολύ λιγότερα κύτταρα με χρωμοσωμικές ανωμαλίες και πολύ λιγότερες βλάβες ανά κύτταρο⁹¹.

1.3.9 Αναθεώρηση του τρόπου πρόκλησης αλλοιώσεων στα κύτταρα από τα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ

Για πολλά χρόνια, οι θραύσεις στην διπλή έλικα του DNA θεωρούνταν η βασική γονιδιοτοξική βλάβη που προκαλούσε η ΙΑ, πράγμα που υποδήλωνε ότι αυτές οι αλλοιώσεις μπορεί να εμπλέκονταν και στα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης (bystander effects) των παρακειμένων κυττάρων. Η θεωρία αυτή φαίνεται να έχει ξεπεραστεί επειδή έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της σε κύτταρα που έχουν ακτινοβοληθεί μόνο κυτταροπλασματικά και όχι στον πυρήνα⁹². Ο σχηματισμός θραυσμάτων της διπλής έλικας του DNA φαίνεται να επάγεται μέσω φωσφορυλίωσης της ιστόνης H2AX, όπου στην φωσφορυλιωμένη της μορφή συγκεντρώνεται σε θέσεις θραύσης του DNA. Έχει αναφερθεί ότι η ακτινοβολήση κυττάρων - στόχων προκαλεί το σχηματισμό φωσφορυλιωμένων ιστονικών πρωτεϊνών H2AX σε πληθυσμούς γειτονικών μη ακτινοβολημένων κυττάρων. Επίσης, κύτταρα που καλλιεργήθηκαν μαζί με κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν με ακτίνες γ, παρουσίαζαν

αυξημένα ποσοστά φωσφορυλιωμένων θέσεων H2AX⁶². Η μελέτη αυτή υποδηλώνει ότι ίσως η φωσφορυλίωση θέσεων H2AX μπορεί να είναι ένα πρώιμο στάδιο στην απόκριση των γειτονικών μη ακτινοβολημένων κυττάρων και ότι τα θραύσματα DNA αλλά και οι γενικότερες βλάβες στο κύτταρο (πρωτεΐνες, λιπιδική μεμβράνη) που προκύπτουν οδηγούν στην επαγωγή των συστημικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης.

1.3.10 Επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ

Οι δύο οδοί σηματοδότησης των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης φαίνεται να επάγουν σήματα απόκρισης στο οξειδωτικό στρες, ειδικότερα δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species: ROS) και δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species: RNS) οι οποίες μετατρέπονται στην συνέχεια σε ελεύθερες ρίζες. Επίσης επάγουν πρωτεΐνες που σχετίζονται στην απόκριση στο κυτταρικό στρες^{93,94}. Η υπόθεση ότι η απόκριση στην ακτινοβολία των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης σχετίζεται με φαινόμενα απόκρισης στο στρες, αποδείχθηκε σε μελέτη με τη χρήση στρεσογόνων παραγόντων ώστε ναδειχθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα βλαβών στο DNA προκαλούνταν από φαινόμενα παρόμοια με εκείνα που προκύπτουν από την ΙΑ⁹⁵. Μεταξύ των διάφορων σηματοδοτικών παραγόντων, οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) αναδείχθηκαν ότι έχουν άμεση σχέση με τα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ⁹⁶. Ο λόγος είναι διότι διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης μεταξύ της οξειδωτικής παραγωγής και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών.

Γονίδιο	Προσωνυμία
OGG1	8-Oxoguanine DNA Glycosylase
APEX1	Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1
SOD2	Superoxide Dismutase 2
PARP1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
ATM	ATM Serine/Threonine Kinase
GSTM1	Glutathione S-Transferase Mu 1
XRCC1	X-Ray Repair Cross Complementing 1
CAT	Catalase
GSTT1	Glutathione S-Transferase Theta 1
GPX1	Glutathione peroxidase 1
ERCC6	ERCC Excision Repair 6
NFE2L2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
ERCC2	ERCC Excision Repair 2
NUDT1	Nudix Hydrolase 1
NEIL1	Nei Like DNA Glycosylase 1
WRN	Werner Syndrome RecQ Like Helicase
MUTYH	MutY DNA Glycosylase
TP53	Tumor Protein P53

Εικόνα 1-6 Πίνακας γονιδίων που έχουν συσχετισθεί με απόκριση στο οξειδωτικό στρες⁹⁷

Μέσω βιβλιογραφικής μελέτης με χρήση μη αυτοματοποιημένων μεθόδων αλλά και μεθόδων εξόρυξης δεδομένων κειμένου έχουν βρεθεί ένα πλήθος γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σχετιζόμενα με τους επιδιόρθωτικούς μηχανισμούς του DNA ως προς την απόκριση στην ΙΑ, τους επιδιόρθωτικούς μηχανισμούς του DNA ως προς την απόκριση στο οξειδωτικό στρες και τους επιδιόρθωτικούς μηχανισμούς του DNA ως προς την απόκριση στο μεταγραφικό στρες. Βρέθηκε μόνο ένα γονίδιο που θα μπορούσε να οδηγήσει στον προσδιορισμό του οξειδωτικού στρες σε σχέση με τους επιδιόρθωτικούς μηχανισμούς του DNA, αυτό ήταν το PSEN1. Κωδικοποιείται σε μια υπομονάδα με δραστηριότητα πεπτιδάσης του συμπλόκου γ-εκκριτάσης⁹⁷. Στην εικόνα 1-6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης ως προς τα γονίδια που βρέθηκαν ότι έχουν γενικά σχέση με απόκριση στο οξειδωτικό στρες.

Η παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου ξεκινά αμέσως μετά από έκθεση σε ακτινοβολία, ωστόσο σημαντικό ποσοστό τους συνεχίζει να προέρχεται από τα μιτοχόνδρια, οξειδάσες NADPH και λιποξυγενάσες⁹⁸. Η υπερβολική παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου μπορεί επίσης να διαταράξει την αντιοξειδωτική δραστηριότητα δημιουργώντας ανισορροπία στην αντιοξειδωτική άμυνα, το οποίο είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό των παρακείμενων κυττάρων. Οι μακροπρόθεσμες

στρεσογόνες επιπτώσεις στους απογόνους των παρακείμενων κυττάρων έχουν επίσης συνδεθεί με κυτταρική οξειδοαναγωγική ανισορροπία⁹⁹.

Οι δραστικές μορφές αζώτου και κυρίως το μονοξείδιο του αζώτου, παράγονται σε ακτινοβολημένα κύτταρα τόσο από ιδιοσυστατικούς όσο και από επαγωγικούς μηχανισμούς, μέσω της συνθάσης μονοξειδίου του αζώτου, που ξεκινά να ενεργεί 5-30 λεπτά μετά την ακτινοβολήση και οδηγείται σε αύξηση της δραστηριότητας της μετά από 3-24 ώρες¹⁰⁰. Το μονοξείδιο του αζώτου δρα ως σηματοδοτικό μόριο οξειδοαναγωγής, είναι σχετικά σταθερό, υδρόφοβο και μπορεί να διαχυθεί μέσα στο κυτταρόπλασμα αλλά και στο πλάσμα μεμβρανών σε αρκετή απόσταση μέσα στο κύτταρο. Αντιδρά με ανιόντα υπεροξειδίου σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες περοξυνιτρίτη υψηλής δραστηριότητας, ένα είδος ελευθέρων ριζών που μπορεί να προκαλέσει οξείδωση των λιπιδίων και βλάβες στο DNA μέσω θραύσεων διπλής έλικας. Κατά συνέπεια ενεργοποιεί την στρατολόγηση συμπλόκων επιδιόρθωσης όπως τις κινάσες ATM ή ATR του σηματοδοτικού μονοπατιού απόκρισης στις βλάβες του DNA¹⁰¹.

Έχειδειχθεί πειραματικά ότι μετά την ακτινοβολήση με σωματίδια άλφα, τα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου αυξάνονται σχεδόν ταυτόχρονα στα ακτινοβολημένα και στα παρακείμενα κύτταρα. Η αύξηση διαρκεί περίπου 30 λεπτά και ακολουθείται από μιτοχονδριακή παραγωγή των δραστικών μορφών σε μεταγενέστερους χρόνους οι οποίοι διαφέρουν από τα ακτινοβολημένα (30 λεπτά~6 ώρες) στα παρακείμενα (2~6 ώρες) κύτταρα¹⁰².

Η οξειδοαναγωγική ανισορροπία στα ακτινοβολημένα κύτταρα επάγει επίσης την ταχεία απελευθέρωση διαφορετικών ειδών κυτταροκινών οι οποίες ενεργώντας μέσω σηματοδότησης της μεμβράνης στα παρακείμενα κύτταρα δημιουργούν δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου συμβάλλοντας περαιτέρω στο οξειδωτικό στρες καθώς ενισχύουν τον καταρράκτη σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια απόκρισης στο οξειδωτικό στρες οδηγούν επίσης σε ενεργοποίηση του καταρράκτη σηματοδότησης των MAP κινάσων¹⁰³.

Τα βραχυπρόθεσμα και μακροπρόθεσμα αποτελέσματα προκαλούμενα από το οξειδωτικό στρες μπορούν να οδηγήσουν σε οξειδωτικές βλάβες του μιτοχονδριακού DNA, πράγμα που πιθανώς οδηγεί σε συνεχές μεταβολικό στρες και σε τροποποίηση της έκφρασης των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, επηρεάζοντας έτσι το οξειδοαναγωγικό περιβάλλον του κυττάρου¹⁰⁴. Η λεπτομερής μελέτη των παραγόντων TGF- β 1 και TNF- α που εκκρίνονται από τα ακτινοβολημένα κύτταρα, έδειξε ότι οι παράγοντες αυτοί ενεργοποιούν οξείδια του αζώτου που βρίσκονται σε γλυκοπρωτεϊνικές επικράτειες της

πλασματικής μεμβράνης, προκαλώντας μακροχρόνια παραγωγή ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια¹⁰⁵. Τα εξαρτώμενα μιτοχονδριακά μονοπάτια NFκB/iNOS/NO, NFκB/COX-2/PGE2 επάγονται στα παρακείμενα κύτταρα ταυτόχρονα με τον σχηματισμό μικροπυρήνων και βλαβών στο DNA. Η μελέτη των μηχανισμών των μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών σχετίζεται με την έρευνα φαινομένων που προκαλούνται από χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας¹⁰⁶.

Παρά την συνεχή έρευνα δεν έχουν μελετηθεί πλήρως οι μηχανισμοί της απόκρισης στο οξειδωτικό στρες και οξειδωτικό καταβολισμό που μπορούν να οδηγήσουν σε θραύση του DNA στα παρακείμενα μη ακτινοβολημένα κύτταρα καθώς υπάρχουν επίσης και άλλα στοιχεία που εμπλέκονται στις θραύσεις διπλής έλικας DNA. Έχει πραγματοποιηθεί μια σειρά μελετών σε κυτταρικές σειρές που έχουν συνήθως κάποια ανεπάρκεια σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης, όπως η σειρά xrs5. Σε αυτή τη κυτταρική σειρά η εκφραζόμενη πρωτεΐνη Ku80 είναι ελλιπής, ο ρόλος της οποίας είναι η δημιουργία ενός ετεροδιμερούς που προσδένεται στα τέλη των θραυσμάτων της διπλής έλικας και απαιτείται για να γίνει μη ομόλογη πρόσδεση και επιδιόρθωση του DNA. Σε πειράματα που έγιναν με αυτή τη κυτταρική σειρά για την ανάλυση των τοπικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης παρατηρήθηκαν σημαντικά αυξημένες συχνότητες μετάλλαξης στο γενετικό τόπο της φωσφοριβοσυλτρανσφεράσης της υποξανθίνης (hprt) σε σχέση με τα αγρίου τύπου κύτταρα¹⁰⁷.

Μοριακές αναλύσεις έδειξαν ότι μετά από την ακτινοβολήση των κυττάρων στόχων με σωματίδια άλφα (υψηλής ικανότητας εναπόθεσης ενέργειας), οι συστημικές μεταλλάξεις που γίνονταν στα γειτονικά αγρίου τύπου κύτταρα ήταν κυρίως σημειακές μεταλλάξεις, σε αντίθεση με τα κύτταρα xrs5 που είχαν μερική ή πλήρη διαγραφή του hprt¹⁰⁸. Η αύξηση των χρωμοσωμικών αναδιατάξεων που αναφέρθηκαν στα κύτταρα xrs5 οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η μη σωστή ή καθόλου επιδιόρθωση των θραυσμάτων διπλής έλικας προκαλείται από οξειδωτικές βλάβες των αδελφών χρωματίδων του DNA¹⁰⁹. Μία εναλλακτική εξήγηση είναι ότι οι διαγραφές προκύπτουν σε θέσεις που έχει καταστραφεί η διχάλα αντιγραφής με ανεπάρκεια επανασύνδεσης. Με τη χρησιμοποίηση διαφόρων κυτταρικών σειρών με ανεπαρκείς παράγοντες επιδιόρθωσης, διερευνήθηκε ο κυτταρικός θάνατος γειτονικών μη ακτινοβολημένων κυττάρων με τη μεταφορά θρεπτικού μέσου από τα ακτινοβολημένα κύτταρα. Έτσι καταγράφηκε η σημαντική αύξηση της κυτταροτοξικότητας σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές (Human AT Br 1, 180Br ινοβλάστες επιδερμίδας, CHO-K1 κλπ.) όπως επίσης και η αυξημένη ευαισθησία στην αποδοχή συστημικών σημάτων που προκύπτουν από

φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης, που θεωρούνται μέρος των συστημικών δράσεων της ακτινοβολίας (Radiation-Induced Bystander Effects: RIBE)¹¹⁰.

1.3.11 Νέοι τομείς ερευνών των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ

Ένας άλλος τομέας μελέτης έχει ξεκινήσει ως προς τα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης, σχετικά με τις επιπτώσεις της ΙΑ στην έκφραση των miRNAs σε κύτταρα ακτινοβολημένα ή παρακαείμενα. Τα miRNAs είναι σημαντικά μόρια σηματοδότησης που εμπλέκονται στην επικοινωνία μεταξύ κυττάρων και είναι υποψήφια μόρια για την διάδοση των συστημικών φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ. Είναι σχετικά σταθερά και μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις μέσω εξωσωμάτων και χασματοσυνδέσεων¹¹¹. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει αλλαγές στα επίπεδα miRNAs που προκαλούνται από την ακτινοβολία¹¹². Επιπλέον έχουν βρεθεί μεγάλες διαφορές στον πληθυσμό των miRNAs που εμπλέκονται στα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης, που θεωρούνται μέρος των συστημικών δράσεων της ακτινοβολίας, ενδεχομένως λόγω των διαφορετικών πειραματικών συνθηκών¹¹³. Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την διαφορετική έκφραση των miRNAs επικαλύπτεται σημαντικά από αυτό που προκαλείται από την ακτινοβολία, επισημαίνοντας τη συμμετοχή του οξειδωτικού στρες στην απόκριση των κυττάρων στην ακτινοβολία και μέσω των miRNAs^{114,115}.

1.3.12 Διερεύνηση στην μοντελοποίηση των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ

Το βασικό ερώτημα για τα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης είναι οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην συνολική βιολογική απόκριση ενάντια της ΙΑ και πως τα φαινόμενα απόκρισης μη ειδικής στόχευσης των συστημικών δράσεων της ακτινοβολίας (non-targeted effects) μπορούν να επηρεάσουν την πιθανότητα εμφάνισης νόσων, όπως ο καρκίνος. Η πλειοψηφία των δεδομένων σχετικά με τα παραπάνω φαινόμενα έχει εξαχθεί από πειράματα σε καλλιέργειες κυττάρων και υπάρχουν συγκριτικά ελάχιστα δεδομένα με τεχνικούς ιστούς σε τρισδιάστατες διαμορφώσεις¹¹⁶.

Με την χρήση μοντέλων συστημικών φαινομένων μη ειδικής στόχευσης είναι δυνατόν να δοθούν απαντήσεις σε αυτά τα ερωτήματα. Μέχρι τώρα έχουν προταθεί μοντέλα με χρήση δεδομένων από *in vitro* καλλιέργειες, από τη χρήση 3D ιστών¹¹⁷ και από συστήματα *in vivo*¹¹⁸. Επομένως, με βάση την πηγή δεδομένων που χρησιμοποιούν έχουν προταθεί διάφορα υπολογιστικά μοντέλα για την επικοινωνία των κυττάρων και τη διαφοροποίηση από εξωτερικούς παράγοντες, όπως η ΙΑ. Παράλληλα,

με βάση τις παραπάνω συστημικές μεθόδους έχει μελετηθεί ο συσχετισμός του μεγέθους της έντασης του σήματος ακτινοβολίας με την επιβίωση των παρακείμενων κυττάρων, υποδεικνύοντας ότι η έκκριση σηματοδοτικών παραγόντων από τα κατεστραμμένα ακτινοβολημένα κύτταρα δεν είναι ανάλογη της δόσης απορρόφησης των κυττάρων. Ακόμη, εκτιμάται ότι το μήκος από το σημείο ακτινοβολήσης που επηρεάζεται μέσω μοριακής σηματοδότησης είναι 3~10μm¹¹⁹.

1.3.13 Μελέτη γονιδιακής έκφρασης των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ

Η ανάπτυξη μεθοδολογιών ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης και ειδικότερα η εξέλιξη τεχνολογιών υψηλής απόδοσης, βοήθησε στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ. Με τον τρόπο αυτό διαφορετικές πειραματικές διαδικασίες διεξήχθησαν με χρήση διαφόρων τύπων ακτινοβολίας και δόσης σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών συστημάτων. Οι περισσότερες αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε *in vitro* πειράματα ακτινοβολίας για τον εντοπισμό κυτταρικών μηχανισμών και μοριακών σηματοδοτικών μονοπατιών, που σχετίζονται με τις άμεσες ή έμμεσες επιδράσεις της ακτινοβολίας. Τα πειραματικά αποτελέσματα των παραπάνω μελετών επισήμαναν την σημαντικότητα του μεταγραφώματος για την εύρεση βιοδεικτών σε ακτινοβολία, είτε χαμηλών είτε υψηλών δόσεων⁸⁷.

Διάφορες ερευνητικές μελέτες έχουν επισημάνει, πως συγκεκριμένα γονίδια που έχουν χαρακτηριστεί διαφορετικά εκφρασμένα με βάση την επίδραση της ακτινοβολίας, εμπλέκονται με μοριακούς μηχανισμούς όπως η γονιδιοτοξική απόκριση στο στρες, η ανίχνευση και επιδιόρθωση βλαβών στο DNA καθώς επίσης και η ανοσολογική απόκριση^{120,121}. Ανεξάρτητα από την σημαντική μεταβολή συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών, διαφοροποίηση στην έκφραση γονιδίων που συνδέονται με την ανταπόκριση στη βλάβη του DNA είναι λιγότερο χαρακτηριστική σε μεταγενέστερα χρονικά σημεία. Αντίθετα, οι φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αποκρίσεις γίνονται εντονότερες. Επίσης *in vivo* πειράματα υποδεικνύουν περισσότερες μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση που σχετίζεται με την εμφάνιση φλεγμονωδών αντιδράσεων και ανοσολογικών αποκρίσεων σε σχέση με τα *in vitro* πειράματα, αναδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό τη σημασία των μικρο- και μακρο-περιβαλλοντικών παραγόντων στην διαμόρφωση των άμεσων κυτταρικών επιδράσεων της ακτινοβολήσης¹²².

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά την διαδικασία της ακτινοβολήσης είναι μία διαδικασία δύο σταδίων. Γονίδια κυτταροκινών που σχετίζονται με την απόκριση στη

φλεγμονή ενεργοποιούνται άμεσα μετά την ακτινοβολήση, όπως για παράδειγμα τα G-CSF, IFNs, IL-1, IL-6, IL-8, & TNFα. Η παραγωγή πρόωρων κυτταροκινών μπορεί να θεωρηθεί ως τμήμα σήματος κινδύνου για την απόκριση στην ακτινοβολία και είναι η κύρια πηγή για την περαιτέρω παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου. Αυτή η δευτερογενής παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου είναι εν μέρει υπεύθυνη για την βραδεία αύξηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών¹⁰³.

Οι κυτταρικές αποκρίσεις λόγω της άμεσης έκθεσης στην ακτινοβολία, μπορεί να προκαλούνται από πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια εξαιτίας των άμεσων βλαβών του DNA ή από βλάβες/διαταραχές στην κυτταρική μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα. Στην πλειοψηφία τα παραπάνω σηματοδοτικά μονοπάτια καταλήγουν στον πυρήνα, για την ενεργοποίηση συγκεκριμένου αριθμού μεταγραφικών παραγόντων, με σημαντικότερους τους p53, AP-1, Egr-1 και NF-kB. Η αλληλεπίδραση αυτών των παραγόντων καθοδικά των μονοπατιών σηματοδότησης είναι καθοριστικός παράγοντας για την επιβίωση των κυττάρων μετά την ακτινοβολήση. Ενώ η ενεργοποίηση του p53 μονοπατιού έχει συνήθως προ-αποπτωτική απόκριση ρυθμίζοντας γονίδια έναρξης της απόπτωσης, αντίθετα ο NF –kB έχει αντι-αποπτωτική λειτουργία και δρα ανταγωνιστικά με το μονοπάτι p53¹²³.

1.4 Μέθοδοι Μικροσυστοιχιών – Τεχνικές Υψηλής Απόδοσης

1.4.1 Χρήση μεθόδων μικροσυστοιχιών

Η έρευνα και η ανάλυση φαινομένων όπως τα RIBE ξεκινάει από την αναγνώριση του φαινοτύπου μη φυσιολογικής λειτουργίας των κυττάρων μέσω της εφαρμογής μεθόδων ανάλυσης του γονιδιώματος τους και του γονοτύπου τους.

Με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών μελετώνται προφίλ γονιδιακής έκφρασης με σκοπό την ερμηνεία και κατανόηση των ρυθμιστικών βιολογικών διεργασιών σε κυτταρικό επίπεδο. Ο προσδιορισμός του προφίλ γονιδιακής έκφρασης προσφέρει πληροφορία για το μεταγράφημα των προς ανάλυση κυττάρων για την αναζήτηση οικογενειών γονιδίων που επηρεάζονται στην υπό μελέτη κατάσταση^{124,125}. Επίσης χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών, στην γονοτύπηση¹²⁶, στην επιγενετική, στην ιατρική διαγνωστική, στην φαρμακογονιδιωματική και στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων¹²⁷.

1.4.2 Πρόοδος των μεθόδων μικροσυστοιχιών

Η ανάπτυξη των πρώιμων τεχνολογιών μικροσυστοιχιών είχε ξεκινήσει από τα μέσα της δεκαετίας του '70^{128,129} αλλά οι σύγχρονες τεχνολογίες εμφανίστηκαν στις

αρχές της δεκαετίας του '90. Το 1991 ο Fodor *et.al.* δημοσίευσε την μέθοδο φωτολιθογραφίας για την σύνθεση αρχικά πεπτιδίων 10 αμινοξικών καταλοίπων και στην συνέχεια συστοιχίες δι-νουκλεοτιδίων¹³⁰. Το 1994 ο Fodor *et.al.* στην τότε νεοσύστατη εταιρία Affymetrix χρησιμοποίησε την εκτύπωση μέσω φωτολιθογραφία για την δημιουργία σειρών DNA 256 διαφορετικών οκτα-νουκλεοτιδίων¹³¹. Το 1996 ο Derisi *et.al.* δημοσίευσε μια μέθοδο που επέτρεπε πολύ υψηλή πυκνότητα στις συστοιχίες DNA σε γυάλινα υποστρώματα¹³². Τα γυάλινα πλακάκια μικροσκοπίου που είχαν καλυφθεί από πολύ-λυσίνη παρείχαν δυνατή πρόσδεση στο DNA και με τη χρήση ρομποτικών ανιχνευτών η εκτύπωση τους έδινε την δυνατότητα χρήσης φθορίζοντων ανιχνευτών στο κάθε δείγμα. Η ανίχνευση μέσω φθορισμού παρείχε αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με ραδιενεργούς ανιχνευτές ή ανιχνευτές χημειοφωταύγειας.

Η φθορίζουσα ανίχνευση είναι αρκετά ευαίσθητη και έχει μεγάλο εύρος ανίχνευσης, είναι λιγότερο δαπανηρή, λιγότερο περίπλοκη, σχετικά ακίνδυνη και επιτρέπει την σήμανση δύο διαφορετικών δειγμάτων με διαφορετικά χρώματα που μπορούν στην συνέχεια να υβριδιστούν ταυτόχρονα και να μετρηθεί η αναλογία των σημάτων στην ίδια συστοιχία¹³³. Μια εναλλακτική προσέγγιση για την κατασκευή συστοιχιών δημιουργήθηκε από την ομάδα του David Walt η οποία χρησιμοποιήθηκε εμπορικά από την εταιρεία Illumina. Στη μέθοδο αυτή εμπλέκοταν η σύνθεση DNA σε μικρά σφαιρίδια πολύ-στυρενίου και η απόθεση τους στο τέλος μιας συστοιχίας οπτικών ινών όπου το κάθε σφαιρίδιο προσδενόταν σε ένα 'πηγαδάκι' σημασμένο με φθορίζον ανιχνευτή. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία εξελίχθηκε περαιτέρω αυξάνοντας κατά πολύ την ειδικότητα και της ανιχνευτική ικανότητα των μικροσυστοιχιών^{134–136}.

1.4.3 Εφαρμογές μικροσυστοιχιών

Αρχικά οι μικροσυστοιχίες DNA εφαρμόστηκαν στην μέτρηση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης και αυτή παραμένει η κύρια εφαρμογή τους μέχρι σήμερα¹³⁷. Μέσω των υπολογιστικών δεδομένων γονιδιακής έκφρασης παράγεται πληροφορία σχετικά με την επίδραση του γονοτύπου στο φαινότυπο του κυττάρου για την έρευνα ενός φαινομένου. Μέσω της ανάλυσης των αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες και κυττάρων που έχουν επηρεαστεί από το φαινόμενο προς μελέτη, δίνεται η δυνατότητα εύρεσης γονιδίων-στόχων προς περαιτέρω έρευνα. Στο τομέα της διαγνωστικής μέσω της ανάλυσης της γονιδιακής

έκφρασης με χρήση αλγορίθμων μηχανικής μάθησης, μπορούν να βρεθούν συγκεκριμένες ομάδες γονιδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες.

Επίσης, μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανάδειξη συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την γονιδιακή σηματοδότηση ως προς την απόκριση των κυττάρων προς το φαινόμενο και η υπόδειξη πρωτεϊνικών στόχων που δημιουργούν παθολογικές καταστάσεις για την αναζήτηση θεραπείας. Ειδικότερα για να συσχετιστούν διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες που ενέχονται στο προς μελέτη φαινόμενο αλλά και να καθοριστούν οι θέσεις πρόσδεσης των παραγόντων, χρησιμοποιείται μια διαφορετική τεχνική μικροσυστοιχιών σε συνδυασμό με την τεχνική ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης^{138,139}. Ακόμη, οι μικροσυστοιχίες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την γονοτύπηση μονο-νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών. Ως μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP) ορίζεται η αντικατάσταση μίας νουκλεοτιδικής βάσης με κάποια άλλη, με την ίδια στατιστική πιθανότητας εμφάνισης να εντοπίζεται σε ένα αποδεκτό ποσοστό σε ένα πληθυσμό. Επειδή οι πολυμορφισμοί που συναντώνται στην κωδικοποιούσα περιοχή κάποιου γονιδίου, συχνά μεταβάλλουν την λειτουργικότητα ή την δομή της παραγόμενης πρωτεΐνης, έχουν ως αποτέλεσμα την κληρονόμηση (μεταβίβαση) συγκεκριμένων παθολογικών καταστάσεων (κληρονομικές γενετικές ασθένειες). Πολυμορφισμοί που συναντώνται σε μη κωδικοποιούσα περιοχή μπορεί να επηρεάσουν την λειτουργικότητα κάποιου γονιδίου εάν βρίσκονται σε κάποια ρυθμιστική αλληλουχία με αποτέλεσμα την δημιουργία παθολογικών καταστάσεων(εμφάνιση καρκίνου, διαβήτη κ.α.)^{140–142}.

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών ως μεθοδολογία υψηλής απόδοσης είναι αυτή που έδωσε το έναυσμα για την εξαγωγή υπολογιστικών δεδομένων βιολογικής πληροφορίας. Η όλο και αυξανόμενη αξιοποίηση αυτής της τεχνολογίας και η αναγκαιότητα για περαιτέρω αναλύσεις και μετα-αναλύσεις αυτών των πειραμάτων, έδωσε το έναυσμα για την δημιουργία κανόνων και προτύπων για την τυποποίηση της πληροφορίας που προκύπτει. Οι κανόνες αυτοί απαρτίζουν την ελάχιστη πληροφορία για πειράματα μικροσυστοιχιών (Minimal Information About Microarray Experiment, MIAME)^{143,144}. Αποτελούνται από τα πρωτογενή δεδομένα κάθε πειράματος μικροσυστοιχίας, τα επεξεργασμένα δεδομένα μετά από την βιοστατιστική ανάλυση του πειράματος, βασικούς σχολιασμούς των δειγμάτων και των πειραματικών παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν. Επίσης από τον πειραματικό σχεδιασμό, επαρκή σχολιασμό της μικροσυστοιχίας και βασικά πρωτόκολλα στατιστικής και εργαστηριακής επεξεργασίας των δεδομένων που λήφθηκαν.

1.4.4 Μειονεκτήματα-Περιορισμοί Μικροσυστοιχιών

Παρόλο που η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών παρέχει την πρωτογενή πληροφορία για ταυτόχρονη μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης πολλών διαφορετικών αλληλουχιών DNA ή RNA, η συγκεκριμένη τεχνολογία παρέχει μόνο σχετικές ποσότητες έκφρασης. Αυτό συμβαίνει γιατί το σήμα που μετρά ο ανιχνευτής σε μία δεδομένη θέση μικροσυστοιχίας συνήθως θεωρείται ότι είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του διαλύματος που έχει υβριδοποιηθεί σε αυτή τη θέση. Ωστόσο λόγω της κινητικής της υβριδοποίησης, το επίπεδο του σήματος σε αυτή τη θέση της συστοιχίας δεν είναι γραμμικά ανάλογο με τη συγκέντρωση των ειδών που υβριδοποιούνται με τη συστοιχία. Σε υψηλές συγκεντρώσεις υβριδοποίησης η συστοιχία θα είναι κορεσμένη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να μην υπάρχει πρόσδεση. Για αυτό το λόγο το σήμα ακολουθεί γραμμική αναλογία μόνο σε περιορισμένο εύρος συγκεντρώσεων στο διάλυμα.

Ακόμη είναι δύσκολος ο σχεδιασμός συστοιχιών στις οποίες δεν θα δεσμεύονται παραπάνω από μία αλληλουχίες στον ίδιο ανιχνευτή, ειδικά στα πολύπλοκα γονιδιώματα, σε ομόλογα γονίδια και σε οικογένειες γονιδίων με παραλλαγές ματίσματος, στα θηλαστικά, με αποτέλεσμα ύπαρξης ψευδώς θετικών πληροφοριών¹⁴⁵. Αλλά ένα ακόμη βασικό πρόβλημα των μικροσυστοιχιών είναι ότι μπορούν να ανιχνεύσουν μόνο ακολουθίες που έχουν σχεδιαστεί να ανιχνεύουν. Παρά την ολοκλήρωση της αλληλούχησης του ανθρώπινου γονιδιώματος υπάρχουν περιοχές που δεν είναι γνωστή η λειτουργία τους. Πρόκειται για γονίδια που δεν έχουν βρεθεί ακόμη, ή που εκφράζουν μη κωδικό RNA και δεν έχει αναγνωρισθεί ότι εκφράζεται μέχρι τώρα. Επομένως το δυναμικό εύρος είναι περιορισμένο και είναι δυνατή η μελέτη μόνο γνωστών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

1.4.5 Μεθοδολογία μικροσυστοιχιών – Πειραματική διαδικασία

Ένα πείραμα μικροσυστοιχιών μπορεί να χωριστεί σε δύο βασικά τμήματα, το πρακτικό-εργαστηριακό σκέλος και στο σκέλος της επεξεργασίας των δεδομένων προς βιοπληροφορική ανάλυση.

Ειδικότερα:

Στο εργαστηριακό σκέλος τα βήματα που ακολουθούνται είναι:

1. Συλλογή των δειγμάτων, απομόνωση του συνολικού RNA από τα κύτταρα που θέλουμε αναλύονται για την κάθε κατάσταση.

2. Με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης παράγεται cDNA για όλα τα δείγματα.
3. Μεταγραφή του cDNA σε cRNA και ταυτόχρονα πραγματοποιείται η σήμανση των δειγμάτων με προσθήκη φθοριούχων μορίων.
4. Υβριδοποίηση στην πλακέτα μικροσυστοιχιών και απομάκρυνση υπολειμμάτων που δεν έχουν υβριδοποιηθεί μέσω πλύσης.
5. Εισαγωγή της σε σαρωτή και αποτύπωση της σε ψηφιακή μορφή.

Στο σκέλος επεξεργασίας των δεδομένων τα βήματα που ακολουθούνται είναι:

1. Ψηφιακή επεξεργασία της εικόνας (κατάτμηση, εφαρμογή πλέγματος, εξαγωγή έντασης μέσω ποσοτικοποίησης του σήματος)
2. Επεξεργασία δεδομένων (διόρθωση υποβάθρου, κανονικοποίηση, φιλτράρισμα, κ.α.)
3. Ανάλυση δεδομένων με χρήση στατιστικών μεθόδων για την ανάδειξη γονιδίων με διαφορετική έκφραση.

Η μορφολογία της πλακέτας μικροσυστοιχιών συνίσταται από σειρές μικροσκοπικών οπών, οι οποίες είναι κατάλληλα σχηματισμένες σε μία γυάλινη επιφάνεια. Έχουν διαταχθεί σε μορφή πίνακα και απαρτίζουν τα σημεία πρόσδεσης γνωστών ακολουθιών DNA. Η δημιουργία των αλληλουχιών, το 'τύπωμα' δηλαδή στις φωτογραφικές πλάκες, γίνεται με ρομποτικά μηχανήματα με διαφορετικό τρόπο ανάλογα την εταιρεία¹⁴⁶.

Η απόκτηση της ψηφιακής εικόνας του υβριδοποιημένου πλακιδίου λαμβάνεται μέσω ενός συστήματος σάρωσης μικροσυστοιχιών, όπου χρησιμοποιεί μια πηγή φωτός με συγκεκριμένο μήκος κύματος για την σωστή διέγερση της φθορίζουσας χρωστικής των υβριδοποιημένων αλληλουχιών, ανιχνεύοντας την εκπεμπόμενη ακτινοβολία. Με αυτό τον τρόπο γίνεται η εκτίμηση της συγκέντρωσης των επισημασμένων αλληλουχιών του δείγματος λόγω παραδοχής ότι η συγκέντρωση τους εξαρτάται από την ένταση φθορισμού. Στην συνέχεια με τη χρήση λογισμικού για την ανάλυση της εικόνας γίνεται ποσοτικοποίηση της έντασης του σήματος και ακολουθεί η επεξεργασία των ψηφιακών δεδομένων που προέκυψαν^{147,148}.

1.4.6 Μεθοδολογία μικροσυστοιχιών – Βιοπληροφορική ανάλυση

Μετά την ποσοτικοποίηση των εντάσεων της ψηφιακής εικόνας του υβριδοποιημένου πλακιδίου ακολουθεί η προεπεξεργασία των δεδομένων για την

μείωση της μεταβλητότητας και του θορύβου που υπάρχει εγγενώς λόγω τεχνικών σταδίων της πειραματικής διαδικασίας. Σκοπός είναι η διόρθωση τεχνικών σφαλμάτων έτσι ώστε η διακύμανση των παραγόμενων δεδομένων να οφείλεται αποκλειστικά στην πραγματική διαφορική έκφραση γονιδίων των υπό μελέτη δειγμάτων. Σημαντικές πηγές μεταβλητότητας και θορύβου προκύπτουν κατά τα στάδια κατασκευής της μικροσυστοιχίας, την συλλογή δειγμάτων και απομόνωσης RNA, την παραγωγή εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση, κατά την υβριδοποίηση, κατά την έκπλυση, κατά την απόκτηση και επεξεργασία της ψηφιακής εικόνας¹⁴⁹.

Την διόρθωση υποβάθρου ακολουθεί η κανονικοποίηση των τιμών έντασης. Το βήμα της κανονικοποίησης είναι βασικό για την μείωση της μεταβλητότητας έτσι ώστε να γίνει προσαρμογή των δεδομένων και να απομακρυνθούν τα συστηματικά σφάλματα όπως έχει ειπωθεί παραπάνω.

Στην συνέχεια ακολουθεί ο λογαριθμικός μετασχηματισμός δεδομένων ώστε να επιτευχθεί ένα συνεχές σύνολο τιμών καθώς επίσης και η συμμετρική έκφραση των υπερεκφραζόμενων και υποεκφραζόμενων γονιδίων. Η εφαρμογή του λογαριθμικού μετασχηματισμού διαφοροποιεί το σύνολο τιμών τους και έχει ως επακόλουθο τη σταθεροποίηση της διακύμανσης ιδιαιτέρως ανάμεσα στις ενδιάμεσες και στις υψηλές τιμές έντασης¹⁵⁰. Η χρήση του λογαριθμικού μετασχηματισμού προτιμάται γιατί:

- η διακύμανση των λογαριθμικών τιμών έντασης εξαρτάται λιγότερο από τις απόλυτες τιμές
- η κανονικοποίηση λαμβάνει χώρα προσθετικά
- γίνεται εξομάλυνση των υψηλά ασύμμετρων κατανομών
- προσδίδεται περισσότερο πραγματική εικόνα της διακύμανσης

Τέλος ακολουθεί η στατιστική επιλογή που γίνεται για την ανάδειξη των γονιδίων σχετικής διαφορικής έκφρασης. Η στατιστική επιλογή μπορεί να γίνει με την χρήση στατιστικών τεστ, σε περιπτώσεις ύπαρξης μιας κατηγορίας πειραμάτων, που βασίζονται σε έλεγχο υποθέσεων σε γνωστές κατανομές, όπως είναι η t και η z , εφόσον θεωρούμε ότι οι μέσες τιμές των διαθέσιμων τεχνικών αντιγράφων ακολουθούν την κανονική κατανομή. Στην περίπτωση περισσότερων κατηγοριών πειραμάτων διεξάγονται στατιστικά τεστ που έχουν να κάνουν με την ανάλυση διασποράς (ANOVA) ή με την χρήση μη παραμετρικών στατιστικών τεστ. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και

πειράματα με χρονική διάσταση και τα γονίδια διαφορετικής έκφρασης που προκύπτουν μεταξύ των πειραμάτων και όχι για κάθε κατηγορία ξεχωριστά. Με την ανάλυση διασποράς μπορούν να βρεθούν γονίδια η έκφραση των οποίων αλλάζει σε όλο το εύρος των πειραμάτων¹⁵¹.

1.5 Οντολογίες γονιδίων

1.5.1 Gene Ontology Project

Το Gene Ontology Project είναι μία μεγάλη πρωτοβουλία στον τομέα της βιοπληροφορικής για την ανάπτυξη υπολογιστικής αναπαράστασης της εξελισσόμενης πληροφορίας που παράγεται, για τον τρόπο κωδικοποίησης των βιολογικών λειτουργιών των γονιδίων σε μοριακό, κυτταρικό και επίπεδο ιστού. Επειδή τα βιολογικά συστήματα είναι πολύπλοκα, μόνο με την χρήση υπολογιστικών συστημάτων μπορεί να γίνει αναπαράσταση και διαχείριση αυτής της πληροφορίας. Μέσω αυτού του ερευνητικού έργου έχει γίνει η ανάπτυξη τυποποιημένων οντολογιών που αντιπροσωπεύουν πάνω από 40.000 βιολογικές έννοιες. Η συνεχής αναθεώρηση τους είναι βασικό μέρος της έρευνας ώστε να ακολουθούνται οι νέες ανακαλύψεις.

1.5.2 Σκοπός του Gene Ontology Project

Το έργο αυτό παρέχει οντολογίες γονιδίων που απαρτίζουν βιβλιοθήκες με καταχωρημένα λεξιλόγια όρων που εκπροσωπούνται από γονιδιακά προϊόντα. Μια ποικιλία βιολογικών όρων περιγράφει ολοκληρωμένα κάθε γονίδιο σε σχέση με τα προϊόντα και τα παράγωγα του (RNA, πρωτεΐνες, μέρη που εκφράζεται κλπ.). Επίσης παρέχει εργαλεία για την πρόσβαση και επεξεργασία αυτών των δεδομένων.

Σκοπός της δημιουργίας οντολογιών γονιδίων είναι η διευκόλυνση της εξαγωγής συμπερασμάτων μέσα από την μελέτη ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων χωρίς να είναι απαραίτητη η διερεύνηση της σύνθεσης της πληροφορίας στο επίπεδο των λειτουργικών εγγράφων μεμονωμένων γονιδίων. Οι συσχετίσεις γονιδίων όπως και οι περιγραφές των όρων κάθε οντολογίας ονομάζονται GO annotations¹⁵².

1.5.3 Δομή οντολογίας γονιδίων

Η οντολογία γονιδίων είναι ένα δομημένο μη κυκλικό γράφημα όπου ο κάθε όρος είναι κόμβος στο γράφημα και οι σχέσεις/ιδιότητες μεταξύ όρων είναι άκρες. Κάθε όρος μπορεί να έχει περισσότερους από έναν γονείς και κανένα ή ένα ή παραπάνω παιδιά. Οι όροι καλύπτουν τρεις τομείς: Κυτταρική θέση, Μοριακή λειτουργία, Βιολογική διεργασία.

Η κυτταρική θέση αποτελείται από τα μέρη ενός κυττάρου ή του εξωκυτταρικού περιβάλλοντός του όπου δρουν τα παράγωγα των γονιδίων που περιλαμβάνονται στους συγκεκριμένους όρους.

Παράδειγμα όρων κυτταρικής θέσης είναι τα proteasome complex, cytosol, actin cytoskeleton.

Η μοριακή λειτουργία αποτελείται από όρους που εκφράζουν στοιχειώδεις λειτουργίες και αντιδράσεις παραγώγων γονιδίων που περιλαμβάνονται στους συγκεκριμένους όρους.

Παράδειγμα όρων μοριακής λειτουργίας είναι τα chemokine activity, alpha-tubulin binding, phospholipase A2 activity.

Η βιολογική διεργασία αποτελείται από όρους που εκφράζουν λειτουργίες ή σύνολα μοριακών γεγονότων με μία καθορισμένη αρχή και σχετίζονται με ολοκληρωμένες μονάδες διαβίωσης: κύτταρα, ιστοί, όργανα και οργανισμοί.

Παράδειγμα όρων βιολογικής διεργασίας είναι τα negative regulation of growth, NIK/NF-kappaB signaling, inflammatory response.

Οι κόμβοι που βρίσκονται πιο κοντά στην ρίζα αποτελούν ευρύτερους όρους ενώ οι κόμβοι που βρίσκονται πιο κοντά στα φύλλα απαρτίζουν πιο συγκεκριμένους όρους, ενώ τα φύλλα είναι οι πιο εξειδικευμένοι όροι. Οι σχέσεις μεταξύ των κόμβων μπορούν να ερμηνευθούν με συγκεκριμένους τρόπους:

1.A είναι B

2.B είναι μέρος του C

3.A είναι μέρος του C επειδή είναι B

Άλλες σχέσεις μπορεί να είναι: το A έχει μέρος το B, το A ρυθμίζει (θετικά ή αρνητικά) το B¹⁵².

1.5.4 Παράδειγμα όρου βιολογικής διεργασίας της Gene Ontology

id: GO:0016049

name: cell growth

namespace: biological_process

def: "The process in which a cell irreversibly increases in size over time by accretion and biosynthetic production of matter similar to that already present." [GOC:ai]

subset: goslim_generic

subset: goslim_plant

subset: gosubset_prok

synonym: "cell expansion" RELATED []

synonym: "cellular growth" EXACT []

synonym: "growth of cell" EXACT []

is_a: GO:0009987 ! cellular process

is_a: GO:0040007 ! growth

relationship: part_of GO:0008361 ! regulation of cell size¹⁵²

1.6 Gene Expression Omnibus (GEO)

1.6.1 Σκοπό της GEO

Η βάση δεδομένων λειτουργικής γονιδιωματικής Gene Expression Omnibus (GEO)^{153,154} είναι ένα δημόσιο αποθετήριο του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών (National Center for Biotechnology Information, NCBI)¹⁵⁵ πειραμάτων υψηλής απόδοσης.

The screenshot shows the top of the GEO website. At the top is a navigation bar with links for NCBI, Resources, How To, and a sign-in link. Below this is a secondary navigation bar with links for GEO Home, Documentation, Query & Browse, and Email GEO. The main heading is "Gene Expression Omnibus" with a description: "GEO is a public functional genomics data repository supporting MIAME-compliant data submissions. Array- and sequence-based data are accepted. Tools are provided to help users query and download experiments and curated gene expression profiles." To the right is the GEO logo. Below the description is a search bar with the placeholder text "Keyword or GEO Accession" and a "Search" button. The page is divided into three main columns: "Getting Started" (with links like Overview, FAQ, About GEO DataSets, etc.), "Tools" (with links like Search for Studies at GEO DataSets, Search for Gene Expression at GEO Profiles, etc.), and "Browse Content" (with a table showing Repository Browser, DataSets: 4348, Series: 80039, Platforms: 16880, Samples: 2075725). At the bottom is a link for "Information for Submitters".

Repository Browser	
DataSets:	4348
Series:	80039
Platforms:	16880
Samples:	2075725

Εικόνα 1-7 Αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων λειτουργικής γονιδιωματικής GEO

1.6.2 Δομή της GEO

Στο δημόσιο αποθετήριο GEO έχει δημιουργηθεί ένα σύνολο κανόνων αρχειοθέτησης των συνόλων δεδομένων για την ευκολότερη διαχείριση τους. Για κάθε

διαφορετική πλατφόρμα για πειράματα μικροσυστοιχιών υπάρχει ένας συγκεκριμένος κωδικός GPL (GEO Platform). Για κάθε δείγμα υπάρχει ένας συγκεκριμένος κωδικός GSM (GEO Sample) που ανήκει σε μία πλατφόρμα.

Κάθε πείραμα μικροσυστοιχιών, αποτελείται από μία σειρά GSM που έχει ένα μοναδικό αριθμό GSE (GEO Series) και αποτελείται από ένα ή περισσότερα σύνολα δειγμάτων GSE που ανήκουν σε μία ή περισσότερες πλατφόρμες GPL. Παρόλο που ένας κωδικός GSM μπορεί να ανήκει σε περισσότερο από ένα σύνολο GSE, αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ανάλυση είναι μοναδικά ως προς τα GSE τους. Για κάθε σύνολο δεδομένων έχει σχηματιστεί μία επιμελημένη συλλογή περισσότερων του ενός δειγμάτων (GSMs), με συγκεκριμένο κωδικό GDS (GEO DataSet), τα οποία ανήκουν συγκεκριμένα σε μία πλατφόρμα GPL και ένα σύνολο δεδομένων GSE¹⁵⁶.

1.7 Σκοπός Διπλωματικής εργασίας

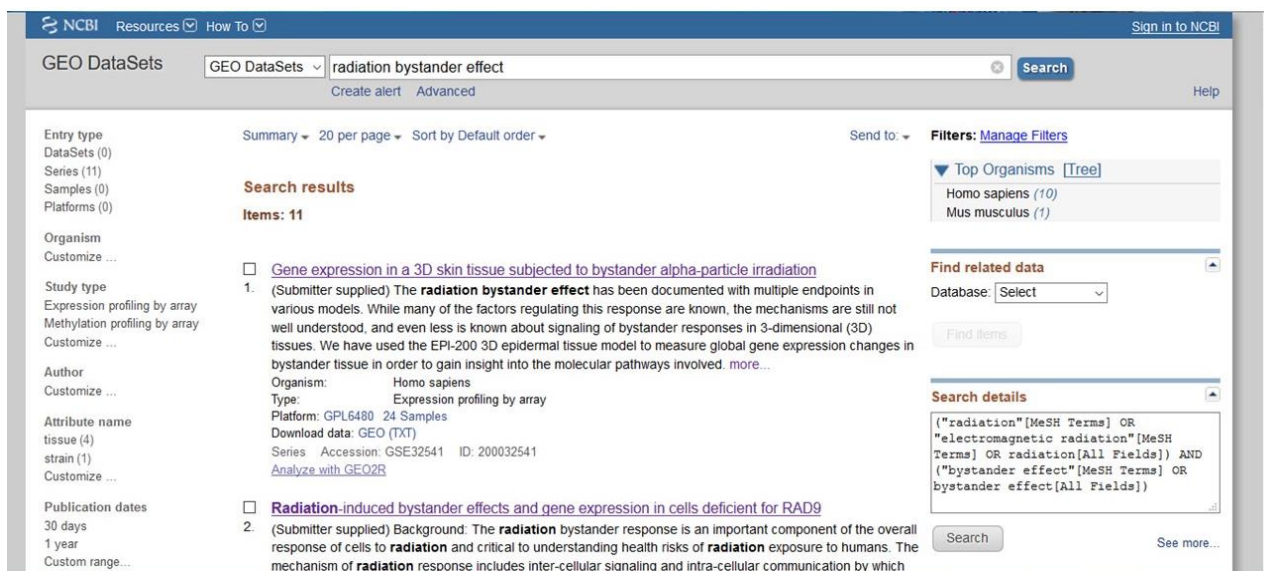
Σκοπός της διπλωματικής εργασίας στο πλαίσιο του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών στην Βιοπληροφορική είναι η διαπίστωση της φύσης φαινομένων απόκρισης γειννίας που θεωρούνται μέρος των συστημικών δράσεων της ακτινοβολίας, μέσω της ανάπτυξης γενικευμένων υπολογιστικών μεθοδολογιών ανάλυσης δεδομένων μικροσυστοιχιών και της χρήσης αυτών σε βιοπληροφορικά εργαλεία λειτουργικής ανάλυσης ώστε να οδηγηθούμε στην αναγνώριση των μοριακών σηματοδοτικών μονοπατιών καθώς και των λειτουργιών που ενέχονται σε αυτά τα φαινόμενα. Η κατανόηση της φύσεως του σήματος, του χρονικού διαστήματος και πορείας εντάσεως της γονιδιακής έκφρασης καθώς επίσης και ο τρόπος απόκρισης λόγω γειννίας της ΙΑ στα παρακείμενα κύτταρα αποτελούν τις σημαντικότερες πληροφορίες για την κατανόηση του μοριακού μηχανισμού και της βιολογικής σημασίας των φαινομένων απόκρισης γειννίας.

1. ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Αναζήτηση των συνόλων δεδομένων μικροσυστοιχιών

1.1.1 Εύρεση των συνόλων δεδομένων μικροσυστοιχιών

Αρχικά έγινε αναζήτηση στο δημόσιο αποθετήριο του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών (National Center for Biotechnology Information, NCBI)¹⁵⁵ της βάσης δεδομένων λειτουργικής γονιδιωματικής Gene Expression Omnibus (GEO)^{153,154} με χρήση του όρου : 'radiation bystander effect' για την εύρεση πειραματικών δεδομένων μικροσυστοιχιών.



Εικόνα 1-1 Σελίδα αναζήτησης συνόλων δεδομένων πειραμάτων μικροσυστοιχιών της βάσης λειτουργικής γονιδιωμικής GEO

1.1.2 Αποτελέσματα αναζήτησης συνόλων δεδομένων μικροσυστοιχιών

Τα σύνολα δεδομένων προς ανάλυση σε αυτή την εργασία ανήκουν σε τρία διαφορετικά GPL:

- GPL6480: Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F (Probe Name version)
- GPL13497: Agilent-026652 Whole Human Genome Microarray 4x44K v2 (Probe Name version)
- GPL6884 Illumina HumanWG-6 v3.0 expression bead chip.

Ως αποτέλεσμα της αναζήτησης δόθηκαν από την βάση 11 αποτελέσματα, από τα οποία τα 10 είχαν γίνει σε ανθρώπινα κύτταρα και 1 είχε γίνει με ποντικού (*Mus musculus*). Η διερεύνηση των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ αποφασίσθηκε ότι θα γινόταν μόνο σε ανθρώπινα κύτταρα και έτσι διαλέχθηκαν προς ανάλυση τα 10 από τα 11 αποτελέσματα, με κωδικούς GSE32541, GSE55869, GSE32091, GSE23899, GSE23804, GSE21059, GSE25772, GSE18760, GSE12435, GSE8993.

Από τα 10 σύνολα δεδομένων και αξιοποιώντας τις πληροφορίες σχετικά με τις πειραματικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν σε κάθε ένα ξεχωριστά, καταλήξαμε σε 7 σύνολα δεδομένων προς βιοπληροφορική ανάλυση. Τα σύνολα δεδομένων

GSE32541, GSE23804, GSE23899 δεν χρησιμοποιήθηκαν στην βιοπληροφορική ανάλυση, επειδή περιείχαν αντιφατικά αρχεία πληροφορίας σχέσεων σχετικά μεταξύ δειγμάτων και δεδομένων. Επίσης η έλλειψη δημοσίευσης των αποτελεσμάτων στα 3 αυτά σύνολα δεδομένων ήταν ακόμη ένα αποτρεπτικός παράγοντας χρήσης τους.

Τελικά 7 από τα 11 σύνολα δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν για βιοπληροφορική ανάλυση:

GSE55869¹⁵⁷, GSE32091¹⁵⁸, GSE21059¹⁵⁹, GSE25772¹⁶⁰, GSE18760¹⁶¹, GSE12435¹⁶², GSE8993¹⁶³.

ΣΥΝΟΛΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

GEO Series	GSE12435	GSE18760	GSE21059	GSE55869	GSE32091	GSE25772	GSE8993
ΤΥΠΟΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ	α-particles					γ-RAY	carbon-ion
ΧΡΟΝΟΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ (ΩΡΕΣ)	4	0.5	0.5, 1, 2, 4, 6, 24	4	4, 8, 26		2, 6
ΔΟΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ (Gy)	0.5			1	0.1	2	1.3, 0.13, 0.013
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ	IMR-90 primary lung fibroblast			H1299 non-small cell lung carcinoma cells	F11-hTERT immortalized foreskin fibroblasts		AG01522D primary normal human diploid skin fibroblasts

Εικόνα 1-2 Πίνακας περιγραφής βασικών πληροφοριών για το κάθε σύνολο δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε. Περιγράφεται ο σωματιδιακός τύπος ιοντίζουσας ακτινοβολίας, ο χρόνος εξαγωγής του RNA από τα κύτταρα μετά την ακτινοβολή τους, η δόση της ακτινοβολίας και τέλος η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για το κάθε πείραμα

1.2 Βιοπληροφορική ανάλυση συνόλων δεδομένων μικροσυστοιχιών

1.2.1 Λήψη των αρχείων των συνόλων δεδομένων

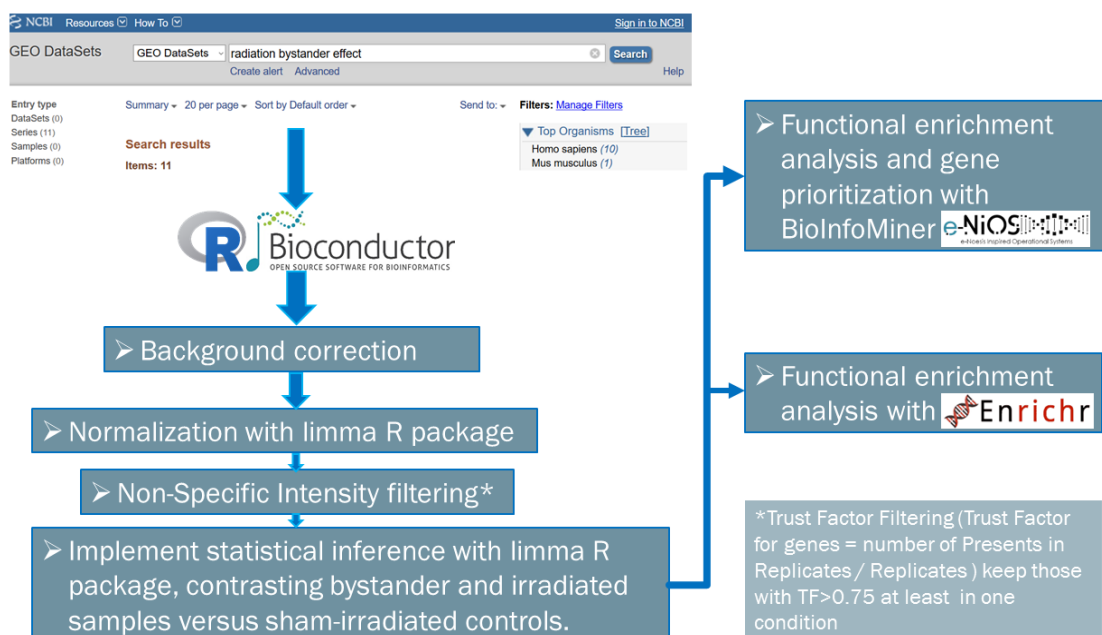
Για την αρχική βιοπληροφορική ανάλυση των συνόλων δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η γλώσσα προγραμματισμού R164 [R version 3.3.2 (2016-10-31)], με χρήση του γραφικού περιβάλλοντος χρήστη Rstudio165 [RStudio 1.0.136 (2016-12-21)]. Ειδικότερα χρησιμοποιήθηκαν πακέτα βιοπληροφορικής και στατιστικής ανάλυσης από το Bioconductor166, ένα έργο ανάπτυξης λογισμικού ανοικτού κώδικα που παρέχει εργαλεία για την ανάλυση και την κατανόηση γονιδιωματικών δεδομένων που έχουν προκύψει από πειράματα υψηλής απόδοσης.

Το πρώτο βήμα για την λήψη των αρχείων που αποτελούνται τα σύνολα δεδομένων είναι η χρήση του πακέτου GEOquery167 για την εύρεση και 'κατέβασμα' των αρχείων που περιέχει το κάθε σύνολο δεδομένων της GEO που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση. Με χρήση της υπολογιστικής συνάρτησης getGEOSuppFiles() όπως δείχνει το εγχειρίδιο του πακέτου:

<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/manuals/GEOquery/man/GEOquery.pdf>

Λαμβάνονται τοπικά τα βασικά και συμπληρωματικά αρχεία του συνόλου δεδομένων προς ανάλυση. Επειδή τα αρχεία του συνόλου δεδομένων είναι συμπιεσμένα σε tar μορφή, χρησιμοποιείται η συνάρτηση untar() για την εξαγωγή τους. Στην συνέχεια χρησιμοποιώντας το αρχείο πληροφορίας σχέσεων μεταξύ δειγμάτων και δεδομένων(sample and data relationship format) από την βάση δεδομένων λειτουργικής γονιδιωματικής ArrayExpress168 , δημιουργήθηκαν δύο αντικείμενα στο περιβάλλον του Rstudio τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την μετέπειτα ανάλυση, ακολουθώντας το αρχείο οδηγιών χρήστη του πακέτου limma169–172 για Single Channel Agilent και Illumina Arrays του κεφαλαίου 17:

<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/limma/inst/doc/usersguide.pdf>



Εικόνα 1-3 Κύριος σκελετός της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε για την βιοπληροφορική ανάλυση των συνόλων δεδομένων μικροσυστοιχιών

1.2.2 Μεθοδολογίες διόρθωσης υποβάθρου

Στην συνέχεια ακολουθούνται διαφορετικοί τρόποι διόρθωσης υποβάθρου και κανονικοποίησης του συνόλου δεδομένων ανάλογα την πλατφόρμα στην οποία ανήκει το σύνολο δεδομένων.

Στην περίπτωση της Agilent για διόρθωση υποβάθρου χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση του πακέτου `limma backgroundCorrect()` με την μέθοδο "normexp"¹⁷². Για κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση `normalizeBetweenArrays()` με την μέθοδο "quantile"¹⁷³. Ακολουθεί ο σχηματισμός διαγνωστικών διαγραμμάτων για την οπτικοποίηση των εντάσεων σήματος φθορισμού των probes.

Στην περίπτωση πλατφόρμας Illumina χρησιμοποιείται για διόρθωση υποβάθρου και κανονικοποίηση η συνάρτηση του πακέτου `limma neqc()`¹⁷⁴. Χρησιμοποιεί του αρνητικούς ανιχνευτές ελέγχου δημιουργώντας μία κατανομή για να βρει ποιοι ανιχνευτές έχουν μεγαλύτερη τιμή έντασης και χρησιμοποιεί τους θετικούς και αρνητικούς ανιχνευτές ελέγχου για την κανονικοποίηση.

Με χρήση συγκεκριμένων συναρτήσεων : `hist()`, `boxplot()`¹⁶⁹, γίνεται η δημιουργία ιστογράμματος και θηκογράμματος. Με το ιστόγραμμα φαίνεται η κατανομή των εντάσεων σήματος των ανιχνευτών. Με τα διαγράμματα θηκογραμμάτων πριν και μετά την διόρθωση υποβάθρου και την κανονικοποίηση φαίνεται εάν έχει γίνει σωστή κανονικοποίηση και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην περαιτέρω ανάλυση.

1.2.3 Φιλτράρισμα εντάσεων ανιχνευτών

Επόμενο βήμα είναι το μη ειδικό φιλτράρισμα εντάσεων των ανιχνευτών έκφρασης (probes). Με χρήση της μεθοδολογίας του αρχείου οδηγιών χρήστη του πακέτου `limma` ακολουθείται η διαδικασία φιλτραρίσματος. Στην περίπτωση πλατφόρμων Agilent σε αυτό το βήμα φιλτράρονται οι ανιχνευτές ελέγχου (control probes) της μικροσυστοιχίας και όσοι έχουν πολύ χαμηλή έκφραση. Επειδή η Agilent χρησιμοποιεί αρνητικούς ανιχνευτές ελέγχου έκφρασης (negative control probes) χρησιμοποιούνται για να υπολογισθεί το 95% των αρνητικών ανιχνευτών ελέγχου έκφρασης σε κάθε συστοιχία και διατηρούνται οι ανιχνευτές έκφρασης που έχουν 10% περισσότερη ένταση σήματος από τους αρνητικούς ανιχνευτές ελέγχου έκφρασης, σε τουλάχιστον το 75% των δειγμάτων. Δηλαδή τρεις στις τέσσερις συστοιχίες (επειδή υπάρχουν τέσσερα βιολογικά δείγματα για κάθε κατάσταση $3/4=0.75$) για τα GSE12435, GSE18760, GSE21059, GSE25772 και GSE32091, ενώ για το GSE55869 $4/5$ (80%) καθώς και στο GSE8993

2/2 (100%). Έτσι, συνολικά διατηρούνται οι ανιχνευτές έκφρασης που εμφανίζονται σε τουλάχιστον μία από τις βιολογικές καταστάσεις.

Στην περίπτωση πλατφόρμας Illumina εκτός από το μη ειδικό φιλτράρισμα ακολουθεί και ένα δεύτερο φιλτράρισμα ως προς την ποιότητα των ανιχνευτών που βρίσκεται στην βάση δεδομένων illuminaHumanv3() για την συγκεκριμένη πλατφόρμα. Με την συγκεκριμένη μεθοδολογία, αφαιρούνται όσοι ανιχνευτές έχουν κακή ποιότητα σήματος ή δεν έχουν σωστή αντιστοίχιση ως προς το στόχο.

1.2.4 Διερευνητική ανάλυση δεδομένων (Exploratory Data Analysis)

Η διερευνητική ανάλυση δεδομένων είναι μία προσέγγιση που χρησιμοποιείται στον τομέα της στατιστικής για την ανάλυση των συνόλων δεδομένων ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά τους, συχνά με οπτικές μεθόδους. Η ανάλυση αυτή γίνεται για να μελετηθούν χαρακτηριστικά των δεδομένων που δεν παρατηρούνται με τις τυπικές μοντελοποιήσεις ή τις υποθέσεις δοκιμασιών¹⁷⁵.

Υπάρχει μία σειρά από συγκεκριμένες μεθόδους που χρησιμοποιούνται στην διερευνητική ανάλυση, τυπικές τεχνικές είναι:

Ιστόγραμμα συχνοτήτων, θηκόγραμμα, διάγραμμα διασποράς, διάγραμμα πολυδιάστατης διαβάθμισης (MDS plot), ανάλυση των κύριων συνιστωσών (PCA).

Τα διαγράμματα πολυδιάστατης διαβάθμισης και ανάλυσης κυρίων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση μη τυχαίων συσχετισμών μεταξύ των δειγμάτων οι οποίοι δεν αποτελούν βιολογικά ευρήματα αλλά έχουν προκύψει λόγω διακύμανσης των τεχνικών διαδικασιών (Batch effects) και αποτελούν πληροφορία-θόρυβο. Το σύνολο δεδομένων που προέκυψε μετά από το φιλτράρισμα εντάσεων των ανιχνευτών χρησιμοποιήθηκε για τον σχηματισμό διερευνητικών διαγραμμάτων MDS & PCA με χρήση των συναρτήσεων plotMDS()¹⁶⁹ και prcomp()¹⁷⁶.

1.2.5 Σχηματισμός συγκρίσεων και ανάλυσή τους

Ακολουθεί η χρήση της συνάρτησης averseps()¹⁷⁰ η οποία υπολογίζει το μέσο όρο τιμών έκφρασης για κάθε ανιχνευτή και των αντιγράφων του (duplicates) στην ίδια μικροσυστοιχία, μετατρέποντας τις τιμές τους σε αυτή του μέσου όρου τους. Στην συνέχεια, σχεδιάζεται με χρήση της συνάρτησης makeContrasts() ένας πίνακας που αντιστοιχεί τις παραμέτρους των βιολογικών καταστάσεων. Οι παράμετροι είναι συνήθως οι σταθερές (συντελεστές) ενός γραμμικού μοντέλου, έτσι ώστε ο παραπάνω πίνακας να καθορίζει ποιες συγκρίσεις μεταξύ των σταθερών πρέπει να εξαχθούν από

το γραμμικό μοντέλο. Στα σύνολα δεδομένων προς ανάλυση οι συγκρίσεις αφορούν τις κατηγορίες: control, bystander, irradiated και ειδικότερα τις συγκρίσεις:

BYvsCtrl = Bystander – control, IRvsCtrl = irradiated – control, IRvsBY = irradiated – bystander, για κάθε χρονικό σημείο.

Έπειτα, χρησιμοποιείται η συνάρτηση $\text{lmFit}()$ ^{169,170}. Η συνάρτηση αυτή ταιριάζει πολλαπλά γραμμικά μοντέλα σταθμισμένων ή γενικευμένων x τετραγώνων. Ένα γραμμικό μοντέλο δημιουργείται για κάθε ανιχνευτή προσαρμοσμένο από τα δεδομένα έκφρασης του. Οι συντελεστές των διαφόρων καταστάσεων των μοντέλων περιγράφουν τις διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που ανήκουν σε κάθε κατηγορία.

Με χρήση της συνάρτησης $\text{contrasts.fit}()$ ¹⁷⁰ η οποία λαμβάνει υπόψη το γραμμικό μοντέλο που έχει προκύψει από την $\text{lmFit}()$ ταιριάζει τα δεδομένα μικροσυστοιχιών υπολογίζοντας τους εκτιμώμενους συντελεστές και τα τυπικά σφάλματα για ένα δεδομένο σύνολο παραμέτρων που αποτελούν τις διαφορετικές βιολογικές καταστάσεις. Στην ουσία αναπροσαρμόζει το γραμμικό μοντέλο σύμφωνα με τις παραμέτρους των καταστάσεων που λαμβάνει υπολογίζοντας εκ νέου τους εκτιμώμενους συντελεστές, τις τυπικές αποκλίσεις και τους πίνακες συσχετίσεων για κάθε συγκεκριμένη διαφορά (BYvsCtrl, IRvsCtrl, IRvsBY) που υποβάλλεται.

Εν συνεχεία γίνεται χρήση της συνάρτησης $\text{eBayes}()$ ^{170,171} η οποία χρησιμοποιείται για την κατάταξη των γονιδίων ως προς την εύρεση διαφορικής έκφρασης. Χρησιμοποιεί μία εμπειρική Μπαεσιανή μεθοδολογία για την συρρίκνωση των διακυμάνσεων μεταξύ ανιχνευτών προς μία κοινή τιμή και αυξάνει του βαθμούς ελευθερίας για τις επιμέρους διαφορές¹⁶⁹. Η Μπαεσιανή εμπειρική μεθοδολογία προσαρμοσμένου t -στατιστικού τεστ δοκιμάζει κάθε επιμέρους διαφορά ίση με το μηδέν. Για κάθε ανιχνευτή το προσαρμοσμένο t -στατιστικό τεστ δοκιμάζει αν όλες οι διαφορές είναι ίσες με το μηδέν. Επιπρόσθετα, σε συγκεκριμένες στατιστικές συγκρίσεις, όπως το σύνολο δεδομένων GSE21059 που περιέχει time-series χρησιμοποιήθηκε το F -στατιστικό τεστ που υπολογίζεται από τα συνολικά t -στατιστικά τεστ για τον συγκεκριμένο ανιχνευτή. Είναι ακριβώς ανάλογο με το απλό ANOVA τεστ με μόνη διαφορά ότι έχει γίνει προσαρμογή των μέσων τετραγώνων καταλοίπων και των βαθμών ελευθερίας καταλοίπων μεταξύ των ανιχνευτών.

Η επόμενη συνάρτηση που χρησιμοποιείται είναι η $\text{topTable}()$ ¹⁶⁹ η οποία συνοψίζει το αποτέλεσμα του γραμμικού μοντέλου που έχει προκύψει από την $\text{eBayes}()$ επιλέγοντας τα υψηλότερα στην κατάταξη γονίδια ως προς την διαφορική έκφραση για

κάθε λαμβάνουσα διαφορά. Στις τιμές p έχει γίνει διόρθωση πολλαπλών δοκιμών με χρήση του False Discovery Rate (FDR)¹⁷⁷, όπου είναι η αναμενόμενη τιμή των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων διαιρούμενα με τον συνολικό αριθμό των αποτελεσμάτων.

Ακολουθεί η χρήση των βάσεων δεδομένων ανάλογα με την πλατφόρμα hgug4112a.db / illuminaHumanv3.db / HsAgilentDesign026652.db οι οποίες παρέχουν λεπτομέρειες και πληροφορίες σχετικά με την ανάλογη πλατφόρμα και ενημερώνονται 2 φορές τον χρόνο. Με αυτό τον τρόπο γίνεται η αντιστοίχιση των ανιχνευτών με τα συγκεκριμένα ονόματα γονιδίων σύμφωνα με την HUGO Gene Nomenclature Committee¹⁷⁸, που είναι η παγκόσμια αρχή για την απονομή τυποποιημένης ονοματολογίας των ανθρώπινων γονιδίων.

Τελευταίο βήμα πριν την λήψη λίστας διαφορεικά εκφρασμένων γονιδίων είναι ο υπολογισμός της μέσης απόλυτης διακύμανσης^{179–181} των εντάσεων για κάθε ανιχνευτή και η χρήση των ανιχνευτών με τη μεγαλύτερη τιμή μέσης απόλυτης διακύμανσης ώστε να χρησιμοποιηθούν αυτοί στην αντιστοίχιση με ονόματα γονιδίων.

Ως διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια λαμβάνονται όσα έχουν διορθωμένη τιμή p (FDR adj. P value) μικρότερη του 0.05 (FDR < 0.05) και απόλυτο $\log_2(\text{Fold Change})$ μεγαλύτερο του 0.5 (δηλαδή αν $\log_2\text{FC}=1$ τότε σημαίνει διπλάσια έκφραση σε σχέση με τη συνθήκη ελέγχου και $\log_2\text{FC}= -1$ υποδηλώνει μείωση στο μισό).

1.2.6 Διάγραμμα ανάλυσης κυρίων συνιστωσών και πολυδιάστατης διαβάθμισης

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών και η ανάλυση πολυδιάστατης διαβάθμισης ανήκουν στις τεχνικές μείωσης διαστάσεων. Έχουν ως στόχο να αναδείξουν τις κυριότερες διαφορές μεταξύ των στοιχείων μιας δομής δεδομένων, όπως είναι τα πρότυπα έκφρασης γονιδίων που έχουν προκύψει από τα πειράματα μικροσυστοιχιών, μειώνοντας και παρουσιάζοντας τα χαρακτηριστικά τους που ευθύνονται για τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία του δείγματος. Οι τεχνικές αυτές βασίζονται σε μια σταδιακή μεγιστοποίηση της διασποράς των επιμέρους τιμών που χαρακτηρίζουν τα στοιχεία. Στη μέθοδο πολυδιάστατης διαβάθμισης που χρησιμοποιήθηκε υπολογίζεται για κάθε ζεύγος των δειγμάτων η ευκλείδεια απόσταση με βάση το $\log_2\text{FoldChange}$ για τα top500 διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια.

1.2.7 Διάγραμμα Ηφαιστείου (volcano plot)

Πρόκειται για ένα διάγραμμα σκέδασης όπου κάθε σημείο αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο. Οι καρτεσιανές συντεταγμένες του κάθε γονιδίου είναι η τιμή $\log_2\text{FoldChange}$

στον οριζόντιο άξονα και ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος του p-value στον κάθετο. Όσο ψηλότερα στον κάθετο άξονα βρίσκεται ένα σημείο τόσο πιο στατιστικά σημαντική διαφορική έκφραση έχει. Όσο πιο μακριά από το σημείο 0 στον οριζόντιο άξονα, τόσο πιο μεγάλη ένταση διαφοράς έκφρασης έχει.

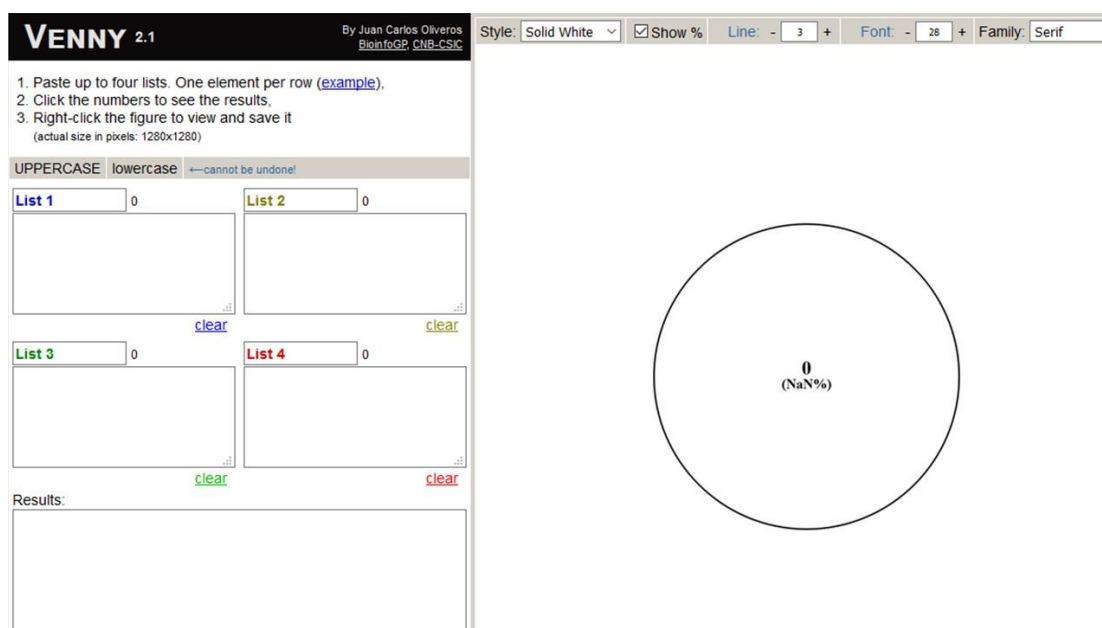
1.2.8 Δενδρόγραμμα

Είναι ένας τύπος διαγράμματος που παρουσιάζει τα αποτελέσματα ιεραρχικής ομαδοποίησης (Hierarchical Clustering). Οι κάθετες γραμμές δηλώνουν συνδυασμούς ομάδων παρατηρήσεων, ενώ το μήκος κάθε γραμμής δηλώνει την απόσταση κατά την οποία οι ομάδες συνδυάζονται.

1.2.9 Διάγραμμα Venn

Είναι μία μορφή διαγράμματος που δείχνει όλες τις πιθανές λογικές σχέσεις μεταξύ ενός πεπερασμένου αριθμού στοιχείων ενός συνόλου με ένα άλλο. Χρησιμοποιούνται για την απεικόνιση των ποσοστών ομοιότητας μεταξύ συνόλων.

Χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό εργαλείο Venny¹⁸² για την δημιουργία διαγραμμάτων Venn μεταξύ των διαφόρων λιστών γονιδίων που έχουν προκύψει από την ανάλυση.



Εικόνα 1-4 Σελίδα εισαγωγής λιστών γονιδίων για την αναζήτηση κοινών σχέσεων, Venny. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>

1.2.10 Θερμικό Διάγραμμα ή Θερμικός Χάρτης (Heatmap)

Οι θερμικοί χάρτες είναι δισδιάστατες αναπαραστάσεις ομαδοποιημένων δεδομένων όπου οι τιμές τους αναπαρίστανται ως διαφορετικά χρώματα.

Χρησιμοποιούνται στην Βιολογία για να αναπαραστήσουν αντιπροσωπευτικά τα επίπεδα έκφρασης πολλών γονιδίων σε συγκρίσιμα δείγματα (π.χ. κύτταρα σε διαφορετικές καταστάσεις, δείγματα από ασθενείς, κλπ.) όπως προκύπτουν από πειράματα υψηλής απόδοσης. Χρησιμοποιούνται διαβαθμίσεις χρωμάτων (πράσινο, κόκκινο, μαύρο) για την εμφάνιση των διαφορετικού τύπου εκφράσεων μεταξύ των δειγμάτων. Η δημιουργία θερμικού χάρτη έγινε με την χρήση του πακέτου ComplexHeatmap και της συνάρτησης Heatmap()¹⁸³.

1.3 Λειτουργική ανάλυση αποτελεσμάτων

1.3.1 Λειτουργική ανάλυση και ιεράρχηση γονιδίων με χρήση εργαλείου BioInfoMiner

Η κύρια μεθοδολογία του διαδικτυακού βιοπληροφορικού εργαλείου BioInfoMiner βασίζεται στις δημοσιεύσεις των επικυρωμένων αλγόριθμων stRAnGER¹⁸⁴ και GOrevenge¹⁸⁵, οι οποίοι έχουν επανασχεδιαστεί και ενημερώνονται. Αναλυτικότερα ο stRAnGER¹⁸⁴ αλγόριθμος εκτελεί μεθοδολογία στατιστικού εμπλουτισμού, προκειμένου να συνδέσει την λίστα γονιδίων που εισάχθηκε με εμπλουτισμένους όρους οντολογιών γονιδίων (GO terms) οι οποίοι μπορεί να σχετίζονται με το φαινότυπο ενδιαφέροντος.

Τα βήματα του πλαισίου εμπλουτισμού είναι τα ακόλουθα:

Ο χρήστης καλείται να εισάγει μια λίστα γονιδίων (με αναγνωριστικά ονόματα γονιδίων είτε Gene Symbols είτε Ensembl Gene ID) με τα p-values που προήλθαν από την στατιστική ανάλυση εύρεσης διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων και προαιρετικά με τα fold changes. Στην συνέχεια υπολογίζεται υπεργεωμετρικό p-value με χρήση υπεργεωμετρικού τεστ βάση της υπεργεωμετρικής κατανομής, σύμφωνα με το καθορισμένο όριο υπεργεωμετρικού p-value που έχει θέσει ο χρήστης (στην παρόν εργασία ήταν $p\text{-value} < 0.05$). Οι όροι οντολογιών γονιδίων που εξάγονται από την ανάλυση εμπλουτισμού με μεγαλύτερη τιμή από το καθορισμένο όριο του χρήστη φιλτράρονται. Οι όροι που έχουν επιστραφεί από τον αλγόριθμο με διορθωμένη τιμή p-value κατατάσσονται με βάση εμπειρικής αναδειγματοληψίας (bootstrapping) με προτιμώμενους όσους εμφανίζονται με τιμή p-value μικρότερη από το καθορισμένο όριο του χρήστη. Με αυτό το δεύτερο στάδιο οι περισσότεροι συστημικοί όροι ευνοούνται, οι οποίοι πιθανώς να αντιπροσωπεύουν λειτουργικά συμπλέγματα γονιδίων που σχετίζονται με το φαινότυπο ή την ασθένεια προς διερεύνηση.

Η έξοδος του αλγορίθμου stRAnGER χρησιμοποιείται ως είσοδος στον αλγόριθμο GOrevenge, ο οποίος εντοπίζει και ιεραρχεί τα 'κομβικά' γονίδια, αξιοποιώντας τη δομή του δένδρου των οντολογιών. Αυτά τα γονίδια αποτελούν κεντρικό ρόλο σε μια πληθώρα από ξεχωριστές διεργασίες. Αυτές οι διεργασίες αποτελούν ζωτικής σημασίας ρυθμιστικούς μηχανισμούς του κυττάρου, οι οποίοι θα μπορούσαν ενδεχομένως να επηρεάσουν την κυτταρική ομοιόσταση και στην συνέχεια το φαινόμενο προς μελέτη.

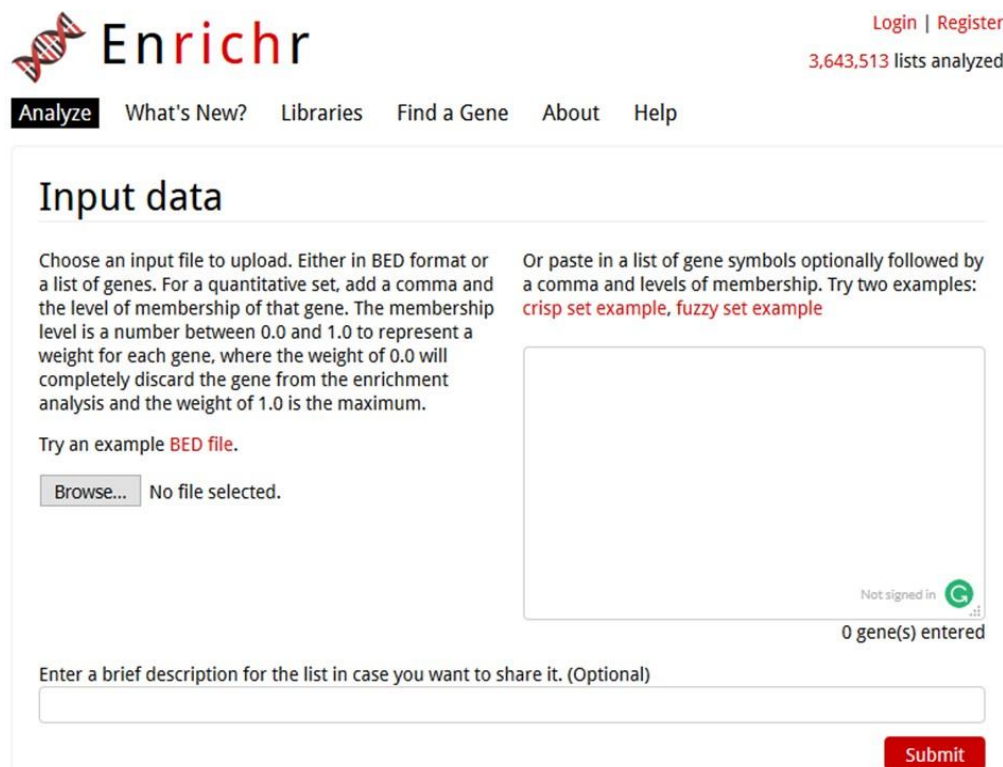
Ιστοσελίδα Εργαλείου: <https://bioinfominer.com/>

1.3.2 Λειτουργική ανάλυση με χρήση εργαλείου EnrichR

Το βιοπληροφορικό εργαλείο λειτουργικής ανάλυσης EnrichR^{186,187} χρησιμοποιεί τρεις τύπους εμπλουτισμού της βαθμολογίας κατάταξης ενός όρου (GO term) για την εκτίμηση της επικάλυψης των γονιδίων που εισάχθηκαν και του συνόλου γονιδίων κάθε βιβλιοθήκης που χρησιμοποιεί το εργαλείο.

Ο πρώτος τύπος είναι η ακριβής δοκιμασία Fisher που χρησιμοποιείται συχνά σε μεθοδολογίες λειτουργικής ανάλυσης. Ο δεύτερος τύπος είναι μια διόρθωση της δοκιμασίας Fisher με χρήση τον υπολογισμό αρχικά της δοκιμασίας Fisher για πολλές λίστες τυχαίων γονιδίων που εισάγονται ώστε να υπολογιστεί μία μέση τιμή και η τυπική της απόκλιση για κάθε όρο οντολογίας γονιδίων, για κάθε βιβλιοθήκη γονιδιακών όρων. Στην συνέχεια χρησιμοποιώντας ένα πίνακα με τις αναμενόμενες τιμές των διακυμάνσεων του υπολογίζουν το z-score για την απόκλιση τους από την αναμενόμενη τιμή. Αυτή μπορεί να είναι μια νέα διορθωμένη τιμή κατάταξης στις οντολογίες γονιδίων. Για τρίτο τύπο εμπλουτισμού χρησιμοποιούν μία συνδυαστική τιμή που αποτελείται από τον πολλαπλασιασμό του λογάριθμου του p-value που υπολογίζει η δοκιμασία Fisher με το z-score που προκύπτει από το δεύτερο τύπο εμπλουτισμού διόρθωσης βαθμολογίας.

Ο χρήστης ακολουθεί τον ίδιο τρόπο με το προηγούμενο εργαλείο, βάζοντας μία λίστα γονιδίων και του επιστρέφει επιγενωμικά, microRNA, μοριακά μονοπάτια και δεδομένα οντολογιών από πολλές βάσεις δεδομένων όπως: GO¹⁵², KEGG¹⁸⁸, ChIP-x Enrichment Analysis (ChEA)¹⁸⁹, ENCODE¹⁹⁰, Connectivity Map (CMAP)¹⁹¹ κλπ. Όπως επίσης και να δει κάποια δίκτυα που δημιουργεί το εργαλείο μεταξύ γονιδίων.



The screenshot shows the Enrichr website. At the top, there is a navigation bar with links: 'Analyze', 'What's New?', 'Libraries', 'Find a Gene', 'About', and 'Help'. The 'Analyze' link is highlighted. To the right of the navigation bar, there are links for 'Login | Register' and a counter '3,643,513 lists analyzed'. The main content area is titled 'Input data'. It contains two columns of text. The left column explains how to upload a file in BED format or a list of genes, and mentions the membership level (0.0 to 1.0). The right column explains how to paste a list of gene symbols optionally followed by a comma and levels of membership, and provides two examples: 'crisp set example' and 'fuzzy set example'. Below the text, there is a 'Browse...' button and a message 'No file selected.'. To the right of the text, there is a large empty box for pasting data. At the bottom of the box, it says 'Not signed in' and '0 gene(s) entered'. Below the box, there is a text input field for a brief description and a 'Submit' button.

Εικόνα 1-5 Σελίδα εισαγωγής δεδομένων για την εύρεση οντολογιών Enrichr

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE12435

2.1.1 Γενικές πληροφορίες GSE12435

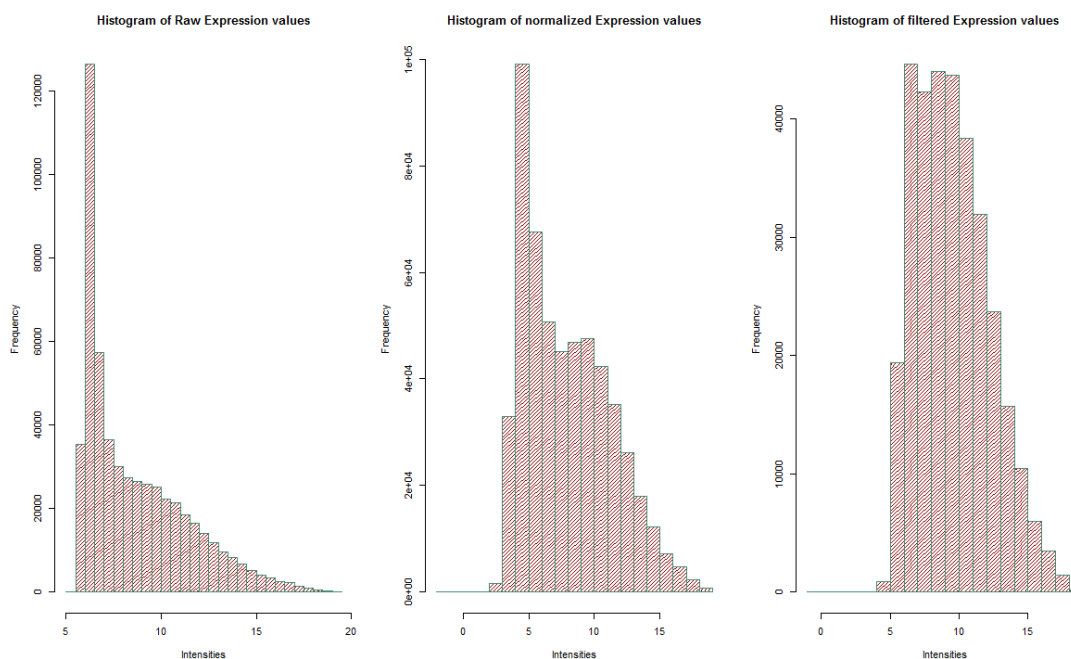
Από τις γενικές πληροφορίες για το σύνολο δεδομένων GSE12435 στην ιστοσελίδα της GEO και τις εκτενέστερες πληροφορίες από τη δημοσίευση της ανάλυσης από την ερευνητική ομάδα που πραγματοποίησε το πείραμα: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19108712> εξάγουμε τις παρακάτω πληροφορίες:

- Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από καλλιέργειες κυτάρων ινοβλαστών από ανθρώπινο πνεύμονα (IMR-90)
- Τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με 0.5 Gy με ιόντα ^4He (125 keV/ μm) ως προσομοίωση σωματιδίων α ή με 0 Gy στην περίπτωση των control (sham-irradiation)
- Δημιουργήθηκαν 4 διαφορετικά βιολογικά replicates για κάθε μία από τις 3 καταστάσεις (irradiated, bystander, control), συνολικά 12 δείγματα.
- Ύστερα από 4 ώρες από την ακτινοβολήση τους, έγινε η εξαγωγή του RNA.
- Η πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την ακτινοβολήση και σχηματισμό των παρακείμενων κυττάρων ήταν με χρήση μερικής θωράκισης σε

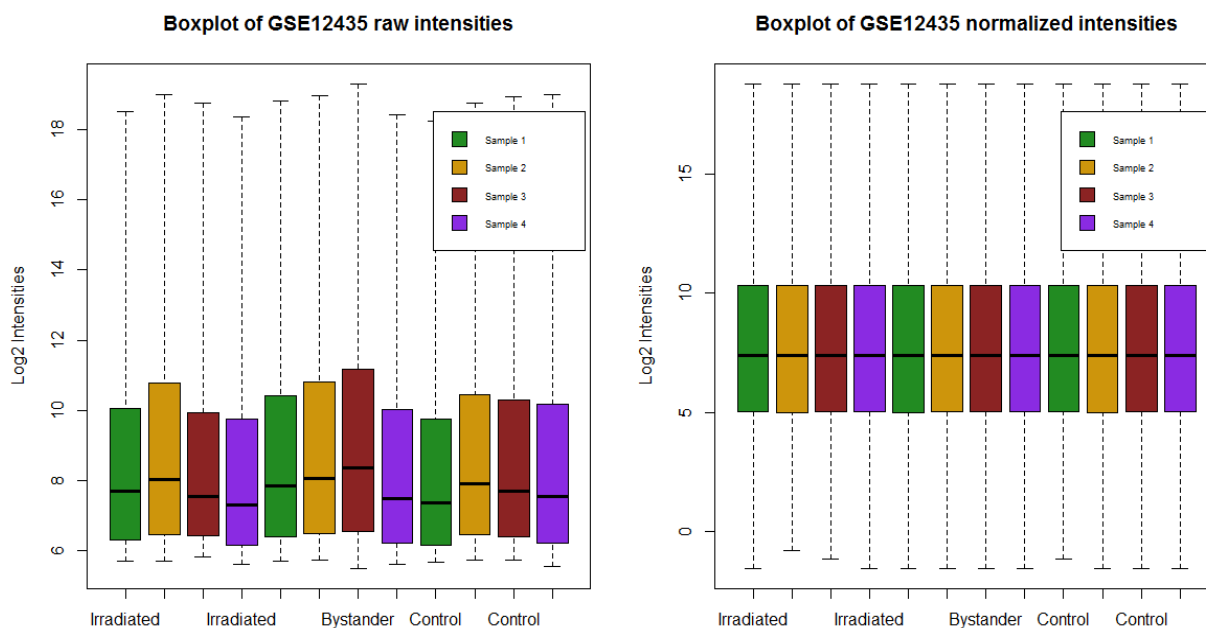
διπλό τρυβλίο καλλιέργειας όπου το εσωτερικό είχε θωράκιση για ακτινοβολία (παρακείμενα κύτταρα) ενώ το εξωτερικό όχι (ακτινοβολημένα κύτταρα).

Με χρήση της βιοπληροφορικής μεθοδολογίας που παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο Μέθοδοι για τις Agilent πλατφόρμες μικροσυστοιχιών, έγινε εξαγωγή των διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων με $FDR < 0.05$ & $|\log_2 \text{Fold Change}| > 0.5$.

2.1.2 Διόρθωση υποβάθρου, κανονικοποίηση και φιλτράρισμα εντάσεων



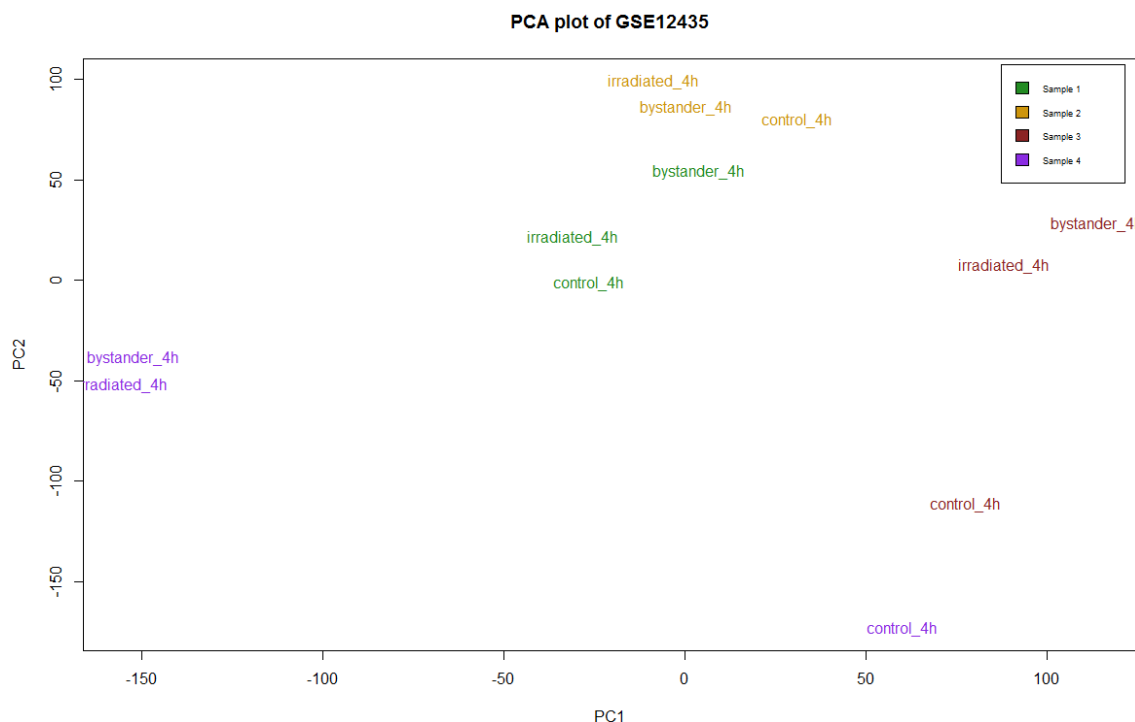
Σχήμα 2-1 Ιστόγραμμα συχνοτήτων των εντάσεων όλων των ανιχνευτών του συνόλου δεδομένων GSE12435. Οι τιμές των εντάσεων έχουν υποστεί μετασχηματισμό $\log_2$. Στο αριστερό ιστόγραμμα φαίνονται οι συχνότητες των ανεπεξέργαστων εντάσεων. Στο κεντρικό ιστόγραμμα φαίνονται οι συχνότητες μετά από κανονικοποίηση και στο δεξί μετά το φιλτράρισμα των εντάσεων. Παρατηρούμε ότι ακολουθούν θετικά ασύμμετρη κατανομή.



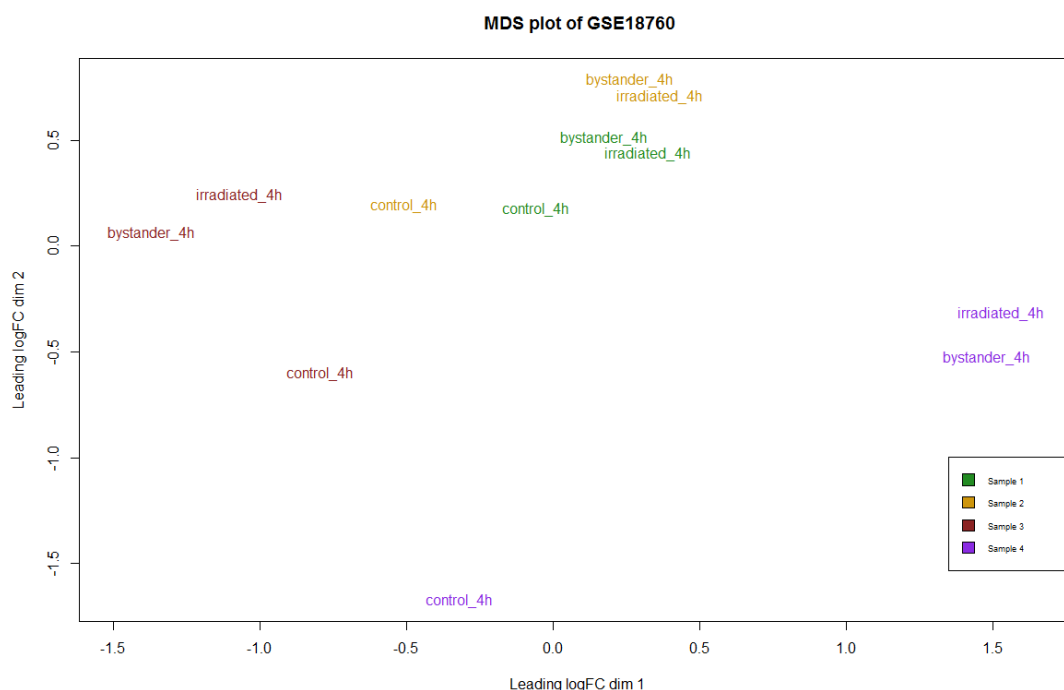
Σχήμα 2-2 Θηκόγραμμα δειγμάτων του συνόλου δεδομένων ως προς τις εντάσεις τους (έχουν υποστεί μετασχηματισμό $\log_2$). Στο πρώτο θηκόγραμμα φαίνονται οι τιμές των ανεπεξέργαστων εντάσεων. Στο δεύτερο διάγραμμα φαίνονται οι τιμές των εντάσεων μετά από κανονικοποίηση. Παρατηρούμε ότι μετά την κανονικοποίηση έχουν όλα τα δείγματα παρόμοια διάμεσο και το παρόμοιο ενδοτεταρτημοριακό εύρος.

Από το σχήμα 3-1 και 3-2 παρατηρούμε ότι η συγκεκριμένη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για την διόρθωση υποβάθρου και την κανονικοποίηση, όπως παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο μέθοδοι, οδήγησε στον μετασχηματισμό των τιμών των εντάσεων έκφρασης. Ελέγχοντας την κατανομή των συχνοτήτων των ιστογραμμάτων και διαπιστώνοντας από την μελέτη των θηκογραμμάτων ότι το εύρος και η διάμεσος των τιμών των εντάσεων για κάθε δείγμα είναι παρόμοια φαίνεται ότι έχει πετύχει η κανονικοποίηση ώστε να απομακρυνθούν παράγοντες τεχνικού υποβάθρου ώστε να χρησιμοποιηθούν για την περαιτέρω βιοπληροφορική ανάλυση. Στην συνέχεια αφού γίνει φιλτράρισμα των τιμών των εντάσεων αναζητούμε μέσω διαγραμμάτων διερευνητικής ανάλυσης την πιθανότητα παρατήρησης μη τυχαίων συσχετισμών μεταξύ των δειγμάτων. Συνήθως αυτοί οι συσχετισμοί αποτελούν τεχνικό θόρυβο που έχει προκύψει λόγω διακύμανσης των τεχνικών διαδικασιών και οδηγούν σε λανθασμένα στατιστικά αποτελέσματα αν δεν ληφθούν υπόψιν.

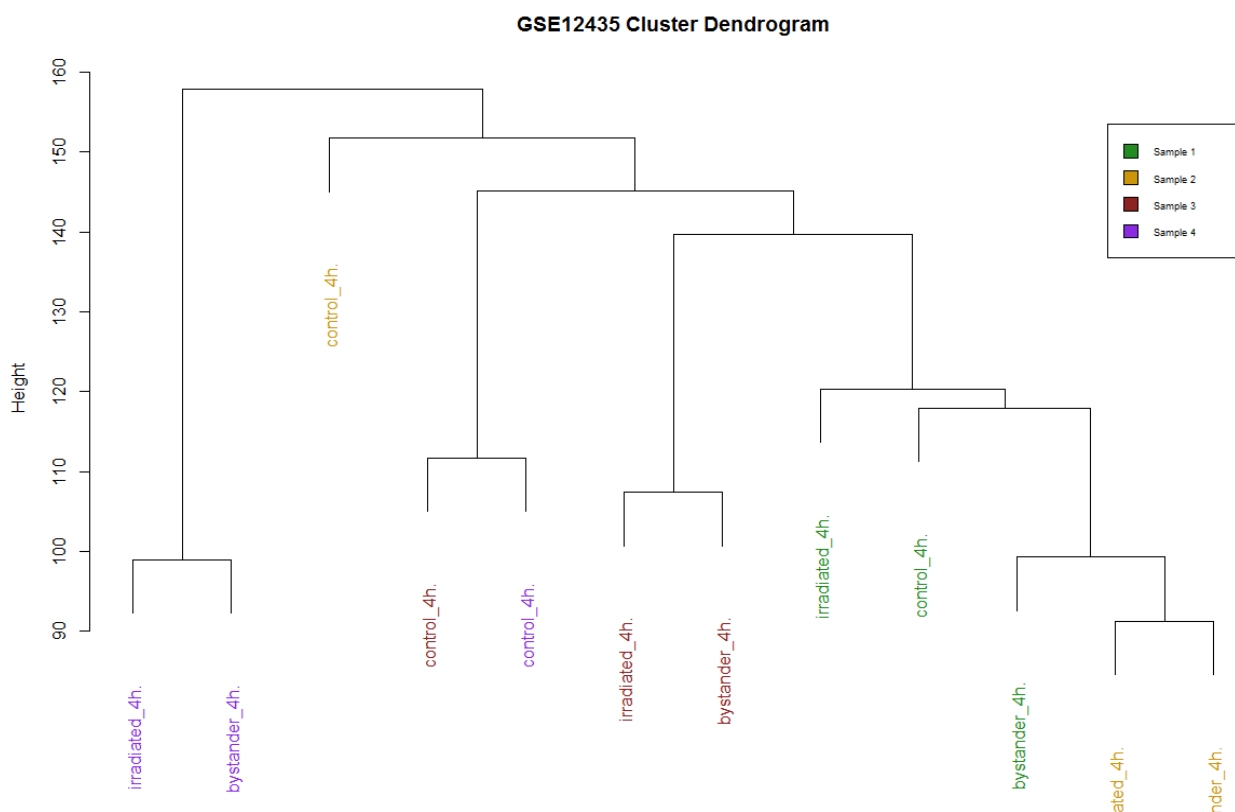
2.1.3 Διαγράμματα διερευνητικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE12435



Σχήμα 2-3 Διάγραμμα κύριων συνιστωσών του συνόλου δεδομένων GSE12435. Παρατηρούμε ότι τα δείγματα ίδιου βιολογικού replicate μεταξύ irradiated και bystander δεν έχουν μεγάλες διαφορές σε αντίθεση με τα control τους που παρουσιάζουν αρκετά μεγάλες, τουλάχιστον στα δείγματα 3 και 4.



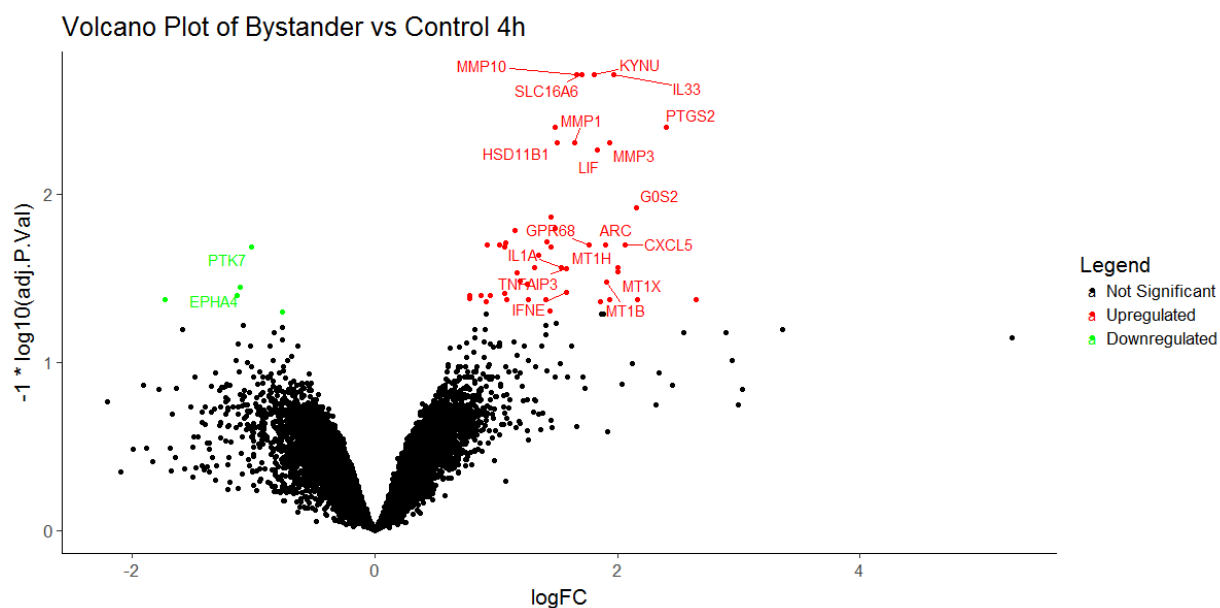
Σχήμα 2-4 Διάγραμμα πολυδιάστατης διαβάθμισης του συνόλου δεδομένων GSE12435. Παρατηρούμε ότι όπως και στο παραπάνω διάγραμμα κύριων συνιστωσών τα δείγματα ίδιου βιολογικού replicate μεταξύ irradiated και bystander δεν έχουν μεγάλες διαφορές σε αντίθεση με τα control τους που έχουν αρκετά εμφανείς διαφορές στις 2 πρώτες διαστάσεις.



Σχήμα 2-5 Δενδρόγραμμα του συνόλου δεδομένων GSE12435 με χρήση της τεχνικής clustering average. Φαίνεται ότι η ομαδοποίηση γίνεται μεταξύ των irradiated με τα bystander ενώ τα control ομαδοποιούνται μόνα τους

Στα διαγράμματα 3-3 και 3-4 παρατηρούμε ότι υπάρχουν μη τυχαίοι συσχετισμοί ανά βιολογικό δείγμα. Φαίνεται ότι τα δείγματα των bystander με των irradiated ομαδοποιούνται ανάλογα με το δείγμα τους. Επίσης μπορεί να παρατηρηθεί ότι τα controls δειγμάτων 2,3,4 διαφέρουν ως προς τη 2^η κύρια συνιστώσα στο διάγραμμα 3-3 και ως προς την πρώτη διάσταση στο διάγραμμα 3-4. Στο διάγραμμα 3-5 είναι φανερή η συσχέτιση των Bystander με τα Irradiated δείγματα 2,3,4. Επειδή υπάρχει τεχνική διακύμανση στα δείγματα, στο σχεδιασμό των τελικών συγκρίσεων λήφθηκε υπόψιν το batch ανάλογα με το δείγμα ώστε να επηρεαστούν όσο το δυνατόν λιγότερο οι στατιστικές δοκιμές.

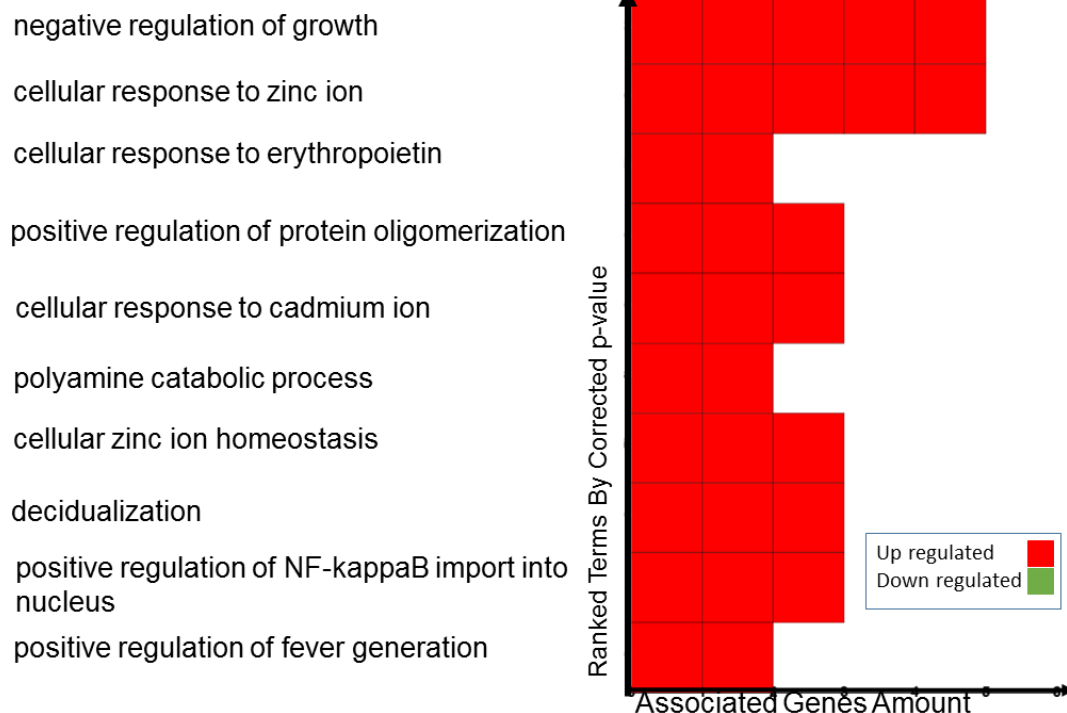
2.1.4 Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια συνόλου δεδομένων GSE12435



Σχήμα 2-6 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE12435. Παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ bystander και control δειγμάτων. Βρέθηκαν μόνο 5 στατιστικά σημαντικά υποεκφρασμένα γονίδια και 48 στατιστικά σημαντικά υπερεκφρασμένα

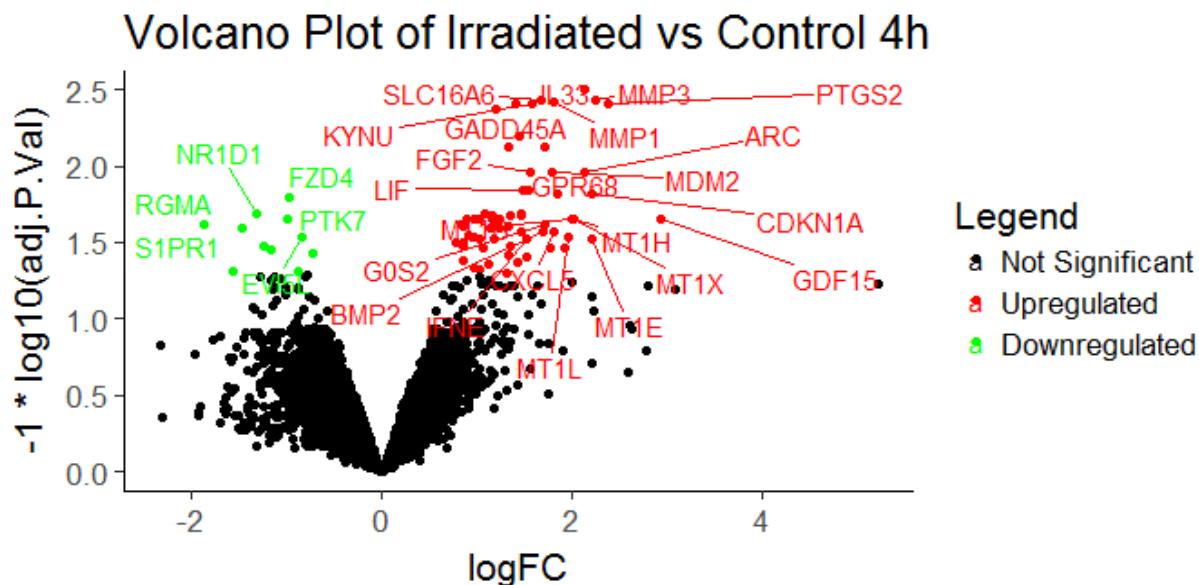
Από την σύγκριση μεταξύ Bystander (0.5 Gy) και Control (sham-irradiated) στις 4 ώρες του συνόλου δεδομένων GSE12435 λήφθηκαν 53 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. Μόνο 5 γονίδια (EPHA4, EPHB3, FZD4, NR1D1, PTK7) φαίνεται να είναι υποεκφρασμένα. Η λειτουργική ανάλυση του εργαλείου BioInfoMiner δίνει 10 στατιστικά σημαντικές οντολογίες βιολογικών διαδικασιών που φαίνονται στο διάγραμμα 3-7. Παρόμοιες οντολογίες δίνονται από το εργαλείο Enrichr με μόνη διαφορά την οντολογία cellular response to inorganic substance (GO:0071241) (ο πίνακας δίνεται στο παράρτημα). Επίσης βασικό αποτέλεσμα αποτελούν και οι οντολογίες κυτταρικών στοιχείων που προκύπτουν από το BioInfoMiner οι οποίες έχουν σχέση με τον εξωκυττάριο χώρο και αναπόσπαστα συστατικά της πλασματικής μεμβράνης. Επιπρόσθετα οντολογίες των μοριακών λειτουργιών έχουν σχέση με δραστικότητα κυτοκινών, χημειοκινών και των υποδοχέων τους. Τέλος μέσω της λειτουργικής ανάλυσης του εργαλείου Enrichr παρουσιάζονται τα κυριότερα μοριακά μονοπάτια με χρήση της KEGG 2016 που περιέχουν τα γονίδια της ανάλυσης. Αυτά είναι το TNF signaling pathway hsa04668, Cytokine-cytokine receptor interaction hsa04060, Mineral absorption hsa04978, NF-kappa B signaling pathway hsa04064 και NOD-like receptor signaling pathway hsa04621.

Ραβδόγραμμα οντολογιών συνόλου δεδομένων GSE12435 Bystander vs Control



Σχήμα 2-7 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Bystander vs Control GSE12435. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα $\log\text{FoldChange}$ τους.

Εκτός από τα αποτελέσματα των οντολογιών το εργαλείο BioInfoMiner δίνει ένα υποσύνολο γονιδίων από την αρχική λίστα τα οποία χαρακτηρίζονται ως κομβικά επειδή αποτελούν κεντρικό ρόλο σε μια πληθώρα από ξεχωριστές κυτταρικές διεργασίες. Αυτά είναι MT1X, MT2A, PTGS2, MT1H, MT1E, MT1B. Παρατηρούμε ότι 5 από τα 6 είναι μεταλλοθειονίνες και ένα από τα βασικά επαγόμενα ένζυμα σύνθεσης προσταγλανδινών.



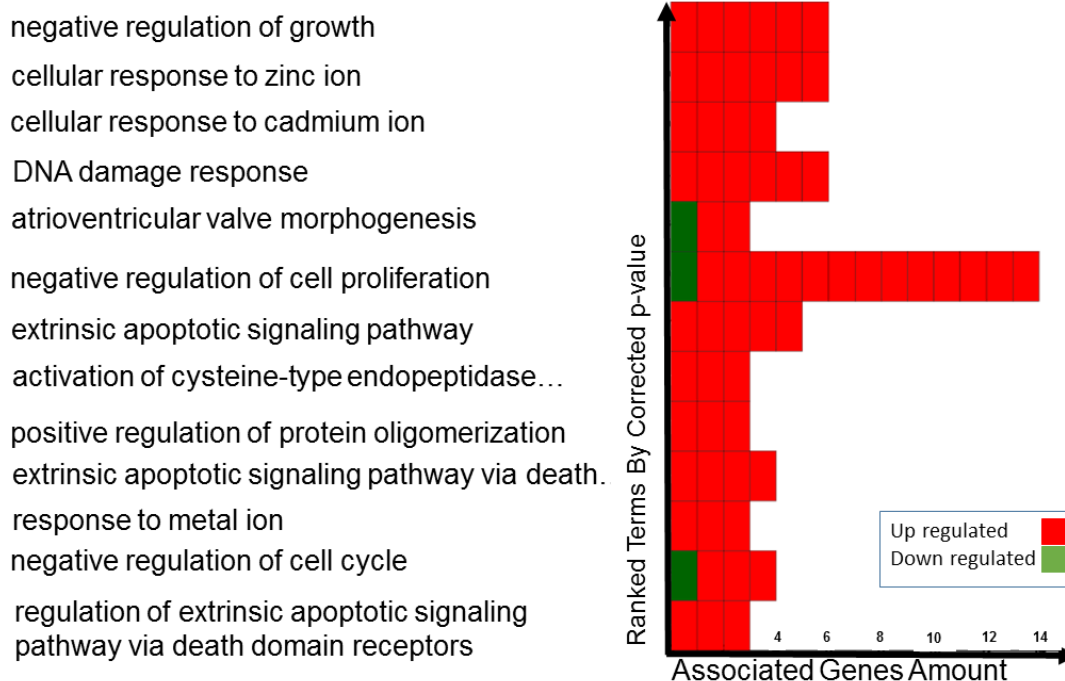
Σχήμα 2-8 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE12435. Παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ irradiated και control δειγμάτων. Βρέθηκαν μόνο 11 στατιστικά σημαντικά υποεκφρασμένα γονίδια και 65 στατιστικά σημαντικά υπερεκφρασμένα.

Από την διαφορά μεταξύ Irradiated (0.5 Gy) και Control (sham-irradiated) στις 4 ώρες του συνόλου δεδομένων GSE12435 λήφθηκαν 76 διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια. Μόνο 11 γονίδια (BRINP3, C10orf10, Evi5L, FZD4, NR1D1, PLEKHA6, PTK7, RGMA, S1PR1, SIX1, TBX5) φαίνεται να είναι υπο-εκφρασμένα. Από την λειτουργική ανάλυση του εργαλείου BioInfoMiner δίνει 13 στατιστικά σημαντικές οντολογίες βιολογικών διαδικασιών που φαίνονται στο διάγραμμα 3-9. Σχετικά όμοιες είναι οι οντολογίες που δίνει το εργαλείο Enrichr με βασική διαφορά ότι δεν δίνει στις top100 την οντολογία positive regulation of protein oligomerization αλλά προσθέτει τις οντολογίες cellular response to abiotic stimulus (GO:0071214) και την οντολογία cellular response to inorganic substance (GO:0071241) και την οντολογία cellular response to inorganic substance (GO:0071241)(ο πίνακας δίνεται στο παράρτημα). Στα αποτελέσματα των οντολογιών κυτταρικών στοιχείων που προκύπτουν από το BioInfoMiner εκτός από αυτές που έχουν σχέση με τον εξωκυττάριο χώρο προστίθεται μία καινούργια, αυτή της περιπυρηνικής περιοχής του κυτταροπλάσματος. Οι οντολογίες των μοριακών λειτουργιών έχουν σχέση με τη δραστικότητα κυτοκινών, χημειοκινών και των υποδοχέων τους, αυξητικών παραγόντων αλλά επίσης και δραστηριότητα επαγωγής απόπτωσης (TNF-related apoptosis inducing ligand).

Μέσω της λειτουργικής ανάλυσης του εργαλείου Enrichr παρουσιάζονται τα κυριότερα μοριακά μονοπάτια με χρήση της KEGG 2016 που περιέχουν τα γονίδια της ανάλυσης. Αυτά είναι το Cytokine-cytokine receptor interaction hsa04060, p53 signaling

pathway hsa04115, Mineral absorption hsa04978, TNF signaling pathway hsa04668, Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells hsa04550, Jak-STAT signaling pathway hsa04630 και Transcriptional misregulation in cancer hsa 05202.

Παβδόγραμμα οντολογιών συνόλου δεδομένων GSE12435 Irradiated vs Control



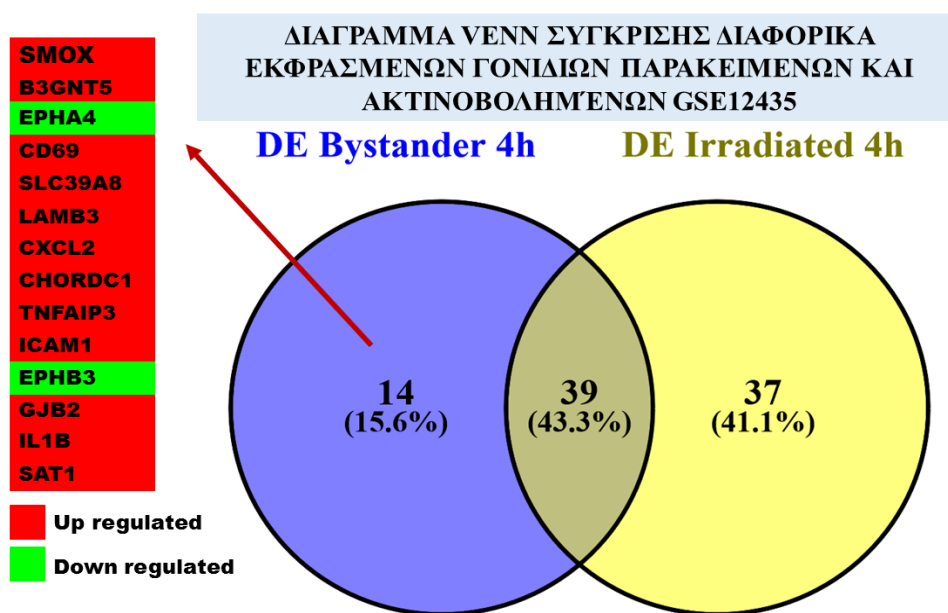
Σχήμα 2-9 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Irradiated vs Control GSE12435. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.

Το υποσύνολο κομβικών γονιδίων που δόθηκαν από το BioInfoMiner είναι μία λίστα 18 γονιδίων. Τα 6 από αυτά είναι ακριβώς ίδια κομβικά με της λίστας που δόθηκε από την σύγκριση των Bystander vs control, τα υπόλοιπα είναι: INHBA, BMP2, FAS, CDKN1A, TBX5, IL1A, MDM2, MT1A, LIF, E2F7, PIDD1, BTG3. Παρατηρούμε αυτά τα 12 γονίδια έχουν πολλές διακριτές μεταξύ τους λειτουργίες, όπως απόπτωση, παύση του κυτταρικού κύκλου και επαγωγή της οικογένειας πρωτεϊνών TGF-beta.

Η σύγκριση μεταξύ Bystander vs Irradiated στις 4 ώρες μετά την ακτινοβολήση δεν έδωσε διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια ως αποτέλεσμα. Κάτι τέτοιο μπορεί να θεωρηθεί λογικό βάση των διαγραμμάτων διερευνητικής ανάλυσης τα Bystander δείγματα με τα Irradiated παρατηρήθηκε ότι δεν φέραν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

2.1.5 Σύγκριση των αποτελεσμάτων Bystander vs Control και Irradiated vs Control GSE12435

Συγκρίνοντας τις λίστες διαφορεικά εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ Bystander vs Control και Irradiated vs Control προκύπτουν 39 κοινά γονίδια (διάγραμμα 3-10). Στα 14 διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια που απομένουν στην λίστα της σύγκρισης Bystander vs Control μπορεί να υπάρχουν γονίδια τα οποία αποκαλύπτουν τις διαφορετικές διεργασίες που θα βοηθήσουν στο να ερμηνευτεί η ουσιαστική διαφορά των παρακειμένων με τα ακτινοβολημένα κύτταρα.



Σχήμα 2-10 Venn διάγραμμα μεταξύ των δύο λιστών διαφορετικών εκφρασμένων γονιδίων του συνόλου δεδομένων GSE12435. Παρατηρούμε ότι από τα 53 και 76 διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια των συγκρίσεων Bystander vs Control και Irradiated vs Control 39 είναι κοινά. Αριστερά υποδεικνύονται τα 14 γονίδια που είναι διαφορετικά μεταξύ των συγκρίσεων Bystander vs Control και Irradiated vs Control. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.

Αφού εισάγουμε την λίστα των 14 διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων στον BioInfoMiner προκύπτουν οι οντολογίες βιολογικών διαδικασιών polyamine catabolic process, response to molecule of bacterial origin, regulation of axonogenesis, negative regulation of endothelial cell apoptotic process, inflammatory response και cellular response to organic substance. Επίσης ως κομβικά γονίδια θεωρούνται τα ICAM1, TNFAIP3, SAT1, IL1B και SMOX. Ο μικρός αριθμός γονιδίων που εισάχθηκε δεν δίνει αρκετές πληροφορίες ώστε να εξαχθούν τα αποτελέσματα που θα μας οδηγήσουν στην ερμηνεία των διαφορών μεταξύ των παρακειμένων και ακτινοβολημένων γονιδίων.

Αξιοπρόσεκτο όμως είναι ότι 4 από τα 14 γονίδια έχουν σχέση με την απόκριση σε φλεγμονή (IL1B,CXCL2,ICAM1,TNFAIP3) τα οποία είναι υπερεκφρασμένα.

2.2 Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE18760

2.2.1 Γενικές πληροφορίες GSE18760

Από τις γενικές πληροφορίες για το σύνολο δεδομένων GSE18760 στην ιστοσελίδα της GEO και τις εκτενέστερες πληροφορίες από τη δημοσίευση της ανάλυσης από την ερευνητική ομάδα που πραγματοποίησε το πείραμα: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20670442> εξάγουμε τις παρακάτω πληροφορίες:

- Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από καλλιέργειες κυττάρων ινοβλαστών από ανθρώπινο πνεύμονα (IMR-90)
- Τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με 0.5 Gy με ιόντα 4He (125 keV/μm) ως προσομοίωση σωματιδίων α ή με 0 Gy στην περίπτωση των control (sham-irradiation)
- Δημιουργήθηκαν 4 διαφορετικά βιολογικά replicates για κάθε μία από τις 3 καταστάσεις (irradiated, bystander, control), συνολικά 12 δείγματα.
- Ύστερα από 30 λεπτά από την ακτινοβολήση τους, έγινε η εξαγωγή του RNA.
- Η πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την ακτινοβολήση και σχηματισμό των παρακείμενων κυττάρων ήταν με χρήση μερικής θωράκισης σε διπλό τρυβλίο καλλιέργειας όπου το εσωτερικό είχε θωράκιση για ακτινοβολία (παρακείμενα κύτταρα) ενώ το εξωτερικό όχι (ακτινοβολημένα κύτταρα).

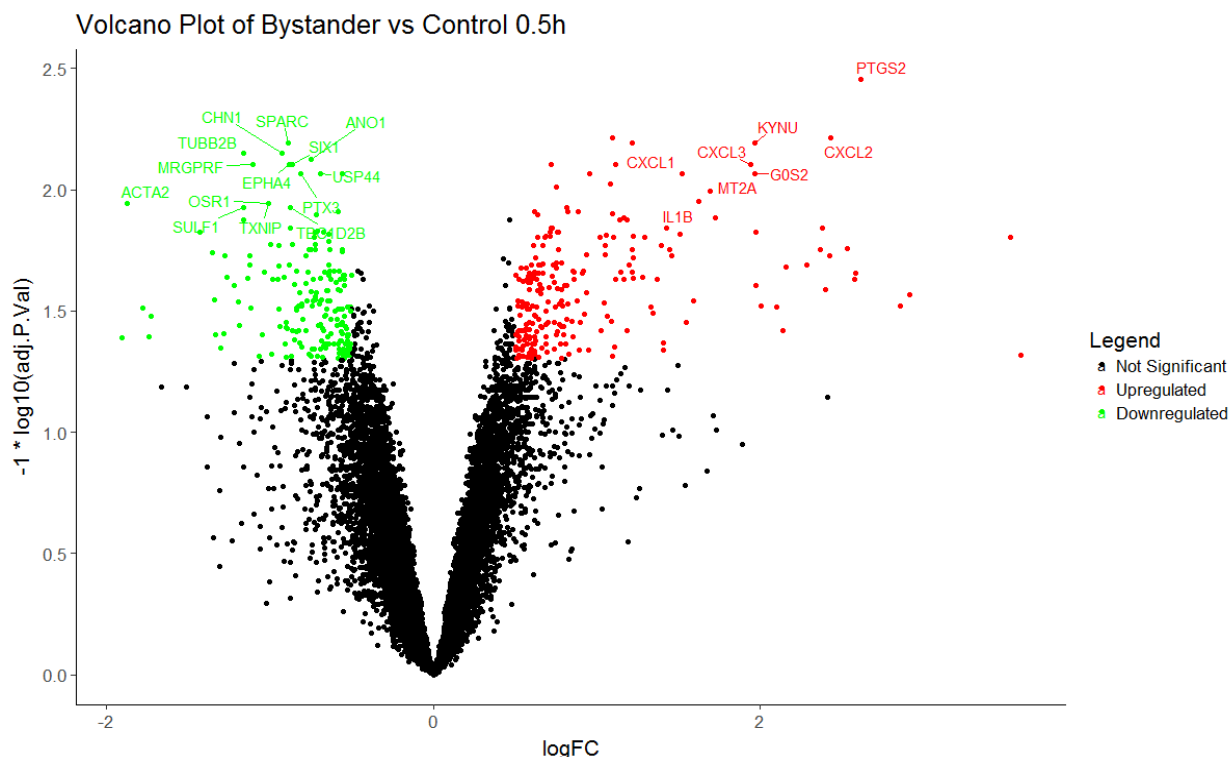
Με χρήση της βιοπληροφορικής μεθοδολογίας που παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο Μέθοδοι για τις Agilent πλατφόρμες μικροσυστοιχιών, έγινε εξαγωγή των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων με $FDR < 0.05$ & $|\log_2 \text{Fold Change}| > 0.5$.

2.2.2 Επεξεργασία δεδομένων του GSE18760

Ακολουθήθηκε η ίδια βιοπληροφορική μεθοδολογία του σύνολο δεδομένων GSE12435 για την ανάλυση και των ακατέργαστων δεδομένων του GSE18760. Η διόρθωση υποβάθρου και η κανονικοποίηση απομάκρυναν παράγοντες τεχνικού υποβάθρου. Παρόμοια αποτελέσματα με του GSE12435 έδωσε η διερευνητική ανάλυση μέσω διαγραμμάτων πολυδιάστατης διαβάθμισης και ανάλυσης των κύριων συνιστωσών (τα διαγράμματα δεν παρουσιάζονται). Και στα δύο διαγράμματα φάνηκε

ότι υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ bystander με control και irradiated με control ενώ μεταξύ bystander με irradiated δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές.

2.2.3 Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια συνόλου δεδομένων GSE18760

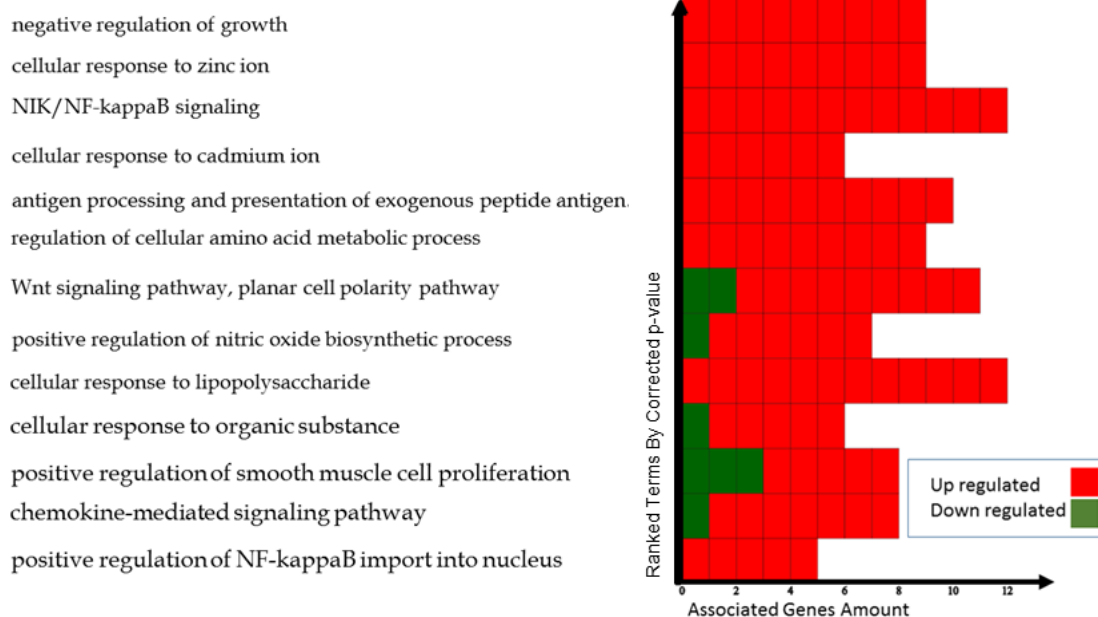


Σχήμα 2-11 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE18760. Παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ bystander και control δειγμάτων. Βρέθηκαν 424 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, από τα οποία 194 υποεκφρασμένα και 230 υπερεκφρασμένα

Από την σύγκριση μεταξύ Bystander (0.5 Gy) και Control (sham-irradiated) στη μισή ώρα μετά από ακτινοβολήση, του συνόλου δεδομένων GSE18760, λήφθηκαν 424 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. Από αυτά 194 γονίδια φαίνεται να είναι υποεκφρασμένα και 230 υπερεκφρασμένα. Η λειτουργική ανάλυση του εργαλείου BioInfoMiner δίνει 23 στατιστικά σημαντικές οντολογίες βιολογικών διαδικασιών, οι 13 από αυτές παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3-12. Παρόμοιες οντολογίες δίνονται από το εργαλείο Enrichr με την διαφορά ότι δεν καλύπτουν μεγάλο φάσμα διαδικασιών σε σχέση με του BioInfoMiner (ο πίνακας δίνεται στο παράρτημα). Επίσης βασικό αποτέλεσμα αποτελούν και οι οντολογίες κυτταρικών στοιχείων που προκύπτουν από το BioInfoMiner οι οποίες έχουν σχέση με πυρηνικό και κυτοσολικό σύμπλοκο του πρωτεασώματος, τον εξωκυττάριο χώρο, το σύμπλοκο I-kappaB/NF-kappaB και μηχανισμούς συνάφειας μεταξύ κυττάρων. Τέλος οντολογίες των μοριακών λειτουργιών έχουν σχέση με δραστικότητα κυτοκινών, χημειοκινών και ενεργοποίησης του πρωτεασώματος. Επιπρόσθετα μέσω της λειτουργικής ανάλυσης του εργαλείου Enrichr

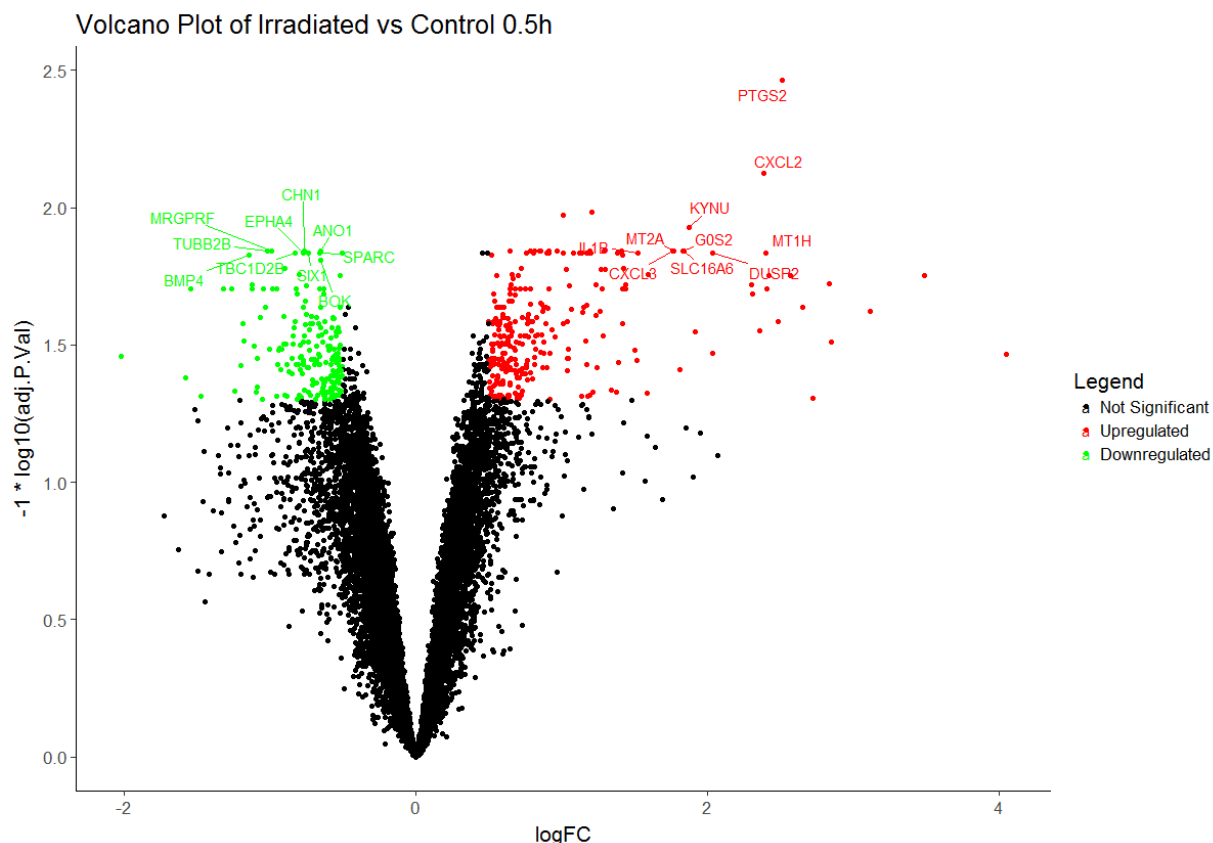
παρουσιάζονται τα κυριότερα μοριακά μονοπάτια με χρήση της KEGG 2016 που περιέχουν τα γονίδια της ανάλυσης. Με βάση την ιεράρχηση τους από το πιο στατιστικά σημαντικό είναι το TNF signaling pathway hsa04668, Mineral absorption hsa04978, NOD-like receptor signaling pathway hsa04621, Proteasome hsa03050, NF-kappa B signaling pathway hsa04064 και Cytokine-cytokine receptor interaction hsa04060.

Ραβδόγραμμα οντολογιών συνόλου δεδομένων GSE18760



Σχήμα 2-12 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Bystander vs Control GSE18760. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.

Ένα ακόμη αποτέλεσμα του εργαλείου BioInfoMiner είναι τα «κομβικά» γονίδια από την αρχική λίστα που αποτελούν κεντρικό ρόλο σε μια πληθώρα από ξεχωριστές κυτταρικές διεργασίες. Συνολικά λήφθηκε μία λίστα 34 κομβικών γονιδίων και ενδεικτικά με βάση την ιεράρχηση του εργαλείου τα σημαντικότερα είναι: IL6, PTGS2, CCL20, CXCL10, PSMD6, PSMD1, IL24, ZC3H12A, IL1B & MT1X. Από τα 34 κομβικά γονίδια μόνο 3 είναι υποεκφρασμένα : BMP4, COL1A1 και το AARS. Παρατηρούμε ότι τα περισσότερα κομβικά γονίδια έχουν σχέση με φλεγμονώδη αντίδραση, αντιγονοπαρουσίαση σε MHC τάξης I και τα σηματοδοτικά μονοπάτια Wnt και NIK/NF-kappaB.



Σχήμα 2-13 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE18760. Παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ irradiated και control δειγμάτων. Βρέθηκαν 481 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, από τα οποία 189 υποεκφρασμένα και 292 υπερεκφρασμένα.

Από την διαφορά μεταξύ Irradiated (0.5 Gy) και Control (sham-irradiated) στα 30 λεπτά μετά την ακτινοβολήση, του συνόλου δεδομένων GSE18760, λήφθηκαν 481 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. Από αυτά 189 γονίδια φαίνεται να είναι υποεκφρασμένα και 292 υπερεκφρασμένα.

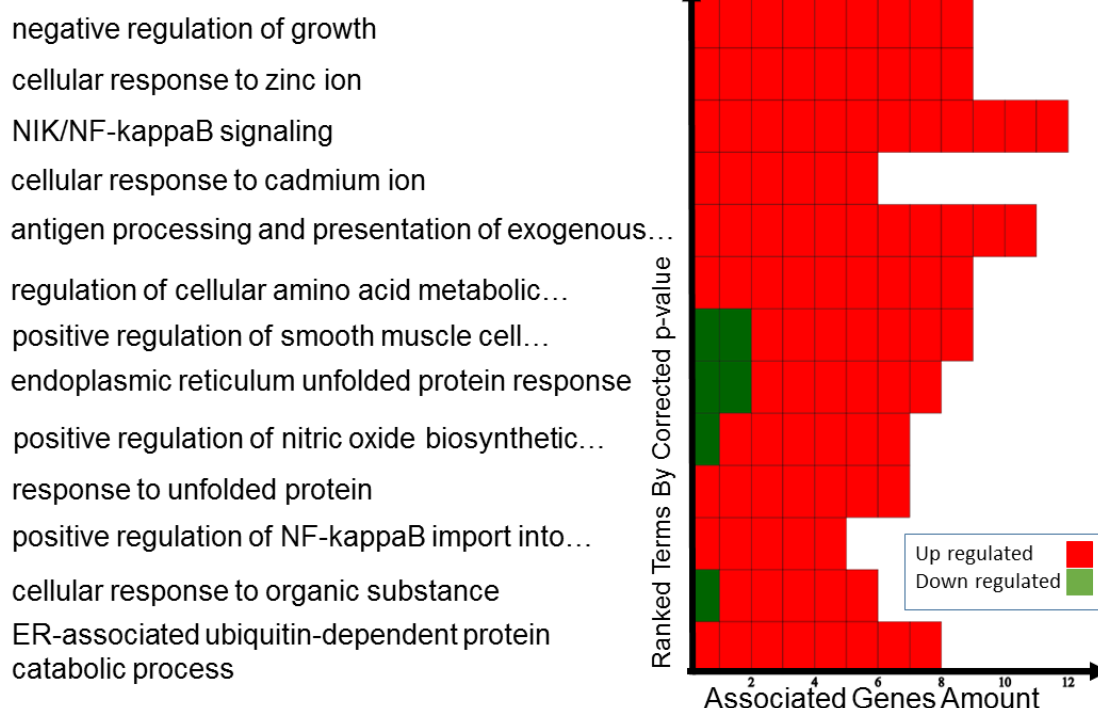
Η λειτουργική ανάλυση του εργαλείου BioInfoMiner δίνει 23 στατιστικά σημαντικές οντολογίες βιολογικών διαδικασιών, οι 13 από αυτές παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3-14. Παρόμοιες οντολογίες δίνονται από το εργαλείο Enrichr από τις οποίες οι περισσότερες έχουν σχέση με απόκριση σε μεταλλικά ιχνοστοιχεία. Από τις top25 οντολογίες του εργαλείου Enrichr δύο οντολογίες είναι αυτές που προσθέτουν παραπάνω πληροφορία, negative regulation of phosphorylation και positive regulation of nitric oxide biosynthetic process (ο πίνακας δίνεται στο παράρτημα).

Οι οντολογίες κυτταρικών στοιχείων που προκύπτουν από το BioInfoMiner είναι παρόμοιες με αυτές της προηγούμενης σύγκρισης (πυρηνικό και κυτοσολικό σύμπλοκο του πρωτεασώματος, τον εξωκυττάριο χώρο, το σύμπλοκο I-kappaB/NF-kappaB και μηχανισμούς συνάφειας μεταξύ κυττάρων) αλλά λαμβάνεται και μία αξιοσημείωτη που

έχει σχέση με το σχηματισμό εγκλείστων (inclusion body). Τέλος λαμβάνονται σχετικά όμοιες οντολογίες των μοριακών λειτουργιών ως προς την προηγούμενη σύγκριση (δραστικότητα κυτοκινών, χημειοκινών) με σημαντική διαφορά την ενεργοποίηση υποδοχέων πολλαπλασιασμού του υπεροξεισώματος.

Επιπρόσθετα μέσω της λειτουργικής ανάλυσης του εργαλείου Enrichr παρουσιάζονται τα κυριότερα μοριακά μονοπάτια με χρήση της KEGG 2016 που περιέχουν τα γονίδια της ανάλυσης. Με βάση την ιεράρχηση τους από το πιο στατιστικά σημαντικό είναι το TNF signaling pathway hsa04668, Mineral absorption hsa04978, NOD-like receptor signaling pathway hsa04621, Proteasome hsa03050, NF-kappa B signaling pathway hsa04064, Transcriptional misregulation in cancer hsa05202 και το Insulin resistance hsa04931. Παρατηρούμε ότι εκτός από τα δύο τελευταία μονοπάτια τα υπόλοιπα είναι όμοια με της σύγκρισης Bystander vs Control του GSE18760.

Ραβδόγραμμα οντολογιών συνόλου δεδομένων GSE18760 Irradiated vs Control



Σχήμα 2-14 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Irradiated vs Control GSE18760. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.

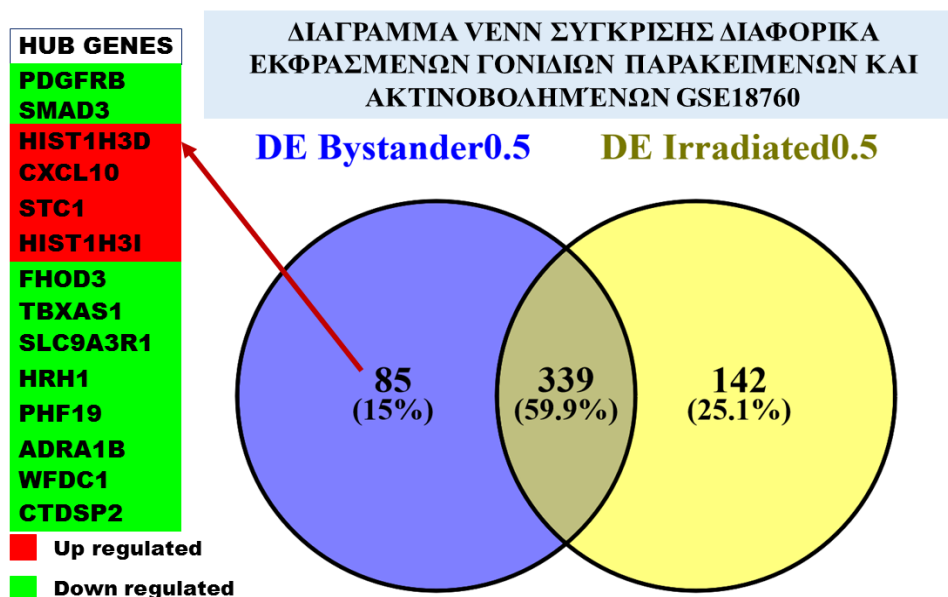
Τα «κομβικά» γονίδια από την αρχική λίστα που λαμβάνονται από το εργαλείο BioInfoMiner αποτελούν κεντρικό ρόλο σε μια πληθώρα από ξεχωριστές κυτταρικές

διεργασίες. Λήφθηκε μία λίστα 27 κομβικών γονιδίων και ενδεικτικά με βάση την ιεράρχηση του εργαλείου τα σημαντικότερα είναι: PSMC1, PSMC2, PSMC6, PTGS2, HSPA5, PSMD6, PSMD1, MT1X, PSMA2, PSMA3, MT1G. Από τα 27 κομβικά γονίδια μόνο 2 είναι υποεκφρασμένα : BMP4 και AARS. Παρατηρούμε ότι τα περισσότερα κομβικά γονίδια συμμετέχουν στον μηχανισμό ουβικιτινίωσης και αποικοδόμησης πρωτεϊνών.

Η σύγκριση μεταξύ Bystander vs Irradiated στη μισή ώρα μετά την ακτινοβολήση δεν έδωσε διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια ως αποτέλεσμα. Κάτι τέτοιο μπορεί να θεωρηθεί λογικό βάση των διαγραμμάτων διερευνητικής ανάλυσης τα Bystander δείγματα με τα Irradiated παρατηρήθηκε ότι δεν φέραν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

2.2.4 Σύγκριση των αποτελεσμάτων Bystander vs Control και Irradiated vs Control GSE18760

Η σύγκριση των λιστών διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ Bystander vs Control και Irradiated vs Control παρουσιάζει 339 κοινά γονίδια (διάγραμμα 3-15). 85 διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια μοναδικά απομένουν στην λίστα της σύγκρισης Bystander vs Control μπορεί να υπάρχουν γονίδια τα οποία αποκαλύπτουν τις διαφορετικές διεργασίες που θα βοηθήσουν στο να ερμηνευτεί η ουσιαστική διαφορά των παρακειμένων με τα ακτινοβολημένα κύτταρα.



Σχήμα 2-15 Venn διάγραμμα μεταξύ των δύο λιστών διαφορετικών εκφρασμένων γονιδίων του συνόλου δεδομένων GSE18760. Παρατηρούμε ότι από τα 424 και 481 διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια των συγκρίσεων Bystander vs Control και Irradiated vs Control 339 είναι ίδια. Αριστερά υποδεικνύονται τα 14 κομβικά γονίδια που είναι διαφορετικά μεταξύ των συγκρίσεων Bystander

vs Control και Irradiated vs Control όπως προέκυψαν από την λειτουργική ανάλυση του εργαλείου Bioninformatics. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.

Αφού εισάγουμε την λίστα των 85 διαφορεικά εκφρασμένων γονιδίων στον BioInfoMiner προκύπτουν οι οντολογίες βιολογικών διαδικασιών positive regulation of vasoconstriction, negative regulation of wound healing, regulation of gene silencing, negative regulation of gene expression-epigenetic, response to vitamin D, negative regulation of mitotic cell cycle και negative regulation of macromolecule metabolic process. Τα κομβικά γονίδια που προκύπτουν από την ανάλυση του BioInfoMiner είναι: PDGFRB, SMAD3, HIST1H3D, CXCL10, STC1, HIST1H3I, FHOD3, TBXAS1, SLC9A3R1, HRH1, PHF19, ADRA1B, WFDC1 και CTDSP2. Εντυπωσιακό είναι ότι μόνο 4 από αυτά είναι υπερ-εκφρασμένα. Τα δύο μεταγράφουν γονίδια ιστονών (HIST1H3I, HIST1H3D), το CXCL10 εκφράζει χημειοκίνη για την επαγωγή μονοκυττάρων, Τ-λεμφοκυττάρων, κυτταροτοξικών και μορίων κυτταρικής συνάφειας. Το STC1 εκφράζει μία ρυθμιστική πρωτεΐνη της ομοιόστασης ασβεστίου/φωσφόρου.

2.3 Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE21059

2.3.1 Γενικές πληροφορίες GSE21059

Από τις γενικές πληροφορίες για το σύνολο δεδομένων GSE21059 στην ιστοσελίδα της GEO και τις εκτενέστερες πληροφορίες από τη δημοσίευση της ανάλυσης της ερευνητικής ομάδας που πραγματοποίησε το πείραμα: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022823/> εξάγουμε τις παρακάτω πληροφορίες:

- Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από καλλιέργειες κυττάρων ινοβλαστών από ανθρώπινο πνεύμονα (IMR-90)
- Τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με 0.5 Gy με ιόντα ^4He (125 keV/ μm) ως προσομοίωση σωματιδίων α ή με 0 Gy στην περίπτωση των control (sham-irradiation)
- Δημιουργήθηκαν 4 διαφορετικά βιολογικά replicates για κάθε μία από τις 3 καταστάσεις (irradiated, bystander, control), συνολικά 72 δείγματα.
- Ύστερα από 30 λεπτά, 1, 2, 4, 6 και 24 ώρες από την ακτινοβολήση τους, έγινε η εξαγωγή του RNA.
- Η πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την ακτινοβολήση και σχηματισμό των bystander κυττάρων ήταν με χρήση μερικής θωράκισης σε

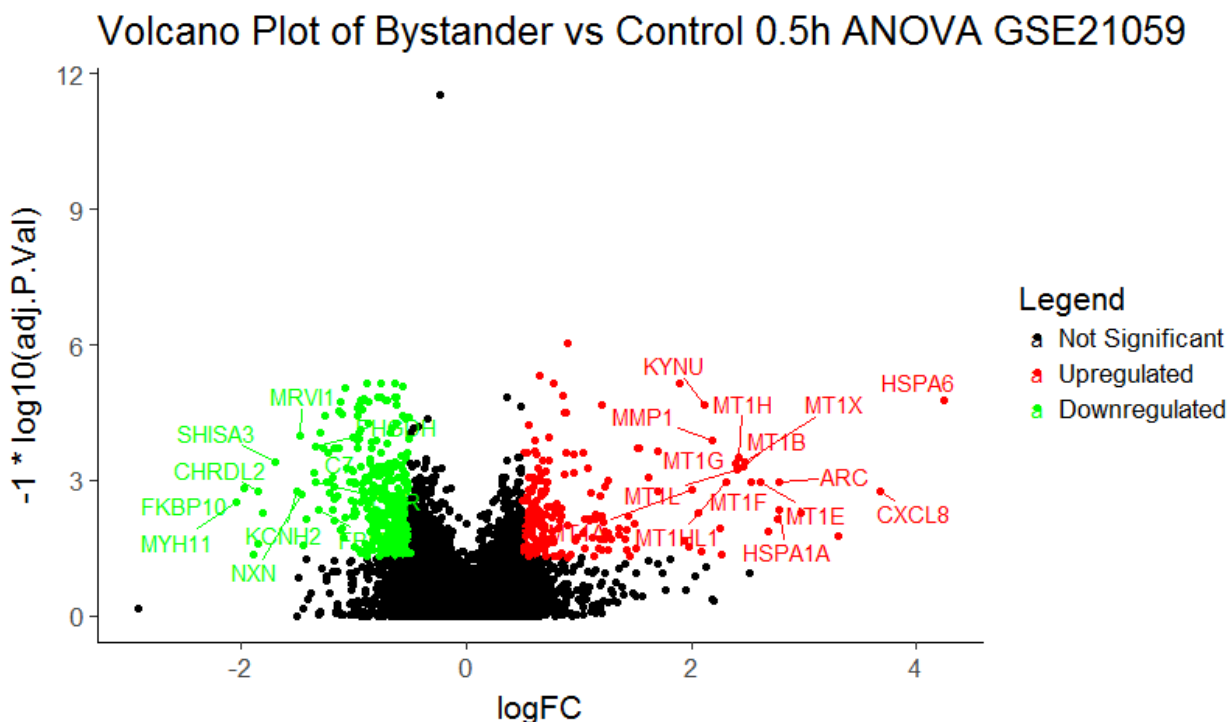
διπλό τρυβλίο καλλιέργειας όπου το εσωτερικό είχε θωράκιση για ακτινοβολία (bystander κύτταρα) ενώ το εξωτερικό όχι (irradiated κύτταρα).

Με χρήση της βιοπληροφορικής/στατιστικής μεθοδολογίας που παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο Μέθοδοι για τις Agilent πλατφόρμες μικροσυστοιχιών, έγινε εξαγωγή των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων με $FDR < 0.05$ για δοκιμασία ANOVA και στα επιμέρους t-test με $FDR < 0.05$ & $|\log_2 \text{Fold Change}| > 0.5$.

2.3.2 Επεξεργασία δεδομένων του GSE21059

Τα δεδομένα του GSE21059 επεξεργάστηκαν με την ίδια βιοπληροφορική διαδικασία για την αφαίρεση τεχνικών παραγόντων διακύμανσης που ακολουθήθηκε στα σύνολα δεδομένων GSE12435, GSE18760. Βασική διαφορά αποτελεί η στατιστική δοκιμασία ANOVA που χρησιμοποιήθηκε, για το λόγο ότι αποτελείται από time series δειγμάτων. Βέβαια χρησιμοποιήθηκαν και τα επιμέρους t-test για διερευνητική μελέτη τυχόν διαφορών με το ANOVA. Η διερευνητική ανάλυση μέσω διαγραμμάτων πολυδιάστατης διαβάθμισης και ανάλυσης των κύριων συνιστωσών (τα διαγράμματα δεν παρουσιάζονται) έδειξε ότι υπάρχει batch effect και λήφθηκε υπόψιν στις στατιστικές δοκιμασίες.

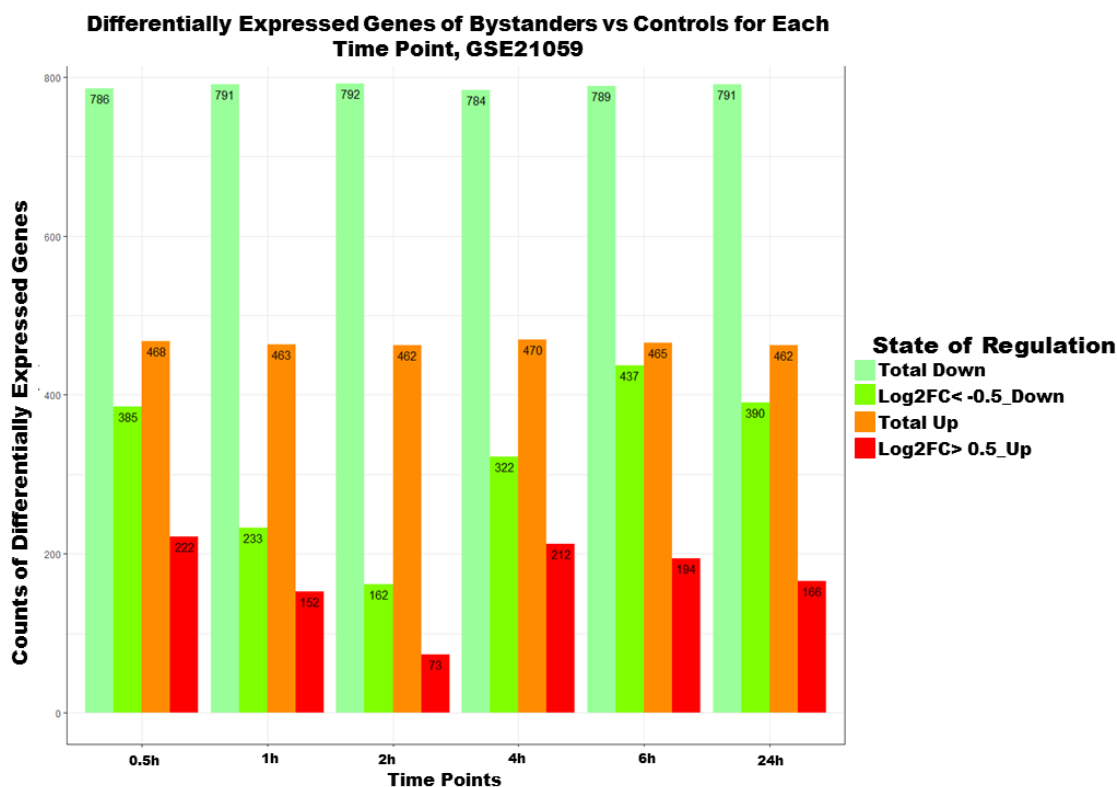
2.3.3 Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια συνόλου δεδομένων GSE21059



Σχήμα 2-16 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE21059. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ bystander και control δειγμάτων που προέκυψε από δοκιμασία ANOVA για μία χρονική

στιγμή (0.5h). Λήφθηκαν 1254 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια από όλες τις συγκρίσεις των διαφορετικών χρονικών στιγμών. Στη μισή ώρα μετά την ακτινοβολήση 786 ήταν υποεκφρασμένα και 468 υπερεκφρασμένα.

Από την δοκιμασία ANOVA μεταξύ των συγκρίσεων Bystander vs Control για κάθε χρονική στιγμή (0.5, 1, 2, 4, 6 & 24h) λήφθηκαν 1254 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. Από το t-test μεταξύ των συγκρίσεων Bystander vs Control για την χρονική τιμή 0.5h λήφθηκαν 92 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, για την χρονική στιγμή 1h λήφθηκε 1 διαφορικά εκφρασμένο γονίδιο, για την χρονική στιγμή 2h δεν λήφθηκε διαφορικά εκφρασμένο γονίδιο, για την χρονική στιγμή 4h λήφθηκαν 4 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, για την χρονική στιγμή 6h λήφθηκαν 23 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια και για την χρονική στιγμή 24h λήφθηκαν 30 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια.



Σχήμα 2-17 Ραβδόγραμμα πλήθους διαφορικών εκφρασμένων γονιδίων ως προς την χρονική στιγμή της σύγκρισης Bystander vs Control του συνόλου δεδομένων GSE21059. Με ανοικτό κυανό και πορτοκαλί παρουσιάζεται το πλήθος των διαφορικά υπο/υπερ-εκφρασμένων γονιδίων αντίστοιχα. Με πράσινο και κόκκινο παρουσιάζεται το υποσύνολο των διαφορικά υπο/υπερ-εκφρασμένων γονιδίων αντίστοιχα που ξεπερνάει τις τιμές απόλυτου Log2FoldChange >0.5 και κρίνεται ως βιολογικά σημαντικό.

Στο διάγραμμα 3-17 παρουσιάζονται οι τιμές υπερ-εκφρασμένων και υπο-εκφρασμένων γονιδίων που έχουν προκύψει με χρήση στατιστικής δοκιμασίας ANOVA, στη σύγκριση bystander vs control του GSE21059, σε αντιπαράθεση με τα υπερ/υπο-εκφρασμένα που έχουν $|\log_2\text{FoldChange}| > 0.5$. Με αυτό τον τρόπο αναδεικνύεται το πλήθος των

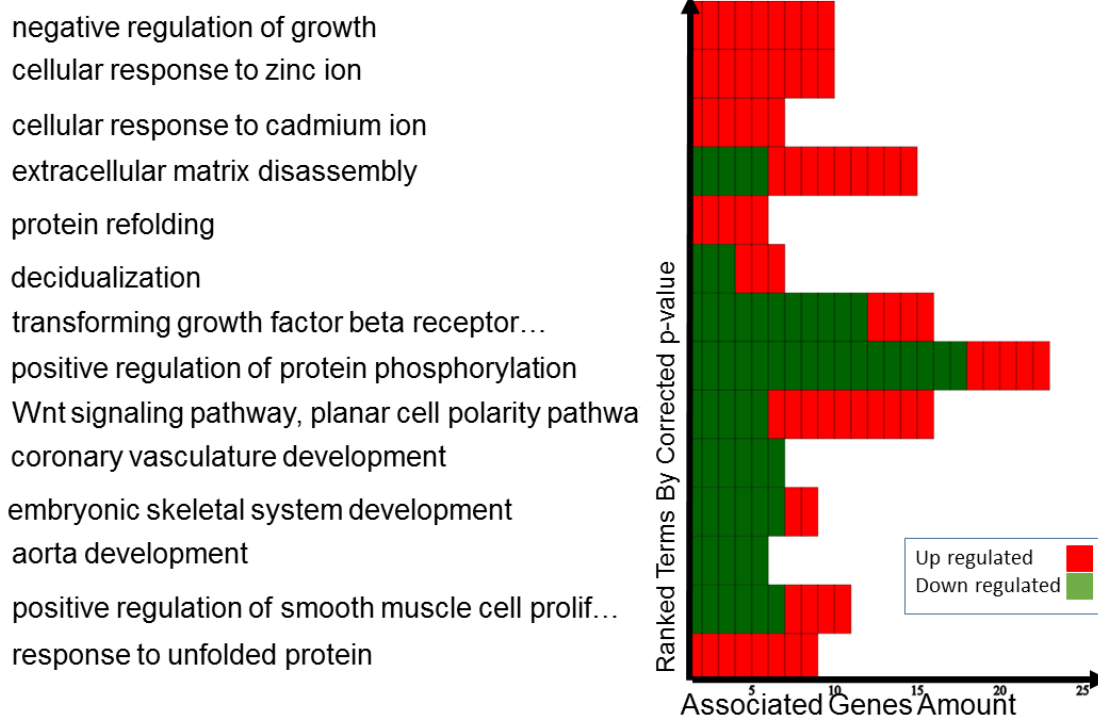
διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων που κρίνεται ότι η διαφορική τους έκφραση είναι βιολογικά σημαντική.

Η λειτουργική ανάλυση του εργαλείου BioInfoMiner δίνει 29 στατιστικά σημαντικές οντολογίες βιολογικών διαδικασιών, οι 15 από αυτές παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3-18. Παρόμοιες οντολογίες δίνονται από το εργαλείο Enrichr από τις οποίες αρκετές έχουν σχέση με την οργάνωση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, απόκριση σε μεταλλικά στοιχεία και την αναδίπλωση πρωτεϊνών. Στις top50 οντολογίες του εργαλείου Enrichr με χαμηλό σκορ βρίσκονται οι οντολογίες που έχουν σχέση με την απόκριση σε βλάβες στο DNA π.χ. DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in cell cycle arrest (GO:0006977) και signal transduction involved in mitotic G1 DNA damage checkpoint (GO:0072431)(ο πίνακας δίνεται στο παράρτημα).

Οι οντολογίες κυτταρικών στοιχείων που προκύπτουν από το BioInfoMiner είναι παρόμοιες με αυτές της προηγούμενης σύγκρισης (πυρηνικό και κυτοσολικό σύμπλοκο του πρωτεασώματος, την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, και μηχανισμούς συνάφειας μεταξύ κυττάρων) αλλά λαμβάνονται και κάποιες νέες. Συσχετίζονται με τα μελανοσώματα, τη βασική πλασματική μεμβράνη και το κυτοσόλιο. Επιπρόσθετα λαμβάνονται αρκετές νέες οντολογίες των μοριακών λειτουργιών ως προς τις προηγούμενες συγκρίσεις με σημαντικότερες την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt, ιντεγκρίνες και κολλαγόνο.

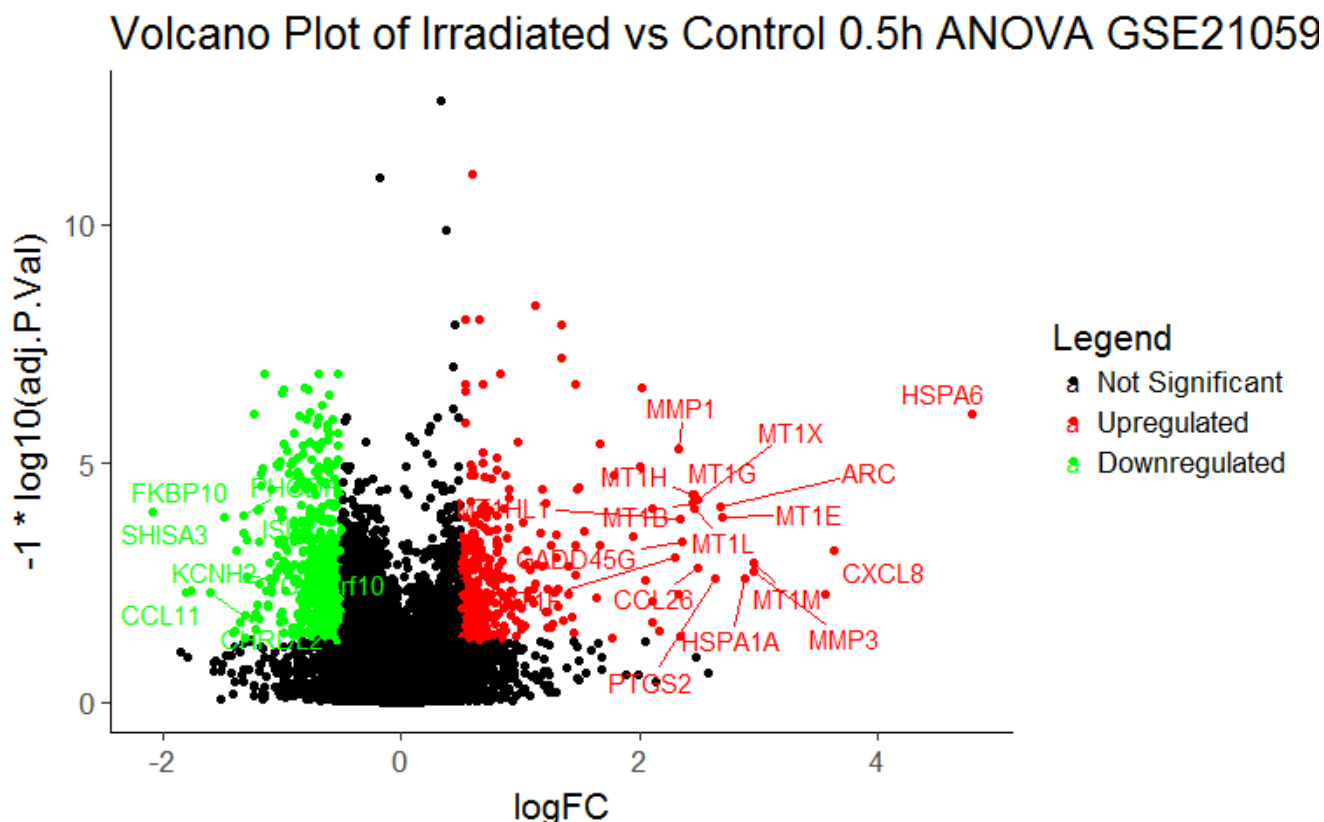
Τέλος μέσω της λειτουργικής ανάλυσης του εργαλείου Enrichr παρουσιάζονται τα κυριότερα μοριακά μονοπάτια με χρήση της KEGG 2016 που περιέχουν τα γονίδια της ανάλυσης. Με βάση την ιεράρχηση τους από το πιο στατιστικά σημαντικό είναι το Mineral absorption hsa04978, Proteasome hsa03050, MAPK signaling pathway hsa04010, Ribosome biogenesis in eukaryotes hsa03008, Proteoglycans in cancer hsa05205 και το Estrogen signaling pathway hsa04915. Παρατηρούμε ότι εκτός από το πρώτο μονοπάτι τα υπόλοιπα είναι διαφορετικά ως προς τις συγκρίσεις Bystander vs Control των GSE12435 και GSE18760.

Παβδόγραμμα οντολογιών συνόλου δεδομένων GSE21059 Bystander vs Control



Σχήμα 2-18 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Bystander vs Control GSE21059 με δοκιμασία ANOVA. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους. Έχουν χρησιμοποιηθεί οι τιμές έκφρασης για την μισή ώρα μετά την ακτινοβολήση (αντιπροσωπευτικά όλων των χρονικών στιγμών).

Από την ιεράρχηση γονιδίων του εργαλείου BioInfoMiner προέκυψε η λίστα 35 κομβικών γονιδίων. Τα top10 στατιστικώς σημαντικά είναι : BMP4, TGFB3, SRC, ELANE, BMP1, TAB1, SPP1, HSPA2, MT2A και MT1G. Παρατηρούμε ότι τα περισσότερα κομβικά γονίδια έχουν σχέση με το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-beta, αλληλεπιδράσεις κυτταρικής μεμβράνης με θεμέλια ουσία και απόκριση στο στρες.



Σχήμα 2-19 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE21059. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Irradiated και control δειγμάτων που προέκυψε από δοκιμασία ANOVA για μία χρονική στιγμή (0.5h). Λήφθηκαν 2399 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια από όλες τις συγκρίσεις των διαφορετικών χρονικών στιγμών. Στη μισή ώρα μετά την ακτινοβολήση 1446 ήταν υποεκφρασμένα και 953 υπερεκφρασμένα.

Από την δοκιμασία ANOVA μεταξύ των συγκρίσεων Irradiated vs Control για κάθε χρονική στιγμή (0.5, 1, 2, 4, 6 & 24h) λήφθηκαν 2399 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. Από το t-test μεταξύ διαφορών Irradiated vs Control για την χρονική στιγμή 0.5h λήφθηκαν 123 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, για την χρονική στιγμή 1h λήφθηκε 1 διαφορικά εκφρασμένο γονίδιο, για την χρονική στιγμή 2h λήφθηκαν 5 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, για την χρονική στιγμή 4h λήφθηκαν 53 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, για την χρονική στιγμή 6h λήφθηκαν 1232 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια και για την χρονική στιγμή 24h λήφθηκαν 74 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια.

Η λειτουργική ανάλυση του εργαλείου BioInfoMiner δίνει 36 στατιστικά σημαντικές οντολογίες βιολογικών διαδικασιών, οι 17 από αυτές παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3-20. Παρόμοιες οντολογίες δίνονται από το εργαλείο Enrichr με μικρότερο φάσμα διαφορετικών οντολογιών. Στις top25 οντολογίες του εργαλείου Enrichr με χαμηλό σκορ βρίσκονται οι οντολογίες που έχουν σχέση με διαδικασίες μεταγωγής σήματος για

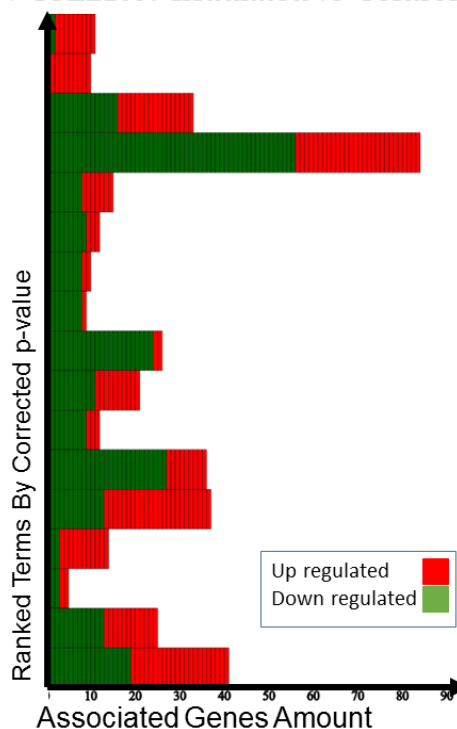
έλεγχο βλαβών και ακεραιότητας του DNA (GO:0072401) (GO:0072422) (ο πίνακας δίνεται στο παράρτημα).

Οι οντολογίες κυτταρικών στοιχείων που προκύπτουν από το BionInfoMiner είναι αρκετά διαφορετικές ως προς αυτές της προηγούμενης σύγκρισης. Οι πιο στατιστικά σημαντικές έχουν σχέση με τον πυρηνίσκο, την πυρηνική μεμβράνη, αλλά λαμβάνονται και κάποιες νέες. Συσχετίζονται με τα μελανοσώματα, το πυρηνόπλασμα και το κυτοσόλιο. Επιπρόσθετα λαμβάνονται αρκετές νέες οντολογίες των μοριακών λειτουργιών ως προς τις προηγούμενες συγκρίσεις με σημαντικότερες την πρόσδεση poly(A) ουράς στο RNA, αλληλεπίδραση με επαγωγείς της οικογένειας TNF, με ρυθμιστικές πρωτεΐνες τύπου Tat και πρωτεΐνες φωσφορυλίωσης MAP κινασών.

Τέλος μέσω της λειτουργικής ανάλυσης του εργαλείου Enrichr παρουσιάζονται τα κυριότερα μοριακά μονοπάτια με χρήση της KEGG 2016 που περιέχουν τα γονίδια της ανάλυσης. Με βάση την ιεράρχηση τους από το πιο στατιστικά σημαντικό είναι το Mineral absorption hsa04978, Proteasome hsa03050, p53 signaling pathway hsa04115, Endocytosis hsa04144, Thyroid hormone signaling pathway hsa04919, N-Glycan biosynthesis hsa00510, Proteoglycans in cancer hsa05205 και Apoptosis hsa04210. Παρατηρούμε ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια είναι διαφορετικά ως προς τις συγκρίσεις Irradiated vs Control των GSE12435 και GSE18760.

Ραβδόγραμμα οντολογιών συνόλου δεδομένων GSE21059 Irradiated vs Control

cellular response to zinc ion
negative regulation of growth
positive regulation of canonical Wnt signaling...
negative regulation of cell proliferation
erythrocyte differentiation
intrinsic apoptotic signaling pathway in response..
negative regulation of G1/S transition of mitotic...
aorta development
anterior/posterior pattern specification
extracellular matrix disassembly
lamellipodium assembly
positive regulation of protein phosphorylation
protein folding
response to unfolded protein
protein localization to endosome
Wnt signaling pathway, planar cell polarity...
protein polyubiquitination



Σχήμα 2-20 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Irradiated vs Control GSE21059 με δοκιμασία ANOVA. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την

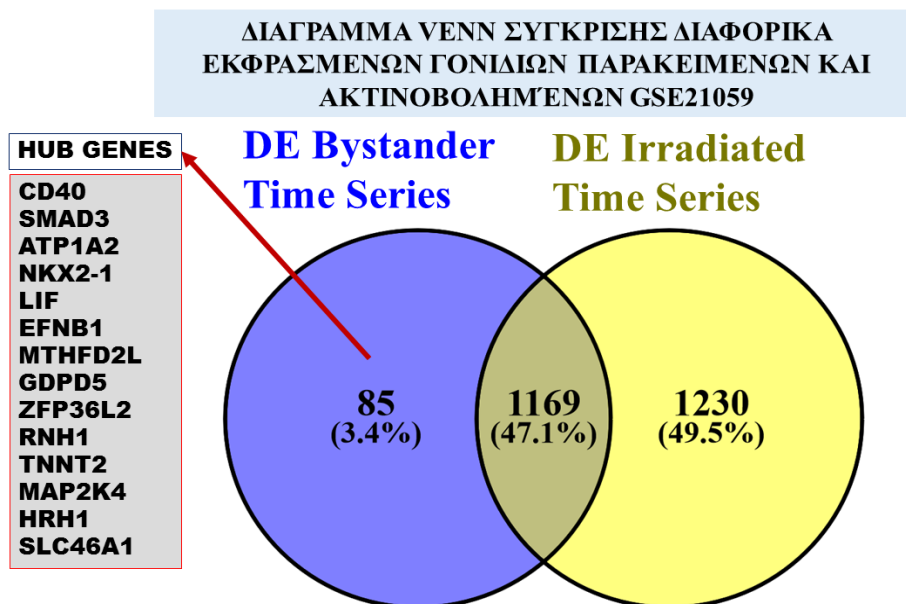
στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους. Έχουν χρησιμοποιηθεί οι τιμές έκφρασης για την μισή ώρα μετά την ακτινοβολήση (αντιπροσωπευτικά όλων των χρονικών στιγμών).

Από την ιεράρχηση γονιδίων του εργαλείου BioInfoMiner προέκυψε η λίστα 27 κομβικών γονιδίων. Τα top10 στατιστικά σημαντικά είναι : BMP4, TP53, HIPK2, PML, SMAD4, CDKN1A, MUL1, HSPA2, ABL1, AXIN1. Παρατηρούμε ότι τα περισσότερα κομβικά γονίδια έχουν σχέση σε απόκριση σε βλάβες του DNA, βλάβες στην αναδίπλωση πρωτεϊνών και ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Η σύγκριση μεταξύ Bystander vs Irradiated με δοκιμασία ANOVA και t-test δεν έδωσε διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια ως αποτέλεσμα.

2.3.4 Σύγκριση των αποτελεσμάτων Bystander vs Control και Irradiated vs Control GSE21059

Η σύγκριση των λιστών διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ Bystander vs Control και Irradiated vs Control που έχουν προκύψει από τις δοκιμασίες ANOVA για πολλαπλές χρονικές στιγμές παρουσιάζουν 1169 κοινά γονίδια (σχήμα 3-21). 85 διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια μοναδικά απομένουν στην λίστα της σύγκρισης Bystander vs Control μπορεί να υπάρχουν γονίδια τα οποία αποκαλύπτουν τις διαφορετικές διεργασίες που θα βοηθήσουν στο να ερμηνευτεί η ουσιαστική διαφορά των παρακειμένων με τα ακτινοβολημένα κύτταρα.



Σχήμα 2-21 Venn διάγραμμα μεταξύ των δύο λιστών διαφορικών εκφρασμένων γονιδίων του συνόλου δεδομένων GSE21059. Παρατηρούμε ότι από τα 1254 και 2339 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια των συγκρίσεων Bystander vs Control και Irradiated vs Control αντίστοιχα, 1169 είναι ίδια. Αριστερά υποδεικνύονται τα 14 κομβικά γονίδια που είναι μοναδικά της σύγκρισης μεταξύ Bystander vs Control και Irradiated vs Control όπως προέκυψαν από την λειτουργική ανάλυση του εργαλείου BioInfoMiner.

Αφού εισάγουμε την λίστα των 85 διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων στον BioInfoMiner προκύπτουν οι οντολογίες βιολογικών διαδικασιών positive regulation of tyrosine phosphorylation of Stat1 protein, cerebral cortex neuron differentiation, regulation of muscle contraction, mRNA catabolic process, folic acid metabolic process, regulation of vasoconstriction, cellular response to mechanical stimulus και embryonic pattern specification. Τα κομβικά γονίδια που προκύπτουν από την ανάλυση του BioInfoMiner είναι CD40, SMAD3, ATP1A2, NKX2-1, LIF, EFNB1, MTHFD2L, GDPD5, ZFP36L2, RNH1, TNNT2, MAP2K4, HRH1 και SLC46A1. Σημαντικό είναι να ειπωθεί ότι τα κομβικά γονίδια SMAD3, ATP1A2, NKX2-1, EFNB1, GDPD5, ZFP36L2, RNH1, HRH1 και SLC46A1 βρίσκονται υποεκφρασμένα σε όλες τις διαφορετικές χρονικές στιγμές, τα κομβικά γονίδια LIF και MAP2K4 βρίσκονται να είναι υπερεκφρασμένα σε όλες τις διαφορετικές χρονικές στιγμές, ενώ τα κομβικά γονίδια CD40, MTHFD2L και TNNT2 φαίνεται να εμφανίζουν υπό/υπέρ-έκφραση εξαρτώμενη από την χρονική στιγμή.

2.4 Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE55869

2.4.1 Γενικές πληροφορίες GSE55869

Από τις γενικές πληροφορίες για το σύνολο δεδομένων GSE55869 στην ιστοσελίδα της GEO και τις εκτενέστερες πληροφορίες από τη δημοσίευση της ανάλυσης της ερευνητικής ομάδας που πραγματοποίησε το πείραμα: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022823/> εξάγουμε τις παρακάτω πληροφορίες:

- Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από καλλιέργειες μη μικροκυτταρικών κυττάρων καρκινώματος από ανθρώπινο πνεύμονα H1299 (ATCC, CRL-5803) και knockdown H1299shRAD9
- Τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με 1 Gy με ιόντα 4He (125 keV/μm) ως προσομοίωση σωματιδίων α ή με 0 Gy στην περίπτωση των control (sham-irradiation)
- Δημιουργήθηκαν 5 διαφορετικά βιολογικά replicates για κάθε μία από τις 3 καταστάσεις (irradiated, bystander, control), συνολικά 50 .
- Ύστερα από 4 ώρες από την ακτινοβολήση τους, έγινε η εξαγωγή του RNA.
- Η πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την ακτινοβολήση και σχηματισμό των bystander κυττάρων ήταν με χρήση μερικής θωράκισης σε διπλό τρυβλίο καλλιέργειας όπου το εσωτερικό είχε θωράκιση για ακτινοβολία (bystander κύτταρα) ενώ το εξωτερικό όχι (irradiated κύτταρα).

Για την ανάλυση του συνόλου δεδομένων GSE55869 χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα 25 δείγματα που δεν είχαν απενεργοποιημένο το RAD9 με χρήση shRAD9. Σκοπός της επιλογής αυτής ότι τα υπόλοιπα 25 δείγματα επηρεάζονταν γονιδιακά από παράγοντα ο οποίος δεν βρίσκεται στα υπόλοιπα σύνολα δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν προς ανάλυση και θα προσέδιδε στατιστικό θόρυβο.

Με χρήση της βιοπληροφορικής μεθοδολογίας που παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο Μέθοδοι για τις Agilent πλατφόρμες μικροσυστοιχιών, έγινε εξαγωγή των διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων με $FDR < 0.05$ & $|\log_2 \text{Fold Change}| > 0.5$.

2.4.2 Επεξεργασία δεδομένων του GSE55869

Η επεξεργασία του συνόλου δεδομένων GSE55869 έγινε με το ίδιο τρόπο βιοπληροφορικής διαδικασίας για την αφαίρεση τεχνικών παραγόντων διακύμανσης

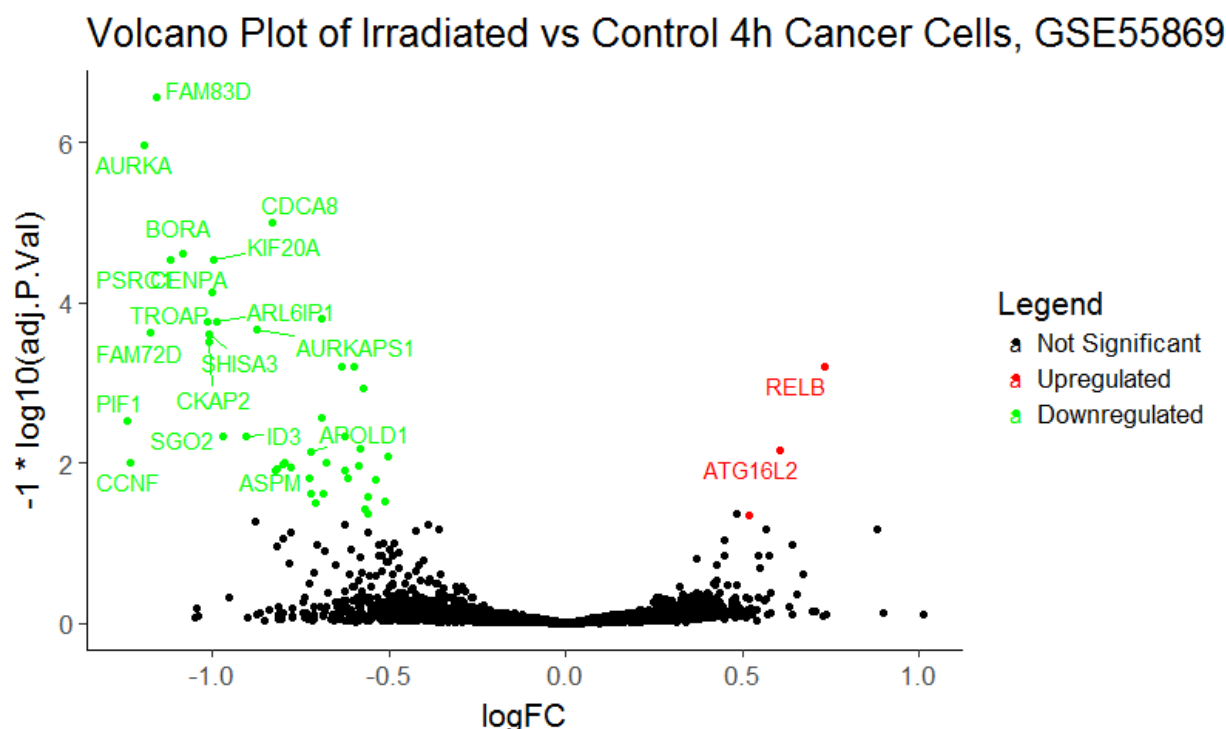
που ακολουθήθηκε στα σύνολα δεδομένων GSE12435, GSE18760 και GSE21059 επειδή είναι όλα από πλατφόρμα μικροσυστοιχιών Agilent. Τη μόνη βασική διαφορά αποτελεί ο αριθμός των δειγμάτων σε κάθε κατάσταση που είναι 5 αντί για 4 (ως προς τα προηγούμενα σύνολα δεδομένων) και χρησιμοποιήθηκε διαφορετική οριακή τιμή για το φιλτράρισμα των εντάσεων, όπως παρουσιάζεται στο κεφάλαιο Μέθοδοι. Η διερευνητική ανάλυση μέσω διαγραμμάτων πολυδιάστατης διαβάθμισης και ανάλυσης των κύριων συνιστωσών (τα διαγράμματα δεν παρουσιάζονται) έδειξε ότι υπάρχει batch effect και λήφθηκε υπόψιν στις στατιστικές δοκιμασίες.

2.4.3 Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια συνόλου δεδομένων GSE55869

Από την σύγκριση μεταξύ Bystander και Control (sham- irradiated) στις 4h μετά την ακτινοβολήση δεν λήφθηκαν διαφορικά εκφρασμένα γονίδια.

Από την σύγκριση μεταξύ Irradiated και Control (sham- irradiated) στις 4h μετά την ακτινοβολήση δεν λήφθηκαν διαφορικά εκφρασμένα γονίδια.

Από την σύγκριση μεταξύ Bystander και Control (non-sham-irradiated) στις 4h μετά την ακτινοβολήση δεν λήφθηκαν διαφορικά εκφρασμένα γονίδια.



Σχήμα 2-22 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE55869. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Irradiated vs control (non-sham-irradiated) δειγμάτων για την χρονική στιγμή 4h.. Λήφθηκαν 47 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. 44 υποεκφρασμένα και 3 υπερεκφρασμένα

Από την σύγκριση μεταξύ Irradiated και Control (non-sham-irradiated) λήφθηκαν 47 διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια. Επειδή η σύγκριση δεν υπάρχει στα περισσότερα από τα προηγούμενα σύνολα δεδομένων που έχουν αναλυθεί δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω συγκριτική ανάλυση, κρίθηκε χαμηλής σημαντικότητας. Εισάχθηκε στο εργαλείο BioInfoMiner για λειτουργική ανάλυση δίνοντας τις οντολογίες βιολογικών διαδικασιών: cell division, mitotic nuclear division, spindle organization, mitotic spindle organization, chromosome segregation, mitotic metaphase plate congression και regulation of mitotic spindle organization.

2.5 Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE25772

2.5.1 Γενικές πληροφορίες GSE25772

Από τις γενικές πληροφορίες για το σύνολο δεδομένων GSE25772 στην ιστοσελίδα της GEO και τις εκτενέστερες πληροφορίες από τη δημοσίευση της ανάλυσης της ερευνητικής ομάδα που πραγματοποίησε το πείραμα: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22034846> εξάγουμε τις παρακάτω πληροφορίες:

- Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από καλλιέργειες αθανοτοποιημένων κύτταρων ανθρώπινων ινοβλαστών από F11-hTERT
- Τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με 2 Gy με χρήση ισότοπου ^{60}Co .
- Δημιουργήθηκαν 4 διαφορετικά βιολογικά replicates για κάθε μία από τις 3 καταστάσεις (irradiated, bystander, control), συνολικά 36.
- Ύστερα από 4, 8 και 24 ώρες από την ακτινοβολήση τους, έγινε η εξαγωγή του RNA.
- Η πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την ακτινοβολήση και σχηματισμό των bystander κυττάρων ήταν μεταφορά του μέσου καλλιέργειας από τα ακτινοβολημένα κύτταρα 'δότες' σε μη ακτινοβολημένα κύτταρα (bystander κύτταρα).

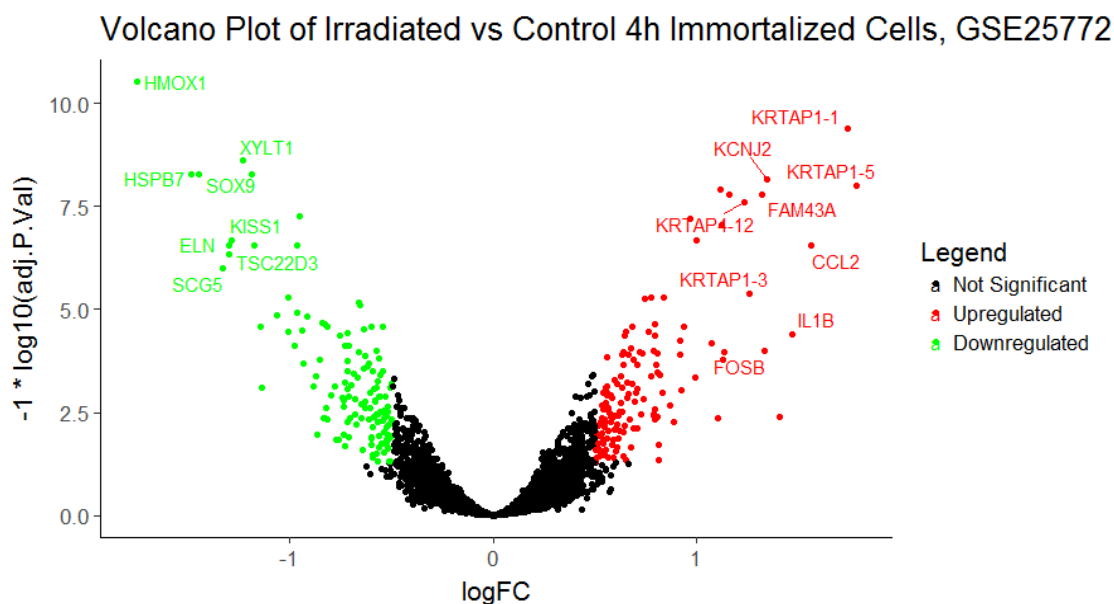
Με χρήση της βιοπληροφορικής μεθοδολογίας που παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο Μέθοδοι για τις Illumina πλατφόρμες μικροσυστοιχιών, έγινε εξαγωγή των διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων με $\text{FDR} < 0.05$ & $|\log_2 \text{Fold Change}| > 0.5$.

2.5.2 Επεξεργασία δεδομένων του GSE25772

Η επεξεργασία του συνόλου δεδομένων GSE25772 για διόρθωση υποβάθρου και κανονικοποίηση των τιμών του για την αφαίρεση τεχνικών παραγόντων διακύμανσης έγινε με μεθοδολογία για πλατφόρμες μικροσυστοιχιών Illumina. Επίσης. Εκτός από την βασική μεθοδολογία φιλτραρίσματος των εντάσεων έκφρασης ακολουθήθηκε και μία δεύτερη ειδικά σχεδιασμένη για τους ανιχνευτές έντασης της Illumina, όπως παρουσιάζεται στο κεφάλαιο Μέθοδοι. Η διερευνητική ανάλυση μέσω διαγραμμάτων πολυδιάστατης διαβάθμισης και ανάλυσης των κύριων συνιστωσών (τα διαγράμματα δεν παρουσιάζονται) έδειξε ότι υπάρχει batch effect και λήφθηκε υπόψιν στις στατιστικές δοκιμασίες.

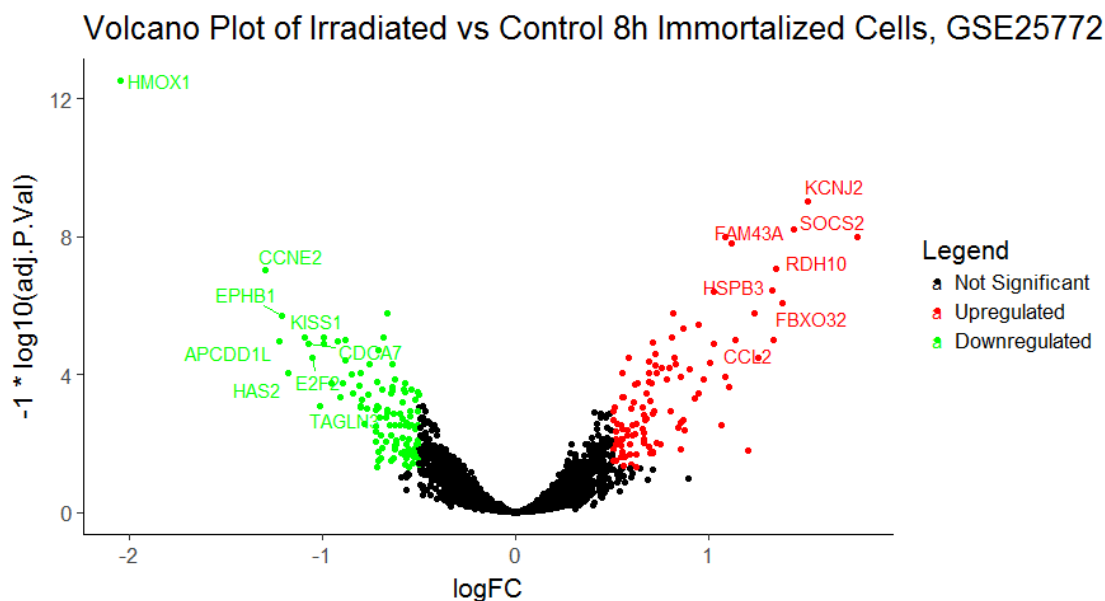
2.5.3 Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια συνόλου δεδομένων GSE25772

Από την σύγκριση μεταξύ Bystander και Control στις 4, 8 και 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση δεν λήφθηκαν διαφορικά εκφρασμένα γονίδια.



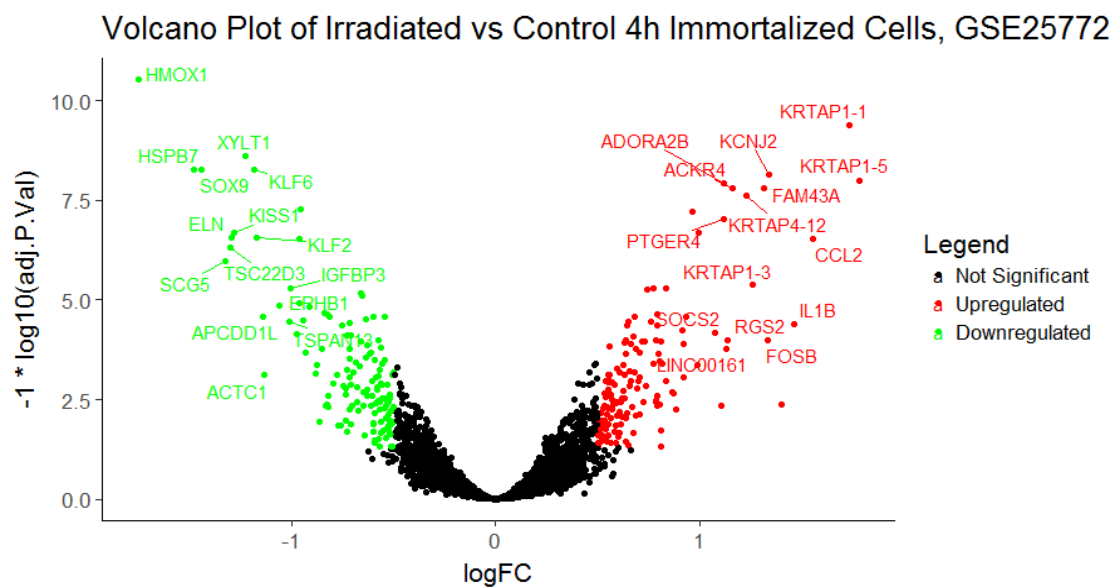
Σχήμα 2-23 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE25772. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Irradiated vs control δειγμάτων για την χρονική στιγμή 4 ωρών μετά την ακτινοβολήση. Λήφθηκαν 271 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια από τα οποία 133 υποεκφρασμένα και 138 υπερεκφρασμένα.

Από την σύγκριση μεταξύ Irradiated και Control στις 4 ώρες μετά την ακτινοβολήση, λήφθηκαν 271 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια.



Σχήμα 2-24 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE25772. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Irradiated vs control δειγμάτων για την χρονική στιγμή 8 ωρών μετά την ακτινοβολήση. Λήφθηκαν 223 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια από τα οποία 116 υποεκφρασμένα και 107 υπερεκφρασμένα

Από την σύγκριση μεταξύ Irradiated και Control στις 8 ώρες μετά την ακτινοβολήση, λήφθηκαν 223 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια.



Σχήμα 2-25 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE25772. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Irradiated vs control δειγμάτων για την χρονική στιγμή 24 ωρών μετά την ακτινοβολήση. Λήφθηκαν 1977 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια από τα οποία 965 υποεκφρασμένα και 1012 υπερεκφρασμένα.

Από την σύγκριση μεταξύ Irradiated και Control στις 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση, λήφθηκαν 1977 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια.

Επειδή δεν λήφθηκαν αποτελέσματα στατιστικά σημαντικών διαφορικών εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ Bystander και Control δεν προχωρήσαμε σε λειτουργική ανάλυση των υπολοίπων αποτελεσμάτων (Irradiated vs Control).

2.6 Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE32091

2.6.1 Γενικές πληροφορίες GSE32091

Από τις γενικές πληροφορίες για το σύνολο δεδομένων GSE32091 στην ιστοσελίδα της GEO και τις εκτενέστερες πληροφορίες από τη δημοσίευση της ανάλυσης της ερευνητικής ομάδα που πραγματοποίησε το πείραμα: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22765265> εξάγουμε τις παρακάτω πληροφορίες:

- Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από καλλιέργειες αθανοτοποιημένων κύτταρων ανθρώπινων ινοβλαστών από F11-hTERT
- Τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με 2 Gy με χρήση ισότοπου ^{60}Co .
- Δημιουργήθηκαν 3 ή 4 διαφορετικά βιολογικά replicates για κάθε μία από τις 3 καταστάσεις (irradiated, bystander, control), συνολικά 42.
- Ύστερα από 4, 8 και 24 ώρες από την ακτινοβολήση τους, έγινε η εξαγωγή του RNA.
- Η πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την ακτινοβολήση και σχηματισμό των bystander κυττάρων ήταν μεταφορά του μέσου καλλιέργειας από τα ακτινοβολημένα κύτταρα 'δότες' σε μη ακτινοβολημένα κύτταρα (bystander κύτταρα).

Με χρήση της βιοπληροφορικής μεθοδολογίας που παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο Μέθοδοι για τις Illumina πλατφόρμες μικροσυστοιχιών, έγινε εξαγωγή των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων με $\text{FDR} < 0.05$ & $|\log_2 \text{Fold Change}| > 0.5$.

2.6.2 Επεξεργασία δεδομένων του GSE32091

Η επεξεργασία του συνόλου δεδομένων GSE32091 έγινε με το ίδιο τρόπο βιοπληροφορικής διαδικασίας για την αφαίρεση τεχνικών παραγόντων διακύμανσης που ακολουθήθηκε στο σύνολο δεδομένων GSE25772 επειδή είναι από πλατφόρμα μικροσυστοιχιών Illumina. Η διερευνητική ανάλυση μέσω διαγραμμάτων πολυδιάστατης διαβάθμισης και ανάλυσης των κύριων συνιστωσών (τα διαγράμματα δεν

παρουσιάζονται) έδειξε ότι υπάρχει batch effect και λήφθηκε υπόψιν στις στατιστικές δοκιμασίες.

2.6.3 Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια συνόλου δεδομένων GSE32091

Από την σύγκριση μεταξύ Bystander και Control στις 4, 8 και 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση δεν λήφθηκαν διαφορικά εκφρασμένα γονίδια.

Από την σύγκριση μεταξύ Irradiated και Control στις 4 ώρες μετά την ακτινοβολήση, λήφθηκαν 3 διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, ένα αποτέλεσμα που δεν μπορεί να κριθεί ότι περιέχει πληροφορία. Τα γονίδια αυτά βρέθηκαν υποεκφρασμένα και είναι: FASN, DOHH, NELFB.

Από την σύγκριση μεταξύ Irradiated και Control στις 8 και 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση, δεν λήφθηκαν διαφορικά εκφρασμένα γονίδια.

2.7 Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης συνόλου δεδομένων GSE8993

2.7.1 Γενικές πληροφορίες GSE8993

Από τις γενικές πληροφορίες για το σύνολο δεδομένων GSE8993 στην ιστοσελίδα της GEO και τις εκτενέστερες πληροφορίες από τη δημοσίευση της ανάλυσης της ερευνητικής ομάδα που πραγματοποίησε το πείραμα: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538798> εξάγουμε τις παρακάτω πληροφορίες:

- Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από καλλιέργειες πρωτογενών φυσιολογικών κύτταρων ανθρώπινων ινοβλαστών από AG01522D.
- Τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με 1.3 Gy (10% survival dose; D), 0.13 Gy (0.1D), 0.013 Gy (0.01D), (broadbeam) και 0.12 Gy (microbeam 1c, 5c, 25c) με ιόντα άνθρακα (18.3 MeV/u, 108 keV/μm). Το κλάσμα των κυττάρων που ακτινοβολήθηκε με microbeam εκτιμάται μεταξύ του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων στο τρυβλίο καλλιέργειας ότι είναι 0.00026 (1c), 0.0013 (5c) και 0.0066% (25c) που χτυπήθηκαν με 10 σωματίδια.
- Δημιουργήθηκαν 2 τεχνικά replicates για κάθε μία από τις 6 καταστάσεις (irradiated, bystander, sham-irradiated control, sham-bystander control, bystander control, irradiated control), συνολικά 36.
- Ύστερα από 2 και 6 ώρες από την ακτινοβολήση τους, έγινε η εξαγωγή του RNA.
- Η πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για την ακτινοβολήση και σχηματισμό των παρακειμένων κυττάρων ήταν μέσω της χρήσης στοχευμένης

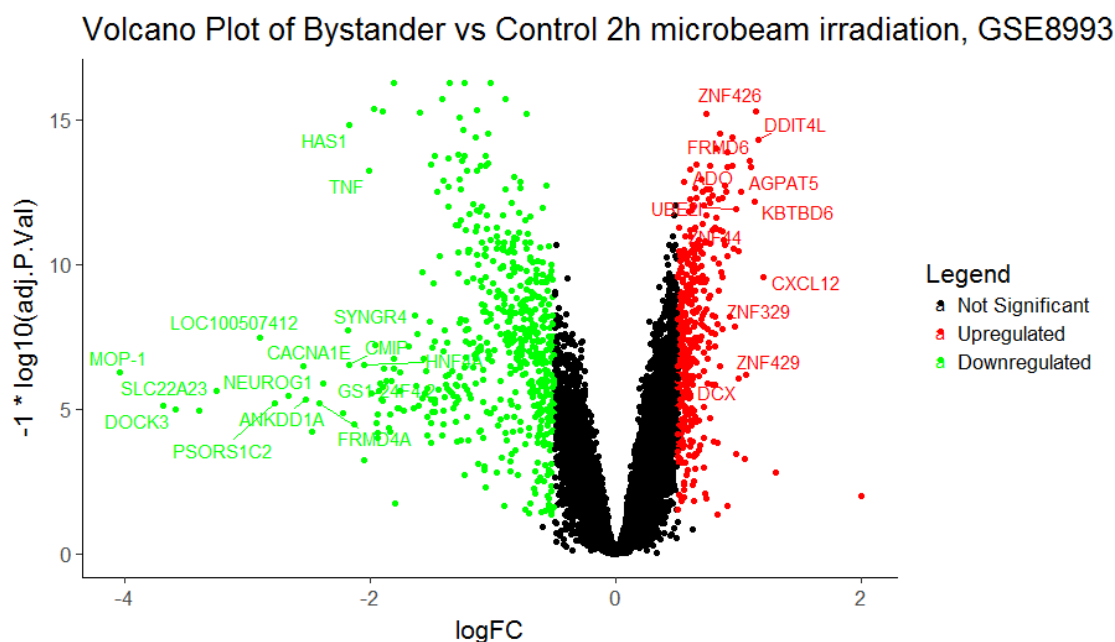
ακτινοβολήσης με μικρο-ακτίνα σε ένα μικρό κλάσμα των κυττάρων της καλλιέργειας (bystander κύτταρα). Για τα ακτινοβολημένα χρησιμοποιήθηκε μη στοχευμένη ακτινοβολήση με αποτέλεσμα να δέχονται σωματίδια είτε στον πυρήνα τους (1 στα 8) είτε στο κυτταρόπλασμα τους όλα τα κύτταρα στην καλλιέργεια.

Με χρήση της βιοπληροφορικής μεθοδολογίας που παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο Μέθοδοι για τις Agilent πλατφόρμες μικροσυστοιχιών, έγινε εξαγωγή των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων με $FDR < 0.05$ & $|\log_2 \text{Fold Change}| > 0.5$.

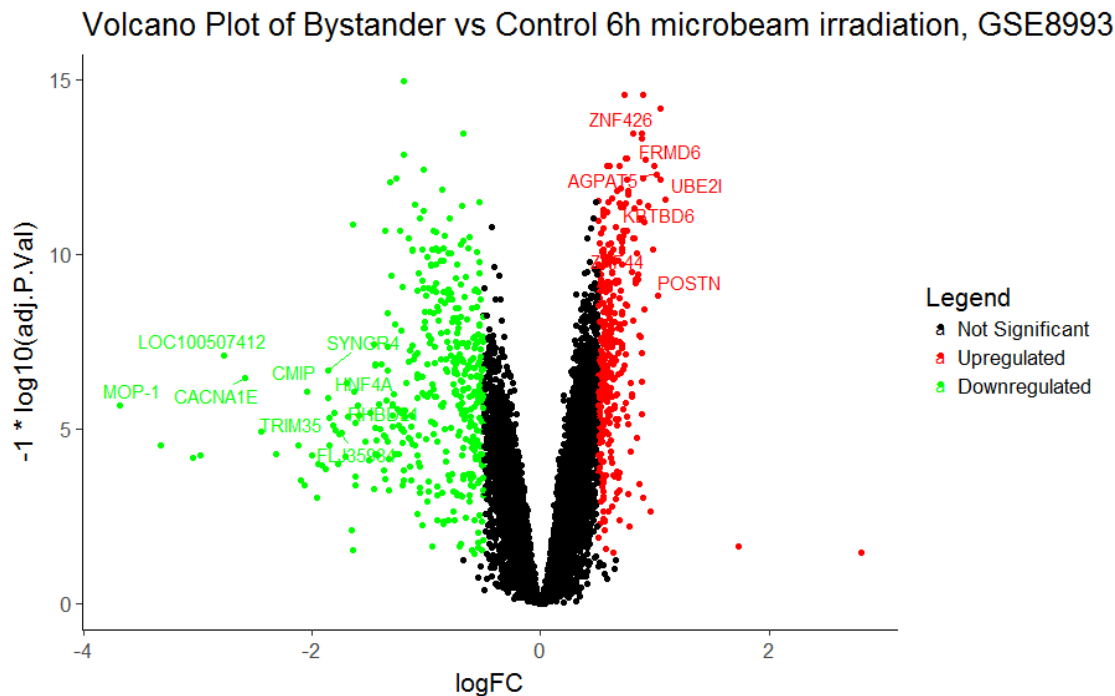
2.7.2 Επεξεργασία δεδομένων του GSE8993

Η επεξεργασία του συνόλου δεδομένων GSE8993 έγινε με το ίδιο τρόπο βιοπληροφορικής διαδικασίας για την αφαίρεση τεχνικών παραγόντων διακύμανσης που ακολουθήθηκε στα σύνολα δεδομένων GSE12435, GSE18760 και GSE21059 και GSE55869 επειδή είναι όλα από πλατφόρμα μικροσυστοιχιών Agilent. Βασική διαφορά αποτελεί ο αριθμός των δειγμάτων σε κάθε κατάσταση που είναι 2 αντί για 4 ή 5 (ως προς τα προηγούμενα σύνολα δεδομένων) και χρησιμοποιήθηκε διαφορετική οριακή τιμή για το φιλτράρισμα των εντάσεων, όπως παρουσιάζεται στο κεφάλαιο Μέθοδοι. Η διερευνητική ανάλυση μέσω διαγραμμάτων πολυδιάστατης διαβάθμισης και ανάλυσης των κύριων συνιστωσών (τα διαγράμματα δεν παρουσιάζονται) έδειξε ότι τα τεχνικά δείγματα μεταξύ τους ήταν σχεδόν πανομοιότυπα και μεταξύ τους για την κάθε διαφορετική κατάσταση. Μεταξύ διαφορετικών καταστάσεων παρατηρήθηκε batch effect και λήφθηκε υπόψιν στις στατιστικές δοκιμασίες.

2.7.3 Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια συνόλου δεδομένων GSE8993



Σχήμα 2-26 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE8993. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Bystander vs control (sham-irradiated) 0.12 Gy (microbeam 1c) δειγμάτων για την χρονική στιγμή 2 ωρών. Λήφθηκαν 1003 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. 578 υποεκφρασμένα και 425 υπερεκφρασμένα.



Σχήμα 2-27 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE8993. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Bystander vs control (sham-irradiated) 0.12 Gy (microbeam 1c) δειγμάτων για την χρονική στιγμή 6 ωρών. Λήφθηκαν 796 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. 422 υποεκφρασμένα και 374 υπερεκφρασμένα

Πλήθος στατιστικά σημαντικών γονιδίων της σύγκρισης
Bystander vs Control για κάθε χρονική στιγμή,
GSE8993

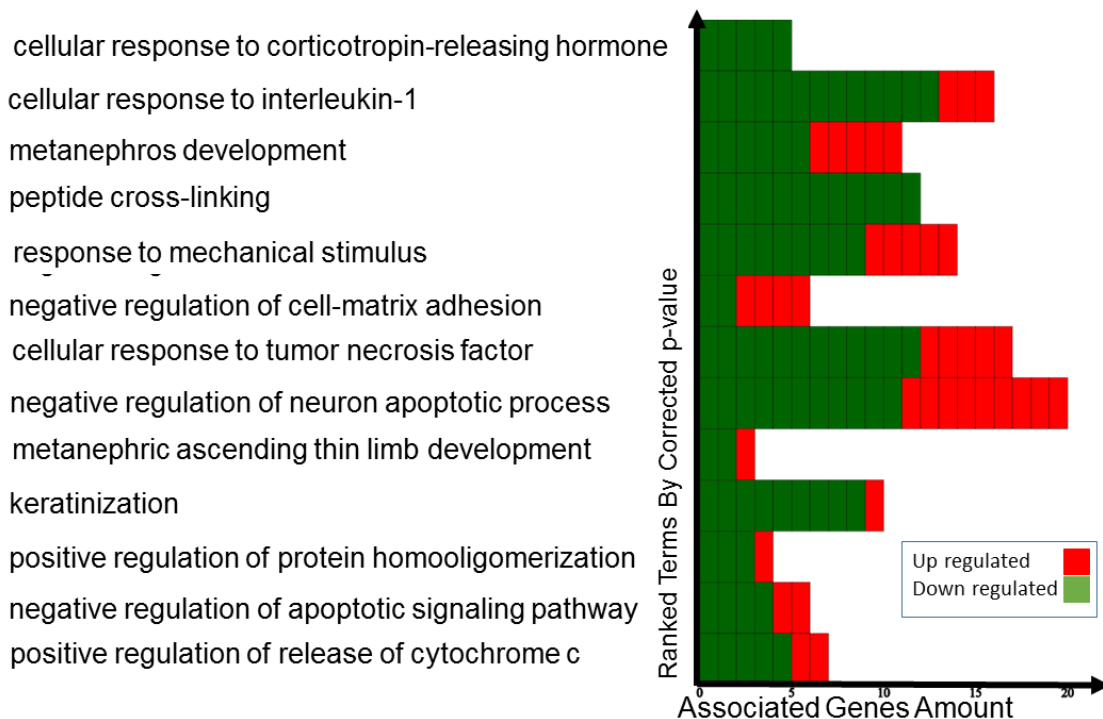
Ποσοστό κυττάρων που ακτινοβολήθηκαν με μικροακτίνια	2 ώρες μετά την ακτινοβολήση		Σύνολο	6 ώρες μετά την ακτινοβολήση		Σύνολο
	FoldChange <0	FoldChange >0		FoldChange <0	FoldChange >0	
0.00026% (1c)	578	425	1003	422	374	796
0.0013% (5c)	483	386	869	363	334	697
0.0066% (25c)	515	350	865	447	448	895

Σχήμα 2-28 Πίνακας πλήθους στατιστικά σημαντικών γονιδίων σύγκρισης Bystander vs Control GSE8993

Από τις συγκρίσεις για τα Bystander vs Control δείγματα παρατηρούμε στον Πίνακα 3-28 ότι η σύγκριση για τις 2 ώρες και ποσοστό ακτινοβολημένων κυττάρων 0.00026% περιέχει το μεγαλύτερο πλήθος στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων. Για αυτό το λόγο θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω λειτουργική ανάλυση μαζί με την ίδια σύγκριση για τις 6 ώρες.

Η λειτουργική ανάλυση του εργαλείου BioInfoMiner για την σύγκριση Bystander vs Control 2 ωρών και ποσοστό ακτινοβολημένων κυττάρων 0.00026% δίνει 29 στατιστικά σημαντικές οντολογίες βιολογικών διαδικασιών, οι 13 από αυτές παρουσιάζονται στο σχήμα 3-29. Παρόμοιες οντολογίες δίνονται από το εργαλείο Enrichr με την διαφορά ότι δεν καλύπτουν μεγάλο φάσμα διαδικασιών σε σχέση με του BioInfoMiner (ο πίνακας δίνεται στο παράρτημα). Επίσης οι οντολογίες κυτταρικών στοιχείων που προκύπτουν από το BioInfoMiner έχουν σχέση με τον εξωκυττάριο χώρο, το πυρήνα και σύμπλοκα όπως το I-kappaB/NF-kappaB, μεταγραφικών παραγόντων, polycystin και nuclear telomere cap. Τέλος οντολογίες των μοριακών λειτουργιών έχουν σχέση με δραστικότητα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων σε ειδικές αλληλουχίες του DNA, δραστικότητα κυτοκινών και πρόσδεσης λιγάνης ουβικιτίνης. Επιπρόσθετα μέσω της λειτουργικής ανάλυσης του εργαλείου Enrichr παρουσιάζονται τα κυριότερα μοριακά μονοπάτια με χρήση της KEGG 2016 που περιέχουν τα γονίδια της ανάλυσης. Με βάση την ιεράρχηση τους από το πιο στατιστικά σημαντικό είναι το TNF signaling pathway hsa04668, Maturity onset diabetes of the young hsa04950, Transcriptional misregulation in cancer hsa05202, NOD-like receptor signaling pathway hsa04621, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications hsa04933, NF-kappa B signaling pathway hsa04064 και Cytokine-cytokine receptor interaction hsa04060.

Ραβδόγραμμα οντολογιών συνόλου δεδομένων GSE8993 Bystander vs Control 2h

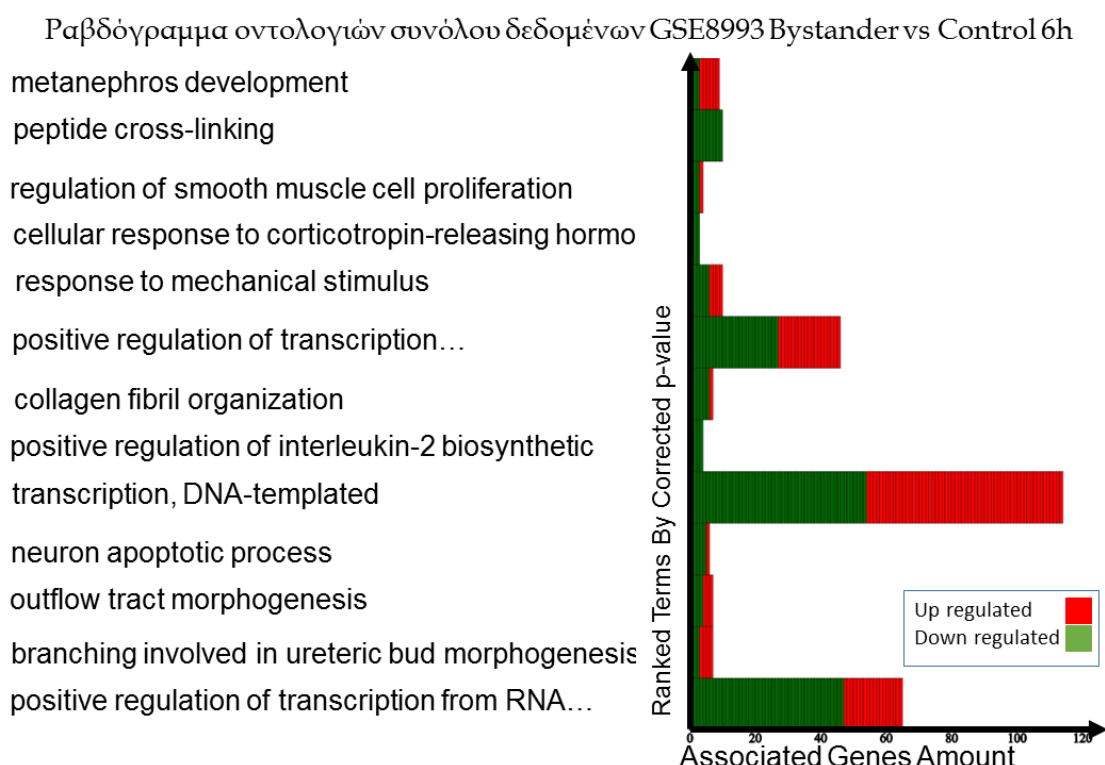


Σχήμα 2-29 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Bystander vs Control GSE8993 στις 2h. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.

Επίσης λήφθηκε μία λίστα 44 κομβικών γονιδίων βάση της ιεράρχησης γονιδίων του εργαλείου BioInfoMiner. Από τα 44 κομβικά γονίδια τα 34 είχαν βρεθεί υποεκφρασμένα και τα 10 υπερεκφρασμένα. Ενδεικτικά με βάση την ιεράρχηση του εργαλείου τα 13 πρώτα στατιστικά σημαντικά κομβικά γονίδια είναι: IL1B, THBS1, BCL2, PTGS2, BAX, DCN, NR4A3, TNF, IL6, F2R, CCL2, ZC3H12A και IL1A.

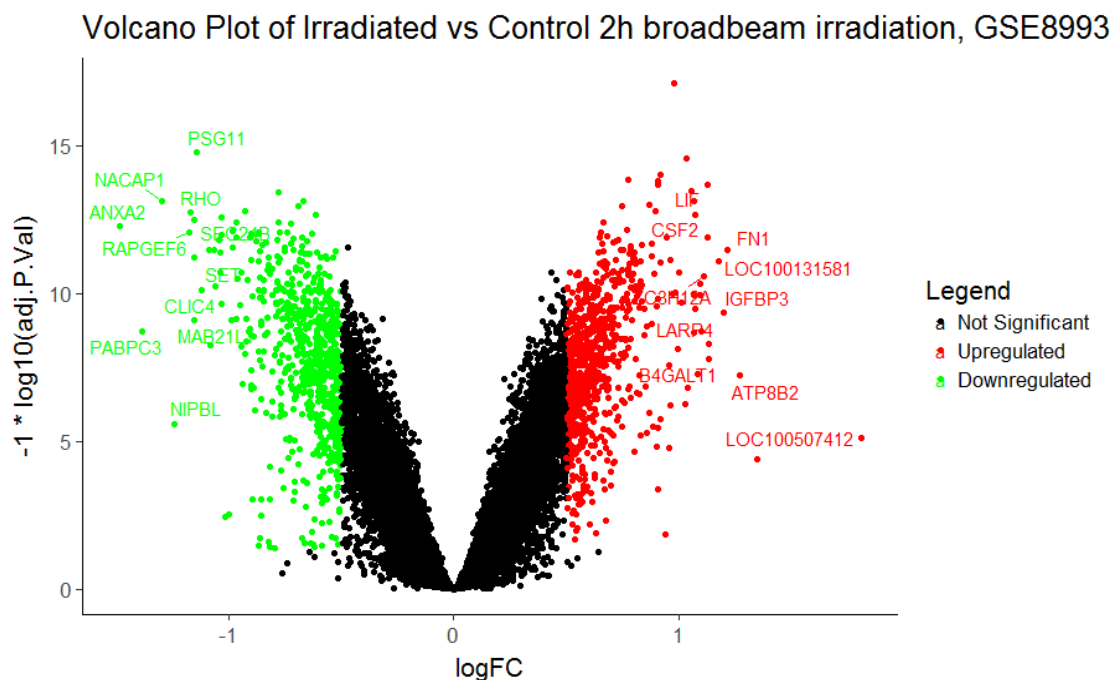
Η λειτουργική ανάλυση του εργαλείου BioInfoMiner για την σύγκριση Bystander vs Control 6 ωρών και ποσοστό ακτινοβολημένων κυττάρων 0.00026% δίνει 26 στατιστικά σημαντικές οντολογίες βιολογικών διαδικασιών, οι 13 από αυτές παρουσιάζονται στο σχήμα 3-30. Παρόμοιες οντολογίες δίνονται από το εργαλείο Enrichr (ο πίνακας δίνεται στο παράρτημα). Επίσης οι οντολογίες κυτταρικών στοιχείων που προκύπτουν από το BioInfoMiner έχουν σχέση με τον εξωκυττάριο χώρο, το πυρήνα και σύμπλοκα όπως τον εξωκυττάριο χώρο, σύμπλοκα μεταγραφικών παραγόντων, πυρήνα, σύμπλοκο ινωδογόνου και εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Τέλος οντολογίες των μοριακών λειτουργιών έχουν σχέση με δραστηριότητα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων σε ειδικές αλληλουχίες του DNA, δραστηριότητα φωσφολιπάσης D, πρόσδεσης λαμινίνης

και πρόσδεσης λιγάσης ουβικιτίνης. Επιπρόσθετα μέσω της λειτουργικής ανάλυσης του εργαλείου Enrichr παρουσιάζονται τα κυριότερα μοριακά μονοπάτια με χρήση της KEGG 2016 που περιέχουν τα γονίδια της ανάλυσης. Με βάση την ιεράρχηση τους από το πιο στατιστικά σημαντικό είναι το Pathways in cancer hsa05200, Maturity onset diabetes of the young hsa04950, Transcriptional misregulation in cancer hsa05202, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications hsa04933, Transcriptional misregulation in cancer hsa05202, p53 signaling pathway hsa04115, TGF-beta signaling pathway hsa04350 και Apoptosis hsa04210.



Σχήμα 2-30 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Bystander vs Control GSE8993 στις 6h. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.

Επιπρόσθετα λήφθηκε μία λίστα 22 κομβικών γονιδίων βάση της ιεράρχησης γονιδίων του εργαλείου BioInfoMiner. Από τα 22 κομβικά γονίδια τα 17 είχαν βρεθεί υποεκφρασμένα και τα 5 υπερεκφρασμένα. Ενδεικτικά με βάση την ιεράρχηση του εργαλείου τα 17 πρώτα στατιστικά σημαντικά κομβικά γονίδια είναι NF1, THBS1, COL3A1, IL1B, DCN, NR4A2, NR4A3, FGF2, BMP4, HMOX1, STC1, BCL2, ID2, IL1A, NIPBL, FOXB1 και TGFBR1.



Σχήμα 2-31 Διάγραμμα ηφαιστείου συνόλου δεδομένων GSE8993. Παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ Irradiated vs control (sham-irradiated) 0.013 Gy (0.01D, broadband) δειγμάτων για την χρονική στιγμή 2 ωρών. Λήφθηκαν 1502 στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. 703 υποεκφρασμένα και 799 υπερεκφρασμένα.

Πλήθος στατιστικά σημαντικών γονιδίων της σύγκρισης
Irradiated vs Control για κάθε χρονική στιγμή, GSE8993

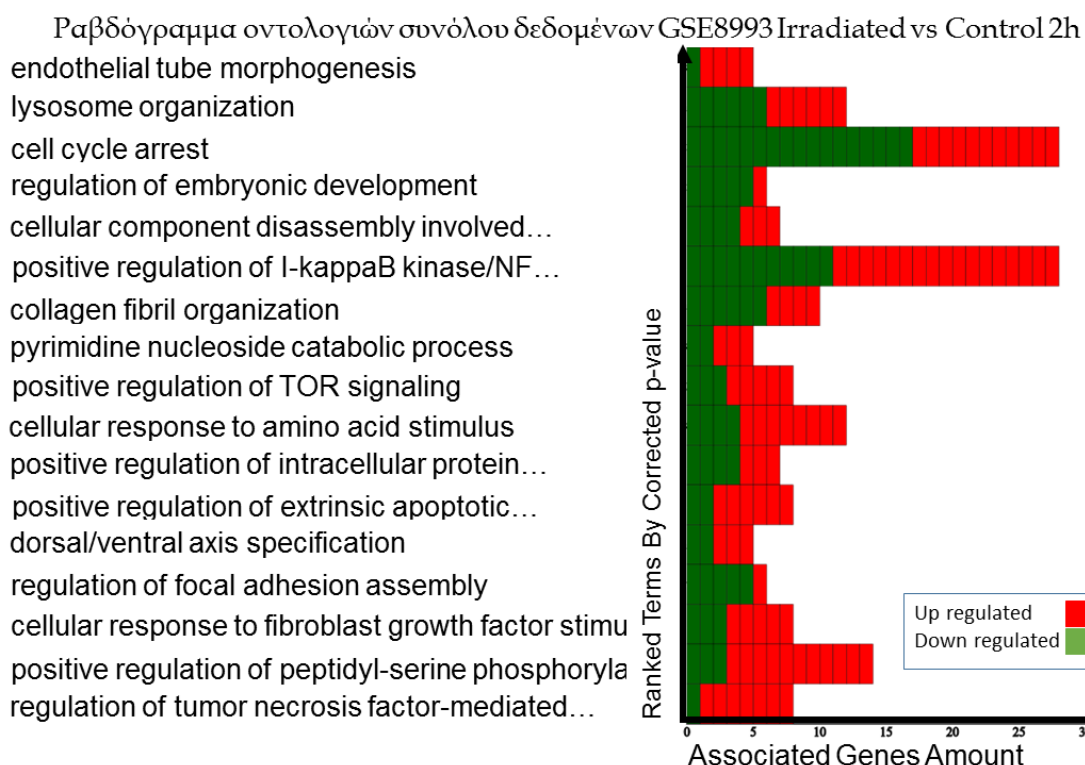
Δόση μη στοχευμένης ακτινοβολίας	2 ώρες μετά την ακτινοβολήση		Σύνολο	6 ώρες μετά την ακτινοβολήση		Σύνολο
	FoldChange <0	FoldChange >0		FoldChange <0	FoldChange >0	
0.013 Gy (0.01D)	703	799	1502	1070	827	1897
0.13 Gy (0.1D)	69	37	106	902	815	1717
1.3 Gy (1D)	169	117	286	202	138	340

Σχήμα 2-32 Πίνακας πλήθους στατιστικά σημαντικών γονιδίων σύγκρισης Irradiated vs Control GSE8993

Από τις συγκρίσεις για τα Irradiated vs Control δείγματα παρατηρούμε ότι η σύγκριση για τις 2 ώρες και δόση μη στοχευμένης ακτινοβολίας 0.013 Gy (0.01D) περιέχει το μεγαλύτερο πλήθος στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων. Για αυτό το λόγο θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω λειτουργική ανάλυση μαζί με την ίδια σύγκριση για τις 6 ώρες.

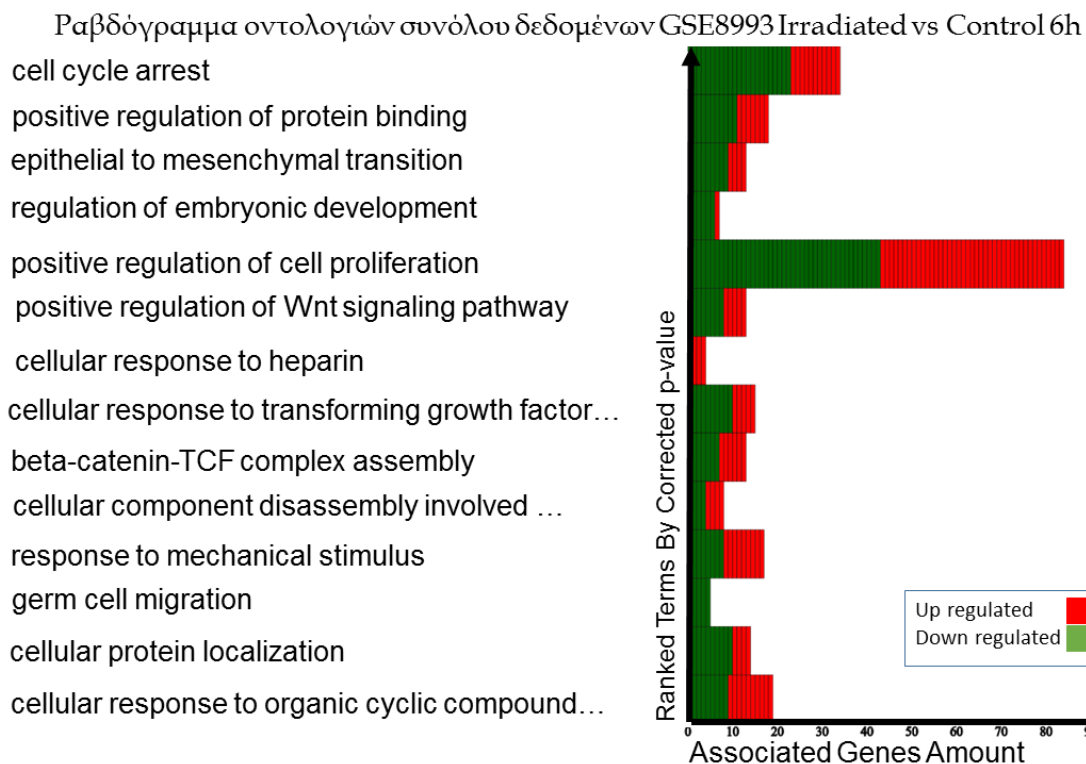
Η λειτουργική ανάλυση του εργαλείου BioInfoMiner για την σύγκριση Irradiated vs Control 2 ωρών και δόση ακτινοβολίας κυττάρων 0.013 Gy (0.01D) δίνει 33 στατιστικά

σημαντικές οντολογίες βιολογικών διαδικασιών, οι 13 από αυτές παρουσιάζονται στο σχήμα 3-33. Παρόμοιες οντολογίες δίνονται από το εργαλείο Enrichr με την διαφορά ότι δεν καλύπτουν μεγάλο φάσμα διαδικασιών σε σχέση με του BioInfoMiner (ο πίνακας δίνεται στο παράρτημα). Επίσης οι οντολογίες κυτταρικών στοιχείων που προκύπτουν από το BioInfoMiner έχουν σχέση με τον εξωκυττάριο χώρο, το πυρήνα και σύμπλοκα όπως το I-kappaB/NF-kappaB, μεταγραφικών παραγόντων, polycystin και nuclear telomere cap. Τέλος οντολογίες των μοριακών λειτουργιών έχουν σχέση με δραστικότητα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων σε ειδικές αλληλουχίες του DNA, δραστικότητα κυτοκινών και πρόσδεσης λιγάνης ουβικιτίνης. Επιπρόσθετα μέσω της λειτουργικής ανάλυσης του εργαλείου Enrichr παρουσιάζονται τα κυριότερα μοριακά μονοπάτια με χρήση της KEGG 2016 που περιέχουν τα γονίδια της ανάλυσης. Με βάση την ιεράρχηση τους από το πιο στατιστικά σημαντικό είναι TNF signaling pathway hsa04668, Proteoglycans in cancer hsa05205, Focal adhesion hsa04510, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications hsa04933, Small cell lung cancer hsa05222, p53 signaling pathway hsa04115 και Ubiquitin mediated proteolysis hsa04120.



Σχήμα 2-33 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Irradiated vs Control GSE8993 στις 6h. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.

Επιπρόσθετα λήφθηκε μία λίστα 28 κομβικών γονιδίων βάση της ιεράρχησης γονιδίων του εργαλείου BioInfoMiner. Από τα 28 κομβικά γονίδια τα 10 είχαν βρεθεί υποεκφρασμένα και τα 18 υπερεκφρασμένα. Ενδεικτικά με βάση την ιεράρχηση του εργαλείου τα 13 πρώτα στατιστικά σημαντικά κομβικά γονίδια είναι TNF, CTNNB1, CAV1, JUN, THBS1, TGFBR1, CCL2, IL1B, KLF4, GREM1, SFRP1, CXCL8 και GAS6.



Σχήμα 2-34 Διάγραμμα οντολογιών σύγκρισης Irradiated vs Control GSE8993 στις 6h. Οι οντολογίες έχουν ταξινομηθεί με βάση τη διορθωμένη τιμή p που προκύπτει από την στατιστική δοκιμασία του BioInfoMiner. Οι υψηλότερες οντολογίες είναι στατιστικά σημαντικότερες. Επίσης με την μορφή τετραγώνων δίνεται ο αριθμός των γονιδίων που συσχετίζονται με την κάθε οντολογία. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.

Η λειτουργική ανάλυση του εργαλείου BioInfoMiner για την σύγκριση Irradiated vs Control 6 ωρών και δόση ακτινοβολίας κυττάρων 0.013 Gy (0.01D) δίνει 34 στατιστικά σημαντικές οντολογίες βιολογικών διαδικασιών, οι 14 από αυτές παρουσιάζονται στο σχήμα 3-34. Παρόμοιες οντολογίες δίνονται από το εργαλείο Enrichr (ο πίνακας δίνεται στο παράρτημα). Επίσης οι οντολογίες κυτταρικών στοιχείων που προκύπτουν από το BioInfoMiner έχουν σχέση με την εξωκυτταρική θεμέλια ουσία, το πυρηνόπλασμα, την περιπυρηνική περιοχή του κυτταροπλάσματος και τις κομβικές συνδέσεις μεταξύ κυττάρων. Τέλος οντολογίες των μοριακών λειτουργιών έχουν σχέση με πρόσδεση polyA στο RNA, πρόσδεση λαμίνης-1, πρόσδεση κολλαγόνου, TGF-beta1 ενεργότητα υποδοχέα και πρόσδεση λιγάνης ουβικιτίνης. Επιπρόσθετα μέσω της λειτουργικής

ανάλυσης του εργαλείου Enrichr παρουσιάζονται τα κυριότερα μοριακά μονοπάτια με χρήση της KEGG 2016 που περιέχουν τα γονίδια της ανάλυσης. Με βάση την ιεράρχηση τους από το πιο στατιστικά σημαντικό είναι Pathways in cancer hsa05200, Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells hsa04550, Focal adhesion hsa04510, Wnt signaling pathway hsa04310, Basal cell carcinoma hsa05217, TNF signaling pathway hsa04668, Ubiquitin mediated proteolysis hsa04120, PI3K-Akt signaling pathway hsa04151 και Small cell lung cancer hsa05222.

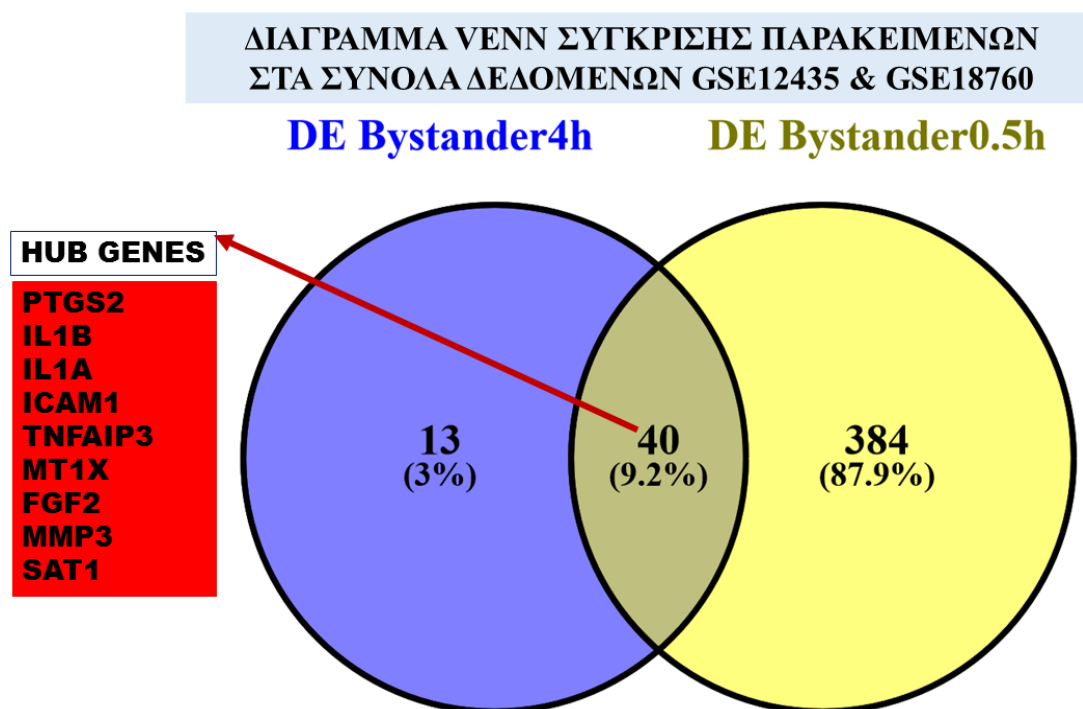
Ακόμη λήφθηκε μία λίστα 22 κομβικών γονιδίων βάση της ιεράρχησης γονιδίων του εργαλείου BioInfoMiner. Από τα 22 κομβικά γονίδια τα 13 είχαν βρεθεί υποεκφρασμένα και τα 9 υπερεκφρασμένα. Ενδεικτικά με βάση την ιεράρχηση του εργαλείου τα 10 πρώτα στατιστικά σημαντικά κομβικά γονίδια είναι TGFBR1, SOX9, BMP4, WNT5A, THBS1, SFRP1, MEF2C, PTEN, CTNNB1 και BMP2.

2.8 Συγκριτική ανάλυση μεταξύ συνόλων δεδομένων

2.8.1 Επιλογή συνόλων δεδομένων για συγκριτική ανάλυση αποτελεσμάτων

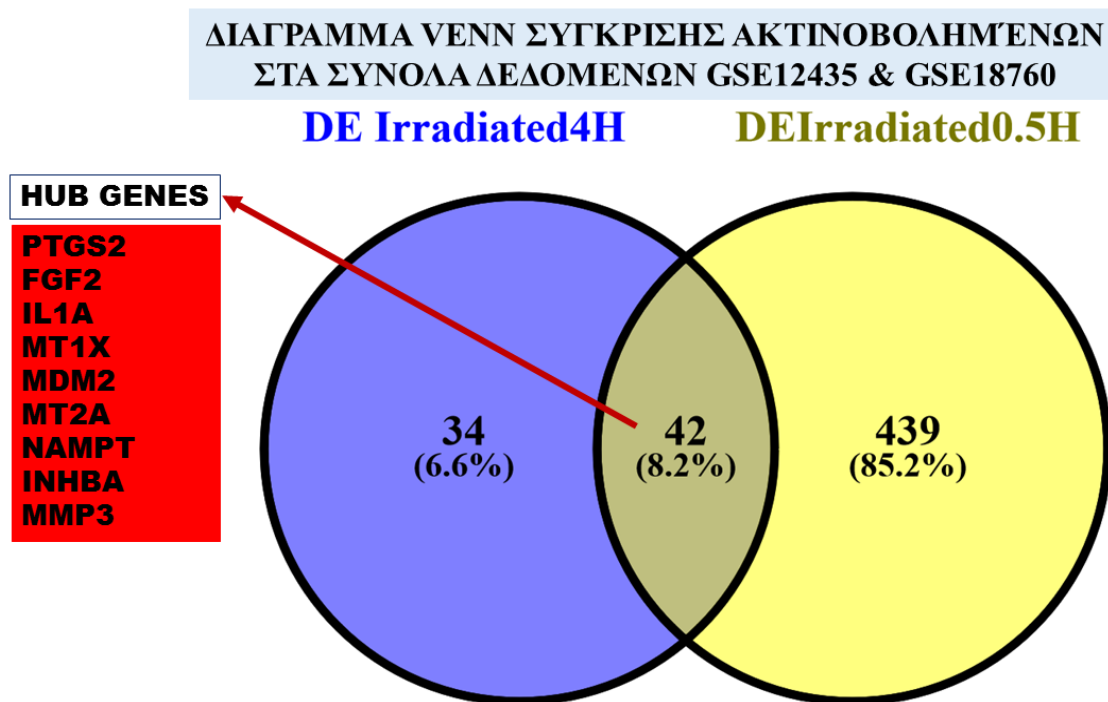
Από τα 7 σύνολα δεδομένων που αναλύθηκαν μόνο από 4 λήφθηκαν στατιστικά σημαντικά, διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια από τις συγκρίσεις μεταξύ Bystander vs Control (GSE12435, GSE18760, GSE21059, GSE8993). Επειδή στο σύνολο δεδομένων GSE8993 έχει χρησιμοποιηθεί διαφορετικός τύπος κυττάρων, διαφορετικές χρονικές στιγμές εξαγωγής RNA μετά την ακτινοβολία και διαφορετική κατηγορία ιοντίζουσας ακτινοβολίας (ιόντα άνθρακα) δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω συγκριτική ανάλυση με τα υπόλοιπα σύνολα δεδομένων λόγω πολύ διαφορετικής πειραματικής διαδικασίας. Από τα υπόλοιπα τρία σύνολα δεδομένων, βασική διαφορά είναι ότι έχουν διαφορετική χρονική στιγμή εξαγωγής του RNA μετά την ακτινοβολία (GSE18760: 0.5h, GSE12435: 4h και GSE21059: 0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h και 24h). Αυτή η βασική διαφορά δημιουργεί προβλήματα στην περαιτέρω στατιστική τους μετα-ανάλυση για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε ένας πιο απλός και συντηρητικός τρόπος για τις μεταξύ τους συγκρίσεις. Έγινε χρήση διαγραμμάτων Venn για την εύρεση κοινών διαφορεικά εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ των 2 συνόλων δεδομένων αρχικά (GSE12435, GSE18760) και στην συνέχεια και των τριών για την εύρεση των πιο συντηρημένων διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων που είναι κυρίαρχα στο φαινότυπο των παρακειμένων κυττάρων αποκρινόμενα στην ΙΑ.

2.8.2 Συγκριτική ανάλυση μεταξύ συνόλων δεδομένων GSE12435, GSE18760



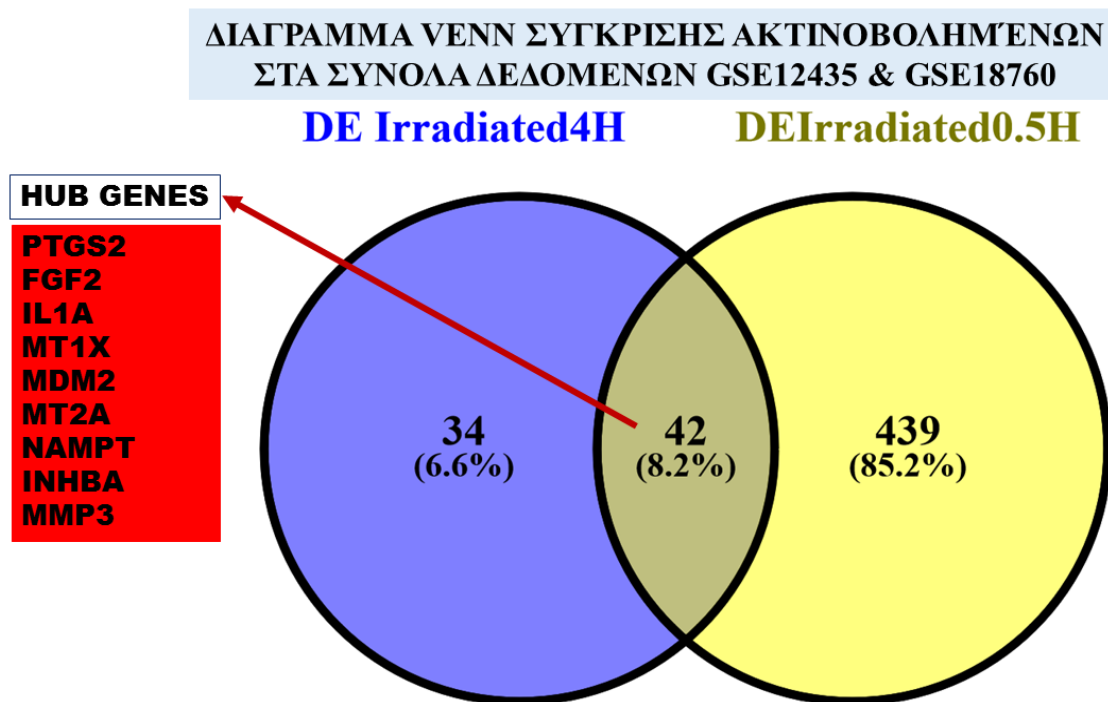
Σχήμα 2-35 Venn διάγραμμα σύγκρισης διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων που προέκυψαν από τις συγκρίσεις των Bystander vs Control των συνόλων δεδομένων GSE12435 και GSE18760. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.

Μετά την σύγκριση των δύο λιστών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων των συγκρίσεων Bystander vs Control, λήφθηκαν 40 κοινά γονίδια. Και τα 40 είχαν ίδια υπερέκφραση ή υποέκφραση παρόλο που προέκυψαν από 2 διαφορετικές χρονικές στιγμές. Με λειτουργική ανάλυση των 40 γονιδίων λήφθηκαν 9 κομβικά γονίδια (σχήμα 3-35) και τα 9 είχαν βρεθεί υπερεκφρασμένα. Επίσης οι πιο σημαντικές οντολογίες είναι: cellular response to zinc ion, inflammatory response και cell migration.



Σχήμα 2-36 Venn διάγραμμα σύγκρισης διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων που προέκυψαν από τις συγκρίσεις των Bystander vs Control των συνόλων δεδομένων GSE12435 και GSE18760. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.

Μετά την σύγκριση των δύο λιστών διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων των συγκρίσεων Bystander vs Control, λήφθηκαν 40 κοινά γονίδια. Και τα 40 είχαν ίδια υπερ-έκφραση ή υπο-έκφραση παρόλο που προέκυψαν από 2 διαφορετικές χρονικές στιγμές. Με λειτουργική ανάλυση των 40 γονιδίων λήφθηκαν 9 κομβικά γονίδια (σχήμα 3-36) και τα 9 είχαν βρεθεί υπερεκφρασμένα. Επίσης οι πιο σημαντικές οντολογίες είναι: cellular response to zinc ion, inflammatory response και cell migration.

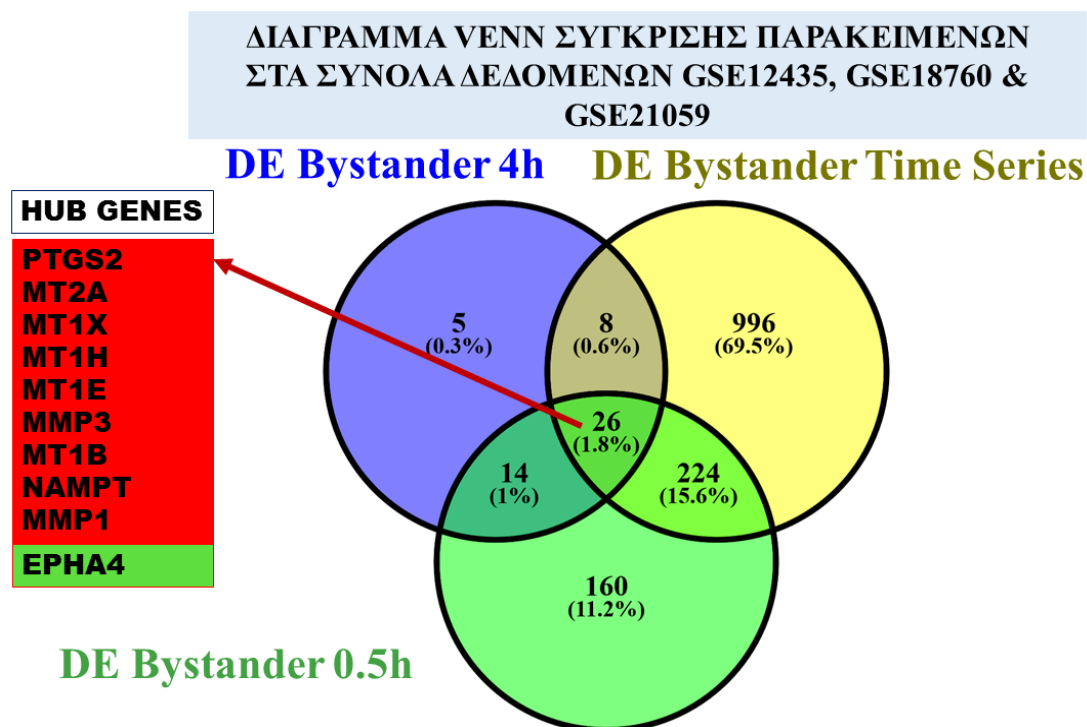


Σχήμα 2-37 Venn διάγραμμα σύγκρισης διαφορεικά εκφρασμένων γονιδίων που προέκυψαν από τις συγκρίσεις των Irradiated vs Control των συνόλων δεδομένων GSE12435 και GSE18760. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.

Μετά την σύγκριση των δύο λιστών διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων των συγκρίσεων Irradiated vs Control, λήφθηκαν 42 κοινά γονίδια. Και τα 42 είχαν ίδια υπερέκφραση ή υποέκφραση παρόλο που προέκυψαν από 2 διαφορετικές χρονικές στιγμές. Με λειτουργική ανάλυση των 40 γονιδίων λήφθηκαν 9 κομβικά γονίδια (διάγραμμα 3-37) και τα 9 είχαν βρεθεί υπερεκφρασμένα. Επίσης οι πιο σημαντικές οντολογίες είναι: cellular response to zinc ion, negative regulation of growth, inflammatory response και extrinsic apoptotic signaling pathway.

Από τα 40 κοινά γονίδια μεταξύ παρακειμένων και 42 κοινά γονίδια μεταξύ ακτινοβολημένων δειγμάτων που προέκυψαν από τις παραπάνω συγκρίσεις τα 30 είναι κοινά. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι αυτά τα κοινά γονίδια που παραμένουν συντηρημένα σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές αποτελούν τον βασικό μηχανισμό που μοιράζεται το φαινόμενο της απόκρισης στην ΙΑ των παρακειμένων και των ακτινοβολημένων κυττάρων στις 0.5 και 4 ώρες.

2.8.3 Συγκριτική ανάλυση μεταξύ συνόλων δεδομένων GSE12435, GSE18760 και GSE21059



Σχήμα 2-38 Venn διάγραμμα σύγκρισης διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων που προέκυψαν από τις συγκρίσεις των Bystander vs Control των συνόλων δεδομένων GSE12435, GSE18760 και GSE21059. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.

Μετά την σύγκριση των τριών λιστών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων των συγκρίσεων Bystander vs Control, λήφθηκαν 26 κοινά γονίδια. Και τα 26 είχαν ίδια υπερέκφραση ή υποέκφραση παρόλο που προέκυψαν από 2 διαφορετικές χρονικές στιγμές και ανάλυση ANOVA 6 διαφορετικών χρονικών στιγμών. Τα 16 από τα 26 παρουσιάζονται στους πίνακες 3-39, 3-40. Με λειτουργική ανάλυση των 26 γονιδίων λήφθηκαν 10 κομβικά γονίδια (διάγραμμα 3-38). Από τα 10 τα 9 είχαν βρεθεί υπερεκφρασμένα. Επίσης οι πιο σημαντικές οντολογίες είναι: cellular response to zinc ion , extracellular matrix disassembly και cell migration.

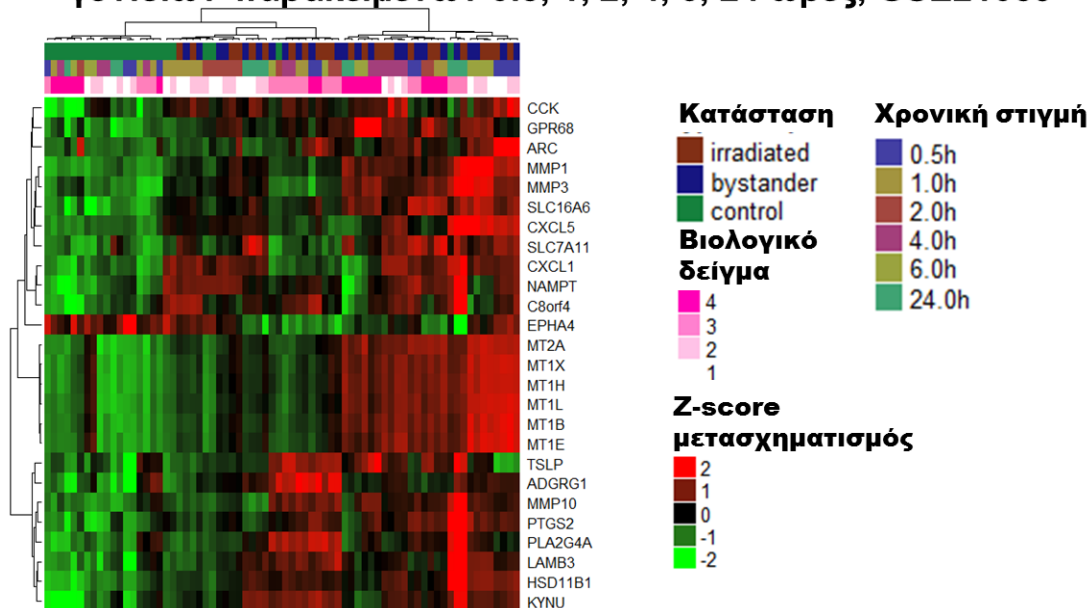
Πίνακας κοινών στατιστικά σημαντικών γονιδίων παρακειμένων κυττάρων								
Κοινά Γονίδια	Log ₂ Fold Change							
Σύνολα Δεδομένων	Bystander (GSE18760)	Bystander (GSE12435)	Bystander (GSE21059) Time-Series					
Χρονικά Σημεία	0.5h	4h	0.5h	1h	2h	4h	6h	24h
MT1B	2.421	1.905	2.456	0.898	1.122	1.927	1.244	1.185
MT1E	2.574	2.165	2.620	0.964	1.143	2.178	1.209	1.114
MT1H	2.380	2.001	2.424	0.982	1.076	2.028	1.186	1.205
MT1X	2.528	2.002	2.480	1.013	1.048	2.033	1.173	1.196
MT2A	1.690	1.450	1.704	0.678	0.790	1.455	0.885	0.975
PTGS2	2.615	2.401	2.769	0.842	1.036	2.259	2.616	0.323
CXCL5	1.589	2.063	1.975	0.383	0.133	1.772	2.335	1.154
MMP3	2.582	1.932	2.690	1.143	0.963	1.901	3.335	2.023

Σχήμα 2-39 Πίνακας κοινών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων (1 έως 8/26) μεταξύ των τριών συνόλων δεδομένων από την σύγκριση Bystander vs Control.

Πίνακας κοινών στατιστικά σημαντικών γονιδίων παρακειμένων κυττάρων								
Κοινά Γονίδια	Log ₂ Fold Change							
Σύνολα Δεδομένων	Bystander (GSE18760)	Bystander (GSE12435)	Bystander (GSE21059) Time-Series					
Χρονικά Σημεία	0.5h	4h	0.5h	1h	2h	4h	6h	24h
MT1L	2.364	1.931	2.404	0.898	1.014	1.958	1.192	1.280
ARC	2.102	1.904	2.778	0.603	-0.374	1.289	1.244	0.163
TSLP	0.618	1.407	0.703	0.628	0.466	1.354	0.829	1.043
CXCL1	1.518	1.420	1.508	0.673	0.761	1.453	1.160	0.836
MT2A	1.690	1.450	1.705	0.679	0.791	1.455	0.886	0.976
MMP1	2.154	1.648	2.187	1.078	0.941	1.662	2.827	1.366
MMP10	1.098	1.666	1.262	0.726	0.699	1.549	1.663	0.892
KYNU	1.963	1.806	2.121	1.220	0.876	1.622	1.385	1.332

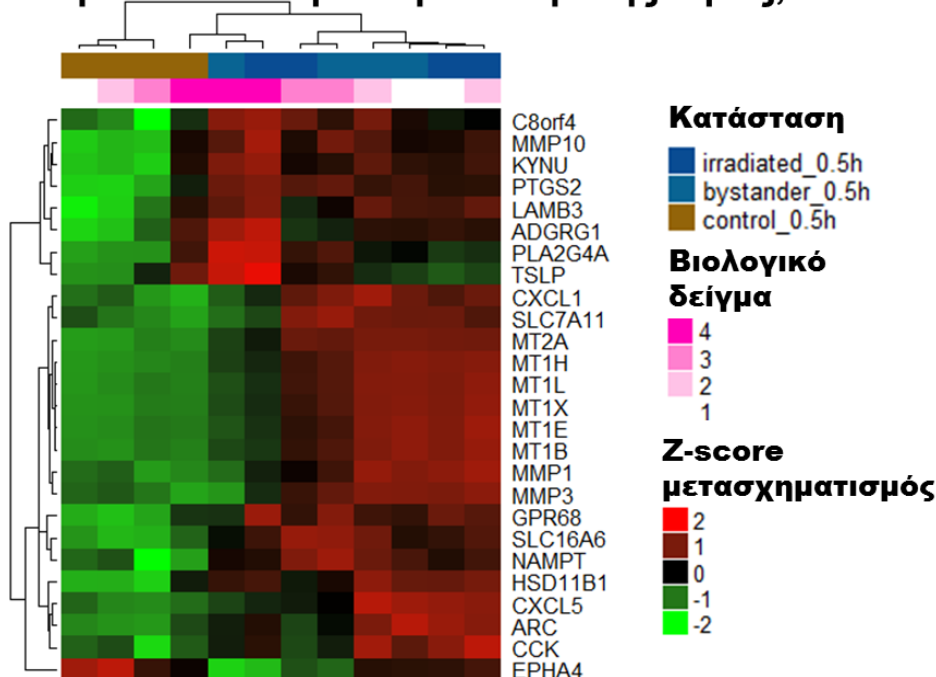
Σχήμα 2-40 Πίνακας κοινών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων (9 έως 16/26) μεταξύ των τριών συνόλων δεδομένων από την σύγκριση Bystander vs Control.

Θερμικό διάγραμμα 26 κοινών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων παρακειμένων 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 ώρες, GSE21059



Σχήμα 2-41 Θερμικό διάγραμμα 26 κοινών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων από τις συγκρίσεις των Bystander vs Control από τα τρία σύνολα δεδομένων για το GSE21059. Έχει χρησιμοποιηθεί μέθοδος ομαδοποίησης Ward και μέτρησης αποστάσεων Euclidean. Με πράσινο παρατηρούμε ότι ομαδοποιούνται τα περισσότερα από τα Control.

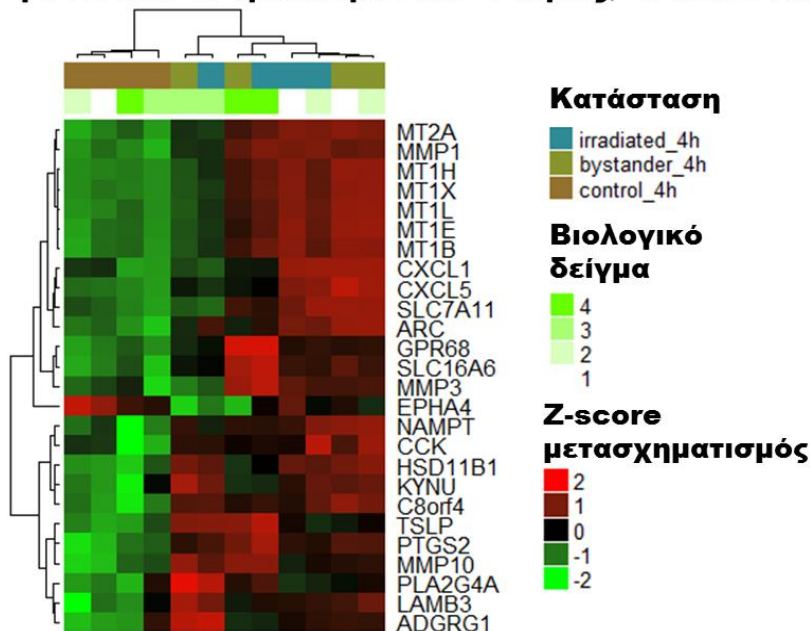
Θερμικό διάγραμμα 26 κοινών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων παρακειμένων μισής ώρας, GSE18760



Σχήμα 2-42 Θερμικό διάγραμμα 26 κοινών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων από τις συγκρίσεις των Bystander vs Control από τα τρία σύνολα δεδομένων για το GSE18760.. Έχει χρησιμοποιηθεί

μέθοδος ομαδοποίησης Ward και μέτρησης αποστάσεων Euclidean. Με καφέ παρατηρούμε ότι ομαδοποιούνται μόνο τους τα Control.

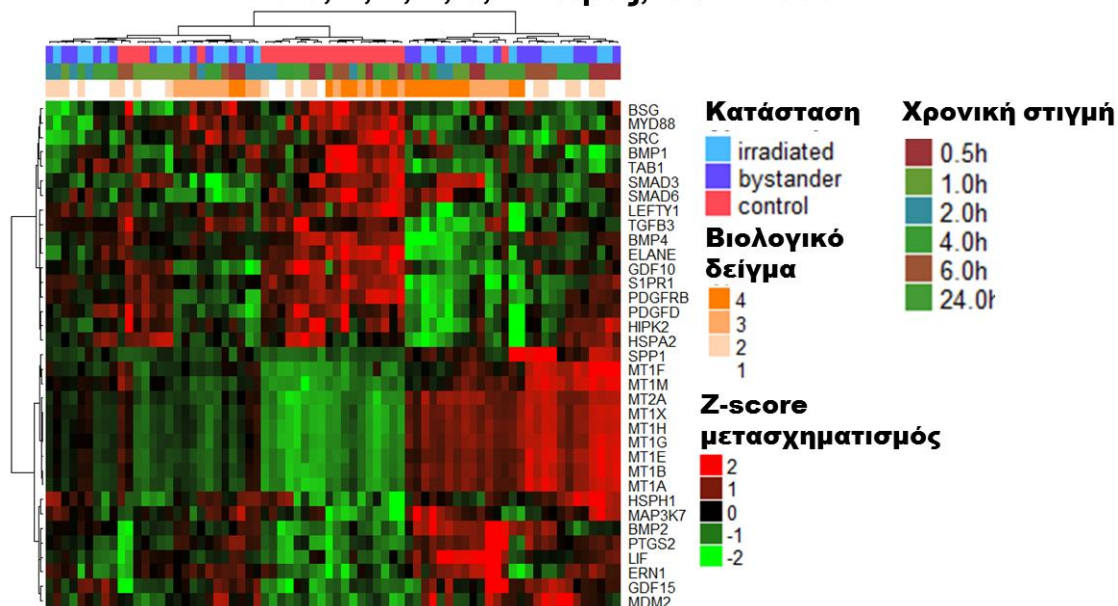
Θερμικό διάγραμμα 26 κοινών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων παρακειμένων 4 ώρες, GSE12435



Σχήμα 2-43 Θερμικό διάγραμμα 26 κοινών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων από τις συγκρίσεις των Bystander vs Control από τα τρία σύνολα δεδομένων για το GSE12435. Έχει χρησιμοποιηθεί μέθοδος ομαδοποίησης Ward και μέτρησης αποστάσεων Euclidean. Με καφέ παρατηρούμε ότι ομαδοποιούνται μόνο τους τα Control.

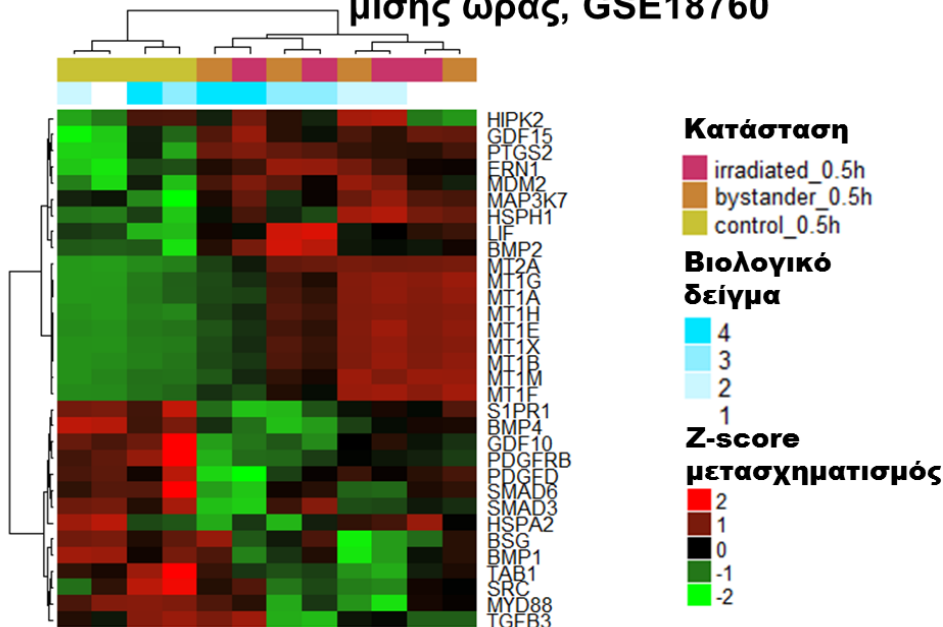
Στα παραπάνω θερμικά διαγράμματα μπορεί να παρατηρηθεί ότι το σύνολο των 26 κοινών διαφορικά εκφρασμένων μεταξύ Bystander vs Control που προέκυψαν από την σύγκριση των τριών συνόλων δεδομένων διαχωρίζουν τα control δείγματα από τα bystander και irradiated στις 4 ώρες. Στην μισή ώρα δεν διαχωρίζουν ένα και στο σύνολο δεδομένων πολλαπλών χρονικών σημείων δεν διαχωρίζει 4. Επειδή δεν υπάρχει πλήρης διαχωρισμός των control από τα bystander/irradiated και στα 3 σύνολα δεδομένων θα χρησιμοποιηθούν τα κομβικά γονίδια που έχουν προκύψει από την ιεράρχηση γονιδίων της λειτουργικής ανάλυσης του εργαλείου BioInfoMiner στην σύγκριση Bystander vs Control με δοκιμασία ANOVA του συνόλου δεδομένων GSE21059 (κεφάλαιο 3.3.3). Θα χρησιμοποιηθούν τα κομβικά γονίδια από αυτό το σύνολο δεδομένων γιατί έχουν προκύψει από πολλές διαφορετικές στιγμές και περιέχουν περισσότερη βιολογική πληροφορία.

Θερμικό διάγραμμα 35 κομβικών γονιδίων παρακειμένων 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 ώρες, GSE21059



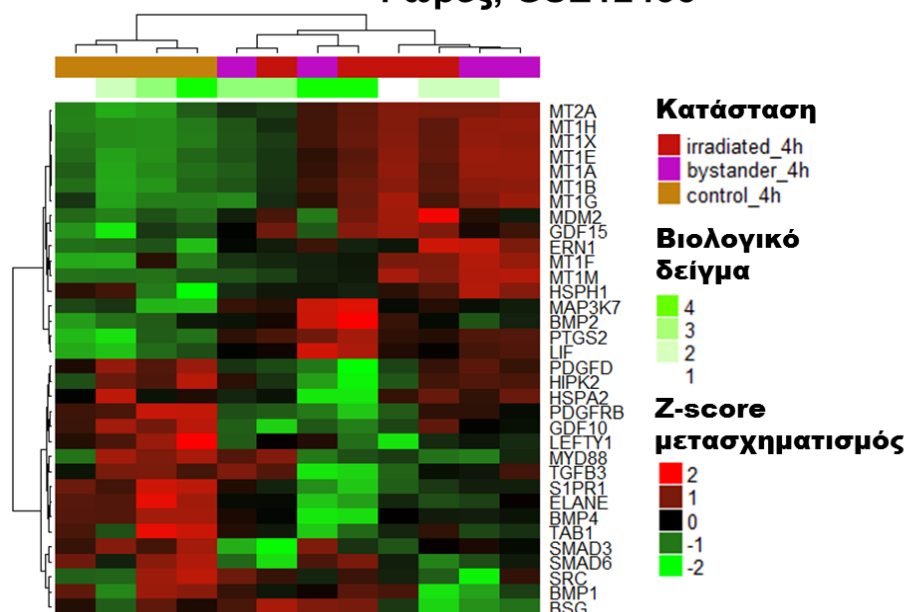
Σχήμα 2-44 Θερμικό διάγραμμα 35/35 κομβικών γονιδίων από την σύγκριση των Bystander vs Control (GSE21059) για το 21059. Έχει χρησιμοποιηθεί μέθοδος ομαδοποίησης Ward και μέτρησης αποστάσεων Euclidean. Με ροζ παρατηρούμε ότι ομαδοποιούνται μόνο τους τα Control.

Θερμικό διάγραμμα 33 κομβικών γονιδίων παρακειμένων μισής ώρας, GSE18760



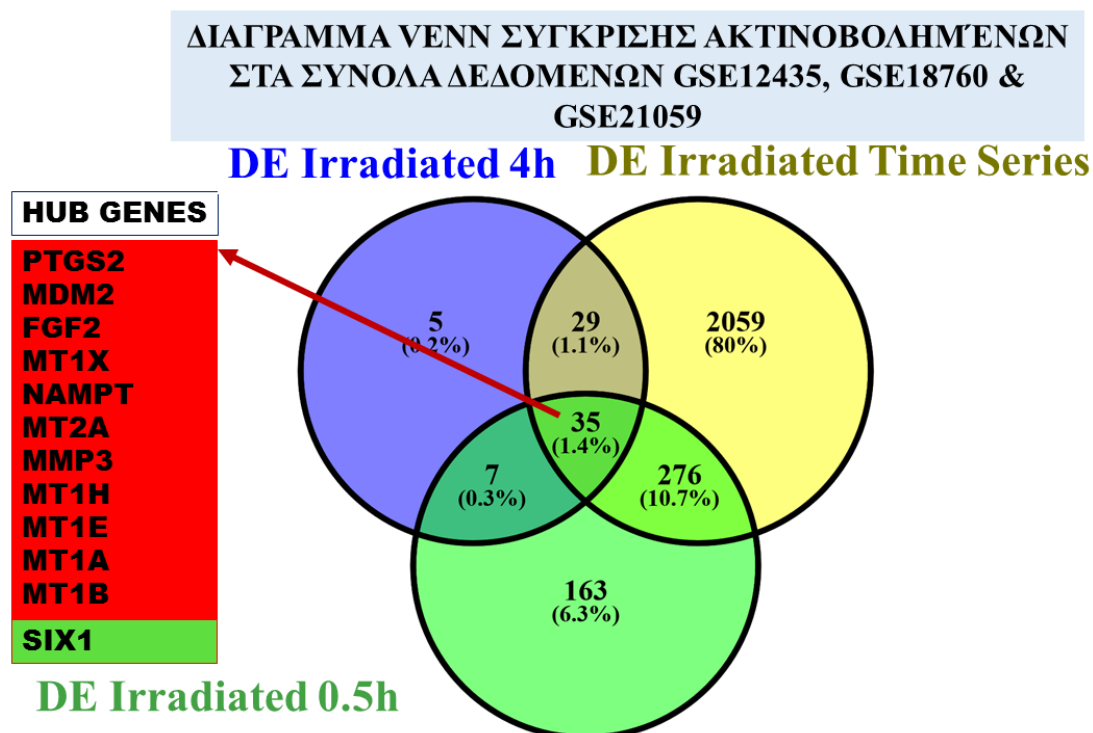
Σχήμα 2-45 Θερμικό διάγραμμα 33/35 κομβικών γονιδίων από την σύγκριση των Bystander vs Control (GSE21059) για το GSE18760. Έχει χρησιμοποιηθεί μέθοδος ομαδοποίησης Ward και μέτρησης αποστάσεων Euclidean. Με ώχρα παρατηρούμε ότι ομαδοποιούνται μόνο τους τα Control.

Θερμικό διάγραμμα 34 κομβικών γονιδίων παρακειμένων 4 ώρες, GSE12435



Σχήμα 2-46 Θερμικό διάγραμμα 34/35 κομβικών γονιδίων από την σύγκριση των Bystander vs Control (GSE21059) για το GSE12435. Έχει χρησιμοποιηθεί μέθοδος ομαδοποίησης Ward και μέτρησης αποστάσεων Euclidean. Με καφέ παρατηρούμε ότι ομαδοποιούνται μόνο τους τα Control.

Παρατηρούμε ότι στα παραπάνω διαγράμματα πραγματοποιείται πλήρης διαχωρισμός μεταξύ Control και Bystander/Irradiated στα δύο σύνολα δεδομένων, GSE12435 4 ώρες μετά την ακτινοβολήση και GSE18760 μισή ώρα μετά την ακτινοβολήση. Στο σύνολο δεδομένων διαφορετικών χρονικών στιγμών GSE21059 παρατηρούμε ότι ομαδοποιούνται τα περισσότερα Control εκτός από 6.

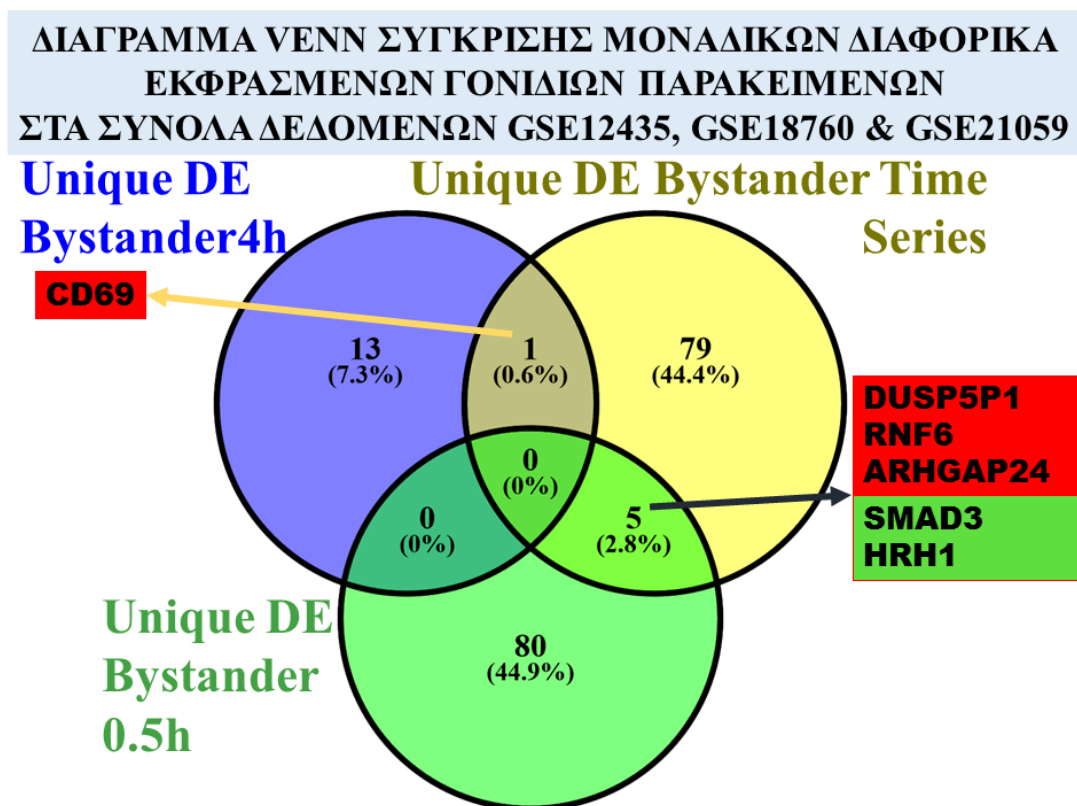


Σχήμα 2-47 Venn διάγραμμα σύγκρισης διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων που προέκυψαν από τις συγκρίσεις των Irradiated vs Control των συνόλων δεδομένων GSE12435, GSE18760 και GSE21059. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.

Μετά την σύγκριση των τριών λιστών διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων των συγκρίσεων Irradiated vs Control, λήφθηκαν 35 κοινά γονίδια. Και τα 35 είχαν ίδια υπερέκφραση ή υποέκφραση παρόλο που προέκυψαν από 2 διαφορετικές χρονικές στιγμές και ανάλυση ANOVA 6 διαφορετικών χρονικών στιγμών. Με λειτουργική ανάλυση των 35 γονιδίων λήφθηκαν 12 κομβικά γονίδια (διάγραμμα 3-47). Από τα 12 τα 11 είχαν βρεθεί υπερεκφρασμένα. Επίσης οι πιο σημαντικές οντολογίες είναι: cellular response to zinc ion, regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation και cell migration.

Από τα 26 κοινά γονίδια μεταξύ παρακειμένων και 35 κοινά γονίδια μεταξύ ακτινοβολημένων δειγμάτων που προέκυψαν από τις παραπάνω συγκρίσεις τα 24 είναι κοινά. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι αυτά τα κοινά γονίδια που παραμένουν συντηρημένα σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές και στα τρία διαφορετικά σύνολα δεδομένων αποτελούν τον βασικό μηχανισμό που μοιράζεται το φαινόμενο της απόκρισης στην ΙΑ των παρακειμένων και των ακτινοβολημένων κυττάρων στις 0.5 και 4 ώρες.

2.8.4 Συγκριτική ανάλυση για την εύρεση διαφορών μεταξύ Παρακειμένων και Ακτινοβολημένων κυττάρων μεταξύ συνόλων δεδομένων GSE12435, GSE18760 και GSE21059



Σχήμα 2-48 Venn διάγραμμα σύγκρισης μοναδικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων που προέκυψαν από τις συγκρίσεις των Bystander vs Control με τα Irradiated vs Control των συνόλων δεδομένων GSE12435, GSE18760 και GSE21059. Το χρώμα δείχνει αν τα γονίδια έχουν βρεθεί υποεκφρασμένα (πράσινο) ή υπερεκφρασμένα (κόκκινο) με βάση τα logFoldChange τους.

Από τις συγκρίσεις των μοναδικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων που περιεγράφηκαν στα κεφάλαια 3.1.5, 3.2.4 και 3.3.4 παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν κοινά γονίδια και στις τρεις λίστες. Μόνο 1 μοναδικό κοινό γονίδιο μεταξύ των συνόλων δεδομένων GSE12435 και GSE18760 (CD69), ενώ μεταξύ των GSE18760 και GSE21059 βρέθηκαν 5 (DUSP5P1, SMAD3, RNF6, HRH1, ARHGAP24). Επομένως δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν κάποια κοινά μοναδικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια των παρακειμένων δειγμάτων μεταξύ διαφορετικών ωρών ώστε να περιγραφεί με βάση αυτά το φαινόμενο απόκρισης λόγω γειννίας.

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Εισαγωγή

Η μελέτη της ιοντίζουσας ακτινοβολίας για θεραπευτικούς σκοπούς φανέρωσε την ύπαρξη φαινομένων έμμεσης επίδρασης της σε παρακείμενα κύτταρα, όργανα και ιστούς. Από τα φαινόμενα έμμεσης επίδρασης της ακτινοβολίας εκείνα που έχουν χαρακτηριστεί ως φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης είναι όσα έχουν μικρή σχετικά εμβέλεια επίδρασης προκαλώντας δευτερογενείς βλάβες στα παρακείμενα κύτταρα. Έχουν παρατηρηθεί βλάβες στο DNA⁴⁴, σχηματισμός μικροπυρήνων⁴², γονιδιακή αστάθεια⁴³, επαγωγή απόπτωσης⁴¹ και απελευθέρωση αναστολέων αυξητικών παραγόντων⁴⁷. Ο μηχανισμός των φαινομένων αυτών δεν έχει μελετηθεί πλήρως ώστε να διαλευκανθούν όλες οι λειτουργίες που εμπλέκονται στις έμμεσες επιδράσεις της ακτινοβολίας και για αυτό το λόγο χρήζουν περισσότερης διερεύνησης. Η παρούσα εργασία ερευνά τα παραπάνω φαινόμενα μέσω μίας συγκριτικής προσέγγισης μελετών πειραμάτων μικροσυστοιχιών RNA.

3.2 Διερεύνηση συγκριτικής ανάλυσης

3.2.1 Μελέτη των διαφορών πειραματικών διαδικασιών μεταξύ συνόλων δεδομένων

Ένα βασικό πρόβλημα μεταξύ των συνόλων δεδομένων που συγκεντρώθηκαν από τη βάση δεδομένων GEO (Σχήμα 2-2) είναι ότι έχει χρησιμοποιηθεί διαφορετική πειραματική διαδικασία για το σχηματισμό των παρακείμενων κυττάρων και για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση σε επίπεδο βιολογικών διεργασιών. Με αυτό το τρόπο αναδεικνύονται διαφορές σε επίπεδο συστήματος διεργασιών κάτι που δεν μπορεί να αποδοθεί μέσω της σύγκρισης γονιδιακών λιστών. Από τα σύνολα δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε παρόμοια πειραματική διαδικασία (ίδιος τύπος κυττάρων, ίδιος τύπος και δόση ακτινοβολίας, παρόμοιος τρόπος σχηματισμού παρακείμενων κυττάρων) δεν έχει ακολουθηθεί παρόμοια χρονική στιγμή εξαγωγής RNA μετά την ακτινοβολήση. Αυτή η σημαντική διαφορά πρέπει να μελετηθεί ξεχωριστά ώστε να ερευνηθεί αν τα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ που θεωρούνται μέρος των συστημικών δράσεων της ακτινοβολίας, εξελίσσονται διαφορετικά ανάλογα με το χρόνο που έχει περάσει από την ακτινοβολήση. Επίσης να μελετηθεί εάν υπάρχουν κοινοί μηχανισμοί απόκρισης που παρατηρούνται στις διαφορετικές στιγμές μετά την ακτινοβολία και κατά πόσο συντηρημένοι είναι ώστε να χρησιμοποιηθούν σαν κύριοι μηχανισμοί περιγραφής του φαινομένου.

Στα σύνολα δεδομένων που έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικοί τύποι κυττάρων μπορεί να μελετηθεί συγκριτικά η απόκριση τους σε αυτά τα φαινόμενα και κατά πόσο υπάρχουν συντηρημένοι μηχανισμοί. Επίσης στα σύνολα δεδομένων που έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικοί τύποι ΙΑ μπορεί να ερευνηθούν συγκριτικά οι διαφορές στην απόκριση των κυττάρων και αν κάποια δημιουργεί περισσότερες βλάβες.

Για την περαιτέρω μελέτη των αποτελεσμάτων που έχουν προκύψει από την ανάλυση των συνόλων δεδομένων θα βασιστούμε κυρίως στις οντολογίες και τα κομβικά γονίδια που έχουν προκύψει από την λειτουργική ανάλυση του εργαλείου BioInfoMiner. Με τον τρόπο αυτό μέσω της κατηγοριοποίησης των διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων σε λειτουργικό επίπεδο (π.χ. με βάση ιεραρχημένα λεξιλόγια όπως οι βιολογικές οντολογίες) επιτυγχάνεται η συστημική αποτύπωση των κυτταρικών λειτουργιών και βιολογικών διεργασιών που ενέχονται στον υπο μελέτη φαινότυπο. Ο βασικότερος λόγος αυτής της κατηγοριοποίησης είναι γνωστό ότι τα γονίδια δεν δρουν μεμονωμένα αλλά σε συστάδες ή υποσύνολα τα οποία εκφράζονται με παρόμοιο τρόπο σε διάφορα βιολογικά φαινόμενα

3.2.2 Κατηγοριοποίηση μεταξύ συνόλων δεδομένων

Από τα επτά σύνολα δεδομένων που βρέθηκαν, τα σύνολα δεδομένων GSE12435, GSE18760 και GSE21059 μοιράζονται ένα σημαντικό αριθμό κοινών στοιχείων του πειραματικού πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για την δημιουργία των αντίστοιχων δεδομένων μικροσυστοιχιών. Αρχικά έχει χρησιμοποιηθεί ο ίδιος τύπος κυττάρων (ινοβλάστες από ανθρώπινα κύτταρα πνεύμονα, IMR-90). Χρησιμοποιήθηκε ίδιος τύπος και δόση ακτινοβολίας (0.5 Gy με ιόντα ^4He 125 keV/ μm ως προσομοίωση σωματιδίων άλφα). Επίσης χρησιμοποιήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία για τον σχηματισμό των παρακειμένων κυττάρων με χρήση μερικής θωράκισης σε διπλό τρυβλίο καλλιέργειας όπου το εσωτερικό είχε θωράκιση για ακτινοβολία. Σημαντική διαφορά είναι ότι μελετήθηκαν διαφορετικά χρονικά σημεία ως προς την αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης μετά την ακτινοβολία και επομένως χρησιμοποιήθηκαν για συγκριτική ανάλυση, ώστε να ερευνηθεί εάν υπάρχουν συντηρημένοι μοριακοί μηχανισμοί αλλά και διαφορετικά μοριακά μονοπάτια, συγκριτικά με τις διαφορετικές χρονική στιγμές.

Το σύνολο δεδομένων GSE55869 διαφέρει μόνο ως προς τον τύπο κυττάρων (μη μικροκυτταρικά κύτταρα καρκινώματος από ανθρώπινο πνεύμονα H1299, ATCC, CRL-5803) και ως προς την δόση ακτινοβολίας (1 Gy με ιόντα ^4He , 125 keV/ μm). Κοινά

στοιχεία με τα υπόλοιπα σύνολα δεδομένων, αποτελεί η ίδια πειραματική διαδικασία για τον σχηματισμό των παρακειμένων κυττάρων με χρήση μερικής θωράκισης σε διπλό τρυβλίο καλλιέργειας, όπου το εσωτερικό είχε θωράκιση για ακτινοβολία και η χρονική στιγμή μετά την ακτινοβολήση (4 ώρες). Επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί προς συγκριτική μελέτη μόνο για να ερευνηθούν κοινοί μηχανισμοί απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων.

Τα σύνολα δεδομένων GSE25772 και GSE32091 έχουν τις περισσότερες ομοιότητες μεταξύ τους, όσον αφορά τον πειραματικό σχεδιασμό. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος τύπος κυττάρων (αθανοτοποιημένα κύτταρα ανθρώπινων ινοβλαστών F11-hTERT), όπως επίσης και παρόμοια πειραματική διαδικασία για τον σχηματισμό παρακειμένων κυττάρων, με χρήση μεταφοράς μέσου καλλιέργειας από τα ακτινοβολημένα κύτταρα στα παρακείμενα. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τρεις ίδιες χρονικές στιγμές μετά την ακτινοβολήση (4, 8, 24 ώρες). Βασική διαφορά είναι ότι χρησιμοποιήθηκε διαφορετική δόση ακτινοβολίας (ισότοπο ^{60}Co 2 Gy , 0.1 Gy αντίστοιχα). Παρατηρούμε ότι τα 2 παραπάνω σύνολα διαφέρουν σχεδόν σε όλα τα στοιχεία της πειραματικής διαδικασίας ως προς τα 4 σύνολα GSE12435, GSE18760, GSE21059 και GSE55869. Έτσι μπορεί να γίνει μόνο συγκριτική μελέτη για το κατά πόσο τα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης ενέχουν όμοιους μηχανισμούς σε φυσιολογικά κύτταρα, καρκινικά και αθανοτοποιημένα.

Το σύνολο δεδομένων GSE8993 είναι αυτό που δεν εμφανίζει κοινά στοιχεία με τα υπόλοιπα σύνολα δεδομένων, αφού έχει χρησιμοποιηθεί διαφορετικός τύπος και δόση ακτινοβολήσης (1.3, 0.13, 0.013 και 0.12 Gy ιόντα άνθρακα, 18.3 MeV/u, 108 keV/μm), διαφορετικός τύπος κυττάρων (πρωτογενή φυσιολογικά κύτταρα ανθρώπινων ινοβλαστών AG01522D) και διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά την ακτινοβολήση (2, 6 ώρες). Επειδή έχει εντελώς διαφορετική πειραματική προσέγγιση ως προς τα άλλα σύνολα δεδομένων δεν μπορεί να συμπεριληφθεί σε κάποια συγκριτική ανάλυση. Όμως, καθώς ο τύπος κυττάρων που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι φυσιολογικοί ινοβλάστες μπορεί να βρεθεί συσχέτιση ή μη, των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ ως προς τον διαφορετικό τύπο ακτινοβολήσης. Ένα σημαντικό πρόβλημα είναι ότι χρησιμοποιήθηκαν μόνο δύο τεχνικά δείγματα από ένα βιολογικό δείγμα για κάθε κατάσταση.

3.2.3 Μελέτη αποτελεσμάτων συνόλου δεδομένων GSE8993 (Ακτινοβολήση με ιόντα άνθρακα)

Από την μελέτη των αποτελεσμάτων του συνόλου δεδομένων GSE8993 στο κεφάλαιο 3.7.3 μπορούμε να εξάγουμε πληροφορία για τις διαφορές μεταξύ των παρακειμένων και ακτινοβολημένων κυττάρων όπως επίσης για διαφορές μεταξύ των 2 διαφορετικών χρονικών στιγμών που εξετάζονται πειραματικά μετά την ακτινοβολήση. Αρχικά είναι σημαντικό να αναφερθεί πως ο αριθμός των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων είναι αρκετά μεγαλύτερος από τους αντίστοιχες λίστες διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων των άλλων συνόλων δεδομένων. Μια πιθανή εξήγηση της διαφοράς στον αριθμό των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων μπορεί να σχετίζεται με την χρήση διαφορετικού τύπου ακτινοβολίας (ιόντα άνθρακα).

Με βάση τα αποτελέσματα της λειτουργικής ανάλυσης του BioInfoMiner, οι πιο αντιπροσωπευτικές οντολογίες που προέκυψαν για τα παρακείμενα κύτταρα στις 2 ώρες ενέχονται σε μοριακούς μηχανισμούς όπως: την κυτταρική απόκριση σε απελευθέρωση κορτικοτροπίνης, με επικάλυψη οντολογίας 5/5 γονίδια όπου και τα 5 βρέθηκαν υποεκφρασμένα και επομένως οδηγεί σε αρνητική ρύθμιση διαφόρων διαδικασιών όπως η ανοσολογική απόκριση, η απόκριση στο στρες και στη φλεγμονή. Την κυτταρική απόκριση στην ιντερλευκίνη-1, με επικάλυψη οντολογίας 16/67 γονίδια όπου τα 13 βρέθηκαν υποεκφρασμένα κάτι που μπορεί να οδηγεί στην αρνητική ρύθμιση απόκρισης σε φλεγμονή. Αναπτυξιακές οντολογίες (ανάπτυξη μετάνεφρου, νεφρών και εμφύτεσης εμβρύου) στις οποίες τα περισσότερα γονίδια βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την οντολογία διασταυρούμενης ομοιοπολικής σύνδεσης πεπτιδίων, με επικάλυψη οντολογίας 12/50 γονίδια όπου όλα βρέθηκαν υποεκφρασμένα, τα οποία σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου- εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (φιμπρονεκτίνη, θρομβοβοσπονδίνη) κάτι που υποδηλώνει την χάλαση των συνδετικών δομικών λίθων του κυττάρου. Την απόκριση σε μηχανική διέγερση, με επικάλυψη οντολογίας 14/64 γονίδια από τα οποία 9 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την οντολογία αρνητικής ρύθμισης της προσκόλλησης στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, με επικάλυψη οντολογίας 6/15 γονίδια όπου μόνο 2 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την οντολογία κυτταρικής απόκρισης σε TNF, με επικάλυψη οντολογίας 17/100 γονίδια από τα οποία τα 12 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την οντολογία αρνητικής ρύθμισης σηματοδοτικού μονοπατιού απόπτωσης, με επικάλυψη οντολογίας 6/19 από τα οποία τα 4 βρέθηκαν υποεκφρασμένα και μπορεί να υποδηλώνει το αντίθετο προφίλ. Την οντολογία θετικής ρύθμισης απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια,

με επικάλυψη οντολογίας 7/27 γονίδια από τα οποία τα 5 βρέθηκαν υποεκφρασμένα και άρα φαίνεται να λειτουργεί ο αντίθετος μηχανισμός. Την οντολογία απόκρισης στην φλεγμονή, με επικάλυψη 39/368 γονίδια όπου τα 33 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Επίσης και άλλες οντολογίες που έχουν σχέση με την απόπτωση.

Από τα κομβικά γονίδια που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μπορούμε να επικεντρωθούμε στα: IL1B (κυτταροκίνη) που είναι υποεκφρασμένο ($\log FC = -1.2$), THBS1 (συνεκτική γλυκοπρωτεΐνη) υποεκφρασμένο ($\log FC = -1.1$), BCL2 (ρυθμιστής απόπτωσης) υποεκφρασμένο ($\log FC = -1$), PTGS2 (συνθάσης προσταγλαδινών) υποεκφρασμένο ($\log FC = -0.7$), TNFAIP3 (ένζυμο ουβικιτινίωσης) υποεκφρασμένο ($\log FC = -1.4$), BMP4 (προσδέτης TGF-beta) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 0.7$), BMP6 (προσδέτης TGF-beta) υπερεκφρασμένο ($\log FC = -0.79$), FN1 (διμερής γλυκοπρωτεΐνη) υπερεκφρασμένο ($\log FC = -1.1$) και TNF (κυτταροκίνη) υποεκφρασμένο ($\log FC = -2$).

Από τα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε ότι το φαινόμενο απόκρισης λόγω γειννίας της ΙΑ με ιόντα άνθρακα, στα παρακείμενα κύτταρα στις 2 ώρες οδηγεί τα κύτταρα στην μείωση των αναπτυξιακών τους μηχανισμών και στην αύξηση μηχανισμών αποκατάστασης βλαβών και επιβίωσης οι οποίοι αν δεν φέρουν αποκατάσταση της ομοιόστασης τα κύτταρα οδηγούνται στην απόπτωση. Επίσης η αρνητική ρύθμιση μηχανισμών που επάγουν την φλεγμονή όπως είναι η υποέκφραση κυτταροκινών δηλώνουν μια εντελώς διαφορετική απόκριση του κυττάρου στην ΙΑ σε σχέση με την απόκριση που παρατηρήθηκε στα πειράματα με ΙΑ σωματιδίων άλφα.

Αντίστοιχα, στο χρονικό σημείο των 6 ωρών μετά την ακτινοβολήση, οι σημαντικότερες βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, ενέχονται σε μοριακούς μηχανισμούς όπως: αναπτυξιακές οντολογίες (ανάπτυξη μετάνεφρου, ανάπτυξη νωτιαίου μυελού και εμφύτευσης εμβρύου) στις οποίες η πλειοψηφία των γονιδίων βρέθηκε υποεκφρασμένη αλλά στην ανάπτυξη μετάνεφρου με επικάλυψη οντολογίας 9/35 γονίδια από τα οποία τα 6 ήταν υπερεκφρασμένα. Την οντολογία διασταυρούμενης ομοιοπολικής σύνδεσης πεπτιδίων, με επικάλυψη οντολογίας 10/50 γονίδια όπου όλα βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την απόκριση σε μηχανική διέγερση, με επικάλυψη οντολογίας 10/64 γονίδια από τα οποία 6 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την οντολογία οργάνωσης ινιδίων κολλαγόνου, με επικάλυψη οντολογίας 7/35 γονίδια από τα οποία τα 6 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την κυτταρική απόκριση σε απελευθέρωση κορτικοτροπίνης, με επικάλυψη οντολογίας 3/5 γονίδια όπου και τα 3 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την οντολογία θετικής ρύθμισης της διαδικασίας βιοσύνθεσης ιντερλευκίνης 2, με επικάλυψη οντολογίας 4/12 γονίδια όπου

και τα 4 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την οντολογία κυτταρικής απόκρισης στην ζέστη, με επικάλυψη 6/35 γονίδια όπου 3 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την οντολογία απόκρισης στην υποξία, με επικάλυψη 16/167 γονίδια από τα οποία 5 ήταν υποεκφρασμένα. Όπως επίσης και οντολογίες που έχουν σχέση με την απόπτωση νευρώνων.

Από τα κομβικά γονίδια που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μπορούμε να επικεντρωθούμε στα: NF1 (αρνητικός ρυθμιστής του Ras μονοπατιού μεταγωγής σήματος) που είναι υπερεκφρασμένο ($\log FC = 0.5$), THBS1 (συνεκτική γλυκοπρωτεΐνη) υποεκφρασμένο ($\log FC = -1.2$), BCL2 (ρυθμιστής απόπτωσης) υποεκφρασμένο ($\log FC = -0.7$), COL3A1 (προ-αλφα αλυσίδες κολλαγόνου τύπου 3, ινώδες κολλαγόνο) υποεκφρασμένο ($\log FC = -0.9$), IL1B (κυτταροκίνη) υποεκφρασμένο ($\log FC = -0.5$), BMP4 (προσδέτης TGF-beta) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 0.9$), MMP2 (μεταλοπепτιδάση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας) υποεκφρασμένο ($\log FC = -0.8$), STC1 (ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη) υποεκφρασμένο ($\log FC = -0.7$) και ID2 (αναστολέας πρόσδεσης στο DNA) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 0.6$).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούμε να υποθέσουμε ότι στις 6 ώρες μετά την ακτινοβολήση, δεν παρατηρούμε να έχουν αλλάξει πολύ οι μηχανισμοί απόκρισης των παρακειμένων κυττάρων στο φαινόμενο απόκρισης λόγω γειτνίασης αλλά φαίνεται να βρίσκονται ακόμη σε ενεργότητα ομοιοστατικές διαδικασίες που είτε θα διατηρήσουν τα κύτταρα μέχρι να γίνει αποκατάσταση βλαβών είτε θα τα οδηγήσουν σε απόπτωση.

Από την λειτουργική ανάλυση του BioInfoMiner οι πιο αντιπροσωπευτικές οντολογίες που προέκυψαν για τα ακτινοβολημένα κύτταρα στις 2 ώρες ενέχονται σε μοριακούς μηχανισμούς όπως: η οντολογία μορφογένεσης ενδοθηλιακού σωλήνα, με επικάλυψη 5/6 γονίδια από τα οποία 4 βρέθηκαν υπερεκφρασμένα. Την οντολογία οργάνωσης λυσοσώματος, με επικάλυψη 12/37 γονίδια από τα οποία 6 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την οντολογία διακοπής του κυτταρικού κύκλου, με επικάλυψη 28/142 γονίδια από τα οποία 17 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την οντολογία αποδιάταξης κυτταρικών συστατικών κατά την διαδικασία της αποπτωτικής φάσης 7/20 γονίδια από τα οποία τα 4 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την οντολογία θετικής ρύθμισης της σηματοδότησης IkarappaB κινάσης /NF-kappaB, με επικάλυψη 28/162 γονίδια από τα οποία 17 βρέθηκαν υπερεκφρασμένα. Την οντολογία θετικής ρύθμισης εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού σηματοδότησης, με επικάλυψη 8/27 γονίδια από τα οποία 6 βρέθηκαν υπερεκφρασμένα. Την οντολογία ρύθμισης μηχανισμών συνάφειας μεταξύ

κυττάρων, με επικάλυψη 6/17 γονίδια από τα οποία 5 βρέθηκαν υποεκφρασμένα και το 6ο (DAPK3) όταν υπερεκφράζεται έχει σχέση με την απόπτωση και αρκετές ακόμη οντολογίες που έχουν σχέση με την απόπτωση.

Από τα κομβικά γονίδια που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μπορούμε να επικεντρωθούμε στα: TNF (κυτταροκίνη) που είναι υπερεκφρασμένο ($\log FC = 0.7$), CTNNB1 (πρωτεΐνη κυτταρικής προσκόλλησης) υποεκφρασμένο ($\log FC = -1$), ZC3H12A (μεταγραφικός ενεργοποιητής) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 1.1$), CCND1 (κυκλίνη) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 1$), IL1B (κυτταροκίνη) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 0.9$), JUN (μεταγραφικός παράγοντας) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 1$), IRF1 (ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερονών) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 0.9$), THBS1 (συνεκτική γλυκοπρωτεΐνη) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 0.7$), SFRP1 (ρυθμιστής του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού) υποεκφρασμένο ($\log FC = -0.7$), CXCL8 (χυμοκίνη φλεγμονώδους απόκρισης) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 0.5$) και TGFBR1 (υποδοχέας TGF-beta1) υποεκφρασμένο ($\log FC = -0.7$).

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούμε να υποθέσουμε ότι στις 2 ώρες μετά την ακτινοβολήση, η απόκριση των ακτινοβολημένων κυττάρων ακολουθεί την αποπτωτική πορεία προς τον κυτταρικό θάνατο. Παρόλο που παρουσιάζονται αναπτυξιακοί μηχανισμοί, οι βλάβες που έχουν δεχθεί τα κύτταρα φαίνεται να είναι τέτοιες που οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης δεν μπορούν να δράσουν αρκετά ώστε να σωθούν τα κύτταρα.

Αντίστοιχα, στο χρονικό σημείο των 6 ωρών μετά την ακτινοβολήση, οι σημαντικότερες βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, ενέχονται σε μοριακούς μηχανισμούς όπως: την οντολογία διακοπής του κυτταρικού κύκλου, με επικάλυψη 34/142 γονίδια από τα οποία 23 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την οντολογία μετάβασης από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό κύτταρο, με επικάλυψη 13/34 από τα οποία 9 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την οντολογία της θετικής ρύθμισης του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt, με επικάλυψη 13/40 γονίδια από τα οποία 8 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Οντολογίες που έχουν σχέση με πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη των κυττάρων, όπου σε κάθε μία βρίσκονται τα μισά περίπου γονίδια υποεκφρασμένα. Την οντολογία αποδιάταξης κυτταρικών συστατικών κατά την διαδικασία της αποπτωτικής φάσης 8/20 γονίδια από τα οποία τα 4 βρέθηκαν υποεκφρασμένα. Την οντολογία θετικής ρύθμισης εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού σηματοδότησης, με επικάλυψη 9/27 γονίδια από τα οποία 6 βρέθηκαν υπερεκφρασμένα. Την οντολογία θετικής ρύθμισης της σηματοδότησης IkarppaB

κινάσης /NF-kappaB, με επικάλυψη 32/162 γονίδια από τα οποία 15 βρέθηκαν υπερεκφρασμένα. Την οντολογία απόκρισης στην υποξία, με επικάλυψη 32/169 από τα οποία 17 βρέθηκαν υποεκφρασμένα.

Από τα κομβικά γονίδια που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μπορούμε να επικεντρωθούμε στα: TGFBR1 (υποδοχέας TGF-beta1) υποεκφρασμένο (logFC=-0.9), BMP4 (προσδέτης TGF-beta) υποεκφρασμένο (logFC= -0.6), THBS1 (συνεκτική γλυκοπρωτεΐνη) υπερεκφρασμένο (logFC= 0.6), SFRP1 (ρυθμιστής του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού) υποεκφρασμένο (logFC= -0.8), CTNNB1 (πρωτεΐνη κυτταρικής προσκόλλησης) υποεκφρασμένο (logFC= -1), FGF9 (αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών) υποεκφρασμένο (logFC= -0.8), WNT11 (εκκρινόμενος παράγοντας σηματοδότησης) υποεκφρασμένο (logFC= -0.7), WNT5A (εκκρινόμενος παράγοντας σηματοδότησης) υποεκφρασμένο (logFC= -0.5), ZC3H12A (μεταγραφικός ενεργοποιητής) υπερεκφρασμένο (logFC= 0.7) και JUN (μεταγραφικός παράγοντας) υπερεκφρασμένο (logFC= 1.3).

Όπως παρατηρούμε από τις παραπάνω λειτουργίες μπορούμε να υποθέσουμε ότι στις 6 ώρες μετά την ακτινοβολήση, η απόκριση των ακτινοβολημένων κυττάρων διατηρεί συγκεκριμένους μηχανισμούς απόπτωσης. Ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι οι γονιδιακή έκφραση των περισσότερων κομβικών γονιδίων παραμένει σχετικά στα ίδια επίπεδα και επομένως οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί των κυττάρων δεν έχουν καταφέρει λειτουργήσουν ομοιοστατικά ώστε να επιβιώσουν τα κύτταρα.

Συνολικά οι λειτουργίες των παρακειμένων και ακτινοβολημένων φαίνεται ότι διαφέρουν κυρίως στην ύπαρξη περισσότερων μηχανισμών απόπτωσης στα ακτινοβολημένα κύτταρα, ενώ στα παρακείμενα έχουν αρχίσει να επάγονται οι μηχανισμοί απόπτωσης από τα ακτινοβολημένα σε μικρότερο βαθμό. Τέλος σημαντική παρατήρηση αποτελεί η έλλειψη μηχανισμού σχηματισμού φλεγμονής όπως βρέθηκε στα πειράματα με ΙΑ άλφα σωματιδίων.

3.2.4 Μελέτη αποτελεσμάτων συνόλων δεδομένων GSE25772 και GSE32091 (μεταφορά μέσου καλλιέργειας για τον σχηματισμό παρακειμένων κυττάρων)

Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί ότι και στα δύο σύνολα δεδομένων GSE25772, GSE32091 δεν βρέθηκε κάποιο στατιστικά σημαντικό διαφορικά εκφρασμένο γονίδιο στην σύγκριση μεταξύ παρακειμένων με φυσιολογικά κύτταρα. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να συνέβη διότι η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε μέσω της χρήσης

μεταφοράς μέσου καλλιέργειας από ακτινοβολημένα στα «παρακείμενα» κύτταρα στην ουσία χάνεται η άμεση επαφή μεταξύ ακτινοβολημένων και παρακείμενων κυττάρων. Πράγματι ότι μόρια έχουν εκκριθεί από τα ακτινοβολημένα θα τα δεχθούν σαν σήμα τα «παρακείμενα» αλλά δεν υπάρχει καθόλου διασύνδεση των κυττάρων μέσω χασματοσυνδέσεων και επομένως δεν υπάρχει άμεση μεταφορά μορίων μεταξύ των δύο πληθυσμών. Ένα ακόμη σημαντικό στοιχείο που πρέπει να ληφθεί είναι ότι χρησιμοποιήθηκαν αθανатоποιημένα κύτταρα. Από την στιγμή που τα κύτταρα ήταν αθανатоποιημένα υπάρχει περίπτωση να μην διατηρούν ευαισθησία στα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης από την ακτινοβολήση ή τουλάχιστον να μην είναι δυνατό να ευαισθητοποιηθούν με την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία. Επίσης οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο ένα σύνολο δεδομένων ήταν 2 Gy και στο άλλο 0.1 Gy και μόνο στο πρώτο σύνολο δεδομένων βρέθηκαν αρκετά στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια στα ακτινοβολημένα κύτταρα. Από τα παραπάνω οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι ίσως η χρήση του συγκεκριμένου τύπου κυττάρων για πειράματα απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ δεν μπορεί να βοηθήσει στην περαιτέρω μελέτη του φαινομένου.

3.2.5 Μελέτη αποτελεσμάτων συνόλων δεδομένων GSE12435, GSE18760, GSE21059 και GSE55869 (συγκρίσεις διαφορετικών χρονικών στιγμών μετά από την ακτινοβολήση κυττάρων)

Από την μελέτη των αποτελεσμάτων των συνόλων δεδομένων GSE12435, GSE18760, GSE21059 και GSE55869 στα κεφάλαια **Error! Reference source not found.**, **Error! Reference source not found.**, **Error! Reference source not found.** και **Error! Reference source not found.** μπορούμε να εξάγουμε πληροφορία για τις διαφορές μεταξύ των παρακειμένων και ακτινοβολημένων κυττάρων όπως επίσης για διαφορές μεταξύ των 2 διαφορετικών χρονικών στιγμών που εξετάζονται πειραματικά μετά την ακτινοβολήση. Επίσης επειδή στο σύνολο δεδομένων GSE55869 έχει χρησιμοποιηθεί διαφορετικός τύπος κυττάρων μπορεί να εξεταστεί και αυτή η σύγκριση. Η τιμές έκφρασης διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων του συνόλου δεδομένων GSE21059 που μελετά διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά από ακτινοβολήση χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση των τιμών έκφρασης των συγκεκριμένων χρονικών στιγμών από τα άλλα δύο σύνολα δεδομένων (GSE12435, GSE18760). Αυτό γίνεται γιατί τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια αυτού του συνόλου δεδομένων έχουν προκύψει από δοκιμασία ANOVA και δεν μπορούμε να γνωρίζουμε αν στην κάθε διαφορετική χρονική στιγμή η συγκεκριμένη διαφορά έκφρασης είναι στατιστικά

σημαντική. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως ο αριθμός των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων διαφέρει μεταξύ των δύο διαφορετικών στιγμών μετά την ακτινοβολήση.

Στο χρονικό σημείο της μισής ώρας μετά την ακτινοβολήση, οι σημαντικότερες βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια στα παρακείμενα κύτταρα, ενέχονται σε μοριακούς μηχανισμούς όπως: η οντολογία αρνητικής ρύθμισης της ανάπτυξης, με επικάλυψη 9/17 γονίδια από τα οποία και τα 9 βρέθηκαν υπερεκφρασμένα. Οντολογίες που έχουν σχέση με την απόκριση σε μεταλλικά ιόντα (ψευδαργύρου, καδμίου) με όλα τα γονίδια υπερεκφρασμένα. Οντολογία σηματοδότησης NIK/NF-kappaB, με επικάλυψη 12/65 γονίδια από τα οποία και τα 12 βρέθηκαν υπερεκφρασμένα. Οντολογία επεξεργασία και παρουσίασης αντιγόνου μέσω MHC τάξης I, με επικάλυψη 10/62 γονίδια όλα υπερεκφρασμένα. Οντολογία σηματοδότησης του μοριακού μονοπατιού Wnt, με επικάλυψη 11/94 γονίδια από τα οποία 9 υπερεκφρασμένα. Οντολογία θετικής ρύθμισης του πολλαπλασιασμού κυττάρων λείων μυϊκών ινών, με επικάλυψη 8/56 γονίδια από τα οποία 5 υπερεκφρασμένα. Οντολογία θετικής ρύθμισης εισαγωγής στον πυρήνα του NF-kappaB, με επικάλυψη 5/21 γονίδια όλα υπερεκφρασμένα. Οντολογία απόκρισης στην φλεγμονή, με επικάλυψη 26/368 γονίδια από τα οποία 23 υπερεκφρασμένα και άλλες οντολογίες απόκρισης στην ζέστη, στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, στην επούλωση πληγών και στην ενεργοποίηση μοριακών μονοπατιών από χυμοκίνες.

Από τα κομβικά γονίδια που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μπορούμε να επικεντρωθούμε στα: IL6 (κυτταροκίνη) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 2.1$), PTGS2 (κυκλοξυγενάση) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 2.6$), CXCL8 (χυμοκίνη) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 3.5$), IL1B (κυτταροκίνη) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 1.6$), MT1E (μεταλλοθειονίνη) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 2.5$) και άλλες 6 μεταλλοθειονίνες με ίδια ένταση έκφρασης, BMP4 (προσδέτης TGF-beta) υποεκφρασμένο ($\log FC = -1.1$), ZC3H12A (μεταγραφικός ενεργοποιητής) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 1.4$) όπως επίσης και πολλές υπομονάδες του πρωτεασώματος υπερεκφρασμένες (σχετικό $\log FC = 0.6$)

Αντίστοιχα, στο χρονικό σημείο των 4 ωρών μετά την ακτινοβολήση, οι σημαντικότερες βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια στα παρακείμενα κύτταρα, ενέχονται σε μοριακούς μηχανισμούς όπως: η οντολογία αρνητικής ρύθμισης της ανάπτυξης, με επικάλυψη 5/17 γονίδια από τα οποία και τα 9 βρέθηκαν υπερεκφρασμένα. Οντολογίες που έχουν σχέση με την απόκριση σε μεταλλικά ιόντα (ψευδαργύρου, καδμίου) με όλα τα γονίδια υπερεκφρασμένα. Την

οντολογία απόκρισης στην ερυθροποιητίνη, με επικάλυψη 2/2 γονίδια υπερεκφρασμένα και την οντολογία θετικής ρύθμισης εισαγωγής στον πυρήνα του NF-kappaB, με επικάλυψη 3/21 γονίδια όλα υπερεκφρασμένα.

Τα κομβικά γονίδια που βρέθηκαν ήταν : PTGS2 (κυκλοξυγενάση) υπερεκφρασμένο (logFC= 2.4), MT1X (μεταλλοθειονίνη) υπερεκφρασμένο (logFC= 2), MT2A, MT1H, MT1E και MT1B όλα υπερεκφρασμένα.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα για την απόκριση των παρακειμένων στο φαινόμενο απόκρισης λόγω γειννίας της ΙΑ με σωματίδια άλφα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι παρόλο που δέχονται αρκετό οξειδωτικό και θερμικό στρες τα παρακείμενα κύτταρα προσπαθούν να επιβιώσουν μέσω της απόκρισης με μηχανισμούς επιδιόρθωσης και επίσης να εκκρίνουν σηματοδοτικούς παράγοντες (χυκοκίνες, κυτταροκίνες) ώστε να προκαλέσουν φλεγμονή. Ακολούθως να προσελκύσουν φαγοκύτταρα, ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα και βασεόφιλα ώστε να ξεκινήσει η ανίχνευση και αποικοδόμηση μορίων, κυττάρων που έχουν βλάβες από την ακτινοβολία. Ταυτόχρονα επάγεται αγγειογένεση για την αύξηση της αιμάτωσης της περιοχής ώστε να γίνει πιο γρήγορα και η μεταγωγή σήματος της φλεγμονώδους απόκρισης. Τέλος όταν περάσουν αρκετές ώρες (4) αρχίζουν να δρουν ομοιστατικοί μηχανισμοί επούλωσης του ιστού που «τραυματίστηκε» από την ακτινοβολία.

Στο χρονικό σημείο της μισής ώρας μετά την ακτινοβολήση, οι σημαντικότερες βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια στα ακτινοβολημένα κύτταρα, ενέχονται σε μοριακούς μηχανισμούς όπως: η οντολογία αρνητικής ρύθμισης της ανάπτυξης, με επικάλυψη 9/17 γονίδια από τα οποία και τα 9 βρέθηκαν υπερεκφρασμένα. Οντολογίες που έχουν σχέση με την απόκριση σε μεταλλικά ιόντα (ψευδαργύρου, καδμίου) με όλα τα γονίδια υπερεκφρασμένα. Οντολογία σηματοδότησης NIK/NF-kappaB, με επικάλυψη 12/65 γονίδια από τα οποία και τα 12 βρέθηκαν υπερεκφρασμένα. Οντολογία επεξεργασία και παρουσίασης αντιγόνικου πεπτιδίου μέσω MHC τάξης I, με επικάλυψη 11/62 γονίδια όλα υπερεκφρασμένα. Οντολογία σηματοδότησης του μοριακού μονοπατιού Wnt, με επικάλυψη 11/94 γονίδια από τα οποία 9 υπερεκφρασμένα. Οντολογία θετικής ρύθμισης του πολλαπλασιασμού κυττάρων λείων μυϊκών ινών, με επικάλυψη 8/56 γονίδια από τα οποία 5 υπερεκφρασμένα. Οντολογία θετικής ρύθμισης εισαγωγής στον πυρήνα του NF-kappaB, με επικάλυψη 5/21 γονίδια όλα υπερεκφρασμένα. Επιπρόσθετες είναι οντολογίες απόκρισης στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες του

ενδοπλασματικού δικτύου, απόκριση στην ζέστη, στην ιντερφερόνη γάμμα και στην ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA.

Από τα κομβικά γονίδια που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μπορούμε να επικεντρωθούμε στα: PSMC1 (υπομονάδα πρωτεασώματος) και πολλές άλλες υπομονάδες του πρωτεασώματος υπερεκφρασμένες ($\log FC = 0.58$), PTGS2 (κυκλοξυγενάση) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 2.5$), HSPA1A (πρωτεΐνη θερμικού σοκ) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 2.7$), IL1B (κυτταροκίνη) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 1.5$), IL6 (κυτταροκίνη) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 2.4$), MT1E (μεταλλοθειονίνη) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 2.65$) και άλλες 6 μεταλλοθειονίνες με ίδια ένταση έκφρασης, BMP4 (προσδέτης TGF-beta) υποεκφρασμένο ($\log FC = -1.1$), ZC3H12A (μεταγραφικός ενεργοποιητής) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 1.4$) και CD36 (γλυκοπρωτεΐνη, υποδοχέας θρομβοσπονδίνης) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 0.5$).

Αντίστοιχα, στο χρονικό σημείο των 4 ωρών μετά την ακτινοβολήση, οι σημαντικότερες βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια στα ακτινοβολημένα κύτταρα, ενέχονται σε μοριακούς μηχανισμούς όπως: η οντολογία αρνητικής ρύθμισης της ανάπτυξης, με επικάλυψη 6/17 γονίδια από τα οποία και τα 6 βρέθηκαν υπερεκφρασμένα. Οντολογίες που έχουν σχέση με την απόκριση σε μεταλλικά ιόντα (ψευδαργύρου, καδμίου) με όλα τα γονίδια υπερεκφρασμένα. Την οντολογία απόκρισης στις βλάβες του DNA μέσω της μεταγωγής σήματος από p53 με επικάλυψη 6/60 γονίδια από τα οποία και τα 6 βρέθηκαν υπερεκφρασμένα. Οντολογία αρνητικής ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με επικάλυψη 14/402 γονίδια από τα οποία τα 13 βρέθηκαν υπερεκφρασμένα και αρκετές οντολογίες που έχουν σχέση με την απόπτωση.

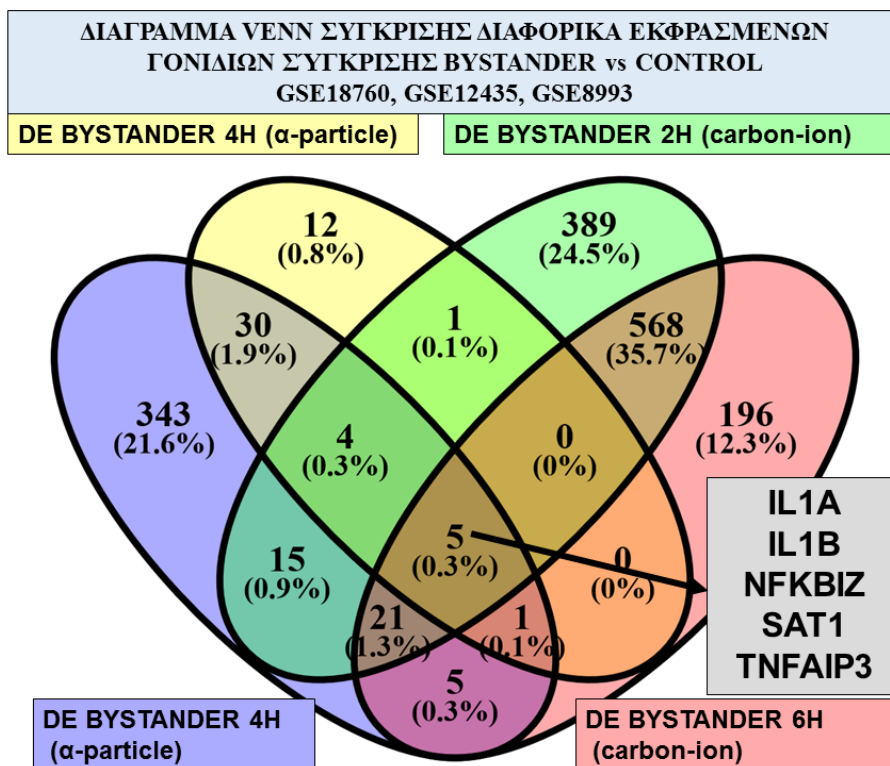
Από τα κομβικά γονίδια που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μπορούμε να επικεντρωθούμε στα: INHBA υπερεκφρασμένο ($\log FC = 1.77$), PTGS2 (κυκλοξυγενάση) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 2.3$), IL1A (κυτταροκίνη) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 1.3$), MT1E (μεταλλοθειονίνη) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 2.2$) και άλλες 6 μεταλλοθειονίνες με ίδια ένταση έκφρασης, BMP2 (προσδέτης TGF-beta) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 1.6$), FAS (υποδοχέας θανάτου) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 1.1$), E2F7 (μεταγραφικός παράγοντας) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 1.3$) και CDKN1A (κυκλινοεξαρτώμενος αναστολέας) υπερεκφρασμένο ($\log FC = 2.2$).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι στην μισή ώρα μετά την ακτινοβολήση πολύ λίγες διεργασίες διαφέρουν μεταξύ ακτινοβολημένων και παρακειμένων κυττάρων. Κυρίως στην χρονική στιγμή της μισής ώρας μετά την

ακτινοβολήση οι επιπρόσθετες λειτουργίες που κάνουν τα ακτινοβολημένα αφορούν επιδιόρθωση ή αποδιάταξη μη διπλωμένων ή διπλωμένων λάθος πρωτεϊνών όπως επίσης και επιδιόρθωσης βλαβών στο κύτταρο. Η σημαντικότερη διαφορά παρουσιάζεται στις 4 ώρες μετά την ακτινοβολήση όπου εμφανίζονται μηχανισμοί απόκρισης βλαβών στο DNA και απόπτωσης. Επομένως οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι ο χρόνος των 4 ωρών που περνάει είναι κομβικός για να «πληροφορηθεί» το κύτταρο σε τι κατάσταση βρίσκεται το γενετικό του υλικό, αν μπορεί να διορθωθεί και αν όχι να προχωρήσει σε απόπτωση κάτι που δεν παρατηρούμε στα παρακείμενα κύτταρα.

Επίσης από την ανάλυση του συνόλου δεδομένων GSE55869 που χρησιμοποιήθηκαν μη μικροκυτταρικά κύτταρα καρκινώματος δεν λήφθηκαν στατιστικά σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια στα παρακείμενα κύτταρα, κάτι που παρατηρήθηκε και στα σύνολα δεδομένων GSE25772, GSE32091 που είχαν χρησιμοποιηθεί αθανатоποιημένα κύτταρα. Από αυτό το αποτέλεσμα μπορούμε να δεχθούμε ότι τα φυσιολογικά κύτταρα είναι αρκετά πιο ευαίσθητα στις επιδράσεις γειννίαςης απόκρισης στην ακτινοβολία ως προς τα καρκινικά.

3.2.6 Σύγκριση λιστών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ των συνόλων δεδομένων GSE18760, GSE12435 και GSE8993



Σχήμα 3-1 Διάγραμμα Venn για την εύρεση των κοινών στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων των συγκρίσεων Bystander vs Control για τα σύνολα GSE18760, GSE12435 και GSE8993

Από τα στατιστικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια που προέκυψαν στα τρία σύνολα δεδομένων GSE18760, GSE12435 και GSE8993 για την σύγκριση μεταξύ Bystander vs Control χρησιμοποιήθηκε ένα διάγραμμα Venn ώστε να βρεθούν τα κοινά που θα μπορούσαν να αποτελούν ένα μέρος του συντηρημένου μηχανισμού που δρα στα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειννίας της ΙΑ. Η λίστα των κοινών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ διαφορετικών συνόλων δεδομένων δίνεται παρακάτω. Για να μην μειωθεί η πληροφορία που έχει βρεθεί και επειδή κοινά γονίδια και στα 3 σύνολα δεδομένων σε όλες τις διαφορετικές χρονικές στιγμές βρέθηκαν λίγα, παρουσιάζονται και αυτά που βρέθηκαν κοινά σε 3 από τις 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές.

Κοινά διαφορετικά εκφρασμένα στατιστικά σημαντικά γονίδια για τις συγκρίσεις μεταξύ Bystander vs Control, GSE18760, GSE12435 και GSE8993				
Common Genes	Log2FoldChange			
	α -particle		carbon-ion	
	0.5h	4h	2h	6h
IL1A	0.81	1.53	-1.27	-0.5
IL1B	1.62	1.85	-1.23	-0.54
NFKBIZ	1.32	1.44	-1.41	-0.53
SAT1	1.16	0.91	0.52	0.54
TNFAIP3	1.22	1.58	-1.35	-0.52
CXCL2	2.42	2.64	-0.92	-
G0S2	1.96	2.15	-0.73	-
MT1E	2.57	2.16	-0.5	-
PTGS2	2.61	2.4	-0.73	-
CXCL8	3.53	-	-1.36	-0.69
FGF2	1.29	1.31	-	-0.53

Σχήμα 3-2 1^{ος} Πίνακας κοινών στατιστικά σημαντικών διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ των συνόλων δεδομένων GSE18760, GSE12435 και GSE8993 για την σύγκριση μεταξύ Bystander vs Control.

Κοινά διαφορετικά εκφρασμένα στατιστικά σημαντικά γονίδια για τις συγκρίσεις μεταξύ Bystander vs Control, GSE18760, GSE12435 και GSE8993				
Common Genes	Log2FoldChange			
	α -particle		carbon-ion	
	0.5h	4h	2h	6h
MT1M	2.85	-	-0.55	-0.50
CXCL3	1.93	-	-1.25	-0.51
IL11	1.08	-	-0.71	-0.62
TNFAIP6	0.78	-	-1.03	-0.56
DNAJB4	0.89	-	0.86	0.85
GCH1	1.07	-	-0.66	-0.73
BMP4	-1.16	-	0.71	0.94
ALDH1L2	-0.72	-	0.78	0.74
BIRC3	0.86	-	-1.22	-0.66
CXCL12	-0.82	-	1.20	0.66
BCL2A1	1.18	-	-0.74	-0.79

Σχήμα 3-3 2^{ος} Πίνακας κοινών στατιστικά σημαντικών διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ των συνόλων δεδομένων GSE18760, GSE12435 και GSE8993 για την σύγκριση μεταξύ Bystander vs Control.

Κοινά διαφορετικά εκφρασμένα στατιστικά σημαντικά γονίδια για τις συγκρίσεις μεταξύ Bystander vs Control, GSE18760, GSE12435 και GSE8993				
Common Genes	Log2FoldChange			
	α -particle		carbon-ion	
	0.5h	4h	2h	6h
EIF4EBP1	-0.86	-	0.76	0.74
STC1	1.09	-	-0.89	-0.74
PRR5	-0.70	-	-1.08	-1.02
OSR1	-1.01	-	0.58	0.54
TM4SF1	1.04	-	-1.28	-0.74
CPEB4	0.73	-	-0.61	-0.53
TMEM88	0.61	-	-1.13	-0.63
HIST1H3I	0.57	-	-0.60	-0.60
HRH1	-0.50	-	0.5	0.71

Σχήμα 3-4 3^{ος} Πίνακας κοινών στατιστικά σημαντικών διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ των συνόλων δεδομένων GSE18760, GSE12435 και GSE8993 για την σύγκριση μεταξύ Bystander vs Control.

Όπως παρουσιάζονται στους παραπάνω πίνακες 4-2 έως 4-4 παρατηρήθηκε ότι παρόλο που μεταξύ των συνόλων δεδομένων που χρησιμοποιούνται διαφορετικά είδη σωματιδίων ιοντίζουσας ακτινοβολίας (σωματίδια-α, ιόντα άνθρακα) βρέθηκαν κοινά στατιστικά σημαντικά διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια για την σύγκριση Bystander vs Control, στα περισσότερα η διαφορεική έκφραση τους ήταν αντίθετη. Για παράδειγμα τα IL1A, IL1B, TNFAIP3, NFKBIZ βρέθηκαν υπερεκφρασμένα στα σύνολα δεδομένων GSE18760, GSE12435 ενώ βρέθηκαν υποεκφρασμένα στο σύνολο δεδομένων GSE8993. Επειδή όμως υπάρχει διαφορετική χρονική στιγμή εξαγωγής του RNA μετά την ακτινοβολήση μεταξύ συνόλων αναζητήθηκε η διαφορεική έκφραση στις ίδιες χρονικές στιγμές του συνόλου δεδομένων GSE8993 και του GSE21059. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 4-5. Παρατηρούμε ότι στην πλειοψηφία των κοινών γονιδίων παρατηρούνται παρόμοιες διαφορές γονιδιακής έκφρασης μεταξύ συνόλων δεδομένων με διαφορετικά είδη σωματιδίων ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Η σύγκριση αυτή παρουσιάζει την διαφοροποίηση που υπάρχει στην απόκριση των παρακειμένων κυττάρων ανάλογα με τον τύπο σωματιδίων που προκαλούν ΙΑ. Κάτι που συνάδει με την διαφορά των οντολογιών βιολογικών διεργασιών όπως προκύπτουν για το κάθε διαφορετικό σύνολο δεδομένων. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να οδηγήσει στην αξιοποίηση των αποτελεσμάτων γονιδιακής

έκφρασης για την περαιτέρω μελέτη των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ έτσι ώστε να προκύψουν γονιδιακές ταυτότητες για τους δύο τύπους σωματιδίων ΙΑ.

Κοινά γονίδια για τις συγκρίσεις μεταξύ Bystander vs Control, GSE18760, GSE12435, GSE8993 και GSE21059						
Common Genes	Log2FoldChange					
	α -particle		carbon-ion		Time series	
	0.5h	4h	2h	6h	2h	6h
IL1A	0.81	1.53	-1.27	-0.5	0.34	0.76
IL1B	1.62	1.85	-1.23	-0.54	0.36	1.74
NFKBIZ	1.32	1.44	-1.41	-0.53	0.51	0.85
SAT1	1.16	0.91	0.52	0.54	-0.05	0.4
TNFAIP3	1.22	1.58	-1.35	-0.52	-0.02	0.22
CXCL2	2.42	2.64	-0.92	-	0.64	1.14
G0S2	1.96	2.15	-0.73	-	0.57	1.02
MT1E	2.57	2.16	-0.5	-	1.1	1.2
PTGS2	2.61	2.4	-0.73	-	1.03	2.61
CXCL8	3.53	-	-1.36	-0.69	1.3	3.6
FGF2	1.29	1.31	-	-0.53	-	-

Σχήμα 3-5 Πίνακας κοινών γονιδίων μεταξύ των συνόλων δεδομένων GSE18760, GSE12435, GSE8993 και GSE21059 για την σύγκριση μεταξύ Bystander vs Control.

3.2.7 Συγκριτική ανάλυση αποτελεσμάτων με βιβλιογραφική μελέτη

Για την ανάδειξη της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων συγκριτικής ανάλυσης της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκε δημοσιευμένη δουλειά βιβλιογραφικής μελέτης για την εύρεση παραγόντων και γονιδίων που σχετίζονται με συστημικά και τοπικά φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης, της ΙΑ³⁵. Στην δημοσιευμένη εργασία έγινε χρήση βιβλιογραφικής μελέτης με μη υπολογιστικό τρόπο, με υπολογιστικά εργαλεία εξόρυξης κειμένου (text mining) και άλλων βιοπληροφορικών εργαλείων. Για την αξιοποίηση των συσχετίσεων μεταξύ των ευρημάτων της μελέτης αναδείχθηκε η αξιοπιστία μεταξύ βιβλιογραφικής ανάλυσης και συγκριτικής βιοπληροφορικής ανάλυσης συνόλων δεδομένων από πειράματα μικροσυστοιχιών.

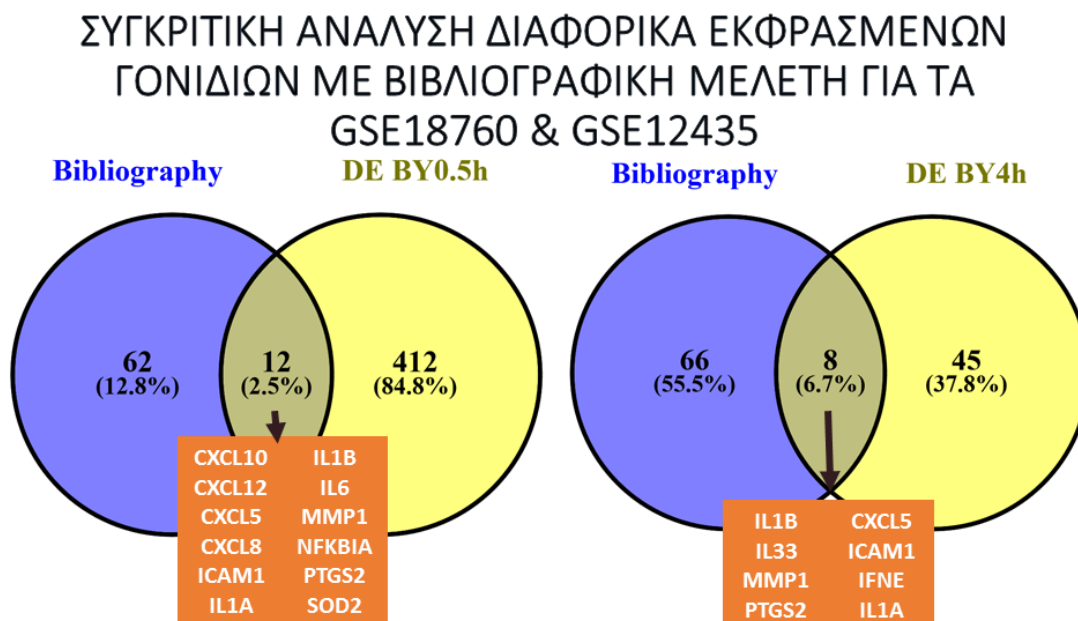
Χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω λίστα γονιδίων της δημοσίευσης Z. Nikitaki, *et al.*, Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: A new ‘old’ paradigm of how the bystanders and distant can become the players Semin Cancer Biol (2016)³⁵ που αναδεικνύει τα γονίδια που συσχετίζονται με τα τοπικά φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης, που θεωρούνται μέρος των συστημικών δράσεων της ακτινοβολίας.

Λίστα Γονιδίων συσχετισμένων με τα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειννίας

AKT1	CASP6	CXCL12	GJA1	IFNA4	IL8	MAPK14	NQO1	SOD1
AMBP	CASP7	CXCL16	GJB1	IFNE	JAK2	MIR21	P2RX7	SOD2
ATM	CASP9	CXCL5	H2AFX	IGF1	KDM5B	MIR663A	P2RY2	STAT3
ATR	CCL2	CXCL8	HIF1A	IL15	MAPK1	MMP1	PRKCE	TGFB1
BAX	CDKN1A	CXCR4	HMGB1	IL1A	MAPK8	MMP9	PRKDC	TGFB2
BCL2	CLU	CXCR7	HSPA4	IL1B	MAPK11	NFKB1	PTGS2	TNF
CASP2	CXCL10	EGR1	ICAM1	IL33	MAPK12	NFKBIA	SCO2	TNFSF10
CASP3	CXCL11	FAS	IFI27	IL6	MAPK13	NOS2	SLC5A5	TP53
TP53BP1	VCAM1							

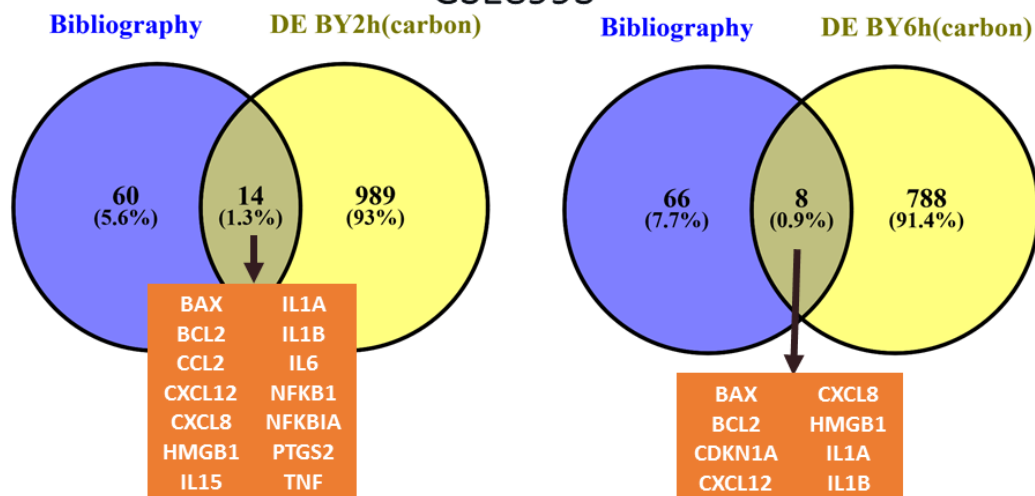
Σχήμα 3-6 Λίστα γονιδίων βιβλιογραφικά συσχετισμένων με τα τοπικά φαινόμενα απόκρισης λόγω γειννίας, που θεωρούνται μέρος των συστημικών δράσεων της ακτινοβολίας³⁵

Μέσω της συγκριτικής διαδικασίας βρέθηκαν συντηρημένα γονίδια μεταξύ της δημοσιευμένης μελέτης και της ανάλυσης δεδομένων από πειράματα μικροσυστοιχιών που αναδεικνύονται στα παρακάτω διαγράμματα Venn:



Σχήμα 3-7 Διαγράμματα Venn για την σύγκριση βιβλιογραφικά σχετιζόμενων γονιδίων με γονίδια που έχουν προκύψει από τις αναλύσεις εύρεσης στατιστικά σημαντικά, διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια μεταξύ Bystander vs Control που προέκυψαν από τα σύνολα δεδομένων GSE18760 & GSE12435.

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΦΟΡΙΚΑ ΕΚΦΡΑΣΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΟ GSE8993



Σχήμα 3-8 Διαγράμματα Venn για την σύγκριση βιβλιογραφικά σχετιζόμενων γονιδίων με γονίδια που έχουν προκύψει από τις αναλύσεις εύρεσης στατιστικά σημαντικά, διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια μεταξύ Bystander vs Control που προέκυψαν από τα σύνολα δεδομένων GSE8993.

Όπως παρουσιάζεται στα διαγράμματα Venn παραπάνω βρέθηκαν κοινά γονίδια μεταξύ των διαφορετικών λιστών στατιστικά σημαντικά, διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων που προέκυψαν από την ανάλυση των συνόλων δεδομένων μικροσυστοιχιών και της λίστας γονιδίων που έχει προκύψει από βιβλιογραφική μελέτη. Έτσι αποδεικνύονται ότι δεν έχουν προκύψει τα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια βάση τυχαιότητας αλλά έχουν πραγματικά βιολογική σημασία στα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ.

Από τα δύο παραπάνω διαγράμματα μπορεί να παρατηρηθεί ότι υπάρχουν κοινά γονίδια μεταξύ όλων των συγκρίσεων τα οποία είναι τα IL1A, IL1B που είναι γονίδια σχετιζόμενα με την φλεγμονώδη απόκριση του κυττάρου. Επίσης στα 3 από τα 4 διαγράμματα Venn παρατηρούμε ότι υπάρχουν, τρία ακόμη κοινά γονίδια, τα CXCL12, CXCL8 και PTGS2. Και τα πέντε αυτά γονίδια σχετίζονται με την φλεγμονώδη απόκριση του κυττάρου.

3.3 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, με βάση την βιοπληροφορική μελέτη των φαινομένων απόκρισης λόγω γειτνίασης της ΙΑ, μέσω της συγκριτικής ανάλυσης πειραμάτων μικροσυστοιχιών αποκαλύφθηκαν ειδικοί μηχανισμοί απόκρισης που σχετίζονται με τον τύπο σωματιδίων ΙΑ, την χρονική στιγμή μετά την ακτινοβολήση και τον τύπο των παρακείμενων στα ακτινοβολημένα, κυττάρων. Ειδικότερα όπως παρατηρήθηκε στα περισσότερα αποτελέσματα των συνόλων δεδομένων μία υπο-ομάδα στατιστικά

σημαντικών γονιδίων εντοπίστηκε ως διαφορεικά εκφρασμένα, ανεξαρτήτως τύπου ακτινοβολίας. Τα IL1A, IL1B, TNFAIP3, NFKBIZ σχετίζονται με την φλεγμονώδη απόκριση και την απόπτωση. Δύο μηχανισμοί που έχουν άμεση σχέση με τις επιδράσεις της ακτινοβολίας. Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης ελέγχθηκαν περαιτέρω μέσω βιβλιογραφικής ανασκόπησης δημοσιευμένης μελέτης και αναδείχθηκε η πιστότητα τους σε σχέση με τα αποτελέσματα της δημοσιευμένης μελέτης. Επιπρόσθετα είναι σημαντικό να αναφερθεί, πώς μέσω της λειτουργικής ανάλυσης, εντοπίστηκαν βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με διακριτούς μηχανισμούς ανάμεσα στα παρακείμενα και ακτινοβολημένα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα στα παρακείμενα κύτταρα βρέθηκαν βιολογικές διεργασίες που έχουν σχέση με φλεγμονώδη απόκριση και την απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Στα ακτινοβολημένα κύτταρα βρέθηκαν βιολογικές διεργασίες που έχουν σχέση με την απόκριση στις βλάβες του DNA, την απόπτωση, την απόκριση σε μη διπλωμένες πρωτεΐνες, και μηχανισμούς που έχουν σχέση με την ουβικιτινίωση πρωτεϊνών. Στις διαφορές μεταξύ τύπου σωματιδίων ΙΑ βρέθηκε ότι η ΙΑ με σωματίδια άλφα προκαλεί πολύ μεγαλύτερα επίπεδα οξειδωτικού στρες στα κύτταρα (υπερεκφρασμένα γονίδια μεταλλοθειονινών, απόκριση στο οξειδωτικό στρες) ενώ στην ΙΑ με ιόντα άνθρακα ενεργοποιούνται κατευθείαν μονοπάτια απόπτωσης. Επίσης βρέθηκε ότι τα φαινόμενα απόκρισης λόγω γειννίας της ΙΑ εξαρτώνται από την χρονική στιγμή μετά την ακτινοβολήση. Δεν βρέθηκαν μεγάλες διαφορές έντασης της διαφορικής έκφρασης γονιδίων ανάλογα με την χρονική στιγμή μετά την ακτινοβολήση. Και στους δύο τύπους σωματιδίων ΙΑ η ένταση της διαφορικής έκφρασης μέχρι και τις 6 ώρες φαίνεται να παραμένει στα ίδια επίπεδα σε συγκεκριμένα γονίδια (μεταλλοθειονίνες, κυτταροκίνες, γλυκοπρωτεΐνες κυτταρικής προσκόλλησης) αλλά παρατηρήθηκαν διαφορές θετικής ρύθμισης ως προς την επαγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών απόπτωσης μεταξύ 0.5 - 4 ωρών και 2 - 6 ωρών. Επίσης ο τύπος κυτάρων κατέχει σημαντικό ρόλο στην επίδραση σε φαινόμενα απόκρισης λόγω γειννίας της ΙΑ, αφού σε καρκινικά και αθανатоποιημένα παρακείμενα κύτταρα δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια με βάση τα στατιστικά όρια που χρησιμοποιήθηκαν για την σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών συνόλων δεδομένων. Συνοψίζοντας παρόλη την μεγάλη ετερογένεια των πειραματικών δεδομένων των μικροσυστοιχιών που χρησιμοποιήθηκαν, αναδείχθηκαν συντηρημένοι μοριακοί μηχανισμοί των φαινομένων απόκρισης λόγω γειννίας της ΙΑ. Τέλος λόγω της πολυπλοκότητας του φαινομένου, όπως αναδεικνύεται από αυτήν την εργασία και άλλες δημοσιευμένες εργασίες, είναι

σημαντικό η επιστημονική κοινότητα να στραφεί στην δημιουργία περαιτέρω πειραματικών δεδομένων *in vivo*, για την εξονυχιστική μελέτη του φαινομένου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Radiation induced bystander effects	Φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης που οφείλονται στην ιοντίζουσα ακτινοβολία
Gene Ontology Project	Έργο γονιδιακών οντολογιών
Gene Ontology	Γονιδιακή οντολογία
Gene Expression Omnibus	Δημόσιο αποθετήριο λειτουργικής γονιδιωματικής
Bystander effects	Φαινόμενα απόκρισης λόγω γειτνίασης
Exploratory Data Analysis	Διερευνητική ανάλυση δεδομένων
Volcano plot	Διάγραμμα ηφαιστείου
Heatmap	Θερμικό διάγραμμα ή Θερμικός χάρτης
Ionizing radiation	Ιοντίζουσα ακτινοβολία
S.I.	Διεθνές μετρικό σύστημα
FC	Τιμή διαφορικής έκφρασης
FDR	Αναμενόμενο ποσοστό σφαλμάτων τύπου I

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

IA	Ιοντίζουσα ακτινοβολία
GEO	Gene Expression Omnibus
RIBE	Radiation induced bystander effects
S.I.	Système International d'unités
FC	Fold Change
FDR	False Discovery Rate

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Παρακάτω δίνονται οι πίνακες οντολογιών που έχουν προκύψει από το εργαλείο BioInfoMiner και Enrichr. Δίνονται μόνο οι TOP10 στατιστικά σημαντικές οντολογίες σε κάθε πίνακα.

GSE12435

Bystander vs Control, GSE12435, 4h, 0.5 Gy BioInfoMiner Gene Ontologies			
Rank	Term id	Term Definition	Enrichment
1	GO:0045926	negative regulation of growth	5/17
2	GO:0071294	cellular response to zinc ion	3/18
3	GO:0036018	cellular response to erythropoietin	2/2
4	GO:0032461	positive regulation of protein oligomerization	3/14
5	GO:0071276	cellular response to cadmium ion	3/15
6	GO:0006598	polyamine catabolic process	2/3
7	GO:0006882	cellular zinc ion homeostasis	3/17
8	GO:0046697	decidualization	3/20
9	GO:0042346	positive regulation of NF-kappaB import into nucleus	3/21
10	GO:0031622	positive regulation of fever generation	2/5

Bystander vs Control, GSE12435, 4h, 0.5 Gy Enrichr Gene Ontologies	
Index	Name
1	cellular response to zinc ion (GO:0071294)
2	response to transition metal nanoparticle (GO:1990267)
3	response to zinc ion (GO:0010043)
4	response to metal ion (GO:0010038)
5	response to inorganic substance (GO:0010035)
6	cellular response to metal ion (GO:0071248)
7	cellular response to inorganic substance (GO:0071241)
8	cellular biogenic amine catabolic process (GO:0042402)
9	amine catabolic process (GO:0009310)
10	cellular response to cadmium ion (GO:0071276)

Irradiated vs Control, GSE12435, 4h, 0.5 Gy BioInfoMiner Gene Ontologies			
Rank	Term id	Term Definition	Enrichment
1	GO:0045926	negative regulation of growth	6/17
2	GO:0071294	cellular response to zinc ion	6/18
3	GO:0071276	cellular response to cadmium ion	4/15
4	GO:0006977	DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in cell cycle arrest	6/60
5	GO:0003181	atrioventricular valve morphogenesis	3/7
6	GO:0008285	negative regulation of cell proliferation	14/402
7	GO:0097191	extrinsic apoptotic signaling pathway	5/42
8	GO:0097296	activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic signaling pathway	3/13
9	GO:0032461	positive regulation of protein oligomerization	3/14
10	GO:0008625	extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors	4/37

Irradiated vs Control, GSE12435, 4h, 0.5 Gy Enrichr Gene Ontologies	
Index	Name
1	cellular response to zinc ion (GO:0071294)
2	response to transition metal nanoparticle (GO:1990267)
3	response to zinc ion (GO:0010043)
4	extrinsic apoptotic signaling pathway (GO:0097191)
5	response to metal ion (GO:0010038)
6	cellular response to metal ion (GO:0071248)
7	cellular response to inorganic substance (GO:0071241)
8	negative regulation of growth (GO:0045926)
9	cellular response to abiotic stimulus (GO:0071214)
10	negative regulation of cell cycle (GO:0045786)

GSE18760

Bystander vs Control, GSE18760, 0.5h, 0.5 Gy BioInfoMiner Gene Ontologies			
Rank	Term id	Term Definition	Enrichment
1	GO:0045926	negative regulation of growth	9/17
2	GO:0071294	cellular response to zinc ion	9/18
3	GO:0038061	NIK/NF-kappaB signaling	12/65
4	GO:0071276	cellular response to cadmium ion	6/15
5	GO:0002479	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent	10/62
6	GO:0006521	regulation of cellular amino acid metabolic process	9/51
7	GO:0060071	Wnt signaling pathway, planar cell polarity pathway	11/94
8	GO:0045429	positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	7/39
9	GO:0071222	cellular response to lipopolysaccharide	12/111
10	GO:0071310	cellular response to organic substance	6/31

Bystander vs Control, GSE18760, 0.5h, 0.5 Gy Enrichr GO	
Index	Name
1	cellular response to zinc ion (GO:0071294)
2	response to transition metal nanoparticle (GO:1990267)
3	response to inorganic substance (GO:0010035)
4	response to metal ion (GO:0010038)
5	response to zinc ion (GO:0010043)
6	response to cadmium ion (GO:0046686)
7	response to oxidative stress (GO:0006979)
8	response to unfolded protein (GO:0006986)
9	negative regulation of growth (GO:0045926)
10	negative regulation of protein modification process (GO:0031400)

Irradiated vs Control, GSE18760, 0.5h, 0.5 Gy BioInfoMiner Gene Ontologies			
Rank	Term id	Term Definition	Enrichment
1	GO:0045926	negative regulation of growth	9/17
2	GO:0071294	cellular response to zinc ion	9/18
3	GO:0038061	NIK/NF-kappaB signaling	12/65
4	GO:0071276	cellular response to cadmium ion	6/15
5	GO:0002479	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent	11/62
6	GO:0006521	regulation of cellular amino acid metabolic process	9/51
7	GO:0048661	positive regulation of smooth muscle cell proliferation	9/56
8	GO:0030968	endoplasmic reticulum unfolded protein response	8/46
9	GO:0045429	positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	7/39
10	GO:0006986	response to unfolded protein	7/41

Irradiated vs Control, GSE18760, 0.5h, 0.5 Gy Enrichr GO	
Index	Name
1	cellular response to zinc ion (GO:0071294)
2	response to transition metal nanoparticle (GO:1990267)
3	response to zinc ion (GO:0010043)
4	response to metal ion (GO:0010038)
5	response to unfolded protein (GO:0006986)
6	response to topologically incorrect protein (GO:0035966)
7	response to inorganic substance (GO:0010035)
8	negative regulation of transferase activity (GO:0051348)
9	regulation of cellular response to stress (GO:0080135)
10	response to oxidative stress (GO:0006979)

GSE21059

Bystander vs Control, GSE21059, Time Series, 0.5 Gy, BioInfoMiner Gene Ontologies			
Rank	Term id	Term Definition	Enrichment
1	GO:0045926	negative regulation of growth	9/17
2	GO:0071294	cellular response to zinc ion	9/18
3	GO:0071276	cellular response to cadmium ion	7/15
4	GO:0022617	extracellular matrix disassembly	15/72
5	GO:0042026	protein refolding	6/14
6	GO:0046697	decidualization	7/20
7	GO:0007179	transforming growth factor beta receptor signaling pathway	16/88
8	GO:0001934	positive regulation of protein phosphorylation	23/149
9	GO:0060071	Wnt signaling pathway, planar cell polarity pathway	16/94
10	GO:0060976	coronary vasculature development	7/25

Bystander vs Control, GSE21059, Time Series, 0.5 Gy Enrichr GO	
Index	Name
1	cellular response to zinc ion (GO:0071294)
2	protein folding (GO:0006457)
3	response to zinc ion (GO:0010043)
4	regulation of cell morphogenesis (GO:0022604)
5	embryonic organ morphogenesis (GO:0048562)
6	organ morphogenesis (GO:0009887)
7	negative regulation of protein modification process (GO:0031400)
8	extracellular matrix organization (GO:0030198)
9	extracellular structure organization (GO:0043062)
10	cellular response to cadmium ion (GO:0071276)

Irradiated vs Control, GSE21059, Time Series, 0.5 Gy, BioInfoMiner Gene Ontologies			
Rank	Term id	Term Definition	Enrichment
1	GO:0071294	cellular response to zinc ion	11/18
2	GO:0045926	negative regulation of growth	10/17
3	GO:0090263	positive regulation of canonical Wnt signaling pathway	33/117
4	GO:0008285	negative regulation of cell proliferation	84/402
5	GO:0035904	aorta development	9/19
6	GO:0042771	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator	12/29
7	GO:2000134	negative regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle	10/23
8	GO:0030032	lamellipodium assembly	12/31
9	GO:0006457	protein folding	37/155
10	GO:0001934	positive regulation of protein phosphorylation	36/148

Irradiated vs Control, GSE21059, Time Series, 0.5 Gy Enrichr GO	
Index	Name
1	cellular response to zinc ion (GO:0071294)
2	protein folding (GO:0006457)
3	response to topologically incorrect protein (GO:0035966)
4	response to unfolded protein (GO:0006986)
5	negative regulation of cell cycle (GO:0045786)
6	embryonic morphogenesis (GO:0048598)
7	negative regulation of protein modification process (GO:0031400)
8	signal transduction by p53 class mediator (GO:0072331)
9	embryonic organ morphogenesis (GO:0048562)
10	proteolysis involved in cellular protein catabolic process (GO:0051603)

GSE8993

Bystander vs Control, GSE8993, 2h, 0.12Gy, BioInfoMiner Gene Ontologies			
Rank	Term id	Term Definition	Enrichment
1	GO:0071376	cellular response to corticotropin-releasing hormone stimulus	5/5
2	GO:0071347	cellular response to interleukin-1	16/67
3	GO:0001656	metanephros development	11/35
4	GO:0018149	peptide cross-linking	12/50
5	GO:0009612	response to mechanical stimulus	14/64
6	GO:0001953	negative regulation of cell-matrix adhesion	6/1515
7	GO:0071356	cellular response to tumor necrosis factor	17/100
8	GO:0043524	negative regulation of neuron apoptotic process	20/130
9	GO:0072218	metanephric ascending thin limb development	3/4
10	GO:0031424	keratinization	10/48

Bystander vs Control, GSE8993, 2h, 0.12Gy, Enrichr GO	
Index	Name
1	response to mechanical stimulus (GO:0009612)
2	negative regulation of transport (GO:0051051)
3	response to molecule of bacterial origin (GO:0002237)
4	response to lipopolysaccharide (GO:0032496)
5	regulation of endocrine process (GO:0044060)
6	response to oxygen levels (GO:0070482)
7	regulation of cytokine biosynthetic process (GO:0042035)
8	negative regulation of phosphate metabolic process (GO:0045936)
9	negative regulation of phosphorus metabolic process (GO:0010563)
10	response to inorganic substance (GO:0010035)

Irradiated vs Control, GSE8993, 6h, 0.12Gy, BioInfoMiner Gene Ontologies			
Rank	Term id	Term Definition	Enrichment
1	GO:0001656	metanephros development	9/35
2	GO:0018149	peptide cross-linking	10/50
3	GO:0048660	regulation of smooth muscle cell proliferation	4/9
4	GO:0071376	cellular response to corticotropin-releasing hormone stimulus	3/4
5	GO:0009612	response to mechanical stimulus	10/64
6	GO:0045893	positive regulation of transcription, DNA-templated	46/571
7	GO:0030199	collagen fibril organization	7/37
8	GO:0045086	positive regulation of interleukin-2 biosynthetic process	4/12
9	GO:0006351	transcription, DNA-templated	114/1752
10	GO:0051402	neuron apoptotic process	6/33

Bystander vs Control, GSE8993, 6h, 0.12Gy, Enrichr GO	
Index	Name
1	regulation of fibroblast migration (GO:0010762)
2	regulation of transcription involved in cell fate commitment (GO:0060850)
3	metanephros development (GO:0001656)
4	regulation of respiratory gaseous exchange (GO:0043576)
5	collagen fibril organization (GO:0030199)
6	pattern specification involved in kidney development (GO:0061004)
7	response to oxygen levels (GO:0070482)
8	negative regulation of transport (GO:0051051)
9	response to inorganic substance (GO:0010035)
10	response to steroid hormone (GO:0048545)

Irradiated vs Control, GSE8993, 2h, 0.013Gy, BioInfoMiner Gene Ontologies			
Rank	Term id	Term Definition	Enrichment
1	GO:0061154	endothelial tube morphogenesis	5/6
2	GO:0007040	lysosome organization	12/37
3	GO:0007050	cell cycle arrest	28/142
4	GO:0045995	regulation of embryonic development	6/13
5	GO:0006921	cellular component disassembly involved in execution phase of apoptosis	7/20
6	GO:0043123	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	28/162
7	GO:0030199	collagen fibril organization	10/37
8	GO:0046135	pyrimidine nucleoside catabolic process	5/11
9	GO:0032008	positive regulation of TOR signaling	8/26
10	GO:0071230	cellular response to amino acid stimulus	12/50

Irradiated vs Control, GSE8993, 6h, 0.013Gy, BioInfoMiner Gene Ontologies			
Rank	Term id	Term Definition	Enrichment
1	GO:0007050	cell cycle arrest	34/142
2	GO:0032092	positive regulation of protein binding	18/57
3	GO:0001837	epithelial to mesenchymal transition	13/34
4	GO:0045995	regulation of embryonic development	7/13
5	GO:0008284	positive regulation of cell proliferation	84/480
6	GO:0030177	positive regulation of Wnt signaling pathway	13/40
7	GO:0071504	cellular response to heparin	4/5
8	GO:0071560	cellular response to transforming growth factor beta stimulus	15/52
9	GO:1904837	beta-catenin-TCF complex assembly	13/43
10	GO:0006921	cellular component disassembly involved in execution phase of	8/20

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Για τις λίστες στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων μπορείτε να απευθυνθείτε στο yelkon@biol.uoa.gr.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, U. SOURCES AND EFFECTS OF IONIZING RADIATION United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation UNSCEAR 2000 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes.
2. BIOLOGICAL EFFECTS OF IONIZING RADIATION Background Radiation Sources. at <<http://www.world-nuclear.org/education/ral.htm>>
3. IUPAC Compendium of Chemical Terminology (IUPAC). doi:10.1351/goldbook.I03183
4. Robert N. Cherry, J. Chapter 48 - Radiation: Ionizing. Encyclopedia of Occupational Health and Safety at <<http://www.ilocis.org/documents/chpt48e.htm>>
5. Schimmerling, W. The space radiation environment: an introduction.
6. Zuber, K. Neutrino physics. (CRC Press, 2012).
7. Christensen, D. M., Iddins, C. J. & Sugarman, S. L. Ionizing Radiation Injuries and Illnesses. Emerg. Med. Clin. North Am. 32, 245–265 (2014).
8. ICRP: The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. Ann. ICRP 37 (2-4). 2–4 (2007). at <[http://www.icrp.org/publication.asp?id=ICRP Publication 103](http://www.icrp.org/publication.asp?id=ICRP%20Publication%20103)>
9. Kónya, J. & Nagy, N. M. Nuclear and radiochemistry. (Elsevier Science, 2012).
10. Jensen, C., Aaserud, F., Kragh, H., Rüdinger, E. & Stuewer, R. H. in Controversy and Consensus: Nuclear Beta Decay 1911–1934 29–53 (Birkhäuser Basel, 2000). doi:10.1007/978-3-0348-8444-0_2
11. Jensen, C., Aaserud, F., Kragh, H., Rüdinger, E. & Stuewer, R. H. in Controversy and Consensus: Nuclear Beta Decay 1911–1934 185–206 (Birkhäuser Basel, 2000). doi:10.1007/978-3-0348-8444-0_7
12. Knipp, J. K. & Uhlenbeck, G. E. Emission of gamma radiation during the beta decay of nuclei. Physica 3, 425–439 (1936).
13. L'Annunziata, M. F. Handbook of radioactivity analysis.
14. Little, J. B. Cellular, molecular, and carcinogenic effects of radiation. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 7, 337–52 (1993).
15. Coggle, J. E. Medical Effects of Ionizing Radiation. Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Physics, Chem. Med. 50, 755–755 (1986).
16. Maisey, M. N. in Positron Emission Tomography 1–12 (Springer-Verlag). doi:10.1007/1-84628-007-9_1
17. Scuffham, J. W. et al. A CdTe detector for hyperspectral SPECT imaging. J. Instrum. 7, P08027–P08027 (2012).
18. Amdur, R. J. et al. Radiation therapy for skin cancer near the eye: Kilovoltage x-rays versus electrons. Int. J. Radiat. Oncol. 23, 769–779 (1992).

19. Desouky, O., Ding, N. & Zhou, G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 8, 247–254 (2015).
20. How radiation affects cells - Radiation Effects Research Foundation. at http://www.rerf.jp/radefx/basic_kno_e/radcell.htm
21. Wright, E. G. & Coates, P. J. Untargeted effects of ionizing radiation: Implications for radiation pathology. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 597, 119–132 (2006).
22. Council, N. R. Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation. (National Academies Press, 2006). doi:10.17226/11340
23. Bielski, B. H. J., Cabelli, D. E., Arudi, R. L. & Ross, A. B. Reactivity of HO₂/O₂ Radicals in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 14, 1041 (1985).
24. Ershov, B. G. & Gordeev, A. V. A model for radiolysis of water and aqueous solutions of H₂, H₂O₂ and O₂. *Radiat. Phys. Chem.* 77, 928–935 (2008).
25. O'Neill, P. & Wardman, P. Radiation chemistry comes before radiation biology. *Int. J. Radiat. Biol.* 85, 9–25 (2009).
26. Mikkelsen, R. B. & Wardman, P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22, 5734–54 (2003).
27. Berlett, B. S. & Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–6 (1997).
28. Azzam, E. I., de Toledo, S. M. & Little, J. B. Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. *Oncogene* 22, 7050–7 (2003).
29. Hei, T. K., Zhou, H., Chai, Y., Ponnaiya, B. & Ivanov, V. N. Radiation induced non-targeted response: mechanism and potential clinical implications. *Curr. Mol. Pharmacol.* 4, 96–105 (2011).
30. Prise, K. M. & O'Sullivan, J. M. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 9, 351–60 (2009).
31. Hieronymi, A. Understanding Systems Science: A Visual and Integrative Approach. *Syst. Res. Behav. Sci.* 30, 580–595 (2013).
32. Systems Theory and Biology. (Springer Berlin Heidelberg, 1968). doi:10.1007/978-3-642-88343-9
33. Westerhoff, H. V. & Hofmeyr, J.-H. S. in Systems Biology 119–141 (Springer-Verlag). doi:10.1007/b137122
34. Walhout, A. J. M., Vidal, M. & Dekker, J. Handbook of systems biology: concepts and insights. (Elsevier/Academic Press, 2012).
35. Nikitaki, Z. et al. Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: A new 'old' paradigm of how the bystanders and distant can become the players. *Seminars in Cancer Biology* (2015). doi:10.1016/j.semcancer.2016.02.002
36. Prise, K. M. New advances in radiation biology. *Occup. Med. (Lond.)* 56, 156–61 (2006).

37. Guadagnolo, B. A. et al. Use of radiation therapy in the last 30 days of life among a large population-based cohort of elderly patients in the United States. *J. Clin. Oncol.* 31, 80–7 (2013).
38. Liao, S. L., Connell, P. P. & Weichselbaum, R. R. New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology. *Sci. Transl. Med.* 5, 173sr2 (2013).
39. Freeman, S. M. et al. The bystander effect: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* 53, 5274–83 (1993).
40. Nagasawa, H. & Little, J. B. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res.* 52, 6394–6396 (1992).
41. Belyakov, O. V., Prise, K. M., Trott, K. R. & Michael, B. D. Delayed lethality, apoptosis and micronucleus formation in human fibroblasts irradiated with X-rays or alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.* 75, 985–93 (1999).
42. Shao, C., Furusawa, Y., Kobayashi, Y., Funayama, T. & Wada, S. Bystander effect induced by counted high-LET particles in confluent human fibroblasts: a mechanistic study. *FASEB J.* 17, 1422–7 (2003).
43. Ponnaiya, B., Jenkins-Baker, G., Bigelow, A., Marino, S. & Geard, C. R. Detection of chromosomal instability in alpha-irradiated and bystander human fibroblasts. *Mutat. Res.* 568, 41–8 (2004).
44. Zhou, H. et al. Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2099–104 (2000).
45. Seymour, C. B. & Mothersill, C. Delayed expression of lethal mutations and genomic instability in the progeny of human epithelial cells that survived in a bystander-killing environment. *Radiat. Oncol. Investig.* 5, 106–10 (1997).
46. Gerashchenko, B. I. & Howell, R. W. Proliferative response of bystander cells adjacent to cells with incorporated radioactivity. *Cytometry. A* 60, 155–64 (2004).
47. Komarova, E. A. et al. Stress-induced secretion of growth inhibitors: a novel tumor suppressor function of p53. *Oncogene* 17, 1089–96 (1998).
48. Iyer, R. & Lehnert, B. E. Alpha-particle-induced increases in the radioresistance of normal human bystander cells. *Radiat. Res.* 157, 3–7 (2002).
49. Blyth, B. J. & Sykes, P. J. Radiation-Induced Bystander Effects: What Are They, and How Relevant Are They to Human Radiation Exposures? *Radiat. Res.* 176, 139–157 (2011).
50. Hu, B. et al. The time and spatial effects of bystander response in mammalian cells induced by low dose radiation. *Carcinogenesis* 27, 245–51 (2006).
51. Prise, K. M. & Schettino, G. Microbeams in radiation biology: review and critical comparison. *Radiat. Prot. Dosimetry* 143, 335–9 (2011).
52. Wu, L. J. et al. Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4959–64 (1999).

53. Bishayee, A., Rao, D. V. & Howell, R. W. Evidence for Pronounced Bystander Effects Caused by Nonuniform Distributions of Radioactivity using a Novel Three-Dimensional Tissue Culture Model. *Radiat. Res.* 152, 88 (1999).
54. Akudugu, J. M., Azzam, E. I. & Howell, R. W. Induction of lethal bystander effects in human breast cancer cell cultures by DNA-incorporated Iodine-125 depends on phenotype. *Int. J. Radiat. Biol.* 88, 1028–1038 (2012).
55. Schettino, G. et al. Low-Dose Studies of Bystander Cell Killing with Targeted Soft X Rays. *Radiat. Res.* 160, 505–511 (2003).
56. Gaillard, S., Pusset, D., de Toledo, S. M., Fromm, M. & Azzam, E. I. Propagation Distance of the α -Particle-Induced Bystander Effect: The Role of Nuclear Traversal and Gap Junction Communication. *Radiat. Res.* 171, 513–520 (2009).
57. Belyakov, O. V et al. Biological effects in unirradiated human tissue induced by radiation damage up to 1 mm away. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14203–8 (2005).
58. Hamada, N., Ni, M., Funayama, T., Sakashita, T. & Kobayashi, Y. Temporally distinct response of irradiated normal human fibroblasts and their bystander cells to energetic heavy ions. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 639, 35–44 (2008).
59. Prise, K. M. & O'Sullivan, J. M. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 9, 351–360 (2009).
60. Mancuso, M. et al. Role of connexin43 and ATP in long-range bystander radiation damage and oncogenesis in vivo. *Oncogene* 30, 4601–4608 (2011).
61. Mothersill, C. & Seymour, C. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 71, 421–427 (1997).
62. Yang, H., Asaad, N. & Held, K. D. Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts. *Oncogene* 24, 2096–2103 (2005).
63. Yang, H., Anzenberg, V. & Held, K. D. The Time Dependence of Bystander Responses Induced by Iron-Ion Radiation in Normal Human Skin Fibroblasts. *Radiat. Res.* 168, 292–298 (2007).
64. Azzam, E. I., de Toledo, S. M. & Little, J. B. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from α -particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 473–478 (2001).
65. Hamada, N., Maeda, M., Otsuka, K. & Tomita, M. Signaling Pathways Underpinning the Manifestations of Ionizing Radiation-Induced Bystander Effects. *Curr. Mol. Pharmacol.* 4, 79–95 (2011).
66. Al-Mayah, A. H. J., Irons, S. L., Pink, R. C., Carter, D. R. F. & Kadhim, M. A. Possible Role of Exosomes Containing RNA in Mediating Nontargeted Effect of Ionizing Radiation. *Radiat. Res.* 177, 539–545 (2012).
67. Soleymanifard, S., Toossi, M. T. B., Sazgarnia, A. & Mohebbi, S. The role of target and bystander cells in dose-response relationship of radiation-induced bystander effects in two cell lines. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 16, 177–183 (2013).

68. Herok, R. et al. Bystander effects induced by medium from irradiated cells: similar transcriptome responses in irradiated and bystander K562 cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 77, 244–52 (2010).
69. Belyakov, O. V, Malcolmson, A. M., Folkard, M., Prise, K. M. & Michael, B. D. Direct evidence for a bystander effect of ionizing radiation in primary human fibroblasts. *Br. J. Cancer* 84, 674–679 (2001).
70. McIlrath, J., Lorimore, S. A., Coates, P. J. & Wright, E. G. Radiation-induced genomic instability in immortalized haemopoietic stem cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 79, 27–34 (2003).
71. Mothersill, C. et al. Individual variation in the production of a 'bystander signal' following irradiation of primary cultures of normal human urothelium. *Carcinogenesis* 22, 1465–71 (2001).
72. He, M., Zhao, M., Shen, B., Prise, K. M. & Shao, C. Radiation-induced intercellular signaling mediated by cytochrome-c via a p53-dependent pathway in hepatoma cells. *Oncogene* 30, 1947–1955 (2011).
73. Tomita, M., Maeda, M., Kobayashi, K. & Matsumoto, H. Dose Response of Soft X-Ray-Induced Bystander Cell Killing Affected by p53 Status. *Radiat. Res.* 179, 200–207 (2013).
74. Kadhim, M. A. et al. Genomic instability after targeted irradiation of human lymphocytes: Evidence for inter-individual differences under bystander conditions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 688, (2010).
75. Irons, S. L. et al. The effect of genetic background and dose on non-targeted effects of radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 88, 735–742 (2012).
76. Groesser, T., Cooper, B. & Rydberg, B. Lack of Bystander Effects from High-LET Radiation for Early Cytogenetic End Points. *Radiat. Res.* 170, 794–802 (2008).
77. Gow, M. D., Seymour, C. B., Ryan, L. A. & Mothersill, C. E. Induction of Bystander Response in Human Glioma Cells using High-Energy Electrons: A Role for TGF- β 1. *Radiat. Res.* 173, 769–778 (2010).
78. Ryan, L. A., Smith, R. W., Seymour, C. B. & Mothersill, C. E. Dilution of Irradiated Cell Conditioned Medium and the Bystander Effect. *Radiat. Res.* 169, 188–196 (2008).
79. Wakatsuki, M. et al. Differential bystander signaling between radioresistant chondrosarcoma cells and fibroblasts after x-ray, proton, iron ion and carbon ion exposures. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 84, e103-8 (2012).
80. Anzenberg, V., Chandiramani, S. & Coderre, J. A. LET-Dependent Bystander Effects Caused by Irradiation of Human Prostate Carcinoma Cells with X Rays or Alpha Particles. *Radiat. Res.* 170, 467–476 (2008).
81. Johnston, C. J., Williams, J. P., Okunieff, P. & Finkelstein, J. N. Radiation-induced pulmonary fibrosis: examination of chemokine and chemokine receptor families. *Radiat. Res.* 157, 256–65 (2002).
82. Ding, L.-H. et al. Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses. *Radiat. Res.* 164, 17–26 (2005).
83. Kis, E. et al. Microarray analysis of radiation response genes in primary human fibroblasts. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 66, 1506–1514 (2006).

84. Goldberg, Z., Schwietert, C. W., Lehnert, B., Stern, R. & Nami, I. Effects of low-dose ionizing radiation on gene expression in human skin biopsies. in *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 58, 567–574 (2004).
85. Wyrobek, A. & Manohar, C. Low dose radiation response curves, networks and pathways in human lymphoblastoid cells exposed from 1 to 10cGy of acute gamma radiation. *Mutat. Researsearch* 722, 119–130 (2011).
86. Fält, S., Holmberg, K., Lambert, B. & Wennborg, A. Long-term global gene expression patterns in irradiated human lymphocytes. *Carcinogenesis* 24, 1837–1845 (2003).
87. Dressman, H. K. et al. Gene expression signatures that predict radiation exposure in mice and humans. *PLoS Med.* 4, 690–701 (2007).
88. Martins, M. B., Sabatier, L., Ricoul, M., Pinton, A. & Dutrillaux, B. Specific chromosome instability induced by heavy ions: a step towards transformation of human fibroblasts? *Mutat. Res.* 285, 229–37 (1993).
89. Ponnaiya, B., Cornforth, M. N. & Ullrich, R. L. Induction of chromosomal instability in human mammary cells by neutrons and gamma rays. *Radiat. Res.* 147, 288–94 (1997).
90. Dugan, L. C. & Bedford, J. S. Are chromosomal instabilities induced by exposure of cultured normal human cells to low- or high-LET radiation? *Radiat. Res.* 159, 301–11 (2003).
91. Watson, G. E., Pocock, D. a, Papworth, D., Lorimore, S. a & Wright, E. G. In vivo chromosomal instability and transmissible aberrations in the progeny of haemopoietic stem cells induced by high- and low-LET radiations. *Int. J. Radiat. Biol.* 77, 409–417 (2001).
92. Prise, K. M. et al. What role for DNA damage and repair in the bystander response? *Mutat. Res.* 597, 1–4 (2006).
93. Chen, S. et al. Up-regulation of ROS by mitochondria-dependent bystander signaling contributes to genotoxicity of bystander effects. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 666, 68–73 (2009).
94. Leach, J. K., Van Tuyle, G., Lin, P. S., Schmidt-Ullrich, R. & Mikkelsen, R. B. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res.* 61, 3894–901 (2001).
95. Dickey, J. S. et al. Intercellular communication of cellular stress monitored by gamma-H2AX induction. *Carcinogenesis* 30, 1686–95 (2009).
96. Han, W., Wu, L., Chen, S. & Yu, K. N. Exogenous carbon monoxide protects the bystander Chinese hamster ovary cells in mixed coculture system after alpha-particle irradiation. *Carcinogenesis* 31, 275–80 (2010).
97. Nikitaki, Z., Hellweg, C. E., Georgakilas, A. G. & Ravanat, J.-L. Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Front. Chem.* 3, 35 (2015).
98. Narayanan, P. K., Goodwin, E. H. & Lehnert, B. E. Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. *Cancer Res.* 57, 3963–71 (1997).

99. Buonanno, M., de Toledo, S. M., Pain, D. & Azzam, E. I. Long-Term Consequences of Radiation-Induced Bystander Effects Depend on Radiation Quality and Dose and Correlate with Oxidative Stress. *Radiat. Res.* 175, 405–415 (2011).
100. Han, W. et al. Constitutive nitric oxide acting as a possible intercellular signaling molecule in the initiation of radiation-induced DNA double strand breaks in non-irradiated bystander cells. *Oncogene* 26, 2330–2339 (2007).
101. Maréchal, A. & Zou, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, (2013).
102. Hanot, M. et al. Membrane-dependent bystander effect contributes to amplification of the response to alpha-particle irradiation in targeted and nontargeted cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 75, 1247–53 (2009).
103. Schaeue, D., Kachikwu, E. L. & McBride, W. H. Cytokines in radiobiological responses: a review. *Radiat Res* 178, 505–523 (2012).
104. Spitz, D. R., Azzam, E. I., Jian Li, J. & Gius, D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: A unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev.* 23, 311–322 (2004).
105. Shareef, M. M. et al. Role of Tumor Necrosis Factor- α and TRAIL in High-Dose Radiation-Induced Bystander Signaling in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res.* 67, (2007).
106. Jiang, Y. et al. The role of TGF- β 1–miR-21–ROS pathway in bystander responses induced by irradiated non-small-cell lung cancer cells. *Br. J. Cancer* 111, 772–780 (2014).
107. Nagasawa, H., Huo, L. & Little, J. B. Increased bystander mutagenic effect in DNA double-strand break repair-deficient mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 79, 35–41 (2003).
108. Huo, L., Nagasawa, H. & Little, J. B. HPRT mutants induced in bystander cells by very low fluences of alpha particles result primarily from point mutations. *Radiat. Res.* 156, 521–5 (2001).
109. Nagasawa, H. & Little, J. B. Bystander effect for chromosomal aberrations induced in wild-type and repair deficient CHO cells by low fluences of alpha particles. *Mutat. Res.* 508, 121–9 (2002).
110. Mothersill, C., Seymour, R. J. & Seymour, C. B. Bystander effects in repair-deficient cell lines. *Radiat. Res.* 161, 256–263 (2004).
111. Zong, L., Zhu, Y., Liang, R. & Zhao, H.-B. Gap junction mediated miRNA intercellular transfer and gene regulation: A novel mechanism for intercellular genetic communication. *Sci. Rep.* 6, 19884 (2016).
112. Wang, K. et al. Ionizing radiation-induced microRNA expression changes in cultured RGC-5 cells. *Mol. Med. Rep.* 12, 4173–4178 (2015).
113. Spitz, D. R., Azzam, E. I., Li, J. J. & Gius, D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: A unifying concept in stress response biology. *Cancer and Metastasis Reviews* 23, 311–322 (2004).

114. Dickey, J. S., Zemp, F. J., Martin, O. A. & Kovalchuk, O. The role of miRNA in the direct and indirect effects of ionizing radiation. *Radiation and Environmental Biophysics* 50, 491–499 (Springer-Verlag, 2011).
115. Cha, H. J. et al. Identification of specific microRNAs responding to low and high dose γ -irradiation in the human lymphoblast line IM9. *Oncol. Rep.* 22, 863–868 (2009).
116. Sedelnikova, O. A. et al. DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. *Cancer Res.* 67, 4295–4302 (2007).
117. Facoetti, A. et al. Experimental and theoretical analysis of cytokine release for the study of radiation-induced bystander effect. *Int. J. Radiat. Biol.* 85, (2009).
118. Mariotti, L. et al. Effects of ionizing radiation on cell-to-cell communication. *Radiat. Res.* 174, 280–9 (2010).
119. Stewart, R. D., Ratnayake, R. K. & Jennings, K. Microdosimetric model for the induction of cell killing through medium-borne signals. *Radiat. Res.* 165, 460–469 (2006).
120. Amundson, S. a, Bittner, M. & Fornace, A. J. Functional genomics as a window on radiation stress signaling. *Oncogene* 22, 5828–5833 (2003).
121. Snyder, A. R. & Morgan, W. F. Gene expression profiling after irradiation: Clues to understanding acute and persistent responses? *Cancer and Metastasis Reviews* 23, 259–268 (2004).
122. Amundson, S. A. et al. Human in vivo radiation-induced biomarkers: Gene expression changes in radiotherapy patients. *Cancer Res.* 64, 6368–6371 (2004).
123. Webster, G. A. & Perkins, N. D. Transcriptional Cross Talk between NF- κ B and p53. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3485–3495 (1999).
124. Pollack, J. R. et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* 23, 41–46 (1999).
125. Brown, P. O. & Botstein, D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet.* 21, 33–7 (1999).
126. Chee, M. et al. Accessing Genetic Information with High-Density DNA Arrays. *Source Sci. Genome Issue* 274, 610–614 (1996).
127. Wick, I. & Hardiman, G. Biochip platforms as functional genomics tools for drug discovery. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 8, 347–354 (2005).
128. Grunstein, M. & Hogness, D. S. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 3961–5 (1975).
129. Gergen, J. P., Stern, R. H. & Wensink, P. C. Filter replicas and permanent collections of recombinant DNA plasmids. *Nucleic Acids Res.* 7, 2115–2136 (1979).
130. Fodor, S. P. et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251, 767–773 (1991).

131. Lipshutz, R. J. et al. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *BioTechniques* 19, 442–447 (1995).
132. DeRisi, J. et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat. Genet.* 14, 457–460 (1996).
133. DeRisi, J. et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat. Genet.* 14, 457–460 (1996).
134. Ferguson, J. A., Steemers, F. J. & Walt, D. R. High-density fiber-optic DNA random microsphere array. *Anal. Chem.* 72, 5618–5624 (2000).
135. Michael, K. L., Taylor, L. C., Schultz, S. L. & Walt, D. R. Randomly ordered addressable high-density optical sensor arrays. *Anal. Chem.* 70, 1242–1248 (1998).
136. Walt, D. R. Bead-based optical fiber arrays for artificial olfaction. *Current Opinion in Chemical Biology* 14, 767–770 (2010).
137. Van Gelder, R. N. et al. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1663–1667 (1990).
138. Solomon, M. J., Larsen, P. L. & Varshavsky, A. Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: Evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell* 53, 937–947 (1988).
139. Horak, C. E. & Snyder, M. ChIP-chip: A genomic approach for identifying transcription factor binding sites. *Methods in Enzymology* 350, 469–483 (2002).
140. Wang, D. G. et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* (80-.). 280, 1077–1082 (1998).
141. Fan, J.-B. et al. Highly Parallel SNP Genotyping. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 68, 69–78 (2003).
142. Gunderson, K. L. et al. Whole-Genome Genotyping. *Methods in Enzymology* 410, 359–376 (2006).
143. Ball, C. A. & Brazma, A. MGED standards: work in progress. *OMICS* 10, 138–144 (2006).
144. Brazma, A. et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME) - toward standards for microarray data. *Nat. Genet.* 29, 365–371 (2001).
145. Gardina, P. J. et al. Alternative splicing and differential gene expression in colon cancer detected by a whole genome exon array. *BMC Genomics* 7, 325 (2006).
146. Kerr, M. K. & Churchill, G. A. Experimental design for gene expression microarrays. *Biostatistics* 2, 183–201 (2001).
147. Chen, Y., Dougherty, E. R. & Bittner, M. L. Ratio-based decisions and the quantitative analysis of cDNA microarray images. *J. Biomed. Opt.* 2, 364–374 (1997).
148. Yang, Y. H., Buckley, M. J. & Speed, T. P. Analysis of cDNA microarray images. *Brief. Bioinform.* 2, 341–9 (2001).

149. Kooperberg, C., Fazio, T. G., Delrow, J. J. & Tsukiyama, T. Improved background correction for spotted DNA microarrays. *J. Comput. Biol.* 9, 55–66 (2002).
150. Quackenbush, J. Microarray data normalization and transformation. *Nat. Genet.* 32 Suppl, 496–501 (2002).
151. Dudoit, S., Yang, Y. H., Callow, M. J. & Speed, T. P. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. *Stat. Sin.* 12, 111–139 (2002).
152. Gene Ontology Consortium | Gene Ontology Consortium. at <<http://geneontology.org/>>
153. Barrett, T. et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets - Update. *Nucleic Acids Res.* 41, (2013).
154. Edgar, R., Domrachev, M. & Lash, A. E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30, 207–210 (2002).
155. National Center for Biotechnology Information. at <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>
156. Michalopoulos Y. Microarrays. at <http://bioinformatics.biol.uoa.gr/msc/secure/C_SEMES/lesson5/dialexi06/Michalopoulos_Microarrays.pdf>
157. Ghandhi, S. A. et al. RAD9 deficiency enhances radiation induced bystander DNA damage and transcriptomal response. *Radiat. Oncol.* 9, 206 (2014).
158. Kalanxhi, E. & Dahle, J. Transcriptional responses in irradiated and bystander fibroblasts after low dose α -particle radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 88, 713–9 (2012).
159. Ghandhi, S. A., Sinha, A., Markatou, M. & Amundson, S. A. Time-series clustering of gene expression in irradiated and bystander fibroblasts: an application of FBPA clustering. *BMC Genomics* 12, 2 (2011).
160. Kalanxhi, E. & Dahle, J. Genome-Wide Microarray Analysis of Human Fibroblasts in Response to γ Radiation and the Radiation-Induced Bystander Effect. *Radiat. Res.* 177, 35–43 (2012).
161. Ghandhi, S. A., Ming, L., Ivanov, V. N., Hei, T. K. & Amundson, S. A. Regulation of early signaling and gene expression in the alpha-particle and bystander response of IMR-90 human fibroblasts. *BMC Med. Genomics* 3, 31 (2010).
162. Mezentsev, A. & Amundson, S. A. Global gene expression responses to low- or high-dose radiation in a human three-dimensional tissue model. *Radiat. Res.* 175, 677–88 (2011).
163. Iwakawa, M. et al. Expression profiles are different in carbon ion-irradiated normal human fibroblasts and their bystander cells. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 642, 57–67 (2008).
164. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found. Stat. Comput. version 3, 3503 (2016).
165. RStudio. RStudio: Integrated development environment for R. *The Journal of Wildlife Management* 75, (2012).
166. Bioconductor - Home. at <<https://www.bioconductor.org/>>

167. Sean, D. & Meltzer, P. S. GEOquery: A bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics* 23, 1846–1847 (2007).
168. Kolesnikov, N. et al. ArrayExpress update-simplifying data submissions. *Nucleic Acids Res.* 43, D1113–D1116 (2015).
169. Ritchie, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43, e47 (2015).
170. Smith, G. K. limma: Linear Models for Microarray Data. *Bioinforma. Comput. Biol. Solut. Using R Bioconductor* 397–420 (2005). doi:citeulike-article-id:5722720
171. Phipson, B., Lee, S., Majewski, I. J., Alexander, W. S. & Smyth, G. K. Robust hyperparameter estimation protects against hypervariable genes and improves power to detect differential expression. *Ann. Appl. Stat.* 10, 946–963 (2016).
172. Ritchie, M. E. et al. A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* 23, 2700–7 (2007).
173. Yang, Y. & Thorne, N. Normalization for Two-Color cDNA Microarray Data. *Lect. Notes-Monograph Ser.* 40, 403–418 (2003).
174. Shi, W., Oshlack, A. & Smyth, G. K. Optimizing the noise versus bias trade-off for Illumina whole genome expression BeadChips. *Nucleic Acids Res.* 38, (2010).
175. Chatfield, C. Problem solving : a statistician's guide. (Chapman & Hall, 1995).
176. Venables, W. N. & Ripley, B. D. Modern Applied Statistics with \proglang{S}. *World* 53, (2002).
177. Hochberg, Y. & Benjamini, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Source J. R. Stat. Soc. Ser. B J. R. Stat. Soc. Ser. B J. R. Stat. Soc. B* 57, 289–300 (1995).
178. Gray, K. A., Yates, B., Seal, R. L., Wright, M. W. & Bruford, E. A. Genenames.org: the HGNC resources in 2015. *Nucleic Acids Res.* 43, D1079–D1085 (2015).
179. Walker, H. *Studies in the History of the Statistical Method.* (Williams & Wilkins Co, 1931).
180. Hoaglin, D. C. (David C., Mosteller, F. & Tukey, J. W. (John W. Understanding robust and exploratory data analysis. (Wiley, 1983).
181. Gauss, C. F. Bestimmung der Genauigkeit der Beobachtungen. *Zeitschrift für Astron. und verwandte Wissenschaften* 1, 187–197 (1816).
182. Oliveros, J. C. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. *BioinfoGP of CNB-CSIC* <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.ht> (2007). at <<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>>
183. Gu, Z., Eils, R. & Schlesner, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 2022 (2016). doi:10.1093/bioinformatics/btw313

184. Chatziioannou, A. A. & Moulos, P. Exploiting statistical methodologies and controlled vocabularies for prioritized functional analysis of genomic experiments: The StRAnGER web application. *Front. Neurosci.* 5, 8 (2011).
185. Moutselos, K., Maglogiannis, I. & Chatziioannou, A. GOrevenge: A novel generic reverse engineering method for the identification of critical molecular players, through the use of ontologies. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 58, 3522–3527 (2011).
186. Kuleshov, M. V et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 44, W90-7 (2016).
187. Chen, E. Y. et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 14, 128 (2013).
188. Ogata, H. et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research* 27, 29–34 (1999).
189. Lachmann, A. et al. ChEA: Transcription factor regulation inferred from integrating genome-wide ChIP-X experiments. *Bioinformatics* 26, 2438–2444 (2010).
190. Rosenbloom, K. R. et al. ENCODE whole-genome data in the UCSC Genome Browser: Update 2012. *Nucleic Acids Res.* 40, D912–D917 (2012).
191. Lamb, J. et al. The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease. *Science* (80-.). 313, 1929–1935 (2006).