



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

*ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ»*

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ «Θ.ΓΑΡΟΦΑΛΙΔΗΣ»
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΣΜΗΝΗ ΔΟΝΤΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΣΤΗ ΓΟΝΙΑΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ
ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ ΜΕΣΟΔΕΡΜΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ:
ΡΑΒΔΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑ**

**Υπό:
ΒΙΚΤΩΡΙΑΣ ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ
ΦΥΣΙΚΟΘΕΡΑΠΕΥΤΡΙΑΣ**

Επιβλέπων: Γεώργιος Π. Λυρίτης
Ομότιμος Καθηγητής Ορθοπαιδικής ΕΚΠΑ

Αθήνα, Φεβρουάριος 2018



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

*ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ»*

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ «Θ.ΓΑΡΟΦΑΛΙΔΗΣ»
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ : ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΣΜΗΝΗ ΔΟΝΤΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ
ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ ΜΕΣΟΔΕΡΜΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ:
ΡΑΒΔΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑ**

**Υπό:
ΒΙΚΤΩΡΙΑΣ ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ
ΦΥΣΙΚΟΘΕΡΑΠΕΥΤΡΙΑΣ**

Επιβλέπων: Γεώργιος Π. Λυρίτης
Ομότιμος Καθηγητής Ορθοπαιδικής ΕΚΠΑ

Αθήνα, Φεβρουάριος 2018



**NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
MEDICAL SCHOOL
POST-GRADUATE PROGRAM
“METABOLIC BONE DISEASES”**

MASTER THESIS

**GENE EXPRESSION CHROMOSOMAL CORRELATIONS IN
TUMORS OF MESODERMAL ORIGIN: THE CASE OF
RHABDOMYOSARCOMA**

VIKTORIA PAPADIMITRIOU
PHYSICAL THERAPIST

Supervisor: George P. Lyritis
Emeritus Professor of Orthopedic NKUA

Athens, February 2018

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΠΟΥΔΕΣ

Έχω φοιτήσει για δύο χρόνια στο Τμήμα Βιολογίας του ΕΚΠΑ (2009-2011).

ΠΤΥΧΙΟ

Ίδρυμα	ΑΤΕΙ Αθήνας
Τμήμα	Φυσικοθεραπείας
Έτος εγγραφής	2011
Έτος αποφοίτησης	2015
Βαθμός πτυχίου	Άριστα 9,28
Θέμα Πτυχιακής Εργασίας	«Διαγνωστικός υπέρηχος: Αξιολόγηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών του υπερακανθίου μυός στο ισχυρό μέλος ενάντια στο μη ισχυρό.»
Βαθμός Πτυχιακής Εργασίας	Άριστα 10
Πρακτική Άσκηση	Γ.Ν. Ασκληπιείο Βούλας
Βαθμός Πρακτικής Άσκησης	Άριστα 10

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ ΣΤΟ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ MCKENZIE

ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Α΄ Εκπαιδευτική Σειρά: Οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης	7,8,9,10 Απριλίου 2016, Αθήνα
Β΄ Εκπαιδευτική Σειρά: Αυχενική και θωρακική μοίρα της σπονδυλικής στήλης	26,27,28,29 Μαΐου 2016, Αθήνα
Γ΄ Εκπαιδευτική Σειρά: Εξειδίκευση στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και κάτω άκρα	19,20,21,22 Μαΐου 2016, Αθήνα
Δ΄ Εκπαιδευτική Σειρά: Εξειδίκευση στην αυχενική και θωρακική μοίρα της σπονδυλικής στήλης και άνω άκρα	20,21,22,23 Οκτωβρίου 2016, Αθήνα

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Γλώσσα	Πιστοποιητικό
Αγγλικά	University of Central Lancashire Certificate in English (Council of Europe Level B2)

ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ Η/Υ

Πιστοποίηση Η/Υ	ECDL 2014
Πιστοποίηση Η/Υ	ICBU 2014

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Τίτλος Δημοσίευσης	Περιοδικό	Ημερομηνία
Νεότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις στη Μυϊκή Δυστροφία: Γονιδιακή θεραπεία και Νανοςωματίδια.	Α΄ Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών Τόμος 66, Τεύχος 3.	2016
Gene expression chromosomal correlations in tumors of mesodermal origin: the case of Rhabdomyosarcoma and Acute Lymphoblastic Leukemia	IJOER: Engineering Research Journal ,Volume-3,Issue -3, PP:155-160	March,2017

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Τίτλος	Ημερομηνία
21 ^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Φυσικοθεραπείας: «Αναπηρία και σύγχρονη φυσιοθεραπευτική αποκατάσταση. »	25,26,27 Νοεμβρίου 2011
1 ^ο Πανελλήνιο Λεμφολογικό Συνέδριο στο Νοσοκομείο Αττικών	8,9 Ιουνίου 2012
26 ^ο Συνέδριο Φυσικοθεραπείας: «Μειωμένη Λειτουργική Ικανότητα. Φυσικοθεραπευτική Παρέμβαση.»	2,3,4 Νοεμβρίου 2012
22 ^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Φυσικοθεραπείας: «Φυσικοθεραπεία: Σύγχρονες Τάσεις και Προοπτικές»	7,8,9 Δεκεμβρίου 2012
13 ^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Γενετικής «Κυστική Ίνωση. Σύγχρονες Απόψεις και Μελλοντικές Προοπτικές»	20, 21 Απριλίου 2013
27 ^ο Συνέδριο Ελληνικής Επιστημονικής Εταιρείας Φυσικοθεραπείας: «Η συμβολή της τεχνολογίας στην αναβάθμιση της ποιότητας ζωής των παιδιών με νευροαναπτυξιακές διαταραχές»	5,6 Οκτωβρίου 2013
23 ^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Φυσικοθεραπείας: «Εφαρμοσμένη μυοσκελετική φυσικοθεραπεία: επιστημονική τεκμηρίωση ή προσωπική άποψη;»	22,23,24 Νοεμβρίου 2013
Κλινικό φροντιστήριο με θέμα Εφαρμογή Μη Επεμβατικού Αερισμού στη ΜΕΘ του Νοσοκομείου Αττικών	16 Ιανουαρίου 2014
10 ^ο Ετήσιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής	15,16 Μαρτίου 2014
7 ^ο Εντατικό Σεμινάριο στην Εφηβική Ιατρική	4,5 Απριλίου 2014
«Μέθοδος Pilates-κλινικές εφαρμογές» Εργαστηριακό Σεμινάριο ΕΕΕΦ	27,28 Σεπτεμβρίου 2014
24 ^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Φυσικοθεραπείας: «Επανεκκίνηση. Διεθνείς Κατευθυντήριες Οδηγίες. Μια σύγχρονη διεπιστημονική προσέγγιση.»	5,6,7 Δεκεμβρίου 2014
3 ^η Επιστημονική Ημερίδα: «Μέθοδοι παρέμβασης στις νευροαναπτυξιακές διαταραχές» Ε.Ε.Θ.Ι.Ι.Ε.	18 Ιανουαρίου 2015
25 ^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Φυσικοθεραπείας: «αξιολογείν, επιλέγειν, εκτελείν»	22,23,24 Ιανουαρίου 2016

Αναθεωρήσεις στη διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση των Μεταβολικών Νοσημάτων των Οστών ΕΛΙΟΣ International Osteoporosis Foundation	13,14 Φεβρουαρίου 2016
International Spine Master Course NHS Ελληνική Εταιρεία Ορθοπαιδικής Χειρουργικής και Τραυματολογίας Ε.Ε.Χ.Ο.Τ Cambridge University Hospitals	9,10,11,12 Ιουνίου 2016
Ειδικά θέματα στα Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών ΕΛΙΟΣ (Ελληνικό Ίδρυμα Οστεοπόρωσης)	11 Ιουνίου 2016
Ημερίδα φροντίδα της γυναίκας κατά την κλιμακτήριο και την εμμηνόπαυση	3 Δεκεμβρίου 2016
Πρακτικά ερωτήματα για τη διάγνωση και αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης ΕΛΙΟΣ (Ελληνικό Ίδρυμα Οστεοπόρωσης)	18,19 Φεβρουαρίου 2017

Συμμετείχα εθελοντικά και προσέφερα τη βοήθεια μου στην διεξαγωγή της Ενημερωτικής Ημερίδας του Συλλόγου Ατόμων με Σκλήρυνση Κατά Πλάκας που πραγματοποιήθηκε στο αμφιθέατρο του Πολεμικού Μουσείου, στην Αθήνα στις 15 Μαρτίου 2015.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον Ομότιμο Καθηγητή Ορθοπαιδικής, κύριο Γεώργιο Λυρίτη και την Διευθύντρια του Ερευνητικού Εργαστηρίου και του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών Καθηγήτρια κυρία Ισμήνη- Νίκη Δοντά. Ευχαριστώ θερμά τον κύριο Γεώργιο Λάμπρου για την επιστημονική του καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη του.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	IV
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	VIII
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	IX
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	XI
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	XIII
ΜΕΡΟΣ Ι-ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1-Η ΑΝΑΓΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΜΕ ΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ.....	2
1.1. ΘΕΩΡΙΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΣΑΦΗΝΙΣΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ.....	4
1.2. ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ ΠΑΙΔΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΚΟΙΝΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ	5
1.2.1. ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΡΑΒΔΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑ.....	6
1.2.2. ΚΟΙΝΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ALL ΚΑΙ RMS	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2-<i>IN VITRO</i> ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΚΟΙΝΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ.....	10
ΜΕΡΟΣ ΙΙ-ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3- ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ.....	15
3.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	16
3.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ	17
3.3. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	17
3.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ	18
3.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA	18
3.6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4-ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ	24
4.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ	24
4.2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	24
4.3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΡΟ-ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΘΟΡΥΒΟΥ	24
4.4. ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ	25
4.5. ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΑ	27
4.6. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ/ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	27
4.7. ΑΝΑΛΥΣΗ	28
4.8. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΙΚΑ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ (DEGs).....	28
4.9. ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ	28
4.10. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ	28
4.11. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ (TRANSCRIPTION FACTOR BINDING MOTIFS (TFBMS))	29
4.12. ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ (GENE ONTOLOGY (GO)).....	29
4.13. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ	29
4.14. ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	30
ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	32
5.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ, ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ, ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.	32
5.2. ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ, ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ.....	35
5.3. ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ	39
5.4. ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΟΛΑ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΜΕΤΑ ΤΟ ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΑ	41
5.5. ΚΟΙΝΑ DEGs ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΚΑΝΑΛΙ ΞΕΧΩΡΙΣΤΑ	42
5.6. DEGs ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	43

5.7. ΚΟΙΝΑ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΚΑΝΑΛΙ ΞΕΧΩΡΙΣΤΑ ΚΑΙ Η ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	43
5.8. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ..	45
5.9. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΟΝΤΟΛΟΓΙΑ (GO)	47
5.10. TFBMs	55
5.11. BIONETWORK ANALYSIS.....	59
5.12. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6-ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΕΙΣ	61
ΜΕΡΟΣ IV-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7-ΤΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΑ ΚΟΙΝΩΣ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	65
7.1. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΥΤΟΚΙΝΗΣ / ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΚΥΤΟΚΙΝΗΣ	65
7.2. ΟΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ECM-ΥΠΟΔΟΧΕΑ.....	66
7.3. ΕΣΤΙΑΚΗ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ	66
7.4. ΤΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ JAK-STAT/MAPK	67
7.5. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	68
7.6. ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΤΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ JAK-STAT/MAPK ΚΑΙ TGF-B.....	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8- ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΕΠΙ ΤΩΝ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΕΩΝ ΤΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ ...	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	74
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	75
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	84

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Κανονικοποίηση των δεδομένων μικροσυστοιχιών. (A) MA- plot με ισχυρή loess κανονικοποίηση. Rank κανονικοποίηση για τα (B) Cy5 και (C) Cy3 κανάλια. (D) Ένα box-plot των δύο καναλιών φανερώνει ότι η κανονικοποίηση έχει εξαλείψει τη διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων. ^[1, 3]	26
Εικόνα 2. Ανάλυση των χαρακτηριστικών των κυτταρικών σειρών CCRF-CEM και TE-671 όπως εκδηλώνεται από τη κυτταρομετρία ροής στην καμπύλη διασποράς (contour plot) (A, B) αντίστοιχα, forward (C) και side scatters (D) και η μορφολογία τους στο μικροσκόπιο (E, F) αντίστοιχα. ^[1, 3]	33
Εικόνα 3. Η κατανομή του κυτταρικού κύκλου CCRF-CEM (A, C) και TE-671 (B, D). Τα πειράματα εκτελούνται εις διπλούν. Τα δεδομένα παρουσιάζονται από ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα. Και οι δύο τύποι κυττάρων έχουν καλλιεργηθεί σε χρόνο 24h και μετρώνται σε 0h και κάθε 24h στη συνέχεια. Και οι δύο τύποι κυττάρων εισέρχονται στην S-φάση σε 0h με μία ταχεία μείωση στις 24 ώρες και σταδιακή αύξηση στη συνέχεια. Στη G1-φάση εκδηλώνεται επίσης μια σταδιακή μείωση από τις 24h έως τις 72h. Τέλος, υπάρχει μια μικρή διακύμανση στην G2-φάση με την πάροδο του χρόνου. ^[1, 3]	34
Εικόνα 4. Η κατανομή του κυτταρικού κύκλου σε σχέση με το χρόνο για τις κυτταρικές σειρές (A) CCRF-CEM και (B) TE-671. Η απόπτωση ήταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα για τις κυτταρικές σειρές (C) CCRF-CEM και (D) TE671 κυτταρικές σειρές. ^[1, 3]	34
Εικόνα 5. Αναπαράσταση των κανονικοποιημένων δεδομένων μικροσυστοιχίας, με τη μορφή διαγραμμάτων διασποράς (scatter plots) (A), (E), M-A plots για όλα τα γονίδια στις δύο πλατφόρμες (B), (F), M-A plots για τα σημασμένα γονίδια, δηλαδή εκείνα που πέρασαν το κριτήριο φιλτραρίσματος SNR (C), (G) και εξαρτώμενα της έντασης Z-scores (D) και (H) IntelliGene 4.8k chip και IMT 9.6k chip αντίστοιχα. ^[1, 3]	36
Εικόνα 6. Rank invariant κανονικοποίηση του συνόλου των δεδομένων μικροσυστοιχίας σε σύγκριση με διάφορες παραλλαγές, δηλαδή με και χωρίς διόρθωση του θορύβου. Τα κοινά γονίδια παρουσιάζονται στην (A, B και στη D, E, F) η κανονικοποίηση του συνόλου των δεδομένων παρουσιάζεται με τις διακεκομμένες γραμμές για το βαθμό έκφρασης. Στην (G, H, I, J) οι κατανομές γονιδιακών συχνοτήτων παρουσιάζονται με ή χωρίς διόρθωση του θορύβου και με ή χωρίς rank invariant κανονικοποίηση. ^[1, 3]	37
Εικόνα 7. Δεδομένα μικροσυστοιχίας για το κάθε κανάλι (A), των αναλογιών γονιδίου (B) και κοινά DEGs για τα κανάλια μεμονωμένα και των αναλογιών (C). DE: διαφορεικά εκφραζόμενα. ^[1-3]	38
Εικόνα 8. Χρωμοσωμικές κατανομές των γνωστών γονιδίων και των προβλεπόμενων TFBMs. Όλα τα διαφορεικά εκφραζόμενα γονίδια χαρτογραφήθηκαν στα χρωμοσώματα (A), ενώ η διάμεσος της γονιδιακής έκφρασης χαρτογραφήθηκε χωριστά για κάθε κυτταρικό τύπο με βάση τα επίπεδα έκφρασης (που ορίζεται ως η δραστηριότητα του γονιδίου) (B). Οι προβλεπόμενοι TFBMs χαρτογραφήθηκαν στα χρωμοσώματα για να βρεθεί η κατανομή τους (C, D, E, και F) θερμικός χάρτης της γονιδιακής έκφρασης με βάση την χρωμοσωμική κατανομή έγινε για την ανίχνευση χρωμοσωμικών περιοχών που είναι μεταγραφικά δραστικές (G). ^[1, 3]	40
Εικόνα 9. (A) Χρωμοσωμική έκφραση όλων των γονιδίων και (B) ξεχωριστά για κάθε κανάλι (Cy3 και Cy5). ^[1, 3]	41
Εικόνα 10. Μέση γονιδιακή έκφραση στο κάθε χρωμόσωμα υπολογιζόμενη με το λόγο Cy5/Cy3. ^[1, 3]	42
Εικόνα 11. (A) Χρωμοσωμική κατανομή και (B) έκφραση των DEGs, ξεχωριστά για κάθε κανάλι (Cy3 and Cy5). DE: διαφορεικά εκφραζόμενα. ^[1-3]	42

Εικόνα 12. Χρωμοσωμική γονιδιακή έκφραση (Α) DEGs και (Β) μέση τιμή του λόγου Cy5/Cy3της γονιδιακής έκφρασης. DE, διαφορεικά εκφραζόμενα. ^[1-3]	43
Εικόνα 13. Χρωμοσωμική κατανομή των (Α) κοινών εκφραζόμενων γονιδίων (<i>non-significant genes</i>), (Β) με μέση τιμή της γονιδιακής έκφρασης για κάθε κανάλι ξεχωριστά και (C) γονιδιακές αναλογίες. ^[1-3]	44
Εικόνα 14. Παλινδρομήσεις των χρωμοσωμικών κατανομών (Α) καμπύλη παλινδρόμησης των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων(<i>non-significant genes</i>), με Cy3 και κοινών γονιδίων(<i>non-significant genes</i>), με Cy5 (Β) Καμπύλη παλινδρόμησης των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων με Cy3 και του αριθμού των γονιδίων ανά χρωμόσωμα. (C) Καμπύλη παλινδρόμησης των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων με Cy5 και του αριθμού των γονιδίων ανά χρωμόσωμα. (D) Καμπύλη παλινδρόμησης των αναλογιών των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων και του αριθμού των γονιδίων ανά χρωμόσωμα. (E) 3D παλινδρομήσεις του μέσου όρου του αριθμού των γονιδίων Cy5 και Cy3. (F) 3D παλινδρομήσεις του αριθμού των DEGs, ο μέσος όρος των εντάσεων Cy5 και Cy3. (G) 3D παλινδρομήσεις του αριθμού των κοινών γονιδίων , ο μέσος όρος των εντάσεων Cy5 και Cy3 των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων. (H) 3D παλινδρομήσεις των αναλογιών των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων, ο μέσος όρος των εντάσεων Cy5 και Cy3 των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων. ^[1-3]	46
Εικόνα 15. Γονιδιακή Οντολογία (GO). Αποτελέσματα: βιολογική διαδικασία (Α) , κυτταρική διαμερισματοποίηση (Β) , μοριακή λειτουργία (C) για τις πλατφόρμες TAKARA και IMT. Μεταγενέστερη εστίαση πάνω στην κυτταρική διαδικασία έδωσε αποτελέσματα οντολογίας για υποδοχέα/δέσμευση υποδοχέα (D-F) , κυτταρική επικοινωνία/διακυτταρική σηματοδότηση (G-I) , κυτταρικός κύκλος (J-L) , κυτταρική διαφοροποίηση/ανάπτυξη/εμβρυϊκή διαδικασία (M-O) . Η ομαδοποίηση των γονιδιακών λειτουργιών παρουσιάζονται στις (P-R) , όπως αποκαλύπτεται από το εργαλείο ανάλυσης webgestalt. ^[1-3]	54
Εικόνα 16. GO προβλέψεις για (Α) DEGs και (Β) κοινά εκφραζόμενα γονίδια (<i>non-significant</i>). ^[1-3]	55
Εικόνα 17. TFs των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων. Έμφαση δόθηκε στα STAT, GR και NF-κB. ^[1]	57
Εικόνα 18. TFBM ανάλυση των (Α) κοινών DEGs όπως επίσης και των (Β και C) κοινών εκφραζόμενων γονιδίων. DE: διαφορεικά εκφραζόμενα. ^[1-3]	58
Εικόνα 19. Πρόβλεψη των μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν τα κοινά εκφραζόμενα γονίδια. Οι αριθμοί πάνω στις ράβδους υποδηλώνουν τον αριθμό των γονιδίων που βρέθηκαν σε κάθε μονοπάτι με διάστημα εμπιστοσύνης 99%. ^[1-3]	60
Εικόνα 20. Παλινδρομήσεις των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των κυττάρων CCRF-CEM και TE-671, σε σχέση με τη χρωμοσωμική έκφραση. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις υπάρχουν για τα χρωμοσώματα 1 (Α) , 3 (Β) , 8 (C) , 13 (D) , 14 (E) , 15 (F) , 16 (G) , 17 (H) , 21 (I) , 22 (J) και X (K) . ^[97]	62
Εικόνα 21. 3D παλινδρομήσεις των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των κυττάρων CCRF-CEM και TE-671 και του αντίστοιχου μετασχηματισμένου με log2 λόγου τους σε σχέση με την χρωμοσωμική έκφραση. Στατιστικά σημαντικές σχέσεις υπήρξαν για χρωμοσώματα 1 (Α) με ιδανική (<i>biharmonic</i>) συνάρτηση, 1 (Β) με γραμμική συνάρτηση, 7 (C) , 9 (D) , 10 (E) , 11 (F) , 13 (G) , 21 (H) και X (I) . ^[97]	63

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη σημερινή εποχή, ο συνεχής αγώνας στη μάχη κατά του καρκίνου καθιστά απαραίτητη την κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την ογκογένεση, ώστε να ανακαλυφθούν περισσότερα εξειδικευμένα και πιο αποτελεσματικά φάρμακα, με όσο το δυνατόν μικρότερο κόστος. Στην παρούσα έρευνα θα χρησιμοποιήσουμε τα μαθηματικά και τη φυσική για την ανάλυση των βιολογικών φαινομένων. Θα παρουσιάσουμε μία υπολογιστική και συστημική προσέγγιση μελετώντας τους κοινούς μηχανισμούς μεταξύ δύο νεοπλασιών της παιδικής ηλικίας μεσοδερμικής προέλευσης, της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και του ραβδομυοσάρκωματος. Με τη χρήση των μεθόδων υψηλής απόδοσης, όπως οι μικροσυστοιχίες, θα πάρουμε πληροφορίες σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης και θα προσπαθήσουμε να διερευνήσουμε την κοινή γονιδιακή ρύθμιση με βάση τις χρωμοσωμικές συσχετίσεις. Με την διερεύνηση των πιθανών κοινών ρυθμιστικών μηχανισμών, ίσως μπορέσουμε να κατανοήσουμε τα αίτια της ογκογένεσης και το ρόλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων.

Τα πειράματα, που αναφέρονται στην παρούσα εργασία, διεξήχθησαν στο Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο. Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές CCRF-CEM (Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ), Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)) και TE-671 (Ραβδομυοσάρκωμα (ΡΜΣ), Rhabdomyosarcoma (RMS)) ως πειραματικό μοντέλο. Τα κοινά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων διερευνήθηκαν με τη χρήση μικροσυστοιχιών. Ο απώτερος στόχος ήταν να βρεθούν αιτιακές σχέσεις μεταξύ των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης σε σχέση με τη χρωμοσωμική θέση.

Χρησιμοποιώντας ανάλυση παλινδρόμησης διαπιστώσαμε ότι αρκετά γονίδια εκφράζουν σημαντικές σχέσεις. Αυτός ο τύπος ανάλυσης μπορεί να συμβάλλει στην κατανόηση των κοινών μηχανισμών που μετατρέπουν τα φυσιολογικά κύτταρα σε κακοήγη. Επίσης αποκαλύπτεται ένας νέος ολιστικός τρόπος κατανόησης της δυναμικής εμφάνισης του όγκου καθώς και το πώς λειτουργούν οι ογκογόνοι μηχανισμοί.

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας είναι κλινικά χρήσιμα για την πρόβλεψη γονιδιωματικών στόχων που θα μπορούσαν να μελετηθούν περαιτέρω προκειμένου να ανακαλυφθούν οι μηχανισμοί δημιουργίας και εξέλιξης του όγκου, καθώς συμβάλλουν και στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Λέξεις κλειδιά- Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία, Χρωμοσωμικές συσχετίσεις, Μεσόδερμα, Μικροσυστοιχίες, Ραβδομυοσάρκωμα

ABSTRACT

At the present, the constant struggle in the fight against cancer makes it necessary to understand the mechanisms that dominate on tumorigenesis in order to discover more specialized and more effective drugs at as low a cost as possible. In this research we will use mathematical and physical approaches, in order to analyze complex biological phenomena. We will present a computational and systemic approach by studying the common mechanisms between two childhood neoplasms of mesodermal origin i.e. Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) and Rhabdomyosarcoma (RMS). Using high-efficiency methods, such as microarrays, we will get information at the level of gene expression and try to investigate common gene regulation based on chromosomal correlations. By exploring possible common regulatory mechanisms, we may be able to understand the causes of oncogenesis and the role of cancer stem cells.

The experiments were conducted at Choremio Research Laboratory. The CCRF-CEM (T cell ALL) and TE-671 (RMS of medulloblastic origin) were used as an experimental model. Using microarrays we have discovered the common patterns of gene expression between the two cell types. Our target was to attempt to find causal relations between gene expression levels with respect to chromosomal location.

Using regression analysis, we found that several genes manifested significant relations. This type of analysis can help to understand the common mechanisms that transform normal cells into malignant. It also reveals a new holistic way of understanding the tumor dynamics as well as the *mechanics* of oncogenic drivers.

The results of this research are clinically useful for predicting genomic targets that could be further studied in order to discover the mechanics of tumor creation and progression and will contribute to the discovery of new therapeutic approaches.

Keywords- Acute Lymphoblastic Leukemia, Chromosomal correlations, Mesoderm, Microarrays, Rhabdomyosarcoma

ΜΕΡΟΣ Ι-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1-Η ΑΝΑΓΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΜΕ ΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ

Τα βιολογικά συστήματα είναι ένας σχετικά νέος κλάδος, όπου τα μαθηματικά και η φυσική συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση των βιολογικών φαινομένων. Με την παλαιότερη αναφορά του *Henri Poincaré*: «...η ζωή είναι μια σχέση μεταξύ των μορίων και όχι μια ιδιότητα του κάθε μορίου...» αποδεικνύεται η ανάγκη περιγραφής των βιολογικών φαινομένων με μία συστημική προσέγγιση.^[1-4] Οι βιολογικές επιστήμες θα μπορούσαν να ωφεληθούν σε μεγάλο βαθμό από την ενσωμάτωση της γνώσης των μαθηματικών και του κλάδου της μηχανικής. Η βιολογία ασχολείται με πολύ περίπλοκα φαινόμενα, όπως η εμβρυογένεση, η νευροφυσιολογία, η ογκογένεση και άλλα. Η ογκογένεση είναι ζωτικής σημασίας όχι μόνο από βιολογικής απόψεως, αλλά και από τη σκοπιά της νόσου. Οι όγκοι θεωρούνται θανατηφόροι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων και στερούν την ποιότητα ζωής του ατόμου που προσβάλλεται από τη νόσο. Παρά τις ερευνητικές προσπάθειες που γίνονται κυρίως στον τομέα των μηχανισμών που διέπουν την ασθένεια αυτή, εξακολουθούν σε μεγάλο βαθμό οι μηχανισμοί να παραμένουν άγνωστοι. Εκτός από τα βιολογικά φαινόμενα τα οποία είναι υπό έρευνα, γίνονται μελέτες για αρκετές πολύ σημαντικές πτυχές της κοινωνικής ζωής, που επηρεάζονται. Ο καρκίνος δεν κάνει διακρίσεις μεταξύ της ηλικίας, του φύλου ή της φυλής. Εκτός από την επιζήμια επίπτωση που προκαλεί η ασθένεια αυτή στην υγεία, έχει επίσης μεγάλη επίδραση στην ποιότητα ζωής των ατόμων που προσβάλλονται από αυτήν. Για παράδειγμα, οι περισσότεροι άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο από τη στεφανιαία νόσο, παρά από τον καρκίνο, αλλά η τελευταία θεωρείται πιο σοβαρή λόγω της αργής εξέλιξης, του πόνου που προκαλεί στο ανθρώπινο σώμα και της επιδεινούμενης πορείας που έχει. Ίσως το πιο σημαντικό μέλημα της σύγχρονης ζωής είναι το εύρος και η ποιότητα των υπηρεσιών υγείας, ενώ την ίδια στιγμή υπάρχει μια μεγάλη συζήτηση σχετικά με τη φύση των παρεχόμενων υπηρεσιών υγείας δηλαδή δημόσιες ή ιδιωτικές. Ένα από τα μεγάλα βάρη των υπηρεσιών υγείας είναι η χορήγηση του φαρμάκου. Η χημειοθεραπεία αποτελεί το κύριο όπλο κατά της νόσου. Μια άλλη σημαντική πτυχή είναι η θεραπεία. Οι θεραπείες για τον καρκίνο είναι εξαιρετικά ακριβές, τόσο για τον ασθενή, όσο και για τον πάροχο υγείας. Από την άποψη του δυτικού κόσμου, η ιδιωτική ή η δημόσια ασφάλεια υγείας μπορεί να αντέξει οικονομικά το κόστος της θεραπείας του καρκίνου. Ωστόσο, αν δούμε τα πράγματα από την άποψη των αναπτυσσόμενων χωρών ή των υπανάπτυκτων χωρών, η θεραπεία του καρκίνου δεν μπορεί ακόμη να θεωρηθεί ως επιλογή στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. Το υψηλό κόστος των θεραπειών κατά του καρκίνου οφείλεται στην διαδικασία ανάπτυξης των φαρμάκων, η οποία απαιτεί σχεδόν 10 χρόνια έρευνας και περίπου 800 εκατομμύρια δολάρια για να φτάσει ένα φάρμακο στην αγορά. Οι περισσότερες από τις προσπάθειες για την ανακάλυψη φαρμάκων βασίζονται κυρίως στη μέθοδο της δοκιμής και του λάθους. Αυτό οφείλεται στην έλλειψη γνώσεων σχετικά με τους μηχανισμούς που διέπουν την ασθένεια. Ωστόσο, τα κλασικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα είναι σήμερα προσιτά αφού για τα περισσότερα φάρμακα έχουν λήξει τα δικαιώματα ευρεσιτεχνίας. Ωστόσο, το πρόβλημα με την

κλασική θεραπεία είναι οι παρενέργειες. Δυστυχώς, η αποτελεσματικότητα συνοδεύεται από μη ειδικότητα. Τα κλασικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα δεν κάνουν διακρίσεις μεταξύ υγιών και νοσούντων κυττάρων. Βασίζονται στο γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι πιο δραστήρια, μεταβολικά και μεταγραφικά, ειδικά στο επίπεδο της κυτταρικής σηματοδότησης. Αν φανταστούμε, το καλύτερο σενάριο όπου η ογκογένεση είναι κατανοητή, τουλάχιστον εν μέρει, τότε ο σχεδιασμός φαρμάκων, η αποτελεσματικότητα και οι παρενέργειες θα μπορούσαν να επιλυθούν με την απλή μοντελοποίηση του συστήματος. Αυτό θα μείωνε δραματικά το κόστος των φαρμάκων με θετικές συνέπειες όχι μόνο για τη θεραπεία, αλλά και για το κοινωνικό επίπεδο. Νέα φάρμακα θα γίνονταν πολύ πιο προσιτά, με αποτέλεσμα, την θεραπεία και τη βελτίωση της ζωής των περισσότερων ανθρώπων. Ως εκ τούτου, όταν πρόκειται για τα βιολογικά συστήματα και τον καρκίνο προκύπτει το ερώτημα: Πώς μπορούν τα βιολογικά συστήματα να συμβάλουν στη βελτίωση των θεραπειών και να βοηθήσουν στη διατήρηση της ποιότητας ζωής του ασθενούς; Δεν υπάρχει απλή απάντηση σε αυτό. Η θεωρία των βιολογικών συστημάτων εμφανίστηκε στα μέσα της δεκαετίας του '60 και από τότε έχουν γίνει προσπάθειες για τη μοντελοποίηση των βιολογικών συστημάτων. Μέσα από την αλληλεπίδραση της βιολογίας με τους κλάδους των μαθηματικών και της μηχανικής θα μελετήσουμε τα βιολογικά συστήματα. Με άλλα λόγια, η καλύτερη κατανόηση της βιολογίας μπορεί να επιτευχθεί μέσω της προόδου της υπολογιστικής και της συστημικής βιολογίας. Μέχρι πρόσφατα, η βιολογία κατά κάποιο τρόπο περιοριζόταν στη μελέτη μερικών παραγόντων ταυτόχρονα. Με την τεχνολογική πρόοδο, μέσω της εφαρμογής των μεθόδων υψηλής απόδοσης, όπως μικροσυστοιχίες και βαθιάς αλληλουχοποίησης, κατέστη δυνατή η μαζική παραγωγή δεδομένων. Αυτό μας έδωσε τη δυνατότητα να εξετάσουμε πολλαπλούς παράγοντες ταυτόχρονα, φέρνοντας πιο κοντά ένα περισσότερο προσανατολισμένο σύστημα ανάλυσης των βιολογικών φαινομένων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, για να βελτιωθεί μια συγκεκριμένη κατάσταση, πρέπει πρώτα να κατανοήσουμε τους κανόνες που διέπουν το σύστημα. Ακριβώς αυτό κάνουν τα βιολογικά συστήματα, δηλαδή, προσπαθούν να κατανοήσουν και να καθορίσουν τους κανόνες που διέπουν τα βιολογικά φαινόμενα. Στην περίπτωση των φαρμάκων χημειοθεραπείας, θα μπορούσαν να ακολουθηθούν δύο οδοί. Η πρώτη θα ήταν να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς που οδηγούν σε μια ασθένεια, δηλαδή τους παθογενετικούς μηχανισμούς, και να παρέμβουμε σε αυτούς, με τέτοιο τρόπο ώστε να διορθώσουμε τα «λάθη» σε επίπεδο κυτταρικής λειτουργίας ή ακόμα καλύτερα, να εξαλείψουμε τα νοσούντα κύτταρα στην περίπτωση του καρκίνου. Η δεύτερη οδός θα είναι η ανάπτυξη νέων ή η βελτίωση των υφιστάμενων φαρμάκων σε συγκεκριμένη ασθένεια. Στην περίπτωση της θεραπείας του καρκίνου θα μπορούσε να υπάρξει μια βελτίωση των κλασικών θεραπειών, δεδομένου ότι αυτές είναι ήδη διαθέσιμες και ως εκ τούτου θα ήταν πιο εφικτό οικονομικά, σε αντίθεση με την επικέντρωση αποκλειστικά στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων για τη θεραπεία, η οποία είναι αναμφίβολη και είναι μία εξαιρετικά ακριβή και χρονοβόρα διαδικασία. Με την τεχνολογία αλληλουχοποίησης επόμενης γενιάς, μας δίνεται η δυνατότητα να βρούμε το ρόλο που παίζουν οι μεταλλάξεις στα ογκογενετικά μονοπάτια. Προηγούμενες μελέτες έχουν τονίσει ότι, από τη μία πλευρά, η παρουσία των μεταλλάξεων είναι

απαραίτητη προϋπόθεση για την ογκογένεση, και από την άλλη πλευρά, ορισμένες από αυτές τις μεταλλάξεις απαιτούνται για την εμφάνιση νεοπλασιών.^[5-9] Ειδικότερα, υπάρχει μια προσπάθεια σύνδεσης των μεταλλάξεων που ανακαλύπτονται με τη γονιδιακή έκφραση στα δείγματα του όγκου. Σε αυτό το σημείο, θα μπορούσαμε να προσθέσουμε ότι η ύπαρξη μιας ή περισσότερων μεταλλάξεων, δεν είναι ίσως η αιτία για το σχηματισμό ενός όγκου, λόγω του γεγονότος ότι η ύπαρξη μεταλλάξεων αυτή καθ' εαυτή, δεν σημαίνει τίποτα εάν ο ίδιος ο μηχανισμός δεν υπάρχει.^[2]

Στην παρούσα μελέτη θα αναλύσουμε τα βήματα που θα ακολουθήσουμε για να κατανοήσουμε τα αίτια της ογκογένεσης. Θα παρέχουμε χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την υπολογιστική ροή των εργασιών που θα μπορούσε να βοηθήσει στη διερεύνηση της διαδικασίας εξέλιξης του όγκου σε μικρή κλίμακα, και θα παρουσιάσουμε αυτή την προσέγγιση μέσα από ένα παράδειγμα μελέτης δύο διαφορετικών, αλλά καταστροφικών παρ' όλα αυτά, νεοπλασιών της παιδικής ηλικίας. Μια τέτοια προσέγγιση θα μπορούσε να βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τον κακοήγη μετασχηματισμό και ως συνέπεια έχουν άμεσες επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία και πρακτικά στην ποιότητα ζωής. Πιο συγκεκριμένα, θα παρουσιάσουμε μια υπολογιστική και συστημική προσέγγιση της βιολογίας με την μελέτη των κοινών μηχανισμών μεταξύ δύο νεοπλασιών της παιδικής ηλικίας, της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και του ραβδομυοσάρκωματος. Η παιδική λευχαιμία είναι η πιο κοινή μορφή παιδικής κακοήθειας, από την άλλη πλευρά το ραβδομυοσάρκωμα είναι ένας σπάνιος τύπος κακοήθειας, που ανήκει στην οικογένεια των πρωτόγονων νευροεξωδερμικών όγκων. Γνωρίζουμε ότι οι όγκοι έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, όχι μόνο ανάμεσα σε διαφορετικούς τύπους κακοήθειας, αλλά και μεταξύ δύο ασθενών που έχουν προσβληθεί από τον ίδιο τύπο του όγκου. Παρόλα αυτά, υπάρχουν αρκετά στοιχεία που να δείχνουν ότι οι όγκοι μπορεί να έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά τα οποία, όταν ανακαλυφθούν, θα οδηγήσουν σε: α) πιο αποτελεσματική θεραπεία, β) σε καλύτερη κατανόηση της προέλευσης της ογκογένεσης και γ) στην ανακάλυψη των βιοδεικτών του όγκου.

1.1. ΘΕΩΡΙΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΣΑΦΗΝΙΣΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ

Όσον αφορά την ογκογένεση του καρκίνου, η διασύνδεση χιλιάδων παραγόντων που δρουν ταυτόχρονα οδηγεί στον κακοήγη φαινότυπο.^[2] Πολλές θεωρίες έχουν προταθεί για την εμφάνιση των όγκων, η πιο σημαντική από τις οποίες είναι η συσσώρευση μεταλλάξεων σε όλη την διάρκεια της ζωής των ατόμων, αλλά έχουν προταθεί και άλλες εξίσου σημαντικές θεωρίες, όπως η πολυσταδιακή θεωρία της ογκογένεσης.^[10-12] Ωστόσο, στις νεοπλασίες της παιδικής ηλικίας αυτές οι θεωρίες/μοντέλα δεν μπορούν να εφαρμοστούν άμεσα, καθώς ο χρόνος που έχει παρέλθει από την έκθεση στην μεταλλαξογένεση δεν είναι επαρκής για να εξηγήσει την εμφάνιση του καρκίνου.^[2] Υπάρχουν αρκετές υποθέσεις σχετικά με τις νεοπλασίες της παιδικής ηλικίας, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της παιδικής λευχαιμίας προτείνεται ότι κυτταρογενετικές ανωμαλίες μπορεί να παίζουν ρόλο στην εκδήλωση της κακοήθειας. Άλλη ενδιαφέρουσα θεωρία είναι ότι οι όγκοι

συνδέονται άμεσα με την εκβιομηχάνιση της σύγχρονης ζωής και έχει προταθεί ότι ο καρκίνος δεν είναι πραγματικά μια ασθένεια αλλά μια εξελικτική προσαρμογή των κυττάρων, προκειμένου να επιβιώσουν σε ορισμένες περιβαλλοντικές αλλαγές/απειλές. Η προέλευση και η αιτιολογία του καρκίνου εξακολουθούν να βρίσκονται υπό διερεύνηση. Συνεπώς, είναι προφανές ότι, προκειμένου να είμαστε σε θέση να βελτιώσουμε μια συγκεκριμένη κατάσταση, πρέπει να κατανοήσουμε το φαινόμενο, δηλαδή να κατανοήσουμε τους κανόνες που διέπουν το σύστημα. Με τα βιολογικά συστήματα κατανοούμε και καθορίζουμε τους κανόνες που διέπουν τα βιολογικά φαινόμενα, για την επίτευξη αυτού του σκοπού προτείνονται δύο οδοί. Η πρώτη οδός είναι να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς που οδηγούν στη νόσο, δηλαδή των παθογενετικών μηχανισμών και να παρέμβουμε με τέτοιο τρόπο ώστε να προσπαθήσουμε να διορθώσουμε τα «λάθη» στην κυτταρική λειτουργία ή ακόμα καλύτερα να εξαλείψουμε τα νοσούντα κύτταρα στην περίπτωση του καρκίνου. Αυτή η οδός μπορεί να διαιρεθεί περαιτέρω σε δύο υποκατηγορίες: α) στην ανακάλυψη των διαφορών μεταξύ των υποτύπων των όγκων ή των διαφορών στις αντιδράσεις των κυττάρων όγκων σε ειδικές επεξεργασίες, μία από τις κύριες προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα, και β) στην ανακάλυψη των κοινών χαρακτηριστικών μεταξύ των διαφόρων τύπων όγκων, όχι μόνο μεταξύ των υποτύπων της ίδιας οικογένειας όγκων, αλλά και μεταξύ διαφόρων τύπων, τόσο ιστολογικά όσο και φαινοτυπικά, μια προσέγγιση που συχνά δεν αναφέρεται στη βιβλιογραφία.^[2] Η δεύτερη οδός είναι η ανάπτυξη νέων φαρμάκων σε συγκεκριμένη ασθένεια ή η βελτίωση των ήδη υπαρχόντων. Πιστεύουμε ότι τα κοινά στοιχεία που χαρακτηρίζουν τους όγκους ανεξαρτήτως του τύπου ή υποτύπου είναι μείζονος επιστημονικού ενδιαφέροντος. Είναι πιθανόν ότι ο μηχανισμός που οδηγεί ένα κύτταρο σε κακόηθες μπορεί να είναι παρόμοιος μεταξύ ορισμένων τύπων καρκίνου. Για παράδειγμα, ένα κοινό χαρακτηριστικό σχεδόν όλων των τύπων των όγκων είναι το γνωστό φαινόμενο *Warburg*, όπως περιγράφεται από τον *Otto Warburg* το 1924. Αυτή η απλή παρατήρηση παραμένει μέχρι σήμερα και αποτελεί, ένα θεμελιώδες γνώρισμα της βιολογίας των όγκων, δηλαδή ότι οι όγκοι υφίστανται μια στροφή από οξειδωτική φωσφορυλίωση σε αερόβια γλυκόλυση για τις ενεργειακές τους ανάγκες. Αυτό είναι ένα χαρακτηριστικό που όλοι οι όγκοι έχουν από κοινού και τα φαρμακευτικά προϊόντα που εκμεταλλεύονται αυτό το γνώρισμα είναι ήδη σε κλινικές δοκιμές. Είναι δυνατόν να υπάρχει ένας κοινός ογκογενετικός μηχανισμός, η διευκρίνιση του οποίου θα μπορούσε να προσφέρει ένα ευρύ φάσμα όπλων στη μάχη κατά του καρκίνου. Όχι μόνο θα είναι δυνατόν να αποκτήσουμε μια πιο σε βάθος κατανόηση της βιολογίας του όγκου, αλλά θα ανοίξει επίσης νέους δρόμους για τη θεραπεία του καρκίνου.

1.2. ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ ΠΑΙΔΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΚΟΙΝΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Μέχρι πρόσφατα, οι επιστημονικές προσεγγίσεις επικεντρώνονταν στην εξέταση μερικών παραγόντων ταυτόχρονα, που αποκάλυπταν ένα κομμάτι του παζλ. Η ογκογένεση είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία και ένα από τα εργαλεία που έχουμε στα χέρια μας είναι τα υπολογιστικά και τα βιολογικά συστήματα. Επομένως, είμαστε τώρα σε θέση να διερευνήσουμε πιθανόν κοινούς μηχανισμούς που διέπουν διάφορες νεοπλασίες. Στην παρούσα έρευνα θα αναλύσουμε και θα παρουσιάσουμε την

πορεία των εργασιών που θα ακολουθήσουμε για να κατανοήσουμε τα αίτια της ογκογένεσης. Θα εξετάσουμε δύο νεοπλασίες της παιδικής ηλικίας, διαφορετικής κυτταρικής καταγωγής και διαφορετικού φαινοτύπου. Την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ALL) και το ραβδομυοσάρκωμα. Η πρώτη είναι η πιο κοινή μορφή καρκίνου στην παιδική ηλικία και η δεύτερη είναι ένας από τους σπανιότερους όγκους που εμφανίζεται στα παιδιά. Η ALL θεωρείται μία από τις μεγάλες επιτυχίες του αιώνα με τα ποσοστά ίασης να φτάνουν το 80% των περιπτώσεων, ενώ τα ποσοστά επιβίωσης σε άλλες νεοπλασίες εξακολουθούν να παραμένουν πολύ χαμηλά. Χρησιμοποιούμε την μηχανική μεθοδολογία αντίστροφα ως μια προσέγγιση για την εξεύρεση κοινών μηχανισμών της εξέλιξης του καρκίνου.

1.2.1. ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΡΑΒΔΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑ

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ALL) είναι η συχνότερη κακοήθεια μεταξύ των καρκίνων που εμφανίζονται κατά την παιδική ηλικία. Η ALL προέρχεται από την αδιαφοροποίητη λεμφοβλάστη, που μη φυσιολογικά παύει να εξελίσσεται σε ώριμο λεμφικό κύτταρο και οδηγεί στην ανάπτυξη του όγκου. Η οξεία λευχαιμία εμφανίζεται κυρίως κατά την παιδική ηλικία, αλλά και στην εφηβεία και παρουσιάζει κακή πρόγνωση ανεξαρτήτως ηλικίας. Η πρόοδος στην λευχαιμία της παιδικής ηλικίας είναι τεράστια τις τελευταίες δεκαετίες με το συνολικό ποσοστό επιβίωσης να υπερβαίνει το 75%.^[13] Επίσης έχουν χαρακτηριστεί οι προγνωστικοί παράγοντες για την παιδική λευχαιμία, όπου περιλαμβάνονται τα λευκά αιμοσφαίρια, ο αριθμός των κυττάρων που παρουσιάζονται (διάγνωση), η ηλικία, το φύλο, καθώς και ορισμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες.^[13] Η θεραπεία της παιδικής λευχαιμίας είναι επιτυχής για την πλειοψηφία των ασθενών, κυρίως λόγω της χρήσης της κλασικής χημειοθεραπείας. Πρόσφατα εξατομικευμένες θεραπείες έχουν επίσης εφαρμοστεί, όπως στην περίπτωση των BCR / ABL θετικών (επίσης γνωστές ως *Philadelphia* θετικές (*Ph* +)) λευχαιμιών, χρησιμοποιώντας το *imatinib mesylate*, έναν νέο ειδικό παράγοντα για το συγκεκριμένο γονίδιο σύντηξης. Αυτό αντιπροσωπεύει ένα σπουδαίο παράδειγμα πώς η παιδική λευχαιμία μπορεί να επωφεληθεί από την εξατομικευμένη θεραπεία. Από την άλλη πλευρά, το ραβδομυοσάρκωμα (RMS) είναι μια σπάνια μορφή καρκίνου της παιδικής ηλικίας που αντιπροσωπεύει το 5-8% όλων των όγκων που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας. Ωστόσο, τα σαρκώματα της κεφαλής και του τραχήλου περιλαμβάνουν το 12% του συνόλου των νεοπλασιών της παιδικής ηλικίας^[14] με συχνότητα εμφάνισης 250 περιπτώσεις κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες. Το ραβδομυοσάρκωμα είναι ένας κακοήθης όγκος μεσεγχυματικής προέλευσης και ανήκει στην κατηγορία των μικρών μπλε κυτταρικών όγκων, συμπεριλαμβανομένων του νευροβλαστώματος και του πρωτογενή νευροεξωδερμικού όγκου.^[14] Η εμβρυϊκή μορφή είναι πιο συχνή κατά τη γέννηση, ενώ η κυψελιδική μορφή κυρίως εμφανίζεται στην παιδική ηλικία και στην εφηβεία.^[15] Το εμβρυϊκό ραβδομυοσάρκωμα, χαρακτηρίζεται από ατρακτοειδή κύτταρα με βοτρυοειδή μορφή και σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση ^[16]. Όπως και στην περίπτωση της λευχαιμίας στην παιδική ηλικία, πολλές κυψελιδικές μορφές ραβδομυοσαρκώματος παρουσιάζουν χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, όπως η PAX3-FKHR, που είναι ένας δείκτης κακής πρόγνωσης, αφού σχετίζεται ιδιαίτερα με μετάσταση.^[14]

^{17-20]} Το ραβδομυοσάρκωμα σπάνια θεραπεύεται με μία μόνο μέθοδο θεραπείας. Τα πρωτόκολλα θεραπείας περιλαμβάνουν τη χημειοθεραπεία και είτε χειρουργική επέμβαση είτε ακτινοθεραπεία. Σε γενικές γραμμές τα ποσοστά 5ετούς επιβίωσης ανέρχονται σε 97% στην περίπτωση εμβρυικού μη οφθαλμικού, μη παραμηνιγγικού σαρκώματος της κεφαλής και του τραχήλου, και σε 67% στις περιπτώσεις κυψελιδικής μορφής.^[21] Το κύτταρο προέλευσης θεωρείται η μυοβλάστη ή κύτταρα που θα σχηματίσουν το σκελετικό μυ. Αυτά τα κύτταρα είναι διαφορετικά από τα λεία μυϊκά κύτταρα που ευθυγραμμίζουν τον εντερικό σωλήνα. Θεωρητικά, το ραβδομυοσάρκωμα μπορεί να δημιουργηθεί σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος που έχει σκελετικό μυ, αλλά εμφανίζεται κυρίως στο κεφάλι και το λαιμό.

1.2.2. ΚΟΙΝΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ALL ΚΑΙ RMS

Ένα κοινό γνώρισμα των ALL και RMS κυττάρων είναι ότι και οι δύο τύποι αποτελούνται από κύτταρα τα οποία είναι αδιαφοροποίητα, αθάνατα και με τη δυνατότητα να διαιρούνται ασταμάτητα. Αυτό σημαίνει ότι ο πολλαπλασιασμός λαμβάνει χώρα σε ένα ανεξέλεγκτο πρότυπο. Έχει αναφερθεί ότι το ραβδομυοσάρκωμα μπορεί να υπάρχει στο μυελό των οστών των ασθενών που παρουσιάζουν λευχαιμική εικόνα, χωρίς την παρουσία ενός πρωτογενούς όγκου, κάτι το οποίο παρουσιάζει ενδιαφέρον.^[22-25] Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι υπάρχει η πιθανότητα της παρουσίας δευτερογενούς κακοήθειας μετά από επιτυχή θεραπεία ενός πρωτογενούς όγκου (λευχαιμία προκαλούμενη από τη θεραπεία). Για παράδειγμα, μετά την επιτυχή θεραπεία ενός παρασπονδυλικού εμβρυικού ραβδομυοσαρκώματος (ERS), ένας ασθενής ανέπτυξε οξεία T-λεμφοβλαστική λευχαιμία.^[26] Το ερώτημα που τίθεται είναι αν η ανάπτυξη του δευτερογενούς όγκου προήλθε από κύτταρα του πρωτογενούς όγκου, όπως στην περίπτωση της λευχαιμίας προκαλούμενη από τη θεραπεία, ή κατά πόσον υπήρχαν «αδρανή» λευχαιμικά κύτταρα στο μυελό των οστών που πυροδοτήθηκαν και οδηγήθηκαν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό μετά τη χημειοθεραπεία του ραβδομυοσαρκώματος. Στην περίπτωση, όπου τα κύτταρα από το ένα είδος καρκίνου εξελίσσονται σε ένα άλλο είδος, αυτό πιθανόν σημαίνει ότι το καρκινικό κύτταρο έχει δύο χαρακτηριστικά: πρώτον, είναι σε θέση να μεταναστεύσει και δεύτερον είναι σε θέση να διαφοροποιηθεί σε άλλο τύπο κυττάρων εκδηλώνοντας ιδιότητες βλαστικών κυττάρων. Αυτό είναι σύμφωνο με τη θεωρία προέλευσης του καρκίνου από τα βλαστικά κύτταρα, όπου τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα διατηρούν τη δυνατότητά τους να διαφοροποιούνται, να μεταναστεύουν, ακόμη και να οδηγήσουν στην ανάπτυξη μιας νέας κακοήθειας με σχεδόν εντελώς νέα χαρακτηριστικά. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η προκαλούμενη από τη θεραπεία λευχαιμία μπορεί να συμβεί λόγω της χημειοθεραπείας.^[27, 28] Το φαινόμενο αυτό δεν έχει ερευνηθεί πλήρως και οι μηχανισμοί πίσω από αυτό είναι ακόμα ασαφείς. Ωστόσο, επισημαίνεται το γεγονός ότι η καρκινογένεση είναι μια περίπλοκη διαδικασία, ενοχοποιώντας μια σειρά από μηχανισμούς και όχι μόνο μεμονωμένα γεγονότα στη διάρκεια της ζωής ενός κυττάρου. Αν επρόκειτο να δεχθούμε την υπόθεση ότι δύο διαφορετικά καρκινικά κύτταρα μπορούν να συνυπάρξουν σε διαφορετικές θέσεις, όπως ισχύει, τότε θα μπορούσαμε να δεχτούμε την ιδέα ότι τα βλαστικά κύτταρα παίζουν τον κύριο ρόλο στην καρκινογένεση και την ανάπτυξη του όγκου. Η παρουσία των

καρκινικών βλαστικών κυττάρων δεν είναι απαραίτητη για την διατήρηση της ανάπτυξης του όγκου, εν μέρει τουλάχιστον.^[29] Μετά από έρευνα της διαδικασίας ανάπτυξης των προαναφερθέντων τύπων κυττάρων, και οι δυο τύποι φαίνεται να προέρχονται από το εμβρυϊκό μεσόδερμα. Οι μυοβλάστες προέρχονται από το ραχιαίο μεσόδερμα (*paraxial*) ενώ τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από το πλευρικό μεσόδερμα, το οποίο οδηγεί στην ανάπτυξη του σπλαχνικού μεσοδέρματος και αυτό, με τη σειρά του, στον αιμαγγειοβλαστικό ιστό. Στη συνέχεια, το ραχιαίο μεσόδερμα δημιουργεί το συνοστεομένο προ-σωμιτικό μεσόδερμα, που σχηματίζεται κατά τη γαστριδίωση, και το μεσόδερμα που δημιουργείται από την πρωτόγονη ράβδωση. Ένα από τα πρώτα γονίδια που εκφράζονται στο ραχιαίο μεσόδερμα είναι το T (*branchyury*). Αυτός είναι επίσης ένας εμβρυϊκός παράγοντας μεταγραφής που εκφράζεται προοδευτικά σε όλες τις αναπτυξιακές θέσεις προερχόμενες από την αρχέγονη ράβδωση και συνεχώς εκφραζόμενες στη νωτιαία χορδή ^[30]. Τα μονοπάτια του Fibroblast Growth Factor (FGF) (παράγοντας αύξησης των ινοβλαστών) και του ρετινοϊκού οξέος (Retinoic Acid (RA)) είναι τα κύρια μονοπάτια που ακολουθούνται κατά την αρχική σωματική ανάπτυξη.^[30] Ένα άλλο σημαντικό σηματοδοτικό μονοπάτι που έχει βρεθεί να συμμετέχει στην ανάπτυξη, καθώς και στα ογκογενετικά μονοπάτια είναι το μονοπάτι NOTCH. Τα γονίδια NOTCH κωδικοποιούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει τέσσερις ομόλογους υποδοχείς NOTCH. Στο σωμιτικό στάδιο, ο NOTCH 1 εκφράζεται σε ολόκληρο το προ-σωμιτικό μεσόδερμα, όπου οι μεταλλάξεις έχουν βρεθεί ότι προκαλούν ελαττώματα στην τμηματοποίηση του σωμιτικού και δεν οδηγεί στη δημιουργία των μυοβλαστών, και στην πρόσθια-οπίσθια πολικότητα.^[31, 32] Από την άλλη πλευρά, κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από δύο περιοχές: η πρώτη σκέψη είναι ότι προέρχονται από το κοιλιακό μεσόδερμα κοντά στο λεκιθικό σάκο, οδηγώντας στα πρόδρομα ενδο-εμβρυϊκά αιμοποιητικά κύτταρα, ενώ τα αιμοποιητικά κύτταρα που διαρκούν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού προέρχονται από την μεσοδερμική περιοχή που περιβάλλει την αορτή.^[33] Από το σημείο της μεσοδερμικής διαφοροποίησης, η αυστηρή ρύθμιση μέσω διαφόρων γονιδίων οδηγεί σε δύο παρόμοιους κυτταρικούς τύπους με διαφορετικές λειτουργίες και ρόλους στο σώμα. Αυτό είναι το αποτέλεσμα ενός πολύπλοκου δικτύου γονιδιακής ρύθμισης και έκφρασης. Εύκολα υποθέτουμε ότι οι εκτροπές των ρυθμιστικών δικτύων που διέπουν την εξέλιξη θα οδηγήσουν σε καρκινικά κύτταρα. Αναπτυξιακά, υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν τη γονιδιακή ρύθμιση, προκειμένου να λάβει χώρα η διαφοροποίηση. Οι όγκοι μπορεί να είναι τόσο διαφορετικοί όσο και οι ασθενείς που φέρουν την ασθένεια. Αυτές οι διαφορές είναι που καθιστούν τους όγκους τόσο ανθεκτικούς στη θεραπεία, δεδομένου ότι οι θεραπείες σε διαφορετικούς ασθενείς έχουν διαφορετικά αποτελέσματα. Προς το παρόν δεν υπάρχουν πολλές αναφορές που να προσπαθούν να εντοπίσουν τα κοινά προφίλ γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των δύο προαναφερθέντων όγκων. Μια ενδιαφέρουσα αναφορά υπογραμμίζει το γεγονός ότι τα βλαστικά κύτταρα πιθανόν βρίσκονται σε διαφορετικούς τύπους όγκων, υποδηλώνοντας έτσι ότι τα βλαστικά κύτταρα εμπλέκονται στην αιτιολογία, στη διατήρηση και την ανάπτυξη του όγκου.^[34] Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι ακόμα και τα φυσιολογικά, ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα, μπορούν να μετασχηματιστούν σε καρκινικά.^[34] Με βάση αυτήν την παρατήρηση, υπήρξε μια μελέτη περίπτωσης, όπου ένα παιδί εκδήλωσε 5

διαφορετικούς τύπους όγκων ταυτόχρονα.^[35] Θα μπορούσε τα βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τον ίδιο οργανισμό να κατέχουν παρόμοια ελαττώματα, αλλά αρκετές μεταλλαγές να είναι σε θέση να οδηγήσουν σε πέντε διαφορετικά είδη όγκων. Η ανακάλυψη κοινών ή διαφορικών προφίλ γονιδιακής έκφρασης μπορεί να οδηγήσει στην κατανόηση της κοινής καταγωγής του όγκου, εάν υπάρχει. Ένα άλλο σημείο στο οποίο πρέπει να δοθεί προσοχή είναι η ρύθμιση των γονιδίων μέσω μεταγραφικών παραγόντων (Transcription Factors (TFs)). Η γνώση των γονιδιακών ρυθμιστικών δικτύων θεωρείται ότι είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση των ασθενειών όπως ο καρκίνος, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις.^[36] Η γνώση των κοινών μεταγραφικών ρυθμιστικών δικτύων θα μπορούσε δυνητικά να οδηγήσει σε μια καθολική θεραπεία για ποικίλες ασθένειες όπως ο καρκίνος, και μέσα από αυτό το ενδεχόμενο γίνεται εμφανής η ανάγκη για υπολογιστικές μεθόδους στη μελέτη της καρκινογένεσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2-*IN VITRO* ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΚΟΙΝΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ

Η μελέτη των μηχανισμών που διέπουν την καρκινογένεση ή την εξέλιξη του όγκου ή την αντίσταση στην χημειοθεραπεία απαιτεί βιολογικά συστήματα που θα μοιάζουν με αυτές τις διαδικασίες *in vivo*. Υπάρχουν πολλά μοντέλα που είναι διαθέσιμα τόσο στην πειραματική πράξη, όσο και στην βιβλιογραφία. Μία από τις κύριες προσεγγίσεις που χρησιμοποιείται είναι η χρήση κυτταρικών σειρών, που λαμβάνονται από βιοψίες είτε ανθρώπινες ή από άλλα είδη, και μετασχηματίζονται για να διαιρεθούν ασταμάτητα σε εργαστηριακές συνθήκες. Οι κυτταρικές σειρές έχουν αρκετά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα, είναι η δυνατότητα της επαναληψιμότητας των πειραματικών διαδικασιών, η εύκολη χρήση τους στην καθημερινή εργαστηριακή πράξη και η σκοπιμότητα της χρήσης τους από οικονομικής απόψεως. Από την άλλη πλευρά, οι κυτταρικές σειρές δεν αντιπροσωπεύουν με ακρίβεια τα κυψελιδικά συστήματα, την παθογένεση ή τον φαινότυπο όπως παρουσιάζονται *in vivo*. Ωστόσο, όσον αφορά την ηθική πλευρά του πειράματος οι κυτταρικές σειρές ξεπερνούν όλα τα άλλα μοντέλα μελέτης. Τα ηθικά ζητήματα τίθενται λόγω της χρήσης των ανθρώπινων δειγμάτων ή των πειραματόζωων. Υπάρχει επίσης μια γενική τάση για μια αύξηση της χρήσης των κυτταρικών σειρών ως μοντέλα της μελέτης και μείωση των άλλων τύπων βιολογικών συστημάτων, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις, τα δείγματα ασθενών και ζωικών μοντέλων είναι αναντικατάστατα. Εδώ χρησιμοποιούμε δύο κυτταρικές σειρές ως τα συστήματα αναφοράς μας. Εξετάζουμε την πειραματική διαδικασία και τα βήματα της ανάλυσης που λαμβάνουν χώρα προκειμένου να διευκρινίσουμε τα κοινά πρότυπα κυτταρικής λειτουργίας μεταξύ των δύο συστημάτων. Οι δύο κυτταρικές σειρές είναι η T-κυτταρική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία CCRF-CEM κυτταρική σειρά και το ραβδομυοσάρκωμα TE-671 κυτταρική σειρά. Και οι δύο έχουν ληφθεί από την Ευρωπαϊκή Συλλογή Κυτταρικών Καλλιιεργειών (ECACC). Η κυτταρική σειρά CCRF-CEM, μία CD4⁺[37] και CD34⁺[38] κυτταρική σειρά παρουσίασης, αρχικά ελήφθη από το περιφερικό αίμα ενός 2 ετών κοριτσιού Καυκάσιας φυλής που είχε διαγνωστεί με λεμφοσάρκωμα, που αργότερα εξελίχθηκε σε οξεία λευχαιμία. Το παιδί είχε υποβληθεί σε θεραπεία, ακτινοβολία και χημειοθεραπεία, πριν από την απόκτηση της κυτταρικής σειράς. Αν και επιτεύχθηκε μία ύφεση σε διάφορα στάδια, η νόσος εξελίχθηκε με ραγδαίο ρυθμό.^[39] Η κυτταρική σειρά παρατηρήθηκε ότι είχε υποστεί μικρές αλλαγές μετά από μακροχρόνια καλλιέργεια, εκτός από την παρουσία πυκνών κόκκων στους πυρηνίσκους^[40] και στην εκδήλωση αυτοκρινής δραστηριότητας καταλάσης, έναν σημαντικό ρυθμιστή της ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς.^[41] Το γεγονός ότι αυτά τα κύτταρα έχουν υποβληθεί σε θεραπεία πριν από τη συλλογή τους τα καθιστά ένα ιδανικό μοντέλο για την διερεύνηση της αντίστασης στα φάρμακα, προηγουμένως είχε αναφερθεί ότι η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά παρουσιάζει αντίσταση σε αρκετούς παράγοντες χημειοθεραπείας, όπως γλυκοκορτικοειδή.^[42] Η κυτταρική σειρά TE-671 αρχικά αναφέρεται ότι λήφθηκε από ένα παρεγκεφαλιδικό μυελοβλάστωμα, πριν από την ακτινοβολία, ενός 6 ετών κοριτσιού Καυκάσιας φυλής^[43], και αργότερα διαγιγνώστηκε.^[44] Σήμερα γνωρίζουμε ότι αυτή η κυτταρική σειρά είναι γονική, αν όχι ταυτόσημη, με

την $RD^{[45]}$ κυτταρική σειρά ραβδομυοσαρκώματος. Ωστόσο, αρκετές αναφορές εξακολουθούν να αναφέρονται σε αυτήν την κυτταρική σειρά, ως μυελοβλάστωμα.^[46, 47] Με βάση τα παραπάνω, τα κύτταρα αυτά μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά, παρά τις προφανείς διαφορές. Η παρούσα μελέτη ασχολείται με το κοινό προφίλ έκφρασης των δύο κυτταρικών σειρών: T-ALL (CCRF-CEM) και RMS (TE-671) κυτταρικές σειρές. Η έρευνά μας επικεντρώθηκε στην αναγνώριση των γονιδίων που μοιράζονται ένα κοινό προφίλ έκφρασης μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών. Και οι δύο τύποι κυττάρων προέρχονται κατά κύριο λόγο από το μεσόδερμα, όπου τα κύτταρα σταμάτησαν να διαφοροποιούνται, πιθανότατα σε πρώιμο στάδιο, προτού να ωριμάσουν στον τελικό φαινότυπο τους. Φυσιολογικά, αυτά τα κύτταρα θα είχαν ωριμάσει και διαφοροποιηθεί σε κύτταρα του αίματος και των μυών, αντίστοιχα. Επίσης, σε κάποιο άγνωστο σημείο, η φυσιολογική διαφοροποίηση σταμάτησε και τα κύτταρα άρχισαν να συσσωρεύονται ανεξέλεγκτα, δηλαδή έγιναν κακοήγη. Από εκείνο το σημείο και μετά, μέχρι την πρώτη εκδήλωση των συμπτωμάτων κακοήθειας, υπάρχει μια έλλειψη γνώσης των μηχανισμών που οδηγούν στην ογκογένεση. Με άλλα λόγια, δεν μπορούμε να γνωρίζουμε τα στάδια εμφάνισης των βλαστικών κυττάρων και τη δυναμική του πολλαπλασιασμού τους μέχρι το σημείο εμφάνισης της κλινικής εικόνας.^[2] Αυτό φανερώνει ένα ακόμα καλό λόγο για τη μελέτη τέτοιων συστημάτων με τη χρήση *in vitro* μοντέλων, δεδομένου ότι τα *in vitro* μοντέλα επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των μοντέλων μακροπρόθεσμα, κάτι που είναι αδύνατο να επιτευχθεί με *ex vivo* κύτταρα ή ζώα. Το θέμα είναι ότι δύο διαφορετικά είδη κυττάρων, που προορίζονται να εκτελούν διαφορετικές λειτουργίες, παρουσιάζουν παρόμοιους μηχανισμούς ανάπτυξης και εξέλιξης, το οποίο οφείλεται στον κακοήγη χαρακτήρα τους. Ο φαινότυπος αυτών των κυττάρων οφείλεται στον κακοήγη χαρακτήρα τους, που αποκτήθηκε σε κάποιο σημείο της ανάπτυξης και καθορίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, τη γονιδιακή έκφραση και ρύθμιση. Προς το παρόν, θα εστιάσουμε στο διαφορετικό προφίλ έκφρασης των δύο κυτταρικών σειρών και στην υπολογιστική προσέγγιση του κοινού προφίλ έκφρασης. Συγκεκριμένα, θα εξετάσουμε τις ομάδες των γονιδίων με βάση τη λειτουργία τους και τη ρύθμιση τους. Για παράδειγμα, αναμένουμε ότι οι δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές έχουν διαφορετική γονιδιακή έκφραση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, ποια είναι τα γονίδια που εκφράζονται και στις δύο κυτταρικές σειρές. Έχουμε επικεντρωθεί κυρίως στις ομοιότητες μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις θα μπορούσαμε να περιορίσουμε την αναζήτησή μας στους κοινούς μηχανισμούς και να επικεντρωθούμε στις ομάδες των γονιδίων όπως τα γονίδια που δρουν στην ανάπτυξη, τα μόρια που εκκρίνονται και στους δύο τύπους κυττάρων, τα γονίδια που διατηρούν την ανάπτυξη και τα γονίδια που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο. Θα χρησιμοποιήσουμε υψηλής απόδοσης και υπολογιστικές προσεγγίσεις και θα προσπαθήσουμε να διαφωτίσουμε ποια γονίδια (μέσα σε μια συγκεκριμένη ομάδα γονιδίων) είναι τυπικά για κάθε κυτταρικό τύπο, αλλά την ίδια χρονική στιγμή τα γονίδια που είναι ειδικά για κάθε κυτταρικό τύπο και τα οποία εμφανίζονται και στον άλλο κυτταρικό τύπο. Περιμένουμε να βρούμε μερικά γονίδια που δραστηριοποιούνται και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Εμείς θα προσπαθήσουμε να βρούμε ομοιότητες στην εξέλιξη του όγκου, του κυτταρικού κύκλου και στην εξωκυττάρια εκκριτική σηματοδότηση. Θα προσπαθήσουμε να

αποσαφηνίσουμε τους πιθανούς κοινούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς για τους δύο τύπους κυττάρων με βάση το γονιδιακό προφίλ έκφρασης και να διερευνήσουμε κατά πόσον υπάρχουν κοινά μονοπάτια για τους δύο κυτταρικούς τύπους. Το τελευταίο θα μπορούσε να μοντελοποιηθεί ως μέσο διερεύνησης του τρόπου λειτουργίας των γονιδίων που εμπλέκονται στο δίκτυο που παρατηρείται σε όλα τα βιολογικά συστήματα, ειδικά στον καρκίνο. Τέλος, θα προσπαθήσουμε να φτάσουμε σε κάποια συμπεράσματα σχετικά με την προέλευση της ογκογένεσης. Με άλλα λόγια, από την υπολογιστική ανάλυση που θα γίνει θα προσπαθήσουμε να συμπεράνουμε αν τα βλαστικά κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του όγκου. Αρκετές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την ανίχνευση των γονιδίων καρκίνου βλαστικής γραμμής (CGGs) τόσο σε σαρκώματα^[48], όσο και σε όγκους εγκεφάλου στην παιδική ηλικία.^[49] Η ανακάλυψη των παγκόσμιων αντιγόνων για εμβόλια όγκου θα ήταν σωτήρια για τις κακοήθειες της παιδικής ηλικίας.^[48] Μερικές μελέτες αναφέρουν την εμφάνιση κοινών αντιγόνων στο σάρκωμα Ewing / πρωτογενή νευροεξωδερμική νεοπλασία (EWS/PNET) και στο λεμφοβλαστικό λέμφωμα.^[50] Το ραβδομυοσάρκωμα (RMS) ανήκει στην οικογένεια PNET όγκων, οι οποίες χρησιμοποιούν εμβρυϊκά γονίδια για την εξέλιξη τους.^[51] Η λευχαιμία, και πιο συγκεκριμένα η ALL, από την άλλη πλευρά, προέρχεται από την λεμφοβλάστη, επίσης, γνωστό ότι χρησιμοποιεί εμβρυϊκούς μηχανισμούς διαφοροποίησης και εξέλιξης. Αυτό το είδος της προσέγγισης ανοίγει το δρόμο για μια πιο ολιστική κατανόηση του όγκου/της δυναμικής της ογκογένεσης, δεδομένου ότι με την εξεύρεση κοινών μηχανισμών δράσης θα είναι δυνατόν να κατανοήσουμε καλύτερα την προέλευση του καρκίνου. Οι διάφορες νεοπλασίες με διαφορετικά χαρακτηριστικά αναμένεται να έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά και φαινοτύπους. Ωστόσο, μια προσέγγιση που εντοπίζει ομοιότητες μεταξύ των διαφορετικών βιολογικών συστημάτων θα μπορούσε να οδηγήσει στην κατανόηση των κοινών μηχανισμών που μετασχηματίζουν τα φυσιολογικά κύτταρα σε κακοήθη. Αυτό θα μπορούσε να έχει ένα πολύ θετικό αποτέλεσμα στην ανάπτυξη φαρμάκων και να συμβάλει στη δημιουργία παγκοσμίως νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Όπως αναφέραμε παραπάνω, χρησιμοποιούμε αυτές τις κυτταρικές σειρές για να διερευνήσουμε τα κοινά πρότυπα κυτταρικής λειτουργίας μεταξύ των δύο συστημάτων. Αυτοί οι δύο κυτταρικοί τύποι, φυσιολογικά θα είχαν διαφοροποιηθεί σε κύτταρα του αίματος και μυϊκά κύτταρα, αλλά σε ένα άγνωστο στάδιο αυτή η φυσιολογική διαφοροποίηση σταμάτησε και άρχισε ένας άτυπος, ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, ο οποίος δημιούργησε την κακοήθεια. Τα ενδιάμεσα στάδια που οδήγησαν στη γένεση του όγκου είναι άγνωστα. Έτσι, στην παρούσα έρευνα προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε την κοινή γονιδιακή ρύθμιση με βάση τις χρωμοσωμικές συσχετίσεις. Η συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης και ειδικότερα, η χρωμοσωμική συσχέτιση υποδηλώνει κοινή γονιδιακή ρύθμιση. Ωστόσο, γνωρίζουμε ότι η συσχέτιση δεν είναι πάντα αιτιολογική, αλλά μπορεί να είναι τυχαία. Υπό αυτή την έννοια, έχει μεγάλη σημασία αν θα είμαστε σε θέση να συμπεράνουμε τους μηχανισμούς γονιδιακής ρύθμισης από τα επίπεδα της χρωμοσωμικής έκφρασης. Προσπαθήσαμε να προχωρήσουμε ένα βήμα μπροστά και να βρούμε πιθανές αιτιακές σχέσεις στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης. Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται σε προσεγγίσεις που χρησιμοποιούν τη βιολογία μαζί με τα μαθηματικά, προκειμένου να διαλευκάνουμε τους μηχανισμούς που οδηγούν σε αυτά τα

πρότυπα γονιδιακής έκφρασης. Στη συνέχεια, κινούμαστε προς μια κατεύθυνση που προσπαθεί να ερμηνεύσει τη γονιδιακή ρύθμιση όχι από τη διαφορική άποψη, αλλά από τα κοινά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης.

ΜΕΡΟΣ ΙΙ-ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3- ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

Τα παρακάτω πειράματα διεξήχθησαν στο Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο και τα δεδομένα πάρθηκαν από τα άρθρα Lambrou et al. (2012a) και Lambrou et al. (2012b).^[1, 3] Στη συνέχεια θα περιγράψουμε συνοπτικά τα βήματα τα οποία ακολουθήθηκαν στην πειραματική διαδικασία, όπως αυτά περιγράφησαν στις προαναφερόμενες εργασίες. Η ανάλυση μπορεί να χωριστεί σε δύο μέρη: στο πειραματικό μέρος και στο υπολογιστικό μέρος. Το πειραματικό μέρος καθορίζει στο μεγαλύτερο βαθμό το αποτέλεσμα της υπολογιστικής ανάλυσης. Αυτό σημαίνει ότι ο πειραματικός σχεδιασμός πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να περιγράφει, όσο είναι δυνατόν, τα κύρια ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν. Όμως, αυτό δεν συμβαίνει πάντα. Υπάρχουν αρκετές πειραματικές διαδικασίες που περισσότερο αποκαλύπτονται και λιγότερο υποθέτονται. Σε αυτήν την περίπτωση, χρησιμοποιείται μία αποκαλυπτόμενη πειραματική προσέγγιση. Παρακάτω περιγράφεται περιληπτικά το σύνολο των εργασιών που θα χρησιμοποιηθούν για την εν λόγω ανάλυση:

- κυτταρική καλλιέργεια και ανάπτυξη
- κυτταρικός πολλαπλασιασμός μέχρι να φτάσει στον επιθυμητό βαθμό
- μετρήσεις του κυτταρικού πολλαπλασιασμού
- κυτταρική συλλογή, στα επιθυμητά χρονικά σημεία, για περαιτέρω επεξεργασία
- κυτταρική συλλογή για:
 - RNA εκχυλίσεις
 - DNA εκχυλίσεις (προαιρετικά)
 - εκχυλίσεις πρωτεϊνών (προαιρετικά)
 - υπερκείμενα κυτταρικής καλλιέργειας για μετρήσεις των εξωκυττάρων μορίων και παραγόντων
 - κύτταρα για τις αναλύσεις κυτταρομετρίας ροής
- εκχυλίσεις από τα προαναφερθέντα μόρια
- αναλύσεις κυτταρομετρίας ροής για τον κυτταρικό θάνατο, το μέγεθος του κυττάρου, την κοκκίωση και την κατανομή του κυτταρικού κύκλου
- υπολογιστική ανάλυση των δεδομένων κυτταρομετρίας ροής (προαιρετικά)
- πειραματικός σχεδιασμός μικροσυστοιχίας
- πειράματα μικροσυστοιχίας μεταξύ των συλλεγόμενων δειγμάτων
- υπολογιστική ανάλυση των δεδομένων μικροσυστοιχίας
- φιλτράρισμα σήματος
- διόρθωση θορύβου
- κανονικοποίηση των εντάσεων του σήματος
- στατιστικές δοκιμασίες για την ανίχνευση διαφορικής γονιδιακής έκφρασης
- ιεραρχική ταξινόμηση / ομαδοποίηση
- άλλες μέθοδοι ομαδοποίησης (π.χ. *k-means*, *Principal Component Analysis*)

- προβλεπόμενα πρότυπα των δεσμευτικών μεταγραφικών παραγόντων (*Transcription Factor Binding Motifs*) TFBMs))
 - αναλύσεις χρωμοσωμικής κατανομής
 - αναλύσεις γονιδιακής οντολογίας (*Gene Ontology*) GO)
 - συμμετοχή μονοπατιού και αναλύσεις χαρτογράφησης
 - προσομοιώσεις μονοπατιού (προαιρετικά)
 - πρόβλεψη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών (προαιρετικά)
- τελικά συμπεράσματα

Σε αυτό το σημείο θα περιγράψουμε τις εργασίες βήμα προς βήμα με τρόπο που να εξηγεί περαιτέρω τις απαραίτητες διεργασίες για κάθε ένα από τα μέτρα που έχουν ληφθεί.

3.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Οι κυτταρικές σειρές CCRF-CEM (ALL) και TE-671 (RMS) χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικό μοντέλο, αποκτήθηκαν από την Ευρωπαϊκή συλλογή κυτταρικών καλλιέργειών (ECACC). Η κυτταρική σειρά CCRF-CEM, CD4⁺ και CD34⁺, αποκτήθηκε αρχικά από το περιφερικό αίμα 2 ετών κοριτσιού Καυκάσιας φυλής. Ο όγκος διαγνώστηκε ως λεμφοσάρκωμα, που αργότερα εξελίχθηκε σε οξεία λευχαιμία. Το παιδί είχε υποβληθεί σε ακτινοβολία και χημειοθεραπεία πριν από τη χορήγηση της κυτταρικής σειράς. Μολονότι την ύφεση που επιτεύχθηκε σε διάφορα στάδια, η νόσος εξελίχθηκε ραγδαίως. Έχει παρατηρηθεί ότι η κυτταρική σειρά υπόκεινται σε μικρές τροποποιήσεις μετά από μακροχρόνια καλλιέργεια, εκτός από την παρουσία πυκνών κόκκων στους πυρηνίσκους, έχει αναφερθεί ότι εκδηλώνεται αυτοκρινή δραστηριότητα καταλάσης η οποία συμμετέχει στους μηχανισμούς της ανάπτυξης και της εξέλιξης. Η κυτταρική σειρά TE-671 αναφέρεται ότι έχει ληφθεί από παραγκεφαλικό μυελοβλάστωμα 6 ετών κοριτσιού Καυκάσιας φυλής, πριν από τη θεραπεία ακτινοβολίας. Ωστόσο, σήμερα είναι γνωστό ότι αυτή η κυτταρική σειρά είναι η γονική αν όχι ταυτόσημη με την RD RMS κυτταρική σειρά. Παρόλα αυτά, σε μια σειρά αναφορών αναφέρονται σε αυτή την κυτταρική σειρά, ως μυελοβλάστωμα. Αμφότερες οι κυτταρικές σειρές καλλιιεργήθηκαν για 24 ώρες (h) και παρέμειναν για να αναπτυχθούν όλη τη νύχτα. Αυτό είναι ένα απαραίτητο βήμα για να αναπροσαρμοστούν τα κύτταρα στο περιβάλλον τους και να αποφύγουμε τις επιπτώσεις που προκαλεί το στρες κατά τη διάρκεια της σίτισης και της καλλιέργειας στις μελλοντικές μετρήσεις. Μετά από 24 ώρες (χρόνος, 0 h) έγινε λήψη ενός δείγματος και από τις δύο κυτταρικές σειρές ώστε να γίνουν μετρήσεις και στη συνέχεια γίνονταν λήψεις κάθε 24 ώρες. Τα κύτταρα CCRF-CEM αναπτύχθηκαν σε μέσο RPMI-1640 συμπληρωμένο με 2 mM L-γλουταμίνη και 100 U / ml στρεπτομυκίνη / πενικιλίνη (Gibco), 20% FBS (Gibco) στους 37°C, 5% CO₂ και ~100% υγρασία. Τα TE-671 κύτταρα αναπτύχθηκαν σε DMEM (Gibco) συμπληρωμένο με 2 mM L-γλουταμίνη, 10% FBS και 100 U / ml στρεπτομυκίνη / πενικιλίνη. Τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε ~ 1.500x10³ κύτταρα / μl για CCRF-CEM και ~ 80% για τα TE-671. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας 0,1% θρυψίνη (μόνο για TE-671) και φυγοκέντρωση στα 1000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο

απορρίφθηκε και τα κύτταρα πλύθηκαν σε προθερμασμένο 1×PBS, εκ νέου σε φυγοκέντρηση σε 1000 rpm για 10 λεπτά και το κυτταρικό ίζημα κρατήθηκε για περαιτέρω επεξεργασία.

3.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

Ο κυτταρικός πληθυσμός είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του κυτταρικού τύπου. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα δύο κυτταρικά συστήματα που χρησιμοποιούνται καλλιεργούνται με πολύ διαφορετικό τρόπο. Η CEM κυτταρική σειρά αναπτύσσεται σε εναιώρημα δηλαδή σε ένα τρισδιάστατο περιβάλλον που παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την *in vivo* κατάσταση του μυελού των οστών. Από την άλλη πλευρά, τα κύτταρα του ραβδομυοσاركώματος αναπτύσσονται προσκολλημένα σε μια επιφάνεια. Αυτό φανερώνει αμέσως δύο βασικές διαφορές. Στην περίπτωση των λευχαιμικών κυττάρων, θέτονται τα ζητήματα της θρέψης και της διαθεσιμότητας του χώρου, οπότε δεν μπορούμε να καθορίσουμε άμεσα τους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των κυττάρων. Από την άλλη, τα κύτταρα RMS ανεξάρτητα από τη διατροφή, εξαρτώνται άμεσα από τη διαθεσιμότητα του χώρου, καθώς η μη προσκόλληση στην επιφάνεια, μπορεί να τους οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Ως εκ τούτου, κυτταρικές μετρήσεις πρέπει να γίνονται τακτικά. Στην προκειμένη περίπτωση, τα κύτταρα μετρήθηκαν στο χρονικό σημείο 24h, καθώς και σε 0, 4, 24, 48 και 72 ώρες μετά αφέθηκαν να καλλιεργηθούν υπό κανονικές συνθήκες. Για το σκοπό αυτό, ελήφθησαν 200 μl κυτταρικού αιωρήματος από κάθε φιάλη και μετρήθηκαν απευθείας με τον αναλυτή. Ο κυτταρικός πληθυσμός προσδιορίστηκε με τη χρήση ενός αναλυτή αιματολογίας Nihon Kohden CellTaq-α.

3.3. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια ισχυρή μέθοδος που επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλαπλών παραγόντων όπως το μέγεθος του κυττάρου, την κοκκίωση, τους μεμβρανικούς δείκτες, τον κυτταρικό θάνατο, τη βιωσιμότητα, το περιεχόμενο DNA ή τα στάδια του κυτταρικού κύκλου. Στην περίπτωση αυτή, παρουσιάζουμε το παράδειγμα προσδιορισμού των τριών παραγόντων: 1) το μέγεθος του κυττάρου και την κοκκίωση, 2) την απόπτωση και 3) τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου και το περιεχόμενο DNA προσδιορίζονται με την πρότυπη χρωστική, το ιωδιούχο προπύδιο (PI), μία χρώση που παρουσιάζει υψηλή συγγένεια με τα νουκλεοτίδια. Όταν η PI διεγείρεται από μια πηγή ενέργειας εκλύει φθορισμό ανάλογο με το περιεχόμενο DNA των κυττάρων, υποδεικνύοντας έτσι τις φάσεις G_1 , G_2 και S. Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε σε FlowCount XL κυτταρόμετρο (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Η κατανομή του κυτταρικού κύκλου και το περιεχόμενο DNA προσδιορίστηκαν με το πρότυπο χρώσης PI (Invitrogen Inc., Grand Island, NY, USA). Εν συντομία, 1ml κυτταρικού αιωρήματος από κάθε φιάλη φυγοκεντρήθηκε στα 1000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα αιωρήθηκαν σε 1ml 75% αιθυλικής αλκοόλης. Τα κύτταρα επώαστηκαν στους 4° C όλη τη νύκτα. Μετά την επώαση, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 1000rpm¹ για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο

¹Rounds per minute

απομακρύνθηκε και τα κύτταρα πλύθηκαν με 1ml παγωμένου PBS, pH 7.4. Τα κύτταρα εκ νέου φυγοκεντρήθηκαν και αραιώθηκαν σε 1ml PBS pH 7,4. Στη συνέχεια, προστέθηκε RNase A (0.25 μg / ml) και τα κύτταρα επώστηκαν στους 37 ° C για 30 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν εναπομείναντα ίχνη του RNA που θα μπορούσε να παρέμβουν με χρώση PI. Προστέθηκε PI σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές. Τα αναφερόμενα στοιχεία αποτελούν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Τα δεδομένα της κυτταρομετρίας ροής και του κυτταρικού κύκλου αναλύθηκαν με WinMDI έκδοση λογισμικού 2.8 (Ερευνητικό Ινστιτούτο *Scripps, Flow Cytometry Core Facility*) και την Cylchred έκδοση 1.0.2 (*Cardiff University, Ουαλία*), η οποία βασίζεται σε αλγορίθμους που προτείνουν οι Ormerod et al. και Watson et al.^[52-54]

3.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Από την απομόνωση του RNA από την υπό μελέτη κυτταρική σειρά εξαρτάται σημαντικά η ποιότητα των τελικών δεδομένων των μικροσυστοιχιών, καθώς οι μετρήσεις της γονιδιακής έκφρασης βασίζονται στο ότι το υπό μελέτη απομονωμένο δείγμα RNA υποθέτουμε ότι είναι παρόμοιο με τα *in vivo* επίπεδα έκφρασης. Η διαδικασία της απομόνωσης του RNA λόγω δράσης της ριβονουκλεάσης απαιτεί ταχεία κατεργασία και προσεκτικό χειρισμό, ώστε να μειώσουμε στο ελάχιστο την αποδόμηση του.^[55] Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι, ενώ η μέθοδος απομόνωσης του RNA που θα επιλέξουμε εξαρτάται τόσο από το μέγεθος όσο και από τον τύπο της υπό μελέτη κυτταρικής σειράς. Η απομόνωση του RNA είναι ένα από τα πιο κρίσιμα βήματα για την επιτυχία των μετέπειτα αναλύσεων από καλής ποιότητας RNA και καθορίζει την απόδοση της έκφρασης των γονιδίων που αργότερα θα μελετηθεί με μικροσυστοιχίες. Στην προκειμένη περίπτωση, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: το RNA απομονώθηκε με το αντιδραστήριο Trizol (*Invitrogen Inc.*) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ποσότητα του RNA που απομονώθηκε μετρήθηκε με ένα φασματοφωτόμετρο SmartSpec 3000 (*BioRad, Berkley, CA, USA*) και η ακεραιότητα του RNA εκτιμήθηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης 2%. Χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 40 μg RNA από κάθε δείγμα. Η επεξεργασία DNases (RQ1 DNASE; *Promega, Fitchburg, WI, USA*) που ακολουθήθηκε, έγινε όπως περιγράφεται από τον κατασκευαστή. Τέλος, τα δείγματα RNA καθαρίστηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας το εργαλείο RNeasy mini (*Qiagen, Hilden, Germany*) και η ποσότητα και η ακεραιότητα του RNA προσδιορίστηκαν και πάλι όπως παραπάνω. Επιλέγησαν δείγματα με λόγο A260/ A280 από 1,8 έως 2,0. Επιπλέον, εμπειρικά χρησιμοποιήθηκαν εκείνα τα δείγματα που έδειξαν δύο φορές πιο φωτεινή ζώνη 28S σε σύγκριση με τη ζώνη 18S στο πήκτωμα.

3.6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ

Οι μικροσυστοιχίες έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανακάλυψη των διαφορών μεταξύ των βιολογικών δειγμάτων. Για παράδειγμα, στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης, ένα δείγμα συγκρίνεται με ένα δείγμα αναφοράς, προκειμένου να ανακαλυφθούν διαφορές στο γονιδιακό προφίλ έκφρασης. Δείγματα που ακολουθούν διαφορετική θεραπεία, για παράδειγμα μία θεραπεία με ένα φάρμακο σε σύγκριση με καμία θεραπεία ή φυσιολογικά κύτταρα σε σύγκριση με τα καρκινικά κύτταρα, χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση και υβριδοποίηση RNA, είτε ως cDNAs είτε ως cRNAs (*complementary RNAs* ή επίσης αναφέρεται ως *anti-sense RNAs*). Ομοίως, οι μικροσυστοιχίες έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των πολυμορφισμών. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, οι τεχνολογίες των μικροσυστοιχιών έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, λόγω του ότι δίνουν τη δυνατότητα να διερευνήσουμε χιλιάδες παράγοντες ταυτόχρονα. Η πρώτη χρήση της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών ήταν για την ανίχνευση των διαφορών μεταξύ δύο δειγμάτων στο επίπεδο του mRNA. Οι μικροσυστοιχίες αποτελούνται από γυάλινα πλακίδια ή μεμβράνες εντυπωμένες με ολιγονουκλεοτίδια ή θραύσματα cDNA. Με βάση αυτή την ιδιότητα και την πρόοδο της υψηλής ρομποτικής τεχνολογίας, οι μικροσυστοιχίες έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά πολύτιμες για την ανίχνευση κυριολεκτικά δεκάδων χιλιάδων στόχων μέσα σε ένα πείραμα. Για το λόγο αυτό, η συγκεκριμένη μέθοδος έχει βρει εφαρμογές σε πολλούς τομείς των βιοεπιστημών. Με τον καιρό, οι μικροσυστοιχίες επεκτάθηκαν σε διάφορους τύπους πειραμάτων με υψηλή απόδοση. Για παράδειγμα, μελέτες μεθυλίωσης, SNP ανίχνευση (πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου), CGH μικροσυστοιχίες (Συγκριτικός Γονιδιωματικός Υβριδισμός) και CHIP-chip μικροσυστοιχίες (ανοσο-κατακρύμνιση *Chip*). Μια πολύ σημαντική πτυχή των μικροσυστοιχιών είναι η πειραματική σχεδίαση. Ένα άλλο σημαντικό ζήτημα της ανάλυσης των μικροσυστοιχιών είναι η κανονικοποίηση των δεδομένων. Αυτό ίσως περιλαμβάνει την πιο σημαντική πτυχή της μεθοδολογίας των μικροσυστοιχιών, δεδομένου ότι είναι το στοιχείο που επηρεάζει όλες τις περαιτέρω αποφάσεις και τα συμπεράσματα.

Οι μικροσυστοιχίες DNA μας παρέχουν ένα γονιδιακό προφίλ έκφρασης ή εναλλακτικά προφίλ μεταγραφής. Για να αναλύσουμε την έκφραση των γονιδίων, απομονώνονται από τα κύτταρα RNA μετάγραφα, επισημαίνονται με φθορίζουσα χρωστική και υβριδίζονται σε μία DNA μικροσυστοιχία. Κατά τη διάρκεια του υβριδισμού, οι DNA αλληλουχίες των σταθεροποιημένων στοιχείων καταλαμβάνουν-συγκρατούν τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μίγμα των φθοριζόντων κλώνων. Το φθορίζον σήμα στο σημείο- κηλίδα της συστοιχίας, που αντιπροσωπεύει κάθε γονίδιο χωριστά, παρέχει μία ποσοτική μέτρηση του επιπέδου έκφρασης αυτού του γονιδίου στο δείγμα. Η διαδικασία αυτή, παρέχει μία συστηματική, ποσοτική μέθοδο για να παρακολουθήσουμε ταυτόχρονα την έκφραση δεκάδων χιλιάδων γονιδίων. Με τη μέθοδο αυτή μπορούμε να κατανοήσουμε και να αποκρυπτογραφήσουμε τις ρυθμιστικές διεργασίες σε κυτταρικό επίπεδο. Στις μικροσυστοιχίες cDNA η ευαισθησία ορίζεται ως το ελάχιστο ανιχνεύσιμο σήμα φθορισμού, που μπορεί να αναπαραχθεί, για ένα συγκεκριμένο σύστημα σάρωσης ή ως η ελάχιστη συγκέντρωση γνωστής σχετικής έκφρασης, που μπορεί να ανιχνευθεί κατ' εξακολούθηση. Το σήμα φθορισμού που ανιχνεύεται μιας συγκεκριμένης

αναφοράς αποτελεί ένα άμεσο μέτρο της ποσότητας της υπό μελέτη αλληλουχίας στο δείγμα. Οι μεγαλύτερες σε μήκος αναφορές παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία, καθώς όσο περισσότερες είναι οι διαθέσιμες προς υβριδοποίηση βάσεις, τόσο ισχυρότερο θα είναι και το σήμα φθορισμού που παράγεται ^[55]. Η ειδικότητα, ελέγχεται καθορίζοντας την αλληλουχία της αναφοράς. Ο σκοπός κάθε πειράματος DNA μικροσυστοιχίας είναι να μετρήσουμε την ποσότητα των μορίων RNA σε ένα βιολογικό δείγμα μιας συγκεκριμένης κατάστασης. Επομένως, είναι σημαντικό σε κάθε βήμα της εργαστηριακής διαδικασίας να εισάγεται όσο το δυνατό λιγότερος θόρυβος, και οι μετρήσεις των επιπέδων έκφρασης να αποκλίνουν όσο το δυνατό λιγότερο από τις πραγματικές. Έτσι, το εκχύλισμα προς υβριδοποίηση θα πρέπει να αντιπροσωπεύει τις αρχικές ποσότητες RNA, διαφορετικά τα δεδομένα, που θα παραχθούν, θα είναι μικρής ή άνευ αξίας. Συγκεκριμένα, στις διχρωματικές μικροσυστοιχίες είναι αναγκαίο να ληφθούν υπόψη (α) τα διαφορετικά δείγματα mRNA, (β) οι αρχικές ποσότητες από το κάθε δείγμα, και (γ) ο αριθμός και ο τύπος των διαθέσιμων μικροσυστοιχιών για το πείραμα. Στις διχρωματικές, υβριδοποιούνται ταυτόχρονα δύο δείγματα πάνω σε κάθε μικροσυστοιχία (ανταγωνιστική υβριδοποίηση).^[56] Στα πλαίσια ενός σωστού σχεδιασμού θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και ένας ελάχιστος αριθμός αντιγράφων (*replicates*), ο οποίος ελαττώνει τη μεταβλητότητα, και επιτρέπει τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων.^[57, 58] Οι βιολογικές επαναλήψεις (*biological replicates*) αναφέρονται σε επαναλήψεις της υβριδοποίησης με RNA, που έχει προκύψει από διαφορετικό βιολογικό δείγμα, ενώ παρέχουν ένα μέτρο τόσο για την εγγενή βιολογική μεταβλητότητα, που υπάρχει στο υπό μελέτη βιολογικό σύστημα, όσο και για την όποια τυχαία διακύμανση κατά την προετοιμασία του δείγματος.^[59] Στην ανάλυση μικροσυστοιχιών πρέπει να καθορίσουμε τους τύπους των νουκλεϊκών οξέων που θα χρησιμοποιήσουμε. Ο πρώτος τύπος και τα πιο χρησιμοποιούμενα μόρια είναι τα cDNAs. Η *in vitro* ανάστροφη μεταγραφή RNA στα αντίστοιχα cDNAs όλων των εκφρασμένων εξονίων σε ένα ορισμένο χρονικό σημείο είναι μέθοδος επισημάνσης που χρησιμοποιείται. Αυτή η μέθοδος συνήθως απαιτεί μεγάλες ποσότητες του ολικού RNA ως αρχικό υλικό, η οποία κυμαίνεται από 20-50ug ανά δείγμα. Δεδομένου ότι αυτό δεν είναι πάντα εφικτό, καθώς τα δείγματα μπορεί να είναι σπάνια ή δύσκολο να ληφθούν ή χαμηλή ποσότητα, πρέπει να εξεταστούν άλλες εναλλακτικές λύσεις. Μια λύση σε αυτά τα προαναφερθέντα προβλήματα ήρθε με τη μεθοδολογία της ενίσχυσης RNA. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1990 από τους Van Gelder *et al.*^[60] Αυτή η μεθοδολογία βασίζεται στην γραμμική ενίσχυση του μεταγραφημένου dsDNA (*double-stranded DNA* = δίκλωνο DNA) σε cRNA με τη χρήση της T4 DNA πολυμεράσης, T3 RNA πολυμεράσης και T7 RNA πολυμεράσης. Η βασική αρχή της *in vitro* μεταγραφής είναι η αντίδραση της ανάστροφης μεταγραφής με χρήση ενός τροποποιημένου εκκινητή με θέση πρόσδεσης για την T7 RNA πολυμεράση. Στη συνέχεια, το μονόκλωνο cDNA μετατρέπεται σε δίκλωνο cDNA, το οποίο με τη σειρά του χρησιμοποιείται ως μήτρα για την αντίδραση της *in vitro* μεταγραφής (*In vitro Transcription – IVT*). Κατά την αντίδραση αυτή, η T7 RNA πολυμεράση προσδένεται στη θέση πρόσδεσής της και μεταγράφει πολλά αντίγραφα συμπληρωματικού RNA (*complementary RNA – cRNA* ή αντινόημα RNA – *aRNA*). Για την επισημάνση του παραγόμενου cRNA, μια δυνατή επιλογή αποτελεί η ενσωμάτωση κατά την IVT τροποποιημένων με αμινο-αλλυλική ομάδα νουκλεοτιδίων, και

έπειτα σύνδεση με τη φθορίζουσα χρωστική. Είναι μια πολύ ισχυρή τεχνική δεδομένου ότι μπορεί να ενισχύσει 20ng σε 2 ug του ολικού RNA αποδίδοντας περίπου 5000 φορές πολλαπλάσια ενίσχυση. Αυτό σημαίνει ότι τα δείγματα των 200ng θα μπορούσε να αποφέρουν 40 ug του cRNA ή δείγματα 2 ug του ολικού RNA θα μπορούσε να αποφέρουν έως και 100 ug του cRNA. Το cRNA (συμπληρωματικό RNA) καλείται επίσης aaRNA (anti-sense ενισχυμένο RNA). Τελικά, όταν τα επιθυμητά μόρια έχουν εξαχθεί και η ποιότητα του δείγματος είναι εξασφαλισμένη, τα νουκλεϊκά οξέα είναι επισημασμένα με φθοριοχρώματα και αφήνονται να υβριδοποιηθούν.

Το βασικό και αποφασιστικό βήμα στη μεθοδολογία μικροσυστοιχιών είναι η επιλογή του δείγματος και η εκχύλιση νουκλεϊνικού οξέος, με RNAs ή DNAs. Προκειμένου να προσδιοριστεί το γονιδιακό προφίλ έκφρασης σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία, δημιουργήθηκε η ανάγκη για «σύλληψη» RNA του κυττάρου ή DNA σε αυτή τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Η ποιότητα του DNA και RNA καθορίζει τα πειράματα που θα διεξαχθούν. Το αποτέλεσμα είναι το «στιγμιότυπο» της μεταγραφής σε μια δεδομένη χρονική στιγμή. Συνήθως, προκειμένου να λάβουμε περισσότερο ακριβείς πληροφορίες, είναι απαραίτητη η εκτέλεση πολλαπλών πειραμάτων σε διαφορετικά χρονικά σημεία ή συνθήκες, και στη συνέχεια μιλάμε για μια λειτουργική γονιδιωματική δοκιμασία.

Για την ανάλυση των επιπέδων mRNA χρησιμοποιήθηκαν δύο set μικροσυστοιχιές chips: cDNA μικροσυστοιχία chips (4,8 k γονίδια) που λαμβάνεται από την Takara (*IntelliGene™ II Ανθρώπινα CHIP 1*)^[61] και οι μικροσυστοιχιές chips (9,6 k γονίδια) από το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Έρευνας του Όγκου, *Microarray Core Facility* του Πανεπιστημίου *Philipps, Marburg*, Γερμανία (*IMT9.6 k*).

Για την παραγωγή του εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση χρησιμοποιήθηκαν οι φθορίζουσες χρωστικές Cy3 και Cy5. Το RNA που εκχυλίστηκε από τα κύτταρα CCRF-CEM βάφτηκε με Cy3 (αναφοράς) και το RNA από την κυτταρική σειρά TE-671 με Cy5 (πείραμα). Το βήμα αυτό έχει ως σκοπό τη μετατροπή του RNA σε μια επισημασμένη μορφή κατάλληλη για υβριδοποίηση^[55], περιλαμβάνει τη μετατροπή του απομονωμένου RNA σε cDNA ή σε συμπληρωματικό RNA (*complementary RNA – cRNA*) και την επισήμανση αυτού. Για την επισήμανση χρησιμοποιήσαμε τις φθορίζουσες χρωστικές Cyanine-3 (Cy3) και Cyanine-5 (Cy5), που είναι οι πιο δημοφιλείς για χρήση στις διχρωματικές μικροσυστοιχιές DNA.^[55] Η Cy3 έχει μέγιστα απορρόφησης και εκπομπής στα 550nm και στα 570nm, αντίστοιχα και διεγείρεται από πράσινο λέιζερ, ενώ η Cy5 έχει μέγιστα απορρόφησης και εκπομπής στα 649nm και στα 670nm, αντίστοιχα και διεγείρεται από κόκκινο λέιζερ. Ένας από τους βασικούς λόγους χρήσης των συγκεκριμένων φθορίζουσών χρωστικών είναι η μη σημαντική αλληλοεπικάλυψη των φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής μεταξύ τους. Είναι και οι δύο υψηλά φθορίζουσες και υδατοδιαλυτές. Η Cy5 είναι δυνητικώς πιο ασταθής και συγκεκριμένα πιο ευαίσθητη στην οξείδωση από το περιβαλλοντικό όζον, σε σύγκριση με τη Cy3. Έτσι, θα πρέπει να πάρουμε κάποια μέτρα ρύθμισης των επιπέδων του όζοντος.

Μετά την παραγωγή του επισημασμένου εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση από το κάθε βιολογικό δείγμα ακολουθεί το στάδιο της υβριδοποίησης. Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει ενδιάμεσα βήματα, (α) την αναστολή (blocking), την κατάλληλη κατεργασία της μικροσυστοιχίας με σκοπό την

ελαχιστοποίηση του σήματος θορύβου, (β) την προσθήκη του επισημασμένου εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση στη μικροσυστοιχία κάτω από μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, ώστε να επιτραπεί η αναδιάταξη των συμπληρωματικών αλληλουχιών, και (γ) την έκπλυση, για να απομακρυνθούν τα ελεύθερα ή ασθενώς υβριδοποιημένα στελέχη ^[55]. Πριν την υβριδοποίηση πραγματοποιείται μια ειδική διαδικασία ώστε να ανασταλεί η μη ειδική υβριδοποίηση ανάμεσα στο επισημασμένο εκχύλισμα και στην επιφάνεια του πλακιδίου. Η αναστολή παρεμποδίζει τις περιοχές εκείνες στην επιφάνεια της μικροσυστοιχίας, οι οποίες παραμένουν δραστικές μετά την κατασκευή της, ούτως ώστε να περιοριστεί ο φθορισμός θορύβου.^[55]

Η υβριδοποίηση, αφορά στο φαινόμενο όπου οι αναφορές της μικροσυστοιχίας και οι αλληλουχίες του επισημασμένου εκχυλίσματος υβριδοποίησης συνδέονται σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των *Watson-Crick*. Το φαινόμενο της υβριδοποίησης είναι μια σύνθετη διεργασία που εξαρτάται από μια πληθώρα παραγόντων, όπως (α) η θερμοκρασία, (β) η υγρασία, (γ) οι συγκεντρώσεις αλάτων, (δ) η συγκέντρωση φορμαμιδίου, (ε) ο όγκος του εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση, και (στ) ο ανθρώπινος παράγοντας. Η υβριδοποίηση συνήθως λαμβάνει χώρα από 12 έως 24 ώρες, ώστε να διασφαλίσουμε ότι η αντίδραση προσεγγίζει την κατάσταση χημικής ισορροπίας. Ο υβριδισμός πραγματοποιήθηκε με το εργαλείο CyScribe Post-Labeling (*GE Healthcare* (πρώην *Amersham Inc.*), *Buckinghamshire, UK*) όπως περιγράφεται από τον κατασκευαστή.

Μετά το πέρας της αντίδρασης υβριδοποίησης ακολουθείται η έκπλυση. Το βήμα αυτό ακολουθείται κυρίως για δύο λόγους. Ο πρώτος αφορά την απομάκρυνση της περίσσειας του επισημασμένου εκχυλίσματος προς υβριδοποίηση από τη μικροσυστοιχία γεγονός, που διασφαλίζει ότι οι μόνες επισημασμένες αλληλουχίες πάνω στο πλακίδιο είναι οι υβριδοποιημένες με τις αναφορές αλληλουχίες. Ο δεύτερος αφορά την απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερων μερικώς υβριδοποιημένων αλληλουχιών, δηλαδή μειώνοντας την αλληλο-υβριδοποίηση. Η έκπλυση, αντίθετα με την υβριδοποίηση, είναι αποτελεσματικότερη με χρήση μεγάλου όγκου διαλύματος (έκπλυσης), μιας και απομακρύνονται αποτελεσματικότερα οι ανεπιθύμητες προσμίξεις, οι οποίες δύναται να συνεισφέρουν στο σήμα θορύβου. Τα cDNA καθαρίστηκαν με το προϊόν *Qiagen PCR*. Τα πλακίδια ενεργοποιήθηκαν στους 55 ° C για 30 λεπτά σε 1% BSA. Τα δείγματα εφαρμόστηκαν πάνω στα πλακίδια, και αφέθηκαν για να υβριδοποιηθούν στους 55 ° C όλη τη νύκτα. Την επόμενη ημέρα, τα πλακίδια πλύθηκαν σε 200 ml 0,1×SSC και 0,1% SDS για 3×5 λεπτά, σε 200 ml 0,1×SSC για 2×5 λεπτά και σε 200 ml ddH₂O για 30 δευτερόλεπτα. Τα πλακίδια ξηραίνονται με φυγοκέντρηση σε 1500 rpm για 3 λεπτά και σαρώνονται με ένα σαρωτή μικροσυστοιχίας *ScanArray 4000XL* [*Perkin-Elmer Inc.* (πρώην *GSI Lumonics*), *Waltham, MA, USA*]. Οι εικόνες δημιουργήθηκαν με λογισμικό απόκτησης *ScanArray* μικροσυστοιχιών (*Perkin-Elmer Inc.*). Τα δεδομένα μικροσυστοιχιών έχουν υποβληθεί στη βάση δεδομένων GEO (*Accession No GSE34522*). Το τελευταίο βήμα της εργαστηριακής διαδικασίας αποτελεί η απόκτηση μιας ψηφιακής εικόνας της επιφάνειας της υβριδοποιημένης μικροσυστοιχίας. Η εικόνα αυτή λαμβάνεται με την τοποθέτηση του πλακιδίου μέσα σε ένα σαρωτή μικροσυστοιχιών, ο οποίος χρησιμοποιώντας μια πηγή φωτός στο κατάλληλο μήκος κύματος, ώστε να διεγερθεί η φθορίζουσα χρωστική των υβριδοποιημένων αλληλουχιών του

δείγματος, ανιχνεύει την εκπεμπόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία. Με τον τρόπο αυτό, μετράμε την ποσότητα των επισημασμένων αλληλουχιών του δείγματος, οι οποίες έχουν υβριδοποιηθεί με τις αναφορές της μικροσυστοιχίας, η ποσότητα αυτή εξαρτάται από την ένταση φθορισμού. Στις διχρωματικές μικροσυστοιχίες με τη σάρωση προκύπτουν δύο μονόχρωμες εικόνες, μία για το κάθε μήκος κύματος σάρωσης (ή κανάλι). Αυτές οι δύο εικόνες, αφού προστεθεί ψευδόχρωμα (κόκκινο και πράσινο για τις χρωστικές Cy5 και Cy3, αντίστοιχα) και ευθυγραμμιστούν, συνδυάζονται σε μια νέα εικόνα, στην εικόνα των διχρωματικών μικροσυστοιχιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4-ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

4.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ

Η διαθεσιμότητα των πακέτων λογισμικού για την ανάλυση δεδομένων μικροσυστοιχιών είναι πραγματικά εντυπωσιακή. Υπάρχουν πολλά διαθέσιμα πακέτα λογισμικού, αλλά υπάρχει επίσης μια πολύ ισχυρή κοινότητα προγραμματιστών και επιστημόνων που έχουν δημιουργήσει λογισμικό ανοιχτού κώδικα για μικροσυστοιχίες. Για την παρούσα ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί κατά κύριο λόγο το λογισμικό ανοιχτού κώδικα, εκτός από τα βήματα απόκτησης της εικόνας και των πρώτων δεδομένων εκχύλισης.

4.2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η ανάλυση μικροσυστοιχιών των πρώτων εικόνων και των πρώτων δεδομένων που αποκτήθηκαν έγινε με ImaGene® v.6.0 λογισμικό (BioDiscovery Inc., El Segundo, CA, USA) και το λογισμικό Armada, (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, Ελλάδα) το οποίο χρησιμοποιείται για περαιτέρω φιλτράρισμα, κανονικοποίηση και ομαδοποίηση των αναλύσεων.^[62] Τα δεδομένα συλλέχθηκαν από το εξαγόμενο αρχείο κειμένου και η επεξεργασία των πρώτων δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Microsoft Excel®. Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με δύο τρόπους: Ο πρώτος περιλαμβάνει το διαχωρισμό κάθε καναλιού (Cy3 και Cy5), και η δεύτερη περιλαμβάνει την πρώτη επεξεργασία της αναλογίας μεταξύ των δύο δειγμάτων.

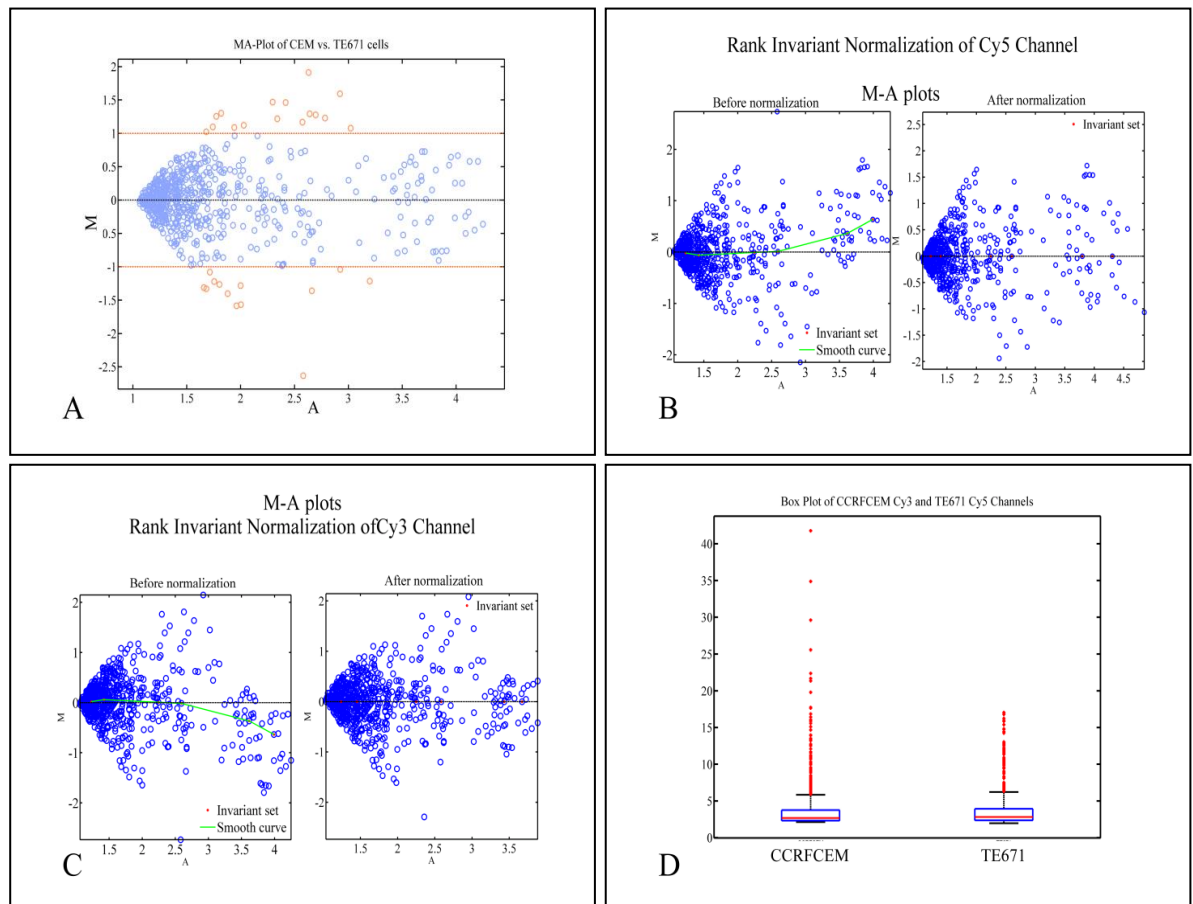
4.3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΡΟ-ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΘΟΡΥΒΟΥ

Ως θόρυβος (*background*) ορίζεται η τυχαία διακύμανση του σήματος φθορισμού ενός συγκεκριμένου ζεύγους υβριδοποίησης, και μετριέται ως ο συντελεστής μεταβλητότητας ενός συνόλου επαναλαμβανόμενων μετρήσεων. Ο θόρυβος μειώνεται καθώς αυξάνεται το μήκος των αναφορών. Ένα κοινό στάδιο προ-επεξεργασίας εφαρμόστηκε στα ακατέργαστα δεδομένα (η διάμεση τιμή έντασης σε κάθε κανάλι) και στις δυο πλατφόρμες. Συγκεκριμένα, η rLsBC (*robust Loess-based Background Correction*) μέθοδος εφαρμόστηκε για την διόρθωση του θορύβου. Η rLsBC υποθέτει ότι ο θόρυβος επηρεάζει τις εντάσεις με ένα πολλαπλασιαστικό τρόπο.^[56] Αντί να χρησιμοποιεί τις μετρήσεις του τοπικού θορύβου για τη διόρθωση, η rLsBC χρησιμοποιεί την εκτίμηση παλινδρόμησης της λογαριθμικής κατανομής του θορύβου $B^{R, G}$ σύμφωνα με την λογαριθμική ένταση καθαρού σήματος $F^{R, G}$ για κάθε κανάλι (R : το κόκκινο και G : το πράσινο). Έτσι, η rLsBC παρέχει μια ισχυρή εκτίμηση του θορύβου στο συγκεκριμένο κανάλι, χρησιμοποιώντας για τη διόρθωση του θορύβου, τη λογαριθμική ένταση καθαρού σήματος: $F^{R, G} = F^{R, G} - B^{R, G}$ όπου $F^{R, G}$ είναι η λογαριθμική ένταση καθαρού σήματος διορθωμένου θορύβου, και $B^{R, G}$ η σταθερή εκτίμηση του θορύβου, για κάθε κανάλι. Η απόλυτη

ένταση καθαρού σήματος διορθωμένου θορύβου $f_C^{R, G}$ για κάθε κανάλι στη συνέχεια υπολογίζεται ως εξής: $f_C^{R, G} = 2F_C^{R, G}$

4.4. ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

Οι εντάσεις του σήματος διορθωμένου θορύβου κανονικοποιούνται περαιτέρω ώστε να μετριάσει η επίδραση των εξωτερικών, μη βιολογικών διακυμάνσεων των μετρούμενων επιπέδων γονιδιακής έκφρασης. Η κανονικοποίηση διεξήχθη με τη χρήση έξι διαφορετικών μεθόδων: i) δεν υπήρξε περαιτέρω επεξεργασία μετά τη διόρθωση του θορύβου, ii) τον μετασχηματισμό $\log_2$, iii) lowess κανονικοποίηση (τοπικά σταθμισμένη εξομάλυνση), iv) διαίρεση με την ολική διάμεση τιμή (διάμεση τιμή του εκατοστημορίου 50%), v) την αφαίρεση της ολικής διάμεσης τιμής (διάμεση τιμή του εκατοστημορίου 50%) και vi) rank-invariant με την τρέχουσα διάμεση τιμή. Τέλος, η μέθοδος κανονικοποίησης rank-invariant επιλέχθηκε για περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυση.^[63-65] Η κανονικοποίηση rank-invariant περιλαμβάνει την ισχυρή έκδοση της LOWESS (*Locally Weighted Scatterplot Smoothing*)^[58] με ένα τετραγωνικό πολυώνυμο μοντέλο και μια παράμετρο εξομάλυνσης ίση με το 10%, που θεωρήθηκε κατάλληλη για τον σχετικά μικρό αριθμό των ανιχνευτών που επισυνάπτεται στις μικροσυτοιχίες. Τα αποτελέσματα κανονικοποίησης παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1**. Box plots χρησιμοποιήθηκαν για να εξετάσουμε την αποτελεσματικότητα της κανονικοποίησης όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1D**.



Εικόνα 1. Κανονικοποίηση των δεδομένων μικροσυστοιχιών. **(A)** MA- plot με ισχυρή loess κανονικοποίηση. Rank κανονικοποίηση για τα **(B)** Cy5 και **(C)** Cy3 κανάλια. **(D)** Ένα box-plot των δύο καναλιών φανερώνει ότι η κανονικοποίηση έχει εξαλείψει τη διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων.^[1, 3]

4.5. ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΑ

Οι μετρήσεις με χαμηλή ένταση του σήματος είναι λιγότερο αξιόπιστες από την άποψη των επιπτώσεων του θορύβου σε αυτά σε σχέση με τις μετρήσεις υψηλής έκφρασης του γονιδίου, μια ένταση που εξαρτάται από το φιλτράρισμα με απόλυτη οριακή τιμή 10 χρησιμοποιήθηκε σε κάθε κανάλι, προκειμένου να αποκλειστούν τα χαρακτηριστικά χαμηλής ποιότητας.^[66, 67] Τα γονίδια φιλτράρονται πρώτα για την ποιότητα του σημείου. Αυτό έγινε με την απόκτηση ενός σημείου «0» ως σήμανση σε κάθε σημείο, όπως εκτιμάται από το λογισμικό ImaGene Signal-to-Noise Ratio (SNR). Επιπλέον, η αναλογία σήματος προς θόρυβο χρησιμοποιήθηκε ως:

$$SNR = \frac{\mu_{R,G} - \mu_B}{\sigma_B}$$

όπου $\mu_{R,G}$ και μ_B είναι η μέση τιμή της έντασης για το αντίστοιχο κανάλι (Cy3 ή Cy5) και η μέση τιμή της έντασης θορύβου, αντίστοιχα και σ_B είναι η μέση τιμή του θορύβου που σηματοδοτεί την τυπική απόκλιση. Ένα όριο του 2 ορίστηκε ως τιμή αποκοπής, που σημαίνει ότι η ένταση στα σημεία για τουλάχιστον ένα κανάλι θα πρέπει να είναι διπλάσια από εκείνη του θορύβου.

4.6. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ/ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η ανάλυση ομαδοποίησης και η χαρτογράφηση των χρωμοσωμάτων διεξήχθησαν με ARMADA, Genesis 1.7.2 (*Technische Universitaet-Graz, Austria*) χρησιμοποιώντας Pearson's correlation και Spearman's rank order correlation και το διαδικτυακό εργαλείο WebGestalt (*Vanderbilt University, The Netherlands*, <http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm/>). Για την ανάλυση ομαδοποίησης, χρησιμοποιήθηκε ιεραρχική ομαδοποίηση από την Ευκλείδεια γεωμετρία. Επιπλέον, ομαδοποίηση *k-means* καθώς και ανάλυση PCA διεξήχθη μεταξύ ομάδων διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων. Πραγματοποιήσαμε την ομαδοποίηση των δεδομένων σε χαμηλότερο επίπεδο όπως περιγράφηκε προηγουμένως.^[68] Συγκεκριμένα, τα προ-επεξεργασμένα σύνολα δεδομένων από κάθε συστοιχία συνδυάστηκαν σε ένα ενιαίο σύνολο δεδομένων, στο οποίο εφαρμόστηκαν συνήθεις στατιστικές διαδικασίες. Ωστόσο ορισμένα βασικά ζητήματα έπρεπε να αντιμετωπιστούν, όπως η προ-επεξεργασία, η προετοιμασία και ο σχολιασμός των επιμέρους συνόλων δεδομένων, σε συμφωνία με τις κατευθυντήριες γραμμές που έχουν αναφερθεί προηγουμένως.^[69] Για την εκτέλεση της ομαδοποίησης των δεδομένων, δύο κύρια ζητήματα έπρεπε να επιλυθούν: i) η αντιστοίχιση ανιχνευτών στις δύο πλατφόρμες μικροσυστοιχιών και ii) η κανονικοποίηση των δεδομένων για την αντιμετώπιση των σχετικών διαφορών ανάμεσα στις δυο πλατφόρμες.^[55] Συγκεκριμένα, κάθε ανιχνευτής-ταυτοποίησης (αριθμοί πρόσβασης *GenBank*) χαρτογραφήθηκε σε ένα ταυτοποιημένο UniGene (*UniGene Cluster ID*).^[70-74] Η χαρτογράφηση έγινε μέσω του εργαλείου Source web-based^[75], ταυτόχρονα και για τις δύο πλατφόρμες, προκειμένου να αποφευχθούν ασυνέπειες.^[76] Όλοι οι ανιχνευτές-ταυτοποίησης που χαρτογραφήθηκαν είχαν μια σχέση ένα-προς-ένα με το γονίδιο-ταυτοποίησης, δηλαδή, κάθε ανιχνευτής συνδέθηκε με ένα μόνο ταυτοποιημένο UniGene και δεν

χαρτογραφήθηκε πάνω από ένας ανιχνευτής με το ίδιο ταυτοποιημένο UniGene. Ανιχνευτές που είχαν ανεπαρκείς πληροφορίες για να αντιστοιχηθούν με κάποιο ταυτοποιημένο γονίδιο παραλείφθηκαν. Έτσι, ένα πλήρως ενημερωμένο σύνολο μοναδικών ταυτοποιημένων γονιδίων δημιουργήθηκε για κάθε πλατφόρμα.

4.7. ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δεδομένα αναλύθηκαν περαιτέρω, προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια (*Differentially Expressed Genes (DEGs)*) και οι ομάδες των γονιδίων που έχουν κοινά χαρακτηριστικά έκφρασης. Τα βήματα ανάλυσης διεξήχθησαν στο υπολογιστικό περιβάλλον MATLAB®.

4.8. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΙΚΑ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ (DEGs)

Επιπλέον, κάθε γονίδιο ελέγχθηκε για την στατιστικά σημαντική διαφορική του έκφραση χρησιμοποιώντας το z-test. Τα γονίδια με σημαντικά διαφορική έκφραση θεωρήθηκαν αυτά που λαμβάνουν τιμή $p < 0,05$. Το ποσοστό σφάλματος (False Discovery Rate (FDR)) υπολογίστηκε όπως περιγράφηκε προηγουμένως.^[77-79] Υπήρξε FDR 1% για $p < 0,05$ για το chip μικροσυστοιχιών IntelliGene, και FDR 9% για $p < 0,01$ για το IMT 9,6 k chip μικροσυστοιχιών. Υπολογισμός του FDR για το συνδυασμό και των δύο πλατφόρμων δίνει FDR 6% για $p < 0,01$. Τα DEGs για κάθε πείραμα εντοπίστηκαν με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

4.9. ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ

Η χαρτογράφηση χρωμοσωμάτων φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την ανακάλυψη κοινών προτύπων έκφρασης μεταξύ των γονιδίων. Η κύρια ιδέα, αναφερόμενη αρχικά από τον Cohen *et al.*^[80], είναι η χαρτογράφηση γονιδίων σε χρωμοσωμικές περιοχές και αν υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ των γονιδίων τότε αυτές θα εμφανιστούν πιθανότατα μέσω των γονιδίων σε συγκεκριμένες θέσεις των χρωμοσωμάτων, δεδομένου ότι διαδοχικά γονίδια συχνά εκφράζονται ομοίως. Η χαρτογράφηση χρωμοσώματος πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Genesis 1.7.2 (Technische Universitaet-Graz, Αυστρία) χρησιμοποιώντας Pearson's correlation, τη Spearman's rank order correlation^[80-82] και το διαδικτυακό εργαλείο WebGestalt (Πανεπιστήμιο Vanderbilt, Ολλανδία; <http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm/>).^[83]

4.10. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Η κυτταρομετρία ροής των δεδομένων περιέχει μια μεγάλη ποσότητα πληροφοριών που χρειάζεται εξειδικευμένο λογισμικό, ώστε να αναλυθούν. Υπάρχουν πολλά διαθέσιμα πακέτα λογισμικού, που είναι πολύ καλά για την ανάλυση των δεδομένων κυτταρομετρίας ροής.

Για την παρούσα ανάλυση έχουμε χρησιμοποιήσει το WinMDI 2.8 έκδοση λογισμικού (*The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility* <http://facs.scripps.edu/software.html>) και το Cylchred έκδοση 1.0.2 (*Cardiff University, Ουαλία*), βάσει των αλγόριθμων που προτείνονται από τους *Watson et al* και τον *Ormerod et al.*^[52-54]

4.11. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ (TRANSCRIPTION FACTOR BINDING MOTIFS (TFBMS))

Πολύ σημαντική πτυχή της γονιδιακής έκφρασης είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω μεταγραφικών παραγόντων. Με τη διαθεσιμότητα χιλιάδων γονιδίων ταυτόχρονα, μπορούν να αναπτυχθούν νέες μέθοδοι που θα επέτρεπαν την πρόβλεψη των μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν τα διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια. TFBMs αναζητήθηκαν στη βάση δεδομένων Transcription Element Listening System Database (TELIS)^[84] (www.telis.ucla.edu) και το διαδικτυακό εργαλείο WebGestalt (*Vanderbilt University*; <http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm/>).^[83] Η βάση δεδομένων TRANSFAC TF χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των θέσεων πρόσδεσης γονιδίου TF.^[85]

4.12. ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ (GENE ONTOLOGY (GO))

Η ανάλυση της γονιδιακής οντολογίας (GO) είναι απαραίτητη για την εξαγωγή συμπερασμάτων από τα δεδομένα μικροσυστοιχιών. Η γονιδιακή οντολογία είναι μια βάση δεδομένων με αναφορές και σχολιασμούς για τα γνωστά γονίδια όπως βιολογικές διεργασίες γονιδίου, μοριακές λειτουργίες και κυτταρικά συστατικά. Η GO ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το διαδικτυακό εργαλείο eGOn για τη Γονιδιακή Οντολογία (Νορβηγικό Πανεπιστήμιο Επιστήμης και Τεχνολογίας, Trondheim, Νορβηγία, <http://www.genetools.microarray.ntnu.no/egon/>)^[86], λογισμικό Genesis 1.7.2^[82] και το διαδικτυακό εργαλείο WebGestalt.^[83] Οι συσχετίσεις μεταξύ των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων και των TFBMs ερευνήθηκαν περαιτέρω με τη χρήση της βάσης δεδομένων PubGene Ontology (www.pubgene.org). Για τη βιβλιογραφική αναζήτηση χρησιμοποιήθηκαν το Microarray Literature-based Annotation (MILANO) (<http://milano.md.huji.ac.il/>; *Department of Molecular Biology, Hadassah Medical School, Hebrew University, Jerusalem, Israel*)^[87] και το εργαλείο web-based. Ο ορισμός των γονιδίων και οι λειτουργίες τους βασίστηκαν στη βάση δεδομένων National Institutes of Health (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>).

4.13. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ

Αυτό είναι το τελικό στάδιο στην διαδικασία της ανάλυσης δεδομένων μικροσυστοιχιών, που επιχειρεί να δημιουργήσει μια σύνδεση μεταξύ του γονότυπου, όπως αποκαλύπτεται με την ανάλυση της μεταγραφής, και του παρατηρούμενου κυτταρικού φαινότυπου. Αυτή η διαδικασία μπορεί να διαιρεθεί περαιτέρω σε μικρότερα βήματα.

Το πρώτο βήμα θα είναι η χαρτογράφηση των εκφραζόμενων γονιδίων σε γνωστά μονοπάτια. Αυτό θα δώσει μια άμεση πρώτη εικόνα της συμμετοχής των γνωστών γονιδίων σε επιμέρους μονοπάτια. Το δεύτερο βήμα θα είναι η προσομοίωση των χαρτογραφημένων γονιδίων εντός του επιθυμητού μονοπατιού. Αυτό το βήμα είναι πιο περίπλοκο δεδομένου ότι περιλαμβάνει τη προσομοίωση των εν δυνάμει χημικών αντιδράσεων μεταξύ γονιδιακών προϊόντων δηλαδή πρωτεϊνών και μικρότερων μορίων. Τα διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια χαρτογραφήθηκαν σε διαφορετικά μονοπάτια χρησιμοποιώντας το λογισμικό Pathway Explorer (Technical University of Graz, Austria).^[88] Το ποσοστό των γονιδίων που ήταν παρόντα σε όλα τα γνωστά μονοπάτια διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας τις βάσεις δεδομένων που διατίθενται μέσω του λογισμικού Pathway Explorer. Για την ανάλυση μας χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων των μονοπατιών KEGG^[89-93], το CellDesigner^[94, 95] και το υπολογιστικό περιβάλλον Matlab v.7.6.0 με SimBiology®. Για την ανάλυση των συγχωνευμένων μονοπατιών χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο KEGGConverter (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, Ελλάδα, <http://www.grissom.gr/keggconverter>).^[96]

4.14. ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η 2D χρωμοσωμική παλινδρόμηση διεξήχθη μεταξύ των γονιδίων με κοινή έκφραση μεταξύ των δυο κυτταρικών σειρών RMS (TE-671) και ALL (CCRF-CEM). Η 3D χρωμοσωμική παλινδρόμηση διεξήχθη ανάμεσα στα κοινά εκφραζόμενα γονίδια μεταξύ των RMS και ALL, προσθέσαμε την τρίτη διάσταση, η οποία ήταν η μετασχηματισμένη αναλογία $\log_2$ των αντίστοιχων γονιδίων. Οι παλινδρομήσεις και η ανάλυση των δεδομένων έγιναν με το MATLAB® υπολογιστικό περιβάλλον (The Mathworks Inc. Natick, MA). Για τις γραμμικές 2D παλινδρομήσεις χρησιμοποιήθηκε η διωνυμική εξίσωση της μορφής $f(x)=y=ax^2+bx+c$, ενώ για τις 3D παλινδρομήσεις η εξίσωση της μορφής $f(x,y)=z=ay+bx+c$.

ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

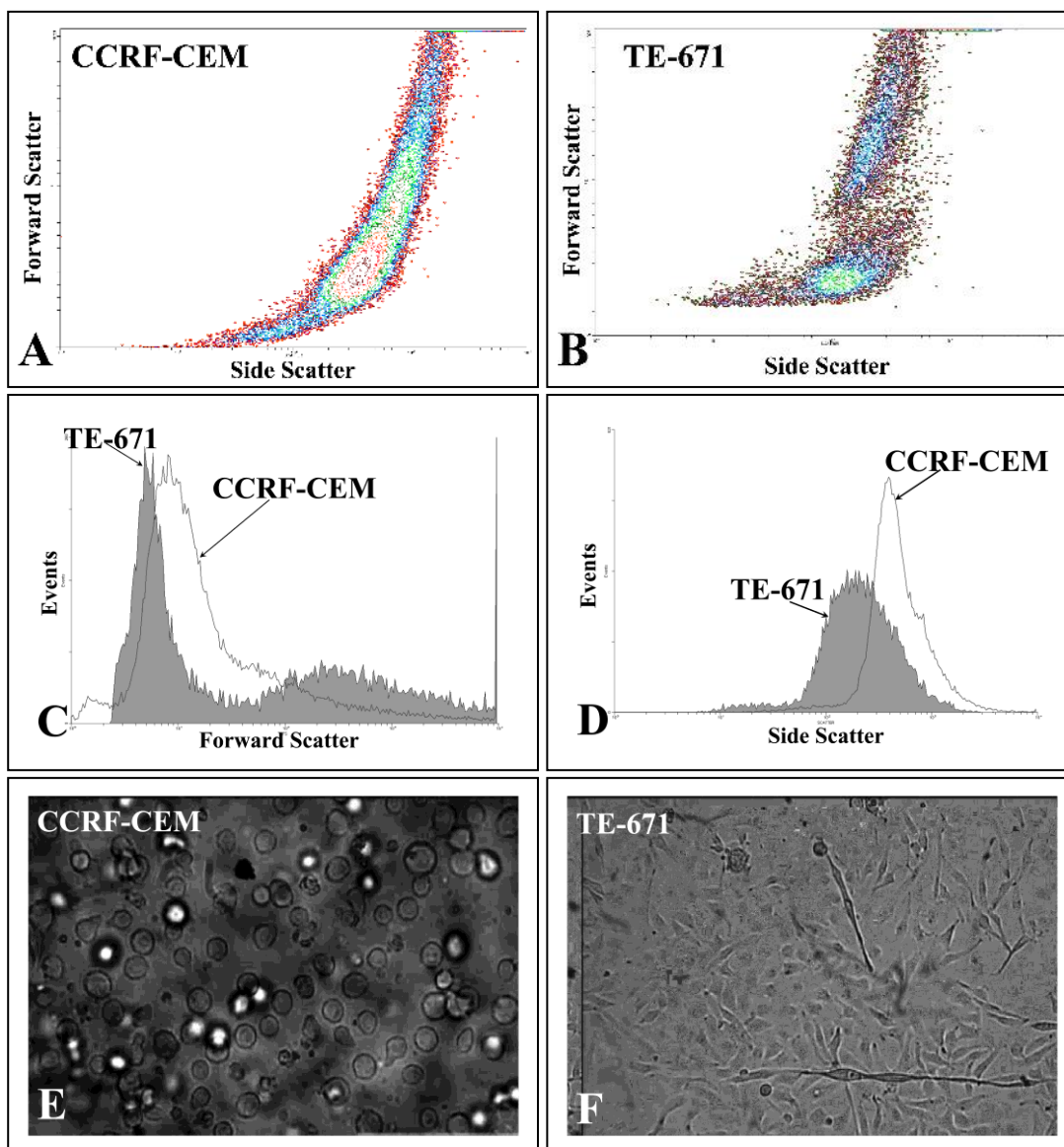
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία είναι η πιο συχνή μορφή κακοήθειας στην παιδική ηλικία. Το ραβδομυοσάρκωμα από την άλλη πλευρά είναι ένας σπάνιος τύπος σαρκώματος που ανήκει στην οικογένεια των πρωτογενών νευροεξωδερμικών όγκων. Οι δύο κακοήθειες είναι διαφορετικού κυτταρικού τύπου (λεμφοβλάστη και μυοβλάστη αντίστοιχα), παρά το γεγονός ότι και οι δύο είναι μεσοδερμικής προέλευσης. Η κατανόηση της προέλευσης των όγκων στο επίπεδο της αιμοποίησης/λεμφοποίησης ή μυογένεσης, μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων. Ως εκ τούτου, υποθέσαμε ότι οι δύο κυτταρικοί τύποι έχουν κοινά χαρακτηριστικά πρώτων λόγω της κοινής αναπτυξιακής καταγωγής τους, και δεύτερον λόγω του κακοήθους χαρακτήρα τους. Χρησιμοποιήσαμε μικροσυστοιχίες και υπολογιστικές προσεγγίσεις για να εξετάσουμε αν υπάρχουν κοινά πρότυπα έκφρασης μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων. Μέσα από αυτές τις προσεγγίσεις θα αποκαλυφθούν πιθανοί κοινοί μηχανισμοί που διέπουν την ογκογένεση ή στη χειρότερη περίπτωση, θα βελτιωθεί η σχέση κόστους-αποτελέσματος για το σχεδιασμό φαρμάκων.

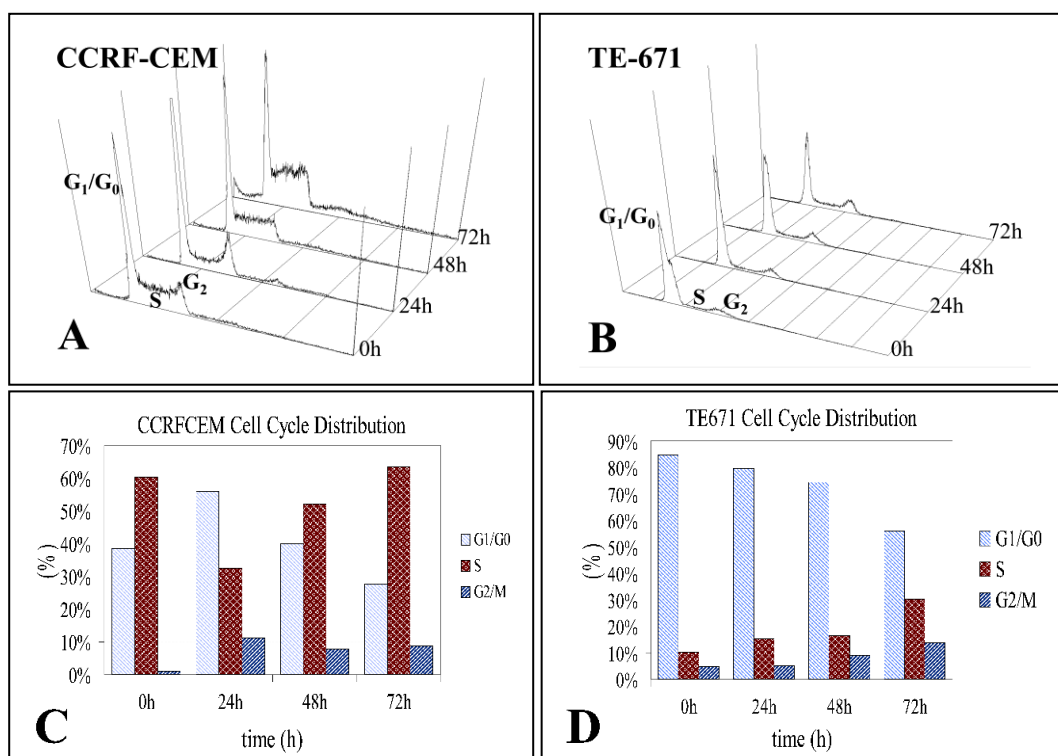
5.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ, ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ, ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.

Αυτά τα στάδια διεξήχθησαν προκειμένου να αποκτήσουμε εικόνα για βασικές διαφορές μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων. Τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν υπό συνήθεις συνθήκες για συνολικά 96 (από 24h έως 72h) ώρες έως ότου καταλήξουν σε τελικό πληθυσμό περίπου 1.5×10^3 κύτταρα / μl . Τα κύτταρα συλλέχθηκαν για περαιτέρω επεξεργασία για την κατανομή του κυτταρικού κύκλου. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα κύτταρα εκδηλώνουν διαφορετικές κατανομές FS έναντι SS (*forward vs. side scatter*) (**Εικόνα 2A, B**). Τα κύτταρα CCRF-CEM εκδηλώνουν πιο ομοιογενή πληθυσμό σε σύγκριση με τα TE-671 (**Εικόνα 2C, D**). Τα κύτταρα TE-671 εκδηλώνουν έναν κυτταρικό πληθυσμό με μεγαλύτερη διακύμανση σε μέγεθος και κοκκίωση. Αυτό ήταν αναμενόμενο αφού τα κύτταρα CCRF-CEM αναπτύσσονται σε εναιώρημα (**Εικόνα 2E**) που δίνει μεγαλύτερη ομοιομορφία στην μορφολογία τους, ενώ τα TE-671 είναι προσκολλημένα κύτταρα (**Εικόνα 2F**), έτσι παράγονται πληθυσμοί διαφορετικής μορφολογίας. Η κατανομή του κυτταρικού κύκλου έδειξε διαφορετικό πρότυπο ανάπτυξης. Τα κύτταρα CCRF-CEM εισήλθαν ταχέως στην S-φάση μετά από 24 ώρες σε καλλιέργεια (από 24h μέχρι 0h) (**Εικόνα 3A, Εικόνα 3B**). Αυτό έδειξε ότι η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου για τα CEM κύτταρα είναι ταχεία, δεδομένου ότι παρατηρήθηκε ταχεία εναλλαγή μεταξύ των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Καμία σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στην G2-φάση μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών. Αμφότερες οι κυτταρικές σειρές, παρά την είσοδο τους στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου σε διαφορετικά ποσοστά, ακολουθούν το ίδιο πρότυπο ανάπτυξης, αποδεικνύοντας ένα κοινό πρότυπο αντίδρασης στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, στην περίπτωση αυτή, της χωροχρονικής ανάπτυξης. Αυτό το πρότυπο ανάπτυξης αναμένεται να αποτυπωθεί στο

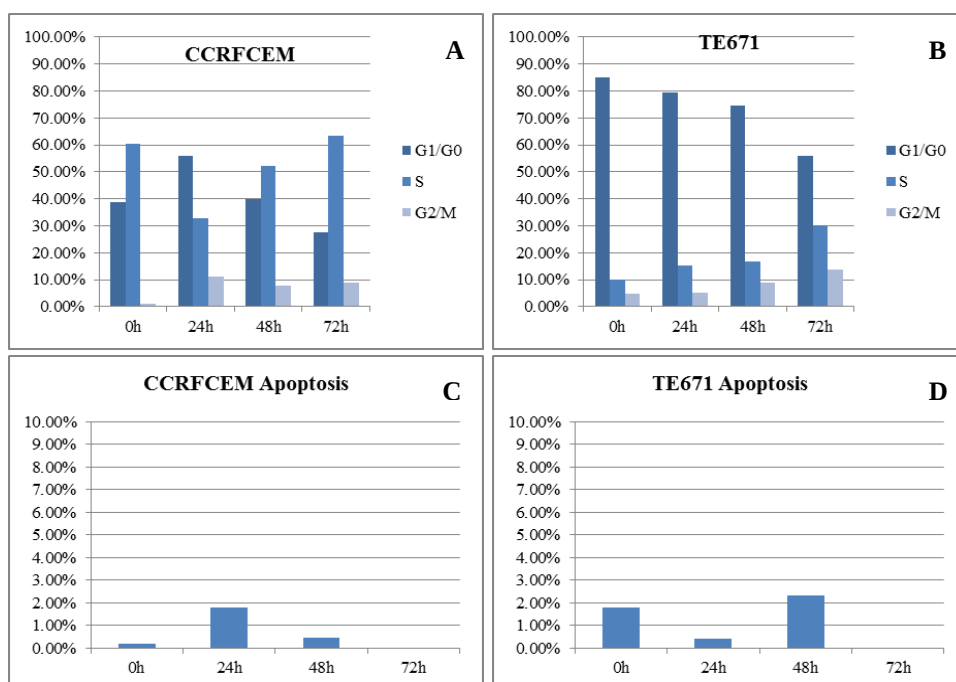
γονιδιακό προφίλ έκφρασης στις 72 ώρες. Δεδομένου ότι τα κύτταρα αυτά, εκδηλώνουν διαφορές στους μορφολογικούς τύπους, στα πρότυπα κατανομής του κυτταρικού κύκλου και στην δυναμική του πολλαπλασιασμού, ήταν αναμενόμενο ότι οι περισσότερες διαφορές θα παρατηρούνταν στην γονιδιακή έκφραση τους. Αυτό ισχύει εν μέρει, δεδομένου ότι αρκετά σημαντικά γονίδια ρυθμίζονται με παρόμοιο τρόπο στους δύο τύπους κυττάρων, όπως θα εξηγήσουμε στη συνέχεια. Επιπλέον, μετρήθηκε η απόπτωση ως το κλάσμα των κυττάρων με θραύσματα DNA για τα κύτταρα CCRF-CEM (Εικόνα 3C) και TE671 (Εικόνα 3D). Τα επίπεδα της απόπτωσης ήταν πολύ χαμηλά αποδεικνύοντας ότι τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται υπό ιδανικές συνθήκες.



Εικόνα 2. Ανάλυση των χαρακτηριστικών των κυτταρικών σειρών CCRF-CEM και TE-671 όπως εκδηλώνεται από τη κυτταρομετρία ροής στην καμπύλη διασποράς (*contour plot*) (A, B) αντίστοιχα, forward (C) και side scatters (D) και η μορφολογία τους στο μικροσκόπιο (E, F) αντίστοιχα. ^[1, 3]



Εικόνα 3. Η κατανομή του κυτταρικού κύκλου CCRF-CEM (A, C) και TE-671 (B, D). Τα πειράματα εκτελούνται εις διπλούν. Τα δεδομένα παρουσιάζονται από ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα. Και οι δύο τύποι κυττάρων έχουν καλλιιεργηθεί σε χρόνο 24h και μετρώνται σε 0h και κάθε 24h στη συνέχεια. Και οι δύο τύποι κυττάρων εισέρχονται στην S-φάση σε 0h με μία ταχεία μείωση στις 24 ώρες και σταδιακή αύξηση στη συνέχεια. Στη G1-φάση εκδηλώνεται επίσης μια σταδιακή μείωση από τις 24h έως τις 72h. Τέλος, υπάρχει μια μικρή διακύμανση στην G2-φάση με την πάροδο του χρόνου. ^[1, 3]



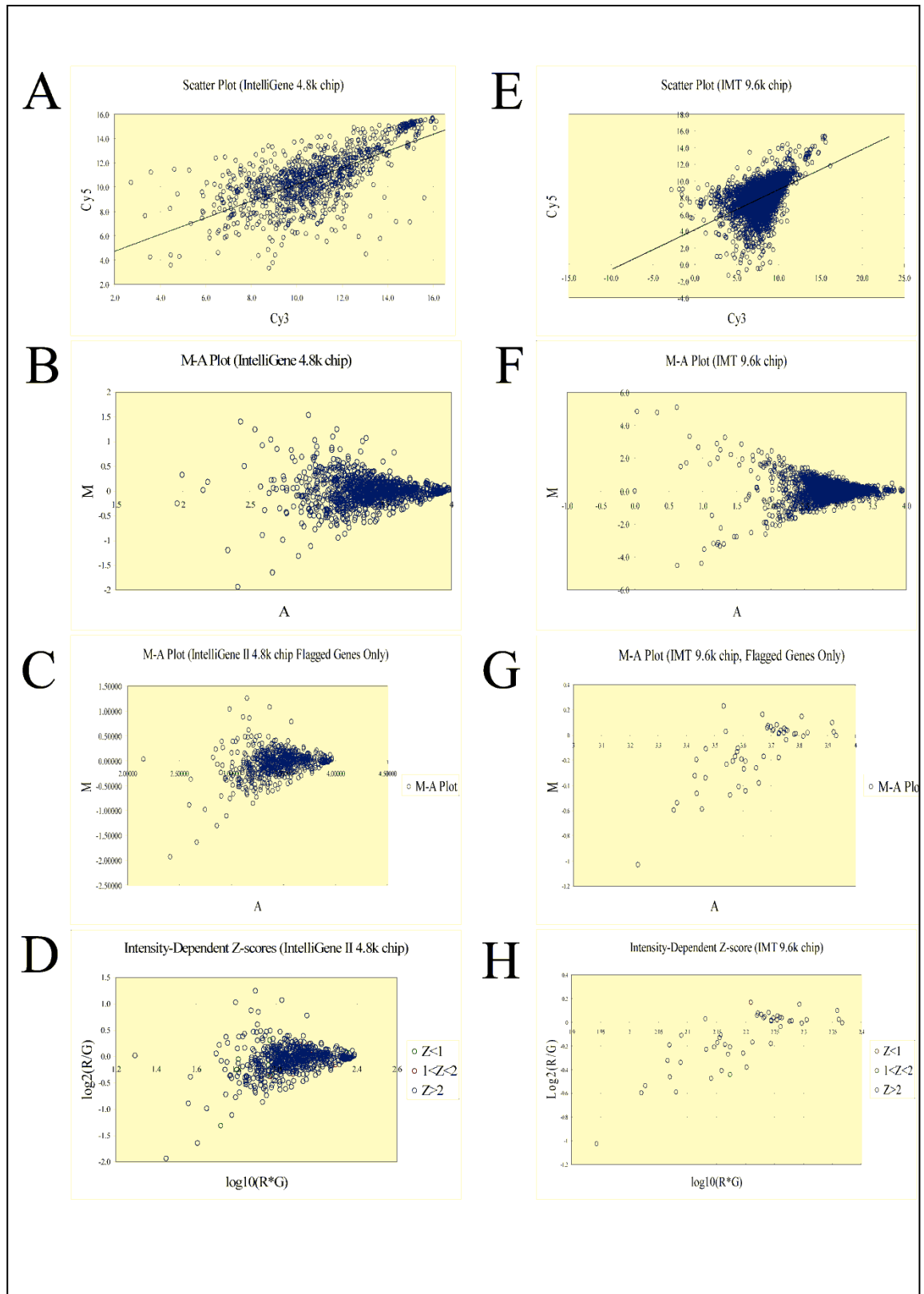
Εικόνα 4. Η κατανομή του κυτταρικού κύκλου σε σχέση με το χρόνο για τις κυτταρικές σειρές (A) CCRF-CEM και (B) TE-671. Η απόπτωση ήταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα για τις κυτταρικές σειρές (C) CCRF-CEM και (D) TE671 κυτταρικές σειρές. ^[1, 3]

5.2. ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ, ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ

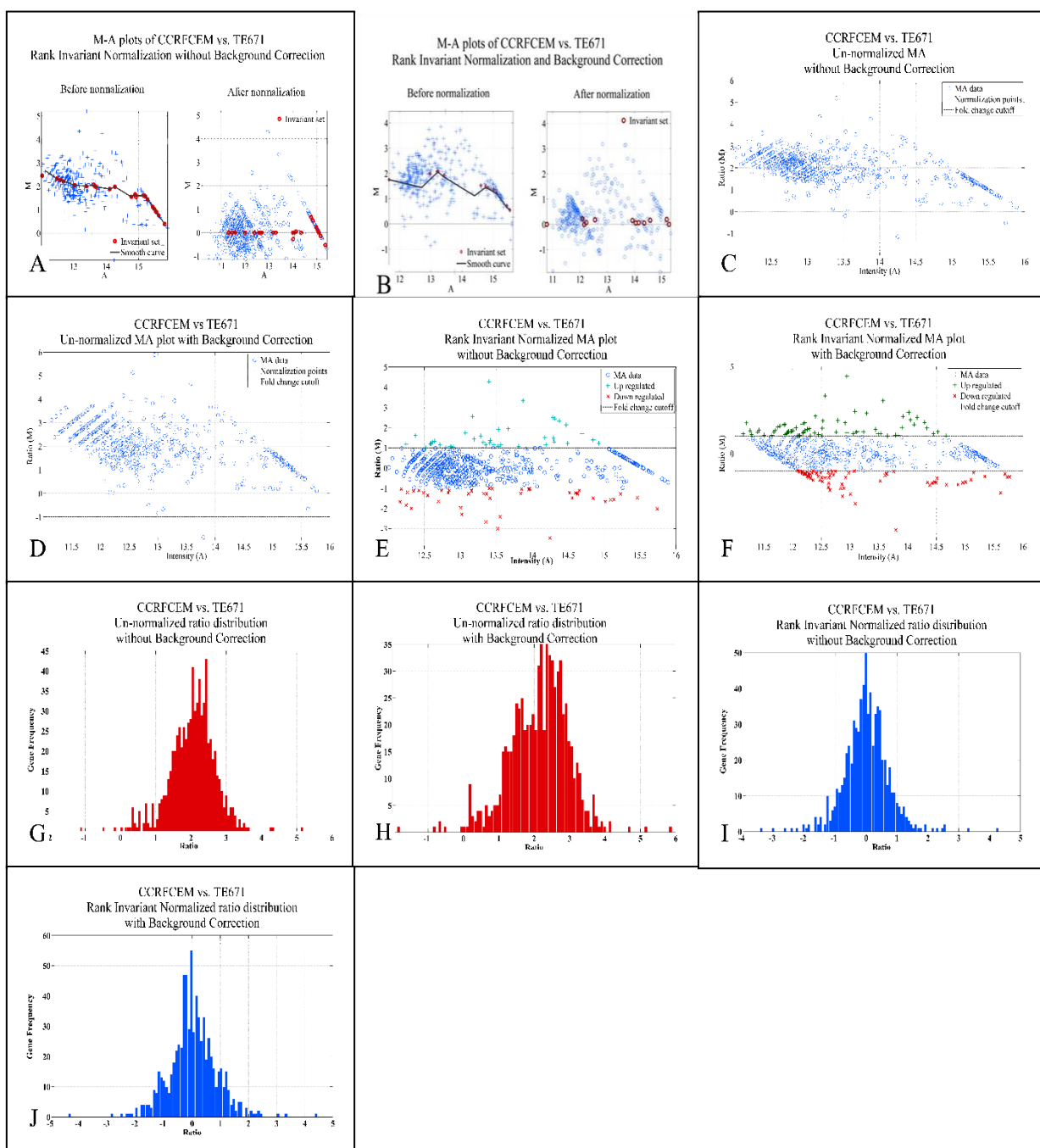
Στο χρονικό σημείο 72h τα κύτταρα συλλέχθηκαν για περαιτέρω επεξεργασία για να γίνει η ανάλυση μικροσυστοιχίας. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με δυο τρόπους: πρώτον, διαχωρίσαμε τα δύο κανάλια και συγκρίναμε τις εντάσεις του κάθε γονιδίου εντός του ίδιου κυτταρικού τύπου και δεύτερον, εξετάσαμε και αναλύσαμε την αναλογία των δύο δειγμάτων.

Αρκετοί αλγόριθμοι χρησιμοποιούνται για την κανονικοποίηση των δεδομένων, όπως περιγράφεται στην προηγούμενη ενότητα. Στην **Εικόνα 5** παρουσιάζονται τα διαγράμματα διασποράς (*scatter plots*) για τις δύο πλατφόρμες μικροσυστοιχίας (**Εικόνα 5A, E**) και τα M-A plots όλων των γονιδίων στα chips (**Εικόνα 5B, F**) όπως επίσης και των γονιδίων που φιλτραρίστηκαν με SNR (**Εικόνα 5C, G**) των κανονικοποιημένων δεδομένων. Για να ορίσουμε υπέρ-, υπό- και κοινώς-εκφραζόμενα γονίδια, ορίστηκε ως κατώφλι ο βαθμός έκφρασης 1 (*fold expression*) στην κλίμακα $\log_2$, για παράδειγμα, εάν ένα γονίδιο παρουσίασε βαθμό έκφρασης $-1 \leq x \leq 1$ θεωρήθηκε ότι είναι αμετάβλητο (κοινώς-εκφραζόμενο) μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων και εάν ένα γονίδιο παρουσίασε $x <$

-1 ή $x > 1$ θεωρήθηκε ότι είναι υπό- και υπέρ- εκφραζόμενο αντίστοιχα. Η ανάλυση μικροσυστοιχίας των πλατφόρμων TAKARA και IMT έδειξε συνολικά 660 και 45 γονίδια αντίστοιχα (συμπεριλαμβανομένων των *ESTs*), δηλαδή καλής ποιότητας κηλίδες που έδειξαν τρεις κύριους τύπους έκφρασης (υπέρ-, υπό- και κοινής έκφρασης). Συνολικά, από το σύνολο των γονιδίων βρέθηκαν, 228 που σχετίζονται με λευχαιμία, 78 με ραβδομυοσάρκωμα, 76 προς την κυτταρική σειρά CCRF-CEM και 8 προς την TE-671 κυτταρική σειρά. Ταυτόχρονα, συγκρίθηκαν οι διαδικασίες κανονικοποίησης και επιλέχθηκε η μέθοδος κανονικοποίησης rank invariant. Οι άλλες μέθοδοι κανονικοποίησης υποθέτουν ότι τα γονίδια στην πλειοψηφία τους παραμένουν αμετάβλητα. Ενώ η rank invariant κανονικοποίηση δεν κάνει προηγουμένως παραδοχές για την έκφραση του γονιδίου και υπολογίζει ένα αμετάβλητο σύνολο γονιδίων που χρησιμοποιείται για την περαιτέρω κανονικοποίηση. Στην **Εικόνα 6** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της rank invariant κανονικοποίησης. Δεδομένου ότι υπήρχε ένα πείραμα μικροσυστοιχίας, αναμένουμε τρεις κύριους άξονες: υπό-έκφρασης, υπέρ-έκφρασης και κοινής έκφρασης των γονιδίων. Ωστόσο, προκειμένου να υπολογιστεί η συσχέτιση μεταξύ αυτών των γονιδίων διεξήχθη μία κατά μέσο όρο ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης (δεν παρουσιάζεται). Ο μόνος λόγος για την εκτέλεση της ανάλυσης ομαδοποίησης σε αυτό το σύνολο δεδομένων ήταν να απεικονιστούν τα γειτονικά γονίδια και να δημιουργηθούν λίστες των γονιδίων που εκφράζονται το ίδιο στους δυο κυτταρικούς τύπους.



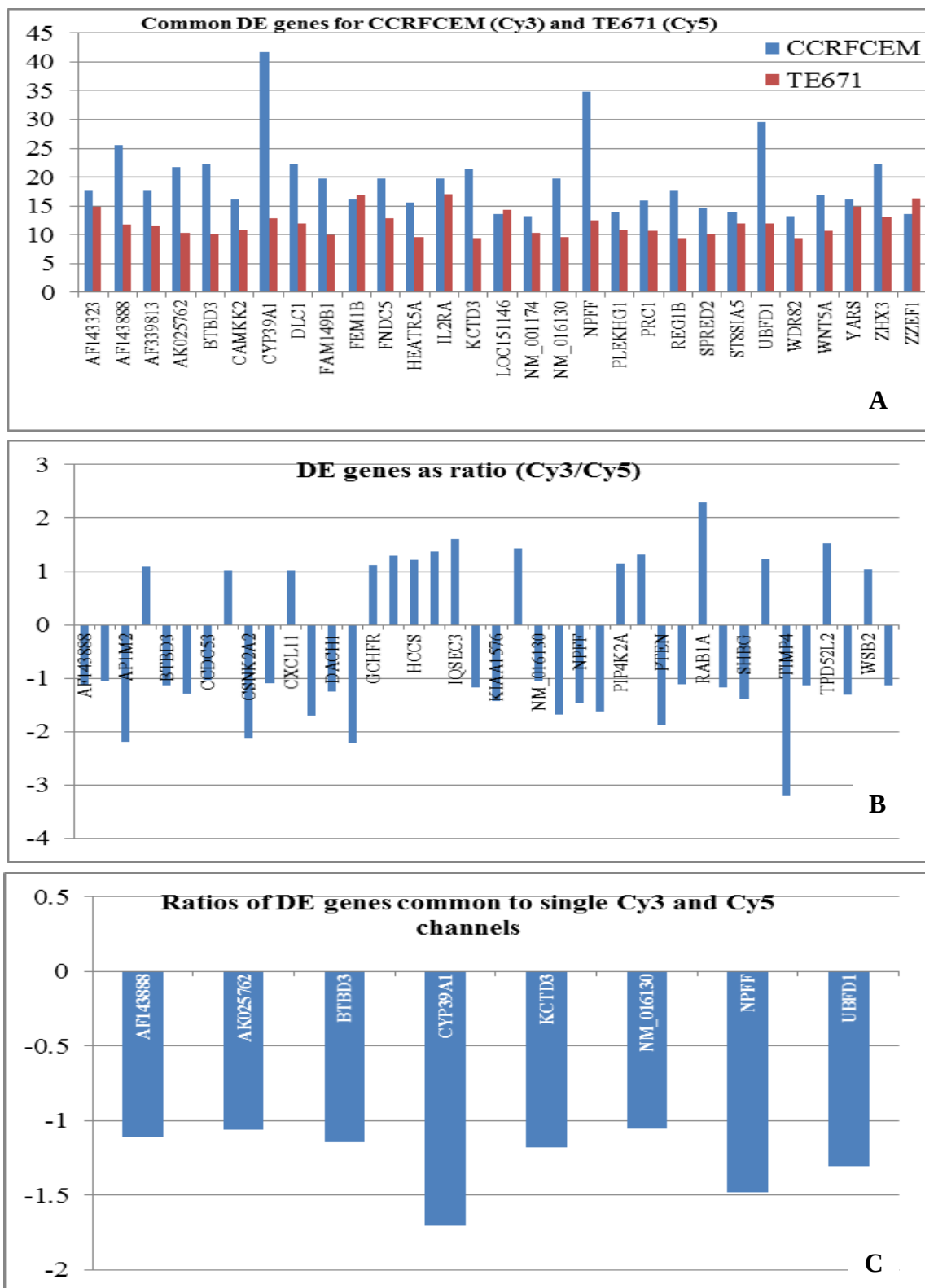
Εικόνα 5. Αναπαράσταση των κανονικοποιημένων δεδομένων μικροσυστοιχίας, με τη μορφή διαγραμμάτων διασποράς (scatter plots) (A), (E), M-A plots για όλα τα γονίδια στις δύο πλατφόρμες (B), (F), M-A plots για τα σημασμένα γονίδια, δηλαδή εκείνα που πέρασαν το κριτήριο φιλτραρίσματος SNR (C), (G) και εξαρτώμενα της έντασης Z-scores (D) και (H) IntelliGene 4.8k chip και IMT 9.6k chip αντίστοιχα. ^[1, 3]



Εικόνα 6. Rank invariant κανονικοποίηση του συνόλου των δεδομένων μικροσυστοιχίας σε σύγκριση με διάφορες παραλλαγές, δηλαδή με και χωρίς διόρθωση του θορύβου. Τα κοινά γονίδια παρουσιάζονται στην (Α, Β και στη D,E, F) η κανονικοποίηση του συνόλου των δεδομένων παρουσιάζεται με τις διακεκομμένες γραμμές για το βαθμό έκφρασης. Στην (G, H, I, J) οι κατανομές γονιδιακών συχνοτήτων παρουσιάζονται με ή χωρίς διόρθωση του θορύβου και με ή χωρίς rank invariant κανονικοποίηση.^[1, 3]

Τα διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια (DEGs) ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση του z-test, και τα γονίδια με μία τιμή $p < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά. Όλα τα άλλα γονίδια θεωρήθηκαν ότι εκφράζονται το ίδιο και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Η Εικόνα 7 παρουσιάζει τα DEGs που πήραμε από κάθε τύπο ανάλυσης. Τα στατιστικά σημαντικά εκφραζόμενα γονίδια και στα δύο δείγματα, καθώς επίσης και κατά τη σύγκριση μεταξύ τους, ήταν τα AF143888, AK025762, BTBD3,

CYP39A1, KCTD3, NM_016130, NPFF και UBFD1. Όλα αυτά τα γονίδια είναι υπό-εκφραζόμενα στα κύτταρα TE-671, σε σύγκριση με τα κύτταρα CCRF-CEM (**Εικόνα 7C**). Αυτά τα γονίδια πιθανόν είναι μοναδικά για κάθε κυτταρικό τύπο και είναι αυτά που διαφοροποιούν τον ένα κυτταρικό τύπο από τον άλλον.

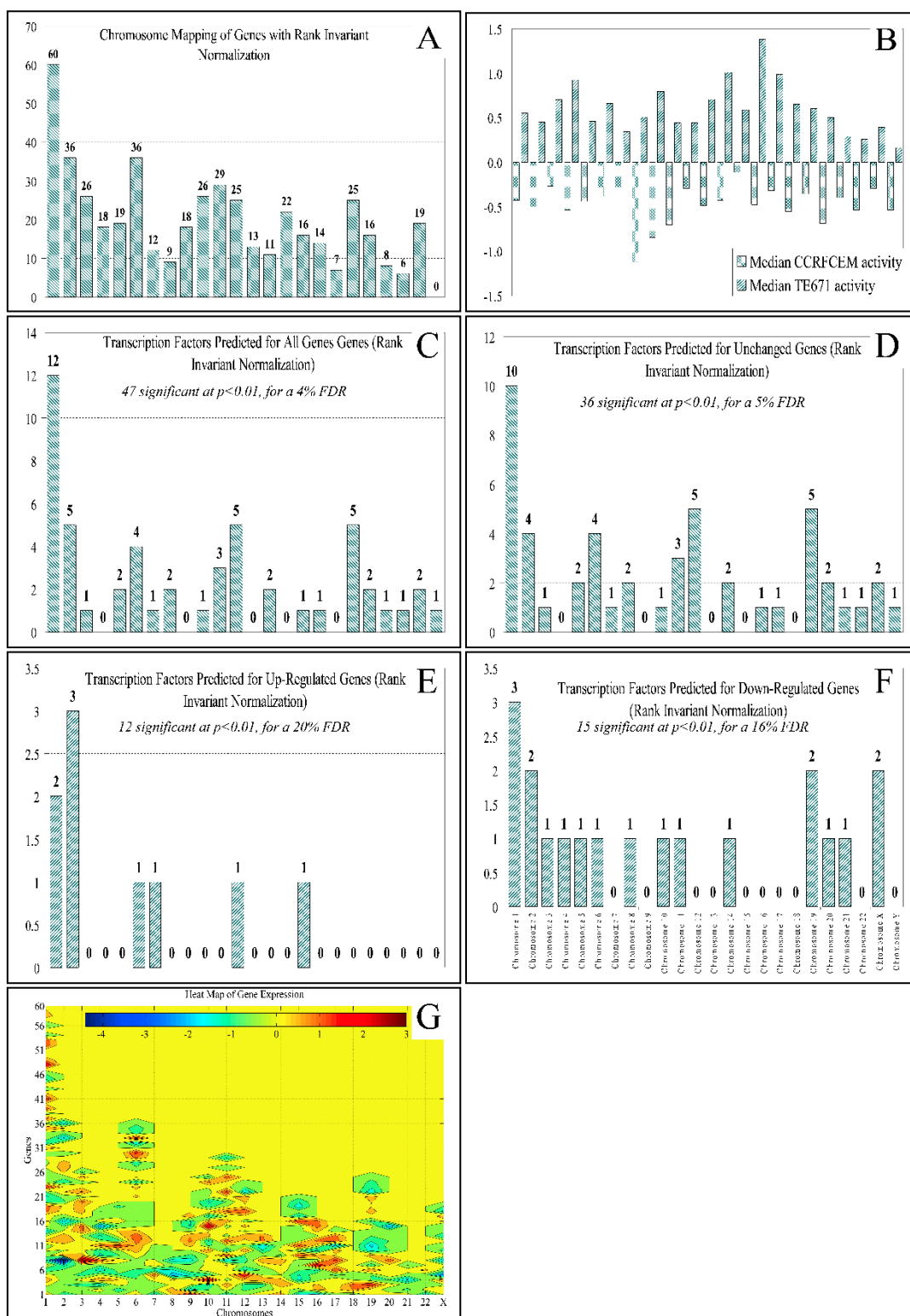


Εικόνα 7. Δεδομένα μικροσυστοιχίας για το κάθε κανάλι (A), των αναλογιών γονιδίου (B) και κοινά DEGs για τα κανάλια μεμονωμένα και των αναλογιών (C). DE: διαφορικά εκφραζόμενα. ^[1-3]

5.3. ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ

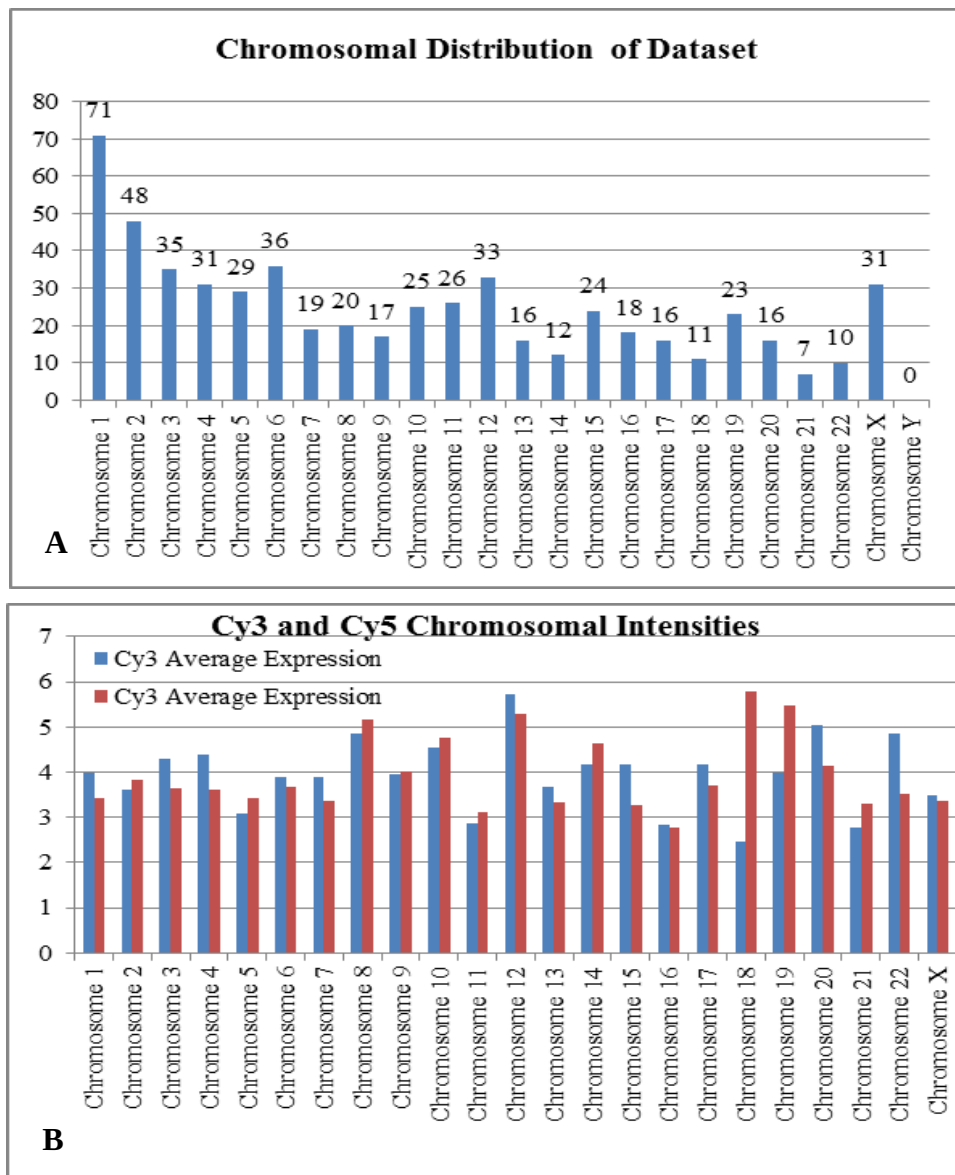
Τα γονίδια χαρτογραφήθηκαν στα 24 ανθρώπινα χρωμοσώματα (**Εικόνα 8**). Υπάρχει μια σχετικά ισότιμη κατανομή των γονιδίων σε κάθε χρωμόσωμα, με την εξαίρεση του χρωμοσώματος 1 στο οποίο χαρτογραφήθηκαν 57 γονίδια (~9%). Μετά από αυτό ακολουθεί το χρωμόσωμα 2 με 39 γονίδια (6,6%), το χρωμόσωμα 6 με 31 γονίδια (5,3%), τα χρωμοσώματα 4 και 10 με 28 και 27 γονίδια, αντίστοιχα (~4,7%) και τα χρωμοσώματα 3, 5, 11, 12, 15, και 19 με ~25 γονίδια (~4%). Στο X χρωμόσωμα χαρτογραφήθηκαν 22 γονίδια (3,7%). Στην **Εικόνα 8B**, έχουμε υπολογίσει τη διάμεσο της γονιδιακής έκφρασης όλων των γονιδίων που ανήκουν σε ένα χρωμόσωμα και παρουσιάζεται με τη μορφή ενός διαγράμματος. Τόσο οι θετικές όσο και οι αρνητικές τιμές δείχνουν μέτρα έκφρασης: θετικές τιμές σημαίνουν υπέρ-έκφραση των γονιδίων στα κύτταρα TE671 πάνω από την έκφραση των γονιδίων στα κύτταρα CEM, ενώ οι αρνητικές τιμές σημαίνουν υπέρ-έκφραση των CEM γονιδίων πάνω από την έκφραση των TE671 γονιδίων. Σε αυτή την εικόνα παρατηρήσαμε ότι το διάγραμμα στην πραγματικότητα αντιπροσωπεύει τη διαφορά μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων. Τα κύτταρα CEM εκδηλώνουν τη μέγιστη τιμή της διαμέσου της γονιδιακής έκφρασης στο χρωμόσωμα 8, ενώ τα κύτταρα TE671 εκδηλώνουν την κορυφαία τιμή της διαμέσου στο χρωμόσωμα 15. Και στις δύο περιπτώσεις η διάμεσος της γονιδιακής έκφρασης έχει ένα ταλαντευόμενο πρότυπο. Το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης σε ολόκληρη τη χρωμοσωμική κατανομή αποτελεί μια πολύ ενδιαφέρουσα ιδέα και χρειάζεται περαιτέρω έρευνα. Όταν χαρτογραφήθηκαν οι προβλεπόμενοι TFBSs στα χρωμοσώματα, κάναμε μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση. Παρά το γεγονός ότι παρατηρήθηκε μέγιστη δραστηριότητα των κυττάρων TE671 στο χρωμόσωμα 15, χαρτογραφήθηκαν μη προβλεπόμενοι TFBSs σε αυτό το χρωμόσωμα για τα κοινά, υπό-ρυθμιζόμενα και υπέρ-ρυθμιζόμενα γονίδια. Αυτό δείχνει ότι κανένας από τους γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες δεν συμμετέχει στην γονιδιακή δραστηριότητα στο χρωμόσωμα 15. Από την άλλη πλευρά, στο χρωμόσωμα 8, όπου παρατηρήθηκε η υψηλότερη δραστηριότητα των CEM κυττάρων, χαρτογραφήθηκαν δύο μεταγραφικοί παράγοντες, ο CEBPD (*CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta*) και ο E2F5 (*E2F transcription factor 5, p130-binding*). Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες φαίνεται να είναι στα γονίδια που έχουν κοινή έκφραση και το ίδιο έχει προβλεφθεί για τα υπό-ρυθμιζόμενα γονίδια, δηλαδή αυτά τα γονίδια που υπέρ-εκφράζονται στα κύτταρα CEM (**Εικόνα 8C, D, E, και F**). Στην χαρτογράφηση των χρωμοσωμάτων περιλαμβάνονται: i) όλα τα γονίδια μετά από το φιλτράρισμα για κάθε κανάλι ξεχωριστά, ii) η αναλογία των δειγμάτων για όλα τα γονίδια μετά το φιλτράρισμα, iii) κοινά DEGs για κάθε κανάλι ξεχωριστά, iv) DEGs για την αναλογία των δειγμάτων, v) κοινά εκφραζόμενα γονίδια για κάθε κανάλι ξεχωριστά και την αναλογία των δειγμάτων. Έγινε ανάλυση όλων των γονιδίων μετά το φιλτράρισμα για κάθε κανάλι ξεχωριστά. Υπήρξε μια σχετικά ισοδύναμη κατανομή των DEGs σε κάθε χρωμόσωμα, με εξαίρεση το χρωμόσωμα 1 με DEGs (10,66%). Το χρωμόσωμα 2 με 48 DEGs (7,21%), ακολουθούμενο από το χρωμόσωμα 6 με 36 DEGs (5,4%), και τα χρωμοσώματα 4 και 10 με 31 και 25 DEGs, αντίστοιχα (~ 4,7%). Τα χρωμοσώματα 3, 5, 11, 12, 15 και 19 χαρτογραφήθηκαν με ~25 DEGs (~4%). Το χρωμόσωμα X με 31 DEGs (3,7%) (Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της

αναφοράς δεν βρέθηκε.). Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν ότι ο αριθμός των γονιδίων δεν συσχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης σε κάθε χρωμόσωμα. Έτσι, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν στα χρωμοσώματα 12, 18 και 19 και όχι στα χρωμοσώματα 1 και 2, στα οποία χαρτογραφήθηκε ο μεγαλύτερος αριθμός γονιδίων.



Εικόνα 8. Χρωμοσωμικές κατανομές των γνωστών γονιδίων και των προβλεπόμενων TFBMs. Όλα τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια χαρτογραφήθηκαν στα χρωμοσώματα(A),ενώ η διάμεσος της γονιδιακής έκφρασης χαρτογραφήθηκε χωριστά για κάθε κυτταρικό τύπο με βάση τα επίπεδα έκφρασης (που ορίζεται ως η δραστηριότητα του γονιδίου)(B).Οι προβλεπόμενοι TFBMs χαρτογραφήθηκαν στα χρωμοσώματα για να βρεθεί η

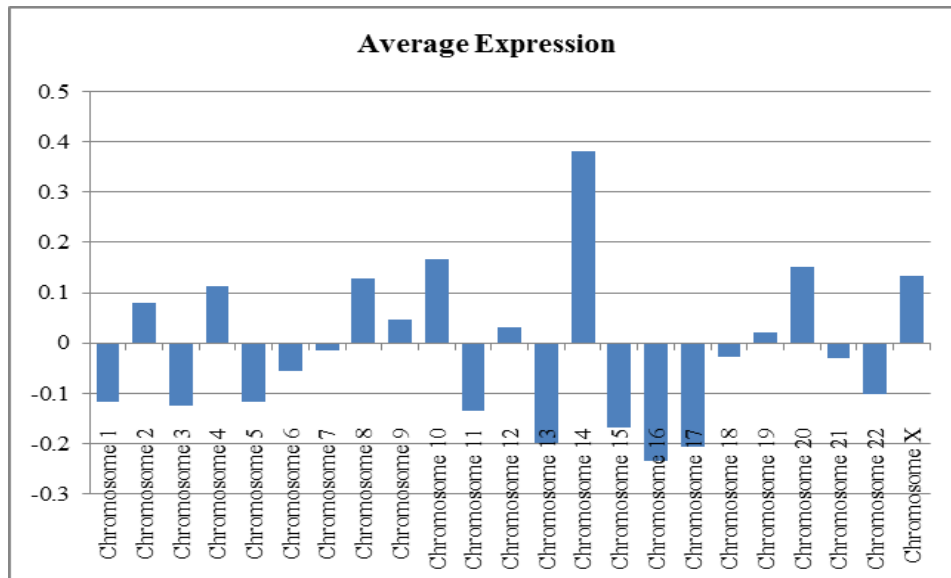
κατανομή τους (**C,D, E, και F**) θερμικός χάρτης της γονιδιακής έκφρασης με βάση την χρωμοσωμική κατανομή έγινε για την ανίχνευση χρωμοσωμικών περιοχών που είναι μεταγραφικά δραστικές (**G**).^[1, 3]



Εικόνα 9. (Α) Χρωμοσωμική έκφραση όλων των γονιδίων και (Β) ξεχωριστά για κάθε κανάλι (Cy3 και Cy5).^[1, 3]

5.4. ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΟΛΑ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΜΕΤΑ ΤΟ ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΑ

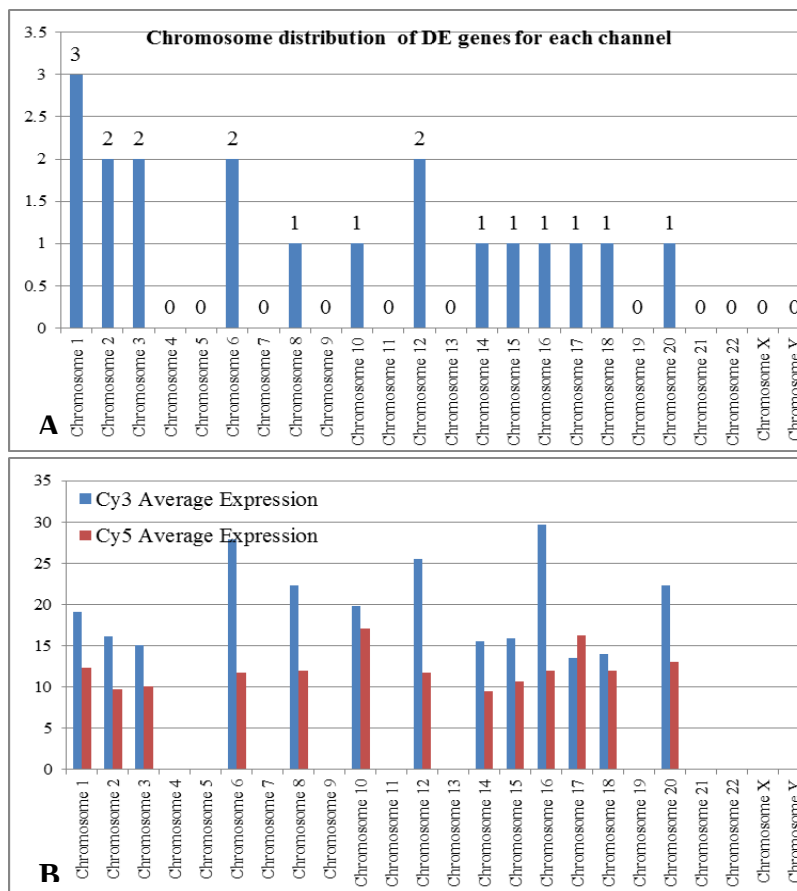
Η μέση γονιδιακή έκφραση υπολογίστηκε με το λόγο Cy5/Cy3 (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**). Η υψηλότερη μέση τιμή έκφρασης παρατηρήθηκε στο χρωμόσωμα 14.



Εικόνα 10. Μέση γονιδιακή έκφραση στο κάθε χρωμόσωμα υπολογιζόμενη με το λόγο Cy5/Cy3.^[1, 3]

5.5. ΚΟΙΝΑ DEGs ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΚΑΝΑΛΙ ΞΕΧΩΡΙΣΤΑ

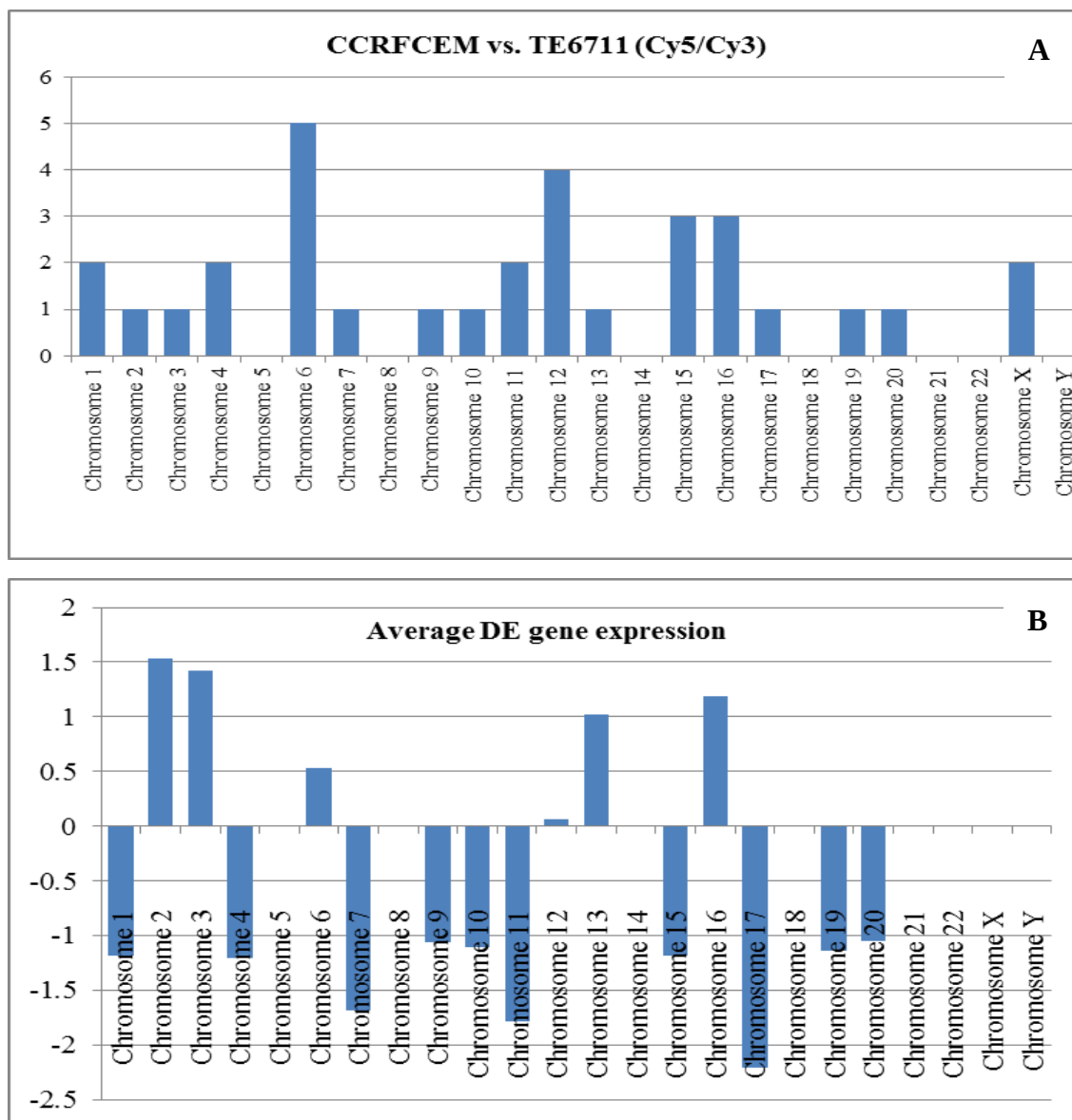
Ο διαχωρισμός των DEGs με βάση την χρωμοσωμική έκφραση παρουσιάζεται στην **Εικόνα 11**. Υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν στα χρωμοσώματα 6 και 16.



Εικόνα 11. (A) Χρωμοσωμική κατανομή και (B) έκφραση των DEGs, ξεχωριστά για κάθε κανάλι (Cy3 and Cy5). DE: διαφορεικά εκφραζόμενα. ^[1-3]

5.6. DEGS ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

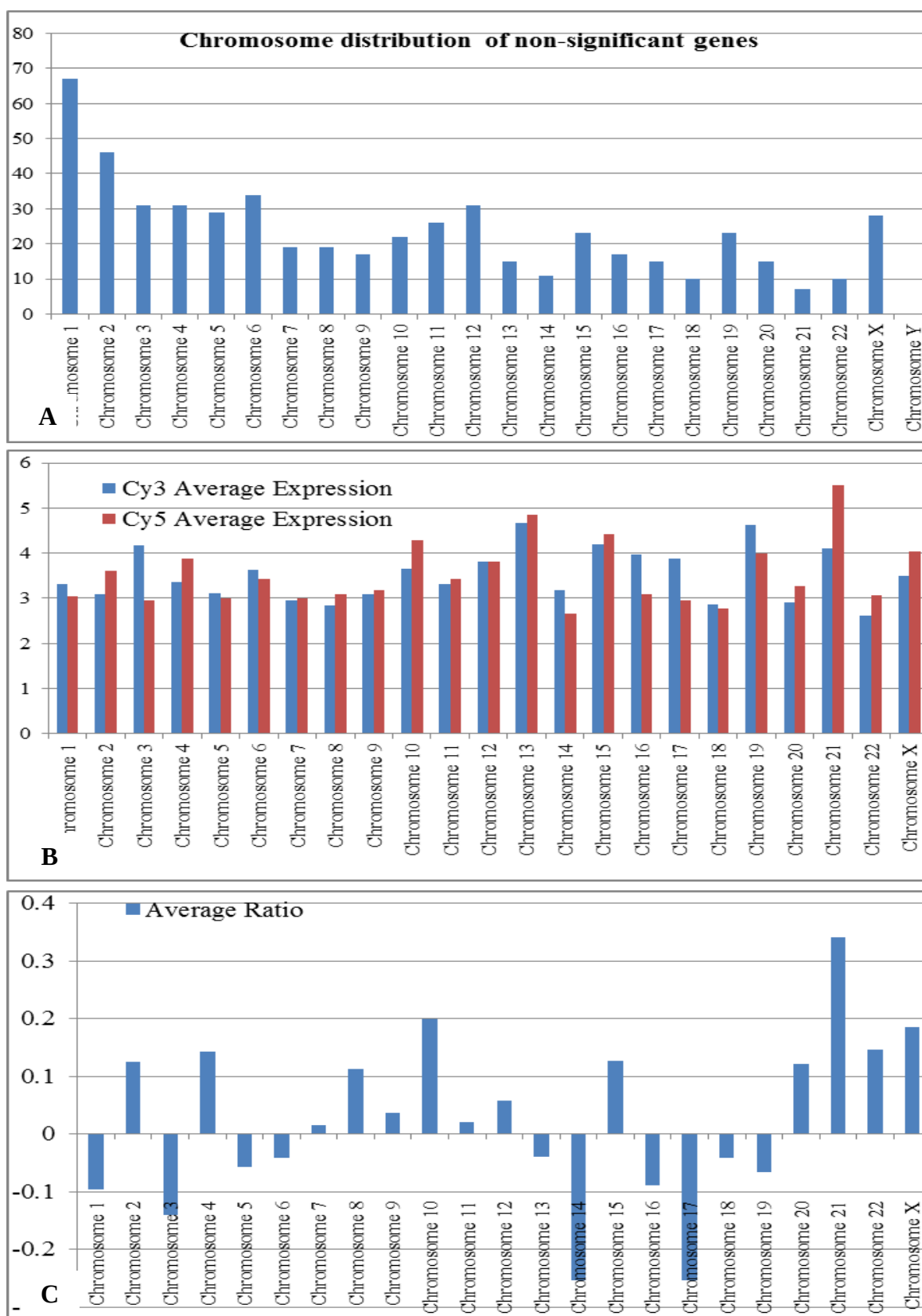
Τα DEGs διερευνήθηκαν σε σχέση με την αναλογία μεταξύ των δύο δειγμάτων (**Εικόνα 12**).



Εικόνα 12. Χρωμοσωμική γονιδιακή έκφραση (**A**) DEGs και (**B**) μέση τιμή του λόγου Cy5/Cy3της γονιδιακής έκφρασης. DE, διαφορεικά εκφραζόμενα.^[1-3]

5.7. ΚΟΙΝΑ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΚΑΝΑΛΙ ΞΕΧΩΡΙΣΤΑ ΚΑΙ Η ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

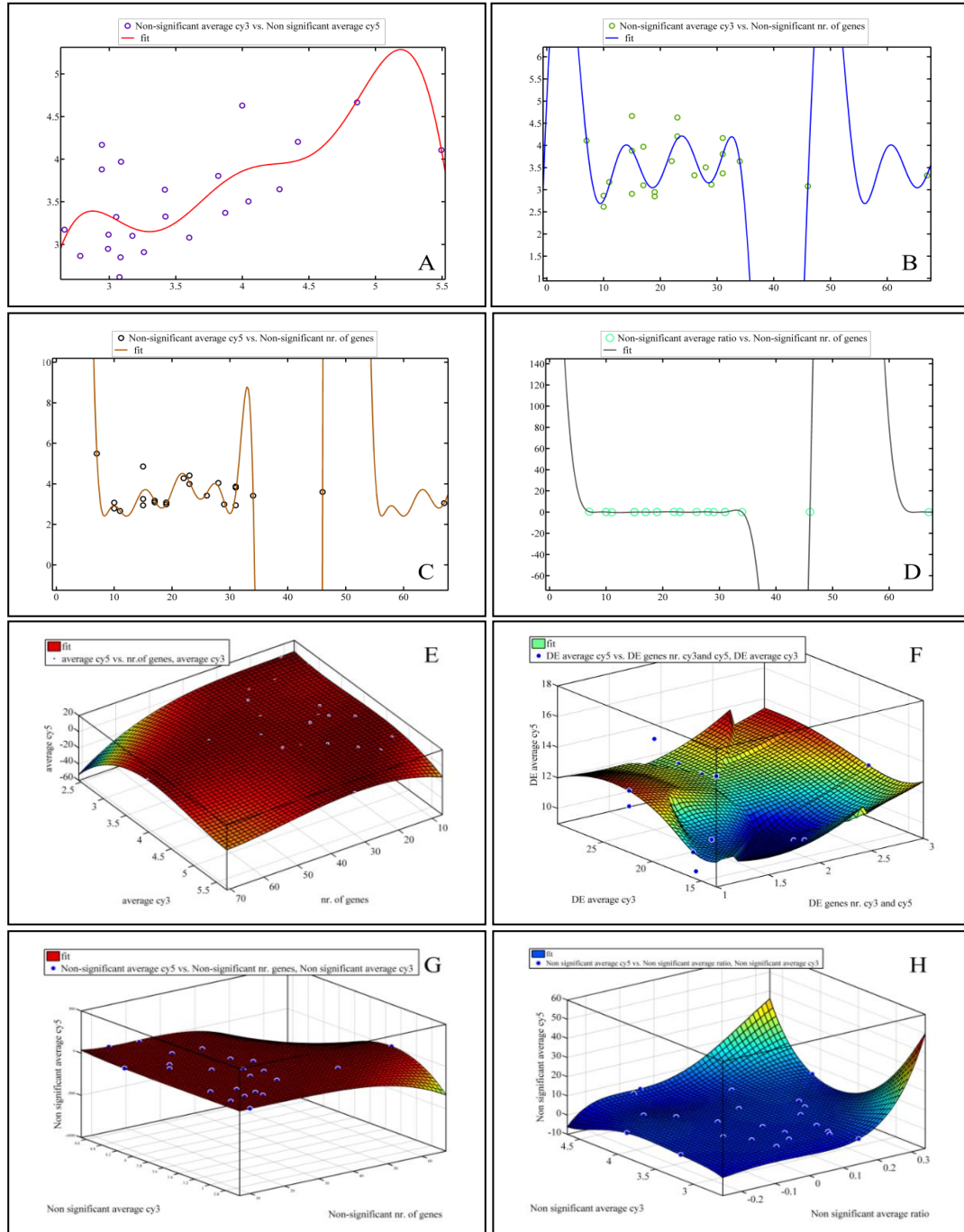
Τέλος, διερευνήσαμε τη χρωμοσωμική κατανομή των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων, δεδομένου ότι συνήθως εκφράζονται και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 13**.



Εικόνα 13. Χρωμοσωμική κατανομή των (Α) κοινών εκφραζόμενων γονιδίων (*non-significant genes*), (Β) μέση τιμή της γονιδιακής έκφρασης για κάθε κανάλι ξεχωριστά και (C) γονιδιακές αναλογίες. ^[1-3]

5.8. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Μετά από την ανάλυση των εντάσεων στα χρωμοσώματα παρατηρήσαμε ότι ο αριθμός των γονιδίων ανά χρωμόσωμα δεν είχε σχέση με τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης. Αυτό μας οδήγησε στην υπόθεση ότι μπορεί να υπάρχει ένα πρότυπο συσχέτισης μεταξύ χρωμοσωμάτων, γονιδίων και των επιπέδων έκφρασης. Για το λόγο αυτό, θα προσπαθήσουμε να εφαρμόσουμε και να προσομοιώσουμε τις διαδικασίες στα δεδομένα μας, για να βρούμε αυτά τα πρότυπα. Οι πρότυπες καμπύλες δεν έδωσαν σημαντικά αποτελέσματα (**Εικόνα 14A-D**). Ένας πιθανός λόγος για αυτό είναι ότι η χρωμοσωμική έκφραση από τη μία πλευρά ακολουθεί κάποιους βασικούς δυναμικούς κανόνες, αλλά από την άλλη πλευρά, η φύση της είναι μη γραμμική. Ως εκ τούτου, δεν μπορούμε να εφαρμόσουμε γραμμικές εξισώσεις. Συνεχίζοντας την ανάλυση αυτή, με την εισαγωγή της τρίτης διάστασης 3D πήραμε μερικά ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Για τη μέση γονιδιακή έκφραση είτε ως ενιαίες εντάσεις ή αναλογίες, χρησιμοποιήσαμε πολώνυμο και loess κανονικοποίηση με $R^2 > 0.9$ και RMSE (*root mean square error*) < 0.4 (**Εικόνα 14E-H**).



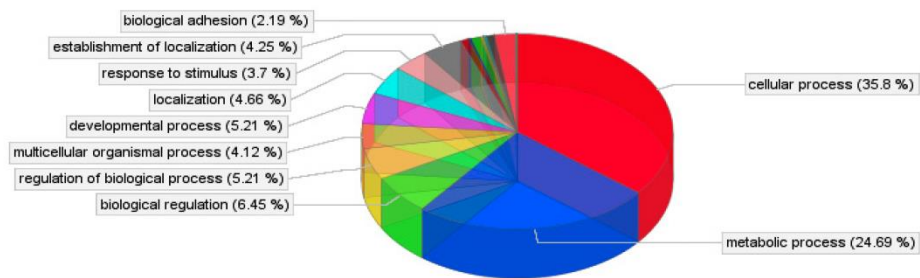
Εικόνα 14. Παλινδρομήσεις των χρωμοσωμικών κατανομών (Α) καμπύλη παλινδρόμησης των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων(*non-significant genes*), με Cy3 και κοινών γονιδίων(*non-significant genes*), με Cy5 (Β) Καμπύλη παλινδρόμησης των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων με Cy3 και του αριθμού των γονιδίων ανά χρωμόσωμα. (C) Καμπύλη παλινδρόμησης των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων με Cy5 και του αριθμού των γονιδίων ανά χρωμόσωμα. (D) Καμπύλη παλινδρόμησης των αναλογιών των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων και του αριθμού των γονιδίων ανά χρωμόσωμα. (E) 3D παλινδρομήσεις του μέσου όρου του αριθμού των γονιδίων Cy5 και Cy3. (F) 3D παλινδρομήσεις του αριθμού των DEGs, ο μέσος όρος των εντάσεων Cy5 και Cy3. (G) 3D παλινδρομήσεις του αριθμού των κοινών γονιδίων , ο μέσος όρος των εντάσεων Cy5 και Cy3 των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων. (H) 3D παλινδρομήσεις των αναλογιών των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων, ο μέσος όρος των εντάσεων Cy5 και Cy3 των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων. ^[1-3]

5.9. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΟΝΤΟΛΟΓΙΑ (GO)

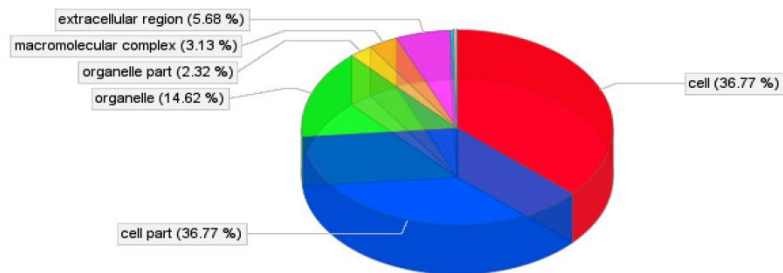
Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού γονιδίων που αποκαλύφθηκε από τα πειράματα μικροσυστοιχίας, χρησιμοποιήσαμε ανάλυση γονιδιακής οντολογίας, προκειμένου να προσεγγίσουμε τη λειτουργικότητά τους. Η ανάλυση GO έδειξε υψηλό βαθμό συγγένειας μεταξύ των γονιδίων μικροσυστοιχίας και των κυτταρικών διεργασιών ή λειτουργιών. Οι ερωτήσεις που τέθηκαν στην εισαγωγή ήταν: α) ποια γονίδια, κάτω από ένα συγκεκριμένο περιορισμένο σύνολο γονιδίων, είναι χαρακτηριστικά για κάθε κυτταρικό τύπο και την ίδια χρονική στιγμή εμφανίζονται στον άλλον, β) ποιες είναι οι ομοιότητες μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων στην εξέλιξη του όγκου, του κυτταρικού κύκλου και της εκκριτικής εξωκυτταρικής σηματοδότησης, γ) ποιοι είναι οι κοινοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί για τους δύο κυτταρικούς τύπους, με βάση το προφίλ έκφρασης τους και δ) ποια κυτταρικά μονοπάτια είναι κοινά για τα δύο κυτταρικά είδη και κατά πόσον αυτά μπορούν να προσομοιωθούν ώστε να συμπεράνουμε κοινές λειτουργίες, ε) υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία για την προέλευση της ογκογένεσης; Οι σχέσεις γονιδιακής οντολογίας για τις γενικές κατηγορίες: βιολογική διαδικασία, κυτταρική διαμερισματοποίηση και μοριακή λειτουργία παρουσιάζονται στην **Εικόνα 15A, B και C**. Χρησιμοποιήσαμε την ανάλυση GO προκειμένου να προσεγγίσουμε τη λειτουργικότητα των DEGs. Όπως περιγράφηκε προηγουμένως χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες γονιδίων: i) DEGs για κάθε κανάλι χωριστά, καθώς και DEGs για την αναλογία των δειγμάτων και ii) GO ανάλυση για την από κοινού βιολογική διαδικασία, κυτταρική διαμερισματοποίηση και μοριακή λειτουργία παρουσιάζονται στην **Εικόνα 16 A,B**. Τα DEGs προβλέψαμε ότι συμμετέχουν σε δύο κύριες λειτουργίες ($p < 0.01$), στην σύνδεση του υποδοχέα και στον δεσμευτικό υποδοχέα κυτοκίνης (**Εικόνα 16A**). Από την άλλη πλευρά, τα κοινά εκφραζόμενα γονίδια αποτελούν ένα μεγαλύτερο σύνολο δεδομένων και περιμέναμε να βρούμε περισσότερες λειτουργίες. Τα γονίδια ενδιαφέροντος ήταν εκείνα που συμμετέχουν στις βιολογικές διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, ο κυτταρικός κύκλος, η διαφοροποίηση, η κυτταρική επικοινωνία (εξωκυττάρια διακυτταρική σηματοδότηση) και η εμβρυική ανάπτυξη. Τα γονίδια χωρίστηκαν σε δέκα κύριες κατηγορίες με βάση τη λειτουργία τους και το αμετάβλητο προφίλ έκφρασης: α) γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκκριση μορίων, όπου περιλαμβάνονται τα CGRRF1, IGFBP7, PDGFB, PRC1, TGFB3, VEGFC, β) γονίδια δραστηριότητας υποδοχέα / δεσμευτικού υποδοχέα / κυτοκίνης (**Εικόνα 15D, E, F**), όπου περιλαμβάνονται τα PDGFB, TGFB3, VEGFC, ADORA1, ALCAM, AVPR1A, CCRL1, CD40LG, CNR1, CSF3R, GABRA2, GLRA3, GPR44, HTR2B, IL2RA, IL9, LIFR, LRP1, MET, NPFF, PDYN, PTPN13, PTPN9, PTPRCAP, RXRB, SPRED2, TFRC, TLR3, TRIP13, γ) γονίδια για την κυτταρική επικοινωνία / διακυτταρική σηματοδότηση (**Εικόνα 15G, H,I**), όπου περιλαμβάνονται τα TGFB3, GABRA2, HTR2B, LIFR, NPFF, PDYN, SPRED2, ARHGAP6, CDC2, DDEF1, DDEF2, EFA6R, GNG12, KIAA0974, PLEKHG1, PSMA4, RAPGEF2, RUNDC3A, TIAM1, TMEPAI, δ) τα γονίδια υπεύθυνα για τον κυτταρικό κύκλο (συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων για τη ρύθμιση της μίτωσης και της διαδικασίας του κυτταρικού κύκλου) (**Εικόνα 15J,K,L**), όπου περιλαμβάνονται τα CDC2, PRC1, AK021716, DLGAP5, H2AFV, PPAPDC1B, ZZEF1, ε) γονίδια για τον κυτταρικό

πολλαπλασιασμό, όπου περιλαμβάνονται τα CDC2, GNL3, PDGFB, στ) γονίδια για την κυτταρική διαφοροποίηση / κυτταρική ανάπτυξη / εμβρυϊκή διαδικασία (**Εικόνα 15M, N, O**), όπου περιλαμβάνονται τα CDC2, VEGFC, CD40LG, IL2RA, ANXA4, BNIP3L, CD36, CFDP1, CUL7, FEM1B, FOXO1, MAB21L1, MBNL3, MMP2, NNAT, NP25, PDCD5, PDLIM7, PLAC1, RPS6KA3, RTTN, TCL1A, THBS4, ZNF313 και ζ) γονίδια που σχετίζονται με τα βλαστικά κύτταρα / την διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων, όπου περιλαμβάνονται τα CDC2, VEGFC, CD40LG, IL2RA, ANXA4, CFDP1, CUL7, FOXO1, MMP2, NNAT, NP25, PDCD5, PDLIM7, TCL1A, PDGFB, PRC1, DLGAP5, TGFB3, GABRA2, HTR2B, LIFR, NPFF, ARHGAP6, DDEF2, ADORA1, CCRL1, CNR1, CSF3R, GPR44, IL9, LRP1, MET, PTPN13, PTPN9, PTPRCAP, RXRB, TFRC, TLR3, CGRRF1, IGFBP7, FOSB, SIRT5, TCF4, η) γονίδια αρνητικοί ρυθμιστές του κυτταρικού θανάτου: IL7, ADAM17, ACVR1, TNFAIP3, ANXA4, DHCR24, LRP1, BNIP3L, SELS, CSF2, NAIP, GSTP1, HMOX1, BARD1, PRDX2, CDC2, XRCC5, FNTA, ADORA1, PTEN, CFDP1, TGFB3, IGF1, DAPK1, MSH2, NUP62, CDKN2D, KIT και LIFR, θ) γονίδια για τον πολλαπλασιασμό των μυών, τα οποία είναι αξιοσημείωτα καθώς αυτά τα γονίδια είναι κοινά για τους δύο κυτταρικούς τύπους: IFNG, PTGS2, TGFB3, ANG, FLT1, STAT1, IGF1, TGFB2, PDGFB και IL12B, ι) γονίδια που εμπλέκονται στη μετανάστευση λευκοκυττάρων, και πάλι μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση καθώς αυτή η λειτουργία είναι κοινή για τους δύο τύπους κυττάρων: IFNG, ADAM17, ADORA1, SELP, ITGA6, IL8, TGFB2, CD34, HMOX1, PDGFB και ICAM1 και κ) γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό: PTPRO, MTM1, ACVR1, PTPRA, NTRK3, NDUFAB1, PDGFB, MAPK14, FLT3, BARD1, CDKN2C, RPS6KA2, TGFB3, CDKL5, IGF1, EPHB6, MET, FGF23, MAP3K10, CDKN2D, GPD1L, KIT, IFNG, TNK2, PTPN9, TLK1, LRP1, KALRN, CDC2, ATP5F1, DCLK1, FLT1, MADD, STAT1, PPP1CB, MAPK13, MAPK10, PARD3, DYRK3, NDUFS1, TRIB2, TGFB2, INPP1, PIP4K2A, ADORA1, ANG, STK3, FLT4, PTEN, MSH2, DAPK1, TGFB3, SYNJ2, CSNK2A2, MORC3, VEGFC, PDGFC, ADAM17, PIK3C3, MAPKAPK3, PTPN13, CSF2, PRDX2, DOCK7, FGR, PGK1, TIE1, NUP62, STK25, CCL11, RPS6KA3 και CSF1R. Τέλος, στην έρευνα μας για αρνητικούς ή θετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, βρήκαμε δύο ομάδες όπου έχουμε μελετήσει ποια γονίδια είναι αρνητικοί και ποια είναι θετικοί ρυθμιστές της κυτταρικής διαδικασίας. Αυτές οι δύο κατηγορίες γονιδίων περιλαμβάνουν: τα ANXA4, CD36, FOSB, SIRT5 και TCF4 για τα γονίδια με αρνητική ρυθμιστική επίδραση, και FEM1B, το γονίδιο με θετική ρυθμιστική επίδραση. Αρκετά γονίδια έχουν επικαλυπτόμενες λειτουργίες και αυτό κάνει την ανάλυσή τους πιο περίπλοκη. Επιπλέον, στην **Εικόνα 15P-R**, παρουσιάζουμε ομαδοποιήσεις των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων. Η **Εικόνα 15P** δείχνει τα γονίδια που παραμένουν αμετάβλητα, η **Εικόνα 15Q** δείχνει τα υπερ-ρυθμιζόμενα γονίδια, δηλαδή αυτά που ενεργοποιούνται στα κύτταρα TE671, και η **Εικόνα 15R** δείχνει τα υπό-ρυθμιζόμενα γονίδια, δηλαδή αυτά που ενεργοποιούνται στα κύτταρα CEM. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η **Εικόνα 15R** που δείχνει σαφώς ότι τα γονίδια που εκφράζονται εξίσου και στα δύο κυτταρικά συστήματα είναι γονίδια που συμμετέχουν στην αιμοποίηση, στην ωρίμανση των μυοβλαστών και στο σχηματισμό του σκελετικού μυ. Αυτό είναι σύμφωνο με μια προηγούμενη έννοια της κοινής αναπτυξιακής κληρονομικότητας, ενώ ταυτόχρονα δείχνει ότι και οι δύο κυτταρικοί τύποι,

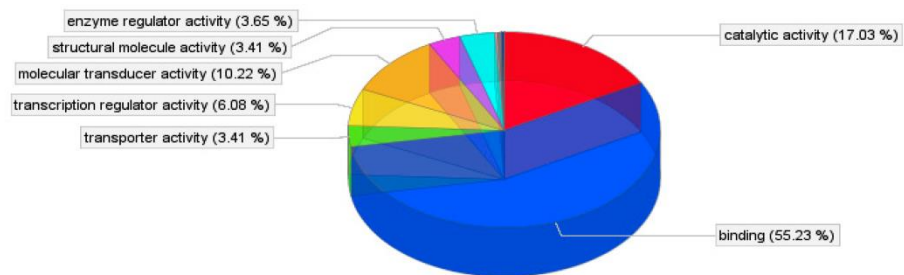
παρά τους διαφορετικούς φαινότυπους, διατηρούν κοινά χαρακτηριστικά με βασικό εκπρόσωπο την αναπτυξιακή ιστορία τους.



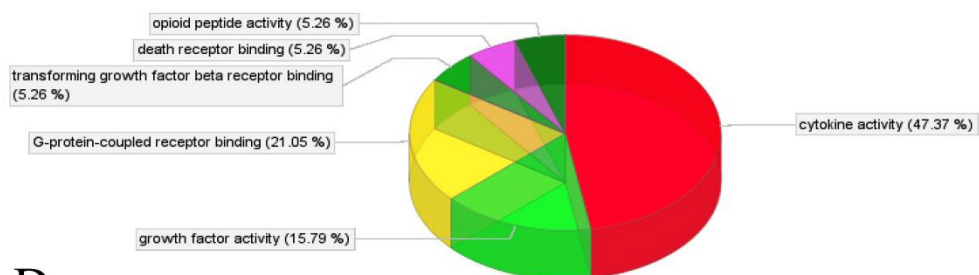
A



B

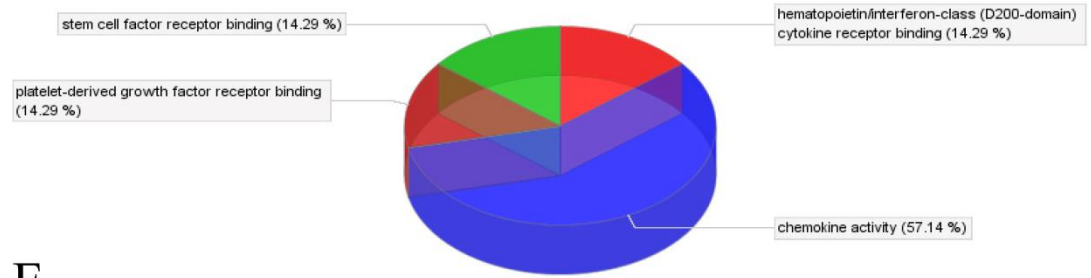


C

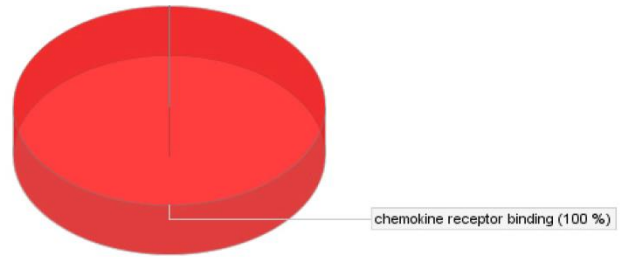


D

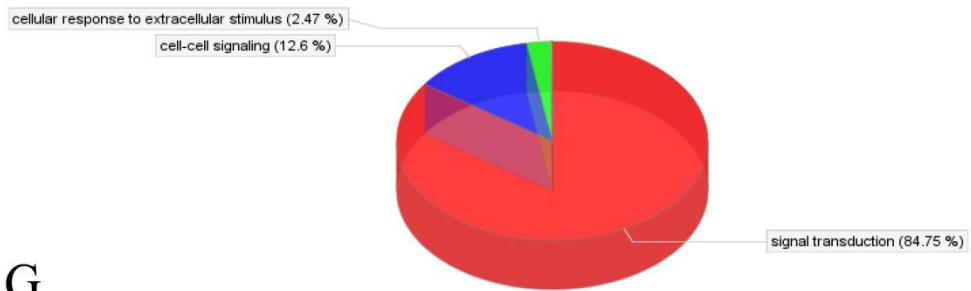
E



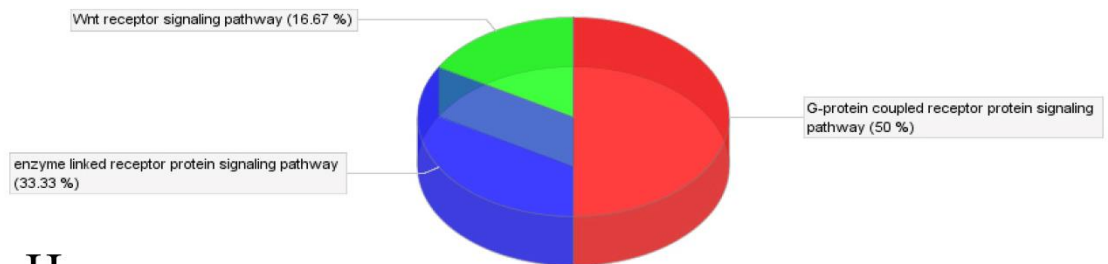
F



G



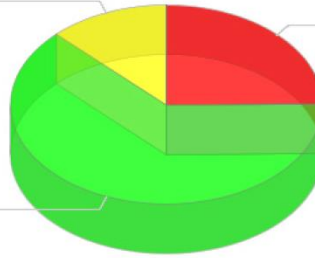
H



regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade (12.5 %)

positive regulation of signal transduction (25 %)

regulation of small GTPase mediated signal transduction (62.5 %)

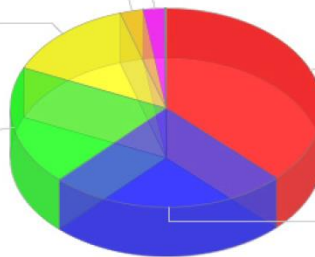


I

positive regulation of cell cycle (2.17 %)
negative regulation of cell cycle (2.35 %)
meiotic cell cycle (13.6 %)
regulation of cell cycle (19.65 %)

cell cycle process (37.45 %)

mitotic cell cycle (24.58 %)

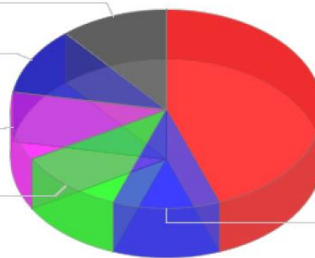


J

mitotic metaphase/anaphase transition (11.11 %)
spindle elongation (11.11 %)
G1/S transition of mitotic cell cycle (11.11 %)
mitotic spindle organization and biogenesis (11.11 %)

cell cycle phase (44.44 %)

regulation of cell cycle process (11.11 %)

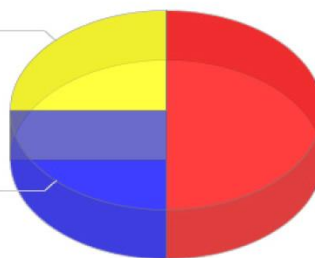


K

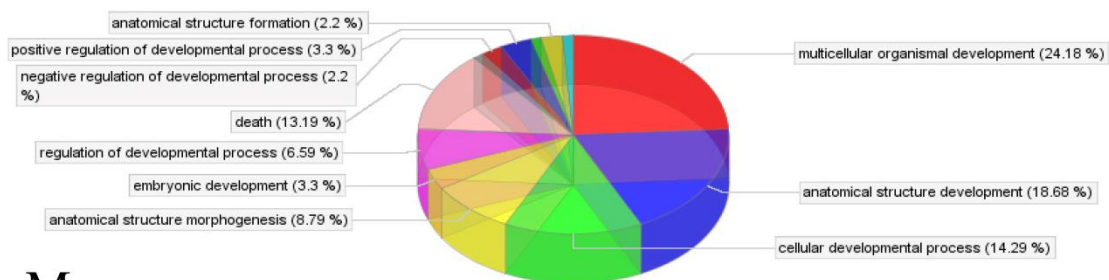
mitotic spindle organization and biogenesis (25 %)

M phase of mitotic cell cycle (50 %)

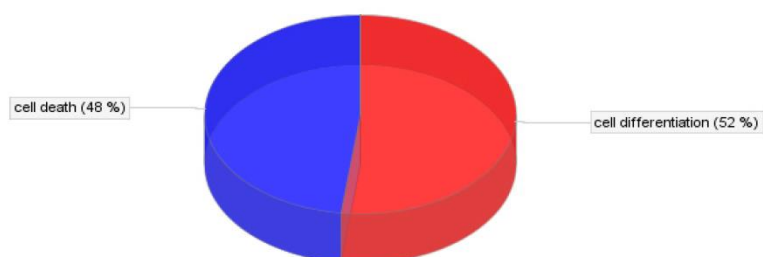
interphase of mitotic cell cycle (25 %)



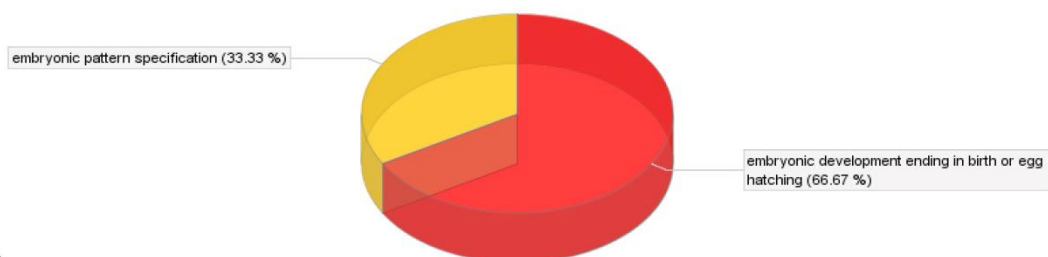
L



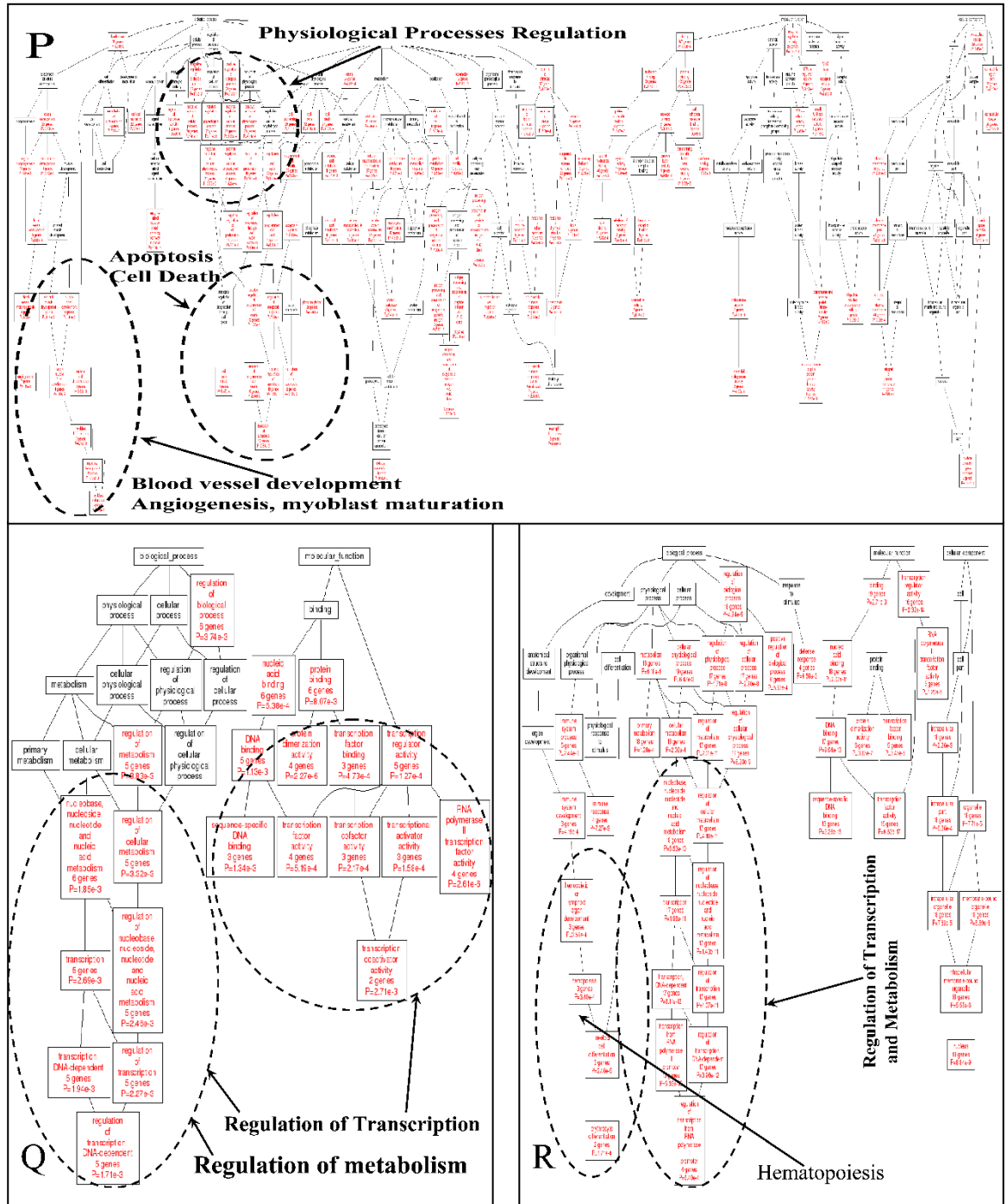
M



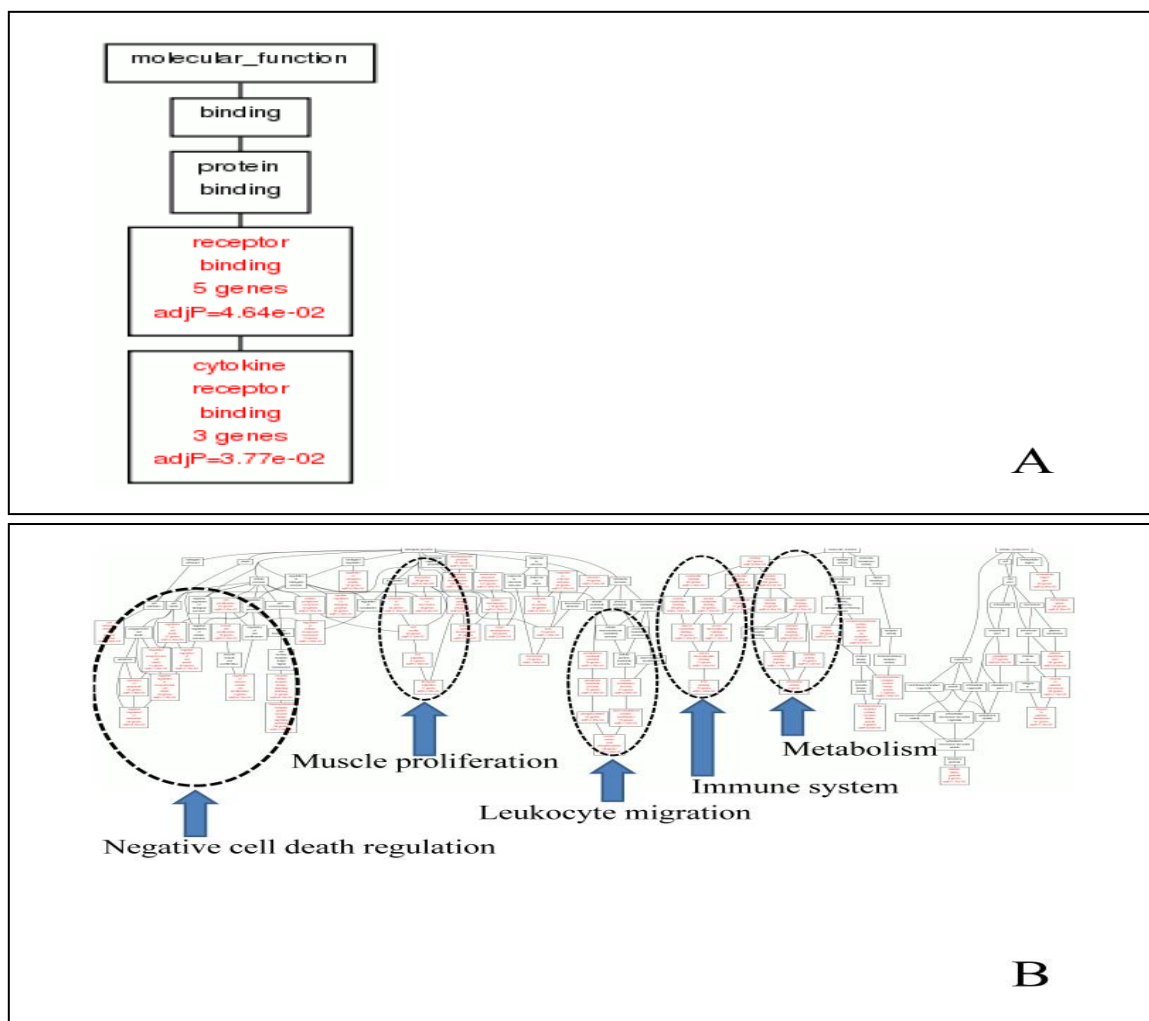
N



O



Εικόνα 15. Γονιδιακή Οντολογία (GO). Αποτελέσματα: βιολογική διαδικασία (A), κυτταρική διαμερισματοποίηση (B), μοριακή λειτουργία (C) για τις πλατφόρμες TAKARA και IMT. Μεταγενέστερη εστίαση πάνω στην κυτταρική διαδικασία έδωσε αποτελέσματα οντολογίας για υποδοχέα/δέσμευση υποδοχέα (D-F), κυτταρική επικοινωνία/διακυτταρική σηματοδότηση (G-I), κυτταρικός κύκλος (J-L), κυτταρική διαφοροποίηση/ανάπτυξη/εμβρυϊκή διαδικασία (M-O). Η ομαδοποίηση των γονιδιακών λειτουργιών παρουσιάζονται στις (P-R), όπως αποκαλύπτεται από το εργαλείο ανάλυσης webgestalt. ^[1-3]



Εικόνα 16. GO προβλέψεις για (A) DEGs και (B) κοινά εκφραζόμενα γονίδια (non-significant). ^[1-3]

5.10. TFBMs

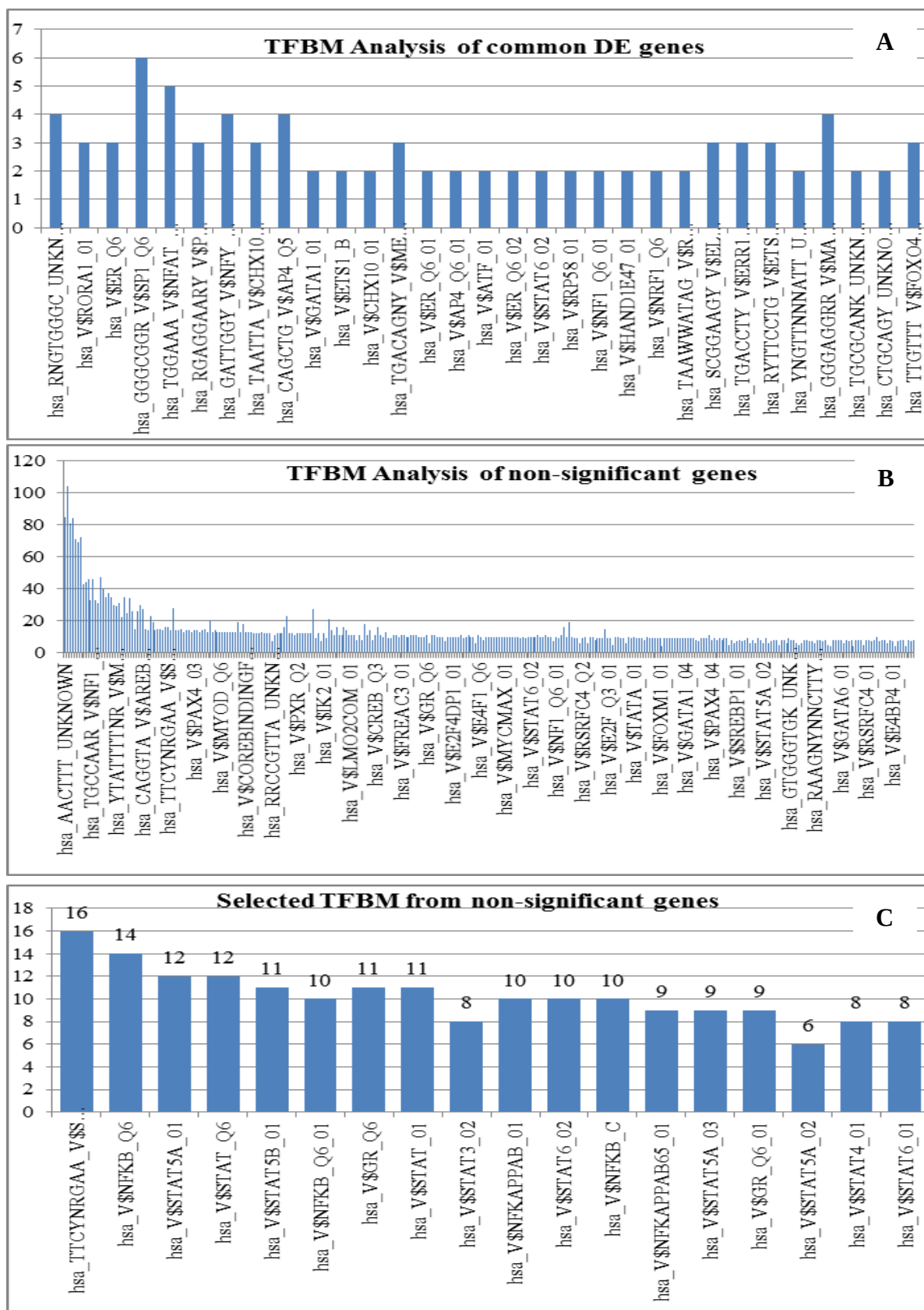
Η ανάλυση του προτύπου των δεσμευτικών μεταγραφικών παραγόντων (TFBMs) πραγματοποιήθηκε με ολόκληρο το πλήθος των γονιδίων με ανάλυση μικροσυστοιχίας και επίσης για κάθε ομάδα ξεχωριστά. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό εργαλείο TELIS και η βάση δεδομένων TRANSFAC χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των TFs. Αναλύσαμε το σύνολο των γονιδίων που αποκαλύφθηκε από το πείραμα μικροσυστοιχίας για TFs και καταλήξαμε συνολικά σε 44 TFs με ένα FDR 4% για $p < 0,01$. Κάθε ομάδα αναλύθηκε ξεχωριστά για TFBMs σε μια προσπάθεια να ταυτοποιηθούν οι TFs που εμφανίζονται μόνο σε μία κατηγορία γονιδίων. Συγκεκριμένα, τρεις TFs είχαν προβλεφθεί ότι είναι κοινοί για όλα τα γονίδια ανεξαρτήτως της έκφρασης τους (υπό-εκπροσωπούνται), Elk-1 (υπέρ-εκπροσωπείται) και C/EBP (υπό-εκπροσωπείται). Μία ομάδα γονιδίων φάνηκε να ρυθμίζει τα κοινά εκφραζόμενα (αμετάβλητα) γονίδια. Επιπλέον, η ανάλυση της ομάδας που περιέχει τα αμετάβλητα γονίδια αποκάλυψε ότι ο TF CDP (υπέρ-εκπροσωπείται) εμφανίστηκε μόνο για αυτή την ομάδα. Το επόμενο βήμα στην ανάλυσή μας ήταν να ταυτοποιήσουμε ποιοι TFs είχαν προβλεφθεί ειδικά για ορισμένα γονίδια. Από την συνδυασμένη ανάλυση των αμετάβλητων

γονιδίων και των ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων τους προβλέφθηκαν οκτώ TFs: C/EBPbeta (υπό-εκπροσωπείται), c-Ets-1(p54) (υπέρ-εκπροσωπείται), CREB (υπέρ-εκπροσωπείται), c-Rel (υπέρ-εκπροσωπείται), GATA-1 (υπό-εκπροσωπείται), GATA-X (υπό-εκπροσωπείται), MyoD (υπό-εκπροσωπείται), Tax/CREB (υπέρ-εκπροσωπείται). Ειδικότερα, ενδιαφέρον παρουσιάζει η πρόβλεψη της STAT6, η οποία ρυθμίζει τα γονίδια DLC1 και WNT5A. Από αυτούς τους TFs, αρκετοί εμφανίζουν ενδιαφέροντα πρότυπα συμπεριφοράς, δεδομένου ότι εκδηλώνουν αυξημένη τάση στην έκφραση γονιδίων. Τέτοια παραδείγματα ήταν οι RORA1, NFY και ERR1 TFs (**Εικόνα 17**). Από την άλλη πλευρά, η ανάλυση όλων των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων προέβλεψε 329 TFs με $p < 0.01$ και FDR $< 1\%$ (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.B**). Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε σε τρεις TFs: STAT, GR και NFκB (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.C**). Αυτοί οι TFs ρυθμίζουν γονίδια στους δύο τύπους κυττάρων με τον ίδιο τρόπο, υποθέτοντας ότι διαδραματίζουν ισότιμο ρόλο στη ρύθμιση των γονιδίων (**Εικόνα 17**). Ειδικότερα, ο STAT είναι μέρος του μονοπατιού JAK-STAT-MAPK, και θεωρείται σπουδαίος ο ρόλος του στη ρύθμιση της καρκινογένεσης και της εξέλιξης του όγκου.



TFs των κοινών DE γονιδίων. Τα RORA1, ERR1 και NFY έδειξαν μια ρύθμιση των γονιδίων σε μια αυξανόμενη τάση.

Εικόνα 17. TFs των κοινών εκφραζόμενων γονιδίων. Έμφαση δόθηκε στα STAT, GR και NF-κB. ^[1]



Εικόνα 18. TFBM ανάλυση των (Α) κοινών DEGs όπως επίσης και των (Β και C) κοινών εκφραζόμενων γονιδίων. DE: διαφορεικά εκφραζόμενα. ^[1-3]

5.11. BIONETWORK ANALYSIS

Οι σχέσεις μεταξύ των γονιδίων διερευνήθηκαν με τη χρήση δύο εργαλείων, PubGene (www.pubgene.org) και το MILANO εργαλείο μικροσυστοιχίας. Ο ακόλουθος σύνδεσμος παρουσιάζει το BioNetwork που δημιουργήθηκε από τα γονίδια με αμετάβλητο βαθμό έκφρασης και τους ρυθμιστικούς τους TFs².

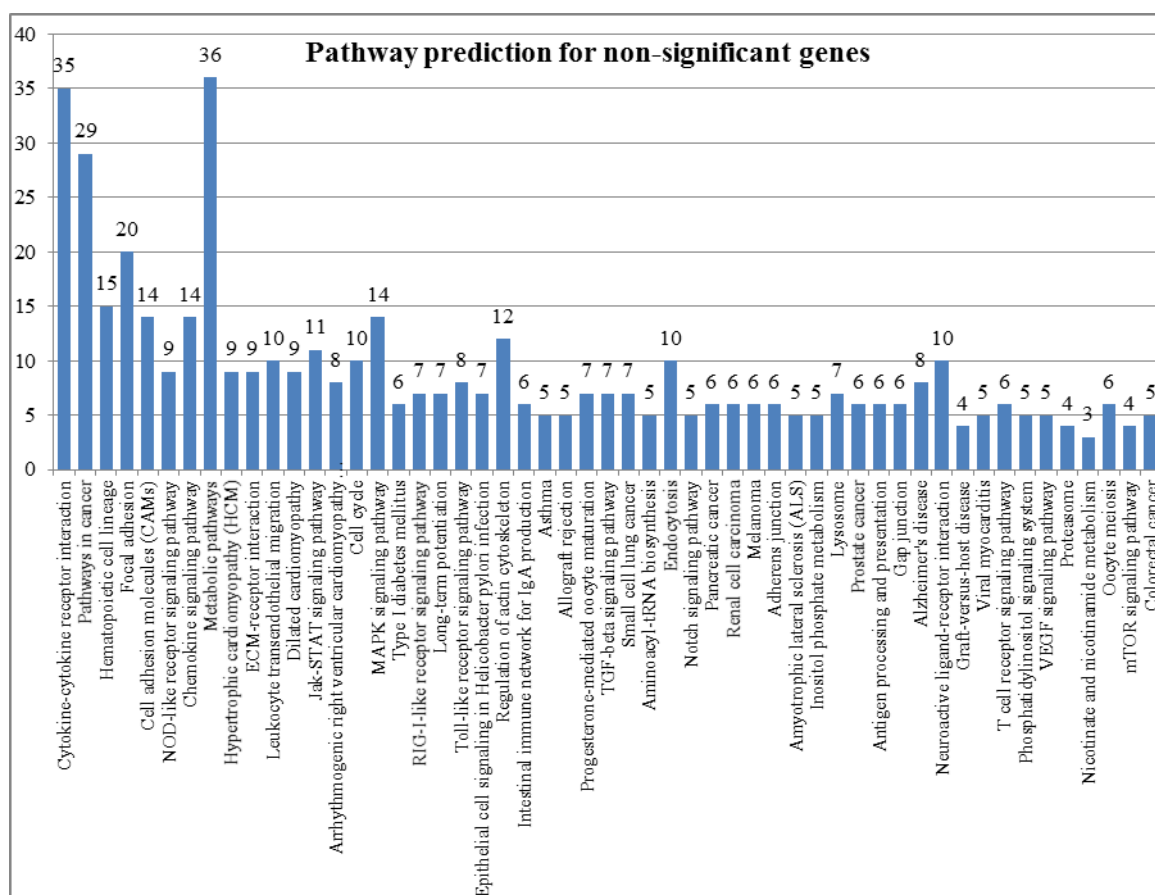
Αναζητήθηκαν οι σχέσεις συγκεκριμένων γονιδίων με αναφορά στον κυτταρικό κύκλο, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τα βλαστικά κύτταρα και την έκφραση γονιδίων ανάπτυξης. Εισάγοντας αυτούς τους όρους στην ιστοσελίδα, η παραπάνω σχέση κατευθύνει την παραγωγή των αντίστοιχων αποτελεσμάτων.

5.12. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ

Μέσω αυτής της ανάλυσης θα κατανοήσουμε τους κοινούς μηχανισμούς που διέπουν τα δύο διαφορετικά είδη καρκίνου. Έχουμε ως στόχο να κατανοήσουμε ποια γονίδια συμμετέχουν, σε ποια μονοπάτια και πως αυτά αλληλεπιδρούν. Λόγω της πολυπλοκότητας των μονοπατιών και των μεταγραφών που αποκάλυψε η ανάλυση μικροσυστοιχίας, χρησιμοποιήσαμε την ακόλουθη προσέγγιση: πρώτον, τα γονίδια χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες διαφορικά (DEGs) και κοινά εκφραζόμενα γονίδια, δεύτερον, με τη βοήθεια του λογισμικού Pathway Explorer, ψάξαμε όλες τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων για την παρουσία των γονιδίων που αποκάλυψε η ανάλυση μικροσυστοιχίας σε γνωστά μονοπάτια. Στη συνέχεια επικεντρωθήκαμε στα μονοπάτια του κυτταρικού κύκλου και της μεταγωγής σήματος. Τα DEGs αποκάλυψαν ένα σημαντικό μονοπάτι, το μονοπάτι JAK-STAT-MAPK ($p < 0,01$), με τη συμμετοχή των SPRED2 και IL2RA. Από την άλλη πλευρά, τα κοινά εκφραζόμενα γονίδια συμμετέχουν σε πολλά μονοπάτια (**Εικόνα 19**). Ανακαλύψαμε κοινή παρουσία των εξωκυττάρων σηματοδοτικών μορίων. Οι δύο κυτταρικοί τύποι μοιράζονται τρεις κύριους άξονες σηματοδότησης, μεταξύ άλλων, για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού: α) ένα ECM – υποδοχέα / εστιακής προσκόλλησης / MAPK μεταγωγής σήματος, β) κυτοκίνη- υποδοχέας κυτοκίνης / MAPK / οδό μεταγωγής σήματος κυτταρικού κύκλου και γ) το Jak-STAT/MAPK μονοπάτι μεταγωγής σήματος. Και οι τρεις συνδυασμοί συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τον καθορισμό της κυτταρικής εξέλιξης και αντι-απόπτωσης. Πηγαίνοντας με περισσότερη λεπτομέρεια στα προβλεπόμενα μονοπάτια, τα έχουμε κατατάσσει σε κατηγορίες. Προκειμένου να καταλάβουμε τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς των γονιδίων που είναι κοινοί στους δύο τύπους κυττάρων, εκτελέσαμε μια προσομοίωση, όπου συμπεριλάβαμε τα γονίδια που παρουσιάζουν ενδιαφέρον από όλα τα μονοπάτια. Επιπλέον, θα προσπαθήσουμε να διαμορφώσουμε τα μονοπάτια χρησιμοποιώντας

²http://www.pubgene.org/tools/Network/Subset.cgi?terms=TAX1BP2%2CTAX1BP1%2CTAX1BP3%2CCEBPB%2CETS1%2CZNF313%2CTIAM1%2CTFRC%2CTMEPAI%2CTLR3%2CTRIP1%2CZEF1%2CVEGFC%2CTHBS4%2CTGFB3%2CTCL1A%2CTCF4%2CSIRT5%2CRXRB%2CRTTN%2CRPS6KA3%2CRAPGEF2%2CPTPRCAP%2CPTPN9%2CPTPN13%2CPSMA4%2CPRC1%2CPPAPDC1B%2CPLKKG1%2CPLAC1%2CPDYN%2CPDLIM7%2CPDGF8%2CPD5%2CNPFF%2CTAGLN3%2CENAT%2CMMP2%2CMET%2CMBNL3%2CMAB21L1%2CLRP1%2CLIFR%2CIL9%2CIL2RA%2CIGFBP7%2CHTR2B%2CH2AFV%2CGNL3%2CGNG12%2CGLRA3%2CGLRA2%2CFOXO1A%2CFOSB%2CFEM1B%2CPSD3%2CDEF2%2CDEF1IT1%2CCUL7%2CCSF3R%2CCNR1%2CCFDP1%2CCDC2%2CCD40LG%2CCCL1%2CBNIP3L%2CAVPR1A%2CARHGAP6%2CANXA4%2CALCAM%2CADORA1%2CMYOD1%2CFPM1%2CREL%2CCREB3L2%2CRELA&termtype=gap&networktype=litp&graph_annotate=none&maxb=10&maxb2=5&maxd=3&maxd2=10&organism=hs&maxn=50&edge_limit=1

προσομοιώσεις. Δημιουργήσαμε ένα συζευγμένο μονοπάτι, που περιλαμβάνει τα σηματοδοτικά μονοπάτια JAK-STAT, MAPK, TGF- β και τα βασικά μεταβολικά μονοπάτια.



Εικόνα 19. Πρόβλεψη των μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν τα κοινά εκφραζόμενα γονίδια. Οι αριθμοί πάνω στις ράβδους υποδηλώνουν τον αριθμό των γονιδίων που βρέθηκαν σε κάθε μονοπάτι με διάστημα εμπιστοσύνης 99%. ^[1-3]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6-ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΕΙΣ

Τα παραπάνω αποτελέσματα, αποτέλεσαν την παράθεση των παλαιότερων ευρημάτων από τις εργασίες των Lambrou et al. (2012).^[1-3] Στο κεφάλαιο αυτό, επεκτείνουμε τα ευρήματα και πραγματοποιήσαμε σειρά παλινδρομήσεων με βάση τη χρωμοσωμική γονιδιακή έκφραση.

Η ανάλυση παλινδρόμησης διεξήχθη για να βρεθούν πιθανές αιτιακές σχέσεις στην γονιδιακή έκφραση σε σχέση με τον κυτταρικό τύπο και την χρωμοσωμική κατανομή. Ειδικότερα, έχουμε χρησιμοποιήσει γονίδια με παρόμοια επίπεδα έκφρασης, δηλαδή αυτά που δεν εκφράστηκαν διαφορετικά. Έχουμε εκτελέσει δύο διαφορετικά είδη ανάλυσης παλινδρόμησης. Το ένα περιελάμβανε μία δύο διαστάσεων 2D παλινδρόμηση της μορφής $y=ax^2+bx+c$ και η δεύτερη της μορφής $z=ay+bx+c$. Οι 2D παλινδρομήσεις έδειξαν στατιστικά σημαντικές σχέσεις μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων και ειδικότερα για το χρωμόσωμα 1 με $R^2 = 0,82$ (**Εικόνα 20Α**), χρωμόσωμα 3 με $R^2 = 0,82$ (**Εικόνα 20Β**), χρωμόσωμα 8 με $R^2 = 0,89$ (**Εικόνα 20C**), χρωμόσωμα 13 με $R^2 = 0,71$ (**Εικόνα 20D**), χρωμόσωμα 14 με $R^2 = 0,91$ (**Εικόνα 20Ε**), χρωμόσωμα 15 με $R^2 = 0,69$ (**Εικόνα 20F**), χρωμόσωμα 16 με $R^2 = 0,89$ (**Εικόνα 20G**), χρωμόσωμα 17 με $R^2 = 0,81$ (**Εικόνα 20H**), το χρωμόσωμα 21 με $R^2 = 0,88$ (**Εικόνα 20I**), το χρωμόσωμα 22 με $R^2 = 0,97$ (**Εικόνα 20J**) και το χρωμόσωμα X με $R^2 = 0,71$ (**Εικόνα 20K**). Αν και με τις 2D παλινδρομήσεις εκδηλώθηκαν σημαντικές σχέσεις σε σχέση με τη γονιδιακή έκφραση, εξακολουθούν οι συναρτήσεις που αποκαλύφθηκαν να μην έχουν το πλήρες σύνολο του ορισμού της συνάρτησης. Με άλλα λόγια, για κάθε $x \in D(f)$, υπάρχουν δύο y , που μπορεί να περιγραφεί ως $\exists x_1, x_2 \in D(f): x_1 \neq x_2 \Rightarrow f(x_1) = f(x_2)$, ή $y_1 = y_2$, όπου $D(f)$ είναι το σύνολο ορισμού της f , και x, y είναι τα επίπεδα έκφρασης του κάθε γονιδίου. Το ερώτημα που προέκυψε από την παρατήρηση αυτή, ήταν ότι οι συσχετίσεις που εκδηλώνονται θα μπορούσαν να παρέχουν περισσότερες πληροφορίες εάν προστεθεί μια άλλη διάσταση στους υπολογισμούς. Η λύση σε αυτό το ερώτημα προήλθε από την παρατήρηση ότι ο μετασχηματισμός $\log_2$ του λόγου TE -671 επίπεδα γονιδιακής έκφρασης προς τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης CCRF-CEM, θα μπορούσε να προστεθεί ως η τρίτη διάσταση. Έτσι, έχουμε διαμορφώσει μια νέα σχέση $z=ay+bx+c$ ή $f(x,y)=ay+bx+c$, που μπορεί να διαμορφωθεί ως

$$z = \log_2 \left(\frac{x}{y} \right).$$

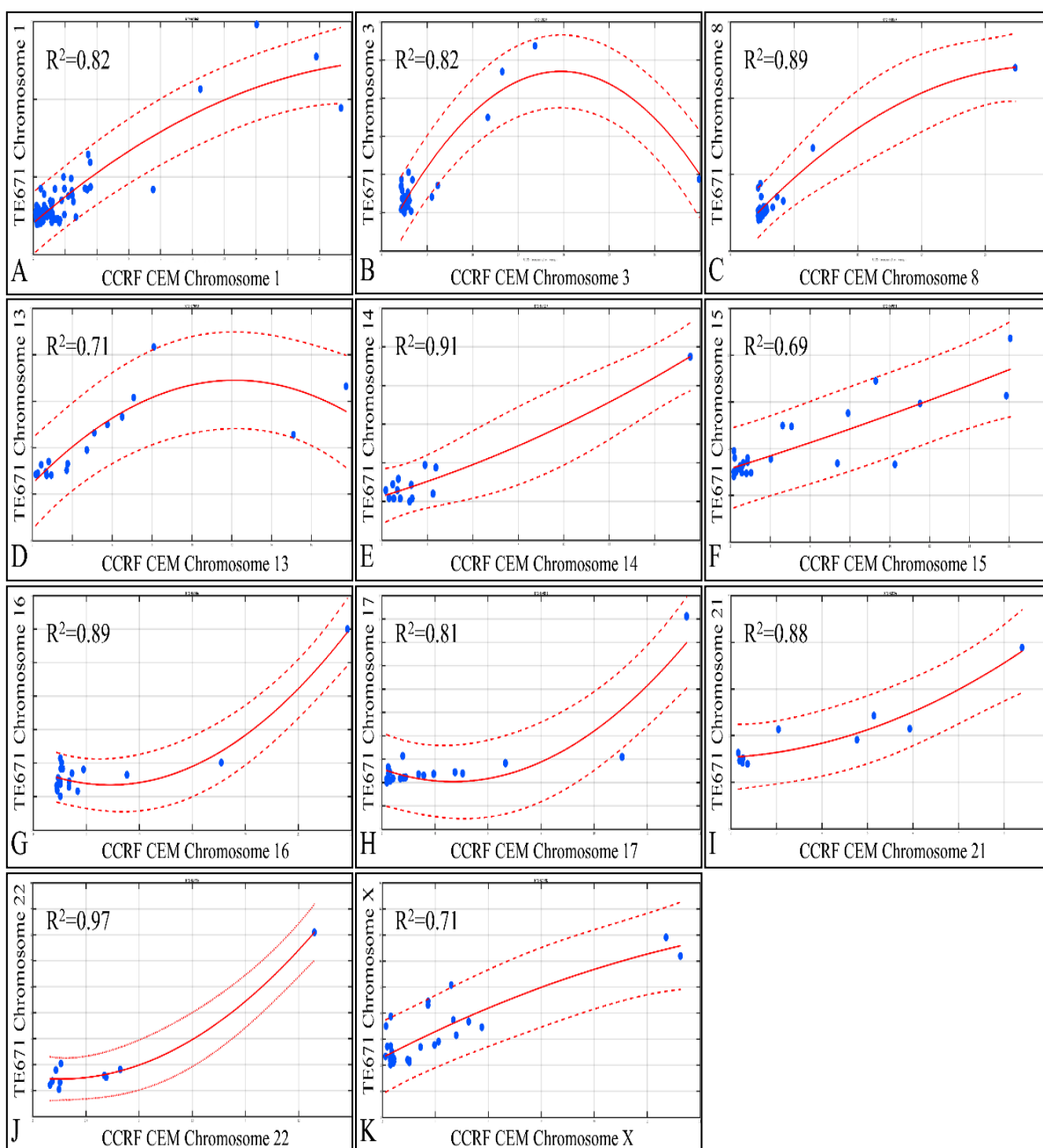
Έτσι, οι προαναφερθείσες εξισώσεις γίνονται $\log_2 \left(\frac{x}{y} \right) = ay + bx + c$.

Τα αποτελέσματα της 3D παλινδρόμησης παρουσιάζονται στην **Εικόνα 21**.

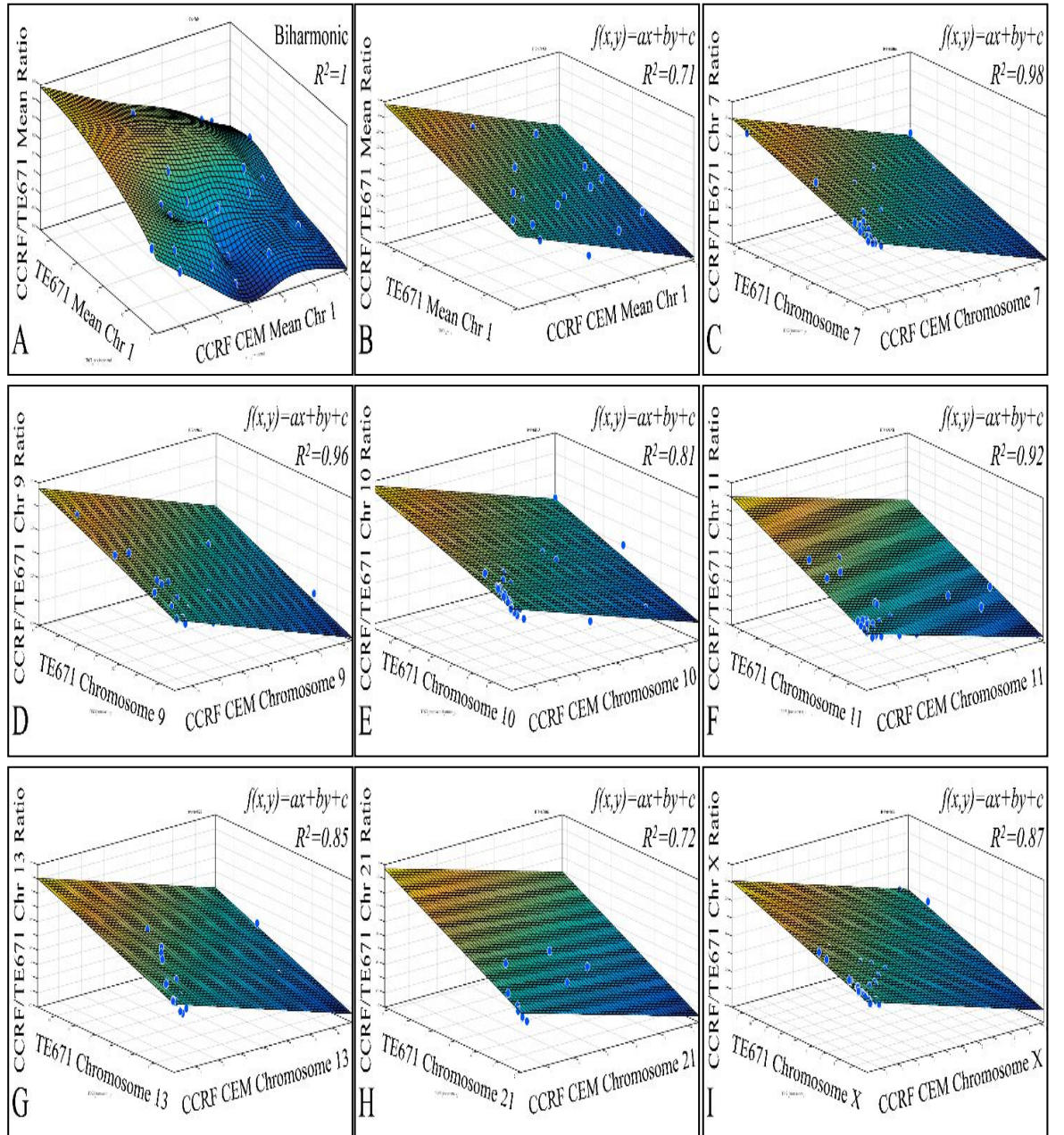
Ειδικότερα, η ανάλυση παλινδρόμησης 3D δείχνει σημαντικές σχέσεις μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων και του λόγου τους, και ειδικότερα για το χρωμόσωμα 1 με $R^2 = 1$ (**Εικόνα 21Α**) με τη χρήση της ιδανικής (*biharmonic*) συνάρτησης, χρωμόσωμα 1 με $R^2 = 0,71$ (**Εικόνα 21Β**) με τη χρήση της προαναφερόμενης γραμμικής συνάρτησης, χρωμόσωμα 7 με $R^2 = 0,98$ (**Εικόνα 21 C**), το χρωμόσωμα

9 με $R^2=0.96$ (**Εικόνα 21D**), χρωμόσωμα 10 με $R^2=0.81$ (**Εικόνα 21E**), χρωμόσωμα 11 με $R^2=0.92$ (**Εικόνα 21F**), χρωμόσωμα 13 με $R^2=0.85$ (**Εικόνα 21G**), χρωμόσωμα 21 με $R^2=0.72$ (**Εικόνα 21H**) και X χρωμόσωμα με $R^2=0.87$ (**Εικόνα 21I**).

Φαίνεται ότι οι σχέσεις σε τρεις διαστάσεις εκδηλώνουν καλύτερα αποτελέσματα για τα συγκεκριμένα χρωμοσώματα σε σύγκριση με τις παλινδρομήσεις δύο διαστάσεων. Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι πιθανώς μια τρίτη διάσταση είναι αναγκαία για να κατανοήσουμε τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς των γονιδίων. [97]



Εικόνα 20. Παλινδρομήσεις των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των κυττάρων CCRF-CEM και TE-671, σε σχέση με τη χρωμοσωμική έκφραση. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις υπάρχουν για τα χρωμοσώματα 1 (A), 3 (B), 8 (C), 13 (D), 14 (E), 15 (F), 16 (G), 17 (H), 21 (I), 22 (J) και X (K). [97]



Εικόνα 21. 3D παλινδρομήσεις των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των κυττάρων CCRF-CEM και TE-671 και του αντίστοιχου μετασχηματισμένου με $\log_2$ λόγου τους σε σχέση με την χρωμοσωμική έκφραση. Στατιστικά σημαντικές σχέσεις υπήρξαν για χρωμοσώματα 1 (A) με ιδανική (biharmonic) συνάρτηση, 1 (B) με γραμμική συνάρτηση, 7 (C), 9 (D), 10 (E), 11 (F), 13 (G), 21 (H) και X (I).^[97]

ΜΕΡΟΣ IV-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7-ΤΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΑ ΚΟΙΝΩΣ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

7.1. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΥΤΟΚΙΝΗΣ / ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΚΥΤΟΚΙΝΗΣ

I. Οι ιντερλευκίνες.

Η ανάλυσή μας έχει προβλέψει 25 μοναδικούς στόχους που χαρτογραφήθηκαν στο μονοπάτι κυτοκίνη/υποδοχέα κυτοκίνης. Οι κυτοκίνες είναι σημαντικά μόρια που συμμετέχουν στην διαφοροποίηση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, ειδικότερα των γ ιντερλευκινών, αναφέρεται ότι παίζουν ρόλο στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των πρωτογενών T-κυττάρων οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας ^[98]. Παρά τις διαφορές μεταξύ φυσιολογικών και κακοήγη βλαστικών κυττάρων του αίματος, και οι δύο κυτταρικοί τύποι χρησιμοποιούν τη σηματοδότηση κυτοκίνης για την εξέλιξη και διαφοροποίηση ^[99]. Στην ανάλυσή μας, προβλέψαμε την IL8 και IL9, μαζί με τον υποδοχέα IL2.

II. Οι χημειοκίνες.

Καμία από τις οικογένειες των μορίων CXCL ή CXCR δεν φαίνεται να έχουν παρόμοια πρότυπα έκφρασης, αλλά προβλέπεται ότι υπέρ-εκφράζονται στην κυτταρική γραμμή CCRF-CEM. Αυτό επιβεβαιώνει τις προβλέψεις που έγιναν από το πείραμα μικροσυστοιχίας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, ότι για ορισμένες κυτταρικές σειρές απαιτείται η συστηματική παρουσία του NF-kB στον πυρήνα για να παραχθούν οι χημειοκίνες ^[100]. Στα κύτταρα CCRF-CEM έχει φανεί ότι ο NF-kB είναι παρόν στον πυρήνα ^[42], υποστηρίζοντας έτσι την απόδειξη της έκφρασης χημειοκίνης.

III. Οι αιμοποιητίνες.

Οι δύο κυτταρικοί τύποι φαίνεται ότι παρουσιάζουν κοινή έκφραση του γονιδίου LIFR. Αυτή η πρωτεΐνη συμμετέχει στην εμφύτευση του εμβρύου, στη διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων σε αστροκύτταρα ^[101], καθώς και στη μετατροπή του μεσεγχύματος σε επιθηλιακά κύτταρα ^[102]. Το γονίδιο LIFR έχει αναφερθεί ότι συνδέεται με τον άξονα PTEN-Akt-FOXO και STAT3 ^[101]. Δεν υπάρχουν αναφορές που συνδέουν αυτό το γονίδιο με την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία ή με το ραβδομυοσάρκωμα. Ο ρόλος του LIFR δεν είναι σαφής στο παρόν σύστημα. Ένα άλλο σημαντικό γονίδιο που προβλέπεται είναι το CSF3R, που έχει αναφερθεί στο παρελθόν ο ρόλος του στην αιμοποίηση, δεδομένου ότι εκφράζεται μόνο στα αιμοποιητικά κύτταρα μυελοειδούς καταγωγής ^[103]. Δεν υπάρχουν αναφορές που να συνδέουν αυτό το γονίδιο με το ραβδομυοσάρκωμα. Ωστόσο, είναι ένας κοινός αναπτυξιακός μηχανισμός που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και από τους δύο κυτταρικούς τύπους για την ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου.

IV. Η οικογένεια PDGF.

Η μελέτη μας προέβλεψε από αυτή την οικογένεια γονιδίων, ότι οι δύο κυτταρικοί τύποι από κοινού εκφράζουν τα εκκριτικά μόρια PDGFB, VEGFC και τους υποδοχείς MET και FLT3.

Η οικογένεια PDGF ρυθμίζει τον κλωνικό πολλαπλασιασμό στις κυτταρικές σειρές προ-B και έχει βρεθεί ότι υπερ-εκφράζεται στην B-χρόνια λευχαιμία ^[104]. Και οι δυο οικογένειες VEGF και PDGF εμπλέκονται στην νεο-αγγειογένεση στο έμβρυο και στους όγκους ^[105]. Το ραβδομυοσάρκωμα έχει αναφερθεί ότι εκφράζει τους υποδοχείς IGF και PDGF ^[51]. Ωστόσο, η έκφραση του υποδοχέα είναι ανεξάρτητη από την έκφραση του σηματοδοτικού μορίου και η έκφραση του PDGF σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση ^[51]. MET είναι ο υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων, που παράγεται από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών ^[106] ειδικά στην οξεία φάση της T-ALL ^[107]. Ο MET είναι επίσης γνωστό ότι παίζει ρόλο στην χρόνια μυελοειδή λευχαιμία ^[108] και εκφράζεται στα κύτταρα B ALL που έχουν την μετατόπιση TEL-AML1 ^[109]. Ομοίως, η μεταλλαγμένη μορφή του υποδοχέα FLT3 εμπλέκεται στην AML ^[110]. Μέλη της οικογένειας PDGF των μορίων σηματοδότησης φαίνεται να δραστηριοποιούνται και στις δύο κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Αυτό υποδηλώνει ότι και οι δύο κυτταρικοί τύποι χρησιμοποιούν τα ίδια μόρια για τη σηματοδότηση. Αυτή η οικογένεια μορίων είναι ενεργή στην εμβρυογένεση και στην διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων, μπορεί να υποτεθεί ότι στο παρόν σύστημα αποτελεί αναπτυξιακό μηχανισμό ακόμα ενεργό μετά από την παρουσία της κακοήθειας.

7.2. ΟΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ECM-ΥΠΟΔΟΧΕΑ

Σε αυτό το μονοπάτι σηματοδότησης οι δύο κυτταρικοί τύποι μοιράζονται δύο γονίδια με ίδια έκφραση: Thrombospondin-4 (THBS4) και ITGA6. Το γονίδιο ιντεγκρίνης είναι γνωστό ότι εκφράζεται σε αιματολογικές κακοήθειες της παιδικής ηλικίας ^[111], ενώ δεν υπάρχουν αναφορές που να χαρακτηρίζουν το γονίδιο THBS4 σε σχέση με τη λευχαιμία ή το ραβδομυοσάρκωμα. Και τα δύο σηματοδοτικά μόρια εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση ECM-υποδοχέα.

7.3. ΕΣΤΙΑΚΗ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ

Τόσο ο ECM-υποδοχέας όσο και η αλληλεπίδραση του σηματοδοτικού υποδοχέα-κυτοκίνης είναι αλληλένδετα με την εστιακή προσκόλληση. Το σύστημά μας προέβλεψε ότι υπάρχουν δύο οδοί μεταγωγής σήματος, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 19**: η μία οδός ακολουθεί τον ECM-υποδοχέα σήματος LAMB2-ITGA6-CAPN2-VASP-κυτταρικής κινητικότητας και η άλλη ακολουθεί την επαγωγή κυτοκίνης VEGF-MET/ACK1/-ELK1- κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το ELK1 στο microarray screening δεν βρέθηκε να εκφράζεται αλλά μάλλον είχε προβλεφθεί σωστά στην ανάλυση TFBM. Το CAPN2 είναι ένας γνωστός ρυθμιστής της κυτταρικής μετανάστευσης των διάφορων κυτταρικών τύπων ^[112], αλλά δεν υπάρχει σύνδεση αυτού του γονιδίου είτε με τη λευχαιμία ή το ραβδομυοσάρκωμα που να έχει αναφερθεί. Ομοίως, δεν υπάρχουν αναφορές που να συνδέουν το LAMB2 με λευχαιμία ή ραβδομυοσάρκωμα. Στο σύστημά μας προβλέπεται ότι αυτά τα δύο μόρια παίζουν ρόλο στη μετανάστευση και για τους δύο κυτταρικούς τύπους που μελετήθηκαν. Το ACK1 είναι γνωστός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου του οποίου η υπέρ-έκφραση σχετίζεται με καρκίνο

και του EGFR η υπό-ρύθμιση ^[113, 114] . Είναι ενδιαφέρον, ότι στο παρόν σύστημα το ACK1 εκφράζεται εξίσου και στις δύο κυτταρικές σειρές, ενώ το EGFR φαίνεται να υπέρ-εκφράζεται στα κύτταρα TE-671. Ο ELK-1, μεταγραφικός παράγοντας φαίνεται να εμπλέκεται στην άμεση συσχέτιση με την κινάση εστιακής προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase) και την MAP κινάση επάγοντας την αντι-απόπτωση ^[115] . Υπάρχει μία άμεση σύνδεση του μονοπατιού εστιακής προσκόλλησης στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου πάνω από το μονοπάτι MAPK. Το σύστημά μας προέβλεψε σωστά ότι ο διαμεσολαβητής για αυτή τη μετάβαση, στους δύο κυτταρικούς τύπους, είναι ο μεταγραφικός παράγοντας ELK-1.

7.4. ΤΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ JAK-STAT/MAPK

Η σηματοδότηση στο μονοπάτι JAK-STAT προβλέπεται ότι ξεκινάει με τις ιντερλευκίνες IL2, IL8, IL9 και τους υποδοχείς τους στο παρόν σύστημα, που φαίνεται να είναι οι ίδιοι και για τους δύο κυτταρικούς τύπους. Ο υποδοχέας ιντερλευκίνης δεσμεύεται στην JAK κινάση, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί ^[116] τον μεταγραφικό παράγοντα STAT1 με φωσφορυλίωση ^[117, 118] . Ο μεταγραφικός παράγοντας STAT1 παραμένει αδρανής στο κυτταρόπλασμα μέχρι να λάβει χώρα η ενεργοποίηση από την JAK και τότε μεταφέρεται στον πυρήνα σηματοδοτώντας την έκφραση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση. Οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT1 και STAT5B φάνηκε να εκφράζονται στο παρόν σύστημα ενώ ο παράγοντας STAT1 επίσης είχε προβλεφθεί από την ανάλυση TFBM. Και οι δύο παράγοντες φαίνεται να υπέρ-εκφράζονται στα κύτταρα TE-671, σε σύγκριση με τα κύτταρα CCRF-CEM. Την ίδια χρονική στιγμή, οι δύο κυτταρικοί τύποι φαίνεται να εκφράζουν PIAS2 (*PIASalpha*), ένα γνωστό αναστολέα του STAT1 δρώντας ως E3 λιγάση ^[116] . Όταν ο STAT1 μετατοπίζεται στον πυρήνα, αλληλεπιδρά με την ιστόνη ακετυλοτρανσφεράση (CREB-δεσμευτική πρωτεΐνη) συν-παράγοντα ^[119] και τον NF-kB με την έναρξη της μεταγραφής ^[120] . Αυτό το μέρος του μονοπατιού JAK-STAT μπορεί να ξεκινήσει τη μεταγραφή γονιδίων που οδηγούν σε πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και ανάπτυξη. Από την άλλη πλευρά, υπάρχει η εναλλακτική ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από κυτοκίνες μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού MAPK μέσω της πρωτεΐνης τυροσίνης φωσφατάσης και του μονοπατιού Ras / MAPK.^[121] Η ενεργοποίηση μέσω του μονοπατιού Ras / MAPK περιλαμβάνει τη σηματοδότηση από κυτοκίνες όπως PDGFA ή PDGFB, και τα δύο εκφράζονται στο σύστημά μας, η ενεργοποίηση του HRAS και η επακόλουθη ενεργοποίηση των RAF/MAPK/ERK, είναι γνωστό επίσης ότι εμπλέκονται στην τελική διαφοροποίηση των μυελοειδών κυττάρων ^[122] . Στη συνέχεια, μια νέα πρωτεΐνη της οικογένειας σερίνης / θρεονίνης κινασών (*RPS6KA3*) συμμετέχει στο μονοπάτι Ras / Raf / MAPK.^[123] Το *RPS6KA3* αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα CREB, που προβλέφθηκε από την ανάλυση TFBM, οδηγώντας στην γονιδιακή ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Εναλλακτική λύση για αυτή τη διαδικασία είναι η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα ELK-1 από την κινάση ERK. Ο μεταγραφικός παράγοντας ELK-1 φωσφορυλιώνεται από τις MAP κινάσες ^[124-126] και προσλαμβάνεται από το μεταγραφικό παράγοντα SRF ^[125, 126] . Ο παράγοντας SRF δεσμεύει τους παράγοντες που επάγουν το γονίδιο, τα SREs (*Serum*

Response Elements) επάγουν την έκφραση των άμεσων πρώιμων γονιδίων (*IE*) όπως ο c-FOS και ο EGR-1 ^[127]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, ο μεταγραφικός παράγοντας SRF, που είχε προβλεφθεί από την ανάλυση TFBM ενώ τα γονίδια EGR-1, -2, -3, -4 και FOSB φάνηκε ότι εκφράζονται στο σύστημα της μελέτης μας. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι ο TGF-β ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK πάνω από το μονοπάτι της p38 / MAPK ^[128]. Ενδιαφέρον προκαλεί, ότι τα δύο βασικά μόρια TGF-β και p38 φάνηκε όχι μόνο να εκφράζονται και στους δύο κυτταρικούς τύπους, αλλά και ότι ρυθμίζονται εξίσου, γεγονός που υποδηλώνει μια κοινή αξιοποίηση αυτού του μονοπατιού για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Συγκεκριμένα, ο TGF-β ενεργοποιεί μέλη του μονοπατιού MAPK, όπως c-JUN, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν την p38 κινάση (*stress activated*) ^[129-132]. Η κινάση p38 είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες ELK-1 και ATF-2 ^[133-136]. Ο μεταγραφικός παράγοντας ATF-2 επίσης έχει προβλεφθεί από την ανάλυση TFBM. Οι μηχανισμοί που περιγράφονται στη μελέτη μας φαίνεται να είναι κοινοί τόσο για την λευχαιμία όσο και για το ραβδομυοσάρκωμα. Απ' όσο γνωρίζουμε, αρκετοί από τους μηχανισμούς αυτούς είναι γνωστοί ότι εκδηλώνονται σε λευχαιμικά κύτταρα, αλλά δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής αναφορές που να συνδέουν το σάρκωμα ή κύτταρα ραβδομυοσαρκόματος. Τέλος, ένα άλλο μονοπάτι που προβλέπεται και από την ανάλυσή μας είναι η αλληλεπίδραση της p38 κινάσης με τον μεταγραφικό παράγοντα MAX (*MYC associated factor X*), που είναι γνωστό ότι σχηματίζει σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες για τη γονιδιακή ρύθμιση ^[137]. Το μονοπάτι JAK-STAT, συγκεκριμένα, είναι απαραίτητο για την ανανέωση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους ^[138] υπονοώντας την ενεργή παρουσία στο σύστημα της μελέτης μας.

7.5. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Ακόμα κι αν έχουμε περιγράψει τα μονοπάτια σηματοδότησης που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, δεν έχουμε περιγράψει πώς αυτό υλοποιείται στον ίδιο τον κυτταρικό κύκλο. Ένας βασικός ρυθμιστής της προόδου του κυτταρικού κύκλου είναι το μονοπάτι MAPK. Ανάλογα με τη σηματοδότηση του MAPK, το μονοπάτι του κυτταρικού κύκλου λαμβάνει σήματα, προκειμένου να προχωρήσει. Φαίνεται ότι στο σύστημά μας τα μόρια-κλειδιά στο μονοπάτι MAPK σηματοδοτούν την ενεργοποίηση της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Ειδικά για τους δύο κυτταρικούς τύπους της μελέτης μας, φάνηκε ότι ο κυτταρικός κύκλος ακολουθεί μια εξαρτώμενη από τον χρόνο μετάπτωση από την G1 στη φάση S, ενώ η G2 φάση παραμένει πρακτικά σταθερή (**Εικόνα 3C, D**). Η κυτταρική σειρά CCRF-CEM έχει ένα ελαττωματικό γονίδιο, το TP53 ^[139] το οποίο δεν είναι σε θέση να αλληλεπιδρά με το PCNA. Επίσης, η έκφραση PCNA συνδέεται με την μετάπτωση στη φάση S ^[140]. Αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας που δείχνουν ότι το PCNA υπέρ-εκφράζεται στα λευχαιμικά κύτταρα, τα οποία προχωρούν ταχύτερα στην S-φάση από ό, τι η κύτταρα του ραβδομυοσαρκόματος. Είναι ενδιαφέρον, ότι η ιστόνη αποακετυλάση 7 (HDAC7), που εκφράζεται στο σύστημά μας, είναι μία γνωστή ιστο-ειδικής τάξης II αποακετυλάσης ιστόνη ^[141]. Αυτή η κατηγορία αποακετυλασών ιστόνης είναι αντι-αποπτωτικοί παράγοντες που βρέθηκαν σε θυμοκύτταρα ^[142] και υπερ-εκφράζονται στα κύτταρα ραβδομυοσαρκόματος.

7.6. ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΤΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ JAK-STAT/MAPK ΚΑΙ TGF- β

Από την ανάλυση των μονοπατιών JAK-STAT-MAPK-TGF- β μονοπάτια, παρατηρήσαμε ότι τα JAK1, STAT1, PIAS2 και CDK4 είναι πιθανά υποψήφια γονίδια. Το γεγονός ότι αυτά τα μόρια ευδοκιμούν με απειροελάχιστη ταλάντωση, ελλείπει ανασταλτικών μηχανισμών, τα καθιστά υποψήφια ογκογόνα γονίδια. Ο αριθμός των γονιδίων που έχουν ήδη αναφερθεί ως πιθανοί ογκογόνοι μηχανισμοί, είναι οι πρωτεΐνες PRDM, που ανήκουν στην οικογένεια SET της ιστόνης μεθυλτρανσφεράσης. Η ενζυματική δραστηριότητα έχει προσδιορισθεί για μόνο μερικές PRDMs υποδηλώνοντας ότι αυτές ενεργούν με την πρόσληψη συν-παραγόντων ή υποθετικά, με μεθυλίωση των στόχων μη-ιστόνης. Τα μέλη της οικογένειας PRDM απορρυθμίζονται σε ανθρώπινες ασθένειες, ειδικά σε αιματολογικές κακοήθειες και συμπαγείς καρκίνους, όπου μπορούν να δρουν με δυο τρόπους ως καταστολείς όγκων και ως ογκογόνοι καθοδηγητές ^[143]. Παρόμοιες αναφορές έχουν δείξει την ύπαρξη τέτοιων γονιδίων στο γλοιοβλάστωμα, όπου αποκαλύφθηκε μια μετα-μεταγραφική ρύθμιση εκπληκτικού μεγέθους, η οποία περιλαμβάνει περισσότερα από 248.000 microRNA-διαμεσολαβούμενες αλληλεπιδράσεις. Οι αναλύσεις στις κυτταρικές σειρές επιβεβαίωσαν ότι το δίκτυο αυτό ρυθμίζει την έναρξη του όγκου και την εξέλιξη του συμπεριλαμβανομένων των PTEN, PDGFRA, RB1, VEGFA, STAT3 και RUNX1, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτές οι αλληλεπιδράσεις διαμεσολαβούν σε ογκογενετικά μονοπάτια ^[144]. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός, ότι αυτά τα μόρια παίζουν ένα ρόλο στην ποικιλομορφία του αιμοποιητικού ενδεχομένως και του λευχαιμικού πληθυσμού^[145]. Αυτές οι παρατηρήσεις μας φέρνουν στο μυαλό τις μεταλλάξεις. Θεωρήθηκε ότι οι μεταλλάξεις είναι η κύρια κινητήρια δύναμη των όγκων. Ωστόσο, με βάση τις παρούσες προβλέψεις και σε προηγούμενη έρευνα σχετικά με τους λεγόμενους «backseat drivers» ^[146], είναι πιθανό ότι οι μεταλλάξεις δεν κατευθύνουν ή οδηγούν σε όγκους. Από τις παρατηρήσεις αυτές, φαίνεται ότι υπάρχουν ορισμένα μόρια σε ένα μονοπάτι που λειτουργούν με απρόβλεπτο τρόπο, που μπορεί να οδηγήσει ένα σύστημα προς το άπειρο. Με άλλα λόγια, αυτά τα μόρια είναι ικανά να κατευθύνουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, η δυσλειτουργία και όχι μόνο μια μετάλλαξη θα μπορούσε να οδηγήσει στην εκδήλωση της ογκογένεσης. Δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με τη μη γραμμική φύση της συμπεριφοράς των γονιδίων JAK, STAT και PIAS2. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι η οικογένεια CDK πρωτεϊνών ακολουθεί μη γραμμική δυναμική ως ενισχυτής του κυτταρικού κύκλου. Περαιτέρω έρευνες για το θέμα αυτό θα μας δώσουν περισσότερες γνώσεις σχετικά με τους μηχανισμούς της γονιδιακής ρύθμισης και θα μπορούσαν ενδεχομένως να οδηγήσουν στην ανακάλυψη νέων προγνωστικών ή θεραπευτικών στόχων.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη αποκαλύπτει μια νέα ολιστική προσέγγιση για την κατανόηση της δυναμικής έναρξης του όγκου και των πιθανών κινητήριων δυνάμεων. Οι JAK1, STAT1, PIAS2 και CDK4 προβλέψαμε ότι είναι οι κινητήριες δυνάμεις στις κυτταρικές σειρές CCRF-CEM και TE-671. Επίσης, προτείνουμε ότι οι μεταλλάξεις δεν είναι οι μόνες κινητήριες δυνάμεις πίσω από την ογκογένεση. Διάφορα νεοπλάσματα φέρουν διαφορετικά χαρακτηριστικά και αναμένεται να έχουν

διαφορετικά χαρακτηριστικά και φαινοτύπους. Ωστόσο, μια προσέγγιση για την ταυτοποίηση κοινών στοιχείων μεταξύ τέτοιων ποικίλων βιολογικών συστημάτων, θα μπορούσε ενδεχομένως να οδηγήσει στην κατανόηση των κοινών μηχανισμών που μετατρέπουν τα φυσιολογικά αυτά κύτταρα σε κακοήθη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8- ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΕΠΙ ΤΩΝ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΕΩΝ ΤΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ

Έχουν χρησιμοποιηθεί υπολογιστικά και βιολογικά συστήματα προκειμένου να διερευνηθούν τα εξής: i) ένα ορισμένο σύνολο γονιδίων, τα γονίδια που είναι ειδικά για κάθε κυτταρικό τύπο και συγχρόνως κοινά και για τους δύο τύπους κυττάρων, ii) ομοιότητες στη εξέλιξη των όγκων, στον κυτταρικό κύκλο και στην εξωκυττάρια εκκριτική σηματοδότηση, iii) κοινοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί για τους δύο τύπους κυττάρων, με βάση το προφίλ έκφρασης τους, iv) τα μονοπάτια που είναι κοινά στους δύο τύπους κυττάρων, και v) ο ρόλος των βλαστικών κυττάρων στην ογκογένεση. Για το σκοπό αυτό, έχουν αναλυθεί διάφοροι οδοί σηματοδότησης και έχει αναζητηθεί το επικρατέστερο μονοπάτι στην εξέλιξη των δύο τύπων κυττάρων. ALL και RMS είναι δύο κακοήθειες που προέρχονται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων (λεμφοβλάστη και μυοβλάστη, αντίστοιχα), αν και οι δύο είναι μεσοδερμικής προέλευσης. Η κατανόηση της προέλευσης των όγκων στο επίπεδο της αιμοποίησης/λεμφοποίησης^[147] ή μυογένεσης, μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων. Οι δύο τύποι κυττάρων έχουν κοινά χαρακτηριστικά, πρώτον λόγω της κοινής καταγωγής και δεύτερον, λόγω του κακοήθους χαρακτήρα τους. Έχουν χρησιμοποιηθεί μικροσυστοιχίες και μια βιοπληροφορική προσέγγιση, προκειμένου να εξεταστεί αν υπάρχουν κοινά γονίδια που συμμετέχουν στα κρίσιμα κυτταρικά μονοπάτια μεταξύ των δύο τύπων κυττάρων. Έχει παρατηρηθεί, ότι αν και οι δύο κυτταρικοί τύποι που μελετήθηκαν ήταν διαφορετικοί, κατέχουν παρόμοιους μηχανισμούς εξέλιξης και διατήρησης από την εμβρυϊκή ιστορία τους. Το μονοπάτι κλειδί φαίνεται να είναι το MAPK μαζί με το μονοπάτι JAK-STAT. Αυτό θα μπορούσε πιθανότατα να είναι ένας υπαινιγμός για την «βλαστική ικανότητα» του καρκίνου. Επίσης, οι δύο κυτταρικοί τύποι έχουν κοινά εξωκυττάρια σηματοδοτικά μόρια ανοίγοντας το δρόμο για την ανακάλυψη κοινών βιοδεικτών. Οι περαιτέρω προσομοιώσεις του μονοπατιού οδηγούν σε πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Τέσσερα μόρια φάνηκε να εκδηλώνουν ταλαντώσεις στη συμπεριφορά τους: JAK, STAT1 και PIAS2 (μέρος του μονοπατιού JAK-STAT) και CDK4 (μέρος του μονοπατιού TGF-β). Φάνηκε ότι αυτά τα μόρια που ακολουθούν ταχεία δυναμική ταλάντωση και χωρίς ανασταλτικό μηχανισμό, αποτελούν πιθανούς καθοδηγητές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Προτείνεται ότι αυτά τα τέσσερα μόρια είναι εν δυνάμει ογκογόνοι μηχανισμοί στα υπό μελέτη κυτταρικά συστήματα.^[1-3] Από αναλύσεις μικροσυστοιχίας έχει βρεθεί ότι αυτά τα τέσσερα γονίδια συμμετέχουν εξίσου στους δύο τύπους κυττάρων. Για να ερευνηθεί η αρχική δυναμική αυτών των μορίων, μελετήθηκε κατά πόσο ακολουθούν γραμμική ή μη-γραμμική δυναμική, και αν υπάρχουν περαιτέρω συσχετίσεις μεταξύ τους. Για να γίνει αυτό, έχουν χρησιμοποιηθεί state-space plots (χώρου-θέσης) των συνδυασμών των 4 γονιδίων. Το JAK1 έναντι STAT1 έδειξε ότι ακολουθούν πολύ περίπλοκη δυναμική, που στην πραγματικότητα μοιάζει απωθητική ή μία «πηγή». Παρόμοια συμπεριφορά εκδηλώθηκε με την σύγκριση των PIAS2 με STAT1 και PIAS2 με JAK1. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι το JAK1 έναντι STAT1 και PIAS2 έναντι JAK1 είναι σχεδόν το ένα καθρέφτης του άλλου. Αντίθετα, το CDK4 έναντι

JAK1 δεν έχει δείξει παρόμοια συμπεριφορά, αποκαλύπτοντας ένα φαινόμενο «δίνης» (*sink*) όπου οι κοινοί καθοδηγητές τείνουν να συγκρουστούν. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν προς χαοτικά φαινόμενα από την άποψη της δυναμικής του χάους. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται προκειμένου να αναλυθεί περισσότερο η δυναμική που αναδεικνύεται και να αποσαφηνιστεί αυτό το φαινόμενο. Προκειμένου να εξεταστούν οι συνεργικές επιδράσεις των μορίων, έχει προσομοιωθεί το άθροισμα αυτών των μορίων σε σχέση με το χρόνο. Σημειώνεται, ότι το άθροισμα των STAT1 και JAK1 εκδηλώνει παρόμοια συμπεριφορά με το άθροισμα των PIAS2 και STAT1, υποδεικνύοντας ότι αυτά τα μόρια είναι πιθανώς τα μόρια κλειδιά στη λειτουργία του μονοπατιού. Για άλλη μια φορά, το άθροισμα των JAK1 και STAT1 ήταν καθρέφτης του αθροίσματος των JAK1 και PIAS2. Τέλος, η προσομοίωση του αθροίσματος των JAK1 και CDK4 έχει δείξει ότι το σύστημα οδηγεί σε μια ταλάντωση που τείνει στο άπειρο. Αυτό ενισχύει το ρόλο των μορίων JAK1 και CDK4 ως εν δυνάμει καθοδηγητές της ογκογένεσης των κυτταρικών τύπων. Η προσομοίωση των γονιδίων που αλληλεπιδρούν σε ένα μονοπάτι, είναι μια εργασία που απαιτεί γνώση, όχι μόνο της βιβλιογραφίας αλλά και των λαμβανόμενων δεδομένων, των χαρτογραφημένων γονιδίων, των μονοπατιών τους και των αλληλεπιδράσεών τους. Σε προηγούμενες αναφορές είχε αναφερθεί προσομοίωση μερικών από τα κοινώς ρυθμιζόμενα γονίδια.^[1-3] Για παράδειγμα, και οι δύο κυτταρικοί τύποι χρησιμοποιούν τα TGFβ και PDGFA, ως εξωκυττάρια σήματα, με ένα πολύ παρόμοιο τρόπο.^[1-3] Τα δύο εξωκυττάρια μόρια έχουν ως κοινό παρονομαστή την ενεργοποίηση του SPRED2, που μαζί με το BCL2, είναι ένας ρυθμιστής της απόπτωσης και αντι-απόπτωσης, αντίστοιχα.

Τέλος, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε υπολογιστικές και μαθηματικές προσεγγίσεις προκειμένου να απαντήσουμε στο ερώτημα αν θα μπορούσε να βρεθεί αιτιακή σχέση μεταξύ των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης των δύο κυτταρικών τύπων, με βάση την χρωμοσωμική κατανομή τους. Έχουμε διαπιστώσει ότι τέτοιες σημαντικές σχέσεις θα μπορούσαν να βρεθούν τόσο με τη χρήση 2D καθώς και 3D μεθόδους παλινδρόμησης. Συγκεκριμένα, οι 2D παλινδρομήσεις δείχνουν ότι υπάρχουν πολύ καλές σχέσεις μεταξύ των κυτταρικών τύπων σε σχέση με τα χρωμοσώματα, χωρίς όμως να υποδηλώνει μια σαφή αιτιακή σχέση. Από την άλλη πλευρά, οι 3D παλινδρομήσεις εκδηλώνουν καλύτερα αποτελέσματα που υποδηλώνουν ότι πιθανότατα υπάρχουν αιτιακές πολυδιάστατες σχέσεις. Την ίδια στιγμή, το γεγονός ότι ορισμένα γονίδια και χρωμοσώματα δείχνουν σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα σε δύο διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, αλλά παρόμοιας προέλευσης, σημαίνει ότι θα μπορούσαν πιθανόν να αποτελούν κοινούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς της ογκογένεσης. Προηγουμένως, αναφέρθηκαν τα γονίδια ANXA4 (χρωμόσωμα 2), NP25 (χρωμόσωμα 3), VEGFC (χρωμόσωμα 4), PDLIM7 και THBS4 (χρωμόσωμα 5), CUL7 (χρωμόσωμα 6), CD36 (χρωμόσωμα 7), BNIP3L (χρωμόσωμα 8), CDC2 και IL2RA (χρωμόσωμα 10), MAB21L1 και FOXO1 (χρωμόσωμα 13), TCL1A (χρωμόσωμα 14), FEM1B (χρωμόσωμα 15), CFDP1 και MMP2 (χρωμόσωμα 16), RTTN (χρωμόσωμα 18), PDCD5 (χρωμόσωμα 19), NNAT και

ZNF313 (χρωμόσωμα 20), MBNL3, PLAC1, RPS6KA3 και CD40LG (χρωμόσωμα X) που βρέθηκαν να συμμετέχουν στην κυτταρική διαφοροποίηση και την εμβρυική διαδικασία. Αυτά τα γονίδια εμφανίζουν σημαντικές συσχετίσεις τόσο στην 2D, καθώς και στην 3D παλινδρόμηση. Αυτό το εύρημα αποτελεί μια σημαντική παρατήρηση, καθώς είναι πιθανόν ότι τα γονίδια αυτά θα μπορούσαν να έχουν ένα κοινό μηχανισμό, είτε μέσω της γονιδιακής ρύθμισης τους ή της εκτροπής τους, που οδηγεί στην γένεση του όγκου για τους δύο κυτταρικούς τύπους που είναι υπό διερεύνηση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την παρούσα προσέγγιση προσπαθήσαμε να βρούμε κοινούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης των δύο κυτταρικών τύπων. Πιο συγκεκριμένα, προσπαθήσαμε να ανακαλύψουμε πιθανές σχέσεις αιτιότητας στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης. Βρήκαμε αποδεικτικά στοιχεία που δείχνουν να υπάρχουν τέτοιες συσχετίσεις και είναι πιθανό ότι ορισμένα γονίδια θα μπορούσαν να έχουν σπουδαία σημασία στην ογκογένεση. Τέτοιες προσεγγίσεις θα μπορούσαν να αποδειχθούν χρήσιμες στην πρόβλεψη γενομικών στόχων που θα μπορούσαν να μελετηθούν περαιτέρω προκειμένου να διαλευκάνουμε τους μηχανισμούς της ογκογένεσης. Όπως αναφέραμε στην αρχή, δεν υπάρχει άμεση απάντηση στο ερώτημα πώς τα υπολογιστικά και τα βιολογικά συστήματα μπορούν να συμβάλλουν προς όφελος της υγειονομικής περίθαλψης. Μόνο μέσω της κατανόησης της κυτταρικής φυσιολογίας και της μηχανικής μπορούν οι ειδικότητες αυτές να συμβάλλουν προς όφελος της φροντίδας υγείας. Αυτό βέβαια είναι και ο σκοπός των κλασικών προσεγγίσεων, με τη μόνη διαφορά ότι οι κλασικές προσεγγίσεις ασχολούνται με ένα περιορισμένο σύνολο των παραγόντων ταυτόχρονα. Αν θυμηθούμε τα λόγια του *Henri Poincaré*, η απάντηση στα μυστήρια της ζωής δίνεται μέσα από την κατανόηση του ολιστικού συστήματος που ονομάζεται κύτταρο. Υπό αυτή την έννοια, η μεγάλη συνεισφορά της βιολογίας συστημάτων μπορεί να είναι δυνατή. Ένας από τους κύριους λόγους που πολλά πράγματα είναι ακόμη άγνωστα είναι γιατί δεν έχουμε την «ολοκληρωμένη εικόνα» για το τι θα μελετήσουμε. Βλέπουμε τα «δέντρα» ξεχωριστά και όχι το «δάσος» συνολικά. Η βιολογία των συστημάτων θα εφαρμοστεί άμεσα στο σχεδιασμό φαρμάκων. Ωστόσο, η κατανόηση της κυτταρικής μηχανικής και του αποτελεσματικού σχεδιασμού φαρμάκων διασυνδέονται τόσο μεταξύ τους ώστε να καθίσταται αδύνατος ο διαχωρισμός αυτών των κλάδων. Ως εκ τούτου, η εφαρμογή της μεθοδολογίας των βιολογικών συστημάτων για την ανακάλυψη των μηχανισμών που βρίσκονται πίσω από βιολογικά συστήματα θα έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή πιο αποτελεσματικών και πιο οικονομικών φαρμάκων. Φυσικά, η βιολογία συστημάτων δεν ξεφεύγει από την ηθική. Όσο περισσότερο κατανοούμε τα βιολογικά συστήματα τόσο περισσότερο θα είμαστε σε θέση να τα χειραγωγήσουμε προς όφελός μας. Από την άλλη πλευρά, μία από τις κύριες ωφέλιμες χρήσεις είναι η ανακάλυψη αποτελεσματικών φαρμάκων για τη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών ή να εφεύρουμε τρόπους για περισσότερο αποτελεσματικές καλλιέργειες. Σημαντική είναι η συνεισφορά των βιολογικών συστημάτων στην ανακάλυψη φαρμάκων, φθηνών και αποτελεσματικών, που θα είναι διαθέσιμα για το όφελος όλης της ανθρωπότητας, ειδικά για τη θεραπεία του καρκίνου. Παρά το γεγονός ότι πολλές ασθένειες σήμερα μπορούν να θεραπεύονται μέσα σε λίγα μόνο λεπτά, κυρίως λόγω λήξης των διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας, εκατοντάδες εκατομμύρια άνθρωποι εξακολουθούν να πεθαίνουν από απλές ασθένειες (όπως φλεγμονές τετάνου) κάθε χρόνο, επειδή δεν έχουν πρόσβαση ακόμα και στα φάρμακα πρώτης ανάγκης. Αυτό φέρνει στην κορυφή και πάλι το θέμα του διττού χαρακτήρα των βιολογικών συστημάτων. Συμπεραίνουμε, ότι τα βιολογικά συστήματα, σε ένα γενικότερο πλαίσιο συστημικών προσεγγίσεων, είναι ένας μονόδρομος όσον αφορά την κατανόηση των βιολογικών φαινομένων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lambrou GI, et al. Pathway simulations in common oncogenic drivers of leukemic and rhabdomyosarcoma cells: a systems biology approach. *International journal of oncology* 2012;40(5):1365-90.
2. Lambrou GI. COMMON IN VITRO AND IN VIVO GENE EXPRESSION OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM NEOPLASIAS IN THE DISCOVERY OF HEMATOLOGIC BIOMARKERS [PhD Thesis]. Athens: National and Kapodistrian University of Athens; 2013.
3. Lambrou GI, et al. Systems Biology Methodologies for the Understanding of Common Oncogenetic Mechanisms in Childhood Leukemic and Rhabdomyosarcoma Cells. In: Athina L, Andriani D, editors. *Quality Assurance in Healthcare Service Delivery, Nursing and Personalized Medicine: Technologies and Processes*. Hershey, PA, USA: IGI Global; 2012. p. 111-68.
4. Wolkenhauer O. *Systems Biology-Dynamic Pathway Modelling*. Rostock 2010.
5. Pleasance ED, et al. A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature* 2010;463(7278):184-90.
6. Jones S, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science (New York, NY)* 2008;321(5897):1801-6.
7. Mardis ER, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *The New England journal of medicine* 2009;361(11):1058-66.
8. Mosse YP, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008;455(7215):930-5.
9. Wood LD, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science (New York, NY)* 2007;318(5853):1108-13.
10. Knudson A. Alfred Knudson and his two-hit hypothesis. (Interview by Ezzie Hutchinson). *The lancet oncology* 2001;2(10):642-5.
11. Moolgavkar SH. The multistage theory of carcinogenesis and the age distribution of cancer in man. *Journal of the National Cancer Institute* 1978;61(1):49-52.
12. Ritter G, et al. The multistage model of cancer development: some implications. *Toxicology and industrial health* 2003;19(7-10):125-45.
13. Carroll WL, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology* 2003:102-31.
14. Chadha NK, et al. Pediatric head and neck malignancies. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery* 2009;17(6):471-6.
15. Toro JR, et al. Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the surveillance, epidemiology and end results program, 1978-2001: An analysis of 26,758 cases. *International journal of cancer* 2006;119(12):2922-30.
16. Leaphart C, et al. Pediatric surgical oncology: management of rhabdomyosarcoma. *Surgical oncology* 2007;16(3):173-85.

17. Davicioni E, et al. Molecular classification of rhabdomyosarcoma--genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children's Oncology Group. *The American journal of pathology* 2009;174(2):550-64.
18. Khan J, et al. Gene expression profiling of alveolar rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays. *Cancer research* 1998;58(22):5009-13.
19. Oda Y, et al. Recent advances in the molecular pathology of soft tissue sarcoma: Implications for diagnosis, patient prognosis, and molecular target therapy in the future. *Cancer science* 2008.
20. Sorensen PH, et al. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 2002;20(11):2672-9.
21. Pappo AS, et al. Treatment of localized nonorbital, nonparameningeal head and neck rhabdomyosarcoma: lessons learned from intergroup rhabdomyosarcoma studies III and IV. *J Clin Oncol* 2003;21(4):638-45.
22. Morandi S, et al. Rhabdomyosarcoma presenting as acute leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 1996;18(3):305-7.
23. Parham DM, et al. Rhabdomyosarcoma mimicking acute leukemia. *Archives of pathology & laboratory medicine* 1998;122(12):1047.
24. Putti MC, et al. Unusual leukemic presentation of rhabdomyosarcoma: report of two cases with immunological, ultrastructural and cytogenetical studies. *Haematologica* 1991;76(5):368-74.
25. Sandberg AA, et al. Hematologic masquerade of rhabdomyosarcoma. *American journal of hematology* 2001;68(1):51-7.
26. Kaplinsky C, et al. T-cell acute lymphoblastic leukemia following therapy of rhabdomyosarcoma. *Medical and pediatric oncology* 1992;20(3):229-31.
27. Dedrick RL, et al. Carcinogenic potency of alkylating agents in rodents and humans. *Cancer research* 1992;52(9):2464-7.
28. Park DJ, et al. Therapy-related myelodysplastic syndromes. *Seminars in hematology* 1996;33(3):256-73.
29. Kelly PN, et al. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science (New York, NY)* 2007;317(5836):337.
30. Sewell W, et al. Genetic analysis of molecular oscillators in mammalian somitogenesis: clues for studies of human vertebral disorders. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2007;81(2):111-20.
31. Dunwoodie SL, et al. Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene *Dll3* are associated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm. *Development (Cambridge, England)* 2002;129(7):1795-806.
32. Kusumi K, et al. The mouse pudgy mutation disrupts Delta homologue *Dll3* and initiation of early somite boundaries. *Nature genetics* 1998;19(3):274-8.
33. Godin I, et al. Of birds and mice: hematopoietic stem cell development. *The International journal of developmental biology* 2005;49(2-3):251-7.
34. Nicolis SK. Cancer stem cells and "stemness" genes in neuro-oncology. *Neurobiology of disease* 2007;25(2):217-29.

35. Perilongo G, et al. Sequential development of Wilms tumor, T-cell acute lymphoblastic leukemia, medulloblastoma and myeloid leukemia in a child with type 1 neurofibromatosis: a clinical and cytogenetic case report. *Leukemia* 1993;7(6):912-5.
36. Chang LW, et al. A systematic model to predict transcriptional regulatory mechanisms based on overrepresentation of transcription factor binding profiles. *Genome research* 2006;16(3):405-13.
37. Miranda L, et al. Isolation of the human PC6 gene encoding the putative host protease for HIV-1 gp160 processing in CD4+ T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93(15):7695-700.
38. Naujokat C, et al. Proteasome inhibitors induced caspase-dependent apoptosis and accumulation of p21WAF1/Cip1 in human immature leukemic cells. *European journal of haematology* 2000;65(4):221-36.
39. Foley GE, et al. Continuous Culture of Human Lymphoblasts from Peripheral Blood of a Child with Acute Leukemia. *Cancer* 1965;18:522-9.
40. Uzman BG, et al. Morphologic variations in human leukemic lymphoblasts (CCRF-CEM cells) after long-term culture and exposure to chemotherapeutic agents. A study with the electron microscope. *Cancer* 1966;19(11):1725-42.
41. Sandstrom PA, et al. Autocrine production of extracellular catalase prevents apoptosis of the human CEM T-cell line in serum-free medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90(10):4708-12.
42. Lambrou GI, et al. Prednisolone exerts late mitogenic and biphasic effects on resistant acute lymphoblastic leukemia cells: Relation to early gene expression. *Leukemia research* 2009;33(12):1684-95.
43. McAllister RM, et al. Establishment of a human medulloblastoma cell line. *International journal of cancer* 1977;20(2):206-12.
44. Friedman HS, et al. A model for human medulloblastoma. Growth, morphology, and chromosomal analysis in vitro and in athymic mice. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 1983;42(5):485-503.
45. McAllister RM, et al. Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer* 1969;24(3):520-6.
46. Chu ES, et al. Photodynamic effect in medulloblastoma: downregulation of matrix metalloproteinases and human telomerase reverse transcriptase expressions. *Photochem Photobiol Sci* 2008;7(1):76-83.
47. Yeung CM, et al. Expression and transcriptional regulation of the GnRH receptor gene in human neuronal cells. *Molecular human reproduction* 2005;11(11):837-42.
48. Jacobs JF, et al. Cancer-germline gene expression in pediatric solid tumors using quantitative real-time PCR. *International journal of cancer* 2007;120(1):67-74.
49. Jacobs JF, et al. Selective cancer-germline gene expression in pediatric brain tumors. *Journal of neuro-oncology* 2008;88(3):273-80.
50. Mhawech-Fauceglia P, et al. Friend leukaemia integration-1 expression in malignant and benign tumours: a multiple tumour tissue microarray analysis using polyclonal antibody. *Journal of clinical pathology* 2007;60(6):694-700.

51. Blandford MC, et al. Rhabdomyosarcomas utilize developmental, myogenic growth factors for disease advantage: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatric blood & cancer* 2006;46(3):329-38.
52. Ormerod MG, et al. Display of three-parametric data acquired by a flow cytometer. *Cytometry* 1987;8(2):240-3.
53. Ormerod MG, et al. Improved program for the analysis of DNA histograms. *Cytometry* 1987;8(6):637-41.
54. Watson JV, et al. A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry* 1987;8(1):1-8.
55. Russel S, et al. *Microarray Technology in Practice*. London: Elsevier Inc.; 2009.
56. Sifakis EG, et al. Evaluating the effect of various background correction methods regarding noise reduction, in two-channel microarray data. *Computers in biology and medicine* 2012;42(1):19-29.
57. Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. *Nature reviews* 2001;2(6):418-27.
58. Yang IV, et al. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome biology* 2002;3(11):research0062.
59. Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nature genetics* 2002;32 Suppl:496-501.
60. Van Gelder RN, et al. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87(5):1663-7.
61. Chung HW, et al. Differences in genetic expression profiles between young-age and old-age gastric adenocarcinoma using cDNA microarray for endocrine disruptor study. *Oncology reports* 2004;12(1):33-9.
62. Chatziioannou A, et al. Gene ARMADA: an integrated multi-analysis platform for microarray data implemented in MATLAB. *BMC bioinformatics* 2009;10:354.
63. Hoffmann R, et al. Developmental markers of B cells are superior to those of T cells for identification of stages with distinct gene expression profiles. *Journal of leukocyte biology* 2003;74(4):602-10.
64. Hoffmann R, et al. Profound effect of normalization on detection of differentially expressed genes in oligonucleotide microarray data analysis. *Genome biology* 2002;3(7):RESEARCH0033.
65. Tseng GC, et al. Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic acids research* 2001;29(12):2549-57.
66. Causton H, et al. *Microarray gene expression data analysis : A beginner's guide*. Malden, Massachusetts: Blackwell Publishing; 2003.
67. Cleveland W. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *Journal of the American Statistical Association* 1979;74(Dec.):829-36.
68. Shabalín AA, et al. Merging two gene-expression studies via cross-platform normalization. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2008;24(9):1154-60.

69. Ramasamy A, et al. Key issues in conducting a meta-analysis of gene expression microarray datasets. *PLoS medicine* 2008;5(9):e184.
70. Benson DA, et al. GenBank. *Nucleic acids research* 2003;31(1):23-7.
71. Benson DA, et al. GenBank: update. *Nucleic acids research* 2004;32(Database issue):D23-6.
72. Schuler GD. Sequence mapping by electronic PCR. *Genome research* 1997;7(5):541-50.
73. Wheeler DL, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information: update. *Nucleic acids research* 2004;32(Database issue):D35-40.
74. Wheeler DL, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology. *Nucleic acids research* 2003;31(1):28-33.
75. Diehn M, et al. SOURCE: a unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data. *Nucleic acids research* 2003;31(1):219-23.
76. Perez-Iratxeta C, et al. G2D: a tool for mining genes associated with disease. *BMC genetics* 2005;6:45.
77. Klipper-Aurbach Y, et al. Mathematical formulae for the prediction of the residual beta cell function during the first two years of disease in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Medical hypotheses* 1995;45(5):486-90.
78. Storey JD, et al. Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(16):9440-5.
79. Storey JD, et al. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in DNA microarrays. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 2003;224:149-57.
80. Cohen BA, et al. A computational analysis of whole-genome expression data reveals chromosomal domains of gene expression. *Nature genetics* 2000;26(2):183-6.
81. Reyal F, et al. Visualizing chromosomes as transcriptome correlation maps: evidence of chromosomal domains containing co-expressed genes--a study of 130 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer research* 2005;65(4):1376-83.
82. Sturn A, et al. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* (Oxford, England) 2002;18(1):207-8.
83. Zhang B, et al. GOTree Machine (GOTM): a web-based platform for interpreting sets of interesting genes using Gene Ontology hierarchies. *BMC bioinformatics* 2004;5:16.
84. Cole SW, et al. Expression-based monitoring of transcription factor activity: the TELiS database. *Bioinformatics* (Oxford, England) 2005;21(6):803-10.
85. Wingender E, et al. TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucleic acids research* 1996;24(1):238-41.
86. Beisvag V, et al. GeneTools--application for functional annotation and statistical hypothesis testing. *BMC bioinformatics* 2006;7:470.
87. Rubinstein R, et al. MILANO--custom annotation of microarray results using automatic literature searches. *BMC bioinformatics* 2005;6:12.
88. Mlecnik B, et al. PathwayExplorer: web service for visualizing high-throughput expression data on biological pathways. *Nucleic acids research* 2005;33(Web Server issue):W633-7.

89. Kanehisa M. A database for post-genome analysis. *Trends Genet* 1997;13(9):375-6.
90. Kanehisa M. The KEGG database. *Novartis Foundation symposium* 2002;247:91-101; discussion -3, 19-28, 244-52.
91. Kanehisa M, et al. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* 2000;28(1):27-30.
92. Nakao M, et al. Genome-scale Gene Expression Analysis and Pathway Reconstruction in KEGG. *Genome informatics* 1999;10:94-103.
93. Ogata H, et al. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic acids research* 1999;27(1):29-34.
94. Funahashi A, et al. CellDesigner 3.5: A Versatile Modeling Tool for Biochemical Networks. *Proceedings of the IEEE* 2008;96(8):1254-65.
95. Funahashi A, et al. CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks. *BIOSILICO* 2003;1(5):159-62.
96. Moutselos K, et al. KEGGconverter: a tool for the in-silico modelling of metabolic networks of the KEGG Pathways database. *BMC bioinformatics* 2009;10:324.
97. Papadimitriou V, et al. Gene Expression Chromosomal Correlations in Tumors of Mesodermal Origin: The Case of Rhabdomyosarcoma and Acute Lymphoblastic Leukemia. *International Journal of Engineering Research & Science* 2017;3(3):155-160.
98. Barata JT, et al. Common gamma chain-signaling cytokines promote proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2004;89(12):1459-67.
99. Kiss C, et al. Leukemic cells and the cytokine patchwork. *Pediatric blood & cancer* 2004;42(2):113-21.
100. Hiroi M, et al. The transcriptional coactivator CREB-binding protein cooperates with STAT1 and NF-kappa B for synergistic transcriptional activation of the CXC ligand 9/monokine induced by interferon-gamma gene. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(1):651-60.
101. de la Iglesia N, et al. Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway. *Genes & development* 2008;22(4):449-62.
102. Yoshino J, et al. Leukemia inhibitory factor is involved in tubular regeneration after experimental acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(12):3090-101.
103. Niini T, et al. Expression of myeloid-specific genes in childhood acute lymphoblastic leukemia - a cDNA array study. *Leukemia* 2002;16(11):2213-21.
104. Ho CL, et al. Autocrine expression of platelet-derived growth factor B in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Acta haematologica* 2005;114(3):133-40.
105. Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry* 2008;73(7):751-62.
106. Weimar IS, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+). *Experimental hematology* 1998;26(9):885-94.
107. Choi YL, et al. A genomic analysis of adult T-cell leukemia. *Oncogene* 2007;26(8):1245-55.

108. Zhelyazkova AG, et al. Prognostic significance of hepatocyte growth factor and microvessel bone marrow density in patients with chronic myeloid leukaemia. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 2008;1-9.
109. Accordi B, et al. Hepatocyte growth factor receptor c-MET is associated with FAS and when activated enhances drug-induced apoptosis in pediatric B acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 translocation. *The Journal of biological chemistry* 2007;282(40):29384-93.
110. Scholl C, et al. Deregulation of signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Seminars in oncology* 2008;35(4):336-45.
111. Hara J, et al. Expression of adhesion molecules in childhood B-lineage-cell neoplasms. *International journal of hematology* 2000;72(1):69-73.
112. Raynaud F, et al. Calpain 2 expression pattern and sub-cellular localization during mouse embryogenesis. *The International journal of developmental biology* 2008;52(4):383-8.
113. Grovdal LM, et al. Dysregulation of Ack1 inhibits down-regulation of the EGF receptor. *Experimental cell research* 2008;314(6):1292-300.
114. Shen F, et al. Activated Cdc42-associated kinase 1 is a component of EGF receptor signaling complex and regulates EGF receptor degradation. *Molecular biology of the cell* 2007;18(3):732-42.
115. Mamali I, et al. Elk-1 associates with FAK, regulates the expression of FAK and MAP kinases as well as apoptosis in HK-2 cells. *Journal of cellular physiology* 2008;216(1):198-206.
116. Rogers RS, et al. SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(32):30091-7.
117. Kisseleva T, et al. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002;285(1-2):1-24.
118. Levy DE, et al. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(9):651-62.
119. Korzus E, et al. Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science (New York, NY)* 1998;279(5351):703-7.
120. Hiroi M, et al. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required to elicit interferon-gamma-induced expression of chemokine CXC ligand 9 (CXCL9) and CXCL10 in human tumour cell lines. *The Biochemical journal* 2003;376(Pt 2):393-402.
121. So EY, et al. Ras/Erk pathway positively regulates Jak1/STAT6 activity and IL-4 gene expression in Jurkat T cells. *Molecular immunology* 2007;44(13):3416-26.
122. Dorsey JF, et al. Regulation of the Erk2-Elk1 signaling pathway and megakaryocytic differentiation of Bcr-Abl(+) K562 leukemic cells by Gab2. *Blood* 2002;99(4):1388-97.
123. Delaunoy J, et al. Mutations in the X-linked RSK2 gene (RPS6KA3) in patients with Coffin-Lowry syndrome. *Human mutation* 2001;17(2):103-16.
124. Yang SH, et al. The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *The EMBO journal* 1999;18(20):5666-74.
125. Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(11):827-37.

126. Shaw PE, et al. Ternary complex factors: prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2003;35(8):1210-26.
127. Zhang HM, et al. Mitogen-induced recruitment of ERK and MSK to SRE promoter complexes by ternary complex factor Elk-1. *Nucleic acids research* 2008;36(8):2594-607.
128. Ohshima T, et al. Transforming growth factor-beta-mediated signaling via the p38 MAP kinase pathway activates Smad-dependent transcription through SUMO-1 modification of Smad4. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(51):50833-42.
129. Engel ME, et al. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *The Journal of biological chemistry* 1999;274(52):37413-20.
130. Hocevar BA, et al. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *The EMBO journal* 1999;18(5):1345-56.
131. Hu PP, et al. The MEK pathway is required for stimulation of p21(WAF1/CIP1) by transforming growth factor-beta. *The Journal of biological chemistry* 1999;274(50):35381-7.
132. Yue J, et al. Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a smad-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(45):35656.
133. Price MA, et al. The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light. *The EMBO journal* 1996;15(23):6552-63.
134. Raingeaud J, et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *The Journal of biological chemistry* 1995;270(13):7420-6.
135. Raingeaud J, et al. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Molecular and cellular biology* 1996;16(3):1247-55.
136. Whitmarsh AJ, et al. Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Molecular and cellular biology* 1997;17(5):2360-71.
137. Lee CM, et al. JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(22):14189-94.
138. Rho JY, et al. Transcriptional profiling of the developmentally important signalling pathways in human embryonic stem cells. *Human reproduction (Oxford, England)* 2006;21(2):405-12.
139. Strasser-Wozak EM, et al. Irradiation induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in p53-deficient lymphoblastic leukemia cells without affecting Bcl-2 and Bax expression. *Cell death and differentiation* 1998;5(8):687-93.
140. Tonkinson JL, et al. Cell cycle effects of antifolate antimetabolites: implications for cytotoxicity and cytostasis. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 1997;39(6):521-31.
141. Verdin E, et al. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* 2003;19(5):286-93.
142. Dequiedt F, et al. HDAC7, a thymus-specific class II histone deacetylase, regulates Nur77 transcription and TCR-mediated apoptosis. *Immunity* 2003;18(5):687-98.

143. Fog CK, et al. PRDM proteins: important players in differentiation and disease. *Bioessays* 2012;34(1):50-60.
144. Sumazin P, et al. An extensive microRNA-mediated network of RNA-RNA interactions regulates established oncogenic pathways in glioblastoma. *Cell* 2011;147(2):370-81.
145. Hoang T. The origin of hematopoietic cell type diversity. *Oncogene* 2004;23(43):7188-98.
146. Futreal PA. Backseat drivers take the wheel. *Cancer cell* 2007;12(6):493-4.
147. Brown VI, et al. Thymic stromal-derived lymphopoietin induces proliferation of pre-B leukemia and antagonizes mTOR inhibitors, suggesting a role for interleukin-7Ralpha signaling. *Cancer research* 2007;67(20):9963-70.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ