



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

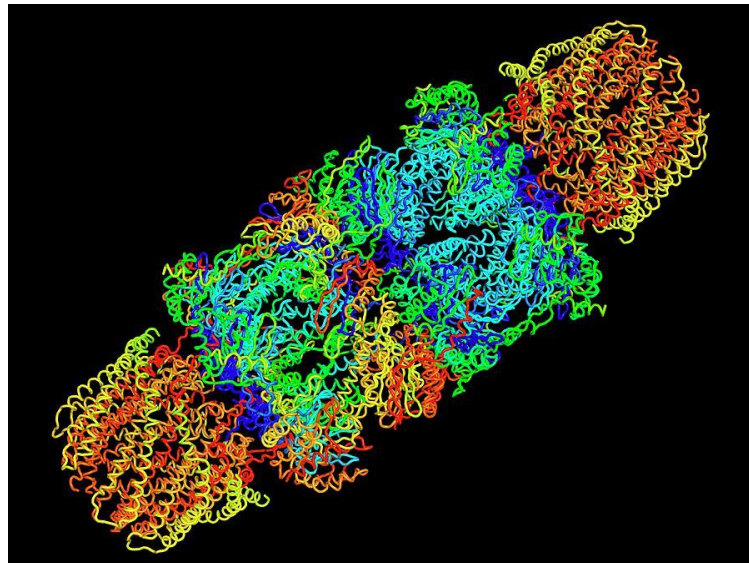
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ-ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

**«Βιοπληροφορική ανάλυση μεταγραφικών δεδομένων
μικροσυστοιχιών για τη μελέτη ενεργοποίησης του
μηχανισμού του πρωτεασώματος»**



Ευθυμία Γιώσα

Πτυχιούχος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

ΑΘΗΝΑ 2019



HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens
—EST. 1837—

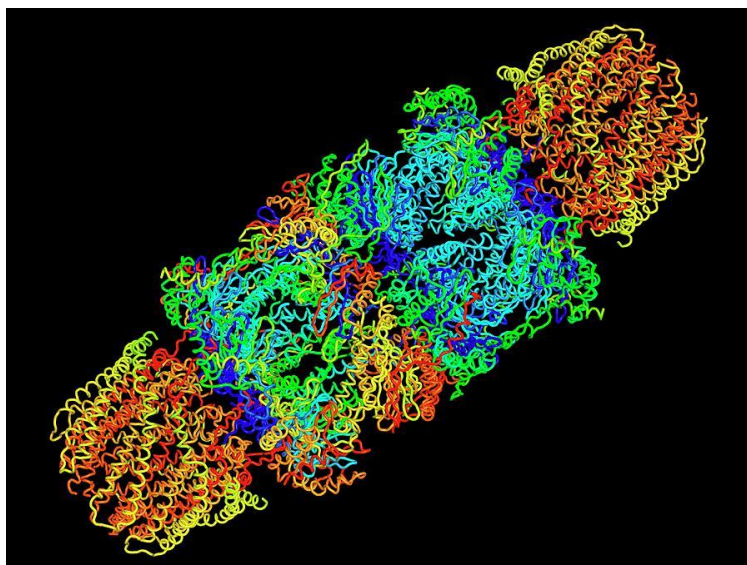
HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens

SCHOOL OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

MASTER IN «BIOINFORMATICS»

Master Diploma Thesis

**«Bioinformatic analysis of microarray
transcriptional data for the study of activation
of the proteasome mechanism»**



EFTHYMIA GIOSA

Biological Applications and Technology, University of Ioannina

A T H E N S 2 0 1 9



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ-ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

«Βιοπληροφορική ανάλυση μεταγραφικών δεδομένων
μικροσυστοιχιών για τη μελέτη ενεργοποίησης του μηχανισμού του
πρωτεασώματος»

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Δρ. Νίκη Χονδρογιάννη

*Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας
Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών*

Επίκουρη Καθηγήτρια Βασιλική Οικονομίδου

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.*

Καθηγητής Κωνσταντίνος Ε. Βοργιάς (επιβλέπων)

*Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας,
Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης και στο Εργαστήριο Μεταβολικής Χημείας και Βιοπληροφορικής, αμφότερα του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών με υπεύθυνους τους Ερευνητές Β' Δρ. Νίκη Χονδρογιάννη και Δρ. Αριστοτέλη Χατζηιωάννου, αντίστοιχα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους καθηγητές μου στο μεταπτυχιακό, που αποτελούν ταυτόχρονα και μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, την κυρία Οικονομίδου και τον κύριο Βοργιά, για τις σημαντικές γνώσεις που μου πρόσφεραν κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου σε αυτό και για την προθυμία τους να λύσουν οποιαδήποτε απορία μου και να με βοηθήσουν με οποιονδήποτε τρόπο περνά από το χέρι τους. Αποδεχόμενοι την πρότασή μου να ανήκουν στην εξεταστική επιτροπή αυτής της εργασίας, με τιμούν και με χαροποιούν ιδιαίτερως.

Η Δρ. Νίκη Χονδρογιάννη δεν ήταν για εμένα μια απλή επιβλέπουσα, αλλά ο άνθρωπος που με βοήθησε και με ενθάρρυνε να πιστέψω ότι μπορούσα να σηκωθώ όταν έπεφτα. Για να θυμίσω το γνωστό απόφθεγμα παραφράζοντάς το ελαφρώς, «αν δεν υπήρχε, θα έπρεπε να την επινοήσω». Την ευχαριστώ από καρδιάς για όλα.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω στον Δρ. Αριστοτέλη Χατζηιωάννου, καθώς και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μεταβολικής Χημείας και Βιοπληροφορικής για τη συνεργασία τους. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα, Γεωργία Κοντογιάννη και στην Ειδική Λειτουργική Επιστήμονα, Όλγα Παπαδόδημα. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να δώσω στον υποψήφιο διδάκτορα, Έκτορα Ξαβιέ-Δελαστίκ, τον οποίο γνώρισα στο εργαστήριο Μεταβολικής Χημείας και Βιοπληροφορικής και η στήριξή του ήταν καθοριστικής σημασίας για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένειά μου και τους λίγους καλούς μου φίλους που με... αντιμετώπισαν με στωικότητα και αγάπη. Τους είμαι ευγνώμων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	σελ.6
1.2 ABSTRACT	σελ.8
2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	σελ.10
2.1 Πρωτεάσωμα και αποικοδόμηση πρωτεϊνών	σελ.10
2.2 Σύστημα ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος	σελ.11
2.2.1 Ουμπικιτίνη	σελ.11
2.2.2 Πρωτεάσωμα	σελ.14
2.3 Εξεταζόμενες ουσίες	σελ.15
2.3.1 Φυκοκυανομπιλίνη (PCB)	σελ.15
2.3.2 Ολεασίνη	σελ.17
2.3.3 MK151-MK154	σελ.18
3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	σελ.20
3.1 Πειραματική διαδικασία	σελ.20
3.2 Μικροσυστοιχίες γονιδιακής έκφρασης	σελ.20
3.2.1 Βιολογικό υπόβαθρο μικροσυστοιχιών	σελ.20
3.2.2 Επί των εργαλείων της βιοστατιστικής ανάλυσης	σελ.22
3.2.3 Κυρίως ανάλυση	σελ.24
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ.27
4.1 Σκοπός εργασίας	σελ.27
4.2 Λίστες διαφορικών εκφρασμένων γονιδίων ανά εξεταζόμενη ουσία	σελ.27
4.3 Αποτελέσματα από την Gene Ontology	σελ.37
4.4 Γονίδια σχετιζόμενα με την ουμπικιτίνη	σελ.64
5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	σελ.66
6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ.69
7 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	σελ.73

1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διαδικασία της γήρανσης εκδηλώνεται μέσω του σταδιακού εκφυλισμού της σύστασης, φυσιολογίας και λειτουργίας των κυττάρων, ιστών και οργάνων και χαρακτηρίζεται από την αδυναμία των συστημάτων ομοιόστασης να αντιδρούν ορθώς στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Η πρωτεόσταση (ομοιόσταση των πρωτεώματος) παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση αυτής της πολυστρωματικής (κυτταρικής, ιστικής και οργανισμικής) ομοιόστασης και εξαρτάται από την ισορροπία ανάμεσα στη σύνθεση, επιδιόρθωση και αποικοδόμηση των κυτταρικών πρωτεϊνών.

Το πρωτεάσωμα αποτελεί ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο με μείζονα πρωτεολυτική δραστηριότητα. Έχει δειχθεί ότι δυσλειτουργεί κατά την εξέλιξη της γήρανσης και κατά τις σχετιζόμενες με αυτή ασθένειες. Αντίθετα, ενεργοποίηση του μηχανισμού έχει συσχετιστεί με επέκταση τόσο του κυτταρικού όσο και του οργανισμικού προσδόκιμου ζωής καθώς και με καθυστέρηση της εξέλιξης διαφόρων ηλικιοεξαρτώμενων ασθενειών, όπως η νευροεκφυλιστική νόσος του Alzheimer.

Η παρούσα εργασία στοχεύει στη βιοπληροφορική ανάλυση μεταγραφικών δεδομένων μικροσυστοιχιών που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του πρωτεολυτικού μηχανισμού του πρωτεασώματος. Η πρωτεασωμική ενεργοποίηση θα πραγματοποιηθεί με τη χρήση φυσικών και συνθετικών ουσιών οι οποίες έχουν δειχθεί ήδη: α) να επάγουν τις πρωτεασωμικές ενεργότητες και, β) να οδηγούν σε επιμήκυνση του κυτταρικού προσδόκιμου ζωής ανθρώπινων ινοβλαστών αλλά και του οργανισμικού προσδόκιμου ζωής του νηματώδους σκώληκα *C. elegans*. Θα συλλεχθεί ολικό RNA από ανθρώπινους ινοβλάστες που θα δεχθούν την επίδραση των υπό μελέτη ουσιών (τόσο φυσικών όσο και συνθετικών) σε συνθήκες που επάγουν τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος. Στα δείγματα αυτά θα πραγματοποιηθούν πειράματα ανάλυσης μικροσυστοιχιών.

Για την επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων από τις συστοιχίες της Illumina θα χρησιμοποιηθεί η πλατφόρμα λογισμικού Gene ARMADA και η διαδικτυακή πύλη GRISSOM (www.grissom.gr), που έχει αναπτυχθεί από το πρόγραμμα Μεταβολικής Μηχανικής και Βιοπληροφορικής του ΙΧΒ/ΕΙΕ και έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση μεγάλου αριθμού συστοιχιών γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης. Αποτελούν ελεύθερο λογισμικό που θα χρησιμοποιηθεί για την προ-επεξεργασία των συστοιχιών που περιλαμβάνει την απαλοιφή θορύβου (noise filtering) από τα δεδομένα, την κανονικοποίηση τους (normalization) και τη διόρθωση υποβάθρου (background correction) αλλά και την πρωταρχική επιλογή των πιο σημαντικά διαφοροποιημένων γονιδίων μεταξύ των διαφορετικών φαινοτυπικών κατηγοριών προς εξέταση. Με σκοπό το τελευταίο θα αξιοποιηθούν μεθοδολογίες στατιστικής εκλογής και ελέγχων έλεγχων που υποστηρίζονται από την Gene ARMADA και την πύλη GRISSOM, όπως παραμετρικοί στατιστικοί έλεγχοι (t-test, ANOVA) και μη

παραμετρικοί έλεγχοι (π.χ. με βάση την τυχαία επαναληπτική δειγματοληψία bootstrapping των δεδομένων που εξάγουν πιο αυστηρά στατιστικά συμπεράσματα που μετρούνται με βάση το False Discovery Rate).

Παράλληλα θα γίνει χρήση μεθόδων μη επιβλεπόμενης μάθησης (hierarchical, k-means, Fuzzy C-means) για την ομαδοποίηση δειγμάτων (clustering) με βάση τα δεδομένα, ενώ θα γίνει χρήση της μεθόδου Gap Statistic που αυτόματα επιλέγει τον αριθμό των ομάδων (clusters). Οι εξαγόμενες λίστες γονιδίων με βάση τις στατιστικές μεθόδους επιλογής και τις μεθόδους ομαδοποίησης θα τροφοδοτήσουν εργαλεία ανεπτυγμένα από το πρόγραμμα Μεταβολικής Μηχανικής και Βιοπληροφορικής που συσχετίζουν λίστες γονιδίων ενδιαφέροντος, με σημασιολογική λειτουργική πληροφορία που αφορά στη λειτουργία των γονιδίων/πρωτεϊνών και τα βιοχημικά μονοπάτια που αυτά εμπλέκονται. Συγκεκριμένα, τα εργαλεία StRAnGER (www.grissom.gr/stranger/) και GORevEng χρησιμοποιούν προηγμένους συνδυασμούς στατιστικών ελέγχων (υπεργεωμετρικός, χ^2 και Fischer έλεγχος) με σύγχρονες μεθόδους δειγματοληψίας (bootstrapping), αλλά και μετρικές ομοιότητας γράφων. Ως αποτέλεσμα, συνδέουν τις λίστες γονιδίων ενδιαφέροντος με τη σημασιολογική πληροφορία για στατιστικά σημαντικές συσχετισμένες λειτουργίες ή βιοχημικά μονοπάτια που εμφανίζονται στο περιεχόμενο αντίστοιχων οντολογιών (Gene Ontology Terms, GOTs) ή άλλες καλά ορισμένες μορφές οργάνωσης της πληροφορίας (KEGG pathways).

Τελικός στόχος θα είναι η εξαγωγή των ευρύτερων μοριακών μονοπατιών/δικτύων που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του πρωτεασωμικού μηχανισμού και η ταυτοποίηση μονοπατιών που ενεργοποιούνται καταρροϊκά της πρωτεασωμικής ενεργοποίησης. Η μελέτη διαφόρων ουσιών/ενεργοποιητών θα αποκαλύψει τόσο κοινά μονοπάτια που επηρεάζονται κατά την ενεργοποίηση του πρωτεασώματος ανεξάρτητα από την υπό μελέτη ουσία όσο και μοναδικά μονοπάτια που σχετίζονται με την πρωτεασωμική ενεργοποίηση μέσω της δράσης συγκεκριμένης ουσίας.

1.2 ABSTRACT

The process of aging is manifested through the gradual degeneration of the composition, physiology and function of cells, tissues and organs and is characterized by the inability of homeostasis systems to respond correctly to environmental stimuli. Proteostasis (protein homeostasis) plays an important role in maintaining this multilayer (cellular, tissue and organismic) homeostasis and depends on the balance between the synthesis, repair and degradation of cellular proteins.

The proteasome is a multiprotein complex with major proteolytic activity. It has been shown to be dysfunctional in the course of aging and related diseases. In contrast, activation of the mechanism has been associated with an extension of both cellular and organismic life expectancy as well as delayed progression of various age-related diseases, such as Alzheimer's neurodegenerative disease.

The present work aims at bioinformatic analysis of microarray transcriptional data related to activation of the proteolytic mechanism of the proteasome. Proteasomal activation will take place using natural and synthetic substances that have already been shown to: (a) induce proteasome activities and, (b) lead to prolong the cellular life expectancy of human fibroblasts as well as the life expectancy of the filamentous moth *C. elegans*. Total RNA will be harvested from human fibroblasts that will accept the effect of the substances under study (both natural and synthetic) in conditions that induce proteasome activity. Microarray analysis experiments will be performed on these samples.

The Gene ARMADA software platform and the GRISSOM web portal (www.grissom.gr) developed by IBFXB's Metabolic Engineering and Bioinformatics software and used for the data processing and analysis of Illumina's clusters will be used. The analysis of a large number of gene and protein expression clusters. They are free software that will be used to pre-process the arrays, which includes noise filtering, normalization and background correction, as well as the primary selection of the most significantly differentiated genes. between the different phenotypic classes to be examined. The latter will utilize statistical selection and test methodologies supported by Gene ARMADA and the GRISSOM portal, such as parametric tests (t-test, ANOVA) and non-parametric tests (e.g., based on bootstrapping random sampling). data that produces more stringent statistical conclusions based on the False Discovery Rate).

At the same time, hierarchical, k-means, Fuzzy C-means will be used to cluster data based on data, while the Gap Statistic method will automatically select the number of clusters. . Extracted gene lists based on statistical selection methods and clustering methods will power tools developed by the Metabolic Engineering and Bioinformatics Program that correlate gene lists of interest with semantic functional information

related to the function of these genes/proteins. Specifically, the StRAnGER tools (www.grissom.gr/stranger/) and GORevEng use advanced combinations of statistical tests (hypergeometric, χ^2 and Fischer control) with modern bootstrapping methods and graph similarity metrics. As a result, they link gene lists of interest to semantic information for statistically significant correlated functions or biochemical pathways that appear in the content of corresponding ontologies (Gene Ontology Terms, GOTs) or other well-defined forms of information organization (KEGG pathways).

The ultimate goal will be to extract the broader molecular pathways/networks involved in proteasome activation and to identify pathways activated catastrophically by proteasome activation. The study of various substances/activators will reveal both common pathways that are involved in proteasome activation independently of the substance under study and unique pathways associated with proteasome activation through the action of a specific substance.

2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Πρωτεάσωμα και αποικοδόμηση πρωτεϊνών

Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών αποτελεί σημαντικό τμήμα της κυτταρικής ρύθμισης, η οποία καθορίζει, σε συνδυασμό με την πρωτεϊνική σύνθεση, τα επίπεδα των πρωτεϊνών εντός των κυττάρων ανά πάσα στιγμή. Ο χρόνος ημιζωής των εκάστοτε πρωτεϊνικών μορίων παρουσιάζει ποικιλία, με αποτέλεσμα ορισμένα εξ αυτών να έχουν χρόνο ημιζωής λίγων μόνο λεπτών, ενώ κάποια άλλα πολλών χρόνων (το κολλαγόνο του δέρματος έχει χρόνο ημιζωής περίπου 15 χρόνια και το κολλαγόνο του χόνδρου 117 χρόνια). Από τα συγκεκριμένα παρατιθέμενα παραδείγματα, αλλά και γενικά από τη μελέτη της αποικοδόμησης, προκύπτει ότι οι πρωτεΐνες που έχουν χαμηλό ρυθμό ανακύκλωσης (ως εκ τούτου, μεγάλο χρόνο ημιζωής) είναι συνήθως δομικές, εν αντιθέσει με εκείνες που έχουν ταχύ ρυθμό ανακύκλωσης (επομένως, μικρό χρόνο ημιζωής) και συνήθως είναι ρυθμιστικές.

Τα κύτταρα διαθέτουν τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά μονοπάτια αποικοδόμησης των πρωτεϊνών, διαδικασία βαρύνουσας σημασίας καθότι μέσω αυτής: i) υπό φυσιολογικές συνθήκες, επιτυγχάνεται ο έλεγχος της ποσότητας των διαφόρων πρωτεϊνών και η απαραίτητη ρύθμιση αυτής ανάλογα με τις εκάστοτε κυτταρικές ανάγκες και απαιτήσεις, ii) σε περιπτώσεις δημιουργίας μη λειτουργικών πρωτεϊνών, λόγου χάρη εξαιτίας εσφαλμένης αναδίπλωσης (misfolding), αναλαμβάνει την καταστροφή τους, η οποία και θα αποτρέψει μια επιζήμια για το κύτταρο συσσώρευση αυτών. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα τα κύρια (ενδοκυτταρικά) μονοπάτια που μεσολαβούν στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών είναι: το (επιλεκτικό) μονοπάτι ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος και η (επίσης επιλεκτική) αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από μοριακές συνοδούς (chaperone mediated) και οι (μη επιλεκτικές) μικρο-αυτοφαγία και μακρο-αυτοφαγία.

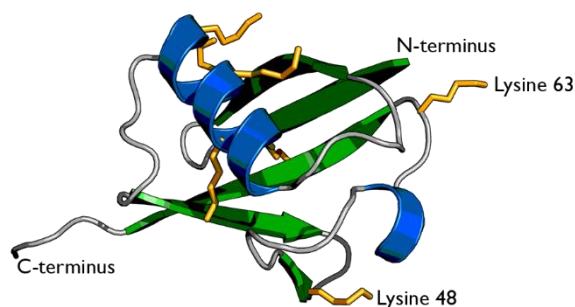
Όσον αφορά τη μη επιλεκτική πρωτεόλυση, το λυσόσωμα αναγνωρίστηκε βιοχημικά στο ήπαρ του μύος ως μια κενοτοπική δομή που περιέχει διάφορα υδρολυτικά ένζυμα – μη ειδικές πρωτεάσες, που διασπούν κάθε πρωτεΐνη με την οποία έρχονται σε επαφή σε μεμονωμένα αμινοξέα. Πρωτεϊνικές αντλίες γεμίζουν το λυσόσωμα με κατιόντα υδρογόνου, κάνοντάς το όξινο, εξασφαλίζοντας τη βέλτιστη ενεργότητα του πρωτεασών του. Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για αποικοδόμηση μέσω του (ετερογενούς και ασυνεχούς) λυσοσωμικού συστήματος, μπορούν να το προσεγγίσουν μέσω μιας ποικιλίας μέσων. Μετά τη διαμεσολαβούμενη από τον υποδοχέα ενδοκυττάρωση, ενδοκυτταρικά κυστίδια από την κυτταρική επιφάνεια δύνανται να συντηχθούν με το λυσόσωμα κι αυτή η διαδικασία αποτελεί μηχανισμό αποικοδόμησης των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας. Στη φαγοκυττάρωση, από την άλλη, το κύτταρο εγκολλώνει «ξένα σώματα» (λόγου χάρη, βακτήρια) και τα

στέλνει στο λυσόσωμα. Ακόμη, κατά την αυτοφαγία σχηματίζεται στο κυτοσόλιο διπλή μεμβράνη γύρω από το υλικό προς αποικοδόμηση (λόγου χάρη, αχρείαστα οργανίδια) και κατόπιν παραδίδεται στο λυσόσωμα. Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών εντός των λυσοσωμάτων χαρακτηρίζεται ως καταβολική, δηλαδή απελευθερώνει ενέργεια, άρα αυτή η απόκριση στη θρεπτική πενία ανακτά μέρος της ενέργειας που αρχικά ξοδεύεται στη σύνθεση πρωτεϊνών και άλλων κυτταρικών συστατικών. Με το σύστημα ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος (Ubiquitin-Proteasome System, UPS) το οποίο και αποτελεί το αντικείμενο μελέτης της εργασίας θα ασχοληθούμε διεξοδικότερα.

2.2 Σύστημα ουμπικιτίνης – πρωτεασώματος

2.2.1 Ουμπικιτίνη

Η ουμπικιτίνη (ubiquitin, Ub) αποτελεί ένα από τα κύρια μέλη μιας οικογένειας δομικά συντηρημένων πρωτεϊνών, οι οποίες ρυθμίζουν μια σειρά από διαδικασίες στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η Ub (Εικ.1) μαζί με τις έτερες συγγενείς πρωτεΐνες επιτελούν τις λειτουργίες τους μέσω ομοιοπολικής πρόσδεσης σε άλλες πρωτεΐνες επιτρέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο την αλλαγή στη σταθερότητα, στον εντοπισμό, ή στη δραστηριότητα των πρωτεϊνών-στόχων (Pickart et al., 2004). Πρόκειται για μια μικρή πρωτεΐνη 76 αμινοξέων, που απαντάται σε όλους τους ευκαρυώτες (Pickart, 2001) με μια συμπαγή δομή, αποτελούμενη από πέντε αντιπαράλληλους β-κλώνους, τους οποίους διαπερνά μία α-έλικα (Kumar et al., 1987). Μία από τις περιοχές της ουμπικιτίνης που έχει αναγνωριστεί ως σημαντική είναι το καρβοξυτελικό άκρο της γλυκίνης, G76, το οποίο αποτελεί βασικό παίκτη στη διαδικασία της ουμπικιτιλίωσης, ενώ βαρύνουσας σημασίας είναι και οι αμινομάδες σε καθένα από τα 7 κατάλοιπα λυσίνης αυτής (K6, K11, K27, K29, K33, K48, and K63) (Pickart and Raasi, 2005; Pickart, 2000).



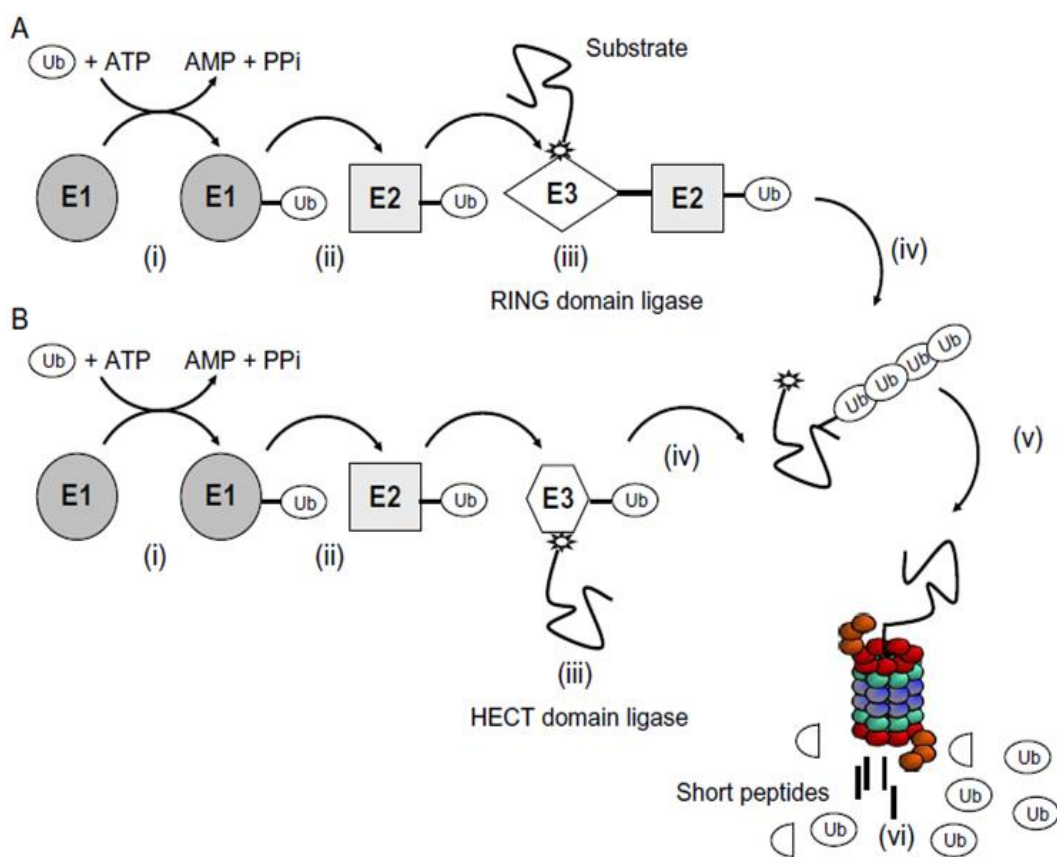
Εικόνα 1: Δομή της ουμπικιτίνης (ηλεκτρονική πηγή:

https://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin#/media/File:Ubiquitin_cartoon-2-.png).

Η ενζυμική μηχανή, που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση της Ub στις διάφορες πρωτεΐνες, αποτελείται από μια τριάδα ενζύμων, E1-E2-E3, τα οποία είναι επιφορτισμένα με την ενεργοποίηση, τη μεταφορά και την πρόσδεση της Ub στις πρωτεΐνες. Η αντίδραση ξεκινά με την ενεργοποίηση του καρβοξυτελικού άκρου της Ub από το ένζυμο-ενεργοποιητή της Ub, E1 (ubiquitin-activating enzyme). Διαμέσου ενός ATP-εξαρτώμενου μηχανισμού, η Ub (πιο συγκεκριμένα, το ενεργοποιημένο καρβοξυτελικό κατάλοιπο γλυκίνης αυτής) συζεύγνυται με ένα κατάλοιπο κυστεΐνης στο καταλυτικό κέντρο του E1, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί ένας θειοεστερικός δεσμός μεταξύ τους. Εν συνεχεία, η ενεργοποιημένη Ub μεταφέρεται σε ένα από τα ποικίλα ένζυμα E2 (ubiquitin-conjugating enzymes), συγκεκριμένα μεταφέρεται μέσω trans-θειοεστεροποίησης σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο κυστεΐνης του E2.

Το τρίτο βήμα περιλαμβάνει μια ειδική για την ουμπικιτίνη πρωτεϊνική λιγάση, την E3 (ubiquitin-protein ligase), η οποία στρατολογεί την πρωτεΐνη-στόχο και μεσολαβεί στη μεταφορά της ενεργοποιημένης Ub από το E2 στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα (Hochstrasser, 2006; Pickart and Eddins, 2004). Όταν το πρωτεϊνικό υπόστρωμα διαθέτει κατάλοιπα λυσίνης, τότε η ε-αμινομάδα αυτής σπάει το θειοεστερικό δεσμό μεταξύ Ub και E2 και δημιουργείται αντ' αυτού ένας ισοπεπτιδικός δεσμός ανάμεσα στο ενεργοποιημένο καρβοξυτελικό άκρο της γλυκίνης της Ub και την αμινομάδα της λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου. Αντιθέτως, στην περίπτωση που δεν υπάρχει λυσίνη, η Ub προσδέεται στην α-αμινομάδα του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης-στόχου (Ravid and Hochstrasser, 2008;). Για μία δομική κατηγορία ενζύμων E3 («HECT» E3s), η Ub μεταφέρεται σε πρώτη φάση σε μια συντηρημένη κυστεΐνη του E3 πριν από την τελική μεταφορά σε μια ομάδα του υποστρώματος (συνήθως, σε μια πλευρική ομάδα λυσίνης). Για τις περισσότερες έτερες αντιδράσεις ουμπικιτιλίωσης, τα ένζυμα E3 φαίνεται να λειτουργούν ως προσαρμογείς που τοποθετούν την πρωτεΐνη-στόχο σε στενή επαφή μεταξύ Ub και E2. Η πλειοψηφία αυτών των E3 έχουν μια υπομονάδα ή μια αυτοτελή δομική περιοχή που φέρει ένα μοτίβο RING (Hochstrasser, 2005).

Εν αρχή, η ATP-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της Ub, καταλυόμενη από το ένζυμο E1 (Ai & Bi). Εν συνεχεία, μεταφορά της ενεργοποιημένης πια Ub στο ένζυμο E2 (Aii & Bii). Το σύμπλοκο Ub-E2 προσδέεται στη λιγάση E3 (η οποία και φέρει την πρωτεΐνη), εφόσον πρόκειται για λιγάση με αυτοτελή δομική περιοχή RING (Aiii) και, τελικά, μεταφέρει την Ub στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα (Aiv). Εναλλακτικά, η Ub μεταφέρεται σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο Cys στη λιγάση E3 (Biii) και μετά στην πρωτεΐνη (Biv), εφόσον πρόκειται για λιγάση με αυτοτελή δομική περιοχή HECT. Τα βήματα που μόλις περιγράφηκαν επαναλαμβάνονται ώστε να παραχθεί η αλυσίδα πολυουμπικιτίνης (A, Bv και A, Bvi). Το ουμπικιτιλωμένο υπόστρωμα διασπάται σε μικρά πεπτίδια από το 26S πρωτεάσωμα απελευθερώνοντας επαναχρησιμοποιούμενη ουμπικιτίνη (Chondrogianni et al., 2012).



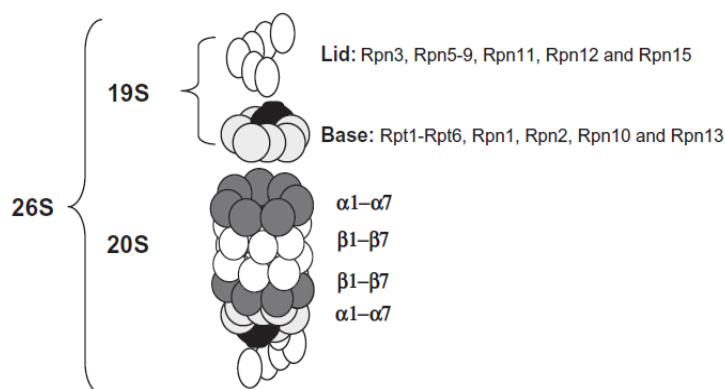
Εικόνα 2: Σύστημα UPS (Chondrogianni and Gonos, 2012).

Πέραν, βέβαια, των ενζύμων που εργάζονται για την πρόσδεση της ουμπικιτίνης στα διάφορα πρωτεϊνικά υποστρώματα, υπάρχουν δεκάδες ένζυμα που είναι επιφορτισμένα με την ακριβώς αντίθετη διαδικασία και δεν είναι άλλα από τα ένζυμα απο-ουμπικιτιλίωσης DUBs (deubiquitinating enzymes). Πρόκειται, λοιπόν, για μια μεγάλη ομάδα ενζύμων που διαχωρίζουν τα προσδεμένα στην ουμπικιτίνη μόρια μετά την τελική καρβονυλομάδα του τελευταίου καταλοίπου της ουμπικιτίνης (Gly76) (Amerik and Hochstrasser, 2004). Τόσο όσα είναι προσδεμένα σε συγκεκριμένες

πρωτεΐνες όσο και εκείνα που δεν είναι κάπου «αγκυροβολημένα» επιδρούν σημαντικά στο κυτταρικό σύνολο των αλυσίδων ουμπικιτίνης.

2.2.2 Πρωτεάσωμα

Το πρωτεάσωμα αποτελεί ένα θεμελιώδες πολυκαταλυτικό ενζυμικό σύμπλοκο το οποίο προάγει την αποικοδόμηση τόσο των φυσιολογικών όσο και των κατεστραμμένων, ανώμαλων ή άχρηστων κυτταρικών πρωτεϊνών. Η ενεργοποίησή του έχει δεχθεί να έχει θετική επίδραση όχι μόνο στη διάρκεια της ζωής κυττάρων και οργανισμών (Chondrogianni et al., 2015), αλλά και στην καθυστέρηση σχετιζόμενων με την ηλικία φαινοτύπων (Chondrogianni et al., 2008). Εντοπίζεται σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα (κυτταρόπλασμα, πυρήνας, ενδοπλασματικό δίκτυο) και συνιστά έως και το 1% του συνολικού κυτταρικού πρωτεϊνικού περιεχομένου. Συμμετέχει σε πολλές και διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένων του κυτταρικού κύκλου, της ρύθμισης των μεταγραφικών παραγόντων και της κυτταρικής διαφοροποίησης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο πολυμερισμός της ουμπικιτίνης εξυπηρετεί ως σήμα αποικοδόμησης για πολλές πρωτεΐνες-στόχους. Η καταστροφή της πρωτεΐνης έχουμε ήδη δει πως ξεκινά με την ομοιοπολική σύνδεσης μιας αλυσίδας που αποτελείται από πανομοιότυπα μόρια ουμπικιτίνης (άνω των τεσσάρων) μέσω συντονισμένων δράσεων ενός δικτύου πρωτεϊνών (βλ. παράγραφο 2.2.1). Αυτή η πολυμερισμένη αλυσίδα ουμπικιτίνης δρα ως σινιάλο που αναγνωρίζεται και προσδέεται από το πρωτεάσωμα, μεταφέροντας εκεί τις πρωτεΐνες-στόχους και το υπόστρωμα πρωτολύεται.



Εικόνα 3: Δομή πρωτεασώματος (Chondrogianni and Gonos, 2012)

Το 26S πρωτεάσωμα είναι ένα μεγάλο σύμπλοκο 2.4 MDa που βρίσκεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Μπορεί να διαχωριστεί σε δύο διακριτά υποσύμπλοκα: το 20S πρωτεάσωμα (20S core) και τα ρυθμιστικά 19S σύμπλοκα τα οποία δένουν είτε στο ένα είτε και στα δύο άκρα του 20S. Τα ρυθμιστικά σύμπλοκα

είναι επιφορτισμένα με την αναγνώριση των ουμπικιτιλιωμένων πρωτεϊνών και παίζουν ρόλο στο ξεδίπλωμα και τη μετατόπιση στο εσωτερικό του πρωτεολυτικού πυρήνα, ο οποίος περιέχει καταλυτικά κατάλοιπα θρεονίνης σε κάποιες από τις υπομονάδες που το αποτελούν.

Πιο συγκεκριμένα, ο πρωτεολυτικός πυρήνας (20S πρωτεάσωμα) είναι ένα ενζυμικό σύμπλοκο 700 kDa με επτά διαφορετικές α και επτά διαφορετικές β υπομονάδες διευθετημένες σε βαρέλι. Το βαρέλι αποτελείται από 2 α -δακτυλίους και 2 β -δακτυλίους σε διάταξη $\alpha_1\text{-}\beta_1\text{-}\beta_1\text{-}\beta_1\text{-}\alpha_1\text{-}\beta_1\text{-}\beta_1\text{-}\alpha_1\text{-}\beta_1$. Οι τρεις β υπομονάδες κάθε εσωτερικού δακτυλίου περιέχουν καταλυτικά ενεργά κατάλοιπα θρεονίνης στο N-τελικό τους άκρο και παρουσιάζουν N-τελική νουκλεοφιλική δράση υδρολάσης, υποδεικνύοντας ότι το πρωτεάσωμα είναι μια πρωτεάση θρεονίνης. Η κρυσταλλική δομή του 20S πρωτεασώματος αποκαλύπτει ότι το κέντρο του α δακτυλίου είναι σχεδόν τελείως κλειστό, εμποδίζοντας τις πρωτεΐνες από το να εισχωρήσουν στο εσώτερο τμήμα του β δακτυλίου που περιλαμβάνει τα πρωτεολυτικά ενεργά κέντρα. Επιπλέον, τα N-τελικά άκρα των α υπομονάδων σχηματίζουν έναν επιπλέον φυσικό φραγμό εναντίον της πρόσβασης στα ενεργά κέντρα. Έτσι, τα καταλυτικά κέντρα του 20S πρωτεασώματος είναι κρυμμένα στα κύτταρα: τα υποστρώματα είναι δυνατόν να έχουν πρόσβαση στα ενεργά κέντρα μόνο αφότου περάσουν μέσω του στενού ανοίγματος στο κέντρο των α δακτυλίων. Η προσπέλαση αυτή επιτυγχάνεται με το ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών προς αποικοδόμηση σε συνδυασμό με την αναδιάταξη των N-τελικών άκρων των α -υπομονάδων (Tanaka, 2009).

Από τη μεριά του, το 19S πρωτεάσωμα αναγνωρίζει τις πρωτεΐνες που έχουν μαρκαριστεί από τις πολυουμπικιτιλιωμένες αλυσίδες, απομακρύνει την αλυσίδα και παγιδεύει τη μισή πρωτεΐνη, ξεδιπλώνει τις υποστρωματικές πρωτεΐνες, ανοίγει τον α δακτύλιο και μεταφέρει τα ξεδιπλωμένα υποστρώματα στο 20S πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Όσον αφορά τη σύστασή του, αποτελείται από περίπου 20 διαφορετικές υπομονάδες οι οποίες δύναται να κατηγοριοποιηθούν σε δύο ομάδες: τις Rpt υπομονάδες (Regulatory particle of triple-ATPase) και τις Rpn (Regulatory particle on non-ATPase). Και οι δύο περιλαμβάνουν πολλαπλές πρωτεΐνες με μοριακά βάρη που ποικίλλουν από 10 έως 110 kDa.

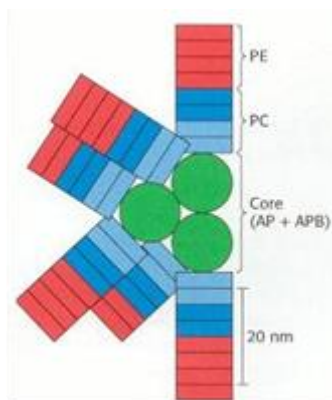
2.3 Εξεταζόμενες ουσίες

2.3.1 Φυκοκυανομπιλίνη (Phycocyanobilin-PCB)

Όσα φύκη αναπτύσσονται εντός της θάλασσας σε βάθος ενός μέτρου ή περισσότερο δέχονται περιορισμένη ποσότητα μπλε ή ερυθρού φωτός το οποίο απορροφάται αφενός από το νερό κι αφετέρου από τα μόρια χλωροφύλλης των οργανισμών που διαβιούν σε μικρότερο βάθος. Προκύπτει, λοιπόν, το ερώτημα πώς καταφέρνουν κι επιβιώνουν οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί υπό τέτοιους όρους. Η απάντηση είναι ότι τα κυανοβακτήρια διαθέτουν μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που καλούνται

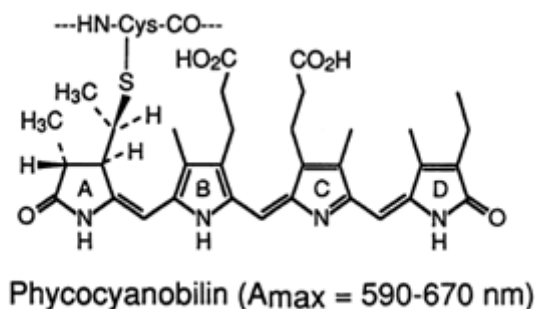
φυκομπιλιώματα (phycobilisomes) που δεν είναι παρά συσκευές συλλογής φωτός. Επιτρέπουν την πρόσληψη του πράσινου και κίτρινου φωτός που εισχωρεί στον οικολογικό θώκο των εν λόγω φυκών. Απαντώνται, σε αντίθεση με τις περισσότερες ανάλογου τύπου συσκευές, προσδεμένα στην εξωτερική μεμβράνη της θυλακοειδούς μεμβράνης των χλωροπλαστών και όχι στο εσωτερικό της, όπου λειτουργούν ως κεραίες που απορροφούν φως διοχετεύοντας την ενέργεια διέγερσης στα κέντρα αντίδρασης του φωτοσυστήματος II. Το μέγιστο της απορρόφησης των φυκομπιλιωμάτων επιτυγχάνεται στην περιοχή μεταξύ των μπλε και υπερερυθρών κορυφών απορρόφησης της χλωροφύλλης α, δηλαδή μεταξύ 470 και 650 nm.

Τα φυκομπιλιώματα έχουν μοριακό βάρος πολλών εκατομμυρίων daltons κι αποτελούνται από πολλές φυκομπιλιπρωτεϊνικές υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες περιέχει ομοιοπολικά προσδεμένες προσθετικές ομάδες μπιλίνης – ευθύγραμμη διευθέτηση τεσσάρων πυρρολικών δακτυλίων–, όπως και πολυπεπίδια. Η φυκοκυανομπιλίνη ανήκει στις πιο κοινές μπιλίνες που απαντώνται στα φυκομπιλιώματα (μαζί με την φυκοερυθρομπιλίνη) και συνιστά το χρωμοφόρο –ήτοι, το τμήμα του μορίου μιας ουσίας που είναι ο φορέας του χρώματός της– της φωτοσυνθετικής χρωστικής, φυκοκυανίνη. Πρόκειται για γραμμική τετραπυρρόλη, η οποία προσδέεται στην ανθρώπινη αλβουμίνη προσδίδοντάς της θερμοσταθερότητα και αντοχή στην πρωτεόλυση (Radibratovic et al, 2016). Στις πιο συχνά απαντώμενες φυκομπιλιπρωτεΐνες του φυκομπιλιώματος, πέραν της φυκοκυανομπιλίνης, περιλαμβάνονται η φυκοερυθρομπιλίνη και η αλλοφυκοκυανομπιλίνη.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του φυκομπιλιώματος του κυανοβακτηρίου *Synechocystis*. Ο πυρήνας (core) αποτελείται από τις αλλοφυκοκυανίνη (AP) και αλλοφυκοκυανίνη Β (APB), ενώ φαίνονται και οι θέσεις πρόσδεσης της φυκοερυθρίνης (PE) και της φυκοκυανίνης (PC).

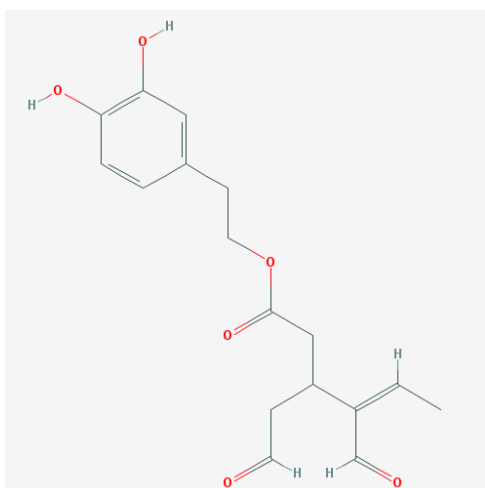
Η γεωμετρική διεύθυνση των φυκομπιλιπρωτεϊνών στα φυκομπιλιώματα σε συνδυασμό με τις φασματικές τους ιδιότητες συνεισφέρουν στην αποτελεσματικότητα της ενεργειακής μεταφοράς, η οποία είναι μεγαλύτερη του 95%.



Εικόνα 5: Χημική δομή της φυκοκυανομπιλίνης. Το μέγιστο απορρόφησης (A_{max}) μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το εκάστοτε περιβάλλον στο οποίο θα βρεθεί η πρωτεΐνη (Grossman et al., 1993).

2.3.2 Ολεασίνη

Οι πιο διαδεδομένες φαινολικές ενώσεις στο ελαιόλαδο είναι τα σεκοϊριδοειδή και τα παράγωγά τους. Τα σεκοϊριδοειδή χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ελενολικού οξέος (EA) ή παραγώγων του (διαλδεϋδική μορφή EA: EDA) στη γλυκοζυλιωμένη ή άγλυκη μορφή τους εστεροποιημένα με υδροξυτυροσόλη ή τυροσόλη. Στα σεκοϊριδοειδή ανήκουν η ολευρωπαΐνη, η διμεθυλολευρωπαΐνη και τα λιγκστροσίδια. Τα παράγωγα των σεκοϊριδοειδών απαντώνται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο ελαιόλαδο και είναι η διαλδεϋδική αποκαρβοξυμεθυλιωμένη μορφή του άγλυκου της ολευρωπαΐνης (3,4-DHPEAEDA ή ολεασίνη), η διαλδεϋδική αποκαρβοξυμεθυλιωμένη μορφή του άγλυκου του λιγκστροσιδίου (p-HPEA-EDA ή ολεοκανθάλη) και το άγλυκο της ολευρωπαΐνης (3,4- DHPEA-EA).



Εικόνα 6: Χημική δομή της ολεασίνης (Πηγή: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oleacein>)

Το κυρίαρχο φαινολικό συστατικό στο αγνό παρθένο ελαιόλαδο είναι η ολεασίνη. Η υδρόλυση της ολευρωπαΐνης, καταλυόμενη από ενδογενείς γλυκοζιδάσες κατά τη διάρκεια σύνθλιψης των καρπών της ελιάς, είναι υπεύθυνη για την υψηλή

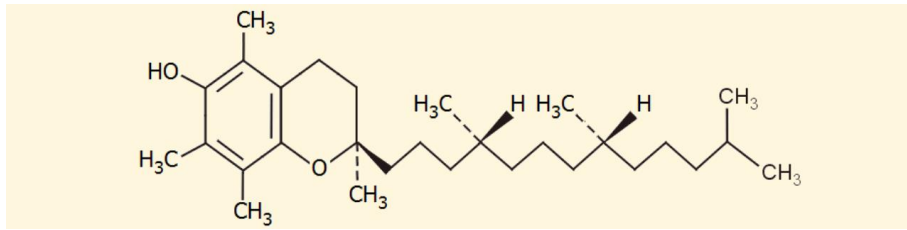
συγκέντρωση της ολεασίνης στο λάδι (Vierhuis et al., 2001). Αποτελεί, μάλιστα, ένα από τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά στο ελαιόλαδο, γεγονός που οφείλεται στην κατεχολική δομή της. Έχει ανακαλυφθεί ότι καταστέλλει τη δράση των ενζύμων που εμπλέκονται στην υπέρταση (Hansen et al., 1996), προλαμβάνει την καταστροφή του DNA που οφείλεται στο υπεροξειδίο του υδρογόνου στα μονοκύτταρα (Fabiani et al., 2008) και αποτελεί αναστολέα των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS).

2.3.3 MK151-MK154

Πρόκειται για υβριδικές ενώσεις α-τοκοφερόλης/υδροξυτυροσόλης οι οποίες συντέθηκαν στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών από την ομάδα Φαρμακευτικής Χημείας και προστατεύονται από Εθνικό Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας (Koufaki M., Calogeropoulou T., Chondrogianni N., Parahatjis D., Gonos E.S., Fotopoulou T., Prousis K., Chazari E. BIO-INSPIRED PROTEASOME ACTIVATORS WITH ANTI-AGEING PROPERTIES (Patent No. GR 20180100094, 07/03/2018) και προσφάτως από PCT (GR2019/000018).

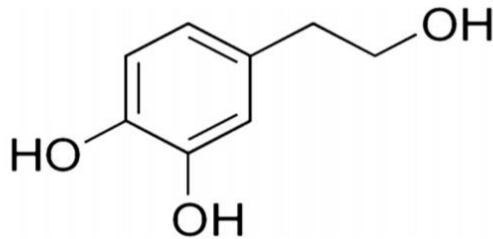
Η α-τοκοφερόλη αποτελεί συστατικό της βιταμίνης E, η οποία βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε ορισμένα σιτηρά-δημητριακά και ειδικά στο φύτρο του σιταριού. Το 1925, οι Evans και Bishop, απομόνωσαν από αυτό ένα βιολογικά ενεργό κίτρινο προϊόν υπό μορφή λαδιού. Δέκα χρόνια αργότερα, απομόνωσαν την α-τοκοφερόλη που πήρε το όνομά της από τη λέξη τόκος (γέννησης) και το ρήμα φέρω, καθώς είχε αρχίσει να χορηγείται για την παρεμπόδιση του εμβρυϊκού θανάτου. Η πλήρης χημική δομή της α-τοκοφερόλης έγινε γνωστή από τον Fernholz το 1938 (Fernholz, 1938).

Γενικά, οι τοκοφερόλες συνιστούν μια ομάδα λιποδιαλυτών χημικών ενώσεων με παρόμοια δομή που παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η πρόσληψη από τον άνθρωπο σε μικρές ποσότητες θεωρείται απαραίτητη, ενώ εντοπίζονται σε φυτικά έλαια και γενικά σε φυτικής προέλευσης τροφές. Η απουσία τους έχει συσχετισθεί με επιπλοκές στην αναπαραγωγική λειτουργία. Κοινό χημικό χαρακτηριστικό των τοκοφερολών είναι η παρουσία χρωμανίου και ο αντιοξειδωτικός τους χαρακτήρας που οφείλεται στο φαινολικό υδροξύλιο του χρωμανίου. Όλες οι τοκοφερόλες περιέχουν τρία ασύμμετρα άτομα άνθρακα, άρα υπάρχουν για την καθεμία 8 οπτικά ισομερή. Η α-τοκοφερόλη βρίσκεται συνήθως σε μεγαλύτερη αναλογία σε σχέση με τις υπόλοιπες, ενώ είναι και η πλέον ενεργή από βιολογικής σκοπιάς. Οι συγκεντρώσεις τους στο αίμα ρυθμίζονται από το ήπαρ, το οποίο τις παραλαμβάνει αφότου απορροφηθούν από το λεπτό έντερο.



Εικόνα 7: Χημική δομή της α-τοκοφερόλης

Η υδροξυτυροσόλη, από τη μεριά της, είναι μια πολυφαινόλη που βρίσκεται σε πολύ μεγάλη συγκέντρωση στα φύλλα της ελιάς, ενώ αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά του ελαιόλαδου. Έχει, μάλιστα, χαρακτηριστεί ως αντιοξειδωτικό με πολλές βιολογικές δράσεις (Convas et al., 2015; Perez-Bonilla et al., 2014). Όταν οι ελιές συνθλίβονται προκειμένου να γίνει η εξαγωγή του λαδιού, προκύπτουν τρία διαφορετικά, πολυφαινολικά στρώματα: τα λύματα, τα υπολείμματα των καρπών και το ελαιόλαδο. Εξαιτίας του αμφιπαθούς χαρακτήρα της, είναι δυνατόν να εντοπιστεί με διαφορετικές μορφές, μία από τις οποίες είναι και ως μέρος πιο πολύπλοκων συστατικών όπως είναι και η ολεασίνη. Το περιεχόμενο της υδροξυτυροσόλης στο ελαιόλαδο εξαρτάται από το είδος του δέντρου της ελιάς, από την τοποθεσία της φυτείας, την ποιότητα του ελαιόλαδου καθώς και από τη διεργασία του ελαιόλαδου (Romero et al., 2004).



Εικόνα 7: Η δομή της υδροξυτυροσόλης

Αν και οι μηχανισμοί δράσης μέσω των οποίων η υδροξυτυροσόλη ασκεί την επίδρασή της μένει να καθοριστούν επακριβώς, είναι γνωστό ότι επηρεάζει την έκφραση διάφορων συστατικών της φλεγμονώδους απόκρισης, πιθανώς μέσω της ρύθμισης του μονοπατιού του NF-κB. Επιπλέον, είναι ικανή να ελέγχει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ενός όγκου, ενώ δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες αποτρέποντας έτσι την οξειδωτική καταστροφή του DNA.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πειραματική Διαδικασία

Για τις ανάγκες του πειράματος, νεαρά κύτταρα (cpd34) δέχθηκαν την επίδραση της κάθε ουσίας σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, δηλαδή σε συγκεντρώσεις στις οποίες έχει δεχθεί να ενεργοποιείται το πρωτεάσωμα παρουσιάζοντας αυξημένες ενεργότητες για είκοσι τέσσερις ώρες. Στη συνέχεια, έγινε συλλογή ολικού RNA από ανθρώπινους ινοβλάστες. Για το σύνολο των ουσιών, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας το DMSO. Η περαιτέρω επεξεργασία των δειγμάτων, που έχει να κάνει με τη δημιουργία των μικροσυστοιχιών, πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Illumina.

3.2 Μικροσυστοιχίες δεδομένων γονιδιακής έκφρασης

Βασικό ερώτημα στο οποίο απαντά αυτή η τεχνολογία είναι η προσπάθεια απόκτησης μιας έστω μερικής εικόνας του τρέχοντος κυτταρικού μεταβολισμού. Το επίπεδο της βιολογικής πραγματικότητας το οποίο καταγράφεται είναι το μεταγράφημα ενός κυτταρικού πληθυσμού, το οποίο με κατάλληλες δειγματοληψίες και συγκρίσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αναδείξει τη μεταβολική απόκριση αυτού του πληθυσμού σε συνθήκες επιστημονικού ενδιαφέροντος.

3.2.1 Βιολογικό υπόβαθρο μικροσυστοιχιών

Η βιολογική ιδιότητα που αποτελεί τη βάση της σχετικής τεχνολογίας είναι η επιλεκτικότητα των κλώνων RNA-DNA να υβριδίζονται με το συμπληρωματικό τους κλώνο με πολύ υψηλό ποσοστό επιτυχίας, ακόμα και παρουσία πολλών κοντινών παραλλαγών αυτού. Ως εκ τούτου, mRNA απομονωμένο από τον εξεταζόμενο κυτταρικό πληθυσμό μπορεί να ανιχνευθεί μέσω του υβριδισμού του σε προεπιλεγμένους και ορθώς καταγεγραμμένους «στόχους», ο καθορισμός των οποίων θα εξηγηθεί παρακάτω.

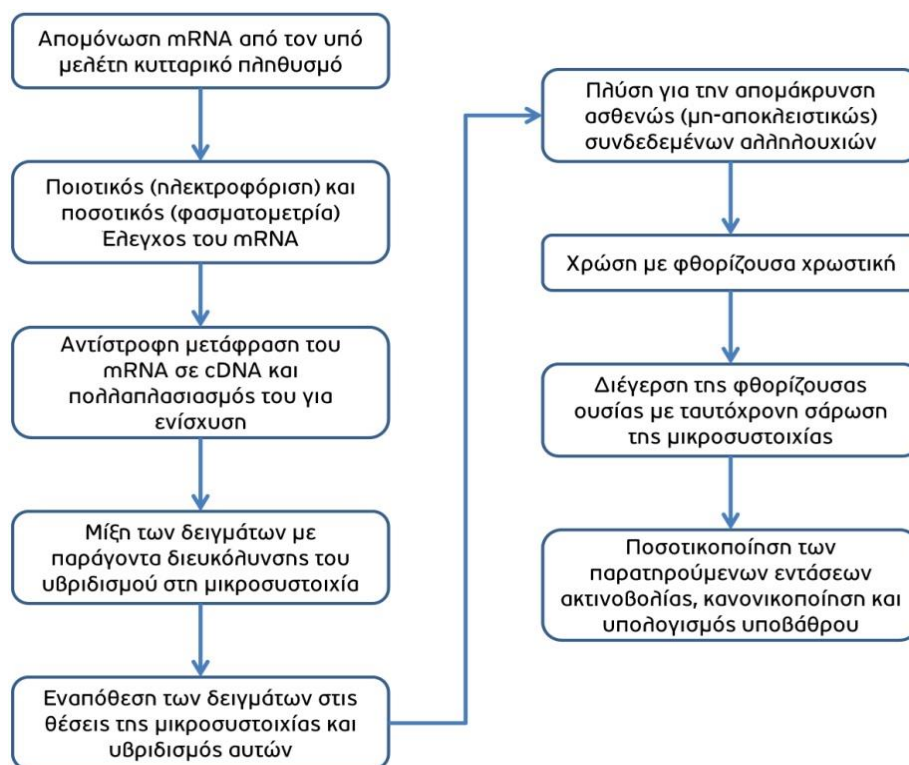
Η δεύτερη βιολογική ιδιότητα που κάνει δυνατή τη συστηματική χρήση αυτής της τεχνολογίας είναι η δυνατότητα παραγωγής πιστών αντιγράφων μορίων RNA-DNA, καθώς και η δυνατότητα αμφίδρομης μεταξύ τους μεταγραφής. Η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction) επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του μεταγραφώματος που έχει απομονωθεί πειραματικά, επιτρέποντας έτσι την ενίσχυση του σήματος σε επίπεδα που επιτρέπουν τόσο την ανίχνευση όσο και τη συστηματική εκτίμηση των επιπέδων τεχνικού θορύβου.

Η αξιοποίηση των ιδιοτήτων αυτών στα πλαίσια της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών γίνεται με την εξής διάταξη: επί στερεής επιφάνειας όπως π.χ. γυαλί ή πλαστικό οργανώνονται καλώς καταγεγραμμένες «ενεργές περιοχές», με την καθεμία να περιέχει καθορισμένο αριθμό συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, οι οποίες ονομάζονται «probes». Η αλληλουχία του κάθε probe επιλέγεται από την

κατασκευάστρια εταιρία ώστε να είναι χαρακτηριστική για το αντίστοιχο εξεταζόμενο γονίδιο και μόνο, επιλεκτική και χωρίς επαναλήψεις ώστε να μειώνεται ο μερικός υβριδισμός που αποτελεί μέρος του τεχνικού θορύβου.

Έχοντας σημαδέψει τα πειραματικώς αποκτηθέντα και ενισχυμένα μέσω PCR μετάγραφα με φθορίζοντα σύμπλοκα, μπορούμε μετά την απομάκρυνση του περιττεύοντος υλικού να απεικονίσουμε οπτικά τους επιτυχείς υβριδισμούς που έχουν λάβει χώρα στη μικροσυστοιχία. Η φωτογράφιση των φθορίζουσών περιοχών ακολουθείται από αυτοματοποιημένη ανάλυση εικόνας και μεταφράζεται σε πίνακες σχετικών εντάσεων, οι οποίοι αποτελούν και τη βάση της συστηματικής ανάλυσης που θα ακολουθήσει.

Το ακολουθούμενο πρωτόκολλο παρουσιάζεται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα (Εικ. 8)



Εικόνα 8: Ενδεικτικό πρωτόκολλο διαδικασίας υβριδισμού

Κατά το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας αυτής, το Illumina Bead Studio Software με το οποίο ελήφθησαν οι μετρήσεις και αναλύθηκαν οι φωτογραφίες των μικροσυστοιχιών εκμεταλλεύεται τα εξής στοιχεία της δομής των chip της Illumina:

- Την ύπαρξη negative control probes, τα οποία διευκολύνουν την εξαγωγή μιας αξιόπιστης τιμής για το θόρυβο υποβάθρου.
- Την ύπαρξη αρκετών probes τα οποία ανιχνεύουν το ίδιο γονίδιο σε κάθε μικροσυστοιχία, με τη σύγκριση μεταξύ των τιμών που δίνουν να επιτρέπει την εξαγωγή της αξιοπιστίας της μετρούμενης φωτεινότητας του κάθε probe. Αυτή δίνεται ως πιθανότητα λανθασμένης ανίχνευσης (false discovery rate–

FDR) στο διάστημα $[0,1]$, με το μηδέν να υποδεικνύει απόλυτη αξιοπιστία της μέτρησης.

Τα εξαγόμενα δεδομένα οργανώνονται σε πίνακα που παρουσιάζει τις παρατηρούμενες σχετικές εντάσεις των probes, τις τιμές αξιοπιστίας αυτών και άλλες πληροφορίες περί της απόδοσης της μικροσυστοιχίας.

Σε αυτό το σημείο γίνονται μία σειρά παραδοχές οι οποίες επιτρέπουν το πέρασμα στην καθεαυτή αναλυτική διαδικασία.

- Η διαχείριση των δειγμάτων έχει γίνει με το ίδιο πρωτόκολλο, ώστε να μην εισαχθούν ανεπιθύμητες αλλοιώσεις στα αποτελέσματα.
- Η απομόνωση και ενίσχυση του mRNA δεν αλλοίωσε συστηματικά τις σχετικές αφθονίες των επιμέρους κλώνων που υπήρχαν στο αρχικό μας δείγμα. (Barbosa-Morais et al., 2009)
- Οι σχετικές φωτεινότητες φθορισμού των υβριδισμένων beads έχουν σχέση αναλογίας με τις σχετικές συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων αλληλουχιών στο αρχικό δείγμα.

Οι υποθέσεις αυτές είναι καλώς μελετημένες και μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστες στη διαδικασία της ανάλυσης.

3.2.2 Επί των εργαλείων της βιοστατιστικής ανάλυσης

Το σύνολο της ανάλυσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εργαλείων ανοιχτού κώδικα της R από το εναποθετήριο Bioconductor. Μπορεί κανείς να ανατρέξει στο Παράρτημα της παρούσας εργασίας για το σύνολο των εντολών στο πλαίσιο αυτής της ανάλυσης.

Προεπεξεργασία

Η προεπεξεργασία των δεδομένων από μονοκαναλικές μικροσυστοιχίες της Illumina κινείται γύρω από τέσσερα διαδοχικά στάδια:

1. Αφαίρεση θορύβου υποβάθρου
2. Κανονικοποίηση ποσοστημορίων
3. Μετασχηματισμός των τιμών των δεδομένων
4. Περίληψη του συνόλου των probes

Στη μελέτη μας, αυτό το στάδιο του pre-processing υλοποιήθηκε με τη μέθοδο `pearc` του πακέτου `limma`, αφότου η οργάνωση των δεδομένων έγινε με τη χρήση της μεθόδου `read.ilmn` (Shi et al., 2010).

Βήμα πρώτο - θόρυβος υποβάθρου:

Μία ευρείας χρήσης υπόθεση στις μικροσυστοιχίες είναι πως το σήμα τους αποτελεί συνέλιξη ενός σήματος θορύβου υποβάθρου και βιολογικού σήματος, με τα δύο αυτά

σήματα να ακολουθούν διαφορετικές κατανομές. Συγκεκριμένα, ο θόρυβος υποβάθρου ακολουθεί μία γραμμική κατανομή, ενώ το βιολογικό σήμα εκθετική. Έτσι, με τον υπολογισμό τριών παραμέτρων (τη μέση τιμή μ και την απόκλιση σ όσον αφορά την ένταση του υποβάθρου και τη μέση τιμή α των εντάσεων του σήματος) μπορεί να διενεργηθεί η αποσυνέλιξη.

Το πακέτο `peac` της R το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη διαδικασία ακολουθεί την εξής προσέγγιση (Xie Y and Wang X, 2009):

$$\hat{\sigma} = s_b$$

$$\hat{\alpha} = \bar{y} - \bar{b}$$

Όπου

\bar{b} : μέση τιμή υποβάθρου

s_b : κανονική απόκλιση υποβάθρου

\bar{y} : μέση τιμή των εντάσεων των κανονικών probes

Βήμα δεύτερο - κανονικοποίηση ποσοστημορίων:

Η διαδικασία αυτή επιχειρεί να εξισώσει τις μέσες τιμές και τις αποκλίσεις μεταξύ των κατανομών των τιμών που περιγράφουν τα διάφορα δείγματα, ώστε να μπορούν αυτά να συγκριθούν μεταξύ τους χωρίς συστηματικό σφάλμα οφειλόμενο στις σχετικές αποδόσεις των μικροσυστοιχιών (Bolstad et al., 2003).

Βήμα τρίτο - μετασχηματισμός των δεδομένων:

Οι σχετικές εντάσεις κινούνται σε ένα διάστημα 10-104, ενώ όπως έχουμε αναφέρει ακολουθούν εκθετική κατανομή. Ως εκ τούτου, ο λογαριθμικός μετασχηματισμός των τιμών επιτρέπει τη με μεγαλύτερη ευκολία σύγκρισή τους κι εξασφαλίζει μια γραμμική μεταξύ τους σχέση, διευκολύνοντας τις επόμενες φάσεις της ανάλυσης. Η γενική σύμβαση σε αυτό το στάδιο, η οποία ακολουθείται κι εδώ, είναι η λογαρίθμηση στη βάση του 2.

Βήμα τέταρτο - φιλτράρισμα των probes

Ξεκινώντας με ένα μεγάλο αριθμό probes (~48.000/δείγμα), καλούμαστε να απαντήσουμε ποια θα χρησιμοποιηθούν στα επόμενα στάδια της ανάλυσης. Δεν πρόκειται για ένα τετριμμένο ερώτημα, καθώς η παρουσία probes χαμηλής τεχνικής (μη αξιόπιστοι υβριδισμοί) ή/και βιολογικής (μετάγραφα χαμηλής εκλεκτικότητας) αξιοπιστίας μπορεί να αλλοιώσει τις κατανομές και να οδηγήσει σε λαθεμένα αποτελέσματα. Δεδομένου του ιστορικά υψηλού ποσοστού θορύβου που χαρακτηρίζει τις μικροσυστοιχίες, η ορθή διαλογή probes μπορεί να επηρεάσει πολύ την ποιότητα των αποτελεσμάτων.

Στα πλαίσια αυτά υιοθετήθηκε ένα διπλό φιλτράρισμα, το οποίο αντιμετωπίζει τόσο τη βιολογική, όσο και την τεχνική αναξιοπιστία. Σε αυτή τη διαδικασία, τα δεδομένα της τεχνικής απόδοσης των probes προέρχονται από την αξιοποίηση των control probes και τα δεδομένα της βιολογικής αξιοπιστίας των μεταγράφων προέρχονται από τη βάση δεδομένων `illuminaHumanv4.db` (Dunning et al.).

Βάσει αυτής της διαδικασίας, απορρίφθηκαν στο τεχνικό φιλτράρισμα όσα probes δεν είχαν detection p-values μικρότερα του 0.01 σε τουλάχιστον έξι δείγματα. Στο βιολογικό φιλτράρισμα απορρίφθηκε κάθε probe το οποίο είχε επισημανθεί ως “No match”, “Bad”, ή “NA”.

3.2.3 Κυρίως ανάλυση

PCA analysis

Πριν προχωρήσουμε στο κυρίως σώμα της ανάλυσης, πρέπει να επιβεβαιωθεί πως η εικόνα των μεταβλητών του πειράματος που έχουμε από τον πειραματικό σχεδιασμό είναι πλήρης, ή με άλλα λόγια πως οι πειραματικές μεταβλητές που έχουμε καταγράψει αρκούν για να περιγράψουν ορθά τα καταγεγραμμένα μοτίβα γονιδιακής έκφρασης. Αυτό το ερώτημα έρχεται να απαντήσει η ανάλυση κύριων συνιστωσών (principal component analysis – PCA).

Μπορούμε να οπτικοποιήσουμε αυτή τη διαδικασία σαν την προσπάθεια να ταιριάξουμε πολυδιάστατα ελλειψοειδή διαδοχικά λιγότερων διαστάσεων στα δεδομένα μας και να υπολογίσουμε τους άξονές τους. Μέσω αυτής της διαδικασίας, μπορεί να γίνει εκτίμηση του πλήθους πειραματικών μεταβλητών που «εξηγούν» το μεγαλύτερο μέρος της ανομοιογένειας των δεδομένων, με τις υπόλοιπες να προσφέρουν μικρό ποσό πληροφορίας για τα δεδομένα.

Ο λόγος που γίνεται αυτή η διαδικασία είναι ώστε να επιβεβαιωθεί πως δεν έχουν παρεισφρήσει στην ανάλυση «κρυφές» μεταβλητές, οι οποίες θα επηρέαζαν τα αποτελέσματα, χωρίς να αποτελούν μέρος του πειραματικού σχεδιασμού.

Βάσει αυτής της διαδικασίας δεν κρίθηκε αναγκαία η εισαγωγή βοηθητικών μεταβλητών στο γραμμικό μοντέλο, ώστε να αντιμετωπιστεί εναπομείνουσα μη εξηγήσιμη ανομοιογένεια των δεδομένων.

Γραμμικά μοντέλα και ανάλυση διαφορικής συμπεριφοράς

Για να προχωρήσουμε σε ανάλυση της διαφορικής συμπεριφοράς των γονιδίων, πρέπει να ξεκινήσουμε από μία βασική υπόθεση για τη σχέση τους με τις πειραματικές μεταβλητές. Η υπόθεση αυτή είναι η επιλογή γραμμικών ή μη γραμμικών μοντέλων για τη μοντελοποίηση της σχέσης αυτής. Τα μη γραμμικά μοντέλα έχουν μειονεκτήματα όσον αφορά τη μη εγγυημένη προσέγγιση λύσης, οπότε και προτιμώνται υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Η συνηθέστερη προσέγγιση στη βιοστατιστική είναι η παραδοχή της αξιοπιστίας ενός γραμμικού μοντέλου για την ανάλυση της διαφορικής συμπεριφοράς.

Υπό αυτή την υπόθεση, το τελικό προφίλ έκφρασης γονιδίων που παρατηρούμε μπορεί να αναλυθεί σε γραμμικό συνδυασμό επιμέρους προφίλ έκφρασης, ένα για κάθε μία πειραματική μεταβλητή. Τα προφίλ αυτά επιμερίζουν τη συνολική συμπεριφορά των δεδομένων στη χωριστή συνεισφορά κάθε πειραματικής μεταβλητής, και αντιστρόφως ο γραμμικός συνδυασμός των επιμέρους προφίλ έκφρασης πρέπει να αναπαράγει τα αρχικά δεδομένα. Σε αντιδιαστολή, τα μη

γραμμικά μοντέλα περιέχουν όρους αλληλεπίδρασης μεταξύ των συνεισφορών των πειραματικών μεταβλητών, οι οποίοι πρέπει να εκτιμηθούν.

Για την εφαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα δεδομένα, καθώς και για τα απαραίτητα στατιστικά σκορ (βλέπε την επόμενη παράγραφο), επελέγη το ανοικτό πακέτο της limma (Smyth, 2004), το οποίο έχει ευρεία χρήση και θεωρείται ιστορικά αξιόπιστης απόδοσης από την κοινότητα.

Υπολογισμός p-values

Ένα από τα σημαντικά μειονεκτήματα της βιοληροφορικής είναι το υψηλό επίπεδο θορύβου που οφείλεται τόσο σε τεχνικές πηγές (PCR, υβριδισμός, μέτρηση φωτεινότητας φθορισμού κ.α.), όσο και σε βιολογικές (cellular noise) (Tsimring, L., S., 2014). Δεδομένου αυτού, είναι μη τετριμμένο το πρόβλημα της αξιολόγησης της στατιστικής σημαντικότητας των ευρημάτων, ώστε να μπορεί να εκτιμηθεί η πιθανότητα εμφάνισης Type I & II εσφαλμένων αποτελεσμάτων. Αυτή η διαδικασία συνίσταται στην επιλογή στατιστικού τεστ που θα ακολουθηθεί, και ύστερα στην εκτίμηση της αναγκαιότητας multiple hypothesis testing correction.

Στατιστικό τεστ – t-testing

Το στατιστικό τεστ αυτό βασίζεται στις εξής παραδοχές και δεδομένα:

- Το είδος της εξεταζόμενης μεταβλητής (συνεχής ή ασυνεχής με διάταξη)
- Τα εξεταζόμενα δεδομένα αποτελούν αξιόπιστη δειγματοληψία του πραγματικού πληθυσμού (αντιμετωπίζεται με σωστό πειραματικό σχεδιασμό)
- Τα δεδομένα ακολουθούν την κανονική κατανομή
- Υψηλός αριθμός δεδομένων, ώστε να προσεγγίζεται η κανονική κατανομή
- Ισότητα της τυπικής απόκλισης των τιμών έκφρασης για τα εξεταζόμενα δείγματα (αντιμετωπίζεται κατά την προεπεξεργασία)

Εν συντομία, το t-test υπολογίζει την τιμή του t-value για κάθε γονίδιο. Αυτή η τιμή ποσοτικοποιεί την πιθανότητα η μέση έκφραση του κάθε γονιδίου να διαφέρει μεταξύ των δύο πληθυσμών (π.χ. cases-controls), παίρνοντας υπ' όψιν τόσο τη διαφορά των μέσων εκφράσεων του για τους δύο πληθυσμούς, όσο και τις τυπικές αποκλίσεις του για αυτούς. Βάσει του t-value υπολογίζεται η αρχική p-value, η οποία αποτελεί κλασική πιθανότητα μεταξύ του 0 και του 1. Αναφέρεται στην πιθανότητα ένα γονίδιο να εμφανίζεται διαφορικά εκπεφρασμένο ενώ ακολουθεί τη μηδενική υπόθεση (μη ύπαρξη διαφορικής συμπεριφοράς ως προς την πειραματική μεταβλητή που εξετάζεται).

Multiple hypothesis testing correction

Ένα επιπλέον πρόβλημα που ανακύπτει στην ανάλυση μικροσυστοιχιών είναι ο πολύ μεγάλος αριθμός εξεταζόμενων γονιδίων για να απαντηθεί το κοινό ερώτημα «διαφέρουν αυτές οι κατηγορίες δειγμάτων»; Λόγω της εγγενούς τυχαιότητας αυτών των μελετών, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των εξεταζόμενων γονιδίων, τόσο υψηλότερη είναι η πιθανότητα να εμφανιστεί τουλάχιστον ένα Type I εσφαλμένο εύρημα. Σε πειράματα μικροσυστοιχιών, ακόμα και μετά τη διαλογή των αξιόπιστων

probes, γίνονται ταυτόχρονα $>5 \cdot 10^3$ ταυτόχρονα τέτοια τεστ, πράγμα που μπορεί να αποβεί μοιραίο για την ποιότητα των αποτελεσμάτων.

Προς αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού, η eBayes μέθοδος του πακέτου limma υπολογίζει τις adjusted p-values, οι οποίες αποτελούν τη βάση της μετέπειτα επιλογής γονιδίων, ώστε να αντιμετωπίζεται πρόβλημα του multiple hypothesis testing.

Λίστες διαφορικής εκφρασμένων και στατιστικά σημαντικών γονιδίων

Η τελική επιλογή των γονιδίων που θα αποτελέσουν τις λίστες που θα χρησιμοποιηθούν στην περαιτέρω ανάλυση είναι (όπως και η διαλογή των probes που κάναμε στην προεπεξεργασία) διπλής φύσης, τεχνική και βιολογική. Από τεχνικής σκοπιάς, απαιτήσαμε την απόρριψη όσων γονιδίων εμφάνισαν adjusted p-value > 0.05 . Από βιολογικής σκοπιάς, απαιτήθηκε ένα ελάχιστο όριο του λόγου έκφρασης ίσο με $\ln 2(1.5)$ για να θεωρήσουμε ότι η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου έχει ισχυρό βιολογικό αντίκτυπο. Οι λίστες που προκύπτουν για τις τέσσερις εξεταζόμενες ουσίες παρουσιάζονται στους πίνακες 2.3.1 έως και 2.3.4.

Λειτουργική ανάλυση λιστών

Έχοντας φτάσει σε απάντηση του ερωτήματος περί του αν υπάρχουν γονίδια που συμπεριφέρονται διαφορετικά παρουσία των εξεταζόμενων ουσιών, πρέπει να απαντηθεί το ερώτημα περί της βιολογικής σημασίας αυτών των γονιδίων.

Σε προσπάθεια απάντησης αυτού, αξιοποιήθηκε η διαδικτυακή πλατφόρμα BioInfoMiner (Koutsandreas et al., 2016), μέσω της οποίας διενεργήθηκε χαρτογράφηση των λιστών στην οντολογία Gene Ontology (Ashburner et al., 2000). Με τη χρήση hypergeometric testing και παίρνοντας υπ' όψιν τη δομή των ιεραρχικών γράφων, επιτρέπει την αντιμετώπιση μεγάλου μέρους του βιολογικού θορύβου που υπάρχει στις λίστες, αναδεικνύοντας τις συστηματικά υπερεκφραζόμενες βιολογικές διεργασίες που αποτυπώνονται στις λίστες. Επίσης, επιτρέπει την αναγνώριση γονιδίων που έχουν υψηλή συνδεσιμότητα με πλήθος των οντολογικών όρων που θα αναδειχθούν και τα οποία είναι πιθανό να εμφανίζουν ρυθμιστικό ρόλο στις εμπλεκόμενες διαδικασίες.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Σκοπός της εργασίας

Στην παρούσα μελέτη έγινε χρήση τεσσάρων ουσιών, δύο φυσικών (PCB και ολεασίνη) και δύο συνθετικών (MK151 και MK154) προκειμένου να εξεταστούν τα γονίδια και οι γονιδιακές οντολογίες που μεταβάλλονται κατά την επίδραση αυτών των ουσιών σε σχέση με την αντιγηραντική και αντιοξειδωτική τους δράση, καθώς και σε σχέση με την ενεργοποίηση του πρωτεασώματος.

4.2 Λίστες διαφορικής εκφρασμένων γονιδίων ανά εξεταζόμενη ουσία

Στους Πίνακες 4.2.1 έως και 4.2.4 παρουσιάζονται οι πλήρεις λίστες διαφορικής εκφρασμένων γονιδίων με στατιστική σημαντικότητα (p -value ≤ 0.05), με το log fold change και την τιμή της adjusted p -value για κάθε μία από τις τέσσερις ουσίες (PCB, Ολεασίνη, MK151 και MK154 αντιστοίχως). Το logFC είναι ο λόγος των μέσων εκφράσεων μεταξύ των δύο πληθυσμών (treated vs untreated σε κάθε περίπτωση μας), ο οποίος έχει λογαριθμηθεί στη βάση του δύο. Στα πλαίσια της ανάλυσης που διενεργήθηκε, θετικές τιμές του logFC υποδεικνύουν αύξηση της έκφρασης ενός γονιδίου, παρουσία της εξεταζόμενης ουσίας, ενώ αρνητικές τιμές τη μείωση της έκφρασης αυτού.

Symbol	LogFC	adj.P.Val
AQP12B	0.618372	0.023141
ARID4B	0.655915	0.00469
ARRB1	0.615194	0.014729
BPTF	-0.92186	0.0004+01
C12orf51	-0.63341	0.001528
C17orf67	0.64463	0.005234
C1orf133	0.62981	0.009906
C1S	0.612917	0.023039
C5orf23	-0.59901	0.004844
C9orf7	-0.61073	0.008283
CCDC71	-1.34373	1.10E-05
CDCA1	0.729273	0.001734
CLDN14	-0.86599	0.00226
CYP1B1	0.909101	3.98E-08
DBF4	-0.61907	0.036807
DCUN1D1	-0.72207	0.011164
DLST	-0.6157	0.001627
DNAJB14	0.681617	0.004595
DNER	-0.64503	0.000863
DYRK1A	1.215783	0.00116

DYRK2	-0.62739	0.001644
EDNRB	-0.71698	0.004715
EP300	-0.72736	0.008126
EYA4	-0.61427	0.005066
FBXL17	-0.62526	0.016689
FBXW7	-1.07131	0.006926
FLJ35258	-0.74927	8.75E-05
GOLGA7B	0.631449	0.01594
GPRC5A	-0.58783	0.005458
GSTZ1	-0.6378	0.022345
HYOU1	-0.64216	0.001495
IKZF3	0.698166	0.011249
IL5RA	-0.70939	0.00492
IQGAP3	-1.3114	2.05E-05
ITGB1	0.712722	0.002903
LATS2	-1.10046	2.42E-07
LBR	0.719605	0.010261
LGR6	0.749037	0.002957
LOC100128533	0.666993	0.006885
LOC100133692	0.746968	0.003178
LOC100133800	0.823991	2.85E-05
LOC100134265	0.834433	0.006944
LOC392787	-0.77412	6.90E-05
LOC441155	-1.08176	0.004613
LOC642282	0.641721	0.025429
LOC644380	0.758292	0.000769
LOC650132	0.65071	0.002582
LOC652330	-1.06752	0.005765
LOC653375	0.892465	0.003453
LOC730525	-0.71319	0.010543
LOC730535	1.03143	6.08E-05
MAP2K3	0.628129	0.01673
MED13L	-0.81383	0.001893
MSL1	-0.62608	0.008592
MX1	1.025123	1.99E-05
NDUFA5	0.707197	0.020621
PACS2	-0.63317	0.020777
PARP12	-0.59576	0.035077
PDCL	-0.67522	0.018245
PDE4D	-0.69323	0.006607
PK2	-0.69478	0.001213
PI4KA	0.730566	0.010303
PLCG1	1.004873	0.000201
PRKAR1B	0.716695	0.004806
PRPS1L1	-0.86629	0.002947
PSMB9	0.600585	0.013196

PTX3	0.717212	0.006617
RBBP8	0.725586	0.010917
RHOBTB2	0.591106	0.012613
RRBP1	-0.87109	0.000796
RSPH10B	0.734634	0.012355
SAMD11	-0.79588	0.019172
SELT	-0.69346	0.002429
SEMA6A	-0.59182	0.018079
SERPINB2	0.702386	1.06E-05
SH3RF2	-0.58884	0.011936
SILV	-0.58686	0.002933
SOD2	0.642592	0.00012
SPATS2	0.729228	0.000884
SPIN1	0.682038	0.033199
SSBP3	-0.80361	0.003103
ST5	-0.7957	0.008789
SULT1A3	-0.59757	0.015287
SVEP1	-0.62171	9.30E-05
SYN1	-0.88448	0.00039
TAPBP	-0.60284	0.000766
TBL3	-0.66468	0.007479
TCEA1	0.651197	0.001803
TCF12	0.864416	0.004744
TERC	0.658703	0.033296
TMEM191B	0.689251	0.003554
TNPO1	0.830355	0.001077
TRIM43	-0.75741	0.006859
VASH2	0.777018	0.004788
VCAM1	0.702257	0.005107
VPS41	0.840981	0.000862
WTAP	0.603651	0.025151
ZBTB20	-0.6753	0.006366
ZBTB25	-0.58922	0.026461
ZDHHC13	0.831414	0.002794
ZNF234	-0.88582	0.000478
ZNF664	0.87315	0.001078
ZNF703	-0.65971	0.002341

Πίνακας 4.2.1: Διαφορικώς εκφρασμένα γονίδια παρουσία της PCB

Symbol	logFC	adj.P.Val
AKR1C4	0.749744541	2.74E-06
ASPHD1	0.630345513	0.005368881
BET1L	-0.616943373	0.004490376
C11orf84	-0.773158071	0.003842186
CACNA1C	0.613064687	0.019812025
CACNA1S	0.637654466	0.020882382
CARD16	0.598087224	0.004060424
CCBE1	-0.710959739	0.000381951
CCDC71	-0.598384047	0.017766128
CCDC80	-0.867332733	0.001436396
CD55	0.608828537	0.001530354
CDC2L2	0.610671035	0.004849223
CDCP1	-0.649671655	0.026514875
CDKN1C	-0.638122408	0.020646231
CEPT1	0.673788346	0.00282768
CHKA	0.637634431	0.012444062
CHTF8	-0.658771911	0.023839208
CYP1B1	1.114209205	1.36E-09
DENND3	0.686749317	0.000926806
DIRAS3	-0.638318022	0.00160529
DSEL	-1.283042028	0.002631566
DST	-0.886336612	0.011248833
DYRK1A	1.063595824	0.003485005
DYRK2	-0.649840835	0.001213093
FAM129A	-0.610745948	0.000604633
FAM43A	0.624030582	3.34E-05
FAM53B	0.640047491	0.0445848
FAM65C	0.682895241	0.001617163
FBXW7	-1.00272484	0.010658548
FLJ10357	-0.799068743	0.045459843
FOXQ1	0.746639778	0.001416384
GAS2L3	-0.676306889	0.025316265
GOLPH4	-0.772039412	0.000114683
GPNMB	0.586669841	0.004328543
GPR68	0.763348033	0.001193638
HCG18	-0.633784041	0.022044872
HDAC11	-0.627889965	0.017106697
HMGA2	-0.600053703	0.011106366
IFI44	0.654632021	0.001100859
KLF4	0.600737316	0.00128054
KRT19	-0.618220746	0.00331838
LGR6	0.910954442	0.000536895
LOC100127887	-0.696481886	0.037105699
LOC100128892	-0.778830048	0.002783941
LOC100130776	-0.788497303	0.013982305

LOC158572	-0.708539324	0.018588783
LOC401805	-1.086647161	0.003144875
LOC441155	-0.79921783	0.02885214
LOC441455	0.588698153	0.035033039
LOC643201	-0.610642625	0.044412974
LOC649841	-0.628694231	0.000464809
LOC727980	-0.591267978	0.025201781
LOC731605	-0.840392256	0.00690859
MAFG	0.602256824	0.024640489
MID2	0.723042432	0.005127792
MN1	0.715156916	0.016735351
MX1	0.634067454	0.002677943
N4BP2L2	0.851796288	0.002830572
NAV2	-0.712204948	0.006205562
NCKAP5	0.821060555	0.000192316
NEFM	-0.703079171	0.010579565
NFAT5	-0.748308914	0.001029968
NOVA1	0.594921854	0.012245047
NPTX1	0.752743765	1.04E-06
NQO1	0.759424342	8.88E-05
NSUN5C	0.868412046	0.001761909
NUCKS1	-1.071487815	0.000307077
PDCD10	0.803167915	0.001592409
PDGFRA	0.586370489	0.002749071
PIR	0.819764134	0.000289157
PLA2G4A	0.596810683	0.009437996
PLCG1	0.748570797	0.002993104
PLEKHJ1	0.650032521	0.018622042
PTGS2	0.720615877	0.000450093
QKI	-0.733500817	0.004776172
RGS4	-0.618649296	0.000129439
RRBP1	-0.868012203	0.00082244
RUNX3	0.677436629	0.018698374
SERPINB2	0.917664393	2.43E-07
SH3RF2	-0.699873986	0.003678711
SHBG	0.773847749	0.005056613
SHCBP1	-0.791298244	0.000513074
SIRT7	0.72196289	0.002701242
SLC16A14	0.736086695	0.005636475
SLC17A9	0.639996231	0.011078444
SLC19A1	0.612184298	0.019805775
SLC7A2	0.664171713	0.000465996
SOCS3	1.132516365	1.22E-05
SPATA7	0.650533143	0.009317039
SPIN1	-0.897499603	0.006901305
SSBP3	-0.832998319	0.002334823

SULT1A2	0.631359173	0.014044513
SYN2	-0.589903879	0.026218293
TADA3	0.648433147	0.017742854
TAOK1	-0.88837554	0.004380514
TBN	-0.722887204	0.009475096
TIPARP	0.676203718	3.27E-06
TLCD1	0.654150896	0.003121804
TOX2	-0.604042947	0.036845874
UBE2CBP	0.585209272	0.022167231
USP48	-0.594794067	0.01646461
ZBTB43	-0.808476531	0.000371755
ZCCHC5	-0.640249223	0.006856774
ZNF282	0.66082856	0.003935817
ZNF557	-0.786834533	0.001992984
ZNF644	-0.630200351	0.001688478

Πίνακας 4.2.2: Διαφορικώς εκφρασμένα γονίδια παρουσία της ολεασίνης

Symbol	logFC	adj.P.Val
ACCS	-0.8646	0.000103
ADHFE1	-0.67563	0.003754
ADSSL1	0.612198	0.023904
AMT	-0.84703	8.46E-05
ARID4B	0.59831	0.049837
ARRDC4	0.797927	0.003139
BAT2	-0.78029	0.015285
C12orf51	-0.61178	0.002045
C6orf57	0.626719	0.003166
CCK	0.809138	0.001058
CD44	-0.7534	0.017268
CDKN1C	-0.78741	0.00562
CEPT1	1.173581	8.36E-06
CHRM2	-0.67888	0.047325
CRAT	-0.68508	0.010669
DNAJB14	0.876766	0.007979
DNAJC12	0.627674	0.004111
DYRK1A	1.149543	0.001876
EIF4EBP3	-0.7641	0.00241
FAM14B	0.683468	0.001435
FANCL	0.621314	0.000447
FLJ35258	-0.61174	0.000713
GALK2	-0.66132	0.008724
GCA	0.642742	0.000471
GIT1	-0.83755	0.022893
GLI2	-0.76211	0.004221

GOLGA6B	-0.63446	0.022248
GPD2	0.731423	0.002021
GSTZ1	-0.59121	0.032685
HAS2AS	0.59251	0.005114
HMGA2	-0.80943	0.001187
IFI44	0.749087	0.000304
ITGB1	0.919108	0.000293
KCTD17	-0.61216	0.013094
KLHL26	0.717886	0.014824
LATS2	-0.75256	4.28E-05
LCAT	-0.62772	0.007486
LOC100131510	-0.67696	0.011971
LOC100132247	-0.59956	0.00019
LOC100132308	-0.74395	0.014003
LOC100134265	0.70632	0.019245
LOC196752	-0.821	0.000584
LOC202051	0.635719	0.020904
LOC23117	-0.62606	0.000387
LOC284297	-0.62685	0.00184
LOC401561	-0.71453	0.024625
LOC441155	-1.3116	0.000958
LOC642771	-0.59462	0.010438
LOC644380	0.62526	0.00387
LOC645722	0.631867	0.005818
LOC650128	-0.58559	0.021467
LOC729660	-0.61182	0.014694
LOC730535	0.604969	0.007733
LRCH4	-0.60122	0.006463
MAP4	-0.66649	0.008953
MED13L	-0.86891	0.001076
MEG3	-0.67411	0.000148
MIR221	-0.78555	0.000944
N4BP2L2	0.681167	0.013208
NDUFA5	0.760871	0.013637
NFS1	0.624919	0.025113
NPY5R	-0.61242	0.015162
NR2C2	-0.8756	0.002104
NRXN3	-0.62338	0.011964
NUDCD2	0.613397	0.005117
PABPC1L	-0.71819	0.000277
PDCD10	0.850846	0.000398
PDCL	-0.63204	0.025912
PLCG1	0.83708	0.001183
PRKAR1B	0.609115	0.013954
PTPLAD1	0.590436	3.47E-05
RBBP8	0.680749	0.015974

RBM33	-0.59891	0.001387
RIPK5	-0.58687	0.016519
RNF217	-0.60587	0.022775
RRBP1	-0.69522	0.005052
RRP1	-0.62439	0.005943
SCN2A	0.602517	0.016055
SHISA4	0.593007	0.00881
SLC41A2	0.609478	0.025696
SPATA13	-0.59145	0.015955
STX1A	0.89586	0.002709
TCF12	0.805836	0.007726
TM4SF4	0.590784	0.002258
TNFRSF25	-0.82797	0.000411
TOX2	-0.89644	0.003405
TPM1	-0.6347	0.006404
UBXN8	0.601593	0.004805
UHMK1	0.643265	0.025692
VPS41	0.65797	0.006181
WDR63	0.642556	0.020823
ZBTB5	-0.61159	0.048593
ZDHHC13	0.644246	0.01573
ZNF234	-0.70123	0.003612
ZNF384	-0.64397	0.005005
ZNF804A	0.613027	0.010479

Πίνακας 4.2.3: Διαφορικώς εκφρασμένα γονίδια παρουσία της MK151

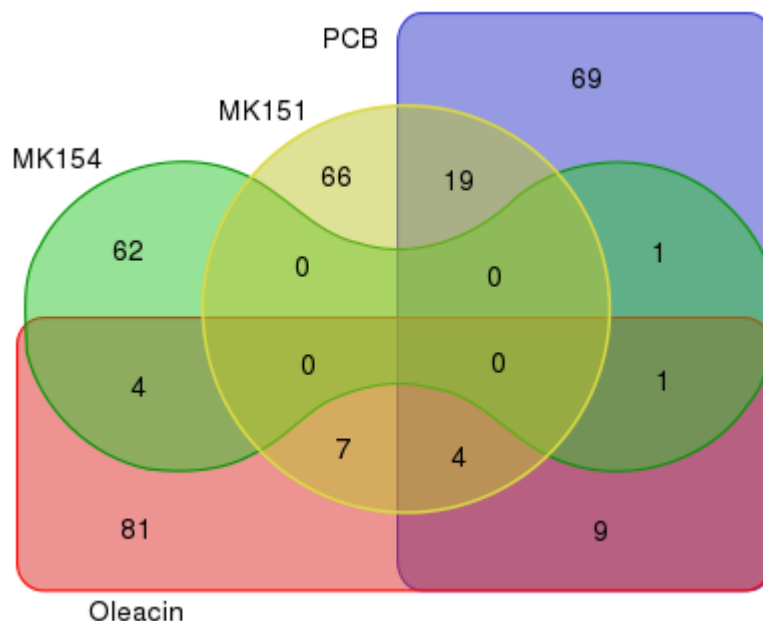
Symbol	logFC	adj.P.Val
AGFG2	0.797892297	0.004184718
ARL13B	0.601040425	0.009772953
ARL4C	0.659204278	0.005213313
ATF6B	0.600432669	0.02154329
CCDC124	-0.78358555	0.000652248
CD68	0.633388667	0.027025073
CDKL3	0.592684453	0.013402684
CHST2	-0.643536562	0.010682993
CHTF8	-0.603933527	0.036472537
COL8A1	-0.601366068	0.007582471
DDX20	0.645508893	0.010061195
DGCR6	-0.72639983	0.00581629
DIAPH3	0.697709519	6.63E-05
DUS1L	0.590361489	0.011142381
E2F7	0.630228455	0.000524589
ERGIC1	0.598465383	0.00761142
FAM156A	-0.597826875	0.047808565

FKBPL	-0.672322155	0.016419786
FLJ35776	-0.679989163	0.011330438
FZD8	-0.609242391	0.027069693
GRIP2	0.661314739	0.029504711
GRK6	0.632585818	0.010097876
GSTM4	-0.592115904	0.012264714
HOPX	0.828772639	0.000182363
HUS1B	-0.591766695	0.009094758
IFT88	0.629383818	0.039805139
IKBKB	0.86495433	0.002411451
KLHL33	-0.728560361	0.010101705
LOC100131426	-0.601464554	0.044731817
LOC392787	0.624627452	0.000655032
LOC649169	-0.59485957	0.006508112
LOC653635	-0.768997031	0.008131125
MX1	0.656318594	0.002026554
NCKAP5	-0.685601801	0.007274723
NEDD9	0.755675788	0.005839126
NMI	0.601469738	0.000444322
NRG1	0.604333917	0.004874303
NUCKS1	0.715947599	0.008709753
NUF2	0.612053133	0.000547219
OR9A4	-0.646629627	0.007613143
OTP	-0.724074591	0.014547922
PDK3	0.613846467	0.036358528
PHF2	-0.793751401	0.014339713
PHLDB3	0.717891876	0.00975667
PITPNC1	-0.597785093	0.011296173
PLCH2	-0.610371462	0.025961621
PRKDC	-0.735575619	0.027892496
PRLR	0.84765267	0.007474898
PRPF40A	-0.630769085	0.014214754
PSKH1	-0.602439063	0.030292431
RASGRP2	0.827220287	0.003522464
SERHL	0.62365769	0.014494634
SLC22A1	0.701977857	0.007801516
SNCA	-0.727397632	0.003333624
SNHG3-RCC1	0.738592812	0.018214973
SNORD96A	-0.593832196	0.00360251
SNX12	0.660308141	0.005252162
SOCS3	-0.728192454	0.001412925
ST3GAL6	0.762096805	0.004152277
TBC1D1	0.592719209	0.011923512
TLE4	0.70360944	0.006162263
UAP1L1	-0.586937348	0.015006964
UBE2K	1.092586901	0.003316651

UNC119B	0.720562928	0.001119519
WDR89	-0.91347743	0.001054766
ZC3HAV1L	0.72292132	0.011291706
ZNF160	0.601951637	0.034940851
ZNF93	0.711011597	0.01362612

Πίνακας 4.2.4: Διαφορικώς εκφρασμένα γονίδια παρουσία της MK154

Στην Εικόνα 9 δίνεται το διάγραμμα Venn των τεσσάρων λιστών που παρατέθηκαν ώστε να οπτικοποιηθεί η αλληλεπικάλυψή τους. Αυτή η οπτικοποίηση δίνει μία πρώτη (ποσοτική, αλλά όχι ποιοτική) εικόνα για την πιθανότητα να επιδρούν μέσω κοινών βιολογικών μονοπατιών οι τέσσερις ουσίες. Παρατηρούμε πως το ζεύγος ουσιών που μοιράζεται ένα σημαντικό ποσοστό των γονιδίων που φαίνονται να συσχετίζονται με τη δράση τους είναι οι PCB-MK151.



Εικόνα 9: Διάγραμμα Venn της αλληλεπικάλυψης των γονιδίων που σχετίζονται με τις τέσσερις εξεταζόμενες ουσίες.

Στον Πίνακα 4.2.5 γίνεται η καταγραφή των αλληλεπικαλυπτόμενων γονιδίων που δίνονται ποσοτικά στο διάγραμμα Venn. Σημειώνουμε πως, εκτός εξαιρετικών περιπτώσεων, το ποσοστό αλληλεπικάλυψης λιστών δεν είναι αρκετό για να αποφανθούμε για τη βιολογική συνάφειά τους. Ένα τέτοιο ερώτημα μπορεί να απαντηθεί μόνο στο πλαίσιο της αποτίμησης των βιολογικών όρων που αναδεικνύονται από τη λίστα γονιδίων (π.χ. γονιδιακών οντολογιών μέσω της Gene Ontology).

PCB- ολεασίνη	MK154- ολεασίνη	MK151- ολεασίνη	PCB-MK151	PCB- MK154	PCB- Ολεασίνη- MK151	PCB- Ολεασίνη- MK154
CCDC71	CHTF8	CDKN1C	ARID4B	LOC392787	DYRK1A	MX1
CYP1B1	NCKAP5	CEPT1	C12orf51		LOC441155	
DYRK2	NUCKS1	HMGA2	DNAJB14		PLCG1	
FBXW7	SOCS3	IFI44	FLJ35258		RRBP1	
LGR6		N4BP2L2	GSTZ1			
SERPINB2		PDCD10	ITGB1			
SHERF2		TOX2	LATS2			
SPIN1			LOC100134265			
SSBP3			LOC644380			
			LOC730535			
			MED13L			
			NDUFA5			
			PDCL			
			PRKAR1B			
			RBBP8			
			TCF12			
			VPS41			
			ZDHC13			
			ZNF234			

Πίνακας 4.2.5: Καταγραφή των κοινών, διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων, παρουσία των υπό εξέταση ουσιών (σε διάφορους συνδυασμούς).

4.3 Αποτελέσματα από τη Gene Ontology

Με τη χρήση του BioInfoMiner έγινε χαρτογράφηση των λιστών στην Gene Ontology, με κύριο αποτέλεσμα την ανάδειξη γονιδιακών οντολογιών που κρίθηκαν υπερεκφρασμένες στις λίστες, των γονιδίων που συμμετείχαν σε κάθε έναν από τους όρους αυτούς, αλλά και την ύπαρξη αλληλεπιδρώντων γονιδίων στα πλαίσια κάθε γονιδιακής οντολογίας. Στους Πίνακες 4.3.1 έως και 4.3.4 συμπυκνώνονται αυτά τα αποτελέσματα για τις PCB, ολεασίνη, MK151 και MK154 αντιστοίχως.

Συγκεκριμένα, για κάθε γονίδιο σημειώνεται το logFC του, οι γονιδιακές οντολογίες (οντολογικοί όροι) της Gene Ontology οι οποίες κρίθηκαν υπερεκπροσωπημένες με βάση το υπεργεωμετρικό τεστ, το enrichment (εμπλουτισμός) αυτών, καθώς και τα ισχυρά αλληλεπιδρώντα γονίδια ανά όρο. Με έντονα γράμματα σημειώνονται οι γονιδιακές οντολογίες ενδιαφέροντος, οι οποίες θα σχολιαστούν στο κομμάτι της συζήτησης. Τέλος, σημειώνεται πως οι καταχωρήσεις LOCXX αναφέρονται σε μετάγραφα που χρησιμοποιούν οι συστοιχίες της Illumina, τα οποία δεν είναι annotated (σχολιασμένα).

Symbol	logFC	Gene Ontologies	Enrichment	Interactor(s)
AQP12B	0.618372			
ARID4B	0.655915			
ARRB1	0.615194	positive regulation of protein ubiquitination	4/174	SPIN1, PDE4D, MAP2K3
		activation of protein kinase activity	5/279	
		positive regulation of protein modification by small protein conjugation or removal	4/189	
		positive regulation of transferase activity	8/611	
		regulation of transferase activity	10/899	
		negative regulation of catalytic activity	9/786	
BPTF	-0.92186	cellular response to organic substance	12/1204	
		cellular response to chemical stimulus	14/1258	
C12orf51	-0.63341			
C17orf67	0.64463			
C1orf133	0.62981			
C1S	0.612917			
C5orf23	-0.59901			
C9orf7	-0.61073			
CCDC71	-1.34373			
CDCA1	0.729273			
CLDN14	-0.86599			
CYP1B1	0.909101	intrinsic apoptotic signaling pathway	5/147	
		intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress	2/17	
		reactive oxygen species biosynthetic process	2/23	
		ameboidal-type cell migration	4/150	
		cellular response to organic substance	12/1204	
		cellular response to chemical stimulus	14/1258	
		apoptotic signaling pathway	5/267	
		positive regulation of angiogenesis	3/121	
		intracellular signal transduction	15/1503	
		regulation of intracellular signal transduction	16/1670	
		positive regulation of vasculature development	3/137	
DBF4	-0.61907	mitotic cell cycle phase transition	5/235	
		cell cycle phase transition	5/241	

DCUN1D1	-0.72207	positive regulation of protein ubiquitination	4/174	
		positive regulation of ubiquitin-protein transferase activity	3/101	
		positive regulation of protein modification by small protein conjugation or removal	4/189	
		positive regulation of transferase activity	8/611	
		regulation of ubiquitin-protein transferase activity	3/116	
		regulation of transferase activity	10/899	
DLST	-0.6157			
DNAJB14	0.681617			
DNER	-0.64503			
DYRK1A	1.215783	regulation of signal transduction by p53 class mediator	4/162	EP300, LATS2
		regulation of protein deacetylation	2/34	
		regulation of alternative mRNA splicing, via spliceosome	2/35	
		peptidyl-tyrosine phosphorylation	4/178	
		peptidyl-tyrosine modification	4/180	
DYRK2	-0.62739	intrinsic apoptotic signaling pathway	5/147	DLST
		intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator	3/52	
		intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	3/72	
		regulation of signal transduction by p53 class mediator	4/162	
		peptidyl-tyrosine phosphorylation	4/178	
		peptidyl-tyrosine modification	4/180	
		apoptotic signaling pathway	5/267	
		signal transduction by p53 class mediator	3/124	
		intracellular signal transduction	15/1503	
EDNRB	-0.71698	vasodilation	2/20	
		ameboidal-type cell migration	4/150	
		second-messenger-mediated signaling	4/154	
		cellular response to organic substance	12/1204	
		cellular response to chemical stimulus	14/1258	
		regulation of epithelial cell proliferation	5/281	
		neural crest cell migration	2/52	
		intracellular signal transduction	15/1503	
		negative regulation of catalytic	9/786	

		activity		
EP300	-0.72736	intrinsic apoptotic signaling pathway	5/147	TCF12, DYRK1A
		intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator	3/52	
		B cell activation	4/134	
		intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	3/72	
		B cell differentiation	3/89	
		regulation of signal transduction by p53 class mediator	4/162	
		regulation of protein deacetylation	2/34	
		apoptotic signaling pathway	5/267	
		nucleotide-excision repair	3/109	
		signal transduction by p53 class mediator	3/124	
		intracellular signal transduction	15/1503	
		regulation of intracellular signal transduction	16/1670	
		interspecies interaction between organisms	9/754	
EYA4	-0.61427			
FBXL17	-0.62526			
FBXW7	-1.07131	positive regulation of protein ubiquitination	4/174	
		positive regulation of ubiquitin- protein transferase activity	3/101	
		positive regulation of protein modification by small protein conjugation or removal	4/189	
		regulation of epithelial cell proliferation	5/281	
		regulation of receptor activity	3/110	
		positive regulation of transferase activity	8/611	
		regulation of ubiquitin-protein transferase activity	3/116	
		interspecies interaction between organisms	9/754	
		regulation of transferase activity	10/899	
FLJ35258	-0.74927			
GOLGA7B	0.631449			
GPRC5A	-0.58783	regulation of receptor activity	3/110	
		regulation of transferase activity	10/899	
		negative regulation of catalytic activity	9/786	

GSTZ1	-0.6378	glutathione metabolic process	2/57	
HYOU1	-0.64216	cellular response to chemical stimulus		
		IRE1-mediated unfolded protein response	2/56	
		regulation of intracellular signal transduction	16/1670	
IKZF3	0.698166	B cell activation	4/134	
IL5RA	-0.70939	regulation of interleukin-5 production	2/19	
		peptidyl-tyrosine phosphorylation	4/178	
		cellular response to organic substance	12/1204	
		cellular response to chemical stimulus	14/1258	
		peptidyl-tyrosine modification	4/180	
		intracellular signal transduction	15/1503	
IQGAP3	-1.3114	positive regulation of mammary gland epithelial cell proliferation	2/8	
		regulation of mammary gland epithelial cell proliferation	2/18	
		mitotic cell cycle phase transition	5/235	
		cell cycle phase transition	5/241	
		cellular response to organic substance	12/1204	
		cellular response to chemical stimulus	14/1258	
		activation of protein kinase activity	5/279	
		regulation of epithelial cell proliferation	5/281	
		positive regulation of transferase activity	8/611	
		intracellular signal transduction	15/1503	
		regulation of transferase activity	10/899	
ITGB1	0.71272	B cell activation	4/134	VCAM1
		ameboidal-type cell migration	4/150	
		mitotic cell cycle phase transition	5/235	
		B cell differentiation	3/89	
		cell cycle phase transition	5/241	
		cellular response to organic substance	12/1204	
		cellular response to chemical stimulus	14/1258	
		regulation of intracellular signal transduction	16/1670	
		interspecies interaction between organisms	9/754	
LATS2	-1.10046	mitotic cell cycle phase transition	5/235	DYRK1A
		cell cycle phase transition	5/241	
		intracellular signal transduction	15/1503	
		regulation of transferase activity	10/899	
		regulation of Wnt signaling pathway	5/311	
		negative regulation of catalytic activity	9/786	

LBR	0.719605			
LGR6	0.749037	regulation of Wnt signaling pathway	5/311	
LOC100128533	0.666993			
LOC100133692	0.746968			
LOC100133800	0.823991			
LOC100134265	0.834433			
LOC392787	-0.77412			
LOC441155	-1.08176			
LOC642282	0.641721			
LOC644380	0.758292			
LOC650132	0.65071			
LOC652330	-1.06752			
LOC653375	0.892465			
LOC730525	-0.71319			
LOC730535	1.03143			
MAP2K3	0.628129	peptidyl-tyrosine phosphorylation	4/178	
		peptidyl-tyrosine modification	4/180	
		activation of protein kinase activity	5/279	
		positive regulation of transferase activity	8/611	
		regulation of transferase activity	10/899	
MED13L	-0.81383			
MSL1	-0.62608			
MX1	1.025123	interspecies interaction between organisms	9/754	
NDUFA5	0.707197			
PACS2	-0.63317	interspecies interaction between organisms	9/754	
PARP12	-0.59576			
PDCL	-0.67522			
PDE4D	-0.69323	regulation of interleukin-5 production	2/19	ARRB1
		second-messenger-mediated signaling	4/154	
		cellular response to organic substance	12/1204	
		cellular response to chemical stimulus	14/1258	
		regulation of receptor activity	3/110	
		intracellular signal transduction	15/1503	
PDK2	-0.69478	intrinsic apoptotic signaling pathway	5/147	
		intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator	3/52	
		cellular response to chemical stimulus	14/1258	
		apoptotic signaling pathway	5/267	
		signal transduction by p53 class mediator	3/124	
		intracellular signal transduction	15/1503	
PI4KA	0.730566	intracellular signal transduction	15/1503	

PLCG1	1.004873	second-messenger-mediated signaling	4/154	
		cellular response to organic substance	12/1204	
		cellular response to chemical stimulus	14/1258	
		activation of protein kinase activity	5/279	
		positive regulation of transferase activity	8/611	
		positive regulation of angiogenesis	3/121	
		intracellular signal transduction	15/1503	
		interspecies interaction between organisms	9/754	
		regulation of transferase activity	10/899	
		positive regulation of vasculature development	3/137	
PRKAR1B	0.716695	cellular response to organic substance	12/1204	
		cellular response to chemical stimulus	14/1258	
		activation of protein kinase activity	5/279	
		positive regulation of transferase activity	8/611	
		regulation of transferase activity	10/899	
		negative regulation of catalytic activity	9/786	
PRPS1L1	-0.86629			
PSMB9	0.600585	positive regulation of protein ubiquitination	4/174	
		positive regulation of ubiquitin-protein transferase activity	3/101	
		positive regulation of protein modification by small protein conjugation or removal	4/189	
		positive regulation of transferase activity	8/611	
		regulation of ubiquitin-protein transferase activity	3/116	
		intracellular signal transduction	15/1503	
		regulation of transferase activity	10/899	
		regulation of Wnt signaling pathway	5/311	
		negative regulation of catalytic activity	9/786	
PTX3	0.717212	interspecies interaction between organisms	9/754	
		negative regulation of catalytic activity	9/786	
RBBP8	0.725586	mitotic cell cycle phase transition	5/235	
		cell cycle phase transition	5/241	
		regulation of signal transduction by	4/162	

		p53 class mediator		
		meiotic cell cycle	2/37	
		nucleotide-excision repair	3/109	
RHOBTB2	0.591106	intracellular signal transduction	15/1503	
RRBP1	-0.87109			
RSPH10B	0.734634			
SAMD11	-0.79588			
SELT	-0.69346			
SEMA6A	-0.59182	ameboidal-type cell migration	4/150	
		neural crest cell migration	2/52	
SERPINB2	0.702386	negative regulation of catalytic activity	9/786	
SH3RF2	-0.58884	negative regulation of catalytic activity	9/786	
SILV	-0.58686			
SOD2	0.642592	intrinsic apoptotic signaling pathway	5/147	
		intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress	2/17	
		reactive oxygen species biosynthetic process	2/23	
		vasodilation	2/20	
		intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	3/72	
		cellular response to organic substance	12/1204	
		cellular response to chemical stimulus	14/1258	
		apoptotic signaling pathway	5/267	
		intracellular signal transduction	15/1503	
		glutathione metabolic process	2/57	
SPATS2	0.729228			
SPIN1	0.682038	meiotic cell cycle	2/37	
		regulation of Wnt signaling pathway	5/311	
SSBP3	-0.80361			
ST5	-0.7957			
SULT1A3	-0.59757	IRE1-mediated unfolded protein response	2/56	
SVEP1	-0.62171			
SYN1	-0.88448			
TAPBP	-0.60284			
TBL3	-0.66468			
TCEA1	0.651197	nucleotide-excision repair	3/109	
TCF12	0.864416			
TERC	0.658703			
TMEM191B	0.689251			
TNPO1	0.830355	interspecies interaction between organisms	9/754	
TRIM43	-0.75741			

VASH2	0.777018	regulation of epithelial cell proliferation	5/281	
		positive regulation of angiogenesis	3/121	
		positive regulation of vasculature development	3/137	
VCAM1	0.702257	B cell activation	4/134	ITGB1,PI4KA
		second-messenger-mediated signaling	4/154	
		B cell differentiation	3/89	
		cellular response to organic substance	12/1204	
		cellular response to chemical stimulus	14/1258	
		intracellular signal transduction	15/1503	
		interspecies interaction between organisms	9/754	
VPS41	0.840981			
WTAP	0.603651	regulation of alternative mRNA splicing, via spliceosome	2/35	
		gene expression	2/51	
ZBTB20	-0.6753			
ZBTB25	-0.58922	gene expression	2/51	
ZDHHC13	0.831414	regulation of intracellular signal transduction	16/1670	
ZNF234	-0.88582			
ZNF664	0.87315			
ZNF703	-0.65971	positive regulation of mammary gland epithelial cell proliferation	2/8	
		regulation of mammary gland epithelial cell proliferation	2/18	
		cellular response to organic substance	12/1204	
		cellular response to chemical stimulus	14/1258	
		regulation of epithelial cell proliferation	5/281	
		regulation of Wnt signaling pathway	5/311	

Πίνακας 4.3.1: Υπερεκφρασμένες γονιδιακές οντολογίες στη λίστα της PCB.

Symbol	logFC	Gene Ontologies	Enrichment	Interactor(s)
AKR1C4	0.749745	androgen metabolic process	2/27	
ASPHD1	0.630346			
BET1L	-0.61694			
C11orf84	-0.77316			
CACNA1C	0.613065	camera-type eye development	3/76	
CACNA1S	0.637654			
CARD16	0.598087			
CCBE1	-0.71096	regulation of endothelial cell migration	5/112	
		positive regulation of vascular endothelial growth factor production	3/26	
		regulation of vascular endothelial growth factor production	3/30	
		regulation of angiogenesis	6/210	
		regulation of vasculature development	6/232	
		regulation of epithelial cell migration	5/165	
		positive regulation of angiogenesis	4/121	
		positive regulation of endothelial cell migration	3/65	
		positive regulation of vasculature development	4/137	
		angiogenesis	5/261	
		positive regulation of epithelial cell migration	3/102	
CCDC71	-0.59838			
CCDC80	-0.86733			
CD55	0.608829	cytokine production	3/75	
		regulation of cell proliferation	16/1483	
CDC2L2	0.610671			
CDCP1	-0.64967			
CDKN1C	-0.63812	negative regulation of epithelial cell proliferation	4/114	
		camera-type eye development	3/76	
		regulation of cell proliferation	16/1483	
CEPT1	0.673788	phosphatidylethanolamine metabolic process	2/18	
		phosphatidylcholine metabolic process	3/63	
		phosphatidylcholine biosynthetic process	2/26	
CHKA	0.637634	phosphatidylethanolamine metabolic process	2/18	
		phosphatidylcholine metabolic process	3/63	
		phosphatidylcholine biosynthetic process	2/26	
CHTF8	-0.65877			

CYP1B1	1.114209	nitric oxide biosynthetic process	3/13	
		nitric oxide metabolic process	3/17	
		reactive nitrogen species metabolic process	3/20	
		reactive oxygen species biosynthetic process	3/23	
		positive regulation of vascular endothelial growth factor production	3/26	
		regulation of vascular endothelial growth factor production	3/30	
		retina vasculature development in camera-type eye	2/8	
		vasculature development	3/39	
		regulation of angiogenesis	6/210	
		long-chain fatty acid metabolic process	4/85	
		regulation of vasculature development	6/232	
		arachidonic acid metabolic process	3/49	
		positive regulation of angiogenesis	4/121	
		positive regulation of vasculature development	4/137	
		cellular response to reactive oxygen species	3/88	
		response to oxidative stress	6/323	
		icosanoid metabolic process	3/92	
		xenobiotic metabolic process	3/96	
		angiogenesis	5/261	
		regulation of cell proliferation	16/1483	
		unsaturated fatty acid metabolic process	3/106	
		response to reactive oxygen species	4/175	
		response to hydrogen peroxide	3/105	
DENND3	0.686749			
DIRAS3	-0.63832			
DSEL	-1.28304			
DST	-0.88634			
DYRK1A	1.063596			
DYRK2	-0.64984			
FAM129A	-0.61075			
FAM43A	0.624031			
FAM53B	0.640047			
FAM65C	0.682895			
FBXW7	-1.00272	vasculature development	3/39	
		negative regulation of epithelial cell proliferation	4/114	
		regulation of cell proliferation	16/1483	
FLJ10357	-0.79907			

FOXQ1	0.74664			
GAS2L3	-0.67631			
GOLPH4	-0.77204			
GPNMB	0.58667	regulation of cell proliferation	16/1483	
GPR68	0.763348			
HCG18	-0.63378			
HDAC11	-0.62789			
HMGA2	-0.60005	regulation of viral transcription	3/60	
		modulation of transcription in other organism involved in symbiotic interaction	2/24	
		regulation of viral genome replication	3/80	
		G2 DNA damage checkpoint	Feb-32	
		regulation of viral life cycle	4/170	
		regulation of transcription regulatory region DNA binding	2/37	
		regulation of cell proliferation	16/1483	
IFI44	0.654632			
KLF4	0.600737	regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis	3/19	
		regulation of blood vessel endothelial cell migration	4/50	
		regulation of endothelial cell migration	5/112	
		regulation of sprouting angiogenesis	3/28	
		negative regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis	2/11	
		regulation of angiogenesis	6/210	
		negative regulation of sprouting angiogenesis	2/12	
		regulation of vasculature development	6/232	
		regulation of epithelial cell migration	5/165	
		negative regulation of blood vessel endothelial cell migration	2/25	
		camera-type eye development	3/76	SHBG
		cellular response to reactive oxygen species	3/88	
		response to oxidative stress	6/323	
		response to fluid shear stress	2/33	
		regulation of transcription regulatory region DNA binding	2/37	
		regulation of cell proliferation	16/1483	
		response to reactive oxygen species	4/175	
		response to hydrogen peroxide	3/105	
KRT19	-0.61822			
LGR6	0.910954			
LOC10012788	-0.69648			

7				
LOC10012889 2	-0.77883			
LOC10013077 6	-0.7885			
LOC158572	-0.70854			
LOC401805	-1.08665			
LOC441155	-0.79922			
LOC441455	0.588698			
LOC643201	-0.61064			
LOC649841	-0.62869			
LOC727980	-0.59127			
LOC731605	-0.84039			
MAFG	0.602257	regulation of cell proliferation	16/1483	
MID2	0.723042	regulation of viral transcription	3/60	
		regulation of viral life cycle	4/170	
MN1	0.715157			
MX1	0.634067	regulation of viral genome replication	3/80	
		regulation of viral life cycle	4/170	
N4BP2L2	0.851796	regulation of stem cell differentiation	2/35	
		regulation of cell proliferation	16/1483	
NAV2	-0.7122			
NCKAP5	0.821061			
NEFM	-0.70308			
NFAT5	-0.74831	cytokine production	3/75	
NOVA1	0.594922			
NPTX1	0.752744			
NQO1	0.759424	nitric oxide biosynthetic process	3/13	
		nitric oxide metabolic process	3/17	
		reactive nitrogen species metabolic process	3/20	
		reactive oxygen species biosynthetic process	3/23	
		response to oxidative stress	6/323	
		xenobiotic metabolic process	3/96	
NSUN5C	0.868412			
NUCKS1	-1.07149	regulation of viral transcription	3/60	
		modulation of transcription in other organism involved in symbiotic interaction	2/24	
		regulation of viral genome replication	3/80	
		regulation of viral life cycle	4/170	
PDCD10	0.803168	regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis	3/19	
		regulation of blood vessel endothelial cell migration	4/50	

		regulation of endothelial cell migration	5/112	όχι GO/KEGG:Ubiquitin system
		regulation of sprouting angiogenesis	3/26	όχι GO/KEGG:Ubiquitin system
		negative regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis	2/11	όχι GO/KEGG:Ubiquitin system
		regulation of angiogenesis	6/210	
		negative regulation of sprouting angiogenesis	2/12	
		regulation of vasculature development	6/232	
		regulation of epithelial cell migration	5/165	
		negative regulation of epithelial cell proliferation	4/114	
		negative regulation of blood vessel endothelial cell migration	2/25	
		response to oxidative stress	6/323	
		angiogenesis	5/261	
		regulation of cell proliferation	16/1483	
		response to reactive oxygen species	4/175	
		response to hydrogen peroxide	3/105	
PDGFRA	0.58637	retina vasculature development in camera-type eye	2/8	PLCG1
		vasculature development	3/39	
		cellular response to reactive oxygen species	3/88	
		response to oxidative stress	6/323	
		regulation of stem cell differentiation	2/35	
		angiogenesis	5/261	
		regulation of cell proliferation	16/1483	
		response to reactive oxygen species	4/175	
PIR	0.819764			
PLA2G4A	0.596811	long-chain fatty acid metabolic process	4/85	SHBG
		arachidonic acid metabolic process	3/49	
		phosphatidylcholine metabolic process	3/63	
		phospholipid catabolic process	2/28	
		icosanoid metabolic process	3/92	
		regulation of cell proliferation	16/1483	
		unsaturated fatty acid metabolic process	3/106	
PLCG1	0.748571	regulation of blood vessel endothelial	4/50	PDGFRA

		cell migration		
		regulation of endothelial cell migration	5/112	
		regulation of angiogenesis	6/210	
		regulation of vasculature development	6/232	
		regulation of epithelial cell migration	5/165	
		positive regulation of angiogenesis	4/121	
		positive regulation of endothelial cell migration	3/65	
		positive regulation of vasculature development	4/137	
		phospholipid catabolic process	2/28	
		positive regulation of epithelial cell migration	3/102	
PLEKHJ1	0.650033			
PTGS2	0.720616	regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis	3/19	
		regulation of blood vessel endothelial cell migration	4/50	
		positive regulation of vascular endothelial growth factor production	3/26	
		regulation of sprouting angiogenesis	3/26	
		regulation of vascular endothelial growth factor production	3/30	
		regulation of angiogenesis	6/210	
		long-chain fatty acid metabolic process	4/85	
		regulation of vasculature development	6/232	
		arachidonic acid metabolic process	3/49	
		regulation of epithelial cell migration	5/165	
		positive regulation of angiogenesis	4/121	
		positive regulation of endothelial cell migration	3/65	
		positive regulation of vasculature development	4/137	
		cytokine production	3/75	
		response to oxidative stress	6/323	
		response to fluid shear stress	2/33	
		icosanoid metabolic process	3/92	
		angiogenesis	5/261	
		positive regulation of epithelial cell migration	3/102	
		regulation of cell proliferation	16/1438	
		unsaturated fatty acid metabolic process	3/106	
QKI	-0.7335	long-chain fatty acid metabolic process	4/85	
RGS4	-0.61865			
RRBP1	-0.86801			

RUNX3	0.677437	negative regulation of epithelial cell proliferation	4/114	
		regulation of cell proliferation	16/1483	
SERPINB2	0.917664			
SH3RF2	-0.69987			
SHBG	0.773848			
SHCBP1	-0.7913	regulation of cell proliferation	16/1483	
SIRT7	0.721963			
SLC16A14	0.736087			
SLC17A9	0.639996			
SLC19A1	0.612184			
SLC7A2	0.664172	nitric oxide biosynthetic process	3/13	
		nitric oxide metabolic process	3/17	
		reactive nitrogen species metabolic process	3/20	
		reactive oxygen species biosynthetic process	3/23	
SOCS3	1.132516			
SPATA7	0.650533			
SPIN1	-0.8975			
SSBP3	-0.833	regulation of cell proliferation	16/1483	
SULT1A2	0.631359	xenobiotic metabolic process	3/96	
SYN2	-0.5899			
TADA3	0.648433			
TAOK1	-0.88838	G2 DNA damage checkpoint	2/32	
TBN	-0.72289			
TIPARP	0.676204	androgen metabolic process	2/27	
TLCD1	0.654151			
TOX2	-0.60404			
UBE2CBP	0.585209			
USP48	-0.59479			
ZBTB43	-0.80848			
ZCCHC5	-0.64025			
ZNF282	0.660829			
ZNF557	-0.78683			
ZNF644	-0.6302			

Πίνακας 4.3.2: Υπερεκφρασμένες γονιδιακές οντολογίες στη λίστα της ολεαίνης.

Symbol	logFC	Gene Ontologies	Enrichment	Interactor(s)
ACCS	-0.864602701			
ADHFE1	-0.675634622			
ADSSL1	0.612198179	alpha-amino acid metabolic process	3/181	
AMT	-0.847026089	cellular amino acid catabolic process	2/78	
		carboxylic acid catabolic process	3/175	
		alpha-amino acid metabolic process	3/181	
ARID4B	0.598310421	single organism reproductive process	11/1037	
		reproductive process	11/1274	
ARRDC4	0.797926949	positive regulation of cellular protein metabolic process	11/1373	
BAT2	-0.780285403			
C12orf51	-0.611777126			
C6orf57	0.62671864			
CCK	0.80913818	cell projection organization	8/700	
		regulation of cellular component biogenesis	8/746	
		positive regulation of cellular protein metabolic process	11/1373	
CD44	-0.753400363	negative regulation of DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	2/13	ITGB1
		negative regulation of response to DNA damage stimulus	3/52	
		negative regulation of signal transduction by p53 class mediator	2/27	
		regulation of DNA damage response , signal transduction by p53 class mediator	2/28	
		regulation of response to DNA damage stimulus	3/147	
		regulation of signal transduction by p53 class mediator	3/162	
		positive regulation of cellular protein metabolic process	11/1373	
CDKN1C	-0.787412559	single organism reproductive process	11/1037	
		developmental growth	5/284	
		negative regulation of protein serine/threonine kinase activity	3/118	

		growth	5/364	
		reproductive process	11/1274	
		multicellular organism growth	2/79	
CEPT1	1.173580719	phosphatidylcholine biosynthetic process	2/26	
		phosphatidylcholine metabolic process	2/63	
CHRM2	-0.678875925			
CRAT	-0.685076695	carboxylic acid catabolic process	3/175	
DNAJB14	0.876765679			
DNAJC12	0.627674185			
DYRK1A	1.14954318	negative regulation of DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	2/13	LATS2
		negative regulation of response to DNA damage stimulus	3/52	
		peptidyl-serine phosphorylation	4/138	
		peptidyl-serine modification	4/151	
		negative regulation of signal transduction by p53 class mediator	2/27	
		regulation of DNA damage response , signal transduction by p53 class mediator	2/28	
		regulation of response to DNA damage stimulus	3/147	
		regulation of alternative mRNA splicing, via spliceosome	2/35	
		regulation of signal transduction by p53 class mediator	3/162	
		positive regulation of cellular protein metabolic process	11/1373	
EIF4EBP3	-0.764099945			
FAM14B	0.683468007			
FANCL	0.621314083	single organism reproductive process	11/1037	
		reproductive process	11/1274	
FLJ35258	-0.611737921			
GALK2	-0.661321263			
GCA	0.642742447	membrane fusion	3/151	
GIT1	-0.837546316			
GLI2	-0.762113055	single organism reproductive process	11/1037	
		pituitary gland development	2/31	
		developmental growth	5/284	

		in utero embryonic development	4/206	
		cell projection organization	8/700	
		chordate embryonic development	4/209	
		embryo development ending in birth or egg hatching	4/215	
		growth	5/364	
		chondrocyte differentiation	2/46	
		embryo development	4/251	
		reproductive process	11/1274	
GOLGA6B	-0.634464946			
GPD2	0.731422829	developmental growth	5/284	
		growth	5/364	
		multicellular organism growth	2/79	
GSTZ1	-0.591205861	cellular amino acid catabolic process	2/78	
		carboxylic acid catabolic process	3/175	
		alpha-amino acid metabolic process	3/181	
HAS2AS	0.592510325			
HMGA2	-0.809427777	negative regulation of response to DNA damage stimulus	3/52	
		peptidyl-serine phosphorylation	4/138	
		peptidyl-serine modification	4/151	
		single organism reproductive process	11/1037	
		pituitary gland development	2/31	
		G2 DNA damage checkpoint	2/32	
		positive regulation of stem cell proliferation	2/38	
		chondrocyte differentiation	2/46	
		regulation of response to DNA damage stimulus	3/147	
		regulation of stem cell proliferation	2/60	
		reproductive process	11/1274	
IFI44	0.749086951			
ITGB1	0.919107526	single organism reproductive process	11/1037	CD44
		developmental growth	5/284	
		in utero embryonic development	4/206	
		cell projection organization	8/700	
		chordate embryonic development	4/209	
		embryo development ending in birth or egg hatching	4/215	

		growth	5/364	
		embryo development	4/251	
		reproductive process	11/1274	
		actomyosin structure organization	2/75	
		neuron projection development	3/167	
KCTD17	-0.612161214	regulation of cilium assembly	2/34	
		regulation of cellular component biogenesis	8/746	
KLHL26	0.717886486			
LATS2	-0.752555872	peptidyl-serine phosphorylation	4/138	
		peptidyl-serine modification	4/151	
		negative regulation of protein serine/threonine kinase activity	3/118	
LCAT	-0.627715799	phosphatidylcholine biosynthetic process	2/26	
		regulation of cellular component biogenesis	8/746	
		phosphatidylcholine metabolic process	2/63	
LOC100131510	-0.676957136			
LOC100132247	-0.599555878			
LOC100132308	-0.743953893			
LOC100134265	0.706319632			
LOC196752	-0.820997464			
LOC202051	0.635719197			
LOC23117	-0.626057934			
LOC284297	-0.62684634			
LOC401561	-0.714526601			
LOC441155	-1.311603281			
LOC642771	-0.594619103			
LOC644380	0.625259504			
LOC645722	0.631866748			
LOC650128	-0.585588963			
LOC729660	-0.611820682			
LOC730535	0.604969342			
LRCH4	-0.601219677			
MAP4	-0.666494083	regulation of cilium assembly	2/34	
		cell projection organization	8/700	
		regulation of cellular component biogenesis	8/746	
		neuron projection development	3/167	
MED13L	-0.868914676			
MEG3	-0.67410621			
MIR221	-0.78555271			
N4BP2L2	0.681166937	positive regulation of stem cell	2/38	

		proliferation		
		regulation of stem cell proliferation	2/60	
NDUFA5	0.760870515			
NFS1	0.624918908			
NPY5R	-0.612423431	single organism reproductive process	11/1037	
		reproductive process	11/1274	
		positive regulation of cellular protein metabolic process	11/1373	
NR2C2	-0.875604556	single organism reproductive process	11/1037	
		meiotic cell cycle	2/37	
		reproductive process	11/1274	
NRXN3	-0.623379254	regulation of cellular component biogenesis	8/746	
		neurotransmitter secretion	2/56	
NUDCD2	0.613396726			
PABPC1L	-0.718192886	single organism reproductive process	11/1037	
		reproductive process	11/1274	
PDCD10	0.850845611	regulation of blood vessel endothelial cell migration	2/50	
		positive regulation of cellular protein metabolic process	11/1373	
PDCL	-0.632039748			
PLCG1	0.837079846	in utero embryonic development	4/206	GIT1
		chordate embryonic development	4/209	
		embryo development ending in birth or egg hatching	4/215	
		regulation of blood vessel endothelial cell migration	2/50	
		embryo development	4/251	
		positive regulation of cellular protein metabolic process	11/1373	
PRKAR1B	0.609114692	negative regulation of protein serine/threonine kinase activity	3/118	
		positive regulation of cellular protein metabolic process	11/1373	
PTPLAD1	0.590436268			
RBBP8	0.680749425	single organism reproductive process	11/1037	
		G2 DNA damage checkpoint	2/32	
		meiotic cell cycle	2/37	
		reproductive process	11/1274	

		regulation of signal transduction by p53 class mediator	3/162	
RBM33	-0.598906573			
RIPK5	-0.586868948			
RNF217	-0.605869861	positive regulation of cellular protein metabolic process	11/1373	
RRBP1	-0.695223783			
RRP1	-0.62438871			
SCN2A	0.602516558			
SHISA4	0.593006525			
SLC41A2	0.6094776			
SPATA13	-0.591449478	cell projection organization	8/700	
STX1A	0.895859698	regulation of cellular component biogenesis	8/746	
		neurotransmitter secretion	2/56	
		membrane fusion	3/151	
TCF12	0.80583598			
TM4SF4	0.590784116	developmental growth	5/284	
		Growth	5/364	
TNFRSF25	-0.827972538	positive regulation of cellular protein metabolic process	11/1373	
TOX2	-0.896435269			
TPM1	-0.634700109	in utero embryonic development	4/206	NUDCD2
		cell projection organization	8/700	
		chordate embryonic development	4/209	
		embryo development ending in birth or egg hatching	4/215	
		regulation of cellular component biogenesis	8/746	
		embryo development	4/251	
		actomyosin structure organization	2/75	
UBXN8	0.601592847	single organism reproductive process	11/1037	
		reproductive process	11/1274	
UHMK1	0.643265316	peptidyl-serine phosphorylation	4/138	
		peptidyl-serine modification	4/151	
		regulation of alternative mRNA splicing, via spliceosome	2/35	
		cell projection organization	8/700	
		neuron projection development	3/167	
		positive regulation of cellular protein metabolic process	11/1373	
VPS41	0.657970286	regulation of cellular component biogenesis	8/746	

WDR63	0.6425562			
ZBTB5	-0.611591053			
ZDHHC13	0.644246192			
ZNF234	-0.701232503			
ZNF384	-0.643973073			
ZNF804A	0.613027285			

Πίνακας 4.3.3: Υπερεκφρασμένοι οντολογικοί όροι στη λίστα της MK151

Symbol	logFC	Gene Ontologies	Enrichment	Interactor(s)
AGFG2	0.797892297			
ARL13B	0.601040425	cilium organization	3/190	
		cilium assembly	3/180	
		intracellular signal transduction	11/1503	
ARL4C	0.659204278	intracellular signal transduction	11/1503	
ATF6B	0.600432669			
CCDC124	-0.78358555			
CD68	0.633388667			
CDKL3	0.592684453			
CHST2	-0.643536562	keratan sulfate biosynthetic process	2/27	
		keratan sulfate metabolic process	2/32	
		sulfur compound biosynthetic process	3/182	
CHTF8	-0.603933527			
COL8A1	-0.601366068			
DDX20	0.645508893			
DGCR6	-0.72639983			
DIAPH3	0.697709519			
DUS1L	0.590361489			
E2F7	0.630228455	trophoblast giant cell differentiation	2/12	
		negative regulation of mitotic cell cycle phase transition	3/130	
		negative regulation of cell cycle phase transition	3/142	
		intracellular signal transduction	11/1503	
ERGIC1	0.598465383			
FAM156A	-0.597826875			
FKBPL	-0.672322155	peptidyl-amino acid modification	7/839	
FLJ35776	-0.679989163			
FZD8	-0.609242391	lymphocyte aggregation	3/199	
GRIP2	0.661314739			

GRK6	0.632585818			
GSTM4	-0.592115904	sulfur compound biosynthetic process	3/182	
HOPX	0.828772639	heart development	4/238	
		positive regulation of striated muscle cell differentiation	2/56	
		positive regulation of developmental growth	3/157	
		regulation of growth	6/623	
HUS1B	-0.591766695	negative regulation of mitotic cell cycle phase transition	3/130	
		negative regulation of cell cycle phase transition	3/142	
		double-strand break repair	3/162	
IFT88	0.629383818	cilium organization	3/190	
		cilium assembly	3/180	
IKBKB	0.86495433	response to cytokine	5/350	PRKDC
		regulation of cytokine-mediated signaling pathway	3/137	
		peptidyl-serine phosphorylation	3/138	
		regulation of response to cytokine stimulus	3/143	
		peptidyl-serine modification	3/151	
		intracellular signal transduction	11/1503	
		regulation of innate immune response	4/351	
		peptidyl-amino acid modification	7/839	
KLHL33	-0.728560361			
LOC100131426	-0.601464554			
LOC392787	0.624627452			
LOC649169	-0.59485957			
LOC653635	-0.768997031			
MX1	0.656318594	response to cytokine	5/350	
NCKAP5	-0.685601801			
NEDD9	0.755675788	regulation of growth	6/623	
NMI	0.601469738	intracellular signal transduction	11/1503	
		regulation of innate immune response	4/351	
NRG1	0.604333917	activation of transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	2/11	
		heart development	4/238	
		gland development	4/248	
		positive regulation of striated muscle cell differentiation	2/56	
		positive regulation of	3/157	

		developmental growth		
		intracellular signal transduction	11/1503	
		receptor metabolic process	2/82	
		regulation of growth	6/623	
		peptidyl-amino acid modification	7/839	
NUCKS1	0.715947599	double-strand break repair	3/162	
		cellular glucose homeostasis	2/65	
NUF2	0.612053133			
OR9A4	-0.646629627			
OTP	-0.724074591	gland development	4/248	
PDK3	0.613846467	regulation of acyl-CoA biosynthetic process	2/13	
		regulation of sulfur metabolic process	2/20	
		peptidyl-serine phosphorylation	3/138	
		peptidyl-serine modification	3/151	
		cellular glucose homeostasis	2/65	
		peptidyl-amino acid modification	7/839	
PHF2	-0.793751401	gland development	4/248	
PHLDB3	0.717891876			
PITPNC1	-0.597785093			
PLCH2	-0.610371462	intracellular signal transduction	11/1503	
PRKDC	-0.735575619	heart development	4/238	IKBKB
		gland development	4/248	
		negative regulation of mitotic cell cycle phase transition	3/130	
		peptidyl-serine phosphorylation	3/138	
		negative regulation of cell cycle phase transition	3/142	
		double-strand break repair	3/162	
		peptidyl-serine modification	3/151	SOCS3
		positive regulation of developmental growth	3/157	
		intracellular signal transduction	11/1503	
		regulation of growth	6/623	
		lymphocyte aggregation	3/199	
		peptidyl-amino acid modification	7/839	
PRLR	0.84765267	activation of transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	2/11	SOCS3
		intracellular signal transduction	11/1503	
		lymphocyte aggregation	3/199	
		peptidyl-amino acid modification	7/839	
PRPF40A	-0.630769085			
PSKH1	-0.602439063	heart development	4/238	
RASGRP2	0.827220287	intracellular signal transduction	11/1503	

		regulation of growth	6/623	
SERHL	0.62365769			
SLC22A1	0.701977857	dopamine transport	2/10	
		catecholamine transport	2/14	
SNCA	-0.727397632	dopamine transport	2/10	GRK6
		regulation of acyl-CoA biosynthetic process	2/13	
		catecholamine transport	2/14	
		regulation of sulfur metabolic process	2/20	
		response to cytokine	5/350	
		receptor metabolic process	2/82	
SNHG3-RCC1	0.738592812			
SNORD96A	-0.593832196			
SNX12	0.660308141			
SOCS3	-0.728192454	trophoblast giant cell differentiation	2/12	PRLR
		regulation of cytokine-mediated signaling pathway	3/137	
		regulation of response to cytokine stimulus	3/143	
		regulation of growth	6/623	
		regulation of innate immune response	4/351	
ST3GAL6	0.762096805	keratan sulfate biosynthetic process	2/27	
		response to cytokine	5/350	
		keratan sulfate metabolic process	2/32	
		sulfur compound biosynthetic process	3/182	
		peptidyl-amino acid modification	7/839	
TBC1D1	0.592719209			
TLE4	0.70360944			
UAP1L1	-0.586937348			
UBE2K	1.092586901	response to cytokine	5/350	
		intracellular signal transduction	11/1503	
		regulation of cytokine-mediated signaling pathway	3/137	
		regulation of response to cytokine stimulus	3/143	
		regulation of innate immune response	4/351	
UNC119B	0.720562928	cilium organization	3/190	
		cilium assembly	3/180	
WDR89	-0.91347743			

ZC3HAV1L	0.72292132		
ZNF160	0.601951637		
ZNF93	0.711011597		

Πίνακας 4.3.4: Υπερεκφρασμένοι οντολογικοί όροι στη λίστα της MK154.

Οι ακόλουθοι πίνακες, 4.3.5 έως και 4.3.8, παρουσιάζουν συνοπτικά τους οντολογικούς όρους που αναγνωρίστηκαν μέσω της Gene Ontology και συνδέονται με το πρωτεάσωμα και τον μηχανισμό της γήρανσης. Στη δεύτερη στήλη των πινάκων αναγράφονται τα γονίδια που προέκυψαν από την ανάλυσή μας και συμμετέχουν σε αυτούς τους οντολογικούς όρους.

Intrinsic apoptotic signaling pathway	SOD2, EP300, DYRK2, CYP1B1, PDK2
Mitotic cell cycle phase transition	ITGB1, LATS2, PBBP8, DBF4, IQGAP3
Meiotic cell cycle	RBBP8, SPIN1
Positive regulation of protein ubiquitination	DCUN1D1, FBXW7, PSMB9, ARRB1
Positive regulation of ubiquitin-protein transferase activity	DCUN1D1, PSMB9, FBXW7
Positive regulation of protein modification by small protein conjugation or removal	ARRB1, DCUN1D1, FBXW7, PSMB9
Positive regulation of transferase activity	ARRB1, DCUN1D1, FBXW7, IQGAP3, MAP2K3, PLCG1, PRKAR1B, PSMB9
Regulation of ubiquitin-protein transferase activity	DCUN1D1, FBXW7, PSMB9

Πίνακας 4.3.5: Οντολογικοί όροι προκύπτοντες από τη μελέτη της PCB.

Regulation of cell proliferation	CD55, CYP1B1, FBXW7, GPNMB, HMGA2, KLF4, MAFG, N4BP2L2, PDCD10, PDGFRA, PLA2G4A, PTGS2, RUNX3, SSBP3
----------------------------------	--

Πίνακας 4.3.6: Οντολογικοί όροι προκύπτοντες από τη μελέτη της Oleacin.

Growth	GLI2, GPD2, ITGB1, TM4SF4
Multicellular Organism growth	CDKN1C, GPD2,
Positive regulation of stem cell proliferation	HMGA2, N4BP2L2
Regulation of DNA damage response	CD44, DYRK1A

Πίνακας 4.3.7: Οντολογικοί όροι προκύπτοντες από τη μελέτη της MK151

Regulation of growth	HOPX, NEDD9, NRG1, PRKDC, PASGRP2, SOCS3
----------------------	--

Πίνακας 4.3.8: Οντολογικοί όροι προκύπτοντες από τη μελέτη της MK154.

4.4 Γονίδια σχετιζόμενα με την ουμπικιτίνη

Οι τέσσερις εξεταζόμενες ουσίες έχουν επιλεγεί ως ενεργοποιητές του πρωτεασώματος. Η ποιοτική αξιολόγηση της δράσης τους θα γίνει μέσα από την αναγνώριση όχι μόνο των γονιδίων των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται παρουσία των εξεταζόμενων ουσιών, αλλά και μέσω των οντολογικών βιολογικών όρων που φαίνεται να υπερεκπροσωπούνται στις λίστες διαφορικής έκφρασης.

Στο πλαίσιο του πρώτου σταδίου της ποιοτικής αξιολόγησης, ακολουθεί ο Πίνακας 4.4.1, στον οποίο περιέχονται τα γονίδια τα οποία εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορική έκφραση και τα οποία έχουν καταγεγραμμένη σύνδεση με τη διαδικασία της ουμπικιτιλίωσης, όπως αυτή καταγράφεται στη δομή της Gene Ontology.

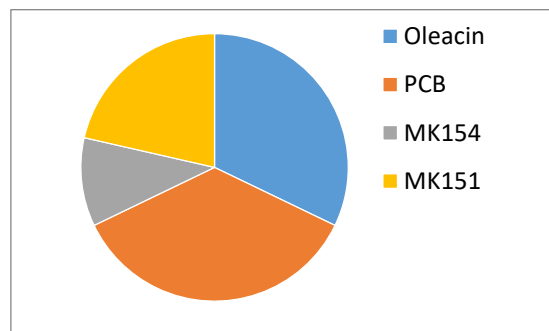
PCB	Oleacin	MK151	MK154
ARRB1	DYRK2	C12orf51	KLHL33
C12orf51	FBXW7	FANCL	SOCS3
DCUN1D1	MID2	KLHL26	UBE2K
DYRK2	PIR	NDUFA5	
FBXL17	SH3RF2	RNF217	
FBXW7	SOCS3	ZBTB5	
PSMB9	UBE2CBP		
RHOBTB2	USP48		
SH3RF2	ZBTB43		
ZBTB25			

Πίνακας 4.4.1: Γονίδια που σχετίζονται με την ουμπικιτίνη ανά εξεταζόμενη ουσία.

1	ARRB1
2	C12orf51
3	DCUN1D1
4	DYRK2
5	FANCL
6	FBXL17
7	FBXW7
8	KLHL26
9	KLHL33
10	MID2
11	NDUFA5
12	PIR
13	PSMB9
14	RHOBTB2
15	RNF217
16	SH3RF2
17	SOCS3

18	UBE2CBP
19	UBE2K
20	USP48
21	ZBTB5
22	ZBTB25
23	ZBTB43

Πίνακας 4.4.2: Σύνολο γονιδίων που σχετίζονται με την ουμπικιτίνη και προέκυψαν στο σύνολο της έρευνας των τεσσάρων ουσιών (PCB, Ολεασίνη, MK151 και MK154).



Εικόνα 10: Οπτική αναπαράσταση του αριθμού γονιδίων σχετιζόμενων με την ουμπικιτίνη ανά εξεταζόμενη ουσία.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πειραματικά αποτελέσματα των ομάδων της Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης και της Φαρμακευτικής Χημείας και της Ενζυμικής και Συνθετικής Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών έχουν δείξει πως οι τέσσερις ουσίες που μελετήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της εργασίας α) οδηγούν σε αύξηση των πρωτεασωματικών ενεργοτήτων (πιο συγκεκριμένα, η MK151 φαίνεται πως δρα στη δομή του πρωτεασώματος αλλάζοντας την ενεργότητά του, ενώ οι υπόλοιπες τρεις μάλλον επηρεάζουν τη μεταγραφή των υπομονάδων του, οδηγώντας σε αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα πρωτεασώματος, άρα σε αυξημένη ενεργότητα), β) προκαλούν επέκταση του προσδόκιμου ζωής του *Caenorhabditis elegans* και του κυτταρικού προσδόκιμου ζωής των ανθρώπινων ινοβλαστών (MK151 και PCB) και γ) εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση (στο σύνολό τους). Τα παραπάνω αποτελούν αδημοσίευτα αποτελέσματα των ομάδων στο πλαίσιο του έργου ΚΡΗΠΙΣ-ΣΘΕΝΟΣ και μας κατήθυσαν ώστε να επικεντρωθούμε σε γονιδιακές οντολογίες που σχετίζονται με το UPS, τη γήρανση και το οξειδωτικό στρες.

Μελετώντας τη λίστα με τις γονιδιακές οντολογίες παρουσία της PCB, παρατηρούμε ότι υπάρχουν οντολογίες που συνδέονται με το πρωτεάσωμα και ειδικότερα με το UPS, όπως οι: α) positive regulation of protein ubiquitination με γονίδια *ARRB1*, *DCUND1*, *FBXW7* και *PSMB9*, β) positive regulation of protein modification by small protein conjugation or removal (γονίδια *ARRB1*, *DCUN1D1*, *FBXW7*, *PSMB9*) και γ) positive regulation of transferase activity (γονίδια *ARRB1*, *DCUN1D1*, *FBXW7*, *IQGAP3*, *MAP2K3*, *PLCG1*, *PRKAR1B*, *PSMB9*). Στην πρώτη περίπτωση, της θετικής ρύθμισης της πρωτεϊνικής ουμπικιτιλίωσης, φαίνεται πως υπάρχει άμεση επίδραση στο UPS, ενώ η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *PSMB9* –υπομονάδα ενός υποτύπου του πρωτεασώματος, του ανοσοπρωτεασώματος (immunoproteasome)– μπορεί να θεωρηθεί ως θετικό control του πειράματος. Η δεύτερη οντολογία ενδιαφέροντος αποτελεί μια διαδικασία πρωτεϊνικής τροποποίησης κατά την οποία μία ή περισσότερες ομάδες μιας μικρής πρωτεΐνης, όπως η ουμπικιτίνη, προσδένεται ομοιοπολικά σε μια πρωτεΐνη-στόχο ή απομακρύνεται από αυτή. Προκύπτει έτσι μία ακόμη ένδειξη της επίδρασης της PCB στο μηχανισμό του πρωτεασώματος. Πέραν των οντολογικών όρων που παρουσιάζουν κάποια σχέση με το UPS, βρισκόμαστε στην PCB και όρους που παραπέμπουν στη διαδικασία της γήρανσης, κατά την οποία είναι γνωστό πως έχουμε οξειδωτικό στρες. Έτσι, ο όρος intrinsic apoptotic signalling pathway in response to oxidative stress (ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι σηματοδότησης ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες με γονίδια *CYP1B1*, *DYRK2*, *EP300*, *SOD2*) υποδεικνύει την πιθανότητα αντιοξειδωτικής δράσης της ουσίας μέσω μεταγραφικής ρύθμισης αντιοξειδωτικών γονιδίων. Επίσης, παρατηρείται μια ομάδα οντολογικών όρων που σχετίζονται με τη μείωση και τη μίτωση (mitotic cell cycle phase transition και meiotic cell cycle) που θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα σημάδι συσχέτισης της ουσίας με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και, κατ' επέκταση, με τη γήρανση.

Από μια αντίστοιχη παρατήρηση στις γονιδιακές οντολογίες παρουσία της ολεασίνης δεν προκύπτουν γονιδιακές οντολογίες που σχετίζονται γενικά με το πρωτεάσωμα και

ειδικότερα με το UPS, ωστόσο μπορούμε να απομονώσουμε δύο χαρακτηριστικές, για τους στόχους αυτής της εργασίας, οντολογίες οι οποίες είναι οι: α) regulation of cell proliferation και β) response to oxidative stress. Η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού θα μπορούσε να συσχετιστεί με την αντιγηραντική δράση της ολεασίνης που αποκάλυψαν τα εργαστηριακά μας πειράματα και η απόκριση στο οξειδωτικό στρες την πιθανή της συμβολή στην αντιοξειδωση του οργανισμού στην καλύτερη ανταπόκριση στο στρες, το οποίο αποτελεί αναπόφευκτο κομμάτι της γήρανσης. Μετρούμε δεκαέξι γονίδια (*CD55, CYP1B1, FBXW7, GPNMB, HMGA2, KLF4, MAFG, N4BP2L2, NQ01, PDCD10, PDGFRA, PLA2G4A, PTGS2, RUNX3, SHCBP1, SSBP3*) στα οποία υπερεκπροσωπούνται οι ανώθεν οντολογίες, δεκατρία (*CD55, CYP1B1, GPNMB, HMGA2, KLF4, MAFG, N4BP2L2, NQ01, PDCD10, PDGFRA, PLA2G4A, PTGS2, RUNX3*) από τα οποία παρουσιάζουν αύξηση της έκφρασής τους. Σε τρία (*KLF4, PDCD10, PTGS2*) από αυτά υπερεκπροσωπούνται και οι δύο οντολογίες.

Σχετικά με τις γονιδιακές οντολογίες παρουσία της MK151, όπως παρατηρείται και στην ολεασίνη, απουσιάζουν εκείνες που έχουν άμεση συσχέτιση με το πρωτεάσωμα και τον μηχανισμό του. Αυτό είναι κάτι αναμενόμενο για τη συγκεκριμένη ουσία καθώς τα πειραματικά μας αποτελέσματα συνηγορούν για ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε δομικό επίπεδο και όχι σε μεταγραφικό. Ωστόσο, βλέπουμε οντολογικούς όρους που υποδηλώνουν μια ενδεχόμενη επίδραση της MK151 στη γήρανση. Ένα ακόμη κοινό με την ολεασίνη είναι η παρουσία οντολογιών που έχουν να κάνουν με την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Έτσι, οι α) regulation of DNA damage response, β) multicellular organism growth και γ) positive regulation of stem cell proliferation συναντώνται με μεγαλύτερη συχνότητα και είναι δυνατόν να θεωρήσουμε ότι υποδηλώνουν μια πιθανή αντιγηραντική δράση της ουσίας, αφού μηχανισμοί κυτταρικού πολλαπλασιασμού, πολυκυτταρικής ανάπτυξης και αντιμετώπισης της βλάβης του DNA σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία της γήρανσης και της μακροβιότητας.

Αναφορικά με τις γονιδιακές οντολογίες παρουσία της MK154, ισχύει ό,τι έχουμε ήδη σχολιάσει και παρατηρήσει για την ολεασίνη και την MK151, δηλαδή απουσιάζουν αυτές που σχετίζονται με το πρωτεάσωμα και το UPS, αλλά απαντάται ξανά ο οντολογικός όρος της ρύθμισης της ανάπτυξης (regulation of growth), που θα μπορούσε να σημαίνει την επίδραση της ουσίας στη διαδικασία της γήρανσης και, πιο συγκεκριμένα, στην επιβράδυνσή της. Συνολικά εντοπίζουμε έξι γονίδια (*HOPX, NEDD9, NRG1, PRKDC, RASGRP2, SOCS3*) που συμμετέχουν στη συγκεκριμένη οντολογία και τέσσερα (*HOPX, NEDD9, NRG1, RASGRP2*) από αυτά παρουσιάζουν αύξηση της έκφρασής τους.

Συνοψίζοντας τα ανωτέρω, η PCB είναι η μοναδική από τις τέσσερις ουσίες της οποίας η παρουσία φαίνεται πως επηρεάζει το UPS, κρίνοντας από τις υπερεκπροσωπημένες γονιδιακές οντολογίες. Βέβαια, από τον πίνακα 4.4.1, βλέπουμε ότι υπάρχουν σε όλες τις ουσίες σχετιζόμενα με την ομπικιτίνη γονίδια με στατιστικά σημαντική διαφορική έκφραση, αλλά στις λίστες των γονιδιακών οντολογιών της κάθε ουσίας σε αυτά τα γονίδια δε βρίσκουμε υπερεκπροσωπημένους βιολογικούς οντολογικούς όρους που να έχουν σχέση με την ομπικιτίνη, το πρωτεάσωμα και το UPS. Τέτοια γονίδια είναι τα ακόλουθα: *C12orf51, DYRK2, FBXL17, RHOBTB2, SH3RF2, ZBTB25,*

MID2, PIR, SOCS3, UBE2CBP, USP48, ZBTB43, FANCL, KLHL26, NDUFA5, RNF217, ZBTB5, KLHL33, UBE2K. Στη δεύτερη φυσική ουσία, την ολεασίνη, υπάρχουν ενδείξεις για αντιγηραντική δράση αυτής, καθώς συναντούμε το βιολογικό μονοπάτι της ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ενδείξεις υπάρχουν και για αντιοξειδωτική δράση, δεδομένης της οντολογίας της απόκρισης στο οξειδωτικό στρες. Για τις δύο συνθετικές, οι ενδείξεις κλίνουν σε πιθανή αντιγηραντική δράση. Μια ακόμη παρατήρηση που χρειάζεται να γίνει αφορά στον αριθμό των αλληλεπικαλύψεων ο οποίος είναι πολύ μικρός ως ποσοστό επί των συνολικών γονιδίων (με εξαίρεση το ζεύγος PCB-MK151 που μοιράζεται σημαντικό ποσοστό γονιδίων αγγίζοντας το 20 με 25%). Αυτό αποτελεί μια ένδειξη ότι οι μηχανισμοί επίδρασης των ουσιών αυτών δε μοιράζονται κοινά μοριακά μονοπάτια, αν και υπάρχει κοινός καταληκτικός παρονομαστής (πιθανή αντιγηραντική ή/και αντιοξειδωτική δράση και ενεργοποίηση του πρωτεασώματος). Επίσης, ενδεχομένως να αποτελεί ένδειξη για την ανάγκη τροποποίησης των συνθηκών του πειράματος.

Σε γενικές γραμμές, ο εμπλουτισμός (enrichment, βλέπουμε τις τιμές του στις λίστες με τις γονιδιακές οντολογίες παρουσία της κάθε εξεταζόμενης ουσίας) κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα κι ειδικά για τις δύο φυσικές ουσίες είναι κάτι αναμενόμενο, δεδομένου ότι ακριβώς επειδή είναι φυσικές αναμέναμε μια ηπιότερη επίδραση. Ακόμα, σημειώνεται ότι ο καθορισμός των τιμών του p-value όπως και του logFC ήταν αρκετά αυστηρός γεγονός το οποίο ναι μεν αυξάνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, αλλά ταυτόχρονα μειώνει τον όγκο τους, αποκλείοντας πιθανότατα γονίδια που βρίσκονται σε άμεση συσχέτιση με τον μηχανισμό του πρωτεασώματος.

Εν κατακλείδι, η παρούσα βιοπληροφορική ανάλυση των μεταγραφικών δεδομένων μάς αποκαλύπτει μονοπάτια που εν δυνάμει σχετίζονται με την αντιοξειδωτική και αντιγηραντική δράση την οποία προτείνουν τα πειραματικά μας δεδομένα. Θα χρειαστεί περαιτέρω ανάλυση για να επιβεβαιώσει αυτές τις σχέσεις και ενδεχομένως να ανακαλύψει τα μοριακά μονοπάτια που σχετίζονται με τις διάφορες θετικές δράσεις των εξεταζόμενων ουσιών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Amerik, Alexander Y., and Mark Hochstrasser. "Mechanism and Function of Deubiquitinating Enzymes." *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1695, no. 1-3, 2004, pp. 189–207., doi:10.1016/j.bbamcr.2004.10.003.
2. Arrigo, Andre-Patrick, et al. "Identity of the 19S Prosome Particle with the Large Multifunctional Protease Complex of Mammalian Cells (the Proteasome)." *Nature*, vol. 331, no. 6152, 1988, pp. 192–194., doi:10.1038/331192a0.
3. Ashburner, Michael, et al. "Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology." *Nature Genetics*, vol. 25, no. 1, 2000, pp. 25–29., doi:10.1038/75556.
4. Barbosa-Morais, N. L., Dunning, M. J., Samarajiwa, S. A., Darot, J. F. J., Ritchie, M. E., Lynch, A. G., & Tavaré, S. (2009). A re-annotation pipeline for Illumina BeadArrays: improving the interpretation of gene expression data. *Nucleic Acids Research*, 38(3). doi: 10.1093/nar/gkp942.
5. Baumeister, Wolfgang, et al. "The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease." *Cell*, vol. 92, no. 3, 1998, pp. 367–380., doi:10.1016/s0092-8674(00)80929-0.
6. Berg, Jeremy M., et al. "Biochemistry". W.H. Freeman, 2002.
7. Bolstad, B.m., et al. "A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Variance and Bias." *Bioinformatics*, vol. 19, no. 2, 2003, pp. 185–193., doi:10.1093/bioinformatics/19.2.185.
8. Branden, Carl, and John Tooze. «Εισαγωγή στη δομή των πρωτεϊνών». Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2006.
9. Chondrogianni, Niki, and Efstathios S. Gonos. "Proteasome Activation as a Novel Antiaging Strategy." *IUBMB Life*, vol. 60, no. 10, 2008, pp. 651–655., doi:10.1002/iub.99.
10. Chondrogianni, Niki, and Efstathios S. Gonos. "Structure and Function of the Ubiquitin–Proteasome System." *Progress in Molecular Biology and Translational Science The Proteasomal System in Aging and Disease*, 2012, pp. 41–74., doi:10.1016/b978-0-12-397863-9.00002-x.
11. Chondrogianni, Niki, et al. "Proteasome Activation: An Innovative Promising Approach for Delaying Aging and Retarding Age-Related Diseases." *Ageing Research Reviews*, vol. 23, 2015, pp. 37–55., doi:10.1016/j.arr.2014.12.003.
12. Chondrogianni, Niki, et al. "20S Proteasome Activation Promotes Life Span Extension and Resistance to Proteotoxicity InCaenorhabditis Elegans." *The FASEB Journal*, vol. 29, no. 2, 2015, pp. 611–622., doi:10.1096/fj.14-252189.
13. Ciechanover, Aaron. "Proteolysis: from the Lysosome to Ubiquitin and the Proteasome." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 6, no. 1, 2005, pp. 79–87., doi:10.1038/nrm1552.

14. Covas, María-Isabel, et al. "Virgin Olive Oil: a Key Food for Cardiovascular Risk Protection." *British Journal of Nutrition*, vol. 113, no. S2, 2015, doi:10.1017/s0007114515000136.
15. Czerwińska, Monika, et al. "A Comparison of Antioxidant Activities of Oleuropein and Its Dialdehydic Derivative from Olive Oil, Oleacein." *Food Chemistry*, vol. 131, no. 3, 2012, pp. 940–947., doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.082.
16. Dunning M, Lynch A, Eldridge M (2015). illuminaHumanv4.db: Illumina HumanHT12v4 annotation data (chip illuminaHumanv4). R package version 1.26.0
17. Fabiani, Roberto, et al. "Oxidative DNA Damage Is Prevented by Extracts of Olive Oil, Hydroxytyrosol, and Other Olive Phenolic Compounds in Human Blood Mononuclear Cells and HL60 Cells." *The Journal of Nutrition*, vol. 138, no. 8, Jan. 2008, pp. 1411–1416., doi:10.1093/jn/138.8.1411.
18. Fernholz, E. "On the Constitution of α -Tocopherol." *Journal of the American Chemical Society*, vol. 60, no. 3, 1938, pp. 700–705., doi:10.1021/ja01270a057.
19. Filipek, Agnieszka, et al. "Oleacein Enhances Anti-Inflammatory Activity of Human Macrophages by Increasing CD163 Receptor Expression." *Phytomedicine*, vol. 22, no. 17, 2015, pp. 1255–1261., doi:10.1016/j.phymed.2015.10.005.
20. Fotopoulou, Theano. "Novel Tocopherol Hybrids and Bioisosteres as Proteasome Activators". Ελληνική Εταιρεία Φαρμακευτικής Ιατρικής, 2019, http://www.elefi.gr/wp-content/uploads/2019/07/3_FOTOPOULOU.pdf, πρόσβαση Ιούλιος 2019.
21. Grossman, A R et al. "The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions." *Microbiological reviews* vol. 57,3 (1993): 725-49.
22. Hansen, K., et al. "Isolation of an Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitor from *Olea Europaea* and *Olea Lancea*." *Phytomedicine*, vol. 2, no. 4, 1996, pp. 319–325., doi:10.1016/s0944-7113(96)80076-6.
23. Hochstrasser, Mark. "Lingering Mysteries of Ubiquitin-Chain Assembly." *Cell*, vol. 124, no. 1, 2006, pp. 27–34., doi:10.1016/j.cell.2005.12.025.
24. Jose L.Quilescd, MCarmenRamirez-Tortosabd. "Hydroxytyrosol: Bioavailability, Toxicity, and Clinical Applications." *Food Research International*, Elsevier, 21 Nov. 2017, <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996917308220>.
25. Koutsandreas, Theodoros, et al. "Analyzing and Visualizing Genomic Complexity for the Derivation of the Emergent Molecular Networks." *International Journal of Monitoring and Surveillance Technologies Research*, vol. 4, no. 2, 2016, pp. 30–49., doi:10.4018/ijmstr.2016040103.
26. Paiva-Martins Fátima, et al. "Powerful Protective Role of 3,4-Dihydroxyphenylethanol–Elenolic Acid Dialdehyde against Erythrocyte Oxidative-Induced Hemolysis." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 1, 2010, pp. 135–140., doi:10.1021/jf9031052.

27. Pérez-Bonilla, Mercedes, et al. "Radical-Scavenging Compounds from Olive Tree (*Olea Europaea* L.) Wood." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, no. 1, 2013, pp. 144–151., doi:10.1021/jf403998t.
28. Pickart, Cecile M. "Ubiquitin in Chains." *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 25, no. 11, 2000, pp. 544–548., doi:10.1016/s0968-0004(00)01681-9.
29. Pickart, Cecile M., and Michael J. Eddins. "Ubiquitin: Structures, Functions, Mechanisms." *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1695, no. 1-3, 2004, pp. 55–72., doi:10.1016/j.bbamcr.2004.09.019.
30. Pickart, Cecile M., and Shahri Raasi. "Controlled Synthesis of Polyubiquitin Chains." *Methods in Enzymology Ubiquitin and Protein Degradation, Part B*, 2005, pp. 21–36., doi:10.1016/s0076-6879(05)99002-2.
31. Radibratovic, Milica, et al. "Stabilization of Human Serum Albumin by the Binding of Phycocyanobilin, a Bioactive Chromophore of Blue-Green Alga *Spirulina*: Molecular Dynamics and Experimental Study." *Plos One*, vol. 11, no. 12, 2016, doi:10.1371/journal.pone.0167973.
32. Ravid, Tommer, and Mark Hochstrasser. "Diversity of Degradation Signals in the Ubiquitin–Proteasome System." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 9, no. 9, 2008, pp. 679–689., doi:10.1038/nrm2468.
33. Romero, Concepción, et al. "Effect of Cultivar and Processing Method on the Contents of Polyphenols in Table Olives." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 3, 2004, pp. 479–484., doi:10.1021/jf030525l.
34. Shi, Wei, et al. "Optimizing the Noise versus Bias Trade-off for Illumina Whole Genome Expression BeadChips." *Nucleic Acids Research*, vol. 38, no. 22, June 2010, doi:10.1093/nar/gkq871.
35. Smyth, Gordon K. "Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments." *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, vol. 3, no. 1, Dec. 2004, pp. 1–25., doi:10.2202/1544-6115.1027.
36. Tanaka, Keiji. "The Proteasome: Overview of Structure and Functions." *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, vol. 85, no. 1, 2009, pp. 12–36., doi:10.2183/pjab.85.12.
37. Tsimring, Lev S. "Noise in Biology." *Reports on Progress in Physics*, vol. 77, no. 2, 2014, p. 026601., doi:10.1088/0034-4885/77/2/026601.
38. Vierhuis, Esther, et al. "Effect of Enzyme Treatment during Mechanical Extraction of Olive Oil on Phenolic Compounds and Polysaccharides." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, no. 3, 2001, pp. 1218–1223., doi:10.1021/jf000578s.
39. Vijay-Kumar, S, et al. "Structure of Ubiquitin Refined at 1.8 Å Resolution." *Journal of Molecular Biology*, U.S. National Library of Medicine, 5 Apr. 1987, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3041007>.

40. Watermann, Tobias, et al. "Phycocyanobilin in Solution – a Solvent Triggered Molecular Switch." *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 16, no. 13, 2014, pp. 6146–6152., doi:10.1039/c3cp54307b.
41. Xie, Yang, et al. "Statistical Methods of Background Correction for Illumina BeadArray Data." *Bioinformatics*, vol. 25, no. 6, Apr. 2009, pp. 751–757., doi:10.1093/bioinformatics/btp040.
42. "Hydroxytyrosol." National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, U.S. National Library of Medicine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroxytyrosol>.
43. Μαρμαράς, Βασίλης, και Μαρία Μαρμαρά-Λαμπροπούλου. «Βιολογία Κυττάρου-Μοριακή Προσέγγιση». ΤΥΡΟΡΑΜΑ, 2005.
44. Τσατσαρώνη, Αλεξάνδρα. «Σχεδιασμός και σύνθεση νέων νευροπροστατευτικών 2- και 5- υποκατεστημένων βενζοπυρανικών παραγώγων». Μεταπτυχιακή διατριβή. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2010.
45. http://195.134.76.37/chemicals/chem_tocopherol.htm

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

```
#packages and libraries

source("https://bioconductor.org/biocLite.R")

biocLite("limma")

install.packages("FactoMineR")

install.packages("EMA")

biocLite("gcrma")

biocLite("cluster")

biocLite("GO.db")

install.packages("gplots")

source("https://bioconductor.org/biocLite.R")

biocLite("illuminaHumanv4.db")

library(limma)

library(FactoMineR)

library(RColorBrewer)

library(gplots)

library(RColorBrewer)

#arxeio-MDS-normalization-MDS

x <- read.ilmn("C:/Users/Efthymia/Desktop/nhfr/SampleProbeProfile_Niki.txt",
ctrlfiles="C:/Users/Efthymia/Desktop/nhfr/ControlProbeProfile_Niki.txt")

plotMDS(x$E)

dim(x$E)

head(x$other$Detection)

y <- neqc(x)
```

```

expressed <- rowSums(y$other$Detection < 0.01) >= 6
y <- y[expressed,]
plotMDS(y$E)
dim(y)

#filtering me illuminaHumanv4.db
library(illuminaHumanv4.db)
illuminaHumanv4()
ids <- as.character(rownames(y))
qual <- unlist(mget(ids, illuminaHumanv4PROBEQUALITY, ifnotfound = NA))
table(qual)
rem <- qual == "No match" | qual == "Bad" | is.na(qual)
y.filt <- y[!rem, ]
dim(y.filt)
plotMDS(y.filt$E)

colnames(y.filt)

y.filt@.Data[[4]]

#PCA
colnames(y.filt$E) <- c("DMSO", "DMSO", "MK151", "MK151", "PCB", "PCB", "Oleacin",
"Oleacin", "DMSOB", "DMSOB", "MK154", "MK154")
pca.res <- prcomp(t(y.filt$E), scale = TRUE)
names(pca.res)

plot(pca.res$x[,1], pca.res$x[,2], main = "PCA plot", xlab = "PC1", ylab = "PC2",
col=as.factor(c("DMSO", "DMSO", "MK151", "MK151", "PCB", "PCB", "Oleacin", "Oleacin",
"DMSOB", "DMSOB", "MK154", "MK154")),pch=18)

```

```

text(pca.res$x[,1], pca.res$x[,2], colnames(y.filt$E),pos=1, offset=0.15, cex=0.7)

#linearization-contrasts

y.filt$other$Targets <- data.frame(Condition=c("DMSO", "DMSO", "MK151", "MK151",
"PCB", "PCB", "Oleacin", "Oleacin", "DMSOB", "DMSOB", "MK154", "MK154"))

dat <- y.filt$other$Targets

head(dat)

rownames(dat)<-colnames(y.filt)

con <- as.factor(dat$Condition)

table(levels(con))

design <- model.matrix(~0 +con)

colnames(design)

fitone <- lmFit(y.filt, design)

cont.matrix <- makeContrasts("conMK154-conDMSOB", "conMK151-conDMSO", "conPCB-
conDMSO", "conOleacin-conDMSO", "conDMSO-conDMSOB", levels=design)

fittwo <- contrasts.fit(fitone, cont.matrix)

fit.final <- eBayes(fittwo,trend = TRUE)

a1 <- topTable(fit.final, coef = 1, adjust.method= "none", number=1000, p.value = 0.05,
lfc=log2(1.5))

a2 <- topTable(fit.final, coef = 2, adjust.method= "none", number=1000, p.value = 0.05,
lfc=log2(1.5))

a3 <- topTable(fit.final, coef = 3, adjust.method= "none", number=1000, p.value = 0.05,
lfc=log2(1.5))

a4 <- topTable(fit.final, coef = 4, adjust.method= "none", number=1000, p.value = 0.05,
lfc=log2(1.5))

write.csv(fit.final, file="C:/Users/Efthymia/Desktop/Genes_all.txt")

all <- read.table("C:/Users/Efthymia/Desktop/ALL.txt", header = TRUE)

rownames(all)=all[,2]

```

```

genes <- cbind(all[,], NA, NA)
rownames(genes)=rownames(all)
genes[,1]=NA
genes[,2]=NA
july <- read.table("C:/Users/Efthymia/Desktop/Genes_all.txt", header=TRUE, sep=',')
colnames(genes)=c("MK151", "MK154", "Oleacin", "PCB")

for(i in 1:nrow(july))

  {for (j in 1:nrow(genes))

    {if(july[i,1]==rownames(genes)[j])

      {genes[j,1]=july[i,3]
        genes[j,2]=july[i,2]
        genes[j,3]=july[i,5]
        genes[j,4]=july[i,4]}

    }

  }

rownames(genes)=all[,1]

```