



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

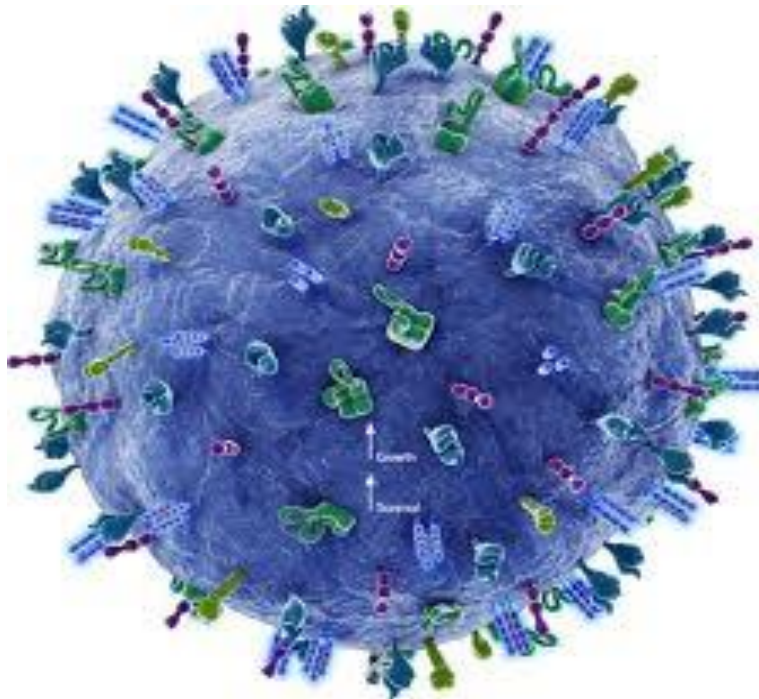
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ & ΑΥΤΟΜΑΤΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Βελτιστοποίηση των μεθόδων και των υλικών για τη διάσπαση κυττάρων
με σκοπό τη μέτρηση βιολογικών σημάτων στο εσωτερικό τους*



Μποτονάκη Μαρίνα

Επιβλέπων καθηγητής: Αλεξόπουλος Λεωνίδας, Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2014

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Μεσσήνη Δημήτριο για την πολύτιμη βοήθεια και τον άπλετο χρόνο που διέθεσε καθ'όλη τη διάρκεια των πειραμάτων καθώς και τη βιοχημικό και ερευνητική επιστήμονα Πλιάκα Βασιλική.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Χατζοπούλου Ελισάβετ για την συμβολή της στην εξοικείωση μου με τα θέματα του εργαστηρίου και την επίλυση των σχετικών αποριών μου καθώς τον υποψήφιο διδάκτορα Σακελλαρόπουλο Θεόδωρο για τη βοήθεια του σε θέματα ανάλυσης και στατιστικής.

Ευχαριστώ οφείλω και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου «Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας» για την συμπαράσταση τους και τη διασφάλιση ενός ιδανικού περιβάλλοντος συνεργασίας και ομαδικότητας.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ, Αλεξόπουλο Λεωνίδα, επίκουρο καθηγητή για την ανάθεση του θέματος, την υποστήριξη του και την παροχή όλων των απαιτούμενων μέσων για την εκπόνηση της εργασίας.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στη Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών ΕΜΠ, Τομέας Μηχανολογικών Κατασκευών και Αυτομάτου Ελέγχου, Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας.

Η μέτρηση βιολογικών σημάτων στο εσωτερικό των κυττάρων αποτελεί βασικό πυλώνα για την κατανόηση της κυτταρικής λειτουργίας, την ανάπτυξη νέων φαρμάκων και την αποκωδικοποίηση της λειτουργίας κάθε ζωντανού οργανισμού και κατ'επέκταση του ανθρώπινου σώματος. Τα βιολογικά αυτά σήματα αποτελούν στην ουσία πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίνονται από τα κύτταρα ως αντίδραση σε ποικίλα ερεθίσματα.

Για τη διάσπαση των κυττάρων, δηλαδή την κυτταρόλυση, και τη μελέτη των σημάτων στο εσωτερικό τους υπάρχουν διάφορες τεχνικές, διαλύματα και πρωτόκολλα χωρίς ωστόσο να έχει βρεθεί ο ιδανικός συνδυασμός. Ακόμη, τα χρησιμοποιούμενα μέσα φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά τα αποτελέσματα και να επιφέρουν σημαντικές διαφορές στις μετρήσεις των ίδιων βιολογικών σημάτων.

Η παρούσα εργασία εστιάζει στην εύρεση του βέλτιστου συνδυασμού υλικών και μεθόδων για τη αποδόμηση των κυττάρων διατηρώντας, ωστόσο, αναλλοίωτα τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες-σήματα ώστε να διασφαλιστούν πιο ισχυρά και βέβαια αποτελέσματα στις μετρήσεις των εκάστοτε βιολογικών σημάτων. Το θέμα, συνεπώς, αφορά σε δύο υποπροβλήματα. Πρώτον, στην εύρεση και παρασκευή των καταλληλότερων διαλυμάτων και μειγμάτων και δεύτερον, στον εντοπισμό και συνδυασμό των καταλληλότερων τεχνικών για τη δημιουργία ενός βέλτιστου πρωτοκόλλου διάσπασης κυττάρων.

Σε πρώτη φάση, λοιπόν, γίνεται μία έρευνα σχετικά με τα συστατικά των ευρέως χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων και των μορίων που συντελούν στην κυτταρόλυση διατηρώντας αναλλοίωτα τα βιολογικά σήματα. Με βάση την έρευνα αυτή, συνδυάζονται και παρασκευάζονται ποικίλα διαλύματα τα οποία χρησιμοποιώντας υπό το ίδιο πρωτόκολλο κυτταρόλυσης και υπό την επίδραση των ίδιων εξωτερικών ερεθισμάτων στην ίδια κατηγορία κυττάρων. Για την αξιολόγηση και επιλογή των υλικών χρησιμοποιείται η μέθοδος bead-based ELISA για τη μέτρηση των ίδιων εκλυόμενων βιολογικών σημάτων.

Σε δεύτερη φάση, ερευνώνται και καταγράφονται τα διαφορετικά πρωτόκολλα κυτταρόλυσης. Κάθε τεχνική μελετάται και αναλύεται ξεχωριστά ώστε να διαπιστωθεί ο ρόλος της στην διάσπαση του κυττάρου. Ακολουθεί μία σειρά πειραμάτων όπου η ίδια κατηγορία κυττάρων, δηλαδή η ίδια κυτταροσειρά, επιχειρείται να διασπαστεί με διαφορετικό πρωτόκολλο κυτταρόλυσης υπό τα ίδια εξωτερικά ερεθίσματα. Τελικά, μετρώντας και αναλύοντας τα ίδια βιολογικά σήματα με τη μέθοδο bead-based ELISA όπως και παραπάνω εκλέγεται τελικά το βέλτιστο πρωτόκολλο κυτταρόλυσης.

Ως αποτέλεσμα, τα μετρούμενα βιολογικά σήματα είναι πιο σίγουρα και κατ'επέκταση η μελέτη της κυτταρικής συμπεριφοράς πραγματοποιείται με μεγαλύτερη βεβαιότητα. Ακόμη, η παρασκευή των διαλυμάτων μειώνει σημαντικά το κόστος της πειραματικής διαδικασίας και προσφέρει μεγαλύτερη αυτονομία στο εργαστήριο.

Στη παρούσα διπλωματική εργασία επιχειρείται η βελτιστοποίηση των χημικών και μηχανικών μεθόδων διάσπασης των κυττάρων με σκοπό την μέτρηση βιολογικών σημάτων. Η ανάπτυξη νέων επιστημονικών προσεγγίσεων στη μελέτη της βιολογίας επιβάλλει τη συνεχή δημιουργία πληθώρας δεδομένων σχετικά με την επικοινωνία των κυττάρων με το εξωτερικό περιβάλλον και τις προκύπτουσες εσωτερικές κυτταρικές διεργασίες. Η εργασία εστιάζει στη βελτιστοποίηση της εξαγωγής δεδομένων από το εσωτερικό του κυττάρου.

Η διπλωματική αποτελείται από δύο σκέλη: το θεωρητικό μέρος και τη πειραματική διαδικασία.

Στο 1^ο κεφάλαιο γίνεται μία εισαγωγή στο πρόβλημα που τίθεται και αποσαφηνίζεται ο σκοπός της εργασίας. Στο 2^ο κεφάλαιο γίνεται συνοπτική παρουσίαση του βιολογικού υπόβαθρου που απαιτείται για την κατανόηση της εργασίας. Στο κεφάλαιο αυτό δίνονται πληροφορίες για τη μείζονα σημασία των πρωτεϊνών στη σύγχρονη βιολογική έρευνα. Στο 3^ο κεφάλαιο περιγράφονται εν συντομία τα επιστημονικά πεδία που σχετίζονται με το αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής. Το 4^ο κεφάλαιο περιλαμβάνει τις τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί για τη διάσπαση των κυττάρων και τη μέτρηση σημάτων στο εσωτερικό τους για τη διεξαγωγή δεδομένων και τη δημιουργία πληροφοριών στο εργαστήριο. Τα τέσσερα αυτά κεφάλαια συνθέτουν το θεωρητικό μέρος.

Στο 5^ο κεφάλαιο αναλύονται τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας στο οποίο εκπονήθηκε η εργασία. Το 6^ο κεφάλαιο αφιερώνεται στο πρώτο σκέλος των πειραμάτων με στόχο τη βελτιστοποίηση της χημικής διάσπασης των κυττάρων. Στο 7^ο κεφάλαιο αναφέρονται όλες οι πληροφορίες για το δεύτερο σκέλος των πειραμάτων που αφορούν στη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου μηχανικής διάσπασης των κυττάρων. Τέλος, στο 8^ο κεφάλαιο συνοψίζει τα αποτελέσματα του συνόλου των πειραμάτων. Τα κεφάλαια αυτά απαρτίζουν το μέρος της πειραματικής διαδικασίας.

Στο παράρτημα της εργασίας περιέχονται πληροφορίες για τα ερεθίσματα και τα σήματα που μετρήθηκαν και παρουσιάζονται οι πληροφορίες στις οποίες βασίστηκε ο σχεδιασμός των πειραμάτων.

ABSTRACT

The present thesis attempts to optimize the methods of chemical and mechanical cell disruption in order to measure biological signals. The emergence of new scientific approaches to the study of biology requires the continuous creation of a plurality of data on cell communication with its external environment and on the resulting internal cellular processes. This work focuses on optimizing the extracting of data from the cell interior.

The thesis consists of two main parts: the theoretical part and the experimental procedure.

The first chapter introduces the problem raised and clarifies the purpose of the study. The second chapter summarizes the biological background required for understanding the work. This chapter provides information about the major importance of proteins to the current biological research. In the third chapter the outline of the scientific fields related to the subject of this thesis is presented. The fourth chapter includes the techniques that have been developed for cell disruption and for the measurement of intracellular signals in order to carry data and create information at the laboratory. These four chapters compose the theoretical part.

The fifth chapter refers to the protocols used in the laboratory of “Bioengineering and Systems Biology” where the thesis was elaborated. The sixth chapter is devoted to the first part of experiments that are related to the optimization of the chemical disruption of the cells. In the 7th chapter, is listed all the information for the second part of experiments that aim to optimize the protocol of mechanical cell disruption. Finally, the 8th chapter summarizes the results of all the experiments conducted. These chapters compose the part of the experimental procedure.

The thesis annex includes information on the stimuli and the signals that were measured. Moreover, the annex contains the information underpinning the design of experiments performed.

Πρόλογος.....	σελ.5
Περίληψη.....	σελ.7
Abstract.....	σελ.9
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	σελ.13
1. Εισαγωγή.....	σελ.13
1.1. Γενικό πλαίσιο.....	σελ.13
1.2 Ορισμός προβλήματος και προτεινόμενη λύση.....	σελ.13
1.3 Σκοπός εργασίας.....	σελ.14
2. Βιολογικό Υπόβαθρο.....	σελ.15
2.1 Το κύτταρο.....	σελ.15
2.2 Οι πρωτεΐνες.....	σελ.15
2.3 Τροποποιήσεις πρωτεϊνών.....	σελ.17
2.4 Δίκτυα κυτταρικής σηματοδότησης.....	σελ.18
3. Οι επιστήμες των πρωτεϊνών.....	σελ.21
3.1 Συστημική Βιολογία.....	σελ.21
3.2 Πρωτεομική.....	σελ.21
3.3	
Φωσφοπρωτεομική.....	σελ.2322
4. Μελετώμενες εργαστηριακές και πειραματικές μέθοδοι.....	σελ.25
4.1 Χημική διάσπαση κυττάρων.....	σελ.25
4.1.1 Ρυθμιστικό διάλυμα λύσεως.....	σελ.25
4.1.2 Αναστολείς.....	σελ.29
4.1.2.1 Αναστολείς πρωτεασών.....	σελ.29
4.1.2.2 Αναστολείς φωσφατασών.....	σελ.31

4.2 Μηχανική διάσπαση κυττάρων.....σελ.323232	
4.3 Μέτρηση πρωτεϊνών με τη τεχνική ELISA.....σελ.34	
5. Εφαρμοζόμενα εργαστηριακά πρωτόκολλα	σελ.39
5.1 Καλλιέργεια κυττάρων.....σελ.39	
5.2 Πρωτόκολλο ELISA για τη μέτρηση σημάτων.....σελ.4141	
5.3 Εξαγωγή και επεξεργασία δεδομένων	σελ.42
Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	σελ.47
6. Βελτιστοποίηση χημικής διάσπασης κυττάρων.....	σελ.49
6.1 Πείραμα 1 ^οσελ.49	
6.2 Πείραμα 2 ^οσελ.54	
6.3 Πείραμα 3 ^οσελ.65	
7. Βελτιστοποίηση μηχανικής διάσπασης κυττάρων.....	σελ.71
7.1 Πείραμα 1 ^οσελ.71	
7.2 Πείραμα 2 ^οσελ.73	
7.3 Στατιστική ανάλυση των πρωτοκόλλων.....σελ.77	
8. Συμπεράσματα- Επίλογος.....	σελ.85
Βιβλιογραφία.....	σελ.87
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	σελ.91

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΕΝΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ

Η διάσπαση των κυττάρων, δηλαδή η κυτταρόλυση αποτελεί συνήθη διαδικασία για τη μελέτη και κατανόηση της κυτταρικής λειτουργίας και της απόκρισης του κυττάρου στα ερεθίσματα του περιβάλλοντος του. Πιο συγκεκριμένα, το κύτταρο αντιδρά σε ορισμένα ερεθίσματα του περιβάλλοντος του εκφράζοντας ποικίλα σήματα στο εσωτερικό και εξωτερικό του. Τόσο τα ερεθίσματα όσο και τα σήματα αυτά είναι ουσιαστικά πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν τη βάση για την αποκωδικοποίηση της κυτταρικής συμπεριφοράς.

Προκειμένου να μετρηθούν και να μελετηθούν τα βιολογικά σήματα που εκκρίνονται υπό την επίδραση συγκεκριμένων ερεθισμάτων είναι αναγκαία η αποδόμηση του κυττάρου ώστε να εξαχθούν οι πρωτεΐνες από το εσωτερικό του. Παράλληλα είναι πολύ σημαντικό οι πρωτεΐνες-σήματα να παραμείνουν αναλλοίωτες χωρίς να διασπαστούν ή να τροποποιήσουν τη δομή τους. Η διαδικασία αυτή αποτελεί κρίσιμο κομμάτι για τη συλλογή δεδομένων στο εργαστήριο και την περαιτέρω διεξαγωγή συμπερασμάτων για το λόγο αυτό τα σήματα θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο βέβαια και ακριβή.

Γενικά, οι τεχνικές και τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την παραπάνω διαδικασία δεν έχουν βελτιστοποιηθεί ακόμη. Ωστόσο, αποτελέσματα από προηγούμενα πειράματα έχουν δείξει ότι τα υλικά και οι τεχνικές είναι στοιχεία που επηρεάζουν σημαντικά τα τελικά αποτελέσματα. Για αυτό επιδιώκεται ο βέλτιστος συνδυασμός αυτών.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΛΥΣΗ

Στο εργαστήριο, τα δεδομένα δημιουργούνται κυρίως από μέτρηση βιολογικών σημάτων. Τα σήματα, δηλαδή οι μετρούμενες πρωτεΐνες από το εσωτερικών των κυττάρων, αποτελούν τα φωσφοπρωτεϊνικά δεδομένα και μετρώνται ακολουθώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο κυτταρόλυσης. Προηγούμενα πειράματα έχουν δείξει ότι οι ύλες και οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στο εκάστοτε πρωτόκολλο επηρεάζουν σημαντικά τα τελικά μετρούμενα

αποτελέσματα ποιοτικά και ποσοτικά. Στα βιολογικά σήματα οι διακυμάνσεις από μέτρηση σε μέτρηση μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ακόμη κι αν πρόκειται για τη μέτρηση ίδιου σήματος. Τα υλικά, οι διαδικασίες, ο πειραματιστής επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το τελικό αποτέλεσμα. Για το λόγο αυτό πρέπει να προσδιοριστούν τα υλικά και οι τεχνικές που προδίδουν στις τελικές μετρήσεις τη μεγαλύτερη δυνατή αξιοπιστία και τα πιο ισχυρά σήματα. Επίσης, λαμβάνεται υπόψη η κατά το δυνατόν πιο εύκολη διαδικασία για τον πειραματιστή από άποψη απλότητας και χρονικής διάρκειας του πρωτοκόλλου της κυτταρόλυσης.

Για το λόγο αυτό στην παρούσα εργασία επιχειρείται μία λεπτομερής και ολιστική προσέγγιση των χρησιμοποιούμενων υλικών και τεχνικών και η μελέτη των πιθανών συσχετισμών μεταξύ των εφαρμοζόμενων τεχνικών και των φωσφοπρωτεϊνικών αποτελεσμάτων. Ακόμη, επιδιώκεται η εύρεση ενός τελικού βέλτιστου πρωτοκόλλου διάσπασης κυττάρων για τη συλλογή κατά το δυνατόν αξιόπιστων και ισχυρών σημάτων.

1.3 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως σκοπό την εύρεση της βέλτιστης μεθόδου διάσπασης των κυττάρων, και της μέτρησης των σημάτων που εκφράζουν στο εσωτερικό τους λόγω διαφόρων εξωτερικών ερεθισμάτων. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η εύρεση των καταλληλότερων υλικών αλλά και διαδικασιών που επιφέρουν την κυτταρόλυση διατηρώντας ωστόσο αναλλοίωτα τα σήματα -πρωτεΐνες που εκκρίνει το κύτταρο. Σε πρώτη φάση λοιπόν, μελετώνται τα διάφορα συστατικά για τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται προκειμένου να διασπαστούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια, μελετάται η παρασκευή και συντήρηση των διαλυμάτων αυτών. Έχοντας παρασκευάσει πλέον όλα τα απαραίτητα διαλύματα είναι απαραίτητη η εύρεση των μεθόδων που επιφέρουν κυτταρόλυση και ο βέλτιστος συνδυασμός τους έτσι ώστε να δημιουργηθεί ένα τελικό και βέλτιστο πρωτόκολλο διάσπασης κυττάρων.

2.1 ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Κατά την Βιολογία, **κύτταρο** ονομάζεται η βασική δομική και λειτουργική μονάδα που εκδηλώνει το φαινόμενο της ζωής. Έτσι, ως κύτταρο νοείται το μικρότερο δομικό συστατικό της έμβιας ύλης, που αποτελείται από μια συστηματικά οργανωμένη ομάδα μορίων, που βρίσκονται σε δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Το κύτταρο διαθέτει μορφολογική, φυσική και χημική οργάνωση και την ικανότητα της αφομοίωσης, της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής. Είναι μια μονάδα της ζωής ανεξάρτητη ως προς την αυτορρύθμιση και την προσαρμοστικότητα του σε σχέση με το περιβάλλον.

Ο χώρος εντός του οποίου βιώνουν τα κύτταρα των πολυκυττάρων οργανισμών ονομάζεται **μεσοκυττάριο υγρό**. Πρόκειται για υδατικό διάλυμα του οποίου η σύσταση καθώς και η συγκέντρωση σε αυτό των διαλυμένων ουσιών κυμαίνονται σε όρια που εξυπηρετούν καλύτερα την λειτουργία των κυττάρων, και κατ' επέκταση του οργανισμού που απαρτίζουν. Τα κύτταρα προσλαμβάνουν από το μεσοκυττάριο υγρό όλα τα απαραίτητα συστατικά για την επιβίωσή τους ενώ αντίθετα αποβάλλουν σε αυτό τα παράγωγα του μεταβολισμού τους.

Τα ζωντανά κύτταρα αποτελούνται από περιορισμένο αριθμό χημικών στοιχείων. Ιδιαίτερο ρόλο παίζει ο Άνθρακας(C), το Υδρογόνο (H), το Οξυγόνο(O), το Άζωτο, ο Φώσφορος (P) και το Θείο, που αποτελούν και το 99% περίπου του βάρους του. Τα χημικά συστατικά του είναι δυνατόν να ταξινομηθούν σε ανόργανα (νερό, μεταλλικά ιόντα) και οργανικά (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη και νουκλεϊκά οξέα). Από τα παραπάνω συστατικά ιδιαίτερα σημαντικές είναι οι πρωτεΐνες καθώς φαίνεται να αποτελούν το κλειδί για την αποκρυπτογράφηση της κυτταρικής συμπεριφοράς.

2.2 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

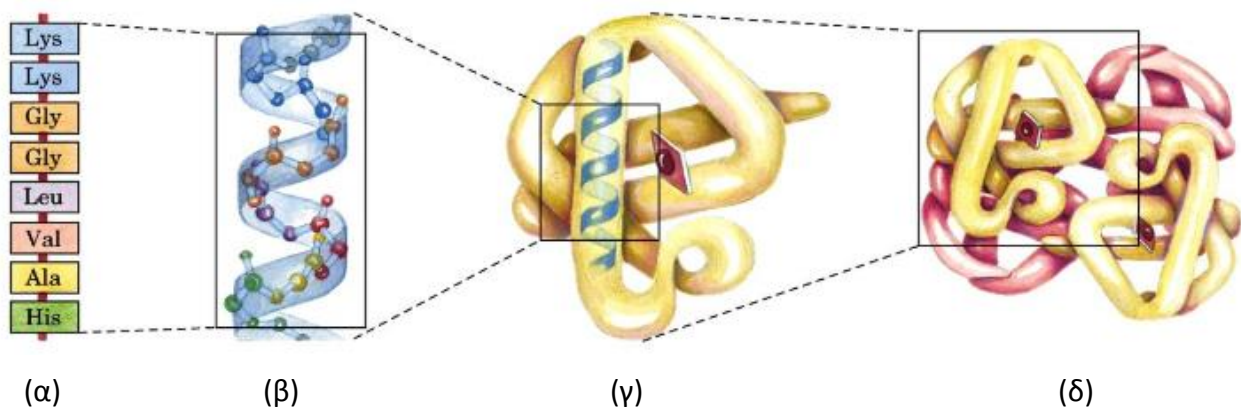
Οι **πρωτεΐνες** αποτελούν τα πιο διαδεδομένα και πολυδιάστατα τόσο στη μορφή όσο και στη λειτουργία τους μακρομόρια. Ακόμη και σε ένα απλό κύτταρο των βακτηρίων εντοπίζονται εκατοντάδες διαφορετικές πρωτεΐνες που κάθε μια εξ αυτών έχει ιδιαίτερο ρόλο. Οι πρωτεΐνες αποτελούν είτε δομικά συστατικά των μεμβρανών του κυττάρου είτε συνεργούν σε κάποια συγκεκριμένη λειτουργία, όπως η δημιουργία πρωτεϊνικών μπλόκων. Είναι μεγάλα σύνθετα βιομόρια, με μοριακό βάρος από 10.000 μέχρι πάνω από 1 εκατομμύριο. Αποτελούμενα από αμινοξέα, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας μια γραμμική αλυσίδα, καλούμενη αλυσίδα πολυπεπτιδίων. Όλες οι πρωτεΐνες περιέχουν άνθρακα, οξυγόνο και άζωτο και οι περισσότερες εξ αυτών και θείο.

Η ακολουθία αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη καθορίζεται από ένα γονίδιο και κωδικοποιείται κατά τον γενετικό κώδικα DNA. Παρόλο που ο γενετικός κώδικας κωδικοποιεί 20 αμινοξέα, τα αμινοξέα που συνιστούν την πρωτεΐνη συχνά υφίστανται χημικές αλλαγές κατά τη μετα-μεταγραφική τροποποίηση, προτού η πρωτεΐνη να μπορέσει να λειτουργήσει είτε στο κύτταρο, είτε ως τμήμα των μηχανισμών ελέγχου.

Οι πρωτεΐνες παράγονται από τα ριβοσώματα που βρίσκονται μέσα στο κυτταρόπλασμα και αρχικά εμφανίζονται ως απλές μη διακλαδωμένες αλληλουχίες αμινοξέων, δηλαδή πεπτιδίων ή πολυπεπτιδίων, σχηματίζοντας την "**πρωτοταγή δομή**" (εικόνα 2.2.1α), για την οποία καθοριστικοί παράγοντες είναι τα νουκλειικά οξέα, τα οποία και φέρονται να ελέγχουν όλες τις λειτουργίες αλλά και τα κληρονομικά γνωρίσματα των οργανισμών.

Στη συνέχεια όλα τα πολυπεπτίδια υφίστανται μια φυσική διαμόρφωση προκειμένου να αποκτήσουν μια "**δευτεροταγή δομή**" (εικόνα 2.2.1β) η οποία προκαλείται από δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των καρβοξυλομάδων και των αμινομάδων των αμινοξέων. Ο πλέον διαδεδομένος τύπος τέτοιας μορφής πολυπεπτιδίου είναι η λεγόμενη "**α-έλικα**", δεξιόστροφη, όπου οι σπείρες διατηρούνται στη θέση τους με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των καρβοξυλομάδων και των αμινομάδων των αμινοξέων. Μια άλλη δευτεροταγής δομή είναι η λεγόμενη "**β-πτυχωτή επιφάνεια**" όπου στη περίπτωση αυτή διασταυρώνονται παράλληλες αλυσίδες πολυπεπτιδίων που ενώνονται στις διασταυρώσεις με δεσμούς υδρογόνου σχηματίζοντας έτσι μια εξαιρετικά σφιχτή δομή. Στη συνέχεια τα πολυπεπτίδια υφίστανται ακόμα πιο περίπλοκο δίπλωμα (πτύχωση) το οποίο καλείται "**τριτοταγής δομή**" (εικόνα 2.2.1γ). Με τον όρο τριτοταγή δομή, εννοούμε το τελικό και λειτουργικό σχήμα που αποκτά το πολυπεπτίδιο, οπότε ονομάζεται πλέον πρωτεΐνη. Αυτή η αναδίπλωση πραγματοποιείται από την αλληλεπίδραση των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων (π.χ. σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ δύο κυστεϊνικών καταλοίπων).

Τέλος, υπάρχουν και πρωτεΐνες που αποτελούνται από πολλές πολυπεπτιδικές αλυσίδες που είναι χαλαρά ενωμένες και αυτό αποτελεί τη λεγόμενη "**τεταρτοταγή δομή**" (εικόνα 2.2.1δ).



Εικόνα 2.2.1

Οι διάφορες λειτουργίες που παρατηρούνται στους οργανισμούς γίνονται χάρη στις πρωτεΐνες. Ο δε βιολογικός τους ρόλος καθορίζεται κάθε φορά από την τρισδιάστατη δομή τους που είναι συνέπεια της αλληλουχίας των αμινοξέων, η οποία και ξεκινά από την πρωτοταγή δομή.

Όπως άλλα βιολογικά μακρομόρια έτσι και οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και συμμετέχουν σε κάθε διαδικασία μέσα στα κύτταρα. Πολλές πρωτεΐνες δρουν ως ένζυμα που καταλύουν τις βιοχημικές αντιδράσεις, και είναι ζωτικής σημασίας στο μεταβολισμό. Άλλες πρωτεΐνες έχουν δομικές ή μηχανικές λειτουργίες, όπως οι πρωτεΐνες του κυτταρικού σκελετού, οι οποίες συμβάλλουν στη διατήρηση της μορφής των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες είναι επίσης σημαντικές στη διακυτταρική επικοινωνία, τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος, τον σχηματισμό κυτταρικών ιστών και τον κυτταρικό κύκλο.

ΚΙΝΑΣΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Στη Βιοχημεία, οι κινάσες είναι ένας τύπος ενζύμων τα οποία μεταφέρουν φωσφορικές ομάδες από μόρια υψηλής ενέργειας, όπως το ATP, σε συγκεκριμένα υποστρώματα. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως φωσφορυλίωση.

Μία από τις μεγαλύτερες ομάδες κινασών είναι οι κινάσες πρωτεϊνών. Αυτές ενεργούν σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες και τροποποιούν τη δραστηριότητά τους. Οι κινάσες χρησιμοποιούνται εκτενώς για τη μετάδοση σημάτων και τον έλεγχο πολύπλοκων διεργασιών στα κύτταρα. Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευθεί περισσότερες από 500 διαφορετικές κινάσες στον ανθρώπινο οργανισμό ενώ αποτελούν αντικείμενο μελέτης λόγω της ποικιλομορφίας και του ιδιαίτερου ρόλου τους στη σηματοδότηση.

2.3 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΠΟΥ ΥΦΙΣΤΑΤΑΝΤΑΙ ΟΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Προκειμένου να γίνουν κατανοητές κάποιες έννοιες και διαδικασίες που περιγράφονται και ακολουθούνται στην παρούσα εργασία κρίνεται σκόπιμο να γίνουν κατανοητές οι έννοιες της **πρωτεόλυσης** και της **μετουσίωσης** των πρωτεϊνών. Οι δύο αυτές έννοιες αναφέρονται σε κάποιου είδους τροποποίησης που υφίστανται οι πρωτεΐνες.

Με τον όρο **πρωτεόλυση** χαρακτηρίζεται στη Βιοχημεία το σύνολο των αντιδράσεων αποδόμησης των μπλόκων πρωτεϊνικών ουσιών. Η διάσπαση των μορίων της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών τους. Στο ζωντανό κύτταρο η πρωτεόλυση εξασφαλίζεται από ειδικά ένζυμα.

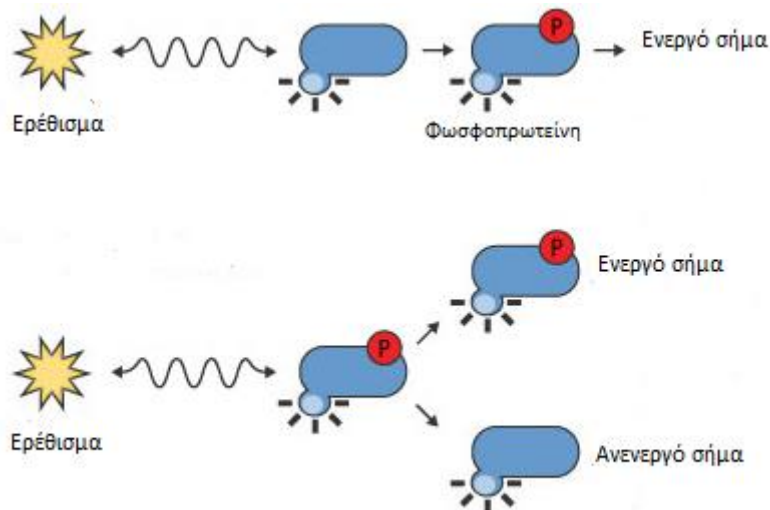
Στη Μοριακή Βιολογία και στη Βιοχημεία, με τον όρο **μετουσίωση** (denaturation) χαρακτηρίζεται το φαινόμενο της διάσπασης των δεσμών, στη δευτεροταγή, τριτοταγή ή τεταρτοταγή δομή και δεν αναφέρεται σε αλλαγές της πρωτοταγούς δομής, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων. Κατά τη μετουσίωση οι δεσμοί που έχουν αναπτυχθεί μεταξύ των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων σπάζουν, (αποκόπτονται), με συνέπεια την καταστροφή της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης. Ως αποτέλεσμα η πρωτεΐνη χάνει τη λειτουργικότητά της. Πρόκειται για ένα φαινόμενο ή διαδικασία που μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες όπως είναι η υπερβολική θερμότητα, το όξινο ή βασικό pH, οι οργανικοί διαλύτες, καθώς ακόμη και οι υπερηχητικές δονήσεις.

Ιδιαίτερα σημαντική για τη παρούσα εργασία είναι και η κατανόηση της έννοιας της φωσφορυλίωσης. Η **φωσφορυλίωση** είναι στην ουσία μία τροποποίηση που πραγματοποιείται σε πολλά ένζυμα και δομικές πρωτεΐνες κατά τη διαδικασία της κυτταρικής σηματοδότησης. Η τροποποίηση αυτή αφορά στην προσθήκη μίας φωσφορικής ομάδας (PO_4^{3-}) σε **συγκεκριμένα**

αμινοξέα- συνήθως σερίνη, θρεονίνη ή τυροσίνη- η οποία προκαλεί την πρωτεΐνη να συνδεθεί ή να αλληλεπιδράσει με μια ξεχωριστή, διακριτή σειρά από άλλες πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν την φωσφορυλιωμένη περιοχή.

Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών αποτελεί μία από τις πιο μελετημένες πρωτεϊνικές τροποποιήσεις. Για αυτό το λόγο πολλές σύγχρονες επιστημονικές προσπάθειες προς τον καθορισμό μίας σειράς φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών σε ένα συγκεκριμένο κύτταρο ή τύπο ιστού υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Με τον τρόπο αυτό προκύπτουν δεδομένα που ενημερώνουν για την οδό σηματοδότησης που ενδέχεται να δραστηριοποιείται σε κάθε περίπτωση.

Όταν ένα κύτταρο δέχεται κάποιο εξωτερικό ερέθισμα ξεκινάει ένας μηχανισμός ενεργοποίησης πρωτεϊνών στο εσωτερικό του. Η κάθε πρωτεΐνη ενεργοποιείται με την προσθήκη μίας φωσφορικής ομάδας η οποία μεταφέρεται σε αυτή με την κατάλληλη κινάση. Η φωσφορυλίωση κρατάει συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Έπειτα η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη χάνει τη φωσφορική ομάδα και το σήμα είναι πλέον ανενεργό. Επομένως, η ανίχνευση μίας φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης, η οποία καλείται και φωσφοπρωτεΐνη, είναι δυνατή μόνο όσο διαθέτει τη φωσφορική ομάδα. Μια απλή απεικόνιση της διαδικασίας απεικονίζεται στην εικόνα 2.3.1



Εικόνα2.3.1

2.4 ΔΙΚΤΥΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ

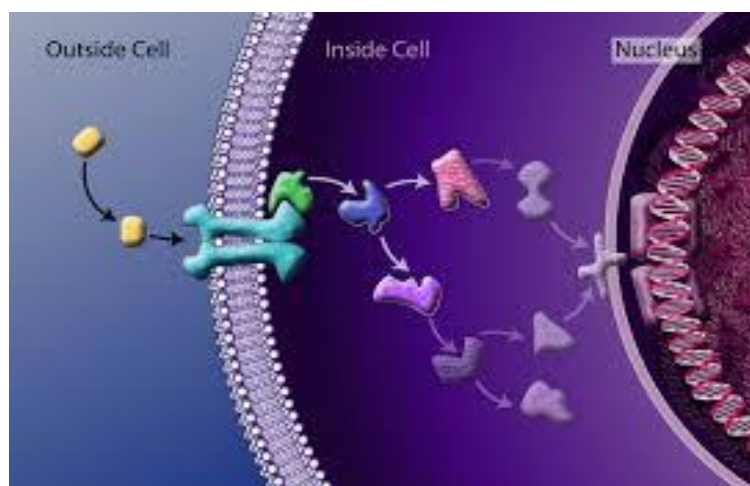
Η μελέτη των βιολογικών συστημάτων και η μοντελοποίηση τους βασίζεται στη μετάδοση σημάτων στο εσωτερικό και εξωτερικό τους περιβάλλον, τη κυτταρική σηματοδότηση. Η ικανότητα των κυττάρων να αντιλαμβάνονται και να αντιδρούν σωστά στο περιβάλλον τους επιτρέπει την ανάπτυξη, την επιδιόρθωση και φυσιολογική ομοιοστασία των ιστών και την ανοσία. Η λανθασμένη επεξεργασία πληροφορίας από τα κύτταρα ευθύνεται για ασθένειες και σοβαρές παθήσεις. Συνεπώς, η κυτταρική σηματοδότηση αποτελεί μέρος ενός πολύπλοκου συστήματος επικοινωνίας που διέπει τις βασικές δραστηριότητες και συντονίζει τις δράσεις των

κυττάρων ενώ, μέσω της κατανόησης της μπορεί να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά ασθένειες όπως ο καρκίνος ή ο διαβήτης.

Η Βιολογία έχει επικεντρωθεί στη μελέτη επιμέρους τμημάτων των οδών κυτταρικής σηματοδότησης. Για την κατανόηση των σύνθετων δικτύων που σχηματίζουν αυτές οι οδοί αναπτύχθηκε η επιστήμη της Συστημικής Βιολογίας . Η Συστημική Βιολογία μελετά τη δομή των δικτύων σηματοδότησης και τον τρόπο με τον οποίο οι αλλαγές σε αυτά μπορεί να επηρεάσει τη ροή των πληροφοριών σε έναν έμβιο οργανισμό. Η ανάλυση των δικτύων απαιτεί συνδυασμό πειραματικών και θεωρητικών προσεγγίσεων, συμπεριλαμβανομένων πειραματικών μετρήσεων, υπολογιστικών προσομοιώσεων και μοντελοποιήσεων.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η ενεργοποίηση ενός υποδοχέα που βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης προκαλείται απευθείας από την σύνδεση του με ένα ερέθισμα-συνδέτη οπότε αυτό συνδέεται αμέσως με την απόκριση του κυττάρου.

Ωστόσο, για τους περισσότερους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, οι αλληλεπιδράσεις συνδέτη-υποδοχέα δεν συνδέονται άμεσα με την απόκριση του κυττάρου. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας πρέπει πρώτα να αλληλεπιδράσει με άλλες πρωτεΐνες στο εσωτερικό του κυττάρου προτού προκληθεί η τελική φυσιολογική επίδραση του ερεθίσματος στη συμπεριφορά του κυττάρου . Συνήθως, στις μεταβολές που προκαλούνται από τη στιγμή της σύνδεσης του υποδοχέα με το εξωτερικό ερέθισμα , εμπλέκονται αρκετές πρωτεΐνες. Το σύνολο των μεταβολών που προκαλείται από τη διέγερση του κυττάρου ονομάζεται μηχανισμός μεταγωγής σήματος ή σηματοδοτική οδός. Παράδειγμα της διαδικασίας αυτής περιγράφεται στην εικόνα 2.4.1



Εικόνα 2.4.1

Κάθε σηματοδοτική οδός περιλαμβάνει τις αλλαγές που προκαλεί ένα εξωτερικό σήμα σε ένα συνδυασμό πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο. Αυτές αφορούν σε κινήσεις πρωτεϊνών που

φωσφορυλιώνουν τους εαυτούς τους αλλά και τις συνδεόμενες με αυτές πρωτεΐνες. Η διαδικασία της φωσφορυλίωσης προκαλεί τη δέσμευση με μία διαφορετική πρωτεΐνη και κατ'επέκταση την αλληλεπίδραση μεταξύ δύο πρωτεϊνών. Οι φωσφορυλιομένες πρωτεΐνες καλούνται φωσφοπρωτεΐνες. Η ενεργοποίηση τους διαρκεί συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Οι πρωτεΐνες μπορούν να ενεργοποιηθούν είτε ανοδικά είτε καθοδικά. Ακόμη, η ποσότητα των ληφθέντων σημάτων επηρεάζει την αντίδραση και την απόκριση του κυττάρου. Τα δίκτυα κυτταρικής σηματοδότησης επιτρέπουν την ανατροφοδότηση, την ενίσχυση των σημάτων και την αύξηση των συσχετίσεων μεταξύ πολλαπλών σημάτων και των αντίστοιχων οδών σηματοδότησης.

3.1 ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Η **Συστημική Βιολογία** (Systems Biology) αποτελεί μία σύγχρονη διεπιστημονική προσέγγιση της βιοιατρικής και βιολογικής επιστημονικής έρευνας. Με βάση τη βιολογία, ο τομέας αυτός εστιάζει στις πολυσύνθετες αλληλεπιδράσεις των βιολογικών συστημάτων. Κύρια επιδίωξη αυτού του ταχέως αναπτυσσόμενου πεδίου αποτελεί κατανόηση και πρόβλεψη της συμπεριφοράς βιολογικών συστημάτων στο σύνολο τους. Για το λόγο αυτό, η Συστημική Βιολογία διαθέτει εργαλεία όπως, τα μεταβολικά δίκτυα και τα δίκτυα κυτταρικής σηματοδότησης, που καθιστούν δυνατή τη μοντελοποίηση και ανακάλυψη ιδιοτήτων και αρχών λειτουργίας των κυττάρων, των ιστών και των οργανισμών. Καθένα από τα αυτά τα συστήματα γίνεται αντιληπτό ως ένα δίκτυα από αλληλεπιδρώντα στοιχεία λ.χ. γονίδια, πρωτεΐνες, μεταβολίτες από τα οποία προκύπτει μία συνδυαστική λειτουργία. Η μοντελοποίηση και ανακατασκευή βιολογικών δικτύων επιτρέπει υπολογιστικές προσομοιώσεις που οδηγούν σε πιθανές υποθέσεις για τον τρόπο που συμπεριφέρεται το εκάστοτε εξεταζόμενο δίκτυο.

Το σπουδαιότερο όραμα της επιστημονικής κοινότητας είναι εφαρμογή των προσεγγίσεων της συστημικής βιολογίας για τον εντοπισμό θεραπευτικών οδών σε ασθενή δίκτυα, καθιστώντας δυνατή στο μέλλον την εξατομικευμένη ιατρική.

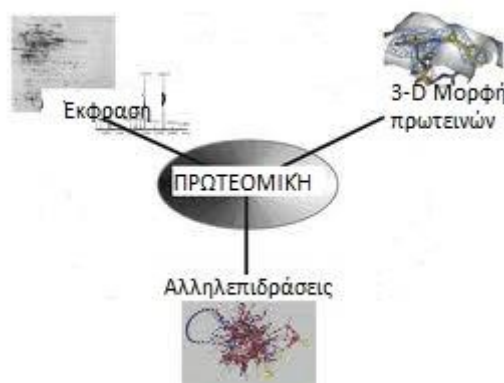
3.2 ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ

Ένας επιστημονικός τομέας που, από πολύ νωρίς, κρίθηκε απαραίτητος για την ακριβή κατασκευή μοντέλων δικτύου και κυτταρικής σηματοδότησης και την εξέλιξη της Συστημικής Βιολογίας είναι η Πρωτεομική.

Πρωτεομική (Proteomics) καλείται η μεγάλης κλίμακας μελέτη των πρωτεϊνών και ειδικά των δομών και λειτουργιών τους. Οι πρωτεΐνες αποτελούν ζωτικό συστατικό μέρος των ζωντανών οργανισμών καθώς είναι το κύριο συστατικό των φυσιολογικών μεταβολικών οδών των κυττάρων. Ο όρος “Πρωτεομική” χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1997 σε αναλογία του κλάδου της “Γενομικής” που αφορά στη μελέτη του γονιδιώματος. Η λέξη πρωτέωμα είναι ένα μείγμα των λέξεων “πρωτεΐνη” και “γονιδίωμα”, και επινοήθηκε από τον Marc Wilkins το 1994, ενώ εργαζόταν πάνω στην ιδέα ως διδακτορικός φοιτητής.

Ως πρωτέωμα ορίζεται το σύνολο των πρωτεϊνών που παράγονται ή τροποποιούνται από έναν οργανισμό ή ένα σύστημα. Αυτό διαφέρει ανάλογα με το χρόνο, τις ειδικές απαιτήσεις και τις εντάσεις που υφίσταται ένα κύτταρο ή ένας οργανισμός. Η “Πρωτεομική” είναι διεπιστημονικό πεδίο το οποίο διερευνά το σύνολο της ενδοκυττάριας πρωτεϊνικής σύστασης, δομής και δραστηριότητας (εικόνα 3.2.1). Ακόμη, επιβεβαιώνει την ύπαρξη και μετρά άμεσα την υπάρχουσα ποσότητα μίας πρωτεΐνης.

Πλέον, έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες μέθοδοι ποσοτικής ανάλυσης πεπτιδίων, πρωτεϊνών και ενζύμων ώστε, να διερευνηθεί ουσιαστικά ένα ευρύ φάσμα βιολογικών θεμάτων ως ένα είδος προσέγγισης της Συστημικής Βιολογίας.



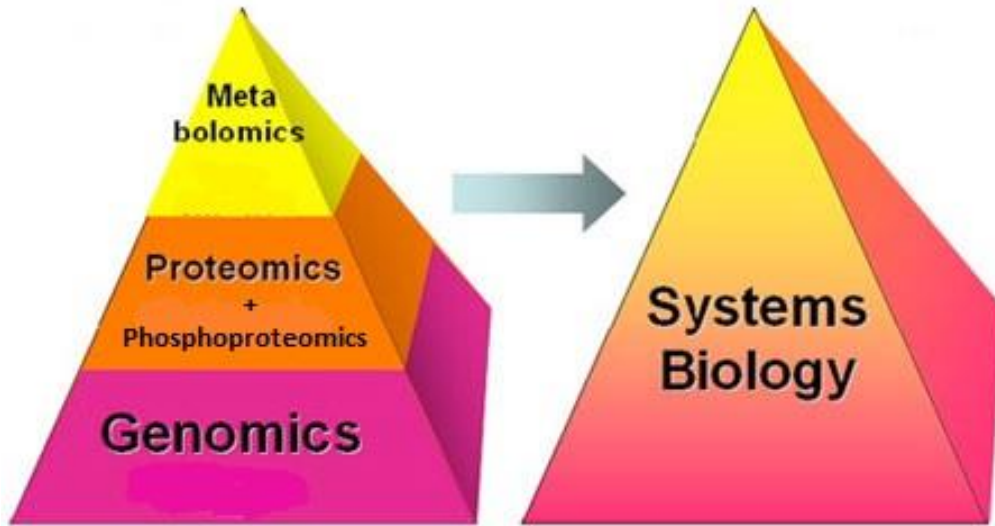
Εικόνα 3.2.1

3.3 ΦΩΣΦΟΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ

Η **Φωσφοπρωτεομική (Phosphoproteomics)** είναι ο κλάδος της “Πρωτεομικής” που αναγνωρίζει, καταγράφει και χαρακτηρίζει πρωτεΐνες που περιέχουν μία φωσφορική ομάδα σαν μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Όπως προαναφέρθηκε, η φωσφορυλίωση είναι βασική, αντιστρεπτή τροποποίηση η οποία ρυθμίζει την πρωτεϊνική λειτουργία, τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό, τον σχηματισμό συμπλεγμάτων, την αποδόμηση πρωτεϊνών και κατ’επέκταση τα δίκτυα σηματοδότησης των κυττάρων. Με βάση τα δεδομένα αυτών των τροποποιήσεων, εκτιμάται ότι πάνω από το 30% όλων των πρωτεϊνών μπορεί να φωσφορυλιωθεί πολλές φορές. Επειδή μια αλλαγή στη κατάσταση της φωσφορυλίωσης αντανακλά σχεδόν πάντα μια αλλαγή στη δραστηριότητα κάποιας πρωτεΐνης, η “Φωσφοπρωτεομική” προσφέρει ενδείξεις για τις πρωτεΐνες ή τις οδούς που είναι πιθανόν να ενεργοποιηθούν εξαιτίας μίας τέτοιας αλλαγής. Επιπλέον, υποδεικνύει τις πρωτεΐνες που μπορεί να είναι πιθανοί στόχοι φαρμάκων. Γενικά, η “Φωσφοπρωτεομική” επεκτείνει σημαντικά τις γνώσεις σχετικά με το πλήθος και τον τύπο των φωσφοπρωτεϊνών. Ωστόσο, η μεγαλύτερη υπόσχεση του κλάδου είναι η ταχεία ανάλυση ολοκληρωμένων δικτύων σηματοδότησης που οφείλονται στη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών.

Η Πρωτεομική και η Φωσφοπρωτεομική αποτελούν ένα εργαλείο συγκέντρωσης δεδομένων που αξιοποιούνται από τον ευρύτερο κλάδο της Συστημικής Βιολογίας.

Σε συνδυασμό με άλλα εργαλεία τα οποία ξεφεύγουν από τα όρια της παρούσας εργασίας, όπως η Γονιδιωματική («Genomics», μελέτη των γονιδιωμάτων) και η Μεταβολομική («Metabolomics», μελέτη των μεταβολιτών) επιχειρείται η αποκρυπτογράφηση της κυτταρικής συμπεριφοράς και επικοινωνίας και η κατανόηση και σχεδίαση δικτύων κυτταρικής σηματοδότησης. Η εικόνα 3.3.1 παρουσιάζει τη σχέση μεταξύ των προαναφερθέντων επιστημονικών κλάδων.



Εικόνα 3.3.1

Για να είναι δυνατή η μέτρηση των φωσφοπρωτεϊνών επιβάλλεται η διάσπαση του κυττάρου, της μεμβράνης και των περιεχόμενων οργανιδίων του. Ως αποτέλεσμα, οι φωσφοπρωτεΐνες απελευθερώνονται από το εσωτερικό του και καθίσταται δυνατός ο εντοπισμός τους. Η διάσπαση του κυττάρου ονομάζεται **κυτταρόλυση**. Πιο αναλυτικά, η κυτταρόλυση ορίζεται η κατάρριψη ενός κυττάρου, συχνά από ιούς και ενζυμικούς ή οσμωτικούς μηχανισμούς που θέτουν σε κίνδυνο την ακεραιότητά του. Το ρευστό υπόλειμμα που περιέχει τα περιεχόμενα των λυμένων κυττάρων ονομάζεται «λύμα». Η λύση των κυττάρων χρησιμοποιείται όταν είναι επιθυμητό να σπάσει το κύτταρο και παράλληλα να αποφευχθούν διατμητικές δυνάμεις που μετουσιώνουν ή υποβαθμίζουν τα ευαίσθητα περιεχόμενα μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες.

Στο εργαστήριο η κυτταρόλυση επιδιώκεται με δύο βασικούς μηχανισμούς:

- Χημικά με τη χρήση κατάλληλων διαλυμάτων και αναστολέων επιζήμιων ενζύμων
- Μηχανικά με τη χρήση διαφόρων τεχνικών κυτταρικής διάσπασης

4.1 ΧΗΜΙΚΗ ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

4.1.1. ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΛΥΣΕΩΣ

Το **ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Lysis Buffer)**, είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται με σκοπό τη λύση των κυττάρων σε πειράματα μοριακής βιολογίας με σκοπό την ανάλυση των ενώσεων των κυττάρων. Κατά τη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών πρέπει να διασφαλίζονται μη αποδιατακτικές συνθήκες ώστε να παραμείνουν αναλλοίωτες οι ενώσεις και τα συστατικά στο εσωτερικό του κυττάρου. Υπάρχουν ποικίλοι τύποι ρυθμιστικών διαλυμάτων καθένα, όμως, έχει ως βάση ένα απορρυπαντικό και ένα σύνολο αντιδραστηρίων. Προκειμένου να διασφαλιστεί η αποτελεσματική λύση των κυττάρων και η εξαγωγή των πρωτεϊνών από αυτά απαιτείται διαφορετική συνταγοποίηση ρυθμιστικού ανάλογα με τα διαφορετικά είδη οργανισμών και τους διάφορους τύπους κυττάρων και ιστών.

Στο εργαστήριο η βασική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση πρωτεϊνών και τη συλλογή δεδομένων αποτελεί η μέτρηση ELISA η οποία περιγράφεται παραπάνω οπότε είναι αναγκαία η παρασκευή ενός ρυθμιστικού διαλύματος κατάλληλου για την εφαρμογή αυτή.

Για το σκοπό αυτό, αρχικά έγινε μία έρευνα στα συστατικά που χρησιμοποιούνται γενικά στα ρυθμιστικά διαλύματα λύσης και δημιουργήθηκαν διαφορετικές συνταγές ώστε να βρεθεί η βέλτιστη για την επιθυμητή εφαρμογή.

Τα συστατικά αυτά παρουσιάζονται παρακάτω:

➤ **ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ (BUFFER SOLUTION)**

Το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελεί το βασικό μέσο στο οποίο προστίθενται τα λοιπά συστατικά που απαιτούνται για την κάθε διαδικασία που πραγματοποιείται στο δείγμα. Πρόκειται στην ουσία για ένα υδατικό διάλυμα αποτελούμενο από ένα μίγμα ασθενούς οξέος και της βάσης του ή μίας ασθενούς βάσης και του συζυγούς οξέος της. Το pH του διαλύματος αυτός αλλάζει ελάχιστα όταν προστίθεται σε αυτό μικρή ποσότητα ισχυρού οξέος ή βάσης. Ως αποτέλεσμα της ιδιότητας αυτής προλαμβάνει αλλαγές στο pH του διαλύματος. Γενικά, τα ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιούνται ως μέσο διατήρησης του pH σε μία σχεδόν σταθερή τιμή σε μία ευρεία ποικιλία χημικών εφαρμογών. Πολλές μορφές ζωής ευδοκιμούν σε ένα σχετικό μικρό φάσμα pH οπότε χρησιμοποιείται ένα ρυθμιστικό διάλυμα για τη διασφάλιση σταθερού pH. Ακόμη, τα ρυθμιστικά διαλύματα είναι απαραίτητα για τη διατήρηση του κατάλληλου pH για τη λειτουργία των ενζύμων και των πρωτεϊνών σε πολλούς οργανισμούς. Η πλειοψηφία των ενζύμων και των πρωτεϊνών λειτουργούν μόνο υπό πολύ συγκεκριμένες συνθήκες. Σε περίπτωση που το pH κινηθεί εκτός ενός πολύ στενού φάσματος, τα ένζυμα επιβραδύνονται ή παύουν να λειτουργούν ενώ, είναι πιθανόν να μετουσιωθούν. Σε πολλές περιπτώσεις η μετουσίωση μπορεί να απενεργοποιήσει μόνιμα την καταλυτική τους δράση.

Σε βιολογικά πειράματα όπως η μέτρηση φωσφοπρωτεϊνών σε κύτταρα που έχουν υποστεί κυτταρόλυση χρησιμοποιούνται κυρίως τα ρυθμιστικά διαλύματα Tris-HCl και MOPS. Η διαφορά τους έγκειται στο οξύ και την αντίστοιχη βάση που περιέχουν ενώ έχουν και διαφορετικό μοριακό βάρος.

➤ **ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ**

Η γλυκερόλη ανήκει στην οικογένεια των αλκοολών και χρησιμοποιείται ευρέως στα εργαστήρια ως σταθεροποιητής και ως κρυο-προστατευτικό για να αποφεύγεται το πάγωμα και η αύξηση της πυκνότητας των υγρών.

Ακόμη, σε περίπτωση κατάψυξης και απόψυξης από τους -20°C η γλυκερόλη ελαχιστοποιεί τη διάσπαση και εμποδίζει την καθίζηση των πρωτεϊνών.

➤ **ΆΛΑΤΑ**

Τα άλατα και συγκεκριμένα το χλωριούχο νάτριο, NaCl και το χλωριούχο κάλιο, KCl διατηρούν την ιοντική ισχύ του διαλύματος, δηλαδή τη συνολική συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών στο εξωτερικών των κυττάρων. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένου ότι το νερό

μπορεί να διαχυθεί διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών από περιοχές χαμηλής συγκέντρωσης διαλυτής ουσίας σε περιοχές με υψηλή συγκέντρωση διαλυμένης ουσίας.

Τόσο το NaCl όσο και το KCl λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο ωστόσο το χλωριούχο νάτριο χρησιμοποιείται στις περισσότερες εφαρμογές λόγω του πιο χαμηλού κόστους.

➤ ΑΠΟΡΡΥΠΑΝΤΙΚΑ

Το απορρυπαντικό είναι το βασικό συστατικό που διαλύει την κυτταρική μεμβράνη ώστε να μπορούν να διαφύγουν τα περιεχόμενα συστατικά. Στη βιολογική έρευνα, τα απορρυπαντικά χρησιμοποιούνται για τη λύση των κυττάρων (ώστε να απελευθερωθούν οι διαλυτές πρωτεΐνες), τη διαλυτοποίηση των μεμβρανωδών πρωτεϊνών και λιπιδίων και τον έλεγχο της πρωτεϊνικής κρυσταλλοποίησης. Ακόμη, τα μόρια του απορρυπαντικού επιτρέπουν την ανάμιξη των αδιάλυτων σε νερό και υδροφοβικών συστατικών σε υδατικά μέσα ενώ εξάγουν και διαλυτοποιούν τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης. Η αναλογία απορρυπαντικού προς πρωτεΐνη είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διαλυτοποίηση. Σε χαμηλές αναλογίες (1:10) οι μεμβράνες υποβάλλονται σε λύση και τα μεγάλα συσσωματώματα που σχηματίζονται περιέχουν πρωτεΐνες, απορρυπαντικά, και τα λιπίδια της μεμβράνης. Με προοδευτικά μεγαλύτερα ποσοστά λαμβάνονται μικρότερα συσσωματώματα. Τέλος, σε αναλογίες 10:01 έως 20:01 σχηματίζονται μεμονωμένα συσσωματώματα απορρυπαντικού-πρωτεΐνης τα οποία δεν περιέχουν λιπίδια της μεμβράνης. Προκειμένου να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες, είναι σημαντικό να τροποποιείται η συγκέντρωση τόσο του απορρυπαντικού όσο και της πρωτεΐνης. Μέτριες συγκεντρώσεις ήπιων απορρυπαντικών θέτουν σε κίνδυνο την ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών, διευκολύνοντας έτσι την λύση των κυττάρων και την εκχύλιση της διαλυτής πρωτεΐνης, συχνά σε φυσική μορφή.

Υπάρχουν ποικίλα είδη απορρυπαντικών που χρησιμοποιούνται σε βιολογικές εφαρμογές. Κάποια από αυτά λειτουργούν αποδιατακτικά για τις φωσφοπρωτεΐνες, δηλαδή τις πρωτεΐνες-σήματα. Τα απορρυπαντικά αυτά διασπούν τους μη-ομοιοπολικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και έτσι τα μόρια χάνουν το αρχικό τους σχήμα. Τα πιο συνήθη δραστικά απορρυπαντικά είναι το SDS και το DOC. Ωστόσο, σε περιπτώσεις μετρήσεων φωσφοπρωτεϊνών είναι αναγκαία η διατήρηση της τεταρτοταγής δομής των μορίων ώστε να είναι ανιχνεύσιμα κατά την τελική μέτρηση. Για το λόγο αυτό υπάρχουν και πιο ήπια απορρυπαντικά τα οποία διαταράσσουν την κυτταρική μεμβράνη αλλά δεν διασπούν τις πρωτεΐνες-σήματα. Συγκεκριμένα, στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα απορρυπαντικά IGEPAL, Triton-X, NP-40.

➤ **ΧΗΛΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ (METAL CHELATORS)**

Οι χηλικές ενώσεις χρησιμοποιούνται για τη δέσμευση ιόντων μετάλλου. Οι ενώσεις αυτές που χρησιμοποιούνται σε βιολογικές εφαρμογές είναι το EDTA ή αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ και το EGTA ή αιθυλενογλυκολικό τετραοξικό οξύ. Οι δύο αυτοί παράγοντες αναστέλλουν ένα φάσμα μεταλλοπεπτιδασών. Ως μεταλλοπεπτιδάση ή μεταλλοπρωτεάση, ορίζεται κάθε ένζυμο πρωτεάσης της οποίας ο καταλυτικός μηχανισμός περιλαμβάνει ένα μέταλλο. Η μέθοδος αναστολής τους με χηλικά αντιδραστήρια πραγματοποιείται μέσω της αποσιδήρωσης του μεταλλικού ιόντος που απαιτείται για την καταλυτική δραστηριότητα της πρωτεάσης.

Σε γενικές γραμμές, το EDTA μειώνει την αντιδραστικότητα ενός μετάλλου, αποτρέποντας τυχόν ανεπιθύμητα αποτελέσματα που μπορεί να προκύψουν από την παρουσία του. Το EDTA χρησιμοποιείται σε μορφή άλατος, πιθανότατα σαν δινάλτριο ή δινάλτριο ασβεστίου. Δεσμεύει κυρίως το Μαγνήσιο και τον ψευδάργυρο.

Το EGTA έχει χαμηλότερη συγγένεια για το μαγνήσιο σε σύγκριση με το EDTA ενώ είναι πιο εκλεκτικό ως προς τα ιόντα ασβεστίου. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για τη παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων που προσομοιάζουν το περιβάλλον μέσα σε ζωντανά κύτταρα, όπου τα ιόντα ασβεστίου είναι συνήθως σε συγκέντρωση τουλάχιστον χίλιες φορές μικρότερη από αυτή του μαγνησίου.

➤ **BSA (BOVINE SERUM ALBUMIN Η ΑΛΒΟΥΜΙΝΗ ΒΟΟΕΙΔΟΥΣ ΟΡΟΥ)**

Πρόκειται για μία πρωτεΐνη ορού λευκωματικής προερχόμενη από αγελάδες. Χρησιμοποιείται ευρέως ως μέτρο για τη συγκέντρωση πρωτεϊνών σε εργαστηριακά πειράματα. Η διαδεδομένη χρήση του οφείλεται στην σταθερότητα με την αυξάνει το σήμα σε βιολογικές εφαρμογές, την έλλειψη επίδρασης σε βιοχημικές αντιδράσεις και το χαμηλό κόστος. Ως συστατικό σε ρυθμιστικά διαλύματα, συμβάλλει στη σταθεροποίηση ορισμένων ενζύμων κατά τη διαδικασία της πέψης και εμποδίζει την προσκόλληση των ενζύμων σε σωλήνες αντίδρασης, στις άκρες της πιπέτας και σε άλλα σκεύη. Η πρωτεΐνη αυτή δεν επηρεάζει ένζυμα τα οποία δεν την έχουν ανάγκη για τη σταθεροποίησή τους.

➤ **NAN3 (SODIUM AZIDE Η ΑΖΙΔΙΟ ΤΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ)**

Είναι ανόργανη, ιοντική ουσία, ιδιαίτερα διαλυτή στο νερό και πολύ έντονα τοξική. Σε μερικές περιπτώσεις προστίθεται σε ρυθμιστικά διαλύματα για βιολογικές εφαρμογές προκειμένου να αναστείλει την ανάπτυξη βακτηριδίων και να προστατεύσει το δείγμα από επιμολύνσεις.

4.1.2. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

Η κυτταρόλυση διαταράσσει το προσεκτικά ελεγχόμενο κυτταρικό περιβάλλον, επιτρέποντας την απορύθμιση των ενδογενών πρωτεϊνών και φωσφατασών. Η δραστηριότητα αυτών των μορίων διασπών ή τροποποιούν τεχνητώς τις εξαγόμενες πρωτεΐνες κάποιες από τις οποίες αποτελούν και τα επιθυμητά μετρούμενα σήματα. Προκειμένου να αποφευχθούν αυτές οι επιπτώσεις και να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή απόδοση και έκφραση πρωτεϊνών κατά τη κυτταρόλυση, προστίθενται αναστολείς πρωτεασών και αναστολείς φωσφατασών στα αντιδραστήρια της λύσης. Οι αναστολείς αυτοί συνδέονται με τα δραστικά μόρια με αναστρέψιμο ή μη αναστρέψιμο τρόπο. Πολυάριθμες ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί και χρησιμοποιηθεί με σκοπό την αδρανοποίηση και παρεμπόδιση των δραστηριοτήτων των πρωτεασών και φωσφατασών.

Όταν ο στόχος της κυτταρικής λύσης είναι να καθαρίσει ή να δοκιμάζει τη λειτουργία μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στις επιδράσεις των αντιδραστηρίων λύσεως σχετικά με τη σταθερότητα και την λειτουργία της πρωτεΐνης που ενδιαφέρει.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται ξεχωριστά καθένας αναστολέας καθώς και ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιείται στη λύση των κυττάρων.

4.1.2.1 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ

Ως πρωτεάση καλείται οποιοδήποτε ένζυμο εκτελεί πρωτεόλυση, δηλαδή, αρχίζει τον καταβολισμό των πρωτεϊνών με υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών που συνδέουν τα αμινοξέα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα που σχηματίζει την πρωτεΐνη. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες πρωτεασών καθεμία από τις οποίες μπορεί να εκτελεί την ίδια αντίδραση με εντελώς διαφορετικούς καταλυτικούς μηχανισμούς. Αντίστοιχα, υπάρχουν αναστολείς πρωτεασών διαφορετικοί μεταξύ τους. Όταν γίνεται επεξεργασία κυττάρων ή ιστών αναμένεται η παρουσία ενεργών πρωτεασών. Επομένως, θα πρέπει το διάλυμα κυτταρόλυσης να περιέχει αναστολείς πρωτεασών. Για να διασφαλιστεί η μέγιστη δραστηριότητα των αναστολέων συνίσταται η προσθήκη τους στο τελικό διάλυμα ακριβώς προτού χρησιμοποιηθεί. Τυπικά, οι αναστολείς των πρωτεασών δεν θα πρέπει να διαλύονται στα ρυθμιστικά διαλύματα και να φυλάσσονται σε αυτά για μεγάλο χρονικό διάστημα. Κάθε τύπος κυττάρου και ιστού εκφράζει διαφορετικά προφίλ πρωτεασών. Επομένως, το κάθε μίγμα διαμορφώνεται με διαφορετικά σύνολα αναστολέων. Με βάση τη βιβλιογραφία και τη μελέτη διαφόρων συνταγών και πρωτοκόλλων κυτταρόλυσης οι βασικοί αναστολείς που ενδιαφέρουν την πειραματική διαδικασία της παρούσας εργασίας είναι οι ακόλουθοι:

➤ **AEBSE**

Πρόκειται για μη αναστρέψιμο αναστολέα της πρωτεάσης σερίνη, είναι διαλυτός στο νερό και έχει μοριακό βάρος 239,5 Da. Τυπικά, χρησιμοποιείται σε ποσότητες 0.1 - 1.0 mM.

➤ **PMSF**

Είναι ένας αναστολέας της πρωτεάσης σερίνης που χρησιμοποιείται ευρέως στην παρασκευή προϊόντων για τη λύση κυττάρων. Συνδέεται επιλεκτικά με το δραστικό τμήμα της πρωτεάσης σερίνης. Ωστόσο, το PMSF δεν αναστέλλει όλες τις πρωτεάσες σερίνης. Χρησιμοποιείται συνήθως για τη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών προκειμένου να ανασταλεί η πέψη των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος από τις πρωτεάσες μετά την κυτταρική λύση. Διαλύεται ταχέως στο νερό και αποθεματικά διαλύματα φυλάσσονται σε αιθανόλη, ισοπροπανόλη ή DMSO. Χρησιμοποιείται σε ποσότητες 0.1-1.0 mM. Έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής και συγκεκριμένα σε θερμοκρασία 25°C η ημιζωή του είναι 110 λεπτά σε pH 7.55, 55 λεπτά σε pH 7.5 και 35 λεπτά σε pH 8.

➤ **BENZAMIDINE (BENZAMIDINE)**

Είναι ένας αναστρέψιμος αναστολέας τρυψίνης, ενζύμων τύπου τρυψίνης και πρωτεασών σερίνης.

➤ **PEPSTATIN A (PEPSTATIN A)**

Πρόκειται για ισχυρό αναστολέα πρωτεασών. Είναι αδιάλυτη στο νερό αλλά διαλύεται σε μεθανόλη, αιθανόλη ή DMSO με προσθήκη οξέος στο διάλυμα.

➤ **LEUPREPTIN (LEUPREPTIN)**

Είναι ένας φυσικός αναστολέας πρωτεάσης ο οποίος παρεμποδίζει πεπτιδάσες (πρωτεολυτικά ένζυμα) σερίνης, θρεονίνης και κυστεΐνης. Η προτεινόμενη συγκέντρωση είναι 1-10 μM (0.5-5 μg / ml).

➤ **APROTININ (APROTININ)**

Πρόκειται για αναστολέα των πρωτεασών τρυψίνης και των πρωτεολυτικών ενζύμων που συνδέονται με αυτή.

➤ **BESTATIN (BESTATIN)**

Είναι ανταγωνιστικός αναστολέας πρωτεασών, κυρίως αμινοπεπτιδασών.

➤ **E64**

Είναι ένα εποξειδίο το οποίο μπορεί να αναστείλει μη αντιστρεπτά ένα ευρύ φάσμα πεπτιδασών κυστεΐνης όπως παπαΐνη, καθεψίνη B, καθεψίνη L και καλπαΐνη.

4.1.2.2 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΩΝ

Προκειμένου να γίνει κατανοητή η χρήση των αναστολέων των φωσφατασών εξηγείται πρώτα η έννοια και διαδικασία της φωσφορυλίωσης. Ουσιαστικά, η φωσφορυλίωση είναι η τροποποίηση μίας πρωτεΐνης με την προσθήκη μίας φωσφορικής ομάδας σε ένα αμινοξύ της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Το αμινοξύ στο οποίο συνδέεται ομοιοπολικά η φωσφορική ομάδα είναι συνήθως μία σερίνη είτε μία θρεονίνη είτε μία τυροσίνη. Με την προσθήκη ή αφαίρεση αυτής της φωσφορικής ομάδας ρυθμίζεται η λειτουργία μίας πρωτεΐνης. Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις η πρωτεΐνη μεταβαίνει από μία φωσφορυλιωμένη μορφή σε μία μη-φωσφορυλιωμένη μορφή όπου η μία αποτελεί την ενεργή φάση και η άλλη την ανενεργή φάση της εν λόγω πρωτεΐνης. Σε κάποιες αντιδράσεις η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης προκαλεί τη δέσμευση της με άλλες πρωτεΐνες οι οποίες φέρουν κατάλληλους υποδοχείς για μία φωσφορυλιωμένη τυροσίνη, θρεονίνη ή σερίνη. Ως αποτέλεσμα της δέσμευσης αυτής, μπορεί να ενεργοποιηθεί ή να ανασταλεί ένα διακριτό σύστημα σηματοδότησης. Η διαδικασία αυτή είναι το κλειδί για τον εντοπισμό και την μέτρηση σημάτων στο εσωτερικό των κυττάρων υπό συγκεκριμένο εξωτερικό ερέθισμα.

Η φωσφατάση είναι ένα ένζυμο που απομακρύνει τη φωσφορική ομάδα από το αμινοξύ στο οποίο συνδέεται κατά τη φωσφορυλίωση. Η δράση αυτή είναι ευθέως αντίθετη με εκείνη των φωσφορυλασών και κινασών, οι οποίες αποδίδουν φωσφορικές ομάδες στην εκάστοτε πρωτεΐνη. Ως αποτέλεσμα η λειτουργία της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης αναστέλλεται και το ενεργοποιούμενο σήμα χάνεται.

Για το λόγο αυτό είναι αναγκαία η αναστολή της δράσης των φωσφατασών ώστε να εντοπιστούν τα ενεργοποιούμενα σήματα κατά τις πειραματικές μετρήσεις. Το ρόλο αυτό αναλαμβάνουν οι αναστολείς των φωσφατασών οι οποίες εμποδίζουν την δράση των εν λόγω ενζύμων. Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι αναστολείς :

➤ **B-ΓΛΥΚΕΡΟΦΩΣΦΟΡΙΚΟ (B-GLYCEROPHOSPHATE)**

Αναστέλλει τις φωσφατάσες πρωτεϊνών σερίνης. Είναι διαλυτό στο νερό και χρησιμοποιείται σε ποσότητες από 1mM έως 60mM.

➤ **ΔΙΦΩΣΦΟΡΙΚΟ ΝΑΤΡΙΟ (SODIUM PYROPHOSPHATE)**

Χρησιμοποιείται για την αναστολή φωσφατασών πρωτεϊνών σερίνης. Διαλύεται σε νερό και η χρησιμοποιούμενη ποσότητα είναι 20mM.

➤ **ΟΡΘΟΒΑΝΑΔΙΚΟ ΝΑΤΡΙΟ (SODIUM ORTHOVANADATE)**

Είναι αναστολέας των φωσφατασών των πρωτεϊνών τυροσίνης. Συνήθως χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση από 1 έως 10mM. Είναι τοξικό όταν εισπνέεται, καταπίνεται ή έρχεται σε επαφή με το δέρμα. Διαλύεται σε νερό.

➤ ΦΘΟΡΙΟΥΧΟ ΝΑΤΡΙΟ(SODIUM FLUORIDE)

Πρόκειται για αναστολέα φωσφατασών σερίνης και είναι υδροδιαλυτό. Η χρησιμοποιούμενη ποσότητα κυμαίνεται από 5 έως 50 mM.

4.2. ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφονται οι μέθοδοι που περιλαμβάνονται στην πειραματική διαδικασία όπως προέκυψε μέσω της βιβλιογραφίας και τη μελέτη ποικίλων πρωτοκόλλων για την επίτευξη της κυτταρόλυσης. Γενικά, η διαδικασία είναι η εξής.

Αρχικά, τα κύτταρα διεγείρονται με τον παράγοντα ενδιαφέροντος όπως ένας αυξητικός παράγοντας ή μία ορμόνη. Η διέγερση μπορεί να συμβεί για διαφορετικά χρονικά διαστήματα για χρονική μελέτη και ανάλυση. Έπειτα τα κύτταρα λύνονται και υπόκεινται σε ενζυματική πέψη. Η λύση των κυττάρων βελτιώνεται με διάφορες τεχνικές οι οποίες περιγράφονται τη συνέχεια.

➤ ΠΛΥΣΗ (WASH)

Η διαδικασία αυτή αφορά στον καθαρισμό και στην αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και του ερεθίσματος από το δείγμα κυττάρων. Αρχικά, αφαιρείται το υλικό στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα και έπειτα το δείγμα ξεπλένεται με PBS. Το PBS είναι ένα αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate buffered saline) το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως στη βιολογική έρευνα. Είναι ένα διάλυμα άλατος με βάση το νερό που περιέχει φωσφορικό νάτριο, χλωριούχο νάτριο και, σε ορισμένες συνταγές, χλωριούχο κάλιο και φωσφορικό κάλιο. Το διάλυμα αυτό διαθέτει οσμωτικότητα και συγκέντρωση ιόντων ταιριάζουν με εκείνες του ανθρωπίνου σώματος

Με τον πλύση καθαρίζεται το δείγμα από υπολείμματα των ερεθισμάτων και των ουσιών που πιθανόν εκκρίνει τα κύτταρα ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού τους. Ο αριθμός των κύκλων πλύσης κυμαίνεται μεταξύ 1 έως 5. Συνήθως, όμως, δεν υπερβαίνει τις 3 επαναλήψεις.

➤ ΑΝΑΜΕΙΞΗ (SHAKING)

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μετά την προσθήκη του διαλύματος κυτταρόλυσης και των αναστολέων στο εξεταζόμενο δείγμα. Κατά την ανάμειξη το δείγμα τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή η οποία προκαλεί συνεχείς δονήσεις, ανακατεύοντας το υγρό περιεχόμενο ενισχύοντας τη δράση του διαλύματος κυτταρόλυσης. Η διάρκεια και η ένταση της διαδικασίας ποικίλει. Κατά την ανάμειξη η θερμοκρασία του δείγματος πρέπει να διατηρείται κοντά στους 4°C. Για το λόγο

αυτό το δείγμα τοποθετείται στην συσκευή πάνω σε παγοκύστη ή καλύτερα ολόκληρη η συσκευή τοποθετείται μέσα σε ψυγείο.

➤ ΥΠΕΡΗΧΟΙ (SONICATION)

Η επεξεργασία με υπερήχους είναι μία από τις πιο αποτελεσματικές μεθόδους φυσικής διακοπής που χρησιμοποιείται για να διασπαστούν τα κύτταρα. Η μέθοδος χρησιμοποιεί παλμικά ηχητικά κύματα υψηλής συχνότητας με σκοπό την ταραχή και τη λύση κυττάρων, βακτηρίων, σπόρων και ψιλών φλουδών ιστού. Τα ηχητικά κύματα παρέχονται από μία συσκευή με λουτρό υπερήχων μέσα στο οποίο τοποθετείται το κυτταρόλυμα. Εναλλακτικά ένας καθέτηρας-πομπός που παράγει υπέρηχους τοποθετείται μέσα στο δείγμα-κυτταρόλυμα. Το εργαστήριο διαθέτει συσκευή με λουτρό υπερήχων για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται αυτή η μέθοδος κατά την πειραματική διαδικασία.

Η ισχύς που παράγεται από τους υπερήχους συντελεί στη διάσπαση των κυττάρων. Έτσι κατά τη μέτρηση των φωσφοπρωτεϊνών στο εξεταζόμενο δείγμα ισχυροποιούνται τα σήματα και μειώνεται ο θόρυβος που μπορεί να οφείλεται σε ακαθαρσίες. Ωστόσο, η επεξεργασία με υπερήχους αυξάνει τη θερμοκρασία του δείγματος λόγω της συσσώρευσης θερμότητας. Γενικά, η θερμοκρασιακή αύξηση προκαλεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών και κατ'επέκταση διατάραξη των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεϊνών.

Προκειμένου να αποτραπεί η υπερβολική θέρμανση και η επερχόμενη μετουσίωση των πρωτεϊνών, η υπερηχητική επεξεργασία εφαρμόζεται συνήθως σε πολλαπλές μικρές δόσεις σε ένα δείγμα που εμβαπτίζεται μέσα σε λουτρό υπερήχων. Κατά τα διαλείμματα είναι προτιμότερο το κυτταρόλυμα να τοποθετείται σε πάγο προκειμένου να διατηρηθεί η θερμοκρασία του περιβάλλοντος των πρωτεϊνών σε χαμηλά επίπεδα. Ο χρόνος του παλμού θα πρέπει να είναι αρκετά μικρός ώστε να μην παράγεται υπερβολική θερμότητα και ο χρόνος ανάπαυσης θα πρέπει να είναι ένα χρονικό διάστημα αρκετό ώστε να διασφαλιστεί η ψύξη και η επαναφορά της θερμοκρασίας σε χαμηλά επίπεδα κατάλληλα για τη διατήρηση της δομής των πρωτεϊνών στο δείγμα. Η επεξεργασία με υπερήχους είναι πιο κατάλληλη για όγκους μικρότερους των 100 ml.

Τα σημεία που εξετάζονται είναι:

- η χρονική διαδικασία της κατεργασίας με υπερήχους
- η παραγόμενη ισχύς από το λουτρό υπερήχων
- κατά πόσο οι υπέρηχοι όντως συντελούν στη μέτρηση καλύτερων φωσφοπρωτεϊνικών σημάτων.

➤ ΚΑΤΑΨΥΞΗ/ΑΠΟΨΥΞΗ (FREEZE/THAW)

Η μέθοδος ψύξης/απόψυξης χρησιμοποιείται κυρίως για τη λύση βακτηρίων και κυττάρων θηλαστικών. Η τεχνική περιλαμβάνει την κατάψυξη ενός εναιωρήματος κυττάρων σε ένα λουτρό ξηρού πάγου και αιθανόλης ή μέσα σε καταψύκτη και στη συνέχεια την τήξη του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 37°C. Αυτή η μέθοδος προκαλεί διόγκωση και πλήρη διάσπαση των κυττάρων σαν κρύσταλλοι πάγου που σχηματίζονται κατά την κατάψυξη και συστέλλονται κατά την απόψυξη. Πολλαπλοί κύκλοι αυτής της διαδικασίας μπορεί να είναι απαραίτητοι για την αποτελεσματική κυτταρόλυση και είναι μία μέθοδος αρκετά χρονοβόρα. Παρόλα αυτά η κατάψυξη/απόψυξη φαίνεται να απελευθερώνει αποτελεσματικά ανασυνδεδεμένες πρωτεΐνες που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα βακτηρίων και συνίσταται για τη λύση θηλαστικών κυττάρων σε ορισμένα πρωτόκολλα. Η μέθοδος αυτή εάν και θεωρείται λίγο αποτελεσματική από πιο δραστικές μεθόδους που περιγράφηκαν παραπάνω είναι δύσκολο να προκαλέσει μετουσίωση και αποδιάταξη των πρωτεϊνών-σημάτων στο εξεταζόμενο δείγμα.

➤ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ (CENTRIFUGE)

Κατά τη φυγοκέντριση το δείγμα τοποθετείται σε φυγόκεντρο ώστε να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες-σήματα από τα υπολείμματα της διάσπασης των κυττάρων. Ως αποτέλεσμα της κυτταρόλυσης τα συστατικά και τα περιεχόμενα των κυττάρων αποσυντίθενται και έτσι απελευθερώνονται και οι πρωτεΐνες-σήματα που ενεργοποιούνται στο εσωτερικό τους.

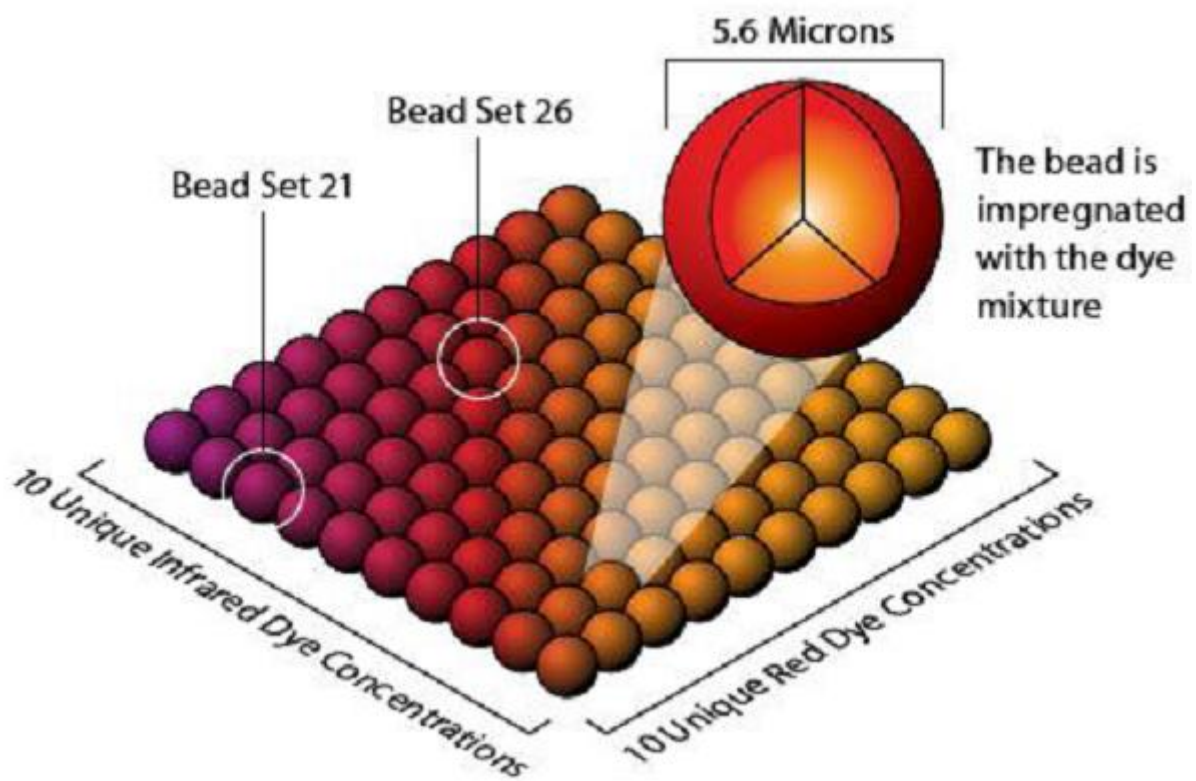
4.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΤΕΧΝΙΚΗ ELISA

Η **εντόπιση μιας πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο**, και γενικότερα μέσα στον οργανισμό είναι το ίδιο σημαντική για τη μελέτη της φυσιολογικής της δράσης με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας αμινοξέων και της δομής της πρωτεΐνης. Για το εντοπισμό μιας πρωτεΐνης χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά **αντισώματα**, τα οποία προσδένουν την πρωτεΐνη με την οποία εμφανίζουν συγγένεια. Τα αντισώματα αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη περιοχή της πρωτεΐνης, το **αντιγόνο**, στην οποία και προσδένονται. Στη συνέχεια, ιχνηθετημένα με φθορίζουσες ή ραδιενεργές ουσίες αντισώματα προσδένουν στα πρώτα και επιτρέπουν τον εντοπισμό τους. Τα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται ευρέως στις εργαστηριακές εξετάσεις επειδή είναι εξειδικευμένα, με αποτέλεσμα να συνδέονται με ένα μόνο αντιγόνο.

Υπάρχουν αρκετές τεχνικές που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα για να εντοπιστεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται σε ένα διάλυμα, όπως για παράδειγμα ο ορός του αίματος, χρησιμοποιείται η ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική μέτρηση, γνωστή εν συντομία ως **ELISA** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση και την ποσοτική μέτρηση πρωτεϊνών σε δείγματα.

Σύμφωνα με τη τεχνική μέτρησης ELISA, οι αναλύτες, δηλαδή η πρωτεΐνη-στόχος, ακινητοποιούνται πάνω στην επιφάνεια **μικροσφαιριδίων (beads)**. Σε αντίθεση με τη συνήθη τεχνική της παθητικής προσρόφησης (adsorption) πάνω σε ακίνητη, επίπεδη επιφάνεια, τα μικροσφαιρίδια (διαμέτρου 5,6μm) έχουν τη δυνατότητα να κινούνται μέσα στο δείγμα καθώς και να επηρεάζονται από τα μαγνητικά πεδία λόγω του σιδήρου που περιέχουν (σε ποσοστό 2%-4%).

Τα μικροσφαιρίδια είναι χρωματισμένα με ειδική φθορίζουσα βαφή, ώστε το κάθε ένα (ή η κάθε ομάδα) να χαρακτηρίζεται από μια ξεχωριστή χρωματική ταυτότητα. Ο διαχωρισμός των μικροσφαιριδίων αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την πολυπλεξία της μεθόδου, διότι έτσι μπορούμε να αντιστοιχίσουμε τα μικροσφαιρίδια στους διάφορους αναλύτες που μας ενδιαφέρουν.

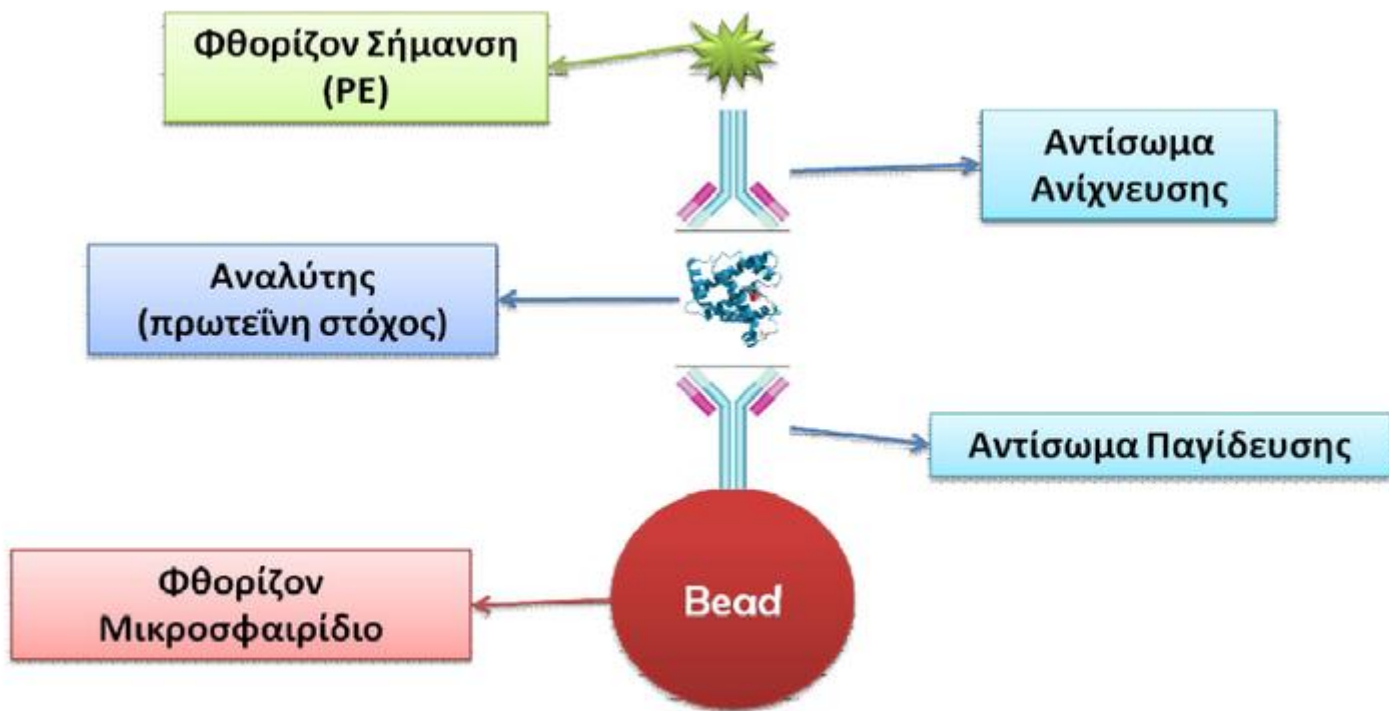


Εικόνα 4.3.1

Η προσρόφηση δεν γίνεται απευθείας στην επιφάνεια, αλλά από τα αντισώματα παγίδευσης (ή πρωτεύον αντίσωμα – Capture/Primary Antibody) με τα οποία έχουν προ-επικαλυφθεί τα μικροσφαιρίδια.

Αυτό το είδος προσρόφησης λέγεται επιλεκτική (specific binding), διότι τα αντισώματα έχουν την ιδιότητα να αντιδρούν επιλεκτικά, ως ένα βαθμό, με τους αναλύτες, ενώ όταν η προσρόφηση γίνεται απ' ευθείας στην επιφάνεια τότε λέγεται μη-επιλεκτική, διότι η επιφάνεια δεν έχει την

ιδιότητα να ξεχωρίζει τους αναλυτές ή οποιαδήποτε άλλη βιομοριακή ουσία μπορεί να υπάρχει στο δείγμα. Λόγω της χρήσης δύο αντισωμάτων για την ανίχνευση ενός αναλύτη, η τεχνική καλείται **bead-based Sandwich ELISA**.



Εικόνα 4.3.2

Τα αντισώματα ανίχνευσης σημαίνονται με διαφορετικού χρώματος βαφή (πράσινη) από τα μικροσφαιρίδια (συνδυασμός ερυθρής και υπέρυθρης).

Για την μέτρηση, τα μικροσφαιρίδια αφήνονται να επωαστούν πρώτα μαζί με το δείγμα και στη συνέχεια με τα αντισώματα ανίχνευσης και κατόπιν αναγκάζονται να περάσουν μέσα από δύο συστήματα ανίχνευσης φωτεινότητας: ένα για την αναγνώριση της χρωματικής ταυτότητας του μικροσφαιριδίου, η οποία γίνεται μέσω της αναγνώρισης έντασης φωτεινότητας κάθε βαφής και του συνδυασμού τους, και ένα για την αναγνώριση της έντασης φωτεινότητας της βαφής των σημασμένων αντισωμάτων ανίχνευσης, η οποία θεωρείται ανάλογη του πλήθους τους (θεωρείται ότι κάθε αντίσωμα εκπέμπει στην ίδια ένταση).

Η τεχνική της bead-based Sandwich ELISA αποτελεί το βασικό εργαλείο για την εξαγωγή πρωτεονιμικών δεδομένων στο εργαστήριο.

Τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:

- Η δυνατότητα καθοδήγησης των μικροσφαιριδίων (είτε μαγνητικά είτε μηχανικά) και άρα αυτοματοποίησης της διαδικασίας.
- Η εξάλειψη των προβλημάτων της αντίδρασης υγρής-στερεάς φάσης.
- Ευκολότερη πολυπλεξία, καθώς αρκεί να προστεθούν στο μίγμα μικροσφαιρίδια διαφορετικών χρωμάτων, ενώ στην επίπεδη επιφάνεια πρέπει να χωριστεί η επιφάνεια σε περιοχές μειώνοντας έτσι την συνολική επιφάνεια αντίδρασης.
- Μεγαλύτερη οικονομία σε χρόνο και κόστος για τον ίδιο όγκο δεδομένων.

Προτού ξεκινήσει ένα πείραμα είναι αναγκαία η καλλιέργεια της κατάλληλης κυτταροσειράς. Η καλλιέργεια περιλαμβάνει κάποιες διαδικασίες καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο εργαστηριακό πρωτόκολλο.

5.1.ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια κυττάρων στην παρούσα εργασία είναι τα εξής:

i. Ξεπάγωμα κυττάρων

Όλα τα κύτταρα φυλάσσονται σε υγρό άζωτο σε θερμοκρασία -196°C σε μικρά φυαλίδια χωρητικότητας 1ml σε συγκέντρωση 10^6 κύτταρα/ml.

Συνεπώς, πρώτο βήμα για την έναρξη της καλλιέργειας είναι η μεταφορά των κυττάρων από τις συνθήκες φύλαξης σε συνθήκες κατάλληλες για την ανάπτυξη τους. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας τα κύτταρα βρίσκονται σε τρυβλίο διαμέτρου 10cm με κατάλληλο θρεπτικό υλικό και τοποθετούνται σε επωαστήρα που προσομοιάζει τις συνθήκες στο εσωτερικό του ανθρώπινου σώματος, δηλαδή 37°C , 5% CO_2 και 100% υγρασία. Το ακολουθούμενο πρωτόκολλο περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Σε ένα κωνικό σωλήνα χωρητικότητας 50ml ο οποίος επισημαίνεται ως «Κύτταρα» τοποθετούνται 10ml θρεπτικού υλικού. Σε ένα δεύτερο ίδιο σωλήνα ο οποίος επισημαίνεται ως «Υλικό» τοποθετούνται 12ml θρεπτικού υλικού.
2. Το φιαλίδιο με την επιθυμητή κυτταροσειρά βγαίνει από το υγρό άζωτο.
3. Το περιεχόμενο του φιαλιδίου ζεσταίνεται λίγο τρίβοντας με το χέρι ή βουτώντας μόνο την άκρη του σε λουτρό νερού 37°C .
4. Μόλις αρχίσει να υγροποιείται το περιεχόμενο του φιαλιδίου και προτού λιώσει τελείως, το μεταφέρεται στο κωνικό σωλήνα με τη σήμανση «Κύτταρα» χρησιμοποιώντας πιπέτα χωρητικότητας 1ml.
5. Με την ίδια πιπέτα μεταφέρεται λίγο υλικό στο φιαλίδιο. Γίνεται μία μικρή ανάμειξη τραβώντας το υλικό με τη πιπέτα και ξαναρίχνοντάς το στο φιαλίδιο ώστε αυτό να ξεπλυθεί και να μεταφερθούν τυχόν κύτταρα που παρέμειναν στα τοιχώματα του κατά την πρώτη μεταφορά. Τέλος, το υλικό αυτό μεταφέρεται στο κωνικό σωλήνα όπου έχουν μεταφερθεί πλέον όλα τα κύτταρα.
6. Ο κωνικός σωλήνας τοποθετείται σε συσκευή φυγοκέντρισης με κατάλληλο αντίβαρο και φυγοκεντρίζεται για 4 λεπτά στα 1500rpm.
7. Χρησιμοποιώντας συσκευή αναρρόφησης, αφαιρείται το υγρό από τον κωνικό σωλήνα. Χρειάζεται προσοχή ώστε να μην ξεκολλήσουν τα κύτταρα από τον πάτο.
8. Μεταφέρονται 10ml από τον δεύτερο κωνικό σωλήνα με τη σήμανση «Υλικό» στο σωλήνα «Κύτταρα».
9. Αφού γίνει μικρή ανάμειξη με χρήση πιπέτας τα 10ml του νέου υλικού που περιέχει πλέον τα κύτταρα τοποθετούνται σε τρυβλίο διαμέτρου 10cm.
10. Στο τρυβλίο αναγράφεται η κυτταροσειρά, η ημερομηνία και το όνομα του πειραματιστή και έπειτα τοποθετείται στον επωαστήρα.

ii. Αλλαγή θρεπτικού υλικού

Κάθε 2-3 μέρες πρέπει να γίνεται αλλαγή στο θρεπτικό υλικό στο οποίο αναπτύσσονται τα κύτταρα ώστε να διασφαλιστεί η επιβίωση και σωστή ανάπτυξη των κυττάρων. Το πρωτόκολλο είναι το εξής:

1. Σε έναν κωνικό σωλήνα τοποθετούνται 11ml θρεπτικού υλικού για κάθε τρυβλίο 10cm.
2. Με τη συσκευή αναρρόφησης αφαιρείται το παλιό θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο με τα αναπτυσσόμενα κύτταρα ακουμπώντας την άκρη του αναρροφητή στο σημείο μεταξύ πυθμένα και τοιχώματος του τρυβλίου.
3. Με γυάλινη πιπέτα κατάλληλης χωρητικότητας προστίθεται το νέο υλικό από το κωνικό σωλήνα στο τρυβλίο το οποίο με τη σειρά του τοποθετείται στον επωαστήρα.

iii. Διαχωρισμός κυττάρων

Όταν τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί τόσο ώστε να καλύπτουν όλο τον πάτο του τρυβλίου πρέπει να γίνει διαχωρισμός, δηλαδή να μοιραστούν σε δύο νέα τρυβλία. Το πρωτόκολλο αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα:

1. Σε έναν κωνικό σωλήνα χωρητικότητας 50ml, ο οποίος επισημαίνεται ως «Υλικό» τοποθετούνται περίπου 12ml θρεπτικό υλικό. Σε ένα δεύτερο όμοιο κωνικό σωλήνα, ο οποίος ονομάζεται «Fill» τοποθετούνται 11 ml θρεπτικού υλικού για κάθε τρυβλίο που θα χρειαστεί και 5ml επιπλέον για ασφάλεια.
2. Με τη συσκευή αναρρόφησης αφαιρείται το παλιό θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο.
3. Προστίθεται 1ml PBS στο τρυβλίο και το αφήνουμε 10 δευτερόλεπτα για να ξεπλυθεί ο πυθμένας. Το αφαιρούμε με τον αναρροφητή.
4. Προστίθενται 2 ml τρυψίνης και το τρυβλίο τοποθετείται στον επωαστήρα για περίπου 5 λεπτά. Η διαδικασία αυτή προκαλεί την αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα του τρυβλίου.
5. Με χρήση μικροσκοπίου εξετάζεται εάν έχουν αποκολληθεί όλα τα κύτταρα. Αν όχι, αφήνεται λίγο ακόμη στον επωαστήρα.
6. Με χρήση πιπέτας χωρητικότητας 1ml μεταφέρονται τα αποκολλημένα κύτταρα από το τρυβλίο στο σωλήνα με τη σήμανση «Υλικό».
7. Ο σωλήνας φυγοκεντρίζεται με χρήση κατάλληλου αντίβαρου σε συσκευή φυγοκέντρισης για 4λεπτά στα 1500rpm.
8. Με τον αναρροφητή αφαιρείται το υλικό από το σωλήνα αφήνοντας τα κύτταρα στον πάτο. Έτσι απομακρύνεται η τρυψίνη από τα κύτταρα.
9. Στο σωλήνα τοποθετείται κατάλληλη ποσότητα νέου θρεπτικού υλικού από το δεύτερο κωνικό σωλήνα, ώστε να έχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση στα νέα τρυβλία. Η συγκέντρωση ποικίλει από 1:5 έως 1:50 αναλόγως με τον προγραμματισμό των πειραμάτων όπου χρειάζονται τα κύτταρα.
10. Τα κύτταρα μεταφέρονται στα τρυβλία και τοποθετούνται στον επωαστήρα.

iv. Μέτρηση κυττάρων

Όταν πρόκειται να γίνει ένα πείραμα ή όταν η αναπτυσσόμενη κυτταροσειρά θα αποθηκευτεί εκ νέου στο υγρό άζωτο για μελλοντική χρήση είναι αναγκαία η μέτρηση των κυττάρων ώστε να δημιουργηθούν οι επιθυμητές πυκνότητες φύλαξης ή αποθήκευσης. Τα απαιτούμενα βήματα αυτού του πρωτοκόλλου είναι:

1. Αρχικά, ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω για την αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα του τρυβλίου.
2. Καθαρίζεται προσεκτικά με αιθανόλη η αντικειμενοφόρος και η καλυπτρίδα που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση των κυττάρων. Χρησιμοποιείται αντικειμενοφόρος κυτταρομετρητής Neubauer Improved 0.100mm depth.
3. Μόλις τα κύτταρα διαλυθούν στο νέο καθαρό υλικό γίνεται πολύ καλή ανάμειξη ώστε να εξασφαλιστεί η ομογένεια του διαλύματος. Έπειτα μεταφέρονται 10ul σε φιαλίδιο χωρητικότητας 1ml. Προστίθενται 10ul χρωστικής ουσίας Trypsin Blue stain 0.4% (Gibco)
4. Γίνεται ανάμειξη με πιπέτα και έπειτα τοποθετούνται 10ul στην αντικειμενοφόρο η οποία είναι σκεπασμένη με την καλυπτρίδα.
5. Σε κάθε τεταρτημόριο μετρούνται τα κύτταρα που δεν έχουν χρωματιστεί. Τα υπόλοιπα είναι νεκρά κύτταρα.
6. Υπολογίζεται ο μέσος όρος και πολλαπλασιάζεται επί 10^4 οπότε προκύπτει η συγκέντρωση ανά ml.
7. Με βάση τη μέτρηση των κυττάρων ανά ml και το επιθυμητό τελικό πλήθος κύτταρων γίνεται η κατάλληλη αραιώση ή συμπύκνωση του υπάρχοντος μίγματος θρεπτικού υλικού-κυττάρων.
8. Σε περίπτωση πειράματος τα κύτταρα μεταφέρονται σε πλάκα με κατάλληλο αριθμό βοθρίων. Σε περίπτωση αποθήκευσης μεταφέρονται σε φιαλίδια 1ml με συγκέντρωση 10^6 κύτταρα ανά ml.
9. Η αντικειμενοφόρος και η καλυπτρίδα καθαρίζονται και φυλάσσονται.

5.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ELISA ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΗΜΑΤΩΝ

1. Μία μέρα πριν τη μέτρηση τα χρησιμοποιούμενα μαγνητικά μικροσφαιρίδια (beads) διαλύονται σε αποστειρωμένο PBS σε συγκέντρωση 2500beads/ul για κάθε σήμα και φυλάσσονται στο ψυγείο. Την προηγούμενη της ELISA, παρασκευάζεται και το μίγμα των απαραίτητων αντισωμάτων ανίχνευσης. Τα αντισώματα ανίχνευσης για τα μετρούμενα σήματα διαλύονται, επίσης, σε αποστειρωμένο PBS σε συγκέντρωση που εξαρτάται από το εκάστοτε αντίσωμα και φυλάσσονται στο ψυγείο.
2. Την ημέρα της μέτρησης γίνεται ανακίνηση του μίγματος σε συσκευή στροβιλισμού (vortex) και σε συσκευή υπερήχων (sonication).
3. Τα beadστοποθετούνται σε πλάκα 96 βοθρίων (96-wells plate) με κατάλληλη πιπέτα σε ποσότητα 50ul/βοθρίο. Γίνεται μικρή ανακίνηση με την πιπέτα για ομοιογένεια σε κάθε πηγάδι.
4. Η πλάκα τοποθετείται σε μαγνητική βάση LUMINEX... για ένα λεπτό.
5. Προστίθενται 100ul PBS στα βοθρία. Μετά από ένα λεπτό πετάμε το περιεχόμενο. Τα σφαιρίδια όντας μαγνητικά παραμένουν στον πάτο της πλάκας, ενώ απομακρύνονται τυχόν ακαθαρσίες από το μίγμα. Η διαδικασία αυτή καλείται «wash», δηλαδή πλύση.
6. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία του wash δεύτερη φορά.
7. Αφαιρούμε την πλάκα από το μαγνήτη και προσθέτουμε 50ul από το δείγμα που πρόκειται να μετρηθεί.
8. Η πλάκα καλύπτεται και τοποθετείται σε συσκευή ανάμιξης (shaker), για μία ώρα και τριάντα λεπτά στο 80% της έντασης της συσκευής. Σε περίπτωση που τα μετρούμενα σήματα αφορούν φωσφοπρωτεΐνες η ανάμιξη πραγματοποιείται στο ψυγείο.
9. Όταν τελειώσει η ανάμιξη, η πλάκα τοποθετείται στη μαγνητική βάση. Πραγματοποιείται πλύση με 100ul PBS δύο φορές.

10. Τοποθετούνται 20ul/βοθρίο από το μίγμα με τα αντισώματα ανίχνευσης αφού γίνει πρώτα ανάδευση με τη χρήση κατάλληλης πιπέτας.
11. Η πλάκα καλύπτεται και τοποθετείται στη συσκευή ανάμιξης για 1 ώρα και τριάντα λεπτά στο 80% της μέγιστης έντασης της συσκευής.
12. Μετά το τέλος της ανάμιξης γίνεται πλύση 2 φορές κατά τα γνωστά.
13. Παρασκευάζεται το μίγμα με τη φωσφορίζουσα ουσία (SAPE) για την ανάγνωση των σημάτων. Η ουσία διαλύεται σε PBS σε αναλογία 1:200. Σε κάθε βοθρίο προστίθενται 50ul/βοθρίο.
14. Γίνεται ανάμιξη για 15 λεπτά.
15. Ακολουθεί μόνο μία πλύση κατά τα γνωστά.
16. Προστίθενται 100ul PBS σε κάθε βοθρίο.
17. Γίνεται ανακίνηση για ένα λεπτό και η πλάκα τοποθετείται στη συσκευή Lumindex για να αρχίσει η μέτρηση.

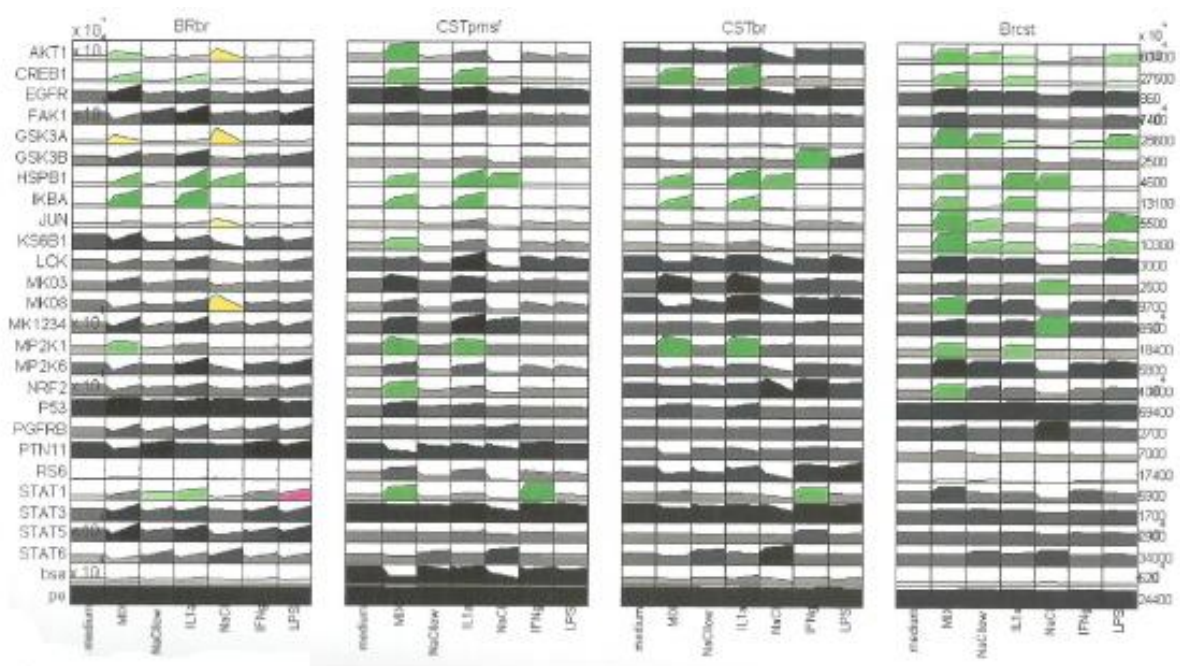
5.3 ΕΞΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Στο εργαστήριο οι μετρήσεις των βιολογικών δεδομένων γίνεται με συσκευή της εταιρείας Lumindex με χρήση της τεχνολογίας xMAP. Η τεχνολογία αυτή συνδυάζει τα προηγμένα ρευστά, την οπτική και τη ψηφιακή επεξεργασία σημάτων με την τεχνολογία μικροσφαιριδίων (beads) που έχει αναπτύξει η ίδια η εταιρεία προκειμένου να εξασφαλιστεί η πολυπλεξία στις πειραματικές μετρήσεις.

Η τεχνολογία των μικροσφαιριδίων βασίζεται στη χρήση μικροσκοπικών σφαιριδίων καθένα από τα οποία διαθέτει ένα κωδικό χρώμα, χαρακτηριστικό για το εκάστοτε σφαιρίδιο. Συνολικά, διατίθενται 500 διαφορετικές χρωματικές ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, κάθε χρωματική ομάδα συνδυάζει δύο βαφές σε διαφορετική ένταση οπότε προκύπτει μία μοναδική φασματική υπογραφή που καθορίζεται από τη μίξη ερυθρού/υπέρυθρου. Κάθε ομάδα σφαιριδίων επικαλύπτεται με ένα ειδικό αντιδραστήριο για μία συγκεκριμένη βιολογική δοκιμή. Επιτρέπει, έτσι, τον εντοπισμό και τη σύλληψη ειδικών αναλυτών σε ένα δείγμα. Ο προσδιορισμός κάθε σφαιριδίου υλοποιείται μέσω κατάλληλης πηγής φωτός στο εσωτερικό της συσκευής ανάλυσης Lumindex. Η πηγή αυτή ανιχνεύει ακόμη κάθε βαφή αναφοράς που αλιεύθηκε κατά τη βιολογική δοκιμή. Η φωτεινή πηγή εκπέμπει δύο ακτίνες laser εκ των οποίων η μία είναι πράσινου χρώματος και η άλλη είναι χρώματος κόκκινου. Καθώς ένα μικροσφαιρίδιο εισέρχεται στο θάλαμο ανίχνευσης στο εσωτερικό της συσκευής η κόκκινη ακτίνα laser διεγείρει τις εσωτερικές ερυθρές και τις υπέρυθρες βαφές επιτρέποντας την ορθή ταξινόμηση του μικροσφαιριδίου σε μία από τις ομάδες που προσδιορίζουν τα χρώματα-κωδικί. Η πράσινη ακτίνα laser διεγείρει τον οποιοδήποτε πορτοκαλί φθορισμό που σχετίζεται με την σύνδεση του επιθυμητού αναλύτη. Η μέθοδος αυτή εξασφαλίζει ακριβείς μετρήσεις και πολυπλεκτικά πειραματικά αποτελέσματα καθώς η ταξινόμηση και η ανάγνωση αναφοράς υλοποιούνται σε επίπεδο μικροσφαιριδίου.

Από τη μέτρηση μέσω της συσκευής Lumindex προκύπτουν ποσοτικά δεδομένα για την παρουσία κάθε μετρούμενης πρωτεΐνης στο δείγμα. Τα δεδομένα αυτά επεξεργάζονται στο

προγραμματιστικό περιβάλλον της Matlab από όπου προκύπτει ένα διάγραμμα όπου συγκεντρώνεται όλη η πληροφορία του πειράματος. Ενδεικτικά, το διάγραμμα αυτό έχει τη μορφή του διαγράμματος 5.3.1 το οποίο προήλθε από τη πειραματική διαδικασία της παρούσας εργασίας. Ανάλυση του συγκεκριμένου διαγράμματος γίνεται στο κεφάλαιο 6.1. Εδώ παρατίθεται για επεξήγηση του τρόπου ανάγνωσης των διαγραμμάτων αυτής της μορφής.



Διάγραμμα 5.3.1

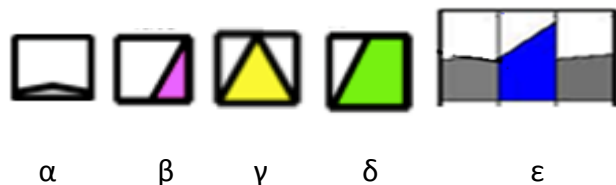
Κάθε διάγραμμα της μορφής που παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 5.3.1 περιγράφει τις αποκρίσεις όλων των μετρούμενων σημάτων για κάθε ερέθισμα και κάθε συνθήκη που εξετάζει το εκάστοτε πείραμα. Συγκεκριμένα, κάθε γραμμή (i) αντιπροσωπεύει ένα μετρούμενο σήμα και κάθε στήλη (j) ένα ερέθισμα. Ακόμη, κάθε επιμέρους πίνακας αφορά σε ξεχωριστές παραμέτρους ενός πειράματος. Έτσι, το τετράγωνο (i,j) περιέχει την καμπύλη μεταβολής του σήματος (i) υπό την επίδραση του ερεθίσματος (j) για τις συνθήκες πειράματος του πίνακα στο οποίο εντάσσεται. Με τον τρόπο αυτό συνοψίζονται σε ένα διάγραμμα οι αναγκαίες πληροφορίες για όλες τις αποκρίσεις και διευκολύνεται η διεξαγωγή συμπερασμάτων.

Η ενεργοποίηση ή μη κενός σήματος κρίνεται με βάση το πόσο αυξήθηκε σε σχέση με το βασικό επίπεδο του εκάστοτε σήματος στο εκάστοτε δείγμα. Σε κάθε μέτρηση ένας αριθμός δειγμάτων δεν διεγείρετε αλλά παραμένει μόνο με το θρεπτικό υλικό. Οι μετρήσεις των σημάτων στα βοηθία των δειγμάτων αυτών είναι ενδεικτικές των βασικών επιπέδων των σημάτων δηλαδή δείχνουν τη φυσική απόκριση των κυττάρων χωρίς την επίδραση κάποιου εξωγενούς παράγοντα. Τα βασικά επίπεδα είναι πολύ σημαντικά στη μελέτη της συμπεριφοράς των κυττάρων.

Προτού κατασκευαστεί ένα διάγραμμα της μορφής του διαγράμματος 6.1, η μέτρηση κάθε σήματος διαιρείται με το μετρούμενο βασικό επίπεδο που του αντιστοιχεί. Αναλόγως αυτής της μεταβολής κρίνεται εάν το σήμα είναι ενεργό ή όχι.

Σε περίπτωση που ενεργοποιείται ένα σήμα i υπό ένα ερέθισμα j , το τετράγωνο (i,j) η καμπύλη μεταβολής τείνει να λάβει τριγωνική μορφή και το εμβαδόν κάτω από αυτή χρωματίζεται. Αντιθέτως, στα σήματα των οποίων η μεταβολή δεν υπήρξε σημαντική το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη μεταβολής παραμένει με γκρι ή μαύρο χρώμα. Το πόσο σκούρο θα είναι το χρώμα των ανενεργών σημάτων εξαρτάται από το πόσο υψηλό είναι το βασικό τους επίπεδο.

Όμως, τα σήματα που περιλαμβάνονται στο διάγραμμα μπορούν να εμφανίζουν διαφορετική απόκριση έστω κι εάν ενεργοποιήθηκαν. Για παράδειγμα μπορεί ένα σήμα να αυξήθηκε και να παρέμεινε ενεργό ή ένα άλλο μπορεί να ενεργοποιήθηκε προς τα κάτω, δηλαδή η τιμή του να μειώθηκε. Για το λόγο αυτό κάθε τετράγωνο του διαγράμματος μπορεί να έχει μία από τις μορφές που εμφανίζονται στην εικόνα 5.3.1 α/β/γ/δ/ε.



Εικόνα 5.3.1

(α) Το σήμα είναι ανενεργό

(β) Το σήμα παραμένει αρχικά σταθερό και έπειτα αυξάνεται

(γ) Το σήμα αυξάνεται και στη συνέχεια μειώνεται

(δ) Το σήμα αυξάνεται και παραμένει ενεργό

(ε) Το σήμα ενεργοποιείται. Το μπλε χρώμα υποδεικνύει ότι το σήμα αυξήθηκε τουλάχιστον κατά 50%. Το γκρι χρώμα αντιστοιχεί σε αύξηση μικρότερη του 50%

Σημειώνεται στο σημείο αυτό η ιδιαιτερότητα των δύο τελευταίων σημάτων κάθε διαγράμματος.

Στην προτελευταία γραμμή, τα βασικά επίπεδα είναι πολύ χαμηλά για κάθε τετράγωνο. Αυτό οφείλεται στη χρήση του BSA ως αρνητικό σήμα ελέγχου. Το BSA εμποδίζει την προσκόλληση των πρωτεϊνών οπότε δεν επιτρέπει την ανίχνευση κατά την μέτρηση της ELISA. Από την άλλη μεριά, όλα τα βασικά επίπεδα στην τελευταία γραμμή είναι πολύ υψηλά. Το σήμα PE που αντιστοιχεί στη τελευταία γραμμή λειτουργεί ως θετικό σήμα ελέγχου καθώς δίνει συνεχώς μέγιστο σήμα

χωρίς να γίνεται διαχωρισμός των σφαιριδίων κατά την μέτρηση της ELISA. Με τα δύο αυτά σημεία ελέγχου αξιολογείται η εγκυρότητα των μετρήσεων.

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει συνολικά δύο βασικές φάσεις.

Κατά την πρώτη φάση πειραμάτων σκοπός είναι η εύρεση του βέλτιστου ρυθμιστικού διαλύματος και των μιγμάτων αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών. Με τον τρόπο αυτό επιχειρείται η βελτιστοποίηση της κυτταρόλυσης με χημικό τρόπο.

Η φάση αυτή ολοκληρώθηκε σε τρεις πειραματικούς κύκλους δηλαδή, έγιναν τρεις πειραματικές διαδικασίες κυτταρόλυσης και μέτρησης φωσφοπρωτεϊνικών δεδομένων.

Η δεύτερη φάση έχει ως στόχο την εύρεση του βέλτιστου πρωτοκόλλου κυτταρόλυσης, δηλαδή τη βελτιστοποίηση των μεθόδων μηχανικής διάσπασης των κυττάρων. Η φάση αυτή ολοκληρώθηκε σε δύο πειραματικούς κύκλους.

Πρώτη και κύρια παράμετρος που πρέπει να καθοριστεί για την εκτέλεση μίας τέτοιας πειραματικής διαδικασίας είναι η επιλογή του είδους των κυττάρων που θα καλλιεργηθεί. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιηθεί σειρά καρκινικών ηπατικών κυττάρων της κυτταροσειράς HuH7. Τα HuH-7 είναι καλά διαφοροποιημένα ηπατοκύτταρα προερχόμενα από μία κυτταρική γραμμή καρκινώματος που είχε αρχικά ληφθεί από έναν όγκο ήπατος ενός 57χρονου Ιάπωνα το 1982. Η γραμμή ιδρύθηκε από τους Nakabayshi, H. και Sato, J και στην ουσία είναι μία αθάνατη κυτταρική γραμμή επιθηλιακών κυττάρων που παρουσιάζουν ογκογονική ομοιότητα.

6.1 ΠΕΙΡΑΜΑ 1^ο**ΣΚΟΠΟΣ**

Στόχος είναι να εντοπιστεί κατά πόσο η λύση των κυττάρων επηρεάζεται από το διάλυμα και κατά πόσο από τους αναστολείς. Να βρεθεί, δηλαδή, εάν το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα δίνει διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με το μίγμα των αναστολέων που προστίθεται σε αυτό και το αντίστροφο. Ακόμη, βρίσκεται εάν η διαφορά σε περίπτωση που υπάρχει είναι σημαντική ώστε να σχεδιαστεί ο επόμενος κύκλος πειραμάτων.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Ένα φιαλίδιο με κύτταρα Huh7 αποψύχθηκαν από θερμοκρασία -196°C στην οποία φυλάσσονταν μέσα σε υγρό άζωτο και τοποθετήθηκαν σε φλάσκα με θρεπτικό υλικό DMEM 1x της εταιρείας Gibco ενισχυμένο με 10% FBS (ref. 10270-106) και 1% αντιβιοτικό Pen Step (ref. 15140-122).

Μετά από 6 μέρες από την έναρξη της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε ο πρώτος κύκλος πειραμάτων όπου εξετάστηκαν δύο εμπορικά ρυθμιστικά διαλύματα, Biorad και CST και δύο μίγματα αναστολέων Biorad (factor 1&2) & Sigma p8340. Τα παραπάνω υλικά χρησιμοποιούνταν στο εργαστήριο και είχαν δώσει τα καλύτερα αποτελέσματα σε προηγούμενα πειράματα κυτταρόλυσης συγκριτικά με άλλα αντίστοιχα εμπορικά διαλύματα και μίγματα. Εξετάστηκαν, λοιπόν, τέσσερις διαφορετικοί συνδυασμοί διαλυμάτων και αναστολέων.

Στο πείραμα αυτό τα ερεθίσματα επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενα πειράματα και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τη λύση είναι το ήδη χρησιμοποιούμενο στο εργαστήριο. Οι βέλτιστες τεχνικές ελέγχονται στον επόμενο κύκλο πειραμάτων.

Την έκτη μέρα μετά την έναρξη της καλλιέργειας τα κύτταρα μετρήθηκαν με χρήση μικροσκοπίου Olympus CK40-RPSL και τοποθετήθηκαν σε πλάκα 96 βοθρίων (flat bottom 96-wells plate Costar #3599) όπου παρέμειναν 24 ώρες με θρεπτικό υλικό σε επωαστή (Thermo electro corporation steri-cult HEPA class 100). Κάθε βοθρίο περιείχε περίπου 50.000 κύτταρα. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα διεγέρθηκαν με προσθήκη των ακόλουθων ερεθισμάτων : Mix το οποίο περιείχε IL1a, IFNg, LPS, erigalo και BDNF, NaCl σε χαμηλή συγκέντρωση, IL1a, NaCl σε υψηλή συγκέντρωση, IFNg και LPS. Πληροφορίες σχετικά με τη βιολογική σημασία των ερεθισμάτων περιλαμβάνονται στο παράρτημα της παρούσας εργασίας. Σε δύο βοθρία τα κύτταρα δεν διεγέρθηκαν αλλά παρέμειναν με απλό θρεπτικό υλικό ως δικλείδα ασφαλείας για τον έλεγχο των σημάτων. Ακόμη, η κυτταρόλυση πραγματοποιείται σε δύο χρονικές στιγμές: 5 λεπτά μετά το ερέθισμα και 25

λεπτά μετά το ερέθισμα. Με τον τρόπο αυτό εντοπίζονται σήματα που μπορεί να ενεργοποιούνται αμέσως και έπειτα να χάνονται πολύ γρήγορα με αποτέλεσμα να χάνεται το σήμα σε περίπτωση που γίνει μέτρηση μόνο για κυτταρόλυση στα 25 λεπτά. Η διάταξη της πλάκας απεικονίζεται στην εικόνα 6.1.1:

		Hepatocytes (Huh7)													
		5min		25min		5min		25min		5min		25min			
A	Mix	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
B	NaCl (low level)	BioRad Buffer with BioRad Inhibitors (f 1&2) +PMSF		CST +PMSF		CST Buffer with factor 1, factor 2 +PMSF		BioRad Buffer p8340 sigma +PMSF							
C	medium														
D	IL1a														
E	NaCl														
F	IFNg														
G	LPS														
H	medium														

Εικόνα 6.1.1

Αφότου προστέθηκαν τα ερεθίσματα στα κύτταρα (stimulation) τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα.

Μετά από 5 λεπτά αρχίζει το πρωτόκολλο της κυτταρόλυσης για τα βοθρία με χρονικό όριο τα 5 λεπτά. Η πλάκα βγαίνει από τον επωαστήρα και τοποθετείται σε παγοκύστη για να διατηρηθεί η θερμοκρασία των δειγμάτων όσο το δυνατόν κοντά στους 4 °C.



Εικόνα 6.1.2

Η πλύση γίνεται ως εξής: Αρχικά, αφαιρείται από τα βοθρία το θρεπτικό υλικό με τα ερεθίσματα και προστίθενται 100ul PBS σε κάθε βοθρίο για την απομάκρυνση υπολειμμάτων και ακαθαρσιών. Έπειτα αφαιρείται το PBS και ρίχνεται στα βοθρία το ρυθμιστικό διάλυμα κυτταρόλυσης (Lysis buffer) μαζί με το μίγμα των αναστολέων που πρόκειται να ελεχθεί σε κάθε περίπτωση.

Τοποθετούμε και πάλι την πλάκα στον επωαστήρα. Μετά από 20 ακόμα λεπτά επαναλαμβάνεται η διαδικασία της πλύσης και της προσθήκης του ρυθμιστικού διαλύματος για τα βοθρία με χρονικό όριο τα 25 λεπτά.

Εν συνεχεία, η πλάκα καλύπτεται με ειδικό κάλυμμα αλουμινίου και τοποθετείται σε συσκευή ανάμιξης (thermo Labsystems wellmix) η οποία τοποθετείται στο ψυγείο ώστε η θερμοκρασία να διατηρηθεί στους 4 °C. Η ανάμειξη διαρκεί 20 λεπτά.

Έπειτα η πλάκα τοποθετείται στην κατάψυξη στους -20 °C για όλη τη νύχτα.

Την επόμενη μέρα, αποψύχεται η πλάκα σε λουτρό 37 °C μέσω συσκευής υδατόλουτρου Clifton.

Ακολουθεί το λουτρό υπερήχων με χρήση συσκευής Digit ultrasonic cleaner. Η πλάκα τοποθετείται διαλειμματικά στο λουτρό υπερήχων για τέσσερις κύκλους διάρκειας 10 δευτερολέπτων. Τα ενδιάμεσα διαλύματα διαρκούν 10-15 δευτερόλεπτα το καθένα.

Τέλος, γίνεται φυγοκέντριση με ταχύτητα 2700g για 20 λεπτά (σε centrifuge 4-15C Qiagon της εταιρείας Sigma) ώστε να καθίσουν στον πάτο των βοθρίων τα κυτταρικά υπολείμματα και να διαχωριστούν από το υπερκείμενο όπου βρίσκονται οι πρωτεΐνες σήματα που πρόκειται να μετρηθούν. Το καθαρό υπερκείμενο αφαιρείται από τα βοθρία και τοποθετείται σε νέα πλάκα 96 βοθρίων όπου πραγματοποιείται η μέτρηση των σημάτων με τη μέθοδο της bead-based ELISA .

Τα μετρούμενα σήματα βρέθηκαν από την βιβλιογραφία και αφορούν στην χρησιμοποιούμενη κυτταροσειρά.

Τα σήματα αυτά είναι:

- AKT1
- MP2K6
- NFR2
- P53
- PGFRB
- PTN11

- RS6
- STAT1
- STAT3
- STAT5
- STAT6
- MP2K1
- CREB1
- EGFR
- FAK1
- GSK3A
- GSK3B
- HSPB1
- IKBA
- JUN
- KS6B1
- LCK
- MK03
- MK09
- MK12

Καθένα από τα σήματα αυτά είναι ενδεικτικό μιας κυτταρικής λειτουργίας. (βλ. Παράρτημα)

Το υπερκείμενο υγρό που προκύπτει από τη φυγοκέντριση του δείγματος και το οποίο έχει υποστεί κυτταρόλυση τοποθετείται σε νέα πλάκα 96 βοθρίων η οποία περιέχει τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια (beads) στα οποία έχει προσδεθεί το αντίσωμα ανίχνευσης. Από το σημείο αυτό ξεκινάει η εφαρμογή του πρωτοκόλλου ELISA. Η πλάκα τοποθετείται στη συσκευή ανάμιξης (shaker) για 1 ώρα και 30 λεπτά. Έπειτα η πλάκα τοποθετείται σε μαγνητική πλάκα Luminex και γίνεται δύο φορές πλύση με PBS-BSA 1% (assay buffer, εταιρεία sigma) ώστε να αφαιρεθούν τα αντισώματα που δεν κόλλησαν και να απομακρυνθούν τυχόν ακαθαρσίες. Στη συνέχεια, το αντίσωμα ανίχνευσης τοποθετείται στο δείγμα το οποίο τοποθετείται έπειτα στη συσκευή

ανάμιξης για ακόμη 1 ώρα και 30 λεπτά. Ακολουθούν 2 πλύσης όπως και πριν. Τέλος, προστίθεται η φθορίζουσα ουσία (PE). Η πλάκα 96 βοθρίων τοποθετείται στη συσκευή ανάμιξης για 15 λεπτά. Γίνεται πλύση μία φορά.

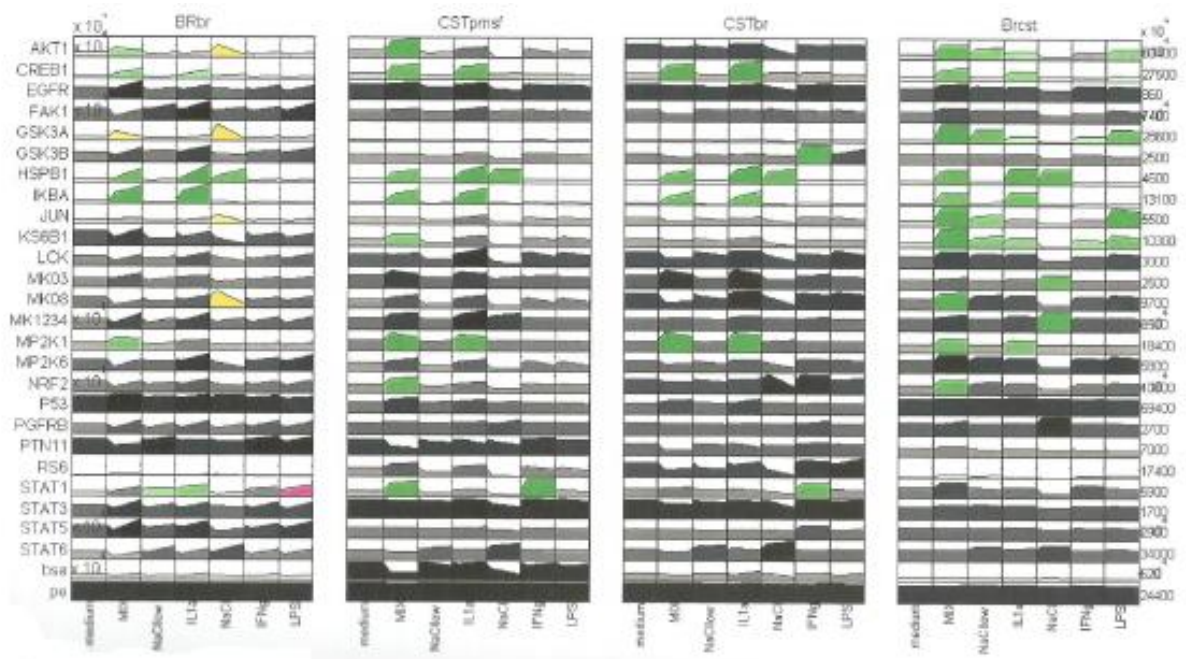
Προσθέτουμε 130ul Assay Buffer σε κάθε βοθρίο. Η πλάκα καλύπτεται με ειδικό αυτοκόλλητο και τοποθετείται στη συσκευή ανάμιξης για ένα λεπτό.

Επόμενο και τελικό βήμα είναι η μέτρηση των φωσφοπρωτεϊνικών δεδομένων με χρήση της συσκευής Lumipex. Η πλάκα τοποθετείται στην κατάλληλη υποδοχή της συσκευής ανίχνευσης Lumipex η οποία με βάση τη τεχνολογία xMAP που αναπτύχθηκε παραπάνω αναγνωρίζει και μετρά τις πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα.

Για την διεξαγωγή των τελικών αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων, γίνεται επεξεργασία των δεδομένων που προκύπτουν από τις πειραματικές μετρήσεις. Η επεξεργασία πραγματοποιείται στο προγραμματιστικό περιβάλλον της Matlab.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 1ΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Με επεξεργασία των μετρήσεων προέκυψε το διάγραμμα 6.1 το οποίο πληροφορεί για τα σήματα που ενεργοποιήθηκαν, το ερέθισμα που προκάλεσε τη διέγερση καθώς και ποιά σήματα παρέμειναν ανενεργά για κάθε συνθήκη.



Διάγραμμα 6.1.

Στο Διάγραμμα 6.1, κάθε πίνακας αναφέρεται στη χρήση διαφορετικού συνδυασμού διαλύματος-αναστολέων και στη συγκεκριμένη περίπτωση, αποτελείται από 7 στήλες –ερεθίσματα και 27 γραμμές-σήματα/φωσφοπρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζουν ξεκάθαρη εικόνα για την επίδραση του διαλύματος και των αναστολέων ξεχωριστά στις μετρήσεις. Από το γεγονός αυτό συμπεραίνεται ότι ο συνδυασμός των δύο παραγόντων επηρεάζει τα αποτελέσματα και όχι το καθένα ξεχωριστά.

6.2 ΠΕΙΡΑΜΑ 2^ο

ΣΚΟΠΟΣ

Κατά τον δεύτερο κύκλο πειραμάτων παρασκευάστηκαν και δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνταγές ρυθμιστικών διαλυμάτων (Lysis Buffer), διαφορετικά μίγματα αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών (protease and phosphatase inhibitors cocktail) καθώς και διάφοροι συνδυασμοί αυτών.

Στον πειραματικό αυτό κύκλο εξετάστηκε ακόμη η επίδραση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος κυτταρόλυσης. Τα μετρούμενα σήματα όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι πρωτεΐνες. Η θερμοκρασία και το pH του περιβάλλοντος τους επηρεάζουν τη δομή και το σχήμα τους. Επομένως, διαλύματα με διαφορετικές τιμές pH μπορεί να αλλοιώσουν τις πρωτεΐνες σε τέτοιο βαθμό ώστε να επηρεαστούν οι πειραματικές μετρήσεις.

Για το λόγο αυτό κρίθηκε σκόπιμη η δοκιμή διαφορετικών τιμών pH.

Τελικά, στόχος είναι να βρεθεί ο συνδυασμός που δίνει τις καλύτερες πειραματικές μετρήσεις και η Παρασκευή αυτού στο εργαστήριο.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά τα οποία αγοράστηκαν από την εταιρεία Santa-Cruz Biotechnology Inc. (εικόνα 6.2.1). Η επιλογή τους έγινε με βάση τα όσα αναφέρθηκαν στο θεωρητικό μέρος της παρούσας εργασίας. Ο κωδικός κάθε προϊόντος αναγράφεται σε παρένθεση:

- AEBSF, Hydrochloride (sc-202041, 50mg)
- Aprotinin (sc-3595 ,10mg)
- Bestatin (sc-202975,10mg)

- beta-mercaptoethanol (sc-202966, 250ml)
- E-64 (sc-201276 , 5mg)
- EDTA, disodium salt, 55hydrate (sc-359904A, 250g)
- Glycerol (sc-29095A, 100ml)
- IGEPAL CA-630 (sc-280818, 25ml)
- Leupeptin hydrochloride (sc-215242, 5mg)
- Magnesium chloride (sc-255260, 100g)
- Nonidet P40 (substitute) (sc-29102 ,500ml)
- Pepstatin A, synthetic (sc-45036, 5mg)
- Sodium deoxycholate monohydrate (sc-253579, 5g)
- Sodium Dodecyl Sulfate (sc-264510, 25g)
- Sodium Fluoride (sc-24988, 125g)
- Sodium Orthovanadate (sc-3540, 5g)
- Sodium pyrophosphate tetrabasic (sc-236921, 500g)
- Triton X-100 (sc-29112A, 500ml)
- β -Glycerophosphate disodium salt (sc-220452, 25g)
- Potassium Chloride (sc-203207, 500 g)



Εικόνα 6.2.1

Συνολικά δοκιμάστηκαν 24 συνταγές για το βασικό ρυθμιστικό διάλυμα. Αυτές είναι οι ακόλουθες:

- Βασική συνταγή, “Basic Buffer”:
 - 20mM Tris-HCl, pH 7.5
 - 1mM EDTA
 - 1mM EGTA
 - 150mM NaCl
 - 1% Triton X-100
- “BasicBuffer” χωρίς χηλικούς παράγοντες (EDTA, EGTA)
- “Basic Buffer” με 20mM MOPS έναντι του Tris-HCl

- “Basic Buffer” με 1% IGEPAL έναντι του Triton X-100
- Triton X-100 με 1% NP- 40 έναντι του Triton X-100
- 150mM KCl έναντι του NaCl
- “BasicBuffer” με επιπλέον 2mg/ml BSA
- “BasicBuffer” με επιπλέον 0,03% w/v Na₃N
- “Basic Buffer” με επιπλέον 5% γλυκερόλη
- “Basic Buffer” με 50mM Tris-HCl, pH7.5 αντί για 20mM
- Katharina's

Η συνταγή Katharina's αποτελείται από:

- 120mM NaCl
- 20mM Tris-HCl, pH 7.4
- 10mM NaF
- 1mM EDTA, pH 8
- 1mM ZnCl₂, pH 4
- 1mM MgCl₂
- 1mM Na₃VO₄
- 10% γλυκερόλη
- 1% NP-40

Ακόμη, προκειμένου να διαπιστωθεί η σημασία του pH και η ευαισθησία των δειγμάτων ως προς αυτό χρησιμοποιήθηκε η συνταγή του βασικού διαλύματος “**BasicBuffer**” σε διάφορες τιμές pH. Η αρχική συνταγή αναφέρεται σε διάλυμα με pH 7.5 ενώ η ίδια ακριβώς συνταγή παρασκευάστηκε και σε τιμές pH 6.5, 7, 7.2, 7.7 και 8.

Οι παραπάνω συνδυασμοί Lysis buffer σχεδιάστηκαν ώστε να απαντηθούν τα ακόλουθα ερωτήματα:

- Επηρεάζει θετικά ή αρνητικά η απουσία των χηλικών παραγόντων τα πειραματικά αποτελέσματα; Αν ναι, κατά πόσο;

- Ποιό από τα συνήθη βασικά ρυθμιστικά που χρησιμοποιούνται στο διάλυμα κυτταρόλυσης παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα; Το MOPS ή το Tris-HCl;
- Επηρεάζει το απορρυπαντικό τα αποτελέσματα; Ποιό από τα χρησιμοποιούμενα απορρυπαντικά δίνει τις καλύτερες μετρήσεις;
- Η χρήση KCl έναντι του NaCl διαφοροποιεί τα αποτελέσματα;
- Πώς επιδρά η προσθήκη BSA στο ρυθμιστικό διάλυμα στα τελικά πειραματικά αποτελέσματα;
- Ποιά η επιρροή του NaN₃ στις μετρήσεις όταν προστεθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα;
- Πώς επιδρά η προσθήκη γλυκερόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα στα αποτελέσματα;
- Πώς αλλάζουν οι τελικές πειραματικές μετρήσεις με αλλαγή του pH του ρυθμιστικού διαλύματος; Σε ποιό pH προκύπτουν τα καλύτερα αποτελέσματα;

Το pH μετρήθηκε μετά την παρασκευή του βασικού διαλύματος και ρυθμίστηκε κατάλληλα με βάση τις προβλεπόμενες τιμές. Η μέτρηση έγινε με χρήση πεχάμετρου και η ρύθμιση του έγινε με χρήση υδροχλωρίου (HCl) για μετάβαση σε πιο όξινο διάλυμα και καυστικού νατρίου (NaOH) για πιο βασικό.

Στη συνέχεια, παρασκευάζονται τα μίγματα των αναστολέων πρωτεασών και τα μίγματα των αναστολέων φωσφατασών. Οι αναστολείς αυτοί βρίσκονται σε μορφή σκόνης οπότε είναι αναγκαία η διάλυση τους σε κατάλληλο διαλυτικό μέσο. Σε μερικά μίγματα αναστολέων μπορεί δημιουργηθούν καθιζήσεις εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αναστολέων και των διαλυτών. Στις περισσότερες περιπτώσεις περαιτέρω αραιώση βελτιώνει τη διαλυτότητα.

Όλα τα συστατικά σε μορφή σκόνης φυλάσσονται στην κατάψυξη στους -20 °C. Τα συστατικά που προορίζονται για φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο σε θερμοκρασία 2-8 °C δεν απαιτούν φύλαξη στους -20 °C, αλλά δεν επηρεάζονται αρνητικά σε περίπτωση που αποθηκευθούν σε αυτή τη θερμοκρασία. Προτού χρησιμοποιηθούν τα συστατικά σε μορφή σκόνης επιβάλλεται να αφεθούν σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου λάβουν τη θερμοκρασία αυτή. Όλα τα μίγματα πρέπει να φυλάσσονται καλά κλεισμένα και να προστατεύονται από την υγρασία.

Προτού παρασκευαστούν τα αναγκαία διαλύματα, απαιτείται ο προσδιορισμός της επιθυμητής συγκέντρωσης και η εύρεση της διαλυτότητας κάθε αναστολέα. Οι πληροφορίες αυτές συνοψίζονται στον πίνακα 6.2.1:

Αναστολέας	Μοριακό Βάρος	Διαλυτότητα	Δραστική Συγκέντρωση
NaF	42.0	40mg/ml σε νερό	1-20mM

Sodium orthovanadate	183.9	20mg/ml σε νερό	1-100mM
b-glycerophosphate	216.0	10mg/ml σε νερό	1-100mM
Sodium pyrophosphate	221.9	65mg/ml σε νερό	1-100mM
AEBSF	239.5	200mg/ml σε νερό	0.2-1mM
Aprotinin	6511.5	10mg/ml σε νερό	100-200nM
Bestatin	308.4	5mg/ml σε MeOH	1-10μM
E-64	357.4	20mg/ml σε αιθανόλη	1-20μM
Leupeptin	475.6	1mg/ml σε νερό	10-100μM
Pepstatin A	685.9	1mg/ml σε νερό	1-20μM
PMSF	174.2	1mg/ml σε MeOH	0.1-1mM
Benzamidine	156.6	50mg/ml σε νερό	0.5-4 mM

Πίνακας 6.2.1

ΜΙΓΜΑΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ

Αρχικά, παρασκευάζονται αποθεματικά διαλύματα για κάθε αναστολέα ξεχωριστά. Έπειτα αναμιγνύονται ώστε να δημιουργηθούν τα μίγματα αναστολέων πρωτεασών. Οι αναστολείς πρωτεασών προστίθενται στο διάλυμα κυτταρόλυσης λίγα λεπτά πριν προστεθεί στο δείγμα ώστε να διατηρήσουν την δραστηριότητα τους. Εξαιρεση αποτελεί ο αναστολέας PMSF ο οποίος έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής και συγκεκριμένα 55 λεπτά σε pH 7.5 και 35 λεπτά σε pH 8. Για αυτό και προστίθεται στο τελικό διάλυμα κυτταρόλυσης ακριβώς προτού αυτό προστεθεί στα κύτταρα.

Στη παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν δύο μίγματα αναστολέων πρωτεασών. Το πρώτο περιείχε όλους τους αναστολείς και διακρίνεται ως «Turbo». Τα συστατικά και οι ποσότητες τους αναγράφονται στον πίνακα 6.2.2. Το δεύτερο μίγμα περιείχε μόνο τους συνηθέστερα χρησιμοποιούμενους αναστολείς και διακρίνεται ως «Light». Τα συστατικά και οι ποσότητες τους αναγράφονται στον πίνακα 6.2.3.

Αναστολέας	Ποσότητα σε mM
AEBSF	1
Benzamidine	3
Pepstatin A	0.01
Leupeptin	0.02
Aprotinin	0.0015
Bestatin	0.05
E64	0.015

Πίνακας 6.2.2

Αναστολέας	Ποσότητα σε mM
Pepstatin A	0.01
Leupeptin	0.02
Bestatin	0.05

Πίνακας 6.2.3

ΜΙΓΜΑΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΦΩΣΦΑΤΑΣΩΝ

Για τους αναστολείς φωσφατασών ακολουθήθηκε μία ελαφρώς διαφορετική διαδικασία. Καθώς έχουν μικρότερη διαλυτότητα κρίθηκε σκόπιμη η απευθείας διάλυση τους στο κυρίως ρυθμιστικό διάλυμα. Οι αναστολείς των φωσφατασών δεν χάνουν τη δραστικότητα τους τόσο γρήγορα όσο οι αναστολείς πρωτεασών για αυτό και μπορούν να παραμείνουν διαλυμένοι στο διάλυμα κυτταρόλυσης για διάστημα έως και 2 εβδομάδων. Οπότε, μετά τη δημιουργία του ρυθμιστικού διαλύματος που προαναφέρθηκε, προστέθηκαν σε αυτό οι αναστολείς φωσφατασών με βάση τη διαλυτότητα του καθενός (βλ. Πίνακα 6.2.1).

Οι αναστολείς και οι χρησιμοποιούμενες ποσότητες που συνοψίζονται στον πίνακα 6.2.4 αφορούν στο κανονικό μίγμα αναστολέων φωσφατασών (αναφέρεται παρακάτω και ως «MAX» μίγμα). Για να διαπιστωθεί η δραστικότητα και η σημασία των ποσοτήτων δοκιμάστηκε και μίγμα με τις μισές από τις ποσότητες του πίνακα 6.2.4. Το δεύτερο αυτό μίγμα αναφέρεται παρακάτω και ως «Light».

Αναστολέας	Ποσότητα σε mM
b-glycerophosphate	2
Sodium pyrophosphate	20
Sodium orthovanadate	2
Sodium fluoride	50

Πίνακας 6.2.4

Προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση των αναστολέων αυτών στο διάλυμα το pH μετρήθηκε και μετά την προσθήκη των αναστολέων φωσφατασών στο διάλυμα κυτταρόλυσης. Οι τιμές που μετρήθηκαν παρουσιάζονται στον εξής πίνακα και υποδηλώνουν τη μετάβαση σε πιο βασικό περιβάλλον:

A/A Συνδυασμού διαλύματος	pH μετά την προσθήκη φωσφατασών	pH μετά την προσθήκη πρωτεασών
A1	7.55	7.77
A2	7.55	7.62
A3	7.58	7.58
A4	7.59	7.80
A5	7.44	7.41
A6	7.61	7.63
A7	7.58	7.64
A8	7.59	7.63
A9	7.52	7.56
A10	7.03	7.13
A11	7.67	7.71
A12	7.40	7.44
B1	7.51	7.52

B2	7.26	7.36
B3	7.56	7.57
B4	7.96	8.07
B5	7.58	7.62
B6	7.54	7.60
B7	7.58	7.64
B8	7.55	7.62
B9	6.53	6.62
B10	7.27	7.35
B11	8.07	8.08
B12	7.54	7.61

Πίνακας 6.2.5

Έπειτα ρυθμίστηκε και πάλι το pH στις επιθυμητές τιμές με προσθήκη HCl ή NaOH ώστε να επανέλθει στις αρχικά προσδιοριζόμενες τιμές. (βλ. Πίνακα 6.2.5).

Αφότου παρασκευάστηκαν όλα τα απαραίτητα υλικά υλοποιήθηκε το πρωτόκολλο κυτταρόλυσης που ακολουθήθηκε και στο πρώτο πείραμα όπως περιγράφηκε παραπάνω. Ωστόσο, στην πειραματική αυτή διαδικασία πραγματοποιήθηκε λύση σε χρονικό σημείο 25 λεπτών μόνο και όχι σε χρονικό σημείο 5 λεπτών προκειμένου να ελεχθούν όσο το δυνατόν περισσότεροι συνδυασμοί ρυθμιστικών διαλυμάτων και μιγμάτων αναστολέων.

Η διάταξη της πλάκας 96 βοθρίων που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στην εικόνα 6.2.2.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MIX	Basic+ EDTA+EGT A+Turbo protease	Basic + Turbo protease	Basic + Phosphata se inhibitors	Basic + Biorad inhibitor	CST buffer + p8340	MOPS buffer + Turbo protease	Buffer with Igepal + Turbo protease	Basic + BSA + Turbo protease	Basic+ Glycerol+ Turbo protease	Basic Ph=7 + turbo protease	Basic Ph=7.7 + turbo protease	Katharina' s buffer + turbo protease
B	NaCl												
C	DME												
D	LPS												
E	MIX	Basic + Light pinhibitor s	Turbo protease no phosphota se	Basic buffer + p8340	Biorad buffer + biorad inhibitors	Basic+ Turbo protease, NO EDTA, EGTA	Buffer with NP40 + Turbo protease	Buffer with KCl + Turbo protease	Basic Buffer + NaN3 + Turbo protease	Basic Ph=6.5 + turbo protease	Basic Ph=7.2 + turbo protease	Basic Ph=8, + turbo protease	Buffer with extra TrisHCl + Turbo protease
F	NaCl												
G	DME												
H	LPS												

Εικόνα 6.2.2

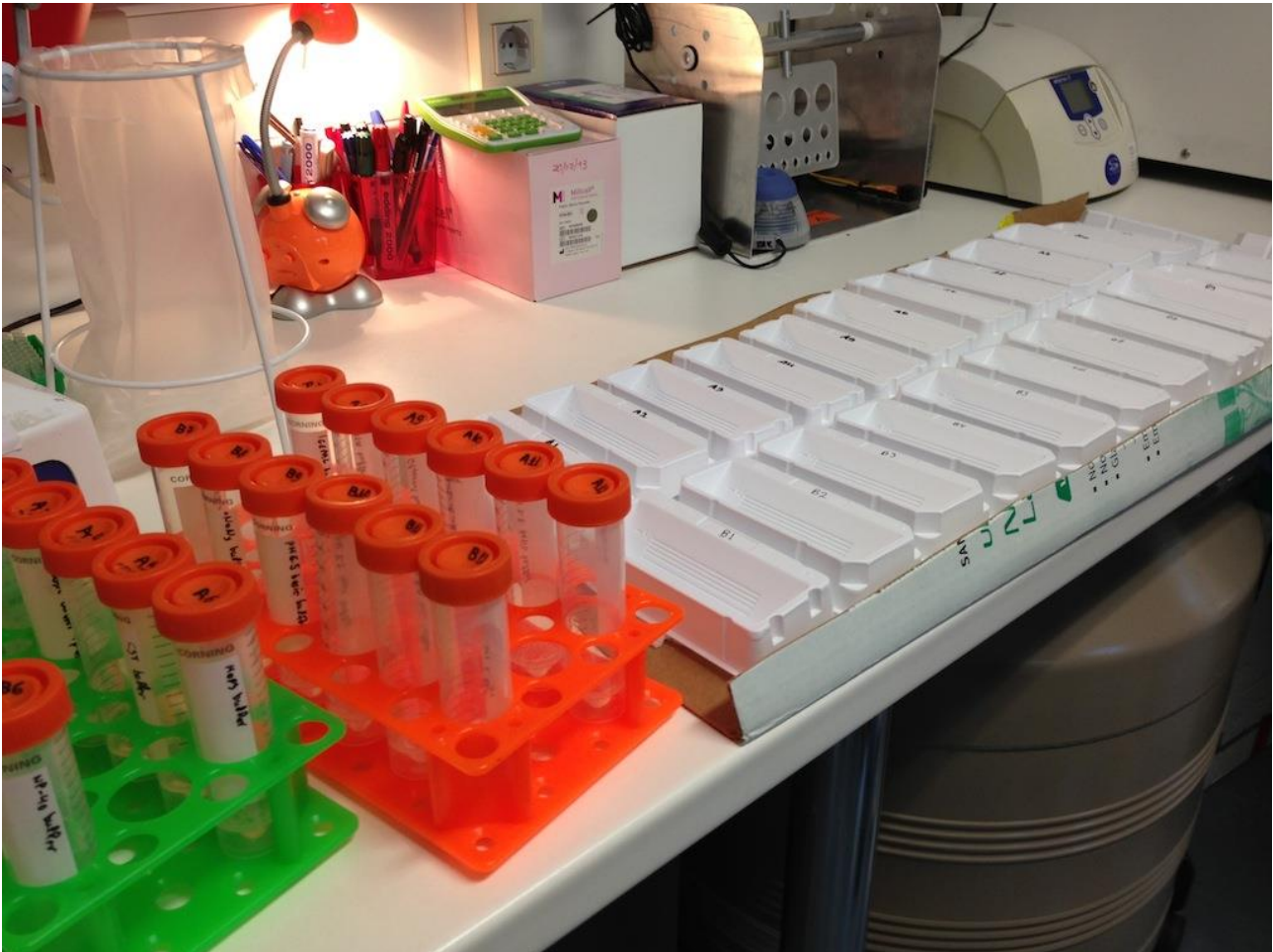
Για καλύτερη κατανόηση τα συστατικά που αντιστοιχούν σε κάθε συνδυασμό συνοψίζονται στον πίνακα 6.2.6 για καλύτερη εποπτεία. Τα έντονα στοιχεία είναι εκείνα τα οποία διαφοροποιούνται κάθε φορά ώστε να μελετηθεί η επίδραση τους στις πειραματικές μετρήσεις.

Συνδυασμός Διαλύματος-Αναστολέων	Συστατικά Διαλύματος κυτταρόλυσης					Αναστολείς Πρωτεασών	Αναστολείς Φωσφατασών	pH
	Ρυθμιστικό Διάλυμα	Απορρυπαντικό	Άλατα	Χημικοί Παράγοντες	Επιπλέον Συστατικό			
Basic, Turbo, Edta, Egta	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA + extra with inhibitors	-	Turbo + EDTA, EGTA	Max	7.5
Turbo protease in basic buffer	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	-	Turbo	-	7.5
Phosphatase in basic buffer	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	-	-	Max	7.5
Biorad inhibitors in basic buffer	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	-	factor 1 & 2 (Biorad bioplex phosphoprotein detection kit)		7.5
P8340 in CST buffer	CST buffer #7018					Sigma, p8340	-	7.5
Turbo protease in MOPS	MOPS	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	-	Turbo	Max	7.5
Turbo protease in IGEPA	Tris-HCl	IGEPAL	NaCl	EDTA, EGTA	-	Turbo	Max	7.5
Turbo protease in BSA	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	BSA	Turbo	Max	7.5
Turbo protease in glycerol	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	Glycerol	Turbo	Max	7.5
Turbo protease in 7.0	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	-	Turbo	Max	7.0
Turbo protease in 7.7	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	-	Turbo	Max	7.7
Turbo protease Katharina's	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	-	Turbo	Max	7.5
Light protease and phosphatase in basic	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	-	Light	Light	7.5
Turbo in no phosphate buffer	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	-	Turbo	-	7.5
P8340 in basic buffer	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	-	P8340	Max	7.5
Biorad inhibitors in Biorad buffer	Biorad buffer (Biorad bioplex phosphoprotein detection kit)					factor 1&2 (Biorad bioplex phosphoprotein detection kit)		8
Turbo protease in buffer with no chelators	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	-	-	Turbo	Max	7.5
Turbo protease in NP40	Tris-HCl	NP40	NaCl	EDTA, EGTA	-	Turbo	Max	7.5
Turbo protease in KCl	Tris-HCl	Triton-X	KCl	EDTA, EGTA	-	Turbo	Max	7.5
Turbo protease in NaN3	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	NaN3	Turbo	Max	7.5
Turbo protease in 6.5	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	-	Turbo	Max	6.5
Turbo protease in 7.2	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	-	Turbo	Max	7.2
Turbo protease in 8.0	Tris-HCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	-	Turbo	Max	8.0
Turbo protease in 50mM TrisHCl	Tris-HCl + 30mM TrisHCl	Triton-X	NaCl	EDTA, EGTA	-	Turbo	Max	7.5

Πίνακας 6.2.6.

Τα ερεθίσματα με τα οποία διεγέρθηκαν τα κύτταρα καθώς και τα σήματα που μετρήθηκαν παρέμειναν ίδια με το πρώτο πείραμα.

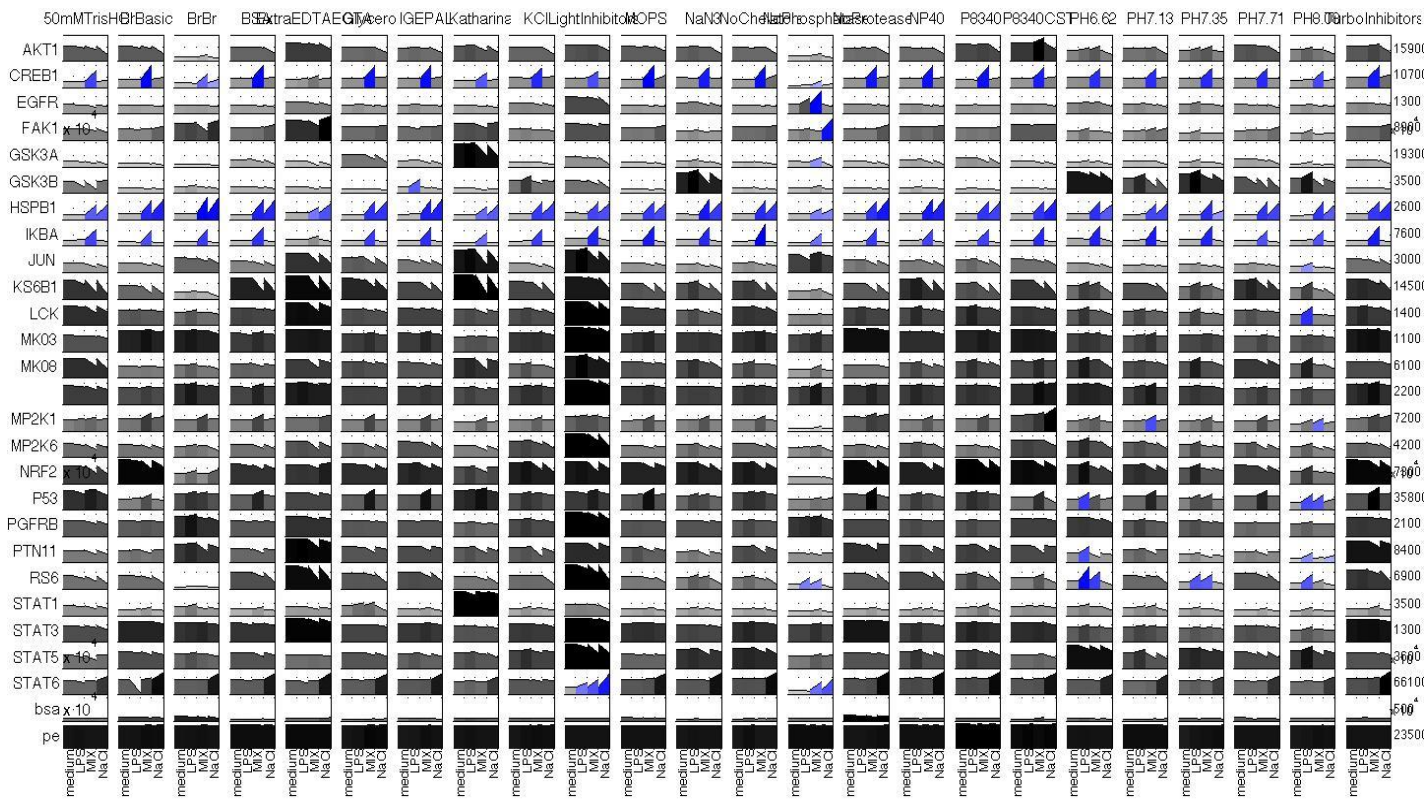
Η διαδικασία της κυτταρόλυσης έγινε ταυτόχρονα σε όλα τα βοηθία ώστε να μην υπάρχουν διαφοροποιήσεις λόγω διαφορετικής χρονικής στιγμής. Κάθε συνδυασμός τοποθετήθηκε σε διαφορετικό δοχείο, «boat» και από εκεί μεταφέρθηκε με κατάλληλη πιπέτα στα κύτταρα. Η διάταξη με τα φιαλίδια και τα «boat» παρουσιάζεται στην εικόνα 6.2.3.



Εικόνα 6.2.3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 2^{ΟΥ} ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο διάγραμμα 6.2.



Διάγραμμα 6.2

Ως αποτέλεσμα του δεύτερου κύκλου πειραμάτων επιλέχθηκαν 5 συνδυασμοί οι οποίοι έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα. Η επιλογή έγινε με κριτήριο το πλήθος των σημάτων που έδωσε κάθε συνδυασμός, την ένταση των σημάτων αυτών, τα επίπεδα των σημάτων που δεν ενεργοποιήθηκαν και το θόρυβο που εμφανίστηκε στις μετρήσεις.

Πιο συγκεκριμένα, επιδιώκεται: υψηλή ένταση των ενεργών σημάτων, χαμηλά βασικά επίπεδα μη ενεργών σημάτων και εικόνα που σε γενικές γραμμές να μην αποκλίνει από τη συνολική εικόνα που παρουσιάζεται από το ολόκληρο διάγραμμα. Σε περίπτωση δηλαδή που κάποια συνταγή δίνει πολλά ενεργά σήματα αλλά παρουσιάζει μεγάλη διαφοροποίηση από τις υπόλοιπες 23 συνταγές τότε συμπεραίνουμε ότι μάλλον η συνταγή αυτή παρουσιάζει μία παραπλανητική εικόνα που απέχει από την πραγματική. Οπότε παρόλο που μπορεί να δίνει πολλά σήματα δεν μπορεί να θεωρηθεί σωστή και απορρίπτεται.

Με τη λογική αυτή επιλέχθηκαν οι ακόλουθες συνταγές:

Προκειμένου να επαληθευθούν τα παραπάνω αποτελέσματα και να επιβεβαιωθεί ο βέλτιστος συνδυασμός πραγματοποιήθηκε το τελικό τρίτο κατά σειρά πείραμα. Κατά το πείραμα αυτό δοκιμάστηκαν οι ακόλουθες συνταγές:

- Biorad buffer με Biorad inhibitors και PMSF, pH8
- Basic IGEPAL με “Turbo” μίγμα πρωτεασών και “Full” μίγμα φωσφατασών και PMSF, pH7,5
- Basic IGEPAL με μίγμα πρωτεασών p8340 (από την εταιρεία Sigma) και PMSF, pH7,5
- Basic IGEPAL με “Turbo” μίγμα πρωτεασών και “Full” μίγμα φωσφατασών και PMSF, pH8
- MOPS με “Turbo” μίγμα πρωτεασών και “Full” μίγμα φωσφατασών και PMSF, pH7,5

Οι συνταγές αυτές δοκιμάστηκαν στον τρίτο κύκλο πειραμάτων.

6.3 ΠΕΙΡΑΜΑ 3^ο

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός του 3^{ου} πειράματος είναι να βρεθεί το τελικό καλύτερο διάλυμα κυτταρόλυσης καθώς και η τιμή του pH του και τα καλύτερα μίγματα αναστολέων. Ακόμη, δοκιμάζονται δύο διαφορετικές τεχνικές προσθήκης του διαλύματος κυτταρόλυσης στα δείγματα ώστε να διαπιστωθούν τυχόν αλλαγές που στα πειραματικά αποτελέσματα.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Στον τελευταίο κύκλο πειραμάτων δοκιμάστηκαν οι 5 συνταγές που έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα στον προηγούμενο κύκλο. Η κυτταρόλυση έγινε σε δύο χρονικά σημεία όπως και στο πρώτο πείραμα δηλαδή στα 5 και 25 λεπτά.

Η διάταξη του plate είχε τη μορφή που παρουσιάζεται στην εικόνα 6.3.1:

			1	2	3	4	5	6	7	8
A										
B	DME	5MIN		Igepal, ph=7.5	Biorad, ph=8	Igepal, p8340	Igepal, ph=8	MOPS		
C	MIX	5MIN								
D	MIX	5MIN								
E	DME	25MIN								
F	MIX	25MIN								
G	MIX	25MIN								
H										

Εικόνα 6.3.1

Επιπλέον, έγινε σύγκριση δύο διαφορετικών τεχνικών προσθήκης του διαλύματος κυτταρόλυσης.

Στην πρώτη τεχνική, πριν την προσθήκη του διαλύματος κυτταρόλυσης γίνεται πλύση αφαιρώντας όλο το θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια προστίθενται 60ul διαλύματος κυτταρόλυσης.

Στη δεύτερη τεχνική, δεν αφαιρείται όλο το θρεπτικό υλικό από το δείγμα. Παραμένουν 20ul σε κάθε βοθρίο και προστίθενται 40ul από το διάλυμα κυτταρόλυσης. Το υπόλοιπο πρωτόκολλο παραμένει ίδιο. Αυτό συμβαίνει διότι μερικά κύτταρα δεν κολλάνε στον πάτο των βοθρίων αλλά επιπλέουν λίγο πάνω από τον πυθμένα. Στη δεύτερη περίπτωση δεν μπορεί να αφαιρεθεί όλο το θρεπτικό υλικό διότι τότε χαθούν και κύτταρα από το δείγμα με αποτέλεσμα την απώλεια σημάτων κατά τη μέτρηση.

Η κυτταρόλυση πραγματοποιήθηκε 25 λεπτά μετά τη διέγερση των κυττάρων.

Η διάταξη της πλάκας είχε τη μορφή που απεικονίζεται στην εικόνα 6.3.2:

			1	2	3	4	5	6	7	8
A										
B	DME	25MIN		Igepal, ph=7.5	Biorad, ph=8	Igepal, p8340	Igepal, ph=8	MOPS	60ul lysis	
C	MIX	25MIN								
D	MIX	25MIN								
E	DME	25MIN		Igepal, ph=7.5	Biorad, ph=8	Igepal, p8340	Igepal, ph=8	MOPS	40ul lysis+	
F	MIX	25MIN								
G	MIX	25MIN							20ul DME	
H										

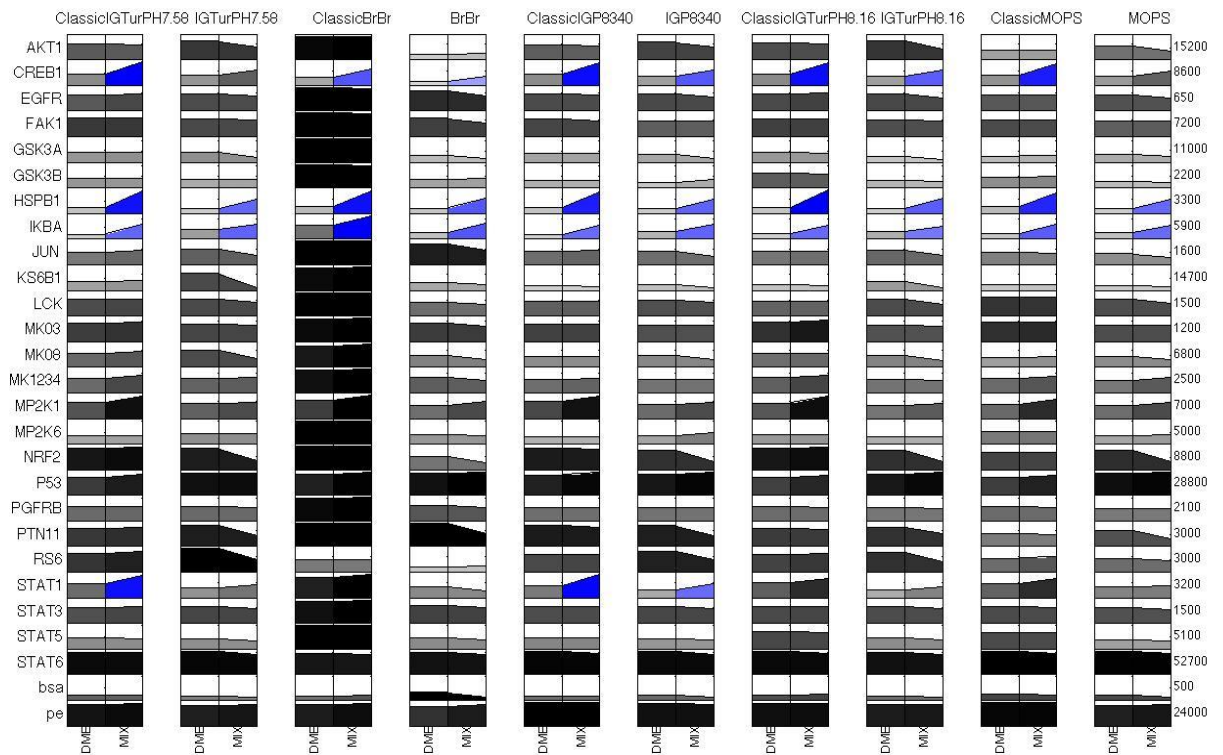
Εικόνα 6.3.2

Τα μετρούμενα σήματα παρέμειναν ίδια ενώ χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα ερεθίσματα που έδωσαν τα πιο ισχυρά σήματα στα προηγούμενα δύο πειράματα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 3^{ΟΥ} ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Οι πληροφορίες που προέκυψαν από τις μετρήσεις του τρίτου πειράματος παρουσιάζονται σε δύο διαγράμματα.

Τα αποτελέσματα για τα διαφορετικά διαλύματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 6.3.α.



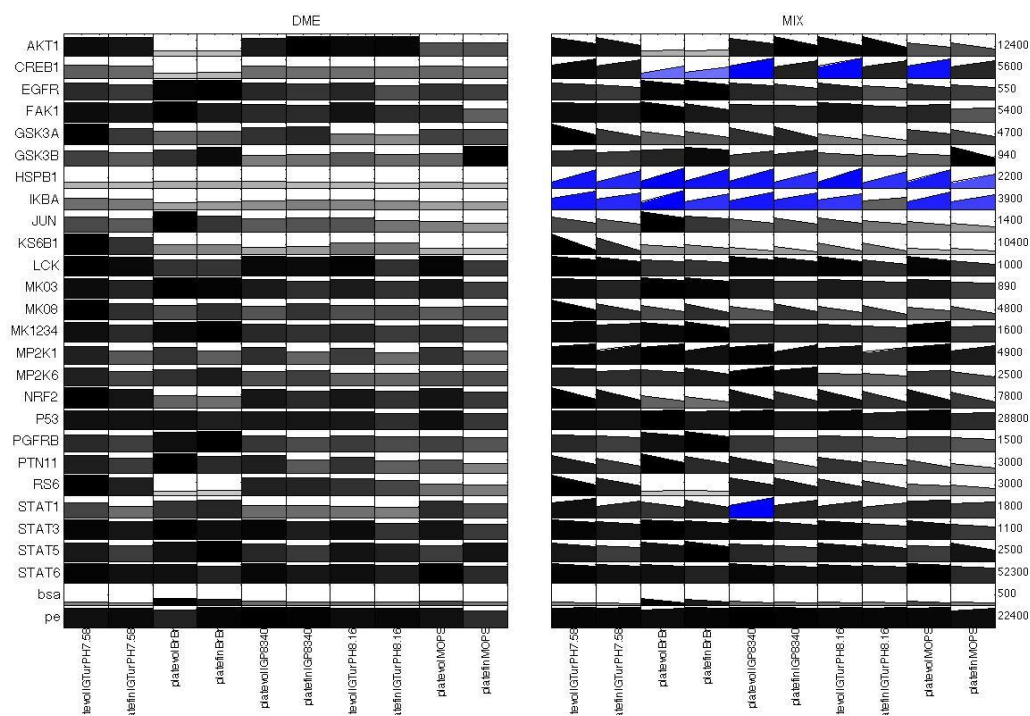
Διάγραμμα 6.3.α

Παρατηρείται ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαλυμάτων. Ωστόσο η χρήση το εμπορικού διαλύματος της Biorad (3^η στήλη αποτελεσμάτων) εμφανίζει περισσότερο «θόρυβο» όπως φαίνεται από το έντονο μαύρο χρώμα σε κάθε σήμα που δεν ενεργοποιήθηκε. Περισσότερα και πιο ξεκάθαρα σήματα έδωσε η χρήση του βασικού διαλύματος με απορρυπαντικό Igepal είτε σε αυτό προστέθηκε μίγμα πρωτεασών που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο (1^η στήλη αποτελεσμάτων) είτε προστέθηκε σε αυτό το εμπορικό μίγμα πρωτεασών r8340 της εταιρείας Sigma(4^η στήλη αποτελεσμάτων).Ωστόσο, καθώς επιδιώκεται η Παρασκευή όλων των υλικών στο εργαστήριο επιλέγεται ο συνδυασμός που αντιστοιχεί στην πρώτη στήλη. Επομένως, η συνταγή του τελικού βασικού διαλύματος είναι:

- 20mM Tris-HCl, pH 7.5
- 1mM EDTA
- 1mM EGTA
- 150mM NaCl
- 1% IGEPAL

Στο διάλυμα αυτό, προστίθενται οι αναστολείς φωσφατασών σε μέγιστη συγκέντρωση. Λίγα λεπτά πριν την κυτταρόλυση, προτίθενται στα παραπάνω το μίγμα αναστολέων «Turbo»σε συγκέντρωση 1:100 και το PMSF σε συγκέντρωση 1:50.

Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των δύο διαφορετικών τεχνικών παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 6.3.β.



Διάγραμμα 6.3.β

Στον πρώτο πίνακα εμφανίζονται τα αποτελέσματα για τα βασικά επίπεδα των σημάτων που παρέμειναν ανενεργά ενώ, στον δεύτερο πίνακα εμφανίζονται τα αποτελέσματα για τα ενεργοποιούμενα σήματα. Οι δύο τεχνικές παρουσιάζονται σε διπλανές στήλες για την ίδια συνταγή κυτταρόλυσης ώστε να είναι δυνατή η άμεση σύγκριση τους. Έτσι η πρώτη στήλη αφορά στην πρώτη τεχνική για την πρώτη συνταγή κυτταρόλυσης και η δεύτερη στήλη για τη δεύτερη τεχνική και την ίδια συνταγή κυτταρόλυσης. Με τον ίδιο τρόπο, η Τρίτη και τέταρτη στήλη αφορούν την πρώτη και δεύτερη τεχνική αντίστοιχα για τη δεύτερη συνταγή κυτταρόλυσης κοκ.

Είναι φανερό ότι οι δύο τεχνικές δεν εμφανίζουν αξιοσημείωτη διαφορά σε καμία από τις πέντε διαφορετικές συνταγές κυτταρόλυσης. Ακόμη, και στις περιπτώσεις που δεν ενεργοποιήθηκαν όλα τα πιθανά σήματα με τη δεύτερη τεχνικά, η αύξηση τους υπήρξε ιδιαίτερα σημαντική.

ΟΔΗΓΙΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗΣ ΤΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΙΓΜΑΤΩΝ

Έχοντας καθορίσει πλέον το ρυθμιστικό διάλυμα κυτταρόλυσης (Lysis buffer) και το μίγμα των αναστολέων (inhibitor cocktail) χρειάζεται να καθοριστεί ο τρόπος φύλαξης και η διάρκεια ζωής τους από τη μέρα παρασκευής τους. Με βάση τη βιβλιογραφία και τα υπάρχοντα πρωτόκολλα που συγκεντρώθηκαν προκύπτουν οι παρακάτω οδηγίες παρασκευής και φύλαξης.

Γενικά, το Lysis Buffer φυλάσσεται στους -20°C εάν δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί άμεσα. Για διάστημα 1-2 εβδομάδων μπορεί να φυλάσσεται στο ψυγείο στους 4°C . Για να ξεπαγώσει το buffer το αφήνουμε σε θερμοκρασία 24°C - 30°C ανακατεύοντας από άκρη σε άκρη. Έπειτα τοποθετείται σε πάγο ή στο ψυγείο για να κρυώσει πριν το προσθέσουμε στα κύτταρα. Τα protease inhibitors cocktails διατηρούνται κατά πλειοψηφία στους -20°C σε DMSO. Πριν τη χρήση πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου αφήνοντας τα να ξεπαγώσουν ή τρίβοντας με το χέρι μέχρι να υγροποιηθούν. Έπειτα κάνουμε vortex για να ομογενοποιηθούν.

Τα phosphatase inhibitors cocktails διατηρούνται σε υδατικό διάλυμα είτε στο ψυγείο ($2-8^{\circ}\text{C}$) είτε στην κατάψυξη (στους -20°C) για διάστημα μηνών. Μπορεί να φυλάσσονται και στο ίδιο το Lysis Buffer. Παρατηρήθηκε ότι τα phosphatase inhibitors cocktails που περιέχουν τα ίδια ακριβώς συστατικά με αυτά που χρησιμοποιούμε για την κυτταρόλυση φυλάσσονται στο ψυγείο, σε υδατικό διάλυμα. Οι εταιρείες τα στέλνουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Για να φτιάξουμε το τελικό buffer προσθέτουμε όλους τους protease inhibitors στο lysis buffer λίγο πριν το χρησιμοποιήσουμε (πολύ λίγα λεπτά πριν) και κάνουμε vortex για να διασφαλίσουμε την ομοιογένεια του μίγματος. Το αφήνουμε σε πάγο ώστε να παραμείνει κρύο. Όσο πιο φρέσκο είναι το μίγμα τόσο το καλύτερο. Το PMSF προστίθεται πάντα αμέσως πριν το ρίξουμε στα κύτταρα λόγω του πολύ σύντομου χρόνου ημιζωής του.

Καλό θα ήταν οι inhibitors να μην παραμένουν διαλυμένοι σε buffers για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ακόμη, θα πρέπει να αποφεύγεται το συνεχές και επαναλαμβανόμενο πάγωμα-ξεπάγωμα.

Πολύ σύνηθες είναι να βρίσκονται όλα τα inhibitors σε μορφή σκόνης και φυλάσσονται στην κατάψυξη. Όταν είναι να χρησιμοποιηθούν διαλύονται σε νερό.

Όλα τα παραπάνω μπορούν να φυλάσσονται για ένα χρόνο από την ημέρα παρασκευής τους.

Κατά τη δεύτερη φάση έγιναν δύο πειραματικές μετρήσεις. Η πρώτη έχει σκοπό την επιλογή των κατάλληλων ερεθισμάτων και σημάτων που θα χρησιμοποιηθούν στο δεύτερο πείραμα όπου δοκιμάζονται τα διαφορετικά πρωτόκολλα κυτταρόλυσης.

7.1 ΠΕΙΡΑΜΑ 1^ο

ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος αυτού του πειράματος είναι η επιλογή των καταλληλότερων σημάτων για το δεύτερο, τελικό πείραμα. Για το σκοπό αυτό, έγινε δοκιμή 7 διαφορετικών ερεθισμάτων και μετρήθηκαν 27 διαφορετικά σήματα. Τα ερεθίσματα και τα σήματα προήλθαν από τη βιβλιογραφία σχετικά με τα δίκτυα σηματοδότησης για την η κυτταροσειρά Huh7.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Τα σήματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι : TNFa, IL1a, b-NGF, BTC, TGFa, NaCl και INS. Η επεξήγηση της βιολογικής σημασίας των πρωτεϊνών αυτών παρατίθενται στο παράρτημα της παρούσας εργασίας.

Η κυτταρόλυση πραγματοποιήθηκε σε ένα χρονικό σημείο, 25 λεπτά μετά τη διέγερση των κυττάρων, ενώ το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε είναι το υπάρχον πρωτόκολλο του εργαστηρίου.

Η διάταξη της πλάκας 96-βοθρίο απεικονίζεται στην εικόνα 7.1.1.

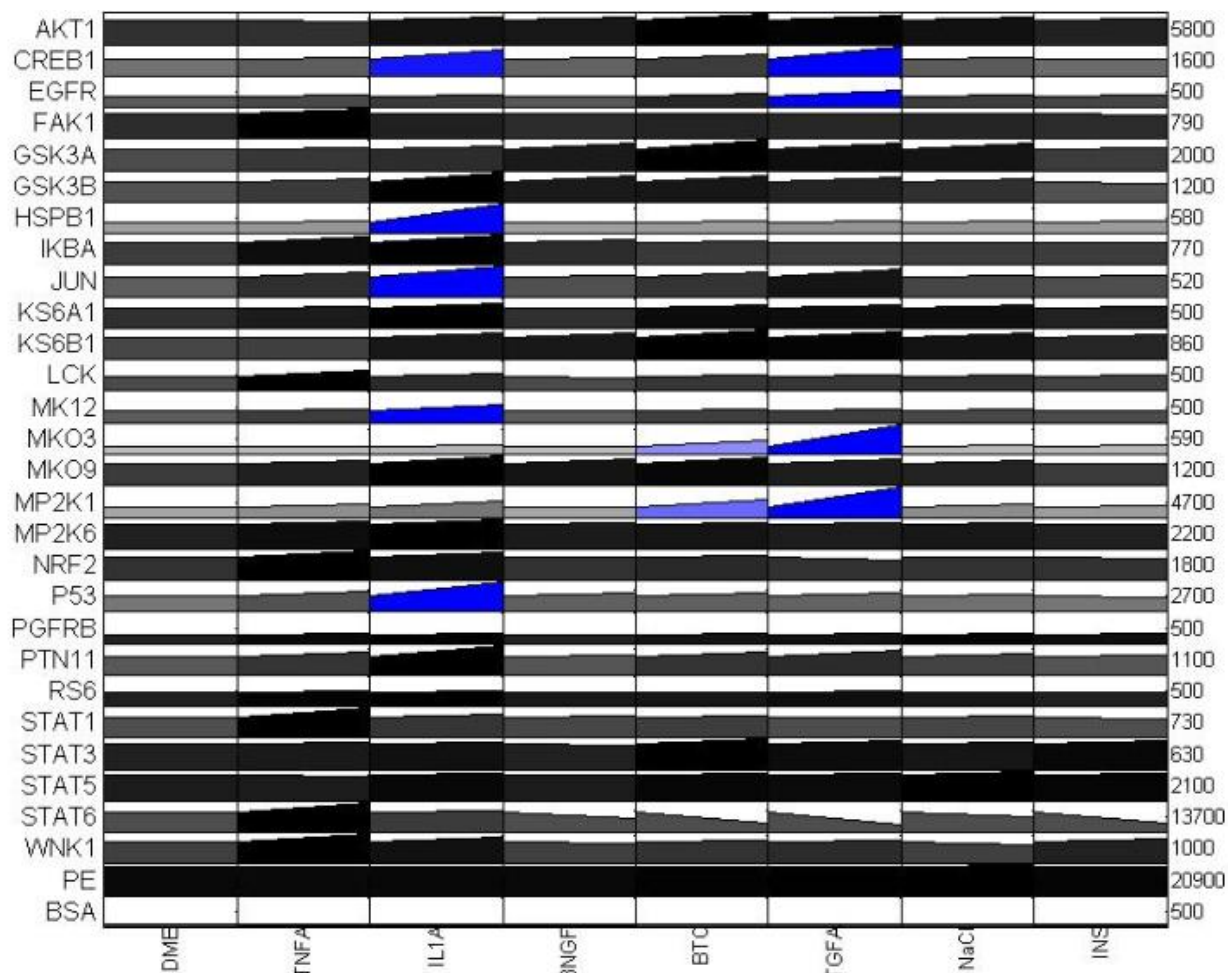
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS		
B	PBS	TNFa	Il1a	b-NGF	BTC	TGFa	NaCl	INS	DME	PBS		
C	PBS	TNFa	Il1a	b-NGF	BTC	TGFa	NaCl	INS	DME	PBS		
D	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS		
E												
F												
G												
H												

Εικόνα 7.1.1

Σημειώνεται ότι στα βοθρία που βρίσκονται στην άκρη της πλάκας τοποθετήθηκε περιμετρικά PBS ώστε να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα εξάτμισης των υγρών στα κεντρικά βοθρία όσο η πλάκα βρίσκεται στον επωαστήρα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στο διάγραμμα 7.1.



Διάγραμμα 7.1

Παρατηρείται ότι τα ερεθίσματα που έδωσαν κάποια απόκριση είναι τα IL1α, BTC και TGFα. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν δύο μίγματα σημάτων στο τελικό πείραμα.

- MIX1: TNFα και IL1α
- MIX2: BTC και TGFα

Ακόμη, θα μετρηθούν όλα τα σήματα που μετρήθηκαν σε αυτό το πείραμα για λόγους πληρότητας και για διεξαγωγή περισσότερης πληροφορίας.

ΣΚΟΠΟΣ

Το πείραμα στοχεύει στον εντοπισμό των καταλληλότερων τεχνικών για την πρόκληση της κυτταρόλυσης με μηχανικό τρόπο. Με βάση τα αποτελέσματα πρόκειται να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα διαφορετικών πρωτοκόλλων με τελικό σκοπό να επιλεγεί το καλύτερο από αυτά για μετέπειτα χρήση στο εργαστήριο.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Στο πείραμα δοκιμάστηκαν συνολικά 9 διαφορετικά πρωτόκολλα κυτταρόλυσης. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μηχανική διάσπαση των κυττάρων περιγράφονται στη παράγραφο 4.2 της παρούσας εργασίας και ονομαστικά είναι:

- Ανάμιξη (Shaking)
- Κύκλοι ψύξης/απόψυξης (Freeze/Thaw cycles)
- Λουτρό υπερήχων (Sonication)
- Απόξεση των κυττάρων (Scraping)

Το υπάρχον πρωτόκολλο του εργαστηρίου περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Αφαίρεση της πλάκας με τα διεγερμένα κύτταρα από τον επωαστήρα.
2. Αφαίρεση του υπάρχοντος θρεπτικού υλικού το οποίο περιέχει τα ερεθίσματα και πρόσθεση 100ul αποστειρωμένου PBS σε όλα τα χρησιμοποιούμενα βοθρία.
4. Αφαίρεση του PBS και πρόσθεση 60ul διαλύματος κυτταρόλυσης το οποίο περιέχει και όλους τους απαραίτητους αναστολείς.
5. Κάλυψη πλάκας και τοποθέτηση στους 4°C, σε συσκευή ανάμιξης για 20 λεπτά στο 80% της μέγιστης έντασης (shaking).
6. Τοποθέτηση της πλάκας στους -20°C κατά τη διάρκεια όλης της νύκτας.
7. Ξεπάγωμα της πλάκας σε λουτρό νερού 37°C, την επόμενη μέρα το πρωί.
8. Τοποθέτηση σε λουτρό υπερήχων (sonication) 4 φορές ανά 10-15 δευτερόλεπτα, για διάρκεια 10 δευτερολέπτων κάθε φορά.
9. Φυγοκέντριση της πλάκας για 20λεπτά σε ταχύτητα 2700g. Συλλογή 50ul από το υπερκείμενο υγρό που περιέχεται στα βοθρία της πλάκας μετά τη φυγοκέντριση.

Τα πρωτόκολλα σχεδιάστηκαν με τρόπο ώστε να απαντηθούν τα ακόλουθα ερωτήματα:

- Είναι απαραίτητη η μέθοδος της ανάμιξης;
- Πώς επιδρούν οι συνθήκες ανάμιξης στις τελικές μετρήσεις; Θα υπάρξει αλλαγή στις μετρήσεις εάν:
 - η ένταση της συσκευής αυξηθεί από 80% σε 100%;
 - η ανάμιξη διαρκέσει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα;
- Είναι απαραίτητη η μέθοδος του λουτρού υπερήχων (sonication);
- Ένας δεύτερος κύκλος ψύξης/απόψυξης των δειγμάτων θα επιφέρει διαφορετικό αποτέλεσμα;
- Ποιός ο ρόλος του ρυθμού αλλαγής της θερμοκρασίας του δείγματος;
 - Απότομη ψύξη στους -80°C
 - Σταδιακή απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου (21°C)
- Η τεχνική της απόξεσης των κυττάρων κατά τη προσθήκη του διαλύματος κυτταρόλυσης μπορεί να βελτιώσει τις τελικές μετρήσεις;

Προκειμένου να απαντηθούν τα παραπάνω ερωτήματα, σχεδιάστηκαν τα πρωτόκολλα που παρατίθενται στον πίνακα 7.2.1.

A/A Πλάκας	Πλύση	Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος	Απόξεση	Ανακίνηση	Ψύξη/Απόψυξη 1 ^{ος} κύκλος	Ψύξη/Απόψυξη 2 ^{ος} κύκλος	Λουτρό Υπερήχων	Φυγοκέντριση 2700g, 20λεπτά
1	✓	✓	✗	4°C για 20'	-20°C/37°C	✗	4x (10sec υπέρηχοι και 10secδιάλειμμα)	✓
2	✓	✓	✗	4°C για 20'	-20°C/37°C	✗	4x (10sec υπέρηχοι και 10secδιάλειμμα)	✓
3	✓	✓	✗	4°C για 20'	-20°C/21°C	✗	4x (10sec υπέρηχοι και 10secδιάλειμμα)	✓
4	✓	✓	✗	Χωρίς ανάμιξη απλά παραμονή στους 4°C για 20'	-20°C/37°C	✗	4x (10sec υπέρηχοι και 10secδιάλειμμα)	✓
5	✓	✓	✗	4°C για 20'	-20°C/37°C	✗	✗	✓
6	✓	✓	✗	4°C για 60', μέγιστη ένταση	-20°C/37°C	✗	4x (10sec υπέρηχοι και 10secδιάλειμμα)	✓
7	✓	✓	✗	✗	-80°C/37°C	✗	4x (10sec υπέρηχοι και 10secδιάλειμμα)	✓
8	✓	✓	✗	4°C για 20', μέγιστη ένταση	-20°C/37°C	✗	4x (10sec υπέρηχοι και 10secδιάλειμμα)	✓
9	✓	✓	✗	4°C για 20'	-20°C/37°C	✗	4x (10sec υπέρηχοι και 10secδιάλειμμα)	✓
10	✓	✓	✗	4°C για 20'	-20°C/37°C	-20°C/37°C	4x (10sec υπέρηχοι και 10secδιάλειμμα)	✓
11	✓	✓	✓	4°C για 20'	-20°C/37°C	✗	4x (10sec υπέρηχοι και 10secδιάλειμμα)	✓

Πίνακας 7.2.1

Καθεμία από τις 11 πλάκες που χρησιμοποιήθηκαν είχε τη διάταξη που απεικονίζεται στην εικόνα 7.2.1.

	1	2	3	4
A	PBS	PBS	PBS	
B	PBS	TNF α & IL1 α	PBS	
C	PBS	DME	PBS	
D	PBS	BTC & TGF α	PBS	
E	PBS	DME	PBS	
F	PBS	TNF α & IL1 α	PBS	
G	PBS	BTC & TGF α	PBS	
H	PBS	PBS	PBS	

Εικόνα 7.2.1

Η προσθήκη PBS περιμετρικά των βοθρίων έγινε για την αποφυγή της εξάτμισης των υγρών στον επωαστήρα.

Για κάθε πλάκα η λύση των κυττάρων (προσθήκη διαλύματος κυτταρόλυσης) έγινε 25 λεπτά μετά τη διέγερση των κυττάρων.

Έπειτα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που αντιστοιχεί σε καθεμία σύμφωνα με τον πίνακα 7.2.1.

Μετά το στάδιο της φυγοκέντρισης, έγινε συλλογή του υπερκείμενου υγρού και τοποθέτηση σε νέα πλάκα 96 βοθρίων. Στη νέα πλάκα συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα όλων των πρωτοκόλλων και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μία μέτρηση ELISA για όλα μαζί. Με τον τρόπο αυτό, αποφεύχθηκαν διαφοροποιήσεις που θα μπορούσε να επιφέρει το πρωτόκολλο μέτρησης ELISA στα τελικά αποτελέσματα σε περίπτωση που γίνονταν ξεχωριστές μετρήσεις για κάθε πρωτόκολλο.

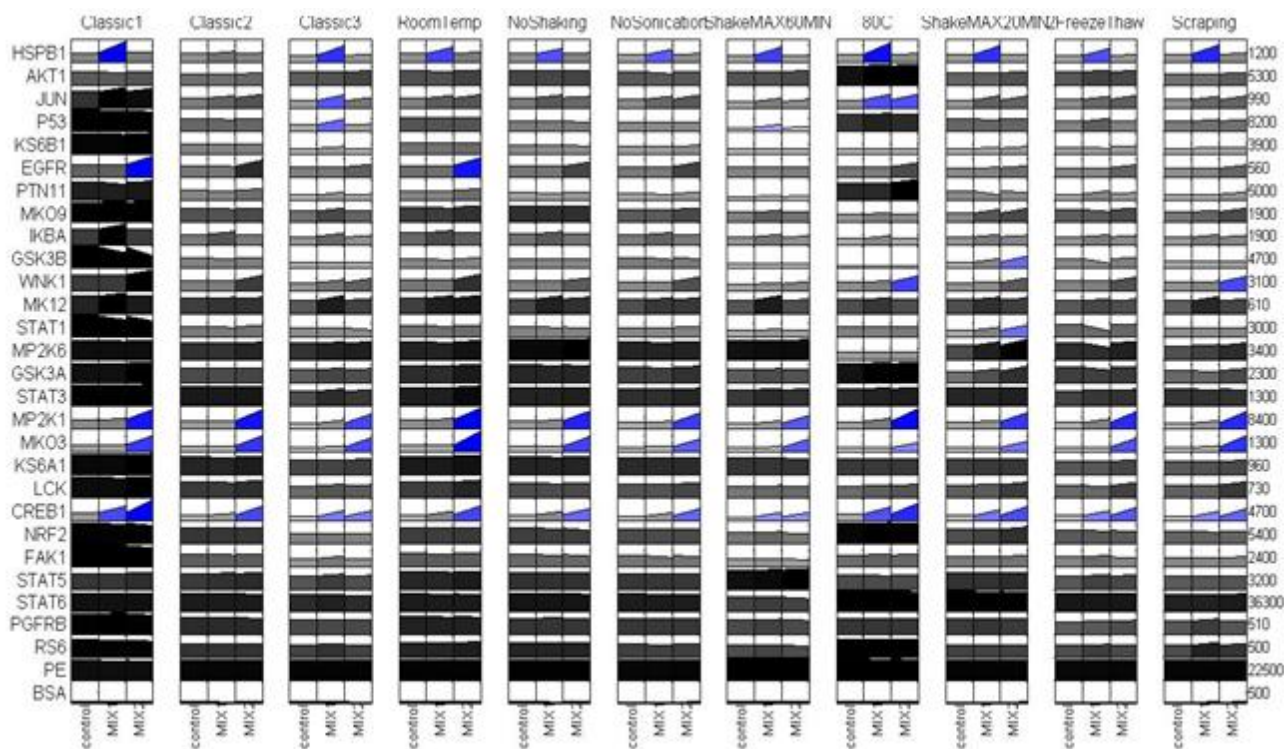
Η πλάκα όπου υλοποιήθηκε η ELISA είχε τη διάταξη της εικόνας 7.2.2.

FOR THE ELISA												
Plate # E1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C	Plate #1	Plate #2	Plate #3	Plate #4	Plate #5	Plate #6	Plate #7	Plate #8	Plate #9	Plate #10	Plate #11	
D												
E												
F												
G												
H												

Εικόνα 7.2.2

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 2^{ΟΥ} ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν απεικονίζονται στο διάγραμμα 7.2.



Διάγραμμα 7.2

Με μία πρώτη ανάγνωση των αποτελεσμάτων φαίνεται να μην υπάρχει σημαντική διαφορά ανάλογα με το πρωτόκολλο που θα χρησιμοποιηθεί. Τα σήματα που ενεργοποιούνται είναι τα ίδια και μάλιστα ενεργοποιούνται σχεδόν με την ίδια ένταση.

Ωστόσο, το πρωτόκολλο που αντιστοιχεί στην 1η στήλη εμφανίζει υψηλό υπόβαθρο. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην ύπαρξη φυσαλίδων στο συγκεκριμένο βοθρίο οι οποίες επηρέασαν αρνητικά την καθαρότητα των αποτελεσμάτων.

Αρκετά υψηλό υπόβαθρο εμφανίζεται και στην περίπτωση του πρωτοκόλλου που αντιστοιχεί στην 8^η στήλη (απευθείας ψύξη στους -80°C). Ωστόσο, τα σήματα είναι πολύ ισχυρά.

Γενικά, δεν μπορούν να διεξαχθούν σαφή και ασφαλή συμπεράσματα για τη διαφορετικότητα μεταξύ των πρωτοκόλλων μόνο από τον πίνακα 7.2.1. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση προκειμένου να εντοπιστεί το καλύτερο πρωτόκολλο καθώς και να διαπιστωθούν τυχόν συσχετίσεις μεταξύ διαφορετικών πρωτοκόλλων.

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές τεχνικές:

- Η τεχνική Anova με χρήση Matlab
- Σύγκριση και συσχέτιση κατά Spearman με χρήση Microsoft Excel

7.3.1 ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΝΟΒΑ

Η ονομασία της τεχνικής Anova προέρχεται από τα αρχικά Analysis Of Variance (ανάλυση διακύμανσης) και αναπτύχθηκε από τον R.A.Fisher. Στη μέθοδο αυτή, η παρατηρούμενη διακύμανση σε μία μεταβλητή διαμερίζεται σε συνιστώσες που αποδίδονται σε διάφορες πηγές διακύμανσης.

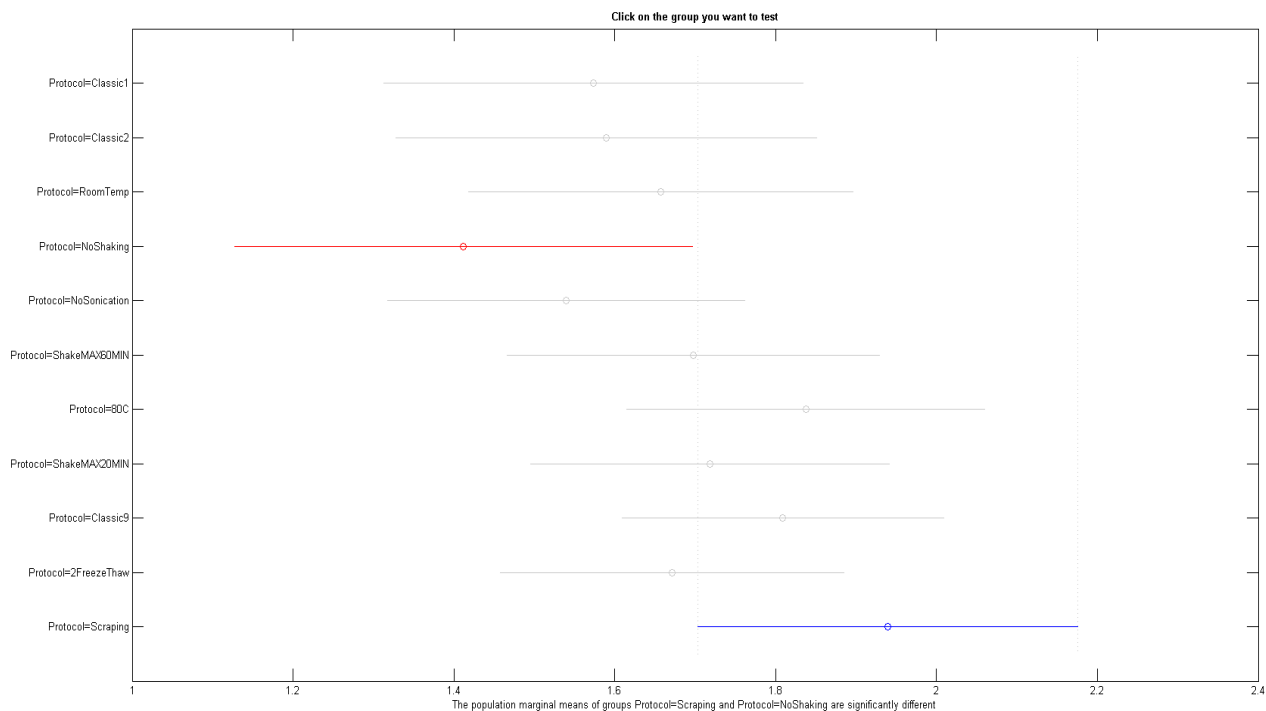
Στην απλούστερη μορφή της, η ANOVA αποτελεί μία μορφή στατιστικού ελέγχου για το κατά πόσο οι μέσες τιμές των συγκρινόμενων δειγμάτων είναι ίσες. Υπό αυτή την έννοια, αποτελεί μία γενίκευση του t-testγια περισσότερα από δύο δείγματα και είναι χρήσιμη για τη σύγκριση τριών ή περισσότερων μεταβλητών στατιστικής σημασίας. Για το λόγο αυτό, η ANOVAχρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση πειραματικών δεδομένων.

Στην τυπική εφαρμογή της ANOVA, ορίζεται η μηδενική υπόθεση ότι όλες οι ομάδες είναι τυχαία δείγματα του ίδιου πληθυσμού. Αυτό στην περίπτωση των πειραμάτων για τον προσδιορισμό του βέλτιστου πρωτοκόλλου σημαίνει ότι όλα τα πρωτόκολλα έχουν το ίδιο αποτέλεσμα. Η περίπτωση απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης υποδεικνύει ότι κάθε πρωτόκολλο οδηγεί σε διαφορετικό αποτέλεσμα και σημαίνει ότι η διακύμανση μεταξύ των αποτελεσμάτων κάθε ομάδας (εδώ κάθε πρωτοκόλλου) δεν μπορεί να θεωρηθεί τυχαία.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ή να απορριφθεί η μηδενική υπόθεση, καθορίζεται ένα κατώτατο όριο («threshold») το οποίο εκφράζει στην ουσία το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας. Σε περίπτωση που η μεταβλητή είναι μικρότερη από το «threshold»τότε, η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται.

Στα εν λόγω πειραματικά αποτελέσματα η τεχνική ANOVA εφαρμόστηκε μόνο για τα σήματα που ενεργοποιήθηκαν τουλάχιστον μία φορά σε κάποιο πρωτόκολλο. Έπειτα, ελέγχθηκε κατά πόσο το εκάστοτε σήμα ενεργοποιήθηκε για κάθε ένα από τα υπόλοιπα πρωτόκολλα και σε ποιά ένταση σε σχέση με το αντίστοιχο βασικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, η απόκριση κάθε σήματος διαιρέθηκε με την απόκριση του σήματος στη περίπτωση όπου δεν υπήρξε διέγερση των κυττάρων, δηλαδή με το βασικό του επίπεδο («control»). Σε περίπτωση που, ο λόγος των αποκρίσεων ήταν μεγαλύτερος της τιμής 1.5, η απόκριση αυξήθηκε κατά 50% στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο και το σήμα κρίνεται ενεργοποιημένο. Η τιμή 1.5, λοιπόν, ορίζεται ως κατώτατο όριο («threshold»). Με

βάση τα ενεργοποιούμενα σήματα, δημιουργήθηκε το διάγραμμα 7.3.1, όπου απεικονίζονται οι προκύπτουσες σχέσεις μεταξύ των πρωτοκόλλων.



Διάγραμμα 7.3.1

Οι κύκλοι που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν την αύξηση της μέσης τιμής και η οριζόντια γραμμή που διέρχεται από αυτούς αντιπροσωπεύει το εύρος στο οποίο εκτείνεται η μέτρηση του κάθε σήματος.

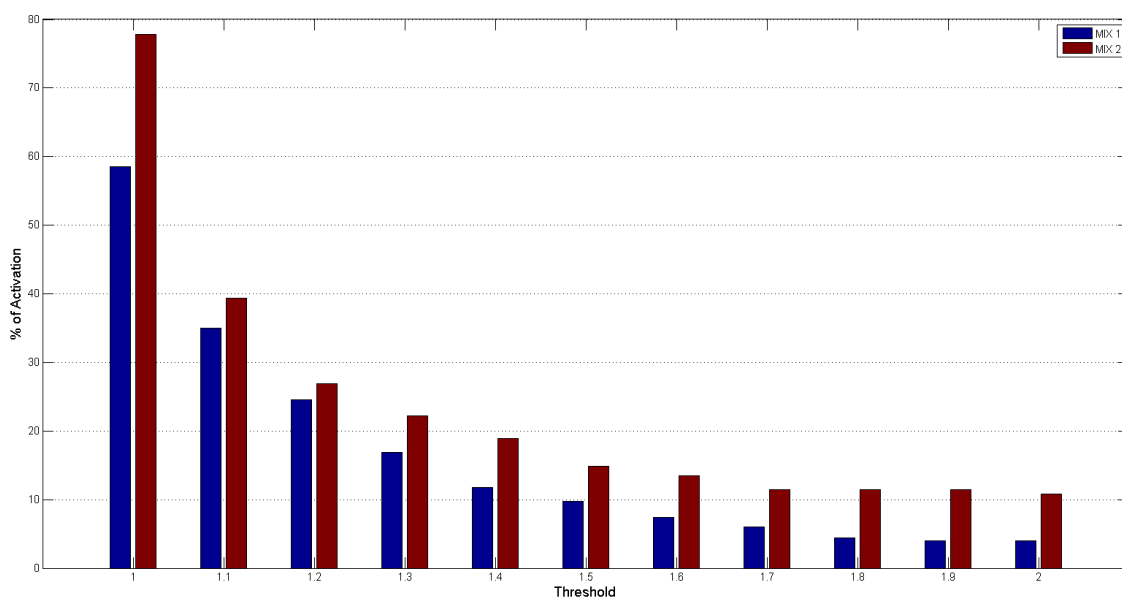
Από το διάγραμμα 7.3.1 παρατηρείται ότι με βάση τη μέθοδο Ανονα δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πρωτοκόλλων παρά μόνο στη σύγκριση του πρωτοκόλλου όπου δεν έγινε καθόλου ανάμιξη και του πρωτοκόλλου όπου έγινε απόξεση των κυττάρων. Εφαρμογή οποιουδήποτε άλλου πρωτοκόλλου φαίνεται ότι δίνει παρόμοια αποτελέσματα και οποιαδήποτε διακύμανση μεταξύ των αποτελεσμάτων τους μπορεί να θεωρηθεί τυχαία.

Ωστόσο, η αυτή η σύγκριση των πρωτοκόλλων μελετά συνολικά όλα τα ενεργά σήματα, αγνοώντας τα επίπεδα των μη ενεργοποιούμενων σημάτων. Ακόμη, εξετάζει συνολικά όλα τα χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα. Για να διεξαχθούν πιο βέβαια συμπεράσματα μελετήθηκε ο βαθμός συσχέτισης των πρωτοκόλλων. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε ανάλυση τόσο των ενεργών όσο και των ανενεργών σημάτων κάθε πρωτοκόλλου σε σχέση με τα υπόλοιπα, δηλαδή έγινε λεπτομερής σύγκριση ανά δύο πρωτόκολλα.

7.3.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ

Αρχικά, έγινε διαίρεση των αποκρίσεων όλων των σημάτων με την απόκριση του αντίστοιχου σήματος στη περίπτωση όπου δεν υπήρξε διέγερση των κυττάρων («control»). Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω σε κάθε πλάκα αφήνονται κάποια βοθρία που περιέχουν κύτταρα μόνο με θρεπτικό υλικό, χωρίς να προστεθεί σε αυτά κάποιου είδους διέγερσης. Με τον τρόπο αυτό μετριέται η φυσική απόκριση των κυττάρων στα μετρούμενα σήματα.

Ένα σήμα χαρακτηρίζεται ως ενεργοποιημένο ή μη ενεργό με βάση πόσες φορές μεγαλύτερη από το «control» είναι η απόκριση ενός σήματος υπό την επίδραση της εκάστοτε διέγερσης («threshold»). Στο διάγραμμα 7.3.2 απεικονίζεται το ποσοστό ενεργοποιημένων σημάτων ανάλογα με το ορισμένο «threshold».



Διάγραμμα 7.3.2

Η σύγκριση των πρωτοκόλλων έγινε για δύο τιμές: για threshold ίσο με 1.5 όπου δηλαδή κρίθηκαν ενεργοποιούμενα τα σήματα που αυξήθηκαν κατά 50% από την τιμή «control» και για threshold ίσο με 2 όπου τα σήματα κρίθηκαν ενεργοποιούμενα σε περίπτωση αύξησης κατά 100% από την τιμή «control». Όταν τουλάχιστον 2 πρωτόκολλα έδιναν τιμές μεγαλύτερες του threshold τότε, το συγκεκριμένο σήμα χαρακτηρίζεται ενεργό για αυτό το ερέθισμα, για όλα τα πρωτόκολλα. Προέκυψαν, έτσι οι πίνακες 7.3.2α για threshold ίσο με 1.5 και 7.3.2β για threshold ίσο με 2.

Higher Activations (1.5)	Classic1	Classic2	RoomTemp	NoShaking	NoSonication	Shake MAX 60'	80C	Shake MAX 20'	Classic9	2FreezeThaw	Scraping	Average
Classic1		50%	30%	50%	40%	20%	20%	30%	20%	30%	20%	31%
Classic2	50%		30%	50%	60%	40%	20%	50%	30%	30%	10%	37%
RoomTemp	70%	70%		80%	50%	40%	20%	30%	40%	40%	10%	45%
NoShaking	50%	50%	20%		30%	10%	10%	30%	10%	10%	0%	22%
NoSonication	60%	40%	50%	70%		40%	20%	40%	20%	30%	10%	38%
ShakeMAX60MIN	80%	60%	60%	90%	60%		40%	60%	0%	50%	40%	54%
80C	80%	80%	80%	90%	80%	60%		80%	50%	70%	30%	70%
ShakeMAX20MIN	70%	50%	70%	70%	60%	40%	20%		20%	50%	10%	46%
Classic3	80%	70%	60%	90%	80%	100%	50%	80%		60%	50%	72%
2FreezeThaw	70%	70%	60%	90%	70%	50%	30%	50%	40%		20%	55%
Scraping	80%	90%	90%	100%	90%	60%	70%	90%	50%	80%		80%

Πίνακας 7.3.2α

Higher Activations (2)	Classic1	Classic2	RoomTemp	NoShaking	NoSonication	Shake MAX 60'	80C	Shake MAX 20'	Classic9	2FreezeThaw	Scraping	Average
Classic1		40%	60%	60%	60%	20%	20%	20%	20%	40%	20%	36%
Classic2	60%		40%	60%	60%	40%	20%	40%	20%	20%	0%	36%
RoomTemp	40%	60%		100%	40%	40%	20%	20%	40%	40%	0%	40%
NoShaking	40%	40%	0%		20%	0%	20%	20%	0%	0%	0%	14%
NoSonication	40%	40%	60%	80%		40%	20%	40%	20%	0%	0%	34%
ShakeMAX60MIN	80%	60%	60%	100%	60%		40%	80%	0%	60%	20%	56%
80C	80%	80%	80%	80%	80%	60%		60%	60%	80%	20%	68%
ShakeMAX20MIN	80%	60%	80%	80%	60%	20%	40%		20%	60%	0%	50%
Classic3	80%	80%	60%	100%	80%	100%	40%	80%		60%	40%	72%
2FreezeThaw	60%	80%	60%	100%	100%	40%	20%	40%	40%		0%	54%
Scraping	80%	100%	100%	100%	100%	80%	80%	100%	60%	100%		90%

Πίνακας 7.3.2β

Στους πίνακες αυτούς, κάθε κελί (σειρά i, στήλη j) απεικονίζει πόσες φορές (ως ποσοστό του συνολικού αριθμού των Activations) το πρωτόκολλο i έδωσε μεγαλύτερο σήμα (fold-change) από το πρωτόκολλο j. Σε περίπτωση όπου το ποσοστό είναι κοντά στο 50% το φαινόμενο μπορεί να θεωρηθεί τυχαίο. Διαφορετικά, υπάρχει συστηματική διαφορά, συνεπώς το πρωτόκολλο i κρίνεται προτιμότερο από το πρωτόκολλο j.

Παρατηρώντας και συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο πινάκων διαπιστώνεται ότι η τεχνική της απόξεσης για τη κυτταρόλυση των δειγμάτων επηρεάζει θετικά τα πειραματικά αποτελέσματα.

Ωστόσο, το πλήθος και η ένταση των ενεργοποιούμενων σημάτων δεν επαρκούν για την εκλογή του βέλτιστου πρωτοκόλλου. Πρέπει να εξεταστούν τα βασικά επίπεδα των μη ενεργών σημάτων. Υψηλά βασικά επίπεδα σημάτων συνεπάγονται περισσότερο θόρυβο στις πειραματικές μετρήσεις και κατ'έκταση πιο αμφίβολα αποτελέσματα.

Για τη σύγκριση των πρωτοκόλλων ως προς τα βασικά επίπεδα, υπολογίστηκε η απόσταση των ανενεργών σημάτων από το 1, δηλαδή από την αντίστοιχη τιμή του «control». Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7.2.3γ για threshold ίσο με 1.5 και στον πίνακα 7.2.3δ για τιμή threshold ίση με 2. Στους πίνακες αυτούς κάθε κελί λέει πόσες φορές το πρωτόκολλο i είχε μεγαλύτερη απόσταση από το 1 (είτε προς τα κάτω είτε προς τα πάνω) σε σχέση με το πρωτόκολλο j.

Steadier Basal (1.5)	Classic1	Classic2	RoomTemp	NoShaking	NoSonication	Shake MAX 60'	80C	Shake MAX 20'	Classic9	2FreezeThaw	Scraping	Average
Classic1		57%	48%	55%	52%	36%	41%	27%	30%	30%	30%	40%
Classic2	43%		36%	50%	41%	30%	41%	34%	18%	23%	30%	35%
RoomTemp	52%	64%		64%	52%	43%	48%	30%	27%	30%	30%	44%
NoShaking	45%	50%	36%		32%	27%	41%	30%	23%	27%	32%	34%
NoSonication	48%	59%	48%	68%		39%	50%	32%	36%	34%	34%	45%
ShakeMAX60MIN	64%	70%	57%	73%	61%		64%	43%	25%	36%	45%	54%
80C	59%	59%	52%	59%	50%	36%		27%	23%	34%	41%	44%
ShakeMAX20MIN	73%	66%	70%	70%	68%	57%	73%		48%	55%	50%	63%
Classic3	70%	82%	73%	77%	64%	75%	77%	52%		57%	57%	68%
2FreezeThaw	70%	77%	70%	73%	66%	64%	66%	45%	43%		50%	63%
Scraping	70%	70%	70%	68%	66%	55%	59%	50%	43%	50%		60%

Πίνακας 7.3.2γ

Steadier Basal (2)												Average
	Classic1	Classic2	RoomTemp	NoShaking	NoSonication	Shake MAX 60'	80C	Shake MAX 20'	Classic9	2FreezeThaw	Scraping	
Classic1		59%	45%	55%	51%	35%	39%	27%	29%	29%	29%	40%
Classic2	41%		37%	51%	41%	31%	39%	35%	20%	24%	29%	35%
RoomTemp	55%	63%		65%	51%	43%	45%	29%	29%	31%	29%	44%
NoShaking	45%	49%	35%		31%	27%	37%	29%	22%	27%	29%	33%
NoSonication	49%	59%	49%	69%		39%	47%	31%	35%	37%	33%	45%
ShakeMAX60MIN	65%	69%	57%	73%	61%		61%	43%	22%	37%	47%	54%
80C	61%	61%	55%	63%	53%	39%		33%	24%	37%	41%	47%
ShakeMAX20MIN	73%	65%	71%	71%	69%	57%	67%		45%	53%	49%	62%
Classic3	71%	80%	71%	78%	65%	78%	76%	55%		57%	57%	69%
2FreezeThaw	71%	76%	69%	73%	63%	63%	63%	47%	43%		49%	62%
Scraping	71%	71%	71%	71%	67%	53%	59%	51%	43%	51%		61%

Πίνακας 7.3.2δ

7.3.3 ΒΑΘΜΟΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΚΑΤΑ SPEARMAN

Στη στατιστική, ο συντελεστής συσχέτισης Spearman, που πήρε το όνομά του από τον Charles Spearman είναι ένα μη παραμετρικό μέτρο της στατιστικής εξάρτησης μεταξύ δύο μεταβλητών. Αξιολογεί το πόσο καλά μπορεί να περιγραφεί η σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών χρησιμοποιώντας μια μονότονη συνάρτηση.

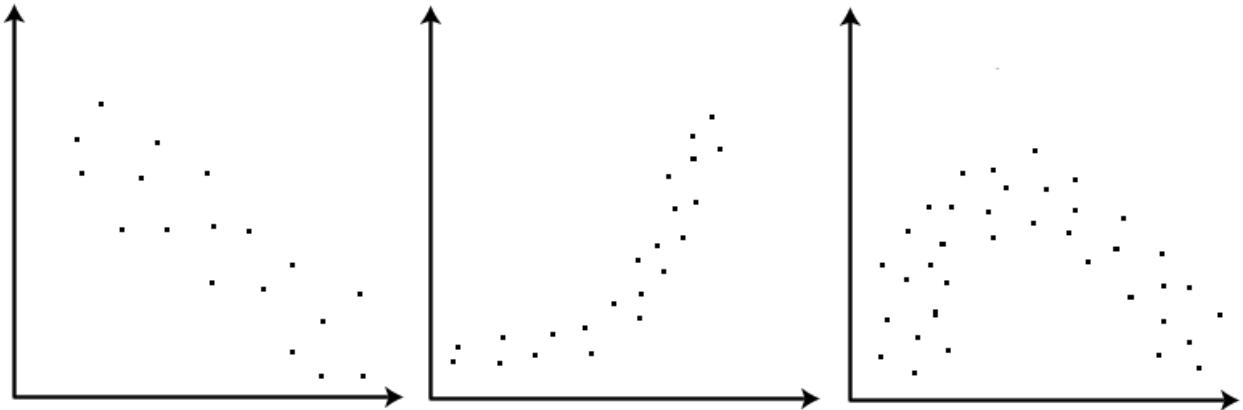
Η συσχέτιση κατά Spearman αποτελεί ουσιαστικά μία μη παραμετρική εκδοχή της συσχέτισης κατά Pearson.

Η συσχέτιση κατά Pearson εκφράζει ένα μέτρο της δύναμης μιας γραμμικής σύνδεσης μεταξύ δύο μεταβλητών. Βασικά, επιχειρεί να χαράξει μία γραμμή η οποία προσαρμόζεται καλύτερα μεταξύ των δεδομένων των δύο συσχετιζόμενων μεταβλητών. Αυτός ο συντελεστής συσχέτισης υποδεικνύει πόσο μακριά βρίσκονται τα σημεία των δεδομένων από τη χαρασσομένη γραμμή (βέλτιστη περίπτωση).

Η υπόθεση της γραμμικής σχέσης μεταξύ των δύο μεταβλητών είναι απαραίτητη για το μοντέλο του Pearson. Ωστόσο, το μοντέλο του Spearman αξιολογεί το πόσο καλά μπορεί να περιγραφεί η σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών χρησιμοποιώντας μια μονότονη συνάρτηση. Μία μονότονη σχέση είναι όπου ισχύει μία από τις παρακάτω προτάσεις:

- Καθώς αυξάνει η τιμή της μίας μεταβλητής, αυξάνει και η τιμή της άλλης μεταβλητής, ή,

- Καθώς αυξάνει η τιμή της μίας μεταβλητής, μειώνεται η τιμή της άλλης μεταβλητής.
Παραδείγματα μονότονης και μη μονότονης σχέσης παρουσιάζονται στην εικόνα 7.3.3:



Εικόνα 7.3.3

- A) Μονότονη: όσο αυξάνει η μία μεταβλητή, μειώνεται η άλλη
- B) Μονότονη: όσο αυξάνει η μία μεταβλητή, αυξάνεται και η άλλη
- Γ) Μη μονότονη

Η ύπαρξη μονότονης σχέσης είναι βασική και ιδιαίτερα σημαντική προϋπόθεση για τη συσχέτιση κατά Spearman. Ακόμη, είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι η υπόθεση της μονότονης σχέσης είναι λιγότερο περιοριστική από την υπόθεση της γραμμικής σχέσης που χρησιμοποιείται για συσχέτιση κατά Pearson. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται από το δεύτερο μέρος του παραπάνω διαγράμματος: η σχέση δεν είναι γραμμική άρα δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί η συσχέτιση κατά Pearson, όμως, η σχέση είναι μονότονη άρα μπορεί να υπάρξει συσχέτιση κατά Spearman.

Εάν δεν υπάρχουν επαναλαμβανόμενες τιμές των δεδομένων, μια τέλεια συσχέτιση Spearman κατά +1 ή -1 συμβαίνει όταν κάθε μία από τις μεταβλητές είναι μια τέλεια μονότονη συνάρτηση της άλλης.

Για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ των πρωτόκολλων και σε ποιό βαθμό εφαρμόζεται η μέθοδος του Spearman καθώς δεν είναι δυνατή η αποδοχή ότι η συσχέτιση των πρωτοκόλλων είναι γραμμική (μέθοδος Pearson).

Ο βαθμός συσχέτισης αποτελεί ένδειξη του κατά πόσο το κάθε πρωτόκολλο συντονίζεται με τη γενική εικόνα που δίνεται από το πείραμα συνολικά. Έτσι, διαπιστώνεται εάν τα αποτελέσματα πλησιάζουν την αλήθεια ή εάν αποκλίνουν από την πραγματικότητα. Για παράδειγμα ένα πρωτόκολλο μπορεί να δίνει μεγαλύτερη πλήθος σημάτων ή πιο ισχυρά σήματα όμως τα ενεργά σήματα να μην συμφωνούν με καμία άλλη μέτρηση. Στην περίπτωση αυτή συμπεραίνεται ότι,

μάλλον το πρωτόκολλο αυτό δίνει εσφαλμένη εικόνα για τις πραγματικές συνδέσεις που πραγματοποιούνται οπότε δεν δύναται να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7.3.3 ο οποίος περιγράφει πόσο συσχετισμένα είναι τα πρωτόκολλα ανά 2. Δηλαδή η τιμή που αντιστοιχεί στη σειρά i και στη στήλη j δείχνει κατά πόσο τα 2 πρωτόκολλα (i,j) μπορούν να συσχετιστούν με μια γνησίως αύξουσα συνάρτηση (είναι δηλαδή $i = f(j)$ όπου f γνησίως αύξουσα). Το ποσοστό 100% υποδεικνύει ότι όποτε αυξάνεται η τιμή του ενός, αυξάνεται και η τιμή του άλλου. Αντίθετα ποσοστό 0% σημαίνει ότι όταν το ένα αυξάνεται το άλλο είναι σταθερό.

Fold-Change Correlation	Classic1	Classic2	RoomTemp	NoShaking	NoSonication	Shake MAX 60'	80C	Shake MAX 20'	Classic9	2FreezeThaw	Scraping
Classic1	100%	75%	76%	79%	77%	39%	61%	36%	59%	65%	70%
Classic2	75%	100%	87%	70%	79%	32%	61%	52%	45%	62%	70%
RoomTemp	76%	87%	100%	69%	90%	35%	66%	51%	47%	66%	76%
NoShaking	79%	70%	69%	100%	69%	45%	65%	35%	67%	63%	72%
NoSonication	77%	79%	90%	69%	100%	47%	74%	52%	56%	58%	77%
ShakeMAX60MIN	39%	32%	35%	45%	47%	100%	68%	51%	77%	44%	50%
80C	61%	61%	66%	65%	74%	68%	100%	60%	73%	51%	69%
ShakeMAX20MIN	36%	52%	51%	35%	52%	51%	60%	100%	24%	17%	55%
Classic3	59%	45%	47%	67%	56%	77%	73%	24%	100%	61%	53%
2FreezeThaw	65%	62%	66%	63%	58%	44%	51%	17%	61%	100%	64%
Scraping	70%	70%	76%	72%	77%	50%	69%	55%	53%	64%	100%

Πίνακας 7.3.3

Ως προς τη συσχέτιση παρατηρείται ότι τα πρωτόκολλα που εμφανίζουν υψηλή συσχέτιση ανήκουν στις 5 πρώτες σειρές του πίνακα (69%-90%). Σε αυτά ανήκουν και τα τρία αντίγραφα του κλασικού πρωτοκόλλου το οποίο λειτουργεί ως επιβεβαίωση ότι η διεξαγωγή των πειραμάτων αλλά και η στατιστική ανάλυση είναι έγκυρες. Η σημαντικότερη παρατήρηση, ωστόσο, είναι ότι το πρωτόκολλο όπου εντάχθηκε η τεχνική της απόξεσης παρουσιάζει ιδιαίτερα ικανοποιητική συσχέτιση η οποία κυμαίνεται μεταξύ 50% και 77%. Το πρωτόκολλο αυτό παρουσιάζει και τα υψηλότερα ενεργοποιούμενα σήματα όπως φαίνεται στους πίνακες 7.3.2α και 7.3.2β. Άρα, η τεχνική απόξεσης δίνει την υπάρχουσα πληροφορία πιο ξεκάθαρα και με σημαντικό βαθμό εμπιστοσύνης.

Έχοντας ολοκληρώσει όλα τα παραπάνω , είμαστε σε θέση πλέον να παρασκευάζουμε στο εργαστήριο τα απαραίτητα διαλύματα ώστε να πραγματοποιούνται πειράματα κυτταρόλυσης και μέτρησης φωσφοπρωτεϊνών. Αυτή η αυτονομία επιτρέπει καλύτερο έλεγχο και μειώνει σημαντικά το κόστος των πειραμάτων. Ακόμη, αποκτήθηκε μία βαθύτερη γνώση για τον τρόπο διεξαγωγής της κυτταρικής ενδοεπικοινωνίας καθώς και για το μηχανισμό λύσης του κυττάρου.

Ως προς τα εργαστηριακά πρωτόκολλα, μπορούμε να πούμε ότι ενώ σε πρώτη ανάγνωση οι διαφορετικές τεχνικές φαίνεται να μην επηρεάζουν σημαντικά το αποτέλεσμα, περαιτέρω ανάλυση καθιστά φανερές κάποιες επιμέρους διαφορές. Συγκεκριμένα, η τεχνική της απόξεσης φαίνεται να βελτιώνει τα πειραματικά αποτελέσματα και συνίσταται να ενταχθεί στο πρωτόκολλο κυτταρόλυσης του εργαστηρίου.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι και η παρατήρηση ότι η πληροφορία της σύνδεσης ενός ερεθίσματος και των σημάτων που αυτό ενεργοποιεί δίνεται ανεξαρτήτως πειραματικών παραμέτρων. Αυτό, διαπιστώνεται από τα εξαγόμενα διαγράμματα κάθε πειράματος όπου δεν σημειώθηκαν μεγάλες αποκλίσεις ως προς τα εξερχόμενα δεδομένα. Συνεπώς, ενισχύεται η εμπιστοσύνη μας στη βιολογική σκοπιά της κυτταρικής σηματοδότησης η οποία είναι αρκετά ισχυρή ώστε να επιτρέπει τη σύνδεση ερεθίσματος –σημάτων ακόμη κι αν οι συνθήκες παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις. Η διαπίστωση αυτή όμως απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Εν κατακλείδι, το εργαστήριο πλέον διαθέτει δικές του συνταγές και πρωτόκολλα για πειράματα που αφορούν μέτρηση φωσφοπρωτεϊνών ενώ παράλληλα προέκυψαν σημαντικά δεδομένα για την επικοινωνία των πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κυττάρου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <https://statistics.laerd.com/statistical-guides/spearmans-rank-order-correlation-statistical-guide.php>.
2. <http://advances.nutrition.org/content/2/4/355.full#sec-2>.
3. Thermo Scientific Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktails.
4. <http://www.sharedproteomics.com/forum/showthread.php?200-Cell-Lysis-Protocol>.
5. Stanford Biology Laboratory- Lysis Buffer Recipe.
6. Sigma-Aldrich Protease Inhibitor Cocktail for general use #2714.
7. Roche Applied Science-The complete Guide for Protease Inhibition.
8. Kineteworks Services: Multi-Immunoblotting analysis customer information package.
9. Path Scan Sandwich ELISA Lysis Buffer #7018, CST
10. GeneTex Inc. Cell Lysate Preparation.
11. BioPlex Phosphoprotein Detection Instruction Manual, Bio-Rad Laboratories Inc.
12. Instructions Pierce IP Lysis Buffer #87787 & 87788.
13. ABCAM Immunoprecipitation protocol.
14. Invitrogen cell extraction buffer #FNN0011.
15. Thermo Scientific Pierce Cell Lysis Technical Handbook.
16. <http://www.bioinformatics.org/wiki/Proteomics>.
17. <http://proteomics.cancer.gov/whatisproteomics>.
18. <http://ts1.mm.bing.net/th?id=HN.608044344163436090&pid=1.7>

19. http://en.wikipedia.org/wiki/Network_biology.
20. <http://www.bioinformatics.org/wiki/Proteomics>.
21. <http://en.wikipedia.org/wiki/Bioinformatics><http://en.wikipedia.org/wiki/Bioinformatic>.
22. Experimental design guidelines and tips, www.RnDSystems.com.
23. Cell Lysate preparation protocol, www.Imgenix.com
24. Mammalian Cell Lysis Buffer, GoldBio. ComTeaching Experimental Design Techniqueto Industrial Engineers, JIJU ANTONY and NICK CAPONPortsmouth Business School, University of Portsmouth, Milton Site, Portsmouth, PO4 8JF, UK.
25. Bioprocessing Tutorial: Enhancing Performance in Cell Culture Hydrolysates from Plants for Medium Supplementation, James Babcock, Ph.D., Shawn Smith, Genetic Engineering & biotechnology News Volume 27, Number 20 November 15, 2007.
26. Immunoprecipitation techniques for the analysis of transcription factor complexes, Elena Klenova, Igor Chernukhin, Toshiaki Inoue, Shaharum Shamsuddin, and John NortonDepartment of Biological Sciences, Gene Regulation Laboratory, University of Essex.
27. Systems biology: experimental design Clemens Kreutz and Jens Timmer Physics Department, University of Freiburg, Germany.
28. Effects of Storage Time and Exogenous Protease Inhibitors on Plasma Protein Levels, Saleh Ayache, MD, Monica Panelli, PhD, Francesco M. Marincola, MD, and David F. Stroncek, MD.
29. TOWARDS A COMPREHENSIVE CENTRIFUGAL PROCESS INTEGRATION BY ROTATIONALLY INDUCED LYOPHILISATE DISSOLUTION AND CELL LYSIS, S. Lutz, P. Lang, B. Faltin, S. Haeberle, F. von Stetten, R. Zengerle and J. Ducrée, HSG-IMIT, Institute for Micromachining and Information Technology, Germany Laboratory for MEMS Applications, Department of Microsystems Engineering (IMTEK), University of Freiburg, Germany.
30. Optimized Release of Recombinant Proteins by Ultrasonication of E.coli Cells J. X. Feliu, R. Cubarsi, A. Villaverde, Institut de Biologia Fonamental and Departament de Genetica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Matemàtica Aplicada i Telemàtica, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, Spain.
31. Protein extraction from Tissues and Cultured Cells using Bioruptor Pico, Diagenode.
32. Cell and Tissue Lysate Preparation: Recipes for solutions, Poteintech.
33. Microfluidic sample preparation: cell lysis and nucleic acid purification Jungkyu Kim, waMichael

Johnson,wb Parker Hilla and Bruce K. Gale.

34. Growth Inhibition of Hepatocellular Carcinoma Huh7 Cells by Lactobacillus casei Extract Dae Jong Han,Jong Bin Kim,Seo Young Park,Man Gil Yang,and Hyuncheol Kim.

35. <http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphoproteomics>.

36. Analytical strategies for phosphoproteomics Tine E. Thingholm, Ole N. Jensen and Martin R. Larsen KMEB, Department of Endocrinology, Odense University Hospital, Odense M, Denmark Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark,Odense M, Denmark.

37. <http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/platforms/proteomics/phosphoproteomics>.

38. http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_kinase.

39. <https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/one-way-anova-using-spss-statistics.php>

40. http://en.wikipedia.org/wiki/Analysis_of_variance

41. http://en.wikipedia.org/wiki/Spearman's_rank_correlation_coefficient

42. <https://statistics.laerd.com/statistical-guides/spearmans-rank-order-correlation-statistical-guide.php>

43. <http://www.wikihow.com/Calculate-Spearman's-Rank-Correlation-Coefficient>

44. http://en.wikipedia.org/wiki/Network_biology

45. <http://www.bioinformatics.org/wiki/Proteomics>

46. <http://en.wikipedia.org/wiki/Bioinformatics><http://en.wikipedia.org/wiki/Bioinformatics>

47. <http://proteomics.cancer.gov/whatisproteomics>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Περιγράφονται εν συντομία βασικά βιολογικά χαρακτηριστικά και λειτουργίες των ερεθισμάτων και των σημάτων που παρουσιάστηκαν στην παρούσα εργασία.

Τα ερεθίσματα, τα σήματα και τα απαιτούμενα αντισώματα για την ELISA είναι από τις εταιρείες R&D Systems, Peprotech και Cell Signaling Technology (CST).

ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΑ

❖ NaCl

Το χλωριούχο νάτριο, το γνωστό αλάτι, είναι μία ιοντική ένωση που αποτελείται από ίση αναλογία νατρίου και χλωρίου.

❖ IL1a

Η Ιντερλευκίνη-1α (IL-1a) είναι μία πρωτεΐνη που ανήκει στην ευρεία οικογένεια της Ιντερλευκίνης-1. Είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία φλεγμονών και την εμφάνιση πυρετού και σηψαιμίας. Παράγεται από ενεργά μακροφάγα καθώς και από ουδετερόφιλα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχει μεταβολικές, φυσιολογικές και αιμοπηκτικές δραστηριότητες και κατέχει έναν από τους κεντρικούς ρόλους στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων. Έχει βρεθεί ότι ανήκει στην οδό που ενεργοποιεί το TNFα.

❖ IFNγ

Η Ιντερφερόνη- ή IFNγ ή ιντερφερόνη τύπου II, είναι μία κυτοκίνη ιδιαίτερα κρίσιμη για την έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία έναντι των ιογενών και ενδοκυτταρικών βακτηριακών μολύνσεων και συμμετέχει τον έλεγχο των όγκων. Είναι ένας σημαντικός ενεργοποιητής των μακροφάγων τόσο λόγω της ικανότητας της να αναστέλλει άμεσα την αντιγραφή των ιών όσο και χάρη στις ανοσοδιεγερτικές και ανοσορυθμιστικές επιδράσεις της. Η ιντερφερόνη-γ παράγεται κυρίως από φυσικά φονικά κύτταρα (natural killers-NK) του ανοσοποιητικού συστήματος ως μέρος της έμφυτης ανοσοαπόκρισης.

❖ LPS

Η πρωτεΐνη δέσμευσης λιποσακχαριτών (lipopolysaccharide (LPS)-binding protein) (LBP) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών που δεσμεύουν λιπίδια. Αυτή η οικογένεια πρωτεϊνών περιλαμβάνει βακτηριοκτόνες πρωτεΐνες, πρωτεΐνες που αυξάνουν την διαπερατότητα, πρωτεΐνες μεταφοράς φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης. Πρόκειται για μια διαλυτή πρωτεΐνη οξείας φάσης που συνδέεται με βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες (ή LPS) για να εγείρει ανοσοαποκρίσεις με την παρουσίαση των LPS σε σημαντικούς υποδοχείς αναγνώρισης της κυτταρικής επιφάνειας. Η πρωτεΐνη αυτή εμπλέκεται στην οξεία φάση της ανοσολογικής απόκρισης εναντίον των βακτηριακών λοιμώξεων.

❖ **Epigalo**

Πρόκειται για συντομογραφία της επιγαλλοκατεχίνης. Είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό που μπορεί να έχει θεραπευτικές εφαρμογές στην αγωγή πολλών διαταραχών και σοβαρών ασθενειών όπως ο καρκίνος.

❖ **BDNF**

Η ονομασία προέρχεται από τα αρχικά για το νεκροτροφικό παράγοντα εγκεφαλικής προέλευσης (Brain-Derived Neurotrophic Factor). Πρόκειται για μία εκκρινόμενη πρωτεΐνη η οποία κωδικοποιείται στον ανθρώπινο οργανισμό από το αντίστοιχο γονίδιο BDNF. Ανήκει στην οικογένεια των «νευροτροφινών», ενός είδους αυξητικών παραγόντων που σχετίζονται με τον κανονικό νευρικό αυξητικό παράγοντα NGF. Οι νευροτροφικοί παράγοντες βρίσκονται στον εγκέφαλο και το περιφερικό σύστημα. Η εν λόγω πρωτεΐνη δρα σε ορισμένους νευρώνες του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος, υποστηρίζοντας την επιβίωση των υπάρχοντων νευρώνων και ενθαρρύνοντας την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των νέων νευρώνων και συνάψεων. Είναι ενεργή στον ιππόκαμπο του εγκεφάλου και στον φλοιό του προσεγκεφάλου, περιοχές ζωτικής σημασίας για τη μάθηση, τη μνήμη, και την ανώτερη σκέψη. Για το λόγο αυτό, η BDNF είναι σημαντική για τη μακροπρόθεσμη μνήμη.

❖ **TNF α**

Πρόκειται για μία ισχυρή ανοτροποποιητική κυτταροκίνη με αποδεδειγμένη ογκοκτόνο δράση, που εμπλέκεται στη συστηματική φλεγμονή και είναι μέρος μίας ομάδας κυτταροκινών που διεγείρουν την αντίδραση οξείας φάσεως. Εκκρίνεται κυρίως από μακροφάγα παρόλο που μπορεί να παραχθεί και από άλλους τύπους κυττάρων, όπως λεμφοκύτταρα και κύτταρα NK (natural killers). Ο βασικός ρόλος του TNF είναι η ρύθμιση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Πρόκειται στην ουσία για ένα ενδογενές πυρετογόνο, ικανό να προκαλέσει πυρετό για να προκληθεί αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος, σήψη, καχεξία,

φλεγμονή, και να ανασταλεί η ογκογένεση και αντιγραφή του ιού. Η δυσρύθμιση της παραγωγής TNF σχετίζεται με μία ποικιλία ασθενειών του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Alzheimer, του καρκίνου, της κατάθλιψης και της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου.

❖ **b-NGF**

Είναι ένας από τους πρώτους αυξητικούς παράγοντες που έχουν χαρακτηριστεί. Πρόκειται για μία μικρή εκκρινόμενη πρωτεΐνη της οποίας η πλήρης ονομασία είναι «παράγοντας ανάπτυξης νεύρου» (Nerve Growth Factor- NGF). Είναι σημαντική για την ανάπτυξη, τη διατήρηση και την επιβίωση ορισμένων νευρώνων(νευρικά κύτταρα). Ακόμη, λειτουργεί ως μόριο σηματοδότησης. Ο παράγοντας NGF είναι κρίσιμης σημασίας για την επιβίωση και συντήρηση των αισθητήριων νευρώνων, οι οποίοι χωρίς αυτή υφίστανται απόπτωση. Μελέτες έχουν δείξει ότι προκαλεί επιμήκυνση των νευρώνων ενώ, υπάρχουν αποδείξεις ότι κυκλοφορεί σε όλο το σώμα και συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης.

❖ **BTC**

Η βήτα σελουλίνη είναι μέλος της οικογένειας αυξητικών παραγόντων EGF. Συντίθεται, κατά κύριο λόγο, ως διαμεμβρανικός προπομπός ο οποίος κατόπιν, υποβάλλεται σε επεξεργασία μέσω πρωτεολυτικών γεγονότων και μετατρέπεται σε ώριμο μόριο. Αυτή η πρωτεΐνη αποτελεί ρίζα σύνδεσης με τον υποδοχέα EGF. Μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας άλφα (TGF-α) ρυθμίζεται αυξητικά σε ορισμένες ανθρώπινων καρκίνων. Παράγεται σε μακροφάγα και στα κύτταρα του εγκεφάλου και επάγει επιθηλιακή ανάπτυξη.

❖ **TGFα**

Η πλήρης ονομασία είναι «αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-α» (Transforming Growth Factor alpha- TGFα) και υπερεκφράζεται σε κάποια είδη ανθρώπινου καρκίνου. Παράγεται από μακροφάγα και εγκεφαλικά κύτταρα και επιφέρει επιθηλιακή ανάπτυξη. Επίσης, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των νευρικών κυττάρων στον τραυματισμένο, ενήλικο. Είναι στενά συνδεδεμένη με τον EGF, και μπορεί επίσης να συνδέεται με τους υποδοχείς του EGF με παρόμοια αποτελέσματα.

❖ **INS**

Η ινσουλίνη είναι μία πεπτιδική ορμόνη που παράγεται στο πάγκρεας και είναι αναγκαία για τη ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων και τους λίπους στο σώμα. Επιπλέον,

προκαλεί την απορρόφηση της γλυκόζης στο αίμα από τα κύτταρα των σκελετικών μυών και του λιπώδους ιστού. Εκτός από τις περιπτώσεις μεταβολικού συνδρόμου και σακχαρώδους διαβήτη, η ινσουλίνη παρέχεται στο σώμα με σταθερό ρυθμό ώστε να απομακρύνεται η περίσσεια γλυκόζης από το αίμα η οποία διαφορετικά θα ήταν τοξική. Ως κεντρικός μηχανισμός ελέγχου του μεταβολισμού, η κατάσταση της χρησιμοποιείται ως σήμα ελέγχου και για άλλα συστήματα του σώματος όπως, η πρόσληψη αμινοξέων από τα κύτταρα του σώματος. Εκτός αυτού, έχει πολλές άλλες αναβολικές επιδράσεις σε όλο το σώμα.

ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΑ ΣΗΜΑΤΑ

❖ AKT1

Πρόκειται για πρωτεϊνική κινάση σερίνης-θρεονίνης (alpha serine/threonine-protein kinase). Είναι καταλυτικώς ανενεργή σε πρωτογενείς και αθανοτοποιημένους ινοβλάστες που έχουν στερηθεί θρεπτικό ορό. Ενεργοποιείται από παράγοντα ανάπτυξης προερχόμενο από αιμοπετάλια. Η ενεργοποίηση είναι ταχεία και συγκεκριμένη αλλά μπορεί να καταργηθεί από ορισμένες μεταλλάξεις. Σε ένα αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα, το AKT αποτελεί κρίσιμο διαμεσολαβητή του παράγοντα ανάπτυξης που προκαλείται από την επιβίωση των νευρώνων καθώς φωσφορυλίζει και απενεργοποιεί συστατικά του μηχανισμού απόπτωσης.

❖ CREB1

Είναι ένας παράγοντας κυτταρικής μεταγραφής. Συνδέεται με συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA που ονομάζονται “στοιχεία απόκρισης cAMP” (CRE), αυξάνοντας έτσι, ή μειώνοντας τη μεταγραφή των μεταγενέστερων γονιδίων. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1987 ως μεταγραφικός παράγοντας απόκρισης cAMP που ρυθμίζει το γονίδιο της σωματοστατίνης.

cAMP είναι η συντομογραφία για την κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη η οποία αποτελεί σημαντικό αγγελιοφόρο σε πολλές βιολογικές διεργασίες. Εκφράζεται σε πολλά ζώα, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Έχει αποδειχθεί ότι είναι αναπόσπαστο κομμάτι της χωρικής μνήμης και μπορεί να έχει θεραπευτικές ιδιότητες για τη νόσο του Αλτσχάιμερ. Ακόμη, έχει συνδεθεί με την πλαστικότητα των νευρώνων και τον σχηματισμό μακροχρόνιας μνήμης στον εγκέφαλο.

❖ EGFR

Ουσιαστικά είναι η συντομογραφία για τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor). Ο υποδοχέας αυτός βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου και χρησιμεύει στη δέσμευση εξωκυτταρικών προσδεμάτων που ανήκουν στην οικογένεια του

επιδερμικού αυξητικού παράγοντα. Ο διμερισμός του παράγοντα αυτού οδηγεί μεταγενέστερα σε ενεργοποίηση πρωτεϊνών που σηματοδοτούν ποικίλες οδούς μεταγωγής σημάτων και κυρίως των οδών σηματοδότησης των MAPK, JNK και AKT, οδηγώντας σε σύνθεση DNA και σε πολλαπλασιασμό κυττάρων. Τέτοιες πρωτεΐνες ρυθμίζουν φαινοτύπους όπως η μετανάστευση, η προσκόλληση και ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου. Ακόμη, η ενεργοποίηση του υποδοχέα EGFR είναι σημαντική για την έμφυτη ανοσολογική απόκριση στο ανθρώπινο δέρμα.

❖ FAK1

Συντομογραφία της κινάσης εστιακής προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase). Εμπλέκεται στην κυτταρική προσκόλληση δηλαδή, στον τρόπο με τον οποίο τα κύτταρα κολλούν μεταξύ τους και με το περιβάλλον τους, και στην κυτταρική διασπορά δηλαδή, στον τρόπο με τον οποίο τα κύτταρα μετακινούνται. Έχει φανεί ότι όταν μπλοκάρεται αυτός ο παράγοντας τότε, τα κύτταρα του καρκίνου του μαστού γίνονται λιγότερο μεταστατικά λόγω μειωμένης κινητικότητας.

❖ GSK3A

Η κινάση της σύνθεσης γλυκογόνου 3-άλφα (Glycogensynthasekinase-3 alpha) είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη της κινάσης σερίνης και εμπλέκεται στον έλεγχο πολλών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης και της σύνθεσης γλυκογόνου, και διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων. Διαδραματίζει, επίσης, έναν ρόλο στη μεταγωγή σημάτων από πρωτεΐνες στο εξωτερικό των κυττάρων στο εσωτερικό τους διαμέσου υποδοχέων που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη.

❖ GSK3B

Η κινάση της σύνθεσης γλυκογόνου 3-βήτα είναι μία κινάση σερίνης-θρεονίνης η οποία αναγνωρίστηκε αρχικά ως παράγοντας φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης της σύνθεσης γλυκογόνου. Έχουν αναγνωρισθεί δύο ισομορφές, η άλφα που περιγράφεται παραπάνω και η βήτα. Οι ισομορφές αυτές εμφανίζουν υψηλό βαθμό ομολογίας αμινοξέων. Η κινάση GSK3B εμπλέκεται στο μεταβολισμό της ενέργειας, στην ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων και στο σχηματισμό του μοτίβου του σώματος.

❖ HSPB1

Συντομογραφία της πρωτεΐνης θερμικού σοκ βήτα-1 (heat shock protein beta-1). Οι βασικές λειτουργίες με τις οποίες συνδέεται είναι η θερμοανεκτικότητα, η αναστολή της απόπτωσης, η ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και η κυτταρική διαφοροποίηση. Ακόμη, συμβάλλει στο

δίπλωμα ή ξεδίπλωμα με μη ομοιοπολικούς δεσμούς και στη συναρμολόγηση ή αποσυναρμολόγηση άλλων μακρομοριακών δομών. Τέλος, συμμετέχει στη μετάβαση σημάτων.

❖ IKBA

Είναι ένα μέλος της οικογένειας των κυτταρικών πρωτεϊνών που λειτουργούν για να αναστέλλουν τον παράγοντα μεταγραφής NP-κΒ.

❖ LCK

Είναι μία κινάση τυροσίνης και η πλήρη ονομασία είναι (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase). Βρίσκεται στο εσωτερικό των λεμφοκυττάρων που είναι ειδικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτή η κινάση τυροσίνης φωσφορυλιώνει τα κομμάτια τυροσίνης ορισμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις ενδοκυττάρειες σηματοδοτικές οδούς των λεμφοκυττάρων.

❖ MK03, MK09, MK12

Αυτές οι πρωτεΐνες σήματα, γνωστές και ως MAPKs, ανήκουν στην ίδια οικογένεια κινασών πρωτεΐνης οι οποίες προέρχονται από μιτογόνα. Εμπλέκονται στην καθοδήγηση κυτταρικών αποκρίσεων σε μία ποικιλία ερεθισμάτων όπως τα μιτογόνα, η οσμωτική πίεση, το θερμικό σοκ και οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Ρυθμίζουν μεταξύ άλλων και τον πολλαπλασιασμό, την έκφραση του γονιδίου, τη διαφοροποίηση, τη μίτωση, την κυτταρική επιβίωση και την απόπτωση.

❖ P53

Η πρωτεΐνη αυτή είναι ζωτικής σημασίας για τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Ρυθμίζει το κυτταρικό κύκλο και ως εκ τούτου λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό για την πρόληψη του καρκίνου. Έχει χαρακτηριστεί ως “φύλακας του γονιδιώματος” καθώς συντελεί στη διατήρηση της ευστάθειας και αποτρέπει τις γονιδιακές μεταλλάξεις.

❖ PGFRB

Πρόκειται για έναν υποδοχέα αυξητικών παραγόντων που προέρχονται από αιμοπετάλια. Ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων για κινάσες τυροσίνης στην επιφάνεια του κυττάρου που

αφορούν σε μέλη των αυξητικών παραγόντων προερχόμενων από αιμοπετάλια. Αυτοί οι αυξητικοί παράγοντες είναι μιτογονική για κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης.

❖ **PTN11**

Είναι μέλος της οικογένειας των φωσφατασών των πρωτεϊνών τυροσίνης (Protein Tyrosine Phosphatase, PTPs). Πρόκειται για σηματοδοτικό μόριο το οποίο ρυθμίζει ποικίλες κυτταρικές διεργασίες όπως η ανάπτυξη και διαφοροποίηση του κυττάρου, ο κύκλος μίτωσης και οι ογκογονικές μετατροπές. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφράζεται ευρέως στους περισσότερους ιστούς και συμμετέχει σε σηματοδοτικές οδούς που συνδέονται με τη μιτογονική ενεργοποίηση, τον έλεγχο του μεταβολισμού, τη ρύθμιση της μεταγραφής και τη μετανάστευση των κυττάρων.

❖ **RS6**

Η ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 είναι ένα συστατικό της υπομονάδας του ριβοσώματος 40S και συνεπώς πιστεύεται ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεταφραστικής διαδικασίας. Η πραγματική λειτουργία της ερευνάται ακόμη σήμερα, ωστόσο μελέτες έχουν δείξει ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση του μεγέθους των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, και την ομοιόσταση της γλυκόζης.

❖ **STAT1, STAT3, STAT5, STAT6**

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής είναι μετατροπείς σημάτων και ενεργοποιητές της μεταγραφής όπως δηλώνει η αγγλική της ονομασία (Signal Transducer and Activator of Transcription). Ρυθμίζουν πολλές πτυχές της ανάπτυξης, της επιβίωσης και της διαφοροποίησης των κυττάρων. Οι μεταγραφικοί παράγοντες αυτής της οικογένειας ενεργοποιούνται από την κινάση “Janus” ή αλλιώς JAN (“ JustAnotherKinase”). Απορρύθμιση αυτής της σηματοδοτικής οδού παρατηρείται συχνά σε πρωτογενείς όγκους και οδηγεί σε αυξημένη αγγειογένεση, σε ενισχυμένη επιβίωση των όγκων και σε ανοσοκαταστολή. Οι πρωτεΐνες τύπου STAT εμπλέκονται στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής και την επίβλεψη των όγκων.

❖ **JUN**

Είναι ο πρώτος ογκογόνος παράγοντας μεταγραφής που ανακαλύφθηκε. Έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη αυτή προστατεύει τα ηπατοκύτταρα από την απόπτωση και προωθεί την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.

❖ **KS6B1**

Το πλήρες όνομα είναι Ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 κινάσης βήτα-1. Πρόκειται για μία πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης που ενεργοποιείται ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες και θρεπτικά συστατικά και προωθεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την κυτταρική ανάπτυξη και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Ακόμη, ρυθμίζει την σύνθεση των πρωτεϊνών μέσω φωσφορυλίωσης, ευνοεί την έναρξη της πρώτης φάσης της πρωτεϊνοσύνθεσης και υποβοηθάει την κυτταρική επιβίωση.

❖ **MP2K1**

Η πρωτεΐνη αυτή είναι μέλος της οικογένειας κινασών πρωτεΐνης διπλής ειδικότητας και ενεργεί ως κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνο (MAPkinase). Οι κινάσες αυτές, γνωστές και ως κινάσες ρυθμιζόμενες από εξωκυτταρικά σήματα (ERKs), λειτουργούν ως σημείο ενσωμάτωσης για πολλαπλά βιοχημικά σήματα. Ως βασικό συστατικό του μονοπατιού μεταγωγής σημάτων των MAP κινασών, αυτή η κινάση εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η ρύθμιση και η ανάπτυξη της μεταγραφής.

❖ **MP2K6**

Ανήκει στην ίδια οικογένεια με την πρωτεΐνη MP2K1. Αυτή η πρωτεΐνη φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την p38 MAP κινάση ως απόκριση στις φλεγμονώδεις κυτοκίνες ή το περιβαλλοντικό στρες. Ως βασικό συστατικό της σηματοδοτικής οδού της p38 MAP κινάσης, η πρωτεΐνη αυτή εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως το άγχος που προκαλείται από διακοπή του κυτταρικού κύκλου, την ενεργοποίηση της μεταγραφής και την απόπτωση.

❖ **NFR2**

Πρόκειται για συντομογραφία του Πυρηνικού παράγοντα ερυθροειδών (NuclearFactorerythroid-derived 2) και συναντάται με τη συντομογραφία NFE2L2 ή Nrf2. Είναι παράγοντας μεταγραφής ο οποίος στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο NFE2L2. Η αντιοξειδωτική οδός απόκρισης του NFR2 αποτελεί την κύρια κυτταρική άμυνα έναντι των κυτταροτοξικών επιδράσεων του οξειδωτικού στρες. Μεταξύ άλλων, το NFE2L2 αυξάνει την έκφραση αρκετών αντιοξειδωτικών ενζύμων.

❖ KINEXUS

20 mM MOPS, pH 7.0
2 mM EGTA
5 mM EDTA
30 mM sodium fluoride
60 mM β-glycerophosphate, pH 7.2
20 mM sodium pyrophosphate
1 mM sodium orthovanadate
1% Triton X-100
1 mM phenylmethylsulfonylfluoride
3 mM benzamidine
5 μM pepstatin A
10 μM leupeptin
1 mM dithiothreitol

❖ SIGMA

Tris-EDTA
NaCl
SDS
DOC
Igepal CA-630

Prior to use

Protease inhibitor cocktail

❖ ABCAM

Buffer
Tris-HCl
NaCl
sodium deoxycholate (DOC)
Triton X-100
EGTA
EDTA

Prior to use

1 mM PMSF
Protease inhibitor cocktail
Phosphatase inhibitor cocktail

❖ **INVITROGEN**

Buffer

10 mM Tris, pH 7.4

100 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM EGTA

1 mM NaF

20 mM Na₄P₂O₇ (Tetrasodium pyrophosphate)

2 mM Na₃VO₄

1% Triton X-100

10% glycerol

0.1% SDS

0.5% deoxycholate

Prior to use

Protease inhibitor cocktail (rec Sigma Cat. # P-2714)

(AEBSF, Aprotinin, Bestatin hydrochloride, E-64, EDTA, Leupeptin hemisulfate salt)

1 mM PMSF

❖ **EMBL (GENERAL BUFFER)**

50mM Tris-HCl pH 7.5

100mM NaCl

1mM DTT (for intracellular proteins)

5% glycerol (possibly)

❖ **GENETEX**

Buffer

50mM, Ph7.4 Tris-HCl

0.5% NP-40

250mM NaCl

5mM EDTA

50mM NaF

Prior to use

Protease inhibitors

Phosphatase inhibitors

(PMSF, Benzamidine, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, NaF, Na₃VO₄)

❖ **CST**

Buffer

20mM Tris-HCl (pH7.5)

150 mM NaCl
1mM disodium EDTA
1mM EGTA
1% Triton
20mM sodium pyrophosphate
25mM sodium fluoride
1mM β -glycerophosphate
1mM Na₃VO₄
1 μ g/ml leupeptin

Prior to use

1mM PMSF
CST PROTEASE INHIBITOR COCTAIL
(AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E64, Leupeptin, and Pepstatin A t
EDTA 5Mm)

❖ [HTTP://WWW.METHODS.INFO/METHODS/PROTEIN MODIFICATIONS/PROT PHOSPHO.HTML](http://www.methods.info/methods/protein_modifications/prot_phospho.html)

Buffer

50 mM Tris Hcl, pH7.4
1mM EDTA
150mM NaCl
1 % NP40
5mM NaF
0.25%Na deoxycholate

Add prior to use

2mM NaVO₃
Protease inhibitors 1x (Complete from Roche with EDTA)

❖ BIORAD

1. Keep cells on ice and wash them with PBS
2. Prepare byffer adding the factors and keep it cool. Add PMSF.
3. Agitate the cells as follows:
Culture Plate — for suspension cells, place the plate on ice and pipet the contents of the wells up and down 5 times. For adherent cells, scrape the cells with a cell scraper. For both, agitate the plate on a microplate shaker at 300 rpm for 20 min at 4°C.
Other Culture Vessel — Transfer the cell lysate to a centrifuge tube and rotate for 20 min at 4°C.
4. Centrifuge at 4500g for 20 min at 4°C
5. Collect supernatant
6. Determine the protein concentration
7. Add an equal volume of the assay buffer to the lysate
8. If the lysate is not tested immediately, store at –20°C. The lysate is stable for up to 5 freeze-thaw cycles.
9. Thaw the lysates at room temperature and then place them on ice.

❖ CST

1. Treat cells as desired.
2. Wash plate with ice-cold PBS to remove residual media.
3. Add 500–1000 µl of lysis buffer/ 10 cm dish.
4. Incubate plate on ice for 2 minutes.
5. Collect cell lysate solution for use. Spin extract 1 minute at 14,000 x g in a cold microfuge if cell debris is present.

Additional notes: For non-adherent cells, judgment must be used as to amount of lysis buffer to add. Addition of volume equal to cell pellet is generally appropriate.

❖ KINEXUS

1. Remove medium from culture dishes containing about 1×10^7 to 2×10^7 cells
2. Rinse the cells twice with ice-cold PBS to remove medium residue (serum must be completely removed from cells); remove as much PBS as possible after the last rinse
3. Add 200 µl ice-cold lysis buffer to 150 mm culture dish per sample (more lysis buffer can be added if cells are concentrated), or add 100 µl ice-cold lysis buffer to 100 mm culture dish;
4. Scrape the cells in lysis buffer, collect the cell suspension from the dishes and transfer it into a 1.5-ml microcentrifuge tube;
5. Sonicate four times for 10 seconds each time with 10-15 second intervals on ice to rupture the cells. This is a crucial step and cannot be omitted.

6. Centrifuge the homogenate at 90,000 x g or more for 30 min at 4°C in a Beckman Table Top TL-100 ultracentrifuge or Beckman Airfuge;
7. Transfer the resulting supernatant fraction to a 1.5-ml microcentrifuge tube

❖ GENETEX

1. Remove media and wash with PBS twice
2. Detach cells with a rubber policeman in 1 ml cold PBS and transfer cell suspension into one 1.5ml microcentrifuge tube.
3. Pellet cells by centrifuging at 3000rpm for 5 min. Remove supernatant.
4. Suspend the pellet with 1 ml cold buffer with freshly added protease and phosphatase inhibitor cocktail.
5. Allow the tube to stand on ice for 30min, vortex every 10min.
6. Centrifuge the resulting mixture at 14000 x g for 15 min at 4°C. This separates the total protein (supernatant) from the cellular debris (pellet).
7. Transfer supernatant to a new tube for further analysis.
8. The cell lysate can be frozen at this point for long-term storage at -80°C.

❖ INVITROGEN

1. Collect cells in PBS by centrifugation (non-adherent) or scraping from culture flasks (adherent).
2. Wash cells twice with cold PBS.
3. Remove and discard the supernatant and collect the cell pellet.
4. Lyse the cell pellet in cell extraction buffer for 30 minutes, on ice, with vortexing at 10 minute intervals. The volume of cell extraction buffer depends on the cell number and expression of target protein and level of phosphorylation. A suitable starting concentration is 10⁸ cells/ml extraction buffer.
5. Transfer the extract to microcentrifuge tubes and centrifuge at 13,000 rpm for 10 minutes at 4°C.
6. Aliquot the clear lysate to clean microfuge tubes. These samples are ready for assay. Lysates can be stored at -80°C. Avoid multiple freeze/thaws.

Note from Invitrogen: This protocol has been successfully applied to several cell lines. Some optimization may be required for each specific application.

❖ ABCAM

1. Place the cell culture dish on ice and wash the cells with ice-cold PBS.
2. Drain the PBS, then add ice-cold lysis buffer (1ml per 10⁷ cells/100mm dish/150cm² flask; 0.5ml per 5x10⁶ cells/60mm dish/75cm² flask).

3. Scrape adherent cells off the dish using a cold plastic cell scraper then gently transfer the cell suspension into a pre-cooled microfuge tube.
4. Maintain constant agitation for 30 minutes at 4°C.
5. Centrifuge in a microcentrifuge at 4°C. You may have to vary the centrifugation force and time depending on the cell type. A guideline is 20 minutes at 12,000 rpm but this must be determined by the end-user (e.g. leukocytes need a very light centrifugation).
6. Gently remove the tubes from the centrifuge and place on ice, aspirate the supernatant and place in a fresh tube kept on ice, and discard the pellet.

❖ **PIERCE THERMO SCIENTIFIC**

1. Centrifuge the cell suspension at 1,000 × g for 5 minutes to pellet the cells. Discard the supernatant
2. Wash the cells once with ice cold PBS. Centrifuge at 1,000 × g for 5 minutes to pellet cells.
3. Add ice cold Lysis Buffer to the cell pellet. Use 500 µl of lysis buffer per 50 mg of wet cell pellet (10:1 v/w).
4. Incubate lysate on ice for 5 minutes with periodic mixing. Remove cell debris by centrifugation at ~13,000 × g for 10 minutes at 4°C.
5. Transfer supernatant to a new tube for protein concentration determination and further analysis.

❖ **SIGMA**

1. Wash cells/ tissue and treat with cell lysis buffer.
2. Incubate the cells/tissue for 15 minutes on an orbital shaker
3. Collect cell lysate.
4. Centrifuge the lysed cells for 10 minutes at 12,000 X g to pellet the cellular debris. Alternatively, to prepare a protein solution using high-speed centrifugation, centrifuge for 45 minutes at 100,000 X g.
5. Remove the protein-containing supernatant to a chilled test tube. For immediate use, keep on ice. Otherwise, store the protein solution at –20 °C (or at –70 °C for improved stability).

❖ [HTTP://CSHPROTOCOLS.CSHLP.ORG](http://CSHPROTOCOLS.CSHLP.ORG)

1. Discard the culture medium. Wash cells twice with ice-cold PBS. Place the culture dishes on ice.
2. Add 1.0 mL of the lysis buffer of choice (pre-chilled to 4°C) per 100-mm dish. For culture dishes of other sizes, adjust the volume of lysis buffer accordingly.
3. Incubate the cells for 10-30 min (depending on the cell line being studied) on ice. Rock the dishes occasionally.
4. Tilt a dish on the bed of ice, allowing the buffer to drain to one side. Remove the lysate with a pipette. Transfer to a microcentrifuge tube (or other suitable centrifuge tube). Repeat with each of the remaining dishes. Some researchers prefer to scrape the cells from the tissue-culture dish. However, this does cause some stress to the cells and is only required in unusual cases.
5. Centrifuge the lysate at 20,000g for 10 min at 4°C.
6. Carefully remove the supernatant to a fresh tube, making sure not to disturb the pellet. Store the lysate on ice until it is needed.

❖ [PAWAN NAYAK · MANIPAL UNIVERSITY](#)

1. Place the cell culture dish in ice and wash the cells with ice-cold PBS
2. Aspirate the PBS, then add ice-cold lysis buffer (1 ml per 10^7 cells/100 mm dish/150 cm² flask; 0.5ml per 5×10^6 cells / 60 mm dish / 75 cm² flask)
3. Scrape adherent cells off the dish using a cold plastic cell scraper, and then gently transfer the cell suspension into a pre-cooled microcentrifuge tube
4. Maintain constant agitation for 30 minutes at 4°C.
5. Spin at 16,000 x g for 20 minutes in a 4°C pre-cooled centrifuge.
6. Gently remove the tube from the centrifuge and place on ice. Transfer the supernatant to a fresh tube kept on ice, and discard the pellet.

❖ [DIAGENODE](#)

1. Pre-cool Bioruptor to 4°C using the Water Cooler.
2. Add Protease Inhibitor Mix (200x) to the ice-cold cell lysis buffer: 5 µl per 1 ml of extraction buffer. Scale accordingly.

3. For monolayer cells: Rinse the monolayer cells 3 times with cold PBS. For the final rinse, use a cell scraper and transfer the cell suspension to a TPX tube. Centrifuge cells at 1,500 rpm for 10 min at 4°C and aspirate as much supernatant as possible. Proceed to step 4. For suspension cells: Centrifuge suspension at 1,500 rpm for 10 min at 4°C and aspirate the supernatant. Resuspend the pellet in cold PBS, transfer to a TPX tube and centrifuge at 1,500 rpm for 10 min at 4°C. Aspirate the supernatant. Repeat 2 more times.
4. Add ice-cold cell lysis buffer and resuspend the pellet. Incubate on ice for 10 min. The viscosity may appear at this step. We recommend using 100 µl of an appropriate lysis buffer per 1×10^6 cells."
5. Vortex tubes briefly and proceed to sonication by using the Bioruptor with the following settings: Power: H position (High) Sonication cycle: 30 sec ON/30 sec OFF .Total sonication time: 5-10 cycles, Temperature: 4°C
6. Stop the Bioruptor after 5 cycles, briefly vortex samples and visually check the samples: Samples should be in solution (viscosity should be reduced). Please note that the optimization might be required depending on sample format (cell density, cell type etc.). The shortest sonication time should be chosen to prevent protein damage
7. Transfer the supernatant to a new tube and centrifuge samples at 14,000 rpm for 15 min at 4°C to remove any remaining insoluble material.
8. Take an aliquot for the quantification and the further analysis if needed. Store protein extracts at -80°C.