



# Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

ΟΜΑΔΑ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΚΑΙ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥ  
ΕΛΕΓΧΟΥ

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Κατασκευή μικρο-συστοιχιών αντισωμάτων στερεής φάσης με  
εναπόθεση λείζερ**

**ΡΟΜΠΟΛΑΣ ΔΙΟΝΥΣΗΣ**

Επιβλέπων καθηγητής: Λεωνίδας Αλεξόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2017





# Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

ΟΜΑΔΑ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΚΑΙ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥ  
ΕΛΕΓΧΟΥ

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Κατασκευή μικρο-συστοιχιών αντισωμάτων στερεής φάσης με  
εναπόθεση λέιζερ**

## ΡΟΜΠΟΛΑΣ ΔΙΟΝΥΣΗΣ

Επιβλέπων καθηγητής: Λεωνίδας Αλεξόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής

Εγκρίθηκε την 24<sup>η</sup> Οκτωβρίου 2017 από την τριμελή επιτροπή:

.....

.....

.....

Αλεξόπουλος Λεωνίδας

Προβατίδης Χριστόφορος

Σπιτάς Βασίλειος

Επίκουρος Καθηγητής ΕΜΠ

Καθηγητής ΕΜΠ

Επίκουρος Καθηγητής ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2017



Copyright © Διονύσης Ρόμπολας, 2017

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό εκπαιδευτικής, ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.



## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο «Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας», του «Τομέα Μηχανολογικών Κατασκευών και Αυτομάτου Ελέγχου», της «Σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών», του «Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου» και σε συνεργασία με τον «Τομέα Φυσικής», της «Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών», του «Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου». Στη διάρκεια των μηνών που απαιτήθηκαν για την ολοκλήρωση της εργασίας, είχα την ευκαιρία να είμαι μέλος του εργαστηρίου, να συνεργαστώ με τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Λεωνίδα Αλεξόπουλο καθώς και με άλλα μέλη του εργαστηρίου, να αποκτήσω πληθώρα γνώσεων, να ασχοληθώ με το «πείραμα» και να αποκτήσω νέες δεξιότητες. Για όλα αυτά, κατ' αρχήν θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Αλεξόπουλο που δέχτηκε να εκπονήσω σε αυτόν την διπλωματική μου εργασία καθώς επίσης και για την καθοδήγηση, τις γνώσεις, τον υλικότεχνικό εξοπλισμό και γενικότερα κάθε είδους βοήθεια που μου προσέφερε. Εν συνεχεία, θέλω να ευχαριστήσω την αναπληρώτρια καθηγήτρια Ιωάννα Ζεργιώτη, η συνεργασία με την οποία ήταν εξαιρετική και απαραίτητη για την διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς επίσης και τον διδακτορικό της φοιτητή Σίμο Παπάζογλου με τον οποίο εγώ προσωπικά συνεργάστηκα. Ακόμη, ευχαριστώ τον κ. Δημήτρη Τζεράνη, συνεργάτη του εργαστηρίου, για την συνεισφορά του στην εργασία. Τέλος, ένα ευχαριστώ στα μέλη του εργαστηρίου Δανάη Ζαρείφη, Θεοχάρη Ιορδανίδη και Γεωργία Διακούδη για την εκπαίδευση, τις γνώσεις και κάθε είδους βοήθεια που ζήτησα και μου προσέφεραν.





## Περίληψη

Οι μικρο-συστοιχίες αντισωμάτων, επίσης γνωστές ως συστοιχίες αντισωμάτων ή «τσιπ» αντισωμάτων, είναι μια κατηγορία πρωτεϊνικών μικρο-συστοιχιών αποτελώντας μια συλλογή από δευτερογενή αντισώματα (capture antibodies) ακινητοποιημένα σε μία στερεή επιφάνεια όπως γυαλί, πλαστικό ή σιλικόνη, με σκοπό την ανίχνευση αντιγόνων. Αυτές οι συστοιχίες συχνά χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της έκφρασης πρωτεϊνών από προϊόντα λύσης κυττάρων στη γενική έρευνα και ειδικών βιο-δεικτών από ορό ή ουρία για διαγνωστικές εφαρμογές, παρακολούθηση και σύγκριση μεταξύ φυσιολογικών, άρρωστων και θεραπευμένων δειγμάτων. Αποτελούν αποτελεσματικά εργαλεία που έχουν φέρει επανάσταση στην συλλογή και ανάλυση δεδομένων «multi-omics» και βρίσκονται ανάμεσα στα πιο ανταγωνιστικά. Ωστόσο, οι υπάρχουσες τεχνολογίες συστοιχιών, έχουν ένα μεγάλο μειονέκτημα που καθιστά την παραγωγή μικρο-συστοιχιών αντισωμάτων τόσο ακριβή διαδικασία. Οι τεχνολογίες αυτές, προκειμένου να φτιάξουν τα σημεία των συστοιχιών, χρησιμοποιούν υγρά διαλύματα αντισωμάτων, αλλά παρά τους μικρούς όγκους διαλύματος που χρησιμοποιούνται, πολύ μεγάλες ποσότητες αντισώματος είναι απαραίτητες για την επανενυδάτωση των αντισωμάτων από τη στερεή τους φάση. Σε αυτή την εργασία, αναπτύξαμε μία μέθοδο για δημιουργία μικρο-συστοιχιών αντισωμάτων με χρήση στεγνών-στερεών αντισωμάτων, ελέγξαμε τη λειτουργικότητα αυτών, παρηγάγαμε καμπύλη ποσοτικοποίησης της μάζας των συστοιχιών και εν ολίγοις καθορίσαμε στο βέλτιστο όλες τις διαδικασίες παρασκευής.

## Abstract

Antibody microarrays, also referred to as antibody arrays or antibody chips, are specific protein microarrays consisting of a collection of capture antibodies fixed on a solid surface such as glass, plastic or silicon, for the purpose of detecting antigens. These arrays are often used for detecting protein expressions from cell lysates in general research and special biomarkers from serum or urine for diagnostic applications, identifying biomarkers and developing drug compounds. Arrays allow protein expression profiling, screening, and comparison between normal, diseased or treated samples. They are effective tools that have revolutionized multi-omics data collection and analysis and are among the most competitive ones. However, the existing array technologies, have a great disadvantage that makes array fabrication process so expensive. Array technologies in order to make the spots of the array, use liquid antibody solutions, but despite the use of very small volumes for spotting, very large amounts of antibodies are required for reconstitution from their dry form. In this project, we developed a method for fabricating antibody microarrays using solid phase antibodies, checked their functionality, produced curve for quantification of antibodies' mass on the arrays and determine optimum protocols for all associated processes.



# Περιεχόμενα

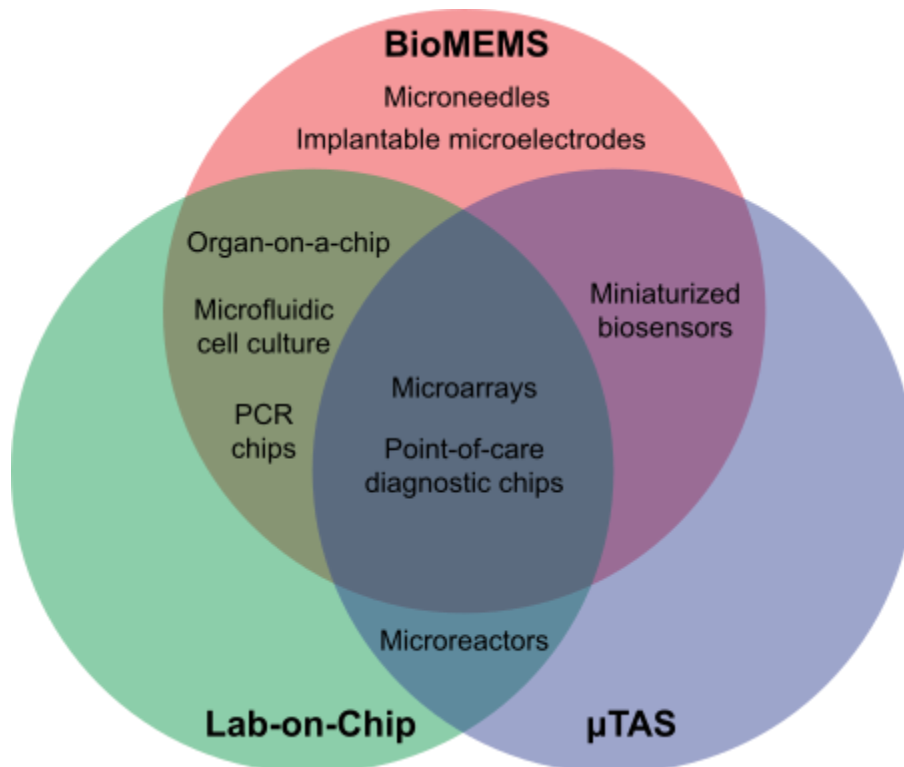
Ευχαριστίες.....	i
Περίληψη.....	iii
Abstract.....	iii
1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Ορισμός μικρο-συστοιχιών.....	1
1.2 Κατασκευή μικρο-συστοιχιών και «εκτύπωση» μικρο-συστοιχιών.....	2
1.2.1 Μικρο-συστοιχίες στερεής κατάστασης.....	2
1.2.2. Ηλεκτρονικές μικρο-συστοιχίες.....	12
1.2.3 Συστοιχίες σφαιριδίων υπερκειμένου(“suspension bead”).....	14
1.3 Εφαρμογή μικρο-συστοιχιών.....	18
1.3.1 Μικρο-συστοιχίες DNA.....	18
1.3.2 Μικρο-συστοιχίες πρωτεϊνών.....	24
1.3.3 Μικρο-συστοιχίες πεπτιδίων.....	29
1.3.4 Μικρο-συστοιχίες αντισωμάτων.....	30
1.4 Ανάλυση δεδομένων “Multi-omics”.....	33
1.4.1 Εισαγωγή στα “Multi-omics” δεδομένα.....	33
1.4.2 Θεωρήσεις για το σχεδιασμό των “omics” μελετών.....	37
1.4.3 Προσεγγίσεις στην ενοποιητική(integrative) ανάλυση πολλαπλών δεδομένων “omics”.....	40
1.5 Σκοπός της έρευνας.....	49
2. Υλικά και μέθοδοι: «Εκτύπωση» χωρίς επαφή μικρο-συστοιχιών αντισωμάτων στερεής φάσης με εναπόθεση λείζερ.....	51
2.1 Αντισώματα.....	51
2.2 Λυοφιλοποίηση.....	51
2.2.1 Διαδικασία λυοφιλοποίησης.....	52
2.2.2 Πειράματα λυοφιλοποίησης.....	54
2.3 Πλάσμα.....	58
2.3.1 Ορισμός πλάσματος.....	59
2.3.2 Πείραμα πλάσμα.....	60
2.4 Εκτύπωση μικρο-συστοιχιών.....	61
2.4.1 Τεχνολογία “Lift”.....	61
2.4.2 Υπόστρωμα δότη.....	63

2.5 Μικρο-συστοιχίες αντισωμάτων .....	64
2.6 Υπόστρωμα δέκτης .....	67
2.7 Έλεγχος λειτουργικότητας μικρο-συστοιχιών .....	69
2.8 Καμπύλη ποσοτικοποίησης .....	71
3. Σύνοψη-Μελλοντική έρευνα .....	73
Βιβλιογραφία .....	75
Παράρτημα Α: Πρωτόκολα .....	77
1. Καθαρισμός υποστρώματος δότη .....	77
2. Επεξεργασία του υποστρώματος-δότη με πλάσμα.....	77
3. Λυοφιλοποίηση.....	78
4. Έλεγχος λειτουργικότητας μικρο-συστοιχιών .....	80
Παράρτημα Β: Σχέδια .....	81
1. Αποδέκτες .....	81
2. Βάσεις .....	81
Παράρτημα Γ: Ανασκόπηση μικροσκοπίου JuLi Stage .....	83
Παράρτημα Δ: Κώδικας υπολογισμού μάζας μικρο-συστοιχίας.....	85

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Ορισμός μικρο-συστοιχιών

Μια μικρο-συστοιχία είναι ένα “multiplex lab-on-a-chip”, δηλαδή μια δυσδιάστατη συστοιχία πάνω σε ένα στερεό υπόστρωμα (συνήθως γυάλινο ή με λεπτή επικάλυψη πυριτίου), μέσω της οποίας μπορούν να προσδιοριστούν μεγάλοι όγκοι βιολογικών υλικών χρησιμοποιώντας υψηλής απόδοσης μεθόδους παρακολούθησης μικρογραφίας, πολυπλεξίας και παράλληλης επεξεργασίας και ανίχνευσης. Η ιδέα και η μεθοδολογία των μικρο-συστοιχιών εισήχθη και παρουσιάστηκε για πρώτη φορά σε μικροσυστοιχίες αντισωμάτων (ή μήτρα αντισωμάτων) από τον “Tse Wen Chang” το 1983 σε επιστημονική δημοσίευση και σε μία σειρά από ευρεσιτεχνίες. Η βιομηχανία γονιδιακού “chip” άρχισε να αναπτύσσεται σημαντικά μετά τη επιστημονική δημοσίευση το 1995 από τα εργαστήρια των “Ron Davis” και “Pat Brown” του Πανεπιστημίου του “Stanford”. Με την εγκαθίδρυση εταιρειών όπως “Affymetrix”, “Agilent”, “Applied Microarrays”, “Arrayjet”, “Illumina”, κ.ά., η τεχνολογία των μικρο-συστοιχιών “DNA” εξελίχθηκε και χρησιμοποιείται ευρέως, ενώ η χρήση πρωτεϊνικών, πεπτιδικών μικρο-συστοιχιών και των μικρο-συστοιχιών υδατανθράκων εξαπλώνεται. (1)



Εικόνα 1.1 Λογικό διάγραμμα περιγραφής και αντιπαράθεσης των αντικειμένων των κλάδων: “bio-MEMS”, “lab-on-a-chip”, “μTAS”.

## 1.2 Κατασκευή μικρο-συστοιχιών και «εκτύπωση» μικρο-συστοιχιών

Οι τεχνολογίες μικρο-συστοιχιών -που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση μικροβιακών στόχων- περιλαμβάνουν στερεής κατάστασης μικρο-συστοιχίες, ηλεκτρονικές μικρο-συστοιχίες και μικρο-συστοιχίες σφαιριδίων υπερκειμένου(“suspension bead micro-arrays”).

### 1.2.1 Μικρο-συστοιχίες στερεής κατάστασης

Οι μικρο-συστοιχίες στερεής κατάστασης (ή στερεής φάσης) χρησιμοποιούν άκαμπτα, αδιαπέραστα υποστρώματα (όπως γυαλί ή επιφάνειες από στρώσεις πυριτίου) ως στερεά υποστήριξη. Τα μικροσκοπικά σημεία(κηλίδες της συστοιχίας), το καθένα με χιλιάδες πανομοιότυπους ανιχνευτές ακινητοποιημένους στη στερεή επιφάνεια, διατάσσονται με τακτικότητα και με υψηλή πυκνότητα. Οι μικρο-συστοιχίες στερεής φάσης αποτελούν τους τεχνολογικούς απογόνους των τεχνικών “dot-blotting”, οι οποίες περιλάμβαναν την εφαρμογή μικροσκοπικών κηλίδων σε πορώδεις μεμβράνες. Η εισαγωγή στερεών υποστρωμάτων ήταν κρίσιμη για την επιτυχία των DNA μικρο-συστοιχιών, για μεγάλης κλίμακας και υψηλής απόδοσης βιολογικές εφαρμογές. Η πρόσδεση των ανιχνευτών στη στερεή επιφάνεια, αντί να θάβονται σε πόρους, αύξησε σημαντικά το ρυθμό υβριδοποίησης και συνέβαλε ώστε τα επακόλουθα βήματα πλύσης να μην παρεμποδίζονται από τη διάχυση. Η ακαμψία του στερεού υποστρώματος βελτιώνει τη λήψη και την επεξεργασία εικόνας, μέσω της παραγωγής ευκρινέστερων εικόνων, και η υψηλή ανάλυση αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τα χαρακτηριστικά μεγέθη μικρο-κλίμακας που επιτυγχάνονται σε αυτές τις μικρο-συστοιχίες.

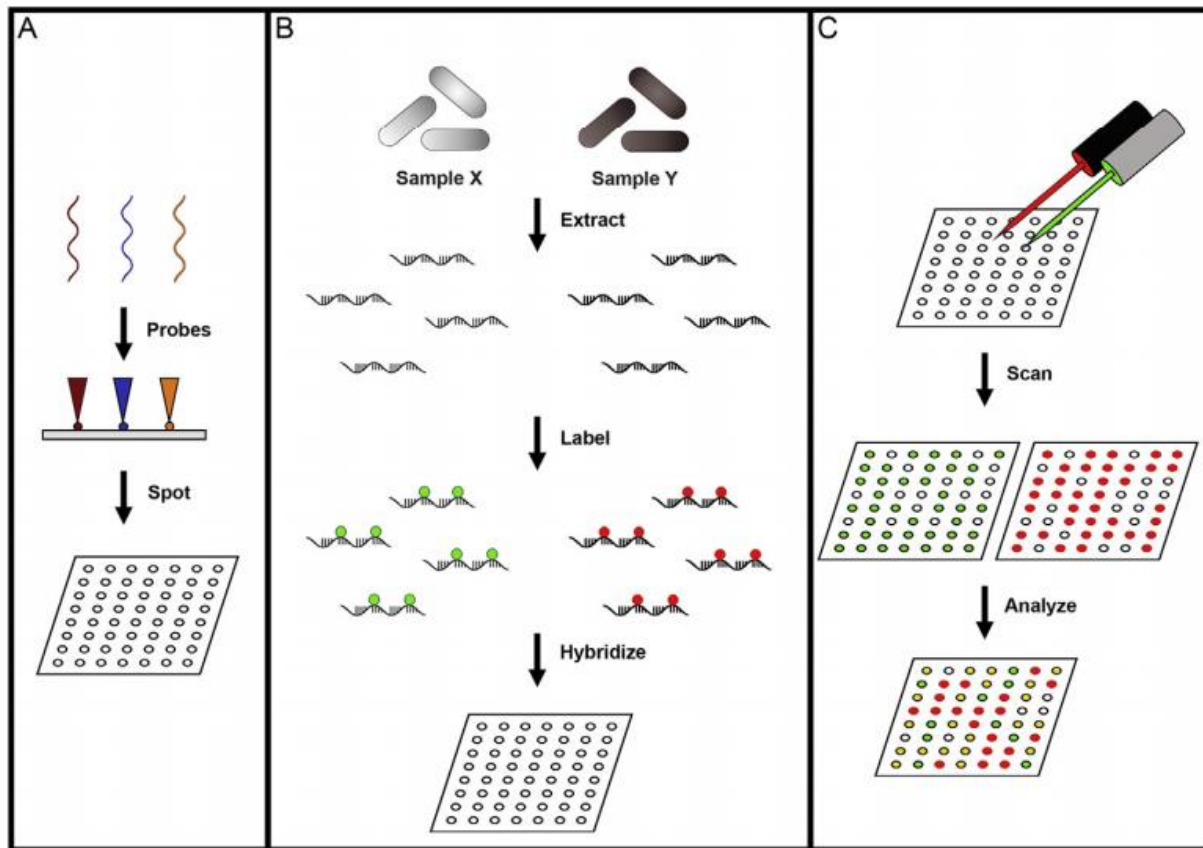
#### 1.2.1.1 Εκτυπωμένες μικρο-συστοιχίες

Οι εκτυπωμένες(“spotted”) μικροσυστοιχίες κατασκευάζονται με εναπόθεση προκατασκευασμένων μορίων-ανιχνευτών σε γυάλινες πλάκες(αντικειμενοφόρες πλάκες) με τη χρήση λεπτών καρφίτσων(“pins”) (εικόνα 1.2). Οι ανιχνευτές μπορεί να είναι μικρά ολιγονουκλεοτίδια, “cDNA” ή “PCR” προϊόντα και η χημεία της επιφανειακής προσκόλλησης μπορεί να είναι είτε ομοιοπολική είτε μη-ομοιοπολική. Η ομοιοπολική προσκόλληση απαιτεί την προσθήκη μιας αλιφατικής αμινομάδας(NH<sub>2</sub>) στο 5'-άκρο του ανιχνευτή. Έτσι οι ανιχνευτές προσκολλώνται στο γυαλί με το 5'-άκρο τους. Η μη ομοιοπολική προσκόλληση περιλαμβάνει ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ αμινομάδων στην επιφάνεια του γυαλιού και φωσφορικών ομάδων στην αλυσίδα του ανιχνευτή. Οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις δεν είναι αρκετά ισχυρές ώστε να δεσμεύσουν μικρούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές στο γυαλί και ως εκ τούτου η μη ομοιοπολική προσκόλληση είναι καταλληλότερη για τις μικρο-συστοιχίες “cDNA”.

Η μεταφορά ανιχνευτών πάνω στη γυάλινη επιφάνεια επιτυγχάνεται μέσω ρομπότ εναπόθεσης κηλίδων(spotting robot) εφαρμόζοντας εκτύπωση με επαφή ή χωρίς-επαφή μικρο-συστοιχιών. Οι τεχνολογίες εκτύπωσης με επαφή χρησιμοποιούνται από την αρχή της ανάπτυξης της τεχνολογίας μικρο-συστοιχιών. Βασίζονται σε εργαλεία βελόνες(pins), τα οποία βυθίζονται στο διάλυμα ανιχνευτή, παίρνοντας μια μικρή ποσότητα δείγματος, και φέροντάς το σε επαφή με την επιφάνεια της γυάλινης πλάκας, αφήνουν το δείγμα σε μορφή μικρής κηλίδας. Οι βελόνες που χρησιμοποιούνται σήμερα

διαχειρίζονται όγκους 0.5-12 nI εύρος, δημιουργώντας έτσι κηλίδες διαμέτρου 62.5 μm έως 600 μm. Η εκτύπωση χωρίς επαφή επιτρέπει την εκτύπωση μικρο-συστοιχιών χωρίς άμεση επαφή με την επιφάνεια. Χρησιμοποιεί πιεζοηλεκτρικούς, “bubble-generated” και μικρο-σωληνοειδείς διανομείς που λειτουργούν με την ίδια αρχή λειτουργίας όπως οι εκτυπωτές ψεκασμού μελανιού. Αυτά τα συστήματα είναι ικανά να διανέμουν μεμονωμένες σταγόνες όγκου έως και αρκετών εκατοντάδων πικο-λίτρων.

Μετά την εκτύπωση των ανιχνευτών, η επιφάνεια της συστοιχίας συνήθως τροποποιείται χημικά, κάνοντας την προσκόλληση επιπλέον “DNA” ανέφικτη. Η τροποποίηση αυτή είναι επιθυμητή προκειμένου να αποφευχθεί η μη ειδική σύνδεση του DNA στόχου του δείγματος στην γυάλινη πλάκα κατά την υβριδοποίηση. Επίσης συχνή είναι η τροποποίηση της επιφάνειας μετά την παραγωγή της συστοιχίας, έτσι ώστε να γίνει πιο υδρόφιλη και να διευκολύνεται η ανάμιξη του DNA στόχου κατά την υβριδοποίηση.



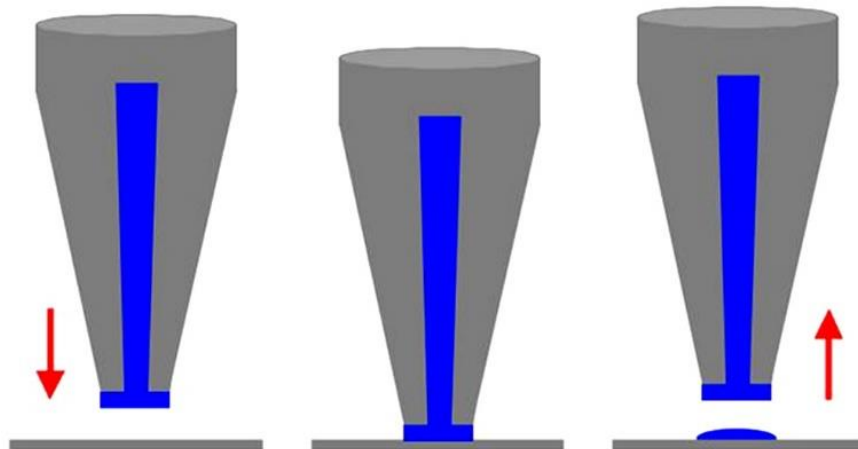
Εικόνα 1.2 Εκτυπωμένες μικρο-συστοιχίες. (Α) Προ-συνθετισμένοι ολιγονουκλεοτιδικοί ή “DNA” ανιχνευτές εκτυπώνονται σε αντικειμενοφόρες πλάκες με χρήση λεπτών βελονών. Μετά την εκτύπωση, οι ανιχνευτές προσκολλώνται χημικά πάνω στην πλάκα. (Β) Δείγματα που περιέχουν “DNA” στόχο επεξεργάζονται μέσω εξαγωγής, σήμανσης και υβριδισμού στη μικρο-συστοιχία. (Γ) Η υβριδοποιημένη μικρο-συστοιχία σκανάρεται και οι εικόνες περνούν από επεξεργασία και ανάλυση.

#### 1.2.1.1.1 Εκτύπωση με επαφή

Η κατασκευή μικρο-συστοιχιών με εκτύπωση επαφής βασίζεται στη χρήση υψηλής ακρίβειας βελονών (εικόνα 1.3) οι οποίες μέσω επαφής με το υπόστρωμα στήριξης της μικρο-συστοιχίας, εναποθέτουν μικρή ποσότητα διαλύματος ανιχνευτή (εικόνα 1.4). Οι βελόνες είναι προσκολλημένες σε ρομποτικό βραχίονα (εικόνα 1.5) ο οποίος κινεί τις βελόνες μεταξύ των διαφορετικών διαλυμάτων ανιχνευτή, των γυάλινων επιφανειών στις οποίες φτιάχνεται επάνω η συστοιχία και ενός δοχείου πλύσης. (2)

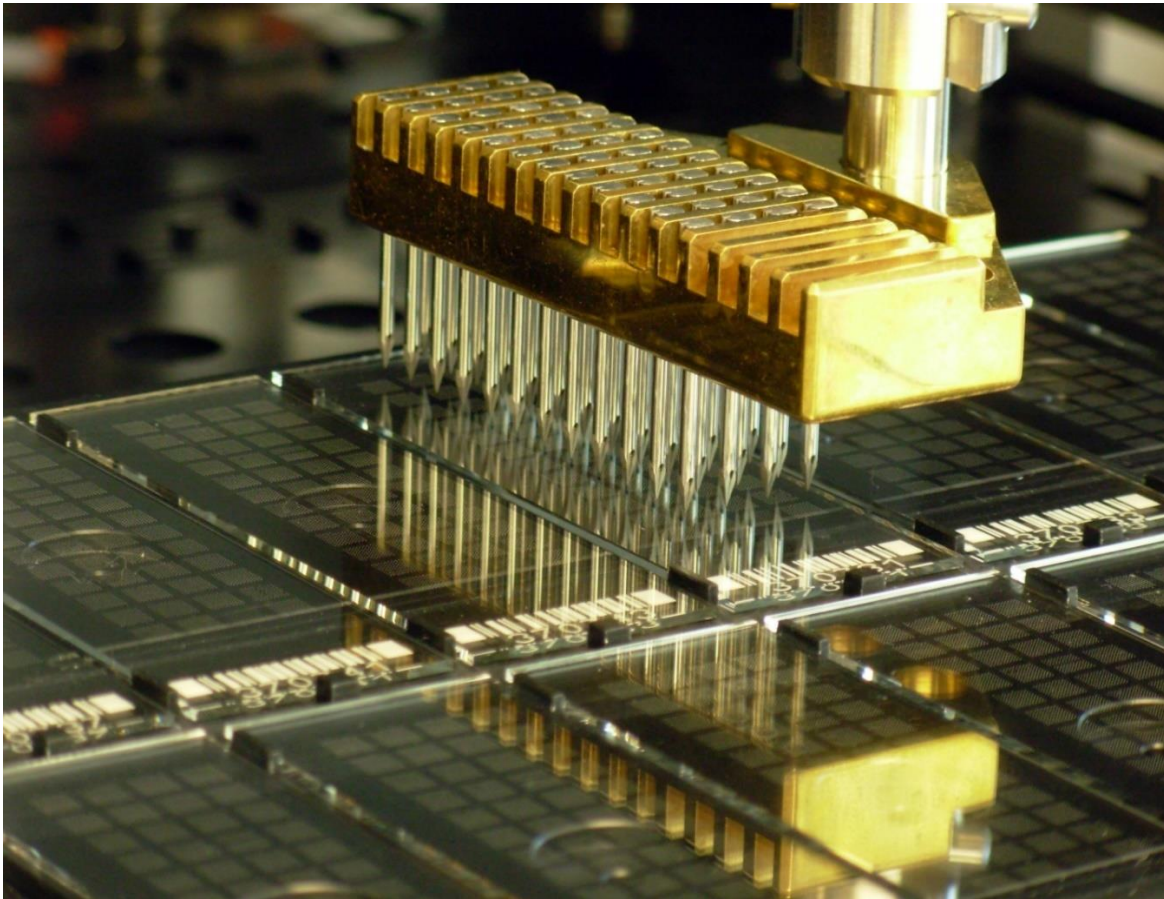


Εικόνα 1.3 Βελόνα εκτύπωσης μικρο-συστοιχιών της “Arrayit”.



Εικόνα 1.4 Ο 946 εκτυπωτικός μηχανισμός εκμεταλλεύεται την επιφανειακή τάση και την πρόσφυση, όπως στις προηγούμενες τεχνολογίες “ChipMaker” και “Stealth”. Το δείγμα(μπλε) εισάγεται στην βελόνα(γκρι) μέσω τριχοειδούς δράσης, γεμίζοντας το εξωτερικό κανάλι δείγματος πλήρως ώστε να παρέχει προκαθορισμένο όγκο πλήρωσης(αριστερό πάνελ). Το οριζόντιο επίπεδο στην άκρη της βελόνας επιτρέπει το σχηματισμό ενός λεπτού στρώματος από δείγμα στην άκρη της βελόνας, το οποίο έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια εκτύπωσης(κεντρικό πάνελ) κατά την κάθοδο της εκτύπωσης, παράγοντας ένα σταγονίδιο ανάμεσα στο υπόστρωμα και στην βελόνα. Καθώς η βελόνα αρχίζει να ανεβαίνει(δεξιά πάνελ), οι ισχυρές δυνάμεις πρόσφυσης του υποστρώματος τραβούν τη σταγόνα έξω από τη βελόνα, αφήνοντας πίσω ένα τέλει εκτυπωμένη κηλίδα μικρο-συστοιχίας. Επειδή δείγμα είναι παρόν στην άκρη της βελόνας, ο μηχανισμός εκτύπωσης της “Arrayit” δεν απαιτεί χτύπημα της βελόνας στο υπόστρωμα για εξαγωγή του δείγματος.





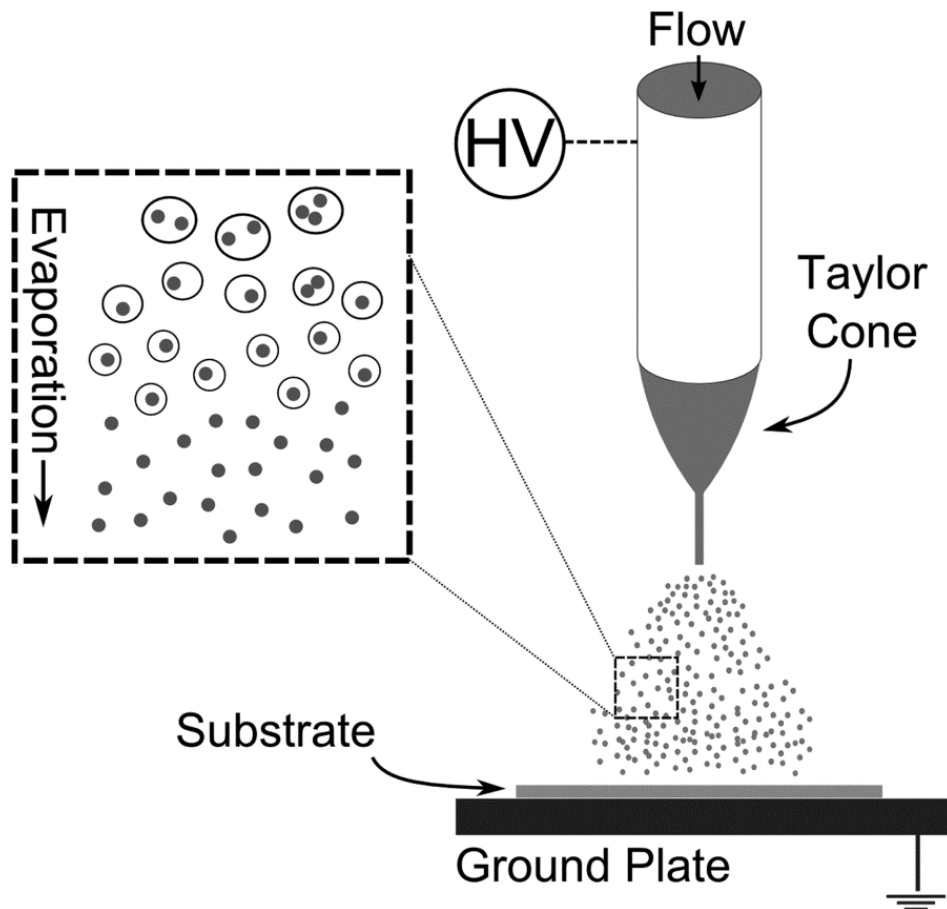
Εικόνα 1.5 Ρομποτικός βραχίονας μετακινεί τις βελόνες μεταξύ των αντικειμενοφόρων πλακών και των μικρο-συστοιχιών. (3)

#### 1.2.1.1.2 Εκτύπωση χωρίς επαφή μέσω εναπόθεσης με ηλεκτροψεκασμό

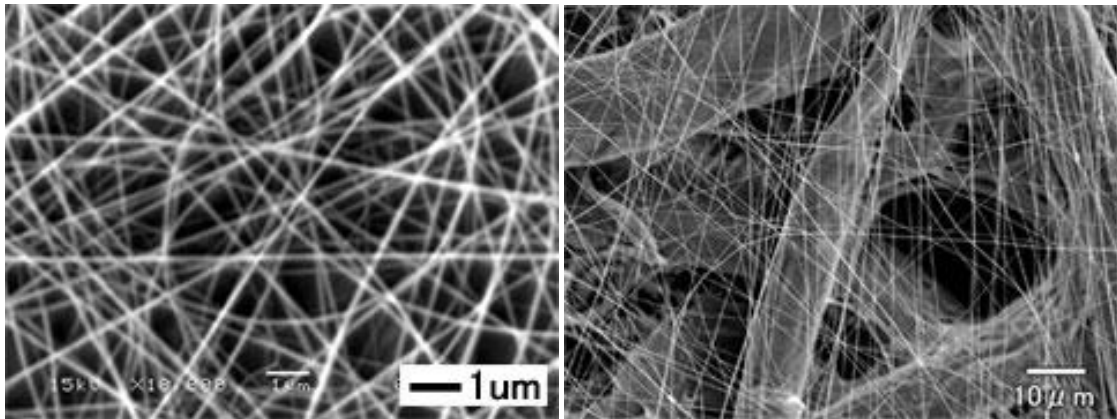
Η μέθοδος εναπόθεσης με ηλεκτροψεκασμό είναι μία διαδικασία μέσω της οποίας ένα υγρό μετατρέπεται σε μία λεπτή δέσμη ομίχλης. Αυτή η μετατροπή προκαλείται από την εφαρμογή ενός πολύ υψηλής τάσης ηλεκτρικού πεδίου στο τριχοειδές όπου συγκρατείται το υγρό. Σήμερα, αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως ως ιονιστής για φασματομετρία μάζας.

Η μέθοδος εναπόθεσης με ηλεκτροψεκασμό (“ESD-Electro Spray Deposition method”) είναι η τεχνική ψεκασμού διαφόρων ειδών διαλυμάτων βιομακρομορίων και/ή συνθετικών πολυμερών, προκειμένου αυτά να σχηματίσουν σωματίδια νάνο-διαστάσεων και ίνες, και έτσι να εναποτεθούν και να προσκολληθούν σε ένα υπόστρωμα μέσω ηλεκτροστατικής δύναμης. Παρ’ ότι ο ηλεκτροψεκασμός είναι μία εξαιρετικά πολύπλοκη φυσική διαδικασία, η οποία μάλιστα δεν είναι πλήρως κατανοητή, γενικά αυτό που συμβαίνει είναι το εξής. Όταν σε ένα δείγμα υγρού αποθηκευμένο σε ένα λεπτό τριχοειδές παρέχεται τάση χιλιάδων έως δεκάδων χιλιάδων “Volts”, ένα ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο παράγεται στο άκρο του τριχοειδούς, λόγω του φαινομένου συγκέντρωσης ηλεκτρικού πεδίου. Καθώς το υγρό αρχίζει να εξέρχεται του τριχοειδούς, σχηματίζει κωνικό σχήμα λόγω των ηλεκτρικά φορτισμένων ιόντων

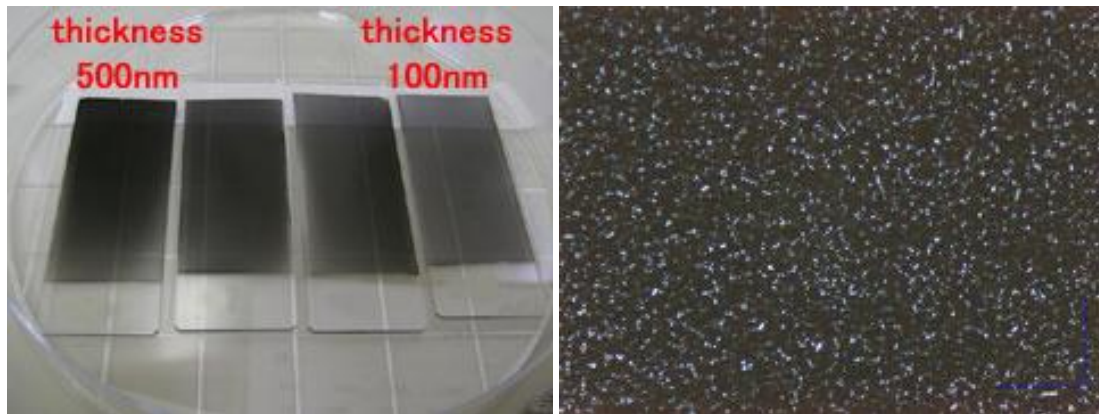
συγκεντρωμένων στην επιφάνειά του. Στη συνέχεια, όταν η ηλεκτροστατική δύναμη γίνεται μεγαλύτερη από την επιφανειακή τάση, το υγρό εκτοξεύεται από το άκρο του τριχοειδούς και σχηματίζει ένα λεπτό πίδακα. Δεδομένου ότι ο πίδακας είναι πολύ φορτισμένος, το υγρό αμέσως μετατρέπεται σε λεπτές σταγόνες (εικόνα 1.6) και παράγει σπρί με κάθε σταγόνα να εγχύεται ωθούμενη από την προηγούμενη μέσω ηλεκτροστατικής δύναμης. Τα σταγονίδια που σχηματίζονται μέσω ηλεκτροψεκασμού είναι μικροσκοπικά. Ως εκ τούτου, ο διαλύτης εξατμίζεται σε πάρα πολύ σύντομο χρονικό διάστημα και κατ' επέκταση σχηματίζονται πολύ λεπτά νανο-σωματίδια. Αυτά τα φορτισμένα μικρά σωματίδια έλκονται από το αντίθετο ηλεκτρόδιο με ηλεκτροστατική δύναμη και εναποτίθενται σε διάφορα μοτίβα (εικόνες 1.7, 1.8, 1.9) τα οποία μπορούν να ελεγχθούν με μάσκες μονωτικού υλικού και/ή από επιπρόσθετα ηλεκτρόδια.



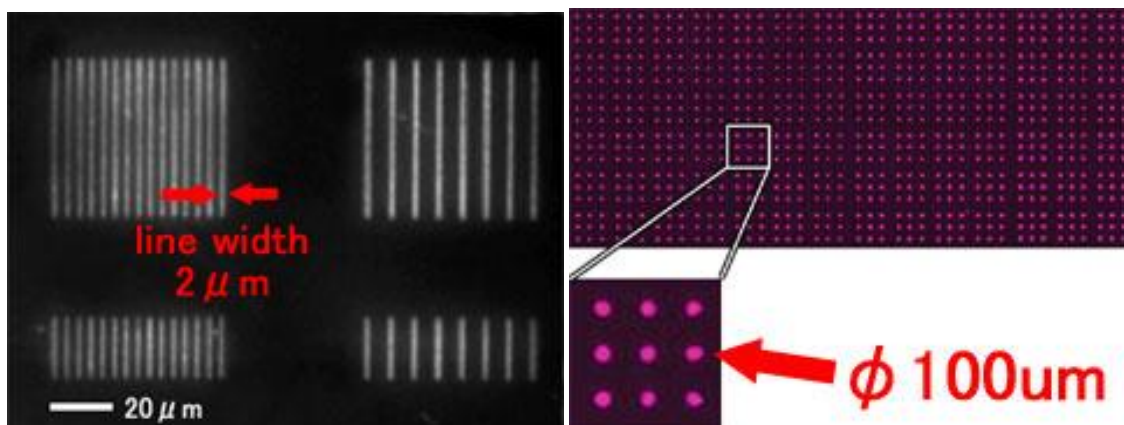
Εικόνα 1.6 Εξέλιξη της πορείας εναπόθεσης των νανο-σωματιδίων.



Εικόνα 1.7 Νανο-ίνες



Εικόνα 1.8 Λεπτό φιλμ



Εικόνα 1.9 Μικρο-μοτίβα

Η μέθοδος εναπόθεσης με ηλεκτροψεκασμό μπορεί:

- 1) να ψεκάσει διάφορες ουσίες που περιέχουν διαλύματα και υγρά διασποράς, όπως οργανικές/μη οργανικές ενώσεις, βιομακρομόρια και/ή συνθετικά πολυμερή και να εναποθέσει διάφορες νανο-δομές.
- 2) να διατηρήσει το δείγμα σχετικά ανέπαφο από ζημιές, δεδομένου ότι η όλη διαδικασία διενεργείται σε θερμοκρασία δωματίου και ατμοσφαιρική πίεση.
- 3) να δημιουργήσει σωματίδια και ίνες νανο-διαστάσεων.
- 4) να ελέγξει τις εναποθέσεις και τα μοτίβα των σωματιδίων χρησιμοποιώντας ηλεκτροστατική δύναμη.
- 5) να σχηματίσει νανο-δομές στη μεγαλύτερη δυνατή περιοχή.

Τέλος, δεδομένου ότι πρόκειται για ξηρή εναπόθεση, δεν προκύπτει κανένα από τα προβλήματα που προκύπτουν στην υγρή εναπόθεση. Φυσικά με τη μέθοδο αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί και υγρή εναπόθεση με αλλαγή των παραμέτρων ψεκασμού. (4)

#### 1.2.1.2 Μικρο-συστοιχίες επί τόπου (“in situ”) σύνθεσης

Οι ανιχνευτές για μικρο-συστοιχίες πολύ υψηλής πυκνότητας συντίθενται βάση προς βάση και επί τόπου (“in situ”) στην στερεή επιφάνεια της μικρο-συστοιχίας. Η πιο απλή μέθοδος σύνθεσης ολιγονουκλεοτιδίων περιλαμβάνει την προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου τη φορά στο αυξανόμενο άκρο μιας ολιγονουκλεοτιδικής αλυσίδας. Σε αυτή τη μέθοδο, η αλληλουχία της ολιγονουκλεοτιδικής αλυσίδας καθορίζεται από τη σειρά με την οποία τα δεοξυριβο-τριφωσφωρικά νουκλεοσίδια (“dNTPs-deoxyribose nucleoside triphosphates”) προστίθενται στην αντίδραση. Για την στερεής φάσης “in situ” χημική σύνθεση “DNA”, μια εναλλακτική χημική σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων που βασίζεται στη χημεία φωσφοραμιδίτη (προστασία/αποπροστασία) ζευγνύει με στερεό υποστήριγμα που περιέχει μόρια ομοιοπολικού δεσμού. Τα δομικά στοιχεία φωσφοραμιδίτη (νουκλεοσίδια φωσφοραμιδίτη) προερχόμενα από χημικά προστατευμένα 2'-δεοξυνουκλεοσίδια (dA, dC, dG και dT) χρησιμοποιούνται στη χημεία προστασίας/αποπροστασίας φωσφοραμιδίτη. Η προστασία των αντιδρώντων αμίνης, φωσφορικού άλατος και υδροξυλίου διασφαλίζει την αποφυγή ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων. Για την προστασία της εξωκυκλικής αμινομάδας, τα πρότυπα σχήματα χρησιμοποιούν μια ομάδα βενζολίου για αδενοσίνη και κυτιδίνη και μια ομάδα ισοβουτυριλίου για γουανοσίνη. Η θυμιδίνη δε διαθέτει αντιδρώσα εξωκυκλική αμινομάδα και έτσι δεν χρήζει προστασίας.

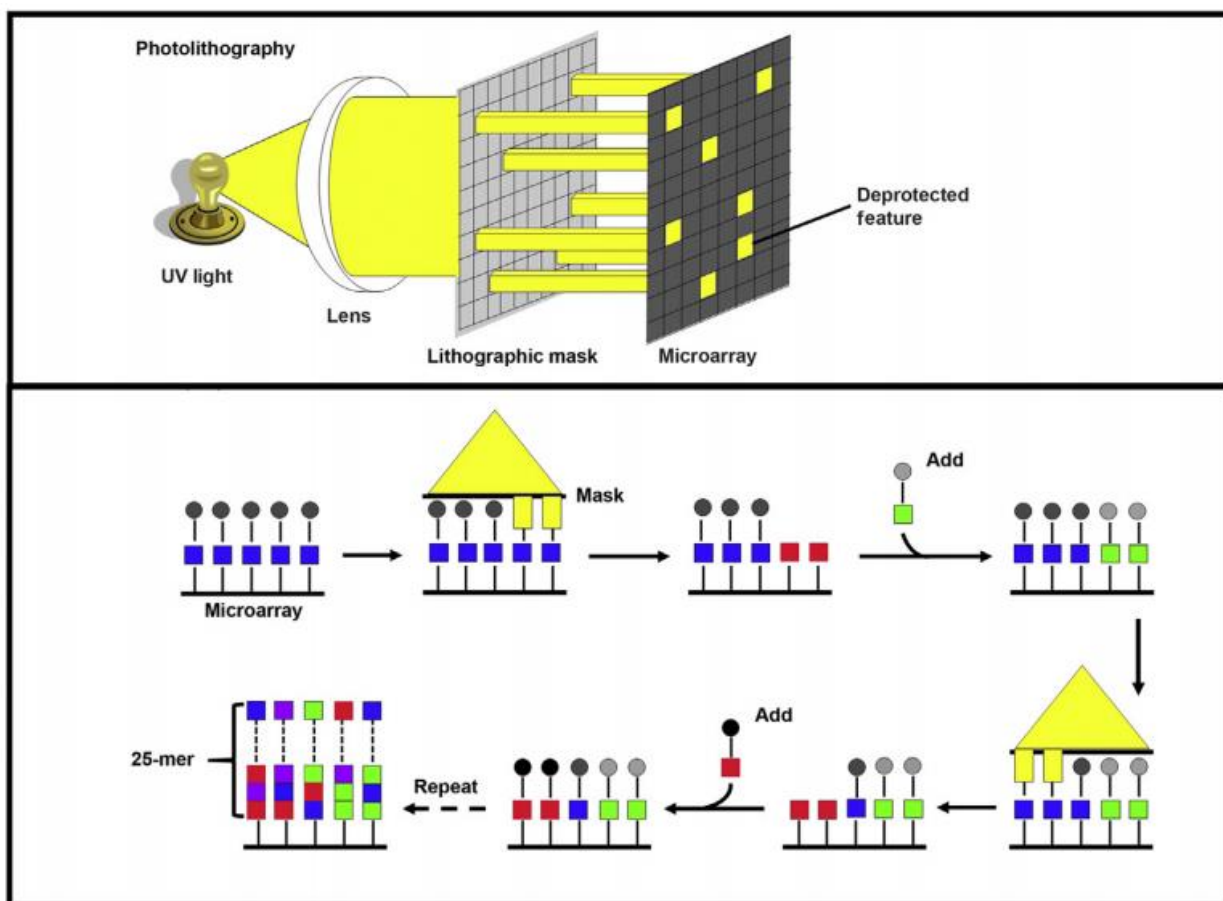
Η “in situ” σύνθεση της ολιγονουκλεοτιδικής αλυσίδας με χρήση της χημείας προστασίας/αποπροστασίας αποτελείται από κύκλους αντιδράσεων, κάθε ένας από τους οποίους καταλήγει στην προσθήκη μίας βάσης. Η προστιθέμενη βάση έχει μια προστατευτική ομάδα στον 5'-άκρο για να αποτρέψει την προσθήκη περισσότερων από μία βάσεων σε κάθε κύκλο της σύνθεσης. Στο αρχικό στάδιο, η τερματική 3'-βάση είναι ομοιοπολικά προσδεμένη στο στερεό υποστήριγμα. Ολιγονουκλεοτίδια συντίθενται στην 3'-προς 5'-κατεύθυνση (αντίθετη από την κατεύθυνση αντιγραφής του DNA 5'-προς 3'-) με επανάληψη του κύκλου σύνθεσης όσες φορές χρειαστεί ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό μήκος “DNA”. Ένας κύκλος σύνθεσης προστασίας/αποπροστασίας περιλαμβάνει τα ακόλουθα τέσσερα βήματα:

1. Αποπροστασία: η προστατευμένη ομάδα στο 5'-τερματικό νουκλεοτίδιο απομακρύνεται, παράγοντας ένα δραστικό 5'-υδροξύλιο(OH), έτοιμο για σύνδεση με το φωσφοραμίδιο που θα προστεθεί.
2. Σύζευξη: ένα ενεργοποιημένο νουκλεοσίδιο φωσφοραμιδίου έρχεται σε επαφή με τον υποστηριζόμενο φορέα νουκλεοτιδίου. Η ομάδα του 5'-OH αντιδρά με το ήμισυ του ενεργοποιημένου φωσφοραμιδίου δημιουργώντας ένα τριμερή φωσφορικό δεσμό. Αυτή η σύνδεση είναι ασταθής για το ολιγονουκλεοτίδιο στο τέλος της αντίδρασης σύζευξης και ένα μικρό κλάσμα των 5'-OH ομάδων παραμένει απρόσιτο. Το κλάσμα των νεο-προστιθέμενων βάσεων που ενσωματώνονται στην πραγματικότητα στην αυξανόμενη αλυσίδα "DNA" ονομάζεται απόδοση σύζευξης.
3. Κάλυψη: η μόνιμη παρεμπόδιση των 5'-OH ομάδων που δεν έχουν αντιδράσει μέσω κατεργασίας με μίγμα χημικού καταλύτη.
4. Οξειδωση: ο τριμερής φωσφορικός δεσμός που δημιουργείται μετά τη σύζευξη είναι ασταθής υπό τις συνθήκες σύνθεσης ολιγονουκλεοτιδίων. Το βήμα αυτό περιλαμβάνει την οξειδωση του τρισθενούς φωσφορικού άλατος σε ένα πιο σταθερό πεντασθενές.

Διαφορετικές μέθοδοι χρησιμοποιούμενες στη φάση αποπροστασίας("deprotection") καταλήγουν σε τρεις τεχνολογίες για τις «επί τόπου» σύνθεσης μικρο-συστοιχίες. Αυτές οι τρεις τεχνολογίες διαφέρουν στο αν χρησιμοποιούν φωτο-προστατευτικές ομάδες ή οξικά-ασταθείς ομάδες για την 5'-OH ομάδα του νουκλεοσιδίου φωσφοραμιδίτη και στο πως επιτυγχάνουν τη συνδυαστική χημεία που εμπεριέχεται στην παράλληλη σύνθεση χιλιάδων ανιχνευτών.

#### 1.2.1.2.1 Φωτο-αποπροστασία με χρήση λιθογραφικής μάσκας

Σε αυτή τη μέθοδο, η οποία αποτελεί τη βάση της τεχνολογίας της "Affymetrix GeneChip", χρησιμοποιείται φως για να μετατρέψει την προστατευτική ομάδα στο 5'-τερματικό νουκλεοτίδιο σε υδροξυλομάδα (εικόνα 1.10). Κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου σύνθεσης, η επιλεκτική έκθεση συγκεκριμένων περιοχών της συστοιχίας σε φως επιτυγχάνεται με μία φυσική μάσκα χρωμίου, η οποία επιτρέπει στο φως να διέλθει μόνο από κάποιες συγκεκριμένες περιοχές(features) της μικρο-συστοιχίας. Αυτή η τεχνική, γνωστή και ως φωτολιθογραφία, υιοθετήθηκε από την κατασκευή των κυκλωμάτων μικροεπεξεργαστών πυριτίου. Τα "features" αυτά ενεργοποιούνται για περαιτέρω σύνθεση μετά την έκθεση σε φως. Η επιφάνεια της μικρο-συστοιχίας τότε ξεπλένεται με ένα διάλυμα που περιέχει ένα μόνο τύπο νουκλεοτιδίου, αλλά η χημική σύζευξη πραγματοποιείται μόνο στα "features" που έχουν αποπροστατευθεί. Τα νεοσυσζευγμένα νουκλεοτίδια έχουν επίσης μια προστατευμένη ομάδα, οπότε η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί με την εφαρμογή άλλης μάσκας και επακόλουθη πλήση με άλλο νουκλεοτίδιο, μέχρι να συντεθούν όλοι οι ανιχνευτές. Για κάθε ανιχνευτή στη μικρο-συστοιχία απαιτούνται τέσσερις μάσκες σε κάθε κύκλο σύνθεσης. Το μήκος τους σε μια μικρο-συστοιχία της "Affymetrix GeneChip" είναι 25 νουκλεοτίδια, απαιτώντας για την κατασκευή 100 μάσκες ανά μικρο-συστοιχία. Οι φωτολιθογραφικές μάσκες είναι ακριβές για να παραχθούν, αλλά μόλις σχεδιαστούν και κατασκευαστούν, μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν προκειμένου να δημιουργηθεί ένας μεγάλος αριθμός πανομοιότυπων μικρο-συστοιχιών υψηλής πιστότητας. Έτσι, η τεχνολογία της "Affymetrix GeneChip" είναι κατάλληλη για τη δημιουργία μεγάλου αριθμού τυποποιημένων μικροσυστοιχιών.

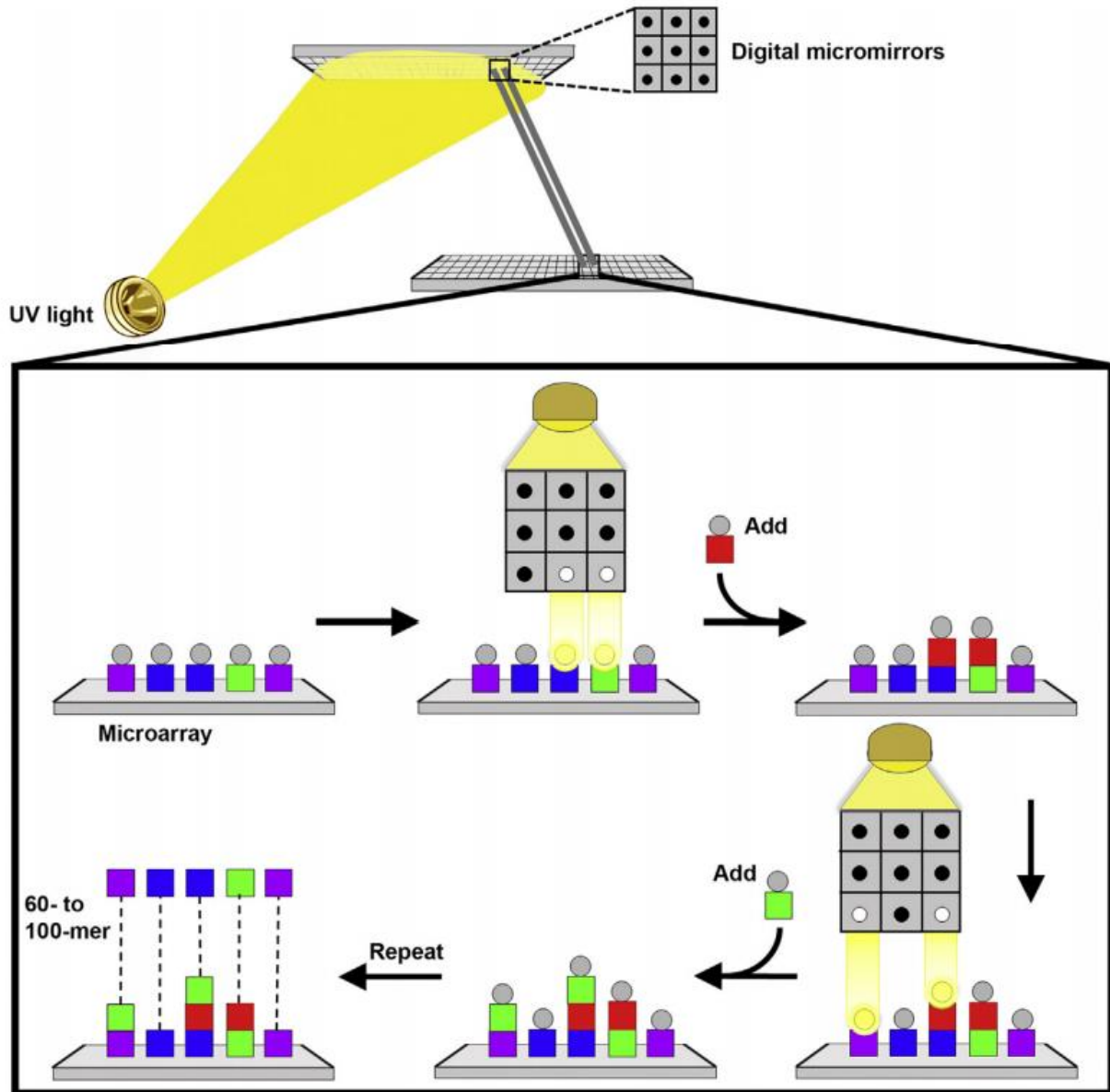


Εικόνα 1.10 "In situ" κατασκευασμένη μικρο-συστοιχία μέσω λιθογραφίας με χρήση μάσκας. (Κορυφή) Λιθογραφική μάσκα χρησιμοποιείται για να μεταφέρει ή να μπλοκάρει φως υπεριώδους ("UV") από προστατευμένα νουκλεοτίδια στην επιφάνεια της μικρο-συστοιχίας. (Κάτω μέρος) Προστατευτικές ομάδες (κύκλοι) απομακρύνονται μέσω έκθεσης σε "UV", επιτρέποντας προσθήκη ενός μόνο προστατευμένου νουκλεοτιδίου (τετράγωνο). Ο κύκλος επαναλαμβάνεται με χρήση διαφορετικών μασκών διαδοχικά ώστε να υπαγορεύεται η σειρά της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων στους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές.

#### 1.2.1.2.2 Φωτο-αποπροστασία χωρίς μάσκα με χρήση ψηφιακών συσκευών μικροκαθρέπτη

Η φωτοαποπροστασία χωρίς μάσκα βασίζεται και αυτή στην κατευθυνόμενη από φως σύνθεση, αλλά χρησιμοποιεί μια ψηφιακή συσκευή μικροκαθρέπτη για την επιλεκτική έκθεση σε φως των περιοχών τις μικρο-συστοιχίας. Σε αυτή τη μέθοδο στηρίζεται η τεχνολογία της "Roche NimbleGen Maskless array Synthesizer (MAS)". Μια ψηφιακή συσκευή μικροκαθρέπτη αποτελεί τη στερεής φάσης συσκευή πυριτίου, με μια συστοιχία αλουμινένιων καθρεπτών που μπορούν να κατευθύνουν το φως στις επιθυμητές θέσεις της στερεής επιφάνειας της μικρο-συστοιχίας (εικόνα 1.11). Δημιουργεί έτσι αποτελεσματικά εικονικές μάσκες αντικαθιστώντας τις πρότυπες φωτολιθογραφικές μάσκες. Η ψηφιακή συσκευή μικροκαθρέπτη της "NimbleGen" μπορεί να δημιουργήσει το μοτίβο μέχρι και 786000 μεμονωμένων πίξελ φωτός, το οποίο επιτρέπει ελάχιστο μέγεθος περιοχής 17μm. Εφόσον δεν υπάρχουν φυσικές μάσκες στην τεχνολογία αυτή, το κύριο κόστος της προσέγγισης χωρίς μάσκα είναι η χημεία. Η

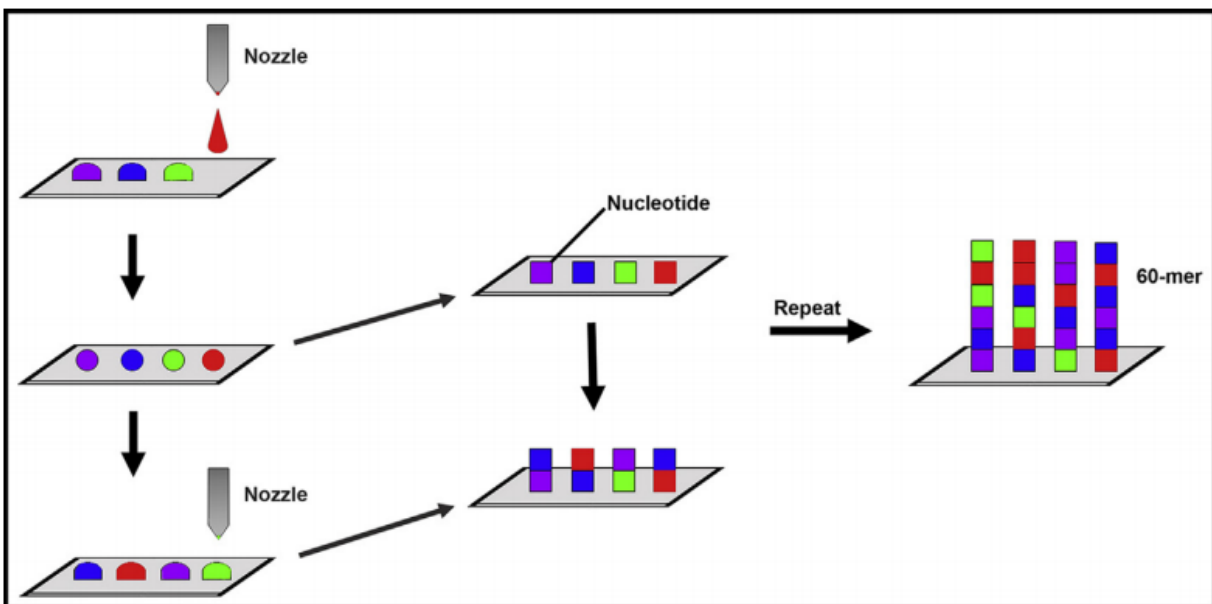
ευελιξία των εικονικών μάσκων επιτρέπει την παραγωγή μικρών παρτίδων μικρο-συστοιχιών υψηλής πυκνότητας με διαφορετικές διατάξεις συστοιχίας μέσα σε λίγες μέρες.



Εικόνα 1.11 “In situ” κατασκευασμένη μικρο-συστοιχία χωρίς χρήση μάσκας και με χρήση ψηφιακών μικρο-καθρεπτών. Η τεχνολογία των ψηφιακών καθρεπτών χρησιμοποιείται για να δημιουργήσει εικονικές μάσκες για φωτο-αποπροστασία. Το φως “UV” κατευθύνεται μέσω της εικόνας της μάσκας πάνω στην επιφάνεια της μικρο-συστοιχίας με σκοπό να μετακινήσει τη προστατευτική ομάδα(κύκλοι) και να επιτρέψει προσθήκη ενός μόνο νουκλεοτιδίου(τετράγωνα). Τα βήματα επαναλαμβάνονται με διαφορετικές εικονικές μάσκες με σκοπό να κατευθύνουν τη σύνθεση των επιθυμητών νουκλεοτιδίων σε ένα επιλεγμένο μοτίβο.

### 1.2.1.2.3 Χημική από-προστασία με σύνθεση μέσω έγχυσης

Αυτή η μέθοδος που βασίζεται στις μικρο-συστοιχίες της “Agilent Technologies” συνδυάζει την αποπροστασία με μεσολάβηση χημικών οξέων με την εκτύπωση με έγχυση για εναπόθεση 60 ζευγαριών βάσεων ολιγονουκλεοτιδίων, μία βάση τη φορά, σε τυπικές γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες. Η αποπροστασία των προστατευμένων με “DMT” νουκλεοσιδίων φωσφοραμιδίου επιτυγχάνεται μέσω απομάκρυνσης του “DMT” με τριχλωροακετικό οξύ. Κατά το βήμα σύζευξης του κύκλου σύνθεσης, ο εκτυπωτής έγχυσης χρησιμοποιεί μικροσκοπικά ακροφύσια για κάθε μονομερές και χημικούς ενεργοποιητές για την τοποθέτηση σταγόνων αντιδραστηρίων όγκου πικο-λίτρων σε συγκεκριμένες θέσεις στη μικρο-συστοιχία (εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12 “In situ” κατασκευασμένη μικρο-συστοιχία με χρήση χημικής αποπροστασίας με σύνθεση βασισμένη στην εκτύπωση με έγχυση μελάνης. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί αποπροστασία με μεσολάβηση οξέος μέσω εκτύπωσης με έγχυση για σύνθεση ανιχνευτών ολιγονουκλεοτιδίων. Ο εκτυπωτής χρησιμοποιεί μικροσκοπικά ακροφύσια για εναπόθεση ποσοτήτων πικο-λίτρων νουκλεοτιδίων και αντιδραστηρίων σε συγκεκριμένες περιοχές της μικρο-συστοιχίας. Επαναλαμβανόμενα στάδια εκτύπωσης επεκτείνουν το μήκος του ανιχνευτή στα 60 νουκλεοτίδια.

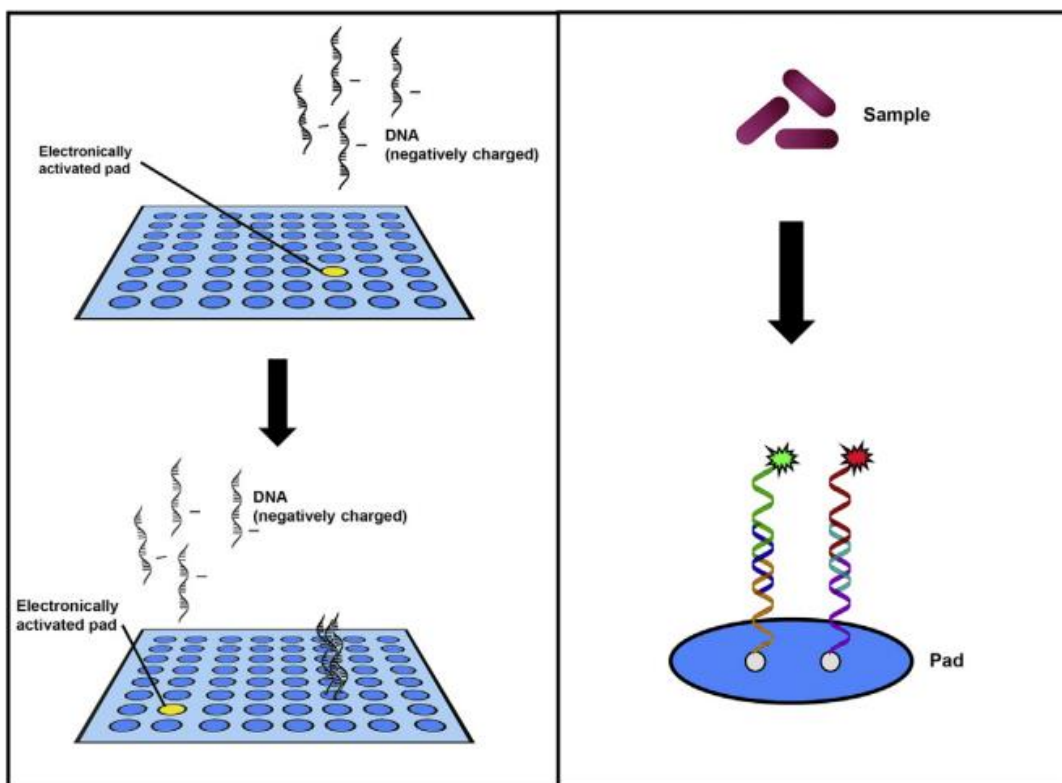
### 1.2.2. Ηλεκτρονικές μικρο-συστοιχίες

Οι εκτυπωμένες και οι “in situ” μικρο-συστοιχίες στηρίζονται στην παθητική μεταφορά για την υβριδοποίηση των νουκλεϊκών οξέων. Από την άλλη, οι ηλεκτρονικές μικρο-συστοιχίες χρησιμοποιούν ενεργό υβριδισμό μέσω ηλεκτρικών πεδίων ώστε να ελέγξουν τη μεταφορά νουκλεϊκών οξέων (εικόνα 1.13). Εμπορικά διαθέσιμες ως “NanoChip XL” από τη “Savvon Diagnostics”, τη βασική τεχνολογία της μικρο-ηλεκτρονικής κεφαλής, χρησιμοποιεί τεχνολογία συμπληρωματικών ημιαγωγών μεταλλικών οξειδίων για τη ν ηλεκτρονική διευθυνσιοδότηση των νουκλεϊκών οξέων. Η κεφαλή διαθέτει 12



συνδέσμοι οι οποίοι ελέγχουν 400 ξεχωριστά κανάλια δοκιμών. Η μικρο-συστοιχία παράγεται από μεταφορά αρνητικά φορτισμένων νουκλεϊκών οξέων σε συγκεκριμένα κανάλια όταν ένα ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται σε ένα ή περισσότερα κανάλια δοκιμών της μικρο-συστοιχίας. Η επιφάνεια της μικρο-συστοιχίας περιέχει στρεπταβιδίνη, η οποία επιτρέπει το σχηματισμό δεσμών στρεπταβιδίνης-βιοτίνης με βιοτινιλωμένους ανιχνευτές να φτάνουν σε κάθε τοποθεσία μέσω της εφαρμογής συγκεκριμένου ηλεκτρικού πεδίου, ακινητοποιώντας έτσι τον ανιχνευτή στην επιφάνεια. Το ηλεκτρικό πεδίο στη συνέχεια αφαιρείται από τις ενεργές θέσεις και νέα κανάλια δοκιμών μπορούν να ενεργοποιηθούν.

Μόλις οι ανιχνευτές υβριδοποιηθούν σε διακριτά κανάλια δοκιμών, η μικρο-συστοιχία είναι έτοιμη για την εφαρμογή στόχων “DNA” σημασμένων με φθορίζοντα μόρια. Το “DNA” στόχος υβριδοποιείται παθητικά με τους ακινητοποιημένους ανιχνευτές στη μικρο-συστοιχία ή συγκεντρώνεται ηλεκτρονικά. Ηλεκτρονική διευθυνσιοδότηση των πρωτογενών ανιχνευτών πρώτα είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μορφή δοκιμής. Αν πραγματοποιηθεί υβριδοποίηση μεταξύ των ανιχνευτών και του DNA στόχου, φθορίζουσες σημάσεις θα εμφανιστούν στα κανάλια ελέγχου που βγήκαν θετικά και θα ανιχνευτούν όταν η ηλεκτρονική μικρο-συστοιχία περάσει από σκάνερ και γίνει ανάλυση από κατάλληλο λογισμικό.

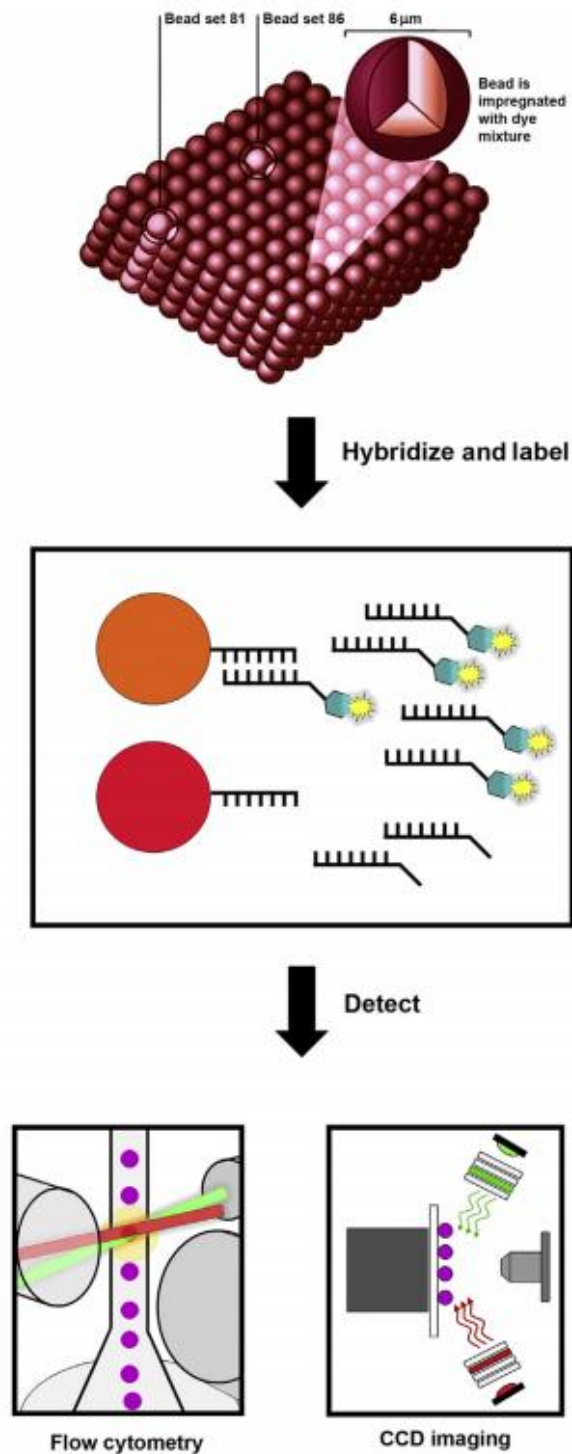


Εικόνα 1.13 Ηλεκτρονική μικρο-συστοιχία. (Αριστερά) Θετικό ρεύμα εφαρμόζεται σε συγκεκριμένα κανάλια δοκιμών για να βοηθήσει την κίνηση αρνητικά φορτισμένων “DNA” ανιχνευτών στα ενεργοποιημένα κανάλια. Οι ανιχνευτές προσκολλώνται μέσω δεσμού στρεπταβιδίνης-βιοτίνης. Το κανάλι απενεργοποιείται και το ρεύμα εφαρμόζεται σε διαφορετικά κανάλια για την τοποθέτηση νέου ανιχνευτή. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου όλοι οι ανιχνευτές να συστοιχισθούν. (Δεξιά) Δείγματα εξάγονται, ενισχύονται και υβριδοποιούνται στην επιφάνεια της μικρο-συστοιχίας. Δευτερογενείς ανιχνευτές εξειδικευμένου στόχου ολιγονουκλεοτίδια με φθορίζον ανιχνευτή χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση των θετικών αντιδράσεων υβριδισμού.

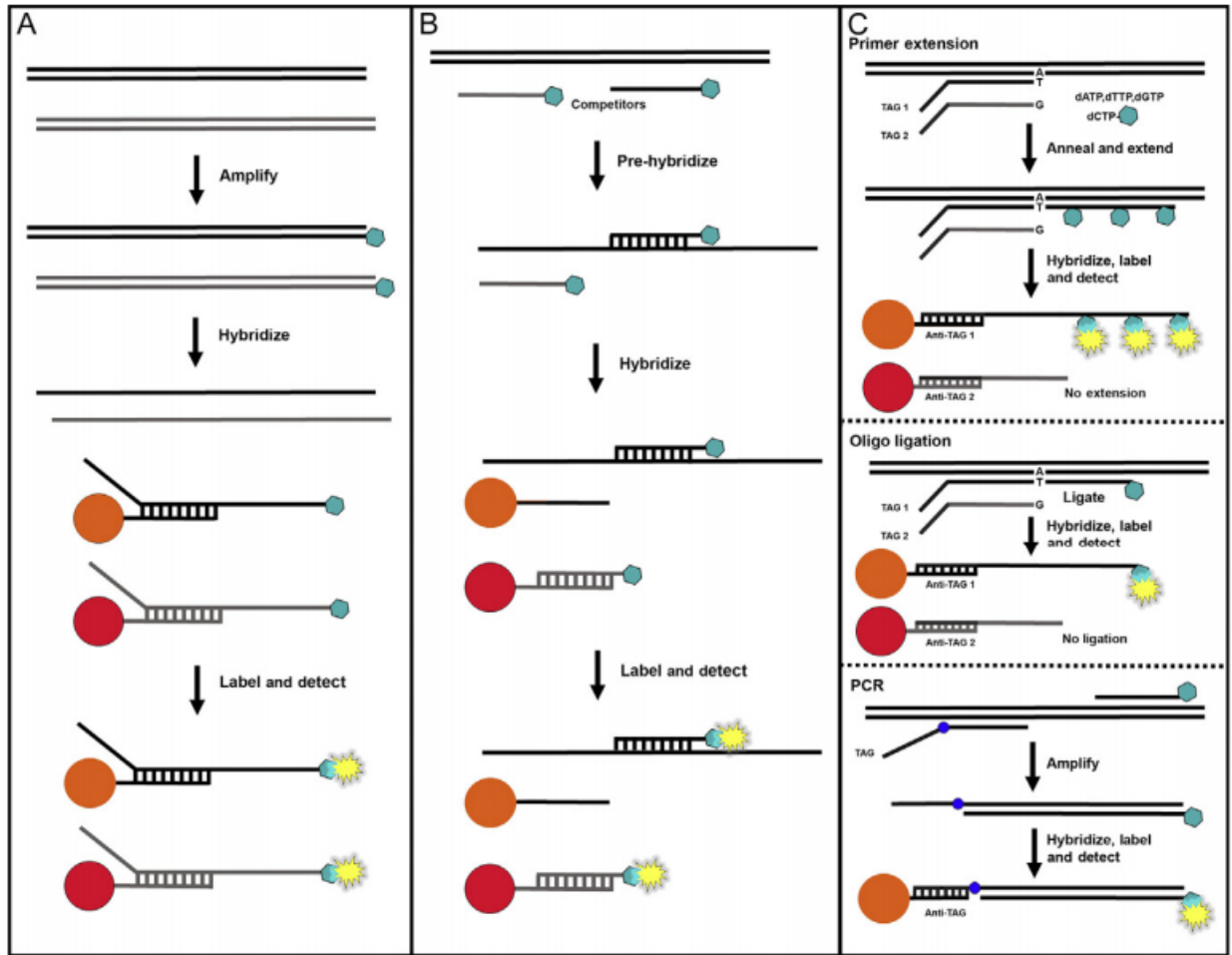
### 1.2.3 Συστοιχίες σφαιριδίων υπερκειμένου (“suspension bead”)

Οι τεχνολογίες συστοιχιών σφαιριδίων υπερκειμένου είναι τρισδιάστατες συστοιχίες οι οποίες χρησιμοποιούν μικρο-σωματίδια(μικροσφαιρίδια) ως τη στερεή στήριξη για την αντίδραση σύνδεσης και τη κυτταρομετρία ροής ή “CCD” οπτικοποίηση για την ανίχνευση των σφαιριδίων και των σχετιζόμενων στόχων (εικόνα 1.14). Τα σωματίδια μπορούν να διαχωριστούν σε υποσύνολα βάση διαφορετικών χαρακτηριστικών κατηγοριοποίησης, όπως μέγεθος ή διάμετρος, και επιφανειακά χαρακτηριστικά ή χαρακτηριστικά σύστασης, και η πολυπλεξία επιτυγχάνεται μέσω των μοναδικών χαρακτηριστικών των υποσυνόλων των σωματιδίων. Η τεχνολογία “Chip Technology platform” από τη “Luminex” είναι μία τεχνολογία συστοιχιών σφαιριδίων υπερκειμένου συχνά χρησιμοποιούμενη για ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων και χρησιμοποιεί μικροσφαιρίδια από πολυστυρένιο τα οποία είναι εσωτερικά βαμμένα με δύο ή τρία φασματικά διακριτά φθορίζοντα χρώματα(χρωστικές). Χρησιμοποιώντας ακριβής ποσότητες αυτών των φθορίζουσών χρωστικών, μια συστοιχία δημιουργείται αποτελούμενη από διαφορετικά σύνολα σφαιριδίων με συγκεκριμένες φασματικές διευθύνσεις. Ένας συγκεκριμένος πρωτογενής ολιγονουκλεοτιδικός ανιχνευτής ομοιοπολικά συζευγμένος με την επιφάνεια συγκεκριμένων συνόλων σφαιριδίων ή σύνολα σφαιριδίων προ-συζευγμένα με μοναδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές είναι διαθέσιμα στο εμπόριο για ανάπτυξη και χρήση σε δοκιμές με μικρο-συστοιχίες νουκλεϊκών οξέων. Το νουκλεϊκό οξύ στόχος αιχμαλωτίζεται μέσω υβριδισμού με τη συμπληρωματική αλληλουχία-ανιχνευτή και σηματοδοτείται με ένα μόριο σήμανσης (π.χ. φθορίζουσα βαφή) ώστε να επιτρέψει την ανίχνευση και τη ποσοτικοποίηση της συγκεκριμένης πρόσδεσης που πραγματοποιήθηκε στην επιφάνεια του σωματιδίου. Πολλαπλά σήματα παίρνονται ανά σύνολο σφαιριδίων ή στόχο, παρέχοντας ένα φθορίζον σήμα εξόδου των αποτελεσμάτων υβριδοποίησης.

Μια ποικιλία χημικών δοκιμών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή στόχων “DNA” για υβριδισμό σφαιριδίων υπερκειμένου, συμπεριλαμβανομένων της άμεσης αιχμαλώτισης, του ανταγωνιστικού υβριδισμού και των ενζυματικών χημικών διαλυματικών δοκιμών σε συνδυασμό με καθολικούς πρωτογενείς(αιχμαλώτισης) ανιχνευτές (εικόνα 1.15).



*Εικόνα 1.14* Συστοιχία σφαιριδίων υπερκειμένων. Μικρο-σφαιρίδια εσωτερικά βάφονται με διαφορετικές εντάσεις του κόκκινου και υπερύθρων βαφών για να δημιουργήσουν 500 σετ μικρο-σφαιριδίων με μοναδικές φασματικές ιδιότητες. Τα σύνολα μικροσφαιριδίων συζευγμένα με ανιχνευτές ολιγονουκλεοτιδίων υβριδοποιούνται σε ενισχυμένους στόχους παραγόμενους από το αρχικό δείγμα. Οι υβριδοποιημένοι στόχοι στιγματίζονται με χρήση φθορίζουσών βαφών και το εναίωρημα μικρο-σφαιριδίων αναλύεται με κυτταρομετρία ροής ή "CCD" οπτικοποίηση για την αναγνώριση κάθε σφαιριδίου και τη ποσοτικοποίηση την αντίδραση ανιχνευτή-στόχου στην επιφάνεια του μικρο-σφαιριδίου.



Εικόνα 1.15 Δοκιμές με μικρο-συστοιχίες μικρο-σφαιριδίων. (Α) Στην άμεση υβριδοποίηση, ο “DNA” στόχος πολλαπλασιάζεται και σημαδεύεται με βιοτίνη. Τα πολλαπλασιασμένα προϊόντα μετουσιώνονται, υβριδοποιούνται σε σύνολα εξειδικευμένων ανιχνευτών και σημαδεύονται με φθορίζοντα μόρια στρεπταβιδίνης. (Β) Στον ανταγωνιστικό υβριδισμό, τα σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν τις αλληλουχίες-στόχους ανταγωνίζονται με το “DNA” στόχο στο δείγμα ελέγχου για υβριδοποίηση με ειδικά σύνολα ανιχνευτών. Η συγκέντρωση στο δείγμα “DNA” στόχου είναι αντιστρόφως ανάλογη στο σήμα των μικρο-σφαιριδίων, το οποίο μειώνεται όσο η συγκέντρωση του δείγματος αυξάνεται. (Γ) Οι των ενζυματικών δοκιμών χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των αλληλουχιών στόχου στο δείγμα και ενσωματώνουν συγκεκριμένες αλληλουχίες αιχμαλώτισης. Οι στόχοι υβριδοποιούνται με τα σύνολα μικρο-σφαιριδίων, που φέρουν συμπληρωματικούς αντι-ανιχνευτές, και σημαδεύονται για ανίχνευση.

### 1.2.3.1 Άμεσος υβριδισμός

Ο άμεσος υβριδισμός ενός “DNA” στόχου σημασμένου και πολλαπλασιασμένου με “PCR” σε σύνολα σφαιριδίων που φέρουν ειδικούς ανιχνευτές δέσμησης ολιγονουκλεοτιδίων είναι μια απλή και συχνά χρησιμοποιούμενη χημική δοκιμή και τυπικά χρησιμοποιεί ανιχνευτές περίπου 20 νουκλεοτιδίων σε μήκος. Οι ανιχνευτές είναι συμπληρωματικοί σε αλληλουχία με το σημασμένο κουβάρι προϊόν της “PCR” και το πολυμορφικό νουκλεοτίδιο(για τη διάκριση ενός νουκλεοτιδίου) είναι τοποθετημένο στο κέντρο του ανιχνευτή ή κοντά σε αυτό. Οι “oligo” ανιχνευτές τροποποιούνται με μία 5’-τερματική αμινομάδα

για ομοιοπολική σύζευξη με τη λειτουργική καρβοξυλομάδα στην επιφάνεια του μικροσφαιριδίου και περιέχουν έναν αραιωτή (συνήθως C-12) ανάμεσα στην αμίνη και την αλληλουχία του ανιχνευτή με σκοπό την ελαχιστοποίηση της στερικής παρεμπόδισης του υβριδισμού στην επιφάνεια του σφαιριδίου. Οι εκκινητές “PCR” σχεδιάζονται τυπικά για να ενισχύουν περιοχές 50- έως 300- ζευγών βάσεων στις αλληλουχίες στόχους με έναν εκκινητή από κάθε ζευγάρι βιοτινυλιωμένο στο 5’-άκρο για σήμανση των κλώνων στόχων του αρχικού μορίου. Με χρήση μικρών “DNA” στόχων ελαχιστοποιείται η πιθανότητα η στερική παρεμπόδιση να επηρεάσει την απόδοση του υβριδισμού αρνητικά στην επιφάνεια του σφαιριδίου.

#### 1.2.3.2 Ανταγωνιστικός υβριδισμός

Ο ανταγωνιστικός υβριδισμός είναι παρόμοιος με τον άμεσο υβριδισμό όσον αφορά το σχεδιασμό των ανιχνευτών και των στόχων. Ωστόσο, στην ανταγωνιστική έκδοση αυτής της δοκιμής, μη σημασμένοι δίκλωνοι πολλαπλασιασμένοι με “PCR” στόχοι ανταγωνίζονται με σημασμένους μονόκλωνους ολιγονουκλεοτιδικούς στόχους για ανόπτηση στους πρωτογενείς ανιχνευτές συγκεκριμένης αλληλουχίας στα μικροσφαιρίδια.

#### 1.2.3.3 Ενζυμικές χημικές δοκιμές με καθολικούς πρωτογενείς ανιχνευτές

Μία άλλη προσέγγιση είναι να χρησιμοποιηθεί μια ενζυματική αντίδραση συγκεκριμένης αλληλουχίας σε διάλυμα για αναγνώριση του “DNA” στόχου, ακολουθούμενη από αιχμαλώτιση από μία καθολική αλληλουχία ανιχνευτή πάνω στην επιφάνεια του σφαιριδίου για ανίχνευση. Αυτή η έκδοση περιλαμβάνει την ενσωμάτωση μιας αλληλουχίας αιχμαλώτισης κατά τη διάρκεια του ενζυματικού σταδίου η οποία επιτρέπει την υβριδοποίηση σε μία συμπληρωματική αλληλουχία προσκολλημένη στην επιφάνεια του σφαιριδίου. Συχνά χρησιμοποιούμενες ενζυματικές μέθοδοι για καθορισμό αλληλουχιών βασίζονται στη διακριτική ικανότητα των “DNA” πολυμερασών και των “DNA” λιγασών και περιλαμβάνουν επέκταση εκκινητή ειδική για αλληλόμορφο ή για στόχο, σύνδεση ολιγονουκλεοτιδίου, μιας βάσης επέκταση αλυσίδας και εξειδικευμένου στόχου “PCR”. Αυτές οι χημείες χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με αντιδραστήρια των σφαιριδίων προσυζευγμένα με καθολικές αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων αιχμαλώτισης οι οποίες έχουν επιλεγεί με πανομοιότυπες παραμέτρους υβριδοποίησης με ελάχιστη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Αυτή η προσέγγιση πλεονεκτεί λόγω της ταχύτητας του υβριδισμού στη φάση διαλύματος και επιτρέπει τα σύνολα καθολικών σφαιρών να μπορούν να χρησιμοποιούνται σε πολλές διαφορετικές δοκιμές όπου νέες αλληλουχίες μπορούν να στοχευθούν με προσθήκη της κατάλληλης αλληλουχίας αιχμαλώτισης στο εξειδικευμένου στόχου ολιγονουκλεοτίδιο που χρησιμοποιείται στο ενζυματικό στάδιο. (5)

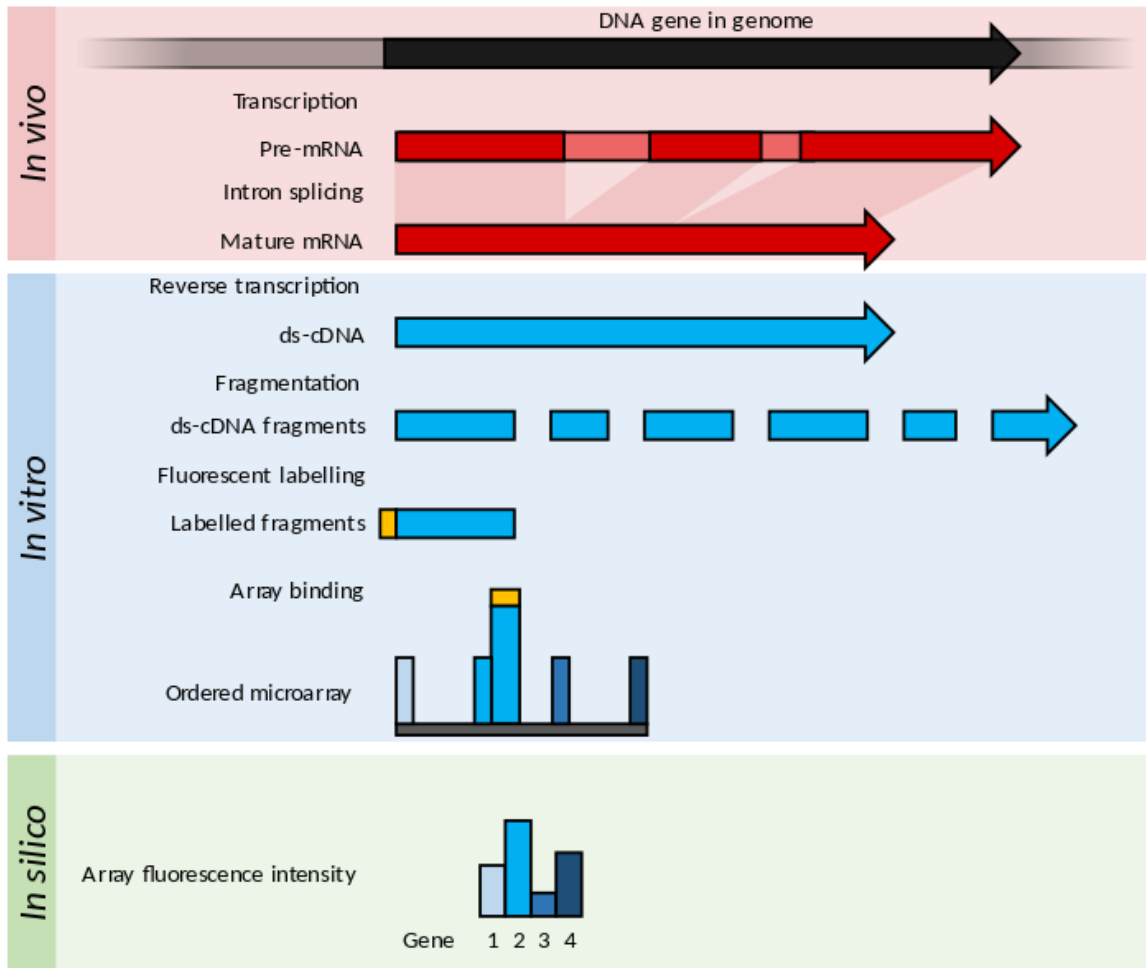
### 1.3 Εφαρμογή μικρο-συστοιχιών

Υπάρχουν πολλά είδη μικρο-συστοιχιών και πολλά άλλα βρίσκονται υπό ανάπτυξη σήμερα. Ανάμεσά τους:

- Μικρο-συστοιχίες “DNA”
- “MMChips”
- Μικρο-συστοιχίες πρωτεϊνών
- Μικρο-συστοιχίες πεπτιδίων
- Μικρο-συστοιχίες ιστών
- Κυτταρικές μικρο-συστοιχίες
- Μικρο-συστοιχίες χημικών ενώσεων
- Μικρο-συστοιχίες αντισωμάτων
- Μικρο-συστοιχίες φαινοτύπου
- Μικρο-συστοιχίες πρωτεϊνών αντίστροφης φάσης

#### 1.3.1 Μικρο-συστοιχίες DNA

Μία μικρο-συστοιχία “DNA” (επίσης γνωστή ως “DNA chip” ή “biochip”) είναι μία συλλογή από μικροσκοπικές κηλίδες “DNA” ακινητοποιημένες πάνω σε μια στερεή επιφάνεια. Οι επιστήμονες χρησιμοποιούν τις μικρο-συστοιχίες DNA για τη ταυτόχρονη μέτρηση της έκφρασης των επιπέδων μεγάλου αριθμού γονιδίων ή την καταγραφή πολλαπλών περιοχών του γονιδιώματος. Κάθε κηλίδα DNA περιέχει “picomoles” ( $10^{-12}$  moles) μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, γνωστής ανιχνευτή. Αυτή μπορεί να είναι ένα μικρό κομμάτι γονιδίου ή άλλου στοιχείου DNA που χρησιμοποιείται για τον υβριδισμό δείγματος cDNA ή cRNA κάτω από αυστηρές συνθήκες. Η υβριδοποίηση ανιχνευτή στόχου ανιχνεύεται συχνά και ποσοτικοποιείται μέσω εντοπισμού από σημασμένους -με φθορίζοντα ή άλλα μόρια- στόχους για τον καθορισμό της σχετικής αφθονίας αλληλουχιών νουκλεϊκού οξέος στο στόχο. Οι πρώτες συστοιχίες νουκλεϊκών οξέων ήταν μακρο-συστοιχίες περίπου 9 cm x 12 cm και η πρώτη υπολογιστική ανάλυση εικόνας είχε δημοσιευτεί το 1981.

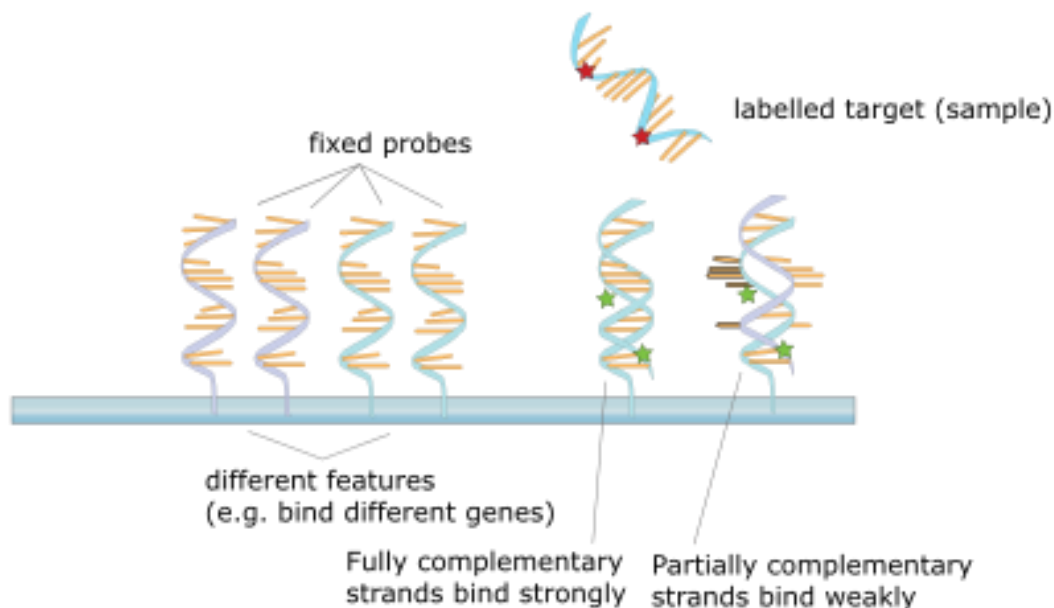


Εικόνα 1.16 Σύνοψη “DNA” μικρο-συστοιχιών. Στο εσωτερικό των οργανισμών, τα γονίδια μεταγράφονται και συνδέονται (σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς) για να παράγουν ώριμα αντίγραφα “mRNA” (κόκκινο). Το mRNA δεσμεύεται από τον οργανισμό και η αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιείται για την αντιγραφή του mRNA σε σταθερό “ds-cDNA” (μπλε). Στις μικρο-συστοιχίες, το “ds-cDNA” κατακερματισμένο και επισημαίνεται με φθορισμό (πορτοκαλί). Τα σημασμένα θραύσματα δένουν σε μία διατεταγμένη συστοιχία από συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια και η μέτρηση της φθορίζουσας έντασης κατά μήκος της συστοιχίας υποδηλώνει την από προκαθορισμένα σύνολα αλληλουχιών.

### 1.3.1.1 Αρχή λειτουργίας

Η αρχή λειτουργίας πίσω από τις μικρο-συστοιχίες “DNA” είναι ο υβριδισμός μεταξύ δύο κλώνων DNA, η ιδιότητα δύο συμπληρωματικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων να συζεύγονται ειδικά η μία με την άλλη σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου μεταξύ νουκλεοτιδικών βάσεων. Ένας μεγάλος αριθμός συμπληρωματικών βάσεων σε μία αλληλουχία νουκλεοτιδίων σημαίνει ισχυρότερους μη ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των δύο κλώνων. Μετά την πλύση όλων των μη προσδεδωμένων αλληλουχιών, μόνο οι ισχυρά δεμένοι κλώνοι θα παραμείνουν υβριδοποιημένοι. Φθορίζουσες αλληλουχίες στόχοι που δένουν σε μία αλληλουχία ανιχνευτή παράγουν σήμα το οποίο εξαρτάται από τις συνθήκες υβριδοποίησης (όπως η θερμοκρασία). Η ισχύς του σήματος αυτού ένα σημείο της συστοιχίας εξαρτάται από τη ποσότητα δείγματος στόχου προσδεδωμένης στους παρόντες στο σημείο ανιχνευτές. Οι μικρο-συστοιχίες

χρησιμοποιούν σχετική ποσοτικοποίηση στην οποία η ένταση ενός σημείου συγκρίνεται με την ένταση του ίδιου σημείου σε διαφορετικές συνθήκες και η ταυτότητα του σημείου είναι γνωστή από τη θέση του.



Εικόνα 1.17 Υβριδισμός του στόχου στον ανιχνευτή.

### 1.3.1.2 Εφαρμογές

Οι μικρο-συστοιχίες DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση DNA ή RNA. Η διαδικασία μέτρησης της έκφρασης των γονιδίων μέσω cDNA ονομάζεται ανάλυση έκφρασης.

Εφαρμογές περιλαμβάνουν:

<b>Πίνακας 1: Εφαρμογές μικρο-συστοιχιών DNA</b>	
<b>Εφαρμογή ή τεχνολογία</b>	<b>Σύνοψη</b>
Ανάλυση έκφρασης γονιδίων	Σε ένα πείραμα mRNA ή έκφρασης γονιδίων τα επίπεδα έκφρασης χιλιάδων γονιδίων παρακολουθούνται ταυτόχρονα με σκοπό τη μελέτη των επιδράσεων συγκεκριμένων θεραπειών, ασθενειών και άλλων σταδίων στην έκφραση των γονιδίων. Για παράδειγμα, η ανάπτυξη του προφίλ της έκφρασης γονιδίων βάση μικρο-συστοιχιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση γονιδίων των οποίων η έκφραση αλλάζει σαν αντίδραση σε παθογόνους ή άλλους οργανισμούς συγκρίνοντας την έκφραση γονιδίων σε ασθενή και υγιή κύτταρα και ιστούς.

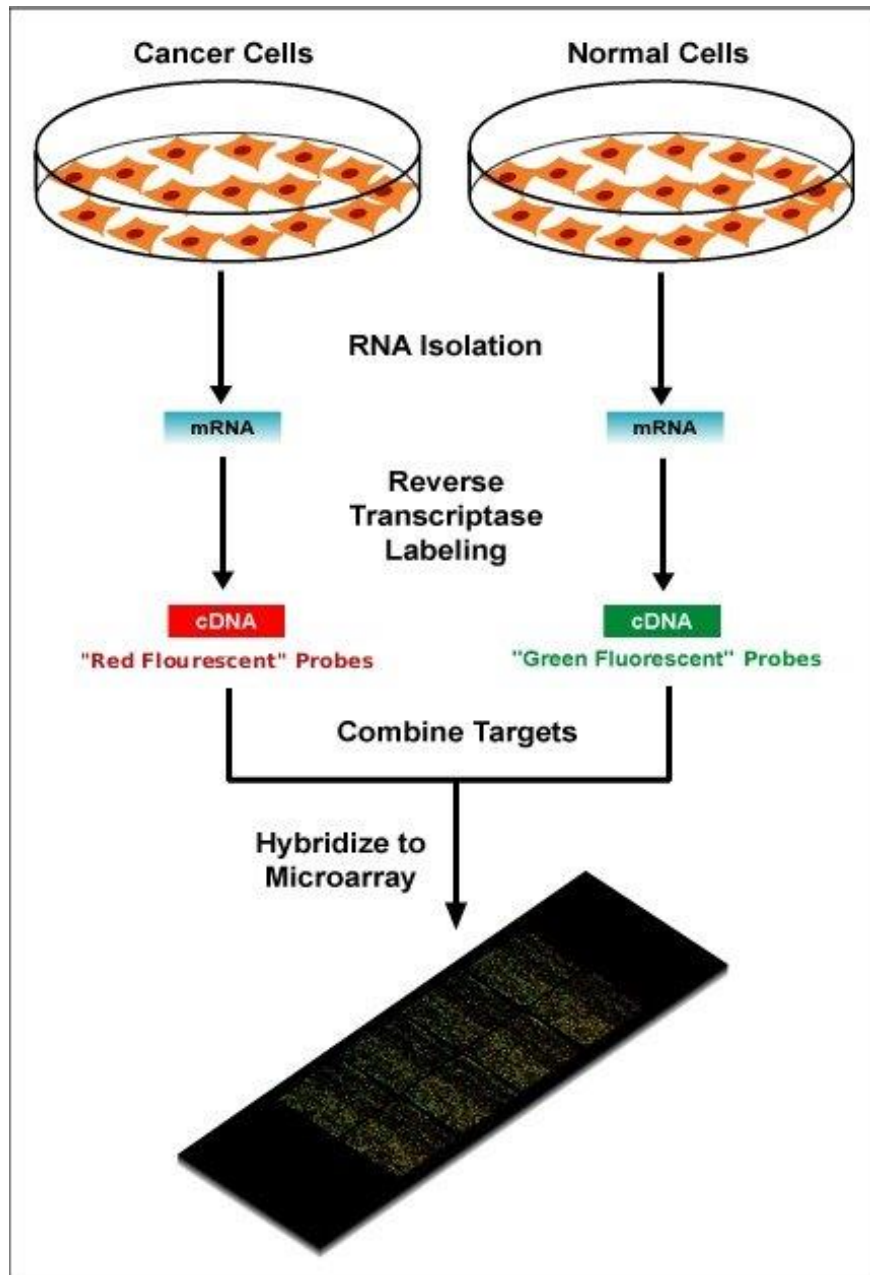


Συγκριτικός γονιδιακός υβριδισμός	Αξιολόγηση του γονιδιακού περιεχομένου σε διαφορετικά κύτταρα και στενά συγγενείς οργανισμούς.
“GeneID”	Μικρές μικρο-συστοιχίες για τον έλεγχο της ταυτότητας των οργανισμών σε τρόφιμα και ζωοτροφές, τα μυκοπλάσματα σε κυτταροκαλλιέργειες ή τους παθογόνους μικροοργανισμούς για την ανίχνευση ασθενειών, κυρίως συνδυάζοντας την “PCR” με την τεχνολογία μικρο-συστοιχιών.
“Chromatin immunoprecipitation on Chip”	Αλληλουχίες DNA συνδεδεμένες σε μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη μπορούν να απομονωθούν μέσω ανοσοκαταβύθισης αυτής της πρωτεΐνης, αυτά τα κομμάτια μπορούν στη συνέχεια να υβριδοποιηθούν σε μία μικρο-συστοιχία επιτρέποντας τον προσδιορισμό της πληρότητας πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο γονιδίωμα. Παράδειγμα πρωτεΐνης που ανοσοκαταβυθίζεται είναι οι τροποποιήσεις ιστονών (H3K27ME3, H3K4ME2, H3K9ME3, etc.), η πρωτεΐνη ομάδας Polycomb (PRC2:Suz12, PRC1:YY1) και πρωτεΐνη ομάδας trithorax (Ash1) για μελέτη του επιγενετικού προφίλ ή της RNA πολυμεράσης II για τη μελέτη του μεταγραφικού προφίλ.
“DamID”	Ανάλογα προς το “ChIP”, γονιδιακές περιοχές συνδεδεμένες με μία πρωτεΐνη ενδιαφέροντος μπορούν να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές σε μικρο-συστοιχία για τον καθορισμό της πληρότητας θέσεων δέσμησης. Σε αντίθεση με το “ChIP”, το “DamID” δεν απαιτεί αντισώματα αλλά κάνει χρήση της μεθυλίωσης αδεϊνίνης κοντά στα σημεία πρόσδεσης ώστε επιλεκτικά να ενισχύσει αυτές τις περιοχές, που εισάγονται εκφράζοντας μικρές ποσότητες πρωτεΐνης ενδιαφέροντος συγχωνευμένης με βακτηριακή DNA αδεϊνίνη μεθυλοτρανσφεράση.
“SNP detection”	Προσδιορισμός πολυμορφισμού ενός νουκλεοτιδίου μεταξύ των αλληλόμορφων εντός ή μεταξύ πληθυσμών. Ορισμένες εφαρμογές μικροσυστοιχιών χρησιμοποιούν ανίχνευση SNP, συμπεριλαμβανομένου του προσδιορισμού γονοτύπων, ιατροδικαστικής ανάλυσης, μέτρησης της προδιάθεσης σε ασθένεια, ταυτοποίησης υποψήφιων φαρμάκων, αξιολόγησης μεταλλάξεων βλαστικών κυττάρων σε άτομα ή σωματικών μεταλλάξεων σε καρκίνους, αξιολόγησης απώλειας ετεροζυγωτικότητας ή ανάλυσης γενετικών δεσμών.
“Alternative splicing detection”	Ένας σχεδιασμός συστοιχίας συνδέσμων εξωνών χρησιμοποιεί ανιχνευτές ειδικούς για τις αναμενόμενες ή πιθανές θέσεις ματίσματος των προβλεπόμενων εξονίων για ένα γονίδιο. Έχει ενδιαμέση πυκνότητα ή κάλυψη σε μια συνηθισμένη συστοιχία έκφρασης γονιδίων (με 1-3 ανιχνευτές ανά γονίδιο) και μια σειρά γονιδιωματικών πλακιδίων (με εκατοντάδες ή χιλιάδες ανιχνευτές ανά γονίδιο). Χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η έκφραση εναλλακτικών μορφών ματίσματος ενός γονιδίου. Οι συστοιχίες εξονίων έχουν διαφορετικό σχεδιασμό, χρησιμοποιώντας ανιχνευτές σχεδιασμένους να ανιχνεύουν κάθε μεμονωμένο εξόνιο για γνωστά ή προβλεπόμενα γονίδια και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση διαφορετικών ισομορφών ματίσματος.
“Fusion genes microarray”	Μια μικρο-συστοιχία γονιδίου σύντηξης μπορεί να ανιχνεύει μεταγραφές σύντηξης, π.χ. από δείγματα καρκίνου. Η αρχή πίσω από αυτό βασίζεται στις εναλλακτικές μικρο-συστοιχίες. Η στρατηγική σχεδίασης “oligo”

	επιτρέπει συνδυασμένες μετρήσεις χημικών συνδέσεων μεταγραφής με εξωγενείς μετρήσεις μεμονωμένων εταίρων σύντηξης.
“Tiling array”	Οι συστοιχίες πλακιδίων γονιδιώματος αποτελούνται από αλληλεπικαλυπτόμενους ανιχνευτές σχεδιασμένους για να αντιπροσωπεύουν πυκνά μια περιοχή γονιδιώματος ενδιαφέροντος, μερικές φορές τόσο μεγάλη όσο ένα ολόκληρο ανθρώπινο χρωμόσωμα. Σκοπός είναι η εμπειρική ανίχνευση έκφρασης μεταγραφών ή εναλλακτικών μορφών, οι οποίες μπορεί να μην είχαν προηγουμένως γίνει γνωστές ή προβλεφθεί.
“Double-stranded B-DNA microarrays”	Οι μικροσυστοιχίες διπλής δεξιόστροφης έλικας “B-DNA” μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να χαρακτηρίσουν νέα φάρμακα και βιολογικά προϊόντα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να δεσμευτούν συγκεκριμένες περιοχές ακινητοποιημένου, άθικτου, δίκλωνου “DNA”. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναστολή της γονιδιακής έκφρασης. Επιτρέπουν επίσης τον χαρακτηρισμό της δομής τους υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.
“Double-Stranded Z-DNA microarrays”	Μικρο-συστοιχίες αριστερόστροφου δίκλωνου “Z-DNA” μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση κοντών αλληλουχιών εναλλακτικών “Z-DNA” δομών εβρισκομένων σε μεγαλύτερες περιοχές δεξιόστροφων “B-DNA” γονιδίων (π.χ., ενίσχυση μεταγραφής, ανασυνδυασμός, επιμέλεια RNA). Οι μικροσυστοιχίες επιτρέπουν επίσης τον χαρακτηρισμό της δομής τους υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.
“Multi-stranded DNA microarrays (triplex-DNA microarrays and quadruplex-DNA microarrays)”	Μικρο-συστοιχίες πολυκλωνικών DNA και RNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση νέων φαρμάκων που δένουν σε πολυκλωνικές αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων και βιολογικών προϊόντων που έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση. Αυτές οι μικρο-συστοιχίες επιτρέπουν επίσης τον χαρακτηρισμό της δομής τους υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

### 1.3.1.3 Ανίχνευση δύο καναλιών-Ανίχνευση ενός καναλιού

Οι διχρωματικές ή δικάνελες μικρο-συστοιχίες υβριδοποιούνται τυπικά με cDNA τα οποία έχουν προετοιμαστεί από δύο δείγματα με σκοπό τη σύγκρισή τους (π.χ. ασθενής ιστός με υγιή ιστό) και τα οποία είναι σημασμένα με δύο διαφορετικά φθορίζοντα μόρια. Οι φθορίζουσες βαφές συχνά χρησιμοποιούμενες για σήμανση cDNA περιλαμβάνουν Cy3, το οποίο εκπέμπει φθορίζουσα ακτινοβολία σε μήκος κύματος 570 nm και Cy5 με μήκος κύματος φθορίζουσας εκπομπής στα 670 nm. Τα δύο δείγματα cDNA σημασμένα με Cy αναμειγνύονται και υβριδοποιούνται σε μία μικρο-συστοιχία η οποία στη συνέχεια σκανάρεται με ειδικό σκάνερ για να οπτικοποιηθεί ο φθορισμός των δύο φθοροφόρων μετά από διέγερση με δέσμη λέιζερ καθορισμένου μήκους κύματος. Οι σχετικές εντάσεις κάθε φθοροφόρου μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ανάλυση βάσει αναλογίας για την αναγνώριση υπερεκφρασμένων και υποεκφρασμένων γονιδίων.



Εικόνα 1.18 Διάγραμμα τυπικού πειράματος με δίχρωματική μικρο-συστοιχία.

Οι μικρο-συστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων συχνά κουβαλούν ανιχνευτές ελέγχου σχεδιασμένους να υβριδοποιούνται με RNA. Ο βαθμός υβριδοποίησης μεταξύ του RNA και των ανιχνευτών ελέγχου χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση των μετρήσεων υβριδοποίησης για τους ανιχνευτές στόχους. Μολονότι σε σπάνιες περιπτώσεις μπορούν να προσδιοριστούν τα απόλυτα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στη δίχρωμη συστοιχία, οι σχετικές διαφορές στην έκφραση μεταξύ διαφορετικών κηλίδων μέσα σε ένα δείγμα και μεταξύ δειγμάτων είναι η προτιμότερη μέθοδος ανάλυσης δεδομένων από το δίχρωμο σύστημα. Παραδείγματα παρόχων τέτοιων μικρο-συστοιχιών περιλαμβάνουν την "Agilent" με

την πλατφόρμα “Dual-Mode”, την “Erppendorf” με την πλατφόρμα “DualChip” για τη χρωματομετρική σήμανση “Silverquant” και την “TeleChem International” με την “Arrayit”.

Στις μονοχρωματικές ή μονοκάναλες μικρο-συστοιχίες, οι συστοιχίες παρέχουν δεδομένα έντασης για κάθε ανιχνευτή ή σύνολο ανιχνευτών οι οποίοι υποδεικνύουν ένα σχετικό επίπεδο υβριδισμού με τον σημασμένο στόχο. Ωστόσο, δεν υποδεικνύουν στη πραγματικότητα τα επίπεδα αφθονίας ενός γονιδίου αλλά την σχετική αφθονία μετά από σύγκριση με άλλα δείγματα ή συνθήκες που έχουν προκύψει στο ίδιο πείραμα. Η σύγκριση δύο συνθηκών για το ίδιο γονίδιο απαιτεί δύο ξεχωριστούς μονής βαφής υβριδισμούς. Πολλά δημοφιλή μονοχρωματικά συστήματα είναι τα "Gene Chip" της "Affymetrix", το "Bead Chip" της "Illumina", οι συστοιχίες "Agilent" με ένα κανάλι, οι συστοιχίες "CodeLink" της "Applied Microarrays" και την "Erppendorf" με τα "DualChip & Silverquant". Η ισχύς του συστήματος μονής χρωστικής έγκειται στο γεγονός ότι ένα παρεκλίνων δείγμα δεν μπορεί να επηρεάσει τα ακατέργαστα δεδομένα που προέρχονται από άλλα δείγματα, επειδή κάθε τσιπ συστοιχίας εκτίθεται σε ένα μόνο δείγμα (σε αντίθεση με ένα σύστημα δύο χρωμάτων στο οποίο ένα μόνο χαμηλής ποιότητας δείγμα μπορεί να επηρεάσει δραστικά την ακρίβεια των δεδομένων, ακόμη και αν το άλλο δείγμα ήταν υψηλής ποιότητας). Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι ότι τα δεδομένα συγκρίνονται ευκολότερα με συστοιχίες από διαφορετικά πειράματα, εφόσον έχουν ληφθεί υπόψη τα αποτελέσματα των διαφόρων παρτίδων.

Η μικρο-συστοιχία ενός καναλιού μπορεί να είναι η μόνη επιλογή σε ορισμένες περιπτώσεις. Ας υποθέσουμε ότι “i” δείγματα πρέπει να συγκριθούν: τότε ο αριθμός των πειραμάτων που απαιτούνται με τη χρήση των συστοιχιών δύο καναλιών γίνεται γρήγορα ανέφικτος, εκτός και αν χρησιμοποιηθεί ένα δείγμα σαν αναφορά. (6)

<b>Πίνακας 2</b>			
<b>αριθμός δειγμάτων</b>	<b>μικρο-συστοιχία ενός καναλιού</b>	<b>μικρο-συστοιχία δύο καναλιών</b>	<b>μικρο-συστοιχία δύο καναλιών (με δείγμα αναφοράς)</b>
1	1	1	1
2	2	1	1
3	3	3	2
4	4	6	3
i	i	$i*(i-1)/2$	i-1

### 1.3.2 Μικρο-συστοιχίες πρωτεϊνών

Μία πρωτεϊνική μικρο-συστοιχία (ή πρωτεϊνικό τσιπ) είναι μια υψηλής απόδοσης μέθοδος εντοπισμού των αλληλεπιδράσεων και της δραστηριότητας των πρωτεϊνών και μια μέθοδος καθορισμού της λειτουργίας σε μεγάλη κλίμακα. Το κύριο πλεονέκτημα αυτών των συστοιχιών βρίσκεται στο ότι μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών μπορεί να ανιχνευτεί παράλληλα. Το τσιπ αποτελείται από μία επιφάνεια στήριξης όπως μια γυάλινη αντικειμενοφόρος πλάκα, μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, σφαιρίδια ή πλάκα “micrototre”, στην οποία μια συστοιχία πρωτογενών πρωτεϊνών (αιχμαλώτισης) προσδένεται. Μόρια ανιχνευτή, τυπικά σημασμένα με φθορίζουσες βαφές προστίθενται στη συστοιχία. Κάθε αντίδραση ανάμεσα στον ανιχνευτή και την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη εκπέμπει φθορίζον σήμα το οποίο διαβάζεται από κατάλληλο σκάνερ. Οι μικρο-συστοιχίες πρωτεϊνών είναι ταχείες, αυτοματοποιημένες,

οικονομικές και εξαιρετικά ευαίσθητες, καταναλώνοντας μικρές ποσότητες δείγματος και αντιδραστήριων.

Οι μικρο-συστοιχίες πρωτεϊνών αναπτύχθηκαν εξαιτίας των περιορισμών στη χρήση μικρο-συστοιχιών DNA για τον καθορισμό των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών στην πρωτεομική. Η ποσότητα του mRNA στο κύτταρο συχνά δεν αντικατοπτρίζει τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών. Εφόσον συνήθως η πρωτεΐνη είναι αυτή που έχει τον λειτουργικό ρόλο στην συμπεριφορά του κυττάρου παρά το mRNA, μια νέα προσέγγιση ήταν απαραίτητη. Επιπρόσθετα, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες είναι συχνά κρίσιμες για τον καθορισμό της λειτουργίας των πρωτεϊνών, δεν είναι ορατές στις μικρο-συστοιχίες DNA. Οι μικρο-συστοιχίες πρωτεϊνών αντικαθιστούν τις παραδοσιακές τεχνικές πρωτεομικής όπως η δισδιάστατη τζελ ηλεκτροφόρηση ή η χρωματογραφία, οι οποίες ήταν χρονοβόρες, έντονες και ακατάλληλες για την ανάλυση πρωτεϊνών χαμηλής περιεκτικότητας.

#### 1.3.2.1 Κατηγορίες μικρο-συστοιχιών πρωτεϊνών

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες πρωτεϊνικών μικρο-συστοιχιών οι οποίες χρησιμοποιούνται σήμερα για τη μελέτη της βιοχημικής δραστηριότητας των πρωτεϊνών.

##### 1.3.2.1.1 Αναλυτικές πρωτεϊνικές μικρο-συστοιχίες

Το πιο αντιπροσωπευτικό δείγμα αναλυτικής πρωτεϊνικής μικρο-συστοιχίας είναι οι συστοιχίες αντισωμάτων. Το πρώτο μοντέλο που παρουσίασε την εφαρμογή των συστοιχιών αντισωμάτων ήταν η χημική δοκιμή με σήμανση αναλύτη. Σε αυτή τη δοκιμή, οι πρωτεΐνες εντοπίζονται μετά την αιχμαλώτιση από αντίσωμα με χρήση άμεσης πρωτεϊνικής σήμανσης. Με χρήση αυτής της δοκιμής ο Knezevic το 2001 βρήκε επιτυχώς μεταβολές στην έκφραση των πρωτεϊνών στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Πολλαπλές διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών θα μπορούσαν να ανιχνευτούν σε επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα με χρήση αυτής της συστοιχίας αντισωμάτων. Ωστόσο, πρέπει να ληφθούν υπόψιν κάποιοι περιορισμοί διότι αυτή η μέθοδος στερείται ειδικότητας στη σήμανση της πρωτεΐνης στόχου και έχει μικρή ευαισθησία για μικρής περιεκτικότητας πρωτεΐνες. Επίσης, η στοχευμένη σήμανση πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή του επιτόπου λόγω χημικών αντιδράσεων. Ένα άλλο μοντέλο συστοιχίας αντισωμάτων παρέχει υψηλότερη ευαισθησία χρησιμοποιώντας τη μορφή χημικής δοκιμής “sandwich”. Αυτή η μορφή χρησιμοποιεί δύο διαφορετικά αντισώματα για να εντοπίσει την πρωτεΐνη στόχο. Ένα αντίσωμα γνωστό ως πρωτογενές (αιχμαλώτισης) το οποίο ακινητοποιεί την πρωτεΐνη, ενώ το δεύτερο γνωστό ως δευτερογενές (εντοπισμού) παράγει σήμα για την ανίχνευσή της. Η χρήση δύο αντισωμάτων αυξάνει σημαντικά την εξειδίκευση και την ευαισθησία της δοκιμής “sandwich” ακόμα και σε επίπεδα ποσοτήτων femtomoles. Ο Gonzalez το 2011 ανέφερε την εφαρμογή του “sandwich” για να διακρίνει δύο όμοια δείγματα: πλάσμα αίματος και ορό αίματος. Ήταν σε θέση να παρουσιάσει υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία ανίχνευσης με χρήση λιγότερου του 1 μl δείγματος. Αυτές οι δοκιμές προσφέρουν μια πολυπλεκτική(multiplex) μορφή της κλασσικής ELISA, αλλά μπορούν να εντοπίσουν ταυτόχρονα δεκάδες κι όχι εκατοντάδες αναλυτών λόγω του ότι μπορεί να προκύψει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των αντισωμάτων. Τα αντισώματα είναι τα πιο δημοφιλή αντιδραστήρια

αιχμαλώτισης πρωτεϊνών, αν και η συγγένειά τους και/ή η εξειδίκευσή τους μπορεί να κυμαίνεται δραματικά. Για παράδειγμα, πολλά αντισώματα μπορεί να αντιδράσουν με πρωτεΐνες άλλες από αυτές που προβλέπονταν να είναι ο στόχος τους σε δοκιμές με πρωτεϊνικές μικρο-συστοιχίες, ειδικά όταν διενεργείται η ανίχνευση πολλαπλών αναλυτών. Η ανάγκη για υψηλής εξειδίκευσης αντισώματα έχει γίνει μια μεγάλη πρόκληση στις αναλυτικές πρωτεϊνικές μικρο-συστοιχίες επειδή μη εξειδικευμένη σύνδεση θα οδηγήσει σε μεγάλους αριθμούς λανθασμένων θετικών αποτελεσμάτων. Μια άλλη πρόκληση έρχεται από την παραγωγή μεγάλου αριθμού αντισωμάτων με μια μέθοδο υψηλής απόδοσης. Τα ανασυνδυασμένα αντισώματα έχουν γίνει εξαιρετικά υποσχόμενα μέσα για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος. Ωστόσο δεν είναι ακόμα έτοιμα για μέγιστη επίδοση.

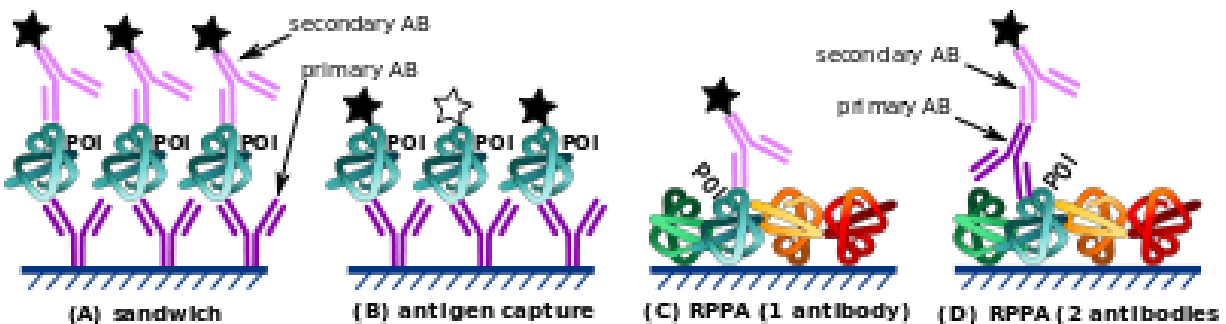
#### 1.3.2.1.2 Λειτουργικές μικρο-συστοιχίες πρωτεϊνών

Οι λειτουργικές μικρο-συστοιχίες πρωτεϊνών είναι επίσης γνωστές και ως συστοιχίες πρωτεΐνης στόχου. Στην μετα-γονιδιωματική εποχή, η δυνατότητα χαρακτηρισμού την λειτουργικότητας μιας πρωτεΐνης σε επίπεδο πρωτεόματος είναι επιθυμητή από τη σύγχρονη πρωτεομική και τις μελέτες συστημικής βιολογίας. Επειδή οι λειτουργικές μικρο-συστοιχίες πρωτεϊνών κατασκευάζονται χρησιμοποιώντας μεμονωμένα καθαρισμένες πρωτεΐνες, δίνουν τη δυνατότητα για μελέτη διαφόρων βιοχημικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών, όπως δραστηριότητες σύζευξης, συμπεριλαμβανομένων των συζεύξεων πρωτεΐνη-πρωτεΐνη, πρωτεΐνη-DNA, πρωτεΐνη-λιπίδιο, πρωτεΐνη-φάρμακο και πρωτεΐνη-πεπτιδίο, και αλληλεπιδράσεις ενζύμων-υποστρώματος μέσω διαφόρων τύπων χημικών αντιδράσεων. Η πρώτη χρήση λειτουργικών πρωτεϊνικών μικρο-συστοιχιών παρουσιάστηκε από το Zhu το 2001 με σκοπό τον καθορισμό της εξειδίκευσης του υποστρώματος σε κινάσες πρωτεϊνών σε ζυμομύκητες. Από τότε, οι αναφορές εφαρμογών λειτουργικών μικρο-συστοιχιών στη βασική έρευνα, όπως επίσης σε κλινικές εφαρμογές, αυξάνονται ραγδαία. Μεγάλη εξέλιξη στην εναπόθεση ολόκληρου του πρωτεόματος ορισμένων οργανισμών πάνω σε συστοιχίες επέτρεψε πολλές σημαντικές βιολογικές ανακαλύψεις. Περαιτέρω, μικρο-συστοιχίες πρωτεϊνών έδωσαν τη δυνατότητα μελέτης πολλών μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων σε ευρεία κλίμακα, πράγμα που ήταν κρίσιμο για την κατανόηση της κυτταρικής σύνθεσης των πρωτεϊνών και της λειτουργίας τους.

#### 1.3.2.1.3 Μικρο-συστοιχίες πρωτεϊνών αντίστροφης φάσης

Εφαρμόζοντας την αντίστροφη μορφή των κλασικών πρωτεϊνικών μικρο-συστοιχιών, οι μικρο-συστοιχίες αντίστροφης φάσης επεκτείνουν τις εφαρμογές αυτής της τεχνολογίας. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την ανάλυση πολλών δειγμάτων τα οποία προσλαμβάνονται σε διαφορετικές καταστάσεις με άμεση εκτύπωση(κηλίδωση) ιστού, κυτταρικής λύσης ή ακόμα και μερών κυτταρικής λύσης πάνω σε γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες. Πολλοί διαφορετικοί ανιχνευτές μπορούν να ελεγχθούν για την εξειδικευμένη αναγνώριση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε δείγματα λύσης κυττάρων. Αυτό ο τύπος μικρο-συστοιχίας εισήχθη από τον Pawelcz και τους συνεργάτες του με σκοπό την παρακολούθηση ιστολογικών αλλαγών σε ασθενής με καρκίνο του προστάτη. Χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο ανίχνευσαν με επιτυχία μικροσκοπικά στάδια μετάβασης της πρωτεΐνης ελέγχου προεπιβίωσης σε τρία διαφορετικά στάδια του καρκίνου: φυσιολογικό επιθήλιο του προστάτη, ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία

προστάτη και διηθητικό καρκίνο του προστάτη. Ο υψηλός βαθμός ευαισθησίας, ακρίβειας και γραμμικότητας που επιτυγχάνονται με μικρο-συστοιχίες πρωτεϊνών αντίστροφης φάσης επέτρεψε αυτή τη μέθοδο να ποσοτικοποιήσει την κατάσταση φωσφορυλίωσης ορισμένων πρωτεϊνών (όπως Akt και ERK) σε αυτά τα δείγματα. Η φωσφορυλίωση συσχετίστηκε στατιστικά με την πρόοδο του καρκίνου του προστάτη. Χρησιμοποιώντας αυτή την εξελιγμένη τεχνολογία, ο Ciaccio το 2010 έφτιαξε το προφίλ της δυναμικής της σηματοδότησης του υποδοχέα EGF χρησιμοποιώντας “micro-western” μικρο-συστοιχίες, οι οποίες συνδυάζουν “western blotting” και μικρο-συστοιχίες αντίστροφης φάσης ώστε να παράγουν καλύτερη ευαισθησία μέσω διαχωρισμού του συνόλου των συστατικών του δείγματος λύσης. Αυτή η μέθοδος του επέτρεψε να μετρήσει με ακρίβεια τα 91 φωσφορώδη των 67 πρωτεϊνών σε 6 διαφορετικά χρονικά σημεία με πέντε συγκεντρώσεις EGF σε κύτταρα ανθρώπινου καρκινώματος A431 για να αναλύσει το δυναμικό προφίλ των συγκεντρώσεων του υποδοχέα EGF. Ένα σημαντικό μειονέκτημα αυτής της προσέγγισης, ωστόσο, είναι ότι εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα και την εξειδίκευση των αντισωμάτων που παράγονται στο εμπόριο. Λόγω αυτής της δυσχέρειας, έχει περιορισμένες εφαρμογές.



Εικόνα 1.19 Τύποι πρωτεϊνικών μικρο-συστοιχιών.

### 1.3.2.2 Ανίχνευση

Το σύστημα ανίχνευσης για μικρο-συστοιχίες πρωτεϊνών είναι μια άλλη σημαντική παράμετρος σχεδιασμού. Υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι συστήματος ανίχνευσης: με σήμανση και χωρίς. Στις ανιχνεύσεις με σήμανση, έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι αντιδραστηρίων σήμανσης, όπως χρωστικές φθορισμού, ένζυμα, ραδιοϊσότοπα και λιποσώματα. Οι χρωστικές φθορισμού με στενό φάσμα διέγερσης και εκπομπής, όπως το Cy3, Cy5 και τα ισοδύναμα, είναι τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα, επειδή είναι βολικά και παρέχουν ευρεία γραμμική περιοχή ανίχνευσης σε σύγκριση με άλλα συστήματα σήμανσης. Επιπλέον, αυτές οι φθορίζουσες βαφές παρέχουν ένα πολύχρωμο σύστημα ανίχνευσης, το οποίο επιτρέπει τον σχεδιασμό πολλαπλής ανάλυσης. Αξιοποιώντας το πλεονέκτημα της ενίσχυσης σήματος, οι ενζυματικές μέθοδοι προσφέρουν σημαντική βελτίωση στην ευαισθησία ανίχνευσης σήματος. Το πιο δημοφιλές ένζυμο είναι η υπεροξειδάση χρένου. Η ενίσχυση του στρεφόμενου κύκλου (RCA) και η ενίσχυση του σήματος τυραμιδίου (TSA) έχουν επίσης αναπτυχθεί για την ανίχνευση πρωτεϊνών χαμηλές σε περιεκτικότητα. Για μερικές δοκιμές, όπως ενζυματικές αντιδράσεις, τα ραδιοϊσότοπα είναι τα πιο απλά για ανίχνευση. Ωστόσο, άλλες μέθοδοι επισήμανσης είναι προτιμότερες από την επισήμανση ραδιοϊσοτόπων λόγω ζητημάτων ασφάλειας.

Επειδή οι διαδικασίες σήμανσης μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι χωρίς ετικέτα. Η ανίχνευση χωρίς σήμανση παρέχει πρόσθετα πλεονεκτήματα παρέχοντας μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο για την παρακολούθηση της δυναμικής των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Η φασματοσκοπία συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR), η οπτική ελλειψομετρία απεικόνισης (OE) και η φασματοσκοπία ανακλασματομετρικής παρεμβολής (RIFS) χρησιμοποιούν τη μέτρηση της οπτικής διηλεκτρικής απόκρισης μιας λεπτής μεμβράνης και έτσι ανιχνεύουν αλλαγές στις φυσικές ή χημικές ιδιότητες. Εκτός από αυτά τα συστήματα ανίχνευσης χωρίς ετικέτα, η τεχνική της διαφοράς ανακλαστικότητας με λοξή επίπτωση (OIRD) εκτελεί εξαιρετικά ευαίσθητη ανίχνευση μετρώντας τη διαφορά στην ανακλαστικότητα μεταξύ της πόλωσης S και της P. Αυτή η μέθοδος μπορεί να επιταχύνει δραματικά τις κινητικές μετρήσεις της δέσμωσης πρωτεϊνών ανιχνεύοντας μια μικρή αλλαγή στις φυσικές της ιδιότητες, όπως το πάχος και η πυκνότητα.

Άλλες εξελιγμένες μέθοδοι έχουν επίσης αναπτυχθεί για την επίτευξη καλής ανίχνευσης σε μικρο-συστοιχίες πρωτεϊνών. Η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) χρησιμοποιεί την κίνηση ενός προβόλου που ελέγχεται από πιεζοηλεκτρικούς κρυστάλλους και ένα οπτικό σύστημα με βάση το λέιζερ για να απεικονίσει την τοπολογική δομή της πρωτεΐνης, ανιχνεύοντας έτσι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών. Το εύρος των μεθόδων επεκτάθηκε συνδυάζοντας τη φασματομετρία μάζας με άλλες επιφανειακές τεχνικές (συζευγμένες με "MS"), όπως το "SELDI" και το "MALDI-TOF MS". Αυτές οι μέθοδοι παρέχουν περαιτέρω πλεονεκτήματα παρέχοντας χημικές και δομικές πληροφορίες για μικρές ποσότητες δείγματος, πληροφορίες που είναι δύσκολο να ληφθούν μέσω άλλων μεθόδων.

### 1.3.2.3 Εφαρμογές

Υπάρχουν πέντε σημαντικοί τομείς όπου εφαρμόζονται συστοιχίες πρωτεϊνών: διαγνωστική, πρωτεομική, ανάλυση πρωτεϊνικής λειτουργίας, χαρακτηρισμός αντισωμάτων και ανάπτυξη θεραπείας

Η διάγνωση περιλαμβάνει την ανίχνευση αντιγόνων και αντισωμάτων σε δείγματα αίματος, το διαμόρφωση του προφίλ ορών για να ανακαλύψουν νέοι βιοδείκτες ασθενειών, την παρακολούθηση των σταδίων μιας νόσου και τις αποκρίσεις του οργανισμού στη θεραπεία στην εξατομικευμένη ιατρική, την παρακολούθηση του περιβάλλοντος και των τροφίμων. Ο ψηφιακή βιοδοκιμή είναι ένα παράδειγμα χρήσης μικρο-συστοιχίας πρωτεϊνών για διαγνωστικούς σκοπούς. Στην τεχνολογία αυτή, μια σειρά μικροκαναλιών σε ένα τσιπ από γυαλί/πολυμερές με περιεχόμενα μαγνητικά σφαιρίδια (επικαλυμμένα με αντισώματα σημασμένα με φθορισμό), υποβάλλονται σε στοχευμένα αντιγόνα και στη συνέχεια χαρακτηρίζονται από μικροσκόπιο μέσω μέτρησης των καναλιών φθορισμού. Μια αποδοτική πλατφόρμα κατασκευής (χρησιμοποιώντας πολυμερή OSTe) για τέτοιες συστοιχίες μικροκαναλιών έχει πρόσφατα παρουσιαστεί και έχει χαρακτηριστεί με επιτυχία σαν σύστημα μοντέλου βιοδοκιμής.

Η πρωτεομική αφορά την ανάπτυξη του προφίλ της έκφρασης των πρωτεϊνών, δηλαδή ποιες πρωτεΐνες εκφράζονται στο προϊόν λύσης ενός συγκεκριμένου κυττάρου.

Η ανάλυση της λειτουργίας των πρωτεϊνών είναι η ταυτοποίηση των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (π.χ. ταυτοποίηση μελών ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών), αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-φωσφολιπιδίου, στόχοι μικρού μορίου, ενζυματικά υποστρώματα (ιδιαίτερα τα υποστρώματα κινασών) και συνδέσεις υποδοχέα.



Ο χαρακτηρισμός αντισώματος είναι ο χαρακτηρισμός της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας, της εξειδίκευσης και της χαρτογράφησης επιτόπων.

Η ανάπτυξη της θεραπείας περιλαμβάνει την ανάπτυξη θεραπειών για συγκεκριμένο αντιγόνο για αυτοανοσία, καρκίνο και αλλεργίες, την αναγνώριση μικρών μορίων στόχων που θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν ως νέα φάρμακα. (7) (8)

### 1.3.3 Μικρο-συστοιχίες πεπτιδίων

Μια μικρο-συστοιχία πεπτιδίων (peptide microarray - κοινώς γνωστή ως πεπτιδικό chip ή μικροσυστοιχία επιτόπων πεπτιδίων) είναι μια συλλογή πεπτιδίων σε στερεή επιφάνεια, συνήθως γυαλί ή πλαστικό chip. Τα πεπτιδικά chip βρίσκουν εφαρμογές στη βιολογία, την ιατρική, και την φαρμακολογία, για τη μελέτη των ιδιοτήτων πρόσδεσης, λειτουργικότητας και κινητικής των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Στη βασική έρευνα, οι μικροσυστοιχίες πεπτιδίων χρησιμοποιούνται συχνά στον χαρακτηρισμό ενζύμων (όπως κινάση, φωσφατάση, πρωτεάση, ακετυλοτρανσφεράση, διακετυλάση των ιστονών κλπ), στη χαρτογράφηση επιτόπων αντισωμάτων ή για την εύρεση καταλοίπων-κλειδιά για την πρόσδεση πρωτεϊνών. Πρακτικές εφαρμογές αφορούν στην ανακάλυψη βιοδεικτών, στην αναγνώριση ανοσοαποκρίσεων ασθενών κατά την εξέλιξη μιας νόσου, στην παρακολούθηση θεραπειών, στη στρωμάτωση των ασθενειών και στην ανάπτυξη διαγνωστικών εργαλείων και εμβολίων.

#### 1.3.3.1 Αρχή λειτουργίας

Η βασική αρχή της μεθόδου των πεπτιδικών μικροσυστοιχειών είναι ίδια με αυτήν των πρωτοκόλλων ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Τα πεπτίδια (εώς 10000 σε πολλαπλά αντίγραφα) προσδένονται στην επιφάνεια ενός γυάλινου chip, τυπικά σε μέγεθος και σχημά αντικειμενοφόρου πλάκας μικροσκοπίου. Το πεπτιδικό chip μπορεί να επωαστεί αμέσως με μια ποικιλία βιολογικών δειγμάτων, όπως καθαρά ένζυμα ή αντισώματα, ορός ασθενών ή ζώων, προϊόντα λύσης κυττάρων κα.. Μετά από πολλά βήματα καθαρισμού, ακολουθεί επώαση με δευτερογενές αντίσωμα με την επιθυμητή ειδικότητα (π.χ. ανθρώπινο αντι-IgG). Συνήθως, το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με φθορίζον ανιχνευτή. Άλλες μέθοδοι εντοπισμού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν περιλαμβάνουν στον χημειοφωσφορισμό, την χρωματομετρία και την αυτοραδιογραφία.

Οι πεπτιδικές μικροσυστοιχίες εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών:

- Εντοπισμός σημείων πρόσδεσης σε επίπεδο επιτόπου, ευκολία μελέτης επιτοπικών συνδέσεων
- Ευέλικτος σχεδιασμός (π.χ. μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, ποικιλία αλληλουχιών, μη-φυσικά αμινοξέα κα)
- Οι μέθοδοι μασίζονται στον εντοπισμό ισχυρών γραμμικών αλληλεπιδράσεων επιτόπων
- Μικρό κόστος
- Μεγαλύτερη ποικιλότητα από παρτίδα σε παρτίδα

### 1.3.3.2 Εφαρμογές

Οι πεπτιδικές μικροσυστοιχίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη διαφόρων ειδών αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών, ειδικά εκείνων που περιλαμβάνουν ρυθμιστικές πρωτεϊνικές υπό-δομές (ενότητες αναγνώρισης πεπτιδίων), ή πιο κοινώς τομέων αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών. Τέτοιες πρωτεϊνικές υπό-δομές αναγνωρίζουν μικρά γραμμικά μοτίβα που συχνά εκτίθενται σε φυσικά μη δομημένες περιοχές της πρωτεΐνης-προσδέτη. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις μπορούν να μοντελοποιηθούν *in vitro* αν τα πεπτίδια χρησιμοποιηθούν ως ιχνηθέτες και η ενότητα αναγνώρισης πεπτιδίων ως ο αναλύτης. Οι περισσότερες δημοσιεύσεις επικεντρώνονται στην αναγνώριση ανοσομορίων και στον χαρακτηρισμό ενζύμων.

#### Ανοσολογία

- Χαρτογράφηση ανοσοεπικρατών περιοχών σε αντιγόνα ή ολόκληρο το πρωτέομα
- Ανακάλυψη βιοδεικτών του ορού
- Παρακολούθηση κλινικών δοκιμών
- Αναγνώριση χαρακτηριστών περιοχών αντισωμάτων και χαρτογράφηση επιτόπων
- Εύρεση ουδέτερων αντισωμάτων

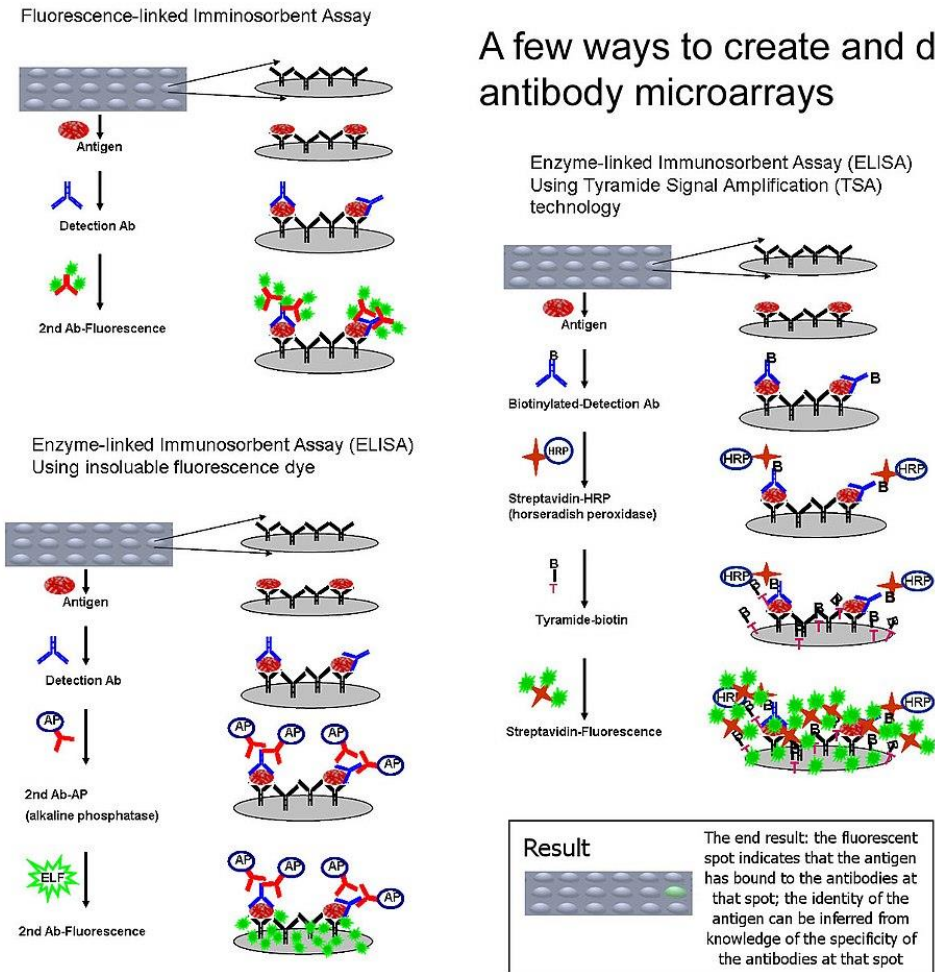
#### Χαρακτηρισμός ενζύμων

- Αναγνώριση υποστρωμάτων ορφανών ενζύμων
- Βελτιστοποίηση γνωστών ενζυμικών υποστρωμάτων
- Αναγνώριση σηματοδοτικών μονοπατιών
- Εντοπισμός ενζυμικών ενεργοτήτων επιμόλυνσης
- Αναγνώριση συνεναιτικών ακολουθιών και καταλοίπων-κλειδιά
- Αναγνώριση θέσεων πρόσδεσης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μέσα σε ένα σύμπλοκο. (9)

### 1.3.4 Μικρο-συστοιχίες αντισωμάτων

Μια μικρο-συστοιχία αντισωμάτων, είναι μια ειδική μορφή πρωτεϊνικής μικρο-συστοιχίας. Σε αυτές, μια συλλογή αντισωμάτων πρόσδεσης (πρωτογενή αντισώματα) εκτυπώνονται και ακινητοποιούνται σε στερεή επιφάνεια, όπως γυαλί, πλαστικό, μεμβράνη ή σιλκόνη και γίνεται εντοπισμός της αλληλεπίδρασης μεταξύ αντισώματος και αντιγόνου-στόχου. Οι μικρο-συστοιχίες αντισωμάτων χρησιμοποιούνται συχνά για τον εντοπισμό πρωτεϊνών σε διάφορα βιολογικά υγρά, συμπεριλαμβανομένου του ορού, του πλάσματος ή των προϊόντων λύσης κυττάρων και ιστών. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για βασική έρευνα όσο και για ιατρικές και διαγνωστικές εφαρμογές.

Αν και η τεχνολογία μικρο-συστοιχιών πρωτεϊνών και αντισωμάτων βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης, πολλές εφαρμογές σε τομείς όπως ο προσδιορισμός αυτοαντισωμάτων, η έρευνα για τον καρκίνο ή ο χαρακτηρισμός μονοπατιών σηματοδότησης υπογραμμίζουν τις δυνατότητές τους. (10)



Εικόνα 1.20 Δείγματα μικρο-συστοιχιών αντισωμάτων.

Στον τομέα της καταγραφής του προφίλ των αυτοάνοσων, ο Robinson και οι συνεργάτες του κατασκεύασαν συστοιχίες που περιείχαν 196 διαφορετικά βιομόρια, συμπεριλαμβανομένων πρωτεΐνες, πεπτίδια, σύμπλοκα ενζύμων, σύμπλοκα ριβονουκλεοπρωτεΐνης, DNA και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένα αντιγόνα. Με τέτοιες συστοιχίες, χαρακτήρισαν ορούς από οκτώ ανθρώπινες αυτοάνοσες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του συστηματικού ερυθματώδους λύκου και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Η Quintana και οι συνεργάτες της χρησιμοποίησαν μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών αποτελούμενες από 266 διαφορετικά αντιγόνα για να επιβεβαιώσουν ότι η μελλοντική απόκριση των ποντικών στον διαβήτη θα μπορούσε να προβλεφθεί μέσω αυτοαντισωμάτων ανοσοσφαιρίνης G. Χαρακτηρισμός της απελευθέρωσης κυτοκίνης διερευνήθηκε από τον Lin, ο οποίος ποσοτικοποίησε ανθρώπινες κυτοκίνες, χημειοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, αγγειογόνους παράγοντες και πρωτεάσες σε θετικά και αρνητικά κύτταρα υποδοχέα οιστρογόνου. Ο Turtinen και οι συνεργάτες του μελέτησαν τις επιδράσεις διαφόρων συνθέσεων αμφοτερικίνης B στην απελευθέρωση κυτοκίνης από λευκαϊκά μονοκύτταρα THP-1 και έδειξαν ότι τα επίπεδα του παράγοντα-νέκρωσης όγκου-α και της ιντερλευκίνης-8 συσχετίζονται καλά μεταξύ της μικροσυστοιχίας αντισώματος και ποσοτικών

μετρήσεων ELISA. Η έρευνα των αντι-ικών αποκρίσεων αντισωμάτων σε δοκιμές εμβολίου με ιό πιθήκου-ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (SHIV), μοντέλο για ιό ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), έγινε από τον Neuman de Vegvar και τους συνεργάτες του. Παρήγαγαν μικροσυστοιχίες αντιγόνου με 430 διαφορετικές πρωτεΐνες και αλληλεπικαλυπτόμενα πεπτιδία που κάλυπταν ολόκληρο το πρωτόμα του SHIV και ταυτοποίησαν οκτώ ανοσοεξαρτώμενα επίτοπα. Ο Xu μελέτησε την μεσολαβούμενη από HIV-1 απόπτωση νευρικών κυττάρων και χρησιμοποίησε μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών για την ταυτοποίηση αυξημένων κυτταρικών παραγόντων ξενιστή σε μολυσμένους μακροφάγους. Η έρευνα για τον καρκίνο είναι σήμερα ένας από τους μεγαλύτερους τομείς εφαρμογής για συστοιχίες πρωτεϊνών και αντισωμάτων. Ο έλεγχος του ορού διεξήχθη σε αρκετές μελέτες για τον χαρακτηρισμό του ορού και του πλάσματος ασθενών που πάσχουν από ποικίλους καρκίνους, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου, του πνεύμονα ή του ρινοφαρυγγικού. Όλες οι μελέτες ανέδειξαν τη δυνατότητα εφαρμογής των συστοιχιών σε αυτόν τον τομέα και οδήγησαν στον εντοπισμό γνωστών ή νέων πιθανών βιοδεικτών. Σε μια άλλη εφαρμογή, οι μεταλλάξεις και οι πολυμορφισμοί της p53 χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά σε σχέση με την ικανότητά πρόσδεσης του DNA σε πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες. Ο Paweletz δημιούργησε μικροσυστοιχίες ειδικών οργάνων και ασθενειών χρησιμοποιώντας συστοιχίες πρωτεϊνών αντίστροφης φάσης, οι οποίες δημιουργήθηκαν με ακινητοποίηση ολόκληρου του συνόλου πρωτεϊνών ασθενών. Τέτοιες συστοιχίες στη συνέχεια εφαρμόστηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της φωσφορυλιωμένης κατάστασης των πρωτεϊνών σήματος και για την παρακολούθηση της προόδου του καρκίνου από ιστολογικά φυσιολογικό προστάτη επιθηλίου σε προστάτη ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και διηθητικό καρκίνο προστάτη. Μια παρόμοια προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε στην ομάδα του Petricoin, που χρησιμοποίησε συστοιχίες αντίστροφης φάσης για τη διαμόρφωση των οδών σήματος στον καρκίνο του προστάτη και των ωοθηκών. Οι πρώτες μεθοδολογίες για την ανάλυση μεμβρανικών πρωτεϊνών αναπτύχθηκαν από τον Fang, ο οποίος παρήγαγε συστοιχίες πρωτεϊνών μεμβράνης για ανάλυση των ιδιοτήτων πρόσδεσης των υποδοχέων σύνδεσης. Οι μικροσυστοιχίες αποτελούνταν από μια συστοιχία υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνη και αδρενεργικούς υποδοχείς, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την επιλεκτική ανίχνευση ενός συγγενικού ανταγωνιστικού αναλόγου ειδικού για β-αδρενεργικούς υποδοχείς. Επειδή σημαντικά μέλη σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως οι υποδοχείς και τα συναφή μόρια σηματοδότησης τους, είναι τοποθετημένα σε μεμβράνη, η συστηματική ανάλυση μεμβρανικών πρωτεϊνών παρέχει μια πολύτιμη εργασία για την πρωτεομική. Επιπλέον, έγιναν προσπάθειες για την παρακολούθηση των ενζυματικών αντιδράσεων σε ένα τσιπ. Σα πρώτο βήμα, η δραστηριότητα κινάσης μετρήθηκε ποσοτικά σε ένα τσιπ πεπτιδίου. Ο Houseman εφάρμοσε SPR, φθορισμός και φωσφοροποίηση για την ανίχνευση της φωσφορυλίωσης και αξιολόγησε ποσοτικά τρεις αναστολείς. Ο Zhu χρησιμοποίησε τσιπ πρωτεϊνών που φέρουν μικροκανάλια για την ανάλυση σχεδόν όλων των πρωτεϊνικών κινασών από *S. cerevisiae*. Πολλές νέες δραστηριότητες βρέθηκαν καθώς και 27 πρωτεϊνικές κινάσες με μη αναμενόμενη δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης. Η ίδια ομάδα διερεύνησε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα μέσω της παραγωγής του πρώτου τσιπ πρωτεόματος. Για την παραγωγή του τσιπ, 5800 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης ζυμομυκήτων κλωνοποιήθηκαν και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες υπερεκφράστηκαν σε *E. Coli*, καθαρίστηκαν και εκτυπώθηκαν. Η προκύπτουσα μικροσυστοιχία πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε για διαλογή αλληλεπιδράσεων με καλμοδουλίνη και φωσφολιπίδια και επέτρεψε την ταυτοποίηση δεσμευτικών μοτίβων. Η φωσφορυλίωση μελετήθηκε επίσης σε φυτά από τον Kramer, ο οποίος προσδιόρισε 21 πιθανά υποστρώματα της κινάσης CK2α του κριθαριού. Η τεχνολογία πρωτεΐνης και μικρο-συστοιχίας αντισώματος δεν περιορίζεται στις περιοχές που αναφέρθηκαν παραπάνω, αλλά έχει εφαρμοστεί σε άλλους τομείς, όπως η διερεύνηση των νευροεκφυλιστικών διαταραχών, η συσχέτιση του κυτταρικού

φαινοτύπου με τους επιφανειακούς δείκτες, η ταυτοποίηση των σχετιζόμενων με τη χρωματίνη πρωτεϊνών καθώς και η χαρτογράφηση των WW περιοχών και η δημιουργία τσιπ πρωτεϊνών Arabidopsis. Μια νέα προσέγγιση, που ονομάζεται πολλαπλή τεχνολογία εντοπισμού (MIST), αναπτύχθηκε από την Angenendt και συνεργάτες της. Το MIST επιτρέπει την πολλαπλή ανάλυση διαφόρων αναλυτών σε ένα μόνο τσιπ. Σε ένα πρώτο κηλίδωμα, βιομόρια όπως αντισώματα, ενζυματικά υποστρώματα ή αντιγόνα μεταφέρονται σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα και η πλάκα δεσμεύεται για να αποτρέψει μη ειδική δέσμευση. Ο αναλύτης, ο οποίος αναμένεται να περιέχει έναν αντιδραστήριο αλληλεπιδράσεως με το αντιδραστήριο που εφαρμόστηκε στο τσιπ στην πρώτη κηλίδωση, στη συνέχεια μεταφέρεται στο τσιπ με ένα δεύτερο κηλίδωμα. Επειδή το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για τη δεύτερη κηλίδωση περιέχει επίσης ένα υγροσκοπικό πρόσθετο, αποφεύγεται η ολική εξάτμιση του υγρού και διατηρούνται τα υγρά στοιχεία αντίδρασης. Μετά την εκτύπωση, οι αντικειμενοφόρες πλάκες πλένονται και σαρώνονται σε έναν συμβατικό σαρωτή μικρο-συστοιχιών. Αυτή η διαδικασία είναι διαφορετική από τις συνήθεις διαδικασίες, καθώς δεν εφαρμόζει τον αναλύτη με ολική επώαση, αλλά επιτρέπει τη μεταφορά πολλών διαφορετικών αναλυτών σε διαφορετικά σημεία. Σε μία πρώτη μελέτη, μετρήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα ενζύμων όπως η αλκαλική φωσφατάση, η β-γαλακτοσιδάση ή η καθεψίνη D με τη μεταφορά ενός φθορογόνου υποστρώματος σε ένα πρώτο κηλίδωμα και την κηλίδωση διαφορετικών συγκεντρώσεων ενζύμου σε μια δεύτερη κηλίδωση στο ίδιο ακριβώς σημείο. Η ίδια τεχνολογία εφαρμόστηκε επίσης για να διευκολύνει και να επιταχύνει τη διαλογή μεγάλων πληθυσμών ανασυνδιασμένων τεμαχίων αντισωμάτων. (11)

## 1.4 Ανάλυση δεδομένων “Multi-omics”

### 1.4.1 Εισαγωγή στα “Multi-omics” δεδομένα

Οι τεχνολογίες υψηλής απόδοσης έχουν φέρει επανάσταση στην ιατρική έρευνα. Η έλευση των συστοιχιών γονότυπου επέτρεψε ευρείας κλίμακας μελέτες σε όλο το εύρος του γονιδιώματος και μεθόδους για την εξέταση των παγκόσμιων επιπέδων μεταγραφής, τα οποία οδήγησαν στο πεδίο της «ολοκληρωτικής γενετικής» (integrative genomics). Άλλες τεχνολογίες omics, όπως η πρωτεομική και η μεταβολική, τώρα ενσωματώνονται συχνά στην καθημερινή μεθοδολογία των βιολογικών ερευνητών.

Η προσθήκη "omics" σε έναν μοριακό όρο συνεπάγεται μια ολοκληρωμένη ή παγκόσμια αξιολόγηση ενός συνόλου μορίων. Η πρώτη επιστημονική ορολογία που εμφανίζεται, η γονιδιωματική, επικεντρώνεται στη μελέτη ολόκληρων γονιδιωμάτων σε αντίθεση με την "γενετική" που διερευνά μεμονωμένες παραλλαγές ή μεμονωμένα γονίδια. Οι γονιδιωματικές μελέτες παρείχαν ένα πολύ χρήσιμο πλαίσιο για τη χαρτογράφηση και τη μελέτη συγκεκριμένων γενετικών παραλλαγών που συμβάλλουν τόσο στις μενδελικές, όσο και στις πολύπλοκες ασθένειες. Ο τομέας των omics έχει ως επί το πλείστον καθοδηγηθεί από τεχνολογικές εξελίξεις που έχουν καταστήσει δυνατή την αποδοτική και υψηλής απόδοσης ανάλυση βιολογικών μορίων. Για παράδειγμα, η "συστοιχία έκφρασης", με βάση την υβριδοποίηση του cDNA σε συστοιχίες ανιχνευτών δέσμευσης ολιγονουκλεοτιδίων, αναπτύχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1990. Οι τεχνολογίες συστοιχιών αποδείχθηκαν ικανές να ποσοτικοποιήσουν τα επίπεδα όλων των γενετικών αντιγράφων που κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη σε έναν συγκεκριμένο ιστό. Η δυνατότητα έρευνας των

μοτίβων έκφρασης γονιδίων σε παγκόσμιο επίπεδο βρήκε γρήγορα εφαρμογή σε πολλούς τομείς της βιολογίας, συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης της ασθένειας.

### **Πίνακας 3: Βασικοί τύποι “omics”**

**“Genomics”** είναι το πιο ώριμο από τα πεδία omics. Στο πεδίο της μοριακής βιολογίας, η γονιδιωματική είναι η μελέτη γονιδιωμάτων, η πλήρης σειρά γενετικού υλικού εντός ενός οργανισμού. Η γονιδιωματική περιλαμβάνει την αλληλούχιση και την ανάλυση γονιδιωμάτων. Επίσης, ασχολείται με τη δομή, τη λειτουργία, τη σύγκριση και την εξέλιξη των γονιδιωμάτων. Στον τομέα της ιατρικής έρευνας, επικεντρώνεται στον εντοπισμό των γενετικών παραλλαγών που συνδέονται με την ασθένεια, την ανταπόκριση στη θεραπεία ή τη μελλοντική πρόγνωση ασθενών. Το GWAS είναι μια επιτυχημένη προσέγγιση που έχει χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό χιλιάδων γενετικών παραλλαγών που σχετίζονται με σύνθετες ασθένειες σε πολλαπλούς ανθρώπινους πληθυσμούς. Σε τέτοιες μελέτες, καταγράφεται το γονιδίωμα χιλιάδων ατόμων για περισσότερους από ένα εκατομμύριο γενετικούς δείκτες και στατιστικά σημαντικές διαφορές στις δευτερεύουσες συχνότητες αλληλόμορφων μεταξύ περιπτώσεων και ελέγχων θεωρούνται αποδεικτικά στοιχεία συσχετισμού. Το GWAS αποτελεί μια ανεκτίμητη συμβολή στην κατανόηση των σύνθετων φαινοτύπων. Οι σχετικές τεχνολογίες περιλαμβάνουν συστοιχίες γονότυπου, NGS για αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος και αλληλούχιση εξόμων.

**“Epigenomics”** επικεντρώνεται στο γενικό χαρακτηρισμό αναστρέψιμων τροποποιήσεων του DNA ή πρωτεϊνών που σχετίζονται με το DNA, όπως η μεθυλίωση του DNA ή η ακετυλίωση της ιστόνης. Η ομοιοπολική τροποποίηση του DNA και των ιστονών είναι σημαντικοί ρυθμιστές της γονιδιακής μεταγραφής και στη συνέχεια της κυτταρικής εξέλιξη. Οι τροποποιήσεις αυτές μπορούν να επηρεαστούν τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, μπορούν να είναι μακροχρόνιες και μερικές φορές κληρονομικές. Ενώ ο ρόλος των επιγονιδιωματικών τροποποιήσεων ως μεσολαβητών των περιβαλλοντικών επιδράσεων παραμένει αμφισβητούμενος, η σημασία τους στις βιολογικές διεργασίες και στην ανάπτυξη της νόσου είναι εμφανής από πολλές μελέτες πάω στο επιγονιδίωμα που έχουν αναφερθεί. Εκτός από την γνώση που αποκτήθηκε από την αναγνώριση επιγενετικών τροποποιήσεων που σχετίζονται με ασθένειες, τα δεδομένα που παράγονται από αυτές τις μελέτες έχουν μεγάλη δυνατότητα να ενισχύσουν τη λειτουργική ερμηνεία των γενετικών παραλλαγών που διαμένουν σε αυτές τις περιοχές ή των επιγενετικών δεικτών που σχετίζονται με τη νόσο ανεξάρτητα από τη γενετική ποικιλομορφία. Η σχετική τεχνολογία περιλαμβάνει αξιολόγηση των τροποποιήσεων DNA χρησιμοποιώντας NGS.

**“Transcriptomics”** εξετάζει τα επίπεδα του RNA, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Το κεντρικό δόγμα της βιολογίας θεωρεί το RNA ως ένα μοριακό ενδιάμεσο μεταξύ του DNA και των πρωτεϊνών, που θεωρούνται ως η κύρια λειτουργική ανάγνωση του DNA. Άλλα παραδείγματα λειτουργίας RNA, όπως τα δομικά, συχνά θεωρήθηκαν ως περιέργες εξαιρέσεις από τον γενικό κανόνα. Η έλευση μεγάλων μεταγραφικών μελετών στην προηγούμενη δεκαετία κατέδειξε ότι ενώ μόνο το 3% περίπου του γονιδιώματος κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες, μεταγράφεται μέχρι και το 80% του γονιδιώματος. Οι μελέτες RNA-Seq (αλληλουχίας RNA) προσδιόρισαν χιλιάδες νέα ισομορφές και έδειξαν μια μεγαλύτερη από την προηγουμένως εκτιμώμενη πολυπλοκότητα του κωδικοποιημένου πρωτεϊνικού συνόλου RNA. Ωστόσο, μια πιο σημαντική συμβολή αυτών των μελετών ήταν η ανάπτυξη του μη κωδικοποιημένου πεδίου RNA. Είναι πλέον σαφές ότι χιλιάδες μακρά μη κωδικοποιημένα RNA που μεταγράφονται σε κύτταρα θηλαστικών παίζουν βασικούς ρόλους σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, για παράδειγμα, καφέ λιπώδη διαφοροποίηση, ενδοκρινική ρύθμιση και ανάπτυξη

νευρώνων. Η δυσλειτουργία μεγάλων μη κωδικοποιημένων RNA είχε εμπλακεί σε διάφορες ασθένειες, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου, διαβήτη, καρκίνο και άλλα. Εκτός από το μακρύ μη κωδικοποιητικό RNA, το NGS επιτρέπει την ανάκριση βραχέων RNAs και την αναγνώριση κυκλικών RNAs. Όπως τα μεγάλα μη κωδικοποιητικά RNAs, ένα αυξανόμενο σύνολο στοιχείων καταδεικνύει τη δυσλειτουργία βραχέων και κυκλικών RNAs σε ασθένειες και την πιθανή χρήση τους ως βιοδείκτες ή ως θεραπευτικούς στόχους. Οι συνδεδεμένες τεχνολογίες περιλαμβάνουν συστοιχίες που βασίζονται σε ανιχνευτές και RNS-Seq.

**“Proteomics”** είναι η μελέτη ευρείας κλίμακας των πρωτεϊνών. Χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της πεπτιδικής αφθονίας, τροποποίησης και αλληλεπίδρασης. Η ανάλυση και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών έχει γνωρίσει επανάσταση από MS(mass spectrometry)-βασισμένες μεθόδους και πρόσφατα αυτές έχουν προσαρμοστεί για αναλύσεις υψηλής απόδοσης χιλιάδων πρωτεϊνών σε κύτταρα ή σωματικά υγρά. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών μπορούν να ανιχνευθούν με κλασσικές αμερόληπτες μεθόδους όπως η εμφάνιση φάγου και οι δυ-υβριδικές συστοιχίες ζύμης. Οι μέθοδοι καθαρισμού συγγένειας, στις οποίες ένα μόριο απομονώνεται χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα ή μια γενετική ετικέτα, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν. Το MS στη συνέχεια χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό οποιωνδήποτε σχετικών πρωτεϊνών. Τέτοιες μέθοδοι συγγένειας, μερικές φορές συζευγμένες με χημική διασύνδεση, έχουν προσαρμοστεί για να εξετάσουν τις παγκόσμιες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων. Τέλος, οι λειτουργίες μεγάλου κλάσματος πρωτεϊνών διαμεσολαβούνται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως πρωτεόλυση, γλυκοζυλίωση, φωσφορυλίωση, νιτροζυλίωση και ουβικιτινίωση. Τέτοιες τροποποιήσεις παίζουν βασικούς ρόλους στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση, τον έλεγχο της ενζυμικής δραστηριότητας, την κυκλοφορία πρωτεϊνών και τη μεταφορά και τη διατήρηση της συνολικής κυτταρικής δομής. Το MS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μετρήσει άμεσα αυτές τις ομοιοπολικές τροποποιήσεις καθορίζοντας την αντίστοιχη μετατόπιση στη μάζα της πρωτεΐνης. Αυτές είναι προσπάθειες για την ανάπτυξη αναλύσεων σε επίπεδο γονιδιώματος τέτοιων τροποποιήσεων. Οι σχετικές τεχνολογίες περιλαμβάνουν προσεγγίσεις βασισμένες σε MS για διερεύνηση της αλληλεπίδρασης πρωτεόλων σε παγκόσμια κλίμακα και ποσοτικοποίηση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.

**“Metabolomics”** είναι η επιστημονική μελέτη χημικών διεργασιών που αφορούν μεταβολίτες. Συγκεκριμένα, η μεταβολική είναι η «συστηματική μελέτη των μοναδικών χημικών δακτυλικών αποτυπωμάτων που αφήνουν πίσω τους συγκεκριμένες κυτταρικές διεργασίες», η μελέτη του προφίλ μικρών μορίων μεταβολιτών. Τα “metabolomics” ταυτόχρονα ποσοτικοποιούν πολλαπλούς τύπους μικρών μορίων, όπως αμινοξέα, λιπαρά οξέα, υδατάνθρακες ή άλλα προϊόντα κυτταρικών μεταβολικών λειτουργιών. Τα επίπεδα μεταβολιτών και οι σχετικές αναλογίες αντικατοπτρίζουν τη μεταβολική λειτουργία και οι διαταραχές της φυσιολογικής κλίμακας είναι συχνά ενδεικτικές ασθένειας. Οι ποσοτικές μετρήσεις των επιπέδων των μεταβολιτών κατέστησαν δυνατή την ανακάλυψη νέων γενετικών τόπων που ρυθμίζουν μικρά μόρια ή των σχετικών αναλογιών τους, στον πλάσμα και σε άλλους ιστούς. Επιπρόσθετα, η “metabolomics” σε συνδυασμό με τη μοντελοποίηση χρησιμοποιήθηκε εκτενώς για τη μελέτη της ροής των μεταβολιτών. Οι σχετικές τεχνολογίες περιλαμβάνουν προσεγγίσεις με βάση το MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό τόσο των σχετικών όσο και των στοχευμένων περιεκτικότητας μικρών μορίων.

**“Microbiomics”** είναι ένας ταχέως αναπτυσσόμενος τομέας στον οποίο εξετάζονται όλοι οι μικροοργανισμοί μιας δεδομένης κοινότητας. Το ανθρώπινο δέρμα, οι βλεννογονικές επιφάνειες και το έντερο αποικίζονται από μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ιών και των μυκήτων, που συλλογικά ονομάζονται “microbiota”. Το ανθρώπινο “microbiome” είναι εξαιρετικά

περίπλοκο, για παράδειγμα το έντερο περιέχει περίπου 100 τρισεκατομμύρια βακτήρια από 1000 διαφορετικά είδη. Υπάρχουν σημαντικές διακυμάνσεις στη σύνθεση του “microbiota” μεταξύ των ατόμων που προέρχονται από τους σπόρους κατά τη γέννηση και την ανάπτυξη, τη διατροφή και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες, τα φάρμακα και την ηλικία. Πολλές μελέτες έχουν αποδώσει στα βακτήρια του εντέρου μια ποικιλία διαταραχών, συμπεριλαμβανομένου του διαβήτη, της παχυσαρκίας, του καρκίνου, της κολίτιδας, των καρδιακών παθήσεων και του αυτισμού. Το “microbiome” μπορεί να διαμορφωθεί με ενίσχυση και στη συνέχεια προσδιορισμό αλληλουχίας ορισμένων υπερμεταβλητών περιοχών των βακτηριακών γονιδίων rSRS 16S που ακολουθούνται από συσσωμάτωση των αλληλουχιών σε λειτουργικές ταξινομικές μονάδες. Η αλληλούχιση μεταγονιδιωματικών όπλων, στην οποία έχει προσδιοριστεί η αλληλουχία του ολικού DNA, μπορεί να παράσχει επιπλέον ανάλυση για τη διάκριση των γενετικά κοντινών μικροβιακών ειδών. Έχουν αναπτυχθεί αρκετά αναλυτικά εργαλεία για την ανάλυση δεδομένων NGS από στοχοθετημένη ανάλυση 16S ή μεταγονιδιωματικής ανάλυσης, όπως το QIIME (ποσοτικές γνώσεις για τη μικροβιακή οικολογία). Αυτά επιτρέπουν ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των ταξινομικών κατηγοριών που μπορούν να συσχετιστούν με ασθένειες ή άλλους φαινοτύπους ενδιαφέροντος. Οι σχετικές τεχνολογίες περιλαμβάνουν εφαρμογές NGS για τον προσδιορισμό της ριβοσωματικής αφθονίας της 16S και της μεταγονιδιωματικής ποσοτικοποίησης.

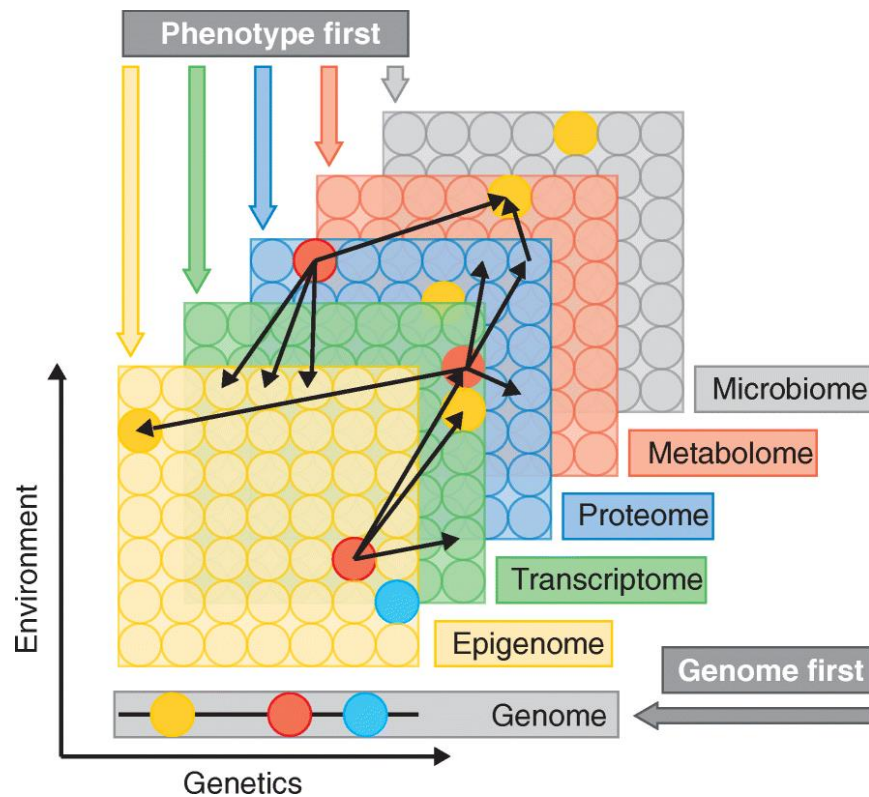
Την περασμένη δεκαετία, η γονοτυπία υψηλής απόδοσης, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη ενός χάρτη αναφοράς υψηλού επιπέδου για το ανθρώπινο γονιδίωμα, τα αυστηρά στατιστικά εργαλεία και τις μεγάλες συντονισμένες ομάδες χιλιάδων ασθενών, επέτρεψε τη χαρτογράφηση χιλιάδων γενετικών παραλλαγών, τόσο σπάνιων και κοινών, που συμβάλλουν σε μια ασθένεια. Ωστόσο, καθώς η ικανότητα εντοπισμού γενετικών παραλλαγών που σχετίζονται με σύνθετη ασθένεια αυξήθηκαν, αρκετά συμπεράσματα διαμόρφωσαν τις επόμενες προσεγγίσεις για την αποσαφήνιση των αιτιών της νόσου. Πρώτον, οι τόποι που έχουν εντοπιστεί μέχρι τώρα γενικά εξηγούν μόνο ένα μέρος της κληρονομικής συνιστώσας για συγκεκριμένες ασθένειες. Δεύτερον, ενώ οι μενδελικές ασθένειες γενικά οφείλονται σε αλλαγές στις περιοχές κωδικοποίησης των γονιδίων, οι συνήθεις ασθένειες συνήθως προκύπτουν από αλλαγές στη ρύθμιση των γονιδίων. Τρίτον, οι ίδιες γενετικές παραλλαγές συχνά συμβάλλουν σε διαφορετικά τελικά αποτελέσματα, ανάλογα με το περιβάλλον και το γενετικό υπόβαθρο. Συνολικά, αυτές οι αντιλήψεις παρείχαν ένα σκεπτικό για την ανάπτυξη τεχνολογιών συστημικής βιολογίας που περιλαμβάνουν την ενσωμάτωση διαφορετικών τύπων δεδομένων “omics” για τον προσδιορισμό των μοριακών προτύπων που σχετίζονται με την ασθένεια.

Κάθε τύπος δεδομένων “omics”, από μόνος του, τυπικά παρέχει μια λίστα διαφορών που σχετίζονται με την ασθένεια. Αυτά τα δεδομένα μπορούν να είναι χρήσιμα τόσο ως δείκτες της διαδικασίας της νόσου όσο και για να δίνουν πληροφορίες σχετικά με ποια βιολογικά μονοπάτια ή διεργασίες είναι διαφορετικές μεταξύ της νόσου και των ομάδων ελέγχου. Ωστόσο, η ανάλυση ενός μόνο τύπου δεδομένων περιορίζεται σε συσχετίσεις, οι οποίες αντανακλούν κυρίως τις αντιδραστικές διαδικασίες και όχι τις αιτιώδεις. Η ενσωμάτωση διαφορετικών τύπων δεδομένων “omics” χρησιμοποιείται συχνά για να διασαφηνίσει τις πιθανές αιτιολογικές αλλαγές που οδηγούν σε ασθένειες ή στόχους θεραπείας, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να δοκιμαστούν σε περαιτέρω μοριακές μελέτες.



### 1.4.2 Θεωρήσεις για το σχεδιασμό των “omics” μελετών

Σε σύγκριση με τις μονές μελέτες “omics” (πίνακας 3, εικόνα 1.21), τα “multi-omics” μπορούν να δώσουν στους ερευνητές μεγαλύτερη κατανόηση της ροής πληροφοριών από την αρχική αιτία της ασθένειας (γενετική, περιβαλλοντική ή αναπτυξιακή) έως τις λειτουργικές συνέπειες ή σχετικές αλληλεπιδράσεις. Οι μελέτες Omics, λόγω της φύσης τους, βασίζονται σε μεγάλο αριθμό συγκρίσεων, προσαρμοσμένες στατιστικές αναλύσεις και σημαντική επένδυση χρόνου, εξειδικευμένου ανθρώπινου δυναμικού και χρημάτων.



Εικόνα 1.21 Πολλαπλοί τύποι δεδομένων “omics” και προσεγγίσεις στην έρευνα ασθένειας. Τα επίπεδα αναπαριστούν διαφορετικούς τύπους δεδομένων “omics” (πίνακας 3). Τα δεδομένα συλλέγονται από όλη την ομάδα μορίων, που αναπαρίστανται με κύκλους. Εκτός από το γονιδίωμα, όλα τα επίπεδα δεδομένων αντανακλούν τη γενετική ρύθμιση και το περιβάλλον, πράγμα που μπορεί να επηρεάσει κάθε μεμονωμένο μόριο σε διαφορετική έκταση. Τα λεπτά κόκκινα βέλη αναπαριστούν πιθανές αλληλεπιδράσεις ή συσχετίσεις ανιχνευμένες σε διαφορετικά επίπεδα -για παράδειγμα, το κόκκινο μεταγραφικό μόριο μπορεί να συσχετιστεί με πολλαπλές πρωτεΐνες. Τα πιο παχιά βέλη υποδεικνύουν διαφορετικά πιθανά σημεία εκκίνησης ή εννοιολογικά πλαίσια για την ενοποίηση πολλών δεδομένων “omics” για την κατανόηση της ασθένειας. Η πρώτη προσέγγιση γονιδιώματος υποδηλώνει ότι ένα επίπεδο ξεκινά από τον σχετικό τόπο, ενώ η πρώτη προσέγγιση φαινότυπου υποδηλώνει ότι οποιοδήποτε άλλο στρώμα είναι το σημείο εκκίνησης. Η πρώτη προσέγγιση περιβάλλοντος (δεν φαίνεται) εξετάζει τις περιβαλλοντικές διαταραχές

#### 1.4.2.1 Πολυπλοκότητα της αιτιολογίας ασθένειας

Ένα σημαντικό στοιχείο στο σχεδιασμό μιας μελέτης “multi-omics” είναι η φύση της διαταραχής. Οι απλές ασθένειες που προκύπτουν από μεμονωμένες μεταλλάξεις γονιδίων ενέχουν λίγους αιτιολογικούς παράγοντες και οι παράγοντες αυτοί τυπικά παίζουν καθοριστικούς ρόλους στην ανάπτυξη της νόσου, αν και η σοβαρότητα ή η πρόοδος πολλών ασθενειών επηρεάζεται από «τροποποιητικά γονίδια» ή περιβαλλοντικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, η πιο συνηθισμένη αιτία κυστικής ίνωσης είναι μία μόνο μετάλλαξη διαύλου χλωριδίου, επιτρέποντας τη σχετική με την ασθένεια έρευνα να επικεντρωθεί στη λειτουργία αυτού του γονιδίου. Έτσι, οι συγκεντρωμένες προσπάθειες “omics” σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία, εστιάζοντας στις άμεσες μοριακές μεταβολές που προκαλούνται από τον αιτιολογικό παράγοντα, αναμένεται να παράγουν επαρκή γνώση για την προώθηση της κατανόησης πιθανών θεραπευτικών στρατηγικών. Σημειώστε ότι ο προεξέχων αιτιολογικός παράγοντας δεν χρειάζεται να είναι γενετικός και θα μπορούσε, για παράδειγμα, να είναι ένας μολυσματικός παράγοντας.

Η αιτιολογία των πολύπλοκων ασθενειών είναι πολύ πιο περίπλοκη και δεν επικεντρώνεται σε έναν συγκεκριμένο παράγοντα. Διαφορετικοί συνδυασμοί ποικίλων παραγόντων θα μπορούσαν να συγκλίνουν σε φαινοτυπικά παρόμοιες καταστάσεις. Επιπλέον, απουσία σαφούς αιτιολογικού παράγοντα που προκαλεί τη νόσο, τα αποτελέσματα από ένα μόνο στρώμα δεδομένων είναι πάντοτε συσχετισμένα και, επειδή τα αντιδραστικά αποτελέσματα συνήθως ξεπερνούν τα αιτιακά αποτελέσματα σε βιολογικούς καταρράκτες, θα πρέπει να ερμηνεύονται ως τέτοια. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι περισσότερες κοινές, πολύπλοκες ασθένειες αναπτύσσονται με την πάροδο του χρόνου και περιλαμβάνουν τόσο περιβαλλοντικούς όσο και γενετικούς παράγοντες, η πλήρης μηχανιστική αντίληψη απαιτεί συντονισμένα σύνολα πολλών “omics” δεδομένων σε πολλαπλά χρονικά σημεία, που συλλέγονται από πολλούς σχετικούς με τη νόσο ιστούς.

#### 1.4.2.2 Κατάντη ανάλυση, μεγέθη δειγμάτων και ισχύς

Οι προσεγγίσεις “Omics” παράγουν δεδομένα για να παρέχουν βιολογική γνώση βάσει στατιστικών συμπερασμάτων από σύνολα δεδομένων που είναι συνήθως μεγάλα. Ως εκ τούτου, η ισχύς ανίχνευσης των συσχετίσεων ή της ροής πληροφοριών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος της επίδρασης, την ετερογένεια του θορύβου υποβάθρου και το μέγεθος του δείγματος, με το τελευταίο να είναι η μόνη παράμετρος που ελέγχεται από τους ερευνητές. Δυστυχώς, οι μελέτες στον άνθρωπο επηρεάζονται από έναν πλήθος παραγόντων που είναι δύσκολο ή αδύνατο να ελεγχθούν (π.χ. δίαιτα και επιλογές τρόπου ζωής). Έτσι, η ικανότητα των “omics” προσεγγίσεων να παράγουν μια ουσιαστική εικόνα για την ανθρώπινη ασθένεια εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τα διαθέσιμα μεγέθη δείγματος και σε πολλές περιπτώσεις μια υποβαθμισμένη μελέτη είναι πιθανό να δώσει λανθασμένα θετικά αποτελέσματα. Αυτό το ζήτημα απεικονίζεται καλά στα πρωταρχικά βήματα των γονιδιακών μελετών για σύνθετες ασθένειες, όπου το γεγονός ότι αυτοί οι παράγοντες δεν λήφθηκαν υπόψιν οδήγησε σε πολλές δημοσιεύσεις μη με αποτελέσματα μη επαναλήψιμα. Ένας αρχικός υπολογισμός ισχύος για την εξασφάλιση επαρκούς μεγέθους δείγματος και διακύμανσης των αποτελεσμάτων είναι όλο και περισσότερο απαραίτητος σε μελέτες μεγάλης κλίμακας.

Μια άλλη πιθανή παγίδα των προσεγγίσεων “omics” είναι η ανεπαρκής προσοχή στις απαιτήσεις ανάλυσης δεδομένων, πριν και κατά τη διάρκεια της συλλογής δεδομένων. Παρέχονται γενικά αναλυτικά πρωτόκολλα για κάθε τύπο “omics” δεδομένων (πίνακας 3). Ωστόσο, τα περισσότερα πεδία “omics” δεν έχουν ακόμη αναπτύξει ένα συμφωνημένο πρότυπο. Επιπλέον, αυτά τα σύνολα δεδομένων είναι συχνά μεγάλα και σύνθετα και απαιτούν προσαρμογή της γενικής στατιστικής προσέγγισης στο συγκεκριμένο σύνολο δεδομένων. Μια σημαντική πτυχή του σχεδιασμού μελετών “omics”, για επιβεβαίωση ότι τα δεδομένα που συλλέγονται πληρούν τις απαιτήσεις ανάλυσης, είναι ο οραματισμός του κύριου στόχου της ανάλυσης και της αναλυτικής προσέγγισης πριν τη συλλογή των δεδομένων. Για παράδειγμα, μια κοινή συνήθεια κατά τον σχεδιασμό πειραμάτων “RNA-Seq” θα ήταν η κατανομή των οικονομικών πόρων για την εξισορρόπηση του αριθμού των δειγμάτων με βάθος κάλυψης. Για τον εντοπισμό διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων μεταξύ των περιπτώσεων και των ελέγχων, η ισχύς που παρέχεται από περισσότερα δείγματα είναι γενικά προτιμότερη από την αυξημένη ακρίβεια που παρέχεται από το μεγαλύτερο βάθος της αλληλουχίας. Ωστόσο, αν ο κύριος σκοπός της ανάλυσης είναι να εντοπιστούν νέες μεταγραφές ή να εξεταστεί η έκφραση που σχετίζεται με αλληλόμορφο, είναι επιθυμητό το μεγαλύτερο βάθος της κάλυψης. Εκτός από τους οικονομικούς περιορισμούς, η ανάλυση δεδομένων θα πρέπει να κατευθύνει τη συλλογή δεδομένων για την αποφυγή ή την ελαχιστοποίηση τεχνικών αντικειμένων, όπως τα αποτελέσματα παρτίδας που θα μπορούσαν να εισαχθούν κατά τη διάρκεια όλων των σταδίων επεξεργασίας του δείγματος και της απόκτησης δεδομένων. Σε μεγάλες μελέτες, ορισμένα τεχνικά αντικείμενα δεν μπορούν να αποφευχθούν και σε αυτές τις περιπτώσεις είναι σημαντικό να καταλάβουμε σε ποιο βαθμό τα εν λόγω αντικείμενα περιορίζουν την ικανότητά μας να εξάγουμε συμπεράσματα από τις παρατηρήσεις και ενδεχομένως να εισαγάγουμε ελέγχους που θα μπορούσαν να ποσοτικοποιήσουν την επίδρασή της.

#### 1.4.2.3 Ανθρώπινες μελέτες και μοντέλα ζώων για ασθένειες

Τόσο οι μελέτες “omics” σε ανθρώπους όσο και σε μοντέλα ζώων παρέχουν σημαντική εικόνα για τη νόσο. Ο άνθρωπος είναι ο κύριος ευνοημένος της ιατρικής έρευνας και, φυσικά, τα ευρήματα από μελέτες σε ανθρώπους έχουν μεγαλύτερη δυναμική από ότι τα ζωικά μοντέλα. Πολλές ανθρώπινες κεντρικές κοινοπραξίες έχουν παράγει ένα μεγάλο σύνολο στοιχείων μεταγραφικής και επιγενετικής σε πολλαπλούς ιστούς, για παράδειγμα, το “Roadmap Epigenomics Project” και το GTEx ανέλυσε επιγονιδιωματικές υπογραφές και μεταγραφικά μόρια σε δεκάδες ανθρώπινους ιστούς και κυτταρικούς τύπους. Επιπλέον, έχουν δημιουργηθεί αρκετά μεγάλες βιοτράπεζες για τη συλλογή, αποθήκευση και ανάλυση χιλιάδων ανθρώπινων δειγμάτων που σχετίζονται με ασθένειες. Για παράδειγμα, το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας και Φροντίδας στη Φινλανδία ανέπτυξε ένα δίκτυο βιοτραπεζών σε ολόκληρη τη χώρα για τη συλλογή δειγμάτων και μετρήσεων από ασθενείς με διάφορες ασθένειες. Η βρετανική βιοτράπεζα συλλέγει δείγματα και φυσιολογικά μετρήσεις και ακολουθεί 500.000 άτομα ανάλογα με τη δραστηριότητά τους. Αυτά τα δείγματα μπορούν να χαρακτηριστούν με διάφορες προσεγγίσεις “omics” και να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση των μοριακών μεταβολών που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ασθένειας ή πριν από αυτήν, όταν υπάρχουν διαθέσιμα υποψήφια δεδομένα.

Παρέχοντας χρήσιμη γνώση, οι μελέτες ανθρώπινων “omics” υποφέρουν από αρκετούς περιορισμούς που μπορούν να αντιμετωπιστούν μόνο σε μελέτες σε ζώα, υπό την προϋπόθεση ότι θα χρησιμοποιηθεί το κατάλληλο ζωικό μοντέλο της νόσου. Θα μπορούσε κανείς να υποστηρίξει ότι οι πρωτογενείς

ανθρώπινες κυτταρικές σειρές αντιπροσωπεύουν μια κατάλληλη πλατφόρμα για να διερευνηθεί η ασθένεια χωρίς την ανάγκη για ζωικά μοντέλα και πράγματι κυτταρικές σειρές έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά εκτεταμένα για να αναλύσουν λεπτομερείς μεμονωμένες μηχανιστικές οδούς. Αλλά η χρήση τους περιορίζεται από τη σύνθετη φύση και τη σύγκλιση πολλαπλών τύπων κυττάρων που προκαλούν τις πιο σύνθετες ασθένειες. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης ζωικών μοντέλων περιλαμβάνουν την αναπαραγωγικότητα, τον έλεγχο των περιβαλλοντικών παραγόντων, την προσβασιμότητα των σχετικών ιστών, την ακριβή φαινοτυπία, τη διαθεσιμότητα ενός σχεδόν απεριόριστου αριθμού ακριβών βιολογικών αντιγράφων και την ικανότητα πειραματικής παρακολούθησης των υποθέσεων. Οι μελέτες σε ζώα ήταν απαραίτητες για την εξέταση των επιπτώσεων των περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η ανταπόκριση στις διαφορές στη διατροφή, οι οποίες συχνά παρέχουν μηχανιστική εικόνα της σχέσης μεταξύ των δεδομένων “omics” και της αντίδρασης σε έναν παράγοντα άγχους. Επιπροσθέτως, ανανεώσιμοι πληθυσμοί ζωικών μοντέλων, όπως τα συγγενή στελέχη αρουραίων ή ποντικών, μπορούν να διερευνηθούν επανειλημμένα και οι ομογενοποιητικές μελέτες τέτοιων πληθυσμών έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη ισχυρών συνόλων δεδομένων που περιέχουν λεπτομερή “omics”, φυσιολογικά και παθολογικά δεδομένα που συλλέγονται υπό διάφορες συνθήκες. Η σύγκριση των δεδομένων “omics” μεταξύ ανθρώπινων και ζωικών μοντέλων μπορεί να συμβάλει στην επικύρωση της βιολογικής σημασίας του ίδιου του μοντέλου, όπως χρησιμοποιήθηκε σε πρόσφατη μελέτη της νόσου του “Alzheimer (AD)”. Ωστόσο, τα ζωικά μοντέλα έχουν επίσης περιορισμούς. Πολλά από τα γονιδιακά μοντέλα περιορίζονται σε ένα γενετικό υπόβαθρο, τα μοντέλα ποντικών δεν μπορούν να ανακεφαλαιώσουν την ανθρώπινη βιολογία της σύνθετης ασθένειας και ορισμένες εκδηλώσεις ανθρώπινης νόσου μπορεί να είναι δύσκολο να δοκιμαστούν στο μοντέλο ποντικού.

#### 1.4.3 Προσεγγίσεις στην ενοποιητική(integrative) ανάλυση πολλαπλών δεδομένων “omics”

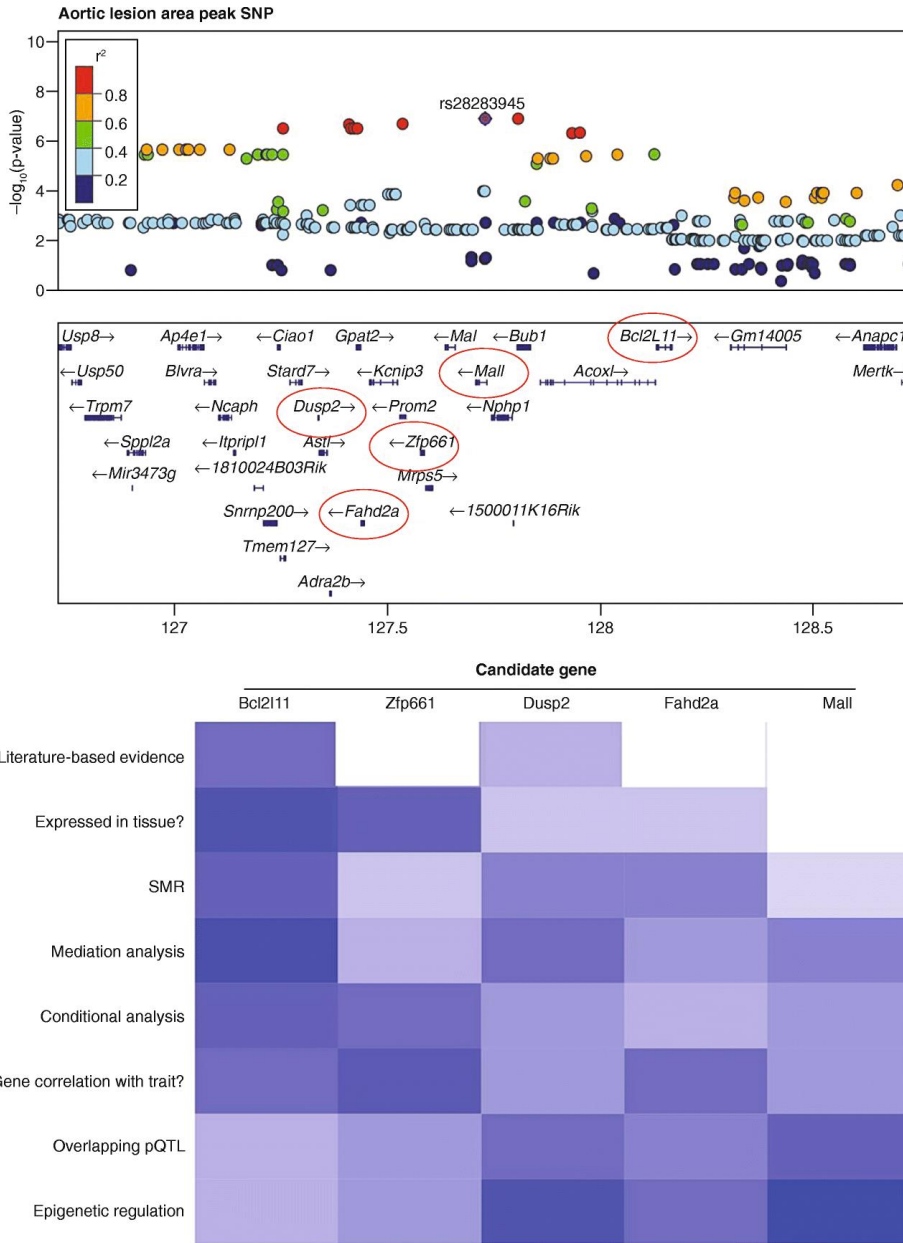
Οι μέθοδοι “multi-omics” έχουν εφαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών προβλημάτων τα οποία ομαδοποιούνται σε τρεις κατηγορίες: “το γονιδίωμα πρώτα”, “ο φαινότυπος πρώτα” και “το περιβάλλον πρώτα”, ανάλογα με την αρχική εστίαση της έρευνας. Έτσι, η πρώτη προσέγγιση γονιδιώματος επιδιώκει να προσδιορίσει τους μηχανισμούς με τους οποίους οι τόποι GWAS συμβάλλουν στην ασθένεια. Η πρώτη προσέγγιση φαινότυπου επιδιώκει να κατανοήσει τις οδούς που συμβάλλουν στην ασθένεια χωρίς να επικεντρώνεται η έρευνα σε έναν συγκεκριμένο τόπο. Και η πρώτη προσέγγιση περιβάλλοντος εξετάζει το περιβάλλον ως κύρια μεταβλητή, ρωτώντας πώς διαταράσσει τις οδούς ή αλληλεπιδρά με τη γενετική ποικιλομορφία. Στη συνέχεια θα συζητήσουμε σύντομα μερικά στατιστικά ζητήματα γύρω από την ενσωμάτωση δεδομένων σε όλα τα στρώματα “Omics” και τη μοντελοποίηση δικτύων.

##### 1.4.3.1 Η προσέγγιση «γονιδίωμα πρώτα»

Απουσία σωματικών μεταλλάξεων, η πρωτογενής ακολουθία DNA παραμένει αναλλοίωτη καθ’ όλη τη διάρκεια της ζωής και δεν επηρεάζεται από το περιβάλλον ή την ανάπτυξη. Έτσι, για τις γενετικές παραλλαγές που συνδέονται με τη νόσο, υποτίθεται ότι μια συγκεκριμένη παραλλαγή συμβάλλει και δεν είναι συνέπεια της ασθένειας. Τέτοιες παραλλαγές αποτελούν ένα πολύ ισχυρό σημείο αγκυροβόλησης για μηχανιστικές μελέτες της αιτιολογίας της νόσου και αλληλεπιδράσεις μοντελοποίησης άλλων “omics”

στρωμάτων. Το “GWAS” συχνά εντοπίζει τόπους που φιλοξενούν τις αιτιώδεις παραλλαγές, αλλά δεν διαθέτει επαρκή ισχύ για να τις διακρίνει από κοντινές παραλλαγές που σχετίζονται με ασθένειες μόνο λόγω της σύνδεσής τους με την αιτιολογική παραλλαγή. Επιπλέον, οι εντοπισμένοι τόποι περιέχουν τυπικά πολλαπλά γονίδια, τα οποία από γονιδιακής άποψης θα μπορούσαν εξίσου να συμβάλλουν στην ασθένεια. Έτσι, αν και τα αποτελέσματα “GWAS” μπορεί να είναι άμεσα χρήσιμα για σκοπούς πρόβλεψης κινδύνου, δεν εμπλέκουν άμεσα ένα συγκεκριμένο γονίδιο ή μονοπάτι, πόσο μάλλον προτείνουν ένα θεραπευτικό στόχο. Ενσωμάτωση με επίκεντρο τον τόπο των επιπρόσθετων “omics” στρωμάτων μπορεί να βοηθήσει στην ταυτοποίηση πολυμορφισμών νουκλεοτιδίων (SNPs) και γονιδίων σε τόπους “GWAS” και στη συνέχεια να εξετάσει τον τρόπο με τον οποίο οι διαδρομές αυτές διαταράσσουν την ασθένεια.

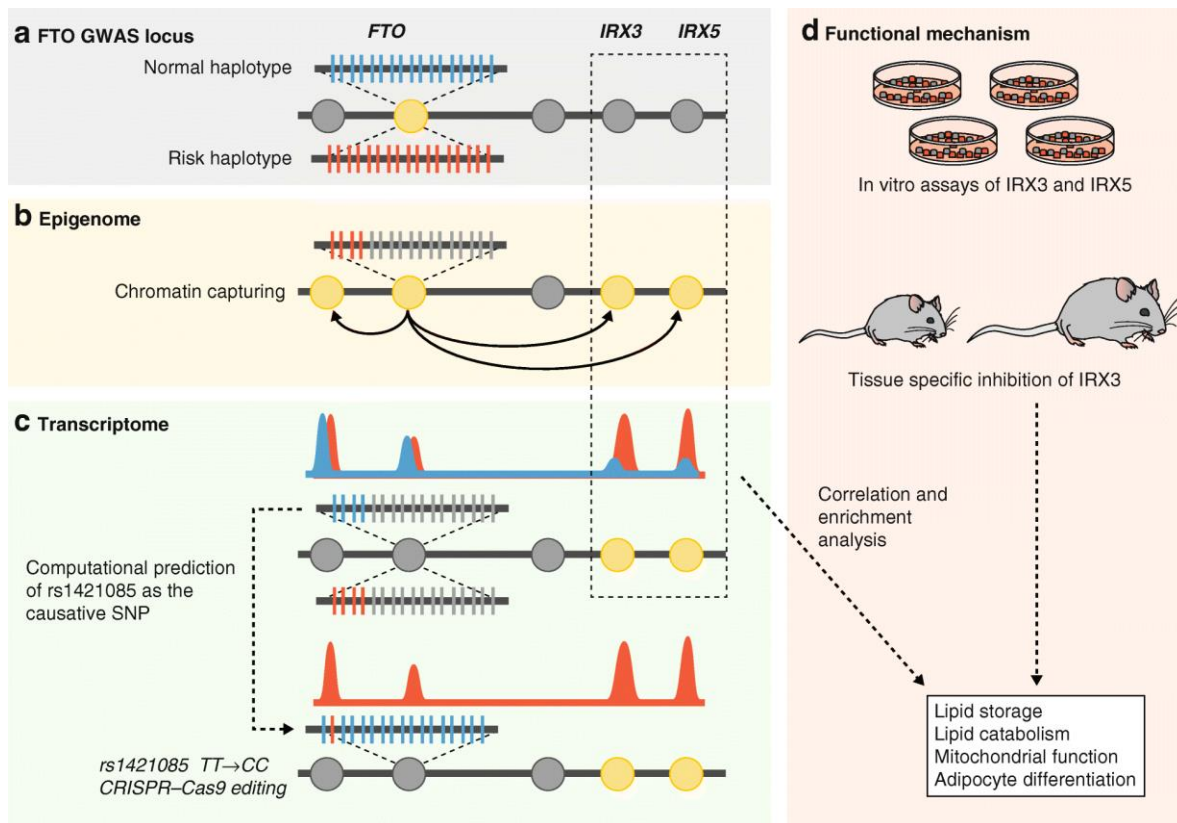
Οι αναλύσεις των αιτιακών παραλλαγών στους τόπους “GWAS” επικεντρώθηκαν αρχικά στις περιοχές κωδικοποίησης, αλλά κατέστη σαφές ότι για πολλές κοινές ασθένειες η κανονιστική διαφοροποίηση εξηγεί το μεγαλύτερο μέρος του κινδύνου. Έτσι, η μεταγραφική μέθοδος, που χρησιμοποιεί είτε συστοιχίες έκφρασης είτε “RNA-Seq” (πίνακας 3), έχει αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την αναγνώριση των αιτιωδών γονιδίων στους τόπους GWAS. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες στατιστικές μέθοδοι για την εξέταση της αιτιότητας που βασίζεται στο “eQTL” στους τόπους “GWAS”, συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης υπό όρους και της ανάλυσης μεσολάβησης (εικόνα 1.22). Μεγάλα σύνολα δεδομένων “eQTL” είναι τώρα διαθέσιμα για έναν αριθμό ιστών σε ανθρώπους και μοντέλα ζώων.



Εικόνα 1.22 Χρήση δεδομένων “omics” για κατάταξη των παραλλαγών “GWAS”.

Η ταυτοποίηση παραγώγων DNA που επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση είναι περίπλοκη καθώς μια ποικιλία στοιχείων, μέσα στο γονίδιο και εκατοντάδες κιλοβάσεις μακριά από το γονίδιο, μπορεί να συμβάλει σε αυτή τη διαδικασία. Τα αποτελέσματα από τα ENCODE (Encyclopedia of DNA elements) και από το “RoadMap Consortia” ήταν ιδιαίτερα χρήσιμα από την άποψη αυτή για τον ορισμό ενισχυτών και προαγωγών σε ποικίλους ιστούς σε ποντίκια και ανθρώπους (πίνακας 3, εικόνα 1.23). Μόλις δημιουργηθούν οι αιτιώδεις παραλλαγές ή γονίδια, άλλα στρώματα “omics” μπορούν να βοηθήσουν στην αναγνώριση των κατάντη αλληλεπιδράσεων ή οδών. Όπως συζητείται περαιτέρω παρακάτω, τα επίπεδα μεταγραφών εμφανίζουν συχνά κακή συσχέτιση με τα επίπεδα πρωτεϊνών και επομένως τα πρωτεομικά δεδομένα αναμένονται να είναι πλησιέστερα προς τους μηχανισμούς της νόσου. Επιπλέον,

μπορούν να χρησιμοποιηθούν πρωτεομικές τεχνικές όπως ζυμομυκήτων δύο υβριδικών οθονών ή αναλύσεις "pull-down" για την ταυτοποίηση διαδρομών που αλληλεπιδρούν συμβάλλοντας στην ασθένεια. Για ορισμένες διαταραχές, η "metabolomics" μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη γεφύρωση μεταξύ γονότυπου και φαινότυπου.



Εικόνα 1.23 Προσέγγιση «γονιδίωμα πρώτα» στην περιοχή "FTO GWAS".

Ένα καλό παράδειγμα μιας πρώτης προσέγγισης του γονιδιώματος είναι η μελέτη του "Claussnitzer" και των συναδέλφων του που περιελάμβανε ανάλυση του τόπου "FTO" που φιλοξενεί την ισχυρότερη συσχέτιση με την παχυσαρκία (εικόνα 1.23). Για να προσδιοριστεί ο τύπος κυττάρων στον οποίο δρα η αιτιώδης παραλλαγή, εξέτασαν τους χάρτες κατάστασης χρωματίνης της περιοχής σε 127 τύπους κυττάρων που είχε στο παρελθόν καταγραφεί το προφίλ τους από το "Project Epigenomics Roadmap" (πίνακας 3). Ένας μακρύς ενισχυτής που δρα σε μεσεγχυματικούς προδρόμους λιποκυττάρων αποδείχθηκε ότι διαφέρει ως προς τη δραστηριότητα μεταξύ του απλοτύπου με κίνδυνου και του απλοτύπου χωρίς κίνδυνο. Στη συνέχεια, διερεύνησαν αλληλεπιδράσεις τρισδιάστατης χρωματίνης (Hi-C) μεγάλης εμβέλειας που εμπλέκουν τον ενισχυτή και ταυτοποίησαν δύο γονίδια, "IRX3" και "IRX5", η έκφραση των οποίων συσχετίζεται με τον απλότυπο κινδύνου σε 20 φορές αλληλομόρφων κινδύνου και 18 φορές αλληλομόρφων μη κινδύνου. Για τον προσδιορισμό των επηρεασμένων βιολογικών διεργασιών, ο "Claussnitzer" και οι συνεργάτες του εξέτασαν συσχετισμούς μεταξύ της έκφρασης των "IRX3" και "IRX5" με άλλα γονίδια στον λιπώδη ιστό από μια ομάδα δέκα ατόμων. Παρατηρήθηκε

ουσιαστικός εμπλουτισμός για γονίδια που εμπλέκονται σε μιτοχονδριακές λειτουργίες και μεταβολισμό λιπιδίων, πράγμα που υποδηλώνει πιθανούς ρόλους στη θερμογένεση. Περαιτέρω εργασία με χρήση της ανάλυσης “trans-eQTL” του τύπου “FTO” πρότεινε μια επίδραση στα γονίδια που εμπλέκονται στο μαύρισμα των λιποκυττάρων. Το μέγεθος των λιποκυττάρων και η περιεκτικότητα σε μιτοχονδριακό DNA στη συνέχεια μελετήθηκαν για 24 αλληλόμορφα κινδύνου και 34 αλληλόμορφα μη-κινδύνου και αποδείχθηκαν ότι διαφέρουν σημαντικά, σύμφωνα με την αυτόνομη επίδραση του λιποκυττάρου στο ενεργειακό ισοζύγιο. Ο “Claussnitzer” και οι συνεργάτες του επιβεβαίωσαν τους ρόλους των “IRX2” και “IRX5” χρησιμοποιώντας πειραματικό χειρισμό σε πρωτεύοντα λιποκύτταρα και σε ποντίκια. Τέλος, η αιτιώδης παραλλαγή στον τόπο FTO προβλεπόταν χρησιμοποιώντας διασταυρούμενη διατήρηση των ειδών και η στοχευμένη επεξεργασία με το “CRISPR-Cas9” ταυτοποίησε μία απλή παραλλαγή νουκλεοτιδίου που διαταράσσει την δέσμευση του αναστολέα “ARID5B”.

#### 1.4.3.2 Η προσέγγιση «φαινότυπος πρώτα»

Ένας διαφορετικός τρόπος να χρησιμοποιούμε δεδομένα “omics” για να αυξήσουμε την κατανόησή μας για την ασθένεια είναι να δοκιμάσουμε απλώς συσχετισμούς μεταξύ της νόσου ή των παραγόντων που συνδέονται με την ασθένεια και των δεδομένων που βασίζονται σε “omics”. Μόλις διαφορετικές παρουσίες δεδομένων “omics” συσχετίζονται με έναν συγκεκριμένο φαινότυπο, μπορούν να τοποθετηθούν σε ένα λογικό πλαίσιο που υποδεικνύει τις επηρεαζόμενες οδούς και παρέχει μια εικόνα για το ρόλο διαφόρων παραγόντων στην ανάπτυξη της νόσου.

Για παράδειγμα, ο “Gjoneska” χρησιμοποίησε μεταγραφικά και επιγονιδιωματικά δεδομένα για να δείξει ότι η γονιδιωματική και η περιβαλλοντική συμβολή στην “AD” δρουν μέσω διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Οι συγγραφείς αναγνώρισαν για πρώτη φορά ομάδες γονιδίων που αντανακλούν μεταβατικές ή παρατεταμένες αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και πληθυσμών κυττάρων κατά τη διάρκεια ανάπτυξης AD. Σύμφωνα με την παθοφυσιολογία του “AD”, τα μεταγραφικά δεδομένα έδειξαν παρατεταμένη αύξηση των σχετιζόμενων με ανοσολογία γονιδίων, ενώ οι συναπτικές λειτουργίες και οι λειτουργίες μάθησης έδειξαν παρατεταμένη μείωση. Οι συγγραφείς στη συνέχεια χρησιμοποίησαν την ανοσοκαταβύθιση χρωματίνης και την αλληλουχία επόμενης γενιάς (NGS) για να καταγράψουν επτά διαφορετικές επιγενετικές τροποποιήσεις που σηματοδοτούν διαφορετικές λειτουργικές καταστάσεις χρωματίνης. Μπορούν να αναγνωρίσουν χιλιάδες προαγωγούς και ενισχυτές που έδειξαν σημαντικά διαφορετικές καταστάσεις χρωματίνης σε “AD” έναντι ελέγχου. Στη συνέχεια, οι συγγραφείς έδειξαν ότι αυτές οι επιγενετικές μεταβολές αντιστοιχούν στις παρατηρούμενες αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση και χρησιμοποίησαν ανάλυση εμπλουτισμού για να αναγνωρίσουν πέντε μοτίβα παράγοντα μεταγραφής εμπλουτισμένα στους ενεργοποιημένους προαγωγούς και ενισχυτές και δύο στα κατασταλαμένα στοιχεία. Τέλος, οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν τα διαθέσιμα δεδομένα “GWAS” για να δουν αν οι γενετικές παραλλαγές που σχετίζονται με “AD” αλληλεπικαλύπτονται με οποιαδήποτε από τις λειτουργικές περιοχές που ταυτοποίησαν. Συγκεκριμένα, διαπίστωσαν ότι οι γενετικές παραλλαγές που σχετίζονται με “AD” εμπλουτίζονται σημαντικά στους ενισχυτές που σχετίζονται με την ανοσολογική λειτουργία αλλά όχι στους προαγωγούς ή στους ενισχυτές που σχετίζονται με τη νευρωνική λειτουργία. Αυτό οδήγησε τους συγγραφείς να υποδείξουν ότι η γενετική προδιάθεση για τον “AD” δρα ως επί το πλείστον μέσω της δυσλειτουργίας των ανοσολογικών λειτουργιών, ενώ οι επιγενετικές μεταβολές στα νευρωνικά κύτταρα είναι ως επί το πλείστον περιβαλλοντικά καθοδηγούμενες.



Σε ένα άλλο παράδειγμα, ο “Lundby” και οι συνάδελφοί του χρησιμοποίησαν ποσοτική πρωτεομική αλληλεπίδρασης συγκεκριμένου ιστού, σε συνδυασμό με δεδομένα από μελέτες GWAS, για να εντοπίσουν ένα δίκτυο γονιδίων που εμπλέκονται σε καρδιακές αρρυθμίες. Οι συγγραφείς άρχισαν επιλέγοντας πέντε γονίδια υποκείμενα σε μενδελικές μορφές συνδρόμου μακρού QT και ανοσοκαταβύθισαν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες από προϊόντα λύσης των καρδιών ποντικών. Χρησιμοποιώντας τη φασματομετρία μάζας (MS), εντόπισαν έπειτα 584 πρωτεΐνες που συνκατακρημνίστηκαν με τις πέντε πρωτεΐνες-στόχους, αντανακλώντας πιθανές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Αξιοσημείωτα, πολλές από αυτές τις 584 πρωτεΐνες είχαν προηγουμένως δειχθεί ότι αλληλεπιδρούν με διαύλους ιόντων, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω τη φυσιολογική σημασία αυτού του πειράματος. Στη συνέχεια συνέκριναν αυτόν τον κατάλογο πρωτεϊνών με τα γονίδια που βρίσκονται σε 35 “GWAS loci” για κοινές μορφές παραλλαγής διαστήματος “QT” και ταυτοποίησαν 12 γονίδια που επικαλύπτονταν μεταξύ των δύο συνόλων. Αυτή η μελέτη παρέχει μια μηχανική σύνδεση μεταξύ συγκεκριμένων γονιδίων σε μερικούς από τους τόπους “GWAS” με τον συγκεκριμένο γονότυπο, γεγονός που υποδηλώνει μια αιτιολογική σύνδεση στον τόπο.

#### 1.4.3.3 Η προσέγγιση «περιβάλλον πρώτα»

Σε αυτή την προσέγγιση, χρησιμοποιούνται “multi-omics” αναλύσεις για τη διερεύνηση των μηχανιστικών δεσμών με την ασθένεια χρησιμοποιώντας έναν περιβαλλοντικό παράγοντα όπως η διατροφή ως μεταβλητή. Η ακριβής αξιολόγηση περιβαλλοντικών παραγόντων ή παραγόντων ελέγχου όπως η διατροφή στους ανθρώπους είναι πολύ δύσκολη και έτσι τα ζωικά μοντέλα αποδείχθηκαν ιδιαίτερα πολύτιμα για την εξέταση του αντίκτυπου του περιβάλλοντος στις ασθένειες. Εδώ, δίνουμε τρία παραδείγματα “multi-omics” σχεδίων μελέτης που χρησιμοποιούνται για να εξετάσουν τον αντίκτυπο του περιβάλλοντος στην ασθένεια.

Ένα είδος μελέτης μελέτης είναι η εξέταση πολλαπλών περιβαλλοντικών συνθηκών για τον προσδιορισμό του τρόπου με τον οποίο διαταράσσονται οι φυσιολογικοί, μοριακοί και κλινικοί φαινοτύποι. Για παράδειγμα, ο “Solon-Biet” και οι συνάδελφοί του διερεύνησαν τη συμβολή 25 διαφορετικών δίαιτων στη γενική υγεία και μακροζωία σε πάνω από 800 ποντίκια. Συγκρίθηκαν η αλληλεπίδραση μεταξύ του λόγου των μακροθρεπτικών συστατικών με μια μυριάδα καρδιομεταβολικών χαρακτηριστικών (όπως η διάρκεια ζωής, τα προφίλ ορού, η ηπατική μιτοχονδριακή δραστηριότητα, η αρτηριακή πίεση και η ανοχή γλυκόζης) προκειμένου να διασαφηνιστούν συγκεκριμένες διαιτητικές συνθέσεις που σχετίζονται με βελτιωμένη υγεία. Η αναλογία πρωτεΐνης προς υδατάνθρακα στη διατροφή έχει δειχθεί ότι έχει βαθιές επιδράσεις στις παραμέτρους της υγείας αργότερα στη ζωή, προσφέροντας μηχανιστική εικόνα για το πώς αυτό επιτυγχάνεται.

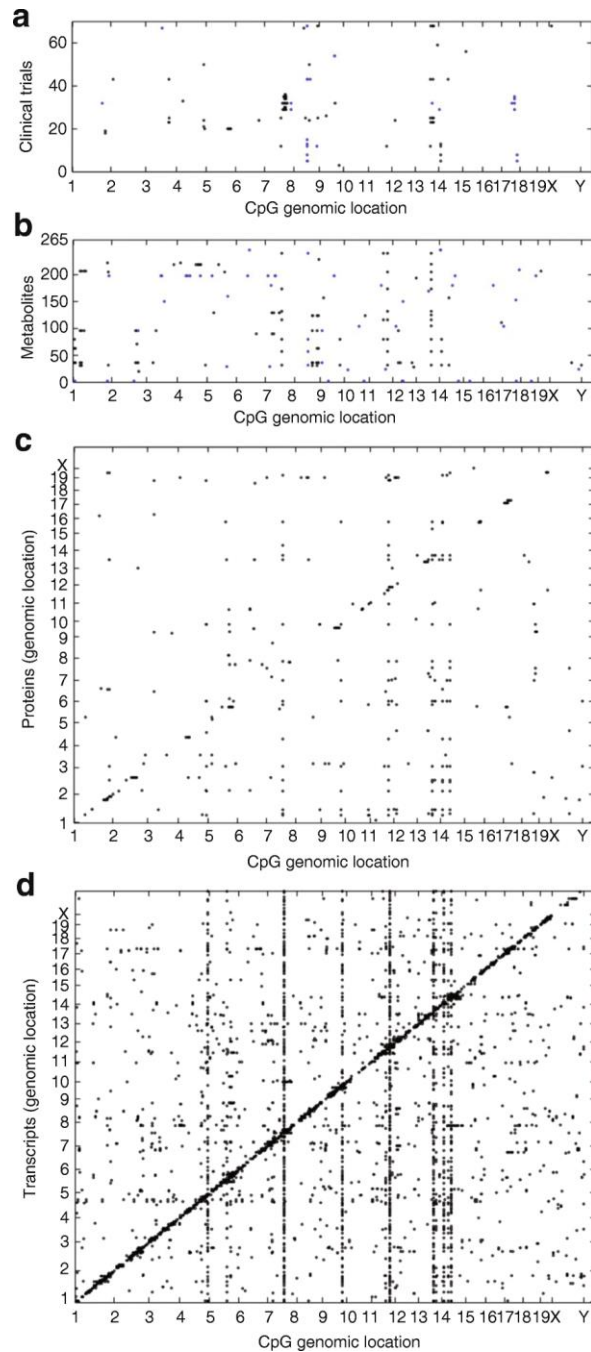
Ο δεύτερος σχεδιασμός μελέτης επιδιώκει να κατανοήσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της γενετικής και του περιβάλλοντος. Για παράδειγμα, ο Parks και οι συνεργάτες του μελέτησαν πρόσφατα τις επιδράσεις μιας δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και υψηλής σακχαρώζης σε περίπου 100 διαφορετικά στελέχη ποντικών. Με την εξέταση της παγκόσμιας γονιδιακής έκφρασης σε πολλαπλούς ιστούς και μεταβολίτες στο πλάσμα, ήταν σε θέση να αναγνωρίσουν μονοπάτια και γονίδια που συμβάλλουν στην παχυσαρκία και τον διαβήτη που προκαλείται από τη διατροφή. Στην περίπτωση των διαιτητικών παραγόντων, το “microbiome” του εντέρου εισάγει έναν επιπρόσθετο βαθμό πολυπλοκότητας καθώς ανταποκρίνεται ιδιαίτερα στις διατροφικές προκλήσεις και επίσης συμβάλλει σημαντικά στη φυσιολογία

και την ασθένεια του ξενιστή. Πρόσφατες μελέτες “multi-omics” έχουν αποκαλύψει την επίδραση του “microbiota” του εντέρου στις αποκρίσεις του ξενιστή στην αλλαγή της διατροφής και στον επιγενετικό προγραμματισμό.

Ο τρίτος τύπος σχεδίου μελέτης περιλαμβάνει τη στατιστική μοντελοποίηση των ροών του μεταβολίτη ως απάντηση σε συγκεκριμένα υποστρώματα. Για παράδειγμα, η ενσωμάτωση βιβλιογραφικών, μεταβολικών και γονιδιωματικών δεδομένων έχει χρησιμοποιηθεί για την αναδημιουργία της δυναμικής περιοχής ροής των μεταβολιτών των οργανισμών, η οποία πραγματοποιήθηκε αρχικά σε “*Escherichia coli*” και έκτοτε επεκτάθηκε σε ζυμομύκητες και σε μεμονωμένους ιστούς σε ποντίκια και ανθρώπους. Άλλες εφαρμογές έχουν διερευνήσει διάφορες συνδέσεις μεταξύ μοντέλων του “metabolome” (το σύνολο των μεταβολιτών) και άλλων επιπέδων πληροφοριών, συμπεριλαμβανομένου του μεταγραφικού και του πρωτεομικού. Η βελτίωση αυτών των τεχνικών και η μετέπειτα εφαρμογή τους σε μεγαλύτερα σύνολα δεδομένων σε ολόκληρο τον πληθυσμό θα οδηγήσει πιθανόν στην αποσαφήνιση νέων βασικών ρυθμιστικών κόμβων στον έλεγχο των μεταβολιτών.

#### 1.4.3.4 Ενσωμάτωση δεδομένων μεταξύ επιπέδων “multi-omics”

Μια ποικιλία προσεγγίσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενσωμάτωση δεδομένων σε πολλαπλά επίπεδα “omics” ανάλογα με το σχεδιασμό της μελέτης. Δύο συχνά χρησιμοποιούμενες προσεγγίσεις περιλαμβάνουν απλή συσχέτιση ή συν-χαρτογράφηση. Επομένως, εάν δύο στοιχεία “omics” μοιράζονται έναν κοινό οδηγό, ή αν το ένα διαταράσσει το άλλο, θα παρουσιάσουν συσχέτιση (εικόνα 1.24). Έχουν αναπτυχθεί ορισμένες εξειδικευμένες στατιστικές προσεγγίσεις που βασίζονται συχνά στην ρύθμιση των συνθηκών. Σε αυτές τις προσεγγίσεις, χρησιμοποιείται ένα στατιστικό μοντέλο για να εκτιμηθεί εάν κάθε στοιχείο του μοντέλου - για παράδειγμα, ένα “SNP” και η αλλαγή της έκφρασης - συμβάλλει στην ασθένεια ανεξάρτητα, ή αν το ένα είναι η λειτουργία του άλλου. Για παράδειγμα, αναπτύχθηκε μια μέθοδος με βάση την παλινδρόμηση που ονομάστηκε “ανάλυση μεσολάβησης” για την ενσωμάτωση των δεδομένων “SNP” και γονιδιακής έκφρασης, την αντιμετώπιση δηλαδή της γονιδιακής έκφρασης ως μεσολαβητή στον αιτιώδη μηχανισμό από “SNPs” σε ασθένειες. Παρόμοιες προσεγγίσεις έχουν εφαρμοστεί σε άλλα επίπεδα “omics”. Σε γενικές γραμμές, τα πολυεπίπεδα “omics” δεδομένα μπορούν να μοντελοποιηθούν ως δίκτυα, με βάση μια προσέγγιση με γνώμονα τα δεδομένα ή βάσει προηγούμενων γνώσεων των μοριακών δικτύων. Μια πρακτική θεώρηση σε “multi-omics” μελέτες είναι η συσχέτιση των ταυτοτήτων των ίδιων αντικειμένων σε επίπεδα “omics”, γνωστά ως μετατροπή ταυτότητας. Αυτό γίνεται χρησιμοποιώντας βάσεις δεδομένων μονοπατιών όπως “KEGG” και πίνακες διασταύρωσης. Στην ιδανική περίπτωση, τα σύνολα δεδομένων “multi-omics” θα συγκεντρωθούν στο ίδιο σύνολο δειγμάτων, αλλά αυτό δεν είναι πάντα δυνατό. Το “GWAS” και τα δεδομένα έκφρασης συλλέγονται συχνά από διαφορετικά υποκείμενα. Σε τέτοιες περιπτώσεις, είναι δυνατόν να εξαχθούν γενετικές υπογραφές (“eQTL”) ή φαινότυποι που βασίζονται σε γονότυπους.



Εικόνα 1.24 Η ροή της βιολογικής πληροφορίας από μεθυλίωση “DNA” στο σκυάτι σε “transcripts” στο σκυάτι, πρωτεΐνες και μεταβολίτες.

Η διερεύνηση των ποσοτικών κανόνων που διέπουν τη ροή πληροφοριών από το ένα στρώμα στο άλλο είναι επίσης σημαντική κατά τη μοντελοποίηση πολλαπλών τύπων δεδομένων. Για παράδειγμα, μία από τις θεμελιώδεις υποθέσεις πίσω από πολλά από τα δίκτυα συν-έκφρασης “RNA” είναι ότι οι διακυμάνσεις στην αφθονία του “RNA” αντικατοπτρίζονται από τις πρωτεΐνες. Ωστόσο, ενώ τα εργαλεία για αποτελεσματική καταγραφή των μεταγραφικών επιπέδων είναι ευρέως διαθέσιμα και

χρησιμοποιούνται συχνά, η αποτελεσματική καταγραφή των μεταγραφικών επιπέδων στο επίπεδο του πληθυσμού είναι μια σχετικά νέα δυνατότητα (πίνακας 3). Ένας αριθμός μελετών έδειξε ότι ενώ τα επίπεδα πολλών πρωτεϊνών συσχετίζονται έντονα με τα επίπεδα μεταγραφής τους, όπως η “eQTL” και η πρωτεΐνη “QTL” (pQTL), οι συσχετισμοί για τα περισσότερα ζεύγη μεταγραφικών πρωτεϊνών είναι μέτρια. Η παρατηρούμενη ασυμφωνία των μεταγραφικών επιπέδων και των επιπέδων των πρωτεϊνών είναι πιθανό να εξηγηθεί από τη ρύθμιση της μετάφρασης, των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και της μεταβολής των πρωτεϊνών. Μαζί αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ότι το “RNA” μπορεί να είναι ένας καλός προγνωστικός παράγοντας αφθονίας μόνο ορισμένων πρωτεϊνών, προσδιορίζοντας ομάδες γονιδίων που υπακούουν σε αυτόν τον κανόνα και εκείνα που δεν το κάνουν. Στο πλαίσιο της έρευνας προσανατολισμένης στις ασθένειες, τέτοιες μελέτες αποτελούν ένα σημαντικό βήμα για τη δημιουργία ενός αναλυτικού πλαισίου το οποίο θα εφαρμοστεί αργότερα στην ερμηνεία των δεδομένων συγκεκριμένων ασθενειών. Επιπλέον, ειδικά σε σχέση με την περιορισμένη διαθεσιμότητα ανθρώπινων δειγμάτων, τέτοιες μελέτες είναι χρήσιμες για την επιλογή μεταξύ πιθανών πειραματικών προσεγγίσεων.

Μια βασική ιδέα της σύγχρονης βιολογίας είναι ότι τα γονίδια και τα προϊόντα τους συμμετέχουν σε πολύπλοκα, διασυνδεδεμένα δίκτυα, παρά σε γραμμικά μονοπάτια. Ένας τρόπος για να μοντελοποιηθούν τέτοια δίκτυα είναι μέσω γράφων που αποτελούνται από στοιχεία που επιδεικνύουν συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις με άλλα στοιχεία. Τέτοια δίκτυα κατασκευάστηκαν πρώτα με βάση τις μεταβολικές οδούς, με τους μεταβολίτες να αντιστοιχούν στους κόμβους και τις ενζυμικές μετατροπές στις γραμμές. Στη συνέχεια, τα δίκτυα μοντελοποιήθηκαν με βάση την συν-έκφραση σε μια σειρά διαταραχών με τα γονίδια που κωδικοποιούν τις μεταγραφές να αντιστοιχούν στους κόμβους και τις συσχετίσεις στις γραμμές. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών, οι γραμμές μπορούν να βασίζονται σε φυσικές αλληλεπιδράσεις, όπως εκείνες που εντοπίστηκαν από δυ-υβριδικές αναλύσεις ζύμης σε παγκόσμια κλίμακα ή από μια σειρά “pulldowns”. Τα δίκτυα μπορούν επίσης να διαμορφωθούν με βάση τις γονιδιωματικές αλληλεπιδράσεις γνωστές από τα δεδομένα “HiC” και οι φυσικές αλληλεπιδράσεις μπορούν επίσης να μετρηθούν σε διαφορετικά στρώματα, όπως στο “ChIP-Seq”, το οποίο ποσοτικοποιεί τη δέσμευση του “DNA” από συγκεκριμένες πρωτεΐνες.

Για μελέτες ασθένειας, τα δίκτυα συν-έκφρασης μπορούν να κατασκευαστούν με βάση παραλλαγές στην γονιδιακή έκφραση που εμφανίζονται μεταξύ των μαρτύρων και των ατόμων που έχουν προσβληθεί ξεχωριστά. Η σύγκριση της αρχιτεκτονικής των δικτύων μεταξύ ομάδων ελέγχου και ασθενειών επιτρέπει την αναγνώριση στενά συνδεδεμένων κόμβων (“μονάδων”) που συσχετίζονται περισσότερο με την κατάσταση της νόσου. Γενικά, τα δίκτυα συν-έκφρασης ή αλληλεπίδρασης είναι “μη κατευθυνόμενα” υπό την έννοια ότι η αιτιώδης φύση των αλληλεπιδράσεων είναι άγνωστη. Τα δίκτυα αλληλεπίδρασης μπορούν να δοκιμαστούν πειραματικά, παρόλο που ο υψηλός αριθμός ενδεικτικών αλληλεπιδράσεων που εντοπίστηκαν σε κάθε μελέτη καθιστά τις δοκιμές απαγορευτικές. Εάν είναι διαθέσιμα γενετικά δεδομένα, όπως οι τόποι “GWAS” για ασθένειες ή “eQTL” για γονίδια, μπορεί να είναι δυνατό να συναχθεί η αιτιότητα χρησιμοποιώντας το DNA ως άγκυρα. Αυτή η ενσωμάτωση της γενετικής πληροφορίας με τη μοντελοποίηση των δικτύων έχει χρησιμοποιηθεί για την επισήμανση μονοπατιών που συμβάλλουν στην ασθένεια και για τον εντοπισμό «βασικών οδηγών» στις βιολογικές διεργασίες. Για παράδειγμα, ο “Marbach” και οι συνάδελφοί του συνένωσαν τη γονιδιωματική, την επιγονιδιωματική και τη μεταγραφική διάγνωση για να διασαφηνίσουν ρυθμιστικά κυκλώματα ειδικά για ιστούς σε 394 τύπους ανθρώπινων κυττάρων. Στη συνέχεια επικάλυψαν τα αποτελέσματα GWAS των ασθενειών σε ιστικά ρυθμιστικά δίκτυα στους ιστούς που σχετίζονται με τη νόσο και εντόπισαν ενόητες ιδιαίτερα εμπλουτισμένες για γενετικές παραλλαγές σε κάθε νόσο. Σε ένα άλλο παράδειγμα, ο “Zhang” και οι

συνάδελφοί του εξέτασαν τα επίπεδα μεταγραφής από τους εγκεφάλους ατόμων με καθυστερημένη εμφάνιση “AD” και ανέλυαν τη συν-έκφραση και το “Bayesian” αιτιώδες μοντέλο για να αναγνωρίσουν τις ενότητες που σχετίζονται με τις ασθένειες και τα βασικά γονίδια οδηγού, σημαντικά στις οδούς ρύθμισης της νόσου. Μαζί, αυτές οι μελέτες απεικονίζουν τον τρόπο με τον οποίο η ανάλυση του δικτύου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να περιορίσει το επίκεντρο της έρευνας ασθενειών σε συγκεκριμένες λειτουργικές πτυχές συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων ή ιστών, διευκολύνοντας σημαντικά τις κατάντη μηχανιστικές προσπάθειες και την παραγωγή υποθέσεων. (12)

## 1.5 Σκοπός της έρευνας

Στην εποχή της παραγωγής μεγάλου όγκου δεδομένων, τεχνολογίες ικανές να παρέχουν χαμηλού κόστους και αξιόπιστα δεδομένα είναι κυρίαρχες. Οι μικρο-συστοιχίες αντισωμάτων ανήκουν ανάμεσα στα πιο αποδοτικά εργαλεία στην ιατρική και βιολογική έρευνα.

Παρ’ όλ’ αυτά, ακόμη η κατασκευή μικρο-συστοιχειών αντισωμάτων είναι μια ακριβή διαδικασία και κύριος λόγος είναι το γεγονός ότι οι υπάρχουσες τεχνολογίες μικρο-συστοιχιών χρησιμοποιούν υγρούς όγκους για εκτύπωση. Αυτό απαιτεί μεγάλες ποσότητες στερεών αντισωμάτων για επανενυδάτωση προκειμένου να φτιαχτούν οι υγροί όγκοι. Ωστόσο, τα αντισώματα είναι εξαιρετικά ακριβά και επίσης σε υγρή μορφή έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής, ενώ ταυτόχρονα δεν παρέχουν τη δυνατότητα εκτύπωσης “on demand”. Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η ανάπτυξη μιας μεθόδου για κατασκευή μικρο-συστοιχιών αντισωμάτων με χρήση αντισωμάτων στερεάς φάσης, παρακάμπτοντας την ανάγκη επανενυδάτωσης. Επιπρόσθετα, η μέθοδος εκτύπωσης που εφαρμόζεται σε αυτή την εργασία παρέχει ένα «μπόνους» πλεονεκτήματα, μικρότερης διαμέτρου κηλίδες εκτύπωσης, πράγμα που επιτρέπει κατασκευή μικρότερων και φτηνότερων συστοιχιών.



## 2. Υλικά και μέθοδοι: «Εκτύπωση» χωρίς επαφή μικρο-συστοιχιών αντισωμάτων στερεής φάσης με εναπόθεση λέιζερ

Σκοπός ανάπτυξης αυτής της τεχνολογίας κατασκευής μικρο-συστοιχιών, ήταν η δυνατότητα κατασκευής μικρο-συστοιχιών με χρήση στερεών(λυοφιλοποιημένων) αντισωμάτων, παρακάμπτοντας την ανάγκη επανενυδάτωσης, λόγω των πλεονεκτημάτων που αυτό έχει, όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα. Προκειμένου να εκτυπωθούν αντισώματα σε στερεή φάση, ήταν επίσης απαραίτητη η χρήση μιας μεθόδου εκτύπωσης διαφορετικής από τις υπάρχουσες, λόγω της προφανούς αιτίας ότι οι υπάρχουσες τεχνολογίες μπορούν να διαχειριστούν μόνο υγρούς όγκους. Στο κεφάλαιο αυτό, αυτή η νέα τεχνολογία παρατίθεται αναλυτικά μαζί με το θεωρητικό υπόβαθρο, τις τεχνολογίες των επιμέρους διαδικασιών, τα πειράματα και τα αποτελέσματα αυτής της νέας και πρώιμης τεχνολογίας.

### 2.1 Αντισώματα

Το κύριο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα ήταν το αντίσωμα IgG PE αντι-μυώς κατσίκας (Santa Cruz Biotechnology, USA). Αργότερα το παραπάνω αντίσωμα αποσύρθηκε και αντικαταστάθηκε από το m-IgGk BP-PE (Santa Cruz Biotechnology, USA) το προτεινόμενο εναλλακτικό της εταιρίας για το αντίσωμα IgG PE αντι-μυώς κατσίκας. Στα επόμενα εδάφια της εργασίας αναφορά σε αυτό το αντίσωμα θα γίνεται ως το αντίσωμα 1. Αυτά τα αντισώματα επιλέχθηκαν για δύο λόγους. Πρώτον, επειδή τα αντισώματα αυτά είχαν προσδεσμένα στα μόριά τους μόρια φυκοερυθρίνης, πράγμα που έδινε τη δυνατότητα παρακολούθησης και ελέγχου των συστοιχιών μετά την εκτύπωση (θα αναλυθεί αργότερα το πως). Ο δεύτερος λόγος, ήταν το γεγονός ότι τα συγκεκριμένα αντισώματα, το εργαστήριο τα προμηθευόταν ήδη για άλλα πειράματα, οπότε βόλευε να χρησιμοποιηθούν αυτά, δεδομένου ότι δεν υπήρχε προϋπάρχουσα γνώση πάνω στο ποιο αντίσωμα από τα αναρίθμητα που υπάρχουν θα ήταν το καταλληλότερο για τα πειράματα.

Ένα άλλο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το αντίσωμα για την ανθρώπινη ιντερλευκίνη-5 κουνελιού (Pepro Tech, USA). Στα επόμενα εδάφια της εργασίας αναφορά σε αυτό το αντίσωμα θα γίνεται ως το αντίσωμα 2. Το συγκεκριμένο αντίσωμα ήταν απαραίτητο για να ελεγχθεί η λειτουργικότητα των αντισωμάτων των μικρο-συστοιχιών. Με απλά λόγια, αυτό το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε για την εκτύπωση μικρο-συστοιχιών και σε αυτές εφαρμόστηκε ένα απλό πρωτόκολλο λογικής “elisa” με χρήση συμπληρωματικού αντισώματος με σκοπό να ελεγχθεί αν τα αντισώματα των συστοιχιών θα «δέσουν» με τα συμπληρωματικά τους (θα αναλυθεί αργότερα με λεπτομέρεια).

### 2.2 Λυοφιλοποίηση

Λόγω του ότι τα αντισώματα ήταν στη μορφή υγρών διαλυμάτων, προκειμένου να προχωρήσουν τα πειράματα, τα αντισώματα λυοφιλοποιήθηκαν. Η λυοφιλοποίηση (“lyophilization”, “freeze-drying”, “cryodesiccation”) είναι μία διαδικασία αφυδάτωσης συνήθως χρησιμοποιούμενη για τη διατήρηση βραχύβιων υλικών ή για την τροποποίησή τους για πιο εύκολη μεταφορά. Η λυοφιλοποίηση λειτουργεί

ψύχοντας το υλικό και στη συνέχεια μειώνοντας την περιβάλλουσα πίεση ώστε να επιτραπεί στο παγωμένο νερό που εμπεριέχεται στο υλικό να μεταβεί απευθείας από την στερεή στην αέρια κατάσταση.

### 2.2.1 Διαδικασία λυοφιλοποίησης

Η πλήρης διαδικασία λυοφιλοποίησης περιλαμβάνει τέσσερα στάδια: την προεπεξεργασία, την ψύξη, την κύρια αφυδάτωση και την δευτερογενή αφυδάτωση.

#### 1. Προεπεξεργασία

Η προεπεξεργασία περιλαμβάνει κάθε μέθοδο επεξεργασίας του προϊόντος που προηγείται της ψύξης. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει τη συγκέντρωση του προϊόντος, αναθεώρηση της διαδικασίας (π.χ. προσθήκη συστατικών για αύξηση της σταθερότητας, διατήρηση εμφάνισης, και/ή βελτίωση της διαδικασίας), μείωση υψηλής πίεσης ατμού διαλύτη, ή αύξηση της επιφάνειας. Κομμάτια φαγητού συχνά περνούν από επεξεργασία "IQF(Individually Quick Frozen)"<sup>2</sup> προκειμένου να εξασφαλιστεί ελεύθερη ροή πριν την λυοφιλοποίηση. Σε πολλές περιπτώσεις, η απόφαση για προεπεξεργασία ενός προϊόντος είναι βασισμένη στη θεωρητική γνώση της λυοφιλοποίησης και των προϋποθέσεων της, ή απαιτείται από το χρόνο του κύκλου ή τις προδιαγραφές ποιότητας προϊόντος.

#### 2. Ψύξη

Σε ένα εργαστήριο, αυτή η διαδικασία συχνά πραγματοποιείται τοποθετώντας το υλικό σε μία φλάσκα λυοφιλοποίησης και περιστρέφοντας τη φλάσκα σε λουτρό, γνωστό ως κέλυφος ψύξης, το οποίο ψύχεται με μηχανική ψύξη, με ξηρό πάγο σε υδατική μεθανόλη ή υγρό άζωτο. Σε μεγαλύτερη κλίμακα, η ψύξη πραγματοποιείται συνήθως με μηχανή λυοφιλοποίησης. Στο βήμα αυτό, είναι σημαντικό να ψυχθεί το υλικό κάτω από το «τριπλό» σημείο του, τη χαμηλότερη δηλαδή θερμοκρασία στην οποία η στερεή και υγρή κατάσταση του υλικού μπορούν να συνυπάρξουν. Αυτό εξασφαλίζει ότι στα επόμενα βήματα θα πραγματοποιηθεί εξάχνωση και όχι λιώσιμο. Όσο μεγαλύτεροι οι κρύσταλλοι τόσο πιο εύκολο είναι να εξαχνωθούν. Για να παραχθούν μεγάλοι κρύσταλλοι, το προϊόν πρέπει να ψυχθεί αργά ή μπορεί να εκτελεί κύκλους μεταξύ μια υψηλής και μιας χαμηλής θερμοκρασίας. Αυτή η κυκλική διαδικασία ονομάζεται ανόπτωση. Ωστόσο, στην περίπτωση του φαγητού ή αντικειμένων που διέθεταν ζωντανά κύτταρα, μεγάλοι κρύσταλλοι πάγου θα σπάσουν τα τοιχώματα του κυττάρου (πρόβλημα που ανακαλύφθηκε και επιλύθηκε από τον "Clarence Birdseye"), καταλήγοντας στην καταστροφή περισσότερων κυττάρων, το οποίο μπορεί οδηγήσει σε κακή υφή προϊόντος και μείωση του θρεπτικού περιεχομένου του. Σε αυτή τη περίπτωση, η ψύξη πραγματοποιείται ραγδαία με σκοπό να οδηγήσουμε το υλικό γρηγορότερα στο ευτηκτικό του σημείο, αποφεύγοντας έτσι το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου. Συνήθως οι θερμοκρασίες ψύξης κυμαίνονται μεταξύ  $-50^{\circ}\text{C}$  και  $-80^{\circ}\text{C}$ . Η φάση της ψύξης είναι η πιο κρίσιμη στην όλη διαδικασία λυοφιλοποίησης επειδή το προϊόν μπορεί να αποτύχει αν ψυχθεί ακατάλληλα.



Τα άμορφα υλικά δεν έχουν ευτηκτικό σημείο, αλλά έχουν κρίσιμο σημείο κάτω από το οποίο το προϊόν πρέπει να παραμείνει για να αποφευχθεί λιώσιμο ή κατάρρευση κατά τη διάρκεια της πρωτοταγούς ή της δευτεροταγούς αφυδάτωσης.

### 3. Πρωτοταγής αφυδάτωση

Κατά τη φάση της πρωτοταγούς αφυδάτωσης, η πίεση μειώνεται (σε τάξη μεγέθους μερικών millibars) και παρέχεται αρκετή θερμότητα στο υλικό προκειμένου να εξαχνωθεί ο πάγος. Η ποσότητα θερμότητας μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας τη λανθάνουσα θερμότητα των μορίων προς εξάχνωση. Σε αυτή την αρχική φάση αφυδάτωσης, περίπου το 95% του νερού στο υλικό εξαχνώνεται. Αυτή η φάση μπορεί να είναι αργή (στη βιομηχανία μπορεί να παίρνει αρκετές ημέρες) επειδή αν προστεθεί πάρα πολύ θερμότητα η δομή του υλικού μπορεί να αλλάξει.

Σε αυτή τη φάση, η πίεση ελέγχεται μέσω εφαρμογής μερικού κενού. Το κενό επιταχύνει την εξάχνωση, κάνοντας το χρήσιμο σαν μία μέθοδο εξαναγκασμένης αφυδάτωσης. Περαιτέρω, ένας ψυχρός θάλαμος συμπύκνωσης και/ή πλάκες συμπύκνωσης παρέχουν επιφάνεια για το εξαχνωμένο νερό να επαναστερεοποιηθεί πάνω της. Αυτός ο συμπυκνωτής δεν παίζει ρόλο στην διατήρηση του υλικού παγωμένου, αντίθετα αποτρέπει τον ατμό να φτάσει στην αντλία κενού, πράγμα που θα μπορούσε να υποβιβάσει τη συμπεριφορά της αντλίας. Οι θερμοκρασίες του συμπυκνωτή τυπικά βρίσκονται κάτω από τους -50°C.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, σε αυτό το εύρος πιέσεων, η μεταφορά θερμότητας πραγματοποιείται κυρίως μέσω αγωγής ή ακτινοβολήσης, το φαινόμενο της συναγωγής είναι αμελητέο λόγω της μικρής πυκνότητας αέρα.

### 4. Δευτεροταγής αφυδάτωση

Η φάση της δευτεροταγούς αφυδάτωσης στοχεύει στην απομάκρυνση μη παγωμένων μορίων νερού, αφού η απομάκρυνση του πάγου πραγματοποιήθηκε στη φάση της πρωτοταγούς αφυδάτωσης. Αυτό το κομμάτι της διαδικασίας λυοφιλοποίησης κυριαρχείται από τις ισόθερμες απορρόφησης του υλικού. Στη φάση αυτή, η θερμοκρασία ανεβαίνει ψηλότερα απ' ό,τι στη φάση της πρωτοταγούς αφυδάτωσης και μπορεί να είναι ακόμη και πάνω από τους 0°C, με σκοπό να σπάσουν όποιες φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις έχουν αναπτυχθεί μεταξύ των μορίων νερού και του παγωμένου υλικού. Συνήθως η πίεση μειώνεται σε αυτό το στάδιο. Ωστόσο, υπάρχουν προϊόντα που ευνοούνται από αυξημένες πιέσεις.

Όταν η διαδικασία λυοφιλοποίησης ολοκληρωθεί, το κενό πληρώνεται με ένα αδρανές αέριο, όπως άζωτο, πριν το προϊόν σφραγιστεί.

Στο τέλος της διαδικασίας, το υπολειπόμενο νερό στο προϊόν είναι εξαιρετικά χαμηλό, περίπου 1% με 4%.

Αν μία λυοφιλοποιημένη ουσία σφραγιστεί για να αποτραπεί η απορρόφηση υγρασίας, η ουσία αυτή μπορεί να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς ψύξη και να συντηρείται για πολλά χρόνια. Η συντήρηση καθίσταται δυνατή λόγω του ότι η μειωμένη περιεκτικότητα της ουσίας σε νερό αναστέλλει τη δράση των μικροοργανισμών και των ενζύμων τα οποία κανονικά φθείρουν και υποβιβάζουν την ουσία.

Η λυοφιλοποίηση επίσης, προκαλεί μικρότερη ζημιά στην ουσία απ' ότι άλλες μέθοδοι αφυδάτωσης οι οποίες χρησιμοποιούν υψηλότερες θερμοκρασίες. Η λυοφιλοποίηση συνήθως δεν προκαλεί συρρίκνωση ή σκλήρυνση του υλικού προς αφυδάτωση. Επιπρόσθετα, οι γεύσεις, οι μυρωδιές και το θρεπτικό περιεχόμενο παραμένουν αναλλοίωτα, καθιστώντας τη διαδικασία αυτή δημοφιλή για τη διατήρηση φαγητού. Ωστόσο, το νερό δεν είναι το μόνο χημικό που μπορεί να εξαχνωθεί και η απώλεια άλλων πτητικών συστατικών όπως οξικό οξύ(ξύδι) και αλκοολών μπορεί να αποδώσει ανεπιθύμητα αποτελέσματα.

Τα λυοφιλοποιημένα προϊόντα μπορούν να επανενυδατωθούν πολύ γρηγορότερα και ευκολότερα επειδή η διαδικασία αφήνει μικροσκοπικούς πόρους. Οι πόροι δημιουργούνται από τους παγοκρυστάλλους που εξαχνώνονται, αφήνοντας κενά και πόρους στη θέση τους. Αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό όταν πρόκειται για φαρμακευτικές χρήσεις. Η λυοφιλοποίηση επίσης χρησιμοποιείται για την αύξηση της διάρκειας ζωής κάποιων φαρμακευτικών ουσιών για πολλά χρόνια.

### 2.2.2 Πειράματα λυοφιλοποίησης

Για τα πειράματα λυοφιλοποίησης χρησιμοποιήθηκε ένας "Virtis Genesis" λυοφιλοποιητής. Κατά κανόνα τρία πρωτόκολλα εφαρμόστηκαν προκειμένου να καθοριστεί ποιο δουλεύει καλύτερα ανάλογα με το ποιο αντίσωμα χρησιμοποιείται, σε τι ποσότητα και τι είδους επεξεργασία έχει υποστεί το υπόστρωμα δότη "donor" (ο δότης είναι η επιφάνεια πάνω στην οποία πιεττάρεται το υγρό αντίσωμα, λεπτομέρειες θα αναφερθούν αναλυτικά σε επόμενη παράγραφο).



Εικόνα 2.1 Τυπικό παράδειγμα λυοφθλοποιημένου αντισώματος.

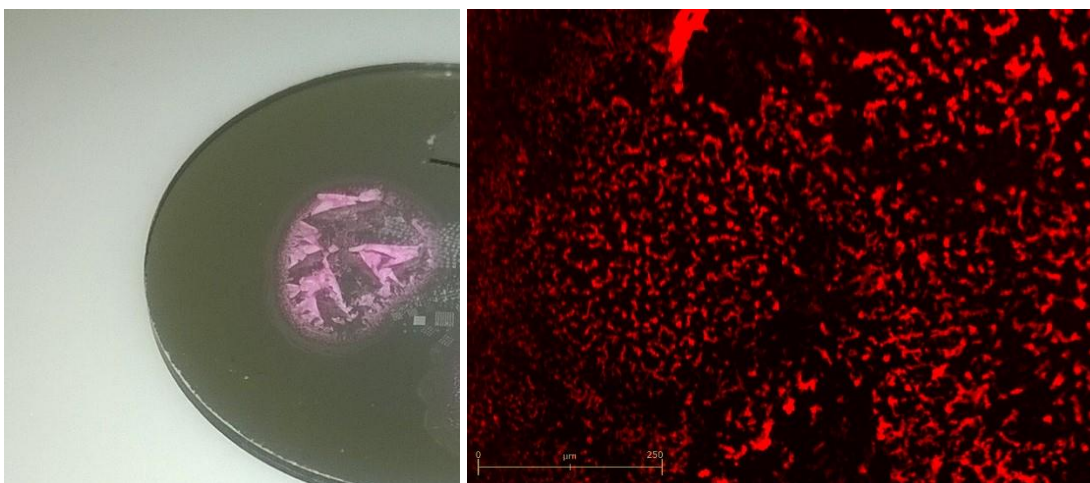
Αυτό που φαίνεται στην πάνω εικόνα, είναι το αποτέλεσμα της λυοφιλοποίησης 10μl από το αντίσωμα 1. Όπως φαίνεται, αυτό που έχει απομείνει είναι το στερεό αντίσωμα σε μορφή σκόνης προσκολλημένο στην επιφάνεια του δότη, χωρίς το υγρό μείγμα στο οποίο ήταν διαλυμένο.

Το πρώτο πρωτόκολλο προς έλεγχο πάνω στο αντίσωμα 1 είναι το ακόλουθο:



Εικόνα 2.2 Το πρώτο πρωτόκολλο πειραμάτων.

Το αποτέλεσμα της λυοφιλοποίησης είναι το ακόλουθο:



Εικόνα 2.3 (Αριστερά) Στρώμα αντισώματος μετά τη λυοφιλοποίηση. (Δεξιά) Μέρος του ίδιου στρώματος από εικόνα φθορίζοντος μικροσκοπίου.

Όπως φαίνεται επάνω το στρώμα αντισώματος πάνω στο δότη έσπασε. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από την εικόνα στα δεξιά, όπου το στρώμα αντισώματος φαίνεται μέσω του φθορίζοντος μικροσκοπίου "Julii Stage". Αυτό που φαίνεται, είναι τα μόρια φυκοερυθρίνης τα οποία διεγείρονται από το μικροσκόπιο και εκπέμπουν το κόκκινο χρώμα. Όμως τα μόρια φυκοερυθρίνης είναι προσκολλημένα στα μόρια των αντισωμάτων, έτσι πρακτικά βλέπουμε και τα μόρια αντισώματος. Προφανώς, ένα τέτοιο στρώμα δεν είναι κατάλληλο για εκτύπωση. Το στρώμα πρέπει να είναι συνεχές και ομοιογενές.

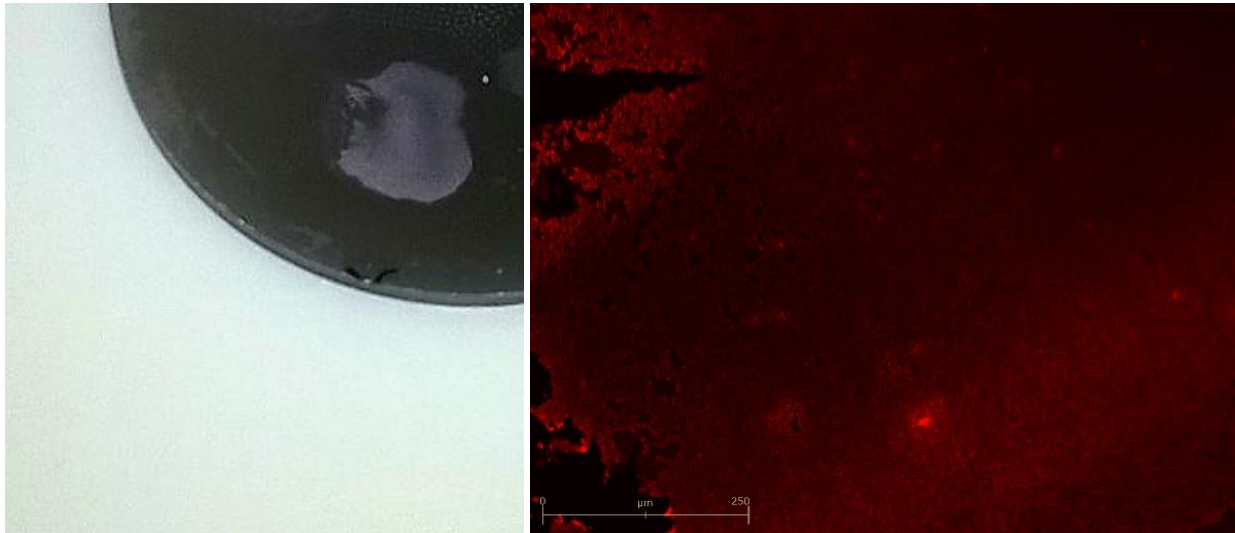
Το σπασμένο προφίλ του στρώματος οφείλεται στο συνδυασμό μικρών χρόνων ψύξης (θέσεις 1,2,3), δηλαδή πολύ γρήγορης, και χαμηλής τελικής θερμοκρασίας ψύξης (θέσεις 4,5,6,7) (εικόνα 2.2). Επίσης, οι σημαδεμένες θέσεις στη συγκεκριμένη εικόνα (εικόνα 2.2) είναι οι παράμετροι των πειραμάτων λυοφιλοποίησης. Διατηρώντας την ποσότητα αντισώματος σταθερή, δύο προφανή συμπεράσματα για καλύτερο αποτέλεσμα θα ήταν:

- 1) η μείωση της τελικής θερμοκρασίας ψύξης
- 2) η αύξηση του χρόνου ψύξης

Έτσι, ακολουθεί το επόμενο πρωτόκολλο στο οποίο εφαρμόζεται η πρώτη από τις δύο προτάσεις, με τις παραμέτρους να αλλάζουν ως εξής:

1. 1 min
2. 35 min
3. 30 min
4. -20°C
5. -20°C
6. -20°C
7. -20°C

Το αποτέλεσμα είναι το ακόλουθο:



Εικόνα 2.4 (Αριστερά) Στρώμα αντισώματος μετά τη λυοφιλοποίηση. (Δεξιά) Μέρος του ίδιου στρώματος από εικόνα φθορίζοντος μικροσκοπίου.

Η βελτίωση στο στρώμα είναι εμφανής. Το στρώμα είναι συνεχές και ομοιογενές, φυσικά όχι τέλειο, αλλά αποδεκτό για εκτύπωση. Η επόμενη σκέψη είναι να εφαρμοστεί και η δεύτερη ιδέα, δηλαδή αύξηση των χρόνων ψύξης, για ένα ακόμα καλύτερο αποτέλεσμα. Έτσι, ακολουθεί το τρίτο πρωτόκολλο με τιμές παραμέτρων:

1. 5 min
2. 50 min
3. 30 min
4. -20°C
5. -20°C
6. -20°C
7. -20°C

Το αποτέλεσμα είναι διαφορετικό, αλλά εξίσου καλό.



Εικόνα 2.5 (Αριστερά) Στρώμα αντισώματος μετά τη λυοφιλοποίηση. (Δεξιά) Μέρος του ίδιου στρώματος από εικόνα φθορίζοντος μικροσκοπίου.

Είναι συνεχές και ομοιογενές. Συγκρίνοντας τα δύο στρώματα με κριτήρια την συνέχεια και την ομοιογένεια του στρώματος δεν είναι ξεκάθαρο πιο εκ των δύο είναι καταλληλότερο για την εκτύπωση. Αυτό λοιπόν που επιλέχθηκε ως καλύτερο είναι αυτό που προκύπτει από το τρίτο πρωτόκολλο λυοφιλοποίησης (εικόνα 2.5) και ο λόγος είναι πως το τρίτο είναι επαναλήψιμο σε σχέση με το δεύτερο.

Παρατηρήσεις:

1) Ίσως φανεί περίεργη η επιλογή της τιμής  $-20^{\circ}\text{C}$  στο δεύτερο πρωτόκολλο, όπου αύξηση της θερμοκρασίας προτάθηκε σαν καλύτερη τιμή της παραμέτρου, χωρίς καμία περαιτέρω εξήγηση. Για παράδειγμα, θα μπορούσε να είναι  $-21^{\circ}\text{C}$ ,  $-19^{\circ}\text{C}$  ή γενικότερα οποιαδήποτε τιμή κάτω των  $-30^{\circ}\text{C}$ . Αυτό είναι φυσιολογικό διότι δεν υπάρχει περαιτέρω εξήγηση ή κάποιος τύπος υπολογισμού των βέλτιστων τιμών των παραμέτρων και γι' αυτό άλλωστε γίνεται και το πείραμα. Ο μόνος κανόνας είναι το να μην αυξηθεί η τελική θερμοκρασία ψύξης πάρα πολύ, ώστε αυτή να είναι υψηλότερη του σημείου υαλώδους μετάβασης ( $T_g$ ), πράγμα που συνεπάγεται καταστροφή του προϊόντος.

2) Εκτός από τα παραπάνω τρία πρωτόκολλα τα οποία αποτέλεσαν τη βάση των πειραμάτων, μερικά ακόμα δοκιμάστηκαν, αλλά χωρίς αξία να αναφερθούν λόγω των πολύ κακών αποτελεσμάτων τους συγκριτικά με τα τρία αυτά.

### 2.3 Πλάσμα

Είναι κατανοητό από τη προηγούμενη παράγραφο η σημασία του στρώματος που δίνει η λυοφιλοποίηση. Χωρίς ένα καλό στρώμα αντισώματος επάνω στο δότη, ο δότης δεν μπορεί να προχωρήσει σε εκτύπωση. Ως ένα καλό στρώμα από την προηγούμενη παράγραφο ορίστηκε ένα συνεχές και ομοιογενές στρώμα. Άλλο ένα κριτήριο χαρακτηρισμού ενός καλού στρώματος θα προστεθεί σε αυτή τη παράγραφο και αυτό είναι το ισοϋψές στρώμα. Η επιφάνεια του δότη επάνω στην οποία πιπεττάρεται το αντισώμα είναι φτιαγμένη από υδρόφοβο υλικό. Το αποτέλεσμα πιπετταρίσματος μιας ποσότητας

υγρού πάνω σε μια τέτοια επιφάνεια, είναι μια σταγόνα η οποία δεν απλώνεται στην επιφάνεια του δότη όπως φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 2.6 Σταγόνα νερού πάνω στο δότη.

Αυτό αποτελεί μεγάλο πρόβλημα. Κάθε σταγόνα σαν αυτή αν λυοφιλοποιηθεί, δίνει ένα τρισδιάστατο πλέγμα αντισώματος στο σχήμα της σταγόνας. Τέτοιο στρώμα δεν είναι αποδεκτό για εκτύπωση για μια σειρά από αιτίες:

- 1) Το τρισδιάστατο πλέγμα αντισώματος σπάει εύκολα, έτσι κατά την εκτύπωση όταν αντίσωμα αφήνει το δότη προκειμένου να σχηματίσει τη μικρο-συστοιχία, το πλέγμα καταρρέει.
- 2) Το στρώμα πρέπει να ναι ισοϋψές ώστε να μπορεί να μπει στη διάταξη η οποία χρησιμοποιείται για την εκτύπωση.
- 3) Τέτοιο στρώμα είναι προφανές ότι έχει διαφορετική ποσότητα αντισώματος σε κάθε θέση, πράγμα που σημαίνει ότι κάθε σημείο της συστοιχίας θα έχει διαφορετική ποσότητα αντισώματος.

Εδώ έρχεται το πλάσμα ώστε να διορθώσει αυτό το πρόβλημα μετατρέποντας την υδρόφοβη επιφάνεια του δότη σε υδρόφιλη. Η υδρόφιλη πλέον επιφάνεια αναγκάζει τη σταγόνα να απλωθεί και έτσι δίνει σαν αποτέλεσμα ένα στρώμα ισοϋψές.

### 2.3.1 Ορισμός πλάσματος

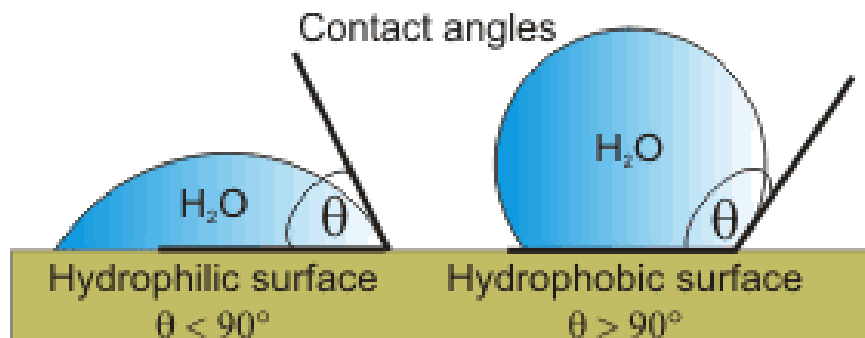
Το πλάσμα είναι μία από τις τέσσερις θεμελιώδεις καταστάσεις της ύλης, ανάμεσα στις στερεή, υγρή και αέρια. Σε αντίθεση με αυτές τις τρεις καταστάσεις της ύλης, το πλάσμα δεν συναντάται κανονικά στη Γη κάτω από κανονικές επιφανειακές συνθήκες και μπορεί μόνο να παραχθεί τεχνητά από ουδέτερα αέρια. Ο όρος πρωτοεισήχθη από τον χημικό "Irving Langmuir" το 1920.

Το πλάσμα και τα ιονισμένα αέρια έχουν μοναδικές ιδιότητες και παρουσιάζουν συμπεριφορές διαφορετικές από αυτές των άλλων καταστάσεων, παρ' όλ' αυτά η πραγματική τεχνική διαφορά μεταξύ των δύο είναι κυρίως θέμα ονοματολογίας και ερμηνείας. Μπορεί απλά να θεωρηθεί ως ένα αέριο μείγμα αρνητικά φορτισμένων ηλεκτρονίων και υψηλά φορτισμένων θετικών ιόντων, τα οποία δημιουργούνται με θέρμανση αερίου ή επιβολή σε αέριο ισχυρού ηλεκτρομαγνητικού πεδίου.

Πλάσμα μπορεί επίσης να παραχθεί μερικώς ή πλήρως ιονισμένο ανάλογα με την περιβάλλουσα θερμοκρασία και πυκνότητα. Το μερικώς ιονισμένο πλάσμα είναι ευρέως κατανοητό, για παράδειγμα οι φωτεινές επιγραφές νέον ή οι κεραυνοί, ενώ το πλήρως ιονισμένο πλάσμα σχετίζεται με το εσωτερικό του ήλιου και τα άστρα.

Το θετικό φορτίο στα ιόντα επιτυγχάνεται με απομάκρυνση ηλεκτρονίων από τους πυρήνες των ατόμων. Ο αριθμός των ηλεκτρονίων που απομακρύνονται σχετίζεται με την αύξηση στη θερμοκρασία ή στην τοπική πυκνότητα άλλης ιονισμένης ύλης. Αυτό επίσης μπορεί να συνοδεύεται από διάσπαση μοριακών δεσμών, αν και αυτή η θεμελιώδης διαδικασία διαφέρει σαφώς από τις χημικές διεργασίες των ιονικών αλληλεπιδράσεων στα υγρά ή τη συμπεριφορά των ιόντων που υπάρχουν στα μέταλλα. Ένας μεγάλος αριθμός από πολύ φορτισμένα σωματίδια μαζί καθιστούν το πλάσμα ηλεκτρικά αγώγιμο ώστε να ανταποκρίνεται έντονα σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία και αυτή η ιδιότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλές σύγχρονες τεχνολογικές συσκευές, όπως τηλεοράσεις πλάσματος ή χάραξη πλάσματος.

### 2.3.2 Πείραμα πλάσμα

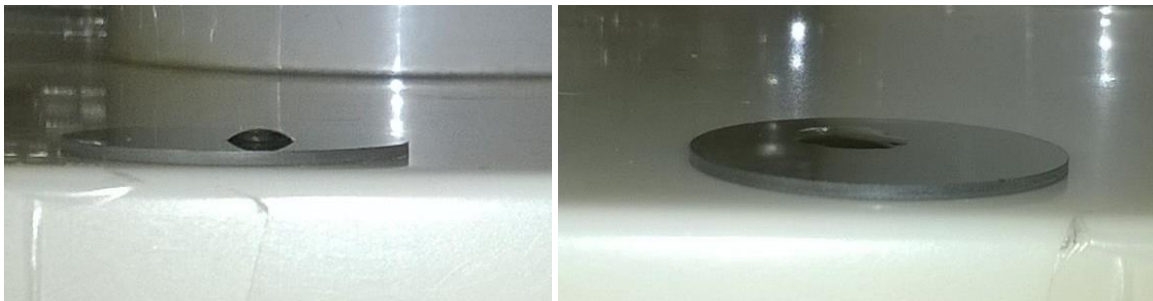


Εικόνα 2.7 Γωνία επαφής σε υδρόφοβη και υδρόφιλη επιφάνεια.

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε μια συσκευή πλάσματος "Plasma Etcher" πλάσματος ατμοσφαιρικού αέρα. Οι παράμετροι της επεξεργασίας του δότη με πλάσμα ήταν ο χρόνος έκθεσης στο πλάσμα και η πίεση στο θάλαμο. Από πειραματισμό για χρόνους από 5 δευτερόλεπτα έως 30 δευτερόλεπτα (με βήμα 5 δευτερόλεπτα) και για πιέσεις από 300 mTorr έως 600 mTorr (με βήμα 50 mTorr) τα αποτελέσματα οπτικά ήταν σχεδόν ίδια και επίσης πείραμα με οποιεσδήποτε τιμές παραμέτρων στα προαναφερθέντα εύρη δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στην όλη διαδικασία. Έτσι, επιλέχθηκαν οι τιμές 20 δευτερόλεπτα και 300 mTorr.



Η υδρόφιλη συμπεριφορά της επιφάνειας του δότη μετά την επεξεργασία πλάσματος φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 2.8 (Αριστερά) Σταγόνα νερού πάνω στο δότη πριν την επεξεργασία με πλάσμα. (Δεξιά) Σταγόνα νερού πάνω στο δότη μετά την επεξεργασία πλάσματος.



Εικόνα 2.9 Θάλαμος του “Plasma Etcher” κατά τη διαδικασία επεξεργασίας πλάσματος.

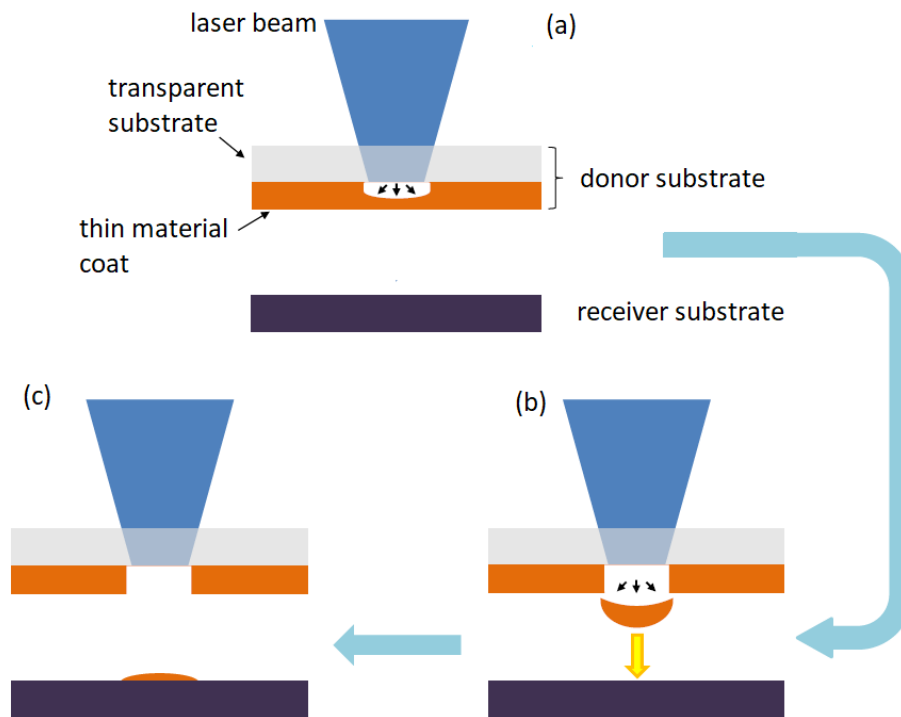
## 2.4 Εκτύπωση μικρο-συστοιχιών

Η εκτύπωση των μικρο-συστοιχιών έλαβε χώρα στη Σ.Ε.Μ.Φ.Ε., με χρήση διάταξης λέιζερ. Η τεχνολογία αυτή ονομάζεται “Lift” και χρησιμοποιείται για κατασκευή μικροδομών.

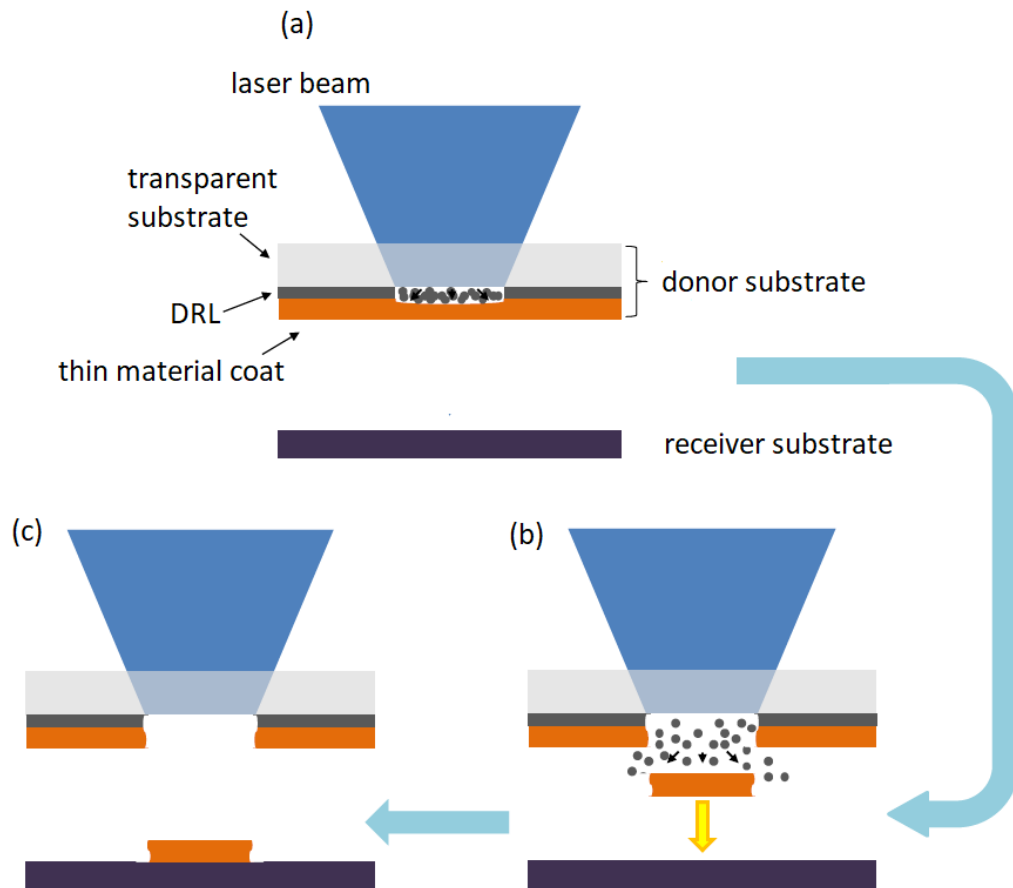
### 2.4.1 Τεχνολογία “Lift”

Η τεχνική της ανάπτυξης μικρο-δομών με χρήση λέιζερ (Laser Induced Forward Technique-LIFT) έχει αναπτυχθεί τα τελευταία 20 χρόνια ως μία εναλλακτική τεχνική μικρο-εναπόθεσης για εφαρμογές

ταχείας προτυποποίησης. Το LIFT κατατάσσεται στις τεχνικές απευθείας εγγραφής και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεταφορά υλικών σε υγρή ή στερεή φάση. Βασίζεται στη χρήση μιας δέσμης λέιζερ για την επιλεκτική μεταφορά ενός υλικού από ένα υποστρώμα δότη σε ένα υποστρώμα αποδέκτη. Το υποστρώμα δότη αποτελείται από ένα διαφανές στη δέσμη λέιζερ υποστρώμα στήριξης και από ένα ενδιάμεσο απορροφητικό υποστρώμα (Dynamic Release Layer-DRL) στο οποίο επιστρώνεται το προς εναπόθεση υλικό σε υγρή ή στερεή φάση (σημειώνεται πως όταν η μέθοδος αυτή ανακαλύφθηκε το DRL δεν υπήρχε). Τα υποστρώματα δότη και αποδέκτη τοποθετούνται αντικριστά σε κοντινή απόσταση. Με ακτινοβολία του υποστρώματος δότη με τη δέσμη λέιζερ είναι δυνατή η μεταφορά καλά καθορισμένων δομών στο υποστρώμα αποδέκτη με μικρομετρική ακρίβεια. Βασικά πλεονεκτήματα της τεχνολογίας LIFT είναι η απλότητα στη χρήση και η μεγάλη ποικιλία υλικών στα οποία μπορεί να εφαρμοστεί (μέταλλα, πολυμερή, βιολογικά διαλύματα, πάστες μεταλλικών νανοσωματιδίων κ.α.). Επιπρόσθετα, σε πρόσφατες εργασίες έχει επιδειχθεί πως η τεχνική μπορεί να επιτύχει χωρική διακριτική ικανότητα έως και 200 nm για την εναπόθεση μεταλλικών δομών. Μια συνήθης πειραματική διάταξη LIFT περιλαμβάνει τα οπτικά διαμόρφωσης και εστίασης της δέσμης λέιζερ, αυτοματοποιημένες βάσεις στήριξης του υποστρώματος δότη και αποδέκτη και ένα ενσωματωμένο σύστημα μικροσκοπίου. Τέτοιου είδους συστήματα, πέραν της διαδικασίας εναπόθεσης προσφέρουν την δυνατότητα για παράλληλες διεργασίες όπως η επιλεκτική ανόπτηση, θέρμανση, στερεοποίηση και μικρομηχανική επιφανειών. Οι δυνατότητες αυτές καθιστούν τους προηγμένους σταθμούς εναπόθεσης “LIFT” ένα εξαιρετικό εργαλείο για εφαρμογές ταχείας προτυποποίησης. (13)



Εικόνα 2.10 Σχηματικό διάγραμμα της αρχικής τεχνικής “Lift”. (a) Ακτινοβολή του διαφανούς υποστρώματος προκαλεί ένα θύλακα αερίων υψηλής πίεσης στη διεπιφάνεια διαφανούς υποστρώματος και υλικού. (b) Εκτόνωση του θύλακα πίεσης σπρώχνει το υπερκείμενο κομμάτι υλικού. (c) Σχηματισμός της δομής λαμβάνει χώρα πάνω στην επιφάνεια του υποστρώματος αποδέκτη.



Εικόνα 2.11 Σχηματικό διάγραμμα της τεχνικής “Lift”. (a) Ακτινοβολήση του “DRL” το θερμαίνει ή το αποδομεί. (b) Ο θύλακας αερίων που σχηματίζεται σπρώχνει το υπερκείμενο κομμάτι στρώσης υλικού. (c) Σχηματισμός της δομής λαμβάνει χώρα με την εναπόθεση του λεπτού αυτού φιλμ πάνω στο υπόστρωμα του αποδέκτη

#### 2.4.2 Υπόστρωμα δότη

Στα πειράματα που διεξήχθησαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας η σύσταση του υποστρώματος δότη ήταν η παρακάτω:

- 1) το διαφανές υπόστρωμα είναι φτιαγμένο από “quartz”
- 2) το απορροφητικό υπόστρωμα (“DRL”) φτιαγμένο από τιτάνιο



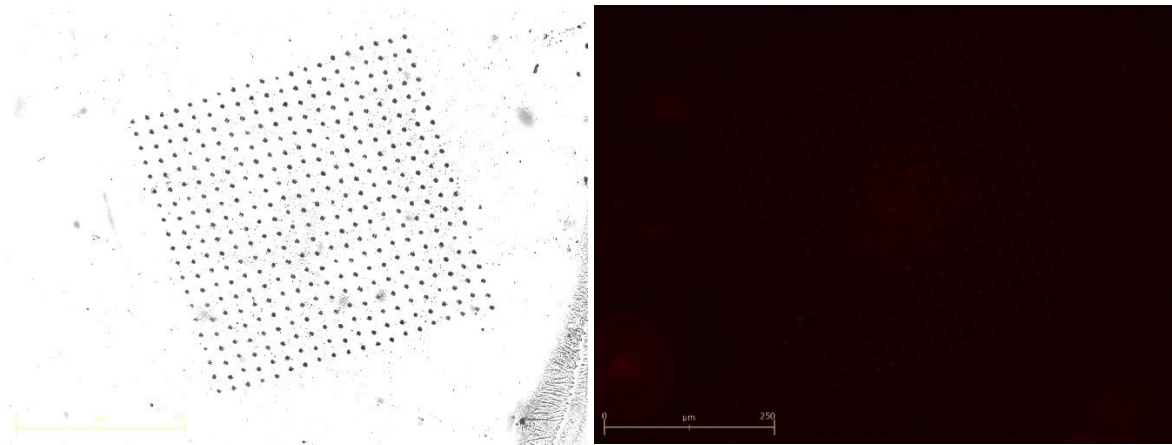
Εικόνα 2.12 Δότης με το στρώμα αντισώματος πάνω του μετά την εκτύπωση .

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν δύο δέσμες ακτινοβολίας, η μία με μήκος κύματος 355 nm και παλμό νανο-δευτερολέπτων και η δεύτερη με μήκος κύματος 532 nm και παλμό πικο-δευτερολέπτων. Η διαφορά έχει να κάνει με το υπόστρωμα “DRL” που είναι από τιτάνιο. Το τιτάνιο στο φάσμα μήκους κύματος απορρόφησης εμφανίζει κορυφή στα 355 nm, πράγμα που σημαίνει ότι ακτινοβόλησή του με τη δέσμη των 355 nm, προκαλεί θέρμανση ή αποδόμηση του DRL και το υπερκείμενο κομμάτι αντισώματος ωθείται προς το υπόστρωμα αποδέκτη, με άλλα λόγια έχουμε το φαινόμενο της ύστερης τεχνικής “Lift” (εικόνα 2.11). Στην περίπτωση όμως ακτινοβόλησης με τη δέσμη των 532 nm, το μεγαλύτερο μέρος της ακτινοβολίας πηγαίνει απευθείας στο αντίσωμα και η μεταφορά του στον αποδέκτη πραγματοποιείται με τον πρώτο τρόπο από τους δύο που αναφέρθηκαν παραπάνω (εικόνα 2.10), αυτόν όπου το υπόστρωμα αποδέκτης δεν διαθέτει DRL. Έτσι, σε αυτή τη περίπτωση υπάρχει πιθανότητα η λειτουργικότητα των αντισωμάτων να επηρεάζεται περισσότερο.

## 2.5 Μικρο-συστοιχίες αντισωμάτων

Οι μικρο-συστοιχίες που τυπώθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας ήταν πολλές. Σε αυτή την παράγραφο, θα παρουσιαστούν οι καλύτερες. Με τον όρο καλύτερες εννοείται μικρο-συστοιχίες οπτικά ωραίες, με ελάχιστα κενά σημεία στη δομή τους, με όσο το δυνατόν όμοια σημεία, με ελάχιστη διασπορά και που να είναι επαναλήψιμες.

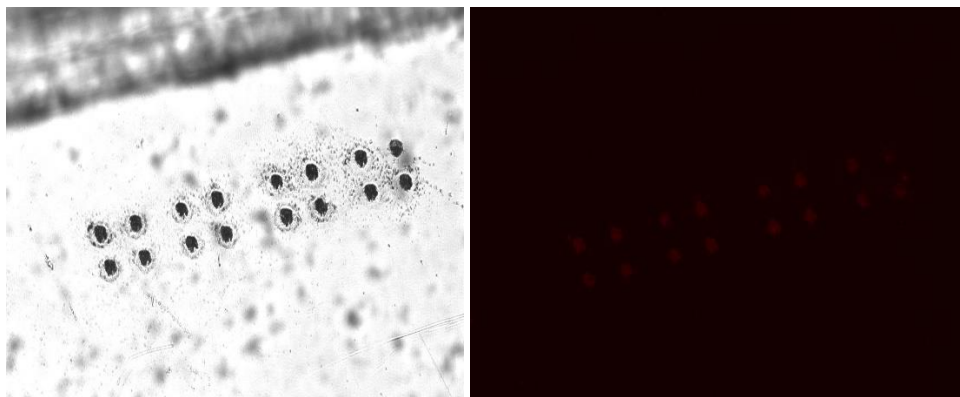
Μικρο-συστοιχία 1: Η μεγαλύτερη σε αριθμό σημείων μικρο-συστοιχία .



Εικόνα 2.13 Μία 20x20 μικρο-συστοιχία αντισωμάτων με σημεία διαμέτρου μεταξύ 20 μm και 30 μm. (Αριστερά) Εικόνα μικρο-συστοιχίας από οπτικό μικροσκόπιο. (Δεξιά) Εικόνα μικρο-συστοιχίας από φθορίζον μικροσκόπιο.

Η συστοιχία αυτή κατασκευάστηκε με το αντίσωμα 1 και με χρήση δέσμης 532 nm. Στη δεξιά εικόνα επάνω, τα σημεία της συστοιχίας που διακρίνονται με κόκκινο χρώμα φαίνονται δύσκολα. Αυτό συμβαίνει λόγω της εξαιρετικά μικρής μάζας αντισώματος που υπάρχει πάνω σε κάθε σημείο (τάξη μεγέθους nano-grams).

Μικρο-συστοιχία 2: Η συστοιχία με τη μικρότερη διασπορά και τα πιο όμοια σημεία.

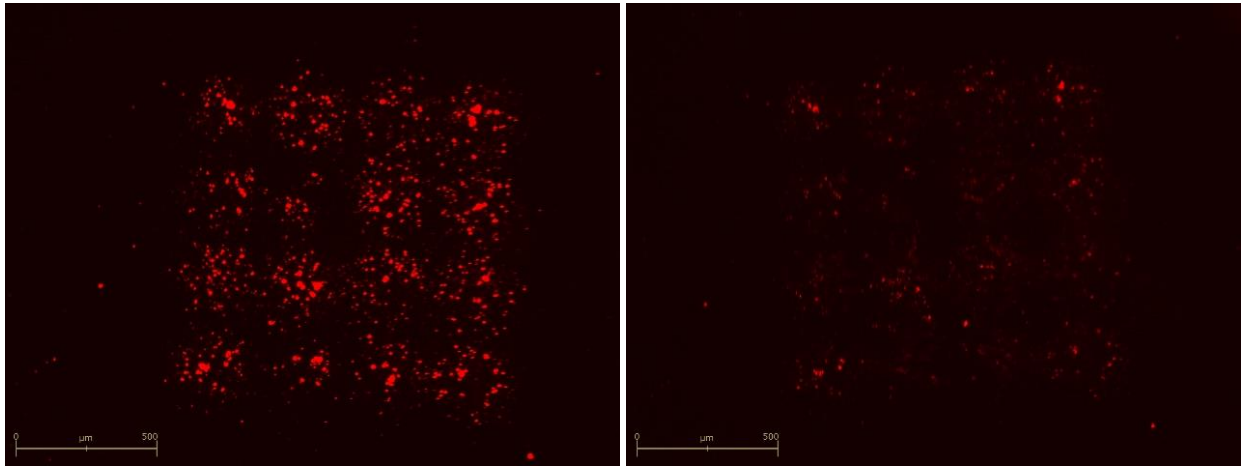


Εικόνα 2.14 Τέσσερις 2x2 μικρο-συστοιχιές αντισώματος. (Αριστερά) Εικόνα των συστοιχιών στο οπτικό μικροσκόπιο. (Δεξιά) Εικόνα συστοιχιών στο φθορίζον μικροσκόπιο.

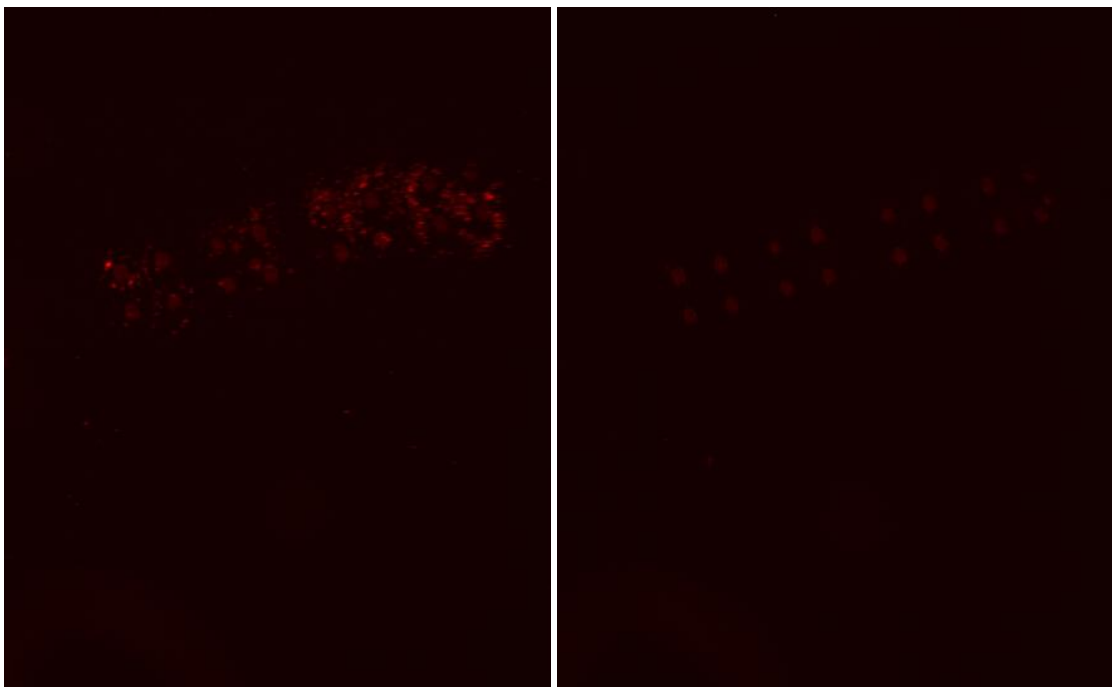
Η διαδικασία που ακολουθεί μετά την εκτύπωση μιας συστοιχίας είναι μία πλύση με νερό τύπου I με σκοπό την απομάκρυνση βρωμιάς και μη προσκολλημένων μορίων αντισώματος καθώς και τον έλεγχο του πόσο αντίσωμα παραμένει στη συστοιχία μετά τη πλύση, με άλλα λόγια πόσο καλά έχει δεσμευτεί η

συστοιχία από τον αποδέκτη. Αυτό είναι απαραίτητο ώστε να καθοριστεί πρώτον η καταλληλότητα των αποδεκτών και δεύτερον οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων του λέιζερ για την καλύτερη ακινητοποίηση των αντισωμάτων πάνω στους αποδέκτες.

Για παράδειγμα, παρακάτω ακολουθούν δύο συστοιχίες με δύο εικόνες για κάθε μια, πριν και μετά τη πλύση.



Εικόνα 2.15 (Αριστερά) Μικρο-συστοιχίες πριν τη πλύση. (Δεξιά) Μικρο-συστοιχίες μετά τη πλύση.



Εικόνα 2.16 (Αριστερά) Μικρο-συστοιχία πριν τη πλύση. (Δεξιά) Μικρο-συστοιχία μετά τη πλύση.

Η πρώτη μικρο-συστοιχία (εικόνα 2.15) είναι ένα παράδειγμα κακής ακινητοποίησης πάνω στον αποδέκτη καθώς μετά τη πλύση μεγάλο ποσοστό αντισώματος έχει φύγει. Από την άλλη, η δεύτερη μικρο-συστοιχία (εικόνα 2.16) είναι παράδειγμα καλής ακινητοποίησης. Ανεξάρτητα από έναν σχηματισμό σε μορφή δαχτυλιδιού που παρατηρείται στην περιφέρεια των σημείων -πράμα που οφείλεται σε τεχνικό πρόβλημα του λέιζερ με αποτέλεσμα αυτό να στέλνει περισσότερη ενέργεια στην περιφέρεια- τα σημεία της συστοιχίας έχουν σχεδόν την ίδια μάζα αντισώματος πριν και μετά την πλύση. Αυτό το συμπέρασμα και άλλα παρόμοια επιβεβαιώνονται και ποσοτικοποιούνται συγκρίνοντας την ένταση φθορίζουσας ακτινοβολίας των συστοιχιών πριν και μετά την πλύση με το λογισμικό Matlab.

Σε αυτή τη παράγραφο, χωρίς πολλές λεπτομέρειες, έχει αξία να αναφερθεί ότι συστοιχίες αντισωμάτων φτιάχτηκαν και από αντισώματα που δεν λυοφιλοποιήθηκαν αλλά αφέθηκαν να στεγνώσουν στην ατμόσφαιρα ή σε μερικό κενό, αλλά αυτή η προοπτική εγκαταλείφθηκε άμεσα διότι πρώτον η αφυδάτωση στην ατμόσφαιρα ή στο μερικό κενό δεν είναι σε καμία περίπτωση επαναλήψιμη, δεύτερον διότι οι απώλειες σε αντίσωμα είναι μεγαλύτερες από αυτές κατά τη λυοφιλοποίηση και τρίτον διότι το προφίλ μετά το στέγνωμα στην ατμόσφαιρα είναι ακατάλληλο για εκτύπωση. Όπως φαίνεται παρακάτω, το αντίσωμα συγκεντρώνεται στην περιφέρεια της σταγόνας.



Εικόνα 2.17 Σταγόνα από διάλυμα αντισώματος που στέγνωσε στην ατμόσφαιρα και όπου φαίνεται η συγκέντρωση του αντισώματος στην περιφέρεια.

## 2.6 Υπόστρωμα δέκτης

Μικρο-συστοιχίες αντισωμάτων εκτυπώνονται κατά κανόνα σε γυαλί(αντικειμεοφόρες πλάκες). Μέχρι τώρα οι τεχνολογίες μικρο-συστοιχιών προτιμούσαν το γυαλί σαν υπόστρωμα αποδέκτη για κατασκευή μικρο-συστοιχιών για δύο λόγους. Ο πρώτος επειδή το γυαλί και πιο συγκεκριμένα οι γυάλινες πλάκες μικροσκοπίου αποτελούν δεκαετίες τώρα τη κύρια δομή στήριξης σε κάθε βιολογικό εργαστήριο και έτσι,

έχουν αναπτυχθεί πολλά πρωτόκολλα για σύζευξη βιολογικών υλικών πάνω σε γυαλί. Ο δεύτερος λόγος είναι το γεγονός ότι δομές από γυαλί παράγονται στη βιομηχανία για διάφορες χρήσεις, σε διάφορα σχήματα και διαστάσεις κι έτσι μπορούν να αγοραστούν.

Για τις ανάγκες όμως της εργασίας αυτής, το γυαλί είναι ακατάλληλο σαν επιφάνεια στήριξης μικρο-συστοιχιών. Αυτό οφείλεται στη φυσική της ακινητοποίησης υλικών στερεής φάσης με χρήση της τεχνολογίας LIFT. Όταν το DRL του δότη σπάει, σπρώχνει το υπερκείμενο κομμάτι αντισώματος δίνοντάς του μεγάλη ταχύτητα. Το κομμάτι αυτό προσκρούει με αυτή τη ταχύτητα στο υπόστρωμα αποδέκτη και ακινητοποιείται στην τραχύτητα του υλικού του αποδέκτη. Αυτό σημαίνει ότι υλικά όπως οι εργοστασιακές πλάκες γυαλιού οι οποίες είναι εξαιρετικά λείες, είναι ακατάλληλες, τουλάχιστον χωρίς κάποια επεξεργασία η οποία θα μπορούσε να ενεργοποιήσει τις επιφάνειες αυτές επιτυγχάνοντας σύζευξη των αντισωμάτων με το γυαλί.

Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν αποδέκτες από πολυστυρένιο. Οι αποδέκτες για τη διάταξη εκτύπωσης έπρεπε να είναι κυκλικοί και με μέγιστη διάμετρο τα 16 mm. Δεδομένου ότι τέτοιες δομές από πολυστυρένιο δεν κυκλοφορούν στην αγορά, κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο με χρήση μηχανής κοπής με λέιζερ. Η μηχανή που χρησιμοποιήθηκε ήταν μία “ULS” μοντέλο “VLS 3.50”.



Εικόνα 2.18 “ULS model VLS 3.50 ;aser printer machine.”



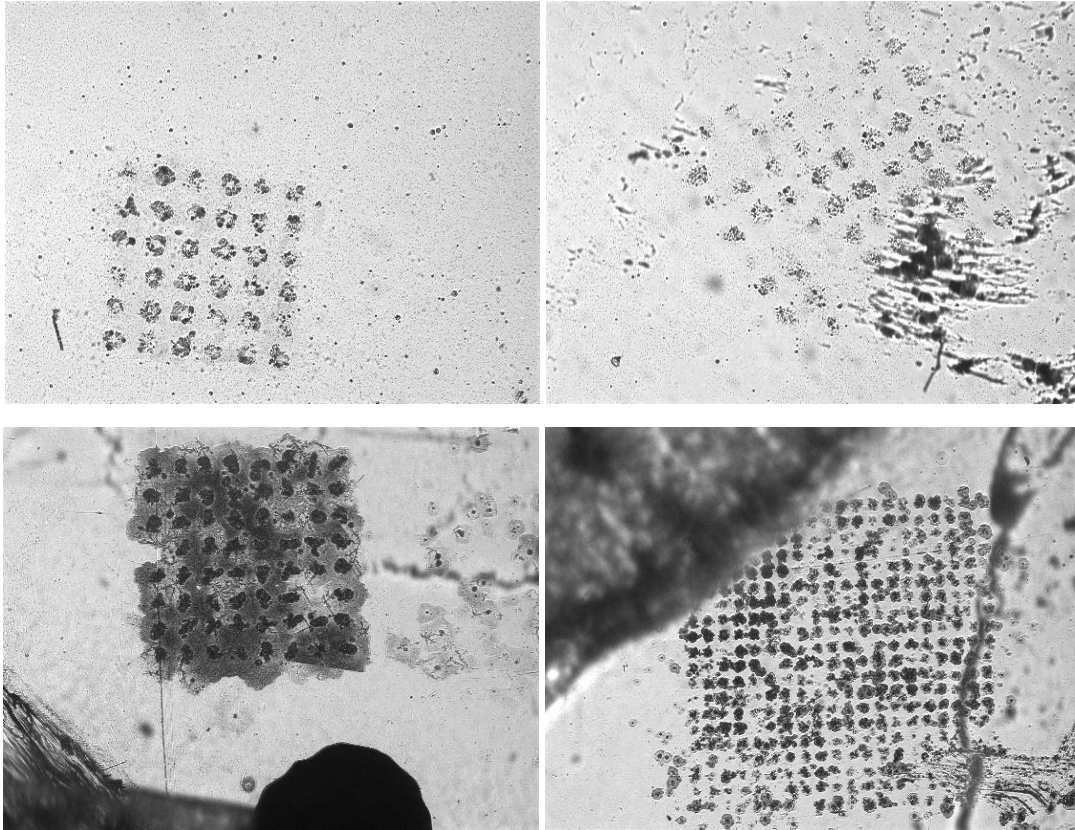
Άλλες κατασκευές που φτιάχτηκαν με τον ίδιο τρόπο ήταν βάσεις για τη μεταφορά και την αποθήκευση των αποδεκτών μετά την εκτύπωση των συστοιχιών, όπως η παρακάτω:



Εικόνα 2.19 Βάση για μεταφορά και αποθήκευση των υποστρωμάτων αποδέκτη.

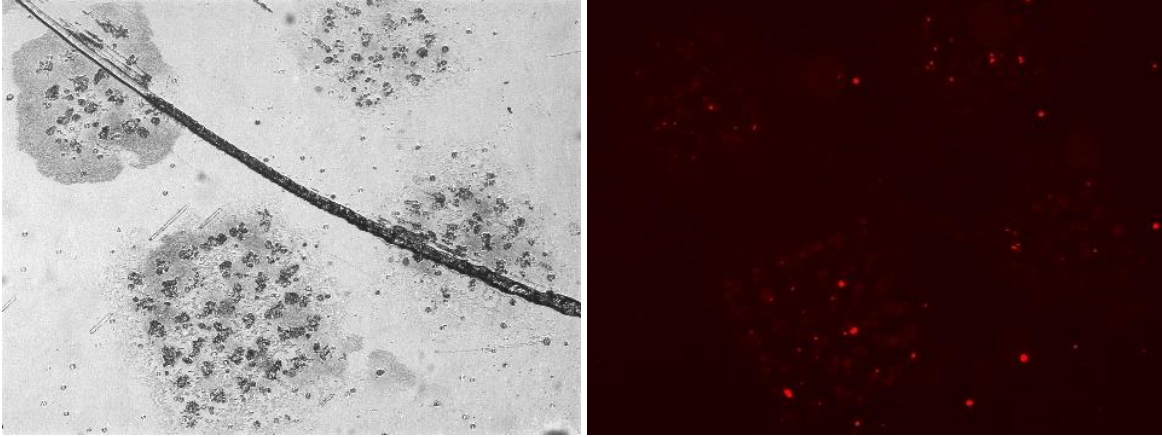
## 2.7 Έλεγχος λειτουργικότητας μικρο-συστοιχιών

Τους πρώτους μήνες πειραμάτων όλες οι μικρο-συστοιχίες που εκτυπώθηκαν, αποτελούνταν από το αντίσωμα 1. Σκοπός αυτών των πρώτων πειραμάτων ήταν ο καθορισμός των καλύτερων συνθηκών και παραμέτρων για όλες τις διαδικασίες που αναφέρθηκαν προηγουμένα, όλες δηλαδή τις διαδικασίες από την έναρξη έως την ολοκλήρωση κατασκευής μια συστοιχίας. Το επόμενο βήμα μετά την επίτευξη μιας αρκετά καλής συστοιχίας είναι ο έλεγχος της λειτουργικότητας των αντισωμάτων της. Με άλλα λόγια, ο έλεγχος του αν τα αντισώματα μετά από όλες τις προαναφερθείσες διαδικασίες στις οποίες υποβλήθηκαν εξακολουθούν να είναι λειτουργικά και μπορούν να «δέσουν» με τα συμπληρωματικά τους μόρια.



Εικόνα 2.20 Μικρο-συστοιχιές φτιαγμένες με το αντίσωμα 2.

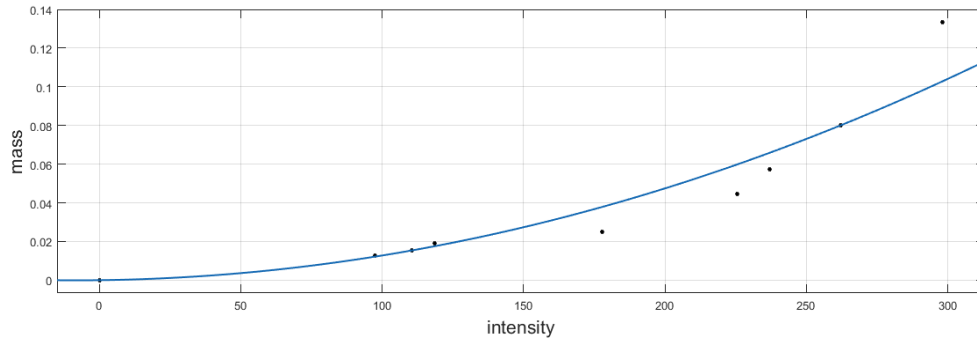
Για το λόγο αυτό και για αυτά τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα 2 το οποίο δεν είναι συζευγμένο με φυκοερυθρίνη, δηλαδή εικόνα συστοιχίας από αυτό το αντίσωμα μέσω του φθορίζοντος μικροσκοπίου αναμένεται να είναι μαύρη χωρίς να διακρίνεται τίποτα. Επάνω παρατίθεται ένα σετ από μικρο-συστοιχιές φτιαγμένες με το αντίσωμα 2. Σε αυτές τις συστοιχιές και σε άλλες σαν αυτές εφαρμόστηκε ένα απλό πρωτόκολλο βασισμένο στην "elisa". Με απλά λόγια, ένα διάλυμα δευτερογενών αντισωμάτων (detection antibodies) ικανών να «δένουν» με τα αντισώματα των συστοιχιών, εγχύθηκε πάνω στις συστοιχιές. Μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα το διάλυμα απομακρύνθηκε. Αν τα αντισώματα των συστοιχιών ήταν λειτουργικά θα «έδεναν» με αυτά του διαλύματος. Επίσης τα αντισώματα του διαλύματος ήταν συζευγμένα με φυκοερυθρίνη. Μετά από πέρασμα μέσω του φθορίζοντος μικροσκοπίου -το οποίο διεγείρει τα μόρια φυκοερυθρίνης να εκπέμπουν κόκκινο χρώμα-, αν τα δευτερογενή αντισώματα είχαν δέσει με τα πρωτογενή, τότε στις θέσεις των σημείων των συστοιχιών θα έπρεπε να φαίνονται κόκκινα σημεία. Άμεσο συμπέρασμα ότι τα αντισώματα είναι λειτουργικά.



Εικόνα 2.21 (Αριστερά) Μικρο-συστοιχία πριν το “elisa-based” πρωτόκολλο. (Δεξιά) Μικρο-συστοιχία μετά το “elisa-based” πρωτόκολλο.

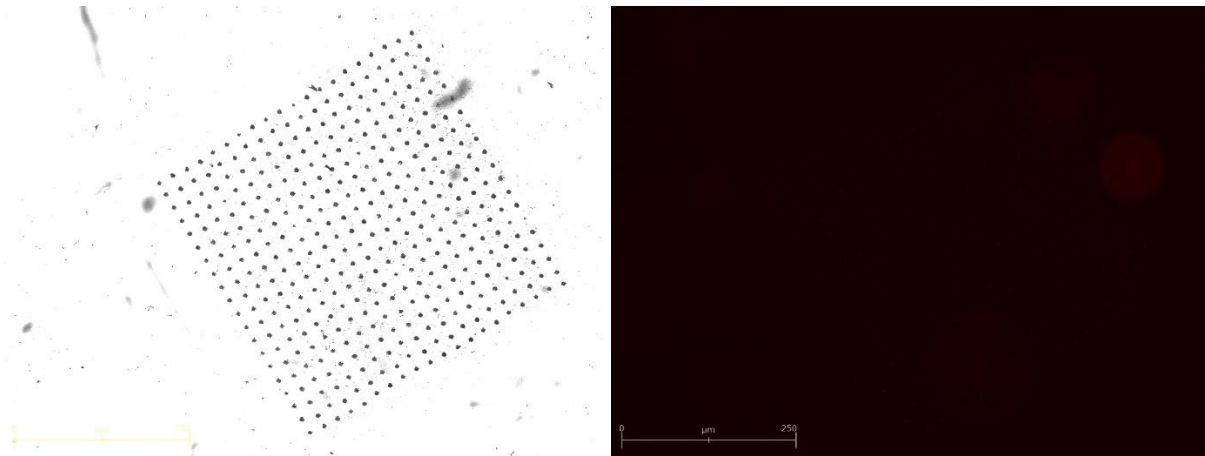
## 2.8 Καμπύλη ποσοτικοποίησης

Τελευταίο στοιχείο απαραίτητο στην παρούσα έρευνα είναι η ποσοτικοποίηση της μάζας αντισώματος στις μικρο-συστοιχίες ή τα σημεία αυτών. Γνωρίζοντας τις διαστάσεις και τον αριθμό των εκάστοτε σημείων στις εκάστοτε συστοιχίες, ένας αρχικός και εύκολος τρόπος υπολογισμού θα ήταν η σύγκριση των διαστάσεων και της μάζας της αρχικά πιπετταρισμένης ποσότητας αντισώματος στον δότη, με τα εκτυπωμένα σημεία των συστοιχιών και με τη μέθοδο των τριών ο υπολογισμός της μάζας αυτών. Όμως ο τρόπος αυτός αποδείχθηκε δύσκολος και εξαιρετικά ανακριβής. Επίσης, ακόμη κι αν αυτός ο τρόπος ήταν ακριβής, αυτό που θα ήθελε ένας βιολόγος που θα χρησιμοποιούσε αυτές τις συστοιχίες, θα ήταν ένας εύκολος και γρήγορος τρόπος ποσοτικοποίησης, βέλτιστα θα ήθελε απλά βλέποντας την εικόνα της συστοιχίας να μπορεί υπολογιστικά με ένα «κλικ» να ξέρει και τη μάζα της. Έτσι, προέκυψε η εξής ιδέα. Μέχρι τώρα κάθε μικρο-συστοιχία ελεγχόταν με ένα φθορίζον μικροσκόπιο. Η λειτουργία του μικροσκοπίου στηρίζεται στο να διεγείρει τα μόρια φυκοερυθρίνης στα αντισώματα, ώστε να εκπέμπουν κόκκινο φως. Με τον τρόπο αυτό λαμβάνονται εικόνες των μικρο-συστοιχιών στο φάσμα χρώματος κόκκινο-μαύρο. Κάθε εικόνα/συστοιχία, ανάλογα με τη μάζα αντισώματος σε αυτή εκπέμπει περισσότερη ή λιγότερη ακτινοβολία, με άλλα λόγια κάθε “pixel” στις εικόνες αυτών θα έχει ένταση χρώματος ανάλογη της μάζα αντισώματος που υπάρχει σε αυτό. Το γεγονός αυτό δίνει τη δυνατότητα κατασκευής καμπύλης η οποία θα συσχετίζει την ένταση φθορίζουσας ακτινοβολίας με τη μάζα της εκάστοτε συστοιχίας. Στη λογική αυτή λοιπόν εύκολα γράφεται απλό πρόγραμμα στο οποίο ο βιολόγος θα εισάγει την εικόνα και αυτό θα του δίνει πίσω τη μάζα. Σκοπός τώρα είναι η κατασκευή της καμπύλης για την κατασκευή της οποίας κάποια γνωστά σημεία αυτής (μάζα-ένταση φθορίζουσας ακτινοβολίας) είναι απαραίτητα. Αυτά φτιάχτηκαν εύκολα, αυτό που έγινε ήταν να πιπετταριστούν γνωστές ποσότητες διαλύματος αντισώματος γνωστής συγκέντρωσης, με άλλα λόγια γνωστής μάζας αντισώματος και στη συνέχεια με χρήση του φθορίζοντος μικροσκοπίου και του λογισμικού Matlab να καθοριστεί η ένταση φθορισμού τους. Έτσι κατασκευάστηκε η παρακάτω καμπύλη ως αποτέλεσμα προσέγγισης σε 8 πειραματικά σημεία και ένα θεωρητικό (0,0) με χρήση πολυωνύμου 2<sup>ης</sup> τάξης.



Εικόνα 2.22 Καμπύλη ποσοτικοποίησης μάζας συστοιχίας (μάζα σε  $\mu\text{g}$ ).

Ενδεικτικά παρατίθεται ποσοτικοποίηση μιας μικρο-συστοιχίας βάσει της παραπάνω καμπύλης. Η μικρο-συστοιχία που θα ποσοτικοποιηθεί είναι:



Εικόνα 2.23 Μικρο-συστοιχία

Βάσει της παραπάνω καμπύλης η μάζα της μικρο-συστοιχίας είναι ίση με  $1.6992 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}$ .

### 3. Σύνοψη-Μελλοντική έρευνα

Στη παρούσα εργασία, έγινε ανασκόπηση των τεχνολογιών μικρο-συστοιχιών και των εφαρμογών αυτών, υπογραμμίστηκε ένα σημαντικό πρόβλημα που έχουν οι υπάρχουσες τεχνολογίες εκτύπωσης μικρο-συστοιχιών και προτάθηκε μία μέθοδος για την κατασκευή μικρο-συστοιχιών αντισωμάτων η οποία παρακάμπτει αυτό το πρόβλημα. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, έγιναν με ένα συγκεκριμένο αντίσωμα και για αυτό το αντίσωμα, καθορίστηκαν τα βέλτιστα πρωτόκολλα και οι διαδικασίες έως την κατασκευή μιας συστοιχίας. Αυτή η νέα τεχνική φαίνεται αρκετά αποδοτική και υποσχόμενη, αλλά ακόμα βρίσκεται στα αρχικά στάδια ανάπτυξής της και πολλά ακόμα πειράματα πρέπει να γίνουν. Αυτό γιατί όντας μια πρώιμη ακόμα τεχνολογία υστερεί σε σχέση με άλλες στο ότι έχει δοκιμαστεί με ένα μόνο αντίσωμα, δεν μπορεί ακόμα να αποδώσει μικρο-συστοιχίες τόσο καλές όσο αυτές άλλων τεχνολογιών και για μερικούς άλλους λόγους.

Τα αποτελέσματα που περιλαμβάνονται στην εργασία αποτελούν μια πρώτη ενδεικτική προσέγγιση. Προτάσεις για ακόμη καλύτερα αποτελέσματα στην περίπτωση συνέχισης αυτής της έρευνας είναι:

- 1) Χρήση διαλυμάτων αντισώματος με πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση για ένα παχύτερο στρώμα.
- 2) Χημική (ή άλλους είδους) επεξεργασία της επιφάνειας των αποδεκτών για ενίσχυση της προσκόλλησης των αντισωμάτων.
- 3) Προσπάθεια αλλαγής των αποδεκτών και χρήσης εργοστασιακών για οπτικά καλύτερα αποτελέσματα.



## Βιβλιογραφία

1. **WIKIPEDIA**. [Ηλεκτρονικό] [Παραπομπή: 1 9 2017.] <https://en.wikipedia.org/wiki/Microarray>.
2. **Arrayit**. [Ηλεκτρονικό] [Παραπομπή: 1 9 2017.] <http://www.arrayit.com/>.
3. **SCRIPPS RESEARCH**. [Ηλεκτρονικό] [Παραπομπή: 1 9 2017.] <https://www.scripps.edu/california/research/dna-array/custom/arrayer.html>.
4. **Fabrication of Protein Microarrays for Immunoassay Using the Electrospray Deposition (ESD) Method**. Lee, Bumhwan, και συν. 2003.
5. Miller, Steve, και συν. Solid and Suspension Microarrays for Microbial Diagnostics. *Methods in Microbiology Vol. 42, Current and Emerging Technologies for the Diagnosis of Microbial Infections*. s.l. : Elsevier, 2015.
6. **WIKIPEDIA**. [Ηλεκτρονικό] [Παραπομπή: 7 9 2017.] [https://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_microarray](https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_microarray).
7. Sutandy, FX Reymond, και συν. *Overview of Protein Microarrays*. 2014.
8. **WIKIPEDIA**. [Ηλεκτρονικό] [Παραπομπή: 7 9 2017.] [https://en.wikipedia.org/wiki/Protein\\_microarray](https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_microarray).
9. **WIKIPEDIA**. [Ηλεκτρονικό] [Παραπομπή: 7 9 2017.] [https://en.wikipedia.org/wiki/Peptide\\_microarray](https://en.wikipedia.org/wiki/Peptide_microarray).
10. **WIKIPEDIA**. [Ηλεκτρονικό] [Παραπομπή: 7 9 2017.] [https://en.wikipedia.org/wiki/Antibody\\_microarray](https://en.wikipedia.org/wiki/Antibody_microarray).
11. Philipp, Angenendt. Progress in protein and microarray antibody technology. *Drug Discovery Today, Vol. 10*. s.l. : Elsevier, 2005.
12. *Multi-omics approaches to disease*. Hasin, Yehudit, Seldin, Marcus και Lusic, Aldons. 2017.
13. Χρήστος, Μπουτόπουλος. *Αλληλεπίδραση Ακτινοβολίας Λέιζερ και Οργανικών Υλικών με Εφαρμογές σε Μικρο - Αισθητήρες*. Αθήνα : s.n., 2011.
14. Νικηφόρος, Ιορδανίδης Θεοχάρης -. *Αυτοματοποίηση Κατασκευής Συσκευών με Συστοιχίες Λεπτών Πορώδων Ικτριωμάτων για Βιολογικές Μελέτες*. Αθήνα : s.n., 2017.





## Παράρτημα Α: Πρωτόκολα

### 1. Καθαρισμός υποστρώματος δότη

- ψεκάσμος του δότη με αιθανόλη 70%
- αφαίρεση υπολειμμάτων με χαρτί
- καθαρισμός με νερό
- ψεκάσμος με αιθανόλη 70%
- καθαρισμός και στέγνωμα με χαρτί
- «φύσημα» με αέρα

### 2. Επεξεργασία του υποστρώματος-δότη με πλάσμα

#### Εξοπλισμός

Plasma Etcher (Plasma Etch, # 775-883-1336)

#### Διαδικασία

##### Ζέσταμα της μηχανής

- Ενεργοποίηση της μηχανής με σήκωμα του διπλού διακόπτη στο πίσω δεξιά μέρος
- ορισμός χρόνου πλάσματος στα 5 min.
- ορισμός πίεσης στα 600 mTorr
- αναμονή ολοκλήρωσης της διαδικασίας
- απασφάλιση κενού

##### Επεξεργασία με πλάσμα

- άνοιγμα θύρας
- εισαγωγή δότη
- ορισμός χρόνου στα 20 sec.
- ορισμός πίεσης στα 300 mTorr
- αναμονή ολοκλήρωσης της διαδικασίας
- απασφάλιση κενού
- άνοιγμα θύρας

### 3. Λυοφιλοποίηση

#### Εξοπλισμός

- Λυοφιλοποιητής, “Virtis Genesis 25EL”.
- Υπολογιστής Ελέγχου του Λυοφιλοποιητή. Περιλαμβάνει το λογισμικό “ENCORE” που ελέγχει και αναφέρει την λειτουργία του λυοφιλοποιητή.
- Παροχή Ρεύματος, Sentinel Power Green SPH 10, 10 kVA.

#### Διαδικασία

##### Ενεργοποίηση του Λυοφιλοποιητή

1. Εισαγωγή του κλειδιού άδειας χρήσης του υπολογιστή στην κατάλληλη θύρα.

2. Ενεργοποίηση της παροχής ρεύματος:

- Ενεργοποίηση του διακόπτη “IN” (ακριβώς δεξιά στο πίσω μέρος της παροχής ρεύματος)
- Επιλογή του πλήκτρου “Select” στο μπροστινό πίνακα της παροχής ρεύματος και έλεγχος των ρυθμίσεων στην οθόνη του μπροστινού πίνακα της παροχής ρεύματος:
- Η τάση εισόδου της παροχής ρεύματος πρέπει να είναι περίπου 230 Volts
- Η τάση εξόδου και η συχνότητα της παροχής ρεύματος πρέπει να είναι περίπου 230 Volts και 60 Hz, αντίστοιχα.
- Συνεχόμενη πίεση του πλήκτρου “ON” στον μπροστινό πίνακα της παροχής ρεύματος μέχρι να ακουστεί ο ηλεκτρονικός ήχος, μπιπ.
- Έλεγχος ότι το ημιτονοειδές στην οθόνη του μπροστινού πίνακα της παροχής ρεύματος αναβοσβήνει.
- Ενεργοποίηση του διακόπτη “OUT” (αριστερά στο πίσω μέρος της παροχής ρεύματος) 3. Ενεργοποίηση του διακόπτη που θέτει σε λειτουργία τον Λυοφιλοποιητή (διακόπτης στο πίσω τμήμα του λυοφιλοποιητή)

3. Ενεργοποίηση του υπολογιστή ελέγχου του λυοφιλοποιητή.

4. Επιλογή της οθόνης “Synoptic” στο λογισμικό ENOCRE (το οποίο ανοίγει αυτόματα με την ενεργοποίηση του υπολογιστή και του λυοφιλοποιητή) και έλεγχος ότι οι παράμετροι έχουν λογικές τιμές.

##### Επιλογή και Έναρξη Πρωτοκόλλου Λυοφιλοποίησης

1. Επιλογή του επιθυμητού πρωτοκόλλου για να πραγματοποιηθεί :

- Επιλογή της οθόνης “Freeze dry Screen” στο λογισμικό ENOCRE. Έπειτα πάτημα του “Load Recipe”, επιλογή του επιθυμητού πρωτοκόλλου από τα αποθηκευμένα και πάτημα της επιλογής “Continue”.

2. Στην οθόνη “Freeze dry Screen” στο λογισμικό ENOCRE, επιλέγεται το “Shelf Load” οπότε και αρχίζει η ψύξη του συμπυκνωτή.

3. Όταν τα δείγματα είναι έτοιμα να λυοφιλοποιηθούν, τοποθετούνται στα ράφια του λυοφιλοποιητή:

- Επιλογή της οθόνης “Manual Tools” στο λογισμικό ENCORE και ενεργοποίηση του διακόπτη “Release Vacuum” και αποσφράγιση της θύρας του λυοφιλοποιητή
- Αναμονή ώσου η πίεση μέσα στον λυοφιλοποιητή να ισορροπήσει με την πίεση του περιβάλλοντος και άνοιγμα της θύρας του λυοφιλοποιητή μόλις γίνει αυτό. 59
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στα ράφια του λυοφιλοποιητή και καλό κλείσιμο της θύρας.
- Στην οθόνη “Manual Tools” απενεργοποιείται ο διακόπτης “Release Vacuum”.

4. Επιβεβαίωση ότι η θύρα του λυοφιλοποιητή και η θύρα του συμπυκνωτή είναι πολύ καλά κλειστές.

5. Επιλογή της οθόνης “Freeze dry Screen” στο λογισμικό ENCORE και επιλογή του πλήκτρου “Start the Cycle”. Επιβεβαίωση επιλογής εισάγοντας “y” στην εμφανιζόμενη οθόνη.

- Αρχίζει η πραγμάτωση του πρωτοκόλλου λυοφιλιοποίησης που περιγράφεται στην οθόνη “Freeze dry Screen”
- Τυπικά πρωτόκολλα λυοφιλιοποίησης για λεπτά ικρίσματα διαρκούν 7 ώρες ενώ για παχύτερα ικρίσματα απαιτούνται περίπου 36 ώρες.
- Έλεγχος ότι στο στάδιο της πρωτοταγούς αφυδάτωσης η αντλία κενού επιτυγχάνει κενό 150 mT. Σε περίπτωση που αυτό δε συμβεί, οι πιθανές αιτίες είναι δύο:

i. Το λάδι της αντλίας κενού χρειάζεται αλλαγή

ii. Η θύρα του λυοφιλοποιητή ή του συμπυκνωτή δεν είναι καλά κλειστή. Σε αυτή την περίπτωση η λειτουργία του λυοφιλοποιητή πρέπει να διακοπεί άμεσα.

Διακοπή κύκλου λυοφιλιοποίησης και απομάκρυνση λυοφιλοποιημένων δειγμάτων

1. Μετά από τουλάχιστον 2 ώρες δευτεροταγούς αφυδάτωσης στους 20 °C/min, επιλέγεται το πλήκτρο “Cancel Current Cycle” στον πίνακα ENOCRE που εμφανίζεται δεξιά όλων των επιλεγόμενων οθόνων. Επιβεβαίωση επιλογής εισάγοντας “y” στην εμφανιζόμενη οθόνη. 2. Επιλογή της οθόνης “Manual Tools” στο λογισμικό ENCORE και ενεργοποίηση του διακόπτη “Release Vacuum” και αποσφράγιση της θύρας του λυοφιλοποιητή

2. Αποσφράγιση της θύρας του λυοφιλοποιητή και αναμονή ώσου η πίεση μέσα στον λυοφιλοποιητή να ισορροπήσει με την πίεση του περιβάλλοντος οπότε και ανοίγει η θύρα.

3. Αφαίρεση των δειγμάτων από τα ράφια του λυοφιλοποιητή και καλό κλείσιμο της θύρας.

Απενεργοποίηση λυοφιλοποιητή

1. Στην οθόνη “Manual Tools” απενεργοποιείται ο διακόπτης “Release Vacuum” και ενεργοποιείται ο διακόπτης “Defrost” που βρίσκεται πάλι στην Οθόνη “Manual Tools”.

- Με την ενεργοποίηση του διακόπτη “Defrost” ενεργοποιείται και το σύστημα θέρμανσης του λυοφιλοποιητή, ενώ παράγεται θόρυβος από τους δύο ανεμιστήρες που λειτουργούν σε αυτήν τη φάση.

2. Επιλογή της οθόνης “Synoptic Screen” και παρατήρηση της αύξησης της θερμοκρασίας του συμπυκνωτή.

3. Μόλις η θερμοκρασία του συμπυκνωτή φτάσει περίπου 35-40 °C, απενεργοποιείται ο διακόπτης “Defrost” στην οθόνη “Manual Tools”.

- Σε αυτό το σημείο η θερμοκρασία του “interstage” συστήματος θα είναι μικρότερη των - 10 °C.
4. Αποσφράγιση της θύρας του συμπυκνωτή και αναμονή ώσπου να λιώσει όλος ο υπάρχον πάγος.
  5. Με χρήση ενός στυλό πραγματοποιείται απαλά πίεση της βαλβίδας αποστράγγισης νερού που βρίσκεται στα αριστερά της θύρας του συμπυκνωτή με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν νερού.
    - Στην περίπτωση που το δείγμα είναι λεπτά ικριώματα, τότε το υπάρχον νερό είναι ελάχιστο ως μηδαμινό.
  6. Αναμονή ώσπου η θερμοκρασία και του “interstage” συστήματος και του συμπυκνωτή να φτάσουν τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, 60
  7. Απενεργοποίηση του διακόπτη του λυοφιλοποιητή (διακόπτης στο πίσω τμήμα του λυοφιλοποιητή)
  8. Απενεργοποίηση του υπολογιστή που ελέγχει τον λυοφιλοποιητή (μέσω πληκτρολόγησης της επιλογής “Windows start” στο πληκτρολόγιο και μετέπειτα επιλογή της εντολής “Shut down”)
  9. Απενεργοποίηση της παροχής ρεύματος
    - Απενεργοποίηση του διακόπτη “OUT” (αριστερά στο πίσω μέρος της παροχής ρεύματος)
    - Συνεχόμενη πίεση της επιλογής “standby” στον μπροστινό πίνακα της παροχής ρεύματος ώσπου να σημειωθεί συνεχόμενο ηλεκτρονικός ήχος, μπιπ και να αναβοσβήνει στην οθόνη του πίνακα ένα τριγωνικό σήμα προσοχής με θαυμαστικό.
    - Απενεργοποίηση του διακόπτη “IN” (δεξιά στο πίσω μέρος της παροχής ρεύματος)

#### 4. Έλεγχος λειτουργικότητας μικρο-συστοιχιών

##### Υλικά

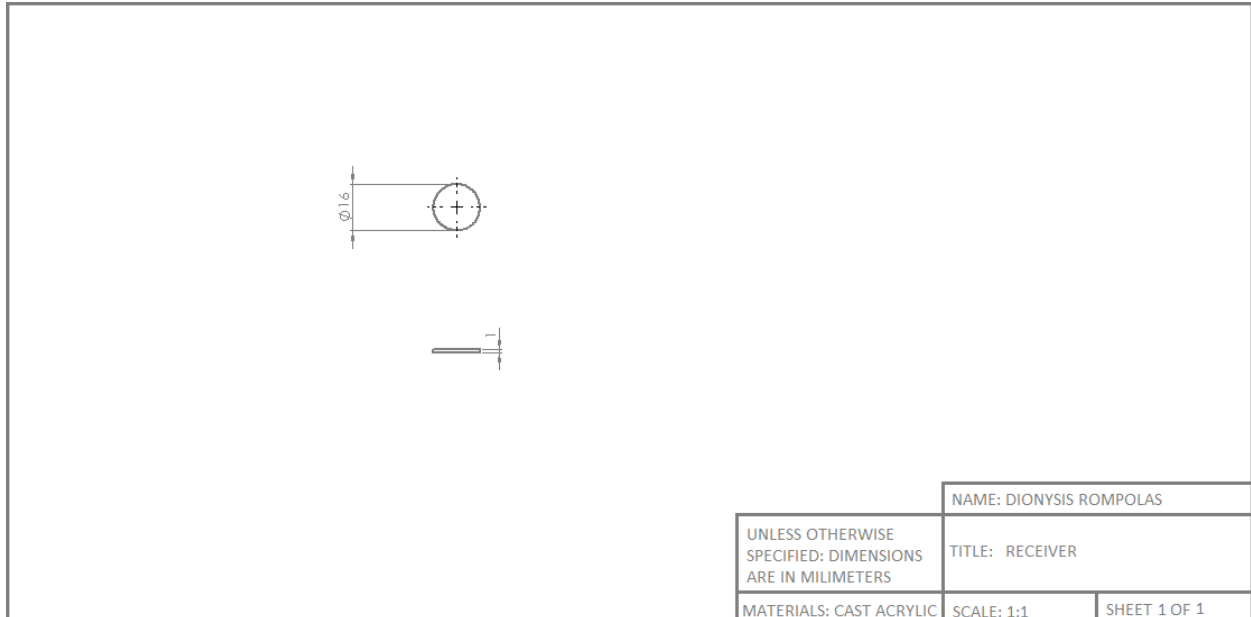
- αποδέκτες με μικρο-συστοιχίες από το αντίσωμα Β
- αντι-αντίσωμα για το συγκεκριμένο αντίσωμα συζευγμένο με φυκοερυθρίνη

##### Διαδικασία

- τοποθέτηση των αποδεκτών σε 96-άρα ή 48-άρα πλάκα
- 3 πλύσεις με διαλύτη (buffer pbs, bsa 1%)
- προσθήκη διαλύματος δευτερογενούς αντισώματος
- “shake” για 1 ώρα και 30 λεπτά
- αφαίρεση υγρού από τη πλάκα
- 3 πλύσεις με διαλύτη όπως παραπάνω
- αφήνουμε τους αποδέκτες να στεγνώσουν στην ατμόσφαιρα
- έλεγχος στο φθορίζον μικροσκόπιο (14)

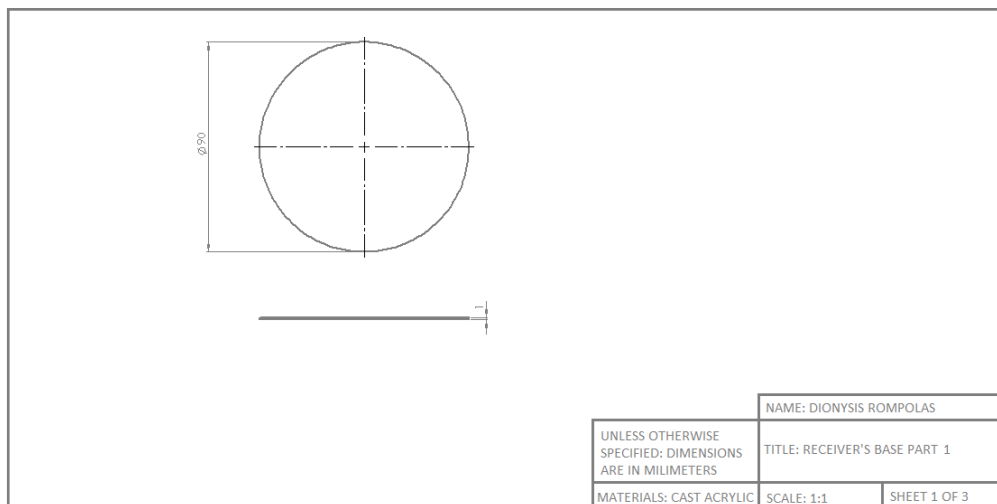
## Παράρτημα Β: Σχέδια

### 1. Αποδέκτες

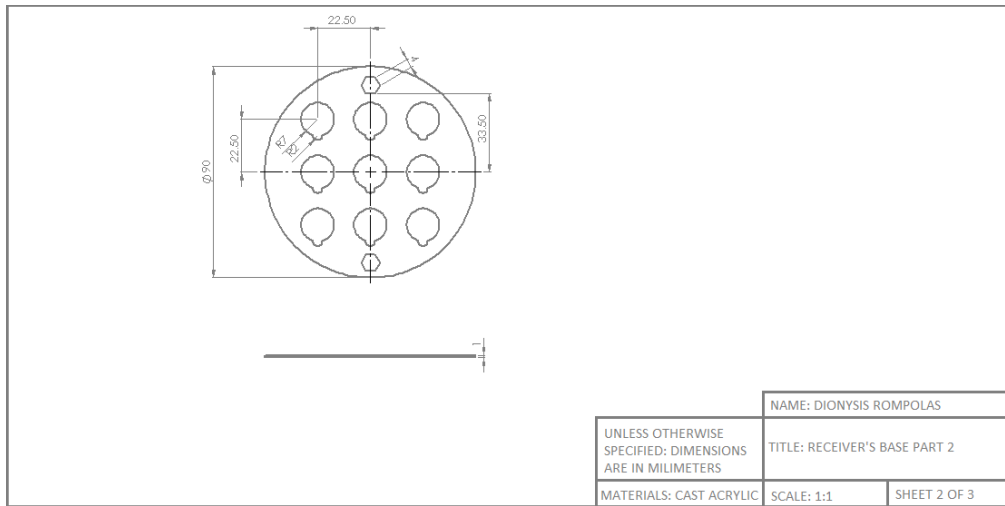


### 2. Βάσεις

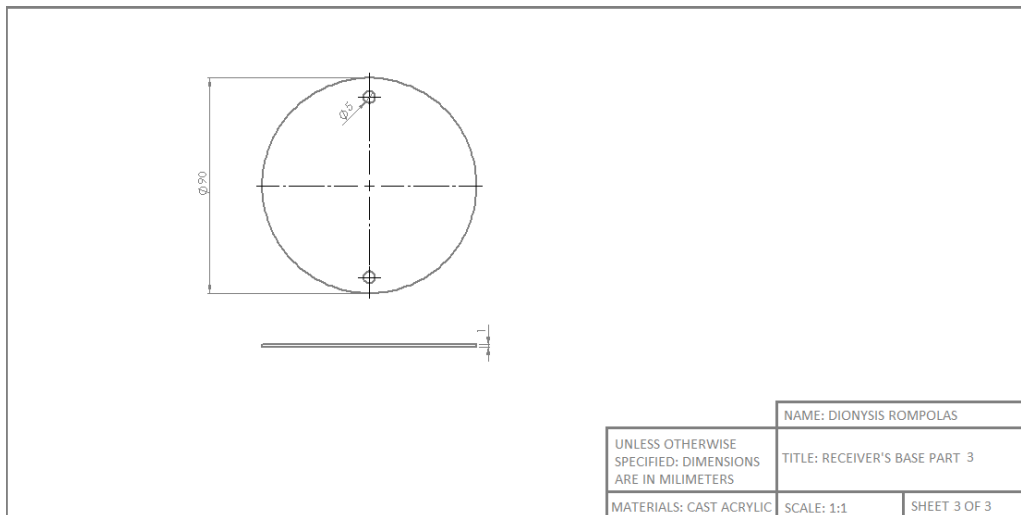
#### κομμάτι 1



κομμάτι 2



κομμάτι 3



## Παράρτημα Γ: Ανασκόπηση μικροσκοπίου JuLi Stage

Το JuLi™ Stage Real-Time Cell History Recorder έχει σχεδιαστεί για να υποστηρίζει τους ερευνητές κυτταρικής βιολογίας να προσεγγίζουν κινητικές εικόνες και δεδομένα από την αρχή μέχρι το τέλος, ώστε να μπορούν να εξοικονομήσουν χρόνο και να επικεντρωθούν σε πιο προηγμένη και πολύτιμη εργασία για την έρευνά τους.

JuLi™ Stage είναι εξοπλισμένο με ένα πλήρως αυτοματοποιημένο x-y-z κινήσεων σύστημα και πολυκαναλικά χρώματα φθορισμού για την απόκτηση κυτταρικών εικόνων και βίντεο από διάφορες πλάκες με κυτταροκαλλιέργειας (μέχρι 384 κάψουλες) και πλάκες σε θάλαμο καλλιιεργειών (incubator). Επιτρέπει επίσης στους χρήστες να επιτυγχάνουν ποσοτικά αποτελέσματα κυτταρικής πληρότητας με χαμηλές διακυμάνσεις, καθώς και την καμπύλη ανάπτυξης χρησιμοποιώντας ανάλυση βάσει εικόνας για ένα φωτεινό πεδίο.

JuLi™ Stage είναι ένας καταγραφές σε πραγματικό χρόνο της κυτταρικής εξέλιξης σχεδιασμένος για απεικόνιση και ανάλυση ζωντανών κυττάρων.

Οι βασικές λειτουργίες που διατίθενται με το JuLi™ Stage παρατίθενται παρακάτω:

- επούλωση των πληγών
- απόπτωση και κυτταροτοξικότητα
- πολλαπλασιασμός κυττάρων
- έκφραση φθορισμού
- τρισδιάστατη σφαιροειδή καλλιέργεια
- παρακολούθηση βλαστικών κυττάρων
- παρακολούθηση κυτταρικής ανάπτυξης
- διαφοροποίηση των νευρώνων
- αγγειογένεση







## Παράρτημα Δ: Κώδικας υπολογισμού μάζας μικρο-συστοιχίας

Παρατίθεται ο κώδικας σε Matlab υπολογισμού μάζας μικρο-συστοιχίας:

```
%join
%using rgb photos
pix=1456*1936;

%point1
pic1=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point1\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00001.jpg');
pic2=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point1\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00002.jpg');
pic3=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point1\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00003.jpg');
pic4=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point1\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00004.jpg');
pic5=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point1\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00005.jpg');
pic6=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point1\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00006.jpg');
pic7=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point1\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00007.jpg');
pic8=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point1\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00008.jpg');
pic9=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point1\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00009.jpg');
pic10=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point1\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00010.jpg');
pic11=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point1\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00011.jpg');
pic12=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point1\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00012.jpg');
image1=cat(2,pic1,pic2);
image1=cat(2,image1,pic3);
image2=cat(2,pic4,pic5);
image2=cat(2,image2,pic6);
image3=cat(2,pic7,pic8);
image3=cat(2,image3,pic9);
image4=cat(2,pic10,pic11);
image4=cat(2,image4,pic12);
image5=cat(1,image1,image2);
image6=cat(1,image3,image4);
pic=cat(1,image5,image6);
pic_gray=rgb2gray(pic);
int1=sum(sum(pic_gray))/pix;

%point2
pic1=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point2\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00001.jpg');
pic2=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point2\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00002.jpg');
```

```

pic3=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point2\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00003.jpg');
pic4=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point2\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00004.jpg');
pic5=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point2\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00005.jpg');
pic6=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point2\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00006.jpg');
pic7=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point2\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00007.jpg');
pic8=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point2\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00008.jpg');
pic9=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point2\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00009.jpg');
pic10=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point2\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00010.jpg');
pic11=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point2\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00011.jpg');
pic12=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point2\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00012.jpg');
image1=cat(2,pic1,pic2);
image1=cat(2,image1,pic3);
image2=cat(2,pic4,pic5);
image2=cat(2,image2,pic6);
image3=cat(2,pic7,pic8);
image3=cat(2,image3,pic9);
image4=cat(2,pic10,pic11);
image4=cat(2,image4,pic12);
image5=cat(1,image1,image2);
image6=cat(1,image3,image4);
pic=cat(1,image5,image6);
pic_gray=rgb2gray(pic);
int2=sum(sum(pic_gray))/pix;

```

```
%point3
```

```

pic1=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point3\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00001.jpg');
pic2=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point3\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00002.jpg');
pic3=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point3\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00003.jpg');
pic4=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point3\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00004.jpg');
pic5=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point3\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00005.jpg');
pic6=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point3\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00006.jpg');
pic7=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point3\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00007.jpg');
pic8=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point3\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00008.jpg');
pic9=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point3\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00009.jpg');
pic10=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point3\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00010.jpg');
pic11=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point3\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\00011.jpg');

```

```

pic12=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point3
\J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00012.jpg');
image1=cat(2,pic1,pic2);
image1=cat(2,image1,pic3);
image2=cat(2,pic4,pic5);
image2=cat(2,image2,pic6);
image3=cat(2,pic7,pic8);
image3=cat(2,image3,pic9);
image4=cat(2,pic10,pic11);
image4=cat(2,image4,pic12);
image5=cat(1,image1,image2);
image6=cat(1,image3,image4);
pic=cat(1,image5,image6);
pic_gray=rgb2gray(pic);
int3=sum(sum(pic_gray))/pix;

```

%point4

```

pic1=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point4\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00001.jpg');
pic2=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point4\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00002.jpg');
pic3=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point4\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00003.jpg');
pic4=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point4\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00004.jpg');
pic5=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point4\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00005.jpg');
pic6=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point4\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00006.jpg');
pic7=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point4\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00007.jpg');
pic8=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point4\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00008.jpg');
pic9=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point4\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00009.jpg');
pic10=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point4
\J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00010.jpg');
pic11=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point4
\J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00011.jpg');
pic12=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point4
\J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00012.jpg');
image1=cat(2,pic1,pic2);
image1=cat(2,image1,pic3);
image2=cat(2,pic4,pic5);
image2=cat(2,image2,pic6);
image3=cat(2,pic7,pic8);
image3=cat(2,image3,pic9);
image4=cat(2,pic10,pic11);
image4=cat(2,image4,pic12);
image5=cat(1,image1,image2);
image6=cat(1,image3,image4);
pic=cat(1,image5,image6);
pic_gray=rgb2gray(pic);
int4=sum(sum(pic_gray))/pix;

```

%point5

```

pic1=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point5\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0001.jpg');
pic2=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point5\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0002.jpg');
pic3=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point5\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0003.jpg');
pic4=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point5\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0004.jpg');
pic5=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point5\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0005.jpg');
pic6=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point5\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0006.jpg');
pic7=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point5\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0007.jpg');
pic8=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point5\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0008.jpg');
pic9=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point5\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0009.jpg');
pic10=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point5\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0010.jpg');
pic11=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point5\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0011.jpg');
pic12=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point5\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0012.jpg');
image1=cat(2,pic1,pic2);
image1=cat(2,image1,pic3);
image2=cat(2,pic4,pic5);
image2=cat(2,image2,pic6);
image3=cat(2,pic7,pic8);
image3=cat(2,image3,pic9);
image4=cat(2,pic10,pic11);
image4=cat(2,image4,pic12);
image5=cat(1,image1,image2);
image6=cat(1,image3,image4);
pic=cat(1,image5,image6);
pic_gray=rgb2gray(pic);
int5=sum(sum(pic_gray))/pix;

```

```

%point6

```

```

pic1=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point6\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0001.jpg');
pic2=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point6\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0002.jpg');
pic3=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point6\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0003.jpg');
pic4=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point6\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0004.jpg');
pic5=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point6\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0005.jpg');
pic6=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point6\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0006.jpg');
pic7=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point6\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0007.jpg');
pic8=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point6\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0008.jpg');
pic9=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point6\
J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0009.jpg');

```

```

pic10=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point6
\J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00010.jpg');
pic11=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point6
\J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00011.jpg');
pic12=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point6
\J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00012.jpg');
image1=cat(2,pic1,pic2);
image1=cat(2,image1,pic3);
image2=cat(2,pic4,pic5);
image2=cat(2,image2,pic6);
image3=cat(2,pic7,pic8);
image3=cat(2,image3,pic9);
image4=cat(2,pic10,pic11);
image4=cat(2,image4,pic12);
image5=cat(1,image1,image2);
image6=cat(1,image3,image4);
pic=cat(1,image5,image6);
pic_gray=rgb2gray(pic);
int6=sum(sum(pic_gray))/pix;

%point7
pic1=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point7\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00001.jpg');
pic2=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point7\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00002.jpg');
pic3=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point7\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00003.jpg');
pic4=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point7\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00004.jpg');
pic5=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point7\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00005.jpg');
pic6=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point7\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00006.jpg');
pic7=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point7\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00007.jpg');
pic8=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point7\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00008.jpg');
pic9=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point7\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00009.jpg');
pic10=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point7\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00010.jpg');
pic11=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point7\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00011.jpg');
pic12=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point7\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00012.jpg');
image1=cat(2,pic1,pic2);
image1=cat(2,image1,pic3);
image2=cat(2,pic4,pic5);
image2=cat(2,image2,pic6);
image3=cat(2,pic7,pic8);
image3=cat(2,image3,pic9);
image4=cat(2,pic10,pic11);
image4=cat(2,image4,pic12);
image5=cat(1,image1,image2);
image6=cat(1,image3,image4);
pic=cat(1,image5,image6);
pic_gray=rgb2gray(pic);

```

```
int7=sum(sum(pic_gray))/pix;
```

```
%point8
```

```
pic1=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point8\J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0001.jpg');  
pic2=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point8\J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0002.jpg');  
pic3=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point8\J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0003.jpg');  
pic4=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point8\J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0004.jpg');  
pic5=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point8\J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0005.jpg');  
pic6=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point8\J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0006.jpg');  
pic7=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point8\J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0007.jpg');  
pic8=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point8\J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0008.jpg');  
pic9=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point8\J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0009.jpg');  
pic10=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point8\J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0010.jpg');  
pic11=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point8\J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0011.jpg');  
pic12=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point8\J10\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0012.jpg');  
image1=cat(2,pic1,pic2);  
image1=cat(2,image1,pic3);  
image2=cat(2,pic4,pic5);  
image2=cat(2,image2,pic6);  
image3=cat(2,pic7,pic8);  
image3=cat(2,image3,pic9);  
image4=cat(2,pic10,pic11);  
image4=cat(2,image4,pic12);  
image5=cat(1,image1,image2);  
image6=cat(1,image3,image4);  
pic=cat(1,image5,image6);  
pic_gray=rgb2gray(pic);  
int8=sum(sum(pic_gray))/pix;
```

```
%point9
```

```
pic1=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point9\K09\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0001.jpg');  
pic2=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point9\K09\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0002.jpg');  
pic3=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point9\K09\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0003.jpg');  
pic4=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point9\K09\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0004.jpg');  
pic5=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point9\K09\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0005.jpg');  
pic6=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point9\K09\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0006.jpg');  
pic7=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point9\K09\POINT 0001\RFP\SCAN 0001\0007.jpg');
```

```

pic8=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point9\
K09\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00008.jpg');
pic9=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point9\
K09\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00009.jpg');
pic10=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point9\
K09\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00010.jpg');
pic11=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point9\
K09\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00011.jpg');
pic12=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point9\
K09\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00012.jpg');
image1=cat(2,pic1,pic2);
image1=cat(2,image1,pic3);
image2=cat(2,pic4,pic5);
image2=cat(2,image2,pic6);
image3=cat(2,pic7,pic8);
image3=cat(2,image3,pic9);
image4=cat(2,pic10,pic11);
image4=cat(2,image4,pic12);
image5=cat(1,image1,image2);
image6=cat(1,image3,image4);
pic=cat(1,image5,image6);
pic_gray=rgb2gray(pic);
int9=sum(sum(pic_gray))/pix;

```

```
%point10
```

```

pic1=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point10\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00001.jpg');
pic2=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point10\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00002.jpg');
pic3=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point10\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00003.jpg');
pic4=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point10\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00004.jpg');
pic5=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point10\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00005.jpg');
pic6=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point10\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00006.jpg');
pic7=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point10\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00007.jpg');
pic8=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point10\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00008.jpg');
pic9=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point10\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00009.jpg');
pic10=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point10\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00010.jpg');
pic11=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point10\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00011.jpg');
pic12=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\curve_4\point10\
J10\POINT 00001\RFP\SCAN 00001\00012.jpg');
image1=cat(2,pic1,pic2);
image1=cat(2,image1,pic3);
image2=cat(2,pic4,pic5);
image2=cat(2,image2,pic6);
image3=cat(2,pic7,pic8);
image3=cat(2,image3,pic9);
image4=cat(2,pic10,pic11);
image4=cat(2,image4,pic12);

```

```

image5=cat(1,image1,image2);
image6=cat(1,image3,image4);
pic=cat(1,image5,image6);
pic_gray=rgb2gray(pic);
int10=sum(sum(pic_gray))/pix;

%curve vectors
int=[0 int1 int2 int3 int4 int6 int7 int8 int9];
mass=[0 0.012903 0.015385 0.019048 0.025 0.044444 0.057143 0.08 0.13333];
%plot(int,mass)
int=int';
mass=mass';
mmass=fit(int,mass,'poly2','Robust','LAR');

testmy=imread('C:\Users\diony\Desktop\antibody_printing_project\peirama#8\afterwash test\exp#6(best_array_2)\1f_afterwash1.jpg');
testmy1=rgb2gray(testmy);
intmy1=sum(sum(testmy1))/pix;

mymass=mmass(intmy1);

```