

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Θετικών Επιστημών - Τμήμα Βιολογίας
και
Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ανάπτυξη και κατασκευή μικροσυστοιχιών DNA για την
ανάλυση της μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων στόχων
του μεταγραφικού παράγοντα GCN4**

ΜΑΡΓΑΡΙΤΗΣ ΘΑΝΑΣΗΣ

Υπεύθυνος Ερευνητής : Δ. Καφετζόπουλος
Επιβλέπουσα καθηγήτρια : Δ. Αλεξανδράκη

Ηράκλειο 2003

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, και συγκεκριμένα, τον Γιάννη το Βόντα, για την ουσιαστική βοήθειά του στην έναρξη αυτής της εργασίας με τα πρώτα πρωτόκολλα - οδηγούς για τις υβριδοποιήσεις σε μικροσυστοιχίες DNA και τις χρήσιμες παρατηρήσεις του στο σχεδιασμό της μικροσυστοιχίας, τον Δρ. Γιώργο. Θηραίο και την Ειρήνη την Τοπαλίδου, για τη παραχώρηση των στελεχών του ζαχαρομύκητα, εκκινήτων και προσωπικού χρόνου καθώς και την εμπειρία τους στον ζαχαρομύκητα, την Καλλιόπη Γκούσκου και το Γιάννη Καγιαμπάκη για τη συμμετοχή τους στην πρώτο στάδιο αυτής της εργασίας, τον Γιώργο Παπαγιαννάκη, που απέδειξε ότι μπορούμε να τα φτιάξουμε καλύτερα μόνοι μας, το Λευτέρη Σπανό, για την πολύπλοκη μεταφορά υλικών με το «τέρας» Biomek2000, τον Αναστάση Ούλα για την ενεργή συμμετοχή του και τις γνώσεις του στον προγραμματισμό σε Matlab, και το Γιώργο Παπαδάκη και την Έφη Καράντζαλη για τη συνεργασία τους στα πλαίσια αυτής της εργασίας. Επίσης, θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην αναφέρω τους ανθρώπους που με στήριξαν ψυχολογικά καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας, τους γονείς μου και τη Δέσποινα, καθώς κι αυτούς που συνέβαλαν στην ευχάριστη ατμόσφαιρα που επικρατούσε στο εργαστήριο, τη Μανουέλα, το Νίκο, το Γιάννη, τη Χρύσα και την Πόπη. Τέλος, η παρούσα εργασία δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση και την ενεργή συμμετοχή του Δρ. Δημήτρη Καφετζόπουλου, τόσο ως επιβλέπων ερευνητής, όσο και ως φίλος.

Εισαγωγή

Το γενετικό υλικό των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι οργανωμένο σε ετερογενώς συμπυκνωμένες ίνες χρωματίνης. Το αν ένα γονίδιο θα ενεργοποιηθεί ή θα σιγήσει καθορίζεται, μεταξύ άλλων, από αρνητικούς μεταγραφικούς παράγοντες που προωθούν το σχηματισμό συμπυκνωμένης, ανώτερης δομής χρωματίνης και σε θετικούς που ενεργοποιούν την έκφραση των γονιδίων, καθιστώντας τα πιο προσιτά στη βασική μεταγραφική μηχανή. Οι δεύτεροι είναι αυτοί που κυρίως χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα για απόκριση σε καταστάσεις περιβαλλοντικών αλλαγών - στρες, όπως και για την έκφραση συστατικά εκφραζόμενων (housekeeping) γονιδίων. (Narlikar et al., 2002).

Η μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω των πρωτεϊνών αυτών επιτελείται μέσω πρόσδεσης σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στα γονίδια – στόχους τους και αλλάζοντας τη θέση ή τη δομή των νουκλεοσωμάτων ή στρατολογώντας γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες (GTFs), την πρωτεΐνη που συνδέεται με το TATA (TBP) ή / και την RNA πολυμεράση (RNA Pol II) στον υποκινητή των γονιδίων. Όλες αυτές οι αλλαγές δεν γίνονται με την άμεση επίδραση των μεταγραφικών ενεργοποιητών, αλλά έμμεσα, με τη στρατολόγηση συμπλόκων, που γενικά ονομάζονται συνενεργοποιητές. Οι τρόποι που επιτελούν τη λειτουργία τους είναι :

- με ενεργητική μετατόπιση των νουκλεοσωμάτων, αποκαλύπτοντας ή καλύπτοντας θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών
- με ακετυλίωση των αμινο-τελικών ουρών των ιστονών, καθιστώντας τη δομή της χρωματίνης πιο προσβάσιμη
- με στρατολόγηση γενικών μεταγραφικών παραγόντων, TBP ή / και RNA πολυμεράσης.
- με υποστήριξη της επιμήκυνσης (elongation) του μεταγράφου

Ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής ή συνενεργοποιητής δεν μπορεί από μόνος του να δημιουργήσει την τεράστια πολυπλοκότητα στη ρύθμιση της μεταγραφής των ευκαρυωτικών γονιδίων. Καθένας από αυτούς, όμως, μπορεί να είναι ο καθοριστικός ρυθμιστής των επιπέδων έκφρασης ενός δεδομένου γονιδίου Ένα λοιπόν από τα πιο βασικά ερωτήματα στη Βιολογία είναι να καταλάβουμε πώς οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες επηρεάζουν τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Devaux et al., 2001).

Τα τελευταία χρόνια, οι αλληλουχίσεις των γονιδιωμάτων έχουν δώσει ένα μεγάλο όγκο πληροφορίας, ο οποίος όμως δεν είναι άμεσα εκμεταλλεύσιμος. Αν συνδυαστεί με τη δυναμικότητα της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών DNA μπορεί να προσεγγίσει ικανοποιητικά το παραπάνω πρόβλημα. Η τεχνολογία αυτή είναι μια τεχνολογία-πλατφόρμα που μπορεί να συμβάλει μαζικά στις μεταγονιδιωματικές προσεγγίσεις. Πρόκειται για μια μεγάλης κλίμακας καταγραφή των επιπέδων νουκλεϊκών οξέων, που σημαίνονται με φθορίζουσες ή ραδιοσημασμένες ομάδες και υβριδοποιούνται σε τμήματα DNA που είναι τοποθετημένα σε σε καθορισμένες θέσεις πάνω σε γυάλινα πλακίδια (DeRisi et al., 1997). Οι μικροσυστοιχίες DNA χρησιμοποιούνται για ανίχνευση γονιδιακών διπλασιασμών ή απαισιών (Albertson, 2003), πολυμορφισμών (SNPs) στην αλληλουχία του DNA (Liljedahl et al., 2003), αλληλεπιδράσεων DNA-πρωτεϊνών

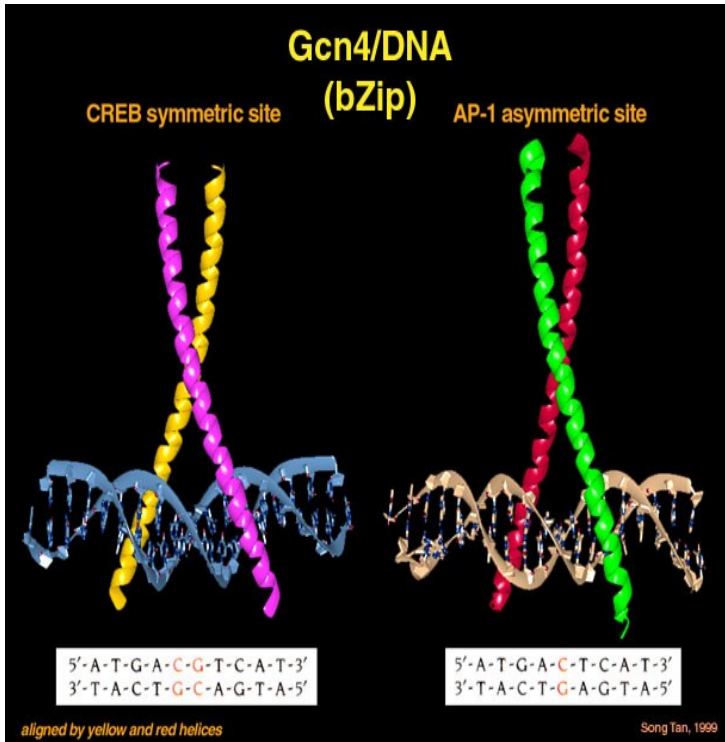
(Ren et al., 2000), δευτεροταγούς δομής του RNA (Mir and Southern, 1999), κ.ά. Αλλά η κύρια χρήση τους είναι η μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης.

Οι μετρήσεις της γονιδιακής έκφρασης που παραλαμβάνονται με τη χρήση των μικροσυστοιχιών αποτελούν άμεσο δείκτη της μεταγραφικής κατάστασης του γονιδίου. Μεταβολές στην έκφραση είναι υπεύθυνες για μορφολογικές και φαινοτυπικές αλλαγές, καθώς και ενδεικτικές κυτταρικής απόκρισης σε εξωτερικά ερεθίσματα. Εφαρμογές της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών στη μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης έχουν βοηθήσει στην αναγνώριση των ειδικών γονιδίων για κάθε ιστό, μοριακών δεικτών - «δακτυλικό αποτύπωμα» για συγκεκριμένες ασθένειες, μοριακών μονοπατιών και την μελέτη της επίδρασης ουσιών σε βιολογικά συστήματα. Οι μετρήσεις της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες δίνουν μια πληθώρα δεδομένων. Γι' αυτό είναι απαιτητική η διαδικασία της άντλησης βιολογικά χρήσιμης πληροφορίας από αυτά. Γονίδια με ανάλογο προφίλ έκφρασης έχουν άμεσα ή έμμεσα και λειτουργική σχέση μεταξύ τους (Niehrs and Pollet, 1999). Η ανάλυση των προφίλ έκφρασης γονιδίων γίνεται με τη χρήση προγραμμάτων στατιστικής. Μπορεί να γίνει είτε μόνο με τα δεδομένα των προφίλ (unsupervised), είτε χρησιμοποιώντας και εξωτερικές πληροφορίες (supervised) σε ένα πρώτο στάδιο εκμάθησης (Raychaudhuri et al., 2001).

Χρήσιμες πληροφορίες για τις δομή - σύσταση της χρωματίνης σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο μπορεί να πάρει κανείς και με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (chromatin immunoprecipitation-ChIP). Με αυτή είναι δυνατή η άμεση *in vivo* παρακολούθηση της παρουσίας μεταγραφικών παραγόντων ή ιστονών συγκεκριμένου τύπου (π.χ. ακετυλιωμένων σε συγκεκριμένο αμινοξύ) σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (Orlando, 2000). Για μαζική ανάλυση με ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης έχουν συνδυαστεί οι δυο τεχνικές στη μέθοδο ChIP to chip (Lieb et al., 2001). Σαν τμήματα DNA σ' αυτή την περίπτωση, αντί για τις κωδικοποιές περιοχές των γονιδίων χρησιμοποιούνται οι προβλεπόμενες διαγονιδιακές περιοχές (intergenic regions).

Η προσέγγιση μας αποβλέπει στο να συνδυάσει στην ίδια μικροσυστοιχία, τόσο τη μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης, όσο και τον εντοπισμό συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων που επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα τη μεταγραφή των υπό μελέτη γονιδίων. Για να γίνει αυτό το κάθε τμήμα DNA σχεδιάστηκε, ώστε να περιέχει τόσο την περιοχή του υποκινητή που είναι κατά μεγάλο ποσοστό υπεύθυνη για την έκφραση του γονιδίου, όσο και ένα μεγάλο μέρος του ORF του.

Τα υπό μελέτη γονίδια είναι μεταγραφικοί στόχοι του GCN4. Η πρωτεΐνη GCN4 είναι ένας καλά μελετημένος μεταγραφικός παράγοντας του ζαχαρομύκητα, *S. cerevisiae*. Ο οργανισμός-μοντέλο αυτός αποκαλείται και *E. coli* των ευκαρυωτικών οργανισμών. Το γονιδίωμα της ζύμης έχει αλληλουχηθεί και εκτεταμένα χαρακτηριστεί γενετικά. Όπως κάθε άλλος μικροοργανισμός είναι εξαιρετικά εύκολο να καλλιεργηθεί, έχει απλοειδές πυρηνικό DNA και παρόλο το σχετικά μικρό μέγεθος του γονιδιώματος έχει συντηρημένα τα χαρακτηριστικά ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών (Lundblad, 2001, Current Protocols in Molecular Biology, Vol.13, 1-3). Σε συνδυασμό με τα ισχυρά εργαλεία Μοριακής Γενετικής που είναι διαθέσιμα στη ζύμη, τον έχουν καταστήσει οργανισμό επιλογής για τη μελέτη βασικών προβλημάτων της Μοριακής Βιολογίας των ευκαρυωτικών και τον οργανισμό με τις περισσότερες δημοσιεύσεις σε πειράματα που αφορούν μικροσυστοιχίες DNA τόσο για την ανάλυση προφίλ γονιδιακής έκφρασης, όσο και για προφίλ εντοπισμού μεταγραφικών παραγόντων.



Εικόνα 1 Οι περιοχές διμερισμού (φερμουάρ λευκίνης) και πρόσδεσης στο DNA του GCN4

Το GCN4 είναι ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής τύπου βασικού φερμουάρ λευκίνης (bZIP) και ενώνεται με το DNA ως διμερές σε αλληλουχίες του υποκινητή με την αλληλουχία TGA(CG)TCA. Η ενεργότητά του εξαρτάται από υδρόφοβα κατάλοιπα αμινοξέων που εντοπίζονται στην περιοχή ενεργοποίησής του. Ενεργοποιείται στο επίπεδο της μετάφρασης από έλλειψη σε οποιοδήποτε αμινοξύ και έχει ως κύριους μεταγραφικούς στόχους γονίδια ενζύμων βιοσύνθεσης αμινοξέων, βιταμινών και πουρινών. Μελέτες σε πρότυπους υποκινητές έχουν δείξει ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση από το GCN4 γίνεται μέσω των παρακάτω

συνενεργοποιητών :

- του συμπλόκου SAGA που περιέχει την ακετυλοτρανσφεράση ιστονών GCN5
- του συμπλόκου NUA4, που περιέχει την ακετυλοτρανσφεράση ιστονών Esa1
- των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης SWI/SNF και RSC
- των συμπλόκων μεσολάβησης SRB/MED, CCR4 – NOT, Paf1 και Mbf1

Σε μια πρόσφατη εργασία, με τη χρήση μικροσυστοιχιών DNA (Natarajan et al., 2001) αναγνωρίστηκαν 539 γονίδια που ελέγχονται από το GCN4, με 241 από αυτά να περιέχουν την περιοχή πρόσδεσής του στον υποκινητή τους. Στην παρούσα εργασία επιχειρείται η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε ένα μέρος αυτών των γονιδίων – στόχων και η συσχέτισή της με την στρατολόγηση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων στα γονίδια, την απαίτηση για τη φυσική παρουσία τους για την ενεργοποίηση των γονιδίων και τις τροποποιήσεις των ιστονών που πραγματοποιούνται κατά την ενεργοποίηση αυτή. Η πρωτοποριακή διεξοδική αυτή μελέτη αποβλέπει στον επακριβή καθορισμό των απαιτήσεων για σύμπλοκα συνενεργοποιητών, την αιτιολόγηση της χρήσης των συμπλόκων ως σύνολο και συγκεκριμένων, σημαντικών για τη μετάγραφή, συστατικών τους για τα επιλεγμένα γονίδια. Τέλος, η μελέτη αυτή θα βοηθήσει στην κατανόηση του ασαφή μέχρι τώρα κώδικα που συνδέει τις «επιλογές» μηχανισμού για τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων ενός δεδομένου και καλά μελετημένου μεταγραφικού ενεργοποιητή με την αρχιτεκτονική του υποκινητή τους

Πειραματική προσέγγιση και αποτελέσματα

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μια μεθοδολογία για την μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης, η οποία μάλιστα απέδωσε τη πρώτη μικροσυστοιχία DNA που κατασκευάστηκε στην Ελλάδα. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν για να μελετηθούν είναι μεταγραφικοί στόχοι του GCN4, ενός καλά χαρακτηρισμένου μεταγραφικού ενεργοποιητή του ζαχαρομύκητα. Τμήματα αυτών που περιείχαν μέρος του υποκινητή, και μέρος του ανοικτού αναγνωστικού πλαισίου παρελήφθησαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και αποτέθηκαν σε επιστρωμένα πλακίδια. Στην συνέχεια επιβεβαιώθηκε η καταλληλότητά τους για την καταγραφή και μελέτη των προφίλ γονιδιακής έκφρασης και του προφίλ ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης. Επίσης, αναπτύχθηκαν ειδικά εργαλεία για την διευκόλυνση της μαζικής ανάλυσης δεδομένων και αποκτήθηκε εμπειρία στον σχεδιασμό και υλοποίηση μιας τόσο εκτεταμένης μελέτης. Τα στάδια της πειραματικής αυτής προσέγγισης είναι τα ακόλουθα :

1. Παραλαβή υλικών προς υβριδοποίηση

1.1-Παραλαβή μεταλλαγμένων στελεχών

1.2 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων προς υβριδοποίηση

2-Σχεδιασμός μικροσυστοιχιών

2.1 Επιλογή γονιδίων για μελέτη

2.2 Επιλογή γονιδίων-μαρτύρων

2.3 Σχεδιασμός εκκινητών για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-PCR

3-Κατασκευή των μικροσυστοιχιών

3.1 Παραλαβή προϊόντων προς απόθεση

3.2 Επίστρωση πλακιδίων

3.3 Απόθεση

4-Σήμανση και υβριδοποίηση

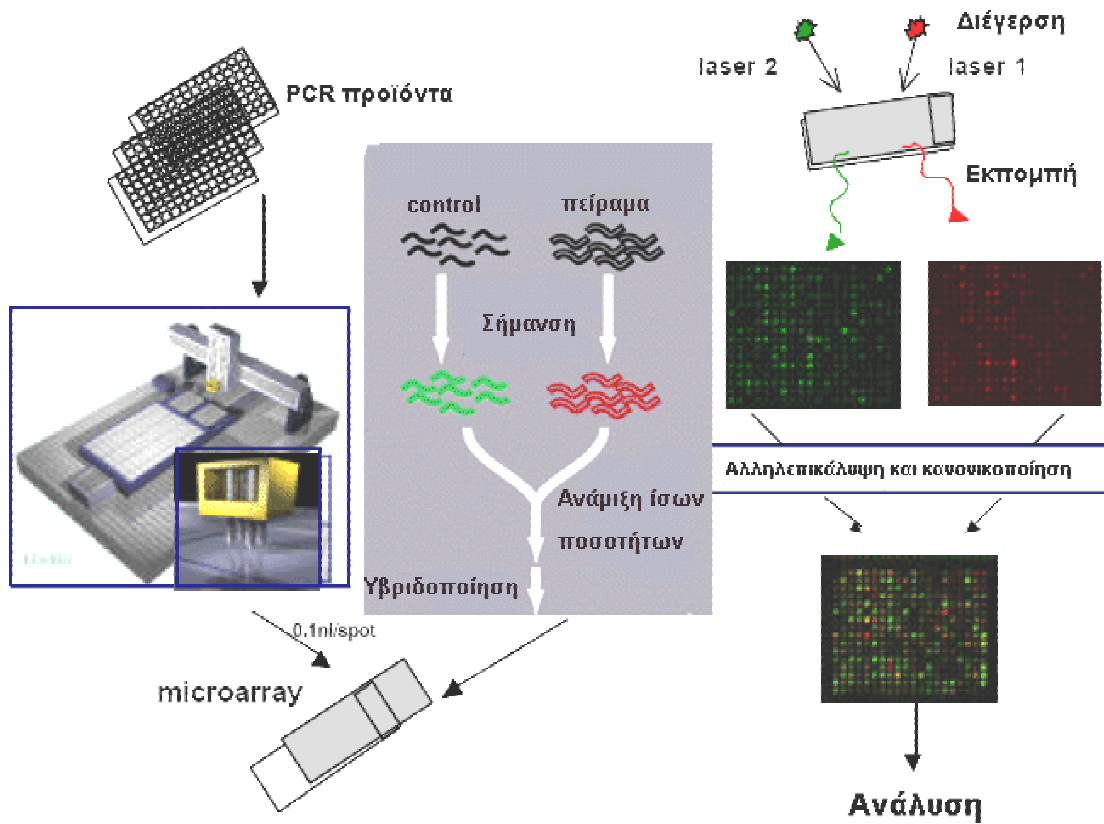
4.1 Συγκριτική μελέτη μεθόδων σήμανσης

4.2 Υβριδοποίηση

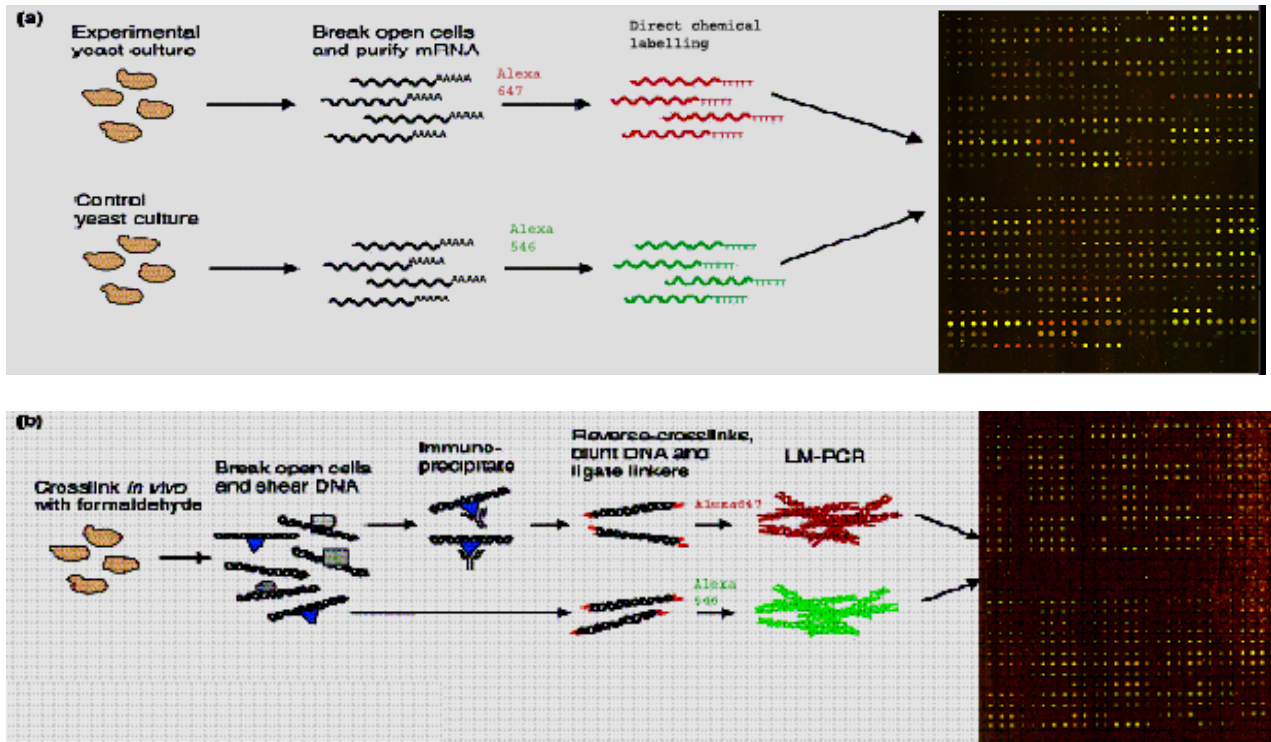
5 Συλλογή δεδομένων

6-Ανάλυση δεδομένων

Τα παραπάνω στάδια αποδίδονται σχηματικά στις παρακάτω εικόνες :



Εικόνα 2α Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παραγωγής των μικροσυστοιχιών και παραλαβής προφίλ γονιδιακής έκφρασης



Εικόνα 2β Οι δυο χρήσεις της μικροσυστοιχίας. (a) για ανάλυση της μεταγραφικής έκφρασης γονιδίων και (b) για ανάλυση του εντοπισμού πρωτεϊνών στον υποκινητή τους.

1. Παραλαβή υλικών προς υβριδοποίηση

1.1-Παραλαβή μεταλλαγμένων στελεχών

Για να δοκιμάσουμε την καταλληλότητα και αποτελεσματικότητα της μικροσυστοιχίας παραχωρήθηκαν, από το εργαστήριο Γονιδιακής Έκφρασης Ζαχαρομύκητα του Δρ. Θηραίου, τα παρακάτω στελέχη ζαχαρομύκητα με μεταλλάξεις στο GCN4 καθώς και σε συνενεργοποιητές που γνωρίζουμε ότι συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των γονιδίων που εξαρτώνται από αυτό. Τα στελέχη αυτά ούτως ή άλλως θα αποτελέσουν και το κύριο αντικείμενο της περαιτέρω μελέτης:

- Αγρίου τύπου (wt), αυξοτροφίες : LEU URA TRP. Στέλεχος αναφοράς για την ενεργοποίηση μέσω GCN4.
- Με μεταλλαγμένο *gcn4*, αυξοτροφίες : LEU URA TRP. Στέλεχος που δεν εκφράζεται λειτουργική GCN4 πρωτεΐνη.
- Με *myc*-tagged το *gcn4*, αυξοτροφίες : LEU URA. Στέλεχος με παρουσία επιτόπων *myc* στην πρωτεΐνη GCN4, απ' όπου θα παραληφθούν τα προφίλ εντοπισμού της πρωτεΐνης.
- Με μεταλλαγμένο *gcn5*, αυξοτροφίες : LEU URA TRP. Στέλεχος με μεταλλαγμένη την ακετυλοτρανσφεράση του SAGA και Ada συμπλόκου, για διερεύνηση της σημασίας της ενεργότητας αυτής.
- Με μεταλλαγμένο *ubr8*, αυξοτροφίες : LEU URA TRP. Στέλεχος με μεταλλαγμένη την πρωτεΐνη Ubr8, που αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο SAGA και προκαλεί αποουμπικουϊνίωση πρωτεϊνών.
- Με μεταλλαγμένο *spt3*, αυξοτροφίες : LEU URA TRP. Στέλεχος με μεταλλαγμένη την πρωτεΐνη Spt3, που συμμετέχει στην στρατολόγηση της TBP στο TATA box του γονιδίου στόχου.
- Με μεταλλαγμένο *spt20*, αυξοτροφίες : LEU URA TRP LYS. Στέλεχος με μεταλλαγμένη την πρωτεΐνη Spt20, καθοριστική για την ακεραιότητα του συμπλόκου SAGA.

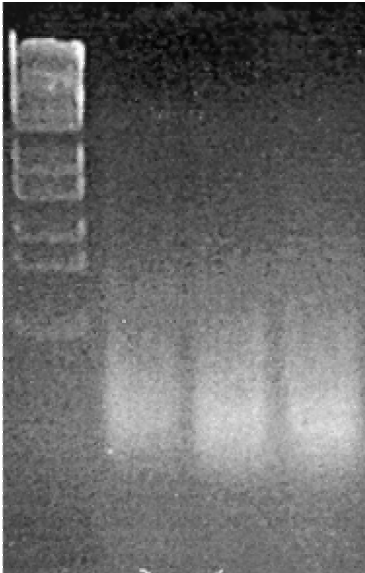
1.2 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων προς υβριδοποίηση

Τα γενετικά υλικά προς απομόνωση είναι, από τη μια, RNA για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης και, από την άλλη, DNA για την ανάλυση εντοπισμού μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές των γονιδίων

Για την μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης, σκοπός είναι οι πειραματικές συνθήκες απομόνωσης RNA των δυο αντιπαραβαλλόμενων πληθυσμών ζαχαρομύκητα να διαφέρουν κάθε φορά μόνο ως προς μια παράμετρο. Αυτή μπορεί να σχετίζεται με τις συνθήκες ανάπτυξης (φυσιολογικές έναντι καταστάσεις στρες) ή με διαφορές στο γενετικό τους υπόβαθρο (αγρίου τύπου έναντι μεταλλαγμένων). Η παραλαβή του RNA

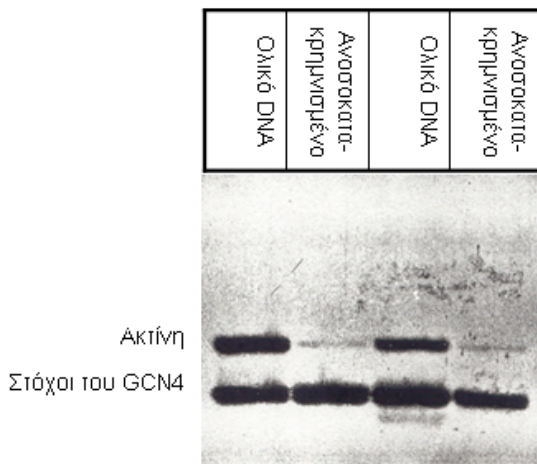
έγινε με τη μέθοδο απομόνωσης της ζεστής όξινης φαινόλης (Current Protocols in Molecular Biology, 13.12.1). Η ποιότητα και η ποσότητά του ελέγχεται πριν τη σήμανση με φωτομέτρηση και ανάλυση κατά Northern.

λ / Styl I Ολικό Ανοσοκατακρήμνι- Ανοσοκατακρήμνι-
DNA σμένο 1 σμένο 2



Εικόνα 3α DNA από ChIP to chip

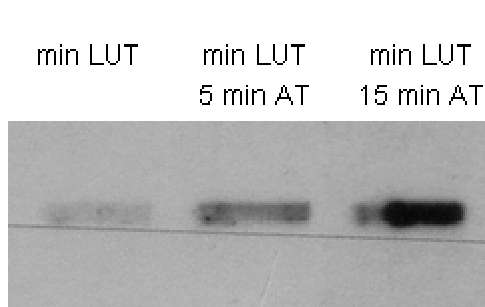
Για την τεχνική ChIP to chip σε ανάλογες πειραματικές συνθήκες με αυτές της παραλαβής RNA, γίνεται *in vivo* ομοιοπολική σύνδεση πρωτεϊνών - DNA με την εφαρμογή φορμαλδεΐδης στα άθικτα κύτταρα. Ακολουθεί λύση των κυττάρων και σπάσιμο της χρωματίνης σε κομμάτια συγκεκριμένου εύρους μεγέθους με υπερήχους (sonication). Μετά από εκλεκτική ανοσοκατακρήμνιση των συμπλόκων πρωτεϊνών-DNA με ειδικά αντισώματα για τους μεταγραφικούς παράγοντες ή τις ιστόνες (Kuo and Allis, 1999) απομονώνεται το γενετικό υλικό που αυτές έχουν συνδεθεί. με αναστροφή των ομοιοπολικών συνδέσεων και πρωτεόλυση. Αυτό γίνεται blunt με T4 πολυμεράση, ενώνεται με T4 λιγάση με ειδικό διμερές εκινητών και εν συνεχεία πολλαπλασιάζεται γραμμικά με PCR. Σαν μάρτυρας σ' αυτή την περίπτωση δεν χρησιμοποιείται γενετικό υλικό από άλλη καλλιέργεια, αλλά το DNA που προκύπτει μετά από σπάσιμο με υπερήχους και πριν την ανοσοκατακρήμνιση. Στην **Εικόνα 3α** φαίνεται ότι το μέγεθος των παραγόμενων τμημάτων είναι 200-1000 bp με μέσο μέγεθος τα 500 bp, ενώ στην **Εικόνα 3β** η εκλεκτική ανοσοκατακρήμνιση γονιδίων που περιέχουν την γνήσια αλληλουχία πρόσδεσης του GCN4.



Εικόνα 3β Έλεγχος της μεθόδου απομόνωσης του υλικού για την ChIP to chip προσέγγιση με κλασσικό ChIP

Σε πειράματα μεγάλης κλίμακας και ευαισθησίας, όπως είναι αυτά που περιλαμβάνουν ανάλυση δεδομένων από μικροσυστοιχίες DNA είναι ιδιαίτερη ανάγκη να εξασφαλιστούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες για την καλλιέργεια του ζαχαρομύκητα και την παραλαβή των υπό εξέταση γενετικών υλικών. Όλα τα παραπάνω στελέχη είναι ισογενή και έχουν ελάχιστους αυξοτροφικούς δείκτες. Η ανάπτυξή τους γίνεται κατά τον ίδιο τρόπο στη φυγόκεντρο του εργαστηρίου, σε φλάσκες ίδιου μεγέθους (ίδιος αερισμός) με τη χρήση ίδιας παρτίδας θρεπτικών μέσων.

Η ενεργοποίηση του GCN4 μονοπατιού μπορεί να προκληθεί με έλλειψη για οποιοδήποτε αμινοξύ. Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε η προσθήκη 10 mM AT (3-αμινοτριαζόλη, χημικό ανάλογο της ιστιδίνης, που αναστέλλει τη βιοσύνθεσή της) για την ενεργοποίηση της GCN4 πρωτεΐνης. Με Western διαπιστώθηκε η παρουσία της πρωτεΐνης, που όπως ανέφερα νωρίτερα ελέγχεται η έκφρασή της στο μεταφραστικό επίπεδο, σε μέγιστα επίπεδα στα πέντε έως δεκαπέντε πρώτα λεπτά της προσθήκης της 3-αμινοτριαζόλης



Εικόνα 3γ Western ανάλυση της ενεργοποίησης της GCN4 πρωτεΐνης παρουσία 3-AT

(Καράντζαλη Ευθυμία, Μαργαρίτης Θανάσης, Καφετζόπουλος Δημήτρης, **Εικόνα 3γ**). Για την αποφυγή όμως παρατήρησης αλλαγών γονιδιακής έκφρασης που οφείλονται σε καταστάσεις στρες η χρονική στιγμή παραλαβής RNA που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι οι τρεις ώρες.

Η συμπεριφορά των στελεχών κατά την καλλιέργειά τους διαφέρει αρκετά. Η σύγχρονη ανάπτυξή τους σε ανάλογη συγκέντρωση είναι σημαντική για την εξασφάλιση ότι δεν θα υπερπολλαπλασιαστεί κάποια από αυτές, με αποτέλεσμα να έχουμε αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση που σχετίζονται με κυτταρικό συνωστισμό ή θάνατο και ότι δεν θα μείνει καμία υποπολλαπλασιασμένη, ώστε να μην μπορεί να παραληφθεί ικανή ποσότητα RNA. Για να εξασφαλιστεί λοιπόν η σύγχρονη ανάπτυξή τους σε ανάλογη πυκνότητα στις καλλιέργειές μελετήθηκε η ανάπτυξή τους, τόσο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης (**Εικόνα 4α**), όσο και παρουσία AT (**Εικόνα 4β**). Τα στοιχεία που παραλήφθηκαν με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των καλλιεργειών φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα. Το πιο «προβληματικό» απ' όλα τα στελέχη είναι το *spt20*, το οποίο δεν ολοκληρώνει διπλασιασμό ούτε μετά από πάροδο 24ωρου.

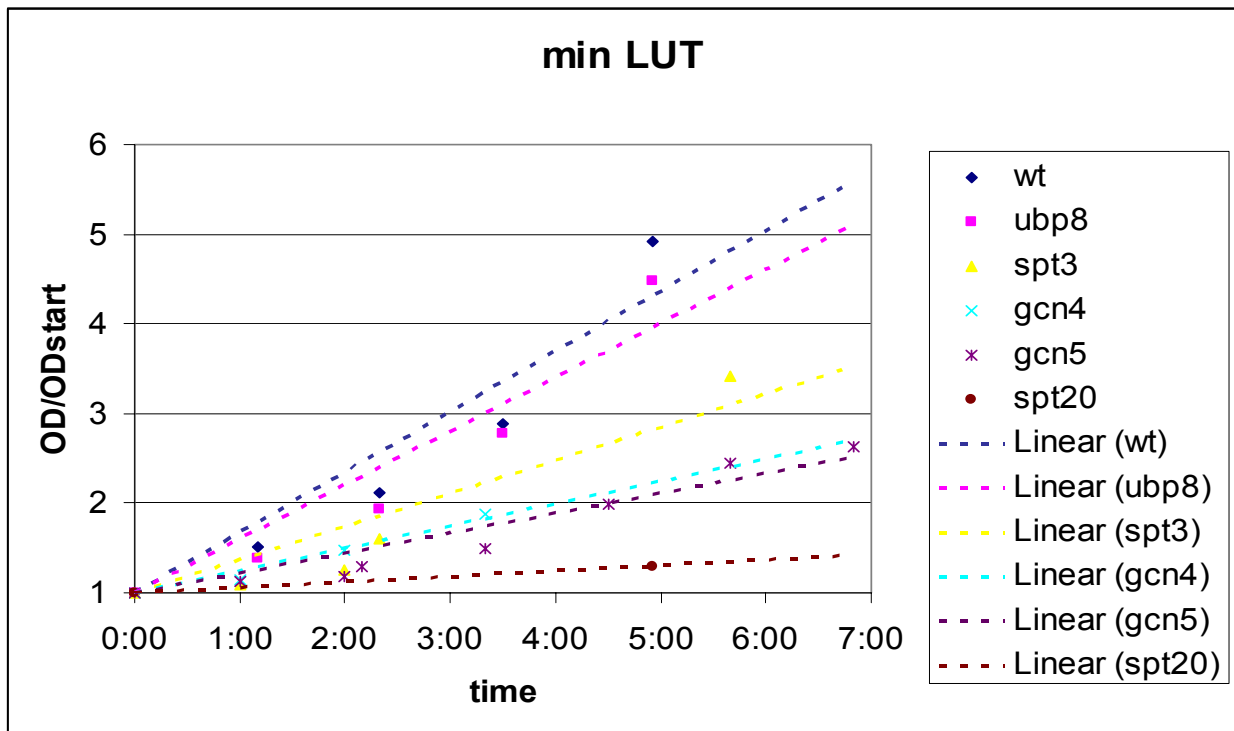
Η πρακτική καλλιέργειας με βάση αυτά τα δεδομένα είναι η εξής :

- Πρώτη μέρα : Ανάπτυξη στελεχών σε καλλιέργειες των 10 ml min LUT
- Δεύτερη μέρα – απόγευμα : Αραίωση με βάση τον παρακάτω πίνακα :

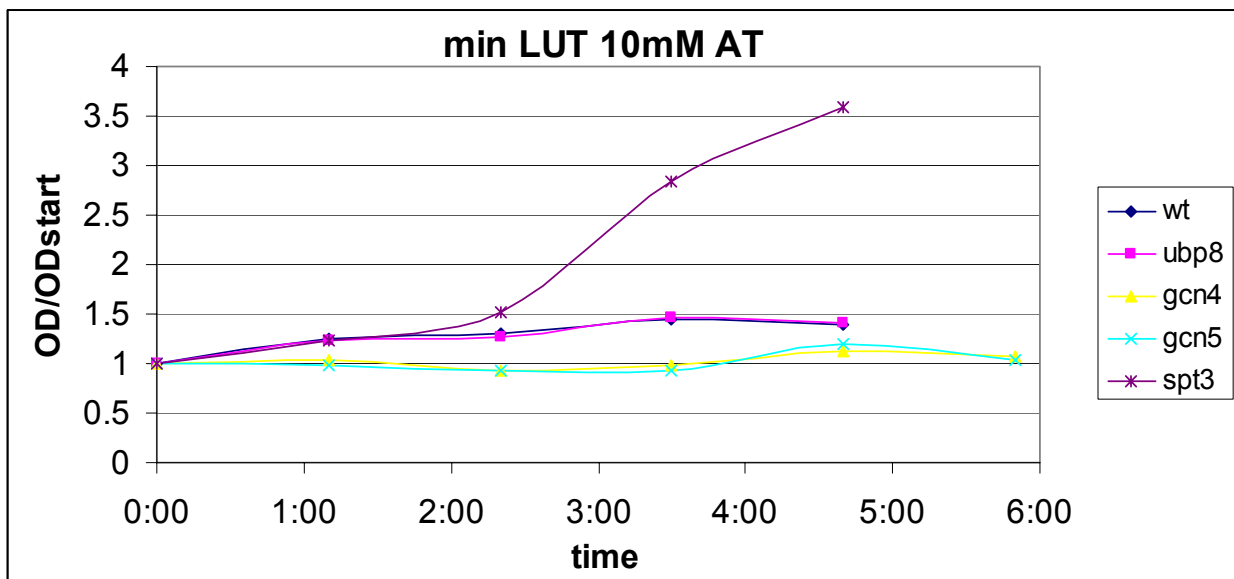
wt		1/750	1/1500
ubp8		1/750	1/1500
gcn4		1/200	1/600
gcn5		1/100	1/400
spt3		1/200	1/600
spt20	Ανάπτυξη σε πλούσιο θρεπτικό YEP μέχρι OD 0.5, έκπλυση και επαναιώρηση σε min LUT lys		

Πίνακας 1 Αραιώσεις στελεχών

- Τρίτη μέρα : έλεγχος οπτικής πυκνότητας και κατάλληλες αναμίξεις ή αραιώσεις



Εικόνα 4α Αύξηση οπτικής πυκνότητας στη διάρκεια του χρόνου



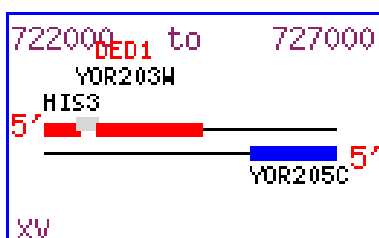
Εικόνα 4β Αύξηση οπτικής πυκνότητας στη διάρκεια του χρόνου παρουσία AT

2-Σχεδιασμός μικροσυστοιχιών

2.1 Επιλογή γονιδίων για μελέτη

Σε προηγούμενη εργασία στο εργαστήριο (Κ. Γκούσκου, Ι. Καγιαμπάκης, Δ. Καφετζόπουλος), επιλέχθηκαν γονίδια – στόχοι του GCN4, με βάση τα παρακάτω κριτήρια:

- Να εκφράζονται σε ένα σημαντικό βαθμό τα γονίδια αυτά και να αυξάνεται η έκφρασή τους παρουσία 10mM AT (3-αμινο -τριαζόλη) πάνω από 40% ($\log_2 > 0,5$) με βάση τα αποτελέσματα της εργασίας των (Natarajan et al., 2001) Παρατήρηση: οι μετρήσεις αυτές είναι δυνατόν να περιέχουν λανθασμένα θετικά αποτελέσματα (false positive), μια και στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε μεγάλης κλίμακας γονιδιακή ανάλυση, με τις συγκεκριμένες φθορίζουσες ουσίες των πειραμάτων της παραπάνω εργασίας παίρνει κανείς για μεταβολές από 100% (2-fold) και πάνω.
- Να μην αυξάνεται η έκφρασή τους πάνω από 15% ($\log_2 > 0,2$), σε στέλεχος που δεν έχει λειτουργικό *gcn4* παρουσία 10mM AT. Παρατήρηση : ισχύει η παραπάνω ένσταση (2-fold cut-off), που σ' αυτή την περίπτωση είναι αυξημένη. Λόγω του σημαντικά χαμηλότερου ορίου, πολλά μη επηρεαζόμενα γονίδια θα θεωρηθούν ότι επηρεάζονται (false negative). Επιπλέον, πολλά γονίδια ρυθμίζονται συνεργιστικά από το συνδυασμό του GCN4 και άλλου μονοπατιού (για παράδειγμα του ArgR/Mcm1p για το γονίδιο ARG1), οπότε απουσία του πρώτου να υπάρχει μια μικρή μεν, σημαντική δε, μεταβολή.
- Να περιέχουν τη γνήσια (TGACGTCA) ή κάποια από τις εκφυλισμένες αλληλουχίες πρόσδεσης του GCN4 σε απόσταση 700 βάσεων πριν από την έναρξη της μεταγραφής. Παρατήρηση : Θεωρητικά ο έλεγχος έπρεπε να επεκταθεί σε τόση απόσταση μεν, πριν όμως την αρχή της μετάφρασης, όπου και πιστεύεται ότι προσδένονται οι μεταγραφικοί παράγοντες που επηρεάζουν την μεταγραφική ενεργοποίηση ενός γονιδίου. Κάτι τέτοιο όμως δεν είναι γνωστό για το σύνολο των εξεταζόμενων γονιδίων
- Από αυτά τα γονίδια επιλέχθηκαν γονίδια με γνωστή - χαρακτηρισμένη λειτουργία.
- Τέλος, επιλέχθηκαν επιπλέον γονίδια ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, που έχουν λειτουργική σχέση με τα υπό μελέτη γονίδια, αλλά διαφορετική από την αναμενόμενη συμπεριφορά. Για παράδειγμα το γονίδιο DED1, ενώ εντοπίζεται πολύ κοντά στο HIS3, κλασσικό γονίδιο-στόχο του GCN4, δεν επηρεάζεται από το GCN4 (**Εικόνα 5**).



Εικόνα 5. Το γονίδιο DED1 είναι πολύ κοντά στο HIS3, στο χρωμόσωμα XV του *S. cerevisiae*.

2.2 Επιλογή γονιδίων-μαρτύρων

Για να μπορέσουμε να εξάγουμε συμπεράσματα από μια ανάλυση με τη βοήθεια μικροσυστοιχιών DNA, όπου ο όγκος των παραγόμενων δεδομένων είναι πολύ μεγάλος, απαιτείται η χρήση γονιδίων - μαρτύρων. Αυτά μπορούν να χωριστούν σε διάφορες υποκατηγορίες:

- **Θετικοί μάρτυρες** : γονίδια που είναι γνωστή η θετική (ή και αρνητική) απόκρισή τους στην ενεργοποίηση από το GCN4, όπως είναι το TRP3, το HIS3 και το HIS4.
- **Σταθεροί μάρτυρες** : γονίδια που δε μεταβάλλονται από τις συνθήκες ή την παρουσία μεταγραφικών παραγόντων. Πρόκειται κυρίως για γονίδια γενικής χρήσης (housekeeping), όπως είναι της ακτίνης, ACT1.
- **Αρνητικοί μάρτυρες** : γονίδια από ετερόλογους οργανισμούς, που δεν έχουν ομολογίες με γονίδια του οργανισμού υπό μελέτη. Αυτά είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τον καθορισμό των επιπέδων του θορύβου (background) από το σύνολο των διεργασιών μέχρι την παραλαβή του αποτελέσματος και σαν ποιοτικός έλεγχος των παραγόμενων αποτελεσμάτων. Γι' αυτό το σκοπό επιλέχτηκε ένα μέρος του γονιδίου της συνθετάσης της χιτίνης από τη *Drosophila melanogaster*.
- **Spike-in μάρτυρες** : στην πορεία της εργασίας διαπιστώθηκε η ανάγκη παρουσίας αρνητικών μαρτύρων, που υβριδοποιούνται με γνωστή ποσότητα του αντίστοιχου mRNA. Αυτό παράγεται με *in vitro* μεταγραφή και εισάγεται στα προς σήμανση υλικά σε διάφορες αναλογίες. Η χρήση τέτοιων μαρτύρων βοηθάει στην κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, μια και είμαστε σίγουροι για την αναλογία με την οποία βρίσκονται αυτά μέσα στα προς εξέταση δείγματα.

2.3 Σχεδιασμός εκκινητών για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, ο σχεδιασμός για την παραλαβή των τμημάτων DNA που θα τοποθετούνταν στα πλακάκια είχε στόχο την παρουσία σε αυτά τόσο μέρος του μεταγράφου του, όσο και του υποκινητή του. Για την παραλαβή ικανών ποσοτήτων αποφασίστηκε η χρησιμοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης - PCR. Για καθένα από τα τμήματα αυτά σχεδιάστηκε ένα συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών. από τους οποίους ξεκινώντας το ένζυμο της πολυμεράσης, με αρχικό υπόστρωμα το γονιδίωμα του ζαχαρομύκητα, πολλαπλασιάζει επιλεκτικά την συγκεκριμένη αλληλουχία.

Για το σχεδιασμό αυτό λήφθηκαν υπ' όψιν διάφορες παράμετροι : οι φυσικοχημικές ιδιότητες των υποκινητών (όπως είναι η θερμοκρασία τήξης και η πιθανότητα δημιουργίας ισχυρών δευτεροταγών δομών), το μήκος - κόστος τους και η πιθανότητα συμπληρωματικότητας με περισσότερες περιοχές του γονιδιώματος, με αποτέλεσμα παραγωγή λάθος προϊόντος (έλεγχος με τον αλγόριθμο BLAST σε όλο το γονιδίωμα του ζαχαρομύκητα). Για το σχεδιασμό αυτό χρησιμοποιήθηκαν το

πρόγραμμα Vector NTI Suite v6.1, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο **Παράρτημα 2** καθώς και προγράμματα - εργαλεία συλλογής πληροφοριών από τη βάση δεδομένων του ζαχαρομύκητα στο διαδίκτυο (Sacharromyces Genome Database) που σχεδιάστηκαν ειδικά γι' αυτήν την ανάλυση. Γονίδια για τα οποία ήταν δύσκολη η σχεδίαση μοναδικών εκκινητών δεν περιλήφθηκαν στα παρακάτω πειράματα.

3-Κατασκευή των μικροσυστοιχιών

3.1 Παραλαβή προϊόντων προς απόθεση

Οι εκκινητές με την παραλαβή τους διαλύθηκαν σε 200 μl TE (stock διάλυμα) και από εκεί κατάλληλη ποσότητα διαλύθηκαν σε κατάλληλη ποσότητα νερού για να πάρουμε τελικά 50 μl 25μM (διάλυμα εργασίας). Αναλυτικά οι αλληλουχίες, οι συγκεντρώσεις και οι αραιώσεις τους φαίνονται στο **Παράρτημα 1**.

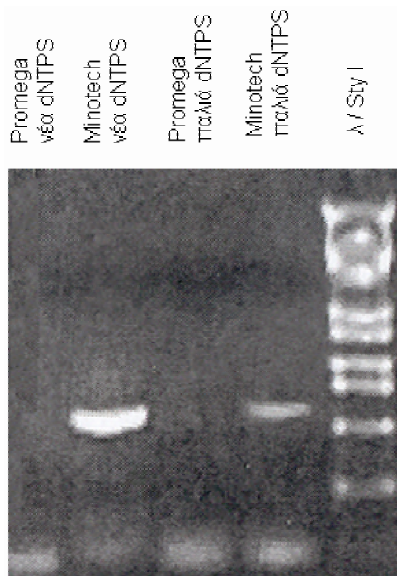
οι εκκινητές για την ακτίνη, YFL039C – ACT1 χρησιμοποιήθηκαν πιλοτικά για την αναγνώριση των βέλτιστων συνθηκών αντίδρασης για την παραλαβή μεγάλης ποσότητας προϊόντων χωρίς παρουσία παραπροϊόντων. Οι συνθήκες αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν ως οδηγός ήταν :

συγκέντρωση εκκινητών 1 μM ο καθένας

συγκέντρωση γενωμικού DNA 0,2 ngr / μl

συγκέντρωση dNTPs 0,2 mM από το καθένα

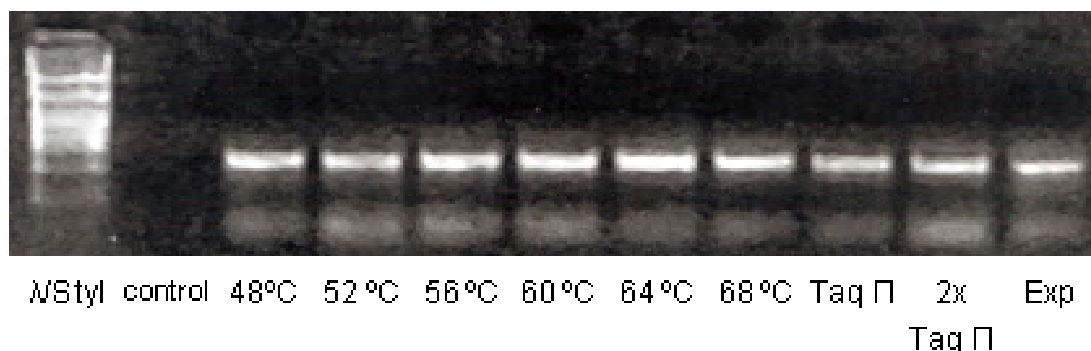
συγκέντρωση Mg²⁺ 1.5 mM



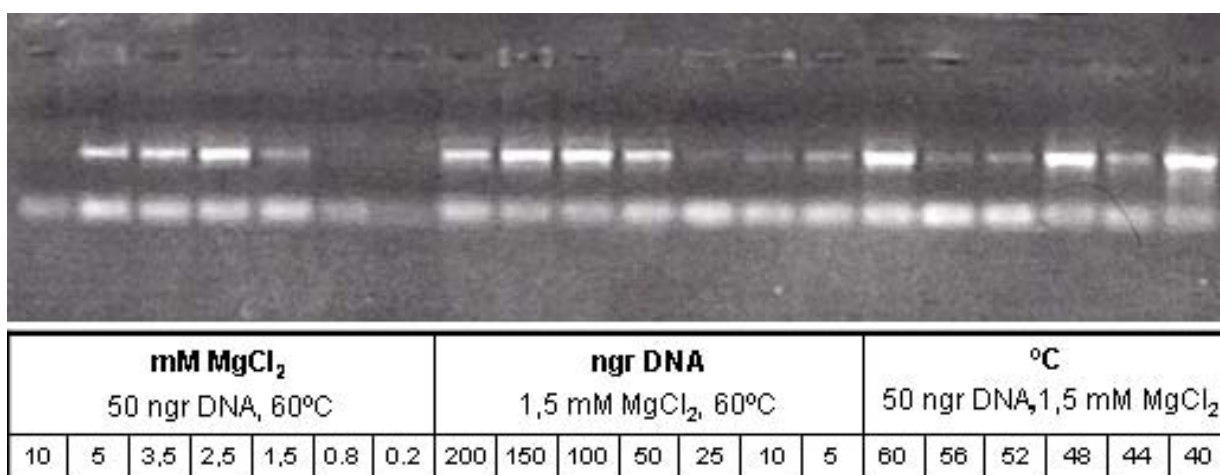
Δοκιμάστηκαν διάφορα ένζυμα DNA πολυμεράσης, Ταq από την Promega, Ταq από την Minotech, μια υψηλής πιστότητας πολυμεράση (Expand) της Roche, και μια Ταq πολυμεράση φτιαγμένη σε διπλανό εργαστήριο με υπερέκφραση της Ταq πολυμεράσης σε E. coli και συμπύκνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (Π) (**Εικόνα 6** κα **7**). Μεταξύ αυτών επιλέχθηκε η Ταq DNA πολυμεράση από την Minotech.

Επίσης δοκιμάστηκαν πρόσφατα και παλαιότερα dNTPs, όπως αναμενόταν τα πιο φρέσκα συμπεριφερόταν καλύτερα (**Εικόνα 6**).

Εικόνα 6 Επίδραση ενζύμου και dNTPs



Εικόνα 7 Επίδραση θερμοκρασίας και άλλων ενζύμων



Εικόνα 8 Επίδραση θερμοκρασίας, συγκέντρωσης Mg²⁺ και αρχικής ποσότητας DNA σε 50 µl αντίδρασης

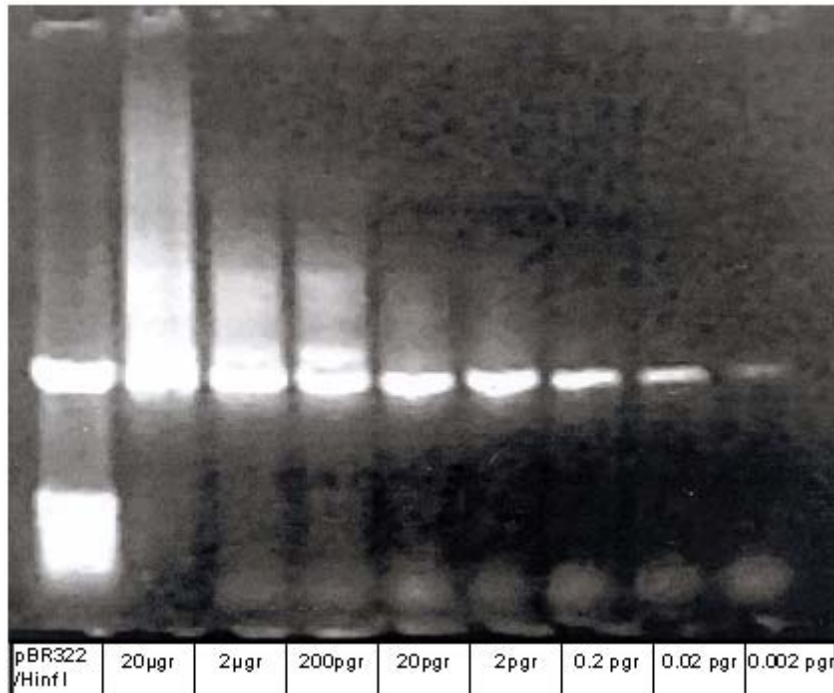
Η θερμοκρασία επαναδιάταξης (annealing) είναι καθοριστική για την ποιότητα των προϊόντων. Χαμηλή θερμοκρασία οδηγεί σε “εύκολο” annealing και δημιουργία μεγάλης ποσότητας προϊόντος, αλλά με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης παραπροϊόντων, λόγω μη ειδικής εκίνησης. Το ανάποδο συμβαίνει σε αυξημένη θερμοκρασία. Η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών της ακτίνης είναι 50,5 °C. Αναζητήθηκε λοιπόν η απόδοση σε θερμοκρασίες από 48 μέχρι 68 °C (**Εικόνα 7**) και από 40 μέχρι 60 °C (**Εικόνα 8**). Το γεγονός ότι μέχρι και στους 68°C παραλαμβάνεται προϊόν είναι ενθαρρυντικό, αφού σε υψηλότερες θερμοκρασίες το προϊόν είναι ειδικό. Μεγαλύτερη ποσότητα παρατηρείται στις θερμοκρασίες των 60 και 64 °C.

Η συγκέντρωση του μαγνησίου είναι επίσης καθοριστική. Ο ρόλος του στην αντίδραση είναι να δεσμεύεται με τις ελεύθερες φωσφορικές ομάδες, από τα δεοξυ - νουκλεοτίδια, τους εκκινητές και το DNA (αρχικό και παραγόμενο). Η συγκέντρωσή του πρέπει να είναι μεγαλύτερη από το σύνολο των ελεύθερων φωσφορικών ομάδων. Παρόλ’ αυτά δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις πολύ μικρότερες (0,2 και 0,8 mM), όπως και πολύ μεγαλύτερες (10 mM). Βέλτιστη συγκέντρωση αποδείχθηκε τα 2,5 mM MgCl₂ (**Εικόνα 8**).

Η αρχική ποσότητα γενωμικού DNA αποτελεί ένα ακόμα παράγοντα που επηρεάζει την ποσότητα και την ποιότητα του προϊόντος. Δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις από 0,1 μέχρι 4 ngr / µl. Καλύτερα αποτελέσματα έδωσαν οι συγκεντρώσεις των 2 και 3 ngr / µl (**Εικόνα 8**). Ανάλογα πειράματα έγιναν και για τον καθορισμό της βέλτιστης ποσότητας αρχικού πλασμιδιακού DNA για την παραλαβή του β- τμήματος της συνθετάσης της χιτίνης (**Εικόνα 9**). Καλύτερη κρίθηκε η ποσότητα των 0,04 µgr / µl και όπως

αναμενόταν είναι αρκετά μικρότερη από την αντίστοιχη γενωμικού DNA του ζαχαρομύκητα.

Τέλος, μεγάλη σημασία στην παραλαβή επαναλήψιμα καλών αντιδράσεων παίζει το τοίχωμα του περιέκτη που γίνεται η αντίδραση. Καλύτερη συμπεριφορά και επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα, ιδιαίτερα όταν γίνονται πολλές αντιδράσεις ταυτόχρονα στον ίδιο μηχανήμα PCR λαμβάνονται με τη χρήση λεπτότοιχων strips.



Εικόνα 9 Επίδραση αρχικής ποσότητας πλασμιδιακού DNA

Συμπερασματικά, οι συνθήκες διαμορφώθηκαν ως εξής :

Πολυμεράση : Taq της Minotech

συγκέντρωση εκκινήτων : 1 µM ο καθένας

συγκέντρωση γενωμικού DNA : 2 ngr / µl (γενωμικό) / 0,04 pgr / µl (πλασμιδιακό)

συγκέντρωση dNTPs : 0,2 mM από το καθένα

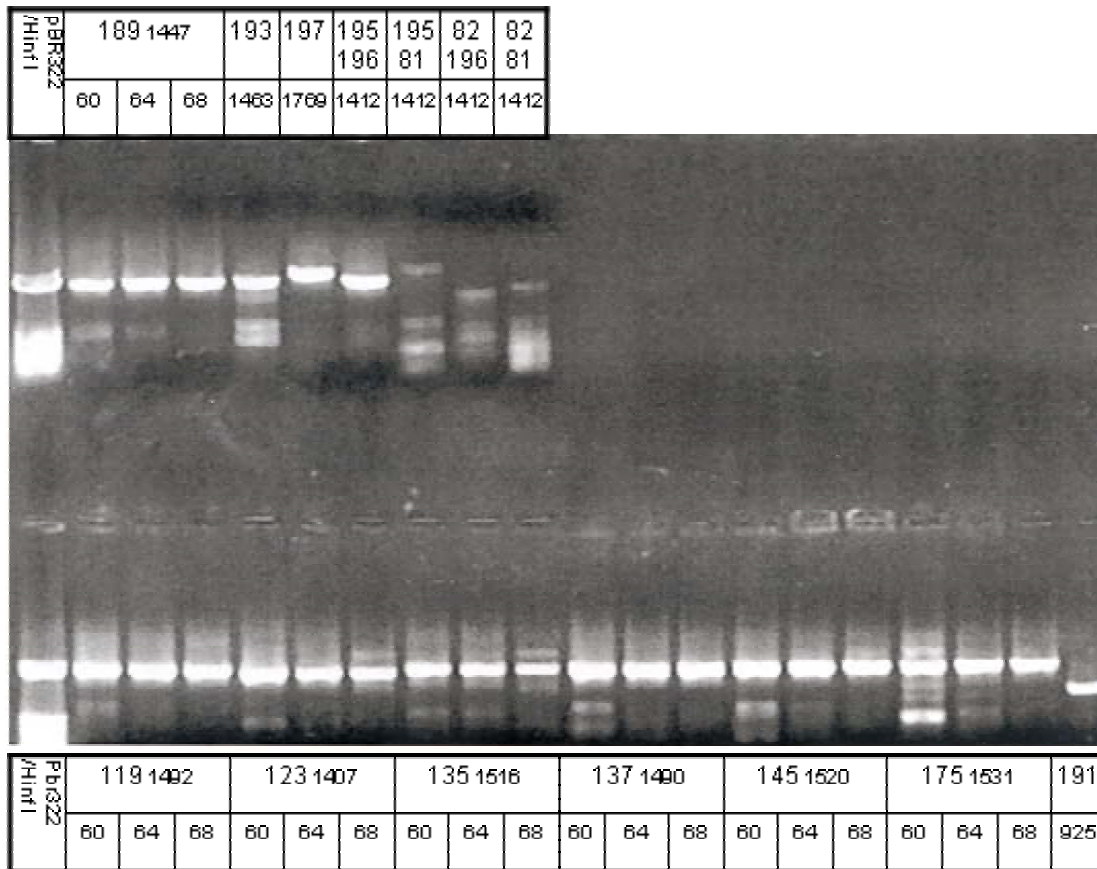
συγκέντρωση Mg²⁺ : 2,5 mM

θερμοκρασία annealing : 60 °C

περιέκτης : λεπτότοιχα strips.

Εφαρμόζοντας τις παραπάνω συνθήκες και στους υπόλοιπους εκκινητές φάνηκε ότι η συμπεριφορά τους δεν ήταν πάντα όπως της ακτίνης. Αυτό βοήθησε για την περαιτέρω βελτίωση των τελικών συνθηκών. Κάποια προϊόντα επέμεναν να μην εμφανίζονται (81, 83, 99 και 101), ενώ για συγκεκριμένα προϊόντα βρέθηκε η βέλτιστη θερμοκρασία annealing για την παραλαβή του προϊόντος να είναι μεγαλύτερη των 60 °C (**Εικόνα 10**).

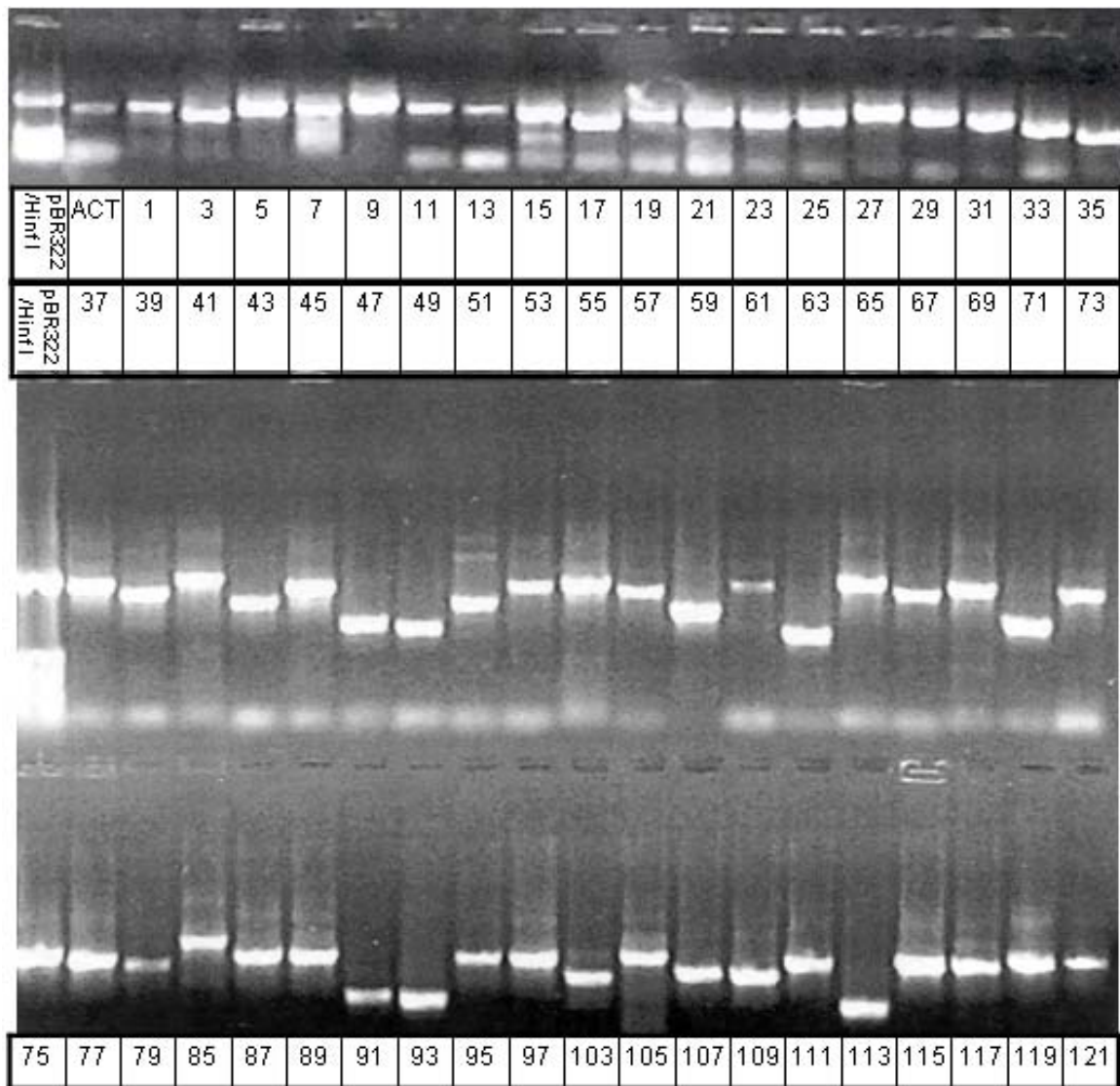
Για το 81, YGL009C-LEU1 σχεδιάστηκαν νέοι εκινηητές (195, 196) οι οποίοι και έδωσαν το επιθυμητό προϊόν (**Εικόνα 10**).



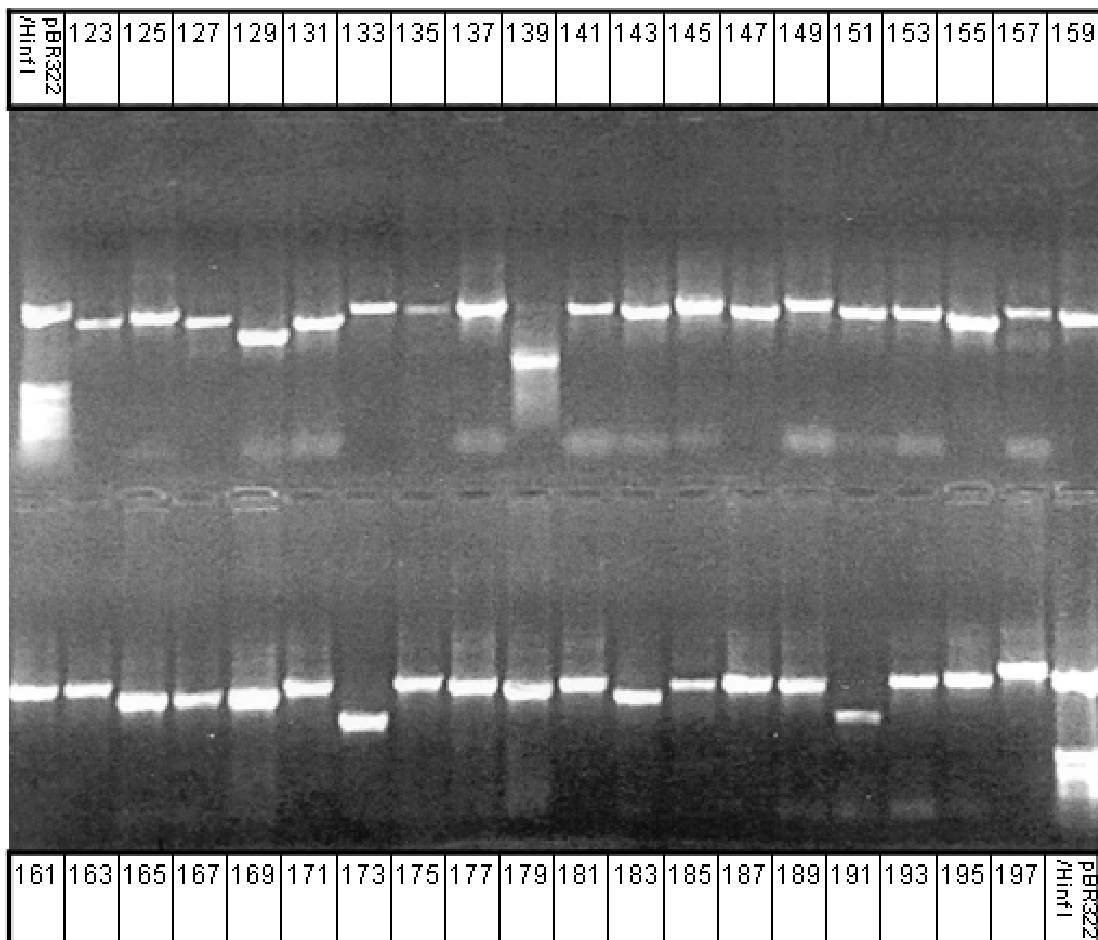
Εικόνα 10 Βελτιστοποίηση της ποιοτικής ή ποσοτικής παραλαβής “δύσκολων” προϊόντων Οι πάνω τιμές συμβολίζουν το PCR προϊόν που παράχθηκε με βάση τις τιμές του Παραρτήματος 1. Οι κάτω τιμές το μέγεθος του σε bp.

Για την κατανόηση της μη ομοιόμορφης συμπεριφοράς των εκινηητών ελέγχθηκαν με BLAST αυτά που έδιναν μη ειδικά προϊόντα. Για τα περισσότερα βρέθηκε ότι τα μικρότερου μεγέθους παραπροϊόντα οφείλονται σε θέσεις που μπορεί να υβριδοποιηθούν με λιγότερη ειδικότητα οι εκινηητές.

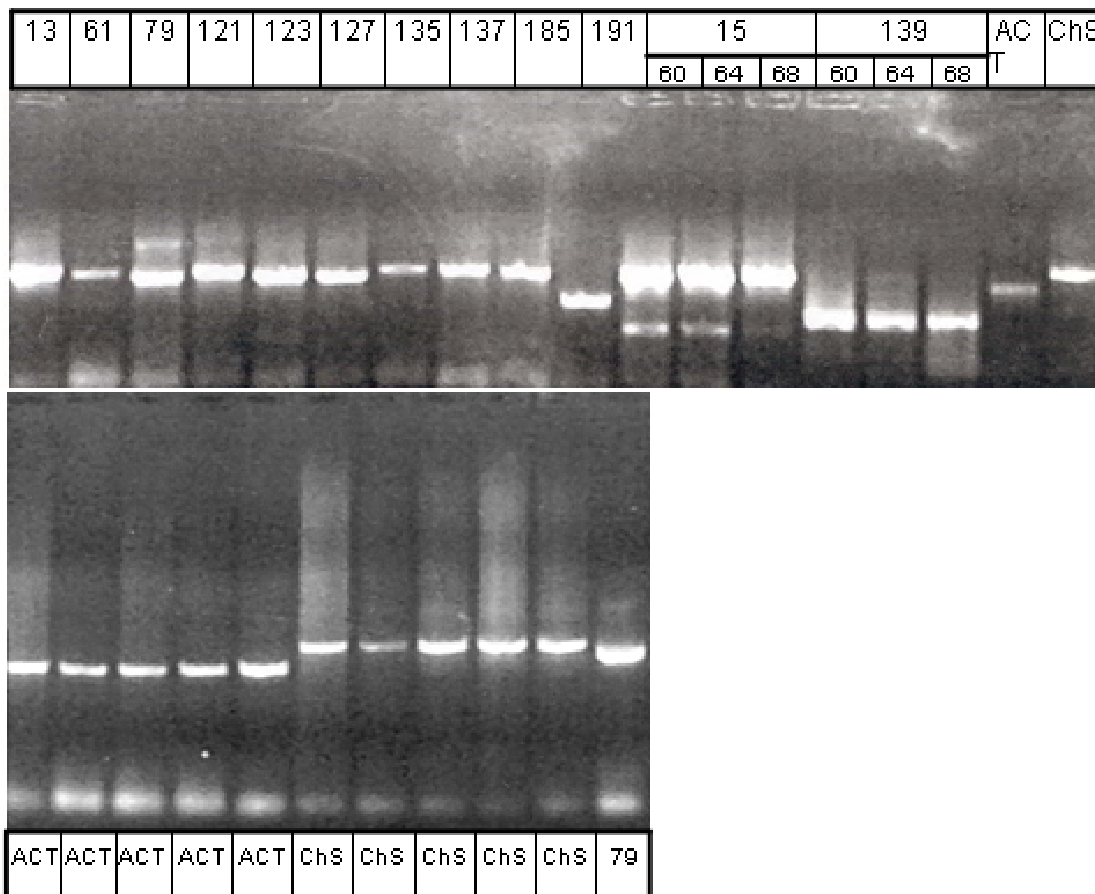
Μετά το τέλος όλων αυτών των πιλοτικών αντιδράσεων, έγινε μαζική παραγωγή (πλην των 81, 83, 99 και 101 για τα οποία όπως αναφέρθηκε δεν έδιναν προϊόν οι σχεδιασμένοι εκινηητές) (**Εικόνα 11**). Μη ικανοποιητικά ποσοτικά αποτελέσματα είχαμε στην περίπτωση των ACT, 13, 61, 135, 157, και 191 ενώ ποιοτικά στα 15, 79 και 139. Για τις πρώτες επαναλήφθηκαν οι αντιδράσεις σε μεγαλύτερους όγκους, ενώ για τις δεύτερες επαναλήφθηκαν σε θερμοκρασίες 60, 64 και 68 °C, με καλύτερα αποτελέσματα για τη θερμοκρασία των 68 °C (**Εικόνα 12**).



Εικόνα 11α Μαζική παραγωγή των προϊόντων



Εικόνα 11β Μαζική παραγωγή των προϊόντων



Εικόνα 12 Επιπρόσθετες αντιδράσεις

Οι τελικές αυτές μαζικές αντιδράσεις καθαρίστηκαν με το Nucleofrast 96 PCR. Οι αντιδράσεις τοποθετήθηκαν πάνω σε φίλτρα, τα οποία υπό επίδραση κενού (600mbar), άφηναν να περάσουν οι εκκινητές και τα συστατικά της αντίδρασης, όχι όμως και το PCR προϊόν. Ο ρυθμός ροής του υγρού ήταν περίπου 100μl / 15min. Ακολούθησε έκπλυση με 100 μl νερού και καλό στέγνωμα. Η ανάκτηση των προϊόντων έγινε με την προσθήκη νερού και την ανάδευση σε αναδευτήρα για πιατάκια, παραλαβή με πιπέτα και μεταφορά σε 96 - well plate. Η τελική συγκέντρωσή τους υπολογίστηκε να είναι 400 ngr / μl.

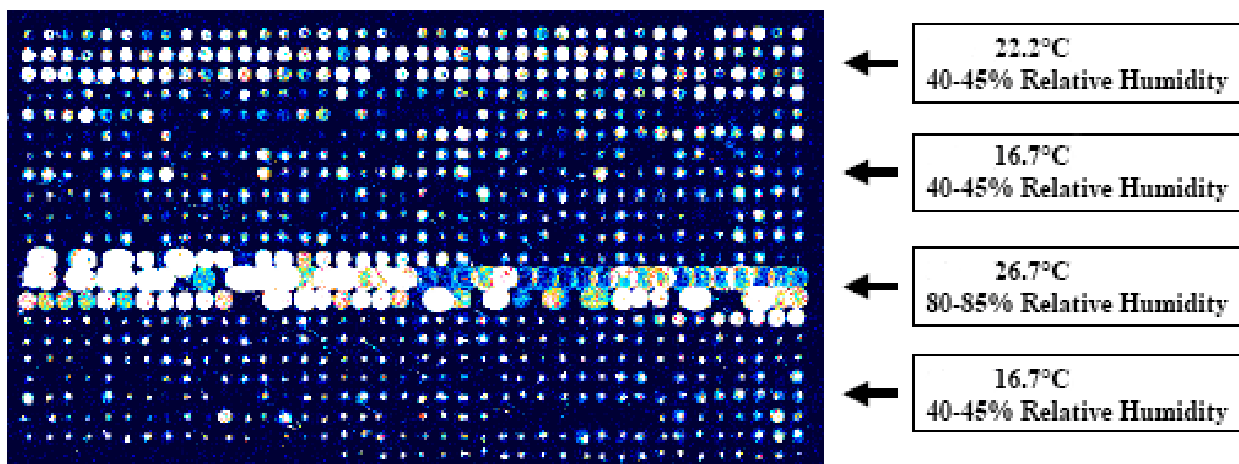
3.2 Επίστρωση πλακιδίων

Τα PCR προϊόντα (αρνητικά φορτισμένα λόγω φωσφορικών ομάδων) δεν μπορούν να συγκρατηθούν ισχυρά σε γυαλί (αρνητικά φορτισμένο). Για την σταθερή πρόσδεση των PCR προϊόντων στα πλακίδια χρησιμοποιούνται επιστρώσεις που σκοπό έχουν την ετεροπολική ή και ομοιοπολική συγκράτηση των νουκλεϊκών οξέων. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα επιστρωμένα εμπορικά πλακίδια. Κατόπιν προχωρήσαμε στην επίστρωση πλακιδίων από μόνοι μας, σύμφωνα με το πρωτόκολλο επίστρωσης πολύ – λυσίνης από το εργαστήριο του De Risi, με αποτέλεσμα εφάμιλλο ή και καλύτερο των εμπορικών που δοκιμάστηκαν με παράλληλη μείωση του κόστους παραγωγής (Παπαγιαννάκης Γιώργος, Εργαστήριο Γονιδιωματικής και Μεταγονιδιωματικής Έρευνας, IMBB - ITE).

3.3 Απόθεση

Με τη χρήση του Packard SpotArray24 spotter έγινε η απόθεση των PCR προϊόντων στα πλακίδια. Διάφοροι παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο και σ' αυτή τη διαδικασία με κυριότερους, το διαλύτη που περιέχονται, το μέγεθος και τη συγκέντρωσή τους, τις συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας, όπως και τις ρυθμίσεις του ίδιου του μηχανήματος.

Μεταξύ των τριών διαφορετικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται συνήθως : 3 x SSC, 50 % DMSO και φωσφορικών, επιλέχτηκε το DMSO, γιατί μειώνει δραστηριότητα εξάτμιση του διαλύτη κατά την εκτύπωση. Αυτό είναι σημαντικό, αν σκεφτεί κανείς ότι οι όγκοι που χρησιμοποιούνται για εκτύπωση είναι της τάξης των 10μl και είναι πολύ εύκολο στις δυο ώρες που διαρκεί περίπου η εκτύπωση για τις συγκεκριμένες μικροσυστοιχίες να μειωθούν σημαντικά και να αλλάξει η σύσταση και η ποιότητα των παραγόμενων spots.

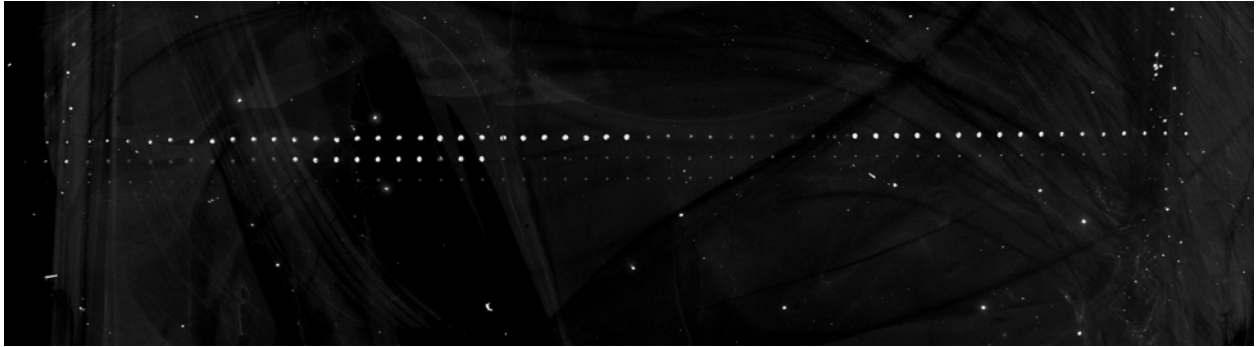


Εικόνα 13. Επίδραση θερμοκρασίας και υγρασίας στη ποιότητα των spots από 50% DMSO, από το TIGR

Η συγκέντρωση του DNA κατά την εκτύπωση θεωρείται βέλτιστη στα 200 ngr / μl. Οι συνθήκες απόθεσης ήταν όσο γίνεται πιο κοντά στα όρια των 17 °C και 45 % σχετικής υγρασίας, όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα.

Η μεταφορά των τμημάτων DNA από το πιατάκι στη μικροσυστοιχία γίνεται από τον αποθέτη αποκλειστικά με γραμμικό, κι όχι με επιλέξιμο, τρόπο. Γι' αυτό πρέπει να τοποθετηθούν σε συγκεκριμένες θέσεις στα προς εκτύπωση πιατάκια, ώστε η μικροσυστοιχία να έχει την κατάλληλη τελική μορφή. Η πρώτη μικροσυστοιχία σχεδιάστηκε για να διερευνηθεί η απόθεση και συγκράτηση των PCR προϊόντων στη μικροσυστοιχία. Είχε τυπωμένα τα γονίδια της ακτίνης του ζαχαρομύκητα (θετικός μάρτυρας) και της συνθετάσης της χιτίνης της δροσόφιλας (αρνητικός μάρτυρας) ανά δεκάδες. Ενδιάμεσα υπήρχαν δεκάδες χωρίς DNA. Η συγκράτηση των τμημάτων DNA στα πλακάκια έγινε με «ψήσιμο» στους 80 °C για 3 ώρες.

Ελέγχοντας την παρουσία DNA με Sybr Green (**Εικόνα 14**), παρατηρήθηκε ότι υπήρχαν μικρές ποσότητες DNA, ακόμα και εκεί φυσιολογικά δεν έπρεπε. Προφανώς μεταφέρονταν εκεί από τα προηγούμενα πηγάδια. Αυτό το πρόβλημα λύθηκε στις επόμενες εκτυπώσεις με αύξηση των εκπλύσεων των βελόνων εκτύπωσης (pins).

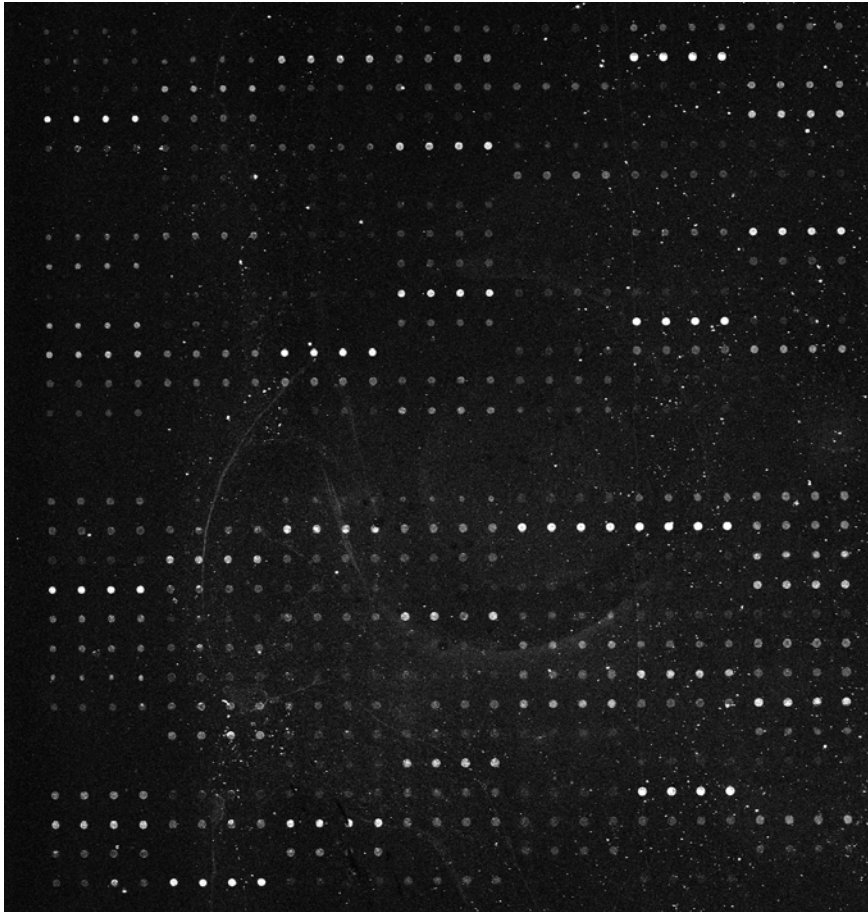


Εικόνα 14. Η πρώτη μικροσυστοιχία. Τα spots έχουν βαφεί με Sybr Green και σκαναριστεί στα 488nm

Η επόμενη μικροσυστοιχία σχεδιάστηκε για τον έλεγχο της επίδρασης της συγκέντρωσης του PCR προϊόντος στην μορφή των spot και στην ένταση του σήματος μετά την υβριδοποίηση. Η μεταφορά των τμημάτων έγινε με το χέρι σε ένα 384 well plate, μια ιδιαίτερη επίπονη διαδικασία για τόσο πολλές μετακινήσεις σε μικρού μεγέθους πιατάκι. Στην σχεδίαση προβλέφθηκε η εκτύπωση της κάθε αλληλουχίας σε τετράδες, ώστε να έχουμε στατιστικά πιο σημαντικά αποτελέσματα, να απέχουν τα spot αρκετά μεταξύ τους, ώστε να αποφευχθεί η αλληλοεπικάλυψη (450μm) και ανά 7 τετράδες να μένουν 4 τετράδες κενές, ώστε να μικρύνουν οι διαστάσεις της μικροσυστοιχίας στο πλάτος. Η εκτύπωση έγινε σε δύο μπλοκ. Οι συγκεντρώσεις των προς απόθεση αλληλουχιών ήταν 100 και 200 ngr / μl στο πάνω και κάτω μπλοκ αντίστοιχα (Εικόνα 15).

Όπως προκύπτει από την εικόνα, καλύτερη εικόνα υβριδοποίησης (σχέση σήματος / θορύβου) παίρνουμε στη συγκέντρωση των 200 ngr / μl. Για την ίδια συγκέντρωση το μέγεθος των spot είναι ελαφρώς μεγαλύτερο, αλλά και σαφώς πιο ομοιόμορφο. Γι' αυτό και αυτή η συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε για απόθεση στην τελική μικροσυστοιχία.

Με αυτή την μικροσυστοιχία προέκυψε το πρόβλημα της δύσκολης κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων, λόγω μικρού αριθμού σταθερών μαρτύρων. Γι' αυτό στην τελική μικροσυστοιχία ενσωματώθηκαν spike-in γονίδια από άνθρωπο (RFX-ANK, RFX-AP, Creb, pCAF) και Δροσόφιλα (ChSb διαφορετικό κομμάτι του γονιδίου από το ήδη χρησιμοποιούμενο ως αρνητικό μάρτυρα), για τα οποία μπορούσαμε να παράγουμε το αντίστοιχο RNA με in vitro transcription.



Εικόνα 15. Σήμανση 4μgr RNA με χημική σήμανση στην πρώτη ολοκληρωμένη μικροσυστοιχία.

Στη τελική μικροσυστοιχία (**Εικόνα 16**), η συγκέντρωση των προϊόντων προς εκτύπωση ήταν 200 ngr / μl και έγινε σε μικρότερη απόσταση (325nm). Προστέθηκαν στην αρχή και το τέλος του κάθε block spike-in μάρτυρες. Η μεταφορά στα προς εκτύπωση πιατάκια έγινε με τη χρήση του Beckman Biomek2000 liquid-handling robot, μετά από σχετικό προγραμματισμό και αρκετούς πιλοτικούς πειραματισμούς (ο τελικός προγραμματισμός φαίνεται στο **Παράρτημα 3**). Αποδείχτηκε ικανό να μεταφέρει πιστά και επαναλήψιμα όγκους της τάξης των 5 μl και μπορεί να αποδειχθεί πολύ χρήσιμο για τέτοιου είδους πολύπλοκες μεταφορές. Το κενό ανάμεσα στα δυο ζεύγη μπλοκ από spot που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, είναι χρήσιμο, αφού μπορεί να γίνει υβριδοποίηση σε κάθε ζεύγος χωριστά.



Εικόνα 16 Η τελική μικροσυστοιχία. Τα spots έχουν βαφεί με Sybr Green και σκαναριστεί στα 488nm

4-Σήμανση και υβριδοποίηση

4.1 Συγκριτική μελέτη μεθόδων σήμανσης

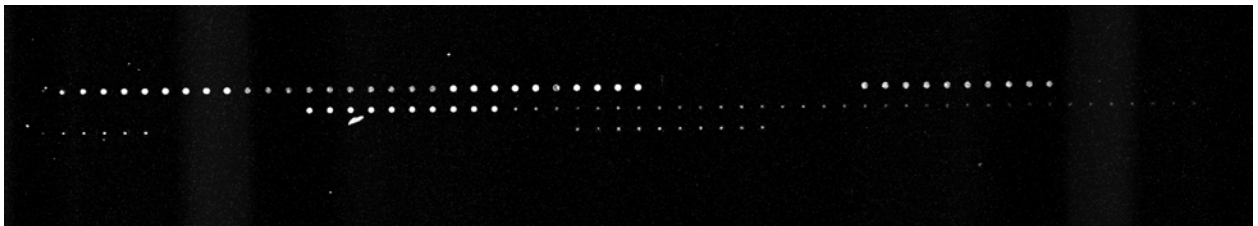
Για την ανίχνευση της παρουσίας spots στην εκτυπωμένη μικροσυστοιχία χρησιμοποιείται η χρωστική SYBR Green (**Εικόνες 14 και 16**). Αυτή παρεμβάλλεται στις βάσεις του DNA, με τρόπο ανάλογο του αιθιδίου που χρησιμοποιείται κλασσικά για την ανίχνευση DNA σε gel αгарόζης. Η ανίχνευση γίνεται στο scanner με ρυθμίσεις laser 488 nm και φίλτρου 522 nm. Όπως φαίνεται από τις εικόνες, δημιουργεί αρκετό θόρυβο, αλλά δεν είναι σημαντικό πρόβλημα για την ποιοτική αξιολόγηση των μικροσυστοιχιών που χρησιμοποιείται.

Για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης η συνήθης πρακτική είναι η παρασκευή cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης και η εισαγωγή φθορίζουσων ομάδων, είτε άμεσα χρησιμοποιώντας ένα φθορίζον νουκλεοτίδιο, είτε

έμμεσα χρησιμοποιώντας ένα τροποποιημένο νουκλεοτίδιο (αμινο-αλλυλο dUTP) το οποίο σημαίνεται κατόπιν με χημική αντίδραση (αμιδοποίηση). Οι φθορίζουσες ομάδες που χρησιμοποιούνται διαφέρουν σαφώς στα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής τους. Τέλος, υπάρχουν διάφορες μέθοδοι πολλαπλασιασμού του αρχικού mRNA, που χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις που το αρχικό υλικό είναι μικρής ποσότητας. Στην περίπτωση του ζαχαρομούκητα το αρχικό RNA δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα, γι' αυτό και δεν μελετήθηκαν αυτές οι μέθοδοι.

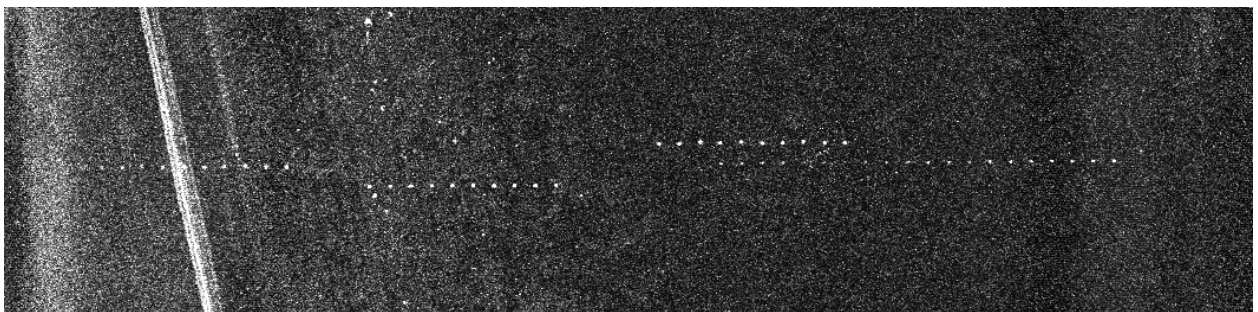
Για τη ανάλυση DNA δεν υπάρχει κοινή πρακτική. Συνήθως εισάγεται άμεσα η φθορίζουσα ομάδα κατά το γραμμικό πολλαπλασιασμό των τμημάτων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – PCR. Μια σχετικά νέα μέθοδος είναι η άμεση χημική ενσωμάτωση φθορίζουσων ομάδων με πυρηνόφιλη προσβολή του N⁷ της γουανίνης.

Για τον έλεγχο της δυνατότητας εκλεκτικής υβριδοποίησης στα εναποθεθέντα τμήματα DNA πραγματοποιήθηκε χημική σήμανση με τη χρωστική Alexa594 του PCR προϊόντος της ακτίνης που χρησιμοποιήθηκε και για την απόθεση και υβριδοποίηση του στην πρώτη μικροσυστοιχία. Παρατηρήθηκε εκλεκτική υβριδοποίηση στα spots που περιείχαν την ακτίνη (**Εικόνα 19**). Επειδή η σήμανση δίκλωνων DNA πάνω από 1000 bp, μπορεί να οδηγήσει σε συσσωμάτωση, πριν τη σήμανση η ακτίνη κόπηκε με isoCia της Minotech.



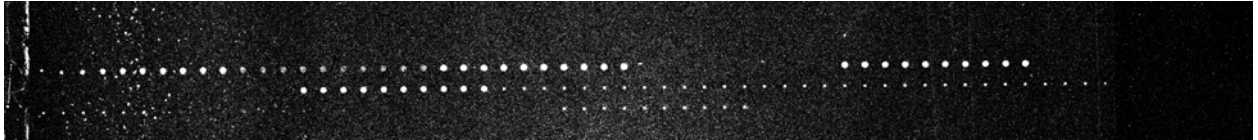
Εικόνα 19. Η ακτίνη (PCR προϊόν) έχει σημειωθεί με Alexa 594 και υβριδοποιηθεί με τη μικροσυστοιχία. Δεν παρατηρείται σήμα στα spots της συνθετάσης της χιτίνης.

Αφού λοιπόν βεβαιωθήκαμε τόσο της απόθεσης, όσο και της εκλεκτικής υβριδοποίησης με το αντίστοιχο DNA, ελέγξαμε την εκλεκτικότητα υβριδοποίησης, αλλά και την ποιότητα του σήματος που παράγεται σημαίνοντας ολικό RNA ζαχαρομούκητα. Μια τέτοια υβριδοποίηση είναι πιο απαιτητική, αφού οι ειδικές προς υβριδοποίηση αλληλουχίες είναι σημαντικά μικρότερες ποσοτικά, αλλά και υπάρχουν χιλιάδες άλλες αλληλουχίες που θα μπορούσαν να υβριδοποιηθούν μη ειδικά (**Εικόνα 20**). Δοκιμάστηκε το αμινο-άλλυλο πρωτόκολλο σήμανσης με ανάστροφη μεταγραφή του ολικού RNA παρουσία τυχαίων και oligo-dT εκκινητών (CyScribe). Το αποτέλεσμα ήταν μεν ειδικό, αλλά η σχέση σήματος θορύβου δεν ήταν ικανοποιητική.



Εικόνα 20. Απόπειρα σήμανσης της μικροσυστοιχίας με 25 μgr ολικού RNA ζαχαρομούκητα σημασμένου με αμινο-άλλυλο σήμανση με χρήση μίγματος τυχαίων και oligo-dT εκκινητών. Πολύ χαμηλό σήμα.

Με τη σκέψη ότι η χημική σήμανση γίνεται σε πυρηνόφιλα άτομα αζώτου γουανίνης, δοκιμάστηκε η χημική σήμανση όχι μόνο για το DNA, αλλά και για το ολικό RNA και μάλιστα σε αρκετά μικρότερη ποσότητα αυτού που χρησιμοποιήθηκε για την αμινο-άλλυλο σήμανση (**Εικόνα 21**). Το αποτέλεσμα ήταν ικανοποιητικό και αποφασίστηκε η χρήση αυτής της μεθόδου σήμανσης για την ανάλυση και της γονιδιακής έκφρασης.



Εικόνα 21. Απόπειρα σήμανσης με 4μgr ολικού RNA σημασμένου με χημική σήμανση. Πολύ ισχυρό σήμα.

4.2 Υβριδοποίηση

Μετά από ένα στάδιο προϋβριδοποίησης που σκοπό έχει να καλύψει τις ενεργές ομάδες της επικάλυψης, ώστε να εμποδιστεί η μη ειδική υβριδοποίηση, το μίγμα του σημασμένου και με τις δυο συνθήκες υλικού υβριδοποιείται με τη μικροσυστοιχία. Ακολουθούν μερικά στάδια ξεπλύματος για μείωση του θορύβου (background) και το πλακίδιο είναι έτοιμο για μέτρηση.

Μετά από αρκετές δοκιμές και τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου, το τελικό πρωτόκολλο έχει ως εξής :

Για την προετοιμασία της μικροσυστοιχίας μαρκάρονται τα όρια των spots με αιχμηρό αντικείμενο, ώστε να τοποθετηθεί η καλυπτρίδα στη σωστή θέση αργότερα. Αυτό είναι απαραίτητο, μια και μετά την προϋβριδοποίηση δεν μπορεί κανείς να διακρίνει τα spot. Στην συνέχεια το πλακίδιο καθαρίζεται με πεπιεσμένο αέρα. Εν τω μεταξύ έχει προθερμανθεί σε ένα corling jar διάλυμα προϋβριδοποίησης σε υδατόλουτρο 42 °C για μισή ώρα. Σκοπό έχει να διαλυθεί τελείως το δυσδιάλυτο σε χαμηλές θερμοκρασίες SDS, που αν δεν είναι καλά διαλυμένο μπορεί να δημιουργήσει θόρυβο.

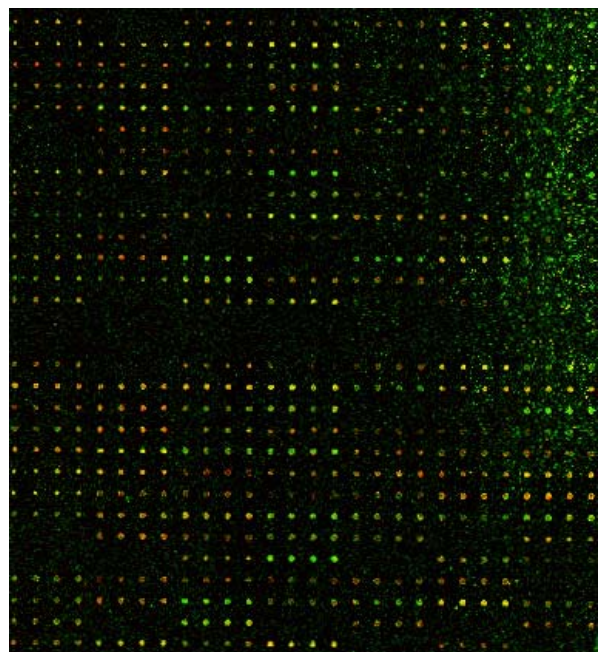
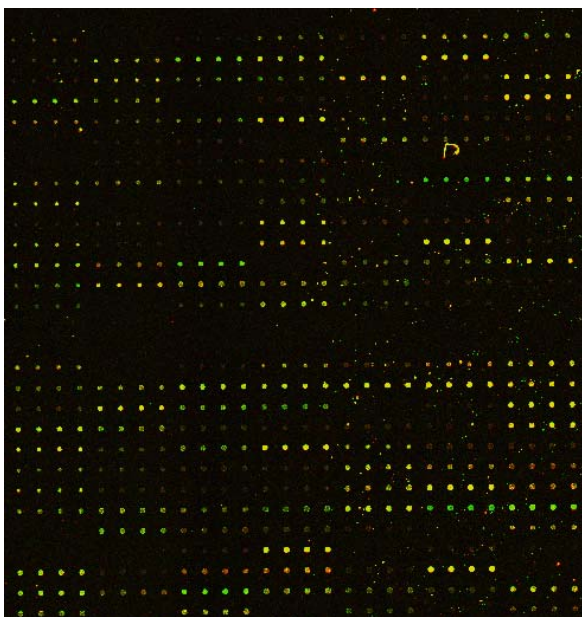
Παράλληλα, το πλακίδιο τοποθετείται ανάποδα σε ένα κουτάκι με 3x SSC για 15 λεπτά, ώστε να ενυδατωθούν τα spots από τους υδρατμούς και στεγνώνεται σε θερμική πλάκα στους 95 °C για 5 δευτερόλεπτα και τοποθετείται στο corling jar με το διάλυμα προϋβριδοποίησης για τουλάχιστον μια ώρα. Εκπλένεται με απιονισμένο νερό και τοποθετείται σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό στους 95 °C για 2 λεπτά. Την στεγνώνουμε με γρήγορη μετακίνησή της και την τοποθετούμε σε ειδικό κουτί.

Κατά τη διάρκεια της προϋβριδοποίησης, σε 4 μg ολικού RNA από τις δυο προς σύγκριση καλλιέργειες Προστίθεται σε καθεμιά από αυτές 10 μl από διαφορετικό μίγμα spike-in RNA. Τις στεγνώνουμε τελείως σε φυγοκέντρηση υπό κενό (προαιρετικά για επίσπευση της διαδικασίας θερμαίνεται αρχικά στους 45 °C) και προσθέτουμε και στα δυο από 20 μl Ullisys buffer. Ακολουθεί αποδιάταξη στο PCR μηχάνημα για 5 λεπτά στους 95 °C (πρόγραμμα ULS95). Παγώνονται και φυγοκεντρούνται, Χωρίζονται στα δυο (1 και 2) και προστίθονται χρωστικές Alexa 546 στα 1 και Alexa 647 στα 2 και ακολουθεί σήμανση στο PCR μηχάνημα για 15 λεπτά στους 90 °C (πρόγραμμα ULS90). Μετά απο ψύξη και φυγοκέντρηση τοποθετούνται σε κολώνες μοριακής

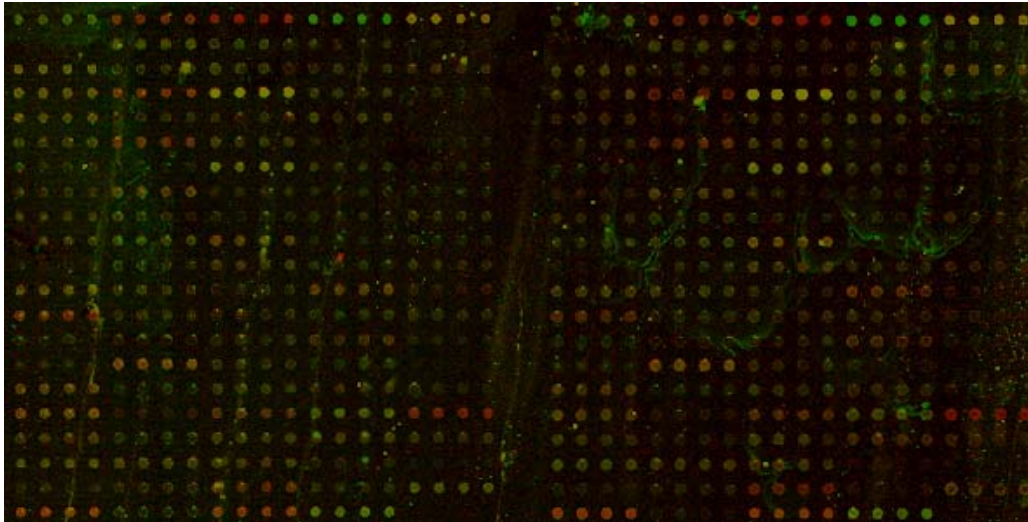
διήθησης Autoseq G50 για διαχωρισμό των σημασμένων νουκλεϊκών οξέων από τις ελεύθερες χρωστικές και αναμιγνύονται τα 1 με τα 2. Προστίθεται 1μl 10 μgr / μl από DNA σπέρματος σολωμού, που σπάστηκε σε μικρά κομμάτια με υπέρηχους (μεγέθη από 100 μέχρι 1000bp, με μέσο μέγεθος τα 400, όπως ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση). Τα δυο μίγματα στεγνώνονται με φυγοκέντρηση υπό κενό (κάλυψη με αλουμινόχαρτο γιατί οι χρωστικές είναι φωτοευαίσθητες). Επαναιωρούνται μηχανικά με 5 μl διαλύματος υβριδοποίησης, διαλύονται στους 42 °C για 10 λεπτά και αποδιατάσσονται στους 95 °C για 2 λεπτά. Ακολούθως ψύχονται, φυγοκεντρώνονται στις 14,5 kgrm για 1-5 λεπτά και τοποθετούνται στις καλυπτρίδες, που έχουν κοπεί σε διαστάσεις 18 x 10 mm, και καθαριστεί με Kimwipe και πετρελαιμένο αέρα.

Εφαρμόζεται η μικροσυστοιχία στις καλυπτρίδες, τοποθετείται στον ειδικό θάλαμο υβριδοποίησης στον οποίο έχουν τοποθετηθεί και 2 σταγόνες των 15 μl 3xSSC, ώστε να εξασφαλιστεί η παρουσία επαρκούς υγρασίας κατά την υβριδοποίηση και αφήνεται για υβριδοποίηση τουλάχιστον 16 ώρες στους 42 °C στο ειδικό υδατόλουτρο που σχεδιάστηκε ειδικά για την υβριδοποίηση μικροσυστοιχιών και κατασκευάστηκε στο Μηχανουργείο του Ι.Τ.Ε. Ακολουθούν πλύσεις των 5 λεπτών για να εξασφαλιστεί μείωση του θορύβου και ειδική υβριδοποίηση, δυο πλύσεις στους 42 °C με διάλυμα 0 (2 x SSC, 0,1 % SDS), δυο πλύσεις σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα 1 (0,1 x SSC, 0,1 % SDS) και δυο πλύσεις στους 42 °C με διάλυμα 2 (0,1 x SSC). Τέλος, η μικροσυστοιχία ενβαπτίζεται σε απιονισμένο νερό 5-6 φορές και στεγνώνεται με φυγοκέντρηση σε 2500 grm για 2 λεπτά. Η μικροσυστοιχία είναι πλέον έτοιμη για συλλογή δεδομένων

Μετά από την σχετικά πρόσφατη κατασκευή της τελικής μορφής της μικροσυστοιχίας και τη βελτιστοποίηση των συνθηκών παραλαβής προφίλ έκφρασης γονιδίων που έγινε απομένει η μαζική παραλαβή προφίλ έκφρασης, για να επακολουθήσει η ανάλυσή τους. Στην παρούσα εργασία δείχθηκε ότι είναι δυνατή η παραλαβή αρκετά καλών αποτελεσμάτων υβριδοποίησης



Εικόνα 22β. ChIP to chip. Πιο πράσινα εμφανίζονται τα γονίδια που έχει προσδεθεί το GCN4. Συγκριτικά η ακτίνη εμφανίζεται ελαφρώς κόκκινη.



Εικόνα 23 Ένα από τα 2 ζεύγη block της νέας μικροσυστοιχίας. Στην πάνω σειρά φαίνονται οι spike-in μάρτυρες. Οι αναλογίες τους (κόκκινο προς πράσινο) είναι κατά σειρά 1/4, 4/1, 4/0, 0/4 και 1/1.

5-Συλλογή δεδομένων

Η παραλαβή των παραπάνω εικόνων έγινε με τη χρήση του GSI Lumonics ScanArray5000, με τον οποίο σαρώνεται η επιφάνεια της μικροσυστοιχίας. Η ανίχνευση των νουκλεϊκών οξέων που έχουν σημειωθεί με τη χρωστική Alexa 546 γίνεται με διέγερση με laser στα 543 nm και ανίχνευση της εκπομπής με φίλτρο στα 570 nm, ενώ για την Alexa 647 οι αντίστοιχες τιμές είναι 633 και 670 nm. Το πρόγραμμα τελικά μας δίνει δυο αρχεία εικόνας τύπου 16bit TIFF, ένα για κάθε μήκος κύματος.

Η αλληλεπικάλυψη αυτών των δυο εικόνων, η εύρεση των ορίων του κάθε spot και η ποσοτικοποίηση του σήματος μπορεί να γίνει με διάφορα προγράμματα ανάλυσης εικόνας. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας δοκιμάστηκαν τα προγράμματα :

- Imagene. Το καλύτερο πρόγραμμα από αυτά που δοκιμάστηκαν. Είναι εμπορικό και διαθέτει έναν από τους καλύτερους αλγόριθμους εύρεσης spot, με δυνατότητα μη μέτρησης των rixel που περιέχουν θόρυβο (από ρωγμές, τριχούλες, SDS), δυνατότητα παραμετροποίησης των συνθηκών φιλτραρίσματος και είναι πολύ φιλικό προς το χρήστη.
- ScanAlyze. Από τα καλύτερα προγράμματα που διατίθενται από ερευνητικά κέντρα. Έχει μεγάλη ποικιλία στατιστικής ανάλυσης και παραμετροποίησης στο φιλτράρισμα των «κακών» spot
- Spot. Θεωρητικά ένα από τα δυναμικότερα προγράμματα. Πρακτικά δεν είναι καθόλου φιλικό στο χρήστη. Όλες οι εντολές γίνονται με προγραμματισμό και είναι δύσκολη η παραμετροποίησή του από μη ειδικούς
- Spottfinder. Το καλύτερο μη εμπορικό πρόγραμμα. Συγκρίσιμα αποτελέσματα με το Imagene, με δυνατότητα μη μέτρησης rixel που περιέχουν πολύ υψηλό θόρυβο και μέτρια δυνατότητα παραμετροποίησης των αποτελεσμάτων
- Quantarray. Υπήρχε σαν συνοδευτικό λογισμικό του σαρωτή. Το αδύνατό του σημείο είναι ο αλγόριθμος εύρεσης spot. Για να μπορέσει να πάρει κανείς αξιοπρεπή μέτρηση πρέπει να μετακινήσει ένα προς ένα τα περιγράμματα των spot στη σωστή θέση.

Αποφασίστηκε η χρήση της επιδεικτικής (demo) έκδοσης του Imagene για την ανάλυση των σαρωμένων εικονών.

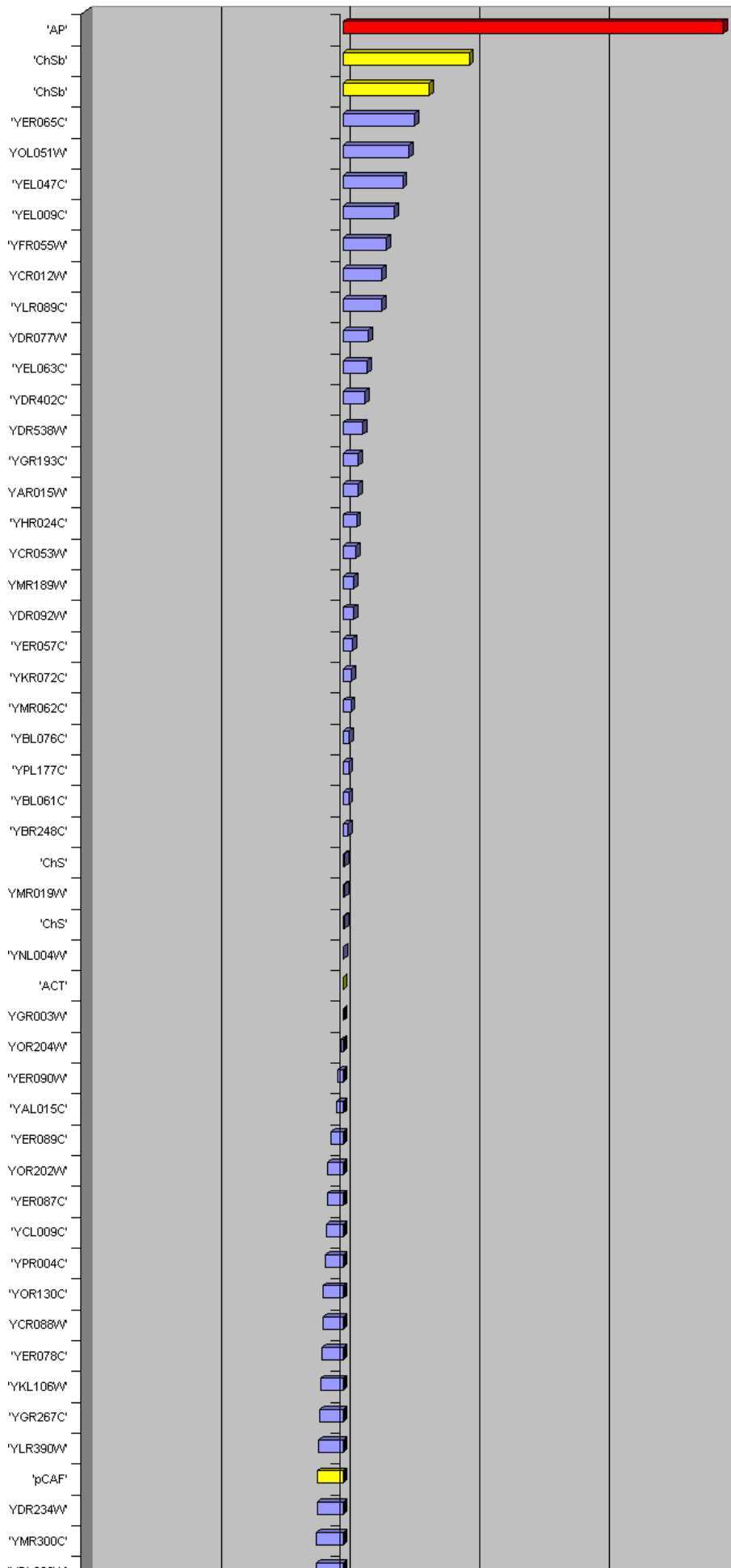
6-Ανάλυση δεδομένων

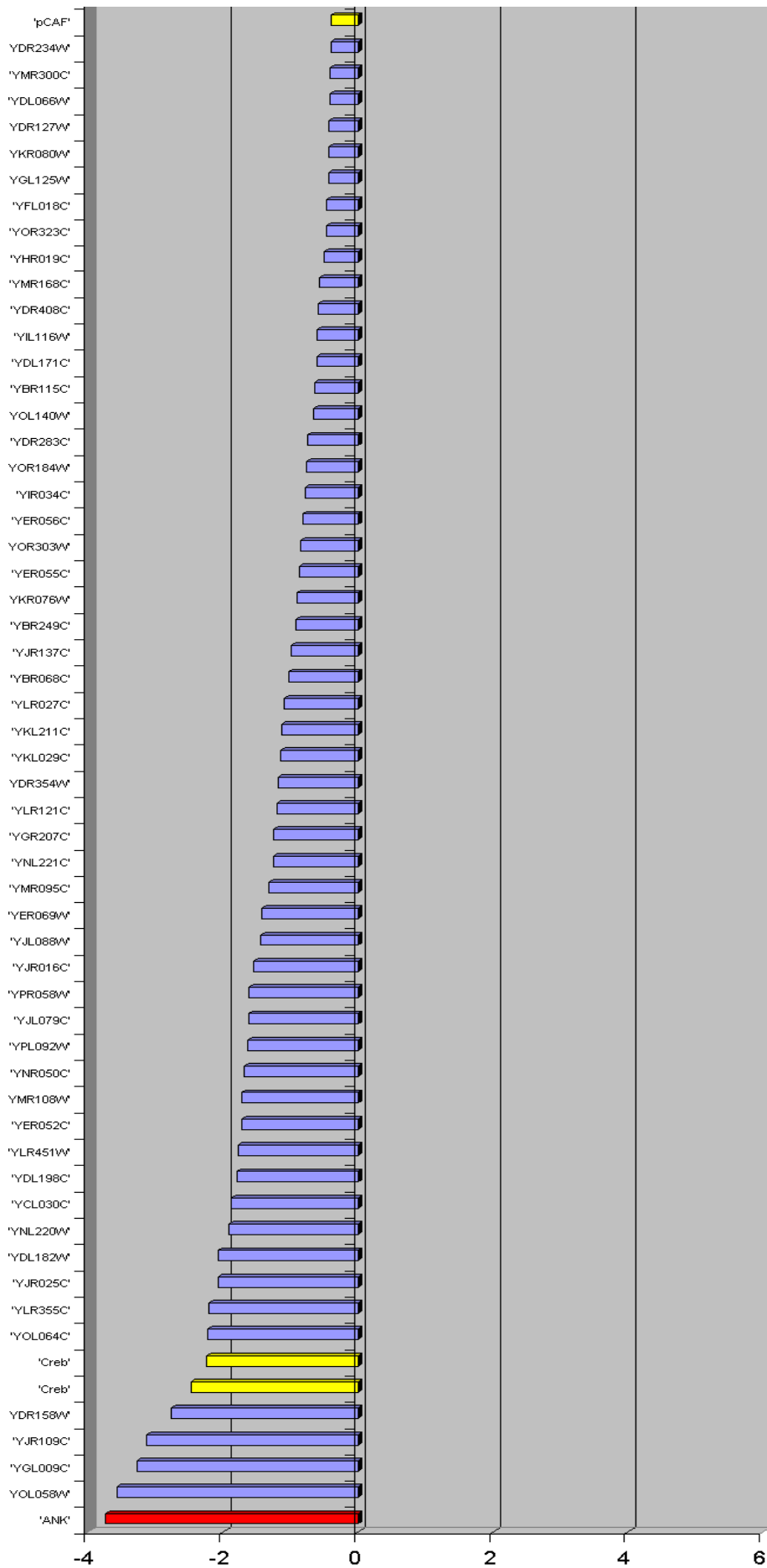
Για την ανάλυση των δεδομένων απαιτείται να γίνει φιλτράρισμα των εσφαλμένων τιμών, κανονικοποίηση με βάση τους σταθερούς και τους spike-in μάρτυρες και γραφική απεικόνιση των τιμών αυτών.

Για το φιλτράρισμα ένα μεγάλο μέρος έγινε με σωστή παραμετροποίηση του Imagene για τις συνθήκες που κρίνεται αποδεκτό ή όχι ένα spot. Στοιχεία που παίρνει υπ' όψιν είναι μεταξύ άλλων η κανονικότητα του σχήματος του spot (ο βαθμός δηλαδή της κυκλικότητάς του) και η παρουσία μεγάλου ποσοστού rixel με τιμές έντασης που δεν συμφωνούν με τις γύρω τους (πιθανότατα σκόνη, ρωγμές ή άλλες ανωμαλίες στη μικροσυστοιχία). Η παραμετροποίηση αυτή δεν είναι ποτέ η ίδια, αλλά διαφέρει από εικόνα σε εικόνα, ανάλογα με την ποιότητά της. Για το φιλτράρισμα αυτό εκμεταλλευόμαστε ακόμα την παρουσία πολλών spot με την ίδια αλληλουχία, οπότε εύκολα απορρίπτουμε spot που δεν είναι καλής ποιότητας και επίσης απορρίπτουμε με στατιστικό τρόπο spot με μη σωστά αποτελέσματα, που δεν αναγνωρίστηκαν με το προηγούμενο φιλτράρισμα (outliers).

Η κανονικοποίηση και η στατιστική ανάλυση των τιμών πραγματοποιείται με ρουτίνες που γράφηκαν ειδικά γι' αυτή την τελική μικροσυστοιχία στο πρόγραμμα Matlab (Μαργαρίτης Θανάσης και Ούλας Αναστάσιος, **Παράρτημα 4**).

Με τη χρήση αυτού του προγράμματος αναλύθηκαν τα δεδομένα από την υβριδοποίηση που απεικονίζεται στην **Εικόνα 23**. Το γράφημα αυτής της ανάλυσης απεικονίζει παρακάτω τη σχετική έκφραση των γονιδίων ως λογάριθμο με βάση το 2 της γονιδιακής έκφρασης σε συνθήκες απουσίας προς την έκφραση παρουσία 3-AT. Με κόκκινο φαίνονται οι μετρήσεις για τα spike in που περιλαμβάνονται μόνο στο ένα από τα δυο μίγματα RNA, με κίτρινο αυτά που προστέθηκαν σε αναλογία 1/4, 4/1, 1/1 και η ακτίνη.





Με μια πρώτη ματιά στο παραπάνω γράφημα βλέπει κανείς ότι για τα περισσότερα γονίδια η έκφραση είναι αυξημένη σε συνθήκες έλλειψης αμινοξέων. Αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς τα περισσότερα είναι στόχοι του GCN4, ο οποίος παράγεται υπό αυτές τις συνθήκες. Το γονίδιο που καταστέλλεται περισσότερο είναι το YER065C παρόλο που περιέχει αλληλουχία πρόσδεσης του GCN4 στον υποκινητή του. Αρχικά το γεγονός αυτό ήγειρε επιφυλάξεις για την καταλληλότητα της μικροσυστοιχίας. Όμως, μια αναδρομή στη ερευνητική βιβλιογραφία επιβεβαίωσε ότι ένα ανάλογο αποτέλεσμα είχε παρατηρηθεί στις ίδιες συνθήκες (Natarajan et al., 2001).

Αντίστοιχα, το γονίδιο που έχει την μεγαλύτερη υπερέκφραση είναι το YOL058W – ARG1 (12πλάσια), κλασσικός στόχος του GCN4 και για το οποίο έχουν γίνει εκτενή πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και έχει δείχθει ότι στον υποκινητή του στρατολογούνται μέσω του GCN4 οι συνενεργοποιητές Mbf1, SAGA, SWI/SNF, SRB/MED, RSC, CCR4-NOT και Paf1 (Swanson et al., 2003). Ισχυρά επίσης υπερεκφράζονται γνωστά γονίδια-στόχοι του GCN4, όπως είναι τα YGL009C-LEU1 (10πλάσια), YCL030C-HIS4 (3,7 φορές), YKL211C-TRP3 (2,2 φορές) και λιγότερο ισχυρά το YOR202W-HIS3 (1,18 φορές).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις και συσχετισμοί επιβεβαιώνουν την καταλληλότητα της μικροσυστοιχίας DNA για την μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης των στόχων του GCN4.

Συμπεράσματα

Το αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας τεχνικής που θα βοηθήσει στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. Η μεθοδολογική προσέγγιση αξιοποιεί τις εξαιρετικές δυνατότητες της μοριακής γενετικής του σακχαρομύκητα, *Saccharomyces cerevisiae*, σε συνδυασμό με τη νέα και δυναμική τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (microarrays) DNA για την παράλληλη και συγκριτική ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων στόχων. Η μελέτη εστιάζεται στα γονίδια που ελέγχονται από τον καλά μελετημένο μεταγραφικό ενεργοποιητή, GCN4 και είναι υπεύθυνα μεταξύ άλλων για τη βιοσύνθεση των αμινοξέων, των βιταμινών και των πουρινών.

Η σχεδίαση της μικροσυστοιχίας έγινε με τέτοιο τρόπο, ώστε να μπορεί να συνδυαστεί η καταγραφή και ανάλυση του προφίλ έκφρασης των γονιδίων με το αντίστοιχο προφίλ της παρουσίας μεταγραφικών παραγόντων, συνενεργοποιητών ή ακόμα και τροποποιημένων ιστονών στους υποκινητές τους. Ο συσχετισμός των προφίλ ανοσοκατακρήμνισης και γονιδιακής έκφρασης, σε διάφορες συνθήκες και γενετικά υποστρώματα, πρόκειται να αποκαλύψει νέες ειδικές αλληλεπιδράσεις, συνέργιες και δίκτυα παραγόντων που εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση και έχουν σαν αποτέλεσμα τα διάφορα παρατηρούμενα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων.

Κατά τη διάρκεια της εργασίας δοκιμάστηκαν παλιές και νέες τεχνικές και αποκτήθηκε εμπειρία σε όλες τις πλευρές της δυναμικής τεχνικής των μικροσυστοιχιών DNA. Χρησιμοποιήθηκαν και αναπτύχθηκαν βιοπληροφορικά και στατιστικά εργαλεία και χρησιμοποιήθηκε διεξοδικά και τελικά με μεγάλη επιτυχία ειδικός εξοπλισμός για μεταγονιδιωματικές αναλύσεις, όπως το ρομπότ μεταφοράς υγρών Beckman Biomek2000, ο αποθέτης Packard SpotArray24 spotter και ο σαρωτής GSI Lumonics ScanArray5000.

Τέλος, η ανάλυση των δεδομένων αυτών μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικά ευρήματα στη συγκεκριμένη ανάλυση. Εμφανίστηκε υπερέκφραση γονιδίων στους θετικούς μάρτυρες όπως αναμενόταν. Επίσης βρέθηκε κατεσταλμένο ένα γονίδιο που φέρει στον υποκινητή του τη γνήσια αλληλουχία του GCN4 και που είχε φανεί να καταστέλλεται και σε προηγούμενα πειράματα με μικροσυστοιχίες DNA (Natarajan et al., 2001) στις ίδιες συνθήκες επιβεβαιώνοντας ένα τέτοιο παράδοξο αποτέλεσμα. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον να μελετήσει κανείς την ανώμαλη συμπεριφορά αυτού του γονιδίου με τη μέθοδο ChIP.

Η μεταγονιδιωματική προσέγγιση των μικροσυστοιχιών DNA διευκολύνει την ολιστική οπτική και επεξεργασία για τη κατανόηση των βιολογικών συστημάτων, σε αντίθεση με την παραδοσιακή προσέγγιση επιμέρους ερωτημάτων. Είναι σαφές ότι ερευνητικές προσεγγίσεις, όπως αυτή που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, επικρατούν στη σύγχρονη βιβλιογραφία και αποδίδουν, με ποσοτικούς πλέον όρους, την απεικόνιση βιολογικών διεργασιών.

Η γονιδιωματική έρευνα και λειτουργική γονιδιωματική ανάλυση έχουν μια μακρά ιστορία στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας και στο Βιολογικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η συμμετοχή στα γονιδιωματικά προγράμματα του σακχαρομύκητα, της δροσόφιλας, του κουνουπιού και του ανθρώπου και η εμπειρία με τη λειτουργική ανάλυση στο σακχαρομύκητα πρόκειται να συμπληρωθεί με τον καταλληλότερο τρόπο με την ανάπτυξη των μικροσυστοιχιών DNA. Η συγκεκριμένη δραστηριότητα είναι η πρώτη ερευνητική προσέγγιση που επιχειρείται με την δυναμική και καινοτόμο τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA στην Ελλάδα. Η σύγχρονη τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA θα επιτρέψει σε Ελληνικά εργαστήρια να διαβούν το κατώφλι της μεταγονιδιωματικής εποχής και να συμμετάσχουν στις ταχύτατες εξελίξεις της Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Ιατρικής. Δεν είναι τυχαίο ότι πολλά εργαστήρια έχουν ήδη εκφράσει την επιθυμία τους να δραστηριοποιηθούν σε αυτό τον τομέα. Η εργασία αυτή θα βοηθήσει να ξεπεραστεί, σε σημαντικό βαθμό, η αδράνεια για την ενσωμάτωση της νέας αυτής μεθοδολογίας στην ερευνητική πρακτική.

Βιβλιογραφία

Albertson, D. G. (2003). Profiling breast cancer by array CGH. *Breast Cancer Res Treat* 78, 289-298.

DeRisi, J. L., Iyer, V. R., and Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686.

Devaux, F., Marc, P., and Jacq, C. (2001). Transcriptomes, transcription activators and microarrays. *FEBS Lett* 498, 140-144.

Kuo, M. H., and Allis, C. D. (1999). In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* 19, 425-433.

Lieb, J. D., Liu, X., Botstein, D., and Brown, P. O. (2001). Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat Genet* 28, 327-334.

- Liljedahl, U., Karlsson, J., Melhus, H., Kurland, L., Lindersson, M., Kahan, T., Nystrom, F., Lind, L., and Syvanen, A. C. (2003). A microarray minisequencing system for pharmacogenetic profiling of antihypertensive drug response. *Pharmacogenetics* 13, 7-17.
- Mir, K. U., and Southern, E. M. (1999). Determining the influence of structure on hybridization using oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 17, 788-792.
- Narlikar, G. J., Fan, H. Y., and Kingston, R. E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475-487.
- Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G., and Marton, M. J. (2001). Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* 21, 4347-4368.
- Niehrs, C., and Pollet, N. (1999). Synexpression groups in eukaryotes. *Nature* 402, 483-487.
- Orlando, V. (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* 25, 99-104.
- Raychaudhuri, S., Sutphin, P. D., Chang, J. T., and Altman, R. B. (2001). Basic microarray analysis: grouping and feature reduction. *Trends Biotechnol* 19, 189-193.
- Ren, B., Robert, F., Wyrick, J. J., Aparicio, O., Jennings, E. G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E., *et al.* (2000). Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* 290, 2306-2309.
- Swanson, M. J., Qiu, H., Sumibcay, L., Krueger, A., Kim, S. J., Natarajan, K., Yoon, S., and Hinnebusch, A. G. (2003). A multiplicity of coactivators is required by Gcn4p at individual promoters in vivo. *Mol Cell Biol* 23, 2800-2820.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

AA	Primer name	Sequence	μgr	MW	nmoles	mM in 200λ TE	λ for 50λ 25*(25μM)	λ ddH2O
1.	YAL015C A	CCTTCCAGGTATTTACCCAC	99	6276	15.77438	0.078871893	15.848	34.152
2.	YAL015C S	GGTTCAAGGATAACGGCAAC	66	6170	10.69692	0.053484603	23.371	26.629
3.	YAR015W A	AGTGTCTGCGATGATGATGC	66	6182	10.67616	0.053380783	23.417	26.583
4.	YAR015W S	ACCACAGCCAGGAAAGAATG	66	6149	10.73345	0.053667263	23.292	26.708
5.	YBL061C A	AAGACCCATTCTGCCGTAGA	105.6	6083	17.35986	0.086799277	14.401	35.599
6.	YBL061C S	GAACATGCCATCGCACTTAG	82.5	6083	13.56239	0.067811935	18.433	31.567
7.	YBL076C A	CAGAATGGATAGGAATGGCG	66	6248	10.56338	0.052816901	23.667	26.333
8.	YBL076C S	GCTACGGGAGGTGGAGAAGATA	66	6904.4	9.559122	0.047795609	26.153	23.847
9.	YBR068C A	TCACTCAAGCCTGCGATAGC	66	6059	10.89289	0.054464433	22.951	27.049
10.	YBR068C S	GGCATCCACATTCCAACTCC	82.5	5981	13.79368	0.0689684	18.124	31.876
11.	YBR115C A	TAGGGTTGGTTGGAATCTG	105.6	6251	16.8933	0.084466485	14.799	35.201
12.	YBR115C S	TCTTCTTGCTGACCGCTTCT	135.3	5999	22.55376	0.112768795	11.085	38.915
13.	YBR248C A	CTCCTCTGTTACCCAACCTCGTA	115.5	6580.4	17.55212	0.087760622	14.243	35.757
14.	YBR248C S	CATTCTTCTCTACCACTGCC	132	6532.4	20.20697	0.101034842	12.372	37.628
15.	YBR249C A	GGACTTAGCGTCGTAGTTGGTAC	82.5	7103.6	11.61383	0.058069148	21.526	28.474
16.	YBR249C S	GCTAGGGTAAAACCTCCACACAG	66	6733.4	9.801883	0.049009416	25.505	24.495
17.	YCL009C A	GCCGAGAGACTAACCTAACCCAG	66	6718.4	9.823768	0.049118838	25.448	24.552
18.	YCL009C S	GCACATCCAACGAATCACCT	184.8	6014	30.7283	0.153641503	8.1358	41.864
19.	YCL030C A	GGTCTGCTCAAAGCCTTCTG	99	6080	16.28289	0.081414474	15.354	34.646
20.	YCL030C S	TCACAATCCTGACAACCAGC	66	6014	10.97439	0.054871965	22.78	27.22
21.	YCR012W A	GCACCACCACCAGTAGAGACAT	99	6679.4	14.82169	0.074108453	16.867	33.133
22.	YCR012W S	GAATCGTGTGACAACAACAGCC	66	6733.4	9.801883	0.049009416	25.505	24.495
23.	YCR053W A	CTTACCGTTGGTGGCTTGGA	82.5	6149	13.41682	0.067084079	18.633	31.367
24.	YCR053W S	ACCTTGGATGTAGATGTGTGCGC	89.1	6775.4	13.15052	0.065752575	19.011	30.989
25.	YCR088W A	GTGGGTCCTCCTTAGCCTTT	151.8	6062	25.04124	0.125206203	9.9835	40.016
26.	YCR088W S	TACTTCTCGTCCCTCGCTGATG	82.5	6336.2	13.02042	0.065102112	19.201	30.799
27.	YDL066W A	GTGTTCAAAGTGCGGATTC	92.4	6182	14.94662	0.074733096	16.726	33.274
28.	YDL066W S	ACAATAGTGGTCAGGTTCCGGTC	108.9	6784.4	16.05153	0.08025765	15.575	34.425
29.	YDL171C A	ATCACACCTTCTCTGGAGCG	99	6050	16.36364	0.081818182	15.278	34.722
30.	YDL171C S	CTTTGATGACTCAGACCCTGG	66	6393.2	10.32347	0.051617343	24.217	25.783
31.	YDL198C A	ATCAGAGAGGAGCAAGCACC	66	6164	10.70733	0.053536665	23.348	26.652
32.	YDL198C S	CCAGACGGGCAGTCATATTC	82.5	6098	13.52903	0.06764513	18.479	31.521
33.	YDR077W A	GACGGTTAGACTTGGGTTGG	132	6236	21.16742	0.105837075	11.811	38.189
34.	YDR077W S	GAGTAAGGAACATTGCTCTGCC	75.9	6754.4	11.23712	0.056185598	22.248	27.752
35.	YDR092W A	CTTTGGCACCTTGCTCATTC	99	6008	16.47803	0.082390146	15.172	34.828
36.	YDR092W S	CCGCATCCGTATTGTTACCC	99	6002	16.4945	0.082472509	15.157	34.843
37.	YDR127W A	GACAACTCCGCTTTGACCT	122.1	6026	20.2622	0.101310986	12.338	37.662
38.	YDR127W S	CGATGTGCTACGCCTTTCTA	85.8	6056	14.16777	0.070838838	17.646	32.354
39.	YDR158W A	GCTGTCTCTGTTCCCTGTCCAA	132	6336.2	20.83268	0.104163379	12	38
40.	YDR158W S	CCATTCACATACGCCTTCTG	151.8	5987	25.35494	0.126774678	9.86	40.14
41.	YDR234W A	TAATCCCGCACCTAGACCGA	191.4	6029	31.74656	0.158732792	7.8749	42.125
42.	YDR234W S	CGTGTCAAGTGAGCAGAATGG	99	6528.2	15.16498	0.075824883	16.485	33.515

43.	YDR354W A	GCCGTATGAAGCACACTTCG	118.8	6098	19.4818	0.097408987	12.832	37.168
44.	YDR354W S	CGTGGTTGCCTATACACCGA	115.5	6089	18.96863	0.09484316	13.18	36.82
45.	YDR402C A	AACCCAGTCACAGCACATCTG	207.9	6342.2	32.78042	0.163902116	7.6265	42.373
46.	YDR402C S	ATTACAAGCCACGGACCACA	191.4	6062	31.57374	0.15786869	7.918	42.082
47.	YDR408C A	TCGTGTACCCTTTGCTCGTA	267.3	6047	44.20374	0.221018687	5.6556	44.344
48.	YDR408C S	AAGAGGAACCTTCTGCTCGC	168.3	6098	27.59921	0.137996064	9.0582	40.942
49.	YDR538W A	TGGATGCCAAAGCAGTCTAGG	105.6	6489.2	16.27319	0.081365962	15.363	34.637
50.	YDR538W S	CGCCTTTCCTGTTTACCGTT	330	5999	55.00917	0.275045841	4.5447	45.455
51.	YEL009C A	GACCCCATCGTGAGTGTTC	217.8	6080	35.82237	0.179111842	6.9789	43.021
52.	YEL009C S	CCGTAACGGTTACCTTTCTGTC	303.6	6649.4	45.65825	0.228291274	5.4755	44.525
53.	YEL047C A	AACGGATCAGCCTTGGTAGT	165	6152	26.82055	0.134102731	9.3212	40.679
54.	YEL047C S	TTCTCGCAGGGTTTCTTCAC	283.8	6047	46.93236	0.234661816	5.3268	44.673
55.	YEL063C A	CAGCGTTGAAGATATGTGGC	122.1	6191	19.72218	0.098610887	12.676	37.324
56.	YEL063C S	CTAGGGTTTCTGTGTGGTTTCC	323.4	6748.4	47.92247	0.239612353	5.2168	44.783
57.	YER052C A	TTCTCAGGAGGATGTGGTGG	132	6236	21.16742	0.105837075	11.811	38.189
58.	YER052C S	TCACTGTCATTGGTCTCACAGG	264	6697.4	39.41828	0.197091409	6.3422	43.658
59.	YER055C A	ACAGCAACCCATCCTTCATC	270.6	5966	45.35702	0.226785116	5.5118	44.488
60.	YER055C S	TAACAGCGTGAATCTTCCCG	198	6050	32.72727	0.163636364	7.6389	42.361
61.	YER056C A	CCATAGCAGAAGCAGCACCA	105.6	6086	17.3513	0.08675649	14.408	35.592
62.	YER056C S	GTGACTGCAATACTCCTCTGCG	316.8	6682.4	47.40812	0.237040584	5.2734	44.727
63.	YER057C A	GCAACAGCAACGCATGATCT	132	6092	21.66776	0.108338805	11.538	38.462
64.	YER057C S	GGCGGATTGATGGTACGAAG	204.6	6254	32.71506	0.163575312	7.6417	42.358
65.	YER065C A	GATAGAACATTGCGTCCCACC	165	6372.2	25.89373	0.129468629	9.6548	40.345
66.	YER065C S	CCAGTTTCCATTCATCCGA	270.6	6026	44.90541	0.224527049	5.5673	44.433
67.	YER069W A	ATTCGCCAATGGAGGATCTC	168.3	6113	27.53149	0.137657451	9.0805	40.919
68.	YER069W S	CATAATGCACGGAACCTGCT	264	6083	43.39964	0.216998192	5.7604	44.24
69.	YER078C A	GGATGTCGTGGAGGGAATAGT	102.3	6597.2	15.50658	0.077532893	16.122	33.878
70.	YER078C S	GAGTTCTGACAAGCGGCAAG	99	6185	16.00647	0.080032336	15.619	34.381
71.	YER087C A	CGACCGCTAGAAACAACAAC	118.8	6673.4	17.80202	0.0890101	14.043	35.957
72.	YER087C S	GACGAAGATAATGTAGACCCGC	165	6772.4	24.36359	0.121817967	10.261	39.739
73.	YER089C A	CATACGGTCGCTCCATTGAG	181.5	6089	29.80785	0.149039251	8.3871	41.613
74.	YER089C S	GTGATGATTGCCTTCTGCTACG	211.2	6727.4	31.394	0.156970003	7.9633	42.037
75.	YER090W A	CTCTAACCTTTGGAGCACCCT	125.4	6628.4	18.91859	0.094592964	13.215	36.785
76.	YER090W S	GTCAGAATCCGAATTGGCTG	155.1	6152	25.21131	0.126056567	9.9162	40.084
77.	YFL018C A	TGGTTGGTCTTGGCTCTTGA	155.1	6155	25.19903	0.125995126	9.921	40.079
78.	YFL018C S	GAACGGCTGTTCCCTCATTG	168.3	6080	27.68092	0.138404605	9.0315	40.969
79.	YFR055W A	ATTGACAGTCCTCGGCACCT	363	6050	60	0.3	4.1667	45.833
80.	YFR055W S	CTCACCAACAACCTTACACCAGC	174.9	6577.4	26.59105	0.132955271	9.4017	40.598
81.	YGL009C A	GGTGTGTTAGGTTCCAAACCC	118.8	6432.2	18.46957	0.092347875	13.536	36.464
82.	YGL009C S	AAATCGCCAGGCCATTCTAC	257.4	6044	42.58769	0.212938451	5.8702	44.13
83.	YGL013C A	GTGTGTGCTGTATTGCGGCT	198	6179	32.04402	0.1602201	7.8018	42.198
84.	YGL013C S	ATACCGGCAATTACGGGATG	211.2	6161	34.28015	0.171400747	7.2929	42.707
85.	YGL125W A	CCGTTGACTTGAGGTTGAGAG	99	6510.2	15.20691	0.07603453	16.44	33.56
86.	YGL125W S	ATGCGACCACCCAGTAATCA	198	6053	32.71105	0.163555262	7.6427	42.357
87.	YGR003W A	CCTTCTCAGTTAGGAGTCCGAT	99	6697.4	14.78186	0.073909278	16.913	33.087
88.	YGR003W S	GGCCATTAGTTGACTTCTGG	234.3	6462.2	36.257	0.181285011	6.8952	43.105

89.	YGR193C A	GTCAAACGGAATAGAGGCGG	66	6233	10.5888	0.052944008	23.61	26.39
90.	YGR193C S	GCTCACAACAGAGACTGAACGA	151.8	6742.4	22.51424	0.112571191	11.104	38.896
91.	YGR207C A	TCGCCTTCATTAGTTTGGGC	155.1	6086	25.48472	0.127423595	9.8098	40.19
92.	YGR207C S	TCTCCATGAGCTATGCAGGTG	99	6432.2	15.39131	0.076956562	16.243	33.757
93.	YGR267C A	TATGAGCCCTAAACCCTCCA	158.4	6005	26.37802	0.131890092	9.4776	40.522
94.	YGR267C S	CCGACTGATTTGCCCTTCTT	240.9	6008	40.09654	0.20048269	6.235	43.765
95.	YHR019C A	GTCGTGTTTCGTTCAACCAGGTA	244.2	6736.4	36.25082	0.181254082	6.8964	43.104
96.	YHR019C S	CCGCCAGCAACTATCTAGCA	138.6	6029	22.98889	0.114944435	10.875	39.125
97.	YHR024C A	CATGAGAACTTGTCTGCCCA	102.3	6074	16.84228	0.084211393	14.844	35.156
98.	YHR024C S	GAGAAAGACCGACACCAAGAAC	92.4	6760.4	13.66783	0.068339152	18.291	31.709
99.	YHR208W A	GCTCGTTGATGTCCCATTCT	303.6	6047	50.20671	0.25103357	4.9794	45.021
100.	YHR208W S	CCAGGCGGTTGATACTTTGT	178.2	6134	29.05119	0.14525595	8.6055	41.395
101.	YIL094C A	TATCTTGGGCAGCTTCGTTG	141.9	6125	23.16735	0.115836735	10.791	39.209
102.	YIL094C S	TCCAACGTCACCTAACCAACC	237.6	6264.2	37.92982	0.189649117	6.5911	43.409
103.	YIL116W A	TTCAGAGGCTAGGGAGGAAA	105.6	6248	16.90141	0.084507042	14.792	35.208
104.	YIL116W S	GATCATGTGACTACGATCCGG	270.6	6441.2	42.01081	0.210054027	5.9508	44.049
105.	YIR034C A	GTTGTGAGGGTTGGTAGTGTCTG	125.4	7202.6	17.41038	0.087051898	14.359	35.641
106.	YIR034C S	GCATTGTTTCCTTGGTTGGC	214.5	6116	35.07194	0.175359712	7.1282	42.872
107.	YJL079C A	TTCGCCTTCGTAGTTTCCTG	204.6	6038	33.88539	0.169426963	7.3778	42.622
108.	YJL079C S	GGATCGCATACCCATTACCT	231	6035	38.27672	0.191383596	6.5314	43.469
109.	YJL088W A	GGATCAGCCACAGAGACAAGTTC	115.5	7061.6	16.35607	0.081780333	15.285	34.715
110.	YJL088W S	CGACCTTCTAACATTACGCTCC	231	6589.4	35.0563	0.175281513	7.1314	42.869
111.	YJR016C A	CGTTCTGCCAAAGTGTCACC	145.2	6050	24	0.12	10.417	39.583
112.	YJR016C S	ATCAAGCGGGTAGGTTAGGTTG	247.5	6862.4	36.0661	0.180330497	6.9317	43.068
113.	YJR025C A	GAGGGCGTGCGTAGTTTAAC	141.9	6206	22.86497	0.114324847	10.934	39.066
114.	YJR025C S	GTCACTGACACCTGTACTCCTGA	211.2	6956.6	30.35966	0.151798292	8.2346	41.765
115.	YJR109C A	GGCTCAAAGTTAGCCACTGTAG	231	6754.4	34.19993	0.170999645	7.31	42.69
116.	YJR109C S	TGACTCATCCACCACTGTCTTC	257.4	6580.4	39.11616	0.195580816	6.3912	43.609
117.	YJR137C A	TTCTTCACGCTGGGCTTCTT	211.2	6038	34.97847	0.174892348	7.1473	42.853
118.	YJR137C S	CACACAGAGGCAGGAATGGT	66	6194	10.65547	0.053277365	23.462	26.538
119.	YKL029C A	GCACCGTAAATAAGCACTCTGG	108.9	6724.4	16.19475	0.080973767	15.437	34.563
120.	YKL029C S	GCTAACATCGCATCGCATCA	102.3	6044	16.92588	0.084629385	14.77	35.23
121.	YKL106W A	CCGTATCCTGGTGGAGAAGAA	49.5	6489.2	7.628059	0.038140295	32.774	17.226
122.	YKL106W S	GCCTTGCGTAATCAAAGTCC	66	6074	10.86599	0.054329931	23.008	26.992
123.	YKL211C A	CCTCTTTGGAGTTCACCTCAAC	99	6619.4	14.95604	0.074780192	16.716	33.284
124.	YKL211C S	ACTATCTCTTCTGGACCTCACCG	89.1	6908.6	12.89697	0.064484845	19.384	30.616
125.	YKR072C A	CATCTTGGTCGGTCCATAGTTG	105.6	6727.4	15.697	0.078485002	15.927	34.073
126.	YKR072C S	CTGGGTTAATGCCATGATCG	108.9	6143	17.72749	0.088637474	14.102	35.898
127.	YKR076W A	CCACAGTGAAGAACTCACCCAA	95.7	6664.4	14.35988	0.071799412	17.41	32.59
128.	YKR076W S	CTCGTCAATGGACATTTGCG	59.4	6104	9.731324	0.048656619	25.69	24.31
129.	YKR080W A	GGACACCAGTGATGACCACAT	75.9	6420.2	11.82206	0.059110308	21.147	28.853
130.	YKR080W S	AAATGAAAGCCCTGCGACTC	72.6	6092	11.91727	0.059586343	20.978	29.022
131.	YLR027C A	TGCGTGGGTTTCTTCAAGTC	82.5	6125	13.46939	0.067346939	18.561	31.439
132.	YLR027C S	ACCGAGTGAGTCAGCGTGAT	214.5	6176	34.73122	0.173656088	7.1981	42.802
133.	YLR089C A	GGAATCAAGACACCCGTTTC	75.9	6083	12.4774	0.06238698	20.036	29.964
134.	YLR089C S	CTCCTCTATCACTGCCACTCAT	141.9	6541.4	21.6926	0.10846302	11.525	38.475

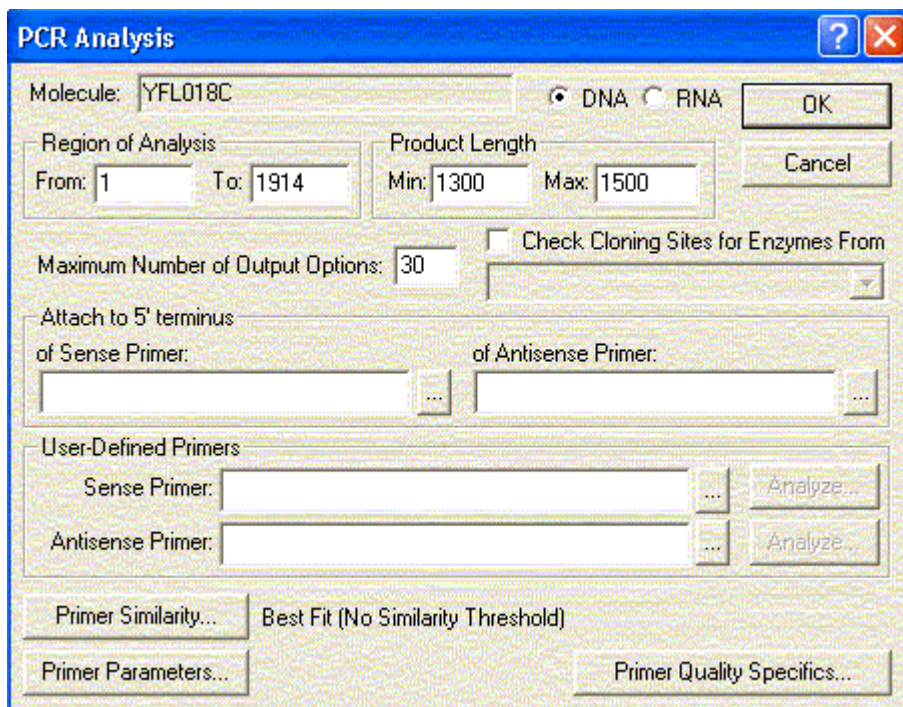
135.	YLR121C A	AGTAAAGTCGGATAGAGGAGCG	66	6889.4	9.579934	0.047899672	26.096	23.904
136.	YLR121C S	CCTTATGACGGAATGGCAGA	59.4	6161	9.641292	0.04820646	25.93	24.07
137.	YLR355C A	CAGTCCAAAGCACCTCTTCTG	125.4	6324.2	19.82859	0.099142975	12.608	37.392
138.	YLR355C S	TACGGCAGTTCGCTGTCACT	105.6	6080	17.36842	0.086842105	14.394	35.606
139.	YLR390W A	AGGTGTAGGTGGTGTAGGTGGT	155.1	6946.4	22.32811	0.111640562	11.197	38.803
140.	YLR390W S	GAATGAGGTCTTCCGAATGG	82.5	6191	13.3258	0.066628978	18.761	31.239
141.	YLR451W A	ATTTAGTCCTACCCGAAGCG	92.4	6074	15.21238	0.076061903	16.434	33.566
142.	YLR451W S	TGAACTGTCTCTGTGCTCCG	125.4	6071	20.65558	0.103277878	12.103	37.897
143.	YMR019W A	GTTGACCACTGTCGGGTTTG	92.4	6149	15.02683	0.075134168	16.637	33.363
144.	YMR019W S	CGCCTACATGAATAAGGGTGAC	82.5	6763.4	12.19801	0.060990035	20.495	29.505
145.	YMR108W A	CAGGTATTTGAGCACGGTCAC	92.4	6441.2	14.34515	0.071725765	17.427	32.573
146.	YMR108W S	GTATCATTGTCTGTGTCAGTCGGC	148.5	6727.4	22.07391	0.110369534	11.326	38.674
147.	YMR168C A	GCTCCCTCCTTATAGCATCCA	132	6276.2	21.03183	0.105159173	11.887	38.113
148.	YMR168C S	TAGAGAATCAGGCGACACCG	49.5	6155	8.042242	0.04021121	31.086	18.914
149.	YMR189W A	GGACCGTGATAAACACAGTAGC	59.4	6772.4	8.770894	0.043854468	28.503	21.497
150.	YMR189W S	CGTTACCCGACATCTCTGACT	188.1	6315.2	29.78528	0.1489264	8.3934	41.607
151.	YMR300C A	GGGACGGAATAACAACATC	82.5	6179	13.35168	0.066758375	18.724	31.276
152.	YMR300C S	CCAGCAAGAACTATGAACGC	82.5	6101	13.52237	0.067611867	18.488	31.512
153.	YNL004W A	CGAGTGCTTTCTTTCTTCTTG	89.1	6038	14.75654	0.07378271	16.942	33.058
154.	YNL004W S	ACACCCAGTCATAACAGCCA	132	6023	21.91599	0.109579944	11.407	38.593
155.	YNL220W A	CCAAGTCTAACCAACCGCAAC	125.4	6312.2	19.86629	0.099331453	12.584	37.416
156.	YNL220W S	TTCGCTCTCGTGACCAAATC	99	6026	16.42881	0.082144042	15.217	34.783
157.	YNL221C A	GGTATCACCGCCCAACCTAT	115.5	6020	19.18605	0.095930233	13.03	36.97
158.	YNL221C S	CCCCTACCTTATCCAACGAA	174.9	5966	29.31612	0.146580624	8.5277	41.472
159.	YNR050C A	CCTGGGTAGATGAAGTAAGGCT	66	6832.4	9.659856	0.04829928	25.88	24.12
160.	YNR050C S	GGGATTCGTTTACCATAGGC	105.6	6143	17.1903	0.08595149	14.543	35.457
161.	YOL051W A	GACAGGTTCCGTCATCGTACTA	82.5	6706.4	12.30168	0.06150841	20.322	29.678
162.	YOL051W S	GGTCCCAAGAGCAATCCTAA	115.5	6092	18.95929	0.094796454	13.186	36.814
163.	YOL058W A	CCATAGAGGATTCTGTGCGATC	92.4	6745.4	13.69822	0.06849112	18.251	31.749
164.	YOL058W S	GACGGCTCTCCAGTCATTTATG	95.7	6697.4	14.28913	0.071445636	17.496	32.504
165.	YOL064C A	CTAGCGTTCTACCGTTACCGAA	99	6667.4	14.84837	0.074241833	16.837	33.163
166.	YOL064C S	AGAGGCTCCTTGAGGGCATT	82.5	6167	13.37766	0.066888276	18.688	31.312
167.	YOL140W A	GCTTCGTCTGCTATGGTATCC	115.5	6375.2	18.11708	0.090585393	13.799	36.201
168.	YOL140W S	ACATATCATTGGAGGCGGTG	108.9	6191	17.59005	0.08795025	14.213	35.787
169.	YOR130C A	CGTTTGCTGGTACTGCCCTAA	128.7	6384.2	20.15914	0.100795714	12.401	37.599
170.	YOR130C S	AGGTGCTGTTGCTGCTGGAT	158.4	6188	25.59793	0.127989657	9.7664	40.234
171.	YOR184W A	CCACCAACTGAACGATGTCC	115.5	6029	19.15741	0.095787029	13.05	36.95
172.	YOR184W S	GGGTCCACAATATGTACGGATG	145.2	6793.4	21.37369	0.106868431	11.697	38.303
173.	YOR202W A	TTGAACGCACTCTCACTACGG	115.5	6363.2	18.15124	0.090756223	13.773	36.227
174.	YOR202W S	TAGGAGTCACTGCCAGGTATCG	105.6	6769.4	15.59961	0.07799805	16.026	33.974
175.	YOR204W A	CCAATAAAGTAGCGGCACCAG	99	6429.2	15.39849	0.076992472	16.235	33.765
176.	YOR204W S	GTGTCATTCTGAACGAGGCG	125.4	6167	20.33404	0.10167018	12.295	37.705
177.	YOR303W A	GCCAGAGCCAAGAGTTGATG	72.6	6185	11.73808	0.05869038	21.298	28.702
178.	YOR303W S	GCCGTCGTGTATGATGTAATCC	112.2	6736.4	16.65578	0.083278903	15.01	34.99
179.	YOR323C A	CGGGCGTGAATCTTAGAGGTAG	178.2	6847.4	26.02448	0.130122382	9.6063	40.394
180.	YOR323C S	GTGGCGTTGGGTCAATGAGT	115.5	6236	18.52149	0.092607441	13.498	36.502

181.	YPL092W A	CGACAGGATTGAAACGACAG	82.5	6179	13.35168	0.066758375	18.724	31.276
182.	YPL092W S	CTCCCACGAGGTTGACAAAT	132	6083	21.69982	0.108499096	11.521	38.479
183.	YPL177C A	GGGCATGAGCAAATCTCTTG	92.4	6152	15.01951	0.075097529	16.645	33.355
184.	YPL177C S	GTGGGAACGGGTCATTTCTG	151.8	6197	24.49572	0.122478619	10.206	39.794
185.	YPR004C A	CCAGTCTGACCGATTTGTAGAG	99	6745.4	14.67667	0.073383343	17.034	32.966
186.	YPR004C S	CCCTTGACTCTTTCGTTCT	217.8	5999	36.30605	0.181530255	6.8859	43.114
187.	YPR058W A	CAACCCAATAACCTCATCGC	168.3	5975	28.16736	0.14083682	8.8755	41.124
188.	YPR058W S	AAGGAAGGCATTATCGTCGG	112.2	6200	18.09677	0.090483871	13.815	36.185
189.	YDL182W A	ATCAATCTGGCACACCTTC	99	6152	16.09233	0.080461638	15.535	34.465
190.	YDL182W S	TTGTAGGAAGTGATCCGCAC	168.3	5996	28.06871	0.140343562	8.9067	41.093
191	YMR095 S	TCCATAGCTCTCAGCGTCCT	211.2	6002	35.18827	175.9413529	7.1046	42.895
192	YMR095C A	CATCCTTTCATTCACTGGC	326.7	5978	54.65038	273.2519237	4.5745	45.425
193	YMR062C S	AGTAAAACACAGGGCTCTGGC	283.8	6763	41.96363	209.818128	5.9575	44.042
194	YMR062C A	GGCACACCATTAGCGACAAG	115.5	6116	18.88489	94.42446043	13.238	36.762
195	YGL009C S	GCCTCCGCGAAATACCTTTA	221.1	6035	36.63629	183.1814416	6.8238	43.176
196	YGL009C A	CGGCCATTGGTACAAGATCC	148.5	6098	24.35225	121.7612332	10.266	39.734
197	YDR283C S	TGTTGGAAAGCCTCGTTGTC	171.6	6134	27.97522	139.8761004	8.9365	41.064
198	YDR283C A	CGGTTATGGTATCTCCAGGAGT	293.7	6775	43.35055	216.7527675	5.7669	44.233

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Επιλογή των υποκινητών με την χρήση του προγράμματος Vector NTI Suite 6

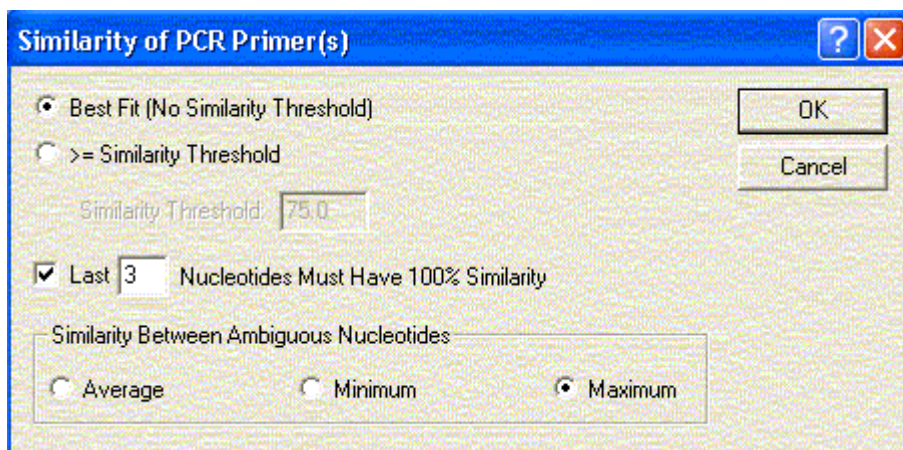
Η επιλογή των υποκινητών έγινε με την χρήση του προγράμματος Vector NTI Suite 6. Στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζονται οι ρυθμίσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή αυτή.



Εικόνα 1

Η παραπάνω εικόνα αποτελεί το πρώτο παράθυρο διαλόγου που εμφανίζεται κατά την διαδικασία της επιλογής. Ανάλογα με το μέγεθος του γονιδίου καθορίζουμε το μήκος του προϊόντος του PCR (Product Length).

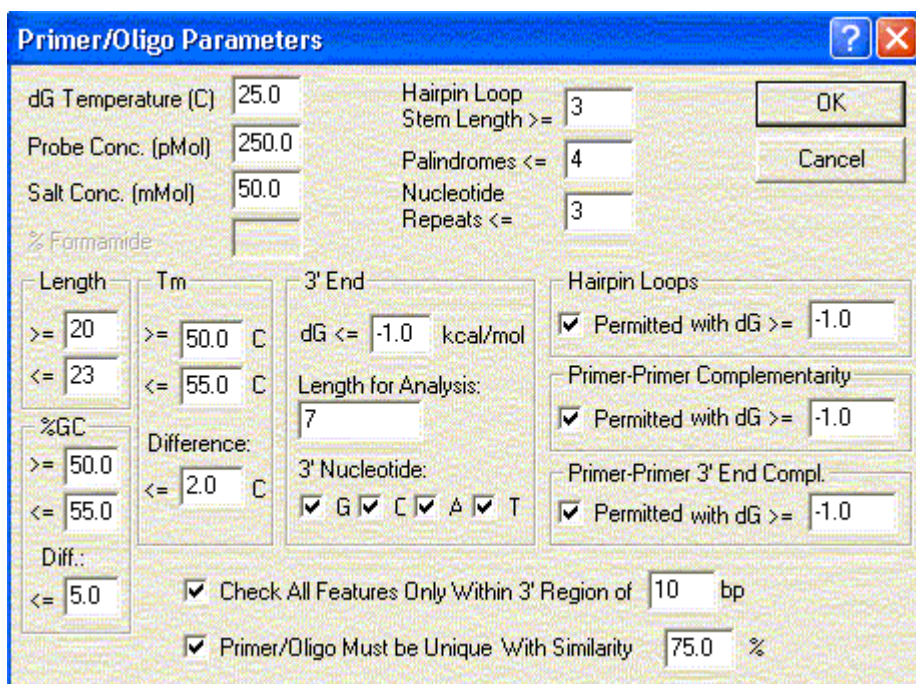
Ακολουθούν οι ρυθμίσεις που αφορούν την ομοιότητα των υποκινητών



Εικόνα 2

Γίνεται φανερό επιλέχθηκαν τα αυστηρότερα κριτήρια μια και ζητάμε 100% ομοιότητα μεταξύ τις αλληλουχίας των υποκινητές και αυτής του DNA.

Επιστρέφοντας στην εικόνα 1 και από αυτό το παράθυρο διαλόγου επιλέγουμε το Primer Parameters.



Εικόνα 3

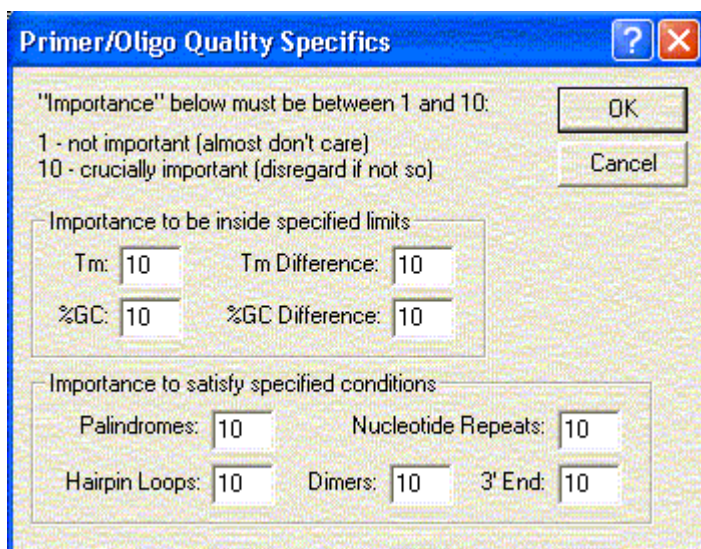
Αυτό που αξίζει να αναφερθεί είναι ότι στις επιλογές Hairpin Loop Stem Length, Palindromes και Nucleotide Repeats τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επίσης τα αυστηρότερα δυνατά. (Το πρόγραμμα επιλέγει αρχικά να παρουσιάσει όλους τους

υποκινητές που έχουν χαρακτηριστικά ίσα με την αριθμητική τιμή στην περίπτωση του Hairpin Loop Stem Length και τιμές μικρότερες από το 4 και 3 για τις περιπτώσεις των Palindromes και Nucleotide Repeats αντίστοιχα. Για παράδειγμα αν η αλληλουχία του υποκινητή εμφανίζει παλίνδρομο με μήκος μεγαλύτερο από το 4 νουκλεοτίδια, τότε ο υποκινητής αυτός απορρίπτεται από το ίδιο το πρόγραμμα. Με το ίδιο σκεπτικό, αν ο υποκινητής σχηματίζει λούπια, τότε καλύτερος θεωρείται ο υποκινητής ο οποίος σχηματίζει λούπια 3 νουκλεοτιδίων κ.ο.κ.)

Ένα επίσης σημαντικό σημείο στην επιλογή των υποκινητών, εκτός από τα προφανή όπως είναι το μήκος του υποκινητή και το Tm που φαίνονται και στην εικόνα 3, είναι και η 100% σύσταση του υποκινητή σε GC η οποία ζητείται να είναι 50 – 55%. Αυτό γίνεται για να μειωθεί η πιθανότητα ο υποκινητής να εμφανίζει ομολογία με περιοχές στο γένωμα πλούσιες σε GC.

Τέλος οι επιλογές για τα dG τόσο για τις Hairpin Loop, Primer-Primer Complementarity όσο και για Primer-Primer 3' End Complementarity ήταν -1. Αυτό σημαίνει ότι ζητάμε από το πρόγραμμα να μας βρει υποκινητές οι οποίοι για να φτιάξουν για παράδειγμα διμερή χρειάζονται ενέργεια από το σύστημα ή αν γίνεται ο σχηματισμός του διμερούς αυτόματα η ενέργεια αυτή να είναι πολύ μικρή. (dG η ελεύθερη ενέργεια).

Παρακάτω φαίνεται και η τελευταία επιλογή από το παράθυρο διαλόγου της εικόνας 1: Primer Quality Specifics



Εικόνα 4

Από εδώ θέτουμε στο πρόγραμμα ότι όλα τα κριτήρια που έχουμε θέση στα 2 προηγούμενα πλαίσια διαλόγου είναι ισοβαρή στην επιλογή των υποκινητών και εξαιρετικά σημαντικά.

Αν το πρόγραμμα δεν μας δώσει κανένα υποκινητή που να πληρεί τις παραπάνω προϋποθέσεις για ένα συγκεκριμένο γονίδιο, τότε χαλαρώνουμε τα κριτήρια ξεκινώντας από τα μεγέθη των Palindromes, Hairpin Loop Stem Length και Nucleotide Repeats. Αν

και πάλι δεν περνούμε κανένα αποτέλεσμα, τότε αυξάνουμε σε απόλυτη τιμή τις αρνητικές ενέργειες (π.χ. το -1 γίνεται -5). Τέλος αν και πάλι δεν έχουμε αποτέλεσμα στο πλαίσιο διαλόγου της εικόνας 4 θέτουμε ότι τα κριτήρια σημαντικότητας είναι 9 (με μέγιστο το 10).

Ως τελευταία εναλλακτική λύση έχουμε την επιστροφή στην αλληλουχία των γονίδιων και την προσθήκη στο 5' άκρο της αλληλουχίας 100 ακόμα νουκλεοτιδίων και επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

Προγραμματισμός του Beckman Biomek2000 liquid-handling robot

02/24/03 12:46:00 Method "384 to 96x5test" begins: Biomek S/N
02/24/03 12:46:02 Light turned on
02/24/03 12:46:14 Vacuum turned on
02/24/03 12:46:15 Reset tip rack at location A2
02/24/03 12:46:15 Pipette 7.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
From 384-well square at B2 By Column Range B12-B12
Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3
To 96-well v-bottom at B3 By Column Range G3-G3
Dispense Height 10.00%, Rate 5
Change Tips Always
02/24/03 12:46:26 Attaching tip 1 of rack at A2
02/24/03 12:46:39 From B12 to G3
02/24/03 12:46:43 Pipette 7.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
From 384-well square at B2 By Column <Local> Pattern
Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3
To 96-well v-bottom at B3 By Column <Local> Pattern
Dispense Height 10.00%, Rate 5
Change Tips Always
02/24/03 12:46:44 Attaching tip 2 of rack at A2
02/24/03 12:46:55 From A12 to A5
02/24/03 12:46:58 Attaching tip 3 of rack at A2
02/24/03 12:47:10 From C12 to C5
02/24/03 12:47:13 Attaching tip 4 of rack at A2
02/24/03 12:47:25 From D12 to E5
02/24/03 12:47:28 Attaching tip 5 of rack at A2
02/24/03 12:47:40 From E12 to G5
02/24/03 12:47:43 Attaching tip 6 of rack at A2
02/24/03 12:47:55 From F12 to C7
02/24/03 12:47:58 Attaching tip 7 of rack at A2
02/24/03 12:48:09 From G12 to E7
02/24/03 12:48:13 Attaching tip 8 of rack at A2
02/24/03 12:48:24 From L12 to G7
02/24/03 12:48:27 Attaching tip 9 of rack at A2
02/24/03 12:48:39 From M12 to A9
02/24/03 12:48:43 Attaching tip 10 of rack at A2
02/24/03 12:48:54 From N12 to C9
02/24/03 12:48:58 Attaching tip 11 of rack at A2
02/24/03 12:49:09 From O12 to G9
02/24/03 12:49:13 Attaching tip 12 of rack at A2
02/24/03 12:49:24 From P12 to A11
02/24/03 12:49:28 Attaching tip 13 of rack at A2
02/24/03 12:49:39 From A13 to C11
02/24/03 12:49:43 Attaching tip 14 of rack at A2
02/24/03 12:49:54 From B13 to E11

02/24/03 12:49:58 Attaching tip 15 of rack at A2
 02/24/03 12:50:09 From G13 to G11
 02/24/03 12:50:13 Pipette 7.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
 From 384-well square at B2 By Column Range B12-B12
 Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3
 To 96-well v-bottom at B3 By Column Range F3-F3
 Dispense Height 10.00%, Rate 10
 Change Tips Always
 02/24/03 12:50:14 Attaching tip 16 of rack at A2
 02/24/03 12:50:25 From B12 to F3
 02/24/03 12:50:28 Pipette 7.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
 From 384-well square at B2 By Column <Local> Pattern
 Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3
 To 96-well v-bottom at B3 By Column <Local> Pattern
 Dispense Height 10.00%, Rate 7
 Change Tips Always
 02/24/03 12:50:29 Attaching tip 17 of rack at A2
 02/24/03 12:50:41 From A12 to H3
 02/24/03 12:50:44 Attaching tip 18 of rack at A2
 02/24/03 12:50:55 From C12 to B5
 02/24/03 12:50:58 Attaching tip 19 of rack at A2
 02/24/03 12:51:09 From D12 to D5
 02/24/03 12:51:13 Attaching tip 20 of rack at A2
 02/24/03 12:51:24 From E12 to F5
 02/24/03 12:51:27 Attaching tip 21 of rack at A2
 02/24/03 12:51:38 From F12 to B7
 02/24/03 12:51:41 Attaching tip 22 of rack at A2
 02/24/03 12:51:53 From G12 to D7
 02/24/03 12:51:56 Attaching tip 23 of rack at A2
 02/24/03 12:52:07 From L12 to F7
 02/24/03 12:52:10 Attaching tip 24 of rack at A2
 02/24/03 12:52:21 From M12 to H7
 02/24/03 12:52:25 Attaching tip 25 of rack at A2
 02/24/03 12:52:36 From N12 to B9
 02/24/03 12:52:39 Attaching tip 26 of rack at A2
 02/24/03 12:52:51 From O12 to F9
 02/24/03 12:52:54 Attaching tip 27 of rack at A2
 02/24/03 12:53:05 From P12 to H9
 02/24/03 12:53:09 Attaching tip 28 of rack at A2
 02/24/03 12:53:20 From A13 to B11
 02/24/03 12:53:23 Attaching tip 29 of rack at A2
 02/24/03 12:53:34 From B13 to D11
 02/24/03 12:53:38 Attaching tip 30 of rack at A2
 02/24/03 12:53:49 From G13 to F11
 02/24/03 12:53:52 Pause system until cancelled
 02/24/03 12:54:27 Pipette 7.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
 From 384-well square at B2 By Column Range K2-K2
 Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3
 To 96-well v-bottom at B4 By Column Range A3-A3
 Dispense Height 10.00%, Rate 5

Change Tips Always

02/24/03 12:54:28 Attaching tip 31 of rack at A2
02/24/03 12:54:40 From K2 to A3
02/24/03 12:54:44 Pipette 7.00 µl, To Contain, by P200L Tool, P250 Tips
From 384-well square at B2 By Column <Local> Pattern
Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 10
To 96-well v-bottom at B4 By Column <Local> Pattern
Dispense Height 10.00%, Rate 5

Change Tips Always

02/24/03 12:54:44 Attaching tip 32 of rack at A2
02/24/03 12:54:53 From H13 to C1
02/24/03 12:54:56 Attaching tip 33 of rack at A2
02/24/03 12:55:05 From I13 to E1
02/24/03 12:55:08 Attaching tip 34 of rack at A2
02/24/03 12:55:16 From J13 to G1
02/24/03 12:55:20 Attaching tip 35 of rack at A2
02/24/03 12:55:29 From L13 to C3
02/24/03 12:55:32 Attaching tip 36 of rack at A2
02/24/03 12:55:40 From M13 to G3
02/24/03 12:55:44 Attaching tip 37 of rack at A2
02/24/03 12:55:52 From B14 to A5
02/24/03 12:55:56 Attaching tip 38 of rack at A2
02/24/03 12:56:04 From C14 to C5
02/24/03 12:56:08 Attaching tip 39 of rack at A2
02/24/03 12:56:16 From D14 to E5
02/24/03 12:56:20 Attaching tip 40 of rack at A2
02/24/03 12:56:28 From E14 to G5
02/24/03 12:56:31 Attaching tip 41 of rack at A2
02/24/03 12:56:40 From F14 to C7
02/24/03 12:56:44 Attaching tip 42 of rack at A2
02/24/03 12:56:52 From G14 to E7
02/24/03 12:56:56 Attaching tip 43 of rack at A2
02/24/03 12:57:04 From H14 to G7
02/24/03 12:57:08 Attaching tip 44 of rack at A2
02/24/03 12:57:16 From M14 to A9
02/24/03 12:57:20 Attaching tip 45 of rack at A2
02/24/03 12:57:28 From N14 to C9
02/24/03 12:57:32 Attaching tip 46 of rack at A2
02/24/03 12:57:40 From O14 to G9
02/24/03 12:57:44 Attaching tip 47 of rack at A2
02/24/03 12:57:53 From P14 to A11
02/24/03 12:57:56 Attaching tip 48 of rack at A2
02/24/03 12:58:05 From A15 to C11
02/24/03 12:58:08 Attaching tip 49 of rack at A2
02/24/03 12:58:17 From B15 to E11
02/24/03 12:58:20 Attaching tip 50 of rack at A2
02/24/03 12:58:29 From C15 to G11
02/24/03 12:58:33 Pipette 7.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
From 384-well square at B2 By Column Range K2-K2
Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3

To 96-well v-bottom at B4 By Column Range H1-H1
 Dispense Height 10.00%, Rate 5
 Change Tips Always
 02/24/03 12:58:33 Attaching tip 51 of rack at A2
 02/24/03 12:58:45 From K2 to H1
 02/24/03 12:58:49 Pipette 9.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
 From 384-well square at B2 By Column <Local> Pattern
 Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3
 To 96-well v-bottom at B4 By Column <Local> Pattern
 Dispense Height 10.00%, Rate 10
 Change Tips Always
 02/24/03 12:58:50 Attaching tip 52 of rack at A2
 02/24/03 12:59:01 From H13 to B1
 02/24/03 12:59:05 Attaching tip 53 of rack at A2
 02/24/03 12:59:16 From I13 to D1
 02/24/03 12:59:20 Attaching tip 54 of rack at A2
 02/24/03 12:59:31 From J13 to F1
 02/24/03 12:59:35 Attaching tip 55 of rack at A2
 02/24/03 12:59:46 From L13 to B3
 02/24/03 12:59:50 Attaching tip 56 of rack at A2
 02/24/03 13:00:01 From M13 to F3
 02/24/03 13:00:05 Attaching tip 57 of rack at A2
 02/24/03 13:00:17 From B14 to H3
 02/24/03 13:00:20 Attaching tip 58 of rack at A2
 02/24/03 13:00:32 From C14 to B5
 02/24/03 13:00:35 Attaching tip 59 of rack at A2
 02/24/03 13:00:47 From D14 to D5
 02/24/03 13:00:50 Attaching tip 60 of rack at A2
 02/24/03 13:01:02 From E14 to F5
 02/24/03 13:01:05 Attaching tip 61 of rack at A2
 02/24/03 13:01:17 From F14 to B7
 02/24/03 13:01:20 Attaching tip 62 of rack at A2
 02/24/03 13:01:32 From G14 to D7
 02/24/03 13:01:35 Attaching tip 63 of rack at A2
 02/24/03 13:01:47 From H14 to F7
 02/24/03 13:01:50 Attaching tip 64 of rack at A2
 02/24/03 13:02:02 From M14 to H7
 02/24/03 13:02:06 Attaching tip 65 of rack at A2
 02/24/03 13:02:18 From N14 to B9
 02/24/03 13:02:21 Attaching tip 66 of rack at A2
 02/24/03 13:02:33 From O14 to F9
 02/24/03 13:02:36 Attaching tip 67 of rack at A2
 02/24/03 13:02:48 From P14 to H9
 02/24/03 13:02:52 Attaching tip 68 of rack at A2
 02/24/03 13:03:04 From A15 to B11
 02/24/03 13:03:07 Attaching tip 69 of rack at A2
 02/24/03 13:03:19 From B15 to D11
 02/24/03 13:03:22 Attaching tip 70 of rack at A2
 02/24/03 13:03:34 From C15 to F11
 02/24/03 13:03:38 Pause system until cancelled

02/24/03 13:05:33 Pipette 7.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
 From 384-well square at B2 By Column <Local> Pattern
 Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3
 To 96-well v-bottom at B5 By Column <Local> Pattern
 Dispense Height 10.00%, Rate 5
 Change Tips Always

02/24/03 13:05:34 Attaching tip 1 of rack at A3
 02/24/03 13:05:46 From H15 to C1
 02/24/03 13:05:50 Attaching tip 2 of rack at A3
 02/24/03 13:06:02 From I15 to E1
 02/24/03 13:06:06 Attaching tip 3 of rack at A3
 02/24/03 13:06:18 From J15 to G1
 02/24/03 13:06:22 Attaching tip 4 of rack at A3
 02/24/03 13:06:34 From K15 to A3
 02/24/03 13:06:38 Attaching tip 5 of rack at A3
 02/24/03 13:06:50 From L15 to C3
 02/24/03 13:06:53 Attaching tip 6 of rack at A3
 02/24/03 13:07:06 From M15 to G3
 02/24/03 13:07:09 Attaching tip 7 of rack at A3
 02/24/03 13:07:22 From N15 to A5
 02/24/03 13:07:25 Attaching tip 8 of rack at A3
 02/24/03 13:07:37 From D16 to E5
 02/24/03 13:07:41 Attaching tip 9 of rack at A3
 02/24/03 13:07:53 From E16 to G5
 02/24/03 13:07:57 Attaching tip 10 of rack at A3
 02/24/03 13:08:09 From F16 to C7
 02/24/03 13:08:13 Attaching tip 11 of rack at A3
 02/24/03 13:08:25 From G16 to E7
 02/24/03 13:08:29 Attaching tip 12 of rack at A3
 02/24/03 13:08:41 From H16 to G7
 02/24/03 13:08:45 Attaching tip 13 of rack at A3
 02/24/03 13:08:57 From I16 to A9
 02/24/03 13:09:01 Attaching tip 14 of rack at A3
 02/24/03 13:09:13 From N16 to C9
 02/24/03 13:09:17 Attaching tip 15 of rack at A3
 02/24/03 13:09:29 From O16 to G9
 02/24/03 13:09:33 Attaching tip 16 of rack at A3
 02/24/03 13:09:45 From P16 to A11
 02/24/03 13:09:49 Attaching tip 17 of rack at A3
 02/24/03 13:10:01 From A17 to C11
 02/24/03 13:10:05 Attaching tip 18 of rack at A3
 02/24/03 13:10:17 From B17 to E11
 02/24/03 13:10:21 Attaching tip 19 of rack at A3
 02/24/03 13:10:33 From C17 to G11
 02/24/03 13:10:37 Pipette 7.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
 From 384-well square at B2 By Column <Local> Pattern
 Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3
 To 96-well v-bottom at B5 By Column <Local> Pattern
 Dispense Height 10.00%, Rate 5
 Change Tips Always

02/24/03 13:10:38 Attaching tip 20 of rack at A3
 02/24/03 13:10:50 From H15 to B1
 02/24/03 13:10:54 Attaching tip 21 of rack at A3
 02/24/03 13:11:06 From I15 to D1
 02/24/03 13:11:10 Attaching tip 22 of rack at A3
 02/24/03 13:11:22 From J15 to F1
 02/24/03 13:11:25 Attaching tip 23 of rack at A3
 02/24/03 13:11:37 From K15 to H1
 02/24/03 13:11:41 Attaching tip 24 of rack at A3
 02/24/03 13:11:53 From L15 to B3
 02/24/03 13:11:57 Attaching tip 25 of rack at A3
 02/24/03 13:12:09 From M15 to F3
 02/24/03 13:12:12 Attaching tip 26 of rack at A3
 02/24/03 13:12:25 From N15 to H3
 02/24/03 13:12:28 Attaching tip 27 of rack at A3
 02/24/03 13:12:41 From D16 to D5
 02/24/03 13:12:44 Attaching tip 28 of rack at A3
 02/24/03 13:12:57 From E16 to F5
 02/24/03 13:13:00 Attaching tip 29 of rack at A3
 02/24/03 13:13:12 From F16 to B7
 02/24/03 13:13:16 Attaching tip 30 of rack at A3
 02/24/03 13:13:28 From G16 to D7
 02/24/03 13:13:32 Attaching tip 31 of rack at A3
 02/24/03 13:13:44 From H16 to F7
 02/24/03 13:13:48 Attaching tip 32 of rack at A3
 02/24/03 13:14:00 From I16 to H7
 02/24/03 13:14:03 Attaching tip 33 of rack at A3
 02/24/03 13:14:16 From N16 to B9
 02/24/03 13:14:20 Attaching tip 34 of rack at A3
 02/24/03 13:14:32 From O16 to F9
 02/24/03 13:14:36 Attaching tip 35 of rack at A3
 02/24/03 13:14:48 From P16 to H9
 02/24/03 13:14:52 Attaching tip 36 of rack at A3
 02/24/03 13:15:04 From A17 to B11
 02/24/03 13:15:08 Attaching tip 37 of rack at A3
 02/24/03 13:15:20 From B17 to D11
 02/24/03 13:15:24 Attaching tip 38 of rack at A3
 02/24/03 13:15:36 From C17 to F11
 02/24/03 13:15:40 Pause system until cancelled
 02/24/03 13:16:08 Pipette 7.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
 From 384-well square at B2 By Column <Local> Pattern
 Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3
 To 96-well v-bottom at B6 By Column <Local> Pattern
 Dispense Height 10.00%, Rate 5
 Change Tips Always
 02/24/03 13:16:09 Attaching tip 39 of rack at A3
 02/24/03 13:16:21 From D17 to C1
 02/24/03 13:16:25 Attaching tip 40 of rack at A3
 02/24/03 13:16:38 From J17 to G1
 02/24/03 13:16:41 Attaching tip 41 of rack at A3

02/24/03 13:16:54 From K17 to A3
 02/24/03 13:16:58 Attaching tip 42 of rack at A3
 02/24/03 13:17:10 From L17 to C3
 02/24/03 13:17:14 Attaching tip 43 of rack at A3
 02/24/03 13:17:27 From M17 to G3
 02/24/03 13:17:30 Attaching tip 44 of rack at A3
 02/24/03 13:17:43 From F18 to C7
 02/24/03 13:17:47 Attaching tip 45 of rack at A3
 02/24/03 13:17:59 From G18 to E7
 02/24/03 13:18:03 Attaching tip 46 of rack at A3
 02/24/03 13:18:16 From I18 to A9
 02/24/03 13:18:20 Attaching tip 47 of rack at A3
 02/24/03 13:18:32 From J18 to C9
 02/24/03 13:18:36 Attaching tip 48 of rack at A3
 02/24/03 13:18:49 From O18 to G9
 02/24/03 13:18:53 Attaching tip 49 of rack at A3
 02/24/03 13:19:06 From P18 to A11
 02/24/03 13:19:09 Attaching tip 50 of rack at A3
 02/24/03 13:19:22 From A19 to C11
 02/24/03 13:19:26 Attaching tip 51 of rack at A3
 02/24/03 13:19:39 From B19 to E11
 02/24/03 13:19:42 Attaching tip 52 of rack at A3
 02/24/03 13:19:55 From C19 to G11
 02/24/03 13:19:59 Pipette 7.00 μ l, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
 From 384-well square at B2 By Column <Local> Pattern
 Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3
 To 96-well v-bottom at B6 By Column <Local> Pattern
 Dispense Height 10.00%, Rate 5
 Change Tips Always
 02/24/03 13:20:00 Attaching tip 53 of rack at A3
 02/24/03 13:20:12 From D17 to B1
 02/24/03 13:20:16 Attaching tip 54 of rack at A3
 02/24/03 13:20:29 From J17 to F1
 02/24/03 13:20:32 Attaching tip 55 of rack at A3
 02/24/03 13:20:45 From K17 to H1
 02/24/03 13:20:48 Attaching tip 56 of rack at A3
 02/24/03 13:21:01 From L17 to B3
 02/24/03 13:21:05 Attaching tip 57 of rack at A3
 02/24/03 13:21:17 From M17 to F3
 02/24/03 13:21:21 Attaching tip 58 of rack at A3
 02/24/03 13:21:34 From F18 to B7
 02/24/03 13:21:37 Attaching tip 59 of rack at A3
 02/24/03 13:21:50 From G18 to D7
 02/24/03 13:21:54 Attaching tip 60 of rack at A3
 02/24/03 13:22:06 From I18 to H7
 02/24/03 13:22:10 Attaching tip 61 of rack at A3
 02/24/03 13:22:23 From J18 to B9
 02/24/03 13:22:27 Attaching tip 62 of rack at A3
 02/24/03 13:22:39 From O18 to F9
 02/24/03 13:22:43 Attaching tip 63 of rack at A3

02/24/03 13:22:56 From P18 to H9
 02/24/03 13:23:00 Attaching tip 64 of rack at A3
 02/24/03 13:23:12 From A19 to B11
 02/24/03 13:23:16 Attaching tip 65 of rack at A3
 02/24/03 13:23:29 From B19 to D11
 02/24/03 13:23:33 Attaching tip 66 of rack at A3
 02/24/03 13:23:45 From C19 to F11
 02/24/03 13:23:49 Pipette 7.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
 From 384-well square at B2 By Column <Local> Pattern
 Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3
 To 96-well v-bottom at B6 By Column <Local> Pattern
 Dispense Height 10.00%, Rate 5
 Change Tips Always
 02/24/03 13:23:50 Attaching tip 67 of rack at A3
 02/24/03 13:24:03 From I6 to E1
 02/24/03 13:24:07 Attaching tip 68 of rack at A3
 02/24/03 13:24:19 From O6 to C5
 02/24/03 13:24:23 Attaching tip 69 of rack at A3
 02/24/03 13:24:36 From E7 to G5
 02/24/03 13:24:40 Attaching tip 70 of rack at A3
 02/24/03 13:24:52 From H7 to G7
 02/24/03 13:24:56 Pipette 7.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
 From 384-well square at B2 By Column <Local> Pattern
 Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3
 To 96-well v-bottom at B6 By Column <Local> Pattern
 Dispense Height 10.00%, Rate 5
 Change Tips Always
 02/24/03 13:24:57 Attaching tip 71 of rack at A3
 02/24/03 13:25:10 From I6 to D1
 02/24/03 13:25:13 Attaching tip 72 of rack at A3
 02/24/03 13:25:26 From O6 to B5
 02/24/03 13:25:30 Attaching tip 73 of rack at A3
 02/24/03 13:25:43 From E7 to F5
 02/24/03 13:25:47 Attaching tip 74 of rack at A3
 02/24/03 13:25:59 From H7 to F7
 02/24/03 13:26:03 Pause system until cancelled
 02/24/03 13:27:18 Pipette 9.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
 From 384-well square at B2 By Column <Local> Pattern
 Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3
 To 96-well v-bottom at A5 By Column <Local> Pattern
 Dispense Height 10.00%, Rate 10
 Change Tips Always
 02/24/03 13:27:19 Attaching tip 1 of rack at A4
 02/24/03 13:27:32 From D19 to C1
 02/24/03 13:27:35 Attaching tip 2 of rack at A4
 02/24/03 13:27:48 From J19 to G1
 02/24/03 13:27:51 Attaching tip 3 of rack at A4
 02/24/03 13:28:04 From K19 to A3
 02/24/03 13:28:07 Attaching tip 4 of rack at A4
 02/24/03 13:28:20 From L19 to C3

02/24/03 13:28:24 Attaching tip 5 of rack at A4
 02/24/03 13:28:36 From M19 to G3
 02/24/03 13:28:40 Attaching tip 6 of rack at A4
 02/24/03 13:28:52 From N19 to A5
 02/24/03 13:28:56 Attaching tip 7 of rack at A4
 02/24/03 13:29:09 From O19 to C5
 02/24/03 13:29:12 Attaching tip 8 of rack at A4
 02/24/03 13:29:25 From P19 to E5
 02/24/03 13:29:28 Attaching tip 9 of rack at A4
 02/24/03 13:29:41 From E20 to G5
 02/24/03 13:29:44 Attaching tip 10 of rack at A4
 02/24/03 13:29:57 From G20 to E7
 02/24/03 13:30:00 Attaching tip 11 of rack at A4
 02/24/03 13:30:13 From I20 to A9
 02/24/03 13:30:17 Attaching tip 12 of rack at A4
 02/24/03 13:30:30 From K20 to G9
 02/24/03 13:30:33 Attaching tip 13 of rack at A4
 02/24/03 13:30:46 From P20 to A11
 02/24/03 13:30:49 Attaching tip 14 of rack at A4
 02/24/03 13:31:02 From A21 to C11
 02/24/03 13:31:05 Attaching tip 15 of rack at A4
 02/24/03 13:31:18 From B21 to E11
 02/24/03 13:31:22 Attaching tip 16 of rack at A4
 02/24/03 13:31:34 From C21 to G11
 02/24/03 13:31:38 Pipette 9.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
 From 384-well square at B2 By Column <Local> Pattern
 Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 10
 To 96-well v-bottom at A5 By Column <Local> Pattern
 Dispense Height 10.00%, Rate 10
 Change Tips Always
 02/24/03 13:31:39 Attaching tip 17 of rack at A4
 02/24/03 13:31:49 From D19 to B1
 02/24/03 13:31:52 Attaching tip 18 of rack at A4
 02/24/03 13:32:01 From J19 to F1
 02/24/03 13:32:04 Attaching tip 19 of rack at A4
 02/24/03 13:32:14 From K19 to H1
 02/24/03 13:32:17 Attaching tip 20 of rack at A4
 02/24/03 13:32:27 From L19 to B3
 02/24/03 13:32:30 Attaching tip 21 of rack at A4
 02/24/03 13:32:40 From M19 to F3
 02/24/03 13:32:43 Attaching tip 22 of rack at A4
 02/24/03 13:32:52 From N19 to H3
 02/24/03 13:32:56 Attaching tip 23 of rack at A4
 02/24/03 13:33:05 From O19 to B5
 02/24/03 13:33:09 Attaching tip 24 of rack at A4
 02/24/03 13:33:18 From P19 to D5
 02/24/03 13:33:21 Attaching tip 25 of rack at A4
 02/24/03 13:33:31 From E20 to F5
 02/24/03 13:33:34 Attaching tip 26 of rack at A4
 02/24/03 13:33:44 From G20 to D7

02/24/03 13:33:47 Attaching tip 27 of rack at A4
 02/24/03 13:33:57 From I20 to H7
 02/24/03 13:34:00 Attaching tip 28 of rack at A4
 02/24/03 13:34:10 From K20 to F9
 02/24/03 13:34:13 Attaching tip 29 of rack at A4
 02/24/03 13:34:23 From P20 to H9
 02/24/03 13:34:26 Attaching tip 30 of rack at A4
 02/24/03 13:34:36 From A21 to B11
 02/24/03 13:34:39 Attaching tip 31 of rack at A4
 02/24/03 13:34:49 From B21 to D11
 02/24/03 13:34:52 Attaching tip 32 of rack at A4
 02/24/03 13:35:02 From C21 to F11
 02/24/03 13:35:05 Pipette 9.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
 From 384-well square at B2 By Column <Local> Pattern
 Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3
 To 96-well v-bottom at A5 By Column <Local> Pattern
 Dispense Height 10.00%, Rate 10
 Change Tips Always
 02/24/03 13:35:06 Attaching tip 33 of rack at A4
 02/24/03 13:35:19 From E8 to E1
 02/24/03 13:35:22 Attaching tip 34 of rack at A4
 02/24/03 13:35:35 From F9 to C7
 02/24/03 13:35:39 Attaching tip 35 of rack at A4
 02/24/03 13:35:52 From H9 to G7
 02/24/03 13:35:55 Attaching tip 36 of rack at A4
 02/24/03 13:36:08 From J9 to C9
 02/24/03 13:36:12 Pipette 9.00 µl, To Contain with Blowout, by P200L Tool, P250 Tips
 From 384-well square at B2 By Column <Local> Pattern
 Aspirate Height Fixed at 0.00%, Rate 3
 To 96-well v-bottom at A5 By Column <Local> Pattern
 Dispense Height 10.00%, Rate 10
 Change Tips Always
 02/24/03 13:36:12 Attaching tip 37 of rack at A4
 02/24/03 13:36:25 From E8 to D1
 02/24/03 13:36:28 Attaching tip 38 of rack at A4
 02/24/03 13:36:42 From F9 to B7
 02/24/03 13:36:45 Attaching tip 39 of rack at A4
 02/24/03 13:36:58 From H9 to F7
 02/24/03 13:37:01 Attaching tip 40 of rack at A4
 02/24/03 13:37:14 From J9 to B9
 02/24/03 13:37:38 Light turned off
 02/24/03 13:37:40 Vacuum turned on
 02/24/03 13:37:40 4250 Moves, 21 Corrections, 0 X, 21 Y
 02/24/03 13:37:40 Method "384 to 96x5test" ends

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

Πρόγραμμα για στατιστική ανάλυση και κανονικοποίηση σε Matlab

```
%filename = {'up5.txt "down3.txt'};
% it measures ratio of up5/down3. that's the way you have to set your txt
% files. they contain A flags,B mean intensities, C median intensities

% loads the first txt file.
up5 = load('down3.txt');

% measures median background corrected mean and median intensities
up5_mean_bck_corr = up5(:,2) - up5(:,4);
up5_median_bck_corr = up5(:,3) - up5(:,4);

%load('d3_correct.mat');
down3 = load('down5.txt');
%down3 = d3_corrected;
down3_mean_bck_corr = down3(:,2) - down3(:,4);
down3_median_bck_corr = down3(:,3) - down3(:,4);

%Diff_spots_average;
Same_spot_average;
%ratio;

%Enwnei ta flags apo ta 2 txt se 840*2
flags_up5_down3 = horzcat(up5(:,1),down3(:,1));

%horizontai oi katalogoi
in = 1;
in2 = 4;
merged_flags = [];
ave_log_ratio_mean = [];
ave_log_ratio_median = [];
me_up5 = [];
med_up5 = [];
me_d3 = [];
med_d3 = [];

%enwnei ta flags ths 4adas(4*2) tou enos sublock(subl1_flags) me tou diplanou(
subl2_flags) sublock pou periexei to idio gonidio sto merged_flags(8*2)
for index = 1:105
    subl1_flags = flags_up5_down3(in:in2,1:2);
    %subl1_flag_2_down3 = flags_up5_down3(in:in2,2);
    subl2_flags = flags_up5_down3(420+in:420+in2,1:2);
    %subl2_flag_2_down3 = flags_up5_down3(420+in:420+in2,2);
    merged_flags = vertcat(subl1_flags,subl2_flags);
```

```

%psaxnei sto merged flags gia flags=2 v, v2 kai gia flags= 3 v3, v4
[v,I] = find(merged_flags(:,1) == 2);
[v2,I2] = find(merged_flags(:,2) == 2);
[v3,I3] = find(merged_flags(:,1) == 3);
[v4,I4] = find(merged_flags(:,2) == 3);

%Count indexes or values
up5_2_index = size(v,1);
d3_2_index = size(v2,1);
up5_3_index = size(v3,1);
d3_3_index = size(v4,1);

if isempty(v)
    up5_2_index = 0;
elseif isempty(v2)
    d3_2_index = 0;
elseif isempty(v3)
    up5_3_index = 0;
elseif isempty(v4)
    d3_3_index = 0;

end

%8etoume syn8hkh pou 8ewroume to spot empty
condit_up5 = up5_2_index+up5_3_index/2;
condit_down3 = d3_2_index+d3_3_index/2;

%psaxnei gia empty spots kai sta 2 kanalia kai mas leei Nan kai to index
if condit_up5 >=6 & condit_down3 >=6
    disp('Nan');
    index
    %ave_log_ratio_mean(index) = NaN;
    %ave_log_ratio_mean
    %ave_log_ratio_median(index) = NaN;
    log_m_up5_vs_d3(index) = NaN;
    log_med_up5_vs_d3(index) = NaN;
    me_up5(index) = NaN;
    med_up5(index) = NaN;
    me_d3(index) = NaN;
    med_d3(index) = NaN;

%ftiaxnei ta merged_c1, _c2, _c3 kai _c4(8*1) me background corrected mean kai median
times gia ka8e gonidio
% apo auta ftiaxnei ta me_med_up5 kai _down3(8*2) ena gia ka8e kanali
else
    %if condit_up5 < 4 | condit_down3 < 4
% elseif condit_up5 < 4 & condit_down3 < 4
    %sum_log_ratio_mean = 0;
    %sum_log_ratio_median = 0;
    c11 = up5_mean_bck_corr(in:in2);

```



```

c21 = up5_median_bck_corr(in:in2);
c12 = up5_mean_bck_corr(420+in:420+in2);
c22 = up5_median_bck_corr(420+in:420+in2);
c31 = down3_mean_bck_corr(in:in2);
c41 = down3_median_bck_corr(in:in2);
c32 = down3_mean_bck_corr(420+in:420+in2);
c42 = down3_median_bck_corr(420+in:420+in2);
merged_c1 = vertcat(c11,c12);
merged_c2 = vertcat(c21,c22);
merged_c3 = vertcat(c31,c32);
merged_c4 = vertcat(c41,c42);
me_med_up5 = horzcat(merged_c1,merged_c2);
me_med_down3 = horzcat(merged_c3,merged_c3);

%horizontal ta indexes kai oi mhtres
count = 0;
low_count = 0;
low_count2 = 0;
up5_vs_d3_mean = [];
up5_vs_d3_median = [];
median_up5_vs_d3_mean = [];
median_up5_vs_d3_median = [];

%metraei to count gia both flags 0
for j = 1:8
    if (merged_flags(j,1) + merged_flags(j,2)) == 0
        count = count + 1;
        up5_vs_d3_mean(j) = log2(me_med_up5(j,1)/me_med_down3(j,1));
        up5_vs_d3_median(j) = log2(me_med_up5(j,2)/me_med_down3(j,2));
    end
end

%an einai apo 3 mexri 8 den exw problhma na parw mia a3iopisth timh
if count > 2
    log_m_up5_vs_d3(index) = sum(up5_vs_d3_mean)/count;
    log_med_up5_vs_d3(index) = sum(up5_vs_d3_median)/count;

%an ta double zeros einai 0,1 h 2 tote ta 3anapairnei apo thn arxh kai to count ginetai
low_count
elseif count <= 2
    for j = 1:8
%ta double zeros opws prin
        if (merged_flags(j,1) + merged_flags(j,2)) == 0
            low_count = low_count + 1;
            up5_vs_d3_mean(j) = log2(me_med_up5(j,1)/me_med_down3(j,1));
            up5_vs_d3_median(j) = log2(me_med_up5(j,2)/me_med_down3(j,2));

%ta 3aria ta petame enw ta 2aria ta metrame me to low count epeidh omws mporei na
exoun outliers apo auta ta spots pairnoume to median
            elseif (merged_flags(j,1) == 0 & merged_flags(j,2)) == 2

```

```

        low_count2 = low_count2 + 1;
        median_up5_vs_d3_mean(j) =
(log2(me_med_up5(j,1)/me_med_down3(j,1)))/2;
        median_up5_vs_d3_median(j) =
(log2(me_med_up5(j,2)/me_med_down3(j,2)))/2;
        elseif (merged_flags(j,1) == 2 & merged_flags(j,2)) == 0
            low_count2 = low_count2 + 1;
            median_up5_vs_d3_mean(j) =
(log2(me_med_up5(j,1)/me_med_down3(j,1)))/2;
            median_up5_vs_d3_median(j) =
(log2(me_med_up5(j,2)/me_med_down3(j,2)))/2;
            elseif (merged_flags(j,1) == 2 & merged_flags(j,2)) == 2
                low_count2 = low_count2 + 1;
                median_up5_vs_d3_mean(j) =
(log2(me_med_up5(j,1)/me_med_down3(j,1)))/4;
                median_up5_vs_d3_median(j) =
(log2(me_med_up5(j,2)/me_med_down3(j,2)))/4;
            end
        end

end

%an sta double zeros exei mhden to kanei empty
zeros_mean = find(median_up5_vs_d3_mean == 0);
median_up5_vs_d3_mean(zeros_mean) = [];
zeros_median = find(median_up5_vs_d3_median == 0);
median_up5_vs_d3_median(zeros_median) = [];

%o telikos ypologismos tw'n log ratio
%log_m_up5_vs_d3(index) = median(median_up5_vs_d3_median)
log_m_up5_vs_d3(index) = (sum(up5_vs_d3_mean) +
median(median_up5_vs_d3_mean)/2)/(low_count+low_count2/2);
log_med_up5_vs_d3(index) = (sum(up5_vs_d3_median) +
median(median_up5_vs_d3_median)/2)/(low_count+low_count2/2);
%if (merged_flags(j,1) == 0 & merged_flags(j,2)) == 0

%mas deixnei low count se osa ypologisthkan me auto ton tropo oi times tous
disp('low count');
index
end

% [value_up5, Index_up5] = find(merged_flags(:,1) == 0);
% [value_up52, Index_up52] = find(merged_flags(:,1) ~= 0);
% [value_d3, Index_d3] = find(merged_flags(:,2) == 0);
% [value_d32, Index_d32] = find(merged_flags(:,2) ~= 0);
% if isempty(Index_up5)
%     disp('hello');
%     me_up5(index) = median(merged_c1(value_up52));
%     med_up5(index) = median(merged_c2(value_up52));

```

```

%
% else
%     me_up5(index) = mean(merged_c1(value_up5));
%     med_up5(index) = mean(merged_c2(value_up5));
% end
%
% if isempty(Index_d3)
%     disp('emptyd3');
%     me_d3(index) = median(merged_c1(value_d32));
%     med_d3(index) = median(merged_c2(value_d32));
% %     me_d3(index) = 100;
% %     med_d3(index) = 100;
% else
% %     me_up5(index) = mean(merged_c1(value_up5));
% %     med_up5(index) = mean(merged_c2(value_up5));
%     me_d3(index) = mean(merged_c3(value_d3));
%     med_d3(index) = mean(merged_c4(value_d3));
% end

%flag_gene = flags_up5_down3(in:in2,1:2);
% for j = 1:8
%     if (flag_gene(j,1) + flag_gene(j,2)) == 0
%         count = count + 1;
%         sum_log_ratio_mean = sum_log_ratio_mean + c1(j);
%         sum_log_ratio_median = sum_log_ratio_median + c2(j);
%     end
% end
%     ave_log_ratio_mean(index) = sum_log_ratio_mean/count;
%     ave_log_ratio_median(index) = sum_log_ratio_median/count;
%     total_count(index) = count;
%     count = 0;
% [value3,Index3] = find(flag_gene == 0);

end

in = in + 4;
in2 = in2 + 4;
end

% kanei plot ta log ratios twn gonidiwn sth seira
plot(1:105,log_m_up5_vs_d3);
figure;
plot(1:105,log_med_up5_vs_d3);
results;

```

```

%ratio_2;

% epeidh yparxoun NaNs den mporoun na ginoun sorted ta log ratios
% ftiaxoume loipon ta with_out_NaN2 gia na metatrepsoume ta NaN se mhden

[Nv2,NI2] = find(isnan(log_m_up5_vs_d3));
log_m_up5_vs_d3_with_out_Nans2 = log_m_up5_vs_d3;
log_m_up5_vs_d3_with_out_Nans2(NI2) = 0;

[Nv3,NI3] = find(isnan(log_med_up5_vs_d3));
log_med_up5_vs_d3_with_out_Nans2 = log_med_up5_vs_d3;
log_med_up5_vs_d3_with_out_Nans2(NI3) = 0;

[sorted inde] = sort(log_med_up5_vs_d3_with_out_Nans2);
bar(sorted);
sorted'
inde'
ind_acc2 = 1;
Gene_accessions = textread('Gene_names.txt','%s');
As_index = find(strcmp(Gene_accessions,'A'));
Gene_accessions(As_index) = [];
% for ind_acc = 1:size(Gene_accessions,1)
%   if strcmp(Gene_accessions(ind_acc),'A')
%       Gene_accessions(ind_acc2) = [];
%       ind_acc2 = ind_acc2 + 1;
%   end
% end

Gene_accessions = Gene_accessions(inde);
Gene_accessions
% for ind_acc = 1:size(Gene_accessions,1)
%   Gene_accessions(ind_acc) = cell2mat(Gene_accessions(ind_acc));
% end

```