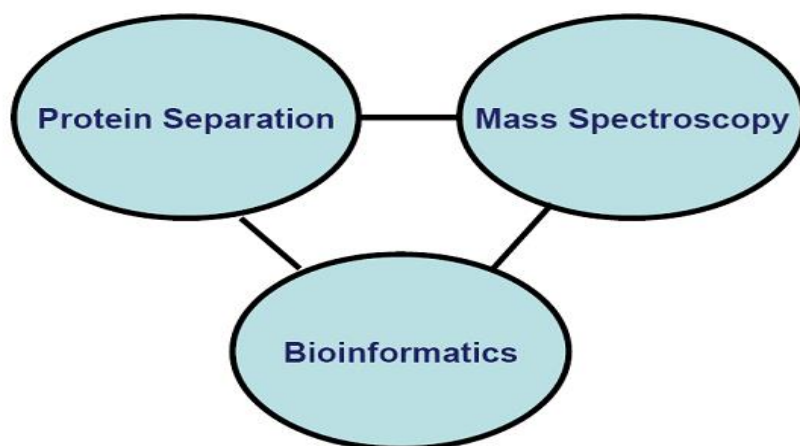




# Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τμήμα Χημείας

*Συγκριτική Πρωτεϊνωματική Ανάλυση Υποτύπων  
Λεμφώματος*



*Χατζηχαραλάμπους Μιχάλης 1808*

*Ηράκλειο, Φεβρουάριος 2018*

Επιβλέπων: *Αναπλ. Καθ. Αϊβαλιώτης Μιχάλης  
Καθ. Τσιώτης Γεώργιος*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</u> .....	- 2 -
<u>Περίληψη</u> .....	- 3 -
<u>Εισαγωγή</u> .....	- 4 -
<u>Λεμφικό Σύστημα και Λέμφωμα</u> .....	- 4 -
<u>Λέμφωμα-Hodgkin</u> .....	- 5 -
<u>Non-Hodgkin Λέμφωμα (NHL)</u> .....	- 6 -
<u>Λεμφικό πρωτείνωμα</u> .....	- 7 -
<u>Στόχος Διπλωματικής</u> .....	- 8 -
<u>Σηματοδοτικά Μονοπάτια</u> .....	- 8 -
<u>Σηματοδοτικό μονοπάτι της p53</u> .....	- 8 -
<u>Σηματοδοτικό μονοπάτι Κυτταρικού Κύκλου</u> .....	- 9 -
<u>Σηματοδοτικό μονοπάτι Απόπτωσης</u> .....	- 11 -
<u>Σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR</u> .....	- 12 -
<u>Σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3k-Akt</u> .....	- 13 -
<u>Σηματοδοτικό μονοπάτι της γλυκόλυση/γλυκονεογένεση</u> .....	- 15 -
<u>Σηματοδοτικό μονοπάτι της οξειδωτική φωσφορυλίωσης</u> .....	- 16 -
<u>Φασματομετρία Μάζας και Υγρή Χρωματογραφία</u> .....	- 18 -
<u>Πρωτεϊνωματική ανάλυση</u> .....	- 20 -
<u>Βιοπληροφορική ανάλυση</u> .....	- 22 -
<u>Πρωτόκολλα και Τεχνικές</u> .....	- 26 -
<u>Χημικά και βιοχημικά αντιδραστήρια</u> .....	- 26 -
<u>Κυτταρικές Σειρές</u> .....	- 26 -
<u>Κυτταρικές σειρές, συνθήκες ανάπτυξης και τεστ βιωσιμότητας</u> .....	- 27 -
<u>Πειραματική πορεία (συνοπτικά)</u> .....	- 28 -
<u>Προετοιμασία Δείγματος Υποβοηθούμενο από Φίλτρο (FASP)</u> .....	- 28 -
<u>Αφαλάτωση</u> .....	- 29 -
<u>Φασματομετρία μάζας</u> .....	- 30 -
<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u> .....	- 31 -
<u>Σύνολο Πρωτεϊνών</u> .....	- 31 -
<u>Σχετική ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών</u> .....	- 32 -
<u>Απόπτωση</u> .....	- 33 -
<u>Κυτταρικός Κύκλος</u> .....	- 34 -
<u>Γλυκόλυση/Γλυκονεογένεση</u> .....	- 35 -
<u>PI3K-Akt</u> .....	- 36 -
<u>Οξειδωτική Φωσφορυλίωση</u> .....	- 37 -
<u>P53</u> .....	- 38 -
<u>GO (Gene Ontology) ανάλυση</u> .....	- 39 -
<u>Απεικόνιση αναλυθέντων πρωτεϊνών</u> .....	- 43 -
<u>Σηματοδοτικά μονοπάτια</u> .....	- 44 -
<u>Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών</u> .....	- 52 -
<u>Ανάλυση-Συζήτηση αποτελεσμάτων</u> .....	- 55 -
<u>Συμπεράσματα και μελλοντικές δυνατότητες</u> .....	- 60 -
<u>Bibliography</u> .....	- 61 -

## **Περίληψη**

Το λέμφωμα είναι ένας τύπος καρκίνου που επηρεάζει τα λεμφοκύτταρα, ένα τύπο λευκών αιμοσφαιρίων . Οι κυτταρικές σειρές που αναλύθηκαν στην διπλωματική ανήκουν τόσο σε Hodgkin όσο και σε non-Hodgkin λεμφώματα. Η πρωτεωμική προσέγγιση έγινε με bottom-up μεθοδολογία και ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εντόπισαν πρωτεΐνες που ανήκουν σε γνωστά απορυθμισμένα μονοπάτια του καρκίνου. Τέλος τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω εξαγωγή συμπερασμάτων μόνο με παράλληλη επιβεβαίωση τους και με τη χρήση άλλων τεχνικών.

## Εισαγωγή

### Λεμφικό Σύστημα και Λέμφωμα

*Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος*, επίσης γνωστά ως λεμφοκύτταρα, αποτελούν το 20-40% των συνολικών λευκοκυττάρων στο ανθρώπινο σώμα και το 99% των λεμφικών κυττάρων. Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από 1 τρισεκατομμύριο ( $10^{12}$ ) λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά κυκλοφορούν διαρκώς μέσα στο αίμα και μπορούν να μεταναστεύσουν σε διαφορετικούς ιστούς και λεμφικά όργανα, ενεργώντας σαν συνδετικός κρίκος μεταξύ των κλάδων του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα λεμφοκύτταρα μπορούν να υποδιαιρεθούν σε τρεις κύριους πληθυσμούς: τα Β-κύτταρα, τα Τ-κύτταρα και τους φυσικούς δολοφόνους (NK). Αυτή η διάκριση βασίζεται στη λειτουργία τους και στα μόρια που υπάρχουν συνδεδεμένα στην επιφάνεια της μεμβράνης τους [3]. Το λέμφωμα ορίζεται ως ο καρκίνος που πλήττει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα λεμφώματα συνήθως αναπτύσσονται όταν εμφανίζεται μια αλλαγή ή μετάλλαξη μέσα σε ένα λεμφοκύτταρο, προκαλώντας το μη φυσιολογικό κύτταρο να αναπαράγεται γρηγορότερα ή να ζει περισσότερο από ένα φυσιολογικό. Όπως τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα, έτσι και τα καρκινικά λεμφοκύτταρα μπορούν να ταξιδεύουν μέσω του αίματος και του λεμφικού συστήματος, να εξαπλώνονται και να αναπτύσσονται σε πολλά μέρη του σώματος όπως των λεμφαδένων, του σπλήνα, του μυελού των οστών και άλλων οργάνων [4]. Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες λεμφώματος: το Hodgkin, το οποίο χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός τύπου κυττάρου που ονομάζεται κύτταρο Reed-Sternberg ενώ η άλλη κατηγορία είναι τα μη Hodgkin, τα οποία περιλαμβάνουν μεγάλη ποικίλα ομάδα καρκινικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Και τα δύο λεμφώματα Hodgkin και non-Hodgkin μπορούν να εμφανιστούν σε παιδιά και ενήλικες και η πρόγνωση και η θεραπεία εξαρτώνται από το στάδιο και τον τύπο του καρκίνου [5].

## Μέρη του ανοσοποιητικού συστήματος

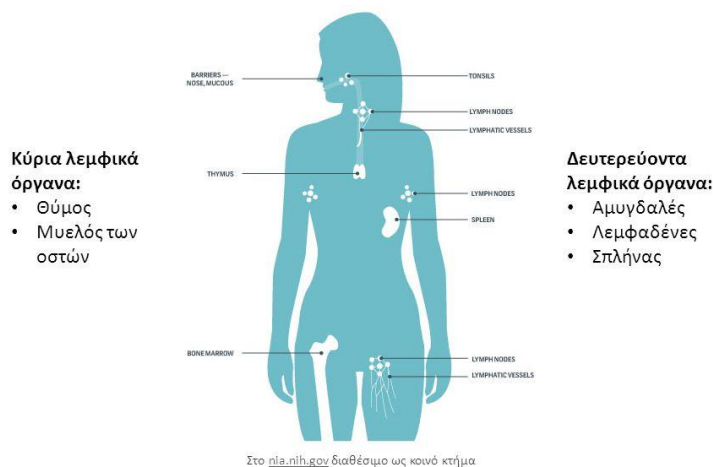


Figure 1. Λεμφικό σύστημα[6]

### Λέμφωμα-Hodgkin

Τόσο τα παιδιά όσο και οι ενήλικες μπορούν να αναπτύξουν HL, αλλά η ασθένεια είναι πιο συχνή στους νεότερους ενήλικες ηλικίας 15-35 ετών και άνω και στους μεγαλύτερους ενήλικες ηλικίας 55 ετών και άνω. HL αναπτύσσεται όταν ένα λεμφοκύτταρο (συνήθως ένας τύπος B-λεμφοκυττάρων) γίνεται ανώμαλο -καρκινικό. Αυτά τα μη φυσιολογικά κύτταρα ονομάζονται κύτταρα Reed-Sternberg (R-S), τα οποία πήραν το όνομα τους από τους 2 επιστήμονες Dorothy Reed και Carl Sternberg, οι οποίοι παρέιχαν τις πρώτες οριστικές μικροσκοπικές περιγραφές του. Οι περισσότεροι άνθρωποι με HL έχουν κύτταρα R-S, αν και μπορεί να υπάρχουν και άλλοι μη φυσιολογικοί τύποι κυττάρων. Τα κύτταρα R-S είναι τα καθοριστικά κύτταρα του HL, αν και αποτελούν μόνο ένα μικρό κλάσμα της συνολικής μάζας του όγκου και δεν διαιρούνται σαν κύτταρα. Παράγουν παράγοντες που προσελκύουν πολλά φλεγμονώδη κύτταρα που αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του συνολικού φορτίου του όγκου. Λόγω αυτής της περίπτωσης, το HL αρχικά δεν αναγνωρίστηκε ως καρκίνος αλλά θεωρήθηκε ως λοίμωξη. Οι δύο κύριοι τύποι HL είναι: Κλασσικό HL, το οποίο επηρεάζει το 95% των ασθενών που έχουν διαγνωστεί με HL στις ανεπτυγμένες χώρες και το κυρίαρχο HL των λεμφοκυττάρων των οξωδών κυττάρων. Οι λόγοι για τους οποίους οι άνθρωποι αναπτύσσουν HL δεν είναι καλά κατανοητοί. Παρ'όλα αυτά, οι επιστήμονες ανακάλυψαν ορισμένα χαρακτηριστικά που ονομάζονται παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι αν εμφανιστούν σε ένα άτομο, τους δίνει μεγάλη πιθανότητα να αναπτύξουν HL[4].

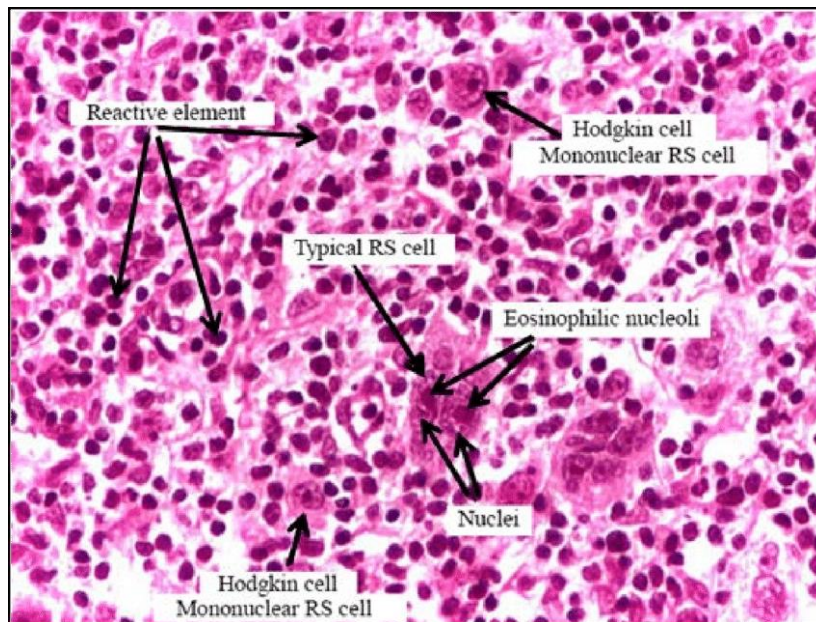


Figure 2 Reed-Sternberg κύτταρα[7]

### **Non-Hodgkin Λέμφωμα (NHL)**

Τα λεμφώματα μη-Hodgkin (NHL) είναι μια ετερογενής ομάδα λεμφοπλασματοειδών κακοηθειών με διαφορετικά πρότυπα συμπεριφοράς και αποκρίσεις στη θεραπεία[8]. Όπως το λέμφωμα Hodgkin, το NHL συνήθως προέρχεται από λεμφοειδή ιστούς και μπορεί να εξαπλωθεί σε άλλα όργανα. Το NHL, ωστόσο, είναι πολύ λιγότερο προβλέψιμο από το λέμφωμα Hodgkin και έχει πολύ μεγαλύτερη προτίμηση για διάδοση σε θέσεις εκτός των λεμφικών κόμβων. Η πρόγνωση εξαρτάται από τον ιστολογικό τύπο, το στάδιο και τη θεραπεία. Τα μη-Hodgkin λεμφώματα μπορούν να χωριστούν περαιτέρω σε καρκίνους που έχουν μια νωχελική-υποτονική (αργή ανάπτυξη) πορεία και εκείνες που έχουν μια επιθετική (ταχέως αναπτυσσόμενη) πορεία. Αυτοί οι υποτύποι συμπεριφέρονται και ανταποκρίνονται διαφορετικά στη θεραπεία. Οι τύποι ήπιου NHL έχουν σχετικά καλή πρόγνωση με μέση επιβίωση για 20 χρόνια, αλλά συνήθως δεν είναι θεραπευτικές σε προχωρημένα κλινικά στάδια [9]. Το πρώιμο στάδιο (στάδιο I και στάδιο II) μπορεί να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά μόνο με ακτινοθεραπεία. Οι περισσότεροι από τους αδυνάτους τύπους είναι οζώδης (ή θυλακοειδής) στη μορφολογία. Ο επιθετικός τύπος NHL έχει μικρότερο φυσικό ιστορικό, αλλά ένας σημαντικός αριθμός αυτών των ασθενών μπορεί να θεραπευτεί με εντατικά συνδυασμένα σχήματα χημειοθεραπείας. Γενικά, με τη σύγχρονη θεραπεία ασθενών με NHL, η συνολική επιβίωση στα 5 χρόνια είναι πάνω από 60%. Από τους ασθενείς με επιθετικό NHL, μπορεί να θεραπευθεί περισσότερο από 50%. Η μεγάλη πλειοψηφία των υποτροπών εμφανίζεται τα πρώτα 2 χρόνια μετά

τη θεραπεία. Ο κίνδυνος της καθυστερημένης υποτροπής είναι υψηλότερος σε ασθενείς που εκδηλώνουν τόσο ήπιες όσο και επιθετικές ιστολογίες[10]

### **Λεμφικό πρωτείνωμα**

Το λέμφωμα ως η συνηθέστερη αιματολογική κακοήθεια που επηρεάζει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος σε συνδυασμό με την μεγάλη ετερογένεια που εμφανίζει(5 HL και τουλάχιστον 60 NHL[11]) δεν θα μπορούσε να μην εξετάζεται από κάθε πιθανή προσέγγιση. Έτσι τόσο η ήδη υπάρχουσα πληροφορία που υπάρχει για την βιολογική βάση( μοριακή, γονιδιακή και πρωτεϊνική) του καρκίνου αυτού όσο και αυτή που ανακαλύπτεται καθημερινώς αναζητά έναν τρόπο σύνδεσης/επικοινωνίας. Σκοπός δεν είναι άλλος από την εύρεση μιας χρυσής τομής μεταξύ των επιπέδων αυτών η οποία πιθανώς να εξηγούσε όχι μόνο το μοτίβο στο οποίο στηρίζεται αυτή η πολυπλοκότητα αλλά να οδηγήσει και στην διαβαθμιζόμενη βιολογική επίλυση του τόσο από το επίπεδο της πρόγνωσης( βιοδείκτες) όσο και της άμεσης επίλυσης ,την θεραπεία( φάρμακα).Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος οι πληροφορίες αυτές προσαρμόζονται και δοκιμάζονται τόσο στις ολοένα νέο-εμφανιζόμενες τεχνικές/μηχανήματα αλλά και στις αναβαθμιζόμενες εκδόσεις υπάρχουσών τεχνικών. Η πρωτεϊνωματική προσέγγιση είναι μια νέο-εμφανιζόμενη τεχνική στον ερευνητικό χώρο(μέσα της δεκαετίας του 1990[12] ) η οποία σε συνδυασμό με την ολοένα και αυξανόμενη αναβάθμιση των κυρίαρχων εργαλείων της ,το MS και την βιοπληροφορική είναι σε θέση να αποδίδει τόσο το προφίλ πρωτεϊνών σε υψηλή απόδοση όσο και των τροποποιήσεων τους μαζί με τις αλληλεπιδράσεις τους προσεγγίζοντας έτσι το βιολογικό ερώτημα και από σφαιρική πλευρά(αυτοποίηση πρωτεϊνών) όσο και από την πιο μικροσκοπική πλευρά(αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών)[13]. Ακόμη , ο συνδυασμός του MS με την βιοπληροφορική στο να προσφέρουν ποσοτικοποίηση των ανιχνευμένων πρωτεϊνών είναι αρκετά ελπιδοφόρα στη διευκόλυνση της μετάφρασης των βασικών επιστημονικών ανακαλύψεων σε εξατομικευμένη ιατρική λεμφώματος για κλινική πρακτική ρουτίνας[14].Όμως μπορεί οι σημαντικές βελτιώσεις στον τομέα της βιοϊατρικής και των τεχνολογικών εφαρμογών τόσο λόγω νέων δεδομένων που καθημερινώς δημιουργούνται όσο και από δεδομένα κλινικών δοκιμών σε βάθος δεκαετίας να αποτελούν σημαντικό σημάδι για την πρόοδο στο ζήτημα αυτό το όλο βιολογικό θέμα δεν παύει να χρήζει περαιτέρω ανάλυση. Ενδεικτικά παραδείγματα, είναι πρώτον πως για βιολογικά στοχευμένα και αποτελεσματική θεραπεία δεν έχουν πιστοποιηθεί καλά καθορισμένες οντότητες κλινικοπαθολογικού λεμφώματος[15] καθώς και μελέτες δημιουργούν προφίλ γονιδιακής έκφρασης αποτυγχάνουν να εντοπίσουν τις διαταραγμένες κυτταρικές διεργασίες που καθορίζουν την κλινική ποικιλομορφία εντός των διακριτών βιολογικών υποομάδων της νόσου[16, 17].

Category	Number of studies
Comparative Profiling	66
Interactomics	18
Modificomics	24
Targeted	4
Label	40
Label-free	19
Cell lines	79
Tissues	19
Biological Fluids	10
HL	18
NHL	80
In Public Databases	18

**Figure 3.** Σύμφωνα με το[13] απεικονίζεται η ταξινόμηση των διαθέσιμων πρωτεωμικών αναλύσεων διαφόρων κατηγοριών. Στις κατηγορίες εμπεριέχονται διάφορες πρωτεωμικές προσεγγίσεις (comperative, interactomics, modificomics, targeted) καθώς και μέθοδοι ποσοτικοποίησης (label, label-free) τύποι βιολογικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (κυτταρικές σειρές, ιστοί και βιολογικά υγρά), τύποι λεμφώματος (HL, NHL) και διαθεσιμότητα αποτελεσμάτων σε ευρέως προσβάσιμες βάσεις.

### **Στόχος Διπλωματικής**

*Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η συγκριτική μελέτη του πρωτεϊνώματος διαφορετικών υποτύπων λεμφώματος με σκοπό την ανίχνευση πρωτεϊνών και μονοπατιών των οποίων η απορρύθμιση οδηγεί σε αυτήν την παθολογία.*

## **Σηματοδοτικά Μονοπάτια**

### **Σηματοδοτικό μονοπάτι της p53**

Το σηματοδοτικό μονοπάτι της p53 είναι η συνηθέστερη απενεργοποιημένη οδός σε καρκινικά κύτταρα. Περισσότεροι από τους μισούς όγκους έχουν μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια δραστηριότητας στην p53. Όταν το κύτταρο έχει βλάβες στο DNA του ή λαμβάνει ενισχυμένα σήματα μη φυσιολογικής πρόθεσης, η



συγκέντρωση πρωτεΐνης p53 αυξάνεται [18] Η ενεργοποίηση της P53 προκαλείται από έναν αριθμό σημάτων στρες, που περιλαμβάνουν βλάβες στο DNA, οξειδωτικό στρες και ενεργοποιημένα ογκογονίδια [19]. Το επίπεδο της πρωτεΐνης p53 υπό κανονικές συνθήκες ρυθμίζεται πάντοτε από την πρωτεΐνη MDM2 η οποία δεσμεύεται με την p53 και προάγει την ουβικουτινυλίωση αυτής. Τα σήματα πίεσης μπορούν να οδηγήσουν στη σταθεροποίηση της p53 με διάφορους μηχανισμούς. Για παράδειγμα, οι βλάβες του DNA προκαλούν τη φωσφορυλίωση τόσο της p53 όσο και της MDM2 καθιστώντας τις αδύνατες να δεσμευτούν πια οδηγώντας έτσι στη συσσώρευση της p53. Η p53 έπειτα φθάνει σε επίπεδα επαρκή για το σχηματισμό τετραμερών τα οποία μπορούν να δεσμεύονται με τους προαγωγούς των 120 γονιδίων-στόχων και να τα ενεργοποιούν. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων-στόχων μπορούν να κατευθύνουν μια σειρά κυτταρικών απαντήσεων για το άγχος. Αυτές οι αποκρίσεις κυττάρων κυμαίνονται από ήπια (π.χ. προκαλούν τη μετάφραση πρωτεϊνών που επισκευάζουν το DNA) σε δραστικό και μη αναστρέψιμο (π.χ. προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) [18].

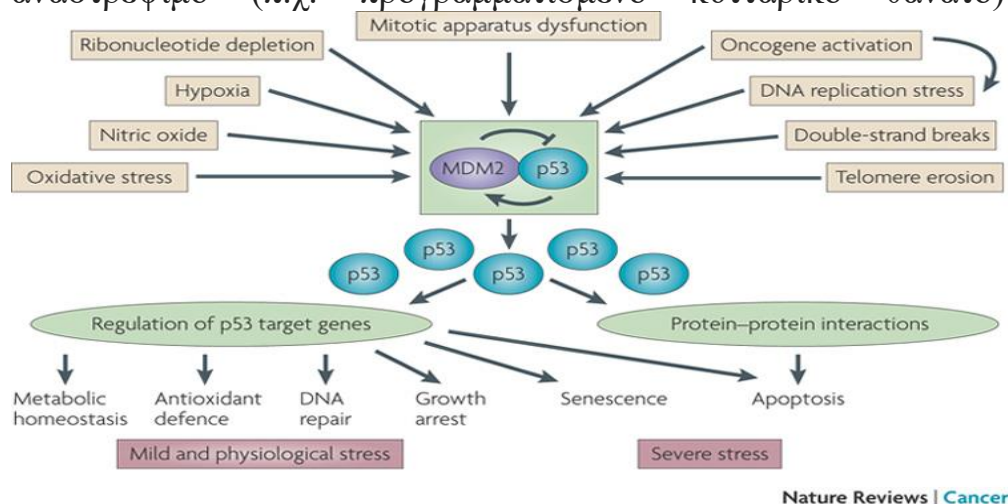


Figure 4 p53 σηματοδοτικό μονοπάτι [20]

### Σηματοδοτικό μονοπάτι Κυτταρικού Κύκλου

Ο κύκλος της αντιγραφής και της διαίρεσης από μια ιεραρχική ακολουθία συμβάντων είναι γνωστός ως κυτταρικός κύκλος και είναι ο βασικός μηχανισμός αναπαραγωγής σε όλα τα έμβια όντα. Ο μηχανισμός του κυτταρικού κύκλου αποτελείται από ένα πολύ περίπλοκο σύστημα πρωτεϊνών ρύθμισης γνωστό ως σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ο κυτταρικός κύκλος έχει τέσσερις φάσεις / στάδια. Ο αναδιπλασιασμός του DNA (φάση S) και η μίτωση (φάση M) διαχωρίζονται χρονικά από κενά γνωστά ως φάσεις G1 και G2.[21]

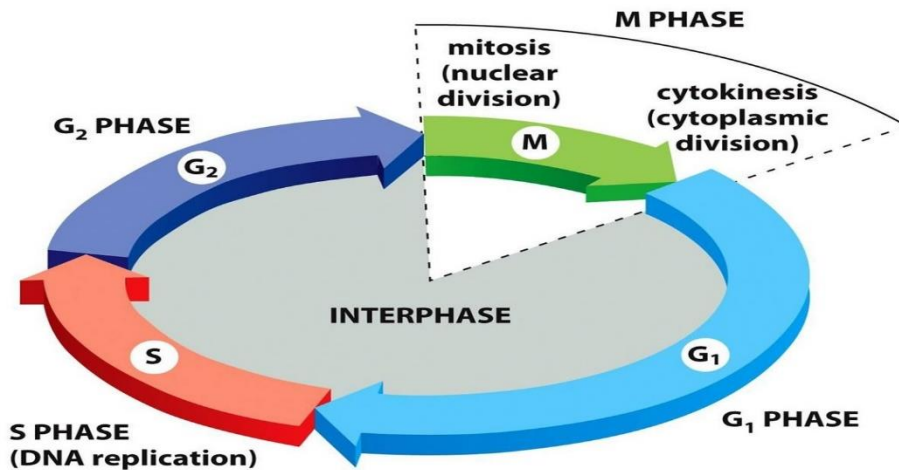


Figure 5 Φάσεις κυτταρικού κύκλου [2]

Το σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου εξασφαλίζει την ομοιόσταση όλων των διαδικασιών χρησιμοποιώντας κατάλληλα «μοριακά φρένα» ικανά να σταματήσουν τον κυτταρικό κύκλο σε διάφορα σημεία γνωστά ως Σημεία Ελέγχου. Η ρύθμιση αυτών των σημείων ελέγχου αποδίδεται στα CDK-Cyclin Depended Kinases (ένζυμα εξαρτώμενα από την κυκλίνη) [2]. Οι CDKs ρυθμίζουν την εξέλιξη του κυττάρου μέσω των φάσεων του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζοντας τη δραστηρότητα των βασικών υποστρωμάτων[21]. Η δραστηρότητα του ενζύμου CDK εξαρτάται από έναν δεύτερο τύπο πρωτεϊνών γνωστές ως Κυκλίνες. Οι κυκλίνες δεν δρουν όπως τα ένζυμα,

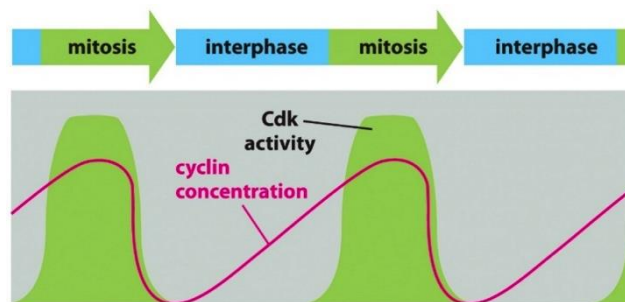


Figure 18-5 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Figure 6. Η αύξηση και η μείωση των CDKs και της κυκλίνης κατά τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. [2]

αλλά είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση των κινασών με το να συνδέονται μαζί τους. Το APC (σύμπλεγμα προαγωγής αναφορικών) είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που προσθέτει μόρια ουβικιτίνης στην κυκλίνη οδηγώντας την σε αποσύνθεση από τα πρωτεασώματα. Η ενέργεια αυτή οδηγεί στην απενεργοποίηση των CDKs[2]. Απαιτείται ακριβής ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των CDK σε συγκεκριμένα σημεία του κυτταρικού κύκλου για την ομαλή διαίρεση των κυττάρων. Οι αναστολείς κυκλίνης-CDK (CKI), όπως οι p16Ink4a, p15Ink4b, p27Kip1 και p21Cip1, εμπλέκονται στην αρνητική ρύθμιση των δραστηριοτήτων CDK, παρέχοντας έτσι μια οδό μέσω της οποίας ο κυτταρικός κύκλος ρυθμίζεται αρνητικά. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα ανταποκρίνονται σε βλάβες DNA ενεργοποιώντας μονοπάτια σηματοδότησης που προάγουν τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την επιδιόρθωση του DNA. Σε απόκριση της βλάβης του DNA, η ATM κινάσης ως σημείου ελέγχου

φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την Chk2, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη καταστολής όγκων p53. Η p53 και οι μεταγραφικοί του στόχοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στα δύο σημεία G1 και G2 [21]. Η p21 είναι ένα παράδειγμα ενός μεταγραφικού παράγοντα της p53 που παίζει σημαντικό ρόλο, διότι αναστέλλοντας τις G1 / S-Cdk και S-Cdk, πρωτεΐνες που προάγουν την φάση S του κυτταρικού κύκλου, σταματά τον κύκλο στη φάση G1 δίνοντας τον χρόνο στο κύτταρο για επιδιόρθωση της βλάβης του DNA πριν από την αναπαραγωγή του [2].

### **Σηματοδοτικό μονοπάτι Απόπτωσης**

Η απόπτωση είναι μια γενετικά προγραμματισμένη διαδικασία για την εξάλειψη των κατεστραμμένων ή περιττών κυττάρων με την ενεργοποίηση των κασπασών (ασπαρτικής-ειδικής κυστεϊνικής πρωτεάσης). Η έναρξη της απόπτωσης ελέγχεται από πολλές συσχετισμένες διεργασίες. Η «εξωγενής» οδός περιλαμβάνει διέγερση μελών της υποοικογένειας του υποδοχέα παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF), όπως TNFR1, CD95 / Fas ή TRAILR (υποδοχείς θανάτου), που εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια, από τους ειδικούς υποκαταστάτες τους, όπως ο TNF-α, FasL ή TRAIL, αντίστοιχα. Η «ενδογενής» οδός ενεργοποιείται κυρίως από ερεθίσματα μη-υποδοχέα, όπως βλάβη DNA, ER στρες, μεταβολικό στρες, υπεριώδη ακτινοβολία ή στέρση παράγοντα ανάπτυξης. Το κεντρικό γεγονός στο «εγγενές» μονοπάτι είναι η διαπερατότητα της μιτοχονδριακής εξωτερικής μεμβράνης (MOMP), η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Αυτές οι δύο οδοί συγκλίνουν στο επίπεδο των ενεργών κασπασών, όπως η κασπάση-3 και η κασπάση-7. Η τρίτη κύρια οδός ξεκινά από τα συστατικά κυτταροτοξικών κόκκων (π. X. Perforin και Granzyme B) τα οποία απελευθερώνονται από CTLs (κυτταροτοξικά κύτταρα T) και κύτταρα NK (φυσικοί δολοφόνοι). Το Granzyme B, παρόμοια με τις κασπάσες, διασπά τα υποστρώματά του μετά από κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος, υποδηλώνοντας ότι αυτή η πρωτεάση μπορεί να ενεργοποιήσει απευθείας μέλη της οικογένειας κασπάσης. Είναι η ισορροπία μεταξύ των προ-αποπτωτικών και των αντι-αποπτωτικών σημάτων που τελικά καθορίζουν εάν τα κύτταρα θα υποβληθούν σε απόπτωση, θα επιβιώσουν ή θα πολλαπλασιαστούν. Η οικογένεια συνδέσμων TNF ενεργοποιεί σήματα αντι-αποπτωτικής ή κυτταρικής επιβίωσης καθώς και αποπτωτικά σήματα. Ο NGF και η ιντερλευκίνη-3 προάγουν την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των νευρώνων ή των αιμοποιητικών κυττάρων,

αντίστοιχα. Η απόσυρση αυτών των αυξητικών παραγόντων οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, όπως περιγράφεται παραπάνω[22].

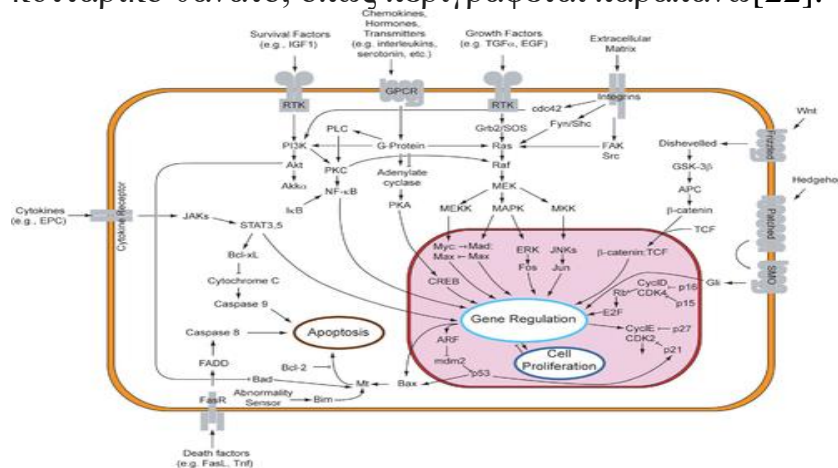


Figure 7 Αποπτοτικό μονοπάτι[23]

### Σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR

Η mTOR αντιλαμβάνεται και ενσωματώνει μια ποικιλία περιβαλλοντικών παραγόντων για τη ρύθμιση της ανάπτυξης του οργανισμού και της ομοιόστασης. Η οδός ρυθμίζει πολλές κύριες κυτταρικές διεργασίες και εμπλέκεται σε έναν αυξανόμενο αριθμό παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, της παχυσαρκίας, του διαβήτη τύπου 2 και του νευροεκφυλισμού [24]. Η mTOR είναι μια πολύ συντηρημένη πρωτεϊνική κινάση σερίνης / θρεονίνης, η οποία υπάρχει σε δύο συμπλέγματα που ονομάζονται σύμπλοκο mTOR 1 (mTORC1) και 2 (mTORC2)[5]. Η mTOR ρυθμίζει άμεσα ή έμμεσα τη φωσφορυλίωση τουλάχιστον 800 πρωτεϊνών. Λειτουργίες ως μέρος 2 δομικά και λειτουργικά διακριτών συμπλεγμάτων σηματοδότησης των mTORC1 και mTORC2 (σύμπλοκο mTOR 1 και 2). Το ενεργοποιημένο mTORC1 ρυθμίζει εκ των προτέρων τη σύνθεση πρωτεϊνών με τη φωσφορυλίωση ρυθμιστών κλειδιών της μετάφρασης mRNA και της σύνθεσης ριβοσώματος. Διεγείρει την οδό βιοσύνθεσης της πυριμιδίνης, τόσο μέσω οξείας ρύθμισης διαμέσου της φωσφορυλίωσης του RPS6KB1, του βιοσυνθετικού ενζύμου CAD, όσο και της καθυστερημένης ρύθμισης, μέσω μεταγραφικής ενίσχυσης της οδού φωσφορικής πεντόζης η οποία παράγει 5-φωσφοριβοζυλ-1-πυροφωσφορικό (PRPP), ένας αλλοστερικός ενεργοποιητής της CAD σε ένα μεταγενέστερο στάδιο της σύνθεσης, με αυτή την λειτουργία να εξαρτάται από το σύμπλοκο mTORC1. Ρυθμίζει τη σύνθεση ριβοσώματος ενεργοποιώντας την μεταγραφή που εξαρτάται από την RNA πολυμεράση III μέσω της φωσφορυλίωσης και της αναστολής του

MAF1 ενός καταστολέα της RNA πολυμεράσης III. Παράλληλα με τη σύνθεση πρωτεϊνών, ρυθμίζει επίσης τη σύνθεση λιπιδίων μέσω των SREBF1 / SREBP1 και LPIN1. Για να διατηρηθεί η ομοιόσταση της ενέργειας, το mTORC1 μπορεί επίσης να ρυθμίσει τη μιτοχondριακή βιογένεση μέσω της ρύθμισης του PPARGC1A. Το mTORC1 επίσης ρυθμίζει αρνητικά την αυτοφαγία μέσω της φωσφορυλίωσης του ULK1 [25].

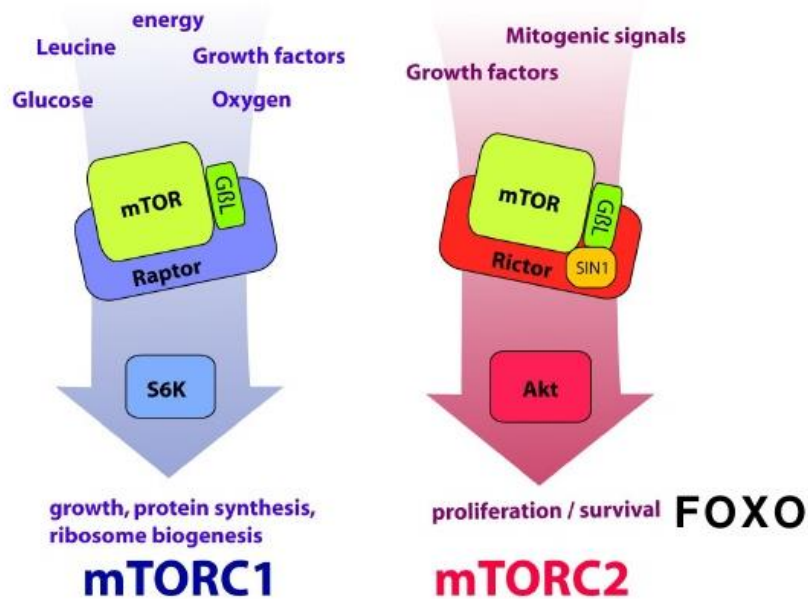


Figure 8 m TOR σηματοδοτικό μονοπάτι [26]

### Σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3k-Akt

Από την αρχική ανακάλυψή του ως πρωτο-ογκογονίδιο, η κινάση σερίνης / θρεονίνης Akt (γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B ή PKB) έχει γίνει το επίκεντρο προσοχής λόγω του κρίσιμου ρόλου της στη ρύθμιση των ποικίλων κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού, της ανάπτυξης, την επιβίωση, τη μεταγραφή και τη σύνθεση πρωτεϊνών. Ο καταρράκτης σηματοδότησης Akt ενεργοποιείται από τον υποδοχέα της κινάσης της τυροσίνης, ιντεγκρίνες, υποδοχείς κυττάρων B και T, υποδοχείς κυτοκίνης, υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνη G και άλλα σήματα που επάγουν την παραγωγή φωσφατιδυλινοσιτόλης (3,4,5) τριφωσφορικών (PIP3) από την 3-κινάσης φωσφοϊνοσιτιδής (PI3K). Αυτά τα λιπίδια χρησιμεύουν ως θέσεις πρόσδεσης της μεμβράνης του πλάσματος για πρωτεΐνες που φέρουν περιοχές πεπτιδρίνης-ομολογίας (PH), συμπεριλαμβανομένου της Akt και του μετέπειτα ενεργοποιητή της PDK1. Στην μεμβράνη της η PDK1

φωσφορυλιώνει την Akt στην Thr308 που οδηγεί σε μερική ενεργοποίηση της Akt. Η φωσφορυλίωση της Akt στη Ser473 από την mTORC2 διεγείρει την πλήρη ενζυματική δραστηρότητα της.

Απορρύθμιση της οδού της PI3K / Akt παρατηρείται σε πολλές ανθρώπινες ασθένειες, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, η καρδιαγγειακή νόσο και οι νευρολογικές ασθένειες.

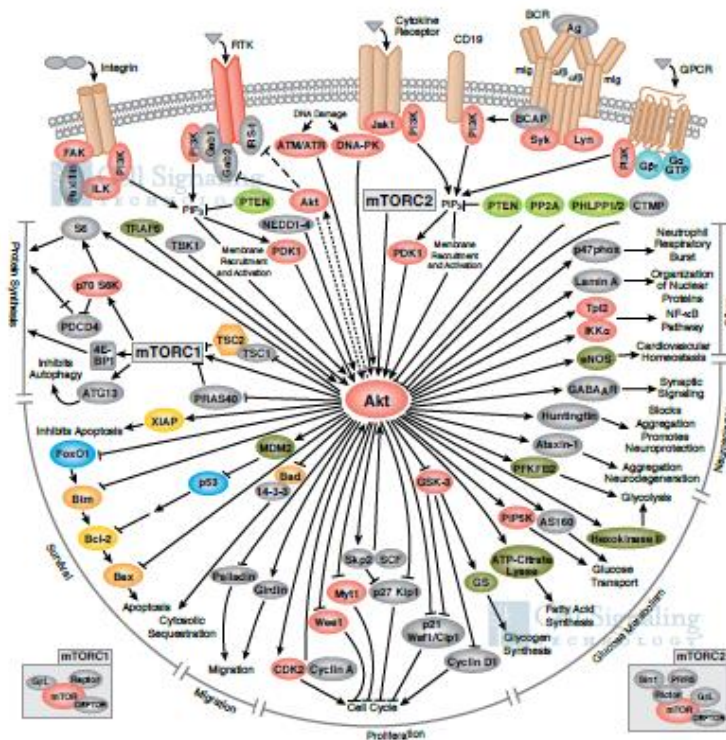


Figure 9.PI3K/Akt σηματοδοτικό μονοπάτι[27]

Στον καρκίνο, έχουν εντοπιστεί δύο μεταλλάξεις που αυξάνουν την ενδογενή δραστηριότητα κινάσης του PI3K. Επιπλέον, το PTEN συχνά μεταλλάσσεται ή χάνεται σε ανθρώπινους όγκους. Ενεργοποιημένες μεταλλάξεις στην Akt έχουν επίσης περιγραφεί. Η συχνότητα με την οποία η μη ρυθμισμένη σηματοδότηση Akt συμβάλλει στην ανθρώπινη ασθένεια κορυφώνεται με την επιθετική ανάπτυξη αναστολέων μικρών μορίων των PI3K και Akt. Το Akt ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη μέσω των επιδράσεων της στο σύμπλεγμα TSC1 / TSC2 και τη σηματοδότηση της mTORC. Το Akt συμβάλλει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της φωσφορυλίωσης των αναστολέων της CDK που είναι οι p21 και p27. Η Akt είναι ένας κύριος μεσολαβητής της κυτταρικής επιβίωσης μέσω της άμεσης αναστολής των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η Bad ή της αναστολής των προ-αποπτωτικών σημάτων που παράγονται από παράγοντες μεταγραφής όπως το FoxO. Λόγω του κρίσιμου ρόλου που έχει στη ρύθμιση των ποικίλων κυτταρικών λειτουργιών, η Akt / PKB είναι ένας σημαντικός

θεραπευτικός στόχος για τη θεραπεία των διαφόρων νόσων στις οποίες εμπλέκετε.[28]

### Σηματοδοτικό μονοπάτι της γλυκόλυση/γλυκονεογέννεση

Η γλυκόλυση είναι η διαδικασία μετατροπής της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό και της παραγωγής μικρών ποσοτήτων ATP (ενέργειας) και NADH (αναγωγικό μέσο-μεταφορέας e). Είναι μια μεταβολική οδός που παράγει σημαντικούς πρόδρομους μεταβολίτες όπως: 6-φωσφορική γλυκόζη, φρουκτόζης-6P και τρεις ενώσεις άνθρακα της γλυκερόνης-P, της γλυκεραλδεΐδης-3P, της γλυκερίνης-3P, της φωσφοενελοπυροσταφυλικής και της πυροσταφυλικής. Το ακετυλο-CoA, ένας άλλος σημαντικός πρόδρομος μεταβολίτης, παράγεται με οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού. Όταν τα γονίδια του ενζύμου αυτής της οδού εξετάζονται σε πλήρη αλληλουχία γονιδιώματος, τα στάδια της αντίδρασης των ενώσεων τριών ατόμων άνθρακα από τη γλυκερόνη-P σε πυροσταφυλικό σχηματίζουν μια συντηρημένη μονάδα πυρήνα, η οποία απαντάται σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς και που μερικές φορές περιέχει δομές οπερονίου σε βακτηριακά γονιδιώματα. Η γλυκονεογέννεση είναι η αντίστροφη διαδικασία, η οποία παράγει γλυκόζη από υποστρώματα άνθρακα μη υδατανθράκων όπως γαλακτικό, όλα τα ενδιάμεσα του κύκλου κιτρικού οξέος (μέσω μετατροπής σε οξαλοξικό) και αμινοξέα εκτός από λυσίνη ή λευκίνη και γλυκερόλη[29]. Το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης έχει παρατηρηθεί πως επηρεάζεται έντονα στον καρκίνο μιας και τα καρκινικά κύτταρα προτιμούν το μονοπάτι αυτό έναντι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης για την παραγωγή ενέργειας, ένα φαινόμενο γνωστό ως Warburg effect. Τα καρκινικά κύτταρα μεταβολίζουν την γλυκόζη σε γαλακτικό ακόμα και παρουσία οξυγόνου.

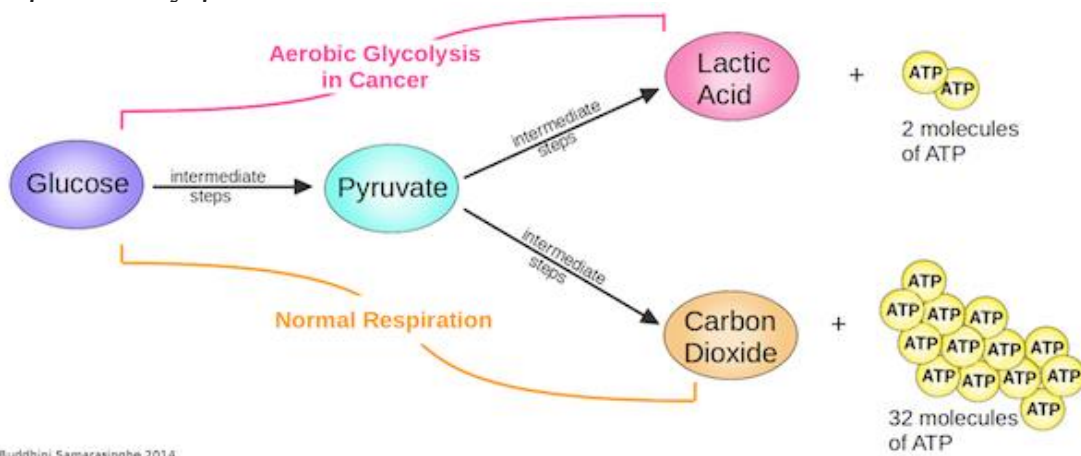


Figure 10 Φαινόμενο Warburg [30]

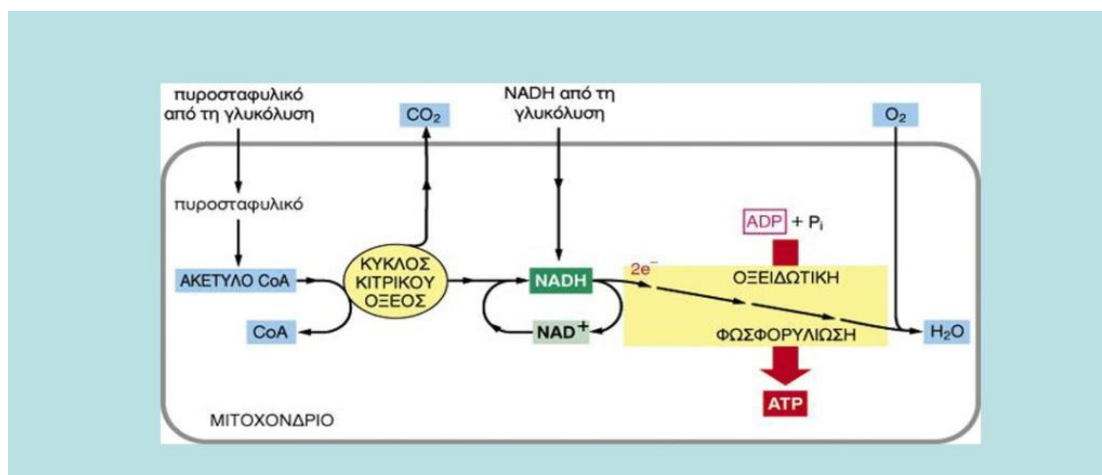
Η χρήση αυτού του μονοπατιού ευνοείται μιας και η παρουσία γαλακτικού οδηγεί σε όξυνση του περιβάλλοντος του όγκου με συνέπεια την αναστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, σύμφωνα πάντα με αρκετές μελέτες. Ακόμη, ο συνδυασμός του φαινομένου υποξίας που δημιουργείται στον όγκο λόγω της συνεχής αύξησης του μεγέθους του φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρολό μιας και οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός μεταγραφικού παράγοντα του HIF-1 ο οποίος ευνοεί την έκφραση περισσότερων γλυκολυτικών ενζύμων και μεταφορέων γλυκόζης GLUT1 και GLUT3. Έτσι ο όγκος κερδίζει αρκετό χρόνο μέχρι να επιτευχθεί μια άλλη σημαντική για το καρκινικό κύτταρο διαδικασία η αγγειογένεση με σημαντικό εκφραστή της τον αγγειογενετικό παράγοντα VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ή αλλιώς αυξητικό παράγοντα αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων[31].

### **Σηματοδοτικό μονοπάτι της οξειδωτική φωσφορυλίωσης**

Αν και οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που υποδεικνύουν τις αερόβιες και γλυκολυτικές οδούς παραγωγής ενέργειας είναι πολύπλοκοι και καθιστούν μάλλον δύσκολη την πρόβλεψη συγκεκριμένων κυτταρικών αποκρίσεων, τα πραγματικά δεδομένα φαίνεται να υποστηρίζουν την άποψη ότι για να ευνοηθεί η παραγωγή βιομάζας, τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα επηρεασμένα από την ανάγκη για μεγάλα ποσά ενέργειας χρησιμοποιούν άλλα υποστρώματα από το να οξειδώσουν πλήρως τη γλυκόζη (σε CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O). Πιο συγκεκριμένα, μόνο ένα μέρος (40 έως 75%,) των κυττάρων που χρειάζονται ATP λαμβάνεται μέσω του ελάχιστα αποτελεσματικού καταβολισμού της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό / γαλακτικό στο κυτταρόπλασμα και η υπόλοιπη ανάγκη ATP συντίθεται στα μιτοχόνδρια μέσω του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (Παράγετε ένα ATP για κάθε οξειδωμένο τμήμα ακετυλίου) και τη οξειδωτική φωσφορυλίωση που αναγεννά τα νικοτιναμιδικά και φλαβινουκλεοτίδια στην οξειδωμένη τους κατάσταση (NAD<sup>+</sup> και FAD). Αυτό μπορεί να οφείλεται στη διαθεσιμότητα του υποστρώματος όπως παρουσιάστηκε στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκινικών κυττάρων (HeLa), εστιάζοντας συγκεκριμένα στην ικανότητά της να χρησιμοποιεί γλυκόλυση έναντι οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και στην επίδραση της ενέργειας που έχει ο τύπος του υποστρώματος στη μιτοχονδριακή σύνθεση, δομή και λειτουργία. Η αντικατάσταση της γλυκόζης με γαλακτόζη / γλουταμίνη στο μέσο καλλιέργειας προκάλεσε αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, υποδηλώνοντας αυξημένη παραγωγή ενέργειας από γλουταμίνη[32]....Ως συμπέρασμα



από αυτό το έργο μπορούμε να δούμε ότι το υπόστρωμα ενέργειας μπορεί να διαμορφώσει την μιτοχονδριακή οξειδωτική ικανότητα στα καρκινικά κύτταρα. Μία άμεση απόδειξη αυτού του φαίνεται σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος, στα οποία αποδείχθηκε ότι η ροή του κύκλου TCA διατηρείται σημαντικά από αναπληρωτικό αλφα-κετογλουταρικό που παράγεται από γλουταμίνη και από ακετυλικά τμήματα που προέρχονται από την αντίδραση πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης όπου το πυροσταφυλικό μπορεί να έχει διαφορετική προέλευση από τη γλυκόζη[33]. Οι παραπάνω αλλαγές είναι αποτέλεσμα γενετικής αλλοίωσης και περιβαλλοντικών συνθηκών που ωθούν πολλά καρκινικά κύτταρα να αλλάξουν το μεταβολισμό τους προκειμένου να συνθέσουν μόρια απαραίτητα για να επιβιώσουν, να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν, περιλαμβανομένης της ριβόζης και του NADPH για τη σύνθεση νουκλεοτιδίων και φωσφορικής γλυκερόλης 3 για την παραγωγή φωσφολιπιδίων. Η σύνθεση των τελευταίων μορίων απαιτεί σημαντική ποσότητα ακετυλικών μονάδων που προέρχονται από βήτα-οξείδωση λιπαρών οξέων και / ή από κυτοσολικό κιτρικό άλας (κιτρική λύση) και / ή από την αντίδραση πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης.



**Figure 11. Οξειδωτική Φωσφορυλίωση[34]**

Δεδομένης της σημαντικής απαίτησης για NADPH στη μακρομοριακή σύνθεση και τον οξειδοαναγωγικό έλεγχο, η παραγωγή NADPH σε καρκινικά κύτταρα, εκτός από την παραγωγή μέσω της διακλάδωσης φωσφορικής πεντόζης, μπορεί να υποστηριχθεί σημαντικά από τις κυτοσολικές ισοκυτταρικές δεϋδρογενάσες και από το μηλικό ένζυμο. Ως εκ τούτου, πολλά καρκινικά κύτταρα τείνουν να έχουν μειωμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια λόγω είτε και μειωμένης ροής εντός του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος ή / και της αναπνοής[35].

## Φασματομετρία Μάζας και Υγρή Χρωματογραφία

Το σύστημα που έγινε η ανάλυση ήταν ένα nano-RSLC Ultimate 3000 συνδεδεμένο απευθείας φασματόμετρο μάζας Orbitrap Fusion-Tribrid.

Το nano-RSLC Ultimate είναι ένας υγρός χρωματογράφος με δυνατότητα για πολύ χαμηλές ροές από  $\mu\text{L}$  μέχρι  $\text{nL}$  αλλά και με υψηλά ποσοστά εμπιστοσύνης όσο αναφορά nano-ροές για υψηλούς χρόνους κατακράτησης δίνοντας αξιόπιστα δεδομένα. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν RP(Reversed Phase). Όπως αναφέρεται και στο κομμάτι της προετοιμασίας για τη πρωτεϊνωματική ανάλυση η υδροφοβικότητα είναι το κύριο χαρακτηριστικό για το διαχωρισμό σε αυτή τη μέθοδο. Ακόμη, ένα σημαντικό πλεονέκτημα του RPLC είναι ότι τα ρυθμιστικά που χρησιμοποιούνται είναι συμβατά με το ESI. Δεδομένης της υψηλής ανάλυσης, της αποδοτικότητας, της αναπαραγωγιμότητας και της



**Figure 12** nRSLC Ultimate συζευγμένο με Orbitrap Fusion-Tribrid[1]

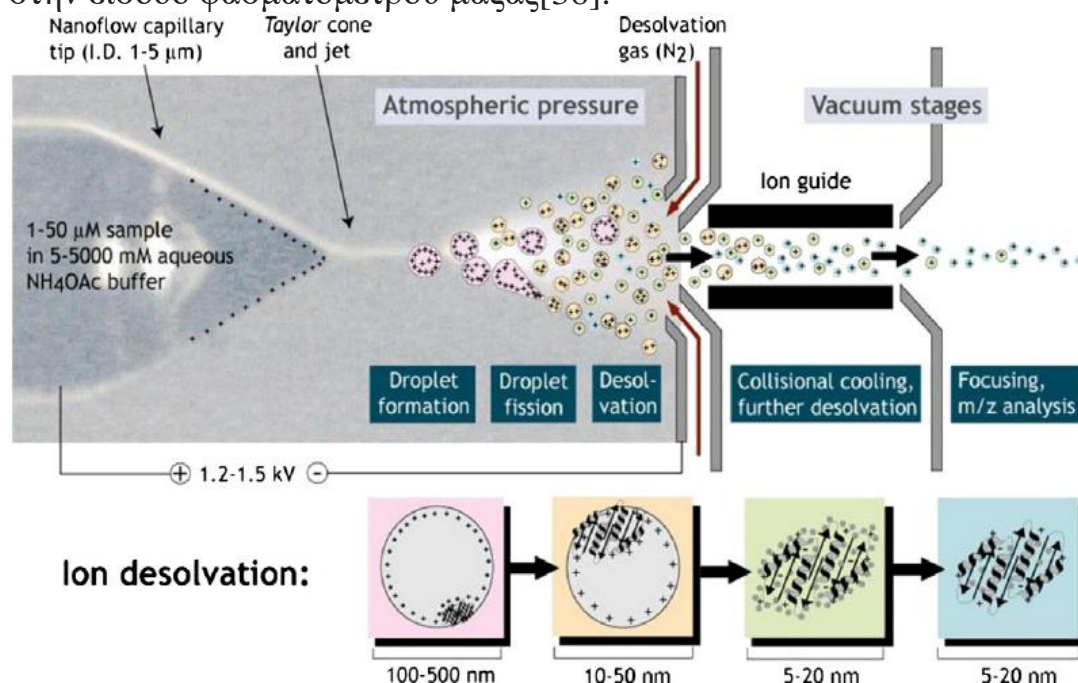
χρησιμοποιείται ως η τελευταία διάσταση του πολυδιάστατου διαχωρισμού πριν από την ανάλυση μάζας. Σημαντική, είναι και η αύξηση που προσφέρει στη χωρητικότητα της κορυφής, την ευαισθησία και την ταχύτητας ανάλυσης[36] [36]

Έπειτα, ο φασματογράφος σαρώνει όλες τις τιμές μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) των πεπτιδικών ιόντων που εκλούνται από τη στήλη nanoLC και καταγράφει τις εντάσεις τους σε ένα φάσμα  $\text{MS}^1$ . Τα ανιχνευθέντα ιόντα πεπτιδίων απομονώνονται και στη συνέχεια θραυσματοποιούνται, με το φασματογράφο να πραγματοποιεί άλλη μια άλλη σάρωση όλων των τιμών  $m/z$  των θραυσμάτων ιόντων και να καταγράφει τις εντάσεις τους σε ένα  $\text{MS}^2$  φάσμα. Έπειτα, μέσω μιας βάσης δεδομένων αυτοματοποιημένης αλληλουχίας υπό την καθοδήγηση του προγράμματος SEQUEST[37] και ακολουθούμενη από το Mascot [38] ταυτίζονται μεγάλες ποσότητες φάσματος  $\text{MS}^2$  με ακολουθίες πεπτιδίων που περιέχονται σε βάσεις δεδομένων και με τη σειρά τους συμπεραίνουμε ταυτότητες πρωτεϊνών που υπάρχουν μέσα σε πολύπλοκα μίγματα. Σημαντική είναι και η αναφορά των επιμέρους διαδικασιών όπως η πηγή ιονισμού (ESI) η οποία είναι μέθοδος "ήπιου" ιονισμού που επιτρέπει τον σχηματισμό ιόντων χωρίς σημαντική απώλεια της

συμβατότητας με το ESI, η αναλυτική RPLC

συμβατότητας με το ESI, η αναλυτική RPLC

ακεραιότητας του δείγματος. Αυτό είναι σημαντικό επειδή επιτρέπει την ακριβή μαζική πληροφόρηση σχετικά με τις πρωτεΐνες και τα πεπτίδια στις φυσικές τους καταστάσεις[39], η θραυσματοποίηση(LTQ) καθώς και η παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης(MS/MS-Orbitrap). Η πηγή ESI παράγει ιόντα από το διάλυμα. Ο ιονισμός ηλεκτροσπασμού κατευθύνεται από υψηλή τάση (2-6 kV) που εφαρμόζεται μεταξύ του πομπού στο τέλος του αγωγού διαχωρισμού και του εισόδου του φασματομέτρου μάζας. Οι φυσικοχημικές διεργασίες του ESI περιλαμβάνουν τη δημιουργία ενός ηλεκτρικά φορτισμένου αερολύματος, το κώνο Taylor, ακολουθούμενο από σχηματισμό και αποδιαλυτοποίηση σταγονιδίων αναλύτη-διαλύτη. Ο σχηματισμός και η διάλυση των σταγονιδίων υποβοηθείται από ένα θερμαινόμενο τριχοειδές, και σε ορισμένες περιπτώσεις από το περίβλημα ροής αερίου στην είσοδο φασματομέτρου μάζας[36].



**Figure 13 Ηλεκτροσπασμός (ESI)[40, 41]**

Στο επόμενο βήμα τα ιόντα εισέρχονται στο LTQ(Linear Trap Quadrupole) όπου συμβαίνει και η θραυσματοποίηση των φορτισμένων ιόντων(σε μεγαλύτερο βαθμό).Ο ευρύτερα διαδεδομένος τρόπος για θραυσματοποίηση είναι ο CID(collision-induced dissociation) ή αλλιώς επαγόμενη -συγκρουσιογενής θραυσματοποίηση. Σε αυτή τη διαδικασία διαρρέετε μια μικρή ποσότητα ενός αδρανούς αερίου (He, N<sub>2</sub>, Ar) μέσα στο θάλαμο όπου βρίσκονται τα απομονωμένα πεπτιδικά ιόντα. Τα ιόντα των πεπτιδίων συγκρούονται με το αέριο και εσωτερικοποιούν την ενέργεια της σύγκρουσης. Όντας στη φάση του αερίου, τα πεπτιδικά ιόντα δεν μπορούν να καταναείμουν εκ νέου την ενέργεια στα μόρια του διαλύτη. Αντ' αυτού, η ενέργεια τελικά μεταφέρεται σε δονητική κατάσταση η οποία δεν μπορεί να διατηρήσει την διαθέσιμη ενέργεια και

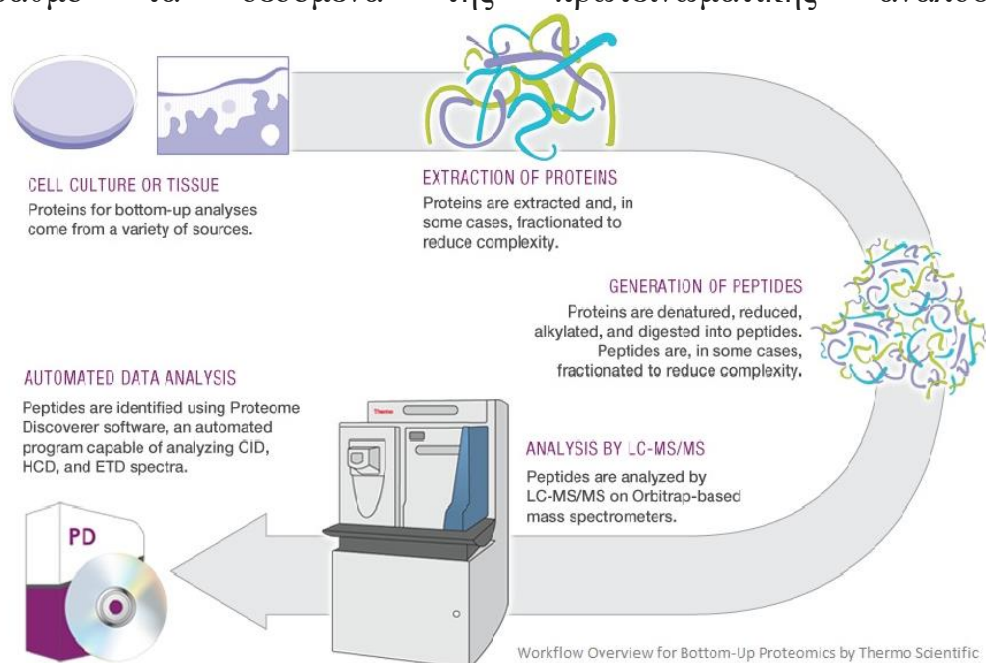
έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των δεσμών. Αυτό οδηγεί κατά κύριο λόγο στη διάσπαση κατά μήκος του πεπτιδικού δεσμού του πεπτιδικού σκελετού, αν και παρατηρείται επίσης συχνά η απώλεια νερού, αμμωνίας, μονοξειδίου του άνθρακα ή ασταθών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων[42].

Τέλος, το Orbitrap χρησιμοποιεί την τροχιακή παγίδευση των ιόντων στα στατικά ηλεκτροστατικά πεδία του όπου τα ιόντα περιστρέφονται γύρω από ένα κεντρικό ηλεκτρόδιο και ταλαντεύονται σε αξονική κατεύθυνση. Το Orbitrap χρησιμοποιεί έναν γρήγορο μετασχηματισμό Fourier (FFT) για τη μετατροπή του σήματος χρονικού πεδίου σε m/z. Ο αναλυτής μάζας Orbitrap διαθέτει υψηλή ανάλυση (έως 150.000), υψηλή ακρίβεια μάζας (2-5 ppm), εύρος μάζας-φορτίου 6000 και δυναμική περιοχή μεγαλύτερη από 10<sup>3</sup>. Όταν συνδέεται με μια παγίδα ιόντων LTQ, όπως και στην δικιά μας περίπτωση, το υβριδικό όργανο έχει τα πλεονεκτήματα τόσο της υψηλής ανάλυσης όσο και της ακρίβειας της μάζας του Orbitrap και της ταχύτητας και της ευαισθησίας του LTQ[36].

### **Πρωτεϊνωματική ανάλυση**

Ο όρος πρωτεϊνωματική ανάλυση αναφέρεται στην ανάλυση του συνόλου των πρωτεϊνών που εκφράζονται από το γονιδίωμα, τα κύτταρα ή τους βιολογικούς οργανισμούς σε μια δεδομένη χρονική στιγμή. Περιλαμβάνει τον ποσοτικό προσδιορισμό της αφθονίας και της έκφρασης των πρωτεϊνών, την ταυτοποίηση αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, την ανίχνευση μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων (PTMs) και τον ρόλο τους ως συνάρτηση του χρόνου, του χώρου και του κυτταρικού τύπου. Η ανάπτυξη της πρωτεϊνωματικής ανάλυσης αυξήθηκε δυναμικά στα μέσα της δεκαετίας του 1990 όταν οι επιστήμονες που είχαν άμεση ενασχόληση με τις πρωτεΐνες άρχισαν να αναγνωρίζουν τα πλεονεκτήματα της ανάλυσης των πρωτεϊνών που παράγονται από γονίδια και συμμετέχουν σε μηχανισμούς ασθενειών σε μοριακό επίπεδο. Υπάρχουν γενικά τρεις τρόποι για να γίνει η πρωτεϊνωματική ανάλυση με τη χρήση MS και είναι οι εξής: top-down, middle-down και bottom-up. Η επιλογή της top-down ανάλυσης αναφέρεται στον άμεσο διαχωρισμό άθικτων πρωτεϊνών ενώ η bottom-up τεχνική αναφέρεται στον χαρακτηρισμό των πεπτιδίων που προκύπτουν από την πέψη πρωτεϊνών εντός διαλύματος. Αυτή η προσέγγιση ονομάζεται και shotgun-proteomics[12].

Η bottom-up τεχνική είναι και αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην διπλωματική αυτή και θα επεξηγηθεί εκτενώς. Αρχικά, το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε και υπάρχει σε επόμενο κομμάτι της εργασίας πιο αναλυτικά ήταν το FASP (Filtred Aided Sample Preperation) το οποίο σε πρώτο στάδιο αποδιατάζει τις πρωτεΐνες εμπεριέχει ένα ευρύτερα χρησιμοποιούμενο αποδιατακτικό το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS), το οποίο οδηγεί σε βελτιωμένη αποτελεσματικότητα της πέψης. Το SDS είναι ένας κατάλληλος χαστροπικός παράγοντας διαλυτοποίησης ,διότι μετουσιώνει και διαταράσσει αποτελεσματικά τα μακρομόρια. Η δέσμευση του μη πολικού άκρου του SDS σε πλευρικές αλυσίδες ή ουρές της πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα την αποτελεσματική μετουσίωση. Η προετοιμασία του δείγματος είναι ένα ζωτικής σημασίας βήμα πριν από την ανάλυση MS, ειδικά όταν ως πηγή ιονισμού επιλέγεται ο ηλεκτροψεκασμός (ESI MS) καθώς μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό τα δεδομένα της πρωτεϊνωματικής ανάλυσης[12].



**Figure 14 Γενική ροή εργασίας πρωτεϊνωματικής ανάλυσης[41]**

Επόμενο βήμα και χαρακτηριστικό της bottom-up ανάλυσης ήταν η πρωτεολυτική πέψη των άθικτων πρωτεϊνών με σκοπό τη δημιουργία πεπτιδίων. Αυτό επιτυγχάνεται με το ένζυμο της θρυψίνης, μία πρωτεάση-σερίνης η οποία κόβει στο τέλος της καρβοξυλικής πλευρά αμινοξέων που έχουν αργινίνη και λυσίνη με την εξαίρεση όταν η λυσίνη και η αργινίνη συνδέονται με N-ασπαρτικό οξύ. Τα κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης που δημιουργούνται προσδίδουν ένα επιπλέον θετικό φορτίο στο πεπτίδιο ,μια ιδιότητα στην οποία βασιζόμαστε για την μετέπειτα εισαγωγή τους στο MS αφού το MS ανιχνεύει μόνο φορτισμένα στοιχεία. Η εκλεκτική πρωτεολυτική πέψη μειώνει την πολυπλοκότητα ενός εξαιρετικά ετερογενούς μείγματος πρωτεϊνών με

ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες και παρακάμπτει τις προκλήσεις που σχετίζονται με την ανέπαφη ανάλυση πρωτεϊνών, ιδιαίτερα όσον αφορά τον ιοντισμό και το χαρακτηρισμό με το MS. Η πέψη, η επαρκής διαλυτοποίηση ή το ξεδίπλωμα όλων των πρωτεϊνών στο μείγμα είναι κρίσιμης σημασίας έτσι ώστε η πρωτεάση να αποκτήσει πρόσβαση στις θέσεις διάσπασης. Έπειτα, τα πεπτίδια ακολούθησαν ένα πρωτόκολλο αφαλάτωσης (Desalting) διότι, ενώ η προσθήκη SDS είναι απαραίτητη για τη διαδικασία πέψης στην bottom-up ανάλυση, το SDS είναι επιζήμιο για την ανάλυση πεπτιδίων στο ESI-MS. Συμπλέγματα θεικού δωδεκυλίου (DS-) κυριαρχούν στα φάσματα, καταστέλλοντας τα πεπτιδικά σήματα [43, 44]. Επίσης, ρυθμιστικά και ανόργανα άλατα που είναι παρόντα στο βιολογικό μείγμα ή προστίθενται κατά την παρασκευή του δείγματος εμποδίζουν σημαντικά την ανάλυση. Οι υψηλές συγκεντρώσεις ανόργανων αλάτων, όπως το χλωριούχο νάτριο που υπάρχει στα βιολογικά δείγματα, είναι δυσμενείς στο ESI-MS λόγω του φαινομένου της μήτρας που προκαλεί καταστολή ή ενίσχυση σήματος [45]. Έπειτα, τα πεπτίδια λίγο πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα ανάλυσης υπόκεινται σε μια τελευταία διαδικασία κατά την οποία αρχικά οξινίζονται με διάλυμα φορμικού οξέος 5% σε νερό για να διατηρήσουν το φορτίο τους και έπειτα με τα sonications που πραγματοποιούνται με υπερήχους διασφαλίζουμε πως είναι πλήρως αποδιαταγμένα. Στην εισαγωγή τους στην RPHPLC τα πεπτίδια διαχωρίζονται με βάση την πολικότητα τους. Συγκεκριμένα, όντας χρωματογραφία αντίστροφης φάσης τα πεπτίδια προσκολλούνται σε μια μη πολική στατική φάση με συνέπεια τα πολικά πεπτίδια να εξέρχονται πρώτα από αυτήν και να ακολουθούν τα υπόλοιπα μετά. Η έκλυση γίνεται με βαθμιδοτό τρόπο, που σημαίνει πως η αναλογία πολικότητας αλλάζει σταδιακά με τον χρόνο, με τον αρχικό διαλύτη που είναι νερό με FA να δίνει την θέση του στο διαλύτη ACN για ένα σύντομο χρονικό περιθώριο και στη συνέχεια να ξαναεπανέρχεται. Τέλος, ο θραυσματοποίηση πεπτιδίων με τη βοήθεια του ESI τα εισαγάγει στο MS και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται με αλγόριθμους από γνωστές βάσεις δεδομένων βιοπληροφορικής ανάλυσης.

### **Βιοπληροφορική ανάλυση**

Η βιοπληροφορική ανάλυση ξεκίνησε με την συλλογή των raw.data που προέκυψαν από την ανάλυση στο MS. Το πρώτο βήμα μετά είναι η

μετατροπή της πληροφορίας από την μορφή m/z σε πρωτεΐνες. Αυτό πραγματοποιείται με το Proteome Discover(PD) 1.3.0.339. Για να γίνει αυτό, ορίζεται ο οργανισμός μελέτης(Homo Sapiens στην δικιά μας περίπτωση) καθώς και τα επιθυμητά PTMS.

Modifications -----		Dynamic								Static	
Cell-lines	Samples	Acetyl(P rotein N- term)	Oxidatio n(M)	Methyl (K)	Phosph o(ST)	Phosph o(Y)	Deamin ed(NQ)	Pyro_ca rbamido methyl (N-term)	Methyl (DE)	Carbamid omethyl	
MDA-V_Control	Fusion00711	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	Fusion00718	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	Fusion00725	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
JMP-1_Control	Fusion00712	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	Fusion00719	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	Fusion00726	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
SUP-M2_Control	Fusion00713	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	Fusion00720	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	Fusion00727	x	x	x	x	x	x	x	x	x	

Figure 15 PTMS σε κάθε δείγμα

Ο παρακάτω πίνακας απεικονίζει και τις παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν από τον αλγόριθμο του Mascot 2.3 για την εξαγωγή των επιθυμητών αποτελεσμάτων.

1. Input Data	Tolerances:
-----	-----
Protein Database: Uni_Human	Precursor Mass Tolerance: 10 ppm
Enzyme Name: Trypsin	Fragment Mass Tolerance: 0.8 Da
Maximum Missed Cleavage Sites: 4	Use Average Precursor Mass: False
Instrument: Default	Spectrum Properties Filter:
Taxonomy: All entries	Min. Precursor Mass: 200 Da
1.1 Peptide Scoring Options:	Max. Precursor Mass: 10000 Da
-----	Total Intensity Threshold: 0
Peptide Cut Off Score: 10	Minimum Peak Count: 1
Peptide Without Protein Cut Off Score: 5	
1.2 Protein Scoring Options:	
-----	
Use MudPIT Scoring: Automatic	
Protein Relevance Threshold: 20	
Protein Relevance Factor: 1	

Figure 16 Παράμετροι Mascot

Τα δεδομένα του PD εισάγονται σε επόμενο βήμα σε ένα εργαλείο βιοπληροφορικής ανάλυσης το οποίο προσφέρει μια καλύτερη οργάνωση της πληροφορίας, το Scaffold 4. Η ανάλυση των δειγμάτων στο Scaffold απεικονίζετε στην κάτω εικόνα.

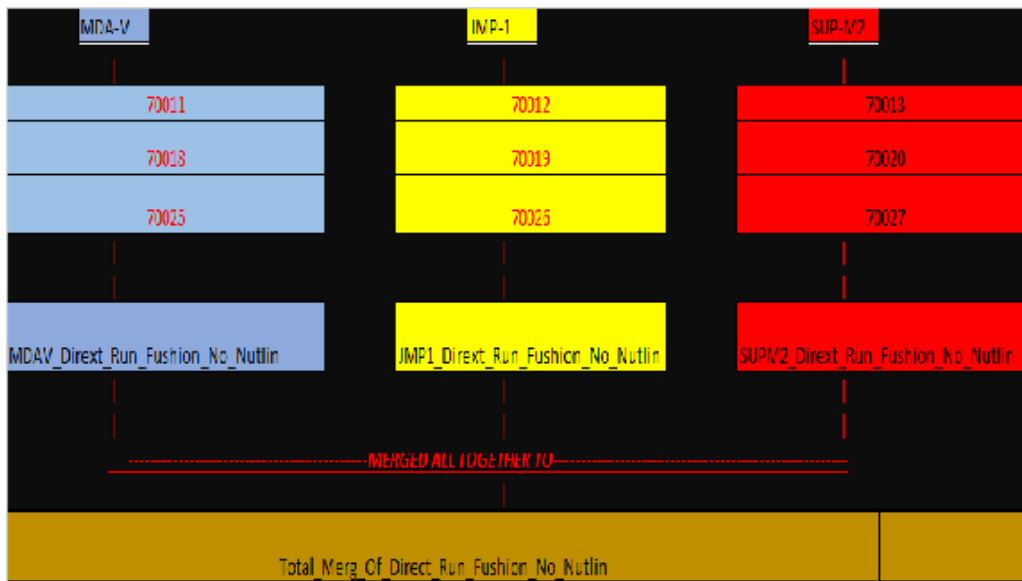


Figure 17 Πορεία φόρτωσης δειγμάτων στο Scaffold

Συγκεκριμένα, και οι 3 βιολογικές επαναλήψεις της εκάστοτε κυτταρικής σειράς φορτώθηκαν στο πρόγραμμα από τον online-Mascot server στον οποίο υπάρχουν τα PD αναλυμένα αρχεία. Προτιμήθηκε αυτός ο τρόπος γιατί, τα αρχεία που δημιουργήθηκαν (MDAV-Direct\_Run\_Fushion\_No\_Nutlin σειρά) όταν συγκριθούν μεταξύ τους θα γίνει άμεση σύγκριση του συνολικού πρωτεϊνώματος και όχι της κάθε υποκατηγορίας της εκάστοτε βιολογικής επανάληψης σε περίπτωση που κάναμε επιλεκτική ανάλυση(3 υπο-αρχεία με μοιρασμένα τα συνολικά PTMS σε 2 από αυτά και ένα χωρίς) αυτής και σε επόμενο βήμα την συγχώνευση τους όπως φαίνεται στην επόμενη εικόνα.



Figure 18 Απεικόνιση εναλλακτικής πορείας για πιο ενδελεχή ανάλυση.

Συνεχίζοντας, το Scaffold μας δίνει την δυνατότητα να δούμε σε τι ποσοστό έχει ταυτοποιηθεί κάθε μια από τις πρωτεΐνες μας,



με τι κριτήρια έχουμε εξαγάγει αυτό το αποτέλεσμα μιας και υπάρχει δυνατότητα να ορίσουμε από τι ποσοστό και πάνω είναι αποδεκτή μια τιμή τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο όσο και σε πεπτιδικό καθώς και με ποσά πεπτίδια μπορεί να οριστεί μια πρωτεΐνη. Το εργαλείο αυτό προσφέρει και μια Label Free ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών στην εκάστοτε κυτταρική σειρά. Στη συνέχεια, η λίστα με τις πρωτεΐνες της κάθε κυτταρικής

Total proteins	2224
Min Protein	80
Min#peptides	1
Protein%FDR	2,7
Min peptides	80
Peptides%FDR	2,35

Figure 19 Παράμετροι Scaffold

σειράς δημιουργούν ένα Venn διάγραμμα(Παρατίθεται στα αποτελέσματα) από το οποίο τόσο οι κοινές όσο και οι μοναδικές πρωτεΐνες υφίστανται περαιτέρω ανάλυση. Συγκεκριμένα, με την χρήση του εργαλείου GO-analysis(Gene-Ontology) γίνεται μια απεικόνιση του εμπλουτισμού έκφρασης των γονιδίων που εκφράζουν τις παρατηρούμενες πρωτεΐνες. Η KEGG χρησιμοποιήθηκε για το pathway analysis, το οποίο μας δείχνει σε πια σηματοδοτικά μονοπάτια συμμετέχουν οι πρωτεΐνες. Ακόμη, το STRING δημιουργεί μια εικόνα στην οποία απεικονίζεται με γραμμές διαβαθμισμένης έντασης το πόσο οι παρατηρούμενες πρωτεΐνες συσχετίζονται-επικοινωνούν η μια με την άλλη.

## Πρωτόκολλα και Τεχνικές

### Χημικά και βιοχημικά αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αποκτήθηκαν από τις εταιρίες Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), Merck (Darmstadt, Γερμανία), Applichem Biochemica (Darmstadt, Γερμανία), Carl Roth (Karlsruhe, Ελβετία) με την υψηλότερη δυνατή καθαρότητα. Τα υλικά για κυτταροκαλλιέργειες προέρχονται από την εταιρεία Invitrogen Corporation (Grand Island, NY). Όλα τα χημικά υψηλής καθαρότητας για τη στήλη HPLC όπως το μυρμηκικό οξύ (FA), το τριφθοροξικό οξύ (TFA) και το ακετονιτρίλιο (ACN) αγοράστηκαν από την εταιρεία Biosolve (Valkenswaard, Ολλανδία). Το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιήθηκε για κυτταρική λύση έγινε στο εργαστήριο ως εξής: 100 mM Tris / HCl (pH = 7,6), 4% SDS και 0,1 M DTT. Η θρυψίνη που χρησιμοποιήθηκε για πρωτεόλυση αγοράστηκε από την εταιρεία Promega GmbH (Mannheim, Germany). Η συγκέντρωση πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με την τεχνική Bradford με BCA από την Bio-Rad (Hercules, Calif) και Pierce (Rockford, IL, Η.Π.Α.) αντίστοιχα.

### Κυτταρικές Σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν 3 κυτταρικές σειρές από διαφορετικό υπότυπο λεμφώματος: Μια από Hodgkin Λέμφωμα και 2 από Non-Hodgkin Λέμφωμα οι οποίες παρατίθενται παρακάτω.

- Κλασσικό Hodgkin Λέμφωμα(cHL):MDA-V
- Λέμφωμα του 'Μανδύα'(MCL):JMP1(M-1)
- Αναπλαστικό Λέμφωμα από Μεγάλα Κύτταρα(ALCL):SUP-M2

00712	JMP-1_Control
00719	JMP-1_Control
00726	JMP-1_Control
00711	MDA-V_Control
00718	MDA-V_Control
00725	MDA-V_Control
00713	SUP-M2_Control
00720	SUP-M2_Control
00727	SUP-M2_Control

Figure 20 Κυτταρικές Σειρές

**MDA-V:** Κλασσικό Hodgkin λέμφωμα Β-λεμφοκυττάρου. Δημιουργήθηκε από τους λεμφικούς κόμβους ασθενούς που διαγνώστηκε με CHL πρώτου σταδίου και ιστολογικό τύπο Κονδυλώδους Σκλήρυνσης.[46]

**JMP-1(M-1):** Non-Hodgkin λέμφωμα Β-λεμφοκυττάρου. Προέρχεται από δείγμα περιφερικού αίματος από άνδρα ηλικίας 58 ετών, με υποτροπιάζον λέμφωμα του μανδύα. Ο ασθενής διαγνώστηκε με λέμφωμα βλαστοειδούς μανδύα σε λευχαιμική φάση και είχε χρωμοσωμική αναδιάταξη  $t(11; 14)(q13; q32)$ . [47]

**SUP-M2: Non-Hodgkin λέμφωμα Τ-λεμφοκυττάρου.** Είναι η μετατόπιση των  $t(2, 5)$  σωματίων που οδηγεί στη δημιουργία του μεταλλαγμένου γονιδίου NPM-ALK ενώ έχει και CD30 +. Αυτά τα κυκλικά κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν είτε μεμονωμένα είτε σε μικρές συγκεντρώσεις (σωρούς). Αυτή η κυτταρική γραμμή προέρχεται από εγκεφαλονωτιαίο υγρό ενός κοριτσιού ηλικίας 5 ετών που θεωρήθηκε ότι πάσχει από ανεξέλεγκτη "κακοήγη ιστοκυττάρωση". [48]

### **Κυτταρικές σειρές, συνθήκες ανάπτυξης και τεστ βιωσιμότητας**

**Κυτταρικές Σειρές Λεμφώματος:** MDA-V (HL) , SUP-M2 (NHL, ALK+ALCL), JMP-1 (NHL, MCL). Οι κυτταρικές σειρές είχαν τον φυσιολογικό τύπο γονιδίου για την p53. [49],[50]

**Παράγοντας ανάπτυξης:** Η κυτταρική ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε 84% RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), με 15% εμβρυϊκό ορό βοδιού που είχε απενεργοποιηθεί με θερμότητα (56 ° C για 30 '), 1% L-γλουταμίνη, 10.000 U / ml πενικιλίνη / . Μετά την προετοιμασία, διηθήθηκε με φίλτρα 0,2 mm για να αποφευχθεί μόλυνση.

**Συνθήκες αποθήκευσης:** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φιάλες και πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε τρυβλία 6 φρεατίων. Η επώαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο υγρό ατμοσφαιρικό αέρα και θερμοκρασία 37 ° C, 95% οξυγόνο και 5% CO<sub>2</sub>

**Δοκιμασία βιωσιμότητας:** Η δοκιμή βιωσιμότητας των κυττάρων (φυσιολογικά κύτταρα / ολικά κύτταρα) έγινε χρησιμοποιώντας αιμοκυτταρόμετρο μετά την χρώση των κυττάρων με trypan blue. Μετά τη μέτρηση των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης, ακολούθησε υπολογισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων και της πυκνότητας των καλλιεργειών. Η μέτρηση της βιωσιμότητας επαναλήφθηκε κάθε δεύτερη ημέρα για την ανανέωση του αυξητικού παράγοντα και τη διατήρηση της κυτταροκαλλιέργειας σε πυκνότητα 10<sup>6</sup> κυττάρων / ml.

## Πειραματική πορεία (συνοπτικά)

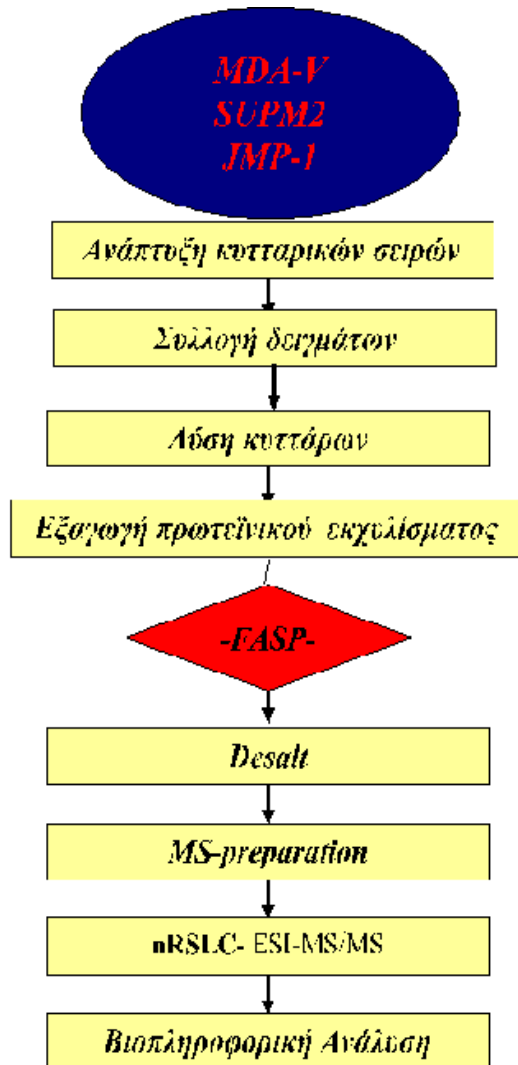


Figure 21. Ποή Εργασίας

### Προετοιμασία Δείγματος Υποβοηθούμενο από Φίλτρο (FASP)

Παρασκευάσμα δειγμάτων χωρίς πήκτωμα(gel) και πρωτεόλυση διεξήχθησαν με τη χρήση πρωτόκολλου προετοιμασίας δείγματος υποβοηθούμενου από φίλτρο (FASP) [51] με μικρές αλλαγές. Εν συντομία, κυτταρολύματα που αντιστοιχούν σε 150 μg πρωτεΐνης υπέστη αναγωγή με προσθήκη 10 mM DTT στους 56 ° C για 30 λεπτά ακολουθούμενα από αλκυλίωση των ελεύθερων θειολικών ομάδων με IAA σε θερμοκρασία δωματίου (RT) στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Ακολούθως, τα λύματα αραιώθηκαν μέχρι 300 μL με πρόσφατα παρασκευασμένη ουρία 8M ουρίας-100mM Tris-HCl (pH 8.5)[52] και τοποθετήθηκε σε μία φυγοκεντρική συσκευή Microsep (30KDa,

Millipore). Οι συσκευές φυγοκεντρήθηκαν σε 13.500 g σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 20 λεπτά. Όλα τα ακόλουθα στάδια φυγοκέντρωσης πραγματοποιήθηκαν υπό παρόμοιες συνθήκες. Για να εξαλειφθεί το υπολειμματικό SDS, διεξήχθησαν τρεις βαθμίδες πλύσεως με τη χρήση 100  $\mu$ L 8M ουρίας-100mM Tris-HCl (pH 8.5) και τελικά για την ανταλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος, οι συσκευές πλύθηκαν τρεις φορές με 100  $\mu$ L 50 mM TEAB (pH 8.5). Στις συμπυκνωμένες πρωτεΐνες προστέθηκαν 100  $\mu$ l ρυθμιστικού διαλύματος πέψης, που περιείχαν, θρυψίνη (1:25 w/w%, ένζυμο σε πρωτεΐνη), 0.2 M GuHCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> σε 50 mM TEAB (pH 8.5) και επώαστηκαν στους 37 ° C για 14 ώρες . Τα παραγόμενα θρυπτικά πεπτίδια ανακτήθηκαν με φυγοκέντρωση ακολουθούμενη από δύο διαδοχικά στάδια έκπλυσης απο 50  $\mu$ l με 50 mM TEAB (pH 8.5) και 50  $\mu$ l πολύ καθαρού νερού. Τέλος, τα πεπτίδια οξιníστηκαν σε pH <3 χρησιμοποιώντας 10% TFA (v/v) και τα προϊόντα πέψης ελέγχθηκαν ποιοτικά όπως περιγράφεται και στο παρακάτω άρθρο[53].

### Αφαλάτωση

Η SPE (Solid-phase Extraction) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική στην προετοιμασία των δειγμάτων. Γενικά, ένα υδατικό διάλυμα δείγματος διέρχεται μέσω ακινητοποιημένης φάσης και στη συνέχεια οι αναλύτες που έχουν προσκολληθεί πάνω σε αυτήν εκλούνται με έναν κατάλληλο διαλύτη ή μείγμα διαλυτών. Τα χαρακτηριστικά της διαμοριακής αλληλεπίδρασης των φάσεων επηρεάζουν τη συγκράτηση και την έκλυση των αναλυτών. Οι χαμηλές χρωματογραφικές αποδόσεις που προκαλούνται από τον σχετικά μεγάλο όγκο δείγματος που χρησιμοποιείτε , την ανεπαρκή συγκράτηση, καθώς και την ανάγκη για πολλαπλές επαναλήψεις/στάδια και εκτεταμένη επένδυση χρόνου περιορίζουν την εφαρμογή της SPE. Αυτά τα μειονεκτήματα είναι ακόμα πιο έντονα όταν αναλύονται βιολογικά συστήματα, όπου η ποσότητα δείγματος είναι πολύ περιορισμένη και η χρήση της SPE μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της αναλυόμενης ουσίας και σε χαμηλή απόδοση δείγματος. Μέσα από τα χρόνια, μελετήθηκαν και αναπτύχθηκαν διάφορες μορφές δειγματοληψίας και απορροφητικών για να παρακάμψουν αυτούς τους περιορισμούς. Μετά την οξίνιση των δειγμάτων, τα πεπτίδια αφαλατώθηκαν χρησιμοποιώντας φίλτρα από C18. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκαν οι εξής ενέργειες ενεργοποίηση, εξισορρόπηση, πλύσεις πεπτιδίων και έκλυση πεπτιδίων. Το φίλτρο ενεργοποιήθηκε με 90% ακετονιτρίλιο (ACN) και στη συνέχεια εξισορροπήθηκε με 5% υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος (FA). Ακολούθως, το πλούσιο σε πεπτίδιο διάλυμα μετά την πρώτη

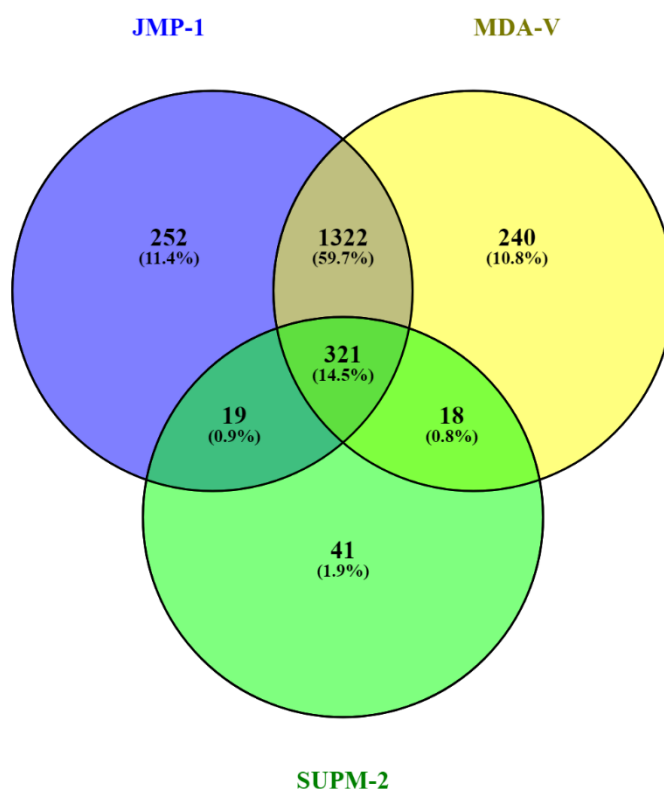
έκλυση του από το φίλτρο επανασυλλέχθηκε και ξαναφιλτραρίστηκε άλλες 2 φορές με σκοπό την δέσμευση των μέγιστων πεπτιδίων πάνω σε αυτό. Η αφαλάτωση διεξήχθη μέσω δύο πλύσεων με 5% FA. Τα αφαλατωμένα πεπτίδια εκλούστηκαν χρησιμοποιώντας 20 µl 90% ACN / 5% FA μέσω 5 πλύσεων και το προϊόν έκλυσης ξηράνθηκε με την βοήθεια μηχανήματος ξήρανσης(SpeedVac).

### **Φασματομετρία μάζας**

Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με την χρήση του nRSLC Ultimate 3000 συνδεδεμένο απευθείας φασματόμετρο μάζας Orbitrap Fusion-Tribrid. Ο χειρισμός που επιλέχθηκε για την ανάλυση από την RSLC στο φασματογράφο ήταν ο εξής: τα πεπτίδια προσυμπυκώθηκαν σε στήλη παρίδευσης 75µm x 2cm C18 για 5 λεπτά με την χρήση TFA 0,1%(v/v) με ροή έκλυσης στα 20µl/min με επακόλουθο διαχωρισμό στην κύρια στήλη C18 διαστάσεων 75µm x 50cm(και τα δύο Acclaim Permapranoniper , Thermo Scientific) με βαθμίδα LC για 120 λεπτά με βαθμιδωτή έκλυση από 3-42% διαλύματος ACN 84% σε 0,1% φορμικό οξύ με ροή έκλυσης 250nl/min. . Το Orbitrap Fusion MS λειτουργεί σε τρόπο λήψης εξαρτώμενο από δεδομένα (OT-Q-CID-IT). Οι σαρώσεις MS έγιναν στο Orbitrap (OT) από 300 έως 2.000 m / z σε ανάλυση 60.000 και για την MS / MS, η απομόνωση προδρόμων στα 1.6m / z πραγματοποιήθηκε από το quadrupole (Q). Ο θρυμματισμός των είκοσι πιο έντονων ιόντων με διαταραχή που προκλήθηκε από σύγκρουση (CID) με κανονικοποιημένη ενέργεια σύγκρουσης 35% και με ανάλυση ταχείας ανίχνευσης MS διεξήχθησαν στην παγίδα ιόντων (IT). Η διάρκεια δυναμικού αποκλεισμού ορίστηκε σε 15 δευτερόλεπτα με ανοχή 10rpm γύρω από τον επιλεγμένο πρόδρομο και τα ισότοπα του. Οι τιμές στόχου AGC ρυθμίστηκαν σε 4,0x10<sup>5</sup> και 1,0 X10<sup>4</sup> και οι μέγιστοι χρόνοι ένεσης ήταν 50ms και 35ms για MS και MS / MS σαρώνει, αντίστοιχα.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Σύνολο Πρωτεϊνών



ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	ΜΟΝΑΔΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ
JMP-1	252
MDA-V	240
SUPM-2	41

Figure 22 Διάγραμμα Venn. Απεικονίζονται οι συνολικές πρωτεΐνες με μια διαδραστικότερη μορφή.

Στο παραπάνω διάγραμμα Venn απεικονίζονται οι 2218 πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν στο πείραμα μας. Ακόμη, είναι εμφανής τόσο οι μοναδικές πρωτεΐνες της κάθε κυτταρικής σειράς όσο και κοινές μεταξύ τους (321). Η βιοπληροφορική ανάλυση που ακολούθησε έγινε στις μοναδικές πρωτεΐνες της κάθε σειράς αλλά και στις κοινές πρωτεΐνες των 3 κυτταρικών σειρών.

## **Σχετική ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών**

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με την βοήθεια δύο υπολογιστικών μεθόδων ποσοτικοποίησης που υπάγονται στο βιοπληροφορικό μέσο SCAFFOLD 4 το emPAI και το NSAF. Το **emPAI** χρησιμοποίησε τον αριθμό των πεπτιδίων που πράγματι αναγνωρίζονται από μια πρωτεΐνη, διαιρούμενο με τον εκτιμώμενο συνολικό αριθμό πεπτιδίων που αναμένεται να ταυτοποιηθεί για την ίδια πρωτεΐνη. Τα αναμενόμενα πεπτιδία υπολογίστηκαν με βάση την αλληλουχία των πρωτεϊνών και τα μεγέθη των πεπτιδίων που προέρχονται από την πρωτεΐνη μετά από ενζυματική πέψη. Η σχετική μοριακή ποσότητα οποιασδήποτε πρωτεΐνης μέσα στο δείγμα μπορεί να υπολογιστεί διαιρώντας την τιμή του emPAI της με το άθροισμα όλων των τιμών emPAI εντός του μίγματος[54]. Το **NSAF** λαμβάνει υπόψη το μήκος της πρωτεΐνης και παρέχει τον παράγοντα κανονικοποιημένης φασματικής αφθονίας για κάθε προσδιορισμένη πρωτεΐνη(NSAF). Η αφθονία οποιασδήποτε δεδομένης πρωτεΐνης μέσα σε ένα μείγμα μπορεί να εκτιμηθεί διαιρώντας την τιμή του NSAF της έναντι του αθροίσματος των τιμών των NSAF για όλες τις υπόλοιπες ταυτοποιημένες πρωτεΐνες[54]. Παρακάτω απεικονίζονται οι τιμές emPAI και NSAF για τις κοινές πρωτεΐνες των τριών κυτταρικών σειρών που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια που θα απεικονιστούν στην επόμενη ενότητα. Οι επικεφαλίδες με πράσινο χρώμα προέκυψαν με τον emPAI υπολογισμό ενώ με μπλε χρώμα από τον NSAF. Οι σημασμένες με κίτρινο χρώμα πρωτεΐνες είναι αυτές που συμμετέχουν στα μονοπάτια αυτά ενώ με μαύρο χρώμα είναι οι 5 πρωτεΐνες με την μεγαλύτερη αφθονία στο κάθε δείγμα. Η αντιπαράθεση αυτή είναι σημαντική για να απεικονιστεί η πραγματική αφθονία της κάθε πρωτεΐνης στο δείγμα αλλά παράλληλα είναι και παράγοντας δυσκολίας στο να γίνει παράθεση και των μοναδικών πρωτεϊνών κάθε σειράς(5 background \*3 έως 4 (πρωτεΐνες/μονοπάτι) ανά κυτταρική σειρά θα δημιουργούσαν το ελάχιστον 112 στοιχεία). Από τα σηματοδοτικά μονοπάτια 4 πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί να συμμετέχουν στο μονοπάτι της mTOR δεν βρέθηκαν στη λίστα με την ποσοτικοποίηση



## Απόπτωση

MDAV	
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprote	29,677
1,4-alpha-glucan-branching enzyme (EC 2.	26,144
26S proteasome non-ATPase regulatory su	24,834
40S ribosomal protein S15 (RIG protein) (S	22,143
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate p	19,515
Serine protease HTRA2, mitochondrial (EC	0,047792

Figure 23 NSAF υπολογισμός.

JMP1	
(E3-independent) E2 ubiquitin-conjugating en	13,727
1,4-alpha-glucan-branching enzyme (EC 2.4.1.1	13,545
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein co	12,721
14 kDa phosphohistidine phosphatase (EC 3.9.	11,973
14-3-3 protein beta/alpha (Protein 1054) (Prot	11,947
Serine protease HTRA2, mitochondrial (EC 3.4.	0,02849

Figure 24 emPAI υπολογισμός

## Κυτταρικός Κύκλος

JMP1		JMP1	
(E3-independent) E2 ubiquitin-c	13,727	26S proteasome regulatory subu	1,4319
1,4-alpha-glucan-branching enzym	13,545	14-3-3 protein theta (14-3-3 prote	1,1505
116 kDa U5 small nuclear ribonu	12,721	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phospho	0,77177
14 kDa phosphohistidine phosph	11,973	2'-5'-oligoadenylate synthase 2 ((	0,55122
14-3-3 protein beta/alpha (Prote	11,947	14-3-3 protein zeta/delta (Protein	0,54434
14-3-3 protein gamma (Protein k	10,748	14-3-3 protein zeta/delta (Protein	0,30891
14-3-3 protein zeta/delta (Prote	8,0202	14-3-3 protein gamma (Protein ki	0,2389
14-3-3 protein theta (14-3-3 prot	5,8802	14-3-3 protein epsilon (14-3-3E)	0,20601
14-3-3 protein epsilon (14-3-3E)	4,7594	14-3-3 protein theta (14-3-3 prote	0,20403
S-phase kinase-associated prote	3,3962	S-phase kinase-associated protei	0,19794
Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1	0,9428	Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1	0,033838
Mitotic spindle assembly checkp	0,51749	Mitotic spindle assembly checkp	0,023175

MDAV		MDAV	
116 kDa U5 small nuclear ribonucle	29,677	(E3-independent) E2 ubiquitin-cor	1,6151
1,4-alpha-glucan-branching enzym	26,144	26S proteasome non-ATPase regul	1,3358
26S proteasome non-ATPase regul	24,834	116 kDa U5 small nuclear ribonucle	1,0303
40S ribosomal protein S15 (RIG pro	22,143	26S proteasome non-ATPase regul	0,80992
14-3-3 protein gamma (Protein kin	19,515	14-3-3 protein theta (14-3-3 protei	0,64168
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphos	19,515	S-phase kinase-associated protein	0,59387
14-3-3 protein theta (14-3-3 protei	10,225	14-3-3 protein gamma (Protein kin	0,54656
14-3-3 protein zeta/delta (Protein	10,089	14-3-3 protein theta (14-3-3 protei	0,36585
14-3-3 protein epsilon (14-3-3E)	9,3307	14-3-3 protein zeta/delta (Protein	0,32984
S-phase kinase-associated protein	9,2311	14-3-3 protein epsilon (14-3-3E)	0,32694
Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)	2,2918	Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)	0,091803
Mitotic spindle assembly checkpoi	0,1617	Mitotic spindle assembly checkpoi	0,014102

SUPM2		SUPM2	
39S ribosomal protein L10, mitocl	56,106	ATP synthase subunit O, mitochi	3,0366
ATP synthase subunit O, mitoch	47,637	26S proteasome regulatory subu	2,0396
26S proteasome regulatory subu	40,118	60S ribosomal protein L27a (Larg	1,6824
2'-5'-oligoadenylate synthase 2 ((	30,713	4-hydroxyphenylpyruvate dioxy	1,3231
4-hydroxyphenylpyruvate dioxyg	18,056	S-phase kinase-associated prote	0,97116
S-phase kinase-associated protei	13,33	26S proteasome regulatory subu	0,90133
14-3-3 protein zeta/delta (Protein	11,06	14-3-3 protein zeta/delta (Prote	0,48873
14-3-3 protein epsilon (14-3-3E)	8,7382	14-3-3 protein gamma (Protein k	0,43768
14-3-3 protein gamma (Protein ki	7,4468	14-3-3 protein epsilon (14-3-3E)	0,27457
14-3-3 protein theta (14-3-3 prote	4,6091	Cyclin-dependent kinase 1 (CDK	0,21501
Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1	3,959	14-3-3 protein theta (14-3-3 prot	0,19779

## Γλυκόλυση/Γλυκονεογέννηση

Figure 25 emPAI και NSAF υπολογισμός

JMP1		JMP1	
(E3-independent	13,727	26S protease	1,4319
1,4-alpha-glucan-	13,545	14-3-3 prote	1,1505
116 kDa U5 small	12,721	Alpha-enola	1,106
14 kDa phosphoh	11,973	L-lactate de	0,77177
14-3-3 protein be	11,947	2',3'-cyclic-n	0,77177
L-lactate dehydro	11,4	L-lactate de	0,66002
Alpha-enolase (E	10,634	2'-5'-oligoad	0,55122
L-lactate dehydro	10,033	14-3-3 prote	0,54434
Glyceraldehyde-3	4,9021	Glyceraldeh	0,47416
Phosphoglycerat	1,9886	Pyruvate kin	0,32577
Glucose-6-phosp	1,7274	Glucose-6-p	0,17992
Pyruvate kinase P	1,6464	Phosphoglyc	0,13449
Hexokinase-2 (EC	0,018322	Hexokinase-	0,000615

MDAV		MDAV	
116 kDa U5 small	29,677	(E3-independi	1,6151
1,4-alpha-glucan-	26,144	26S protease	1,3358
26S proteasome i	24,834	116 kDa U5 si	1,0303
40S ribosomal pro	22,143	Alpha-enola	0,92561
1-phosphatidylin	19,515	26S protease	0,80992
Glyceraldehyde-3	10,964	Glyceraldeh	0,70875
Alpha-enolase (E	8,4351	14-3-3 protei	0,64168
L-lactate dehydro	7,8477	L-lactate de	0,4651
L-lactate dehydro	6,5178	L-lactate de	0,45054
Phosphoglycerat	2,9448	Pyruvate kin	0,18811
Glucose-6-phosp	2,0621	Phosphoglyc	0,12815
Pyruvate kinase P	1,1577	Glucose-6-ph	0,1075
Hexokinase-2 (EC	0,054529	Hexokinase-	0,001913

SUPM2		SUPM2	
Glyceraldehyc	56,106	ATP synthase si	3,0366
39S ribosomal	56,106	26S proteasome	2,0396
ATP synthase :	47,637	Glyceraldehyde	1,9965
26S proteasom	40,118	60S ribosomal p	1,6824
2'-5'-oligoader	30,713	Alpha-enolase	1,6062
Alpha-enolase	25,667	4-hydroxyphen	1,3231
4-hydroxyphe	18,056	26S proteasomi	0,90133
Pyruvate kinas	13,539	Phosphoglycer	0,54566
Phosphoglyce	7,1718	Pyruvate kinase	0,45237
L-lactate dehy	6,1806	L-lactate dehyd	0,26344
L-lactate dehy	2,7294	L-lactate dehyd	0,10149
Glucose-6-pho	1,7016	Glucose-6-phos	0,081257

## PI3K-Akt

JMP1		JMP1	
(E3-independent) E2 ubiquitin-ligase	13,727	26S proteasome regulatory particle non-ATPase	1,4319
1,4-alpha-glucan-branching enzyme	13,545	14-3-3 protein theta (14-3-3θ)	1,1505
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein	12,721	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	0,77177
14 kDa phosphohistidine phosphatase	11,973	2'-5'-oligoadenylate synthetase	0,55122
14-3-3 protein beta/alpha (14-3-3β)	11,947	14-3-3 protein zeta/delta (14-3-3ζ/δ)	0,54434
14-3-3 protein zeta/delta (14-3-3ζ/δ)	8,0202	14-3-3 protein beta/alpha (14-3-3β)	0,3816
14-3-3 protein beta/alpha (14-3-3β)	7,553	14-3-3 protein zeta/delta (14-3-3ζ/δ)	0,30891
14-3-3 protein theta (14-3-3θ)	5,8802	Heat shock protein HSP 90α class B member 1	0,24794
14-3-3 protein epsilon (14-3-3ε)	4,7594	14-3-3 protein epsilon (14-3-3ε)	0,20601
Heat shock protein HSP 90α class B member 1	3,6717	14-3-3 protein theta (14-3-3θ)	0,20403
Serine/threonine-protein phosphatase PP2A (alpha class)	2,9321	Serine/threonine-protein phosphatase PP2A (alpha class)	0,13777
Eukaryotic translation initiation factor 4E	1,4166	Eukaryotic translation initiation factor 4E	0,059156
BAG family molecular chaperone	1,3408	BAG family molecular chaperone	0,042744

MDAV		MDAV	
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein	29,677	(E3-independent) E2 ubiquitin-ligase	1,6151
1,4-alpha-glucan-branching enzyme	26,144	26S proteasome non-ATPase	1,3358
26S proteasome non-ATPase	24,834	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein	1,0303
40S ribosomal protein S6	22,143	26S proteasome non-ATPase	0,80992
1-phosphatidylinositol 3-kinase	19,515	14-3-3 protein theta (14-3-3θ)	0,64168
14-3-3 protein theta (14-3-3θ)	10,225	Heat shock protein HSP 90α class B member 1	0,49877
14-3-3 protein zeta/delta (14-3-3ζ/δ)	10,089	14-3-3 protein beta/alpha (14-3-3β)	0,45715
14-3-3 protein epsilon (14-3-3ε)	9,3307	14-3-3 protein theta (14-3-3θ)	0,36585
14-3-3 protein beta/alpha (14-3-3β)	8,1085	14-3-3 protein zeta/delta (14-3-3ζ/δ)	0,32984
Heat shock protein HSP 90α class B member 1	5,9568	14-3-3 protein epsilon (14-3-3ε)	0,32694
Serine/threonine-protein phosphatase PP2A (alpha class)	2,2544	Serine/threonine-protein phosphatase PP2A (alpha class)	0,10676
Eukaryotic translation initiation factor 4E	1,0225	Eukaryotic translation initiation factor 4E	0,044341
BAG family molecular chaperone	0,42814	BAG family molecular chaperone	0,014752

SUPM2		SUPM2	
39S ribosomal protein L23	56,106	ATP synthase subunit c	3,0366
ATP synthase subunit c	47,637	26S proteasome non-ATPase	2,0396
26S proteasome non-ATPase	40,118	60S ribosomal protein L23	1,6824
2'-5'-oligoadenylate synthetase	30,713	Heat shock protein HSP 90α class B member 1	1,3231
Heat shock protein HSP 90α class B member 1	18,056	4-hydroxyphenylpyruvate lyase	1,3231
4-hydroxyphenylpyruvate lyase	18,056	26S proteasome non-ATPase	0,90133
14-3-3 protein zeta/delta (14-3-3ζ/δ)	11,06	14-3-3 protein zeta/delta (14-3-3ζ/δ)	0,48873
14-3-3 protein epsilon (14-3-3ε)	8,7382	14-3-3 protein beta/alpha (14-3-3β)	0,37463
14-3-3 protein beta/alpha (14-3-3β)	7,0149	14-3-3 protein epsilon (14-3-3ε)	0,27457
14-3-3 protein theta (14-3-3θ)	4,6091	14-3-3 protein theta (14-3-3θ)	0,19779
Serine/threonine-protein phosphatase PP2A (alpha class)	2,5453	Serine/threonine-protein phosphatase PP2A (alpha class)	0,085495
Eukaryotic translation initiation factor 4E	1,5446	Eukaryotic translation initiation factor 4E	0,049549

## Οξειδωτική Φωσφορλίωση

Figure 26 emPAI και NSAF υπολογισμός

JMP1		JMP1	
(E3-independent) E2 ubiquitin	13,727	26S proteasome regulator	1,4319
1,4-alpha-glucan-branching enzyme	13,545	14-3-3 protein theta (14-3-3θ)	1,1505
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein	12,721	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	0,77177
14 kDa phosphohistidine phosphatase	11,973	2'-5'-oligoadenylate synthetase	0,55122
14-3-3 protein beta/alpha	11,947	14-3-3 protein zeta/delta	0,54434
ATP synthase subunit beta	7,7399	ATP synthase subunit beta	0,50439
ATP synthase subunit delta	0,5749	ATP synthase subunit delta	0,017417
MDAV		MDAV	
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein	29,677	(E3-independent) E2 ubiquitin	1,6151
1,4-alpha-glucan-branching enzyme	26,144	26S proteasome non-ATPase	1,3358
26S proteasome non-ATPase	24,834	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein	1,0303
40S ribosomal protein S15 (40S)	22,143	26S proteasome non-ATPase	0,80992
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase class I	19,515	14-3-3 protein theta (14-3-3θ)	0,64168
ATP synthase subunit beta	8,9975	ATP synthase subunit beta	0,5945
ATP synthase subunit delta	0,43418	ATP synthase subunit delta	0,013617
SUPM2		SUPM2	
39S ribosomal protein L1	56,106	ATP synthase subunit O, 16 kDa	3,0366
ATP synthase subunit O, 16 kDa	47,637	26S proteasome regulator	2,0396
26S proteasome regulator	40,118	60S ribosomal protein L2	1,5824
2'-5'-oligoadenylate synthetase	30,713	4-hydroxyphenylpyruvate lyase	1,3231
4-hydroxyphenylpyruvate lyase	18,056	26S proteasome regulator	0,90133
ATP synthase subunit beta	6,4936	ATP synthase subunit beta	0,47707
ATP synthase subunit delta	0,93889	ATP synthase subunit delta	0,026195

**P53**

JMP1		MDAV	
(E3-independent) E2 ubiquitin ligase	13,727	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein	29,677
1,4-alpha-glucan-branching enzyme	13,545	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	26,144
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein	12,721	26S proteasome non-ATPase activator	24,834
14 kDa phosphohistidine phosphatase	11,973	40S ribosomal protein L16	22,143
14-3-3 protein beta/alpha	11,947	1-phosphatidylinositol 3-kinase	19,515
Cyclin-dependent kinase 2	0,9428	Cyclin-dependent kinase 2	2,2918
SUPM2			
39S ribosomal protein L24	56,106		
ATP synthase subunit c	47,637		
26S proteasome regulatory subunit 1	40,118		
2'-5'-oligoadenylate synthetase	30,713		
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	18,056		
Cyclin-dependent kinase 2	3,959		

Figure 27 emPAI υπολογισμός

JMP1		MDAV	
26S proteasome regulatory subunit 1	1,4319	(E3-independent) E2 ubiquitin ligase	1,6151
14-3-3 protein theta (14-3-3θ)	1,1505	26S proteasome non-ATPase activator	1,3358
2',3'-cyclic-nucleotide 3-phosphodiesterase	0,77177	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein	1,0303
2'-5'-oligoadenylate synthetase	0,55122	26S proteasome non-ATPase activator	0,80992
14-3-3 protein zeta/delta	0,54434	14-3-3 protein theta (14-3-3θ)	0,64168
Cyclin-dependent kinase 2	0,033838	Cyclin-dependent kinase 2	0,091803
SUPM2			
ATP synthase subunit c	3,0366		
26S proteasome regulatory subunit 1	2,0396		
60S ribosomal protein L23	1,6824		
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	1,3231		
26S proteasome regulatory subunit 1	0,90133		
Cyclin-dependent kinase 2	0,21501		

Figure 28 NSAF υπολογισμός

## GO (Gene Ontology) ανάλυση

Η χρήση του GO(Gene Ontology) μας επιτρέπει να αντιστοιχήσουμε τις παρατηρούμενες πρωτεΐνες μας στα γονίδια από τα οποία πιθανώς εκφράζονται. Η λέξη πιθανώς χρησιμοποιείται ,διότι στα δεδομένα που καταχωρούνται για την ανάλυση γίνεται στατιστική ανάλυση που βασίζεται σε αρκετούς παράγοντες. Ακόμα, οι βάσεις δεδομένων μέσα από τις οποίες τα δεδομένα του πειράματος αντιστοιχίζονται στα αντίστοιχα γονίδια δεν προέρχονται 100% από πειραματικά δεδομένα υποδεικνύοντας έτσι πως τόσο η μέθοδος ανίχνευσης των πρωτεϊνών όσο και η επιβεβαίωση τους μέσω άλλων βιολογικών τεχνικών( π.χ. western blot ή ELISA για αντισώματα) ισχυροποιεί την πιστότητα των απεικονισθέντων αναλύσεων. Ο παρακάτω πίνακας δείχνει με βάση το είδος στο οποίο γίνεται η ανάλυση την προέλευση των δεδομένων των βάσεων. Η GO analysis πραγματοποιήθηκε για τις μοναδικές πρωτεΐνες των κυτταρικών σειρών JMP-1, και MDA-V καθώς και στις κοινές πρωτεΐνες των 3 κυτταρικών σειρών. Οι μοναδικές πρωτεΐνες της SUPM-2 δεν έδωσαν κάποιο στατιστικής σημασίας αποτέλεσμα και εξαιρέθηκαν.

Experimental annotations by species

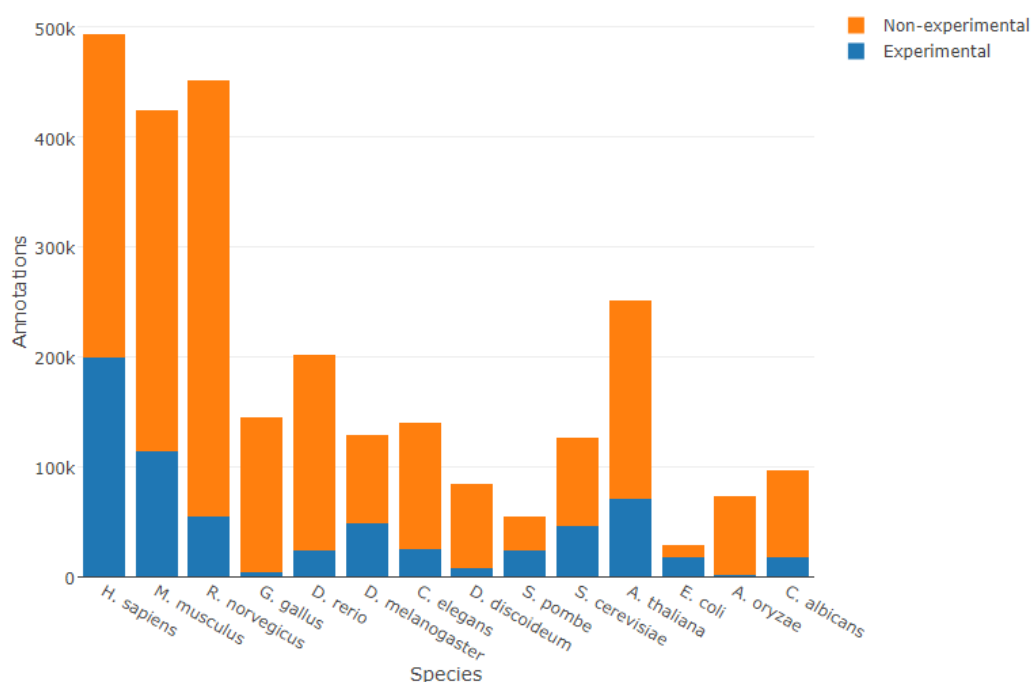


Figure 29 . Διαγραμματική απεικόνιση ανά είδος της προέλευσης των αρχείων. Με πορτοκαλί απεικονίζονται τα μη-πειραματικά ενώ με μπλε τα πειραματικά δεδομένα([http://amigo.geneontology.org/amigo/base\\_statistics](http://amigo.geneontology.org/amigo/base_statistics))

Οι τιμές οι οποίες προέκυψαν στις αναλύσεις δεν ξεπερνούσαν την στατιστική τιμή εύρεσης λάθους (False Discovery Rate) του 0.05. Ο τρόπος με τον οποίο υπολογίζεται κατά

πόσο ένα γονίδιο είναι εμπλουτισμένο καθώς και το πως προκύπτουν οι στατιστικές παράμετροι αναλύονται ενδελεχώς στο site της πλατφόρμας[55]

Η χρωματική επισήμανση δεν είναι τυχαία. Οι πρωτεΐνες των γονιδίων με ήπιο κίτρινο χρώμα έχουν συνδεθεί με τον καρκίνο. Τα γονίδια με μαύρο χρώμα έχουν εμφανίσει μεγάλο εμπλουτισμό και χρησιμοποιούνται στην προκειμένη περίπτωση ως ένα μέτρο σύγκρισης του εμπλουτισμού των αντίστοιχων επιθυμητών διαδικασιών. Τα υπόλοιπα χρώματα αντιστοιχούν σε γονίδια των οποίων οι πρωτεΐνες με την βοήθεια της πλατφόρμας STRING που αναλύεται παρακάτω έχουν ταυτοποιηθεί πως αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους

### ΜΟΝΑΔΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ JMP-1

GO biological process complete	Homo sapiens (REF)	upload_1	expected	Fold Enrichment +/-	raw P value	FDR
regulation of helicase activity	9	3	3.06	50,46 +	5.83E-05	1.96E-02
peptidyl-lysine modification	300	11	1.98	5,55 +	6.76E-06	3.74E-03
covalent chromatin modification	476	14	3.14	4,45 +	4.37E-06	2.51E-03
symbiont process	734	21	4.85	4,33 +	2.27E-08	2.71E-05
histone modification	354	10	2.34	4,28 +	1.49E-04	4.35E-02
interspecies interaction between organisms	771	21	5.09	4,12 +	5.14E-08	5.69E-05
viral process	662	18	4.37	4,12 +	5.19E-07	4.02E-04
RNA metabolic process	3476	48	22.96	2,09 +	2.51E-07	2.17E-04
gene expression	3782	50	24.98	2 +	6.16E-07	4.55E-04
cellular aromatic compound metabolic process	4776	60	31.55	1,9 +	1.21E-07	1.25E-04
cellular metabolic process	9069	104	59.91	1,74 +	4.61E-14	7.15E-10
metabolic process	9969	108	65.85	1,64 +	5.40E-13	2.79E-09

Figure 30 Γονίδια που σχετίζονται με βιολογικές διαδικασίες.

GO cellular component complete	Homo sapiens (REF)	upload_1	expected	Fold Enrichment +/-	raw P value	FDR
protein phosphatase 4 complex	4	2	2.03	75,69 +	6.30E-04	3.36E-02
phosphatase complex	50	4	3.33	12,11 +	4.35E-04	2.39E-02
protein serine/threonine phosphatase complex	50	4	3.33	12,11 +	4.35E-04	2.46E-02
focal adhesion	394	11	2.60	4,23 +	7.64E-05	5.05E-03
nucleoplasm part	1075	20	7.10	2,82 +	3.16E-05	2.25E-03
mitochondrion	1733	27	11.45	2,36 +	3.17E-05	2.17E-03
nuclear part	4295	58	28.37	2,04 +	1.72E-08	2.21E-06
nucleus	7137	74	47.15	1,57 +	3.56E-06	3.10E-04
cytoplasm	11402	105	75.32	1,39 +	3.12E-07	3.53E-05
organelle	13454	122	88.87	1,37 +	3.70E-10	7.89E-08
intracellular	14596	129	96.42	1,34 +	2.66E-11	1.70E-08

Figure 31 Γονίδια που σχετίζονται με κυτταρική σύσταση.

GO molecular function complete	Homo sapiens (REF)	upload_1	expected	Fold Enrichment +/-	raw P value	FDR
transcription factor activity, RNA polymerase	159	8	1.05	7,62 +	1.48E-05	1.48E-05
transcription factor activity, transcription factor	609	14	4.02	3,48 +	6.26E-05	6.26E-05
protein binding	11523	116	76.12	1,52 +	1.72E-12	1.72E-12
enzyme binding	2198	32	14.52	2,2 +	1.87E-05	1.87E-05

Figure 32 Γονίδια που σχετίζονται με μοριακή λειτουργία.



### ΜΟΝΑΔΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ MDA-V

GO biological process complete	Homo sapiens (REFupload_1)	expected	Fold Enrichment	+/-	raw P value	FDR
actin filament-based process	509	13 3.24		4,01 +	2.79E-05	3.33E-02
cellular macromolecule localization	1348	22 8.58		2,56 +	4.82E-05	3.56E-02
regulation of apoptotic process	1497	24 9.53		2,52 +	2.76E-05	3.57E-02
catabolic process	1950	28 12.42		2,25 +	4.02E-05	3.66E-02
metabolic process	9969	97 63.48		1,53 +	5.55E-09	2.15E-05
cellular process	15084	129 96.06		1,34 +	2.53E-13	3.92E-09

Figure 33 Γονίδια που σχετίζονται με βιολογικές διαδικασίες.

GO cellular component complete	Homo sapiens (REF upload_1)	expected	Fold Enrichment	+/-	raw P value	FDR
cell-substrate junction	402	11 2.56		4,3 +	6.53E-05	5.01E-03
focal adhesion	394	10 2.51		3,99 +	2.55E-04	1.69E-02
cell-substrate adherens junction	397	10 2.53		3,96 +	2.71E-04	1.68E-02
membrane region	379	9 2.41		3,73 +	8.28E-04	4.18E-02
adherens junction	510	11 3.25		3,39 +	4.86E-04	2.59E-02
actin cytoskeleton	470	10 2.99		3,34 +	9.73E-04	4.55E-02
membrane-bounded organelle	12458	118 79.34		1,49 +	3.15E-13	6.04E-10
cytoplasm	11402	104 72.61		1,43 +	2.50E-08	4.00E-06
organelle	13454	122 85.68		1,42 +	1.16E-12	1.11E-09
nucleus	7137	64 45.45		1,41 +	9.58E-04	4.60E-02

Figure 34 Γονίδια που σχετίζονται με κυτταρική σύσταση.

GO molecular function complete	Homo sapiens (REF) upload_1	expected	Fold Enrichment	+/-	raw P value	FDR
NAD binding	58	5 3.7		13,54 +	4.93E-05	3.78E-02
isomerase activity	154	7 9.8		7,14 +	7.54E-05	4.96E-02
catalytic activity	6037	67 38.44		1,74 +	2.46E-07	3.77E-04
binding	14888	120 94.81		1,27 +	2.69E-07	3.09E-04

Figure 35 Γονίδια που σχετίζονται με μοριακή λειτουργία.

## ΚΟΙΝΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΤΩΝ 3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

GO biological process complete	Homo sapiens	(RE upload_1 expected)	Fold Enrichment	+/-	raw P value	FDR
glutaminyl-tRNA aminoacylation	2	2 .02	83,83	+	8.18E-04	2.42E-02
meiotic chromosome movement towards spindle pole	3	2 .04	55,89	+	1.35E-03	3.72E-02
negative regulation of histone H2A K63-linked ubiquitination	3	2 .04	55,89	+	1.35E-03	3.74E-02
negative regulation of histone ubiquitination	3	2 .04	55,89	+	1.35E-03	3.74E-02
pentose-phosphate shunt, oxidative branch	3	2 .04	55,89	+	1.35E-03	3.72E-02
nitrogen compound metabolic process	8640	183 103.06	1,78	+	3.64E-24	2.82E-20
cellular aromatic compound metabolic process	4776	126 56.97	2,21	+	4.09E-21	5.77E-18
primary metabolic process	9162	188 109.29	1,72	+	1.59E-23	4.10E-20
RNA metabolic process	3476	76 41.46	1,83	+	8.24E-08	7.43E-06

Figure 36 Γονίδια που σχετίζονται με βιολογικές διαδικασίες.

GO molecular function complete	Homo sapiens	(RE upload_1 expected)	Fold Enrichment	+/-	raw P value	FDR
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase activity	2	2 .02	83,83	+	8.18E-04	4.32E-02
glutamine-tRNA ligase activity	2	2 .02	83,83	+	8.18E-04	4.28E-02
peptide disulfide oxidoreductase activity	13	4 .16	25,79	+	3.98E-05	3.45E-03
MHC class II protein complex binding	16	4 .19	20,96	+	7.87E-05	5.94E-03
aminoacyl-tRNA editing activity	13	3 .16	19,35	+	8.09E-04	4.33E-02
protein binding	11523	224 137.45	1,63	+	8.40E-32	9.67E-29
binding	14888	243 177.59	1,37	+	1.83E-26	1.40E-23

Figure 37 Γονίδια που σχετίζονται με κυτταρική σύσταση.

## Απεικόνιση αναλυθέντων πρωτεϊνών

Με την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών η κάθε μια από αυτές αποκτά και ένα κωδικό όνομα το οποίο εμπεριέχει τόσο γράμματα όσο και αριθμούς( π.χ A8K5K0). Με βάση το όνομα αυτό γίνεται η αναγνώριση της κάθε πρωτεΐνης από τις βάσεις δεδομένων. Η βάση δεδομένων που επιλέχθηκε για την ανάλυση των μονοπατιών και όντας μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες βάσεις ,η KEGG, απαιτούσε την μετατροπή αυτών των αριθμών στην μορφή K+αριθμό( π.χK00356). Η μετατροπή αυτή έγινε μέσω μια πλατφόρμας που εκτελεί αυτές τις αλλαγές την bioDBnet[56]. Η μετατροπή αυτή μας κόστισε μιας και δεν αντιστοιχήθηκαν όλες οι πρωτεΐνες αλλά ένας αριθμός από αυτές. Ο παρακάτω πίνακας παραθέτει με νούμερα τι πραγματικά αναλύθηκε τόσο στις κοινές όσο και στις μοναδικές πρωτεΐνες.

<b>UNIQUE PROTEINS</b>				
<b>CELL-LINE</b>	<b>JMP-1</b>	<b>MDA-V</b>	<b>SUPM-2</b>	<b>COMMON PROTEINS</b>
<b>ACCESSION NUMBERS(uniProt)</b>	<b>252</b>	<b>240</b>	<b>41</b>	<b>321</b>
<b>TRANSFORMED TO</b>				
<b>ko.form</b>	171	192	23	265
<b>AND MINUS KEGG DATABASE_NOT MATCHED</b>	71	83	10	74
<b>TOTAL PROTEINS(AS CODES) MATCHED</b>	<b>100</b>	<b>109</b>	<b>13</b>	<b>191</b>

Figure 38 Πραγματικοί αριθμοί αναλυθέντων πρωτεϊνών. Από τις 252 στην JMP-1 μόνο οι 100 αντιστοιχήθηκαν σε πρωτεΐνες για ανάλυση μονοπατιών.

## Σηματοδοτικά μονοπάτια

### 1. ΑΠΟΠΤΩΣΗ

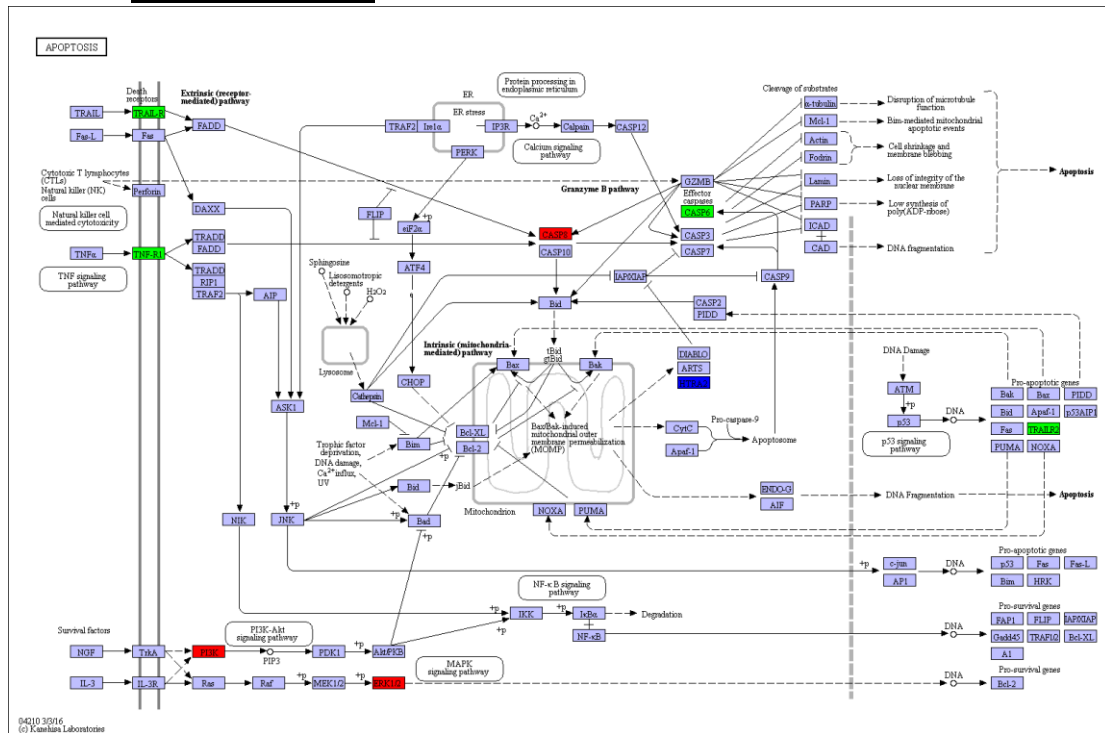


Figure 39. Το μονοπάτι της Απόπτωσης. Πάνω σε αυτό απεικονίζονται οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν και τα χρώματα συνάδουν με το παρακάτω πίνακα.

<b>ΑΠΟΠΤΩΣΗ</b>	<b>Κυτταρική Σειρά</b>	<b>#ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΑΝ</b>	<b>ΟΝΟΜΑΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ</b>
ΜΟΝΑΔΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	JMP-1	3	<ul style="list-style-type: none"> <li>MAPK1_3; mitogen-activated protein kinase 1/3 [EC:2.7.11.24]</li> <li>PIK3R1_2_3; phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit alpha/beta/delta</li> <li>CASP8; caspase 8 [EC:3.4.22.61]</li> </ul>
	MDA-V	3	<ul style="list-style-type: none"> <li>TNFRSF1A; tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A</li> <li>CASP6; caspase 6 [EC:3.4.22.59]</li> <li>TNFRSF10; tumor necrosis factor receptor superfamily member 10</li> </ul>
	SUPM-2	-	
	ΚΟΙΝΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ (ΓΙΑ ΤΙΣ 3 Κ.Σ)	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>HTRA2; HtrA serine peptidase 2 [EC:3.4.21.108]</li> </ul>

## 2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

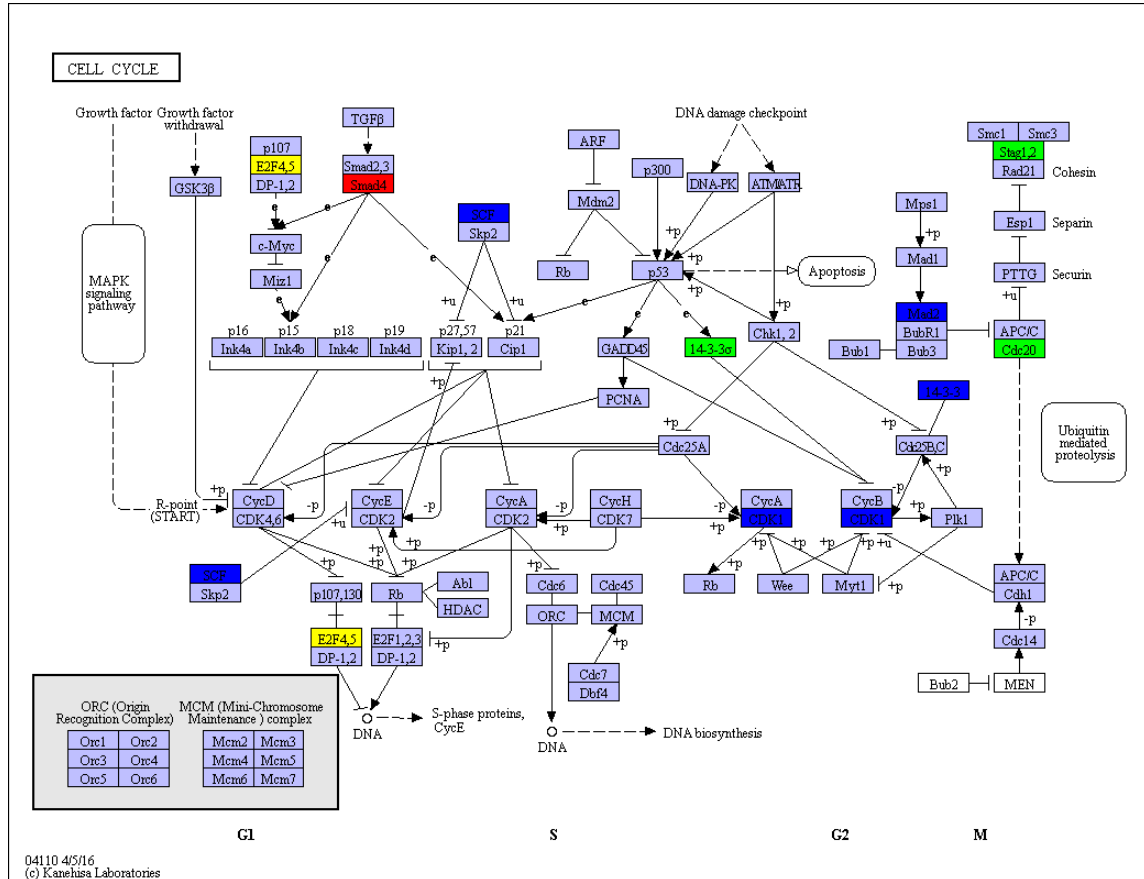


Figure 40 Το μονοπάτι του Κυτταρικού Κύκλου. Πάνω σε αυτό απεικονίζονται οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν και τα χρώματα συνάδουν με το παρακάτω πίνακα.

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	Κυτταρική Σειρά	#ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΑΝ	ΟΝΟΜΑΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ
ΜΟΝΑΔΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	JMP-1	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>SMAD4; mothers against decapentaplegic homolog 4</li> <li>E2F4_5; transcription factor E2F4/5</li> </ul>
	MDA-V	3	<ul style="list-style-type: none"> <li>CDC20; cell division cycle 20, cofactor of APC complex</li> <li>SFN; stratifin</li> <li>STAG1_2; cohesin complex subunit SA-1/2</li> </ul>
	SUPM-2	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>E2F4_5; transcription factor E2F4/5</li> </ul>
ΚΟΙΝΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ (ΓΙΑ ΤΙΣ 3 Κ.Σ)		6	<ul style="list-style-type: none"> <li>CDK1; cyclin-dependent kinase 1 [EC:2.7.11.22 2.7.11.23]</li> <li>MAD2; mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2</li> <li>SKP1; S-phase kinase-associated protein 1</li> <li>YWHAE; 14-3-3 protein epsilon</li> <li>YWHAB_Q_Z; 14-3-3 protein beta/theta/zeta</li> <li>YWHAG_H; 14-3-3 protein gamma/eta</li> </ul>

### 3. *mTOR*

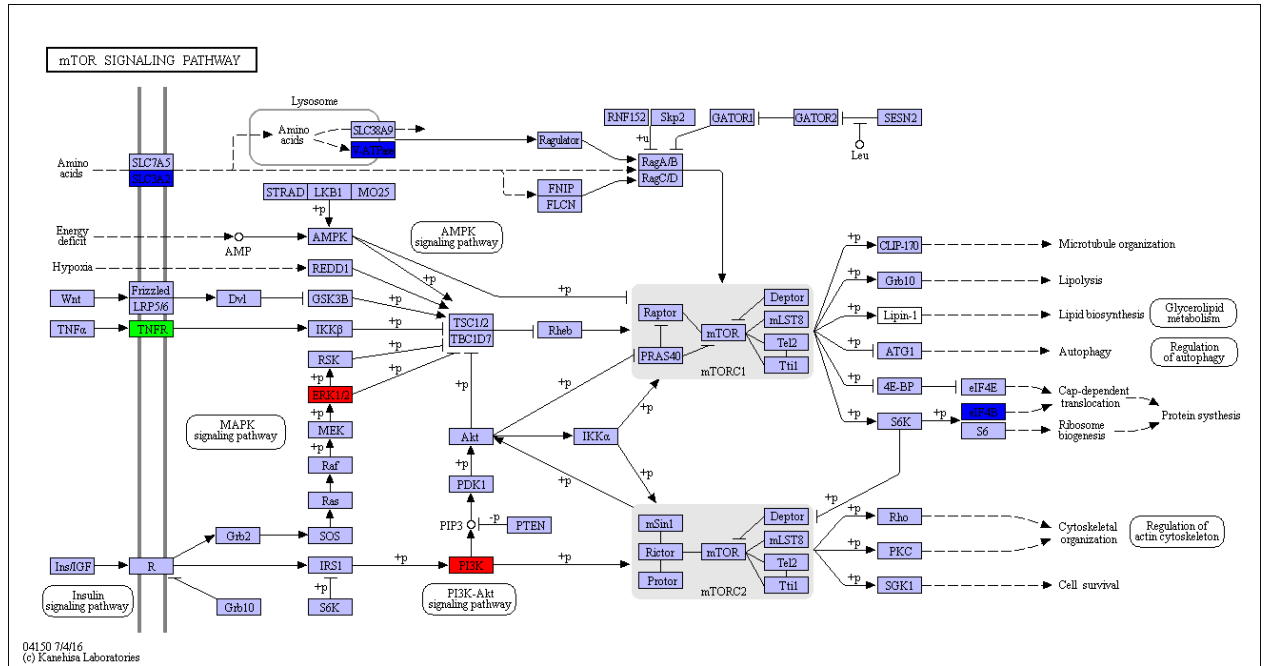


Figure 41 Το μονοπάτι της *mTOR*. Πάνω σε αυτό απεικονίζονται οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν και τα χρώματα

<i>mTOR</i>	Κυτταρική Σειρά	#ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΑΝ	ΟΝΟΜΑΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ
ΜΟΝΑΔΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	JMP-1	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>PIK3R1_2_3; phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit alpha/beta/delta</li> <li>MAPK1_3; mitogen-activated protein kinase 1/3 [EC:2.7.11.24]</li> </ul>
	MDA-V	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>TNFRSF1A; tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A</li> <li>SLC3A2; solute carrier family 3, member 2</li> </ul>
	SUPM-2	-	-
	ΚΟΙΝΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ (ΓΙΑ ΤΙΣ 3 Κ.Σ)	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>ATP6V1A; V-type H<sup>+</sup>-transporting ATPase subunit A [EC:3.6.3.14]</li> <li>ATP6V1F; V-type H<sup>+</sup>-transporting ATPase subunit F</li> <li>EIF4B; translation initiation factor 4B</li> <li>SLC3A2; solute carrier family 3, member 2</li> </ul>

συνάδουν με το παρακάτω πίνακα.

## 4. p53

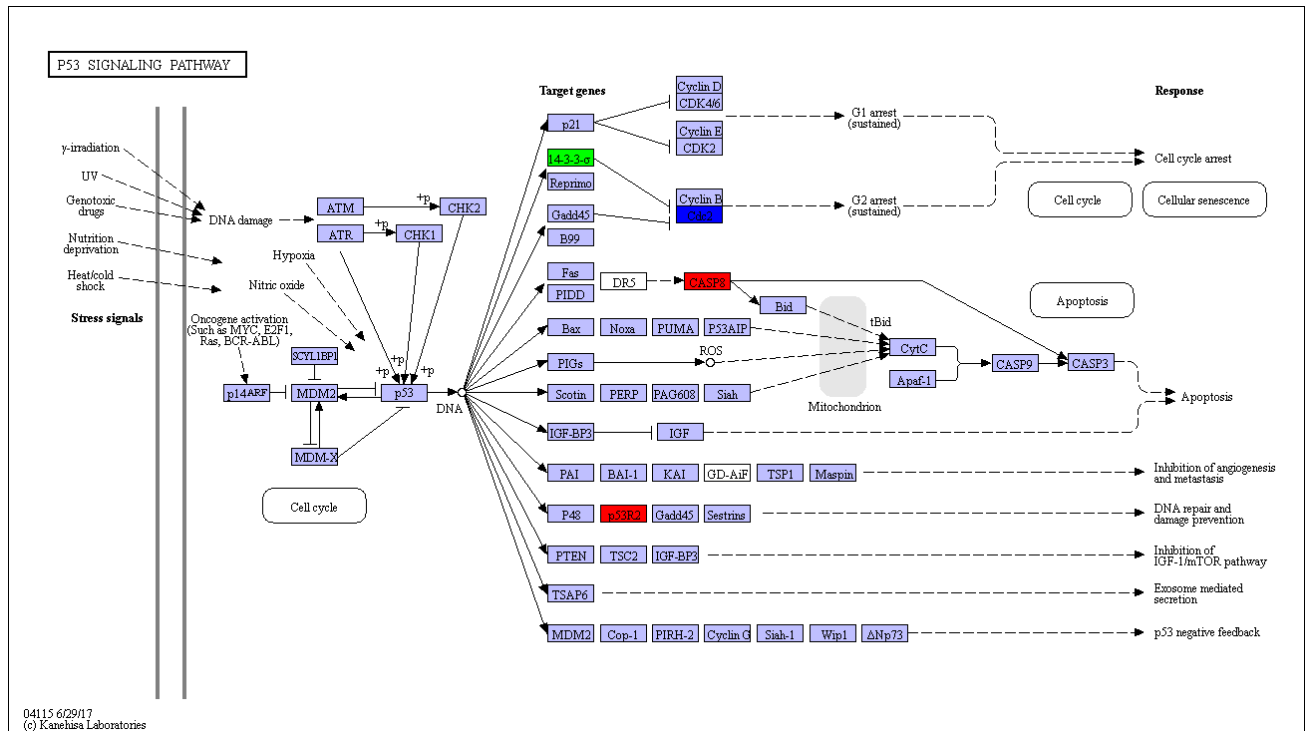


Figure 42 Το μονοπάτι του p53. Πάνω σε αυτό απεικονίζονται οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν και τα χρώματα συνάδουν με το παρακάτω πίνακα.

<b>P53</b>	Κυτταρική Σειρά	#ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΑΝ	ΟΝΟΜΑΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ
ΜΟΝΑΔΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	JMP-1	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>CASP8; caspase 8 [EC:3.4.22.61]</li> <li>RRM2; ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 [EC:1.17.4.1]</li> </ul>
	MDA-V	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>TNFRSF10; tumor necrosis factor receptor superfamily member 10</li> <li>SFN; stratifin</li> </ul>
	SUPM-2	-	-
	ΚΟΙΝΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ (ΓΙΑ ΤΙΣ 3 Κ.Σ)	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>CDK1; cyclin-dependent kinase 1 [EC:2.7.11.22 2.7.11.23]</li> </ul>

## 5. ΓΛΥΚΟΛΥΣΗ/ΓΛΥΚΟΝΕΟΓΕΝΕΣΗ

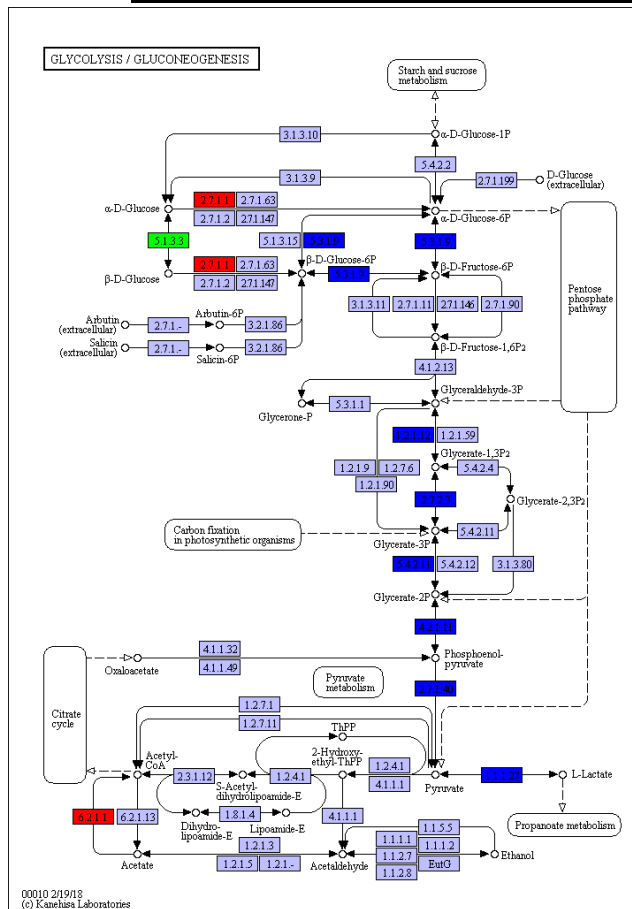


Figure 43 Το μονοπάτι της Γλυκόλυσης/Γλυκονεογένεσης. Πάνω σε αυτό απεικονίζονται οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν και τα χρώματα συνάδουν με το παρακάτω πίνακα.

<b>Glycolysis Gluconeogenesis</b>	Κυτταρική Σειρά	#ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΑΝ	ΟΝΟΜΑΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ
ΜΟΝΑΔΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	JMP-1	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>HK; hexokinase [EC:2.7.1.1]</li> <li>ACSS; acetyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.1]</li> </ul>
	MDA-V	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>galM; aldose 1-epimerase [EC:5.1.3.3]</li> <li>PGAM; 2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase [EC:5.4.2.11]</li> </ul>
	SUPM-2	-	-
	ΚΟΙΝΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ (ΓΙΑ ΤΙΣ 3 Κ.Σ)	7	<ul style="list-style-type: none"> <li>LDH; L-lactate dehydrogenase</li> <li>GAPDH; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</li> <li>PK; pyruvate kinase</li> <li>PGK; phosphoglycerate kinase</li> <li>ENO; enolase</li> <li>GPI; glucose-6-phosphate isomerase</li> <li>PGAM; 2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase</li> </ul>



## 6. PI3K-Akt

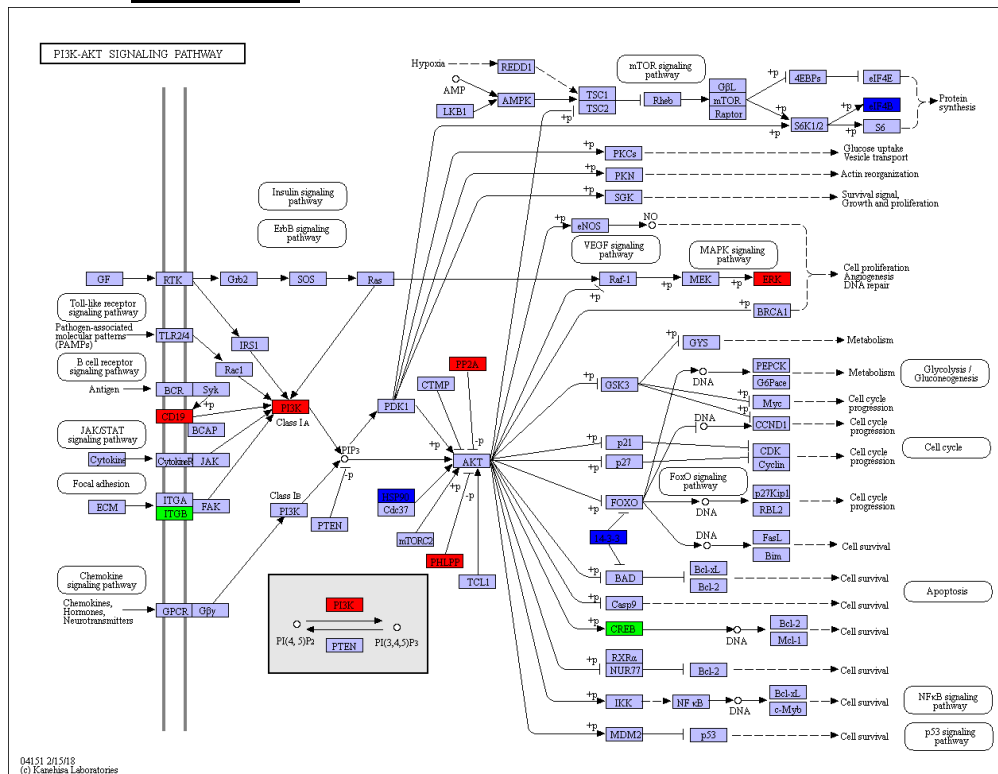


Figure 44 Το μονοπάτι της PI3K-Akt. Πάνω σε αυτό απεικονίζονται οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν και τα χρώματα συνάδουν με τα παρακάτω πίνακα.

<b>PI3K-Akt</b>	Κυτταρική Σειρά	#ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΑΝ	ΟΝΟΜΑΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ
ΜΟΝΑΔΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	JMP-1	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>PIK3R1_2_3; phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit alpha/beta/delta</li> <li>MAPK1_3; mitogen-activated</li> </ul>

			<p>protein kinase 1/3 [EC:2.7.11.24]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• PPP2C; serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit [EC:3.1.3.16]</li> <li>• CD19; B-lymphocyte antigen CD19</li> <li>• PHLPP; PH domain and leucine-rich repeat-containing protein phosphatase [EC:3.1.3.16]</li> </ul>
	MDA-V	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PPP2R1; serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit A</li> <li>• ITGB3; integrin beta 3</li> <li>• ITGB7; integrin beta 7</li> <li>• CREB3; cyclic AMP-responsive element-binding protein 3</li> </ul>
	SUPM-2	-	-
	ΚΟΙΝΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ (ΓΙΑ ΤΙΣ 3 Κ.Σ)	7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EIF4B; translation initiation factor 4B</li> <li>• PPP2R1; serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit A</li> <li>• HSP90A; molecular chaperone HtpG</li> <li>• YWHAE; 14-3-3 protein epsilon</li> <li>• HSP90B; heat shock protein 90kDa beta</li> <li>• YWHAB_Q_Z; 14-3-3 protein beta/theta/zeta</li> <li>• YWHAG_H; 14-3-3 protein gamma/eta</li> </ul>

## 7. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ

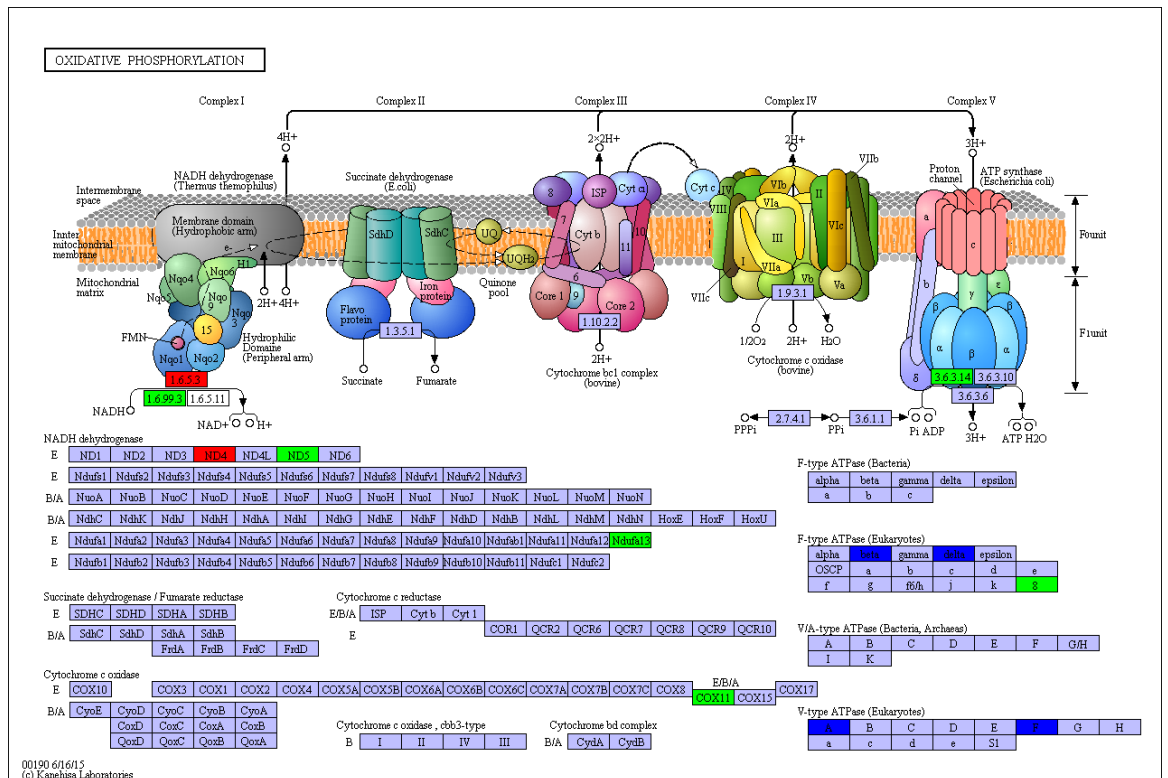


Figure 45 Το μονοπάτι της Οξειδωτικής Φωσφορυλίωσης. Πάνω σε αυτό απεικονίζονται οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν και τα χρώματα συνάδουν με το παρακάτω πίνακα

OxPhosp	Κυτταρική Σειρά	#ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΑΝ	ΟΝΟΜΑΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ
ΜΟΝΑΔΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	JMP-1	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>ND4; NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4</li> </ul>
	MDA-V	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>ATPeF08; F-type H<sup>+</sup>-transporting ATPase subunit 8</li> <li>COX11; cytochrome c oxidase assembly protein subunit 11</li> <li>ND5; NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5</li> <li>NDUFA13; NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex subunit 13</li> </ul>
	SUPM-2	-	-
	ΚΟΙΝΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ (ΓΙΑ ΤΙΣ 3 Κ.Σ)	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>ATPeF1B; F-type H<sup>+</sup>-transporting ATPase subunit beta</li> <li>ATPeF1D; F-type H<sup>+</sup>-transporting ATPase subunit delta</li> <li>ATPeV1A; V-type H<sup>+</sup>-transporting ATPase subunit A</li> <li>ATPeV1F; V-type H<sup>+</sup>-transporting ATPase subunit F</li> </ul>

## Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών

Οι παρακάτω εικόνες αποτελούν μια απεικόνιση πρωτεϊνικών δικτύων και κατασκευάστηκαν με την βοήθεια μιας ηλεκτρονικής πλατφόρμας την STRING. Η πλατφόρμα αυτή σχηματίζει αυτά τα δίκτυα με το να συλλέγει πληροφορίες από βάσεις δεδομένων, όπως GO (Gene Ontology) και KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Τα δίκτυα που απεικονίζονται παρακάτω δημιουργήθηκαν από τις μοναδικές πρωτεΐνες καθώς και από τις κοινές μεταξύ των 3 κυτταρικών σειρών. Η έλλειψη της απεικόνισης των μοναδικών πρωτεϊνών της SUPM-2 οφείλεται στις ελάχιστες πρωτεΐνες που είχε με αποτέλεσμα το μη σχηματισμό ενός αξιόπιστου δικτύου. Επίσης, οι πρωτεΐνες των δικτύων χρωματίζονται κατά επιλογή με βάση το πόσο συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, βιολογικές δραστηριότητες καθώς και το σημείο που εντοπίζονται στο κύτταρο. Οι πίνακες κάτω από κάθε εικόνα παραθέτουν αυτά τα στοιχεία. Η επιλογή της κάθε λειτουργίας στην κάθε κατηγορία έγινε κυρίως με βάση τον υψηλό αριθμό έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αυτές σε συνδυασμό με τη στατιστική ένδειξη για την ύπαρξη λάθους.

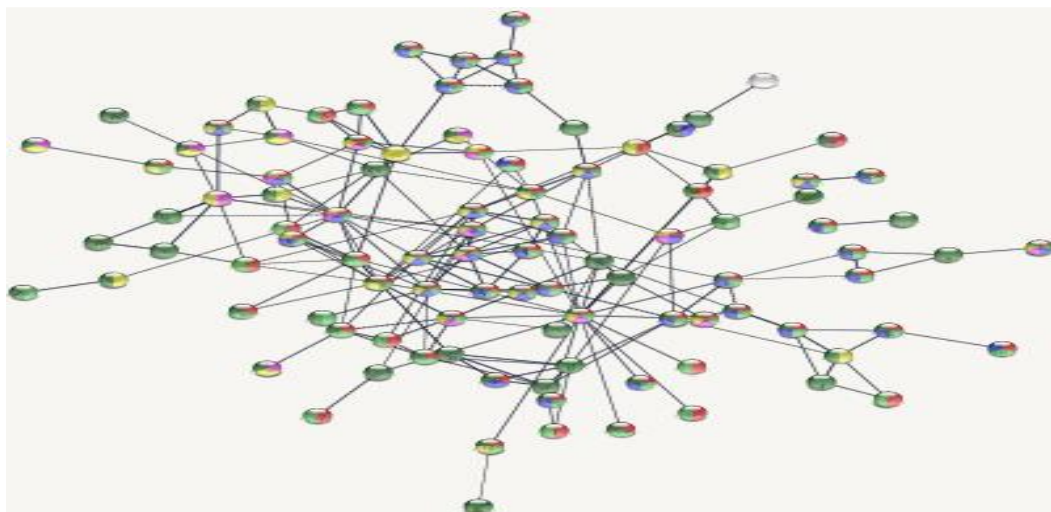


Figure 46 JMP-1 protein-protein interactions (<https://string-db.org> STRING) στις μοναδικές πρωτεΐνες της. Όσο πιο σκούρες είναι οι γραμμές τόσο μεγαλύτερη επιβεβαίωση υπάρχει από δεδομένα ότι υπάρχει αλληλεπίδραση. Το δίκτυο βασίστηκε σε 141 πρωτεΐνες.

<b>Biological Process (GO)</b>				
	<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
RED	GO:0044237	cellular metabolic process	87	6.23e-06
GREEN	GO:0008152	metabolic process	85	0.00198
BLUE	GO:0010467	gene expression	46	0.00563
<b>Molecular Function (GO)</b>				
YELLOW	GO:0005515	protein binding	50	0.0308
PURPLE	GO:0019899	enzyme binding	23	0.0273
<b>Cellular Component (GO)</b>				
DEEP GREEN	GO:0005622	intracellular	108	0.000114

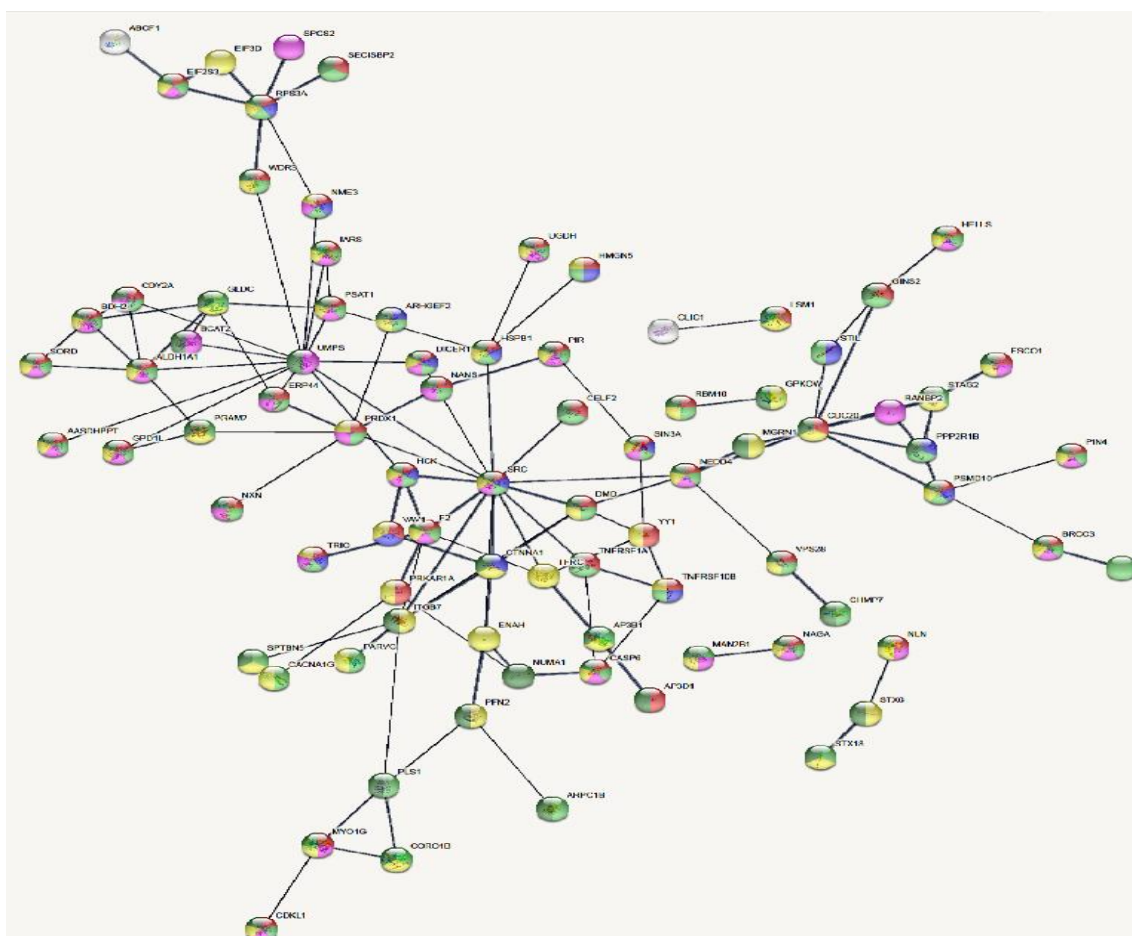


Figure 47 MDA-V protein-protein interactions (<https://string-db.org> STRING) στις μοναδικές της πρωτεΐνες. Όσο πιο σκούρες είναι οι γραμμές τόσο μεγαλύτερη επιβεβαίωση υπάρχει από δεδομένα ότι υπάρχει αλληλεπίδραση. Το δίκτυο βασίστηκε σε 132 πρωτεΐνες.

<b>Biological Process (GO)</b>				
	<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
RED	GO:0008152	metabolic process	87	3.27e-05
GREEN	GO:0009987	cellular process	91	0.0408
BLUE	GO:0042981	regulation of apoptotic process	22	0.0195
<b>Molecular Function (GO)</b>				
YELLOW	GO:0005488	binding	87	0.0101
PURPLE	GO:0003824	catalytic activity	57	0.00231
<b>Cellular Component (GO)</b>				
DEEP GREEN	GO:0043227	membrane-bounded organelle	100	8.03e-07

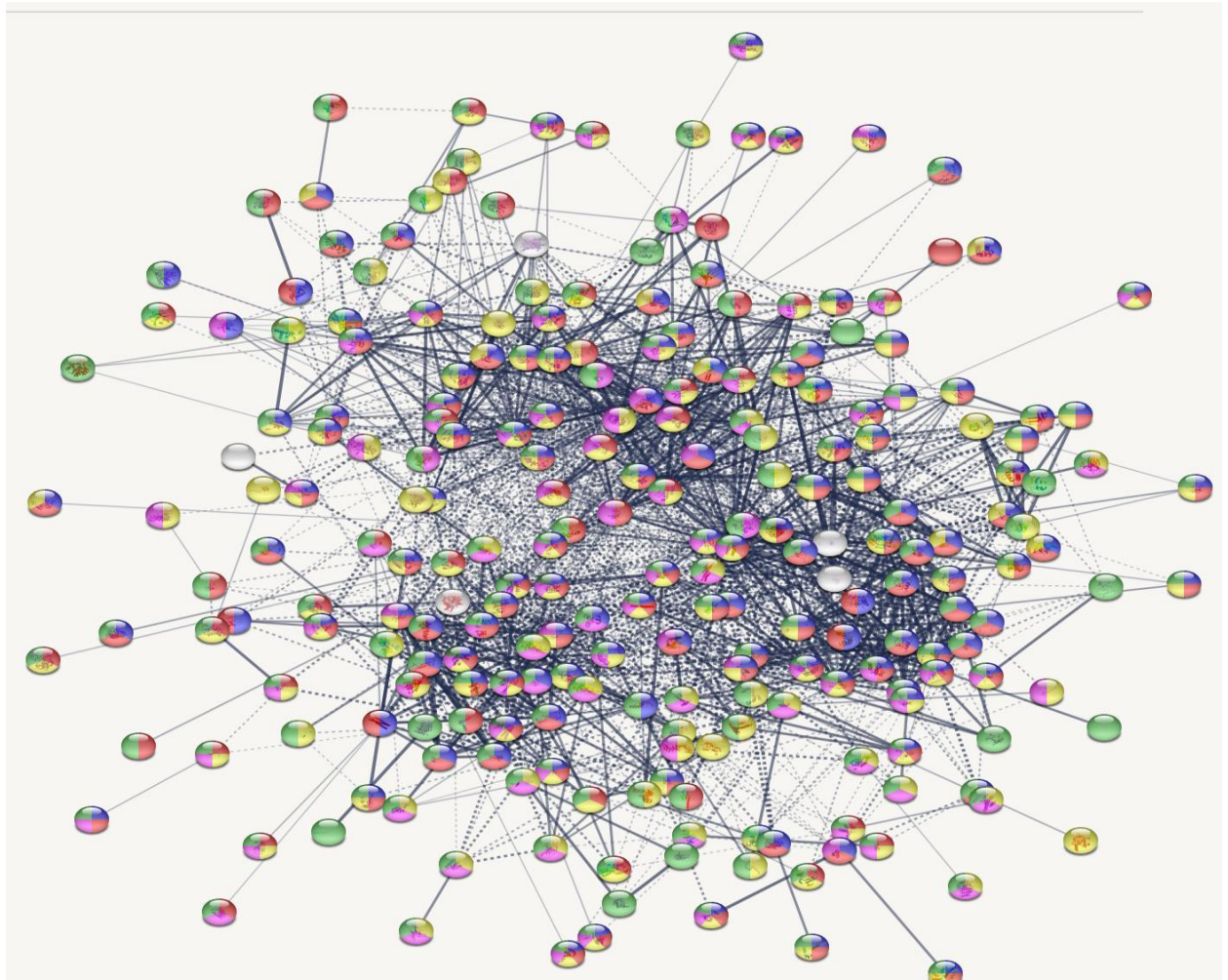


Figure 48 Protein-protein interactions (<https://string-db.org> STRING) στις κοινές πρωτεΐνες. Είναι εμφανές πως μεγαλύτερα δεδομένα είναι ικανά για τη δημιουργία μεγαλύτερου δικτύου. Το δίκτυο βασίστηκε σε 252 πρωτεΐνες.

<b>Biological Process (GO)</b>				
	<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
red	GO:0044238	primary metabolic process	169	2.25e-19
blue	GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	136	1.3e-20
green	GO:0033554	cellular response to stress	54	2.06e-10
<b>Molecular Function (GO)</b>				
yellow	GO:0005488	binding	173	1.8e-10
purple	GO:0005515	protein binding	101	5.92e-10
<b>PFAM Protein Domains</b>				
deep green	PF00244	14-3-3 protein	5	1.68e-05

## **Ανάλυση-Συζήτηση αποτελεσμάτων**

Για περαιτέρω ανάλυση επιλέχθηκαν πρωτεΐνες που είναι κοινές και στις 3 κυτταρικές σειρές αλλά παράλληλα εμφανίζουν και μεγάλο ποσοστό ποσοτικής ανίχνευσης μέσω των μεθόδων emPAI και NSAF. Οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν στα μονοπάτια του Κυτταρικού Κύκλου, της Γλυκόλυσης/Γλυκονεογέννησης, της PI3K-Akt και της Οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

### **ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ**

#### **Cyclin-dependent kinase 1**

Διαδραματίζει βασικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου των ευκαρυωτικών κυττάρων μέσω της διαμόρφωσης του κύκλου κεντροσωμάτων καθώς και της μιτωτικής έναρξης. Προάγει τη μετάβαση G2-M και ρυθμίζει την πρόοδο G1 και τη μετάβαση G1-S μέσω συσχέτισης με πολλαπλές ενδοφασικές κυκλίνες. Απαιτείται σε ανώτερα κύτταρα για είσοδο στη φάση S και την μίτωση. Φωσφορυλιώνει τις εξής πρωτεΐνες APC, AMPH, APC, BARD1, Bcl-xL/BCL2L1, BRCA2, CALD1, CASP8, CDC7, CDC20, CDC25A, CDC25C, CC2D1A, CENPA, CSNK2 proteins/CKII, FZR1/CDH1, CDK7, CEBPB, CHAMP1, DMD/dystrophin, EEF1 proteins/EF-1, EZH2, KIF11/EG5, EGFR, FANCG, FOS, GFAP, GOLGA2/GM130, GRASP1, UBE2A/hHR6A, HIST1H1 proteins/histone H1, HMGA1, HIVEP3/KRC, LMNA, LMNB, LMNC, LBR, LATS1, MAP1B, MAP4, MARCKS, MCM2, MCM4, MKLP1, MYB, NEFH, NFIC, NPC/nuclear pore complex, PITPNM1/NIR2, NPM1, NCL, NUCKS1, NPM1/numatrin, ORC1, PRKAR2A, EEF1E1/p18, EIF3F/p47, p53/TP53, NONO/p54NRB, PAPOLA, PLEC/plectin, RB1, UL40/R2, RAB4A, RAP1GAP, RCC1, RPS6KB1/S6K1, KHDRBS1/SAM68, ESPL1, SKI, BIRC5/survivin, STIP1, TEX14, beta-tubulins, MAPT/TAU, NEDD1, VIM/vimentin, TK1, FOXO1, RUNX1/AML1, SIRT2 and RUNX2.

#### **Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A**

Μέρος του σημείου ελέγχου του συγκροτήματος της ατράκτου που εμποδίζει την εμφάνιση ανάφασης έως ότου όλα τα χρωμοσώματα συντονιστούν σωστά στην φάση της μετάφασης. Απαιτείται για την εκτέλεση του μιτωτικού σημείου ελέγχου το οποίο παρακολουθεί τη διαδικασία της πρόσδεσης του κινετοχωρικού-άξονα και αναστέλλει τη δραστηριότητα του συμπλόκου που προάγει την ανάφαση διαχωρίζοντας το CDC20 έως ότου όλα τα χρωμοσώματα συντονιστούν στην μεταφασική φάση.

#### **S-phase kinase-associated protein 1**

Βασικό συστατικό της SCF (πρωτεΐνη SKP1-CUL1-F-box), σύμπλεγμα ουβικιτινικής λιγάσης, που μεσολαβεί στην ουβικιτίνωση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, τη μεταγωγή σήματος και τη μεταγραφή.

#### **14-3-3 protein epsilon**

Προσαρμοσμένη πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση ενός μεγάλου φάσματος γενικών και εξειδικευμένων οδών σηματοδότησης. Δεσμεύεται σε μεγάλο αριθμό συνεργατών, συνήθως με αναγνώριση μοτίβου φωσφοσερίνης ή φωσφοθρεονίνης. Η σύνδεση γενικά έχει ως αποτέλεσμα τη διαμόρφωση της δραστηριότητας του εταίρου δέσμευσης. Ρυθμίζει θετικά την εξαγωγή φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης HSF1 προς το κυτταρόπλασμα

## **ΓΛΥΚΟΛΥΣΗ/ΓΛΥΚΟΝΕΟΓΕΝΝΕΣΗ**

### **L-lactate dehydrogenase**

Αυτή η πρωτεΐνη εμπλέκεται στο βήμα 1 της υποδιαδρομής που συνθέτει (S) - λακτικό από πυροσταφυλικό.

### **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase**

Έχει δραστηριότητα γλυκεραλδεΰδης-3-φωσφορικής αφυδρογονάσης και νιτροσυλάσης, παίζοντας έτσι ρόλο στη γλυκόλυση και τις πυρηνικές λειτουργίες, αντίστοιχα. Συμμετέχει σε λειτουργίες του πυρήνα, συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφής, της μεταφοράς RNA, του αναδιπλασιασμού του DNA και της απόπτωσης. Οι πυρηνικές λειτουργίες οφείλονται πιθανώς στη δραστηριότητα νιτροζυλάσης που μεσολαβεί στην S-νιτροζυλίωση κυστεΐνης των πυρηνικών πρωτεϊνών-στόχων όπως οι SIRT1, HDAC2 και PRKDC. Ρυθμίζει την οργάνωση και τη συναρμολόγηση του κυτταροσκελετού.

### **Pyruvate kinase PKLR**

Διαδραματίζει βασικό ρόλο στη γλυκόλυση. Εμπλέκεται στο βήμα 5 του υπομονοπατιού που συνθέτει το πυροσταφυλικό από την 3-φωσφορική  $\beta$ -γλυκεραλδεΰδη.

### **Phosphoglycerate kinase 2**

Αυτή η πρωτεΐνη εμπλέκεται στο βήμα 2 του υπομονοπατιού που συνθέτει το πυροσταφυλικό άλας από την 3-φωσφορική D-γλυκεραλδεΰδη.

### **Enolase**

Αυτή η πρωτεΐνη εμπλέκεται στο βήμα 4 του υπομονοπατιού που συνθέτει το πυροσταφυλικό από την 3-φωσφορική  $\beta$ -γλυκεραλδεΰδη.

### **Glucose-6-phosphate isomerase**



Εκτός από το ρόλο του ως γλυκολυτικό ένζυμο, το GPI των θηλαστικού μπορεί να λειτουργήσει ως κυτοκίνη που εκκρίνεται από τον όγκο και έναν αγγειογόνο παράγοντα (AMF) που διεγείρει την κινητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτή η πρωτεΐνη εμπλέκεται στο βήμα 2 του υπομονοπατιού που συνθέτει 3-φωσφορική D-γλυκεραλδεΐδη και φωσφορική γλυκερόνη από D-γλυκόζη.

### **Phosphoglycerate mutase 2**

Διαμετατροπή του 3- και 2-φωσφογλυκερικού με 2,3-διφωσφογλυκερικό εστέρα ως τον εκκινητή της αντίδρασης.

### **PI3K-Akt**

### **translation initiation factor 4B**

Απαιτείται για τη δέσμευση του mRNA σε ριβοσώματα. Λειτουργεί σε στενή συνεργασία με τα EIF4-F και EIF4-A. Δεσμεύεται κοντά στο 5'-τερματικό κάλυμμα του mRNA παρουσία του EIF-4F και του ATP. Προωθεί τη δραστηριότητα της ATPάσης και την δραστηριότητα εκτονωτικής RNA που εξαρτάται από την ATP και αμφοτέρων των EIP4-A και EIP4-P.

### **serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit A**

Απαιτείται για τη δέσμευση του mRNA σε ριβοσώματα. Λειτουργεί σε στενή συνεργασία με τα EIF4-F και EIF4-A. Δεσμεύεται κοντά στο 5'-τερματικό κάλυμμα του mRNA παρουσία του EIF-4F και του ATP. Προωθεί τη δραστηριότητα της ATPάσης και την δραστηριότητα εκτονωτικής RNA που εξαρτάται από την ATP αμφοτέρων των EIP4-A και EIP4-P. Καταλύει τον cis-trans ισομερισμό των προλινιομιδικών πεπτιδικών δεσμών στα ολιγοπεπτίδια.

### **heat shock protein 90kDa beta**

Μοριακή σαπερόνη που προάγει την ωρίμανση, τη δομική διατήρηση και την κατάλληλη ρύθμιση συγκεκριμένων πρωτεϊνών-στόχων που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και στην μεταγωγή σήματος. Συμμετέχει σε ένα λειτουργικό κύκλο που συνδέεται με τη δραστηριότητα της ATPase δραστηριότητας. Αυτός ο κύκλος πιθανώς προκαλεί αλλαγές της διαμόρφωσης στις πρωτεΐνες που είναι άμεσα αλληλεξαρτώμενες, προκαλώντας έτσι την ενεργοποίησή τους. Αλληλεπίδρα δυναμικά με διάφορους συν-συνοδούς που ρυθμίζουν την αναγνώριση υποστρώματος, τον κύκλο της ATPase και τη λειτουργία της σαπερόνης. Συνεργάζεται με μια σειρά κατηγοριών άμεσης αλληλεπίδρασης μέσω της αλληλεπίδρασής της με διάφορες πρωτεΐνες ή σύμπλοκα συν-συνοδού που λειτουργούν ως προσαρμογείς, ταυτόχρονα ικανά να αλληλεπιδρούν με τον συγκεκριμένοστόχο και τον ίδιο τον κεντρικό συνοδό. Η πρόσληψη του ATP και του συν-προστάτη ακολουθούμενη από την πρωτεΐνη-στόχο αποτελεί λειτουργική συνοδό. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας συνοδείας, σωστά διπλωμένη

πρωτεΐνη-στόχος και συν-συνοδό αφήνουν HSP90 σε μια ανοικτή διαμόρφωση με ADP και τελικά, η ADP απελευθερώνεται από το HSP90 η οποία αποκτά ανοικτή διαμόρφωση για τον επόμενο κύκλο

### **14-3-3 protein epsilon**

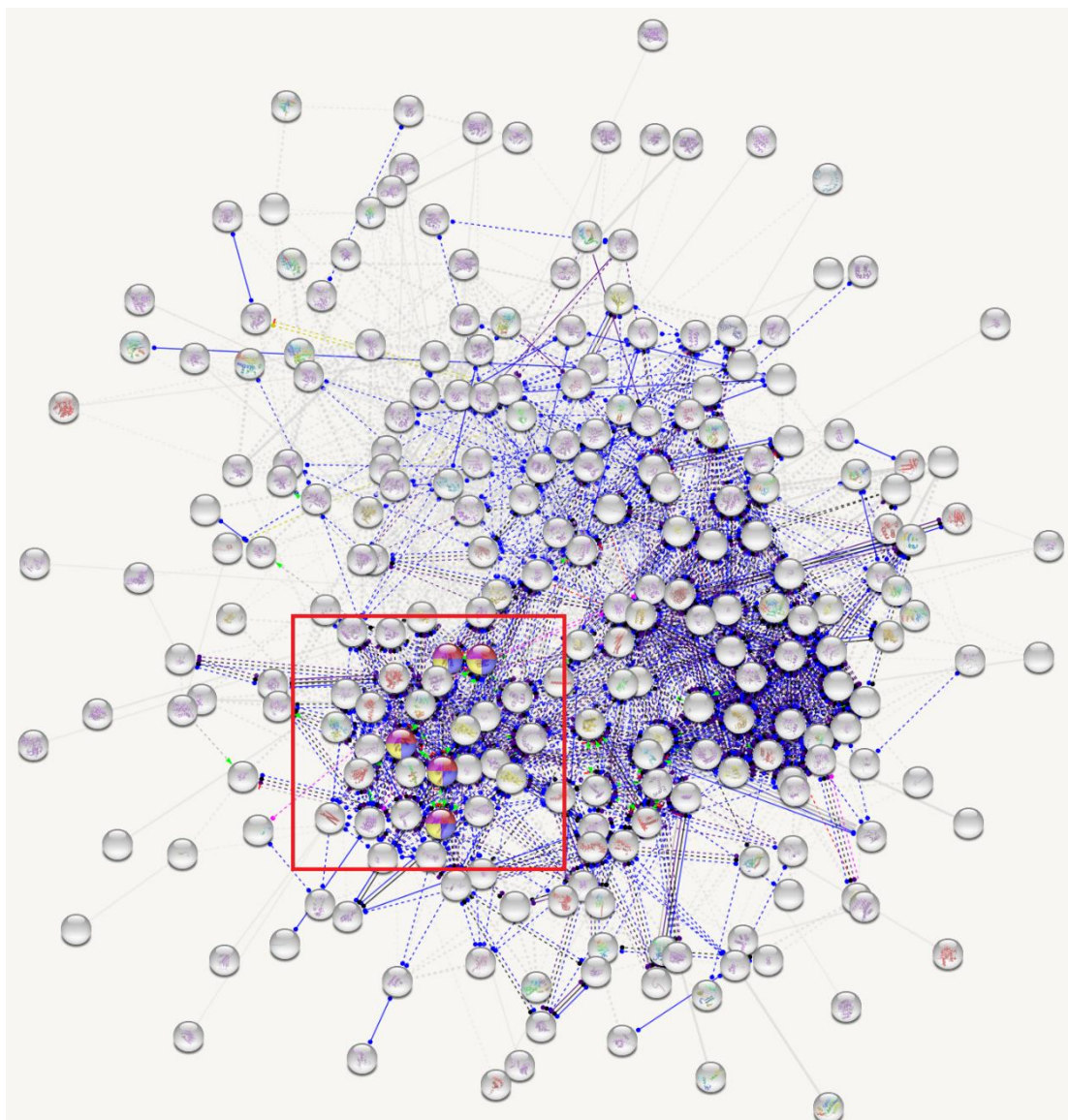
Προσαρμοσμένη πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση ενός μεγάλου φάσματος γενικών και εξειδικευμένων οδών σηματοδότησης. Δεσμεύεται σε μεγάλο αριθμό συνεργατών, συνήθως με αναγνώριση μοτίβου φωσφοσερίνης ή φωσφοθρεονίνης. Η σύνδεση γενικά έχει ως αποτέλεσμα τη διαμόρφωση της δραστηριότητας του εταίρου δέσμευσης. Ρυθμίζει θετικά την εξαγωγή φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης HSF1 προς το κυτταρόπλασμα

### **ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ**

Η συνθάση ATP της μιτοχονδριακής μεμβράνης (F1F0 ATP συνθάση ή το σύμπλεγμα V) παράγει ATP από ADP παρουσία βαθμίδας πρωτονίων διαμέσου της μεμβράνης η οποία παράγεται από σύμπλοκα μεταφοράς ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας. Οι ATPases τύπου F αποτελούνται από δύο δομικές περιοχές, οι οποίες περιέχουν τον εξωμεμβρικό καταλυτικό πυρήνα και το F0 που περιέχει το κανάλι πρωτονίων της μεμβράνης και συνδέονται μεταξύ τους με ένα κεντρικό μίσχο και έναν περιφερειακό μίσχο. Κατά τη διάρκεια της κατάλυσης, η σύνθεση ATP στην καταλυτική περιοχή του P1 συζεύγνυται μέσω ενός περιστροφικού μηχανισμού των κεντρικών υπομονάδων μίσχου προς μετατόπιση πρωτονίων. Οι υπομονάδες άλφα και βήτα σχηματίζουν τον καταλυτικό πυρήνα στο F1. Η περιστροφή του κεντρικού μίσχου ενάντια στις περιβάλλουσες υπομονάδες  $\alpha\beta\beta$  οδηγεί σε υδρόλυση του ATP σε τρεις ξεχωριστές καταλυτικές θέσεις στις βήτα υπομονάδες.

Μέσω τόσο του GO analysis όσο και του STRING παρατηρείται πως τα μονοπάτια του Κυτταρικού κύκλου και της PI3K-Akt στα οποία συμμετέχουν πρωτεΐνες που κατά κύριο λόγο μεταδίδουν σήματα με την μη-ομοιοπολική σύνδεση τους τόσο με απευθείας σύνδεση όσο και με την σύνδεση σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα αποτελούν την πλειονότητα των εντοπισμένων πρωτεϊνών. Ακόμη τα γονίδια υπεύθυνα για πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε τέτοιες διαδικασίες είναι ελαφρά υπεραυξημένα μιας και ο όγκος των γονιδίων στον άνθρωπο αντίστοιχων διεργασιών είναι πολύ μεγάλος και τα εντοπισμένα γονίδια στο πείραμα μας είναι συγκριτικά λίγα. Ακόμη, από το διάγραμμα του STRING παρατηρείται πως πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μεταβολικές διεργασίες αλλά και διεργασίες μεταβολής ουσιών με άζωτο (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) σε συνδυασμό με την κυτταρική απόκριση σε σήματα stress σχηματίζουν κάποια χαρακτηριστικά clusters. Ακόμη με το έντονο πράσινο χρώμα φαίνονται και οι πρωτεΐνες 14-3-3 protein epsilon να αποτελούν σημαντικό ποσοστό του συνόλου, πρωτεΐνες που ανήκουν σε ένα σύνολο πρωτεϊνών που ρυθμίζουν κυτταρικές διαδικασίες που σχετίζονται με καρκινική εξελισιμότητα και ιδιαίτερα σε καρκίνο του λεμφώματος[57]. Αυτές οι πρωτεΐνες χρωματίστηκαν και επιλεγμένα σε ένα STRING διάγραμμα(2) με αυστηρό παράγοντα cluster(MCL=10!Μέγιστο). Αυτό που προσφέρει η πιο στοχευμένη παράθεση είναι

πως οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν σε ένα εκ των δυο μεγάλων cluster και πως η επικοινωνία τους με το υπόλοιπο σύστημα είναι αρκετά μεγάλη. Επίσης, οι κουκίδες υποδηλώνουν πως οι αλληλεπιδράσεις γίνονται με απευθείας σύνδεση.



**Figure 49 STRING 2**

<b>PFAM Protein Domains</b>			
<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
PF00244	14-3-3 protein	5	1.68e-05
<b>INTERPRO Protein Domains and Features</b>			
<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
IPR000308	14-3-3 protein	↑ 5	7.17e-06
IPR023409	14-3-3 protein, conservec	5	7.17e-06
IPR023410	14-3-3 domain	5	7.17e-06

Τέλος, η ύπαρξη ενός cluster(στο STRING των κοινών πρωτεϊνών) με κυρίαρχο το μονοπάτι μεταβολισμού ουσιών με άζωτο αλλά και με την παράλληλη κατοχή υψηλού χρωματισμού του και στα άλλα clusters υποδεικνύει πως πρωτεΐνες με τέτοιο ρόλο αλληλεπιδρούν περισσότερο από τις άλλες χρίζοντας έτσι περαιτέρω μελέτης σε συνδυασμό βέβαια και με άλλα πιο ισχυρά δεδομένα για την στοχοποίηση τους.

### **Συμπεράσματα και μελλοντικές δυνατότητες**

Οι παραπάνω αναλύσεις προσπάθησαν να ταυτοποιήσουν/συνδέσουν πειραματικές πρωτεΐνες με μονοπάτια που είναι συχνά επηρεασμένα στον καρκίνο και κατά επέκταση στο λέμφωμα. Αυτό όμως δεν ήταν και τόσο εύκολη δουλειά , γιατί όπως αναφέρεται και στην κάθε ανάλυση που επιχειρήθηκε υπήρξαν πολλά εμπόδια τα οποία οφείλονται κατά ένα μεγάλο μέρος στην διαχείριση-μετάφραση της πρωτεϊνικής πληροφορίας. Αρκεί να αναλογιστούμε πως σε μίγμα 2218 πρωτεϊνών εκ των οποίων δόθηκε έμφαση στις 252\_JMP-1, 240\_MDA-V,41\_SUPM-2 μοναδικές πρωτεΐνες και 321 κοινές φτάσαμε να αναλύουμε όσο αναφορά τις μοναδικές πρωτεΐνες 100 για την JMP-1, 109 για την MDA-V,13 για την SUPM-2 και 191 όσο αναφορά τις κοινές. Αυτό είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα πως μόνο με συνδυασμό τεχνικών μπορούμε να διασφαλίσουμε την πιστότητα των δεδομένων μας. Όμως δεν παύει η όλη διαδικασία να προβάλλει τα πλεονεκτήματα που θα προσφέρει η διαχρονική αναβάθμιση των ελαττωμάτων αυτών σκεπτόμενος και μόνο την ικανότητα απεικόνισης τόσο πολλών πληροφοριών για ένα δείγμα ξεκινώντας από την απλή ταυτοποίηση-ποσοτικοποίηση έως την ανάλυση βιολογικών διεργασιών και αλληλεπιδράσεων .

## **Bibliography**

### **Primary Sources**

### **Secondary Sources**

### **Uncategorized References**

1.  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAAEGAAPFADBMBXCX>, MS.
2. Alberts, B., Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, *Basic principles of cell biology, 2nd Edition*. BROKEN HILL Publication: p. pg. 759-774.
3. KUBY, T.J.K.R.A.G.B.A.O., 2<sup>η</sup> *Ελληνική Έκδοση 'ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ'*. p. 35.
4. Ranjana Advani, M., Nancy L. Bartlett, MD, Sven de Vos, MD, PhD, Randy Gascoyne, MD, FRCPC, David J. Straus, MD, and M. Anas Younes, *Understanding Hodgkin Lymphoma*. 2012.
5. [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?map04150](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map04150).
6. <http://slideplayer.gr/slide/11468680/>, *Εικόνα λεμφικού συστήματος*.
7. [https://www.researchgate.net/figure/Figure-2-5-Reed-Sternberg-cells-like-owl-eyes-and-Hodgkin-cell-under\\_fig5\\_312553456](https://www.researchgate.net/figure/Figure-2-5-Reed-Sternberg-cells-like-owl-eyes-and-Hodgkin-cell-under_fig5_312553456), *Εικόνα Reed-Sternberg κυττάρων*.
8. 1. Shankland KR, A.J., Hancock BW, PubMed: 22835603, 2012: p. Lancet 380 (9844): 848-57.
9. 3. Tan D, H.S., Hoppe RT, et al, *Improvements in observed and relative survival in follicular grade 1-*

- 2 lymphoma during 4 decades: the Stanford University experience.* PMC free article: PMC3739040] [PubMed: 23777769], 2013: p. . Blood 122 (6): 981-7,.
10. 4. Cabanillas F, V.W., Hagemester FB, et al.: , *Clinical, biologic, and histologic features of late relapses in diffuse large cell lymphoma.* [PubMed: 1737086], 1992: p. Blood 79 (4): 1024-8,.
  11. S.S.E. al., I., ed. S. SH. 2008 Lyon., *WHO Classification of Tumours of the Haemopoietic and Lymphoid tissues* WHO Classification of Tumours of the Haemopoietic and Lymphoid tissues.
  12. Ria Marni Tubaon, P.R.H., and Joselito P. Quirino, *Sample clean-up strategies for Electrospray Ionization Mass Spectrometry applications in bottom-up proteomics: Trends from 2012-2016.* (Australian Centre for Research on Separation Science, School of Physical Sciences-Chemistry,).
  13. Konstantina PsathaLaxmikanth Kolliparad, C.V., Peter Divanacha, and R. Albert SickmanndGeorge! Z., gElias Drakos, Michalis Aivaliotis *Deciphering lymphoma pathogenesis via state-of-the-art mass spectrometry-based quantitative proteomics.* 18 October 2016.
  14. J.M. Koomen, e.a., *Proteomic contributions to personalized cancer care,* *Mol. Cell. Proteom.* 7 (10) (2008) 1780–1794.
  15. E. Roman, A.G.S., *Epidemiology of lymphomas,* *Histopathology* 58 (1) (2011) 4–14.

16. K. Dunleavy, C.G., W.H. Wilson,, *Using biologic predictive factors to direct therapy of diffuse large B-cell lymphoma*. p. Ther. Adv.Hematol. 4 (1) (2013) 43–57.
17. B. Martinez-Delgado, *Peripheral T-cell lymphoma gene expression profiles*, *Hematol. Oncol.* 24 (3) (2006) 113–119.
18. James D. Watson, A.A.C., Richard M. Myers, Jan A. Witkowski, 'ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ DNA' ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΑ-ΜΙΑ ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ. Τρίτη Αγγλική Έκδοση-Πρώτη Ελληνική Έκδοση p. 548-549.
19. [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?map04115](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map04115).
20. <https://www.nature.com/articles/nrc2723>, *Εικόνα p53*.
21. [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?map04110](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map04110).
22. [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?map04210](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map04210).
23. <https://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>, *Εικόνα απόπτωσης*.
24. Mathieu Laplante, D.M.S., *mTOR signaling in growth control and disease*.
25. <http://www.uniprot.org/uniprot/P42345>.
26. <https://www.slideshare.net/dgotto/mtor-growth-regulator-involved-in-disease>, *Εικόνα m TOR*.
27. <https://www.nature.com/articles/nrd1902>, *PI3k/Akt σηματοδοτικό μονοπάτι*.
28. *PI3K / Akt Signaling Interactive Pathway*. <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-pi3k-akt-signaling-resources/pi3k-akt->

[signaling-interactive-pathway/pathways-akt-signaling](#).

29. Kanehisa, M., et al., *KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. Nucleic Acids Res.* 2016: p. 44(D1): p. D457-62.
30. <https://www.jargonwall.com/cancer/hallmarks-cancer-9-reprogramming-energy-metabolism/>, *Εικόνα Γλυκόλυσης*.
31. Jeremy M.Berg, J.L.T., Lubert Stryer, *Βιοχημεία. Ελληνική Έκδοση, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ*: p. pg 488-489.
32. R. Rossignol, R.G., R. Aggeler, K. Yamagata, S.J. Remington, R.A. Capaldi, *Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. Cancer Res.* : p. 64 (2004) 985–993.
33. R.J. DeBerardinis, A.M., E. Daikhin, I. Nissim, M. Yudkoff, S. Wehrli, C.B. Thompson, *Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. Proc. Natl Acad. Sci.* : p. USA 104 (2007) 19345–19350.
34. <http://slideplayer.gr/slide/11908820/>, *Εικόνα Οξειδωτικής Φωσφορυλίωσης*.
35. Giancarlo Solaini , G.S., Alessandra Baracca, *Oxidative phosphorylation in cancer cells.* 16 September 2010. **Review**.
36. John R. Yates, C.I.R. and a.A. Nakorchevsky, *Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications*.
37. Eng JK, M.A., Yates JR, *An approach to correlate tandem mass spectral data of*



- peptides with amino acid sequences in a protein database. J Am Soc Mass Spectrom 5:976–989.*
38. Perkins DN, P.D., Creasy DM, Cottrell JS and (1999), *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.*
39. Graves, P.R.a.T.A., *Haystead, Molecular biologist's guide to proteomics.* Microbiol Mol Biol Rev, 2002. 66(1): p. 39-63; table of contents.
40. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570963912002701>, *ESI.*
41. <http://planetorbitrap.com/top-down-proteomics#.WpqS29uge00>, *ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.*
42. (1995), P.I., *The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass-spectra of peptides.*
43. R.R.O. Loo, N.D., P.C. Andrews,, *Surfactant effects on protein structure examined by electrospray ionization mass spectrometry.* Prot. Sci. 1994,; p. 1975-1983.
44. D. Botelho, M.J.W., D.B. Vieira, S. Fitzsimmons, F. Liu, et al., *Top-down and bottom-up proteomics of sds-containing solutions following mass-based separation.* J. Prot. Res. 2010,; p. 9, 2863-2870.
45. A. Furey, M.M., V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane,, *Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications.* Talanta 2013,; p. 115, 104-122.
46. Rassidakis, G.Z., et al., *Lack of c-kit (CD117) expression in CD30+ lymphomas and*

- lymphomatoid papulosis*. *Mod Pathol*, 2004: p. 17(8): p. 946-53.
47. Goy, A., et al, *Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line M-1*. . *Leuk Lymphoma*, 2004: p. 45(6): p. 1255-60.
48. Morgan, R., et al., *Lack of involvement of the c-fms and N-myc genes by chromosomal translocation t(2;5)(p23;q35) common to malignancies with features of so-called malignant histiocytosis*. *Blood*, 1989: p. 73(8): p. 2155-64.
49. Drakos, E., et al, *The therapeutic potential of p53 reactivation by nutlin-3a in ALK+ anaplastic large cell lymphoma with wild-type or mutated p53*. *Leukemia*, 2009: p. 23(12): p. 2290-9.
50. Amin, H.M., et al., , *Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines*. *Arch Pathol Lab Med*, 2003: p. 127(4): p. 424-31.
51. Wisniewski, J.R., et al., *Universal sample preparation method for proteome analysis*. . 2009. 6(5): p. 359-62.
52. Kollipara, L.a.R.P.Z., *Protein carbamylation: in vivo modification or in vitro artefact?* *Proteomics*, 2013: p. 13(6): p. 941-4.
53. Burkhart, J.M., et al., *Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics*. *J Proteomics*, 2012: p. 75(4): p. 1454-62.
54. IRUN R. COHEN, A.L., JOHN D. LAMBRIS, RODOLFO PAOLETTI, *Advances in Experimental Medicine and Biology*  
*Volume 990*.

55. *GO-EXPLANATION*

[http://pantherdb.org/tips/tips\\_overrep.jsp](http://pantherdb.org/tips/tips_overrep.jsp).

56. *bioDBnet* <https://biodbnet-abcc.ncifcrf.gov>.

57. D. Vergara, a.P.S., c S. De Matteis,d S. Carloni,d P. Lanuti,c M. Marchisio,c and c.A.R. S. Miscia, ab R. Napolitano,d C. Agostinellie and M. Maffia\*ab,  
*Comparative proteomic profiling of Hodgkin lymphoma cell lines†.*