

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**« Σάρωση χημικών μορίων με χρήση in vitro  
δοκιμασίας, για την εύρεση αναστολέων των  
ογκογονιδίων MYC-MAX»**

Της φοιτήτριας: **Καρρά Αθηνά Βασιλική (Α.Μ.: 298)**

Επιβλέπων Καθηγητής: **Σάββας Χριστοφορίδης**

Καθηγητής Βιολογικής Χημείας,

Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Φορέας εκπόνησης: **Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών- ΙΒΕ/ΙΤΕ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ Σεπτέμβριος 2023

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε κατά την περίοδο Νοέμβριος 2021-Απρίλιος 2023 στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών ΙΒΕ/ΙΤΕ.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Σάββα Χριστοφορίδη, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και δέχτηκε να αναλάβει την πτυχιακή μου εργασία, αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές και τη μετάδοση των γνώσεων και εμπειριών που έχει αποκομίσει στα τόσα χρόνια καριέρας του. Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα, η οποία επιμελήθηκε την εκπαίδευσή μου και ήταν πάντοτε παρούσα, πρόθυμη να με βοηθήσει σε οποιοδήποτε ζήτημα προέκυπτε, Τις βαθύτατες ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στον Κωνσταντίνο Γιωτάκη, ο οποίος συνέβαλε ενεργά με υπομονή και άριστο κλίμα συνεργασίας στην εκπαίδευσή μου. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μάρθα Κοντοστάθη για την υποδειγματική συνεργασία κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο και για την υπομονή της προς το μέρος μου κατά την εκπαίδευσή της, καθώς και την Ερβελίνα Νταλάνι για την συνεργασία μας στα πλαίσια της εκπαίδευσής της από εμένα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επιπλέον, όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη συνεργασία, το όμορφο κλίμα και τη βοήθειά τους, καθώς και όλα τα συνεργαζόμενα εργαστήρια, στο πλαίσιο του προγράμματος ΑΚΜΥ, το εργαστήριο της κ. Σαρλή στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης και το εργαστήριο του κ. Τζάκου, που μας παρείχαν τις χημικές ενώσεις, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της διπλωματικής μου εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στους κ. Μιχαηλίδη Θεολόγο και κ. Τράγκα Θεώνη που με τίμησαν με την αποδοχή τους να είναι μέλη της επιτροπής αξιολόγησής μου.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ τον κ. Κωλέττα Ευάγγελο, καθηγητή Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Σχολής για την πολύτιμη καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και όλους τους φίλους και την οικογένειά μου για την στήριξή τους.

# Πίνακας περιεχομένων

---

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
SUMMARY.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Καρκίνος.....	10
1.1.1 Ορισμός και Ιστορική Αναδρομή.....	10
1.1.2 Στατιστικά Στοιχεία .....	12
1.1.3 Αίτια και Δημιουργία .....	13
1.1.4 Παράγοντες Κινδύνου.....	14
1.1.5 Διαφορές καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων.....	15
1.1.6 Γενετική του καρκίνου.....	17
1.1.6.1 Πρωτο-ογκογονίδια και Ογκογονίδια.....	20
1.1.6.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια .....	21
1.2 Ογκογονίδιο MYC.....	23
1.2.1 Ιστορική αναδρομή- Οικογένεια MYC.....	23
1.2.2 ID Πρωτεΐνες .....	27
1.2.3 Βιοχημεία: Δομή και Λειτουργία.....	29
1.2.4 MYC και Καρκίνος.....	32
1.2.5 Θεραπευτικές Προσεγγίσεις.....	32
1.3 Το έργο «AKMY».....	39
1.4 Σκοπός.....	40
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
2.1 Παραγωγή και απομόνωση πρωτεϊνών.....	41
2.1.1 Επιλογή Βακτηριακού στελέχους για παραγωγή πρωτεϊνών .....	41
2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς.....	41
2.1.3 Μετασηματισμός των βακτηρίων.....	42
2.1.4 Τρυβλία επίστρωσης μετασηματισμένων βακτηρίων .....	43
2.1.5 Καλλιέργεια μετασηματισμένων βακτηρίων.....	43
2.1.6 Επαγωγή παραγωγής επιθυμητής πρωτεΐνης με τη χρήση IPTG .....	45
2.1.7 Απομόνωση και αποθήκευση των βακτηρίων από την υγρή καλλιέργεια .....	45

2.1.8	Έλεγχος επαγωγής έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης .....	46
2.1.9	Λύση κυττάρων και απομόνωση/καθαρισμός πρωτεϊνών ενδιαφέροντος .....	46
2.1.10	Λύση των βακτηρίων που υπερεκφράζουν GST-MYC .....	48
2.1.11	Απομόνωση της GST-MYC από το εκχύλισμα.....	48
2.1.12	Λύση των βακτηρίων που υπερεκφράζουν His-MAX και απομόνωση της πρωτεΐνης49	
2.2	Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης- Μέθοδος Bradford.....	52
2.3	Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πιηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE).....	52
2.3.1	Προετοιμασία δειγμάτων ηλεκτροφόρησης.....	54
2.3.2	Χρώση με Coomassie brilliant blue .....	54
2.3.3	Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western – Western Blot .....	54
2.4	Ποσοτικοποίηση των ζωνών της μεμβράνης και στατιστική ανάλυση .....	55
2.5	Χημικές ενώσεις πιθανοί αναστολείς του σχηματισμού του συμπλόκου.....	56
2.6	Δοκιμασία χρωματογραφίας στήλης (Pull-down Assay) για την μελέτη της ανασταλτικής δράσης των χημικών μορίων .....	56
2.7	Δοκιμασία ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) για την μελέτη της ανασταλτικής δράσης των χημικών μορίων.....	62
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	67
3.1	Παραγωγή των πρωτεϊνών GST-MYC και His-MAX.....	67
3.1.1	Έλεγχος επαγωγής παραγωγής της πρωτεΐνης GST-MYC .....	67
3.1.2	Προσδιορισμός συγκέντρωσης GST-MYC στο βακτηριακό εκχύλισμα .....	68
3.1.3	Έλεγχος επαγωγής παραγωγής της πρωτεΐνης His-MAX.....	69
3.1.4	Καθαρισμός και απομόνωση His-MAX από τη βακτηριακή καλλιέργεια και ποσοτικοποίηση.....	70
3.2	Βελτιστοποίηση μεθόδου Χρωματογραφίας Συγγένειας.....	73
3.3	Σάρωση χημικών μορίων- πιθανών αναστολέων του συμπλόκου με Χρωματογραφία Συγγένειας .....	80
3.3.1	Χημικά μόρια (πρόγραμμα «AKMY») .....	81
3.3.2	Χημικά μόρια (Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης εργαστήριο κ. Σαρλή) .	85
3.3.3	Χημικά μόρια (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, εργαστήριο κ. Τζάκου).....	87
3.4	Σχεδιασμός Μεθόδου ELISA για την ανίχνευση πιθανών αναστολέων .....	88

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	104
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	109

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και διάδοση κακοηθών κυττάρων στο σώμα. Οι κακοήθεις όγκοι αναπτύσσονται όταν τα κύτταρα χάνουν την ικανότητά τους να ελέγχουν την αναπαραγωγή τους και αρχίζουν να διαιρούνται εκθετικά, δημιουργώντας μια μάζα κυττάρων που εξαπλώνεται στο περιβάλλον τους. Οι δύο βασικές κατηγορίες γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο είναι τα ογκογονίδια (oncogenes) και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (tumor suppressor genes). Οι γενετικές αλλαγές που οδηγούν ένα κύτταρο σε καρκινογένεση σχετίζονται με τη μείωση της έκφρασης ή της λειτουργικότητας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και την υπερέκφραση ή την αύξηση της λειτουργικότητας των πρωτο-ογκογονιδίων, που μετατρέπονται σε ογκογονίδια. Το C-Myc/ (ή C-MYC ή MYC) είναι ένα από τα πιο σημαντικά ογκογονίδια που έχουν ανακαλυφθεί. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη- μεταγραφικό παράγοντα MYC που ελέγχει την έκφραση άλλων γονιδίων. Όταν η πρωτεΐνη του MYC σχηματίζει ένα ετεροδιμερές με τον παράγοντα MAX, τότε ενεργοποιείται το μεταγραφικό σύμπλοκο, το οποίο όταν συνδεθεί σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA, ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε πλήθος κυτταρικών διεργασιών, γεγονός που μπορεί να επάγει την καρκινογένεση. Η ανακάλυψή του και η αυξημένη συχνότητα με την οποία υπερεκφράζεται, σε πολλούς τύπους καρκίνου το έχουν καταστήσει αντικείμενο έντονης ερευνητικής μελέτης τα τελευταία 40 χρόνια. Στη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί πολλές φαρμακευτικές προσεγγίσεις, μεταξύ των οποίων η σύνθεση μικρών χημικών μορίων που προσδένονται σε επίπεδο πρωτεΐνης στην MYC, αναστέλλοντας τη λειτουργικότητά της.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η βελτιστοποίηση της μεθόδου χρωματογραφίας συγγένειας που έχει εγκαθιδρυθεί από προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου για το έλεγχο της ανασταλτικής δράσης χημικών μορίων έναντι του σχηματισμού του συμπλόκου MYC/MAX. Για την υλοποίηση της δοκιμασίας, παράχθηκαν και απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες MYC και MAX από βακτηριακές καλλιέργειες *E. coli*, σε ανασυνδυασμένη μορφή, έπειτα από προσθήκη κατάλληλων μοριακών ετικετών (GST για την MYC και 6-His για την MAX). Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών μελετήθηκε μέσω της τεχνικής Pull-Down με ακινητοποίηση της GST-MYC σε σφαιρίδια γλουταθειόνης, ενώ η εξακρίβωση του σχηματισμού του συμπλόκου έγινε μετά την ανοσοαποτύπωση των εκλουσμάτων κατά Western. Για τον

έλεγχου της μεθόδου ήταν απαραίτητη η χρήση θετικών και αρνητικών μαρτύρων (controls). Ειδικότερα, ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιούνται σφαιρίδια απουσία GST-MYC, για τον έλεγχο της μη ειδικής δέσμευσης της His-MAX (θόρυβος μεθόδου), ενώ ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιούνται μειούμενες ποσότητες GST-MYC σε σφαιρίδια γλουταθειόνης. Μετά από δοκιμασίες βελτιστοποίησης των ποσοτήτων των πρωτεϊνών, που χρησιμοποιούνται, καταλήξαμε στην ιδανική αναλογία mol GST-MYC/His-MAX=1/500. Έπειτα, το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε για την ταυτοποίηση νέων αναστολέων σχηματισμού του συμπλόκου MYC-MAX. Από τα πειράματα αυτά προέκυψαν αρκετοί νέοι αναστολείς της MYC όπως οι χημικές ενώσεις Myci23s, GZS11, Myci59, Myci63 N-303-4, Smyc-18, PA-04, C44, BS-45, AS-86, MM-5-1, PA-39, EMA-30, B-55, N-191 οι οποίες προκαλούν σχεδόν πλήρη αναστολή σχηματισμού του συμπλόκου. Τα αποτελέσματα προτείνουν πως η μέθοδος του Pull-Down είναι αξιόπιστη, ευαίσθητη και ειδική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια για τον πρωταρχικό εντοπισμό αναστολέων της MYC.

Ακόμη, στα πλαίσια της βελτιστοποίησης της μεθόδου σάρωσης χημικών μορίων για το σύμπλοκο MYC/MAX, επιδιώχθηκε η εγκαθίδρυση ενός νέου πρωτοκόλλου για τον ίδιο σκοπό με τη μέθοδο ELISA, ώστε να καταστεί ακόμα πιο αποτελεσματική, γρήγορη και ακριβής η σάρωση αυτή. Στην προσπάθεια αυτή, χρησιμοποιήθηκαν πιάτα 96- φρεατίων επικαλυμμένα με γλουταθειόνη, με σκοπό την ακινητοποίηση της GST-MYC και προσθήκη His-MAX για τον σχηματισμό του συμπλόκου. Τα πειράματα που έγιναν κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής κατέδειξαν πως η ιδανική αναλογία mol των πρωτεϊνών είναι GST-MYC/His-MAX = 3/100. Η εγκυρότητα της μεθόδου πιστοποιήθηκε με την δοκιμασία και την ποσοτικοποίηση της ανασταλτικής δράσης ενός γνωστού αναστολέα της MYC, του GSZS11, που, σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές, προκαλεί πλήρη αναστολή του συμπλόκου. Αυτή η νέα μεθοδολογία αναμένεται να επιτρέψει την ταχύτερη σάρωση βιβλιοθηκών χημικών μορίων για την εύρεση νέων αναστολέων της MYC, με υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία.

## SUMMARY

Cancer is a disease characterised by the uncontrolled growth and spread of malignant cells in the body. Malignant tumours develop when cells lose their ability to control their reproduction and begin to divide exponentially, creating a mass of cells that spreads into their environment. The two main categories of genes associated with cancer are oncogenes and tumour suppressor genes. The genetic changes that lead a cell to become carcinogenic are associated with a decrease in the expression or functionality of tumour suppressor genes and an overexpression or increase in the functionality of proto-oncogenes, which are converted into oncogenes. C-Myc/ (or C-MYC or MYC) is one of the most important oncogenes discovered. This gene encodes the protein transcription factor MYC that controls the expression of other genes. When the MYC protein forms a heterodimer with the MAX factor, it activates the transcription complex, which when bound to specific regions of DNA, activates the expression of genes involved in a multitude of cellular processes, which can induce carcinogenesis. Its discovery and the increased frequency with which it is overexpressed in many types of cancer have made it the subject of intense research over the last 40 years. Many pharmaceutical approaches have been described in the literature, including the synthesis of small chemical molecules that bind at the protein level of MYC, inhibiting its functionality.

The aim of the present study is to optimize the affinity chromatography method established by previous members of the laboratory to test the inhibitory activity of chemical molecules against the formation of the MYC/MAX complex. To perform the assay, MYC and MAX proteins were produced and isolated from bacterial *E.coli* cultures, in recombinant form, after addition of appropriate molecular tags (GST for MYC and 6-His for MAX). The interaction of the proteins was studied by the Pull-down technique by immobilizing GST-MYC on glutathione beads, while the verification of the complex formation was performed after Western immunoprecipitation of the eluates. To test the method, the use of positive and negative controls was necessary. In particular, beads in the absence of GST-MYC were used as negative controls to check for non-specific binding of His-MAX (method noise), while decreasing amounts of GST-MYC in glutathione beads were used as positive controls. After tests to optimize the amounts of proteins used, we arrived at the ideal GST-MYC/His-MAX mol ratio = 1/500. Then, the protocol was applied to identify new



inhibitors of MYC-MAX complex formation. These experiments resulted in several new MYC inhibitors such as the chemical compounds Myci23s, GZS11, Myci59, Myci63 N-303-4, Smyc-18, PA-04, C44, BS-45, AS-86, MM-5-1, PA-39, EMA-30, B-55, N-191 which cause almost complete inhibition of complex formation. The results suggest that the Pull-down method is reliable, sensitive and specific and can be safely used for the primary identification of MYC inhibitors.

Furthermore, in the context of the optimization of the chemical molecule screening method for the MYC/MAX complex, a new protocol was established for the same purpose using the ELISA technique, in order to make this scan even more efficient, fast and accurate. In this effort, 96-well plates coated with glutathione were used to immobilize GST-MYC and add His-MAX to form the complex. Experiments performed during the master thesis demonstrated that the ideal mole ratio of the proteins is  $\text{GST-MYC/His-MAX} = 3/100$ . Confirmation of the reliability of the method was validated by testing and quantifying the inhibitory effect of a known inhibitor of MYC, GSZS11, which, according to previous reports, causes complete inhibition of the complex. This new methodology is expected to allow faster screening of chemical molecule libraries in search of novel MYC inhibitors with high specificity and sensitivity.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1 Καρκίνος

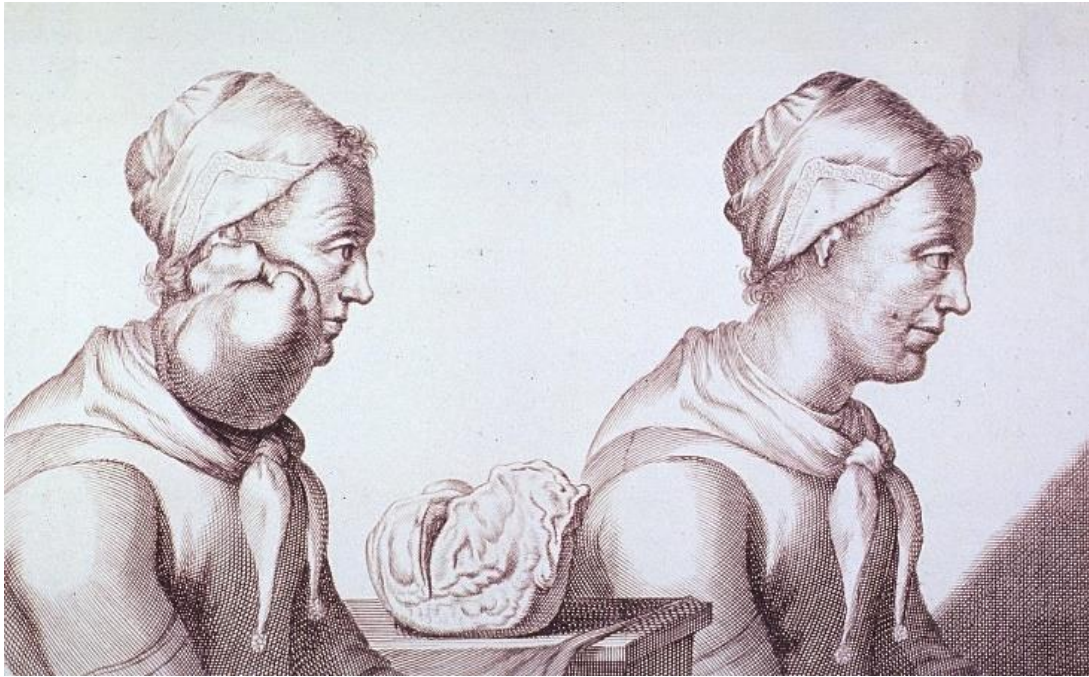
### 1.1.1 Ορισμός και Ιστορική Αναδρομή

Με τον όρο «καρκίνος» ή «(κακοήθεις) νεοπλασίες» περιγράφεται μία ομάδα νοσημάτων, που η αιτία τους βρίσκεται σε κυτταρικό επίπεδο [1].

Αναφορές στην εμφάνιση καρκίνου υπάρχουν από όταν ξεκίνησε η καταγραφή της ζωής. Μάλιστα, μερικές από τις πρώτες ενδείξεις για καρκίνο βρίσκονται ανάμεσα σε απολιθωμένους όγκους οστών (ανθρώπινες μούμιες στην αρχαία Αίγυπτο) και σε αρχαία χειρόγραφα. Σε μούμιες έχουν παρατηρηθεί όγκοι που υποδηλώνουν καρκίνο των οστών ο οποίος ονομάζεται «οστεοσάρκωμα».

Η προέλευση της λέξης καρκίνος αποδίδεται στον Έλληνα ιατρό Ιπποκράτη (460-370 π.Χ.), ο οποίος θεωρείται ο "πατέρας της Ιατρικής". Ο Ιπποκράτης χρησιμοποιούσε τους όρους καρκίνος και καρκίνωμα για να περιγράψει όγκους που είτε συνοδεύονται με την εμφάνιση έλκους είτε όχι. Στα ελληνικά, οι λέξεις αυτές παραπέμπουν σε καβούρι, και πιθανότατα χρησιμοποιήθηκαν στην ασθένεια αυτή επειδή οι δακτυλοειδείς προεξοχές που εξαπλώνονται από έναν καρκίνο θύμιζαν το σχήμα ενός καβουριού. Ο Ρωμαίος ιατρός Κέλσος (25 π.Χ. - 50 μ.Χ.) μετέφρασε αργότερα τον ελληνικό όρο σε «cancer», τη λατινική λέξη για τον κάβουρα. Ο Γαληνός (130-200 μ.Χ.), ένας άλλος Έλληνας γιατρός, χρησιμοποίησε τη λέξη «oncos» για να περιγράψει τους όγκους. Αν και η συσχέτιση του καβουριού με τον καρκίνο από τον Ιπποκράτη και τον Κέλσο χρησιμοποιείται ακόμη για να περιγράψει τους κακοήθεις όγκους, ο όρος του Γαληνού χρησιμοποιείται πλέον ως μέρος της ονομασίας των ειδικών στον καρκίνο – ογκολόγων [2].

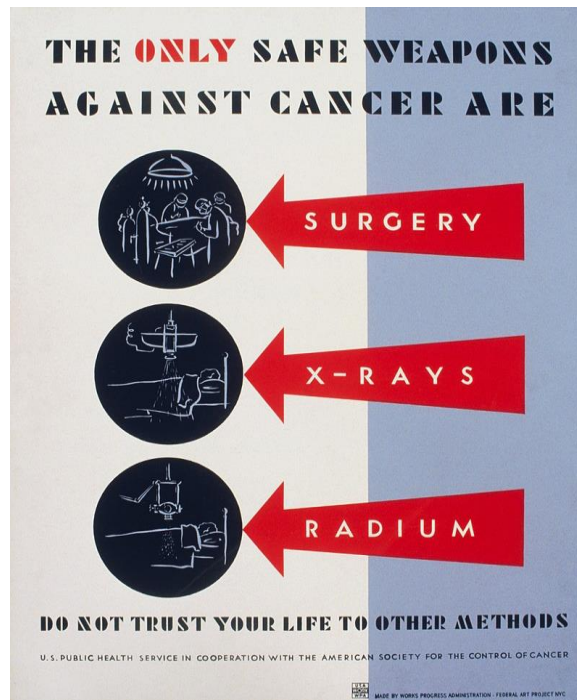
Η παλαιότερη περιγραφή του καρκίνου (αν και η λέξη «καρκίνος» δεν είχε χρησιμοποιηθεί ακόμα) ανακαλύφθηκε στην Αίγυπτο και χρονολογείται περίπου στο 3000 π.Χ. Ονομάζεται Πάπυρος του Έντουιν Σμιθ και είναι αντίγραφο μέρους ενός αρχαίου αιγυπτιακού εγχειριδίου για τη χειρουργική του τραύματος. Περιγράφει 8 περιπτώσεις όγκων ή έλκων του μαστού που αφαιρέθηκαν με καυτηριασμό με ένα εργαλείο που ονομάζεται «πυροσβεστικό τρυπάνι». Η γραφή λέει για την ασθένεια: "Δεν υπάρχει θεραπεία" [2].



*Εικόνα 1: Όγκος που αφαιρέθηκε με χειρουργική επέμβαση το 1689. (National Library of Medicine)*

Κατά τον 15<sup>ο</sup> με 18<sup>ο</sup> αι. επιστήμονες όπως ο Γαλιλαίος και ο Νιούτον ανέπτυξαν τεχνικές για τη μελέτη ασθενειών. Το 1628, ο Harvey συνέβαλε στην κατανόηση της ανατομίας και φυσιολογίας του ανθρώπινου σώματος, με κυριότερο επίτευγμα την λεπτομερή περιγραφή της κυκλοφορίας του αίματος. Οι πρώτες αυτοψίες, για τον συσχετισμό της ασθένειας ενός ασθενή με τα παθολογικά ευρήματα μετά τον θάνατό του, έγιναν από τον Giovanni Morgagni από την Πάντοβα στα τέλη του 18<sup>ου</sup> αι. Την ίδια περίοδο, ο διάσημος Σκωτσέζος χειρουργός John Hunter (1728-1793μ.Χ) πρότεινε ότι ορισμένοι καρκίνοι θα μπορούσαν να θεραπευτούν με χειρουργική επέμβαση και περιέγραψε τον τρόπο με τον οποίο ο χειρουργός θα μπορούσε να αποφασίσει ποιούς καρκίνους θα χειρουργούσε, όπως την περίπτωση αφαίρεσης όγκου εάν δεν είχε εισβάλει σε κοντινό ιστό και ήταν «κινητός». Έναν αιώνα αργότερα η ανάπτυξη της αναισθησίας επέτρεψε στη χειρουργική να ανθίσει και αναπτύχθηκαν κλασικές επεμβάσεις για τον καρκίνο, όπως η ριζική μαστεκτομή. Τέλος, τον 19ο αιώνα γεννήθηκε η επιστημονική ογκολογία με τη χρήση του σύγχρονου μικροσκοπίου για τη μελέτη των ασθενών ιστών. Ο Rudolf Virchow, που συχνά αποκαλείται ιδρυτής της κυτταρικής παθολογίας, παρείχε την επιστημονική βάση για τη σύγχρονη παθολογική μελέτη του καρκίνου. Όπως ο Morgagni είχε συνδέσει τα ευρήματα της αυτοψίας που

παρατηρήθηκαν με γυμνό μάτι με την κλινική πορεία της ασθένειας, έτσι και ο Virchow συσχέτισε τη μικροσκοπική παθολογία με την ασθένεια [3], [4].



Εικόνα 2: Αφίσα του 1938 που προσδιορίζει τη χειρουργική επέμβαση, τις ακτίνες X και το ράδιο ως τις κατάλληλες θεραπείες για τον καρκίνο. (United States Department of Health and Human Services, Library of congress)

### 1.1.2 Στατιστικά Στοιχεία

Στις μέρες μας, ο καρκίνος είναι η κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως, αντιπροσωπεύοντας το 2020 σχεδόν 10 εκατομμύρια θανάτους, ή σχεδόν έναν στους έξι θανάτους [5].

Τα πιο συχνά νέα κρούσματα το 2020 αφορούσαν τους εξής τύπους καρκίνου:

- μαστού (2,26 εκατομμύρια περιπτώσεις),
- πνεύμονα (2,21 εκατομμύρια περιπτώσεις),
- παχέος εντέρου και ορθό (1,93 εκατομμύρια περιπτώσεις),
- προστάτη (1,41 εκατομμύρια περιπτώσεις),
- δέρματος (μη μελάνωμα) (1,20 εκατομμύρια περιπτώσεις) και
- στομάχου (1,09 εκατομμύρια περιπτώσεις).

Οι συχνότεροι θνησιγενείς τύποι καρκίνου το 2020 ήταν:

- πνεύμονα (1,80 εκατομμύρια θάνατοι),

- παχέος έντερο και ορθό (916.000 θάνατοι),
- ήπατος (830.000 θάνατοι),
- στομάχου (769.000 θάνατοι) και
- μαστού (685.000 θάνατοι).

Κάθε χρόνο, περίπου 400.000 παιδιά αναπτύσσουν καρκίνο. Οι συχνότεροι καρκίνοι ποικίλλουν μεταξύ των χωρών. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο πιο συχνός σε 23 χώρες [6].

### 1.1.3 Αίτια και Δημιουργία

Ο καρκίνος προκύπτει από τη μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα σε μια διαδικασία πολλών σταδίων που γενικά εξελίσσεται από μια προκαρκινική βλάβη σε κακοήγη όγκο [6]. Οι κυτταρικές αλλαγές όμως που χαρακτηρίζουν τον καρκίνο είναι αποτέλεσμα συσσωρευμένων μεταλλάξεων. Αυτές μπορεί να είναι είτε κληρονομικές μεταλλάξεις, εντοπισμένες στο ωάριο ή στο σπερματοζωάριο που συμμετέχουν στον σχηματισμό του ζυγωτού, είτε σωματικές μεταλλάξεις, οι οποίες συμβαίνουν τυχαία κατά την κυτταρική διαίρεση ή εξαιτίας της επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων [7], μεταξύ των οποίων είναι οι εξής:

- φυσικοί καρκινογόνοι παράγοντες, όπως η υπεριώδης και η ιονίζουσα ακτινοβολία,
- χημικά καρκινογόνα, όπως ο αμιάντος, τα συστατικά του καπνού, το αλκοόλ, η αφλατοξίνη (ένα συστατικό των τροφίμων) και αρσενικό (μολυσματικός παράγοντας του πόσιμου νερού) και
- βιολογικά καρκινογόνα, όπως λοιμώξεις από ορισμένους ιούς, βακτήρια ή παράσιτα.

Ένα καθοριστικό χαρακτηριστικό του καρκίνου είναι η ταχεία δημιουργία ανώμαλων κυττάρων που αναπτύσσονται πέρα από τα συνήθη όριά τους και τα οποία μπορούν στη συνέχεια να εισβάλουν σε παρακείμενα μέρη του σώματος και να εξαπλωθούν σε άλλα όργανα- η τελευταία διαδικασία αναφέρεται ως «μετάσταση». Οι εκτεταμένες μεταστάσεις, οι οποίες γίνονται μέσω του αίματος ή του λεμφικού συστήματος, είναι η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο [6].

#### 1.1.4 Παράγοντες Κινδύνου

Ο ΠΟΥ, μέσω του οργανισμού του για την έρευνα του καρκίνου, του Διεθνούς Οργανισμού Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC), διατηρεί μια ταξινόμηση επιπλέον καρκινογόνων παραγόντων (εκτός των φυσικών, βιολογικών και χημικών) [6].

Η χρήση καπνού, η κατανάλωση αλκοόλ, η ανθυγιεινή διατροφή, η σωματική αδράνεια και η ατμοσφαιρική ρύπανση αποτελούν παράγοντες κινδύνου για καρκίνο και άλλες μη μεταδοτικές ασθένειες [6]. Ακόμη, ορισμένες χρόνιες λοιμώξεις αποτελούν παράγοντες κινδύνου για καρκίνο. Περίπου το 13% των καρκίνων που διαγνώστηκαν το 2018 σε παγκόσμιο επίπεδο αποδόθηκαν σε καρκινογόνες λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένου του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV), του ιού της ηπατίτιδας Β, του ιού της ηπατίτιδας C και του ιού Epstein-Barr [8]. Οι ιοί της ηπατίτιδας Β και C και ορισμένοι τύποι HPV αυξάνουν τον κίνδυνο για καρκίνο του ήπατος και του τραχήλου της μήτρας, αντίστοιχα. Η λοίμωξη με τον ιό HIV αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας κατά έξι φορές και αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης επιλεγμένων άλλων καρκίνων, όπως το σάρκωμα Kaposi. Η επίπτωση του καρκίνου αυξάνεται δραματικά με την ηλικία, πιθανότατα λόγω της συσσώρευσης κινδύνων για συγκεκριμένους καρκίνους που αυξάνονται με την ηλικία. Η συνολική συσσώρευση κινδύνου συνδυάζεται με την τάση των κυτταρικών μηχανισμών επιδιόρθωσης να είναι λιγότερο αποτελεσματικοί καθώς το άτομο μεγαλώνει [6].

### 1.1.5 Διαφορές καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων

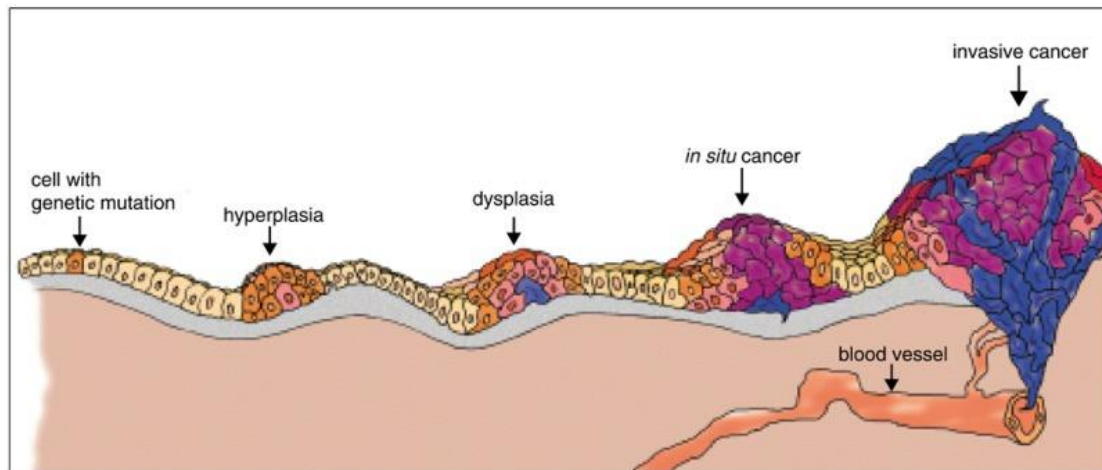
Ο καρκίνος μπορεί να ξεκινήσει σχεδόν οπουδήποτε στο ανθρώπινο σώμα, το οποίο αποτελείται από τρισεκατομμύρια κύτταρα. Κανονικά, τα ανθρώπινα κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται (μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται κυτταρική διαίρεση) για να σχηματίσουν νέα κύτταρα ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού. Όταν τα κύτταρα γερνούν ή καταστρέφονται, πεθαίνουν και νέα κύτταρα παίρνουν τη θέση τους [9].

Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν από τα φυσιολογικά κύτταρα με πολλούς τρόπους. Για παράδειγμα, τα καρκινικά κύτταρα:

- Αναπτύσσονται απουσία σημάτων που τους λένε να αναπτυχθούν. Τα φυσιολογικά κύτταρα αναπτύσσονται μόνο όταν λαμβάνουν τέτοια σήματα.
- Αγνοούν σήματα που κανονικά λένε στα κύτταρα να σταματήσουν να διαιρούνται ή να πεθάνουν (μια διαδικασία γνωστή ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση).
- Εισβάλλουν σε κοντινές περιοχές και εξαπλώνονται σε άλλες περιοχές του σώματος. Τα φυσιολογικά κύτταρα σταματούν να αναπτύσσονται όταν συναντούν άλλα κύτταρα, και τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα δεν μετακινούνται στο σώμα.
- Επάγουν την ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων με κατεύθυνση προς τους όγκους. Αυτά τα αιμοφόρα αγγεία τροφοδοτούν τους όγκους με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά και απομακρύνουν τα απόβλητα των καρκινικών κυττάρων.
- Ξεφεύγουν της αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος. Το ανοσοποιητικό σύστημα κανονικά εξαλείφει τα κατεστραμμένα ή ανώμαλα κύτταρα.
- Επάγουν το ανοσοποιητικό σύστημα ώστε να βοηθήσει τα καρκινικά κύτταρα να παραμείνουν ζωντανά και να αναπτυχθούν. Για παράδειγμα, ορισμένα καρκινικά κύτταρα πείθουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος να προστατεύουν τον όγκο αντί να του επιτίθενται.
- Συσσωρεύουν πολλαπλές αλλαγές στα χρωμοσώματά τους, όπως διπλασιασμούς και διαγραφές τμημάτων χρωμοσωμάτων. Ορισμένα καρκινικά κύτταρα έχουν διπλάσιο αριθμό από τα φυσιολογικά χρωμοσώματα.
- Βασίζονται σε διαφορετικά είδη θρεπτικών ουσιών από τα φυσιολογικά κύτταρα. Επιπλέον, ορισμένα καρκινικά κύτταρα παράγουν ενέργεια από τα

θρεπτικά συστατικά με διαφορετικό τρόπο από ό,τι τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτό επιτρέπει στον καρκίνο κύτταρα να αναπτύσσονται ταχύτερα.

Πολλές φορές, τα καρκινικά κύτταρα βασίζονται τόσο πολύ σε αυτές τις μη φυσιολογικές συμπεριφορές που δεν μπορούν να επιβιώσουν χωρίς αυτές. Οι ερευνητές έχουν εκμεταλλευτεί αυτό το γεγονός, αναπτύσσοντας θεραπείες που στοχεύουν τα ανώμαλα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Για παράδειγμα, ορισμένες θεραπείες για τον καρκίνο αποτρέπουν τα αιμοφόρα αγγεία από το να αναπτύσσονται προς τους όγκους, λιμοκτονώντας ουσιαστικά τον όγκο από τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά [9].



Εικόνα 2: Τα στάδια ανάπτυξης του όγκου. Ένας κακοήθης όγκος αναπτύσσεται με την πάροδο του χρόνου, όπως φαίνεται στην εικόνα. α. Ο όγκος αρχίζει να αναπτύσσεται όταν ένα κύτταρο εμφανίζει μια μετάλλαξη που καθιστά το κύτταρο πιο πιθανό να διαιρευθεί από ό,τι κανονικά. β. Το τροποποιημένο κύτταρο και οι απόγονοί του αναπτύσσονται και διαιρούνται πολύ συχνά, μια κατάσταση που ονομάζεται υπερπλασία. Κάποια στιγμή, ένα από αυτά τα κύτταρα εμφανίζει μια άλλη μετάλλαξη που αυξάνει περαιτέρω την τάση του να διαιρείται. γ. Οι απόγονοι αυτού του κυττάρου διαιρούνται υπερβολικά και φαίνονται ανώμαλοι, μια κατάσταση που ονομάζεται δυσπλασία. Με την πάροδο του χρόνου, ένα από τα κύτταρα εμφανίζει μια ακόμη μετάλλαξη. δ. Αυτό το κύτταρο και οι απόγονοί του είναι πλέον μη φυσιολογικοί τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην εμφάνιση. Εάν ο όγκος που έχει σχηματιστεί από αυτά τα κύτταρα εξακολουθεί να περιέχεται στον ιστό προέλευσής του, ονομάζεται καρκίνος *in situ*. Ο καρκίνος *in situ* μπορεί να παραμείνει περιορισμένος επ' αόριστον. ε. Εάν ορισμένα κύτταρα εμφανίσουν πρόσθετες μεταλλάξεις που επιτρέπουν στον όγκο να εισβάλει σε γειτονικούς ιστούς και να αποβάλλει κύτταρα στο αίμα ή στο λεμφικό σύστημα, ο όγκος λέγεται κακοήθης. Τα διαφυγόντα κύτταρα μπορεί να δημιουργήσουν νέους όγκους (μεταστάσεις) σε άλλες θέσεις του σώματος. (National Library of Medicine, National Institutes of Health)

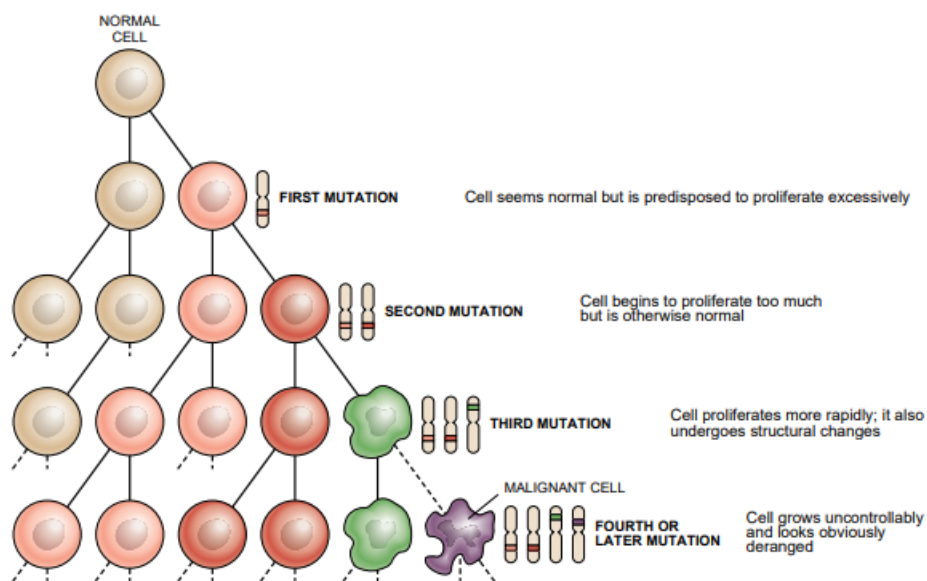


### 1.1.6 Γενετική του καρκίνου

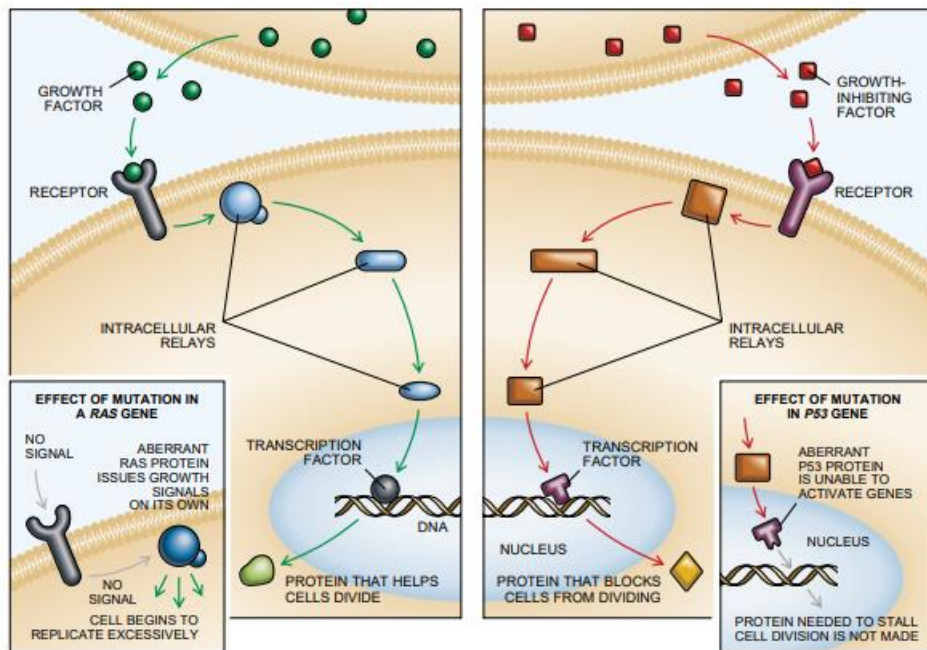
Με λίγες εξαιρέσεις, οι καρκίνοι προέρχονται από μεμονωμένα σωματικά κύτταρα και τους απογόνους τους. Τα κύτταρα στους αναδυόμενους νεοπλασματικούς κλώνους συσσωρεύουν μέσα τους μια σειρά γενετικών ή επιγενετικών αλλαγών, που οδηγούν σε αλλαγές στη γονιδιακή δραστηριότητα, και έτσι σε τροποποιημένους φαινότυπους [10].

Μερικά από τα είδη μεταλλάξεων που μπορούν να συμβούν είναι σημειακές μεταλλάξεις, αναστροφές, διαγραφές και γονιδιακές ενισχύσεις ή ακόμα και μεγαλύτερης κλίμακας όπως σύντηξη τμημάτων από διαφορετικά χρωμοσώματα [11].

Οι όγκοι μπορεί να διαθέτουν χιλιάδες μεταλλάξεις, συνήθως όμως αρκούν μόνο 2 με 8 μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν την ανάπτυξη του καρκίνου, ενώ οι υπόλοιπες αποτελούν «συνοδούς» και δεν προσφέρουν κάποιο πλεονέκτημα σε αυτόν [12].



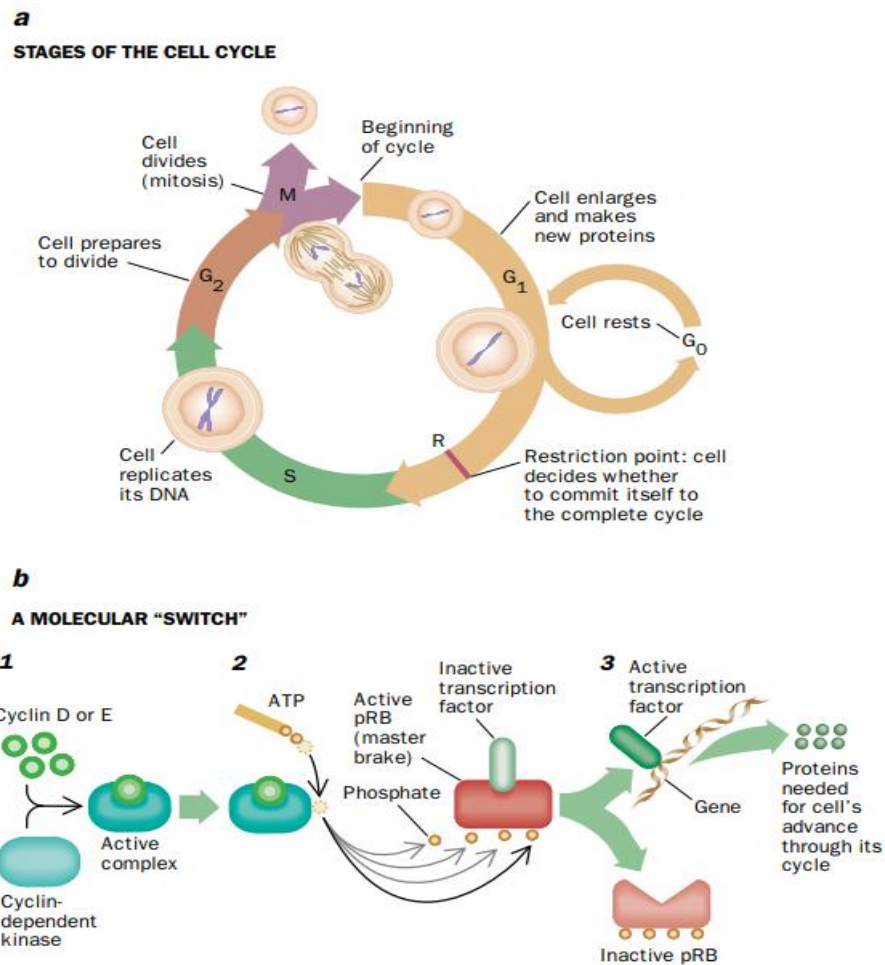
Εικόνα 4: Η αναγέννηση ενός φυσιολογικού κυττάρου πιστεύεται ότι συμβαίνει μέσω μίας διαδικασίας γνωστής ως κλωνική εξέλιξη. Αρχικά, ένα θυγατρικό κύτταρο (ροζ) κληρονομεί ή αποκτά μια μετάλλαξη που προάγει τον καρκίνο και μεταβιβάζει το ελάττωμα στους απογόνους του και σε όλες τις μελλοντικές γενιές. Κάποια στιγμή, ένας από τους απογόνους (πράσινο) αποκτά μια τρίτη μετάλλαξη κ.ο.κ. Τελικά κάποιο κύτταρο (μωβ) συσσωρεύει αρκετές μεταλλάξεις ώστε να αρχίσει να αναπτύσσεται καρκίνος [13].



Εικόνα 5: Το φυσιολογικό κύτταρο αναπαράγεται ως αντίδραση στη διέγερση από εξωτερικούς αυξητικούς παράγοντες (πράσινο, αριστερά), ενώ σταματά να διαιρείται ως αντίδραση σε ανασταλτικούς παράγοντες (κόκκινο, δεξιά). Για να συμβεί οποιαδήποτε από τις δύο αντιδράσεις, τα μηνύματα από τους παράγοντες πρέπει να μεταδοθούν βαθιά στο κύτταρο-στόχο (μεγάλα πλαίσια). Πολλά γονίδια που προκαλούν καρκίνο είναι μεταλλαγμένες εκδοχές εκείνων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σε διεγερτικές οδούς (αριστερό πάνελ). Τα τροποποιημένα γονίδια, που ονομάζονται ογκογονίδια, προκαλούν υπερπολλαπλασιασμό ή υπερδραστηριότητα των διεγερτικών πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, η μετάλλαξη ενός συγκεκριμένου γονιδίου *ras* μπορεί να οδηγήσει στη σύνθεση μιας υπερδραστήριας πρωτεΐνης *ras* (ένθετο αριστερά). Πολλά άλλα γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο κωδικοποιούν πρωτεΐνες σε ανασταλτικά μονοπάτια (δεξιά ένθετο) και συχνά ονομάζονται κατασταλτικοί παράγοντες του όγκου. Η βλάβη αυτών των γονιδίων μπορεί να προάγει τον καρκίνο εάν οι βλάβες εμποδίζουν την παραγωγή ή τη σωστή λειτουργία των ανασταλτικών πρωτεϊνών -όπως συμβαίνει συχνά όταν μεταλλάσσεται το γονίδιο *p53* (ένθετο δεξιά) [13].

Σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου τα κύτταρα διαταράσσονται επειδή επηρεάζεται το λεγόμενο ρολόι του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 6α). Αυτό αποτελείται από ένα σύνολο αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών που σε φυσιολογικά κύτταρα μεταφέρει μηνύματα από διεγερτικά ή ανασταλτικά μονοπάτια (Εικόνα 5). Στην περίπτωση των πρώτων συνεχίζεται η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου για την ανάπτυξη και τη διαίρεση. Η πρόοδος του κύκλου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αύξηση των επιπέδων των κυκλινών (Cyclines). Αρχικά η κυκλίνη D και έπειτα οι E, A και B. Ένα κρίσιμο σημείο του κύκλου ονομαζόμενο ως R, στα τέλη της G1 φάσης, καθορίζει τη μετάβαση του κυττάρου στη φάση S. Η διαδικασία περιγράφεται ως εξής: καθώς τα επίπεδα της κυκλίνης D και αργότερα της E αυξάνονται, οι πρωτεΐνες αυτές συνδυάζονται με κάποια ένζυμα που ονομάζονται κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cDKs) και τα

σύμπλοκα αυτά δεσμεύουν φωσφορικές ομάδες από μόρια ATP και τις μεταφέρουν στην πρωτεΐνη pRB (retinoblastoma protein), η οποία είναι το βασικό «φρένο» του κύκλου. Όταν αυτή στερείται φωσφορικών ομάδων, παύει τον κυτταρικό κύκλο και δεσμεύει μεταγραφικούς παράγοντες, ενώ όταν φωσφορυλιωθεί, τους απελευθερώνει για να δράσουν στα γονίδια (Εικόνα 6β). Η υπερέκφραση των κυκλινών D,E και της cDK4, καθώς και η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών όπως η p53 και η pRB οδηγούν σε απορρύθμιση του ρολογιού και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. [14]



Εικόνα 6: α. Σχηματική απεικόνιση του λεγόμενου κυτταρικού ρολογιού. β. Σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης των κυκλινών, των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών και της πρωτεΐνης pRB για την έκφραση ενός γονιδίου [14].

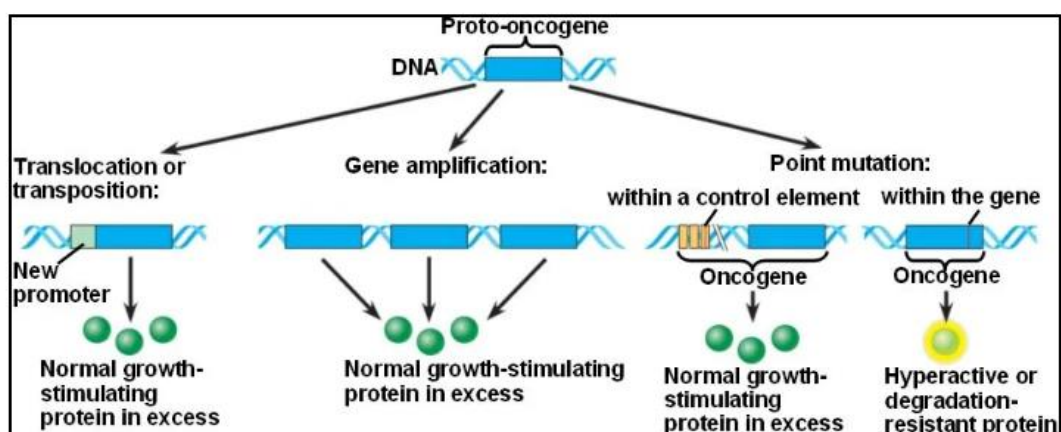
Παρότι τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς επιδιόρθωσης λαθών σε γονιδιακό επίπεδο, υπάρχουν και περιπτώσεις στις οποίες αδυνατούν να αντιμετωπίσουν αυτό το πρόβλημα. Συνήθως αυτό συμβαίνει σε σημαντικά για τα κύτταρα γονίδια και έχει ως συνέπεια τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους.

Δυο είναι τα κρίσιμα είδη γονιδίων που εμπλέκονται στους περισσότερους όγκους. Αρχικά τα πρώτο-ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά. Κατά την καρκινογένεση, αλλαγές στη δομή των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν, μπορούν να οδηγήσουν σε υπερέκφραση των πρωτο-ογκογονιδίων, μετατρέπονται πλέον σε ογκογονίδια και προκαλούν ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Απενεργοποίηση ή απουσία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων συμβάλει στην ανάπτυξη του όγκου [15] [16].

### 1.1.6.1 Πρωτο-ογκογονίδια και Ογκογονίδια

Τα ογκογονίδια προκύπτουν ως μεταλλαγμένα αλληλόμορφα των πρωτο-ογκογονιδίων που υπάρχουν φυσιολογικά στα κύτταρα. Ο βασικός τους ρόλος εντοπίζεται σε σηματοδοτικά μονοπάτια ρύθμισης ουσιωδών λειτουργιών για το κύτταρο όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και η απόπτωση του κυττάρου. Οι τρόποι με τους οποίους αυτά απορρυθμίζονται στον άνθρωπο είναι οι εξής (Εικόνα 7):

- 1) γονιδιακή ενίσχυση, δηλαδή αύξηση του αριθμού αντιγράφων στον άνθρωπο,
- 2) τροποποίηση της αλληλουχίας DNA μέσω σημειακών μεταλλάξεων, εισαγωγών ή ελλείψεων τμήματος του γονιδίου, εντός αυτού ή στον υποκινητή του, και
- 3) χρωμοσωμικές ανακατατάξεις είτε με μετατόπιση του πρωτο-ογκογονιδίου σε θέση με αυξημένη έκφραση, είτε με σύντηξη του πρωτο-ογκογονιδίου με το γονίδιο άλλης πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να παράγεται μια νέα χημική πρωτεΐνη με ογκογόνο δράση [17][18].



Εικόνα 7: Γενετικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην ενεργοποίηση των ογκογονιδίων (Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cummings PowerPoint Lectures for Biology, Seventh Edition Neil Campbell and Jane Reece)

Σε αυτή την κατηγορία ανήκει και το c-Myc, ένα πολύ συχνά απορρυθμιζόμενο γονίδιο, του οποίου η απορρύθμιση οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης Myc. Στην παρούσα διπλωματική εργασία δίνεται έμφαση τόσο σε αυτό όσο και στην αλληλεπίδρασή του με την πρωτεΐνη-εταίρο του MAX (Myc-associated factor) .

#### *1.1.6.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια*

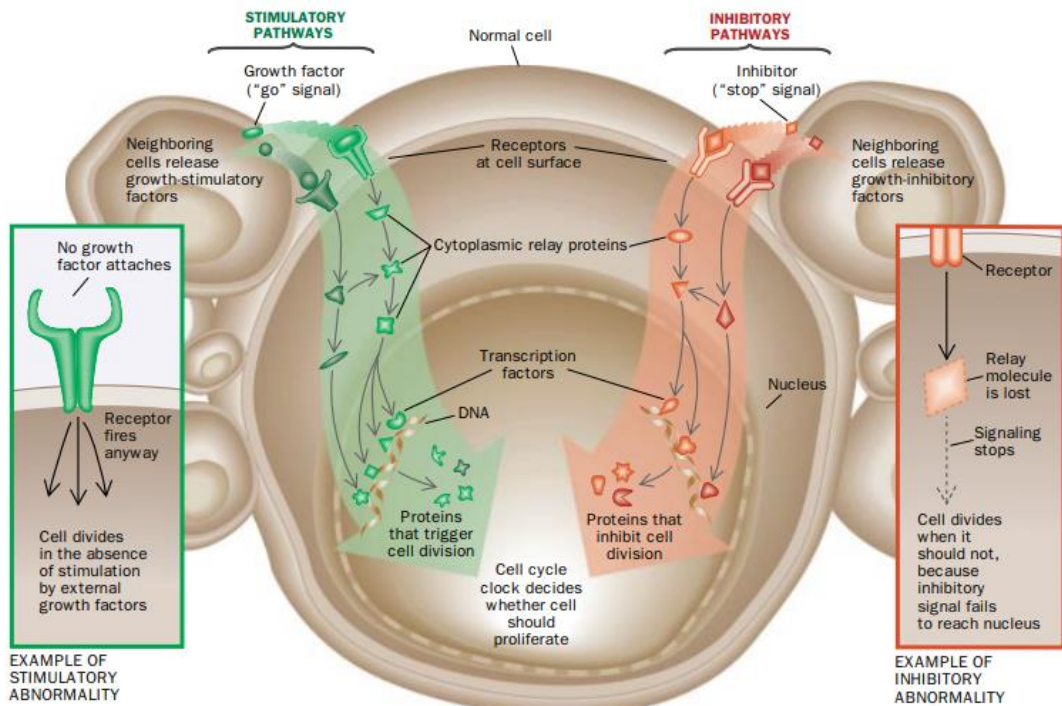
Ο φυσιολογικός ρόλος των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων με αποτέλεσμα την καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αυτά διακρίνονται σε 3 επιμέρους κατηγορίες:

- Γονίδια Gatekeeper: Παράγουν πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζουν τις οδούς ανάπτυξης και διαφοροποίησης του κυττάρου. Η αποκατάσταση της λειτουργίας τους σε καρκινικά κύτταρα καταστέλλει την νεοπλασία.
- Γονίδια «Caretakers»: Δρουν έμμεσα για την καταστολή της ανάπτυξης του καρκίνου παράγοντας πρωτεΐνες που διασφαλίζουν την γενετική ακεραιότητα του κυτταρικού γονιδιώματος μέσω αποκατάστασης της βλάβης του DNA.
- Γονίδια «Landscape»: Διαμορφώνουν το μικροπεριβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται τα καρκινικά κύτταρα. Όταν μεταλλαχθούν μπορεί να δημιουργηθούν ευνοϊκές συνθήκες για των ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων[19].

Για να γίνουν κακοήθη, τα κύτταρα θα πρέπει εκτός από την υπερδιέγερση των πρωτεϊνών που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, να επινοήσουν τρόπους για να αποφύγουν ή να αγνοήσουν σήματα από γειτονικά κύτταρα για αναστολή του πολλαπλασιασμού τους. Στα καρκινικά κύτταρα η μεταφορά των σημάτων διαταράσσεται καθώς χρήσιμα συστατικά αυτών που καθορίζονται από ογκοκατασταλτικά γονίδια απουσιάζουν ή είναι ανενεργά. Μία εκκρινόμενη ουσία που ονομάζεται μετασχηματιστικός παράγοντας βήτα (TGF-β) μπορεί να σταματήσει την ανάπτυξη διαφόρων ειδών φυσιολογικών κυττάρων. Ορισμένα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου γίνονται μη αντιληπτά στον TGF-β, αδρανοποιώντας το γονίδιο DPC4, του οποίου το προϊόν συμβάλει στη διαμόρφωση του υποδοχέα αυξητικού παράγοντα. Ακόμη, μια πληθώρα καρκίνων απορρίπτουν το γονίδιο p15 το οποίο κωδικοποιεί μια

πρωτεΐνη που, σε απόκριση σε σήματα από τον TGF- $\beta$ , κανονικά σταματάει τον κύκλο ανάπτυξης του κυττάρου[14].

Ωστόσο, σε αντίθεση με τα ογκογονίδια, μια μετάλλαξη σε ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο πρέπει να γίνει και στα 2 αλληλόμορφα προκειμένου να είναι κυρίαρχη. Αυτό οφείλεται στην παρουσία χρωμοσωμάτων και από τα δύο προγονικά κύτταρα, κάτι που επιτρέπει την έκφραση των υπεύθυνων ογκοκατασταλτικών γονιδίων[20].



Εικόνα 8: Σημαντικές οδοί στα φυσιολογικά κύτταρα μεταφέρουν μηνύματα ελέγχου της ανάπτυξης από την εξωτερική επιφάνεια βαθιά μέσα στον πυρήνα. Εκεί μια μοριακή συσκευή γνωστή ως ρολόι του κυτταρικού κύκλου συλλέγει τα μηνύματα και αποφασίζει αν το κύτταρο πρέπει να διαιρεθεί. Τα καρκινικά κύτταρα συχνά πολλαπλασιάζονται υπερβολικά επειδή οι γενετικές μεταλλάξεις προκαλούν διεγερτικές οδούς (πράσινο) να εκδίδουν πάρα πολλές σήματα ή επειδή οι ανασταλτικές οδοί (κόκκινες) δεν μπορούν πλέον να μεταφέρουν σήματα.. Μια διεγερτική οδός θα γίνει υπερδραστήρια εάν μια μετάλλαξη προκαλέσει οποιοδήποτε συστατικό, όπως ένα αυξητικό υποδοχέας του παράγοντα (πλαίσιο στα αριστερά), να εκδίδει διεγερτικά μηνύματα αυτόνομα, χωρίς να περιμένει εντολές από τα ανώτερα στάδια. Αντίθετα, τα ανασταλτικά μονοπάτια θα κλείσουν όταν κάποιο συστατικό, όπως ένας κυτταροπλασματικός αναμεταδότης (πλαίσιο στα δεξιά), εξαλείφεται και έτσι διακόπτεται η σηματοδοτική αλυσίδα [14].

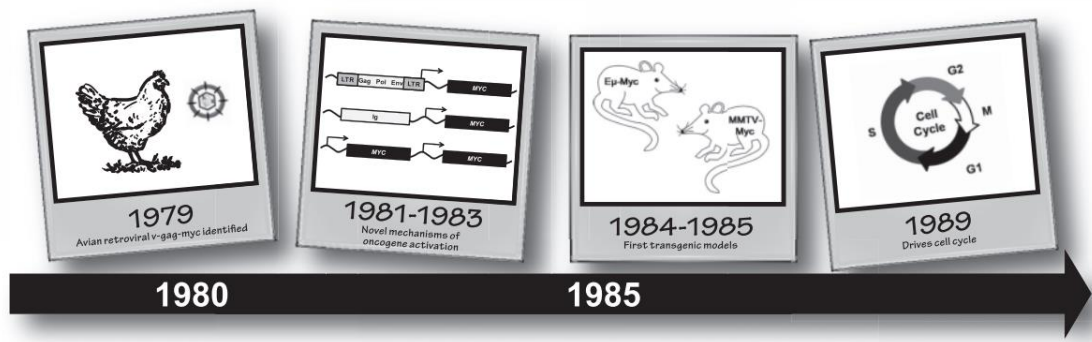
## 1.2 Ογκογονίδιο MYC

### 1.2.1 Ιστορική αναδρομή- Οικογένεια MYC

Το c-Myc (cellular-Myc) αποτελεί ένα εκ των γονιδίων της οικογένειας Myc, μαζί με τα N-Myc, L-Myc και B-Myc, η έκφραση των οποίων εντοπίστηκε σε νευροβλάστωμα, σε καρκίνο του πνεύμονα και στον εγκέφαλο, αντίστοιχα.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1970, ένας ιός οξείας λευχαιμίας των πτηνών (MC29) αποδείχθηκε ότι προάγει ένα φάσμα κακοηθειών, όπως μυελοκυττώματα, σαρκώματα και, κυρίως, καρκινώματα. Η αλληλουχία μετασχηματισμού του MC29 ταυτοποιήθηκε ως v-Myc και ονομάστηκε μυελοκυτταρωμάτωση για την προκύπτουσα λευχαιμία. Γνωρίζοντας ότι τα ογκογονίδια θα μπορούσαν να προέρχονται από ρετροϊούς, το κυτταρικό ομόλογο εντοπίστηκε αμέσως μετά σε φυσιολογικά κύτταρα από πολλά είδη. Η ανακάλυψη του Myc ενίσχυσε περαιτέρω την εκπληκτική διαπίστωση ότι ογκογόνος μετασχηματισμός θα μπορούσε να προκληθεί από την ενεργοποίηση ενός κυτταρικού γονιδίου.

Με βάση τη διαπίστωση ότι, σε αντίθεση με άλλα πρωτο-ογκογονίδια, η ενεργοποίηση του Myc δεν είναι συνέπεια μεταλλάξεων στην κωδική αλληλουχία, η έρευνα επικεντρώθηκε στον εντοπισμό και την κατανόηση άλλων τύπων ογκογόνου ενεργοποίησης. Αυτό οδήγησε στην ανακάλυψη τριών νέων μηχανισμών με τους οποίους το Myc, και κατ' επέκταση άλλα ογκογονίδια, μπορεί να απορρυθμιστούν και να προωθήσουν τον μετασχηματισμό: Εισαγωγική μεταλλαξιγένεση, χρωμοσωμική μετατόπιση και γονιδιακή ενίσχυση. Συνολικά, τα ευρήματα αυτά άνοιξαν το δρόμο για την ανακάλυψη και την κατανόηση των ογκογονιδίων και παρείχαν νέα παραδείγματα για τη γενετική βάση του καρκίνου[21].



Εικόνα 9: Ανακαλύψεις σταθμοί στην ιστορία του Myc [21].

Εκτός από τους ρετροϊούς οξείας μεταμόρφωσης που αναφέρθηκαν προηγουμένως, έχει αποδειχθεί ότι μια δεύτερη κατηγορία ρετροϊών προκαλεί λευχαιμίες και λεμφώματα. Αυτοί οι ιοί, που συχνά αναφέρονται ως μη οξέως μετασχηματίζοντες ρετροϊοί, προκαλούσαν όγκους με πολύ μεγαλύτερη λανθάνουσα κατάσταση και δεν ήταν σε θέση να μετασχηματίσουν κύτταρα σε καλλιέργεια. Παρόλο που αυτές οι αρχικές παρατηρήσεις προκαλούσαν αμηχανία, οι μηχανισμοί με τους οποίους οι ιοί αυτοί προωθούν την καρκινογένεση αναγνωρίστηκαν σύντομα, όταν αποδείχθηκε ότι οι ρετροϊοί ενεργοποιούν την έκφραση ογκογονιδίων μέσω προϊκικής ένθεσης [22][23][24][25].

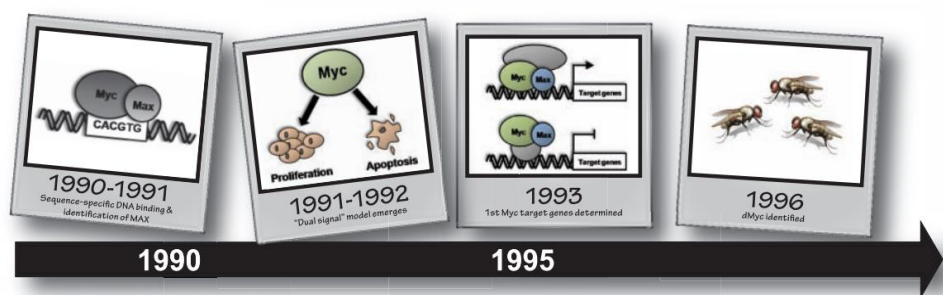
Ειδικότερα, ιοί όπως ο ιός της οξείας λευκοπάθειας (ALV) ενσωματώθηκαν στο γονιδίωμα του ξενιστή στο σημείο ή κοντά σε πρωτο-ογκογονίδια, με αποτέλεσμα την έντονη έκφραση που καθοδηγείται από τον ιικό υποκινητή. Το *Myc* ήταν το πρώτο ογκογονίδιο που βρέθηκε ότι ενεργοποιείται με αυτόν τον μηχανισμό, με το 80% των λεμφωμάτων Β-κυττάρων που προκλήθηκαν από τον ALV να οφείλονται σε ενεργοποίηση του *Myc*. Αυτές οι πρωτοποριακές μελέτες έθεσαν τα θεμέλια για την ανακάλυψη πολλών άλλων ογκογονιδίων [21].

Μη τυχαίες χρωμοσωμικές μετατοπίσεις έχουν παρατηρηθεί σε διάφορες κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένου του λεμφώματος Burkitt και της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας. Υποστηρίχθηκε ότι αυτές οι μετατοπίσεις οδηγούν σε ανώμαλη έκφραση των ίδιων πρωτο-ογκογονιδίων που εντοπίστηκαν στους οξείς μετασχηματιστικούς ρετροϊούς. Η αναγνώριση του *Myc* στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 8 υποστήριξε αυτή την υπόθεση [26] [27]. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το λέμφωμα Burkitt έχει αμοιβαίες μετατοπίσεις μεταξύ του χρωμοσώματος 8 και των χρωμοσωμάτων 14, 2 ή 22, τα οποία φιλοξενούν γονίδια για τις βαριές και ελαφρές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών [28]. Στη συνέχεια ανακαλύφθηκε ότι αυτοί οι καρκίνοι προκαλούνται από την ενεργοποιημένη έκφραση του *Myc* ως αποτέλεσμα της μετατόπισης.

Η *Myc* μελετήθηκε σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου και σε σειρές οξείας μυελοκυτταρικής λευχαιμίας, παρουσιάζοντας γονιδιακές ενισχύσεις σε πρωτογενές υλικό ασθενών. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την ιδέα ότι η απορρυθμισμένη έκφραση ενός πρωτο-ογκογονιδίου μπορεί να προάγει τον νεοπλασματικό μετασχηματισμό.



Μέσω αυτών των μελετών, κατέστη σαφές ότι το Myc ήταν μέλος μιας ευρύτερης οικογένειας ογκογονιδίων. Όταν χρησιμοποιήθηκε το *v-myc* ως ανιχνευτής σε πειράματα υβριδισμού, οδήγησαν στην ανακάλυψη του ογκογονιδίου Myc-N (ονομασία που προέκυψε από τα νευροβλαστώματα στα οποία ταυτοποιήθηκε), το οποίο συσχετίστηκε γρήγορα με επιθετική νόσο και κακή έκβαση σε αυτόν τον καρκίνο, και οι ενισχύσεις που παρατηρήθηκαν απέκτησαν προγνωστική αξία.



Εικόνα 9: (Συνέχεια)[21]

Τα επόμενα χρόνια ανακαλύφθηκε ένα τρίτο μέλος στην οικογένεια Myc, το MycL1, το οποίο συσχετίστηκε με τον καρκίνο του πνεύμονα. Η Myc ήταν επίσης θεμελιώδης για την κατανόηση της συνεργασίας των ογκογονιδίων και του πώς τα κυτταρικά ογκογονίδια θα μπορούσαν να προωθήσουν την καρκινογένεση. Όταν διασταυρώθηκαν ποντίκια Εμ-Myc με ποντίκια Εμ-Bcl2, οδηγώντας σε υπερέκφραση του αντι-αποπτωτικού BCL2 ογκογονιδίου, οι όγκοι σχηματίστηκαν ταχύτερα από ό,τι στα μεμονωμένα διαγονιδιακά[29][30]. Το μοντέλο της συνεργασίας των ογκογονιδίων και η ανάγκη για πολλαπλές συνεργαζόμενες μεταβολές για να προώθηση της καρκινογένεσης έχουν γίνει θεμελιώδους σημασίας για την τρέχουσα κατανόηση της νεοπλασματικής διαδικασίας[31].

Αφού η απορρύθμιση του Myc είχε αρνητικές συνέπειες για τα κύτταρα, δόθηκε έμφαση στην κατανόηση της φυσιολογικής λειτουργίας του οπότε και αποδείχθηκε πως πρόκειται για γονίδιο ενδιάμεσης πρώιμης απόκρισης στο οποίο αντιπολλαπλασιαστικά σήματα είχαν ως αποτέλεσμα την ταχεία καθοδική ρύθμισή του. Επιπλέον, τόσο το mRNA, αλλά και η πρωτεΐνη Myc κατέδειξαν σύντομο χρόνο ημιζωής. Ως εκ τούτου, αναπτύχθηκε μια εκτίμηση για στενά ελεγχόμενη ρύθμιση της έκφρασης της Myc.

Έπειτα διαπιστώθηκαν οι ικανότητες προώθησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η αποτροπή της διαφοροποίησης, στοιχεία που συσχετίζονται με την καρκινογένεση και αποτελούν χαρακτηριστικά επιθετικής νόσου [32].

Αργότερα, στις αρχές της δεκαετίας του 1990, η έκτοπη έκφραση της *Myc* έδειξε ότι οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση, αποκτώντας έτσι διττό ρόλο στην λειτουργία του κυττάρου [33]. Αυτό το εύρημα έριξε σημαντικό φως στην μοντέλο της συνεργασίας των ογκογονιδίων και τον τρόπο με τον οποίο μια αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη όπως η *Bcl2* θα μπορούσε να συνεργαστεί με την *Myc* για την προώθηση της ογκογένεση [34].

Ακολούθως, διαπιστώθηκε πως η *Myc*, σε αντίθεση με άλλα ογκογονίδια, εντοπίζεται στον πυρήνα και είναι σε θέση να δεσμεύει δίκλωνο DNA [35] με αποτέλεσμα να προκύψουν 2 υποθέσεις. Είτε ότι μπορεί να παίζει ρόλο στην αντιγραφή του DNA, είτε στη ρύθμιση των γονιδίων. Το C-τελικό άκρο της *Myc* αποδείχθηκε ότι περιέχει τόσο μία περιοχή έλικας-βρόχου-έλικας [35] και μια περιοχή φερμουάρ λευκίνης [36], και ανακαλύφθηκε μία συγκεκριμένη αλληλουχία δέσμησης του DNA στη *Myc*. Ομοδιμερή των C-τελικών περιοχών της *Myc* μπορούσαν να συνδεθούν σε αλληλουχίες CACGTG *in vitro*, με χαμηλή όμως συγγένεια [37]. Έτσι προέκυψε η υπόθεση μιας πρωτεΐνης-εταίρου και σύντομα εντοπίστηκε η MAX (*Myc associated factor X*) [38]. Η MAX αποδείχθηκε ότι σχηματίζει επίσης ετεροδιμερή με μέλη της οικογένειας Mxd, με αποτέλεσμα να παρέχει έναν πρόσθετο μηχανισμό στη ρύθμιση της δραστηριότητας της *Myc* στο κύτταρο [39]. Η πρώτη άμεση απόδειξη της *Myc* ως ενεργοποιητή της μεταγραφής προήλθε από τη σύντηξη της N-τελικής περιοχής της *Myc* με την περιοχή δέσμησης DNA Gal4 ζύμης, ενώ βρέθηκε ακόμη ότι η ίδια περιοχή αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες συστατικά των συμπλόκων HAT αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης όπως η TRRAP, το οποίο φαίνεται να είναι υπεύθυνο για τη στρατολόγηση αυτών των συμπλόκων στη χρωματίνη κατά τη διάρκεια της μεταγραφής, της αντιγραφής και της επιδιόρθωσης του DNA [40]. Το συμπέρασμα που εξήχθει αργότερα είναι πως τα ετεροδιμερή *Myc*-MAX αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με μεταγραφικούς ενεργοποιητές, όπως ο πυρηνικός παράγοντας Y και Miz1, οι οποίοι συνδέονται άμεσα με το DNA. Αυτή η σύνδεση εκτοπίζει τους συνενεργοποιητές και στρατολογεί τους συμπιεστές αποτρέποντας τη μεταγραφική ενεργοποίηση [41].

Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1990, είχαν προστεθεί αρκετές διαφορετικές βιολογικές δραστηριότητες στη *Myc* καθώς είχε αποδειχθεί ότι ρυθμίζει το μέγεθος

των κυττάρων, επηρεάζει τη γονιδιωματική σταθερότητα και ενεργοποιεί την αγγειογένεση. Τα τελευταία χρόνια έχουν εντοπιστεί πρόσθετες βιολογικές δραστηριότητες της Myc όπως ότι τα ογκογόνα επίπεδά της προάγουν την γλουταμινόλυση, διαδικασία που τροφοδοτεί την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό, με απαραίτητα στοιχεία για τα καρκινικά κύτταρα [42].

Η Myc αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως 1 από τα 4 γονίδια των οποίων η υπερέκφραση θα μπορούσε να επαναπρογραμματίσει τους φυσιολογικά διαφοροποιημένους ινοβλάστες σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα [43].

Πλέον οι έρευνες συνεχίζουν να εστιάζουν στην πλήρη κατανόηση του μοριακού της ρόλου, καθώς και στην άμεση ή έμμεση αντιμετώπισή της ως φαρμακευτικό στόχο λόγω της συχνής υπερέκφρασής της.



Εικόνα 9: (Συνέχεια)[21]

### 1.2.2 ID Πρωτεΐνες

Οι εγγενώς διαταραγμένες (ID) πρωτεΐνες είναι πρωτεΐνες που υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι είτε εντελώς ατακτοποιήτες είτε περιέχουν σημαντικές περιοχές ( $\geq 40$  διαδοχικά κατάλοιπα) με αταξία. Οι ατακτοποιημένες περιοχές χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη ευκαμψία του σκελετού, με παροδικό σχηματισμό δευτεροταγούς δομής, αλλά χωρίς σταθερή τριτοταγή αναδίπλωση. Οι πρωτεΐνες ID επικρατούν στους ευκαρυώτες και είναι ιδιαίτερα συχνές σε σηματοδοτικά μονοπάτια (70% των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη σηματοδότηση) και σε άλλα πολύπλοκα ρυθμιστικά μονοπάτια που είναι χαρακτηριστικά των ανώτερων οργανισμών [44]. Υπάρχουν ως σύνολο ταχέως μεταβαλλόμενων δομών. Η επικράτηση των περιοχών ID αυξάνεται με την αύξηση της πολυπλοκότητας στους οργανισμούς και οι ID πρωτεΐνες έχουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών που περιλαμβάνουν διάφορους βαθμούς αταξίας.

Σε μερικές περιπτώσεις συμβαίνουν αλληλεπιδράσεις που περιλαμβάνουν πρόσδεση και μερική αναδίπλωση με άλλα μόρια, άλλες αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν την διατήρηση της αταξίας και άλλες πάλι παρουσιάζουν μια ενδιάμεση, δυναμική κατάσταση [45]. Ενώ η δέσμευση ενός μικρού μορίου σε μια ID πρωτεΐνη μπορεί να φαίνεται αντιφατική, το εύρος των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που καταδεικνύονται με τις περιοχές ID καθιστά την ικανότητά τους να δημιουργούν μια προσαρμόσιμη, ειδική διεπαφή για τη δέσμευση μικρών μορίων λιγότερο απροσδόκητη [44].

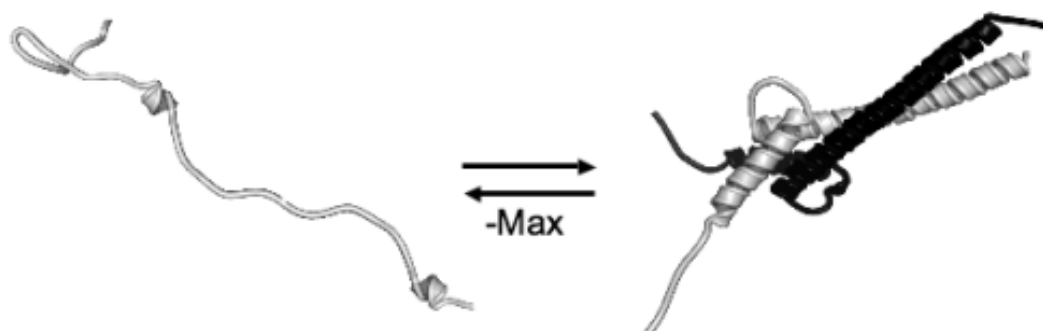
Ο κυριότερος λόγος για την στόχευση αυτών των πρωτεϊνών είναι η μεγάλη συμμετοχή τους σε μονοπάτια σηματοδότησης ασθενειών όπως ο καρκίνος, καρδιαγγειακές παθήσεις, νευροεκφυλιστικές νόσοι και ο διαβήτης [46].

Ένα χαρακτηριστικό που είναι σημαντικό για τη λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών είναι η απόκτηση δομής έπειτα από αλληλεπίδραση με κάποια άλλη πρωτεΐνη, η οποία εννοείται εντροπικά [47]. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση με χαμηλή συγγένεια, η οποία μπορεί να είναι επιθυμητή σε περιπτώσεις που η αναστρέψιμη δέσμευση είναι κρίσιμη. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε μία δυναμική ισορροπία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό ανεπιθύμητου πλέον προϊόντος και κατ' επέκταση κυτταροτοξικότητα [48]. Σύμφωνα με αυτό, οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών ID σε κλίμακα πρωτεώματος ρυθμίζονται στενά από τη μεταγραφή, τον ρυθμό μετάφρασης και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών [49]. Οι αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών ID με τα ζεύγη τους, και το τελικό αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης, θα είναι πιθανότατα ευαίσθητες στη διαμόρφωση από τη δέσμευση μικρών μορίων που μπορούν να επηρεάσουν τη συγγενεία τους με αυτά [50].

Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις που μπορούν να εξεταστούν. Στην πρώτη προσέγγιση στοχεύεται, η αλληλεπίδραση μεταξύ μιας δομημένης πρωτεΐνης και ενός δεσμευτικού ID εταίρου. Οι Cheng et al. σημείωσαν ότι, για αρκετές από τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που έχουν διαμορφωθεί επιτυχώς με μικρά μόρια, ένας από τους εταίρους είναι ο ID και υφίσταται μια μετάβαση από αταξία σε τάξη κατά τη σύνδεση με την πρωτεΐνη-εταίρο [51]. Προτείνουν μια γενική προσέγγιση κατά την οποία συγκεκριμένες, μικρές περιοχές ID αλληλουχίας που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (στοιχεία μοριακής αναγνώρισης, MoREs) χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του διατεταγμένου εταίρου- πρόσδεσής τους, επομένως μπορούν να

αντικατασταθούν από ένα μικρό μόριο. Στη δεύτερη προσέγγιση, ένα μικρό μόριο συνδέεται απευθείας σε ένα σύντομο τμήμα μιας πρωτεΐνης ID, σταθεροποιεί τη συνολική αταξία, και έτσι αναστέλλει τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που απαιτούν συζευγμένη αναδίπλωση και πρόσδεση [44]. Η δεύτερη προσέγγιση έχει ένα σημαντικό λειτουργικό πλεονέκτημα, καθώς δεν απαιτεί δομικά δεδομένα υψηλής ανάλυσης της πρωτεΐνης ID και της πρωτεΐνης-εταίρου. Αντίθετα, η πρώτη προσέγγιση δεν είναι άμεσα δεκτική στον ορθολογικό σχεδιασμό αναστολέων με βάση τη δομή [52][53].

Χαρακτηριστικό παράδειγμα μίας ID πρωτεΐνης, αποτελεί η c-Myc, η οποία συζευγνύεται με τη MAX μέσω μίας περιοχής βασικής έλικας-βρόχου-ελίκας-φερμουάρ λευκίνης (bHLHZip) που υπάρχει σε κάθε πρωτεΐνη. Τα μεμονωμένα μονομερή είναι ατακτοποιήτα και υφίστανται συζευγμένη αναδίπλωση και σύνδεση κατά τον διμερισμό (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση του διμερισμού Myc-Max. Δέσμευση μικρών μορίων μετατοπίζει την ισορροπία προς τα αριστερά [54].

Το σύμπλοκο C-MYC/MAX είναι μια παράλληλη, αριστερόστροφη δέσμη τεσσάρων ελίκων, με κάθε μονομερές να αποτελείται από δύο R-έλικες που χωρίζονται από έναν βρόχο [55].

### 1.2.3 Βιοχημεία: Δομή και Λειτουργία

Η C-MYC, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι το πρωτότυπο μέλος μίας ευρύτερης οικογένειας πρωτεϊνών MYC που περιλαμβάνει επίσης τις πρωτεΐνες N-MYC και L-MYC και B-MYC στα κύτταρα των θηλαστικών, οι οποίες είναι εξαιρετικά ομόλογες αλλά κατανέμονται διαφορετικά. Η C-MYC είναι παρούσα και ιδιαίτερα άφθονη στα

πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, ενώ η N-MYC και η L-MYC εμφανίζουν πιο περιορισμένη έκφραση σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης των κυττάρων και των ιστών [56].

Η C-MYC είναι μια πρωτεΐνη 62 kDa με 439 αμινοξικά κατάλοιπα. Το γονίδιο *c-myc* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8 και στη θέση q24.1, αποτελείται από 3 εξώνια και δύο ιντρόνια [57] και περιλαμβάνει μια σειρά από λειτουργικές περιοχές που διευκολύνουν τις αλληλεπιδράσεις με ένα ευρύ φάσμα μορίων πρόσδεσης, καθεμία από τις οποίες έχουν διακριτούς ρόλους στις αλληλεπιδράσεις της [56].

Η MYC πρωτεΐνη είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ διαφορετικών ειδών. Αποτελείται από τρεις περιοχές:

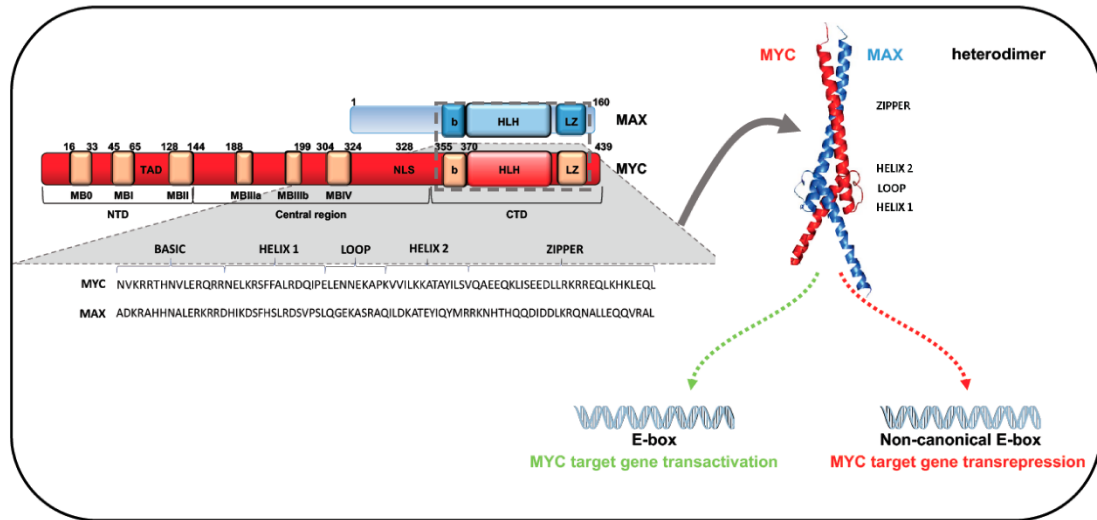
- Ένα σφαιρικό αμινοτελικό άκρο (N- terminal domain, NTD, αμινοξέα 1-203)
- Μία κεντρική μη δομημένη περιοχή (αμινοξέα 204-237)
- Ένα καρβοξυτελικό άκρο που φέρει κυρίως αλληλουχίες για πρόσδεση σε DNA (c- terminal domain, CTD, αμινοξέα 238-439) [56]

Πιο αναλυτικά, στο αμινοτελικό άκρο της φέρει μία ρυθμιστική περιοχή της μεταγραφής και τρία εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές αποκαλούμενες ως MYC homology boxes (MB0, MBI, MBII) που εμπλέκονται στην μεταγραφική ρύθμιση και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Στο κέντρο βρίσκονται μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS, nuclear localization signal), τρία ακόμη MYC boxes (MBIIIa, MBIIIb, και MBIV), που εμπλέκονται στη μετασχηματιστική δραστηριότητα, τη μεταγραφή και την απόπτωση, καθώς και μία περιοχή PEST [56].

Οι αλληλουχίες PEST είναι αλληλουχίες εμπλουτισμένες σε προλίνη (P), γλουταμινικό οξύ (E), σερίνη (S), θρεονίνη (T) και ασπαρτικό οξύ (D), που εμφανίζονται με υψηλή συχνότητα σε βραχύβιες πρωτεΐνες. Στο *c-myc* η PEST που εκτείνεται στα αμινοξέα 241 έως 269, παίζει έναν απαραίτητο ρόλο σε ένα βήμα που βρίσκεται μεταξύ της ουβικιτυλίωσης του *c-myc* και της επακόλουθης αποικοδόμησής του από το πρωτεάσωμα [58].

Η C-τελική περιοχή έχει μήκος περίπου 100 καταλοίπων και περιλαμβάνει την περιοχή βασικής έλικας-στροφής-έλικας-φερμουάρ λευκίνης (bHLHZip) που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του DNA σε υποκινητές συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων και για τον διμερισμό με τη MAX (MYC-associated factor X), μία μικρή πρωτεΐνη μεγέθους 18 kDa, που περιέχει δομή bHLHLZ. Με τον ετεροδιμερισμό της MYC με την MAX,

δημιουργείται μία λειτουργική δομική περιοχή, ικανή να αλληλεπιδράσει με το DNA[56].



Εικόνα 11: Δομική αρχιτεκτονική της πρωτεΐνης MYC και της MAX. Φαίνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών και οι δομικές περιοχές στις οποίες αντιστοιχούν. Το αμινοτελικό άκρο (NTD ή TAD) της MYC αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες και το καρβοξυτελικό άκρο αλληλεπιδρά με την MAX, μέσω της περιοχής bHLHLZ. Το ετεροδιμερές MYC:MAX συνδέεται σε κανονικά ή μη κανονικά μοτίβα E-box των γονιδίων στόχων, προκαλώντας ενεργοποίηση ή καταστολή της γονιδιακής έκφρασης αντίστοιχα [59]

### 1.2.4 MYC και Καρκίνος

Η έκφραση του *c-myc* ελέγχεται αυστηρά στα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά απορρυθμίζεται και υπερεκφράζεται στους περισσότερους καρκίνους του ανθρώπου[34], καθιστώντας το ένα από τα πιο σημαντικά ογκογονίδια. Αυτό μπορεί να προκληθεί από πολλούς μηχανισμούς σε επίπεδο DNA, RNA και πρωτεΐνης, αν και σπάνια μέσω άμεσης μετάλλαξης *c-myc* [56].

Απορρυθμισμένη έκφραση του *myc* στον καρκίνο συμβαίνει μέσω γονιδιακής ενίσχυσης [60], χρωμοσωμικής μετάθεσης [61][28], εστιακής ενίσχυση ενισχυτή [62], πολυμορφισμός ενισχυτή βλαστικής γραμμής [63], ή κοινώς μέσω ενεργοποίησης ανοδικών οδών σηματοδότησης [64].

Η υπερέκφραση του *c-myc* μπορεί να αυξήσει την αλληλεπίδραση με E-boxes χαμηλότερης συγγένειας, που προκαλούν ογκογένεση από αλλαγές στη γονιδιακή ενεργοποίηση, όπως αυτές που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη, οι οποίες δεν θα συνέβαιναν σε κανονικές συγκεντρώσεις της MYC [56].

Χαρακτηριστικό παράδειγμα απορρύθμισης της MYC όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί το λέμφωμα του Burkitt, οπότε και ανακαλύφθηκε η MYC. Εκεί έχουν εντοπιστεί χρωμοσωμικές μετατοπίσεις μεταξύ των χρωμοσωμάτων 14, 2 ή 22, που περιέχουν γονίδια για τις βαριές και ελαφριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών, και του χρωμοσώματος 8. Σε αυτές τις μετατοπίσεις εμπλέκεται και η θέση του γονιδίου *Myc*, οδηγώντας στην μετατόπιση του γονιδίου *myc*, στη θέση ενός γονιδίου αλυσίδας ανοσοσφαιρινών. Έτσι, χρησιμοποιώντας τις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων αυτών, η MYC υπερεκφράζεται στα B-λεμφοκύτταρα [65].

### 1.2.5 Θεραπευτικές Προσεγγίσεις

Ο ρόλος του *myc* στους περισσότερους ανθρώπινους όγκους το έχει καταστήσει αντικείμενο έντονης ερευνητικής μελέτης τα τελευταία χρόνια. Για τον σκοπό αυτό έχουν περιγραφεί πολλές στρατηγικές προσεγγίσεις, οι οποίες συνοψίζονται παρακάτω.

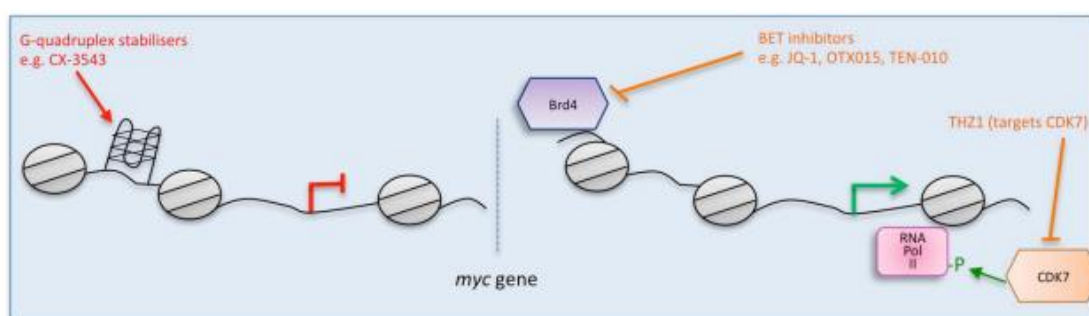
#### Άμεση αναστολή έκφρασης της MYC

Η άμεση αναστολή της MYC μπορεί να επιτευχθεί είτε με παρεμβολή στην παραγωγή είτε στη λειτουργία της. Στην πρώτη περίπτωση, θα μπορούσε κανείς να στοχεύσει στη μεταγραφή της, είτε παρεμβαίνοντας στον υποκινητή και/ή στην στρατολόγηση των



μεταγραφικών παραγόντων, είτε στη μετάφρασή της. (Εικόνες 12, 13). Στη δεύτερη περίπτωση, οι προσπάθειες πιθανόν να κατευθύνονται στην παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης της MYC με τη MAX ή στην περιοχή δέσμευσης με το DNA (Εικόνα 14). Ακολούθως περιγράφονται άμεσοι αναστολείς της παραγωγής της MYC, ενώ οι έμμεσοι αναστολείς της έκφρασής της θα αναλυθούν παρακάτω.

1) **G-quadruplexes** (γνωστά ως G4-DNA): είναι τριτοταγείς δομές που σχηματίζονται στα νουκλεϊκά οξέα από αλληλουχίες πλούσιες σε γουανίνη. Η πλούσια σε πουρίνη αλυσίδα στην περιοχή NHE III(1) του υποκινητή *myc* σχηματίζει G4-DNA [66]. Ένας αριθμός μικρών μοριακών συνδέσμων, συμπεριλαμβανομένων των κατιονικών πορφυρινών [67], κινδολίνες [68], σύμπλοκα πλατίνας [69], και ελλειπτική [70] αποδείχθηκε ότι σταθεροποιούν τέτοια G4-DNA στο γονίδιο *Myc*, καταστέλλοντας έτσι τη μεταγραφή του. Ειδικότερα, η CX-3543 (Quarfloxin) είχε αρχικά επιλεγεί ως συνδετικός παράγοντας του G4-DNA του *myc* [71] και είναι ο μόνος σταθεροποιητής που έχει φθάσει σε κλινικές δοκιμές (εισερχόμενος σε δοκιμές φάσης II για νευροενδοκρινικά καρκινώματα το 2008). Ωστόσο, η ειδικότητα αυτής της προσέγγισης δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, μιας που αποδείχθηκε ότι δεν έχει μεγάλη εξειδίκευση [72].



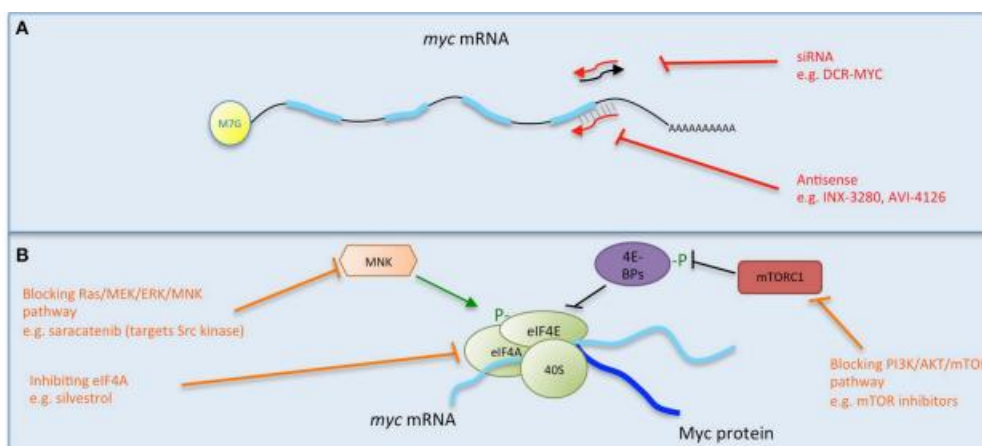
Εικόνα 12: Πολλαπλές στρατηγικές για τη στόχευση της MYC: παρέμβαση στο mRNA της MYC. Οι άμεσοι (κόκκινο) και οι έμμεσοι (πορτοκαλί) αναστολείς παρουσιάζονται σε σχέση με τον τρόπο με τον οποίο παρεμβαίνουν [73].

2) **Αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια** (Antisense Oligonucleotides, (ASOs)). Τα ASOs είναι μικρά, συνθετικά, μονόκλωνα ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια που μπορούν να αλλάξουν το RNA και να μειώσουν, να αποκαταστήσουν ή να τροποποιήσουν

την έκφραση πρωτεΐνης μέσω αρκετών διακριτών μηχανισμών. Η Myc προσβλήθηκε με αυτά για πρώτη φορά με επιτυχία *in vitro* σε πολλαπλές κυτταρικές σειρές [74] (Εικόνα 13Α). Μετά από πολλές προσπάθειες και τροποποιήσεις διαφορετικών ερευνητικών ομάδων, η AVI BioPharma (τώρα Sarepta Therapeutics) ανέπτυξε το AVI-4126 (Resten-RG), ένα φωσφοροδιαμιδικό μορφολινικό ολιγομερές ASO (PMO) που αναστέλλει την έκφραση της MYC εμποδίζοντας τη λειτουργία των ριβοσωμάτων και κατ' επέκταση τη μετάφραση του mRNA. Το PMO είναι μια τροποποίηση που έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει τη σταθερότητα *in vivo* και βιοδιαθεσιμότητα της ένωσης. Μια δοκιμή φάσης I του Resten-RG που διεξήχθη από την AVI BioPharma επέτρεψε τον προσδιορισμό της βιοδιαθεσιμότητάς της σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους και καθιέρωσε την σκοπιμότητα της χρήσης PMO στον ανθρώπινο καρκίνο [75]. Ωστόσο, κανένα φάρμακο δεν έχει αναπτυχθεί περαιτέρω για να φτάσει στην αγορά [76].

**3) Μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (siRNA, short interference RNA).** Αυτά είναι τύπος μορίων δίκλωνου RNA που αναστέλλουν τη μετάφραση, επομένως αναστέλλουν την έκφραση ορισμένων γονιδίων με συμπληρωματικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, αποικοδομώντας το mRNA μετά τη μεταγραφή. Η αρχική χρήση τους για αποτροπή μετάφρασης της MYC, παρουσίασε φτωχό φαρμακοκινητικό προφίλ. Ακολούθως έγιναν προσπάθειες ενσωμάτωσης του siRNA σε νανοσωματίδια:

- χρυσού για το L-MYC με εφαρμογή στον καρκίνο του πνεύμονα ,
- φυλλικού οξέος για το N-MYC με εφαρμογή στο νευροβλάστωμα και
- νανοσωματίδια λιπιδίων/ασβεστίου/φωσφορικών που συνδύαζαν C-MYC siRNA και γεμισταβίνη , οι οποίες έχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα [73].



*Εικόνα 13: Πολλαπλές στρατηγικές για τη στόχευση της MYC: παρέμβαση στο mRNA της MYC. Οι άμεσοι (κόκκινο) και οι έμμεσοι (πορτοκαλί) αναστολείς παρουσιάζονται σε σχέση με τον τρόπο με τον οποίο παρεμβαίνουν: (Α) Προκαλώντας την αποικοδόμηση του Myc mRNA. (Β) Αποτρέποντας τη μετάφραση του Myc. Παρατίθενται ορισμένα παραδείγματα κάθε στρατηγικής αναστολέα [73].*

### Έμμεση αναστολή της MYC

Η αναστολή της έμμεσα μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της στόχευσης μονοπατιών και γονιδίων που έλεγχει. Στα πλαίσια αυτής της προσέγγισης έχουν αναπτυχθεί αναστολείς των BET βρωμο-περιοχών όπως το (JQ1), το οποίο προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου και κυτταρική γήρανση με αποτέλεσμα σημαντική αντικαρκινική δράση σε μοντέλα ποντικών πολλαπλού μυελώματος και μοντέλα ξενομοσχεύματος του λεμφώματος Burkitt και της οξέος μυελοειδούς λευχαιμίας, ασθένειες στις οποίες το γονίδιο *myc* είναι ενισχυμένο [77].

Άλλοι έμμεσοι τρόποι αναστολής της δράσης της MYC είναι η στόχευση στην αναστολή των CDK [78], καθώς και η στόχευση σε ρυθμιστές της σταθερότητας της MYC όπως ουβικιτινάσες ή φωσφατάσες. Η MYC ουβικιτινυλιώνεται από διάφορες E3 λιγάσες, όπως η SCF (FBW7) και SCF (Skp2). Μια προσέγγιση είναι επομένως η αναστολή των αποουβικιτινυλιασών που συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της MYC, όπως οι USP28, USP38, και USP36 [79], η οποία προσέγγιση εγείρει ερωτήματα για παρενέργειες, λόγω μη ειδικότητας στη MYC.

### Άμεσοι αναστολείς που δρουν παρεμβαίνοντας στην αλληλεπίδραση πρωτεϊνών ή τη δέσμευσή τους στο DNA

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το γεγονός ότι η MYC αποτελεί μία ID πρωτεΐνη την καθιστά δύσκολο φαρμακευτικά στόχο. Ωστόσο, η αλληλεπίδραση με τη MAX και η μετέπειτα πρόσδεσή τους στο DNA, αποδείχθηκε ότι σταθεροποιεί τις αναδιπλωμένες διαμορφώσεις της περιοχής bHLH-Zip της MYC, που παρά την έλλειψη προφανούς περιοχής σύνδεσης, θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο για ειδικούς αναστολείς.

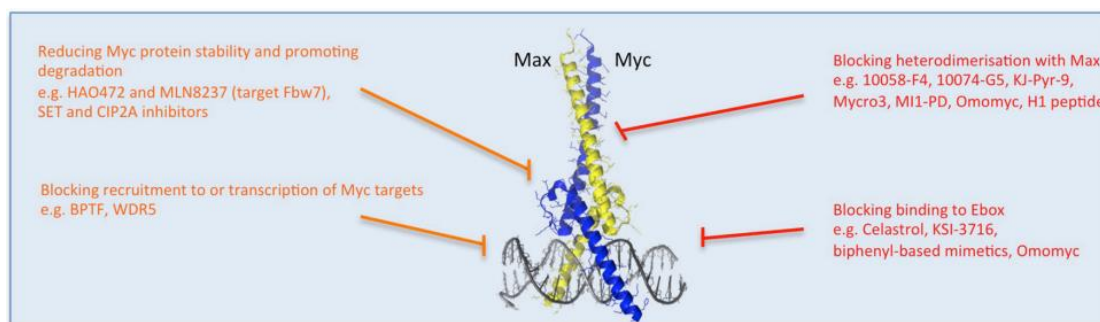
Στην κατηγορία αυτών των αναστολέων μπορούμε να διακρίνουμε 3 μηχανισμούς:

- 1) Μικρά μόρια αναστολείς της αλληλεπίδρασης δύο πρωτεϊνών
- 2) Ενώσεις που ειδικά αναστέλλουν την πρόσδεση της MYC στο DNA
- 3) Μικροπρωτεΐνες ή τμήματα πρωτεϊνών που ανταγωνίζονται τη MYC

Αναφορικά με την πρώτη κατηγορία, έχουν χρησιμοποιηθεί δύο in vitro δοκιμασίες για την ανίχνευση αναστολέων του διμερούς MYC/MAX. Η πρώτη βασίστηκε στην Μεταφορά Ενέργειας Συντονισμού Φθορισμού (FRET) με ένα σύστημα διπλού υβριδισμού της κάθε περιοχής bHLH-ZIP των δύο πρωτεϊνών με φθορίζουσες πρωτεΐνες, ενώ η δεύτερη στην πόλωση φθορισμού παρομοίως [80].

Έπειτα από πολλές προσπάθειες, ταυτοποιήθηκαν ως αναστολείς οι ενώσεις: 10058-F4 και ομόλογά του [81], που δεσμεύονται ειδικά στη μονομερή MYC, αλληλεπιδρώντας με την περιοχή H2/ φερμουάρ λευκίνης με kD 42 μM [67], και η 10074-G5, με kD 20 μM in vitro που συνδέεται στη βασική περιοχή/H1 domain [81]. Η δέσμευση και των δύο αυτών φαρμάκων στην MYC περιορίζει την ικανότητά της να υιοθετεί μια πιο καθορισμένη διαμόρφωση και εμποδίζει την αλληλεπίδραση με τη MAX [82]. Ωστόσο, και οι δύο 10058-F4 και 10074-G5 μεταβολίζονται ταχέως και έδειξαν φτωχή κατανομή σε όγκους, περιορίζοντας τη δυνατότητα εφαρμογής τους in vivo [83][84][85].

Η πρώτη και, μέχρι στιγμής, μοναδική επιτυχημένη αντι-MYC προκλινική μελέτη έγινε με τον αναστολέα Mycro3. Η ένωση αυτή προέρχεται από τις πυραζολοπυριμιδίνες και αναστέλλει τον διμερισμό MYC/MAX [52] και την πρόσδεση στο DNA, με πολύ μεγάλη ειδικότητα [71].

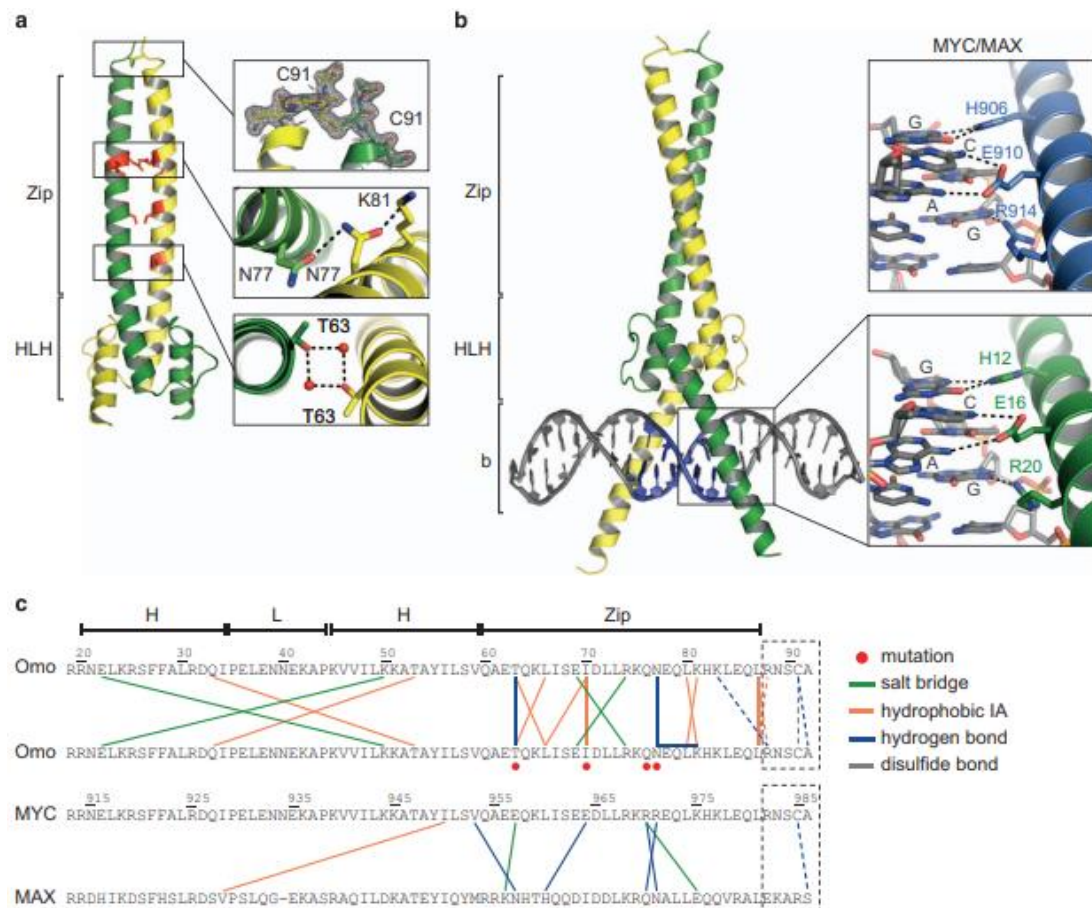


Εικόνα 14: Πολλαπλές στρατηγικές στόχευσης της MYC: μείωση της σταθερότητας και της λειτουργίας της MYC. Οι άμεσοι (κόκκινο) και έμμεσοι (πορτοκαλί) αναστολείς παρουσιάζονται σε σχέση με τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζουν τη σταθερότητα της MYC ή τη σύνδεσή της με τους εταίρους της ή το DNA. Άλλες προσεγγίσεις παρεμποδίζουν την εξαρτώμενη από τη MYC μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Ορισμένα παραδείγματα κάθε αναστολέα στρατηγικής παρατίθενται [73].

Αναφορικά με τη δεύτερη κατηγορία, έχουν ταυτοποιηθεί αρκετοί αναστολείς που στοχεύουν στην σύνδεση της MYC με το DNA μεταξύ των οποίων οι MYRA-A και NSC3088, καθώς και ένα φυσικό προϊόν, η σελαστρόλη και τα τριτερπενοειδή ομόλογά

της που δεσμεύονται και μεταβάλλουν την τεταρτοταγή δομή του προσχηματισμένου διμερούς και καταργούν τη σύνδεση του με το DNA [73].

Τέλος, μία πιο πρόσφατη έμμεση προσέγγιση αποτελεί η OmoMYC. Αυτή περιλαμβάνει την καρβοξυ-τελική βασική περιοχή, έλικα- στροφή έλικα και το φερμουάρ λευκίνης της MYC και φέρει τέσσερις σημειακές μεταλλάξεις στο φερμουάρ λευκίνης που αποσκοπούν στη μεταβολή της ικανότητας διμερισμού [86].



Εικόνα 15: Δομή και ιδιότητες δέσμησης της OmoMYC στο DNA. (α) Σχηματική αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής της OmoMYC. Οι μεταλλάξεις που διακρίνουν την OmoMYC από την MYC επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα. Τα πλαίσια στα δεξιά υπογραμμίζουν την καρβοξυ-τελική δισουλφιδική γέφυρα (επάνω), το δίκτυο δεσμών υδρογόνου που περιλαμβάνει το N77 (μέση) και τους δεσμούς υδρογόνου που γεφυρώνονται από δύο μόρια νερού μεταξύ του T63 (κάτω). (το b αντιπροσωπεύει τη βασική περιοχή- HLH: περιοχή έλικα-βρόχου-έλικας- Zip: φερμουάρ λευκίνης). (β) Κρυσταλλική δομή του ομοδιμερούς OmoMYC συνδεδεμένου με ένα consensus E-box. Το μοτίβο CACGTG επισημαίνεται με μπλε χρώμα. Τα κουτιά στα δεξιά απεικονίζουν τις αλληλεπιδράσεις συγκεκριμένων βάσεων του ενός βραχίονα του ομοδιμερούς OmoMYC (πράσινο) με το ένα μισό των παλίνδρομων αλληλουχιών E-box του δίκλωνου DNA (γκρι). Για λόγους σύγκρισης, οι επαφές πρωτεΐνης-DNA του MYC στη δομή MYC/MAX (1NKP)21 που αφορούν συγκεκριμένες βάσεις απεικονίζονται στο πάνω πλαίσιο. (γ) Αλληλεπιδράσεις που διακρίνουν το ομοδιμερές OmoMYC (άνω πλαίσιο) από το ετεροδιμερές MYC/MAX (κάτω πλαίσιο), όπως προκύπτει

*από τις κρυσταλλικές δομές. Οι μεταλλάξεις της OmoMYC σε σχέση με την MYC απεικονίζονται ως κόκκινες κουκκίδες [25].*

Τα αποτελέσματα ερευνών σχετικά με αυτό έδειξαν πως τα ομοδιμερή OmoMYC έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με το DNA όπως τα διμερή MAX/MAX και MYC/MAX, υποθέτοντας πως μπορεί να δράσει ανταγωνιστικά με το τελευταίο καταλαμβάνοντας θέσεις πρόσδεσης με το DNA και ιδίως θέσεις χαμηλής συγγένειας που είναι χαρακτηριστικό των υψηλών επιπέδων της MYC που παρατηρούνται σε πολλούς ανθρώπινους όγκους. Ωστόσο, τα διμερή OmoMYC έχουν σημαντικά ασθενέστερη επίδραση στη δέσμευση της MYC σε περιοχές που δεσμεύονται από φυσιολογικά επίπεδα MYC [25].

### 1.3 Το έργο «AKMY»

Το έργο με τίτλο “Καινοτόμος ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων με στόχο την ογκοπρωτεΐνη MYC” (AKMY) δημιουργήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος “Ερευνώ-δημιουργώ-καινοτομώ” της ΕΥΔΕ ΕΤΑΚ και εντάσσεται στο ευρύτερο επιχειρησιακό πρόγραμμα “Ανταγωνιστικότητα, επιχειρηματικότητα και Καινοτομία” (ΕΠΑνεΚ). Ο κύριος στόχος του έργου είναι η επιλογή του βέλτιστου αναστολέα της ογκοπρωτεΐνης MYC που μπορεί να οδηγήσει σε κλινικές δοκιμές. Στο πλαίσιο αυτό επιδιώκεται ο σχεδιασμός βελτιστοποιημένων παραγώγων της ένωσης-οδηγού Amy22 που έχει εξακριβωθεί από την ομάδα του ΙΙΒΕΑ ότι καταστέλλει τη δράση της ογκοπρωτεΐνης MYC in vivo, της ένωσης οδηγού Myc19 καθώς και άλλων ενώσεων που μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί να επιτυγχάνουν το ίδιο in vitro και είναι ομόλογα του Mycro3, αλλά παρουσιάζουν καλύτερες φαρμακοκινητικές και φυσικοχημικές ιδιότητες και βελτιωμένες θεραπευτικές ιδιότητες. Με οδηγό την ένωση Amy22 και τη δεύτερη οδηγό-ένωση Myc19, επιδιώκεται ταυτοποίηση περισσότερων ισχυρών ενώσεων που αναστέλλουν το σχηματισμό του συμπλόκου, με υψηλή αποτελεσματικότητα και μειωμένη τοξικότητα in vivo. Χρησιμοποιήθηκαν υπολογιστικές μέθοδοι για διαλογή ενώσεων και έγινε οργανική σύνθεση τους, έλεγχος της σύνδεσης της ένωσης με τον στόχο, φαρμακοκινητικές και μεταβολικές μελέτες, λειτουργικές αξιολογήσεις σε κυτταροκαλλιέργειες, συγκρίσεις με άλλα γνωστά φάρμακα, ταξινομήσεις των ασθενών με τη χρήση της MYC ως δείκτη και, τέλος, in vivo προκλινικές μελέτες σε ζώα. Για να πραγματοποιηθούν όλα τα παραπάνω στάδια, είναι απαραίτητο να γίνει μία σάρωση των πιθανών αναστολέων σχηματισμού του συμπλόκου MYC/MAX, με μία εύκολη, γρήγορη και ευαίσθητη in vitro διαδικασία, ικανή να προσδιορίσει αν μία προτεινόμενη χημική ένωση αναστέλλει το σύμπλοκο in vitro και τον βαθμό της αναστολής αυτής.

## 1.4 Σκοπός

Στη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί πολυάριθμες τεχνικές για την εύρεση μικρών μορίων αναστολέων του σχηματισμού συμπλόκου MYC/MAX, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Τα περισσότερα από αυτά βασίζονται σε βιοφυσικά χαρακτηριστικά και μερικά παραδείγματα τεχνικών που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι: NMR (Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός), CD (κυκλικός διχρωμισμός), FRET (μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού), EMSA (Electrophoretic Mobility-Shift Assay) και 2-υβριδική δοκιμασία. Η μέθοδος χρωματογραφίας συγγένειας (Pull-down) είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ποσοτικοποιηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών MYC και MAX, πριν και μετά την χορήγηση της, υπό εξέταση, χημικής ένωσης, και να διαπιστωθεί αν η ένωση αυτή προκαλεί αναστολή του σχηματισμού του συμπλόκου και το ποσοστό της αναστολής που προκαλεί. Η μεθοδολογία αυτή πραγματοποιείται *in vitro* και απουσία κυττάρων, με αποτέλεσμα να είναι αρκετά οικονομική και απλή στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, καθώς βασίζεται σε απλά βιολογικά συστήματα. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η βελτιστοποίηση της μεθόδου χρωματογραφίας συγγένειας (Pull-down), ώστε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση πιθανών αναστολέων του συμπλόκου MYC/MAX. Επιπροσθέτως, επιδιώχθηκε η εγκαθίδρυση μίας ακόμη πιο γρήγορης και ποσοτικής μεθόδου σάρωσης πιθανών αναστολέων του συμπλόκου τύπου ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 2.1 Παραγωγή και απομόνωση πρωτεϊνών

Προκειμένου να εφαρμοστεί το πρωτόκολλο για τον έλεγχο της ανασταλτικής δράσης πιθανών αναστολέων του σχηματισμού του συμπλόκου MYC-MAX, αρχικά έπρεπε να παραχθούν οι πρωτεΐνες MYC και MAX σε κατάλληλους φορείς, και να απομονωθούν σε επαρκή ποσότητα.

#### 2.1.1 Επιλογή Βακτηριακού στελέχους για παραγωγή πρωτεϊνών

Από προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου εγκαθιδρύθηκαν πρωτόκολλα έκφρασης και απομόνωσης των πρωτεϊνών MYC και MAX με τα προσδέματα GST και 6-His αντίστοιχα. Το βακτηριακό στέλεχος που επιλέχθηκε ήταν το BL21(DE3) pLysS του είδους *Escherichia coli*. Τα βακτήρια BL21(DE3) είναι κατάλληλα για την ετερόλογη έκφραση μη τοξικών γονιδίων. Επίσης, το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος διαθέτει χαρακτηριστικά που βοηθάνε στην παραγωγή και στην απομόνωση πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, δεν διαθέτει την πρωτεάση Lon και την πρωτεάση της εξωτερικής μεμβράνης OmpT, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση ετερόλογων πρωτεϊνών που παράγονται στα κύτταρα. Επιπλέον, αυτή η συγκεκριμένη γενετική παραλλαγή περιέχει τον προφάγο DE3 λ, που φιλοξενεί το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης που ρυθμίζεται από τον υποκινητή lacUV5. Η παρουσία IPTG (ισοπρόλυλο β-d-1-θειογαλακτοπυρανοσίδιο) είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του γονιδίου RNA πολυμεράσης. Ως εκ τούτου, τα βακτήρια BL21(DE3) αποδεικνύονται ιδανικός ξενιστής για ελεγχόμενη έκφραση ανασυνδυασμένων γονιδίων, που ελέγχεται από έναν υποκινητή που αναγνωρίζεται από την πολυμεράση T7. Ακόμα, αυτό το στέλεχος φιλοξενεί το πλασμίδιο pLysS, υπεύθυνο για την παραγωγή ελάχιστων επιπέδων λυσοζύμης T7. Το ένζυμο αυτό περιορίζει αποτελεσματικά την έκφραση των ανασυνδυασμένων γονιδίων αναστέλλοντας την T7 RNA πολυμεράση. Αυτό το συγκεκριμένο πλασμίδιο χρησιμεύει ως φορέας κλωνοποίησης για την έκφραση των πρωτεϊνών GST-MYC και His-MAX σε βακτήρια BL21(DE3) pLysS, μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως στον τομέα της μοριακής βιολογίας.

#### 2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς

Για την έκφραση των πρωτεϊνών στα βακτήρια BL21(DE3) χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια που είχαν ενσωματωμένα τα γονίδια των πρωτεϊνών MYC και MAX με κατάλληλα προσδέματα (tags). Τα αρχικά πλασμίδια παραχωρήθηκαν από το

εργαστήριο του κ. Ευστρατιάδη και μερικές τροποποιήσεις στον συνδυασμό των προσδεμάτων πραγματοποιήθηκαν από προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο της MYC συντήχθηκε με την μοριακή ετικέτα S-τρανσφεράσης γλουταθειόνης (GST) 30 kDa και οδήγησε στη δημιουργία της πρωτεΐνης GST-MYC (36 kDa), στον πλασμιδιακό φορέα pGEX6P1. Αυτή η τροποποιημένη πρωτεΐνη διατηρεί αποκλειστικά τη δομή bHLHLZ του MYC και δεν περιλαμβάνει το σύνολο της αρχικής πρωτεΐνης. Το γονίδιο MAX υποβλήθηκε σε ανασυνδυασμό με μοριακή ετικέτα 6-ιστιδίνης (6-His), βάρους 0,8 kDa, σε πλασμιδιακό φορέα pET15b. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της πρωτεΐνης His-MAX, βάρους 18 kDa. Η επιλογή των ετικετών για κάθε πρωτεΐνη βασίστηκε σε αξιολογήσεις των επιπέδων έκφρασής τους στα βακτήρια και της ικανότητάς τους να σχηματίζουν το σύμπλεγμα MYC-MAX, όπως καθορίστηκε από προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι τα πρωτεϊνικά γονίδια εισάγονται με τέτοιο τρόπο ώστε η μοριακή ετικέτα να βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο, καθώς το καρβοξυτελικό άκρο είναι απαραίτητο για τη αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών και τον σχηματισμό του συμπλόκου.

### 2.1.3 Μετασχηματισμός των βακτηρίων

Εφόσον τα ανασυνδυασμένα πλασμιδία είχαν δημιουργηθεί από προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου, το επόμενο βήμα ήταν η ετερόλογη έκφρασή τους στα βακτήρια BL21(DE3). Για την επίτευξη αυτού του σκοπού έγινε μετασχηματισμός των βακτηρίων με τη τεχνική του θερμικού σοκ. Πιο συγκεκριμένα :

- i. Μεταφορά βακτηρίων E. coli BL21D3 pLysS από τους -80°C, όπου ήταν αποθηκευμένα, σε πάγο για 15 λεπτά, για να ξεπαγώσουν και παράλληλα να αναστέλλεται η ανάπτυξή τους.
- ii. Εισαγωγή 1μl ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σε 100μl βακτηρίων και ήπια ανάδευση. Ακολουθήθηκε επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
- iii. Πραγματοποιήθηκε επώαση για 1 λεπτό στους 42°C σε υδατόλουτρο για να ανοίξουν οι πόροι της κυτταρικής μεμβράνης και να επιτραπεί η είσοδος των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.
- iv. Το δείγμα στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε πάγο για 2 λεπτά για να κλείσουν οι πόροι και να επιστρέψει η κυτταρική μεμβράνη στην κανονική της κατάσταση.

- v. Προσθήκη 200μl αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB [Luria Broth - 1% w/v NaCl (Lach-Ner), 1% w/v Tryptone ή Casein (NEOGEN), 0,5% Yeast Extract (NEOGEN)] υπό στείρες συνθήκες και επώαση στους 37°C, υπό ανάδευση (150 rpm), για 60 λεπτά για να πολλαπλασιαστούν τα βακτήρια.

Μετά το πέρας της επώασης, 50μl της καλλιέργειας επιστρώθηκαν σε κατάλληλο τρυβλίο. Το εναπομένον δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 2 λεπτά στα 6000 rpm και απορρίφθηκε το υπερκείμενο εκτός από 100μl, όπου επιστρώθηκαν σε ένα δεύτερο τρυβλίο έπειτα από επαναιώρηση του ιζήματος. Τέλος γίνεται ολονύκτια επώαση στους 37°C, με τα τρυβλία να τοποθετούνται ανάποδα, ώστε να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός των μετασχηματισμένων βακτηρίων.

#### 2.1.4 Τρυβλία επίστρωσης μετασχηματισμένων βακτηρίων

Τα τρυβλία επίστρωσης των βακτηρίων διέθεταν θρεπτικό μέσο LB εμπλουτισμένο με τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη (Cτελ=100μgr/ml) και χλωραμφενικόλη (Cτελ=25μgr/ml), ώστε να αναπτυχθούν μόνο τα μετασχηματισμένα βακτήρια. Το βακτηριακό στέλεχος BL21(DE3) διαθέτει ανθεκτικότητα στην χλωραμφενικόλη, έτσι οι αποικίες που θα αναπτυχθούν θα προέρχονται από το συγκεκριμένο στέλεχος. Η αμπικιλίνη χρησιμοποιήθηκε για την διαλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων, καθώς το πλασμίδιο pLysS φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, με αποτέλεσμα να αναπτυχθούν τα βακτήρια με τον συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα. Παράλληλα, το πλασμίδιο pLysS που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της λυσοζύμης T7, επομένως είναι απαραίτητο να διατηρηθεί.

#### 2.1.5 Καλλιέργεια μετασχηματισμένων βακτηρίων

Για την παραγωγή των πρωτεϊνών σε επιθυμητή ποσότητα είναι απαραίτητη η ανάπτυξη βακτηριακών καλλιεργειών με τελικούς όγκους 2L για την GST-MYC και 4L για την His-MAX. Η GST-MYC παράγεται σε μικρότερο τελικό όγκο, καθώς παρατηρήθηκε ότι αποδιατάσσεται και έχει χαμηλότερη ενεργότητα, ενώ η His-MAX διατηρείται πιο σταθερή. Προκειμένου να φτάσουμε στον τελικό όγκο πρέπει να γίνει μια κλιμακωτή προκαλλιέργεια από το στάδιο των τρυβλίων μέχρι το τελικό στάδιο. Αναλυτικότερα :

I. Προκαλλιέργεια όγκου 5 mL (για την GST-MYC) ή 3 mL (για την His-MAX)

- Εντός ενός αποστειρωμένου falcon tube προστέθηκαν 5ml (για την GST-MYC) ή 3ml (για την His-MAX) αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB (με 100 µg/ml αμπικιλίνη και 25 µg/ml χλωραμφενικόλη), υπό στείρες συνθήκες.
- Με τη χρήση πιπέτας απομονώθηκε μια αποικία από το τρυβλίο των 50µl και μεταφέρθηκε, υπό στείρες συνθήκες, στο θρεπτικό υλικό εντός του falcon tube.
- Επώαση στους 37°C υπό ανάδευση (200 rpm) για 6 ώρες, με ελαφρώς ανοιχτό το καπάκι για την απαραίτητη τροφοδότηση των βακτηρίων με οξυγόνο, απαραίτητο για την ανάπτυξή τους.

II. Προκαλλιέργεια 100ml

- Σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη προστέθηκαν 100ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB (με 100 µg/ml αμπικιλίνη και 25 µg/ml χλωραμφενικόλη).
- Μετά το πέρας της επώασης, μεταφέρθηκαν 1,5ml από κάθε προκαλλιέργεια στην κωνική φιάλη, υπό στείρες συνθήκες.
- Ολονύχτια επώαση της καλλιέργειας στους 37°C υπό ανάδευση (200 rpm).

III. Καλλιέργεια τελικού όγκου (2L για την GST-MYC ή 4L για την His-MAX)

Η καλλιέργεια αποτελείται από δύο (για την GST-MYC) ή τέσσερις (για την His-MAX) επιμέρους καλλιέργειες όγκου 1 L η καθεμία.

- Σε κάθε αποστειρωμένη φιάλη Erlenmeyer των 2L, προστέθηκε 1L αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB (με 100 µg/mL αμπικιλίνη και 25 µg/mL χλωραμφενικόλη).
- Μεταφορά, υπό στείρες συνθήκες, 10ml από την προκαλλιέργεια όγκου 100ml, σε καθεμία από τις κωνικές φιάλες.
- Επώαση στους 37°C, υπό ανάδευση (200 rpm).
- Έγινε φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 600 nm ανά τακτά χρονικά διαστήματα, έως ότου να ισχύει  $OD_{600nm}=0,4-0,6$ , για να προστεθεί το IPTG. Ως τυφλό, χρησιμοποιήθηκε καθαρό θρεπτικό υλικό LB (με 100 µg/ml αμπικιλίνη και 25 µg/ml χλωραμφενικόλη). Όταν η τιμή της οπτικής

πυκνότητας κυμαίνεται σε αυτό το εύρος, τότε τα βακτήρια έχουν αναπτυχθεί επαρκώς και έτσι μπορεί να γίνει η επαγωγή της παραγωγής της επιθυμητής πρωτεΐνης με το IPTG.

### 2.1.6 Επαγωγή παραγωγής επιθυμητής πρωτεΐνης με τη χρήση IPTG

Για την επαγωγή της παραγωγής των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται το χημικό μόριο IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside). Το IPTG μιμείται τη δράση της αλλολακτόζης, μια μη μεταβολιζόμενη εκδοχή της λακτόζης, και δρα ως επαγωγέας του lac οπερονίου. Αυτή η ένωση διεγείρει τη μεταγραφή του οπερονίου λακτόζης, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί το γονίδιο που ελέγχεται από αυτό το οπερόνιο. Σε αντίθεση με τη λακτόζη, το IPTG δεν μπορεί να διασπαστεί από τη  $\beta$ -γαλακτοσιδάση, επιτρέποντάς του να δεσμεύεται στον καταστολέα του οπερονίου και να το αναστέλλει χωρίς να αποικοδομείται, διατηρώντας έτσι την επαγωγή της μεταγραφής. Συνεπώς, η T7 RNA πολυμεράση, που παράγεται από το βακτηριακό στέλεχος BL21(DE3), είναι συνεχώς ικανή να συνδέεται με τον υποκινητή και να μεταγράφει τα γονίδια εντός του οπερονίου, και κατ' επέκταση των επιθυμητών γονιδίων, που έχουν εισαχθεί μέσω κλωνοποίησης στην περιοχή ORF (Open Reading Frame).

Η διαδικασία της επαγωγής με IPTG ήταν η εξής:

- Όταν κατά την φωτομέτρηση λαμβάνουμε  $OD_{600nm}=0.4-0.6$  σε καθεμία από τις κωνικές φιάλες, λαμβάνονται 1ml καλλιέργειας, για τον έλεγχο της επαγωγής, και προστίθενται 500 $\mu$ l IPTG 1M (Cτελ= 50 mM).
- Επώαση στους 20°C, ολονύκτια υπό ανάδευση.
- Το 1ml που λήφθηκε από την καλλιέργεια πριν την εισαγωγή του IPTG φυγοκεντρείται για 5min στις 6000rpm, απορρίπτεται το υπερκείμενο και αποθηκεύεται στους -20°C.
- Η ίδια διαδικασία απομόνωσης 1ml καλλιέργειας επαναλαμβάνεται και μετά το πέρας της ολονύχτιας επώασης και της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας.

### 2.1.7 Απομόνωση και αποθήκευση των βακτηρίων από την υγρή καλλιέργεια

Η απομόνωση των βακτηρίων γίνεται καθώς πρέπει να είναι σε διαφορετικό περιβάλλον, απομακρυσμένο από εξωκυττάρια πρωτεΐνες και άλλους μεταβολίτες της καλλιέργειας, για να πραγματοποιηθεί η λύση τους και να παραλάβουμε την επιθυμητή πρωτεΐνη στο βακτηριακό εκχύλισμα. Αναλυτικότερα:

- 2L της υγρής καλλιέργειας μοιράστηκαν σε 6 buckets και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 6000 rpm σε θερμοκρασία σταθερή και ίση με 4°C. Με βάση τον διαθέσιμο εξοπλισμό χρησιμοποιήθηκε η φυγόκεντρος : «Sorvall RC6+» (Thermo Fisher Scientific) και η κεφαλή αυτής: «SLA-3000».
- Απόρριψη υπερκείμενου και διατήρηση του ιζήματος σε πάγο.
- Επαναιώρηση του ιζήματος με 50ml διαλύματος λύσης [1μM Leupeptin, 1μgr/ml Aprotinin, 0,7 μgr/ml Pepstatin, 5 μgr/ml DNAase, 1mM PMSF, 50mM Tris (pH=7,5), 100mM NaCl].
- Τα βακτήρια που έχουν επαναιωρηθεί στο Lysis buffer μοιράζονται σε falcon tubes αποθηκεύονται στους - 20°C μέχρι να γίνει η λύση των κυττάρων.

### 2.1.8 Έλεγχος επαγωγής έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης

Τα δείγματα του 1ml, που λήφθηκαν πριν την εισαγωγή IPTG και μετά την ολονόχτια επώαση με αυτό, αραιώνονται με κατάλληλη ποσότητα Sample Buffer 1X [62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2,3% SDS, 10% v/v γλυκερόλη, 0,05% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue- BPB), 100 mM DTT] ώστε να έχουν ίδια συγκέντρωση βακτηρίων, βάση την τιμή απορρόφησης που λήφθηκε. Έπειτα, ακολουθήθηκε βρασμός των δειγμάτων αυτών και φόρτωση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ηλεκτροφόρηση. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, έγινε χρώση του gel με τη χρωστική Coomassie (Coomassie stain) και σύγκριση των ζωνών στο μοριακό βάρος της εκάστοτε πρωτεΐνης . Πιο συγκεκριμένα :

- Προσθήκη κατάλληλου όγκου SB 1X στα δύο δείγματα, ώστε να επιτευχθεί ισοφόρτωση.
- Βρασμός των δειγμάτων στους 100°C για 5 λεπτά.
- Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, βάψιμο του gel με τη χρωστική Coomassie και σύγκριση των ζωνών.

### 2.1.9 Λύση κυττάρων και απομόνωση/καθαρισμός πρωτεϊνών ενδιαφέροντος

Μέσω της χρήσης της προαναφερθείσας διαδικασίας, έχει καταστεί πλέον εφικτή η υπερέκφραση των πρωτεϊνών GST-MYC και His-MAX σε βακτηριακές καλλιέργειες.

Όσον αφορά την GST-MYC, για τις προθέσεις του πειράματος, δεν υπάρχει ανάγκη να καθαριστεί από τις άλλες πρωτεΐνες που υπάρχουν στο εκχύλισμα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας συγγένειας (Pull-down assay), τα σφαιρίδια γλουταθειόνης επιτελούν την αποκλειστική ακινητοποίηση της GST-MYC από το προστιθέμενο βακτηριακό εκχύλισμα, λόγω της εγγενούς συγγένειας της ετικέτας GST με τα εν λόγω σφαιρίδια. Κατά συνέπεια, υφίσταται διαχωρισμό από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες μέσα στο εκχύλισμα.

Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι GST-MYC αποικοδομείται εντός των βακτηριακών κυττάρων και αποκόπτεται το τμήμα της MYC πρωτεΐνης. Η GST όμως όντας μια σφαιρική πρωτεΐνη διατηρείται εντός των κυττάρων και στο βακτηριακό εκχύλισμα που λαμβάνουμε υπάρχει τόσο GST όσο και GST-MYC, και μάλιστα η GST σε μεγαλύτερη ποσότητα. Ως εκ τούτου, είναι επιτακτική ανάγκη να εξακριβωθεί η αναλογία GST/GST-MYC εντός του βακτηριακού εκχυλίσματος, διασφαλίζοντας ότι χρησιμοποιούνται ακριβείς ποσότητες GST-MYC στην δοκιμασία Pull-down. Για να το πετύχουμε αυτό, αναλάβαμε το έργο του καθαρισμού ενός μέρους του βακτηριακού εκχυλίσματος, απομακρύνοντας αποτελεσματικά τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης (που περιλαμβάνει τόσο GST όσο και GST-MYC) εντός του καθαρισμένου δείγματος ποσοτικοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Bradford, ενώ χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση γέλης πολυακρυλαμιδίου και χρώση με Coomassie για να διακριθεί η αναλογία GST και GST-MYC που υπάρχουν, με βάση την σχετική ένταση των ευδιάκριτων ζωνών.

Εν αντιθέσει με την GST-MYC, ο καθαρισμός της πρωτεΐνης His-MAX είναι απαραίτητος για να διαχωριστεί από άλλες πρωτεΐνες που βρίσκονται στο βακτηριακό εκχύλισμα. Η απομόνωση αυτή είναι απαραίτητη, καθώς κατά την δοκιμασία του Pull-down για τον σχηματισμό του συμπλόκου μεταξύ His-MAX και ακινητοποιημένης GST-MYC πρέπει να απομακρυνθούν οι προσμίξεις με άλλες πρωτεΐνες στο εκχύλισμα. Αυτές οι προσμίξεις εμποδίζουν την ευαισθησία της διαδικασίας και ελαττώνουν την ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, μέσω του καθαρισμού και της χρήσης της μεθόδου Bradford, καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της His-MAX στο καθαρισμένο δείγμα. Αυτή η γνώση μας διασφαλίζει την επιλογή κατάλληλων ποσοτήτων, τόσο της His-MAX στο καθαρό δείγμα όσο και του GST-MYC στο βακτηριακό εκχύλισμα, για την σωστή αναλογία των πρωτεϊνών κατά την δοκιμασία του Pull-down για την δημιουργία συμπλόκου.

Παρακάτω περιγράφονται οι διαδικασίες καθαρισμού για κάθε πρωτεΐνη ξεχωριστά.

#### 2.1.10 Λύση των βακτηρίων που υπερεκφράζουν GST-MYC

Η GST-MYC χρησιμοποιείται απευθείας από το βακτηριακό εκχύλισμα χωρίς να προηγηθεί η απομόνωσή της. Για την ανάκτησή της όμως είναι απαραίτητη η λύση των κυττάρων. Επίσης, σε κάθε διαδικασία παραγωγής GST-MYC είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της αναλογίας GST προς GST-MYC, και για αυτόν τον σκοπό πραγματοποιείται ένας πιλοτικός καθαρισμός κάθε φορά ώστε να γίνει η ποσοτικοποίηση αυτή.

Τα βήματα της διαδικασίας λύσης βακτηρίων είναι τα εξής:

- Λύση των βακτηριακών κυττάρων με τη χρήση υπερήχων (sonication). Σε 10 ml βακτηρίων σε διάλυμα λύσης εφαρμόστηκαν 6 κύκλοι υπερήχων με διάρκεια 10 δευτερολέπτων ο καθένας έντασης (amplitude) 35%. Σε όλη τη διαδικασία, το διάλυμα διατηρείται στον πάγο.
- Φυγοκέντρηση στις 15.000 rpm, για 1 ώρα, σε θερμοκρασία σταθερή και ίση με 4 °C [φυγόκεντρος : «Sorvall RC6+» (Thermo Fisher Scientific) και κεφαλή: «ss-34»].
- Συλλέγεται το υπερκείμενο, που αποτελεί το βακτηριακό εκχύλισμα, μοιράζεται ισόποσα σε μερίδες (aliquots) και αποθηκεύεται στους -80°C έως την χρήση του.

#### 2.1.11 Απομόνωση της GST-MYC από το εκχύλισμα

Για την διαδικασία καθαρισμού χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια γλουταθειόνης (Glutathione Sepharose Beads-Cytiva). Η γλουταθειόνη, ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από Glu-Cys-Gly και χρησιμεύει ως υπόστρωμα για την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Κατά συνέπεια, τόσο το GST-MYC όσο και το GST που εντοπίζονται στο βακτηριακό εκχύλισμα θα μπορούσαν να ακινητοποιηθούν αποτελεσματικά σε αυτά τα σφαιρίδια μέσω μιας αντίδρασης δέσμευσης ενζύμου-υποστρώματος που περιλαμβάνει GST και γλουταθειόνη.

Αναλυτικότερα, η διαδικασία καθαρισμού ήταν η εξής:



- Προσθήκη 30μl σφαιριδίων γλουταθειόνης σε σωληνάριο Eppendorf.
- Απομάκρυνση του διαλύματος αποθήκευσης (storage buffer), καθώς περιέχει αιθανόλη, μέσω δυο πλύσεων με 500μl διαλύματος πλύσης (50mM Tris pH=7,5, 100mM NaCl).
- Προσθήκη 500μl βακτηριακού εκχυλίσματος εντός του σωληναρίου Eppendorf.
- Επάωση του δείγματος για 1 ώρα στους 4°C υπό ανάδευση.
- Ακολουθήθηκαν πέντε πλύσεις με 500μl διαλύματος πλύσης για την απομάκρυνση των αδέσμευτων πρωτεϊνών.
- Έκλουση των σφαιριδίων με 50μl διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης (glutathione elution buffer- 50mM Tris pH=8,5, 150 mM NaCl, 20mM reduced glutathione pH=8,5) για την αποδέσμευση των ακινητοποιημένων πρωτεϊνών των σφαιριδίων. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 14.000 rpm (4°C), συλλογή του υπερκείμενου και αποθήκευση στους -20°C.

Η ανηγμένη γλουταθειόνη έχει την ικανότητα να αποδεσμεύει την GST από την γλουταθειόνη των σφαιριδίων ανταγωνίζοντάς την ίδια θέση πρόσδεσης, με τελικό αποτέλεσμα την εκτόπιση της τελευταίας και την έκλουσή της. Έτσι, στο έκλουσμα θα παρατηρείται τόσο η GST όσο και η GST-MYC.

Ακολούθως, διεξήχθη φωτομέτρηση του εκλούσματος σε μήκος κύματος 595 nm και σε συνδυασμό με τη χρήση της μεθόδου Bradford προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης. Το έκλουσμα υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση σε ένα μετουσιωτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE), το οποίο στη συνέχεια βάφτηκε με χρώση Coomassie. Αυτή η διαδικασία είχε ως στόχο την εξακρίβωση της αναλογίας GST-MYC προς GST συγκρίνοντας τις σχετικές εντάσεις των ζωνών στο πήκτωμα.

### 2.1.12 Λύση των βακτηρίων που υπερεκφράζουν His-MAX και απομόνωση της πρωτεΐνης

Σε αντίθεση με την GST-MYC, η His-MAX πρέπει να βρίσκεται σε καθαρή μορφή κατά την διαδικασία του Pull-down. Το πρώτο βήμα για την απομόνωση αποτελεί η λύση των κυττάρων, όπως συνέβη και με την GST-MYC. Η διαδικασία λύσης των κυττάρων ήταν όμοια με εκείνη που χρησιμοποιήθηκε και στην περίπτωση της GST-

MYC. Η διαδικασία της λύσης έγινε με εφαρμογή υπερήχων (sonication) και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο καθαρό δείγμα, με τη μέθοδο Bradford. Σε διάφορα στάδια της διαδικασίας λύσης των βακτηρίων και καθαρισμού της πρωτεΐνης συλλέχθηκαν δείγματα, τα οποία, στη συνέχεια, ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου, για να φανούν οι πρωτεΐνες, που υπάρχουν στο δείγμα, σε κάθε στάδιο, και να επιβεβαιωθεί η ορθότητα της διαδικασίας.

Τα βήματα της πορείας είναι τα εξής:

- Λύση των κυττάρων με εφαρμογή υπερήχων (sonication), έντασης (amplitude) 35% σε 4 κύκλους των 10 δευτερολέπτων, ανά 8ml επαναιωρημένων κυττάρων σε διάλυμα λύσης. Το δείγμα παραμένει εντός πάγου κατά την διάρκεια της διαδικασίας.
- Μετά την εφαρμογή υπερήχων συλλέχθηκαν 50μl δείγματος, για ηλεκτροφόρηση.
- Φυγοκέντρωση στις 15.000 rpm, για 1 ώρα, σε θερμοκρασία σταθερή και ίση με 4°C [φυγόκεντρος : «Sorvall RC6+» (Thermo Fisher Scientific) και κεφαλή: «ss-34»].
- Συλλέχθηκαν 50μl από το υπερκείμενο, για ηλεκτροφόρηση, και το υπόλοιπο αποθηκεύτηκε στους -20°C.
- Το ίζημα της φυγοκέντρωσης επαναιωρήθηκε σε PBS 1X και λήφθηκαν 100μl για ηλεκτροφόρηση.

Η His-MAX, που βρίσκεται στο βακτηριακό εκχύλισμα, πρέπει να απομονωθεί για να χρησιμοποιηθεί μετέπειτα στην δοκιμασία του Pull-down. Για αυτό τον σκοπό, χρησιμοποιήθηκε μια χρωματογραφία συγγένειας αξιοποιώντας στήλες πληρωμένες με σφαιρίδια νικελίου, τα «Nickel NTA Agarose Resin beads» (Qiagen). Τα σφαιρίδια αυτά είναι σφαιρίδια αгарόζης, τα οποία διαθέτουν ακινητοποιημένα ιόντα Νικελίου (Ni<sup>2+</sup>), και νιτριλοτριοξικό οξύ (nitrilotriacetic acid-NTA) και έχουν την δυνατότητα ακινητοποίησης πρωτεϊών που διαθέτουν ετικέτα μορίων ιστιδίνης. Τα μόρια της ιστιδίνης, λόγω της δομής μιδαζόλης τους, διαθέτουν μια αξιοσημείωτη έλξη προς τα ιόντα, ιδιαίτερα τα ιόντα νικελίου σε αυτό το πλαίσιο. Κατά συνέπεια, με τη χρήση αυτών των σφαιριδίων, κατέστη δυνατή η ακινητοποίηση της πρωτεΐνης His-MAX και στη συνέχεια η ανάκτησή της μέσω έκλουσης.

Η διαδικασία καθαρισμού ήταν η εξής:

- Χρησιμοποιώντας δύο στήλες, τοποθετήθηκαν 250  $\mu\text{L}$  σφαιριδίων νικελίου σε κάθε μία. Για περίπου 50 mL εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκαν 500  $\mu\text{L}$  σφαιρίδια.
- Πραγματοποιήθηκαν τρεις πλύσεις σε κάθε στήλη χρησιμοποιώντας δεκαπλάσιο όγκο, από αυτόν των σφαιριδίων, διαλύματος πλύσης (50mM Tris pH=7,5, 100mM NaCl).
- Στη συνέχεια, 30 mL βακτηριακού εκχυλίσματος προστέθηκαν σε κάθε στήλη και αναμίχθηκαν με τα σφαιρίδια. Το μίγμα αναδεύτηκε για 1 ώρα στους 4°C για να συνδεθεί η επιθυμητή πρωτεΐνη από το εκχύλισμα στα σφαιρίδια.
- Μετά την επώαση, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 10 λεπτά σε σταθερή θερμοκρασία 4°C.
- Το μεγαλύτερο μέρος του υπερκειμένου αφαιρέθηκε και αποθηκεύτηκε στους -20 °C, αφήνοντας περίπου 2ml. 50 $\mu\text{l}$  του υπερκειμένου συλλέχθηκαν για ηλεκτροφόρηση.
- Τα σφαιρίδια στη συνέχεια επαναιωρήθηκαν στα 2ml του εναπομείναντος υπερκειμένου και διαιρέθηκαν μεταξύ των δύο στηλών. Η διαδικασία συνεχίστηκε σε ένα δωμάτιο στους 4 °C.
- Αφού το υπερκείμενο πέρασε μέσα από τα σφαιρίδια, πραγματοποιήθηκαν πλύσεις:
  - Δύο πλύσεις με δεκαπλάσιο όγκο, σε σχέση με τον όγκο των σφαιριδίων, διαλύματος πλύσης.
  - Δύο πλύσεις με δεκαπλάσιο όγκο διαλύματος πλύσης + 20mM Ιμιδαζόλιο.
  - Δύο πλύσεις με δεκαπλάσιο όγκο διαλύματος πλύσης + 50mM Ιμιδαζόλιο.
- Η πρωτεΐνη His-MAX εκλούστηκε με προσθήκη δεκαπλάσιου όγκου διαλύματος έκλουσης (διάλυμα πλύσης + 250mM Ιμιδαζόλιο). Τα εκλούσματα ή κλάσματα (fractions) συλλέχθηκαν καθώς έβγαιναν από τη στήλη. Το πρώτο εκλούσμα αναμενόταν να μην φέρει πρωτεΐνη λόγω του νεκρού όγκου μεταξύ

των σφαιριδίων, ενώ το έκτο έκλουσμα αναμενόταν να έχει ελάχιστη πρωτεΐνη αφού το μεγαλύτερο μέρος του είχε ήδη εκλουστεί στα ενδιάμεσα κλάσματα.

- Η πρωτεΐνη στα διαδοχικά εκλούσματα ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford. Τα εκλούσματα με παρόμοιες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης συνδυάστηκαν και κάθε συγκεντρωμένο δείγμα υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση για να προσδιοριστεί η καθαρότητα της πρωτεΐνης.
- Τα εκλούσματα αποθηκεύτηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης- Μέθοδος Bradford

Χρησιμοποιώντας τη φασματοφωτομετρική τεχνική Bradford, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση πρωτεΐνης σε κάθε διάλυμα. Ακολουθήθηκε το συνιστώμενο πρωτόκολλο από τον κατασκευαστή, Bio-Rad, το οποίο περιελάμβανε την προετοιμασία ενός διαλύματος χρωστικής συνδυάζοντας 800μl ddH<sub>2</sub>O με 200μl αντιδραστηρίου Bradford. Στη συνέχεια, ένας όγκος δείγματος της άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης προστέθηκε στο διάλυμα και μετά από ανάδευση, διεξήχθη φωτομετρία σε μήκος κύματος 595 nm. Το διάλυμα χρωστικής χωρίς το δείγμα πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό. Η τιμή οπτικής απορρόφησης που λήφθηκε από το δείγμα στη συνέχεια αντιστοιχίστηκε με τη συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας μια τυπική καμπύλη, η οποία δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας ποικίλες συγκεντρώσεις διαλύματος αλβουμίνης ορού βοοειδών (BSA).

## 2.3 Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τη διάκριση πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων, βασισμένη στο μέγεθος και στα φορτία τους. Η ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών. Αυτό το τζελ, διαθέτει δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS), έναν ισχυρό ανιονικό καθαριστικό παράγοντα που αποδιατάσσει αποτελεσματικά τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, διαταράσσει την τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών και προσδένεται στην επιφάνεια τους, προσδίδοντάς τους έτσι ένα αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο ανάλογο με το μέγεθός τους. Κατά συνέπεια, οι πρωτεΐνες εντός του διαλύματος υφίστανται

διαχωρισμό που βασίζεται τόσο στο φυσικό τους μέγεθος όσο και στο ηλεκτρικό τους φορτίο, καθώς διασχίζουν τους πόρους του τζελ, ύστερα από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου.

Το πήκτωμα αποτελείται από δύο διακριτά τμήματα, τη ζώνη στοίβαξης και τη ζώνη διαχωρισμού, με κάθε τμήμα να έχει ξεχωριστά χαρακτηριστικά. Τοποθετημένη στο ανώτερο μέρος της πηκτής, η ζώνη στοίβαξης χρειάζεται για να ισοσταθμιστούν οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος και να γίνει η έναρξη του διαχωρισμού τους από ένα κοινό σημείο εκκίνησης. Εν τω μεταξύ, στο κάτω τμήμα της πηκτής βρίσκεται η ζώνη διαχωρισμού, όπου οι πρωτεΐνες ταξινομούνται σύμφωνα με τα αντίστοιχα μεγέθη τους. Ο ρυθμός με τον οποίο οι πρωτεΐνες διασχίζουν το πήκτωμα συσχετίζεται αντιστρόφως με το μέγεθός τους, καθώς οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες τείνουν να μπλέκονται στους πόρους της πηκτής σε μεγαλύτερο βαθμό.

Οι διαστάσεις των πόρων εξαρτώνται από την αναλογία ακρυλαμίδιου που υπάρχει μέσα στο πήκτωμα. Τυπικά, χρησιμοποιούνται πηκτές που περιέχουν 11, 12 και 15% ακρυλαμίδιο. Στην επιδίωξη της μελέτης των πρωτεϊνών που έχουν σημασία σε αυτή τη διατριβή, χρησιμοποιήθηκαν πηκτές που αποτελούνταν από 15% ακρυλαμίδιο. Παρακάτω παρουσιάζονται τα ακριβή συστατικά που περιλαμβάνουν οι ζώνες στοίβαξης και διαχωρισμού του τζελ.

- Ζώνη στοίβαξης (5mL)
  - 2,9 ml απιονισμένο νερό
  - 0,75 ml ακρυλαμίδης 30%
  - 1,25 ml 0,5M Tris pH 6,8
  - 50 μl SDS 10%
  - 50μl APS 10%
  - 5μl TEMED
- Ζώνη διαχωρισμού (10mL)
  - 2,3 ml απιονισμένο νερό
  - 5 ml ακρυλαμίδης 30%
  - 2,5 ml 1,5M Tris pH 8,8
  - 100 μl SDS 10%
  - 100 μl APS 10%
  - 5 μl TEMED

Κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα SDS Running Buffer 1x.

### 2.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων ηλεκτροφόρησης

Τα δείγματα πρωτεϊνών προς ηλεκτροφόρηση πρέπει να έχουν συγκεκριμένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και αναλόγως να προσαρμόζονται οι ποσότητες του δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί. Συγκεκριμένα, για μείγματα πρωτεϊνών, μέσα στα οποία βρίσκεται η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, επιλέγονται 80 μg. Για δείγμα καθαρής πρωτεΐνης επιλέγονται 4-5 μg. Στα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση προστίθεται διάλυμα Sample Buffer (Cτελ=1X), μέχρι τελικού όγκου 20 μL. Απαιτείται βρασμός για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση (1 min στις 14000 rpm), ώστε να «πέσει» ο όγκος του δείγματος που μετατοπίστηκε στα τοιχώματα, λόγω του βρασμού. Ο πρωτεϊνικός μάρτυρας, που χρησιμοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής, είναι ο BlueStar Prestained Protein Marker (MWP03, Nippon Genetics).

### 2.3.2 Χρώση με Coomassie brilliant blue

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, είναι δυνατή η χρώση της πηκτής με τη χρωστική Coomassie brilliant blue (40% v/v Methanol, 10% v/v Acetic Acid, 0,15 % w/v Coomassie brilliant blue R-250), η οποία προσδένεται στα πρωτεϊνικά μόρια. Η διάρκεια της χρώσης διαρκεί 20 λεπτά, και στη συνέχεια απαιτείται ξέπλυμα με ρυθμιστικό διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining buffer) για 40 λεπτά. Στη συνέχεια, το πήκτωμα πρέπει να βυθιστεί σε ένα αραιωμένο αποχρωματιστικό διάλυμα, συμπληρωμένο με απιονισμένο νερό, μέχρι να εξαλειφθεί όλη η περιττή βαφή, επιτρέποντας έτσι την εμφανή παρουσία ευδιάκριτων ζωνών.

### 2.3.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western – Western Blot

Η τεχνική του Western blotting επιτρέπει την ακριβή αναγνώριση και μέτρηση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης μέσα σε ένα σύνθετο μείγμα. Στην τρέχουσα μελέτη μας, χρησιμοποιήσαμε αυτή τη μέθοδο για την επιτυχή ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης His-MAX, η οποία βρίσκεται σε μοριακό βάρος 18 kDa εντός του τζελ. Η διαδικασία είναι η εξής:

- Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (GE Healthcare Life Sciences). Κατά τη διαδικασία αυτή, η πηκτή και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμβαπτίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer) και

εφαρμόστηκε σταθερή ένταση ρεύματος 200 mA, για 1 ώρα σε χώρο θερμοκρασίας 4 °C, ώστε οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες του πηκτώματος να μεταφερθούν στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

- Η μεμβράνη ξεπλύθηκε τοπικά 2 φορές με PBS 1X.
- Επώαση με διάλυμα δέσμησης [blocking buffer, 5 % w/v γάλα σε διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline, PAA Laboratories GmbH) (1X)- Tween 20 (0,1%) ] για 1 ώρα, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Γίνεται με τον τρόπο αυτόν δέσμηση των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων.
- Πραγματοποιήθηκαν 3 τοπικές πλύσεις με διάλυμα PBS 1X - Tween 20 (0,1%)
- Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα, έναντι της πρωτεΐνης στόχου, για 1 ώρα, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Συγκεκριμένα για την MAX πρωτεΐνη, χρησιμοποιείται το amax αντίσωμα:199489 (Abcam), σε αραιώση 1:6000 [σε διάλυμα PBS (1X)- Tween 20 (0,1%)].
- Τέσσερις πλύσεις, των πέντε λεπτών η καθεμία, με διάλυμα PBS (1X)- Tween 20 (0,1%).
- Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP), για 1 ώρα, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Συγκεκριμένα για την MAX πρωτεΐνη χρησιμοποιείται το arabbit, σε αραιώση 1:6000 [σε διάλυμα δέσμησης- 5 % w/v γάλα σε διάλυμα PBS (1X)- Tween 20 (0,1%)].
- Τέσσερις πλύσεις, των πέντε λεπτών η καθεμία, με διάλυμα PBS (1X)- Tween 20 (0,1%).
- Επώαση της μεμβράνης για 5 λεπτά με αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας ECL (Roche Diagnostics GmbH).
- Εμφάνιση σήματος εντός κατάλληλης συσκευής προσδιορισμού χημειοφωταύγειας. Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται η συσκευή : «Azure biosystems 600».

## *2.4 Ποσοτικοποίηση των ζωνών της μεμβράνης και στατιστική ανάλυση*

Η ποσοτικοποίηση των ζωνών πραγματοποιείται με το λογισμικό ImageJ (NIH). Η χρήση του συγκεκριμένου υπολογιστικού προγράμματος επιτρέπει τον προσεγγιστικό υπολογισμό της ποσότητας πρωτεΐνης που περιέχεται στην κάθε μπάνα. Οι τιμές που λαμβάνονται, μετά από κατάλληλη επεξεργασία, χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία

επιθυμητού γραφήματος, με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism. Για την στατιστική ανάλυση, κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον 3 φορές.

## *2.5 Χημικές ενώσεις πιθανοί αναστολείς του σχηματισμού του συμπλόκου*

Στο πλαίσιο συνεργασίας με άλλα εργαστήρια, μας δόθηκαν διάφορες μικρές χημικές ενώσεις, οι οποίες είναι πιθανόν να στοχεύουν την MYC πρωτεΐνη, με σκοπό την αναστολή σχηματισμού του ογκογόνου συμπλόκου MYC:MAX. Οι ενώσεις αυτές δόθηκαν σε στερεή μορφή και διαλύθηκαν με DMSO σε τελική συγκέντρωση 10mM. Στην παρούσα πτυχιακή, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χρωματογραφίας συγγένειας, για να διαπιστωθεί αν οι ενώσεις αυτές είναι αναστολείς του συμπλόκου και να προσδιοριστεί το ποσοστό αναστολής. Οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν είναι οι εξής: VM-17, VM-18, ACVM-18 VM-39, VM-43, VM-46, VM-47, VM-48, Myc23s, S14, , S11, S08, S11HCl, Myci23S, Myci59 (Cτελ=1mM), Myci63, Myci68, CSI107, CSI118, CSI86, N-303-1, N-303-4, Smyc-18, , PA-04, PA-11, M-10, C-45, C44, EMA-25, NP-2, NP-3, BS-44, BS-45, BS-23, ET-03, ET-04, MC-01, AS-86, MM-5-1, PA-39, EMA-30, B-55, N-191 και NP-1 Με την μέθοδο ELISA, που εγκαθιδρύθηκε, ελέγχθηκε ο αναστολέας S11, που είναι διαλυμένος σε DMSO, σε τελική συγκέντρωση 10 mM.

## *2.6 Δοκιμασία χρωματογραφίας στήλης (Pull-down Assay) για την μελέτη της ανασταλτικής δράσης των χημικών μορίων*

Η δοκιμασία των αναστολέων βασίστηκε στην τεχνική της μεθόδου Pull-Down. Αναλυτικότερα, η GST-MYC ακινητοποιείται σε σφαιρίδια γλουταθειόνης και έπειτα επώαζεται σε διάλυμα παρουσία της His-MAX. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, όταν στο διάλυμα δεν υπάρχει αναστολέας, οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν το ενεργό ετεροδιμερές MYC/MAX. Έτσι, κατά την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας Western αναμένεται να εντοπιστεί έντονη μπάντα στο μοριακό βάρος της His-MAX (18kDa). Όπως είναι αναμενόμενο λόγω της επίδρασης του SDS και του βρασμού κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, το συμπλόκο θα έχει αποδιαταχθεί



και για αυτό εντοπίζεται η His-MAX στο μοριακό της βάρος και όχι στο ύψος του μοριακού βάρους του συμπλόκου. Σε περίπτωση όμως επίδρασης ανασταλτικού μορίου, η δημιουργία του συμπλόκου δεν θα πραγματοποιηθεί σε ίδιο βαθμό, η ποσότητα της His-MAX στην μεμβράνη θα είναι λιγότερη και επομένως η ένταση της μπάντας αναμένεται να μην είναι το ίδιο έντονη ή να μην ανιχνεύεται καθόλου σε περίπτωση ολικού αναστολέα.

Βασικά σημεία της μεθόδου που πρέπει να διευκρινιστούν είναι τα εξής :

- Επειδή η συγκεκριμένη διαδικασία αποτελεί δοκιμασία δράσης αναστολέων και έπρεπε να ελεγχθούν πολλά πιθανά μόρια, η μέθοδος Pull-Down πραγματοποιείται σε δοκιμαστικά σωληνάρια Eppendorf αντί σε στήλη χρωματογραφίας.

- Σε κάθε δοκιμασία χρησιμοποιείται ένας αριθμός μαρτύρων για να ελεγχθεί η ειδικότητα της μεθόδου και η ικανότητά της να προσδιορίζει την ανασταλτική δράση μορίων με ποσοτικό τρόπο. Έτσι, οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- Ένας αρνητικός μάρτυρας (negative control) στον οποίο εκτελείται κανονικά η διαδικασία χωρίς όμως την αρχική ακινητοποίηση της GST-MYC στα σφαιρίδια. Με αυτό τον τρόπο εντοπίζουμε την μη ειδική πρόσδεση της His-MAX στα σφαιρίδια, τα οποία αποτελούν τον θόρυβο που θα πρέπει να αφαιρεθεί από τα άλλα δείγματα. Επιπροσθέτως, το δείγμα αυτό προσομοιάζει το σενάριο της πλήρης αναστολής σχηματισμού του συμπλόκου (αναστολή κατά 100%).

- Ένας αριθμός θετικών μαρτύρων (positive controls) οι οποίοι θα μας δείχνουν την δημιουργία συμπλόκου όπως θα πραγματοποιηθεί υπό φυσιολογικές συνθήκες, και κάποιοι μάρτυρες ακόμα οι οποίοι θα μας δείχνουν την μερική αναστολή του συμπλόκου. Αυτό συμβαίνει μειώνοντας τον όγκο του βακτηριακού εκχυλίσματος που προστίθεται στα σφαιρίδια και αναλογική θα είναι και η μείωση του σήματος που θα λάβουμε στην διαδικασία του Western. Οι θετικοί μάρτυρες που επιλέχθηκαν είναι :

- Θετικός μάρτυρας που περιέχει τον ολικό όγκο του βακτηριακού εκχυλίσματος (1μl). Η συνθήκη αυτή αποτελεί το δείγμα του βέλτιστου σχηματισμού του συμπλόκου.

- Θετικός μάρτυρας που περιέχει το 1/3 του συνολικού όγκου του βακτηριακού εκχυλίσματος (0,3μl), και άρα περιέχει το 1/3 της συνολικής MYC (προσομοιάζει την περίπτωση αναστολέα που προκαλεί αναστολή κατά 67%)
- Θετικός μάρτυρας που περιέχει το 1/10 του συνολικού όγκου του βακτηριακού εκχυλίσματος (0,1 μl) (προσομοιάζει την περίπτωση αναστολέα που προκαλεί αναστολή κατά 90%)
- Ο επιθυμητός όγκος βακτηριακού εκχυλίσματος GST-MYC υπολογίστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε η αναλογία των mol μεταξύ των πρωτεϊνών να είναι : 1 GST-MYC / 500 His-MAX. Για να επιτευχθεί η συγκεκριμένη αναλογία:
  - Υπολογίζεται με τη μέθοδο Bradford η συγκέντρωση της GST-MYC πρωτεΐνης στο βακτηριακό εκχύλισμα, μέσω της επώασης ορισμένου όγκου εκχυλίσματος με σφαιρίδια γλουταθειόνης και έκλουση της πρωτεΐνης. Προσοχή χρειάζεται στο ότι, μαζί με την GST-MYC υπάρχει και ως παραπροϊόν GST πρωτεΐνη, με αναλογία που είναι δυνατόν να ποικίλει κάθε φορά. Όπως είναι φυσικό, το παραπροϊόν προσδένεται στα σφαιρίδια και άρα επηρεάζει τη συγκέντρωση που λαμβάνεται με την μέθοδο Bradford. Έτσι, η συγκέντρωση του παραπροϊόντος υπολογίζεται και αφαιρείται από τους υπολογισμούς (συνήθης αναλογία: 1 GST-MYC / 5 GST).
  - Με βάση τη συγκέντρωση του δείγματος His-MAX και τον όγκο που θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε, υπολογίζουμε τα μg πρωτεΐνης που προσθέτουμε.
  - Ξέροντας ότι:  $M_{r(GST-MYC)} = 36 \text{ kDa}$  και  $M_{r(His-MAX)} = 18\text{kDa}$ , υπολογίζουμε τον όγκο βακτηριακού εκχυλίσματος που θα επώασουμε στα σφαιρίδια, ώστε να ισχύει η αναλογία των mol: 1 GST-MYC / 500 His-MAX.

Με βάση τα παραπάνω το τελικό πρωτόκολλο που καθιερώσαμε είναι το εξής :

- Μεταφορά του βακτηριακού εκχυλίσματος που περιέχει την GST-MYC από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  σε πάγο, μέχρι να ξεπαγώσει.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 14000rpm για 5min στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Με την μέθοδο Bradford υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο. Το υπερκείμενο παραμένει στον πάγο έως την χρήση του.

- Δημιουργία διαλύματος αλβουμίνης ίδιας συγκέντρωσης (συνήθως είναι  $C=14\text{mg/ml}$ ) με εκείνη του εκχυλίσματος και διατήρηση σε πάγο.
  - Σφαιρίδια γλουταθειόνης μοιράζονται σε δοκιμαστικά σωληνάρια Eppendorf. Ο αριθμός των Eppendorf αντιστοιχεί σε αυτόν των συνθηκών συμπεριλαμβανομένων και των control ( 1 αρνητικό – 3 θετικά). Ο όγκος των σφαιριδίων σε κάθε συνθήκη πρέπει να αντιστοιχεί σε  $\sim 35\mu\text{l}$ .
  - Δύο πλύσεις με  $500\mu\text{l}$  διαλύματος πλύσης ( $50\text{mM}$  Tris  $\text{pH}=7,5$ ,  $100\text{mM}$  NaCl) σε κάθε συνθήκη για απομάκρυνση του διαλύματος αποθήκευσης των σφαιριδίων που αποτελείται από καθαρή αιθανόλη.
  - Προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος αλβουμίνης και βακτηριακού εκχυλίσματος σε κάθε συνθήκη. Πιο συγκεκριμένα :
    - Προσθήκη  $200\mu\text{l}$  διαλύματος πλύσης στο αρνητικό control και τοποθέτηση στους  $4^\circ\text{C}$ .
    - Στα θετικά control και στους πιθανούς αναστολείς προστίθεται:
      - Control  $1\mu\text{l}$  →  $200\mu\text{l}$  BSA  $14\text{mg/ml}$  +  $1\mu\text{l}$  βακτηριακού εκχυλίσματος
      - Control  $0,3\mu\text{l}$  →  $200\mu\text{l}$  BSA  $14\text{mg/ml}$  +  $0,3\mu\text{l}$  βακτηριακού εκχυλίσματος
      - Control  $0,1\mu\text{l}$  →  $200\mu\text{l}$  BSA  $14\text{mg/ml}$  +  $1\mu\text{l}$  βακτηριακού εκχυλίσματος 1:10
      - Πιθανοί αναστολείς →  $200\mu\text{l}$  BSA  $14\text{mg/ml}$  +  $1\mu\text{l}$  βακτηριακού εκχυλίσματος
- Σημείωση: το 1/10 του όγκου προστίθεται μετά από κατάλληλη αραιώση του αρχικού βακτηριακού εκχυλίσματος στο διάλυμα αλβουμίνης που παρασκευάστηκε πιο πριν για να αποφευχθεί ο χειρισμός πολύ μικρών όγκων.
- Επώαση στους  $4^\circ\text{C}$ , υπό ανάδευση, για 90mins
  - Μετά το πέρας της επώασης, φυγοκέντρωση στις  $14000\text{ rpm}$ , για 1min στους  $4^\circ\text{C}$  και απόρριψη του υπερκείμενου.
  - Τρεις πλύσεις με  $500\mu\text{l}$  διαλύματος πλύσης η κάθε μια για κάθε συνθήκη.
  - Προετοιμασία Blocking Buffer
    - Vτελ.= $1\text{ml}$
    - NaCl  $5\text{M}$  →  $10\mu\text{l}$

Tris 1M/pH 7.5 → 25μl

BSA 100mg/ml → 200μl

ddH<sub>2</sub>O → 765μl

- Προσθήκη σε όλες τις συνθήκες 100μl Blocking buffer και επώαση υπό ανάδευση για 30min στους 4°C (από το αρνητικό control έχει προηγηθεί απόρριψη του διαλύματος πλύσης που είχε προστεθεί).

- Μετά το πέρας της επώασης, φυγοκέντρωση στις 14000 rpm, για 1 min, στους 4°C και απόρριψη υπερκειμένου.

- Δύο πλύσεις με 500μl διαλύματος πλύσης η κάθε μια για κάθε συνθήκη.

- Προσθήκη 50μl διαλύματος πλύσης σε όλα τα δείγματα και:

- από 2 μl DMSO (Cτελ= 4%) (Dimethyl Sulfoxide- SIGMA) στο θετικό και στα αρνητικά control (η συγκεκριμένη προσθήκη γίνεται ώστε να επιτευχθούν ίδιες συνθήκες στους μάρτυρες και στα δείγματα δοκιμής της αναστολής χημικών μορίων, τα οποία βρίσκονται διαλυμένα σε DMSO. Σε περίπτωση που γίνει δοκιμή χημικού μορίου διαλυμένου σε άλλο διαλύτη, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ο συγκεκριμένος διαλύτης).

- κατάλληλο όγκο από κάθε πιθανό αναστολέα, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση αναστολέα σε κάθε διάλυμα 0,4 mM.

- Επώαση για 10min, υπό ανάδευση, στους 4°C.

- Προσθήκη κατάλληλου όγκου His-MAX πρωτεΐνης, ώστε να ισχύει η τελική αναλογία mol 1 GST-MYC / 500 His-MAX κατά την επώαση. Πιο συγκεκριμένα: Δημιουργείται διάλυμα His-MAX πρωτεΐνης που περιλαμβάνει διάλυμα αλβουμίνης (C= 1mg/ml), στο οποίο ο διαλύτης είναι το διάλυμα πλύσης, και κατάλληλη ποσότητα His-Max (1,4 μg His-MAX σε κάθε συνθήκη) ώστε, όταν στη συνέχεια προστεθεί στην MYC, η αναλογία MYC προς MAX να είναι 1:500. Μεταφορά από 50μl του συγκεκριμένου διαλύματος (διάλυμα πλύσης+ αλβουμίνη+ His-MAX) σε κάθε συνθήκη.

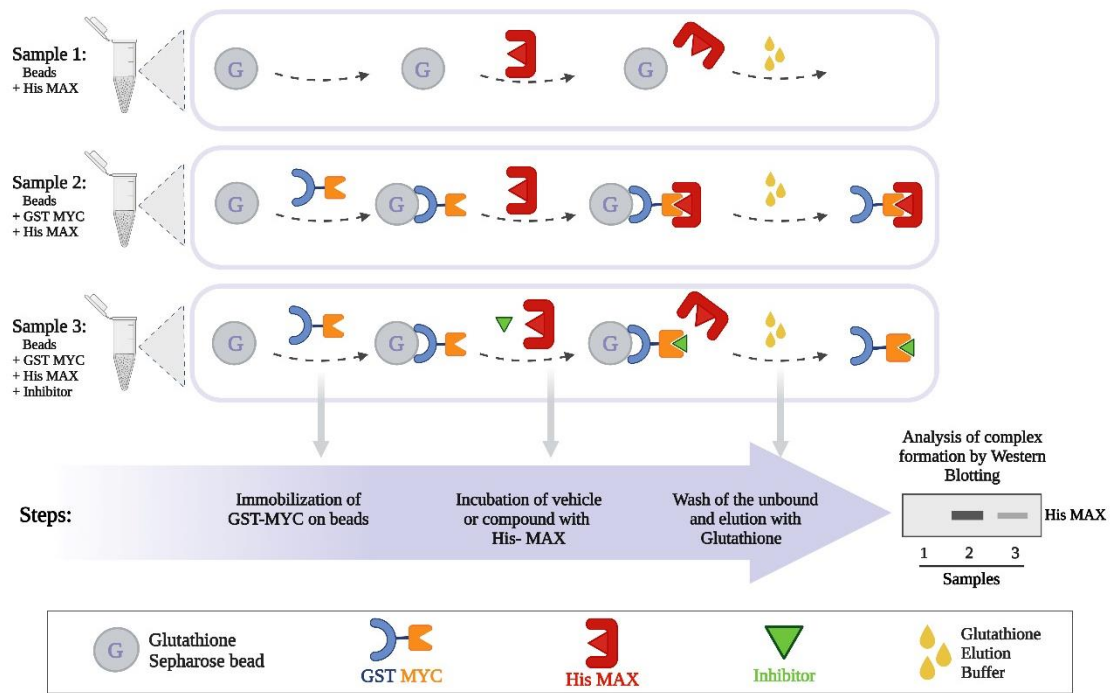
- Επώαση για 10min, υπό ανάδευση, στους 4°C.

- Φυγοκέντρωση στις 14000 rpm, για 1 min, στους 4°C. Αποθήκευση του υπερκειμένου στους -20°C (περιέχει ό,τι δεν δέθηκε στα σφαιρίδια και μπορεί να χρειαστεί να ελεγχθεί).

- Ακολουθούν τρεις πλύσεις με 500μl διάλυμα πλύσης η καθεμία.

- Δεύτερη επώαση, για 5min υπό ανάδευση στους 4°C, με τον πιθανό αναστολέα όπως προηγήθηκε προηγουμένως (50μl διαλύματος πλύσης σε όλες τις συνθήκες και 2μl DMSO στα control και κατάλληλου όγκου από κάθε πιθανό αναστολέα).
- Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm, για 1 min, στους 4°C και απόρριψη υπερκειμένου.
- Τέσσερις πλύσεις με 500μl διαλύματος πλύσης η κάθε μια για κάθε συνθήκη.
- Προσθήκη από 200μl διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης (glutathione elution buffer- 50mM Tris pH=8,5, 150 mM NaCl, 20mM reduced glutathione pH=8,5) σε κάθε συνθήκη.
- Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm, για 1 min, στους 4°C, και συλλογή του υπερκειμένου καθώς αποτελεί το επιθυμητό δείγμα που θα ηλεκτροφορηθεί και τελικά από την ανοσοαποτύπωση κατά Western, θα ποσοτικοποιηθεί η His-MAX πρωτεΐνη, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη δράση των χημικών μορίων. Το έκλουσμα αποθηκεύεται στους -20°C.

Στην εικόνα 16, παρουσιάζεται ένα σχήμα με την αρχή της μεθοδολογίας.



Εικόνα 16: Αρχή της μεθοδολογίας. Παρουσιάζονται 3 συνθήκες και τα βασικά στάδια του πειράματος. Το πρώτο δείγμα είναι ο αρνητικός μάρτυρας, στον οποίο δεν προστέθηκε εκχύλισμα GST-MYC, αλλά προστίθεται His-MAX, και αναμένουμε να μη δώσει σήμα στο Western blot. Το δεύτερο δείγμα είναι ο θετικός μάρτυρας, στον οποίο προστίθεται η μεγαλύτερη ποσότητα εκχυλίσματος GST-MYC και η His-MAX, και αναμένεται να δώσει έντονο σήμα στο μοριακό βάρος της His-MAX. Τέλος, στο τρίτο δείγμα ελέγχεται η δράση ενδεικτικά ενός αναστολέα (εκ των 5 που είναι δυνατό να ελεγχθούν σε κάθε δοκιμασία), ο οποίος προστίθεται μετά την ακινητοποίηση της GST-MYC στα σφαιρίδια. Η μείωση της έντασης της ζώνης της His-MAX, σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα, στο Western blot δείχνει το ποσοστό αναστολής, που προκαλεί η συγκεκριμένη χημική ένωση. (Η εικόνα σχεδιάστηκε με τη χρήση του προγράμματος BioRender) (Πηγή: poster που δημοσιεύσαμε στο 72ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας (EEBMB) με τίτλο “Development of a novel in vitro assay for the identification of chemical inhibitors of the MYC/MAX protein complex”.)

## 2.7 Δοκιμασία ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) για την μελέτη της ανασταλτικής δράσης των χημικών μορίων

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, προχωρήσαμε στην εγκαθίδρυση μίας δοκιμασίας ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) και στην βελτιστοποίηση της, για τον εντοπισμό πιθανών αναστολέων του συμπλόκου.

Η μέθοδος ELISA είναι ευαίσθητη και χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση διαφόρων ουσιών, όπως αντισώματα, αντιγόνα, πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες και ορμόνες. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό της His-MAX. Η δοκιμασία πραγματοποιείται σε πιάτα που καλύπτονται με

γλουταθειόνη (Pierce™ Glutathione Coated Plates, Thermo Scientific™), ώστε η πρωτεΐνη GST-MYC, του προστιθέμενου εκχυλίσματος, να ακινητοποιηθεί στα πιάτα και να απομακρυνθούν οι άλλες πρωτεΐνες του εκχυλίσματος, μέσω πλύσεων. Μετά την ακινητοποίηση και τις πλύσεις, προστίθεται η καθαρή His-MAX, για τον σχηματισμό του συμπλόκου. Μετά από πλύσεις, για να απομακρυνθεί η His-MAX, που δε δέθηκε στα πιάτα, προστίθεται πρώτο αντίσωμα έναντι της His-MAX και δεύτερο αντίσωμα, που είναι συζευγμένο με HRP. Μετά από την αντίδραση με OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride), γίνεται εντοπισμός του σήματος φθορισμού στα 492 nm και ποσοτικοποιείται η His-MAX και, κατά συνέπεια, το σύμπλοκο που σχηματίστηκε. Έτσι, και στο συγκεκριμένο πείραμα, μπορεί να γίνει επώαση με τον πιθανό αναστολέα και να προσδιοριστεί η αναστολή, μέσω του μειωμένου σήματος φθορισμού στα 492 nm, σε σχέση με το θετικό control.

Όπως και στην περίπτωση της χρωματογραφίας συγγένειας, χρησιμοποιούνται control, για να προσδιοριστεί η ειδικότητα της μεθόδου και η ακρίβεια στον εντοπισμό της His-MAX. Συγκεκριμένα, χρειάζονται 3 θετικά control και 3 αρνητικά control, ένα για κάθε θετικό. Σε όλα τα θετικά control προστίθεται ίδια και σταθερή ποσότητα GST-MYC (3  $\mu$ L εκχυλίσματος) και μειούμενες ποσότητες His-MAX. Οι μειούμενες ποσότητες His-MAX προσομοιάζουν την αναστολή ενός πιθανού αναστολέα και η ύπαρξη αναλογικότητας στο σήμα, που λαμβάνεται στα 3 θετικά control, σημαίνει ότι η μέθοδος είναι ποσοτική και μπορεί να προσδιοριστεί, με ασφάλεια, ακριβές ποσοστό αναστολής ενός πιθανού αναστολέα. Στο πρώτο θετικό control, προστίθεται η μέγιστη ποσότητα His-MAX, δηλαδή 0,3  $\mu$ g His-MAX, και θεωρείται ότι σχηματίζεται το 100% του συμπλόκου, που μπορεί να σχηματιστεί. Στο δεύτερο θετικό control προστίθεται 0,1  $\mu$ g His-MAX, δηλαδή το 1/3 του πρώτου θετικού control, προσομοιάζοντας έναν αναστολέα που προκαλεί 67% αναστολή και στο τρίτο θετικό control προστίθεται 0,03  $\mu$ g His-MAX, δηλαδή το 1/10 του πρώτου θετικού control, προσομοιάζοντας έναν αναστολέα με 90% αναστολή. Σε κάθε θετικό control αντιστοιχεί και ένα αρνητικό, στο οποίο προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα His-MAX και καθόλου εκχύλισμα GST-MYC, προκειμένου να ανιχνευτεί ο θόρυβος σε κάθε control και να αφαιρεθεί. Τέλος, στα δείγματα όπου ελέγχεται η δράση ενός πιθανού αναστολέα, προστίθενται 3  $\mu$ L εκχυλίσματος GST-MYC και 0,3  $\mu$ g His-MAX, δηλαδή οι ποσότητες του πρώτου θετικού control. Έτσι, θα φανεί η επίδραση της χημικής αυτής ένωσης στο σχηματισμό του συμπλόκου, συγκρίνοντας την ένταση φθορισμού με το

πρώτο θετικό control. Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να εντοπιστεί ένας πιθανός αναστολέας και το ποσοστό αναστολής που προκαλεί. Για κάθε συνθήκη του πειράματος, γίνονται δύο επαναλήψεις (duplicates) και, στα αποτελέσματα, παρουσιάζονται οι μέσοι όροι τους.

Μετά από δοκιμασίες βελτιστοποίησης των συνθηκών του πειράματος και των ποσοτήτων GST-MYC και His-MAX, καταλήξαμε στο παρακάτω πρωτόκολλο:

- Προστέθηκαν 200  $\mu\text{L}$  blocking buffer [50mM Tris pH=7.5, 150mM NaCl, 20 mg/mL BSA, 0,05% Tween-20) σε όλα τα πηγαδάκια και έγινε επώαση, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά.
- Μεταφορά του βακτηριακού εκχυλίσματος, που περιέχει την GST-MYC, από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  σε πάγο, μέχρι να ξεπαγώσει.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 14000rpm για 1 min στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Προετοιμάστηκε ένα διάλυμα του υπερκειμένου του εκχυλίσματος με διαλύτη το blocking buffer. Στο διάλυμα προστίθεται τέτοια ποσότητα εκχυλίσματος, ώστε, σε καθένα από τα θετικά control και τα δείγματα δοκιμής πιθανών αναστολέων, να προστεθεί 0,3  $\mu\text{g}$  εκχυλίσματος.
- Αφαιρέθηκε το blocking buffer από τα δείγματα, στα οποία θα προστεθεί το παραπάνω διάλυμα, δηλαδή στα θετικά control και στα δείγματα δοκιμής πιθανού αναστολέα. Προστέθηκαν 100  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα του εκχυλίσματος, σε καθένα από τα δείγματα αυτά, και έγινε επώαση, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.
- Με το πέρας της επώασης έγιναν 5 πλύσεις με 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος πλύσης (50mM Tris pH=7.5, 150 mM NaCl, 0,2% Gelatin 10%, 0,05% Tween-20) και επώαση με 200  $\mu\text{L}$  blocking buffer για 15' υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για τα δείγματα, στα οποία προστέθηκε το διάλυμα με το εκχύλισμα GST-MYC.
- Προστέθηκαν 100  $\mu\text{L}$  blocking buffer με:
  - 2  $\mu\text{L}$  DMSO (Cτελ= 4%) (Dimethyl Sulfoxide- SIGMA) στα θετικά και στα αρνητικά control (η συγκεκριμένη προσθήκη γίνεται ώστε να επιτευχθούν ίδιες συνθήκες στους μάρτυρες και στα δείγματα δοκιμής της αναστολής χημικών μορίων, τα οποία βρίσκονται διαλυμένα σε DMSO. Σε περίπτωση



που γίνει δοκιμή χημικού μορίου διαλυμένου σε άλλο διαλύτη, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ο συγκεκριμένος διαλύτης).

- κατάλληλο όγκο από κάθε πιθανό αναστολέα, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση αναστολέα σε κάθε διάλυμα 0,4 mM.
- Έγινε επώαση υπό ανάδευση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά την επώαση, αφαιρέθηκε το περιεχόμενο κάθε πιάτου και προστέθηκαν, σε κάθε συνθήκη, 100  $\mu$ L από ένα διάλυμα με τις κατάλληλες ποσότητες His-MAX πρωτεΐνης, διαλυμένης σε blocking buffer, παρουσία DMSO ή πιθανού αναστολέα, ανάλογα τη συνθήκη.
  - Θετικό και αρνητικό control με 0,3  $\mu$ g His-MAX: κατάλληλος όγκος καθαρής His-MAX (που αντιστοιχεί σε 0,3  $\mu$ g) + 2  $\mu$ L DMSO + blocking buffer (V<sub>τελ</sub>=100 $\mu$ L)
  - Θετικό και αρνητικό control με 0,1  $\mu$ g His-MAX: κατάλληλος όγκος καθαρής His-MAX (που αντιστοιχεί σε 0,1  $\mu$ g) + 2  $\mu$ L DMSO + blocking buffer (V<sub>τελ</sub>=100 $\mu$ L)
  - Θετικό και αρνητικό control με 0,03  $\mu$ g His-MAX: κατάλληλος όγκος καθαρής His-MAX (που αντιστοιχεί σε 0,03  $\mu$ g) + 2  $\mu$ L DMSO + blocking buffer (V<sub>τελ</sub>=100 $\mu$ L)
  - Δείγματα δοκιμής πιθανού αναστολέα: κατάλληλος όγκος καθαρής His-MAX (που αντιστοιχεί σε 0,3  $\mu$ g) + κατάλληλος όγκος του πιθανού αναστολέα, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 0,4 mM + blocking buffer (V<sub>τελ</sub>=100 $\mu$ L)
- Έγινε επώαση για 2min, υπό χειροκίνητη ανάδευση.
- Αφαιρέθηκε το περιεχόμενο κάθε πιάτου και έγιναν 5 πλύσεις με 200  $\mu$ L διαλύματος πλύσης και επώαση με 200  $\mu$ L blocking buffer για 5 min, υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαιρέθηκε το blocking buffer από τα δείγματα και προστέθηκαν, σε κάθε δείγμα, 100  $\mu$ L διαλύματος amax αντίσωματος:199489 (Abcam), σε αραιώση 1:200 (σε blocking buffer).

- Αφαιρέθηκε το περιεχόμενο κάθε πηγαδιού και έγιναν 5 πλύσεις με 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος πλύσης και επώαση με 200  $\mu\text{L}$  blocking buffer για 5 min, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαιρέθηκε το Blocking buffer από τα δείγματα και προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος αντισώματος a-rabbit HRP, σε αραιώση 1:200 (σε blocking buffer).
- Αφαιρέθηκε το περιεχόμενο κάθε πηγαδιού και έγιναν 5 πλύσεις με 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος πλύσης και επώαση με 200  $\mu\text{L}$  blocking buffer για 5 min, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαιρέθηκε το blocking buffer από όλα τα δείγματα και προστέθηκαν 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) (2,1% citric acid, 2,87%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,4 g/mL OPD, 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), σε κάθε δείγμα.
- Για τον τερματισμό της αντίδρασης, προστέθηκαν 50  $\mu\text{L}$  2N (1M)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , σε όλα τα δείγματα, ταυτόχρονα.
- Έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στα 492 nm με τη βοήθεια του ELISA plate reader.

## 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

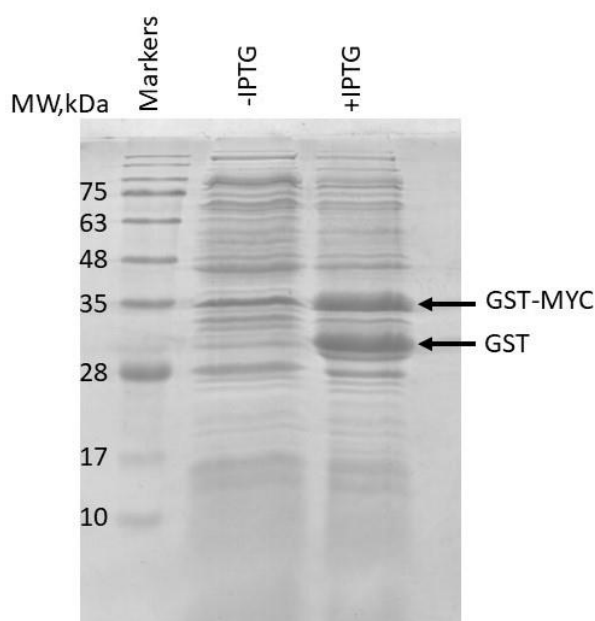
### 3.1 Παραγωγή των πρωτεϊνών GST-MYC και His-MAX

Η μέθοδος παραγωγής και καθαρισμού των πρωτεϊνών GST-MYC και His-MAX είχε εγκαθιδρυθεί προηγουμένα. Ωστόσο, για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας επαναλήφθηκε η διαδικασία παραγωγής και καθαρισμού των πρωτεϊνών αυτών.

#### 3.1.1 Έλεγχος επαγωγής παραγωγής της πρωτεΐνης GST-MYC

Συνοπτικά η διαδικασία παραγωγής της GST-MYC (όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 2.1) περιλαμβάνει μετασχηματισμό των βακτηρίων BL21(DE3) με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pGEX6P1, που εκφράζουν την πρωτεΐνη, πολλαπλασιασμό τους σε υγρή καλλιέργεια, και προσθήκη IPTG. Τόσο πριν όσο και μετά από την προσθήκη IPTG έγινε λήψη δείγματος της βακτηριακής καλλιέργειας, με σκοπό τον έλεγχο επαγωγής παραγωγής της πρωτεΐνης με ηλεκτροφόρηση του επαναιωρισμένου ιζήματος σε PBS 1x. Στην εικόνα 17 αποτυπώνεται το αποτέλεσμα αυτής, έπειτα από χρώση του gel με Coomassie. Συγκεκριμένα:

- Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται τα μοριακά βάρη από τον μάρτυρα
- Στην δεύτερη στήλη παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες από το βακτηριακό εκχύλισμα πριν την προσθήκη IPTG (-IPTG)
- Στην τρίτη στήλη παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες από το βακτηριακό εκχύλισμα μετά την προσθήκη IPTG (+IPTG)



*Εικόνα 17. Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης για έλεγχο παραγωγής GST-MYC πριν και μετά την εισαγωγή IPTG, έπειτα από χρώση με Coomassie. Στην περίπτωση της επαγωγής με την προσθήκη IPTG παρατηρούνται εντονότερες οι μπάντες των πρωτεϊνών GST (~30 kDa) και GST-MYC (~35 kDa).*

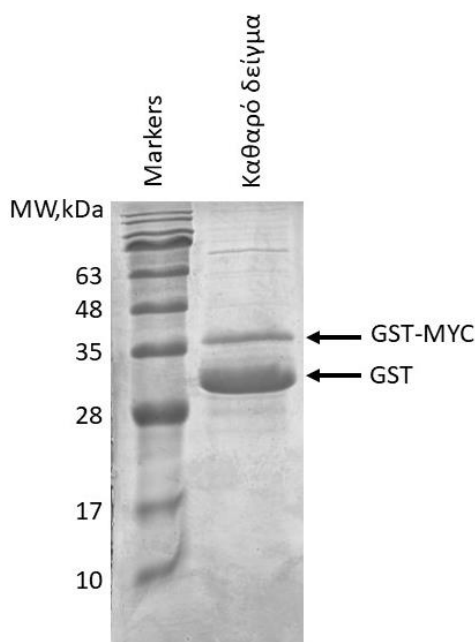
Παρατηρούμε πως και στις δύο στήλες βακτηριακού εκχυλίσματος (+IPTG και -IPTG) διακρίνονται πλήθος άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες αντιστοιχούν στις φυσιολογικά παραγόμενες για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ωστόσο, στην στήλη μετά την προσθήκη IPTG στα μοριακά βάρη ~35 kDa και ~30 kDa οι ζώνες των GST-MYC και GST αντίστοιχα, εμφανίζονται πιο έντονες, γεγονός που επιβεβαιώνει την επιτυχή επαγωγή της και το βακτηριακό εκχύλισμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή της πρωτεΐνης αυτής. Η GST πρωτεΐνη παράγεται κατά πάσα πιθανότητα ως προϊόν αποικοδόμησης του κομματιού MYC της GST-MYC, πιθανότατα λόγω ελλιπούς διαμόρφωσης που καθιστά ευάλωτη την πρωτεΐνη σε πρωτεόλυση.

### 3.1.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης GST-MYC στο βακτηριακό εκχύλισμα

Στην δοκιμασία pull down που ακολουθείται γίνεται χρήση του βακτηριακού εκχυλίσματος λύσης των κυττάρων ως πηγή GST-MYC, καθώς γίνεται έμμεσος καθαρισμός της κατά την επώαση με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης. Οι πειραματικές ανάγκες καθιστούν αναγκαία την παραγωγή των πρωτεϊνών, όταν τα αποθέματα εξαντλούνται. Είναι επομένως σημαντικός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής της στο βακτηριακό εκχύλισμα. Στα πλαίσια αυτά, έγινε μερικός καθαρισμός της GST-MYC από το βακτηριακό εκχύλισμα με την επώαση του τελευταίου σε σφαιρίδια γλουταθειόνης και προσδιορισμός της συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford. Όμως, η συγκέντρωση που υπολογίζεται σε αυτή την περίπτωση, περιλαμβάνει τόσο την GST-MYC, όσο και το παραπροϊόν GST, το οποίο επιτελεί και την ακινητοποίηση της επιθυμητής πρωτεΐνης στα σφαιρίδια. Για να εκτιμηθεί η αναλογία αυτών των πρωτεϊνών στο καθαρό δείγμα, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση αυτού, χρώση με Coomassie και προσεγγιστικός προσδιορισμός της έντασης των ζωνών με το λογισμικό Image J. Γνωρίζοντας πλέον την σχετική αναλογία των δύο πρωτεϊνών στο καθαρισμένο δείγμα και την ολική συγκέντρωση του βακτηριακού εκχυλίσματος, υπολογίσαμε την συγκέντρωση της GST-MYC ανά μονάδα όγκου βακτηριακού εκχυλίσματος. Μέσω της μεθόδου Bradford η ολική συγκέντρωση GST-MYC και GST

στο βακτηριακό εκχύλισμα είναι 0,04  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  και οι σχετικές εντάσεις των ζωνών GST και GST-MYC στο gel της ηλεκτροφόρησης περίπου GST/GST-MYC=5 (Εικόνα 18). Έτσι, η εκτιμώμενη συγκέντρωση της GST-MYC στο βακτηριακό εκχύλισμα βρέθηκε:

$$\text{GST} - \text{MYC} = 0,007 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} = 0,2 \frac{\text{pmol}}{\mu\text{L}}$$



*Εικόνα 18. Καθαρισμός GST-MYC από το βακτηριακό εκχύλισμα. Στην ηλεκτροφόρηση ανιχνεύονται οι πρωτεΐνες GST-MYC και GST σε αναλογία 1/5. Χρησιμοποιήθηκε ο BlueStar Prestained Protein Marker, ως δείκτης μοριακών βαρών.*

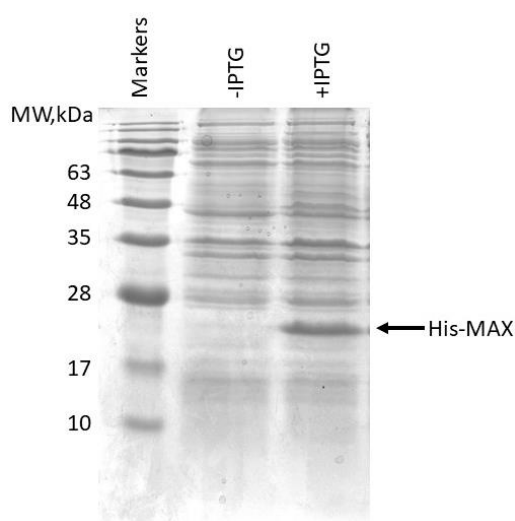
Στο εξής για λόγους συντομίας, όποια αναφορά γίνεται σε όγκο GST-MYC, στην ουσία εννοείται όγκος βακτηριακού εκχυλίσματος που περιέχει GST-MYC. Δηλαδή, όταν αναφέρεται «1 $\mu\text{L}$  GST-MYC», εννοείται 1 $\mu\text{L}$  βακτηριακού εκχυλίσματος, το οποίο περιέχει 0,007 $\mu\text{g}$  ή 0,2 pmol GST-MYC.

### 3.1.3 Έλεγχος επαγωγής παραγωγής της πρωτεΐνης His-MAX

Συνοπτικά η διαδικασία παραγωγής της His-MAX (όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 2.1) περιλαμβάνει μετασχηματισμό των βακτηρίων BL21(DE3) με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pET15b, που εκφράζουν την πρωτεΐνη, πολλαπλασιασμό τους σε υγρή καλλιέργεια, και προσθήκη IPTG. Τόσο πριν όσο και μετά από την προσθήκη IPTG έγινε λήψη δείγματος της βακτηριακής καλλιέργειας, με σκοπό τον έλεγχο επαγωγής παραγωγής της πρωτεΐνης με ηλεκτροφόρηση του επαναιωρισμένου

ιζήματος σε PBS 1x. Στην εικόνα 19 αποτυπώνεται το αποτέλεσμα αυτής, έπειτα από χρώση του gel με Coomassie. Συγκεκριμένα:

- Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται τα μοριακά βάρη από τον μάρτυρα
- Στην δεύτερη στήλη παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες από το βακτηριακό εκχύλισμα πριν την προσθήκη IPTG (-IPTG)
- Στην τρίτη στήλη παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες από το βακτηριακό εκχύλισμα μετά την προσθήκη IPTG (+IPTG)



*Εικόνα 19: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης για έλεγχο παραγωγής της His-MAX πριν και μετά την εισαγωγή IPTG, έπειτα από χρώση με Coomassie. Στην περίπτωση της επαγωγής με την προσθήκη IPTG παρατηρείται εντονότερη η μπάντα της His-MAX (~18 kDa). Χρησιμοποιήθηκε ο BlueStar Prestained Protein Marker, ως δείκτης μοριακών βαρών.*

Παρατηρούμε πως και στις δύο στήλες βακτηριακού εκχυλίσματος (+IPTG και - IPTG) διακρίνονται πλήθος άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες σντιστοιχούν στις φυσιολογικά παραγώμενες για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ωστόσο, στην στήλη μετά την προσθήκη IPTG στο μοριακό βάρος ~18 kDa, εμφανίζεται πιο έντονα η His-MAX, γεγονός που επιβεβαιώνει την επιτυχή επαγωγή της και το βακτηριακό εκχύλισμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον περαιτέρω καθαρισμό της.

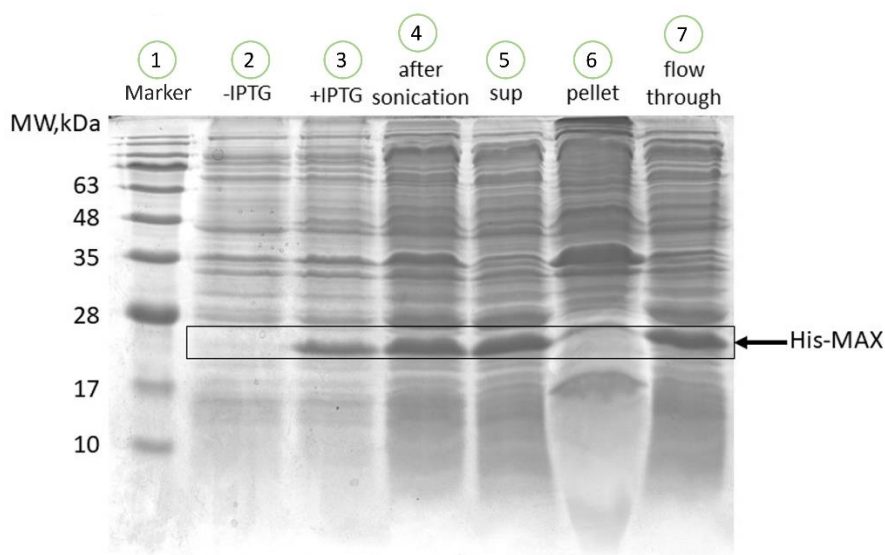
### 3.1.4 Καθαρισμός και απομόνωση His-MAX από τη βακτηριακή καλλιέργεια και ποσοτικοποίηση

Κατά την απομόνωση και καθαρισμό της His-MAX από τη βακτηριακή καλλιέργεια (Ενότητα 2.1.12) έγινε λήψη δείγματος στα διάφορα στάδια με σκοπό την

ηλεκτροφόρηση ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της διαδικασίας. Στην εικόνα 20 αποτυπώνεται το αποτέλεσμα αυτής, έπειτα από χρώση του gel με Coomassie.

Συγκεκριμένα:

- Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται τα μοριακά βάρη από τον μάρτυρα
- Οι δύο επόμενες στήλες (-IPTG, +IPTG), αποτελούν τα δείγματα πριν και μετά την προσθήκη IPTG στην βακτηριακή καλλιέργεια για τον έλεγχο επαγωγής της έκφρασης His-MAX,
- Η τέταρτη στήλη (after sonication), αφορά το δείγμα έπειτα από εφαρμογή υπερήχων στην βακτηριακή καλλιέργεια, οπότε και παρουσιάζονται όλες οι φυσιολογικά παραγόμενες πρωτεΐνες για την ανάπτυξη των κυττάρων.
- Η πέμπτη στήλη (sup) αφορά το υπερκείμενο δείγμα έπειτα από φυγοκέντρηση του προηγούμενου, στο οποίο αναμένονται οι διαλυτές πρωτεΐνες.
- Η έκτη στήλη (pellet) αντιστοιχεί στο ίζημα της παραπάνω φυγοκέντρησης, επαναιωρημένο σε PBS 1x. Αντιστοιχεί στις αδιάλυτες πρωτεΐνες (π.χ διαμεμβρανικές πρωτεΐνες) των σπασμένων βακτηρίων που καθίζησαν κατά την φυγοκέντρηση.
- Η έβδομη στήλη (flow through) αφορά στο υπερκείμενο δείγμα έπειτα από: επώαση του βακτηριακού εκχυλίσματος σε σφαιρίδια Νικελίου, με σκοπό την δέσμευση της His-MAX και φυγοκέντρηση του συνόλου, στο οποίο αναμένονται όλες οι φυσιολογικά παραγόμενες πρωτεΐνες για την ανάπτυξη των κυττάρων, όπως ακριβώς και στο δείγμα του sup.

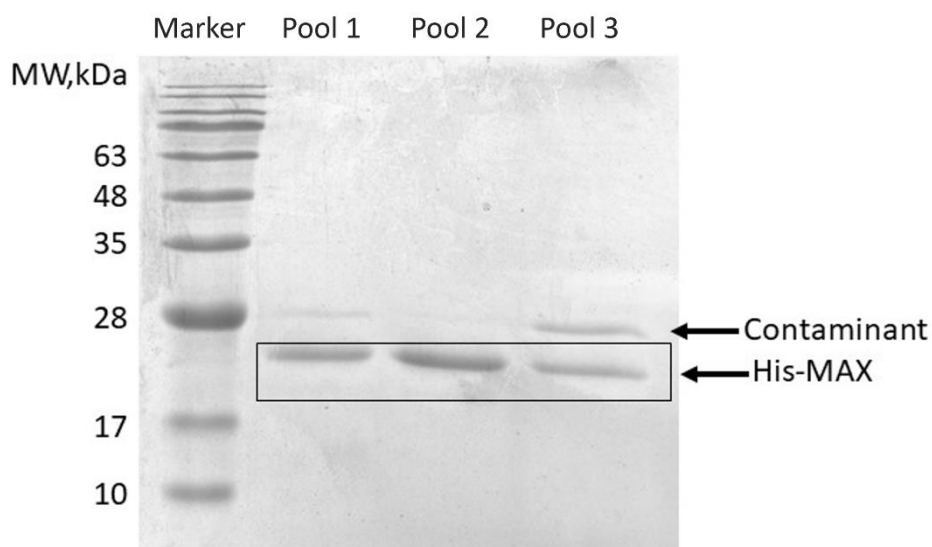


*Εικόνα 20: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των σταδίων έκφρασης- καθαρισμού-απομόνωσης της His-MAX. Τα δείγματα 2 και 3 αντιστοιχούν στην βακτηριακή καλλιέργεια πριν και μετά την προσθήκη IPTG αντίστοιχα, το δείγμα 4 αντιστοιχεί στην καλλιέργεια μετά την εφαρμογή υπερήχων και διάρρηξης της βακτηριακής μεμβράνης, τα δείγματα 5 και 6 αντιστοιχούν στο υπερκείμενο και το ίζημα, αντίστοιχα, με την φυγοκέντρηση των σπασμένων κυττάρων, ενώ το δείγμα 7 αντιστοιχεί στο υπερκείμενο μετά την επώαση του εκχυλίσματος με σφαιρίδια Νικελίου.*

Παρατηρούμε πως στο 6<sup>ο</sup> δείγμα η ζώνη της His-MAX, η οποία είναι υδατοδιαλυτή, απουσιάζει. Εντούτοις όλη η ποσότητα βρίσκεται στο υπερκείμενο της φυγοκέντρησης (5<sup>ο</sup> δείγμα, sup). Αξίζει επίσης να σχολιαστεί η έντονη ζώνη της His-MAX στο 7<sup>ο</sup> δείγμα, η οποία θα έπρεπε να απουσιάζει και όλη η ποσότητα της His-MAX θα έπρεπε να έχει δεσμευτεί από τα σφαιρίδια Νικελίου. Επομένως, μέρος της ποσότητάς της χάθηκε, αλλά η συνολική εικόνα της ηλεκτροφόρησης δείχνει ότι η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού της His-MAX, μέχρι το στάδιο της δέσμευσής της στα σφαιρίδια, έγινε επιτυχώς.

Την παραπάνω διαδικασία ακινητοποίησης της His-MAX στα σφαιρίδια Νικελίου με σκοπό την απομάκρυνση των πρωτεϊνών του εκχυλίσματος, ακολούθησε η έκλυση αυτής. Συλλέχθηκαν 12 κλάσματα, τα οποία φωτομετρήθηκαν και προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους, με τη μέθοδο Bradford. Όσα είχαν παρόμοιες συγκεντρώσεις ενώθηκαν μεταξύ τους, ώστε να προκύψουν τελικά 3 pools καθαρής His-MAX και προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους με τον ίδιο τρόπο.

Ακολούθως, θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε την καθαρότητα της πρωτεΐνης στα 3 pools και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση αυτών. Στην εικόνα 21 αποτυπώνεται το αποτέλεσμα αυτής, έπειτα από χρώση του gel με Coomassie. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται τα μοριακά βάρη από τον μάρτυρα. Στα pool 1 και pool 2 βλέπουμε ότι η His-MAX είναι πολύ καθαρή και υπάρχουν ελάχιστες προσμίξεις. Στο τρίτο pool, παρατηρείται ότι η ένταση της ζώνης της His-MAX είναι πολύ πιο μικρή από τα άλλα δύο pools και υπάρχουν προσμίξεις





*Εικόνα 21: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης διαφορετικών pool καθαρισμένης His-MAX. Στα pools 1 και 2, η His-MAX είναι σχεδόν καθαρή, ενώ στο pool 3 υπάρχει πρόσμιξη με άλλη πρωτεΐνη και η ποσότητα της His-MAX είναι μικρότερη.*

Οι προσμίξεις στο pool 3 είναι αναμενόμενες μιας που αυτό προέκυψε από την συνένωση του πρώτου κλάσματος της έκλουσης των δύο στηλών που χρησιμοποιήθηκαν, στα οποία υπάρχει μικρή ποσότητα His-MAX και πιθανώς το διάλυμα έκλουσης να συμπαρέσυρε και άλλες πρωτεΐνες του βακτηριακού εκχυλίσματος, οι οποίες δεν είχαν ακινητοποιηθεί στα σφαιρίδια, αλλά δεν είχαν απομακρυνθεί με τις προηγούμενες πλύσεις. Επομένως, το pool 1 κρίθηκε κατάλληλο για χρήση στα μετέπειτα πειράματα.

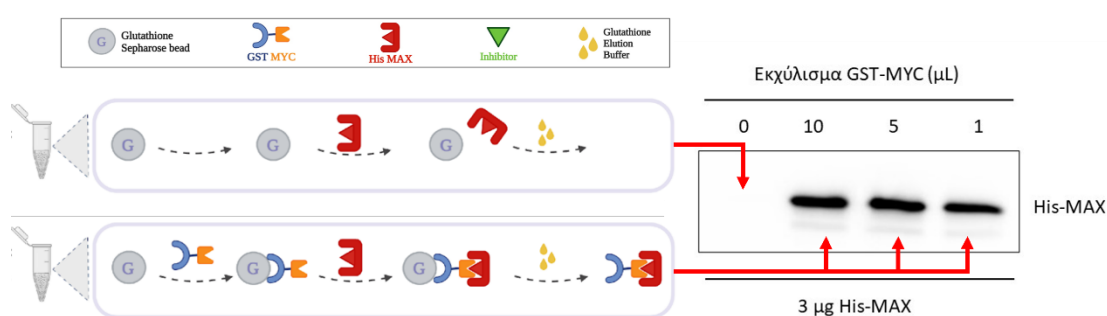
**3.2 Βελτιστοποίηση μεθόδου Χρωματογραφίας Συγγένειας**  
Αρχικά, στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χρωματογραφίας συγγένειας, με σκοπό την ανίχνευση πιθανών αναστολέων του συμπλόκου MYC/MAX. Οι αναστολείς αυτοί είναι σχεδιασμένοι να προσδένονται στην GST-MYC και να εμποδίζουν την πρόσδεση της His-MAX και τη δημιουργία του συμπλόκου. Έτσι, μετά την επώαση με τον πιθανό αναστολέα, όσο πιο μειωμένο είναι το σήμα της His-MAX στο Western blot σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα, τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό αναστολής του χημικού μορίου, δηλαδή ο βαθμός πρόσδεσης του στην GST-MYC και παρεμπόδισης σχηματισμού του συμπλόκου.

Ο ημιποσοτικός χαρακτηρισμός που αποδίδεται στο συγκεκριμένο assay, οφείλεται στην προσεγγιστική εκτίμηση της ποσότητας των χρησιμοποιούμενων πρωτεϊνών, καθώς και της ποσοτικοποίησης με το λογισμικό Image J.

Ωστόσο, είναι σημαντικό να βρεθούν οι ποσότητες εκχυλίσματος GST-MYC και καθαρής His-MAX, που είναι ιδανικές ώστε να υπάρχει αναλογικότητα στον σχηματισμό του συμπλόκου, εξαρτώμενη από την ποσότητα της ακινητοποιημένης στα σφαιρίδια GST-MYC, για να είναι σωστή η μέθοδος και αξιόπιστος ο προσδιορισμός του ποσοστού αναστολής ενός πιθανού αναστολέα.

Παρακάτω αναλύονται τα πειράματα που διεκπεραιώθηκαν ώστε να καταλήξουμε στις βέλτιστες ποσότητες των πρωτεϊνών.

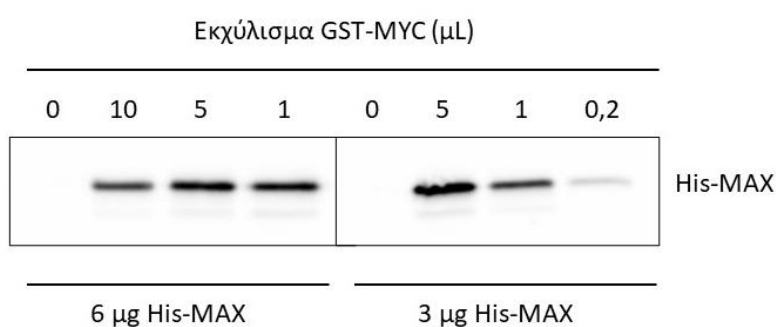
Έπειτα από την παραγωγή της GST-MYC λοιπόν, έγινε μία δοκιμασία Pull Down με 3 δείγματα μειούμενων ποσοτήτων βακτηριακού εκχυλίσματος GST-MYC, ποσότητες που επιλέχθηκαν βασιζόμενες στο προηγούμενο αντίστοιχο πρωτόκολλο. Συγκεκριμένα, τα σφαιρίδια γλουταθειόνης επώαστηκαν με βακτηριακό εκχύλισμα GST-MYC, σε ποσότητες 10  $\mu$ L, 5  $\mu$ L και 1  $\mu$ L σε κάθε δείγμα, αντίστοιχα. Μετά από πλύσεις, σε κάθε δείγμα, προστέθηκαν 3  $\mu$ g His-MAX. Στη συνέχεια, έγιναν πλύσεις και έκλυση του σχηματιζόμενου συμπλόκου και το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western παρουσιάζεται στην εικόνα 22.



**Εικόνα 22:** Σχηματική απεικόνιση βημάτων και αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης για τη δοκιμή σχηματισμού συμπλόκου GST-MYC / His-MAX, με χρήση διαφορετικών ποσοτήτων GST-MYC. Τα σφαιρίδια γλουταθειόνης επώαστηκαν με 10, 5 και 1  $\mu$ L εκχυλίσματος GST-MYC, αντίστοιχα, στα 3 δείγματα και χρησιμοποιήθηκε και ένα αρνητικό control, στο οποίο δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Μετά από τις πλύσεις, προστέθηκαν, σε όλα τα δείγματα, 3  $\mu$ g His-MAX, για να σχηματιστεί το σύμπλοκο. Μετά την επώαση με την His-MAX, έγιναν πλύσεις και έκλυση του συμπλόκου. Τέλος, έγινε ηλεκτροφόρηση των εκλουσμάτων και ανοσοαποτύπωση κατά Western, για την ανίχνευση της His-MAX.

Στο αρνητικό control, όπου δεν γίνεται προσθήκη GST-MYC, δεν παρατηρείται θόρυβος. Ωστόσο σε όλα τα υπόλοιπα θετικά control με τις μειούμενες ποσότητες GST-MYC, οι ζώνες της His-MAX έχουν την ίδια ένταση και δεν μειώνονται αναλόγως της προστιθέμενης ποσότητας της MYC. Μία υπόθεση για τη συγκεκριμένη απεικόνιση θα ήταν πως η His-MAX δεν επαρκεί να καλύψει την ποσότητα της GST-MYC που έχει ακινητοποιηθεί στα σφαιρίδια γλουταθειόνης, ενδεχομένως ακόμα και στο δείγμα με τη μικρότερη προσθήκη GST-MYC. Έτσι σε κάθε συνθήκη η εκάστοτε ποσότητα GST-MYC ήταν ικανή να δημιουργήσει σύμπλοκο με όλη την προστιθέμενη His-MAX και αυτό αποτυπώνεται στο blot. Η απουσία αναλογικότητας στα control καθιστά μη ιδανική τη χρήση αυτής της αναλογίας πρωτεϊνών για τον προσδιορισμό της αναστολής ενός χημικού μορίου, καθώς η His-MAX αφήνει «ακάλυπτα» μόρια GST-MYC, στα οποία μπορεί να προσδεθεί ο αναστολέας και να μην επηρεάσει τον σχηματισμό του συμπλόκου. Επομένως αυτή η αναλογία πρωτεϊνών απορρίφθηκε.

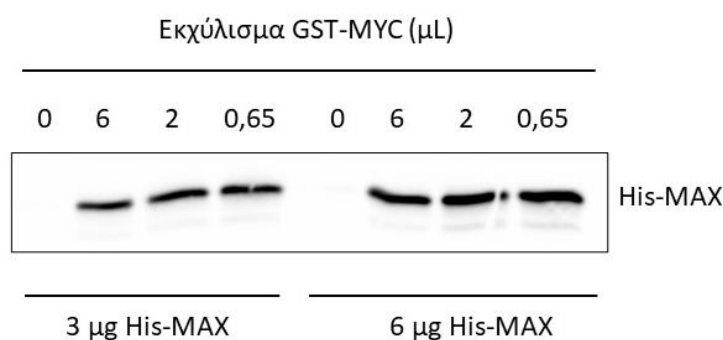
Στη συνέχεια, προέκυψαν δύο υποθέσεις, οι οποίες πρακτικά είναι οι δύο όψεις του ίδιου νομίσματος. Ότι η ποσότητα της His-MAX φαίνεται να μην επαρκεί ή αλλιώς ότι η GST-MYC βρίσκεται σε περίσσεια. Έτσι λοιπόν δοκιμάστηκαν: μία σειρά δειγμάτων διατηρώντας ίδιες τις ποσότητες βακτηριακού εκχυλίσματος GST-MYC, αλλά με διπλάσια ποσότητα His-MAX (6 μg) (βασιζόμενοι στην πρώτη υπόθεση) και μία σειρά δειγμάτων με μικρότερες ποσότητες GST-MYC, δηλαδή 5 μL, 1 μL και 0,2 μL βακτηριακού εκχυλίσματος και τη μισή ποσότητα His-MAX (3 μg) (βασιζόμενοι στην δεύτερη υπόθεση). Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western παρουσιάζονται στην εικόνα 23.



**Εικόνα 23:** Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης για τη δοκιμή σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ GST-MYC / His-MAX, με χρήση διαφορετικών ποσοτήτων GST-MYC και His-MAX. Αριστερό blot: τα σφαιρίδια γλουταθειόνης επωάστηκαν με 10, 5 και 1 μL εκχυλίσματος GST-MYC, αντίστοιχα, και χρησιμοποιήθηκε και ένα αρνητικό control, στο οποίο δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Ο σχηματισμός του συμπλόκου σε όλα τα δείγματα επιδιώχθηκε με 6 μg His-MAX. Δεξί blot: τα σφαιρίδια γλουταθειόνης επωάστηκαν με 5, 1 και 0,2 μL εκχυλίσματος GST-MYC, αντίστοιχα, και χρησιμοποιήθηκε και ένα αρνητικό control, στο οποίο δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Ο σχηματισμός του συμπλόκου σε όλα τα δείγματα επιδιώχθηκε με 3 μg His-MAX. Μετά την επώαση με την His-MAX, έγιναν πλύσεις και έκλουση του συμπλόκου. Τέλος, έγινε ηλεκτροφόρηση των εκλουσμάτων και ανοσοαποτύπωση κατά Western, για την ανίχνευση της His-MAX.

Παρατηρήθηκε πως στο αριστερό blot, ο διπλασιασμός της ποσότητας His-MAX δεν ήταν αρκετός, δηλαδή σε περίσσεια, ώστε να φανεί η αναμενόμενη διαβάθμιση στην ένταση των ζωνών. Αντιθέτως, στο δεξί blot η μείωση των ποσοτήτων της GST-MYC σε 5, 1 και 0,2 μL με διατήρηση τις His-MAX, παρουσιάζει διαβάθμιση, η οποία όμως δεν είναι η ιδανική για πειράματα ανίχνευσης αναστολέων. Αυτό, γιατί η διαφορά στην GST-MYC, και, κατά συνέπεια, στην His-MAX που προσδένεται, μεταξύ του πρώτου και του τρίτου δείγματος είναι 1/25. Δηλαδή, επιτεύχθηκε μείωση στην ένταση των ζωνών, αλλά με πολύ μεγάλη μείωση της ποσότητας GST-MYC, μεταξύ πρώτου και τρίτου δείγματος, που μόνο ένας πολύ καλός αναστολέας θα προκαλούσε ορατή μείωση στην ανιχνεύσιμη ποσότητα His-MAX. Έτσι, αναστολείς με μέτρια ανασταλτική δράση δεν ανιχνεύονται.

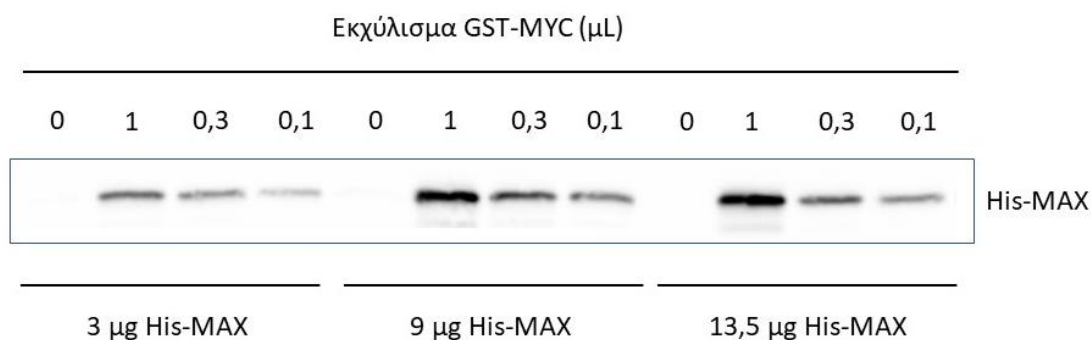
Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος αποφασίστηκε η διενέργηση αντίστοιχης δοκιμασίας Pull-Down στην οποία η διαφορά ποσοτήτων GST-MYC μεταξύ 1<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> control, να είναι 1/10 και επιλέχθηκαν οι ποσότητες 6  $\mu$ L, 2  $\mu$ L και 0,65  $\mu$ L εκχυλίσματος GST-MYC, αντίστοιχα, σε κάθε δείγμα. Με αυτές τις ποσότητες GST-MYC έγινε πάλι δοκιμή προσθήκης 3 $\mu$ g και 6 $\mu$ g His-MAX, ώστε να ελεγχθεί αν με την αύξηση της His-MAX επιτυγχάνεται καλύτερη αναλογικότητα. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western παρουσιάζονται στην εικόνα 24.



**Εικόνα 24:** Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης για τη δοκιμή σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ GST-MYC / His-MAX, με χρήση διαφορετικών ποσοτήτων GST-MYC και His-MAX. Και στα δύο blot τα σφαιρίδια γλουταθειόνης επωάστηκαν με 6, 2 και 0,65  $\mu$ L εκχυλίσματος GST-MYC, αντίστοιχα, και χρησιμοποιήθηκε και ένα αρνητικό control, στο οποίο δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Ο σχηματισμός του συμπλόκου σε όλα τα δείγματα επιδιώχθηκε με 3  $\mu$ g His-MAX (Αριστερό blot) και με 6  $\mu$ g His-MAX (Δεξιό blot) Μετά την επώαση με την His-MAX, έγιναν πλύσεις και έκλυση του συμπλόκου. Τέλος, έγινε ηλεκτροφόρηση των εκλουσμάτων και ανοσοαποτύπωση κατά Western, για την ανίχνευση της His-MAX.

Παρατηρήθηκε πως η ένταση των ζωνών δεν αποτυπώνει την αναμενόμενη μείωση και μάλιστα δεν εμφανίζει καμία μείωση. Μία πιθανή ερμηνεία για αυτό μπορεί να είναι ότι ακόμη και σε αυτές τις ποσότητες της GST-MYC, μία μείωση της τάξης του 1/10 δεν γίνεται να προκαλέσει αναλογική μείωση της προσδεδεμένης His-MAX. Με άλλα λόγια, χρειάζονται πολύ μικρότερες ποσότητες GST-MYC, ώστε η διαφορά 1/10 μεταξύ των δειγμάτων να φανεί και στο σήμα της His-MAX.

Επομένως, ακολούθησε η διενέργεια πειράματος με ακόμη χαμηλότερες ποσότητες βακτηριακού εκχυλίσματος GST-MYC, τέτοιες ώστε να διατηρείται η αναλογία 1/10 μεταξύ του πρώτου και του τελευταίου control. Επιλέχθηκαν οι ποσότητες 1  $\mu$ L, 0,3  $\mu$ L και 0,1  $\mu$ L βακτηριακού εκχυλίσματος GST-MYC και πραγματοποιήθηκαν 3 σειρές πειραμάτων για τη δοκιμή ξανά 3 διαφορετικών ποσοτήτων His-MAX. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν 3  $\mu$ g, 9  $\mu$ g και 13,5  $\mu$ g His-MAX σε κάθε σειρά, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western παρουσιάζονται στην εικόνα 25.



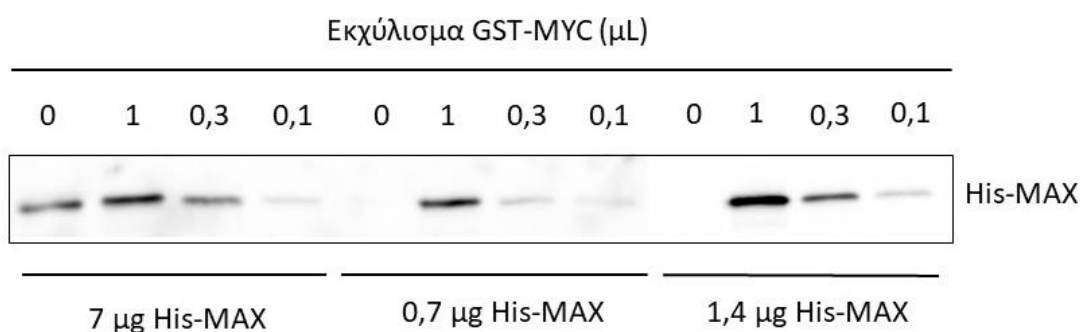
*Εικόνα 25: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης για τη δοκιμή σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ GST-MYC / His-MAX, με χρήση διαφορετικών ποσοτήτων GST-MYC και His-MAX. Και στα τρία blot τα σφαιρίδια γλουταθειόνης επωάστηκαν με 1, 0,3 και 0,1 μL εκχυλίσματος GST-MYC, αντίστοιχα, και χρησιμοποιήθηκε και ένα αρνητικό control, στο οποίο δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Ο σχηματισμός του συμπλόκου σε όλα τα δείγματα επιδιώχθηκε με 3 μg His-MAX (Αριστερό blot), με 9 μg His-MAX (Μεσαίο blot) και με 13,5 μg (Δεξιό blot). Μετά την επώαση με την His-MAX, έγιναν πλύσεις και έκλουση του συμπλόκου. Τέλος, έγινε ηλεκτροφόρηση των εκλουσμάτων και ανοσοαποτύπωση κατά Western, για την ανίχνευση της His-MAX.*

Παρατηρήθηκε πως και στα 3 blot η αναλογικότητα εκ πρώτης όψεως ήταν ικανοποιητική, όμως έπειτα από ανάλυση των εντάσεων των ζωνών κάθε blot με το λογισμικό Image J, η βέλτιστη αναλογικότητα ήταν αυτή στην οποία χρησιμοποιήθηκαν 13,5 μg His-MAX (Δεξιό blot).

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί πως οι παραπάνω δοκιμές έγιναν με καινούργια μεν prep GST-MYC, αλλά η His-MAX που χρησιμοποιήθηκε είχε παρασκευαστεί παλαιότερα από άλλα μέλη του εργαστηρίου. Όταν η τελευταία εξαντλήθηκε, χρειάστηκε να γίνει εκ νέου παραγωγή της και κατ' επέκταση εκ νέου δοκιμή των βέλτιστων ποσοτήτων των δύο πρωτεϊνών για την δοκιμασία ελέγχου πιθανών αναστολέων. Η ανάγκη για επανάληψη τέτοιων πειραμάτων στηρίζεται στην ιδέα ότι με την πάροδο του χρόνου και την συστηματική απόψυξη και ψύξη της His-MAX για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, αυτή μπορεί να αποικοδομείται και να χάνει την ενεργότητά που έχει στον σχηματισμό του συμπλόκου, σε σχέση με μία πρωτεΐνη καινούργιας prep. Επακόλουθο επομένως είναι πως μπορεί να χρειάζονται μικρότερες ποσότητες από μία καινούργια His-MAX, για τον σχηματισμό του συμπλόκου στις ίδιες συνθήκες.

Έτσι λοιπόν μετά την παρασκευή της νέας His-MAX, πραγματοποιήθηκαν 3 σειρές πειραμάτων για τη δοκιμή ξανά 3 διαφορετικών ποσοτήτων His-MAX. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν 7 μg, 0,7 μg και 1,4 μg His-MAX σε κάθε σειρά, αντίστοιχα. Οι

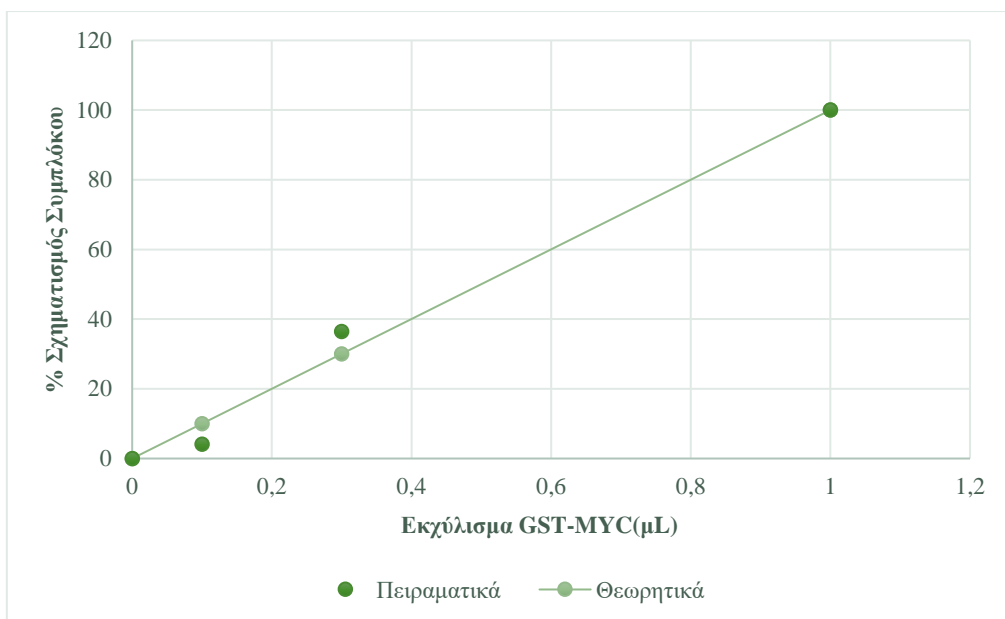
ποσότητες της GST-MYC παρέμειναν ίδιες και ίσες με (1  $\mu$ L, 0,3  $\mu$ L, 0,1  $\mu$ L) Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western παρουσιάζονται στην εικόνα 26.



*Εικόνα 26: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης για τη δοκιμή σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ GST-MYC / His-MAX(νέας) , με χρήση διαφορετικών ποσοτήτων GST-MYC και His-MAX. Και στα τρία blot τα σφαιρίδια γλουταθειόνης επωάστηκαν με 1, 0,3 και 0,1  $\mu$ L εκχυλίσματος GST-MYC, αντίστοιχα, και χρησιμοποιήθηκε και ένα αρνητικό control, στο οποίο δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Ο σχηματισμός του συμπλόκου σε όλα τα δείγματα επιδιώχθηκε με 7 $\mu$ g His-MAX (Αριστερό blot), με 0,7 $\mu$ g His-MAX (Μεσαίο blot) και με 1,4 $\mu$ g (Δεξιό blot). Μετά την επώαση με την His-MAX, έγιναν πλύσεις και έκλυση του συμπλόκου. Τέλος, έγινε ηλεκτροφόρηση των εκλουσμάτων και ανοσοαποτύπωση κατά Western, για την ανίχνευση της His-MAX.*

Παρατηρήθηκε πως στο αριστερό blot υπάρχει θόρυβος στον αρνητικό μάρτυρα και αυτό καταδεικνύει πως η ποσότητα της His-MAX είναι αρκετά μεγάλη και προσδένεται μη ειδικά στα σφαιρίδια ώστε κατά την έκλυση να αποτυπώνεται στο blot. Στα μεσαίο και δεξιό blot δεν ανιχνεύεται θόρυβος, επομένως με τη βοήθεια του προγράμματος Image J έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών και η βέλτιστη αναλογικότητα παρατηρήθηκε στην περίπτωση που έγινε προσθήκη 1,4 $\mu$ g His-MAX για τον σχηματισμό του συμπλόκου. Με αυτή τη βελτιστοποίηση στα control, θα μπορούσαμε πλέον να εκτελέσουμε τα πειράματα και να εντοπίσουμε πιθανούς αναστολείς είτε αυτοί δρουν έντονα, είτε μέτρια, είτε ελάχιστα.

Έπειτα με βάση την παραπάνω ποσοτικοποίηση, σχηματίστηκε η γραφική παράσταση του ποσοστού His-MAX που προσδένεται στην κάθε ποσότητα GST-MYC των control, για να διαπιστωθεί εάν αυτή ανταποκρίνεται στην ποσότητα που θεωρητικά θα αναμέναμε να προσδεθεί στην περίπτωση που η μέθοδος ήταν βέλτιστη και υπήρχε ποσοστό ανίχνευσης 100%. Παρατηρήθηκε ότι η απόκλιση των δύο γραφικών παραστάσεων με τις θεωρητικές και τις πειραματικές τιμές είναι αρκετά μικρή και θεωρείται αποδεκτή (Εικόνα 27). Έτσι, με ασφάλεια μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε αυτές τις ποσότητες His-MAX και GST-MYC, για έλεγχο πιθανών χημικών αναστολέων σχηματισμού του συμπλόκου, με ικανότητα ανίχνευση και ενδιάμεσων ποσοστών αναστολής.



**Εικόνα 27:** : Γραφική απεικόνιση του σχηματιζόμενου συμπλόκου (δηλαδή του ποσοστού προσδεσμένης His-MAX πρωτεΐνης στην GST-MYC) σε συνάρτηση με τον όγκο του βακτηριακού εκχυλίσματος, με τον οποίο γίνεται επώαση των σφαιριδίων. Με σκούρο πράσινο παρουσιάζεται η γραφική παράσταση των πειραματικών δεδομένων και με ανοιχτό η γραφική παράσταση των θεωρητικών τιμών, αν η μέθοδος ήταν 100% ακριβής. Τα πειραματικά δεδομένα προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση των ζωνών His-MAX του western blot της σειράς, στην οποία έγινε δοκιμασία Pull down με την χρήση 1,4 μg His-MAX. Συγκεκριμένα, τα σφαιρίδια γλουταθειόνης επώαστηκαν με 1 μL, 0,3 μL και 0,1 μL εκχυλίσματος GST-MYC, αντίστοιχα, και χρησιμοποιήθηκε και ένα αρνητικό control, στο οποίο δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Μετά από τις πλύσεις, προστέθηκαν 1,4 μg His-MAX, για να σχηματιστεί το σύμπλοκο. Μετά την επώαση με την His-MAX, έγιναν πλύσεις και έκλυση του συμπλόκου. Τέλος, έγινε ηλεκτροφόρηση των εκλουσμάτων και ανοσοαποτύπωση κατά Western, για την ανίχνευση της His-MAX. Ως 100% θεωρείται η μέγιστη τιμή που λαμβάνεται στην περίπτωση προσθήκης 1μl εκχυλίσματος, ενώ τα υπόλοιπα ποσοστά υπολογίζονται σε σύγκριση με την τιμή αυτή.

Τελευταίο βήμα για την βελτιστοποίηση της μεθόδου, αλλά και για μετέπειτα γνώση ήταν ο υπολογισμός της αναλογίας mol των ποσοτήτων των δύο πρωτεϊνών που κρίθηκαν αξιόπιστα για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Αυτή υπολογίζεται στην περίπτωση 100% σχηματισμού του συμπλόκου, δηλαδή στην περίπτωση προσθήκης 1μL GST-MYC και 1,4μg His-MAX, στο οποίο δείγμα θα γίνεται και η δοκιμασία ανίχνευσης πιθανών αναστολέων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί (Ενότητα 3.1.2) 1 μL βακτηριακού εκχυλίσματος αντιστοιχεί, προσεγγιστικά, σε 0,2 pmol GST-MYC και 1,4 μg His-MAX ισούται με 0,1 nmol His-MAX. Έτσι, υπολογίστηκε ότι η αναλογία

$$\text{mol των πρωτεϊνών είναι: } \frac{\text{GST-MYC}}{\text{His-MAX}} = \frac{1}{500}$$

### 3.3 Σάρωση χημικών μορίων- πιθανών αναστολέων του συμπλόκου με Χρωματογραφία Συγγένειας

Αφού με τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου επιτεύχθηκε μηδενικός θόρυβος στα σφαιρίδια απουσία GST-MYC (αρνητικό control) και υψηλή διακριτική ικανότητα ανίχνευσης της His-MAX πρωτεΐνης, κάτι που θα επέτρεπε τον εντοπισμό μεγάλου εύρους ποσοστών αναστολής, αυτό χρησιμοποιήθηκε για την σάρωση και εντοπισμό πλήθους νέων χημικών αναστολέων του συμπλόκου.

Πηγή αυτών των χημικών μορίων αποτέλεσαν οι συνεργάτες του εργαστηρίου στα πλαίσια του προγράμματος «AKMY», το εργαστήριο της κ. Σαρλή από το Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης καθώς και το εργαστήριο του κ. Τζάκου από το τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Όλα τα χημικά μόρια συντέθηκαν από τις εκάστοτε ομάδες ώστε να προσδένονται στη MYC και με αυτόν τον τρόπο να επιτυγχάνεται η αναστολή σχηματισμού του συμπλόκου.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην Ενότητα 2.6 και περιληπτικά περιλαμβάνει: ένα αρνητικό control (απουσιάζει η GST-MYC), 3 θετικά control, στα οποία γίνεται επώαση των σφαιριδίων με 1  $\mu\text{L}$ , 0,3  $\mu\text{L}$  και 0,1  $\mu\text{L}$  εκχυλίσματος GST-MYC, αντίστοιχα. Σε κάθε δείγμα ελέγχου μίας χημικής ένωσης, γίνεται επώαση των σφαιριδίων με 1  $\mu\text{L}$  εκχυλίσματος και, μετά από πλύσεις, προστίθεται η χημική ένωση ενδιαφέροντος. Έπειτα, σε όλα τα δείγματα προστίθεται 1,4  $\mu\text{g}$  His-MAX. Μετά από πλύσεις και έκλουση του συμπλόκου, γίνεται ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western για την ανίχνευση της προσδεδεμένης His-MAX στη GST-MYC. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση των ζωνών με το λογισμικό Image J. Το ποσοστό δέσμευσης His-MAX είναι αντιστρόφως ανάλογο με την ανασταλτική δράση του πιθανού αναστολέα, δηλαδή όσο μικρότερο είναι το ποσοστό σχηματισμού του συμπλόκου, τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό αναστολής, που προκαλεί ο εκάστοτε αναστολέας. Τέλος, γίνεται στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων από τουλάχιστον 3 πειράματα μέσω του λογισμικού Graphpad (Κάθε ζώνη στην οποία έχει δοκιμαστεί ένας αναστολέας συγκρίνεται με την ένταση του πρώτου θετικού control (με το 1  $\mu\text{L}$  εκχυλίσματος), όπου θεωρείται ότι σχηματίζεται το 100% του συμπλόκου).

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, και τα διαγράμματα που προέκυψαν από το Graphpad στα οποία φαίνεται το ποσοστό αναστολής για όλα τα χημικά μόρια που δοκιμάστηκαν.

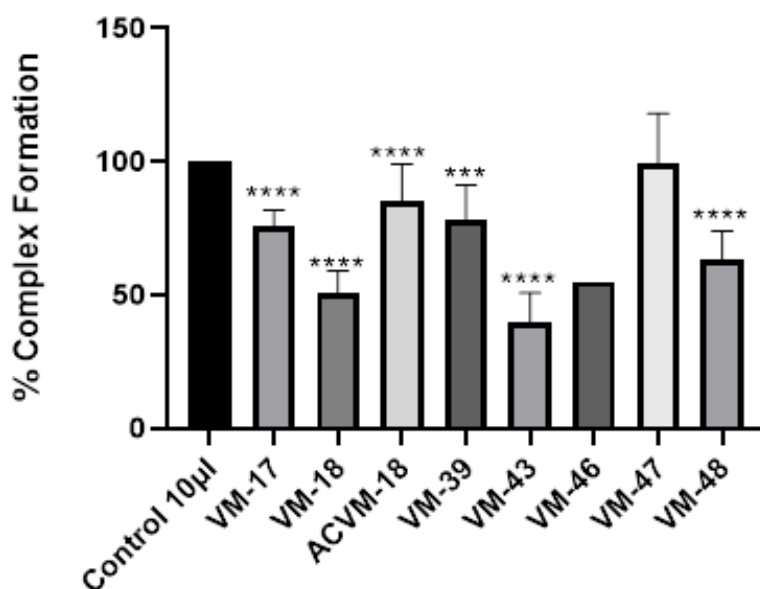


Σημείωση: Για λόγους απλοποίησης παρουσιάζεται μόνο το αρνητικό control (απουσιάζει η GST-MYC, θεωρείται 0% σχηματισμός συμπλόκου) και το θετικό control (όπου θεωρείται ότι σχηματίζεται το 100% του συμπλόκου). Τα άλλα δύο θετικά control είναι δείκτες επιτυχίας του πειράματος και ασφάλειας διεξαγωγής συμπερασμάτων για την ανασταλτική δράση των υπό εξέταση χημικών ενώσεων.

### 3.3.1 Χημικά μόρια (πρόγραμμα «AKMY»)

Στο πλαίσιο του προγράμματος AKMY, μας δόθηκε μια ομάδα πιθανών αναστολέων, τα οποία έχουν κατηγοριοποιηθεί με βάση της ονομασίας τους. Η ονομασία αυτών των μορίων έχει δοθεί κατά τέτοιον τρόπο ούτως ώστε να ομαδοποιούνται με βάση την κωδική ονομασία που δόθηκε ανάλογα με τις τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν και η δομή των μορίων δεν είναι διαθέσιμη, διότι είναι προς δημοσίευση.

Η οικογένεια των VM series προέρχονται από τροποποιήσεις του Amy 22, στο οποίο πραγματοποιήθηκε μια εικονική σάρωση της χημειοθήκης αναλόγων της Amy22 στην πιο κυρίαρχη τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου Amy22-MYC όπου αναγνωρίστηκαν τα μόρια τα οποία παρουσιάζουν υψηλή πρόσδεση στην MYC. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρατίθενται στο παρακάτω γράφημα:



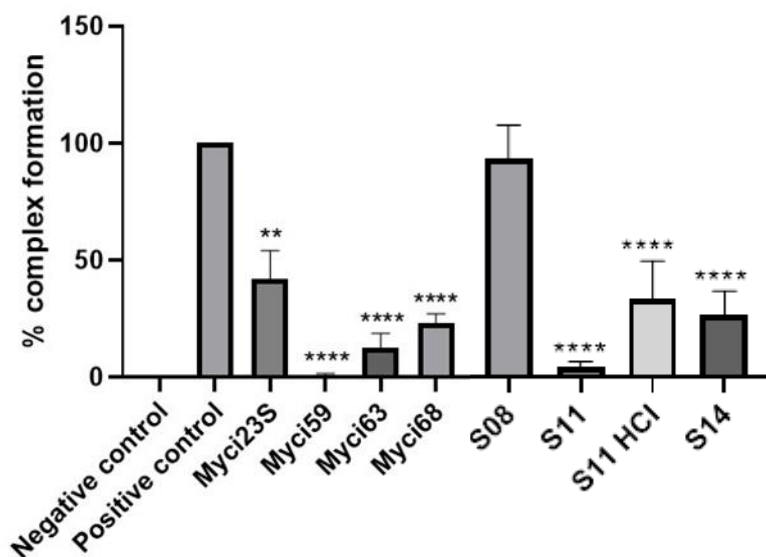
*Εικόνα 28. Γραφική απεικόνιση (μέσω διαγράμματος στηλών) της ποσότητας της His-MAX πρωτεΐνης που λαμβάνεται σε κάθε συνθήκη, μετά την ποσοτικοποίηση των μαντών του αποτελέσματος του Western. Από αριστερά προς τα δεξιά παρουσιάζονται: η ποσότητα στον θετικό μάρτυρα, όπου έχουμε το 100% του σχηματισμού του συμπλόκου και τελικά η ποσότητα στα δείγματα δοκιμής πιθανών αναστολέων. Το γράφημα είναι αποτέλεσμα έξι ανεξάρτητων πειραμάτων και οι αστερίσκοι συμβολίζουν την στατιστική σημαντικότητα για κάθε αναστολέα ( $P < 0.05$ )*

Αναλυτικότερα η αναστολή που παρουσίασαν τα παραπάνω μόρια ήταν τα εξής:

- VM-17=24.5%
- VM-18=49.4%
- ACVM-18=14.5%
- VM-39=22%
- VM-43%=60.3%
- VM-46=45%
- VM-47=1%
- VM-48=36.5%

Από το πείραμα αυτό συμπεραίνουμε ότι δύο μόρια της οικογένειας αυτής, το VM17 και το VM43, έχουν ικανοποιητική ανασταλτική (ίση με 50% ή μεγαλύτερη) δράση.

Η επόμενη σειρά χημικών μορίων που δοκιμάστηκε είναι η GZS series. Η οικογένεια αυτών των μορίων σχεδιάστηκε με βάση την δομή της οδηγού ένωσης Myc19. Η ένωση Myc19 είναι ένα ανάλογο βαρβιτουρικού οξέος, με ομοιότητα προς τον γνωστό αναστολέα 10058-F4, και παρουσίασε ικανοποιητική πρόσδεση στη MYC. Η ένωση αυτή εντοπίστηκε μέσω εικονικής σάρωσης των μορίων της χημειοθήκης του NCI. Με βάση αυτήν την ένωση σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν νέα μόρια, ανάλογα του Myc19, με διαφορετικούς υποκαταστάτες στον βαρβιτουρικό δακτύλιο. Τα ανάλογα Myc123S, Myc159, Myc163 είναι εστέρες και πιθανότατα υδρολύονται όταν εισέλθουν στο κύτταρο. Το Myc168 είναι το υδρολυμένο ανάλογο του Myc163. Οι ενώσεις αυτές δοκιμάστηκαν, για την ανασταλτική τους δράση, με τη δοκιμασία Pull-Down.



Εικόνα 29. Γραφική απεικόνιση (μέσω διαγράμματος στηλών) της ποσότητας της His-MAX πρωτεΐνης που λαμβάνεται σε κάθε συνθήκη, μετά την ποσοτικοποίηση των μπαντών του αποτελέσματος του Western. Από αριστερά προς τα δεξιά παρουσιάζονται: η ποσότητα His-MAX στον αρνητικό μάρτυρα, η ποσότητα στον θετικό μάρτυρα, όπου έχουμε το 100% του σχηματισμού του συμπλόκου και τελικά η ποσότητα στα δείγματα δοκιμής πιθανών αναστολέων. Το γράφημα είναι αποτέλεσμα τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων και οι αστερίσκοι συμβολίζουν την στατιστική σημαντικότητα για κάθε αναστολέα ( $P < 0.05$ ).

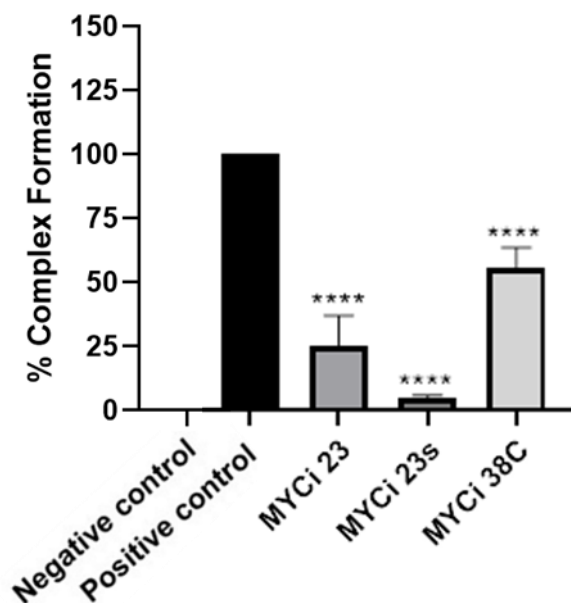
Πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα αναστολής ήταν:

- Myci23S: 58%
- Myci59: 100%
- Myci63: 88%
- Myci68: 77%
- S08=15%
- S11=96%
- S11HCl=70%
- S14=76%

Στην συγκεκριμένη σειρά παρατηρούμε ότι από τα μόρια που ελέγχθηκαν, τα S11 και Myci59, παρουσιάζουν σχεδόν ολική αναστολή του σχηματισμού του συμπλόκου.

Συνεχίζοντας εξετάστηκε η οικογένεια των MYCι αναστολέων. Τα συγκεκριμένα χημικά μόρια προέρχονται μέσω της εικονικής αξιολόγησης της βιβλιοθήκης μορίων NCI, όπου εντοπίστηκαν 40 μόρια με σχετικά υψηλή δομική ομοιότητα με την ουσία

MyCi19. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων, όπως και προηγουμένως, παρατίθενται στο παρακάτω γράφημα.



*Εικόνα 30. Γραφική απεικόνιση (μέσω διαγράμματος στηλών) της ποσότητας της His-MAX πρωτεΐνης που λαμβάνεται σε κάθε συνθήκη, μετά την ποσοτικοποίηση των μπαντών του αποτελέσματος του Western. Από αριστερά προς τα δεξιά παρουσιάζονται: η ποσότητα His-MAX στον αρνητικό μάρτυρα, η ποσότητα στον θετικό μάρτυρα, όπου έχουμε το 100% του σχηματισμού του συμπλόκου και τελικά η ποσότητα στα δείγματα δοκιμής πιθανών αναστολέων. Το γράφημα είναι αποτέλεσμα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και οι αστερίσκοι συμβολίζουν την στατιστική σημαντικότητα για κάθε αναστολέα ( $P < 0.05$ ).*

Τα ποσοστά αναστολής για αυτά τα μόρια είναι τα εξής:

- MYCi23=75%
- MYCi23s=95.6%
- MYCi38C=45%

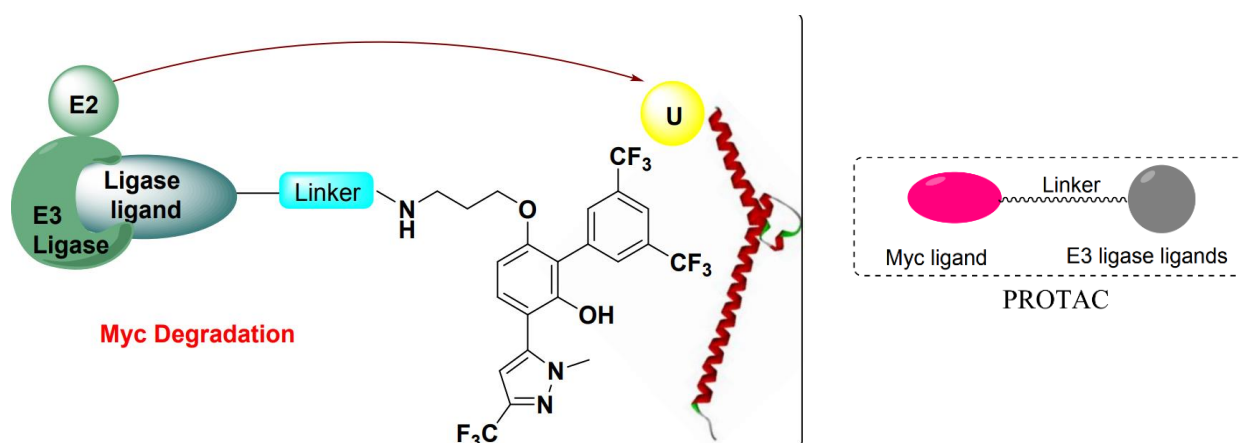
Και σε αυτή την σειρά παρατηρείται ένας ακόμη ολικός αναστολέας του συμπλόκου ο οποίος απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

### 3.3.2 Χημικά μόρια (Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης εργαστήριο κ. Σαρλή)

Στη συνέχεια, στο πλαίσιο της συνεργασίας με το εργαστήριο Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (εργαστήριο κ. Σαρλή), μας δόθηκε μία ομάδα χημικών ενώσεων, που σχεδιάστηκαν με σκοπό την αποικοδόμηση της MYC. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται PROteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) και επιτρέπουν την απενεργοποίηση της πρωτεΐνης στόχου και την επαγωγή της ουβικιτινύλωσης και της αποικοδόμησης, μέσω του πρωτεασώματος UPS. Τα μόρια αυτά έχουν διπλή λειτουργία και αποτελούνται από 3 μέρη:

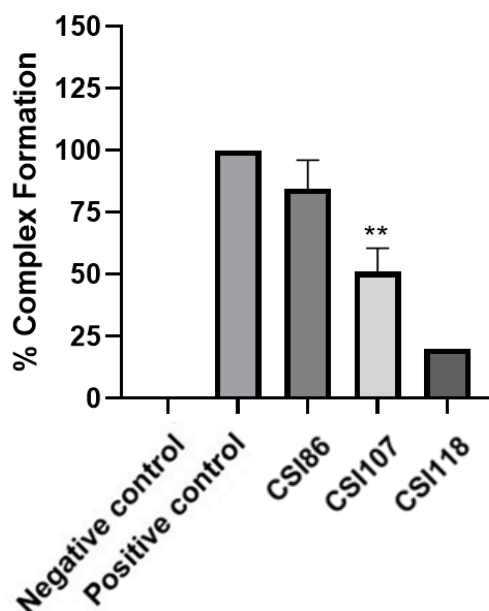
- την περιοχή πρόσδεσης στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος,
- την περιοχή στρατολόγησης της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης και
- έναν προσδέτη, που ενώνει τις 2 περιοχές (Εικόνα 31).

Σχεδιάστηκαν, λοιπόν, χημικές ενώσεις, με αυτές τις δομικές περιοχές, με σκοπό την στόχευση της MYC. Αρχικά, σχεδιάστηκε η ένωση CSI118, που είναι ακετυλικό παράγωγο του διφαινυλικού δακτυλίου της ένωσης MYCi361, η οποία είναι γνωστό ότι αποσταθεροποιεί την πρωτεΐνη MYC, μέσω φωσφορυλίωσης και στρατολόγησης του πρωτεασώματος προς αποικοδόμηση της. Η ένωση CSI118 είναι παράγωγο της MYCi361 και διαθέτει περιοχή πρόσδεσης πρωτεασώματος. Βάση της ένωσης CSI118, σχεδιάστηκαν διάφορα παράγωγα, όπως οι ενώσεις CSI86 και CSI107. Οι 3 αυτές ενώσεις δοκιμάστηκαν, στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής, με την τεχνική pull down, για να διαπιστωθεί αν επηρεάζουν την αλληλεπίδραση της MYC με την MAX. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 32.



*Εικόνα 31: Δομή των χημικών ενώσεων PROTACs, που στοχεύουν την πρωτεΐνη MYC. Οι ενώσεις αυτές στοχεύουν την πρωτεΐνη και προκαλούν την αποικοδόμησή της. Είναι υβριδικά μόρια που αποτελούνται από 3 μέρη: την περιοχή πρόσδεσης στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, την περιοχή στρατολόγησης της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης (Ligase ligand) και έναν προσδέτη (Linker), που ενώνει τις*

2 περιοχές. Σε αυτήν την κατηγορία ενώσεων ανήκουν οι ενώσεις CSI118, CSI86 και CSI107, που ελέγχθηκαν στο εργαστήριο μας, για την ικανότητα τους να αναστέλλουν τον σχηματισμό του συμπλόκου MYC-MAX, μέσω της αποικοδόμησης της MYC. Πηγή: Siokatas et al., 2023 (άρθρο υποβληθέν προς δημοσίευση)

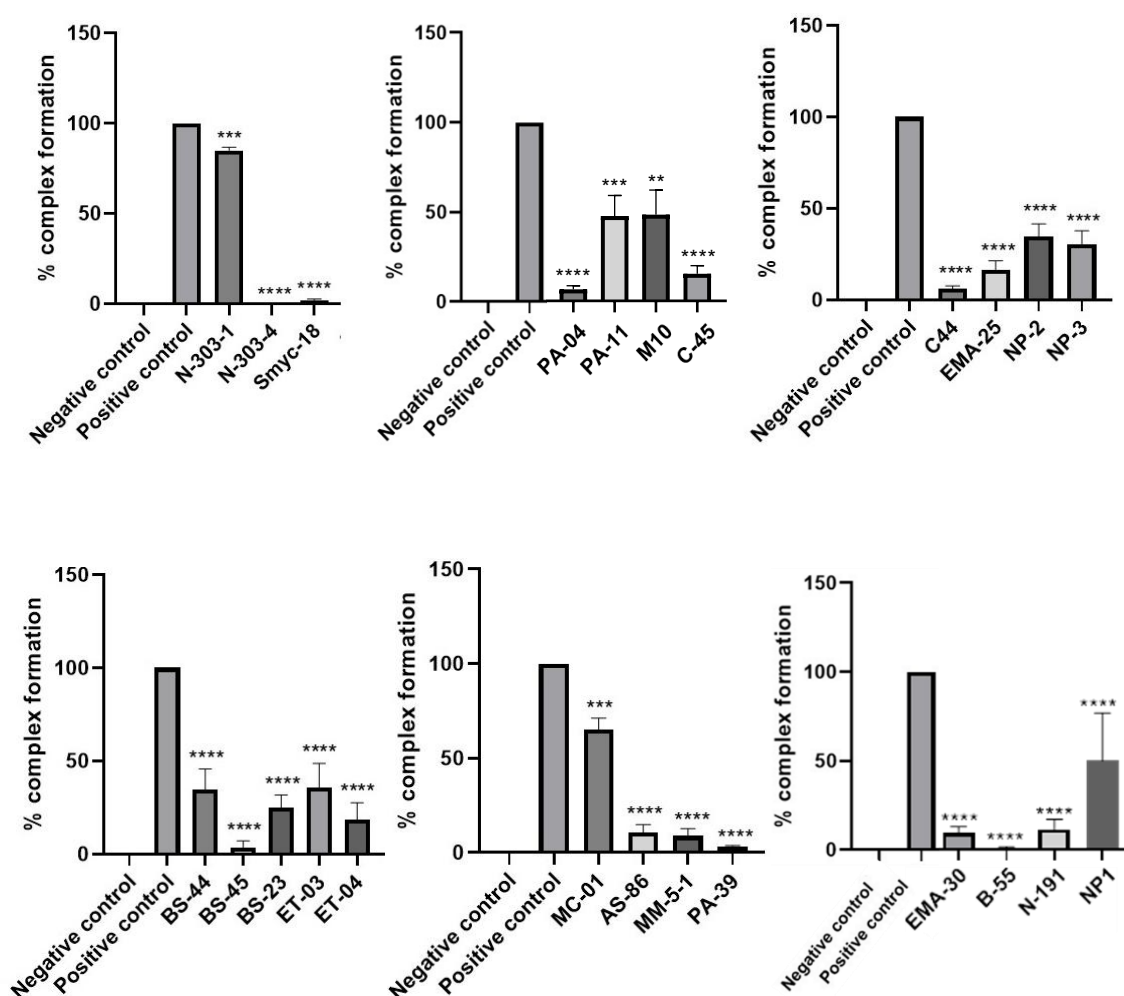


**Εικόνα 32:** Γραφική απεικόνιση (μέσω διαγράμματος στηλών) της ποσότητας της His-MAX πρωτεΐνης που λαμβάνεται σε κάθε συνθήκη, μετά την ποσοτικοποίηση των μαντών του αποτελέσματος του Western. Από αριστερά προς τα δεξιά παρουσιάζονται: η ποσότητα His-MAX στον αρνητικό μάρτυρα, η ποσότητα στον θετικό μάρτυρα, όπου έχουμε το 100% του σχηματισμού του συμπλόκου και τελικά η ποσότητα στα δείγματα δοκιμής πιθανών αναστολέων. Το γράφημα είναι αποτέλεσμα 3 τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων και οι αστερίσκοι συμβολίζουν την στατιστική σημαντικότητα για κάθε αναστολέα ( $P < 0.05$ ). Οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν προήλθαν από το εργαστήριο χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (εργαστήριο κ. Σαρλή) και είναι σχεδιασμένες, ώστε να προκαλούν αποικοδόμηση της MYC, μέσω της στρατολόγησης του πρωτεασώματος. Στην παρούσα δοκιμή ελέγχθηκε αν οι ενώσεις αυτές επηρεάζουν την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών MYC και MAX.

Τα αποτελέσματα της εικόνας 28 έδειξαν ότι οι ενώσεις CSI107 και CSI118 προκάλεσαν αναστολή του συμπλόκου σε ποσοστό περίπου 30% και 80%. Αυτό πιθανότατα σημαίνει ότι ο συγκεκριμένος αποικοδομητής της MYC προσδέεται στην περιοχή σχηματισμού του συμπλόκου, δηλαδή στην δομή bHLHLZ. Η CSI86 δεν φάνηκε να επηρεάζει τον σχηματισμό του συμπλόκου MYC-MAX.

### 3.3.3 Χημικά μόρια (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, εργαστήριο κ. Τζάκου)

Η επόμενη σειρά ενώσεων προήλθε από το εργαστήριο του κ. Τζάκου, στο πλαίσιο της συνεργασίας μας. Πληροφορίες σχετικά με τις δομές των χημικών αυτών ενώσεων δεν είναι διαθέσιμες και επίκειται συγγραφή πρότασης, για την κατοχύρωση πνευματικής ιδιοκτησίας. Δοκιμές pull down για την ανίχνευση αναστολέων της MYC έδωσαν τα αποτελέσματα της εικόνας 33.



Εικόνα 33. Γραφική απεικόνιση (μέσω διαγράμματος στηλών) της ποσότητας της His-MAX πρωτεΐνης που λαμβάνεται σε κάθε συνθήκη, μετά την ποσοτικοποίηση των μπαντών του αποτελέσματος του Western. Σε κάθε διάγραμμα από αριστερά προς τα δεξιά παρουσιάζονται: η ποσότητα His-MAX στον αρνητικό μάρτυρα, η ποσότητα στον θετικό μάρτυρα, όπου έχουμε το 100% του σχηματισμού του συμπλόκου και τελικά η ποσότητα στα δείγματα δοκιμής πιθανών αναστολέων. Τα γραφήματα είναι αποτέλεσμα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και οι αστερίσκοι συμβολίζουν την στατιστική σημαντικότητα για κάθε αναστολέα ( $P < 0.05$ )

Αναλυτικότερα, τα ποσοστά αναστολής είναι τα εξής:

- N-303-1: 15%
- **N-303-4: 100%**
- **Smyc-18: 100%**
- **PA-04: 90%**
- PA-11: 40%
- M10: 50%
- C45: 78%
- **C44: 94%**
- EMA-25: 84%
- NP-2: 65%
- NP-3: 70%
- BS-44: 66%
- **BS-45: 96%**
- BS-23: 75%
- ET-03: 64%
- ET-04: 82%
- MC-01: 35%
- **AS-86: 90%**
- **MM-5-1: 91%**
- **PA-39: 97%**
- **EMA-30=91%**
- **B-55=99 %**
- **N-191=89%**
- NP1=50%

Οι περισσότερες ενώσεις προκάλεσαν αρκετά μεγάλη αναστολή του συμπλόκου, ενώ προέκυψαν και κάποιες ενώσεις οι οποίες προκάλεσαν ολική ή σχεδόν ολική αναστολή του. Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτες των ιδιοτήτων τους και, πιθανή χρήση τους ως οδηγών ενώσεων.

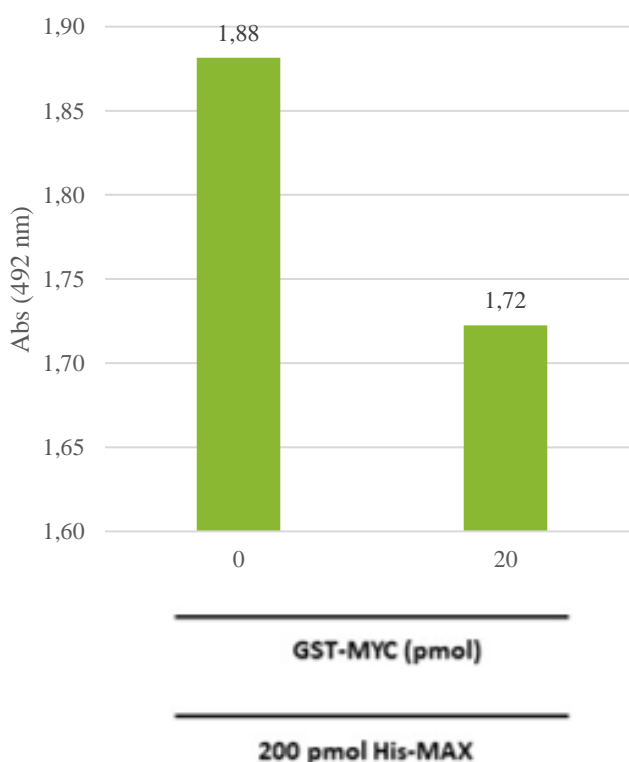
### 3.4 Σχεδιασμός Μεθόδου ELISA για την ανίχνευση πιθανών αναστολέων

Η χρήση της μεθόδου χρωματογραφίας συγγένειας αποτελεί μία πολύ καλή επιλογή για την σύρωση χημικών μορίων, καθώς επιτελείται με απλό και φθινό εργαστηριακό εξοπλισμό και δεν εμφανίζει ιδιαίτερες δυσκολίες στην πραγματοποίησή της. Ωστόσο, παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα, όπως η χρόνος που απαιτείται (περίπου 3 ημέρες), ο ημιποσοτικός χαρακτήρας (μιας που η ανάλυση της έντασης των ζωνών με το λογισμικό Image J δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια) και ο περιορισμός στη δοκιμή μέχρι 5 πιθανών αναστολέων σε κάθε πείραμα.

Όλα τα παραπάνω, οδήγησαν στην σκέψη για την εγκαθίδρυση ενός πρωτοκόλλου με τη μέθοδο ELISA, η οποία είναι πολύ πιο γρήγορη (1 ημέρα/ πείραμα) και εύκολη μέθοδος και, ταυτόχρονα, είναι δυνατόν να γίνει ανίχνευση της αναστολής μεγάλου αριθμού χημικών ενώσεων, σε μία μόνο δοκιμασία (βλ. Ενότητα 2.6)



Οι προσπάθειες ξεκίνησαν αρχικά με τον έλεγχο ικανότητας σχηματισμού του συμπλόκου και λήψης επαρκούς σήματος από τη φωτομέτρηση στα 492 nm. Οι δοκιμασία αποτελούνταν από: ένα δείγμα, στο οποίο προστέθηκαν μόνο αντισώματα και καθόλου πρωτεΐνες (Blank) (για λόγους ευκολίας δεν παρουσιάζεται στα αποτελέσματα, μιας που έδινε σταθερά μηδενικό σήμα), ένα δείγμα, στο οποίο προστέθηκαν μόνο τα 200 pmol His-MAX (3 μg) (Negative control) και ένα δείγμα, στο οποίο προστέθηκαν τα 20 pmol GST-MYC (100 μL εκχυλίσματος) και τα 200 pmol His-MAX (3 μg), με σκοπό τον σχηματισμό του συμπλόκου. Στο αρχικό αυτό πείραμα το Blocking buffer είχε σύσταση 50mM Tris pH=7.5, 150mM NaCl, 0,05% Tween-20 και το διάλυμα πλύσης είχε σύσταση 50mM Tris pH=7.5, 150mM NaCl και 0,2% Gelatin. Επίσης, όσον αφορά τις πλύσεις μεταξύ των διαφόρων σταδίων, πραγματοποιήθηκαν σε κάθε φάση 3 πλύσεις με 200 μL Blocking buffer και 2 πλύσεις με διάλυμα πλύσης. Μετά την πραγματοποίηση της αντίδρασης με OPD, λήφθηκαν οι απορροφήσεις στα 492nm του κάθε δείγματος. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στο διάγραμμα της εικόνας 34.

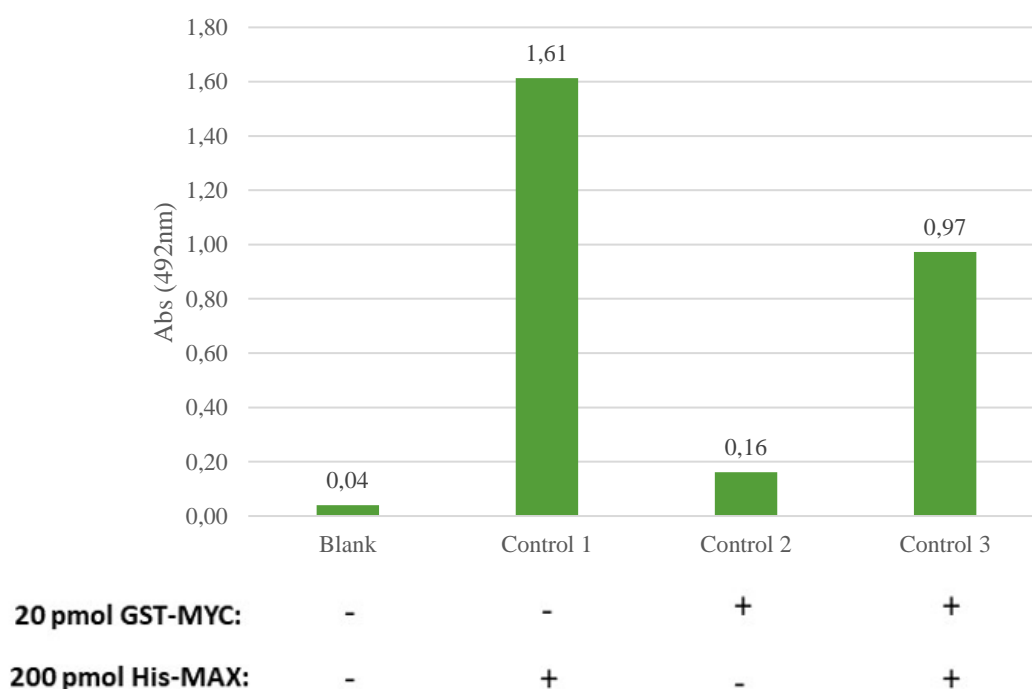


**Εικόνα 34:** Δοκιμασία σχηματισμού του συμπλόκου MYC-MAX με τη μέθοδο ELISA. Για το σχηματισμό του συμπλόκου, προστέθηκαν σε πιάτα γλουταθειόνης περίπου 20 pmol GST-MYC και ακινητοποιήθηκαν. Στη συνθήκη του αρνητικού control, δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Μετά από πλύσεις, απομακρύνθηκαν οι μη ακινητοποιημένες πρωτεΐνες και προστέθηκαν 200 pmol His-MAX, σε όλα τα δείγματα. Μετά από πλύσεις, προστέθηκαν το πρώτο και το δεύτερο αντίσωμα, για την His-MAX πρωτεΐνη, και έγινε προσθήκη OPD, προς αντίδραση με το HRP του δεύτερου αντισώματος. Μετά το πέρας

της αντίδρασης, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 492 nm, που παρουσιάζεται στο διάγραμμα της εικόνας.

Και στις δύο περιπτώσεις το σήμα ήταν αρκετά υψηλό και ικανό για τη συνέχιση των πειραμάτων βελτιστοποίησης της μεθόδου, που σημαίνει ότι η διακριτική ικανότητα των αντισωμάτων είναι επαρκής, ώστε να ανιχνεύσει τις ποσότητες των πρωτεϊνών, οι οποίες προσδένονται στα wells. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μεγάλος θόρυβος στο αρνητικό control. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε λόγω της πολύ μεγάλης ποσότητας His-MAX, η οποία προσδένεται μη ειδικά στα τοιχώματα των πηγαδιών, είτε λόγω πρόσδεσης των αντισωμάτων μη ειδικά σε πρωτεΐνες του εκχυλίσματος που ίσως προσδένονται μη ειδικά στα τοιχώματα.

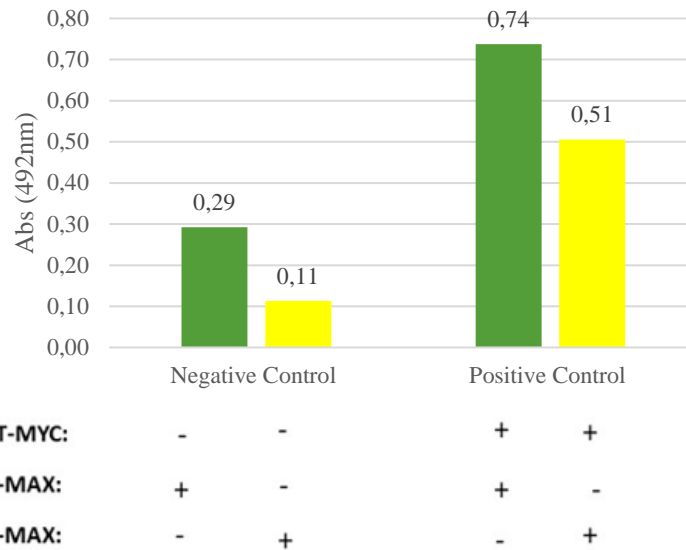
Επομένως, ακολούθησε επανάληψη του πειράματος με ίδιες τις ποσότητες GST-MYC και His-MAX, με την προσθήκη ενός ακόμα δείγματος, στο οποίο προστέθηκε μόνο η ποσότητα εκχυλίσματος GST-MYC και όχι His-MAX, ώστε να διαπιστωθεί αν τα αντισώματα αναγνωρίζουν μη ειδικά πρωτεΐνες του εκχυλίσματος, που ίσως προσδένονται μη ειδικά στα τοιχώματα. Ακόμη έγινε αύξηση του αριθμού των πλύσεων και του χρόνου στην πλύση με Blocking buffer σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα με σκοπό την καλύτερη απομάκρυνση μη ειδικής πρόσδεσης των πρωτεϊνών του εκχυλίσματος στα wells. Έγιναν λοιπόν, 5 πλύσεις με 200  $\mu$ L διαλύματος πλύσης και 1 πλύση (5min) με 200  $\mu$ L Blocking buffer. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στο διάγραμμα της εικόνας 35.



*Εικόνα 35: Δοκιμασία σχηματισμού συμπλόκου MYC-MAX και ανίχνευσης μη ειδικής δέσμευσης αντισωμάτων με τη μέθοδο ELISA. Για το σχηματισμό του συμπλόκου, προστέθηκαν σε πιάτα γλουταθειόνης περίπου 20 pmol GST-MYC και ακινητοποιήθηκαν. Χρησιμοποιήθηκαν ένα τυφλό, στο οποίο δεν προστέθηκε καμία πρωτεΐνη, αλλά μόνο αντισώματα και δύο control. Στο ένα προστέθηκαν 20 pmol GST-MYC και στο άλλο δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Μετά από πλύσεις, προστέθηκαν 200 pmol His-MAX, στο δείγμα σχηματισμού του συμπλόκου και στο control, στο οποίο δεν προστέθηκε GST-MYC. Η His-MAX δεν προστέθηκε στο control, στο οποίο είχε, προηγουμένως προστεθεί εκχύλισμα GST-MYC. Μετά από πλύσεις, προστέθηκαν το πρώτο και το δεύτερο αντίσωμα, για την His-MAX πρωτεΐνη, σε όλα τα δείγματα και έγινε προσθήκη OPD, προς αντίδραση με το HRP του δεύτερου αντισώματος. Μετά το πέρας της αντίδρασης, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 492 nm, που παρουσιάζεται στο διάγραμμα της εικόνας.*

Παρατηρήθηκε πως στην περίπτωση, όπου προστέθηκε μόνο το εκχύλισμα της GST-MYC (20 pmol MYC), ο θόρυβος είναι ελάχιστος, σχεδόν ίσος με το τυφλό (Blank), επομένως τα αντισώματα δεν αναγνωρίζουν μη ειδικά κάποια πρωτεΐνη του εκχυλίσματος. Αντίθετα, στην περίπτωση που έχει προστεθεί μόνο His-MAX (200 pmol MAX), ο θόρυβος είναι πολύ μεγάλος, όπως και στο προηγούμενο πείραμα. Έτσι, δεν μπορεί να εντοπιστεί ο σχηματισμός του συμπλόκου, καθώς δεν υπάρχει επαρκής διαφορά στις απορροφήσεις (παράθυρο).

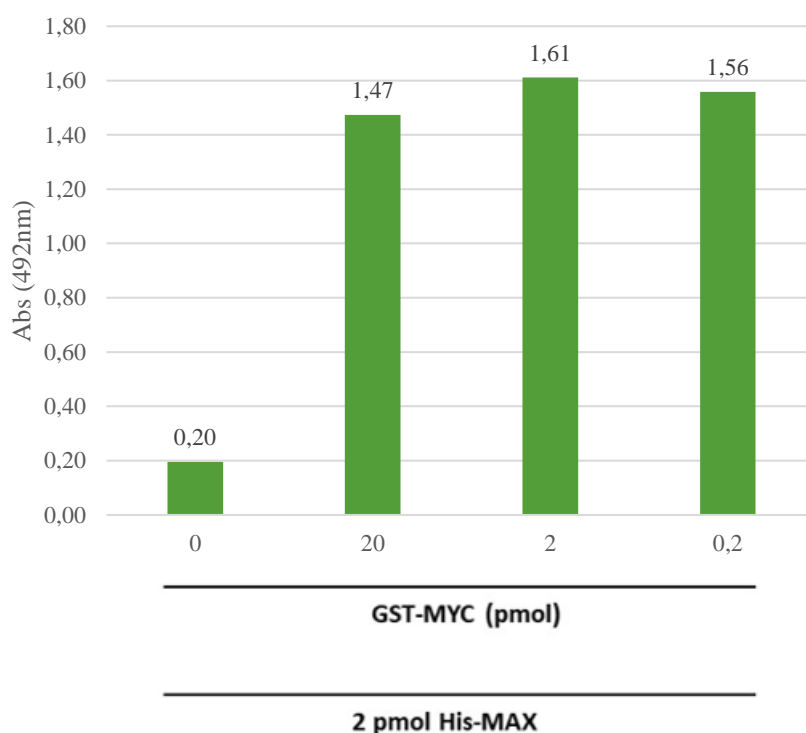
Στην προσπάθεια μείωσης της μη ειδικής πρόσδεσης της His-MAX στα τοιχώματα των πηγαδιών, επιλέξαμε να τροποποιήσουμε τη σύσταση του Blocking buffer που χρησιμοποιούσαμε έως τώρα, αντικαθιστώντας την πρωτεΐνη ζελατίνη με αλβουμίνη (BSA), που είναι γνωστό ότι έχει πολύ καλύτερα αποτελέσματα στην κάλυψη των μη ειδικών θέσεων. Έτσι, η σύσταση του νέου Blocking Buffer διαμορφώθηκε με 50mM Tris pH=7.5, 150mM NaCl, 10 mg/mL BSA, 0,05% Tween-20. Συνεργατικά στην παραπάνω προσπάθεια επιλέξαμε να τροποποιήσουμε και το διάλυμα πλύσης, προσθέτοντας στο νέο και Tween-20, ώστε να ενισχυθεί η επικάλυψη των μη ειδικών θέσεων των πηγαδιών με Tween-20, σε περίπτωση που αυτές μένουν κενές με τις πολλές πλύσεις. Έτσι, η τελική σύσταση του νέου διαλύματος πλύσης διαμορφώθηκε με 50mM Tris pH=7.5, 150mM NaCl, 0,2% gelatin και 0,05% Tween-20. Ακόμη, μετά από τις πλύσεις με διάλυμα πλύσης, έγιναν επώσεις με Blocking buffer, διάρκειας 15 λεπτών, μετά την επώαση με εκχύλισμα με GST-MYC, και 5 λεπτών σε όλα τα υπόλοιπα στάδια. Τέλος, έγινε δοκιμή προσθήκης μικρότερων ποσοτήτων His-MAX για τον σχηματισμό του συμπλόκου με σκοπό τη μείωση του θορύβου. Συγκεκριμένα, τα δείγματα ήταν: ένα τυφλό (Blank), ένα αρνητικό control με περίπου 20 pmol His-MAX (δηλαδή 0,3 μg His-MAX), ένα αρνητικό control με 2 pmol His-MAX (δηλαδή 0,03 μg His-MAX) και δύο δείγματα, όπου προστέθηκε η ίδια ποσότητα εκχυλίσματος GST-MYC (περίπου 20 pmol) και 20 pmol His-MAX στο ένα και 2 pmol His-MAX στο άλλο. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στο διάγραμμα της εικόνας 36.



*Εικόνα 36: Δοκιμασία σχηματισμού συμπλόκου MYC-MAC με δύο διαφορετικές ποσότητες His-MAX με τη μέθοδο ELISA. Για το σχηματισμό του συμπλόκου, προστέθηκαν σε πιάτα γλουταθειόνης περίπου 20 pmol GST-MYC και ακινητοποιήθηκαν. Στη συνθήκη των αρνητικών control, δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Μετά από πλύσεις, απομακρύνθηκαν οι μη ακινητοποιημένες πρωτεΐνες και προστέθηκαν στο ένα αρνητικό control και στο ένα δείγμα 20 pmol His-MAX και στο άλλο αρνητικό control και στο άλλο δείγμα 2 pmol His-MAX. Μετά από πλύσεις, προστέθηκαν το πρώτο και το δεύτερο αντίσωμα, για την His-MAX πρωτεΐνη, και έγινε προσθήκη OPD, προς αντίδραση με το HRP του δεύτερου αντισώματος. Μετά το πέρας της αντίδρασης, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 492 nm, που παρουσιάζεται στο διάγραμμα της εικόνας. Παραλήφθηκε η απορρόφηση του τυφλού, που ήταν πάλι σχεδόν μηδενική.*

Παρατηρήθηκε πως ο θόρυβος στην περίπτωση υποδεκαπλασιασμού της His-MAX (από 200pmol σε 20pmol) μειώθηκε αισθητά. Ακόμη, επίδραση στη μείωση του θορύβου φαίνεται να είχαν και οι υπόλοιπες τροποποιήσεις, μιας που στην εικόνα 35 το control 1 είχε απορρόφηση 1,61, ενώ το αντίστοιχο control (με τα 20 pmol His-MAX) σε αυτή της περίπτωση είχε απορρόφηση μόλις 0,29. Ταυτόχρονα η απορρόφηση του αρνητικού control με τα 2 pmol His-MAX ήταν 0,11 και επιλέχθηκε για τη συνέχιση των πειραμάτων. Ακόμη, στα δείγματα, όπου σχηματίζεται το σύμπλοκο, υπάρχει αύξηση στην απορρόφηση, σε σχέση με τα αρνητικά control. Με άλλα λόγια, σε αυτό το πείραμα μπορεί να φανεί ο σχηματισμός του συμπλόκου, αφού το παράθυρο μεταξύ θετικών και αρνητικών control είναι σχετικά καλό, όχι όμως ιδανικό, αφού για τις ανάγκες της δοκιμασίας, χρειάζεται μεγάλη διαφορά απορροφήσεων μεταξύ του αρνητικού control και του δείγματος σχηματισμού του συμπλόκου (θετικό control), ώστε να υπάρχει περιθώριο για ανίχνευση και ενδιάμεσων ποσοστών σχηματισμού του συμπλόκου, όπως στην περίπτωση του Pull-Down. Εντούτοις, όλα τα παραπάνω καταδεικνύουν πως οι τροποποιήσεις που έγιναν ήταν αναγκαίες στην προσπάθεια βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου.

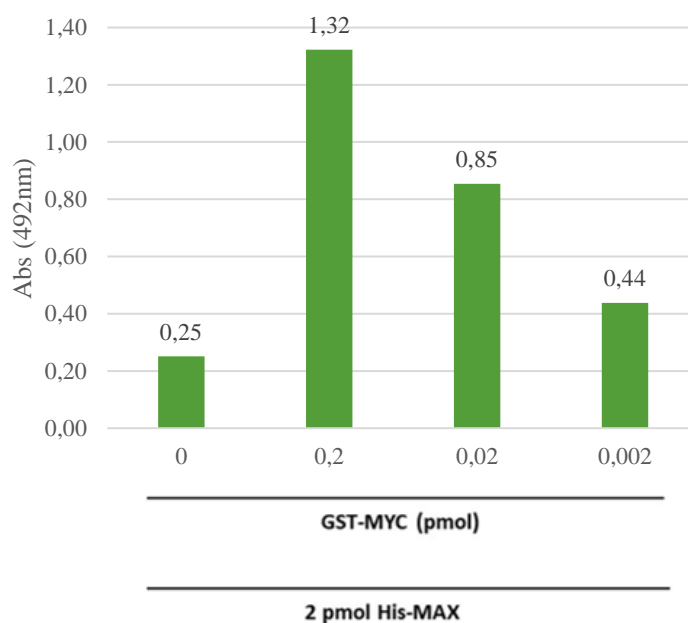
Στη συνέχεια, έγινε δοκιμασία σχηματισμού συμπλόκου, με 3 δείγματα και μειούμενες ποσότητες εκχυλίσματος GST-MYC, για να φανεί αν υπάρχει αναλογικότητα μεταξύ του σήματος που λαμβάνεται και της ποσότητας GST-MYC, που ακινητοποιείται στα wells, ώστε να ελεγχθεί η αναλογικότητα σχηματισμού του συμπλόκου. Σε αυτή χρησιμοποιήθηκε η ποσότητα His-MAX 2 pmol (0,03 μg) (όπως προέκυψε από το προηγούμενο πείραμα, λόγω χαμηλού θορύβου). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν: ένα τυφλό (Blank), ένα αρνητικό control με 2 pmol His-MAX (δηλαδή 0,03 μg His-MAX), ένα δείγμα με 20 pmol GST-MYC (δηλαδή 100 μL εκχυλίσματος) και 2 pmol His-MAX, ένα δείγμα με 2 pmol GST-MYC (δηλαδή 10 μL εκχυλίσματος) και 2 pmol His-MAX και ένα δείγμα με 0,2 pmol GST-MYC (δηλαδή 1 μL εκχυλίσματος) και 2 pmol His-MAX. Τέλος έγινε αύξηση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης (BSA) του Blocking buffer, από 10 mg/mL σε 14 mg/mL. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στο διάγραμμα της εικόνα 37.



**Εικόνα 37:** Δοκιμασία σχηματισμού συμπλόκου MYC-MAC, με μειούμενες ποσότητες εκχυλίσματος GST-MYC με τη μέθοδο ELISA. Για το σχηματισμό του συμπλόκου, προστέθηκαν σε πιάτα γλουταθειόνης περίπου 20 pmol, 2 pmol και 0,2 pmol GST-MYC, αντίστοιχα, και ακινητοποιήθηκαν. Στη συνθήκη του αρνητικού control, δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Μετά από πλύσεις, προστέθηκαν σε όλα τα δείγματα 2 pmol His-MAX. Μετά από πλύσεις, προστέθηκαν το πρώτο και το δεύτερο αντίσωμα, για την His-MAX πρωτεΐνη, και έγινε προσθήκη OPD, προς αντίδραση με το HRP του δεύτερου αντισώματος. Μετά το πέρας της αντίδρασης, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 492 nm, που παρουσιάζεται στο διάγραμμα της εικόνας. Παραλήφθηκε η απορρόφηση του τυφλού, που ήταν πάλι σχεδόν μηδενική.

Παρατηρήθηκε ότι ο θόρυβος της δοκιμασίας ήταν πολύ μικρός, αφού το αρνητικό control είχε απορρόφηση κοντά στο μηδέν. Επίσης υπάρχει ικανοποιητική διαφορά απορροφήσεων μεταξύ του αρνητικού control και των δειγμάτων, δηλαδή μπορεί να ανιχνευτεί επαρκώς το σχηματιζόμενο σύμπλοκο. Ωστόσο, δεν υπάρχουν διαφορές στις απορροφήσεις μεταξύ των 3 δειγμάτων με μειούμενες ποσότητες GST-MYC, δηλαδή η ποσότητα His-MAX που ανιχνεύεται και στα 3 δείγματα είναι η ίδια. Μία ερμηνεία για αυτό είναι πως η ποσότητα του εκχυλίσματος που προστίθεται είναι πολύ μεγαλύτερη από την χωρητικότητα των πηγαδιών σε πρωτεΐνη, με αποτελέσματα να προσδένεται η ίδια ποσότητα GST-MYC στα πηγαδάκια σε κάθε περίπτωση. Έτσι, σε κάθε περίπτωση σχηματίζεται η ίδια ποσότητα συμπλόκου. Επίσης, είναι πιθανό η His-MAX να μη βρίσκεται σε περίσσεια, σε σχέση με την GST-MYC, και, επομένως, ανεξάρτητα από την ποσότητα GST-MYC που έχει ακινητοποιηθεί, να σχηματίζεται σύμπλοκο με την ίδια ποσότητα His-MAX, σε κάθε περίπτωση, δηλαδή όλη τη διαθέσιμη.

Έτσι, στην επόμενη δοκιμασία, διατηρήθηκε σταθερή η ποσότητα της His-MAX (2 pmol) και δοκιμάστηκαν τρεις ποσότητες 1 μL, 0,1 μL και 0,01 μL εκχυλίσματος GST-MYC, δηλαδή 0,2 pmol, 0,02 pmol και 0,002 pmol GST-MYC αντίστοιχα. Η σύσταση του Blocking buffer παρέμεινε με 14 mg/mL BSA. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στο διάγραμμα της εικόνας 38.

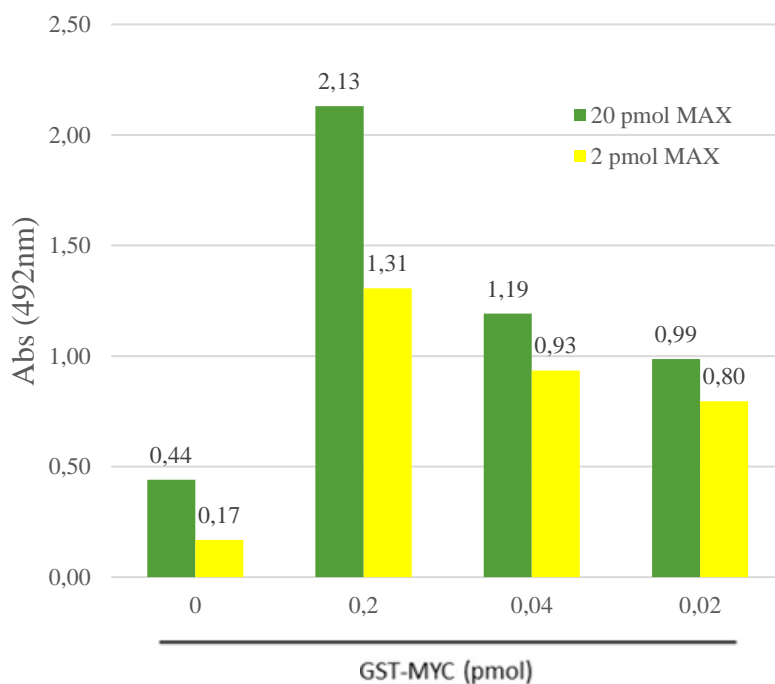


**Εικόνα 38:** Δοκιμασία σχηματισμού συμπλόκου MYC-MAC, με μειούμενες ποσότητες εκχυλίσματος GST-MYC με τη μέθοδο ELISA. Για το σχηματισμό του συμπλόκου, προστέθηκαν σε πιάτα γλουταθειόνης περίπου 0,2 pmol, 0,02 pmol και 0,002 pmol GST-MYC, αντίστοιχα, και

ακίνητοποιήθηκαν. Στη συνθήκη του αρνητικού control, δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Μετά από πλύσεις, προστέθηκαν σε όλα τα δείγματα 2 pmol His-MAX. Μετά από πλύσεις, προστέθηκαν το πρώτο και το δεύτερο αντίσωμα, για την His-MAX πρωτεΐνη, και έγινε προσθήκη OPD, προς αντίδραση με το HRP του δεύτερου αντισώματος. Μετά το πέρας της αντίδρασης, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 492 nm, που παρουσιάζεται στο διάγραμμα της εικόνας. Παραλήφθηκε η απορρόφηση του τυφλού, που ήταν πάλι σχεδόν μηδενική.

Παρατηρήθηκε μειούμενη απορρόφηση στα δείγματα που προστέθηκαν μειούμενες ποσότητες GST-MYC. Αποδείχθηκε λοιπόν πως σε ποσότητες εκχυλίσματος μικρότερες από 1  $\mu\text{L}$  (0,2 pmol GST-MYC) δεν έχει επέλθει κορεσμός των wells σε GST-MYC και μπορούν να φανούν διαφορές σε αυτή που προσδένεται και, κατά συνέπεια, στην ποσότητα His-MAX, που σχηματίζει σύμπλοκο. Ακόμη, μπορεί η απορρόφηση μεταξύ των δειγμάτων να είναι μειούμενη, δεν είναι όμως γραμμική στον βαθμό που θα έπρεπε, καθώς θα αναμέναμε το σήμα απορρόφησης να υποδεκαπλασιάζεται στο δεύτερο δείγμα (0,02 pmol MYC) και να υποεκατονταπλασιάζεται στο τρίτο δείγμα (0,002 pmol MYC), σε σχέση με το πρώτο. Ούτε στο δεύτερο ούτε και στο τρίτο δείγμα φαίνεται κάτι τέτοιο. Αυτό, ίσως, οφείλεται στο γεγονός ότι αυτές οι διαφορές είναι πολύ μεγάλες, για να φανούν με αυτή τη μέθοδο, καθώς μόνο ο θόρυβος της μεθόδου δίνει απορρόφηση 0,25. Η σκέψη για την επίλυση αυτού το προβλήματος ήταν η τροποποίηση της μεθοδολογία, μειώνοντας τις διαφορές της ποσότητας GST-MYC μεταξύ των δειγμάτων.

Ο παραπάνω συλλογισμός χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό του επόμενου πειράματος. Δοκιμάστηκε λοιπόν ο σχηματισμός συμπλόκου σε 3 δείγματα με τις εξής ποσότητες εκχυλίσματος GST-MYC: 1  $\mu\text{L}$  (0,2 pmol GST-MYC), 0,2  $\mu\text{L}$  (0,04 pmol GST-MYC) και 0,1  $\mu\text{L}$  (0,02 pmol GST-MYC), δηλαδή η διαφορά της ποσότητας GST-MYC μεταξύ του πρώτου και του τρίτου δείγματος ήταν 1/10. Σε αυτές τις ποσότητες επιλέχθηκε να γίνει ξανά δοκιμή δύο διαφορετικών ποσοτήτων His-MAX για τον σχηματισμό του συμπλόκου προκειμένου να επιλεγεί η βέλτιστη, οι οποίες ήταν 0,3  $\mu\text{g}$  His-MAX (20 pmol) και 0,03  $\mu\text{g}$  His-MAX (2 pmol) σε καθένα από τα τρία δείγματα. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και δύο αρνητικά control, στα οποία προστέθηκαν 0,3  $\mu\text{g}$  His-MAX (20 pmol) και 0,03  $\mu\text{g}$  His-MAX (2 pmol), αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στο διάγραμμα της εικόνας 39.



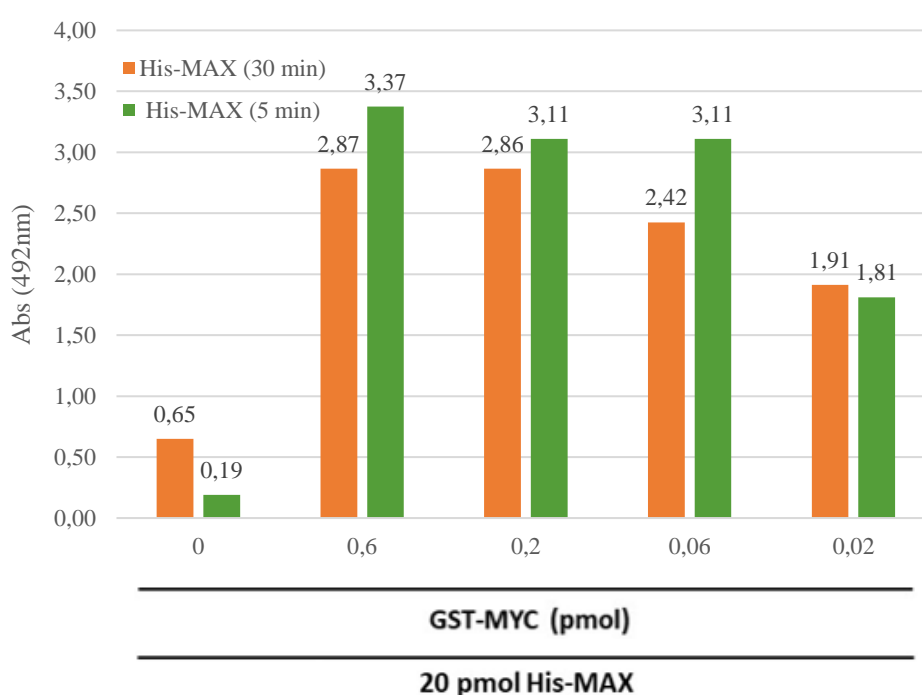
**Εικόνα 39:** Δοκιμασία σχηματισμού συμπλόκου MYC-MAC, με μειούμενες ποσότητες εκχυλίσματος GST-MYC και διαφορετικές ποσότητες His-MAX με τη μέθοδο ELISA. Για το σχηματισμό του συμπλόκου, προστέθηκαν σε πιάτα γλουταθειόνης περίπου 0,2 pmol, 0,04 pmol και 0,02 pmol GST-MYC, αντίστοιχα, και ακινητοποιήθηκαν. Στη συνθήκη του αρνητικού control, δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Μετά από πλύσεις, προστέθηκαν 20 pmol His-MAX (παρουσιάζεται με μπλε) ή 2 pmol His-MAX (παρουσιάζεται με πορτοκαλί), στα δείγματα και τα αρνητικά control. Μετά από πλύσεις, προστέθηκαν το πρώτο και το δεύτερο αντίσωμα, για την His-MAX πρωτεΐνη, και έγινε προσθήκη OPD, προς αντίδραση με το HRP του δεύτερου αντισώματος. Μετά το πέρας της αντίδρασης, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 492 nm, που παρουσιάζεται στο διάγραμμα της εικόνας. Παραλήφθηκε η απορρόφηση του τυφλού, που ήταν πάλι σχεδόν μηδενική.

Παρατηρήθηκε ότι ο θόρυβος είναι μεγαλύτερος στην περίπτωση, όπου προστίθενται 20 pmol His-MAX. Ωστόσο, με την προσθήκη αυτής της ποσότητας His-MAX, επιτυγχάνεται μεγαλύτερη αναλογικότητα στον σχηματισμό του συμπλόκου, σε συνάρτηση με την ακινητοποιημένη GST-MYC, σε σχέση με την περίπτωση, όπου προστίθενται 2 pmol His-MAX και επιλέχθηκε για την συνέχιση των πειραμάτων. Παρόλα αυτά η αναλογικότητα δεν είναι ικανοποιητική.

Ακολουθώντας, διατηρώντας την ποσότητα των 20 pmol His-MAX, προσπαθήσαμε να μειώσουμε τον θόρυβο που εμφανιζόταν στο αρνητικό control (όπως φάνηκε στο προηγούμενο πείραμα, εικόνα 39). Έτσι, τροποποιήθηκε ο χρόνος επώασης της ακινητοποιημένης GST-MYC με την His-MAX, για τον σχηματισμό του συμπλόκου από 30 λεπτά που γινόταν μέχρι τότε σε 5 λεπτά. Για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε το πείραμα παράλληλα και με δείγματα στα οποία έγινε επώαση 30 λεπτών. Παράλληλα αυξήσαμε ακόμη περισσότερο την συγκέντρωση του Blocking buffer σε αλβουμίνη (BSA) από 14 mg/mL σε 20 mg/mL. Πιο



συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν δύο πειραματικές σειρές, όπου χρησιμοποιήθηκαν 4 δείγματα, στα οποία προστέθηκαν περίπου 0,6, 0,2, 0,06 και 0,02 pmol GST-MYC και ένα αρνητικό control, στο οποίο δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Μετά από πλύσεις, και στις 2 σειρές, προστέθηκαν 20 pmol His-MAX και, στη μία σειρά, έγινε 5 min επώαση με την His-MAX, ενώ, στην άλλη σειρά, έγινε 30 min επώαση. Μετά από επώσεις με τα αντισώματα και αντίδραση με OPD, μετρήθηκε το σήμα απορρόφησης κάθε δείγματος στα 492 nm. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στα διαγράμματα της εικόνας 40.

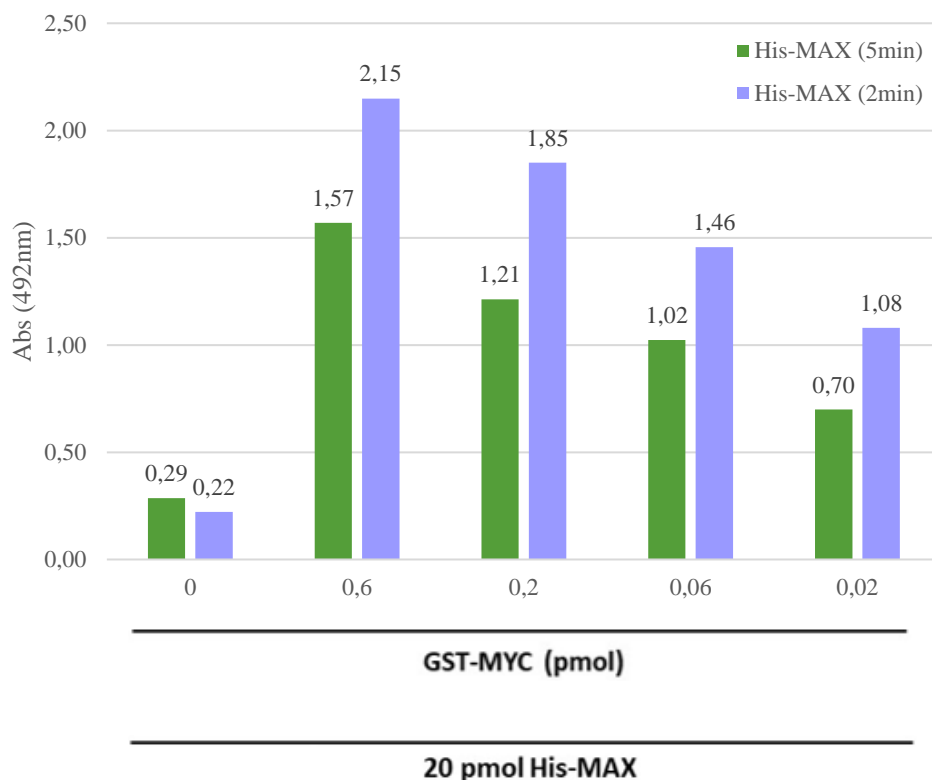


Εικόνα 40: Δοκιμασία σχηματισμού συμπλόκου MYC-MAC, με μειούμενες ποσότητες εκχυλίσματος GST-MYC. Για το σχηματισμό του συμπλόκου, προστέθηκαν σε πιάτα γλουταθειόνης περίπου 0,6 pmol, 0,2 pmol, 0,06 pmol και 0,02 pmol GST-MYC, αντίστοιχα, και ακινητοποιήθηκαν. Στη συνθήκη του αρνητικού control, δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Μετά από πλύσεις, προστέθηκαν σε όλα τα δείγματα 20 pmol His-MAX και έγινε επώαση, στη μία σειρά για 5 λεπτά (πράσινο) και στην άλλη σειρά για 30 λεπτά (πορτοκαλί) υπό ανάδευση. Μετά από πλύσεις, προστέθηκαν το πρώτο και το δεύτερο αντίσωμα, για την His-MAX πρωτεΐνη, και έγινε προσθήκη OPD, προς αντίδραση με το HRP του δεύτερου αντισώματος. Μετά το πέρας της αντίδρασης, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 492 nm, που παρουσιάζεται στο διάγραμμα της εικόνας. Παραλήφθηκε η απορρόφηση του τυφλού, που ήταν πάλι σχεδόν μηδενική.

Παρατηρήθηκε ότι η μείωση του χρόνου επώασης της His-MAX στα 5 λεπτά, μείωσε τον θόρυβο στο αρνητικό control αρκετά. Επίσης, παρατηρώντας το δείγμα, όπου προστέθηκαν 0,6 pmol GST-MYC, σχηματίστηκε περισσότερο σύμπλοκο στην περίπτωση, όπου έγινε επώαση της His-MAX για 5 λεπτά, αφού η απορρόφηση στα 492 nm είναι μεγαλύτερη. Επομένως, τόσο η τροποποίηση για επώαση 5 λεπτών,

όσο και η αύξηση της αλβουμίνης στο Blocking buffer, φάνηκε να λειτουργούν καλύτερα και καθιερώθηκαν στα επόμενα πειράματα. Ωστόσο, παρά τα θετικά αυτά αποτελέσματα, δεν παρουσιάστηκε, σε καμία από τις δύο περιπτώσεις, αναλογικότητα στο σχηματισμό του συμπλόκου. Στην περίπτωση της πεντάλεπτης επώασης με His-MAX, αυτό ίσως οφείλεται σε λάθος χειρισμό, καθώς, μάλλον, καθυστερήσαμε να τερματίσουμε την αντίδραση με OPD και λήφθηκε πολύ μεγάλο σήμα στα 492 nm, σε επίπεδα υψηλά για τα όρια ανίχνευσης πρωτεΐνης από το ELISA Reader.

Μετέπειτα, προέκυψε η σκέψη πως ο χρόνος επώασης με την His-MAX μπορεί να επηρεάζει τον σχηματισμό του συμπλόκου με τον εξής τρόπο: όσο μειώνεται ο χρόνος έκθεσης με την His-MAX, υποβοηθείται ο σχηματισμός του συμπλόκου με αναλογικότητα, καθώς, με το πέρασμα του χρόνου, γίνεται η αντίστροφη αντίδραση διάσπασης του συμπλόκου, λόγω της ισορροπίας της αντίδρασης. Επίσης, είναι πιθανό, η μείωση του χρόνου επώασης να μειώσει στο ελάχιστο τον θόρυβο. Έτσι για να εξασφαλίσουμε ότι η μερική επιτυχία του προηγούμενου πειράματος δεν ήταν τυχαία, αλλά και να ελέγξουμε την ορθότητα του παραπάνω συλλογισμού έγιναν άλλες δύο επαναλήψεις του πειράματος, με τις ίδιες ποσότητες πρωτεϊνών, αλλά, στην μία σειρά, έγινε 5 λεπτά επώαση με την His-MAX και, στην άλλη σειρά, έγινε 2 λεπτά επώαση με την His-MAX, υπό έντονη χειροκίνητη ανάδευση, για να διευκολυνθεί ο σχηματισμός του συμπλόκου, σε αυτό το μικρό χρονικό διάστημα. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στα διαγράμματα της εικόνας 41.



**Εικόνα 41:** Δοκιμασία σχηματισμού συμπλόκου MYC-MAC, με μειούμενες ποσότητες εκχυλίσματος GST-MYC με τη μέθοδο ELISA. Για το σχηματισμό του συμπλόκου, προστέθηκαν σε πιάτα γλουταθειόνης περίπου 0,6 pmol, 0,2 pmol, 0,06 pmol και 0,02 pmol GST-MYC, αντίστοιχα, και ακινητοποιήθηκαν. Στη συνθήκη του αρνητικού control, δεν προστέθηκε καθόλου GST-MYC. Μετά από πλύσεις, προστέθηκαν σε όλα τα δείγματα 20 pmol His-MAX και έγινε επώαση, στη μία σειρά για 5 λεπτά (πράσινο) και στην άλλη για 2 λεπτά (μωβ), υπό ανάδευση. Μετά από πλύσεις, προστέθηκαν το πρώτο και το δεύτερο αντίσωμα, για την His-MAX πρωτεΐνη, και έγινε προσθήκη OPD, προς αντίδραση με το HRP του δεύτερου αντισώματος. Μετά το πέρας της αντίδρασης, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 492 nm, που παρουσιάζεται στο διάγραμμα της εικόνας. Παραλήφθηκε η απορρόφηση του τυφλού, που ήταν πάλι σχεδόν μηδενική.

Παρατηρήθηκε ότι ο θόρυβος της δοκιμασίας είναι παρόμοιος και στους δύο χρόνους επώασης με His-MAX και αρκετά χαμηλός. Στην περίπτωση της πεντάλεπτης επώασης (πράσινο), παρουσιάζεται μία μείωση στο σήμα, μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων μειούμενων ποσοτήτων GST-MYC, σε αντίθεση με το πανομοιότυπο προηγούμενο πείραμα (Εικόνα 41), όπου, μάλλον όπως αναφέρθηκε, έγινε λάθος χειρισμός. Ωστόσο, τόσο με την πεντάλεπτη, όσο και με την δίλεπτη επώαση με His-MAX, δεν υπάρχει πλήρης αναλογικότητα στο σήμα, που λαμβάνεται, μεταξύ των δειγμάτων, και, κατά συνέπεια, στο σχηματισμό του συμπλόκου. Μία πιθανή εξήγηση για αυτό είναι πως ενδεχομένως να μην είναι οι μειούμενες ποσότητες βακτηριακού εκχυλίσματος που προστίθενται αναλογικά μειούμενες με αυτές που τελικά ακινητοποιούνται στα wells. Δηλαδή η προσθήκη μιας ποσότητας GST-MYC και μίας υποδεκαπλάσιας της σε δυο

wells, δεν συνεπάγεται την ακινητοποίηση κάποιας ποσότητας στο ένα well και την υποδεκαπλάσιάς της στο άλλο well, αντίστοιχα.

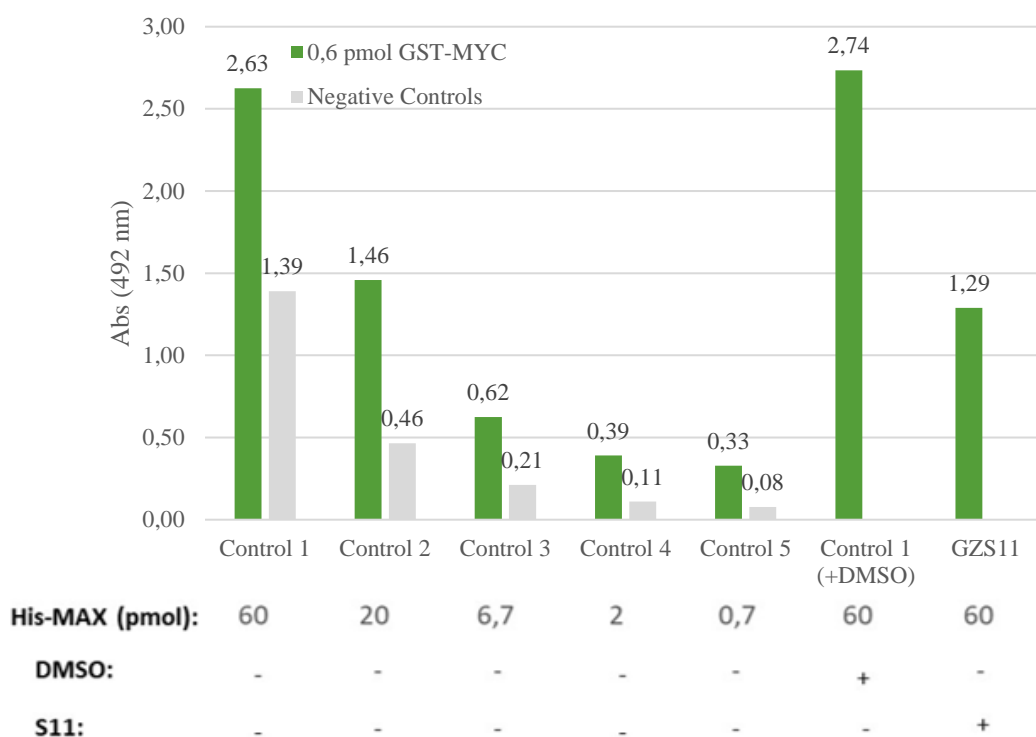
Επομένως, για τη συνέχιση της εγκαθίδρυσης μιας μεθόδου ELISA επιδιώξαμε την δοκιμασία σχηματισμού του συμπλόκου με σταθερή ποσότητα GST-MYC και μειούμενες ποσότητες His-MAX, ενώ, ταυτόχρονα, έγινε έλεγχος ενός γνωστού αναστολέα του συμπλόκου, προκειμένου να διαπιστωθεί αν, με τη συγκεκριμένη μέθοδο, μπορεί να εντοπιστεί η αναστολή και να προσδιοριστεί ακριβές ποσοστό αναστολής. Πλέον ως θετικά control ορίζονται τα δείγματα στα οποία προστέθηκαν μειούμενες ποσότητες His-MAX, ενώ ως αρνητικό control ξανά εκείνο στο οποίο απουσιάζει η GST-MYC.

Για το πρώτο πείραμα δοκιμάστηκαν 5 θετικά control, στα οποία προστέθηκαν 3  $\mu$ L εκχυλίσματος GST-MYC (περίπου 0,6 pmol GST-MYC), ώστε να ακινητοποιηθεί ίδια ποσότητα GST-MYC, σε όλα τα θετικά control. Για κάθε θετικό control, χρησιμοποιήθηκε και ένα αρνητικό, στο οποίο δεν προστέθηκε καθόλου εκχύλισμα GST-MYC. Ακόμη, δοκιμάστηκε ένα δείγμα για την αξιολόγηση της μεθόδου με τον ήδη δοκιμασμένο αναστολέα GZS11. Η χημική ένωση GZS11 ανήκει στη σειρά χημικών ενώσεων GZS, που σχεδιάστηκαν, με βάση την δομή του Myc19, ενός παραγώγου θειουρίας με ομοιότητα προς τον γνωστό αναστολέα 10058-F4, με διαφορετικούς υποκατάστατες στον θειο-βαρβιτουρικό ή βαρβιτουρικό δακτύλιο. Η συνθετική πορεία περιείχε την συμπύκνωση μεταξύ κατάλληλης αλδεϋδης και του θειοβαρβιτουρικού οξέος. Προηγούμενα πειράματα ανίχνευσης αναστολέων MYC, από μέλη του εργαστηρίου, έδειξαν ότι η χημική ένωση GZS11 προκαλεί σχεδόν ολική αναστολή σχηματισμού το συμπλόκου. Επειδή ο αναστολέας είναι διαλυμένος σε DMSO, προκειμένου να ελεγχθεί αν αυτό επηρεάζει το αποτέλεσμα του πειράματος, χρησιμοποιήθηκε ένα ακόμα θετικό control, το οποίο επώαστηκε με DMSO. Αυτό το θετικό control, αρχικά επώαστηκε, όπως όλα τα δείγματα, με 3  $\mu$ L εκχυλίσματος GST-MYC (περίπου 0,6 pmol GST-MYC). Μετά από πλύσεις, στο δείγμα δοκιμής του αναστολέα, προστέθηκε ποσότητα του αναστολέα GZS11 και, στο ένα θετικό control, αντίστοιχη ποσότητα DMSO. Ακολούθησαν πλύσεις και προστέθηκαν:

- 0,9  $\mu$ g His-MAX (60 pmol) στο πρώτο θετικό και αρνητικό control, στο θετικό control, που επώαστηκε με DMSO, και στο δείγμα δοκιμής του αναστολέα GZS11,

- 0,3 μg His-MAX (20 pmol) στο δεύτερο θετικό και αρνητικό control,
- 0,1 μg His-MAX (6,7 pmol) στο τρίτο θετικό και αρνητικό control,
- 0,03 μg His-MAX (2 pmol) στο τέταρτο θετικό και αρνητικό control, και
- 0,01 μg His-MAX (0,7 pmol) στο πέμπτο θετικό και αρνητικό control.

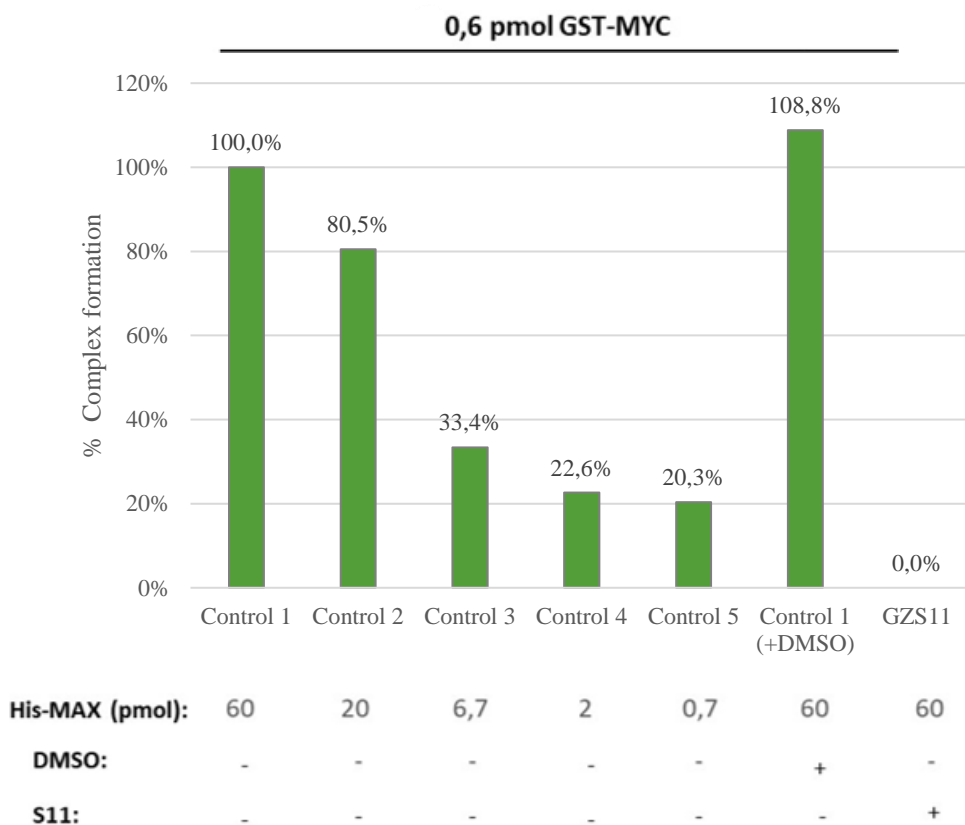
Τα αρνητικά control σε κάθε περίπτωση, δοκιμάζονται με τη λογική ότι σε κάθε control, η ποσότητα His-MAX, που προστίθεται, είναι διαφορετική, οπότε, θεωρητικά, θα είναι διαφορετικός και ο θόρυβος από την προστιθέμενη His-MAX σε κάθε περίπτωση. Επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αφαίρεση του κάθε θορύβου. Μετά από επώσεις με τα αντισώματα και αντίδραση με OPD, μετρήθηκε το σήμα απορρόφησης κάθε δείγματος στα 492 nm. Το ποσοστό αναστολής του GZS11 προσδιορίστηκε, μέσω της σύγκρισης της απορρόφησης του δείγματος, στο οποίο προστέθηκε, με καθένα από τα δύο θετικά control, στα οποία προστέθηκε η μέγιστη ποσότητα His-MAX (0,9 μg ή 60 pmol) και θεωρείται ότι σχηματίζεται το 100% του συμπλόκου. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στα διαγράμματα της εικόνας 42.



**Εικόνα 42: Δοκιμασία σχηματισμού του συμπλόκου MYC-MAX, με μειούμενες ποσότητες His-MAX, και ανίχνευσης της δράσης ενός γνωστού αναστολέα με τη μέθοδο ELISA.** Χρησιμοποιήθηκαν 6 θετικά control (πράσινο), όπου σε πιάτα γλουταθειόνης προστέθηκαν 3 μL εκχυλίσματος GST-MYC (περίπου 0,6 pmol GST-MYC). Στο δείγμα δοκιμής του αναστολέα SZS11 (πράσινο), προστέθηκαν, επίσης, 3 μL εκχυλίσματος GST-MYC. Για κάθε θετικό control, χρησιμοποιήθηκε ένα αρνητικό, στο οποίο δεν προστέθηκε εκχύλισμα (γκρι). Μετά από πλύσεις, στο δείγμα δοκιμής του GZS11, προστέθηκε ποσότητα του αναστολέα S11 και, στο ένα θετικό control, αντίστοιχη ποσότητα DMSO. Στη συνέχεια, έγιναν πλύσεις

και προστέθηκαν 0,9  $\mu\text{g}$  His-MAX (60 pmol) στο πρώτο θετικό και αρνητικό control, στο θετικό control, που επωάστηκε με DMSO, και στο δείγμα δοκιμής του αναστολέα S11, 0,3  $\mu\text{g}$  His-MAX (20 pmol) στο δεύτερο θετικό και αρνητικό control, 0,1  $\mu\text{g}$  His-MAX (6,7 pmol) στο τρίτο θετικό και αρνητικό control, 0,03  $\mu\text{g}$  His-MAX (2 pmol) στο τέταρτο θετικό και αρνητικό control και 0,01  $\mu\text{g}$  His-MAX (0,7 pmol) στο πέμπτο θετικό και αρνητικό control. Στη συνέχεια, προστέθηκαν το πρώτο και το δεύτερο αντίσωμα, για την His-MAX πρωτεΐνη, και έγινε προσθήκη OPD, προς αντίδραση με το HRP του δεύτερου αντισώματος. Μετά το πέρας της αντίδρασης, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 492 nm, που παρουσιάζεται στο διάγραμμα της εικόνας.

Παρατηρήθηκε ότι ο θόρυβος είναι πολύ μεγάλος στην περίπτωση του πρώτου αρνητικού control (γκρι), όπου προστέθηκαν 60 pmol His-MAX. Αυτό σημαίνει ότι αυτή η ποσότητα His-MAX δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μέθοδο, γιατί υπάρχει μεγάλη μη ειδική πρόσδεση της His-MAX στα τοιχώματα και μειώνεται πολύ το παράθυρο. Αντιθέτως στα υπόλοιπα αρνητικά control, ο θόρυβος είναι μικρός. Η ύπαρξη του DMSO ως διαλύτης του αναστολέα δεν επηρεάζει τις συνθήκες σχηματισμού του συμπλόκου, αφού το πρώτο θετικό control, στο οποίο προστέθηκε DMSO έχει παρόμοια απορρόφηση με το πρώτο θετικό control απουσία DMSO. Ακόμη, στο δείγμα, που έγινε επώαση με τον αναστολέα GZS11, φαίνεται μεγάλη μείωση της απορρόφησης, σε σχέση με τα πρώτα θετικά control. Ωστόσο, πρέπει να αφαιρεθεί ο θόρυβος των αρνητικών control από τα αντίστοιχα θετικά control και από το δείγμα, στο οποίο προστέθηκε ο GZS11, για να συγκριθεί το σχηματιζόμενο σύμπλοκο, σε κάθε περίπτωση. Έτσι, αφού αφαιρεθεί από την απορρόφηση του δείγματος με τον αναστολέα GZS11, η απορρόφηση του πρώτου αρνητικού control, όπου προστέθηκε ίδια ποσότητα His-MAX (60 pmol), και αφού αφαιρεθεί ο θόρυβος κάθε αρνητικού control από το αντίστοιχο θετικό, προκύπτει το διάγραμμα της παρακάτω εικόνας 43.



*Εικόνα 43: Δοκιμασία σχηματισμού του συμπλόκου MYC-MAX, με μειούμενες ποσότητες His-MAX, και ανίχνευσης της δράσης ενός γνωστού αναστολέα με τη μέθοδο ELISA. Παρουσιάζονται τα 6 θετικά control, όπου σε πιάτα γλυταθειόνης προστέθηκαν 3  $\mu$ L εκχυλίσματος (περίπου 0,6 pmol GST-MYC). Στο δείγμα δοκιμής του αναστολέα S11, επίσης, προστέθηκαν 3  $\mu$ L εκχυλίσματος (περίπου 0,6 pmol GST-MYC). Μετά από πλύσεις, στο δείγμα δοκιμής του S11, προστέθηκε ποσότητα του αναστολέα S11 και, στο ένα θετικό control, αντίστοιχη ποσότητα DMSO. Στη συνέχεια, έγιναν πλύσεις και προστέθηκαν 0,9  $\mu$ g His-MAX (60 pmol) στο πρώτο θετικό control, απουσία DMSO, στο πρώτο θετικό control, που επωάστηκε με DMSO, και στο δείγμα δοκιμής του αναστολέα S11, 0,3  $\mu$ g His-MAX (20 pmol) στο δεύτερο θετικό control, 0,1  $\mu$ g His-MAX (6,7 pmol) στο τρίτο θετικό control, 0,03  $\mu$ g His-MAX (2 pmol) στο τέταρτο θετικό control και 0,01  $\mu$ g His-MAX (0,7 pmol) στο πέμπτο θετικό control. Στη συνέχεια, προστέθηκαν το πρώτο και το δεύτερο αντίσωμα, για την His-MAX πρωτεΐνη, και έγινε προσθήκη OPD, προς αντίδραση με το HRP του δεύτερου αντισώματος. Μετά το πέρας της αντίδρασης, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 492 nm. Τα ποσοστά σχηματισμού του συμπλόκου MYC-MAX, που παρουσιάζονται στην εικόνα, προέκυψαν μετά από αφαίρεση του θορύβου των αρνητικών control, που χρησιμοποιήθηκαν, και σύγκριση των απορροφήσεων των δειγμάτων με το πρώτο θετικό control, όπου θεωρείται ότι σχηματίζεται το 100% του συμπλόκου.*

Παρατηρήθηκε ότι: μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου control, δεν υπάρχει αναλογική μείωση, καθώς θα περιμέναμε το ποσοστό σχηματισμού συμπλόκου στο δεύτερο control να είναι περίπου στο 33%, αλλά είναι 80,5%. Αυτό σημαίνει ότι, από 20 pmol His-MAX και πάνω επέρχεται κορεσμός στον σχηματισμό του συμπλόκου. Επομένως, το πρώτο control με τα 60 pmol His-MAX δεν είναι κατάλληλο, λόγω κορεσμού, αλλά και επειδή σε αυτήν την ποσότητα His-MAX υπάρχει πολύ μεγάλος θόρυβος στο αντίστοιχο αρνητικό control όπως φαίνεται στην εικόνα 42.

- Διαφορά όμως, σχεδόν αναλογική, παρουσιάζεται μεταξύ του δεύτερου και του τρίτου control. Θεωρητικά θα έπρεπε το ποσοστό σχηματισμού του συμπλόκου στο control με τα 6,7 pmol His-MAX (ποσότητα 1/3 της ποσότητας His-MAX του προηγούμενου control) να ισούται περίπου με  $80,5/3=26,8\%$ . Το πειραματικό ποσοστό σχηματισμού του συμπλόκου υπολογίστηκε 33,4%. Επομένως η απόκλιση είναι μικρή και η μείωση μεταξύ των δύο θεωρείται αναλογική.
- Η διαφορά μεταξύ του τρίτου και του τέταρτου control είναι επίσης σχετικά αναλογική. Θεωρητικά αναμέναμε το ποσοστό σχηματισμού συμπλόκου στο τέταρτο θετικό control να είναι περίπου  $33,4/3=11,1\%$  και το ποσοστό, που λήφθηκε, ήταν 22,6%.
- Μεταξύ τέταρτου και πέμπτου θετικού control, δεν υπάρχει μετρήσιμη διαφορά, μάλλον, λόγω της πολύ μικρής ποσότητας His-MAX σε αυτά τα δύο control και την μικρή διακριτική ικανότητα της μεθόδου στις ποσότητες αυτές.
- Όσον αφορά το δείγμα όπου δοκιμάστηκε ο αναστολέας GZS11, παρουσιάστηκε σχεδόν 100% αναστολή σχηματισμού του συμπλόκου.

Το συμπέρασμα από την διεξαγωγή αυτού του πειράματος είναι πως τα control με 20, 6,7 και 2 pmol His-MAX, αντίστοιχα, είναι ιδανικά για την εγκαθίδρυση αυτής της μεθόδου, καθώς, με αυτές τις μειούμενες ποσότητες His-MAX, παρουσιάζεται αναλογικότητα στον σχηματισμό του συμπλόκου και ελάχιστος θόρυβος και επιπλέον την αξιοπιστία της μεθόδου επιβεβαιώνει η δράση του αναστολέα GZS11.

Ανακεφαλαιώνοντας, από τις παραπάνω δοκιμασίες εξήχθει το συμπέρασμα ότι στη δοκιμασία ELISA, σε αντίθεση με το Pull down, η ποσότητα της GST-MYC που προστίθεται στα wells λειτουργεί καλύτερα όταν είναι ίδια και αυτή που αλλάζει είναι η His-MAX, προστιθέμενη σε μειούμενες ποσότητες, με σκοπό την προσομοίωση της αναστολής του σχηματισμού του συμπλόκου. Έτσι, προκύπτει ότι τα ιδανικά control της δοκιμασίας είναι αυτά, στα οποία προστίθενται 20 pmol, 6,7 pmol και 2 pmol His-MAX, αντίστοιχα, ύστερα από την ακινητοποίηση περίπου 0,6 pmol GST-MYC στα πηγαδάκια γλουταθειόνης. Με αυτές τις συνθήκες, η ιδανική αναλογία mol των πρωτεϊνών, σε αυτήν την μεθοδολογία, είναι:  $\frac{\text{GST-MYC}}{\text{His-MAX}} = \frac{3}{100}$ , με βάση τις ποσότητες που χρησιμοποιούνται στο πρώτο θετικό control. Με αυτήν την αναλογία ποσοτήτων των πρωτεϊνών, καθίσταται δυνατός ο εντοπισμός αναστολέων της MYC και η ποσοτικοποίηση της ανασταλτικής τους δράσης με μεγάλη ακρίβεια. Ωστόσο, χρειάζεται να πραγματοποιηθεί ξανά το τελευταίο πείραμα ώστε να διασφαλιστεί η επαναληψιμότητα και η εγκυρότητα της μεθόδου. Αυτή συνίσταται να επιβεβαιωθεί ακόμα και με άλλους γνωστούς αναστολείς της MYC, με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, για να επιβεβαιωθεί η λειτουργικότητα της μεθόδου στην ανίχνευση αναστολέων. Συνολικά, το πρωτόκολλο, στο οποίο καταλήξαμε, περιγράφεται αναλυτικά στην Ενότητα 2.7.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, προσπαθήσαμε να βελτιστοποιήσουμε την τεχνική χρωματογραφίας συγγένειας (Pull-Down), η οποία είχε εγκαθιδρυθεί από προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου, με σκοπό την ανίχνευση πιθανών αναστολέων του συμπλόκου MYC/MAX και παρουσιάζει πλεονεκτήματα καθώς είναι γρήγορη, οικονομική και αρκετά ευαίσθητη, ικανή να δώσει ποσοτικά αποτελέσματα. Η διαδικασία αυτή απαίτησε την παραγωγή των πρωτεϊνών MYC και MAX από



ανασυνδυασμένα πλασμίδια, με τις μοριακές ετικέτες GST και 6-His, αντίστοιχα. Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό των παραχθέντων πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκαν σε ένα πρωτόκολλο σχηματισμού του συμπλόκου MYC/MAX και ποσοτικοποίησής του, που παρουσιάζεται γραφικά στην εικόνα 16. Αρχικά, ακινητοποιείται η GST-MYC στα σφαιρίδια γλουταθειόνης. Στη συνέχεια, γίνονται πλύσεις και προστίθεται η καθαρή His-MAX, η οποία επωάζεται προς σχηματισμό συμπλόκου. Μετά από πλύσεις και απομάκρυνση της His-MAX που δεν σχημάτισε σύμπλοκο, γίνεται έκλυση του συμπλόκου και ηλεκτροφόρησή του σε αποδιατακτικές συνθήκες. Τέλος, γίνεται ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου εντοπίζεται η His-MAX και ποσοτικοποιείται. Ιδιαίτερη έμφαση δώσαμε στην αναζήτηση της ιδανικής αναλογίας mol των πρωτεϊνών GST-MYC και His-MAX που χρησιμοποιούνται στην συγκεκριμένη τεχνική, καθώς ο προσδιορισμός της μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη διεκπεραίωση των πειραμάτων, από επόμενους συναδέλφους που θα τα πραγματοποιήσουν. Έτσι λοιπόν αυτή βρέθηκε να είναι GST-MYC/His-MAX = 1/500 mol. Με αυτή την αναλογία πέραν του ότι εξασφαλίστηκε πως ο περιοριστικός παράγοντας είναι η GST-MYC, όπως και επιθυμούμε, επιτεύχθηκε υψηλή ακρίβεια της μεθόδου, καθώς τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα θετικά control, όπου προστίθενται μειούμενες ποσότητες GST-MYC στα σφαιρίδια, εντοπίζονται ανάλογα μειούμενες ποσότητες His-MAX, στο Western blot, με μία αναλογία κοντά στις θεωρητικά αναμενόμενες τιμές. Η ποσότητα της πρωτεΐνης GST-MYC θα πρέπει να είναι τουλάχιστον κορεσμένη σε His-MAX, όπως και γίνεται, ώστε να μην μένουν κενές θέσεις πρόσδεσης από ένα πιθανό αναστολέα, οι οποίες θα λειτουργούσαν αρνητικά, υποεκτιμώντας την ανασταλτική του δράση. Ακόμη, διαπιστώθηκε η ειδικότητα της μεθόδου, αφού ο θόρυβος στους αρνητικούς μάρτυρες ήταν σε όλες τις επαναλήψεις μηδενικός.

Διαθέτοντας πλέον μία βελτιστοποιημένη μέθοδο, δοκιμάσαμε αρχικά χημικές ενώσεις προερχόμενες από το πρόγραμμα AKMY. Από αυτές ιδιαίτερα υψηλή, σχεδόν καθολική δράση παρουσίασαν οι ενώσεις GZS11, Myci23s, Myci59 και Myci63, οι οποίες προέρχονται από την ένωση-οδηγό Myci19. Η Myci23s δοκιμάστηκε τόσο στην αρχή, όσο και στο τέλος της παραμονής μου στο εργαστήριο, με την πρώτη να εμφανίζει σχεδόν καθολική, ενώ τη δεύτερη μέτρια αναστολή, γεγονός που υποδεικνύει πως με την πάροδο του χρόνου χάνει τη λειτουργικότητά της, όσο βρίσκεται στη διαλυμένη της μορφή.

Έπειτα, έγινε δοκιμή ενώσεων που προήλθαν από το εργαστήριο της κ.Σαρλή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Παρόλου που ο αρχικός σχεδιασμός τους δεν είναι η στόχευση στην αναστολή σχηματισμού του συμπλόκου MYC/MAX, αλλά η αποικοδόμηση της MYC, με ουβικιτινυλίωση, τα αποτελέσματα από τη δική μας δοκιμασία τους παρείχαν πληροφορίες για το εάν οι ενώσεις αυτές επηρεάζουν την αλληλεπίδραση της MYC με την MAX, δηλαδή προσδένονται στο σημείο αλληλεπίδρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών. Από αυτές, οι CSI107 και CSI118, φάνηκε ότι προκαλούν αναστολή στον σχηματισμό του συμπλόκου σε ποσοστά 30% και 80%, αντίστοιχα. Επομένως φαίνεται πως προσδένονται στην περιοχή bHLHLZ της MYC, εμποδίζοντας σε μικρό βαθμό το σχηματισμό του συμπλόκου. Η δοκιμή των ενώσεων με τη χρήση της in vitro Pull-down δοκιμασίας φυσικά, δεν μπορεί να προκαλέσει αποικοδόμηση της MYC, καθώς δεν διατίθενται συστατικά ενός βιολογικού συστήματος όπως το πρωτεάσωμα που θα μπορούσε να επιστρατευθεί από τις ενώσεις και να επιτελέσει αυτή τη λειτουργία και άρα τα αποτελέσματα που εξήχθησαν είναι ασφαλή.

Τέλος, δοκιμάστηκαν ενώσεις από το εργαστήριο του κ. Τζάκου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Αρκετές ενώσεις παρουσίασαν ολική ή σχεδόν ολική αναστολή, ενώ αρκετές ήταν εκείνες που εμφάνισαν μέτρια αναστολή. Στην πρώτη περίπτωση εντοπίστηκαν οι ενώσεις N-303-4, Smyc-18, PA-04, C44, BS-45, AS-86, MM-5-1, PA-39, EMA-30, B-55, και N-191.

Η τεχνική που βελτιστοποιήσαμε παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα όπως αναφέραμε, καθώς απαιτεί φθηνό εργαστηριακό εξοπλισμό, απλά βιολογικά συστήματα, δεν απαιτεί εξεζητημένες πειραματικές δεξιότητες και είναι αρκετά ευαίσθητη. Ωστόσο στην πορεία των πειραμάτων διαπιστώθηκαν κάποιοι περιορισμοί, όπως ο μικρός αριθμός αναστολέων που μπορούν να δοκιμαστούν κάθε φορά (πέντε), λόγω των διαθέσιμων θέσεων στην πηκτή ακρυλαμίδιου, η σχετικά χρονοβόρα (σε σχέση με άλλες τεχνικές) πειραματική διαδικασία (διάρκεια 3 ημέρες/ πείραμα), καθώς και ο ημιποσοτικός χαρακτήρας της, ο οποίος οφείλεται στην προσεγγιστική εκτίμηση της έντασης των ζωνών της MAX μέσω του προγράμματος ImageJ.

Όλα τα παραπάνω μας οδήγησαν στην σκέψη εγκαθίδρυσης ενός νέου πρωτοκόλλου σχηματισμού του συμπλόκου MYC-MAX με τη τεχνική ELISA, η οποία επιτρέπει την πιο γρήγορη σάρωση (1 πείραμα/ ημέρα) πολύ μεγαλύτερου αριθμού πιθανών αναστολέων και τον προσδιορισμό της ανασταλτικής δράσης με ποσοτικό τρόπο. Για

το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν πιάτα 96-φρεατίων επικαλυμμένα με γλουταθειόνη, στα οποία μπορεί να ακινητοποιηθεί η GST-MYC και στη συνέχεια να προστεθεί η καθαρή His-MAX, προς σχηματισμό συμπλόκου. Μετά από δοκιμές με διάφορες αναλογίες ποσοτήτων πρωτεϊνών GST-MYC και His-MAX, καταλήξαμε πως η ιδανική αναλογία mol των πρωτεϊνών είναι GST-MYC/His-MAX = 3/100 με την His-MAX να βρίσκεται ξανά σε περίσσεια για τους λόγους που αναφέρθηκαν και στην τεχνική Pull-Down.

Ωστόσο, η περίσσεια His-MAX σε αυτή τη περίπτωση είναι μικρότερη, σε σχέση με την τεχνική Pull-Down, καθώς επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν, ως θετικά control της δοκιμασίας, δείγματα, στα οποία προστίθεται ίδια ποσότητα GST-MYC και μειούμενες ποσότητες His-MAX. Με άλλα λόγια, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν control, που προσομοιάζουν έμμεσα την αναστολή σχηματισμού του συμπλόκου, μέσω των μειούμενων ποσοτήτων His-MAX και την αναλογική μείωση του σχηματιζόμενου συμπλόκου. Με αυτόν τον τρόπο, επιτεύχθηκε αναλογικότητα στο σχηματισμό του συμπλόκου μεταξύ των θετικών control, και, μάλιστα, με πειραματικές τιμές πολύ κοντά στις θεωρητικά αναμενόμενες. Αυτό σημαίνει ότι, διαμορφώθηκε μία πολύ ευαίσθητη μέθοδος, που είναι κατάλληλη για τον εντοπισμό αναστολέων και την ποσοτικοποίηση της δράσης τους με μεγάλη ακρίβεια. Ταυτόχρονα, με αυτήν την αναλογία πρωτεϊνών επιτυγχάνεται σχεδόν μηδενικός θόρυβος και, επομένως, μεγάλη εξειδίκευση στη μέθοδο.

Για την πιστοποίηση της ορθότητας και της ακρίβειας στη μέθοδο ELISA που εγκαθιδρύσαμε, επιλέξαμε τη δοκιμή του γνωστού αναστολέα GZS11 από το πρόγραμμα AKMY, ο οποίος είχε καθολική ανασταλτική δράση, βασιζόμενη στην επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων από τη δοκιμή του με την τεχνική Pull-Down, καθώς και με άλλες τεχνικές των εργαστηρίων που συμμετέχουν στο πρόγραμμα. Μετά από έλεγχο του συγκεκριμένου μορίου με την μέθοδο ELISA, προέκυψε, πράγματι, πλήρης αναστολή του συμπλόκου και αποτέλεσε μάρτυρα στην αποτελεσματικότητα της δοκιμασίας, για τον εντοπισμό αναστολέων της MYC και τον προσδιορισμό της αναστολής αυτών, με μεγάλη ακρίβεια.

Ανακεφαλαιώνοντας, το ενδιαφέρον για την ύπαρξη *in vitro* βιοχημικής μεθόδου με σκοπό την εύκολη, γρήγορη και ακριβή σάρωση χημικών μορίων-πιθανών αναστολέων για τον σχηματισμό του συμπλόκου MYC/MAX οδήγησε όχι μόνο στην βελτιστοποίηση της ήδη εγκαθιδρυμένης μεθόδου Pull-Down, αλλά στην εγκαθίδρυση

μίας νέας δοκιμασίας υψηλής απόδοσης (high throughput) ELISA με πολύ αισιόδοξες προοπτικές. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί πως οι τεχνικές αυτές απευθύνονται σε χημικές ενώσεις που έχουν συντεθεί για την αναστολή σχηματισμού του συμπλόκου στο στάδιο σχηματισμού του συμπλόκου, δηλαδή σε επίπεδο πρωτεΐνης της MYC. Όπως έχει αναφερθεί αναλυτικά και στην Ενότητα 1.2.5, μικρά μόρια έχουν συντεθεί στοχεύοντας τη MYC από το γονίδιο, σε όλα τα στάδια έκφρασής του, μέχρι την πρόσδεσή της πρωτεΐνης πλέον, στο DNA. Τέλος, η μελλοντική διενέργεια πειραμάτων για την αναζήτηση του IC<sub>50</sub> στις ενώσεις που έχουν παρουσιάσει μεγάλη αναστολή, καθώς και πειράματα κυτταροτοξικότητας και ικανότητας των ενώσεων να εισέλθουν εντός των κυττάρων, θα μπορούσαν να μας παρέχουν πληροφορίες για τη βελτιστοποίησή τους και την σύνθεση νέων αναλόγων.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- [1] “Cancer/ General,” *Greek National Public Health Organization*, 2021. <https://eody.gov.gr/disease/karkinos/#general>.
- [2] S. I. Hajdu, M. Vadmal, and P. Tang, “A Note From History: Landmarks in History of Cancer, part 1,” *Cancer*, vol. 121, no. 15. pp. 2480–2513, 2015, doi: 10.1002/cncr.29365.
- [3] M. Steven I. Hajdu, “A note from history: Landmarks in history of cancer, part 2,” *Cancer*, vol. 117, no. 12, pp. 2811–2820, 2010, doi: 10.1002/cncr.25825.
- [4] M. Steven I. Hajdu, “A note from history: Landmarks in history of cancer, part 3,” *Cancer*, vol. 118, no. 4, pp. 1155–1168, 2011, doi: 10.1002/cncr.26320.
- [5] J. Ferlay *et al.*, “Cancer statistics for the year 2020: An overview,” *International Journal of Cancer*, vol. 149, no. 4. pp. 778–789, 2021, doi: 10.1002/ijc.33588.
- [6] “Cancer,” *World Health Organization*, 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- [7] “Cancer Basics,” *American Cancer Society*, 2022. <https://www.cancer.org/cancer/understanding-cancer/what-is-cancer.html>.
- [8] D. M. P. PhD, C. de Martel MD, J. V. MSc, J. F. ME, F. B. PhD, and S. F. MD, “Articles Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis,” *The Lancet Global Health*, vol. 4, no. 9. pp. e609–e616, 2016, [Online]. Available: [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7).
- [9] “What Is Cancer?,” - *National Cancer Institute*, 2021. <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>.
- [10] B. A. J. Ponder, “Cancer genetics,” *Nature*, vol. 411, pp. 336–341, 2001.
- [11] Richard Sever1 and Joan S. Brugge, “Signal Transduction in Cancer Richard.” Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press Signal, 2015.
- [12] K. W. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, “Cancer Genome Landscapes,” *Science (80-. )*, vol. 339, no. 6127, pp. 1546–1558, 2013, doi: 10.1126/science.1235122. Cancer.
- [13] Webster K. Cavenee and Raymond L. White, “The Genetic Basis of Cancer,”

- Sci. Am.*, vol. 272, no. 3, pp. 72–79, 1995.
- [14] R. A. Weinberg, *How Cancer Arises*. Scientific American, 1996.
- [15] G. M. Cooper, “Tumor Suppressor Genes - The Cell - NCBI Bookshelf.” 2000, [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/>.
- [16] P Nenclares KJ Harrington, “The biology of cancer.” Elsevier Ltd, 2019.
- [17] Marco A. Pierotti, Gabriella Sozzi, and Carclo M. Croce, “Mechanisms of oncogene activation - Holland-Frei Cancer Medicine - NCBI Bookshelf.” 2003, [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12538/>.
- [18] Michor F, Iwasa Y, and Nowak M. A, “Dynamics of Cancer Progression,” *Nature reviews cancer*, vol. 4, no. 3. pp. 197–205, 2004.
- [19] K. Macleod, “Tumor suppressor genes,” *Current Opinion in Genetics and Development*, vol. 10, no. 1. pp. 81–93, 2000, doi: 10.1016/S0959-437X(99)00041-6.
- [20] Geoffrey M Cooper., *The Cell, 2nd edition*. 2000.
- [21] Amanda R. Wasylshen and Linda Z. Penn, “Myc, The Beauty and the Beast.pdf.” Monographs.
- [22] B. G. Neel, W. S. Hayward, H. L. Robinson, J. Fang, and S. M. Astrin, “Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: oncogenesis by promoter insertion,” *Cell*, vol. 23, no. 2. pp. 323–334, 1981, doi: 10.1016/0092-8674(81)90128-8.
- [23] G. S. Payne, S. A. Courtneidge, L. B. Crittenden, A. M. Fadly, J. M. Bishop, and H. E. Varmus, “Analysis of avian leukosis virus DNA and RNA in bursal tumors: Viral gene expression is not required for maintenance of the tumor state,” *Cell*, vol. 23, no. 2. pp. 311–322, 1981, doi: 10.1016/0092-8674(81)90127-6.
- [24] G. S. Payne, J. M. Bishop, and H. E. Varmus, “Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas,” *Nature*, vol. 295, no. 5846. pp. 209–214, 1982, doi: 10.1038/295209a0.
- [25] L. A. Jung *et al.*, “OmoMYC blunts promoter invasion by oncogenic MYC to inhibit gene expression characteristic of MYC-dependent tumors,” *Oncogene*,

- vol. 36, no. 14. pp. 1911–1924, 2017, doi: 10.1038/onc.2016.354.
- [26] T. Koana and T. Miyake, “A histochemical method to identify the genotype of single embryo cultures of *Drosophila melanogaster*,” *The Japanese Journal of Genetics*, vol. 57, no. 1. pp. 79–87, 1982, doi: 10.1266/jjg.57.79.
- [27] W. S. Neel, B. G., Jhanwar, S. C., Chaganti, R. S., & Hayward, “Two human c-one genes are located on the long arm of chromosome 8,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 79, no. 24, pp. 7842–7846, 1982, doi: 10.1073/pnas.79.24.7842.
- [28] R. Taub *et al.*, “Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 79, no. 24 I. pp. 7837–7841, 1982, doi: 10.1073/pnas.79.24.7837.
- [29] D. L. Vaux, S. Cory, and J. M. Adams, “Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells,” *Nature*, vol. 335, no. 6189. pp. 440–442, 1988, doi: 10.1038/335440a0.
- [30] A. Strasser, A. W. Harris, M. L. Bath, and S. Cory, “Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2,” *Nature*, vol. 348, no. 6299. pp. 331–333, 1990, doi: 10.1038/348331a0.
- [31] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “The hallmarks of cancer,” *Cell*, vol. 100, no. 1. pp. 57–70, 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [32] J. K. E V Prochownik, “Deregulated expression of c-myc by murine erythroleukaemia cells prevents differentiation..pdf,” *Nature*, vol. 322, no. 6082, pp. 848–850, 1986, doi: 10.1038/322848a0.
- [33] D. C. Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., ... Hancock, “Induction of Apoptosis in Fibroblasts by c-myc Protein,” *Cell*, vol. 69, no. 1, pp. 119–128, 1992, doi: 10.1016/0092-8674(92)90123-t.
- [34] G. I. Fanidi, A., Harrington, E. A., & Evan, “Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes,” *Nature*, vol. 359, no. 6395, pp. 554–556, 1992, doi: DOI: 10.1038/359554a0.
- [35] R. N. Hann, S. R., Abrams, H. D., Rohrschneider, L. R., & Eisenman, “Proteins Encoded by v-myc and c-myc Oncogenes: Identification and Localization in

- Acute Leukemia Virus Transformants and Bursal Lymphoma Cell Lines,” *Cell*, vol. 34, no. 3, pp. 789–798, 1983, doi: 10.1016/0092-8674(83)90535-4.
- [36] S. Landschulz, W., Johnson, P., & McKnight, “The Leucine Zipper: A Hypothetical Structure Common to a New Class of DNA Binding Proteins,” *Science (80-. )*, vol. 240, no. 4860, pp. 1759–1764, 1988, doi: 10.1126/science.3289117.
- [37] E. Prendergast, G., & Ziff, “Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region,” *Science (80-. )*, vol. 251, no. 4990, pp. 186–189, 1991, doi: 10.1126/science.1987636.
- [38] Elizabeth M. Blackwood and Robert N. Eisenman, “Max: A Helix-Loop-Helix Zipper Protein That Forms a Sequence-Specific DNA-Binding Complex with Myc,” *Sci. New Ser.*, pp. 1211–1217, 1991.
- [39] R. Blackwood, E., & Eisenman, “Max: A Helix-Loop-Helix Zipper Protein That Forms a Sequence-Specific DNA-Binding Complex with Myc,” *Science (80-. )*, vol. 251, no. 4998, pp. 1211–1217, 1991, doi: 10.1126/science.2006410.
- [40] S. B. McMahon, H. A. Van Buskirk, K. A. Dugan, T. D. Copeland, and M. D. Cole, “The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins,” *Cell*, vol. 94, no. 3, pp. 363–374, 1998, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81479-8.
- [41] D. Kleine-Kohlbrecher, S. Adhikary, and M. Eilers, “Mechanisms of transcriptional repression by Myc,” *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 302, pp. 51–62, 2006, doi: 10.1007/3-540-32952-8\_3.
- [42] C. V. Dang, “Rethinking the warburg effect with Myc micromanaging glutamine metabolism,” *Cancer Research*, vol. 70, no. 3, pp. 859–862, 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3556.
- [43] K. Okita, T. Ichisaka, and S. Yamanaka, “Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells,” *Nature*, vol. 448, no. 7151, pp. 313–317, 2007, doi: 10.1038/nature05934.
- [44] and S. J. M. Dalia I. Hammoudeh, Arielle Viacava Follis, Edward V. Prochownik, “Multiple Independent Binding Sites for Small-Molecule



- Inhibitors on the Oncoprotein c-Myc Dalia.” 2009, doi: 10.1021/ja900616b.
- [45] L. M. Iakoucheva, C. J. Brown, J. D. Lawson, Z. Obradović, and A. K. Dunker, “Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 323, no. 3. pp. 573–584, 2002, doi: 10.1016/S0022-2836(02)00969-5.
- [46] P. Romero, Z. Obradovic, X. Li, E. C. Garner, C. J. Brown, and A. K. Dunker, “Sequence complexity of disordered protein - Romero - 2000 - Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics,” *Wiley Online Library*, vol. 48, no. December 1999. pp. 38–48, 2001.
- [47] A. K. Dunker, C. J. Brown, and Z. Obradovic, “Identification and functions of usefully disordered proteins,” *Advances in Protein Chemistry*, vol. 62. pp. 25–49, 2002, doi: 10.1016/S0065-3233(02)62004-2.
- [48] P. Tompa, “Intrinsically unstructured proteins evolve by repeat expansion,” *BioEssays*, vol. 25, no. 9. pp. 847–855, 2003, doi: 10.1002/bies.10324.
- [49] H. J. Dyson and P. E. Wright, “Coupling of folding and binding for unstructured proteins,” *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 12, no. 1. pp. 54–60, 2002, doi: 10.1016/S0959-440X(02)00289-0.
- [50] A. K. Dunker *et al.*, “Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations.,” *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing*. pp. 473–484, 1998.
- [51] P. Marasco, D., & Scognamiglio, “Identification of Inhibitors of Biological Interactions Involving Intrinsically Disordered Proteins,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 12, pp. 7394–7412, 2015, doi: 10.3390/ijms16047394.
- [52] A. Kiessling, B. Sperl, A. Hollis, D. Eick, and T. Berg, “Selective Inhibition of c-Myc/Max Dimerization and DNA Binding by Small Molecules,” *Chemistry and Biology*, vol. 13, no. 7. pp. 745–751, 2006, doi: 10.1016/j.chembiol.2006.05.011.
- [53] I. Mustata, G., Follis, A. V., Hammoudeh, D. I., Metallo, S. J., Wang, H., Prochownik, E. V., ... Bahar, “Discovery of Novel Myc-Max Heterodimer.pdf,” *J. Med. Chem.*, vol. 52, no. 5, pp. 1247–1250, 2009, doi: 10.1021/jm801278g.

- [54] S. J. Metallo, “Intrinsically disordered proteins are potential drug targets,” *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 14, no. 4. pp. 481–488, 2010, doi: 10.1016/j.cbpa.2010.06.169.
- [55] S. K. Nair, S. K., & Burley, “X-Ray Structures of Myc-Max and Mad-Max Recognizing DNA: Molecular Bases of Regulation by Proto-Oncogenic Transcription Factors,” *Cell*, vol. 112, no. 2, pp. 193–205, 2003, doi: 10.1016/s0092-8674(02)01284-9.
- [56] J. M. Madden, S. K., de Araujo, A. D., Gerhardt, M., Fairlie, D. P., & Mason, “Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 20, no. 3, 2021, doi: 10.1186/s12943-020-01291-6.
- [57] G. Watt, R., Nishikura, K., Sorrentino, J., ar-Rushdi, A., Croce, C. M., & Rovera, “The structure and nucleotide sequence of the 5’ end of the human c-myc oncogene,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 80, no. 20 I. pp. 6307–6311, 1983, doi: 10.1073/pnas.80.20.6307.
- [58] Mark A. Gregory and Stephen R Hann, “c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt’s lymphoma cells,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no. 7. pp. 2423–2435, 2000.
- [59] A. Scafuro, M., Capasso, L., Carafa, V., Altucci, L., & Nebbioso, “Gene Transactivation and Transrepression in MYC-Driven Cancers,” *J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 7, 2021, doi: 10.3390/ijms22073458.
- [60] G. Sauter *et al.*, “c-myc Copy number gains in bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization,” *American Journal of Pathology*, vol. 146, no. 5. pp. 1131–1139, 1995.
- [61] G. Klein, “Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men,” *Cell*, vol. 32, no. 2. pp. 311–315, 1983, doi: 10.1016/0092-8674(83)90449-x.
- [62] 2 Harald Herrmann,1 Katharina Blatt,2 Junwei Shi,3 Karoline V. Gleixner,2 Sabine Cerny-Reiterer,1 Leonhard Müllauer,4 Christopher R. Vakoc,3 Wolfgang R. Sperr,1,2 Hans-Peter Horny,6 James E. Bradner,5 Johannes

- Zuber,<sup>3,7</sup> and Peter Valent<sup>1</sup>, “Small-molecule inhibition of BRD4 as a new potent approach to eliminate leukemic stem- and progenitor cells in acute myeloid leukemia (AML),” *Oncotarget*, vol. 3, no. 12, pp. 1588–1599, 2012, doi: 10.18632/oncotarget.733.
- [63] and B. A. J. P. Douglas F. Easton<sup>1</sup>, Karen A. Pooley<sup>2</sup>, Alison M. Dunning<sup>2</sup>, Paul D. P. Pharoah<sup>2</sup>, Deborah Thompson<sup>1</sup>, Dennis G. Ballinger<sup>3</sup>, Jeffery P. Struewing<sup>4</sup>, Jonathan Morrison<sup>2</sup>, Helen Field<sup>2</sup>, Robert Luben<sup>5</sup>, Nicholas Wareham<sup>5</sup>, Shahana Ahmed<sup>2</sup>, Catherine S. Healey<sup>2</sup>, Richar, “Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci,” *Nature*, vol. 447, no. 7148, pp. 1087–1093, 2007.
- [64] M. L. Pomerantz, M. M., Ahmadiyah, N., Jia, L., Herman, P., Verzi, M. P., Doddapaneni, H., ... Freedman, “The 8q24 cancer risk variant rs6983267 shows long-range interaction with MYC in colorectal cancer,” *Nat. Genet.*, vol. 41, no. 8, pp. 882–884, 2009, doi: 10.1038/ng.403.
- [65] N. Meyer and L. Z. Penn, “Reflecting on 25 years with MYC,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, no. 12, pp. 976–990, 2008, doi: 10.1038/nrc2231.
- [66] T. Simonsson, P. Pecinka, and M. Kubista, “DNA tetraplex formation in the control region of c-myc,” *Doktorsavhandlingar vid Chalmers Tekniska Hogskola*, no. 1436. 1998.
- [67] T. M. Ou *et al.*, “Stabilization of G-quadruplex DNA and down-regulation of oncogene c-myc by quindoline derivatives,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 50, no. 7, pp. 1465–1474, 2007, doi: 10.1021/jm0610088.
- [68] C. Pivetta, L. Lucatello, A. Paul Krapcho, B. Gatto, M. Palumbo, and C. Sissi, “Perylene side chains modulate G-quadruplex conformation in biologically relevant DNA sequences,” *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 16, no. 20, pp. 9331–9339, 2008, doi: 10.1016/j.bmc.2008.08.068.
- [69] P. Wu *et al.*, “Stabilization of G-quadruplex DNA with platinum(II) Schiff base complexes: Luminescent probe and down-regulation of c-myc oncogene expression,” *Chemistry - A European Journal*, vol. 15, no. 47, pp. 13008–13021, 2009, doi: 10.1002/chem.200901943.
- [70] T. A. Brown, R. V., Danford, F. L., Gokhale, V., Hurley, L. H., & Brooks,

- “Demonstration that Drug-targeted Down-regulation of MYC.pdf,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 47, pp. 41018–41027, 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.274720.
- [71] B. J. Chen, Y. L. Wu, Y. Tanaka, and W. Zhang, “Small molecules targeting c-Myc oncogene: Promising anti-cancer therapeutics,” *International Journal of Biological Sciences*, vol. 10, no. 10, pp. 1084–1096, 2014, doi: 10.7150/ijbs.10190.
- [72] J. S. Saunders, L. B., Simmons, J. K., Leon, E., Calabrese, D. R., Zhang, S., ... Schneekloth, “Small Molecule Microarrays Enable the Identification of a Selective, Quadruplex-Binding Inhibitor of MYC Expression,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 11, no. 1, pp. 139–148, 2015, doi: 10.1021/acscchembio.5b00577.
- [73] J. R. Whitfield, M. E. Beaulieu, and L. Soucek, “Strategies to inhibit Myc and their clinical applicability,” *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 5, no. FEB. 2017, doi: 10.3389/fcell.2017.00010.
- [74] E. V Prochownik, J. Kukowska, and C. Rodgers, “c-myc antisense transcripts accelerate differentiation and inhibit G1 progression in murine erythroleukemia cells,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 8, no. 9, pp. 3683–3695, 1988, doi: 10.1128/mcb.8.9.3683.
- [75] G. R. Devi, “In vivo Bioavailability and Pharmacokinetics of a c-MYC Antisense PhosphorodiamidateMorpholino Oligomer, AVI-4126, in Solid Tumors,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 10, pp. 3930–3938, 2005, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2091.
- [76] P. M. D. Moreno and A. P. Pêgo, “Therapeutic antisense oligonucleotides against cancer: Hurdling to the clinic,” *Frontiers in Chemistry*, vol. 2, no. OCT. 2014, doi: 10.3389/fchem.2014.00087.
- [77] J. E. Delmore *et al.*, “BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc,” *Cell*, vol. 146, no. 6, pp. 904–917, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.08.017.
- [78] P. Hydbring *et al.*, “Phosphorylation by Cdk2 is required for Myc to repress Ras-induced senescence in cotransformation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 1, pp. 58–

- 63, 2010, doi: 10.1073/pnas.0900121106.
- [79] X. X. Sun, R. C. Sears, and M. S. Dai, “Deubiquitinating c-Myc: USP36 steps up in the nucleolus,” *Cell Cycle*, vol. 14, no. 24. pp. 3786–3793, 2015, doi: 10.1080/15384101.2015.1093713.
- [80] E. V. Prochownik and P. K. Vogt, “Therapeutic Targeting of Myc,” *Genes & Cancer*, vol. 1, no. 6. pp. 650–659, 2010, doi: 10.1177/1947601910377494.
- [81] X. Yin, C. Giap, J. S. Lazo, and E. V. Prochownik, “Low molecular weight inhibitors of Myc-Max interaction and function,” *Oncogene*, vol. 22, no. 40. pp. 6151–6159, 2003, doi: 10.1038/sj.onc.1206641.
- [82] S. J. Follis, A. V., Hammoudeh, D. I., Wang, H., Prochownik, E. V., & Metallo, “Structural Rationale for the Coupled Binding and Unfolding of the c-Myc Oncoprotein by Small Molecules,” *Chem. Biol.*, vol. 15, no. 11, pp. 1149–1155, 2008, doi: 10.1016/j.chembiol.2008.09.011.
- [83] J. Guo *et al.*, “Efficacy, pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of the Myc-Max disruptor, 10058-F4 [Z,E]-5-[4-ethylbenzylidene]-2-thioxothiazolidin-4-one, in mice,” *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 63, no. 4. pp. 615–625, 2009, doi: 10.1007/s00280-008-0774-y.
- [84] M. Dimerization *et al.*, “In Vitro Cytotoxicity and In Vivo Efficacy , Pharmacokinetics , and Metabolism of 10074-G5 , a Novel Small-Molecule Inhibitor,” *Pharmacology*, vol. 335, no. 3. pp. 715–727, 2010.
- [85] S. Fletcher and E. V. Prochownik, “Small-molecule inhibitors of the Myc oncoprotein,” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1849, no. 5. pp. 525–543, 2015, doi: 10.1016/j.bbagr.2014.03.005.
- [86] L. Soucek, M. Helmer-Citterich, A. Sacco, R. Jucker, G. Cesareni, and S. Nasi, “Design and properties of a Myc derivative that efficiently homodimerizes,” *Oncogene*, vol. 17, no. 19. pp. 2463–2472, 1998, doi: 10.1038/sj.onc.1202199.