



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Εγκαθίδρυση in vitro δοκιμασίας σχηματισμού του συμπλόκου
MYC-MAX για την ταυτοποίηση νέων αναστολέων της ογκοπρωτεΐνης
MYC»

Φοιτήτρια: Ερβελίνα Νταλάνι (ΑΕΜ 188)

Πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών: Βασικών Βιοϊατρικών Επιστημών

Επιβέπων Καθηγητής: Σάββας Χριστοφορίδης
Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ιωάννινα, Ιούνιος 2024

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών και συγκεκριμένα στο εργαστήριο Βιοχημείας, κατά το έτος 2023-2024.

Η ολοκλήρωση της διπλωματικής αυτής εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την πολύτιμη βοήθεια του επιβλέπον καθηγητή μου, κ. Σάββας Χριστοφορίδης. Του εκφράζω βαθύ ευχαριστώ για την καθοδήγηση, την βοήθεια και όλες τις ευκαιρίες που μου πρόσφερε. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα, η οποία πάντα και με πολλή υπομονή, ήταν διαθέσιμη σε ό,τι και αν χρειαζόμουν, αλλά και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου που πάντα με βοηθούσαν με κάθε απορία και πάντα δημιουργούσαν πολύ το ευχάριστο κλίμα εργασίας στο εργαστήριο.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Βασικών Βιοϊατρικών Επιστημών» για όλες τις γνώσεις που μου έχουν προσφέρει και ιδιαίτερα την καθηγήτρια Πάτρα Βεζυράκη, διευθύντρια του μεταπτυχιακού προγράμματος, για όλη την βοήθεια και τους καθηγητές Παναγιώτη Κούκλη και Μαρίκα Σύρρου, που συμμετέχουν στην αξιολόγηση της εργασίας, αποτελώντας μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που υπήρξε πάντα μεγάλο στήριγμα για μένα και στους οποίους οφείλω όλη την διαδρομή των σπουδών μου μέχρι τώρα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ πάει σε όλους τους φίλους μου για την αμέτρητη συμπαράσταση και βοήθεια σε αυτό το ταξίδι.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	2
Περιεχόμενα	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
SUMMARY.....	7
1. Εισαγωγή.....	9
1. Καρκίνος	9
1.1 Ανάπτυξη του καρκίνου	9
1.2 Αιτιολογία του καρκίνου.....	12
1.3 Ογκογονίδια	12
1.4 Ογκοκατασταλτικά γονίδια.....	13
1.5 Οικογένεια πρωτεϊνών MYC	15
1.5.1 Το πρωτο-ογκογονίδιο c-MYC.....	16
1.5.2 c-MYC: σηματοδοτικό μονοπάτι.....	18
1.5.3 Η πρωτεΐνη c-Myc ως θεραπευτικός στόχος.....	21
1.5.4 Στόχευση της αλληλεπίδρασης της MYC με την MAX.....	22
2. Σκοπός	24
3. Υλικά και μέθοδοι	25
3.1 Παραγωγή και απομόνωση πρωτεϊνών από βακτηριακή καλλιέργεια	25
3.1.1 Μετασχηματισμός βακτηρίων	26
3.1.2 Τρυβλία επίστρωσης μετασχηματισμένων βακτηρίων.....	26
3.1.3 Η παραγωγή των πρωτεϊνών σε μεγάλη συγκέντρωση γίνεται σε υγρή καλλιέργεια	27
3.1.4 Απομόνωση των βακτηρίων από την υγρή καλλιέργεια, επαναδιάλυση αυτών (με Lysis Buffer) και αποθήκευση στους -20°C	27
3.1.4 Έλεγχος επαγωγής της επιθυμητής πρωτεΐνης	28
3.1.5 Λύση των βακτηρίων και απομόνωση της His-MAX πρωτεΐνης	28
3.1.6 Λύση των βακτηρίων της πρωτεΐνης MYC.....	30
3.1.7 Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης- Μέθοδος Bradford	30

3.1.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	31
3.1.9 Ποσοτικοποίηση των ζωνών της μεμβράνης και δημιουργία γραφήματος	32
3.2 Εγκαθίδρυση δοκιμασίας σχηματισμού και μελέτης της αναστολής του συμπλόκου MYC/MAX μέσω της τεχνικής PullDown	32
3.3 Εγκαθίδρυση δοκιμασίας σχηματισμού και μελέτης της αναστολής του συμπλόκου MYC/MAX μέσω της τεχνικής ELISA	35
4. Αποτελέσματα	38
4.1 Μέθοδος βασισμένη στην αρχή PullDown	38
4.2 Μέθοδος βασισμένη στην αρχή ELISA	39
4.2.1 Έλεγχος του σχηματισμού του συμπλόκου	39
4.2.2 Χρόνος επώασης	40
4.2.3 Προσαρμογή των συγκεντρώσεων MYC/MAX που χρησιμοποιήθηκαν	42
4.2.4 Δοσοεξαρτώμενη δημιουργία του συμπλόκου	43
4.2.5 Επώαση με τους πιθανούς αναστολείς	45
4.2.6 Δοκιμασία γνωστών αναστολέων του συμπλόκου GST-MYC/MAX	47
4.2.7 Δοκιμασία καινούργιων πιθανών αναστολέων για το σύμπλοκο GST-MYC/MAX	47
5. Συζήτηση	49
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Για την ομαλή λειτουργία του οργανισμού μας, κάθε στιγμή, δρουν με συντονισμένο τρόπο σύνθετα δίκτυα πρωτεϊνών που εξασφαλίζουν την σωστή λειτουργία του κυττάρου και κατ' επέκταση ολόκληρου του οργανισμού. Πολλές φορές λόγω γενετικών αλλαγών η έκφραση αυτών των πρωτεϊνών διαταράσσεται με αποτέλεσμα το κύτταρο να οδηγείται σε μια σειρά γεγονότων που καταλήγει σε δημιουργία κακοηθειών.

Δύο μεγάλες ομάδες γονιδίων που παίζουν κρίσιμο ρόλο στην δημιουργία όγκων είναι η οικογένεια των πρώτο-ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα μέλη της πρώτης οικογένειας κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε πολύ σημαντικές διαδικασίες για το κύτταρο, όπως για παράδειγμα ο κυτταρικός κύκλος, ο μεταβολισμός, η απόπτωση, η πρωτεϊνοσύνθεση, κ.α. Όταν τα πρώτο-ογκογονίδια υποστούν μια γενετική αλλαγή μετατρέπονται σε ογκογονίδια τα οποία πλέον κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην δημιουργία του καρκίνου.

Η δεύτερη οικογένεια γονιδίων, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, επιτελούν αντίθετο ρόλο από τα ογκογονίδια, συνεισφέροντας στην καταστολή όγκων. Στις περιπτώσεις που και τα δύο αλληλόμορφα ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου υποστούν μεταλλαγή, τότε το κύτταρο οδηγείται στην δημιουργία του καρκίνου.

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η ογκοπρωτεΐνη MYC, η έκφραση της οποίας ελέγχεται αυστηρά στα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά υπερεκφράζεται στους περισσότερους ανθρώπινους καρκίνους, καθιστώντας την ένα από τα πιο σημαντικά ανθρώπινα ογκογονίδια. Έτσι, με την πάροδο των ετών, η αναστολή της οικογένειας γονιδίων MYC ήταν ο στόχος εντατικής έρευνας. Η πρωτεΐνη MYC ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων σχηματίζοντας ένα λειτουργικό σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη MAX.

Η περιοχή του MYC που είναι υπεύθυνη για αυτή την αλληλεπίδραση είναι μια δομή έλικα-στροφή-έλικα (bHLHLZ), καθιστώντας αυτήν την περιοχή του MYC ιδανικό στόχο για την ανάπτυξη νέων αναστολέων του συμπλόκου MYC-MAX.

Στη παρούσα μελέτη στόχος μας ήταν να καθιερώσουμε μια *in vitro*, χωρίς κύτταρα ανάλυση βασισμένη στην αρχή ELISA, χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες

GST-MYC και His-MAX. Η ετικέτα (tag), GST, καθιστά δυνατή την πρόσδεση της MYC στα πιάτα καλυμμένα με γλουταθειόνη (glutathione coated plates). Ύστερα από την ακινητοποίηση της, ακολουθεί επώαση με την MAX. Το σύμπλοκο που σχηματίζεται είναι δυνατόν να ανιχνευτεί και να ποσοτικοποιηθεί μετά την προσθήκη αντισωμάτων που αναγνωρίζουν την MAX και την αντίδραση του OPD με το HRP-συνδεδεμένο δεύτερο αντίσωμα. Η ένταση της απορρόφησης στα 492 nm είναι ενδεικτική της ποσότητας του σχηματισμένου συμπλόκου.

Η καθιερωμένη μεθοδολογία υπερσχύει των προηγούμενων μεθόδων καθώς έχει υψηλή αναλογία σήματος προς θόρυβο, υψηλό δυναμικό εύρος και ικανότητα διεκπεραίωσης. Χρησιμοποιώντας αυτή τη δοκιμασία, εξετάζουμε χημικές βιβλιοθήκες με στόχο τον εντοπισμό νέων αναστολέων κατά του συμπλόκου MYC-MAX, οι οποίοι θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε νέα αντικαρκινικά φάρμακα που στοχεύουν το πρωτεϊνικό σύμπλοκο MYC-MAX.

SUMMARY

For the maintenance and smooth functionality of our body, a plethora of protein networks coordinate, at any moment, the correct functioning of the cell and, by extension, of the entire body. Many times, due to genetic changes, the expression of these proteins is disturbed, resulting in the cell being led to a series of events that results in the creation of malignancies.

Two large groups of genes that play a critical role in tumorigenesis are the family of proto-oncogenes and tumor suppressor genes. The members of the first family encode proteins that are involved in very important processes for the cell, such as the cell cycle, metabolism, apoptosis, protein synthesis, etc. When proto-oncogenes undergo a genetic change, they become oncogenes which now code for proteins involved in the creation of cancer.

The second family of genes, tumor suppressor genes, performs the opposite role of oncogenes, contributing to tumor suppression. If both alleles of a tumor suppressor gene undergo mutation, then the cell is led to the creation of cancer.

Expression of the c-MYC protein is tightly controlled in normal cells, but becomes overexpressed in most human cancers, making it one of the most important human oncogenes. Thus, over the years, inhibition of the MYC family has been the goal of intense research. MYC protein regulates transcription of target genes by forming a functional complex with its partner protein MAX. The region of MYC responsible for this interaction lies at the basic helix-loop-helix-leucine zipper(bHLHLZ) domain, making this region of MYC an ideal target for raising new inhibitors of MYC-MAX complex.

Here our aim was to establish an in vitro, cell-free assay based on the ELISA principle, using recombinantly expressed GST-MYC and His-MAX proteins. For the complex formation, GST-MYC protein is incubated on glutathione coated 96-well plates and then, 6-His-MAX protein is added. The complex formed is detected and quantified,

after the addition of antibodies that recognize MAX and the reaction of OPD with the HRP-linked second antibodies. The intensity of the absorbance at 492 nm is indicative of the quantity of the complex formation.

The established assay prevails to previous methods as it has high signal-to-noise ratio, high dynamic range and throughput capacity. Using this assay, we are currently screening chemical libraries aiming in identifying novel inhibitors of MYC-MAX complex, which could lead to new anticancer drugs that target the protein complex MYC-MAX.

1. Εισαγωγή

1. Καρκίνος

Τα κύτταρα του ανθρώπου υπόκεινται σε αυστηρή ρύθμιση για να επιτευχθεί η ομαλή λειτουργία του οργανισμού. Η ρύθμιση γίνεται σε πολλαπλά επίπεδα από ρυθμιστικούς μηχανισμούς που ελέγχουν τη φυσιολογική συμπεριφορά των κυττάρων. Η κατάρρευση των ρυθμιστικών μηχανισμών οδηγεί το κύτταρο σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και ως αποτέλεσμα στη δημιουργία όγκου. Η ιδιότητα που έχουν τα κύτταρα του όγκου να εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς μέσω της κυκλοφορίας του αίματος καθορίζει αν ο όγκος θα είναι καλοήθης ή κακοήθης. Οι καλοήθεις όγκοι παραμένουν περιορισμένοι στην αρχική τους θέση και δεν εισβάλλουν στον περιβάλλοντα φυσιολογικό ιστό ούτε εξαπλώνεται σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος, σε αντίθεση με τους κακοήθεις όγκους που έχουν την τάση και να εισβάλουν σε γειτονικούς ιστούς αλλά και να εξαπλώνονται σε απομακρυσμένους ιστούς.

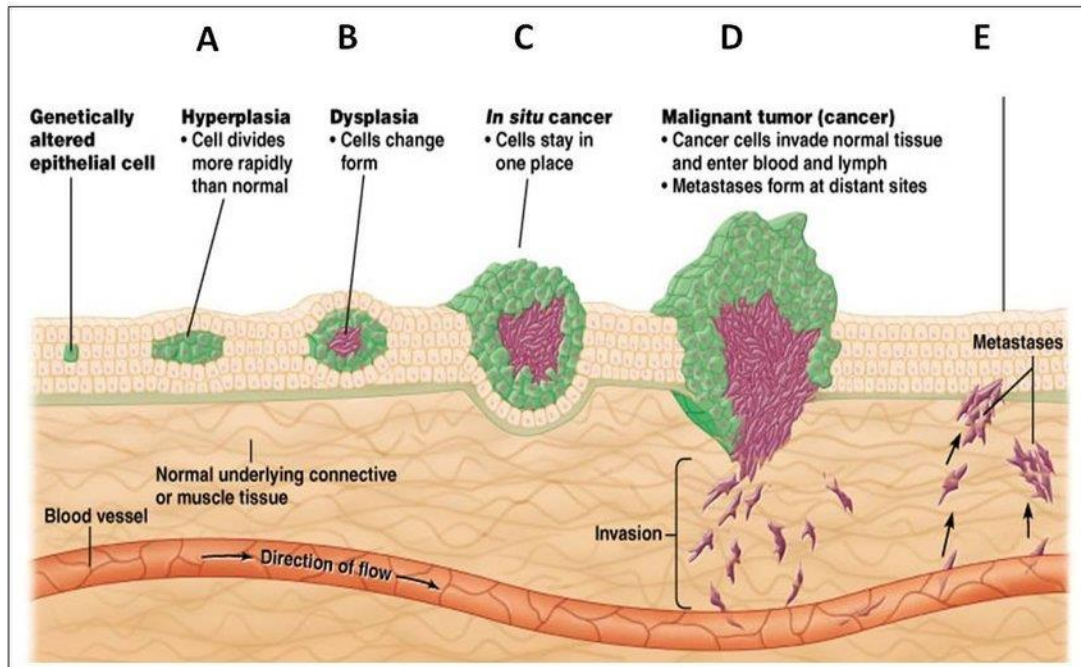
Ο καρκίνος είναι μια γενετική νόσος που προκαλείται από μεταλλάξεις, συμπεριλαμβανομένων των σημειακών μεταλλάξεων, των αναστροφών, των διαγραφών και των γονιδιακών ενισχύσεων. Πέρα από τις γενετικές μεταλλάξεις πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου παίζουν οι επιγενετικές τροποποιήσεις, με σημαντικότερη τη μεταβολή στο πρότυπο μεθυλίωσης των ιστονών, καθώς και κάποιοι μολυσματικοί παράγοντες με κλασικότερο παράδειγμα τους ιούς που μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο (1, 2).

1.1 Ανάπτυξη του καρκίνου

Ένα από τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά του καρκίνου είναι ότι όλα τα κύτταρα του καρκίνου προέρχονται από ένα κυτταρικό κλώνο που πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα. Ο αρχικός κλώνος από τον οποίο προήλθε ο καρκίνος δεν έχει όλα τα χαρακτηριστικά που έχει ένα καρκινικό κύτταρο σε προχωρημένο στάδιο. Η ανάπτυξη του καρκίνου είναι μια διαδικασία πολλών βημάτων, μέσω της οποίας τα κύτταρα μετατρέπονται σταδιακά σε κακοήθη. Τα κύτταρα του καρκίνου συσσωρεύουν ολοένα και μεγαλύτερο αριθμό

μεταλλάξεων. Τα κύτταρα με τις περισσότερες μεταλλάξεις και τον πιο γρήγορο ρυθμό πολλαπλασιασμού είναι αυτά που “επιλέγονται” οδηγώντας στην ανάπτυξη ενός πληθυσμού κυττάρων που πολλαπλασιάζονται με ταχύς ρυθμούς.

Τα στάδια της ανάπτυξης των όγκων φαίνονται στην παρακάτω Εικόνα 1. Όπως αναφέρθηκε, η δημιουργία του όγκου ξεκινάει από ένα μεμονωμένο κύτταρο το οποίο έχει υποστεί γενετική αλλαγή. Αυτό το κύτταρο διαιρείται με ταχείς ρυθμούς από τα φυσιολογικά κύτταρα, δημιουργώντας μια μάζα κυττάρων που ονομάζεται υπερπλασία. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων συνεχίζεται με ταχύς ρυθμούς και μερικά από τα κύτταρα αλλάζουν την μορφή τους δημιουργώντας μια μάζα κυττάρων που ονομάζεται δυσπλασία. Ο όγκος που έχει δημιουργηθεί μεγαλώνει σε μέγεθος καθώς τα κύτταρα διαιρούνται, αλλά ακόμα δεν έχει αποκτήσει την ικανότητα να εισβάλλει σε γειτονικούς ιστούς. Αυτό είναι το στάδιο του *in situ* καρκινώματος. Όσο ο αριθμός των κυττάρων του όγκου αυξάνεται ραγδαία, τόσο αυξάνονται και οι ανάγκες για οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, οδηγώντας στην δημιουργία των αιμοφόρων αγγείων. Αυτό το βήμα είναι πολύ κρίσιμο κατά την δημιουργία του καρκίνου καθώς τα κύτταρα πλέον μπορούν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος να απομακρυνθούν από το σημείο όπου ξεκίνησε ο όγκος και να εισβάλουν σε άλλους ιστούς σφραγίζοντας έτσι την δημιουργία κακοήθους όγκου που έχει την ιδιότητα να κάνει μεταστάσεις και να εξαπλωθεί σε όλο το σώμα (3).



Εικόνα 1 - Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας ενός κακοήθους όγκου, μετά από μετάλλαξη ενός επιθηλιακού κυττάρου.

Ένα μεταλλαγμένο κύτταρο του επιθηλίου πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα και οδηγεί στη δημιουργία μιας καλοήθους μάζας κυττάρων που διατηρούν την σωστή οργάνωση που χαρακτηρίζεται ως υπερπλασία (*Hyperplasia*). Τα κύτταρα που αυξάνονται σε αριθμό αποκτούν μη φυσιολογική διαμόρφωση, στάδιο που χαρακτηρίζεται ως δυσπλασία (*Dysplasia*). Το επόμενο βήμα στην δημιουργία του όγκου είναι το *in situ* καρκίνωμα (*Carcinoma in situ*), το οποίο ακόμα δεν θεωρείται καρκίνος, επειδή τα κύτταρα δεν έχουν τη δυνατότητα εισβολής σε γειτονικούς ιστούς. Ο μεγάλος αριθμός κυττάρων σημαίνει αυξημένες ανάγκες για οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, οδηγώντας στη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων. Αυτό είναι κομβικό σημείο στη δημιουργία του καρκίνου διότι τα κύτταρα πλέον μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μπορούν να “ταξιδέψουν” και να εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς, σχηματίζοντας το τυπικό καρκίνωμα (*Invasive carcinoma*) (3).

1.2 Αιτιολογία του καρκίνου

Τα αίτια πρόκλησης του καρκίνου είναι γενετικές ή/και επιγενετικές τροποποιήσεις σε ένα ή περισσότερα κύτταρα του οργανισμού. Πέρα από τα γενετικά αίτια υπάρχουν και άλλοι παράγοντες υψηλού κινδύνου που οδηγούν στην δημιουργία του καρκίνου όπως για παράδειγμα η διατροφή, το κάπνισμα, το αλκοόλ, οι λοιμώξεις, οι χημικές ουσίες, η ακτινοβολία και η φλεγμονή. Τις περισσότερες φορές η δημιουργία του καρκίνου δεν προέρχεται από ένα μόνο γεγονός, αλλά είναι αποτέλεσμα σύνθετων διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στο κύτταρο.

Παρά την εκτεταμένη μελέτη του καρκίνου τα τελευταία χρόνια, η θεραπεία του παραμένει μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στην ερευνητική κοινότητα. Μεγάλη προσπάθεια γίνεται τα τελευταία χρόνια για την αντιμετώπιση και πρόληψη του καρκίνου με μεθόδους που δεν περιλαμβάνουν μόνο την θεραπεία με φαρμακευτικά προϊόντα αλλά και την ανάπτυξη ενός υγιεινού τρόπου ζωής. Μελέτες έχουν δείξει πως ο ποιοτικός τρόπος ζωής, με ισορροπημένη διατροφή, φυσική άσκηση και περιορισμένη κατανάλωση αλκοόλ, επηρεάζουν θετικά στην πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου (4).

1.3 Ογκογονίδια

Η μοριακή βάση του καρκίνου ανακαλύφθηκε με την μελέτη ορισμένων γονιδίων, των ογκογονιδίων, που προκαλούν μετασχηματισμό των κυττάρων και ως εκ τούτου την δημιουργία του καρκίνου. Τα ογκογονίδια είναι το μεταλλαγμένο προϊόν άλλων γονιδίων, των πρώτο-ογκογονιδίων, που παίζουν κρίσιμο ρόλο στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της επιβίωσης των κυττάρων. Η μελέτη των ογκογονιδίων ξεκίνησε στους ρετροϊούς, συγκεκριμένα για την αλληλουχία *src* που συμμετέχει στη φυσιολογική ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής αύξησης. Η μελέτη των αλληλουχιών *src* άνοιξε τον δρόμο για την μελέτη των προϊόντων που παράγουν τα ογκογονίδια και τα πρώτο-ογκογονίδια και για την κατανόηση της μοριακής βάσης του καρκίνου στον άνθρωπο. Η ενεργοποίηση των πρώτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια είναι αποτέλεσμα μιας ποικιλίας συμβάντων που περιλαμβάνουν:

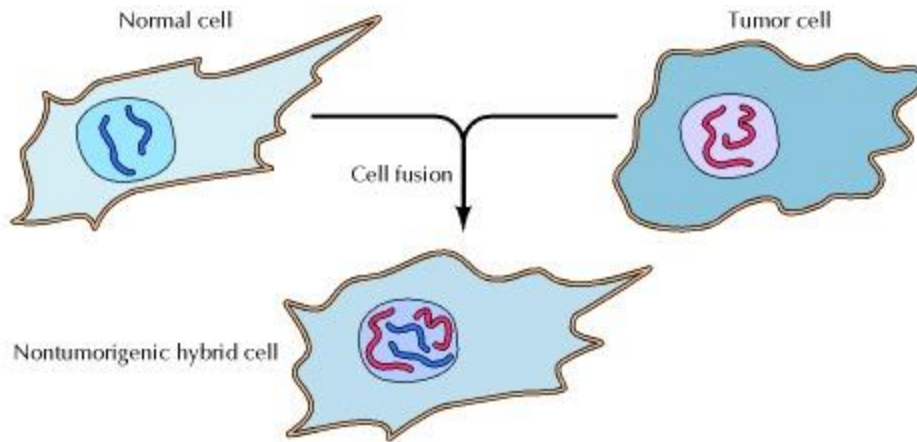
- **Σημειακές μεταλλάξεις**, οι οποίες μπορεί να επιφέρουν την αντικατάσταση ενός μοναδικού αμινοξέος σε κρίσιμα σημεία της αμινοξικής αλληλουχίας.
- **Μετατοπίσεις, διπλασιασμοί και ελλείματα χρωμοσωμάτων**. Οι χρωμοσωμικές αναδιατάξεις δημιουργούν ανώμαλα γονιδιακά προϊόντα με αποτέλεσμα την παραγωγή μη φυσιολογικών, υβριδικών πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν το C-τελικό μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης και το N-τελικό μιας άλλης πρωτεΐνης.
- **Γονιδιακή ενίσχυση**, προκαλεί αυξημένη γονιδιακή έκφραση, πράγμα που είναι αρκετά συνηθισμένο στον καρκίνο καθώς ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων είναι πολύ αυξημένος.

Τα προϊόντα των ογκογονιδίων είναι οι ογκοπρωτεΐνες που εμπλέκονται σε ρυθμιστικά μονοπάτια, και όταν εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα προκαλούν ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων (5, 6).

1.4 Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι πολύ σημαντικά γονίδια για το κύτταρο καθώς ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αύξηση, απόπτωση και επιδιόρθωση του DNA. Υπό κανονικές συνθήκες τα ογκοκατασταλτικά γονίδια παρεμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των κυττάρων με αποτέλεσμα να αναστέλλουν και την δημιουργία των όγκων. Όταν καταστέλλεται η λειτουργία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων το κύτταρο οδηγείται στη δημιουργία του καρκίνου (7).

Τα πρώτα πειράματα που αποδεικνύουν τη δράση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων προέκυψαν από πειράματα με υβριδώματα σωματικών κυττάρων, που πραγματοποίησε για πρώτη φορά ο Henry Harris το 1969. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2 κατά την σύντηξη φυσιολογικών κυττάρων με καρκινικά κύτταρα, προκύπτουν υβριδώματα τα οποία τις περισσότερες φορές δεν οδηγούν στην δημιουργία όγκων.



Εικόνα 2 - Συγχώνευση ενός φυσιολογικού κυττάρου και ενός καρκινικού κυττάρου. Προκύπτει ένα υβρίδωμα το οποίο δεν είναι ογκογόνο (2).

Το πρώτο ογκοκατασταλτικό γονίδιο (Rb) τακτοποιήθηκε κατά τη μελέτη του ρετινοβλαστώματος, όγκος που εκδηλώνεται σε παιδική ηλικία και που μπορεί να θεραπευτεί αν διαγνωστεί έγκαιρα. Πολύ σημαντική παρατήρηση κατά την μελέτη του ρετινοβλαστώματος ήταν ότι υπάρχουν δύο διακριτές περιπτώσεις από τις οποίες μπορεί να αναπτυχθεί ο όγκος.

- Η κληρονομήσιμη μορφή: σε αυτή τη περίπτωση το ένα αλληλόμορφο που κληρονομείται από τον γονέα είναι μεταλλαγμένο. Μια δεύτερη μετάλλαξη που συμβαίνει στο φυσιολογικό σωματικό αλληλόμορφο, σηματοδοτεί την έναρξη της ανάπτυξης του όγκου.
- Μη κληρονομήσιμη μορφή: σε αυτή τη περίπτωση απαιτούνται μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου έτσι ώστε να αναπτυχθεί ο όγκος. Αυτό το γεγονός καθιστά δύσκολη τη δημιουργία του όγκου γι' αυτό η μη κληρονομήσιμη μορφή του ρετινοβλαστώματος είναι πολύ σπάνια νόσος (2).

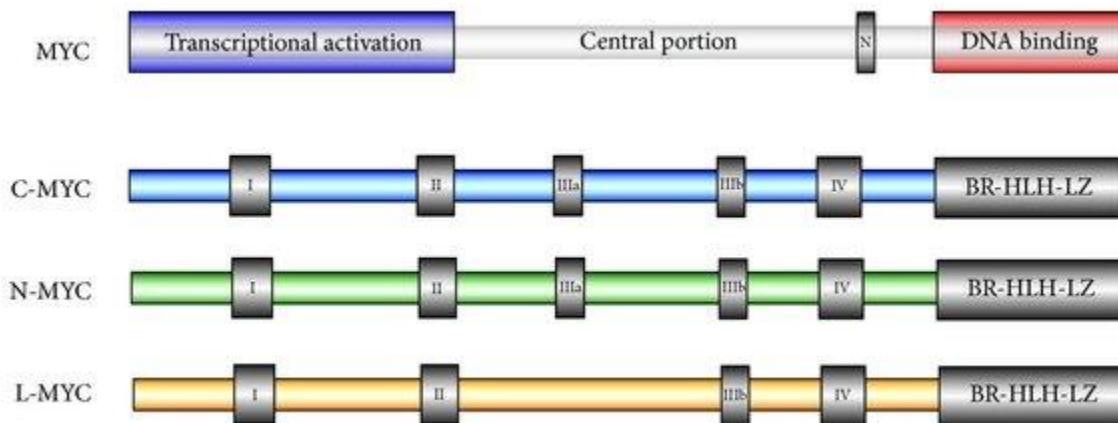
Η μελέτη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου Rb άνοιξε τον δρόμο για την μελέτη μιας σειράς άλλων ογκογονιδίων, των οποίων η απενεργοποίηση οδηγεί στη δημιουργία όγκων. Μερικά παραδείγματα είναι: PTEN, P53, CDH1, NF1, NF2, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, Wn1 κ.α. (7).

1.5 Οικογένεια πρωτεϊνών MYC

Η οικογένεια των πρωτο-ογκογονιδίων MYC κωδικοποιεί τρεις καλά χαρακτηρισμένες ογκοπρωτεΐνες: c-MYC, l-MYC και n-MYC, που λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες, ρυθμίζοντας την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, απόπτωση, επιδιόρθωση του DNA και αιμοποίηση. Η πρωτεΐνη c-MYC ήταν το πρώτο μέλος της ευρύτερης οικογένειας MYC που ανακαλύφθηκε το 1982 και μάλιστα για αρκετό καιρό η μοναδική. Το αυξημένο ενδιαφέρον των ερευνητών για αυτή την οικογένεια πρωτεϊνών οδήγησε στην ανακάλυψη άλλων μελών της οικογένειας MYC. Οι πρωτεΐνες l-MYC και n-MYC μοιράζονται σημαντικές δομικές και λειτουργικές ομοιότητες με την c-MYC αλλά διαφέρουν στο μοτίβο της έκφρασης. Το διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών MYC σχετίζεται με τις διαφορετικές χωρικές και χρονικές ανάγκες έκφρασης κατά την ανάπτυξη του οργανισμού. Μια άλλη πληροφορία που προκύπτει από το πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών είναι πως η κάθε πρωτεΐνη σχετίζεται με διαφορετικό τύπο καρκίνου. Για παράδειγμα το c-MYC υπερεκφράζεται κυρίως στο καρκίνο του αίματος, το l-MYC υπερεκφράζεται στα καρκινώματα του πνεύμονα και το n-MYC έχει βρεθεί σε υψηλά επίπεδα σε συμπαγείς καρκίνους του νευρικού συστήματος. Στην Εικόνα 3 μπορούμε να δούμε την πρότυπη οργάνωση των γονιδίων της οικογένειας MYC.

Ο ρόλος των πρωτεϊνών της οικογένειας MYC στον άνθρωπο είναι πάρα πολύ σημαντικός καθώς εμπλέκονται σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια της ρύθμισης έκφρασης γονιδίων. Αυτός είναι και ο λόγος που η απορρύθμιση αυτών των πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία κακοηθειών στον άνθρωπο. Η εκτεταμένη μελέτη των πρωτεϊνών της ομάδας MYC και η γνώση της δομής και της λειτουργίας τους καθιστά πιο εύκολη την στόχευσή τους από θεραπευτικές προσεγγίσεις που έχουν δημιουργηθεί κατά τους όγκους στους οποίους η MYC υπερεκφράζεται.

Η ετερογένεια της οικογένειας MYC παρουσιάζει πολύ ενδιαφέρον, καθώς, εκτός από τα μέλη που οδηγούν στη δημιουργία του καρκίνου υπάρχουν και πρωτεΐνες μέλη της οικογένειας που παρουσιάζουν κατασταλτική δράση έναντι του σχηματισμού κακοήθειας, για παράδειγμα οι πρωτεΐνες S-MYC και B-MYC (8, 9, 10, 11).



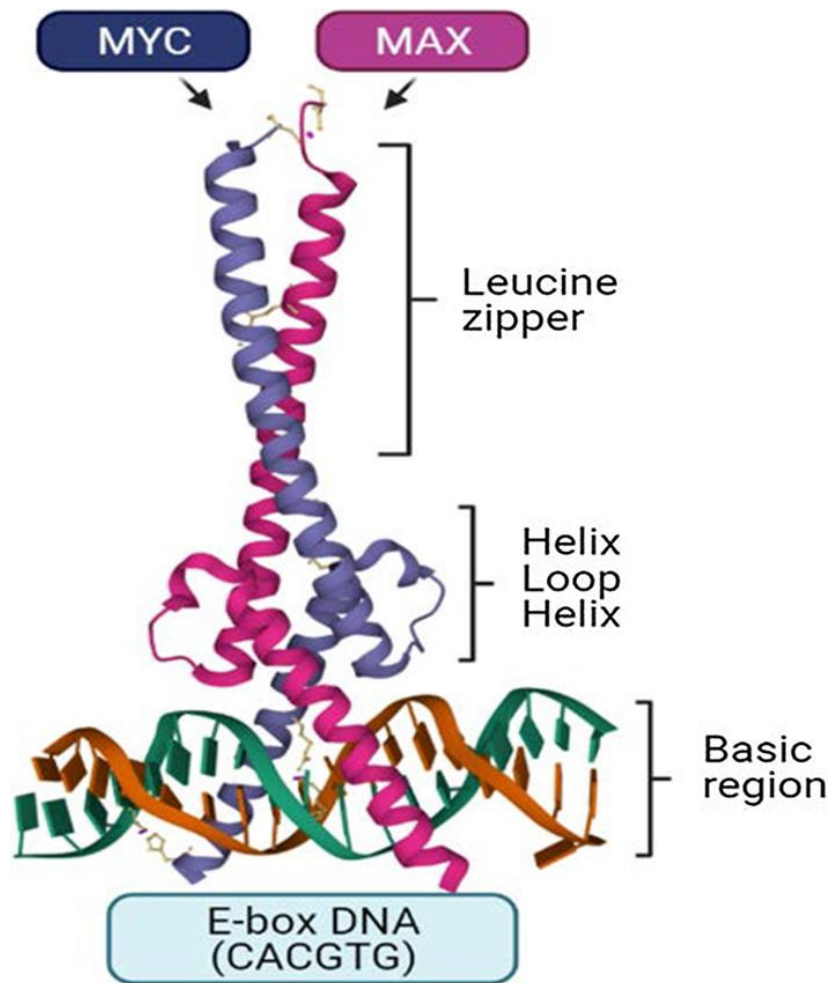
Εικόνα 3 - Στο πάνω μέρος της εικόνας φαίνεται το πρότυπο οργάνωσης των γονιδίων MYC στα θηλαστικά. Αριστερά υποδεικνύεται η περιοχή που ευθύνεται για την ενεργοποίηση και καταστολή της μεταγραφής καθώς και για την σταθερότητα της πρωτεΐνης (MYC box, MBI και MBII αντίστοιχα). Το N-τελικό άκρο ευθύνεται για τον πυρηνικό εντοπισμό. Τέλος στα δεξιά υποδεικνύεται η περιοχή που ευθύνεται για την πρόσδεση της MYC στο DNA. Πιο κάτω υποδεικνύονται οι συντηρημένες περιοχές των πρωτεϊνών c-MYC, l-MYC και n-MYC (11).

1.5.1 Το πρωτο-ογκογονίδιο c-MYC

Το ογκογονίδιο c-MYC είναι το κυτταρικό ομόλογο του γονιδίου v-MYC στους ρετροϊούς. Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8 και περιέχει 3 εξόνια. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου c-MYC έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με μεγάλο αριθμό καρκίνων του ανθρώπου. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε μεταλλάξεις στο ίδιο το γονίδιο της c-MYC, είτε σε μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου c-MYC.

Το γονίδιο του c-MYC κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 439 αμινοξέα (64-kDa) όταν η μετάφραση ξεκινάει από το κωδικόνιο έναρξης AUG και μια

μεγαλύτερη πολυπετιδική αλυσίδα 453 αμινοξέα (67 kDa) όταν η μετάφραση ξεκινάει στο κωδικόνιο έναρξης CUG. Η πρωτεΐνη λειτουργεί ως πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που έχει την ικανότητα να προσδεθεί στο DNA και έχει μόλις 30 λεπτά χρόνο ημιζωής. Οι επικράτειες της πρωτεΐνης c-MYC παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ διαφόρων ειδών αλλά και μεταξύ των πρωτεϊνών της οικογένειας στον ίδιο οργανισμό. Το N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (140 α.ο) είναι μια βασική περιοχή που έρχεται σε επαφή με την μεγάλη αύλακα. Το C-τελικό άκρο είναι μια περιοχή έλικα-στροφή-έλικα φερμουάρ λευκίνης που ευθύνεται για τον διμερισμό της πρωτεΐνης με άλλες μικρές πρωτεΐνες και για την πρόσδεση της πρωτεΐνης στο DNA, συγκεκριμένα στο E-box (5'-CACGTG-3'). Ο διμερισμός της ογκοπρωτεΐνης c-MYC με μια μικρή πρωτεΐνη MAX, είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του συμπλόκου στο DNA και για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Στην Εικόνα 4 φαίνεται πως οι δύο πρωτεΐνες αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους και πως το σύμπλοκο προσδένεται στο DNA (12, 13, 14).

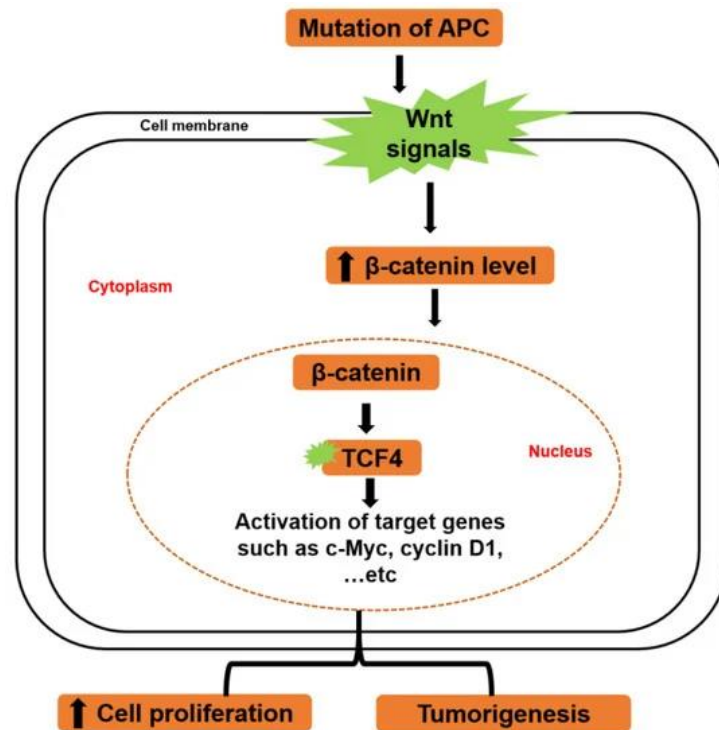


Εικόνα 4 - Κρυσταλλική δομή του ετεροδιμερούς MYC-MAX μέσω της δομής έλικα-στροφή-έλικα φερμουάρ λευκίνης και η πρόσδεση του συμπλόκου στο DNA (9).

1.5.2 c-MYC: σηματοδοτικό μονοπάτι

Το προϊόν του γονιδίου c-MYC είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που είτε ενεργοποιεί είτε καταστέλλει την έκφραση γονιδίων στόχων. Η ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα c-MYC γίνεται από παράγοντες που βρίσκονται ανωδικά στο σηματοδοτικό μονοπάτι. Ένα κλασικό παράδειγμα ενεργοποίησης του c-MYC είναι το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη. Όταν η ουβικιτινίωση της β-κατενίνης αναστέλλεται, με αποτέλεσμα την συσσώρευσή της και την μεταφορά της στον πυρήνα, ενεργοποιείται η μεταγραφή του γονιδίου c-MYC. Υψηλά επίπεδα έκφρασης της c-MYC οδηγούν σε

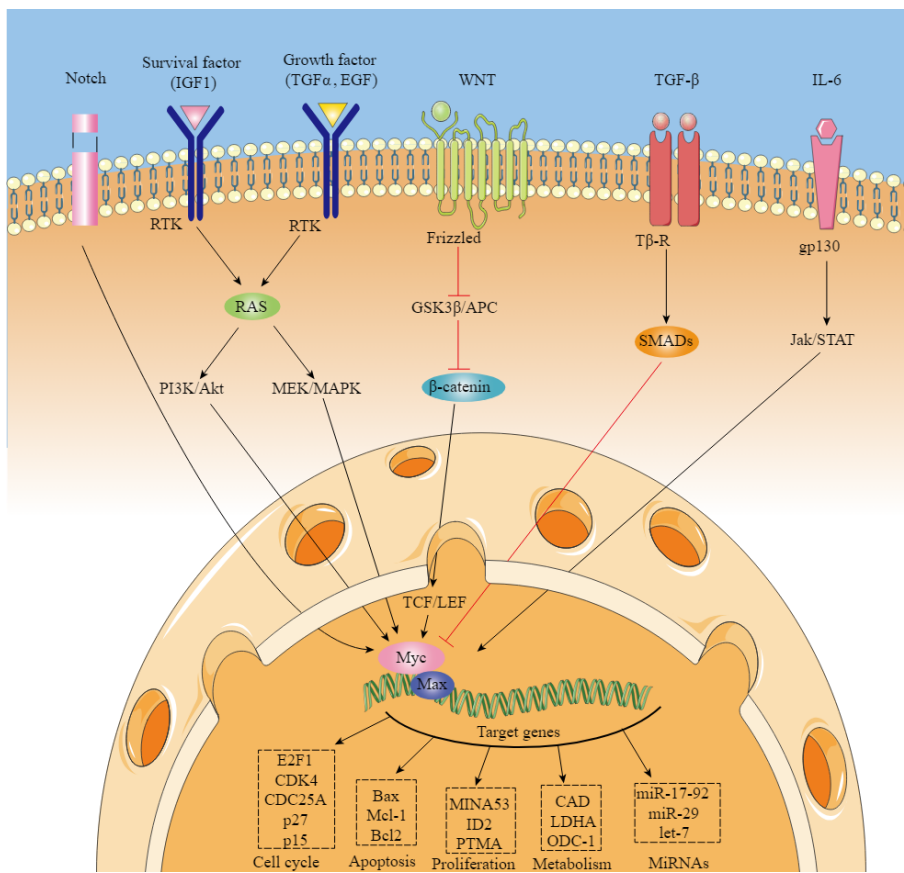
ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καταστολή της απόπτωσης και απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Πέρα από το μονοπάτι του Wnt, υπάρχουν και άλλα μονοπάτια ανοδικά της c-MYC που ρυθμίζουν την έκφραση του όπως για παράδειγμα το μονοπάτι notch, ERK/MAPK, TGFβ, κ.α (Εικόνα 6) (15, 16, 17, 18).



Εικόνα 5 - Σχηματική αναπαράσταση του ρυθμιστικού μηχανισμού Wnt/β-κατενίνη που οδηγεί στην ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου c-MYC (15).

Πέρα από τους παράγοντες που δρουν ανοδικά της c-MYC στο σηματοδοτικό μονοπάτι για την ενεργοποίηση της έκφρασης της c-MYC, σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου παίζουν και οι παράγοντες που βρίσκονται καθοδικά της c-MYC στο σηματοδοτικό μονοπάτι. Αυτοί οι παράγοντες είτε ενεργοποιούνται είτε καταστέλλονται από την c-MYC και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και επιβίωση του κυττάρου. Παρακάτω αναφέρονται μερικές από τις διεργασίες του κυττάρου και ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζονται από την ανώμαλη έκφραση του γονιδίου c-MYC (Εικόνα 6) (19).

- **Κυτταρικός πολλαπλασιασμός:** σχεδόν όλα τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα c-MYC, ενώ τα κύτταρα που υπόκεινται σε φυσιολογικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης της c-MYC.
- **Μιτοχονδριακή βιογένεση:** η c-MYC φαίνεται να ενισχύει την μιτοχονδριακή βιογένεση, αυξάνοντας την σύνθεση της ακέτυλο - CoA που με την σειρά της οδηγεί στην ακετυλίωση των ιστονών και την βιοσύνθεση λιπαρών οξέων. Η ακετυλίωση των ιστονών καθιστά δυνατή την έκφραση των γονιδίων, πράγμα που είναι απαραίτητο για τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα. Η μιτοχονδριακή βιογένεση είναι σημαντική για την παραγωγή ενέργειας (ATP) αλλά και για την δημιουργία υποστρωμάτων για μακρομοριακή σύνθεση. Και οι δύο αυτές είναι απαραίτητες διεργασίες για την ανάπτυξη όγκων (20).
- **Πρωτεϊνική σύνθεση:** η c-MYC επιταχύνει την είσοδο του κυττάρου στη φάση S1 με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και να απαιτούνται αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνικής σύνθεσης. Στα κύτταρα τα οποία η c-MYC υπερεκφράζεται η πρωτεϊνική σύνθεση συμβαίνει με τριπλάσιο ρυθμό σε σχέση με ένα κύτταρο με φυσιολογική έκφραση της c-MYC (21).



<https://www.creative-diagnostics.com/c-myc-signaling-pathway.htm>

Εικόνα 6 -Στο πάνω μέρος της εικόνας φαίνεται η κυτταρική μεμβράνη και μερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως υποδοχείς για διάφορα σήματα στο εξωτερικό του κυττάρου. Η πρόσδεση κάποιου προσδέτη στον υποδοχέα του, πυροδοτεί έναν καταρράκτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών. Το αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων μπορεί είτε να ενεργοποιούν είτε να καταστέλλουν την έκφραση της C-MYC που βρίσκεται στον πυρήνα και με την σειρά της ρυθμίζει την έκφραση άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο, πολλαπλασιασμό, απόπτωση, μεταβολισμό και άλλες διεργασίες.

1.5.3 Η πρωτεΐνη c-Myc ως θεραπευτικός στόχος

Τα τελευταία χρόνια η μελέτη της πρωτεΐνης c-MYC είναι στο επίκεντρο της έρευνας. Η εκτεταμένη μελέτη της πρωτεΐνης έχει προσφέρει πολύ καλή κατανόηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφραση της c-MYC καθώς και την επίδραση αυτής σε

πολλές κυτταρικές διεργασίες. Δεδομένου ότι η c-MYC εμπλέκεται στη δημιουργία πολλών ειδών καρκίνου, αποτελεί ιδανικό εργαλείο στη θεραπεία όγκων. Με βάση τις γνώσεις για την ογκοπρωτεΐνη έχουν προταθεί θεραπείες που στοχεύουν:

- απευθείας στόχευση της c-MYC, με αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασης της και τον αποκλεισμό της λειτουργίας του.
- την στόχευση ενός από τους πολλούς μηχανισμούς μέσω των οποίων η c-MYC οδηγεί στη δημιουργία του καρκίνου.

Η στόχευση της πρωτεΐνης c-MYC είναι μεγάλη πρόκληση για τους επιστήμονες καθώς η πρωτεΐνη είναι αρκετά ασταθής και δεν έχει καθορισμένη τρισδιάστατη δομή. Επίσης, ως μεταγραφικός παράγοντας η c-MYC λειτουργεί μέσω αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ή μέσω αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-DNA και όχι τόσο ως ένζυμο, πράγμα που καθιστά αρκετά δύσκολη την καταστολή της.

Η πρωτεΐνη c-MYC χαρακτηρίζεται ως παράγοντας ζωτικής σημασίας, γεγονός που έχει προκαλέσει ανησυχία στους ερευνητές για της επιδράσεις των πιθανών φαρμάκων στους φυσιολογικούς ιστούς. Μεγάλος αριθμός φαρμάκων έχουν σχεδιαστεί κατά της c-MYC, βασίζονται είτε στην καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης, της σταθερότητά της, είτε και την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες ή το DNA (22).

Οι πιο κοινές προσεγγίσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί για την στόχευση της πρωτεΐνης C-MYC είναι:

1. Στόχευση της μεταγραφής του γονιδίου MYC.
2. Στόχευση της μετάφρασης του mRNA της MYC.
3. Στόχευση της σταθερότητας της MYC.
4. Στόχευση της αλληλεπίδρασης της MYC με την MAX.
5. Στόχευση της προσβασιμότητας της MYC σε άλλα γονίδια.

1.5.4 Στόχευση της αλληλεπίδρασης της MYC με την MAX

Η αλληλεπίδραση της ογκοπρωτεΐνης c-MYC με την πρωτεΐνη MAX επιτρέπει την πρόσδεση του συμπλόκου στο DNA. Η περιοχή αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών έχει

αποτελέσει αντικείμενο μελέτης με σκοπό την ανάπτυξη νέων μικρών μορίων με ανασταλτική δράση στη δημιουργία του συμπλόκου με αποτέλεσμα την καταστολή της ογκογένεσης.

Μερικά μικρά μόρια έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα ως προς την καταστολή του συμπλόκου. Παρ'όλα αυτά η στόχευση του συμπλόκου παραμένει δύσκολη και ιδιαίτερη πρόκληση για τους επιστήμονες. Δεδομένου ότι η επιφάνεια αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών είναι πολύ μικρή, η στόχευσή της καθίσταται ακόμα πιο δύσκολη.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η αλλαγή ενός μόνο αμινοξέος σε μία από τις πρωτεΐνες μπορεί να αποτρέψει τη δημιουργία του συμπλόκου. Αυτό το εύρημα αποτελεί σημαντικό κριτήριο για τη δημιουργία μικρών μορίων με μεγάλη συγγένεια ως προς το σημείο αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών.

2. Σκοπός

Η παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια ενός συνεργατικού προγράμματος με σκοπό τον σχεδιασμό και τον έλεγχο μικρών μορίων που δρουν ως αναστολείς και στοχεύουν στην αναστολή της δημιουργίας του συμπλόκου μεταξύ των πρωτεϊνών MYC και MAX.

Το πρώτο-ογκογονίδιο MYC διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων. Η υπερέκφραση της MYC έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με πολλούς τύπους καρκίνου. Για το λόγο αυτό η ογκοπρωτεΐνη MYC αποτελεί στόχο για την θεραπεία του καρκίνου μέσω μικρών μορίων που δρουν ειδικά στην περιοχή αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη MAX. Τα πρωτόκολλα *in vitro* για τον έλεγχο μικρών μορίων που αναστέλλουν την δράση της MYC μέσω στόχευσης της αλληλεπίδραση του συμπλόκου MYC/MAX (PullDown), μέσω παρεμπόδισης της πρόσδεσης του συμπλόκου στο στοιχείο E ή μέσω αποικοδόμησης της MYC, παρουσιάζουν ορισμένους περιορισμούς (23,24,25).

Σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι μέσω της νέας μεθοδολογίας που εγκαθιδρύσαμε στο εργαστήριο να βελτιώσουμε μερικές παραμέτρους, πράγμα που ήταν αδύνατον να επιτευχθεί με προηγούμενες μεθοδολογίες. Σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους, μέσω της ELISA είναι δυνατόν να ελεγχθεί μεγάλος αριθμός πιθανών αναστολέων του συμπλόκου, καθώς χρησιμοποιούμε πιάτα με 96 φρεάτια (wells). Ο χρόνος πραγματοποίησης του πειράματος είναι μόνο μερικές ώρες και τα αποτελέσματα άμεσα. Επίσης ο εξοπλισμός που χρησιμοποιούμε είναι απλός και οικονομικός. Αυτοί οι παράγοντες καθιστούν την μέθοδο ιδανική για τον έλεγχο νέων αναστολέων *in vitro*.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Παραγωγή και απομόνωση πρωτεϊνών από βακτηριακή καλλιέργεια

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση και τον καθαρισμό των πρωτεϊνών είναι ένα καλά καθορισμένο πρωτόκολλο το οποίο είχε εγκαθιδρυθεί από προηγούμενη ομάδα του εργαστηρίου. Κατά την έκφραση των πρωτεϊνών MYC και MAX θα χρησιμοποιήσουμε τις ετικέτες (tags) GST και 6-His αντίστοιχα.

Το βακτηριακό στέλεχος που κρίθηκε ιδανικό για την έκφραση των πρωτεϊνών είναι το στέλεχος BL21DE3pLysS, του είδους *E. coli*. Οι λόγοι που καθιστούν ιδανικό το στέλεχος αυτό για την παραγωγή πρωτεϊνών είναι:

- Τα BL21 δεν περιέχουν τις “lon” και “ompT” πρωτεάσες, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο κίνδυνος καταστροφής της επιθυμητής πρωτεΐνης.
- Τα BL21DE3 συγκεκριμένα, περιέχουν επιπλέον την T7 RNA πολυμεράση, η οποία επάγεται από IPTG.
- Τα BL21DE3 pLysS διαθέτουν το pLysS πλασμίδιο. Το πλασμίδιο αυτό εκφράζει την T7 λυσοζύμη, η οποία αναστέλλει την T7 RNA πολυμεράση. Το αποτέλεσμα είναι να μειώνεται η έκφραση των πρωτεϊνών, η οποία επάγεται από τον T7 υποκινητή. Μετά την προσθήκη του IPTG, η T7 RNA πολυμεράση παράγεται σε επαρκή επίπεδα και έτσι επιτυγχάνεται η παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι επιθυμητές ετικέτες είναι:

- GST (Glutathione S-transferase). Η συγκεκριμένη ετικέτα προστέθηκε στην MYC πρωτεΐνη μετά από εισαγωγή του γονιδίου της MYC στον πλασμιδιακό φορέα pGEX6P1.
- 6-His (ουρά 6 αμινοξέων Ιστιδίνης). Η συγκεκριμένη ετικέτα προστέθηκε στην MAX πρωτεΐνη μετά την εισαγωγή του γονιδίου της MAX στον φορέα pET15b. Και τα δύο γονίδια εισήχθησαν στον πλασμιδιακό φορέα με κατεύθυνση τέτοια, ώστε η ετικέτα να προστεθεί στο αμινοτελικό άκρο της κάθε πρωτεΐνης. Έτσι το καρβοξυτελικό άκρο παραμένει ανεπηρέαστο, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών μέσω των καρβοξυτελικών τους άκρων.

3.1.1 Μετασχηματισμός βακτηρίων

Η εισαγωγή του πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο ενδιαφέροντος στα βακτήρια γίνεται μέσω της διαδικασίας του “θερμικού σοκ”. Ειδικότερα ακολουθεί:

- μεταφορά των βακτηρίων (BL21DE3 pLysS) από τους -80°C σε πάγο, ώστε να ξεπαγώσουν, για έως 15-25 λεπτά.
- εισαγωγή 1μl διαλύματος πλασμιδίων σε 100μl διαλύματος βακτηρίων, και ήπια ανάδευση του διαλύματος και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
- επώαση του δείγματος στους 42°C (εντός υδατόλουτρου) για 30 δευτερόλεπτα και μεταφορά σε πάγο για 2 λεπτά
- εισαγωγή 500μl θρεπτικού 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 (200 rpm), για 1 ώρα.

Ύστερα επιστρώνονται 2 τρυβλία, ως εξής:

- στο 1ο, μεταφορά και επίστρωση $\sim 50\mu\text{l}$.
- στο 2ο, φυγοκέντρηση του εναπομείναντος δείγματος στις 6000 rpm για 2 λεπτά. Απόρριψη του υπερκειμένου εκτός από $\sim 100\mu\text{l}$. Επαναιώρηση του ιζήματος και επίστρωση στο 2ο τρυβλίο. Τέλος γίνεται ολονύκτια επώαση στους 37°C .

3.1.2 Τρυβλία επίστρωσης μετασχηματισμένων βακτηρίων

Για την εξασφάλιση της ανάπτυξης μόνο των μετασχηματισμένων βακτηρίων, χρησιμοποιούμε αντιβιοτικά για τα οποία ο φορέας είναι ανθεκτικός. Στην περίπτωση παραγωγής των πρωτεϊνών GST-MYC και His-MAX, χρησιμοποιούνται τρυβλία που στο θρεπτικό LB περιέχουν και τα αντιβιοτικά: αμπικιλίνη και χλωραμφενικόλη, αντίστοιχα.

3.1.3 Η παραγωγή των πρωτεϊνών σε μεγάλη συγκέντρωση γίνεται σε υγρή καλλιέργεια

Ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων γίνεται σε υγρή καλλιέργεια. Προκειμένου να παραχθεί ικανοποιητική ποσότητα επιθυμητής πρωτεΐνης, η επαγωγή με προσθήκη του IPTG θα πρέπει να γίνει σε στάδιο που να έχει παραχθεί επαρκής ποσότητα βακτηρίων. Αυτό επιτυγχάνεται στο στάδιο των 4 λίτρων βακτηριακής καλλιέργειας, και συγκεκριμένα όταν η οπτική απορρόφηση (OD) στα 600nm κυμαίνεται μεταξύ των τιμών: $OD_{600nm}=0,4-0,6$. Αυτή είναι μια διαδικασία μερικών βημάτων που περιλαμβάνει:

- Παραγωγή μιας μικρής καλλιέργειας των 5ml, προσθέτοντας 1 αποικία από το τρυβλίο σε 5ml LB με αντιβιοτικά: αμικικιλίνη και χλωραμφενικόλη. Ακολουθεί επώαση για 6 ώρες στους 37°C, υπό ανάδευση.
- Ακολουθεί η προσθήκη 1,5 ml από το προηγούμενο βήμα σε όγκο 100ml που περιέχει LB με αντιβιοτικά: αμικικιλίνη και χλωραμφενικόλη. Ακολουθεί επώαση overnight υπό ανάδευση στους 37°C.
- Μεταφορά, υπό στείρες συνθήκες, 10ml από την προ-καλλιέργεια όγκου 100ml, σε κωνικές φιάλες που περιέχουν από 1 λίτρο LB, με τα αντιβιοτικά: Αμικικιλίνη και Χλωραμφενικόλη. Επώαση στους 37°C, υπό ανάδευση.

Φωτομέτρηση δείγματος στα 600nm, σε τακτά χρονικά διαστήματα (1η μέτρηση ~2 ώρες μετά την έναρξη της επώασης), έως ότου να ισχύει: $28 OD_{600nm}=0,4-0,6$. Ως τυφλό, στη διαδικασία της φωτομέτρησης, χρησιμοποιείται καθαρό θρεπτικό μέσο (LB). Όταν $OD_{600nm}=0,4-0,6$ σε καθεμία από τις τέσσερις κωνικές, προστίθενται 500μl IPTG 1M (Cτελ= 50 mM). Επώαση στους 20°C, ολονύκτια.

3.1.4 Απομόνωση των βακτηρίων από την υγρή καλλιέργεια, επαναδιάλυση αυτών (με Lysis Buffer) και αποθήκευση στους -20°C

Ο λόγος που γίνεται το στάδιο αυτό, είναι για να τοποθετηθούν τα βακτήρια σε κατάλληλο περιβάλλον (εντός του διαλύματος λύσης- lysis buffer), στο οποίο θα γίνει

τελικά η λύση των βακτηριών, για την απομόνωση του βακτηριακού εκχυλίσματος (όπου θα περιέχεται και η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος). Πρώτα γίνεται μια φυγοκέντρηση της υγρής καλλιέργειας στις 6000 rpm για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκείμενου και 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]. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -20°C.

3.1.4 Έλεγχος επαγωγής της επιθυμητής πρωτεΐνης

Για να επιβεβαιωθεί ότι έγινε η επαγωγή μέσω του IPTG και πως πράγματι παράχθηκε η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, πραγματοποιείται βρασμός των ιζημάτων των βακτηριών (που απομονώθηκαν πριν και μετά την προσθήκη του IPTG) εντός διαλύματος 1X Sample buffer (SB) [62,5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2,3% SDS, 10% v/v γλυκερόλη και 0,05% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue- BPB), παρουσία 100 mM DTT] και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, χρώση του gel με χρωστική Coomassie (Coomassie stain) και σύγκριση των ζωνών. Αν έχει πραγματοποιηθεί η επαγωγή, στο μοριακό βάρος που αναμένεται να βρίσκεται η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, θα πρέπει να υπάρχει πολύ πιο έντονη ζώνη στο δείγμα μετά την προσθήκη του IPTG.

3.1.5 Λύση των βακτηριών και απομόνωση της His-MAX πρωτεΐνης

Αρχικά γίνεται η λύση των βακτηριών ώστε να απελευθερωθούν όλες οι πρωτεΐνες από τα βακτήρια, με την χρήση 4 κύκλων υπερήχων με ένταση 35%, 10 δευτερόλεπτα το κάθε ένα. Ακολουθεί η φυγοκέντρηση του δείγματος στις 15.000 rpm, για 1 ώρα, σε θερμοκρασία σταθερή και ίση με 4°C. Το υπερκείμενο που προκύπτει από την φυγοκέντρηση περιλαμβάνει εκτός άλλων και την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος.

Στη συνέχεια θα γίνει ο καθαρισμός της πρωτεΐνης μέσω της χρωματογραφίας στήλης με σφαιρίδια Νικελίου. Τα σφαιρίδια που χρησιμοποιούνται (Nickel NTA Agarose Resin beads), δηλαδή σφαιρίδια αγαρόζης τα οποία διαθέτουν ακινητοποιημένα ιόντα Νικελίου

(Ni²⁺). Τα σφαιρίδια χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό πρωτεϊνών που διαθέτουν ετικέτα μορίων Ιστιδίνης, λόγω της συγγένειας που τα ίδια παρουσιάζουν προς τα ιόντα Νικελίου.

Προσθήκη κατάλληλου όγκου σφαιριδίων σε στήλη χρωματογραφίας. Για τα 50ml διαλύματος λύσης, χρησιμοποιούνται 500μl σφαιρίδια. Μετά ακολουθεί:

- Τρεις πλύσεις με δεκαπλάσιο όγκο (5 ml) διαλύματος πλύσης και επαναιώρηση των σφαιριδίων σε διπλάσιο όγκο (1 ml) διαλύματος πλύσης.
- Ανάμειξη βακτηριακού εκχυλίσματος και σφαιριδίων εντός falcon tube.
- Επώαση στους 4°C, υπό ανάδευση, για ~ 1,5 ώρες.
- Μετά την επώαση, στα σφαιρίδια θα έχει προσδεθεί η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος (His-MAX), ενώ στο βακτηριακό εκχύλισμα θα περιέχονται όλες οι υπόλοιπες πρωτεΐνες.
- Διαχωρισμός σφαιριδίων (με την προσδεμένη πρωτεΐνη) από το εκχύλισμα μέσω φυγοκέντρησης : στις 3000 rpm, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία σταθερή και ίση με 4°C.
- Απόρριψη υπερκειμένου (εκτός από ~ 1ml) και επαναιώρηση των σφαιριδίων στο εναπομείναν υπερκείμενο.
- Μεταφορά των σφαιριδίων σε στήλη χρωματογραφίας.
- Δύο πλύσεις με δεκαπλάσιο όγκο- σε σχέση με τον όγκο των σφαιριδίων διαλύματος πλύσης (5ml).
- Δύο πλύσεις με δεκαπλάσιο όγκο διαλύματος πλύσης + 20mM Ιμιδαζόλιο.
- Δύο πλύσεις με δεκαπλάσιο όγκο διαλύματος πλύσης + 50mM Ιμιδαζόλιο.
- Έκλυση με εισαγωγή δεκαπλάσιου όγκου διαλύματος πλύσης + 250mM Ιμιδαζόλιο (elution buffer).
- Απομονώνονται τα διαδοχικά εκλούσματα, καθώς το elution buffer εξέρχεται από την στήλη.

Το πρώτο έκλυσμα αναμένεται να μην έχει πρωτεΐνη (λόγω του νεκρού όγκου μεταξύ των σφαιριδίων), καθώς και μετά το έκτο έκλυσμα αναμένεται να έχει αποδεσμευτεί όλη

η διαθέσιμη πρωτεΐνη. Στα διαδοχικά εκλούσματα γίνεται ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης μέσω της μεθόδου Bradford. Τα εκλούσματα, μετά τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του καθενός, αποθηκεύονται στους -20°C .

3.1.6 Λύση των βακτηρίων της πρωτεΐνης MYC

Το μόνο που απαιτείται να προηγηθεί πριν τη δοκιμασία του Pull-Down, είναι η λύση των βακτηρίων και αποθήκευση του εκχυλίσματος στους -80°C , έως τη χρήση του. Να σημειωθεί ότι επειδή οι πρωτεΐνες στο εκχύλισμα είναι εύκολο να αλλοιωθούν με την πάροδο του χρόνου, προτιμάται να γίνεται η λύση των βακτηρίων σταδιακά (πχ ανά 10 ml επαναιωρημένων βακτηρίων σε διάλυμα λύσης) και όχι του συνολικού όγκου (50ml). Ο υπόλοιπος όγκος αποθηκεύεται στους -20°C έως τη χρήση. Αναλυτικότερα τα βήματα είναι:

- Λύση των βακτηρίων, με εφαρμογή υπερήχων (sonication), για 10 ml επαναιωρημένων βακτηρίων σε διάλυμα λύσης:
 - Ένταση υπερήχων (Amplitude)= 35%
 - 6 κύκλοι ο Διάρκεια = 10 δευτερόλεπτα ο κύκλος
 - Το δείγμα διατηρείται σε πάγο.
- Φυγοκέντρηση στις 15.000 rpm, για 1 ώρα, σε θερμοκρασία σταθερή και ίση με 4°C .
- Απομόνωση υπερκειμένου (είναι το βακτηριακό εκχύλισμα) και αποθήκευση στους -80°C [επιλέγεται η αποθήκευση σε μερίδες (aliquots), ώστε να ξεπαγώνει κάθε φορά μόνο ο απαιτούμενος όγκος].

3.1.7 Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης- Μέθοδος Bradford

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης που περιέχεται στο διάλυμα χρησιμοποιείται μια φασματοφωτομετρική τεχνική, η μέθοδος Bradford. Συγκεκριμένα, αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα χρωστικής με ανάμειξη 800ml ddH₂O (Double Distilled

Water) και 200μl Bradford (Bio-Rad). Στο διάλυμα αυτό προστίθεται και όγκος δείγματος, του οποίου η συγκέντρωση πρωτεΐνης θέλουμε να προσδιοριστεί. Ακολουθεί ανάδευση και φωτομέτρηση στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα χρωστικής (800μl ddH₂O και 200μl Bradford), το οποίο αποτελεί το μηδέν της μέτρησης. Η τιμή της οπτικής απορρόφησης (OD_{595nm}) αντιστοιχίζεται με την συγκέντρωση που έχει το διάλυμα, μέσω πρότυπης καμπύλης. Για τον υπολογισμό της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις διαλύματος αλβουμίνης (Bovine Serum Albumin, BSA). Προσοχή χρειάζεται το γεγονός ότι για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο αρχικό δείγμα, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η αραίωση του δείγματος στο διάλυμα της χρωστικής.

3.1.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Μεταφορά κατάλληλου όγκου δείγματος (ανάλογα με την επιθυμητή προς ηλεκτροφόρηση ποσότητα πρωτεΐνης) σε διάλυμα Sample buffer (Cτελ=1X), με τελικό όγκο τα 20μl, με προσθήκη κατάλληλου όγκου ddH₂O. Βρασμός για 5 λεπτά και spin (6000 rpm, 5 δευτερόλεπτα), ώστε να «πέσει» ο όγκος του δείγματος που μετατοπίστηκε στα τοιχώματα, λόγω του βρασμού. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Ο πρωτεϊνικός μάρτυρας που χρησιμοποιείται είναι ο BlueStar Prestained Protein Marker (MWP03, Nippon Genetics).

Το πήκτωμα μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης μπορεί:

- είτε να βαφτεί με την χρωστική Coomassie brilliant blue (40% v/v Methanol, 10% v/v Acetic Acid, 0,15 % w/v Coomassie brilliant blue R-250), όπως συμβαίνει για 34 το πάνω μέρος του πηκτώματος που περιέχει την GST-MYC πρωτεΐνη.
- είτε να πραγματοποιηθεί ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western blotting), όπως συμβαίνει για το κάτω μέρος του πηκτώματος που περιέχει την His-MAX πρωτεΐνη. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (GE Healthcare Life Sciences).

Επώαση με διάλυμα δέσμευσης [blocking buffer, 5 % w/v γάλα σε διάλυμα PBS για 1 ώρα, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Γίνεται με τον τρόπο αυτόν δέσμευση των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων.

- Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα, έναντι της πρωτεΐνης στόχου, για 1 ώρα, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Συγκεκριμένα για την MAX πρωτεΐνη, χρησιμοποιείται το α-max αντίσωμα σε αραίωση 1:5000.
- 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 α-rabbit, σε αραίωση 1:5000.
- Τέσσερις πλύσεις, των πέντε λεπτών η καθεμία, με διάλυμα PBS (1X)- Tween 20 (0,1%). 35 ο Επώαση της μεμβράνης για 5 λεπτά με αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας ECL (Roche Diagnostics GmbH).
- Εμφάνιση σήματος εντός κατάλληλης συσκευής προσδιορισμού χημειοφωταύγειας.

3.1.9 Ποσοτικοποίηση των ζωνών της μεμβράνης και δημιουργία γραφήματος

Η ποσοτικοποίηση των ζωνών πραγματοποιείται με το λογισμικό ImageJ (NIH). Η χρήση του συγκεκριμένου υπολογιστικού προγράμματος επιτρέπει τον προσεγγιστικό (όχι απόλυτο) 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 Microsoft Excel.

3.2 Εγκαθίδρυση δοκιμασίας σχηματισμού και μελέτης της αναστολής του συμπλόκου MYC/MAX μέσω της τεχνικής PullDown

Για τον έλεγχο του σχηματισμού του συμπλόκου MYC/MAX και και την μελέτη πιθανών αναστολέων του συμπλόκου, προηγούμενη ομάδα στο εργαστήριο εγκαθίδρυσε

μια μεθοδολογία βασισμένη στην αρχή PullDown. Τα βήματα για την πραγματοποίηση του πρωτοκόλλου είναι:

- Μεταφορά του απομονωμένου βακτηριακού εκχυλίσματος (που περιέχει την GST-MYC πρωτεΐνη) από τους -80°C σε πάγο, μέχρι να ξεπαγώσει.
- Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm, για πέντε λεπτά, στους 4°C .
- Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο υπερκείμενο του εκχυλίσματος με τη μέθοδο Bradford και διατήρηση του υπερκειμένου σε πάγο, έως τη χρήση.
- Δημιουργία διαλύματος αλβουμίνης ίδιας συγκέντρωσης με το βακτηριακό εκχύλισμα και διατήρηση σε πάγο.
- Διαμοιρασμός σφαιριδίων γλουταθειόνης (Glutathione Sepharose beads- Cytiva) ισόποσα σε σωληνάρια Eppendorf, από $\sim 35\mu\text{l}$ σφαιριδίων στο καθένα (προσοχή: πρέπει να προστεθεί ο ίδιος όγκος σφαιριδίων στις διαφορετικές συνθήκες). Ο αριθμός των σωληναρίων ισούται με τον αριθμό των συνθηκών που μελετώνται (στα οποία πρέπει να συνυπολογίζονται το αρνητικό και τα θετικά controls).
- Πλύσεις των διαμοιρασμένων σφαιριδίων δύο φορές, από $500\mu\text{l}$ διαλύματος πλύσης (50mM Tris $\text{pH}=7,5$, 100mM NaCl) για να απομακρυνθεί το διάλυμα αιθανόλης που περιέχει το stock.
- Προσθήκη σε κάθε Eppendorf του κατάλληλου όγκου βακτηριακού εκχυλίσματος, σύμφωνα με:
 - Αρνητικός μάρτυρας: Προστίθεται μόνο διάλυμα πλύσης ($\sim 100\mu\text{l}$) και διατηρείται στους 4°C , έως τη χρήση.
 - Θετικοί μάρτυρες: Επιλέγονται να δημιουργηθούν τρεις, σύμφωνα με: Προσθήκη στον πρώτο κατάλληλου όγκου εκχυλίσματος, ώστε να επιτευχθεί αναλογία mol των πρωτεϊνών 1 GST-MYC/ 10 His-MAX, κατά την τελική επώαση. Προσθήκη του μισού όγκου στον δεύτερο και το 1/10 του όγκου στον τρίτο μάρτυρα. Το 1/10 του όγκου προστίθεται μετά από κατάλληλη αραιώση του αρχικού δείγματος στο διάλυμα αλβουμίνης που παρασκευάστηκε νωρίτερα (για να αποφευχθεί ο χειρισμός πολύ μικρών όγκων).

- Δείγματα δοκιμής νέων πιθανών αναστολέων: Προστίθεται όγκος ίσος με εκείνο του πρώτου θετικού μάρτυρα.
- Συμπλήρωση με διάλυμα αλβουμίνης ίδιας συγκέντρωσης με το εκχύλισμα, έως τελικό όγκο το 1ml (σε όλα τα δείγματα εκτός του αρνητικού μάρτυρα, ο οποίος έχει αποθηκευτεί προσωρινά στους 4°C).
- Επώαση στους 4°C, υπό ανάδευση, για περίπου μιάμιση ώρες.
- Φυγοκέντρωση στις 14.000 rpm, για 1 λεπτό, στους 4°C και απόρριψη υπερκειμένου.
- Τρεις πλύσεις, με 500μl διάλυμα πλύσης η καθεμία.
- Προσθήκη σε όλα τα δείγματα (και στα σφαιρίδια απουσία GST-MYC, αφού πρώτα γίνει απόρριψη του διαλύματος πλύσης που είχε προστεθεί) από 100 μl διαλύματος δέσμευσης [blocking buffer- 50mM Tris (pH= 7,5), 100mM NaCl, 20mgr/ml BSA] και επώαση για 30 λεπτά, υπό ανάδευση, στους 4°C.
- Φυγοκέντρωση στις 14.000 rpm, για 1 λεπτό, στους 4°C και απόρριψη υπερκειμένου.
- Προσθήκη 50μl διαλύματος πλύσης σε όλα τα δείγματα και:
 - από 2 μl DMSO (Cτελ= 4%) (Dimethyl Sulfoxide- SIGMA) στον θετικό και στους αρνητικούς μάρτυρες (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 10 λεπτά, υπό ανάδευση, στους 4°C.
- Προσθήκη κατάλληλου όγκου His-MAX πρωτεΐνης, ώστε να ισχύει η τελική αναλογία mol 1 GST-MYC / 10 His-MAX κατά την επώαση. Η His-MAX πρωτεΐνη προστίθεται σε διάλυμα αλβουμίνης (C= 1mgr/ml), στο οποίο ο διαλύτης είναι το

διάλυμα πλύσης. Μεταφορά από 50μl του συγκεκριμένου διαλύματος (διάλυμα πλύσης+ αλβουμίνη+ His-MAX) σε κάθε δείγμα. Επώαση για 10 λεπτά, υπό ανάδευση, στους 4°C.

- Φυγοκέντρωση στις 14.000 rpm, για 1 λεπτό, στους 4°C. Αποθήκευση του υπερκείμενου στους -20°C (περιέχει ό,τι δεν δέθηκε στα σφαιρίδια και μπορεί να χρειαστεί να ελεγχθεί).
- Επτά πλύσεις, με 500μl διάλυμα πλύσης η καθεμία.
- Προσθήκη από 100μl διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης (glutathione elution buffer- 50mM Tris pH=8,5, 150 mM NaCl, 20mM reduced glutathione pH=8,5) σε κάθε δείγμα. Ήπια ανάδευση «χτυπώντας» το σωληνάριο στο πλάι με το χέρι.
- Φυγοκέντρωση στις 14.000 rpm, για 1 λεπτό, στους 4°C. Το υπερκείμενο είναι 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.

3.3 Εγκαθίδρυση δοκιμασίας σχηματισμού και μελέτης της αναστολής του συμπλόκου MYC/MAX μέσω της τεχνικής ELISA

Με βάση τα δεδομένα από προηγούμενα πειράματα που προέκυψαν από την χρήση της μεθοδολογίας PullDown, και με στόχο την επίτευξη βέλτιστων συνθηκών για την εξέταση πιθανών αναστολέων για το σύμπλοκο MYC/MAX οδηγηθήκαμε στην εγκαθίδρυση μια νέας μεθοδολογίας βασισμένη στην αρχή της ELISA. Τα βήματα για την πραγματοποίηση του πρωτοκόλλου είναι:

- Προετοιμασία των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για blocking και wash buffer.
- Προσθήκη 200μl από το blocking buffer σε όλα τα πηγαδάκια (glutathione coated 96 well plates) που θα χρησιμοποιηθούν και επώαση υπό ανάδευση για 40 λεπτά.
- Σε κάθε πείραμα υπολογίζονται τα δείγματα ως εξής:

- Θετικός μάρτυρας: 3 πηγαδάκια (x2) τα οποία περιέχουν σταθερή συγκέντρωση MYC και μειωμένη συγκέντρωση MAX και το αντίστοιχο 1ο και 2ο αντίσωμα.
- Αρνητικός μάρτυρας: 3 πηγαδάκια (x2) που περιέχουν μειωμένη συγκέντρωση MAX, απουσία της MYC και το αντίστοιχο 1ο και 2ο αντίσωμα.
- Δείγματα δοκιμής νέων πιθανών αναστολέων: κάθε συνθήκη περιέχει σταθερή συγκέντρωση MYC και σταθερή συγκέντρωση MAX, τον αναστολέα που πρόκειται να εξεταστεί και το αντίστοιχο 1ο και 2ο αντίσωμα.
- Προετοιμασία της πρωτεΐνης MYC:
 - Ξεπάγωμα από τους -80°C και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 14.000 rpm. Για κάθε πηγαδάκι υπολογίζεται 3μl βακτηριακό εκχύλισμα που περιέχει περίπου 0,6 pmol πρωτεΐνης.
 - Το βακτηριακό εκχύλισμα προστίθεται σε blocking buffer έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100μl για κάθε συνθήκη.
 - Σε κάθε συνθήκη που πρόκειται να εξετάσουμε προστίθενται 2μl από τον πιθανό αναστολέα. Στα δείγματα που λειτουργούν ως θετικό κοντρόλ αντί για τον αναστολέα προστίθενται 2μl DMSO.
 - Επώαση 15 λεπτά της MYC με τον πιθανό αναστολέα σε Eppendorf tubes.
 - Μετά το πέρας των 15 λεπτών, αφαιρείται το blocking buffer που προστέθηκε στο πρώτο βήμα και προστίθεται το περιεχόμενο που έχουν τα Eppendorf tubes. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα υπό ανάδευση.
- Μετά την επώαση, αφαιρείται το περιεχόμενο από τα πηγαδάκια και ακολουθούν 5 πλύσεις με 200μl wash buffer η κάθε μια.
- Στο positive control προστίθενται 100μl blocking buffer με 2μl DMSO, ενώ στα δείγματα προς δοκιμή προστίθενται 100μl blocking buffer και 2μl του πιθανού αναστολέα. Επώαση για 10 λεπτά υπό ανάδευση.
- Προετοιμασία MAX:
 - Ξεπάγωμα της MAX και φυγοκέντρωση στις 14.000 rpm για 3 λεπτά.

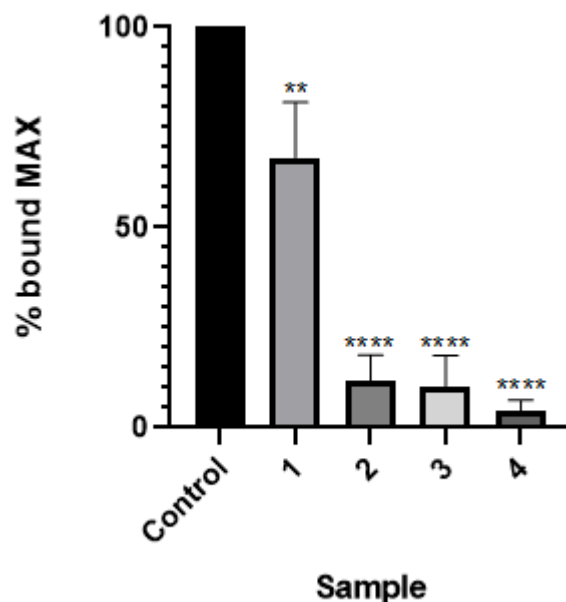
- Σε 3 διαφορετικά σωληνάρια που περιέχουν 100μl blocking buffer/συνθήκη προσθέτουμε MAX (x, x/3, x/9).
 - Στα πηγαδάκια που περιέχουν τον θετικό και αρνητικό μάρτυρα προστίθενται 100μl από το διάλυμα που έχει ετοιμαστεί και 2μl DMSO. Στις συνθήκες που εξετάζονται, γίνεται προσθήκη του διαλύματος με την μεγαλύτερη συγκέντρωση MAX (x) και 2μl από τον αναστολέα. 2 λεπτά επώαση υπό ανάδευση.
- Αφαίρεση του περιεχομένου και πλύση με 200μl διάλυμα πλύσης για 5 φορές.
 - Προσθήκη 200μl blocking buffer και επώαση για 5 λεπτά.
 - Αφαίρεση του blocking buffer και προσθήκη 100μl διαλύματος που περιέχει 1:200 το αντίσωμα α-max. 1 ώρα επώαση υπό ανάδευση.
 - Αφαίρεση του περιεχομένου και πλύση με 200μl διάλυμα πλύσης για 5 φορές.
 - Προσθήκη 200μl blocking buffer και επώαση για 5 λεπτά.
 - Αφαίρεση του blocking buffer και προσθήκη 100μl διαλύματος που περιέχει 1:200 το αντίσωμα α-rabbitHRP. 40 λεπτά επώαση υπό ανάδευση.
 - Αφαίρεση του περιεχομένου και πλύση με 200μl διάλυμα πλύσης για 5 φορές.
 - Προσθήκη 200μl blocking buffer και επώαση για 5 λεπτά.
 - Προσθήκη 200μl OPD.
 - Προσθήκη 50μl H₂SO₄.
 - Μέτρηση απορρόφηση στους 492nm.

4. Αποτελέσματα

4.1 Μέθοδος βασισμένη στην αρχή PullDown

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η μέθοδος που βασίστηκε στην αρχή PullDown εγκαθιδρύθηκε από προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου και είναι μια καλά καθορισμένη μεθοδολογία η οποία χρησιμοποιείται στο εργαστήριο για να εξετάζονται καινούργιοι πιθανοί αναστολείς.

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται μερικές καινούργιες χημικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν για τον έλεγχο την αναστολή τους. Οι ενώσεις 2, 3 και 4 φαίνονται αρκετά υποσχόμενες ενώσεις για την αναστολή του συμπλόκου MYC/MAX.



Εικόνα 7- Ποσοστό αναστολής από καινούργιες χημικές ενώσεις που στοχεύουν το σύμπλοκο MYC/MAX. Ο έλεγχος των ενώσεων πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθοδολογίας PullDown.

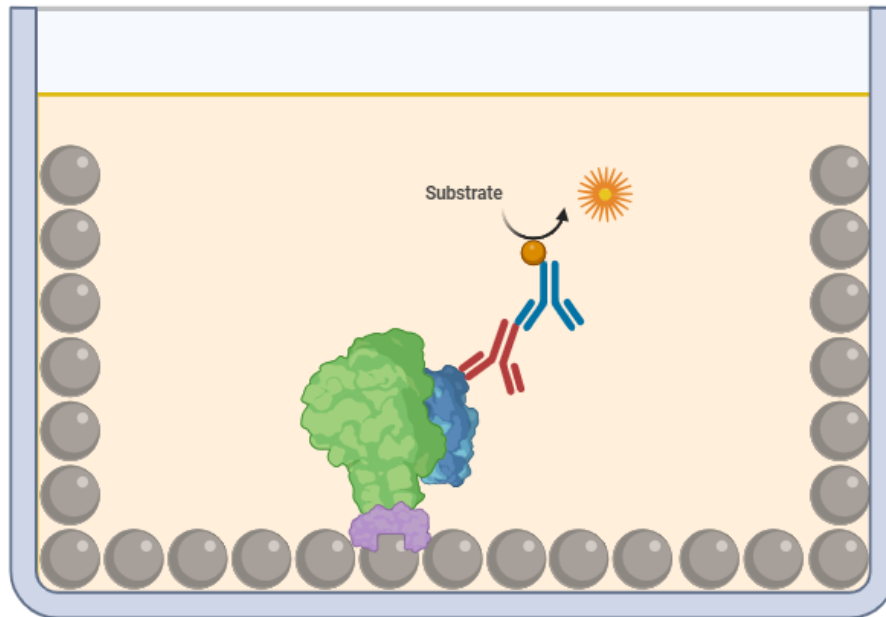
4.2 Μέθοδος βασισμένη στην αρχή ELISA

Βασισμένοι στη μέθοδο PullDown που ανέπτυξε προηγούμενη ομάδα στο εργαστήριο, εγκαθιδρύθηκε μια καινούργια μέθοδος, με στόχο την βελτίωση ορισμένων παραμέτρων οι οποίες με την προηγούμενη μεθοδολογία ήταν δύσκολο να επιτευχθούν. Για την εγκαθίδρυση της μεθόδου ELISA, απαιτήθηκε η τροποποίηση μερικών αναγκαίων σημείων, προκειμένου το πρωτόκολλο να λειτουργήσει με τον βέλτιστο δυνατό τρόπο.

4.2.1 Έλεγχος του σχηματισμού του συμπλόκου

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα που βασίζονται στην αρχή της ELISA παρατηρήθηκε πως ο σχηματισμός του συμπλόκου είναι επιτυχής. Επίσης είναι δυνατή η αναστολή της δημιουργίας του συμπλόκου με την χρήση γνωστών αναστολέων. Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι τα αποτελέσματα μπορούν να επαναληφθούν και είναι εύκολα ερμηνεύσιμα.

Στην Εικόνα 8 αναπαριστάται ο σχηματισμός του συμπλόκου και το ανιχνεύσιμο σήμα που προκύπτει μετά την προσθήκη των αντισωμάτων. Το ανιχνεύσιμο σήμα αντιστοιχεί στο ποσοστό της πρωτεΐνης MAX, διότι η πρώτο αντίσωμα είναι ειδικό για την MAX. Στην περίπτωση που η τιμή της απορρόφησης είναι μεγάλη σημαίνει πως μεγάλη ποσότητα της MAX προσδένεται στην GST-MYC με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του συμπλόκου. Άρα, μεγάλη τιμή απορρόφησης σημαίνει επιτυχή σχηματισμός του συμπλόκου. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον σχηματισμό του συμπλόκου ποικίλουν και μπορεί να είναι από τους πιο απλούς στους πιο σύνθετους.



Εικόνα 8 - Σχηματισμός του συμπλόκου μεταξύ της GST-MYC (μοβ και πράσινο) και της MAX (μπλε). Η ετικέτα GST επιτρέπει στην MYC να προσδεθεί στα πηγαδάκια που θα λάβει χώρα το πείραμα. Με την προσθήκη της MAX επιτυγχάνεται ο σχηματισμός του συμπλόκου. Το πρώτο αντίσωμα, α -max (κόκκινο), προσδένεται ειδικά στην MAX. Το δεύτερο αντίσωμα, α -rabbit (μπλε) προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα και είναι συζευγμένο με HRP (Horseradish peroxidase), καταλύει την οξείδωση των υποστρωμάτων παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου με αποτέλεσμα την εκπομπή του φωτός. Το σήμα που εκπέμπεται είναι αντιπροσωπευτικό της ποσότητας της MAX.

4.2.2 Χρόνος επώασης

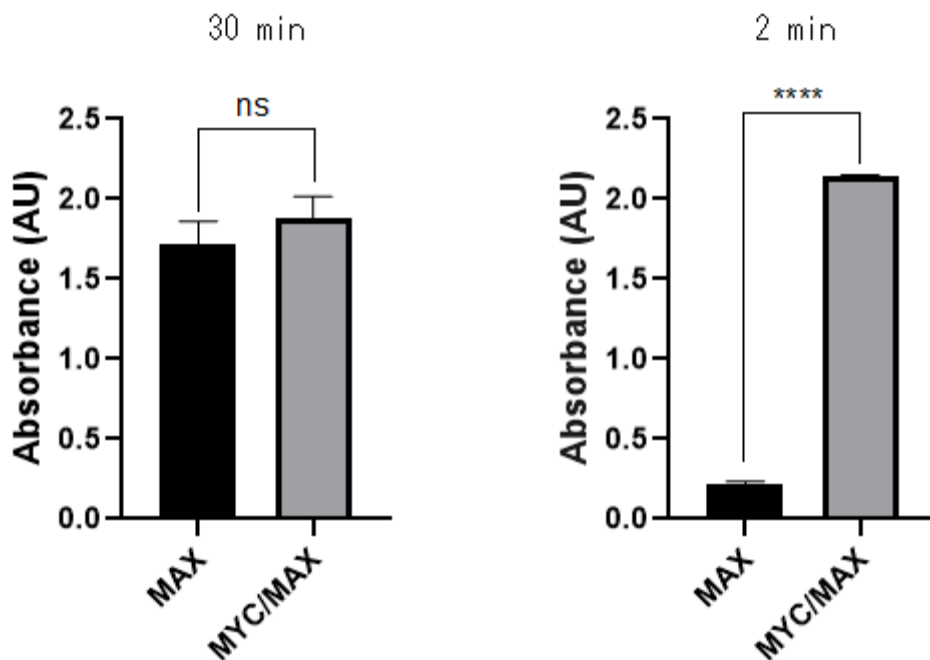
Κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων για την εγκαθίδρυση των πειραμάτων παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος επώασης των πρωτεϊνών GST-MYC/MAX στα πιάτα καλυμμένα με γλουταθειόνη παίζει καθοριστικό ρόλο στην δημιουργία του συμπλόκου. Η επώαση με την GST-MYC απαιτεί μεγάλο χρόνο επώασης (περίπου 1 ώρα) έτσι ώστε να προσδεθεί στην γλουταθειόνη όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης (GST-MYC), άρα να υπάρχει μεγάλη ποσότητα υποστρώματος για να προσδεθεί η MAX και να σχηματιστεί το σύμπλοκο.

Σε αντίθεση με την GST-MYC, η πρωτεΐνη MAX απαιτεί μικρό χρόνο επώασης. Αρχικά, η επώαση με τη MAX διήρκεσε για 30 λεπτά, ωστόσο διαπιστώθηκε ότι αυτό προκαλούσε ένα σοβαρό πρόβλημα. Σε αυτήν την περίπτωση, το σύμπλοκο έχει μεν δημιουργηθεί, αλλά ένα μεγάλο ποσοστό του σήματος που ανιχνεύεται οφείλεται σε μη ειδική πρόσδεση της MAX, με αποτέλεσμα να είναι μικρό το πραγματικό ποσοστό του συμπλόκου που έχει δημιουργηθεί.

Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε με χρήση του αρνητικού μάρτυρα, από τον οποίο στο απουσιάζει η MYC. Με το δείγμα αυτό κατέστη φανερό πως η MAX που ανιχνεύεται δεν συνδέεται με την MYC, καθώς αυτή απουσιάζει από τον αρνητικό μάρτυρα, αλλά στην επιφάνεια του πηγαδιού, μη ειδικά.

Με την μείωση του χρόνου επώασης της MAX από 30 λεπτά στα 2 λεπτά, εξασφαλίστηκε μικρή τιμή θορύβου και μεγάλη τιμή του σχηματισμένου συμπλόκου, αντιμετωπίζοντας έτσι το πρόβλημα με την μη ειδική πρόσδεση της MAX.

Στην Εικόνα 9 είναι εμφανές ότι υπάρχει σαφής διαφορά της ποσότητας της MAX μεταξύ του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα (παράθυρο ειδικού σήματος).



Εικόνα 9 - Σχηματισμός του συμπλόκου σε δύο διαφορετικές συνθήκες. Αριστερά φαίνεται η συνθήκη κατά την οποία η επώαση με την MAX έγινε για 30 λεπτά. Σε αυτή τη συνθήκη η MAX προσδένεται μη ειδικά στο πηγαδάκι και η ποσότητα του συμπλόκου (η διαφορά μεταξύ του συμπλόκου και της σκέτης MAX) που σχηματίζεται είναι πολύ μικρή. Στα δεξιά φαίνεται η περίπτωση που η GST-MYC επώαστηκε μόνο για 2 λεπτά με την MAX. Σε αυτή την περίπτωση η ποσότητα του συμπλόκου που δημιουργήθηκε έχει μεγάλη διαφορά με την μη ειδικά προσδεσμένη MAX, επιτρέποντας τον έλεγχο πιθανών αναστολέων.

4.2.3 Προσαρμογή των συγκεντρώσεων MYC/MAX που χρησιμοποιήθηκαν

Για την βέλτιστη δημιουργία του συμπλόκου, πέρα από τον χρόνο επώασης, πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν και οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών που θα χρησιμοποιήσουμε. Βασικό σημείο αναφοράς κατά τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων είναι το γεγονός ότι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης MAX θα είναι σε κάθε περίπτωση μεγαλύτερη από την συγκέντρωση της GST-MYC. Αυτό συμβαίνει για δύο βασικούς λόγους: πρώτον, η πρωτεΐνη MAX διακρίνεται για την ιδιότητα της να υποστεί ομοδιμερισμό, οδηγώντας στην απώλεια μιας ποσότητας μέσω της διαδικασίας αυτής. Ο δεύτερος λόγος οφείλεται

στην ανάγκη για πλήρη κάλυψη των θέσεων GST-MYC με την MAX, έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή συσχέτιση του συμπλόκου.

Θεωρητικά όταν η MAX καλύπτει όλες τις διαθέσιμες θέσεις που περιέχουν GST-MYC, με την προσθήκη του πιθανού αναστολέα μπορούμε να προσδιορίσουμε την αναστολή με βάση τη μείωση του σήματος και κατ'έπекταση του συμπλόκου. Μετά την δοκιμή μιας ποικιλίας συνδυασμών μεταξύ διαφορετικών συγκεντρώσεων GST-MYC/MAX, προέκυψε το συμπέρασμα ότι ο συνδυασμός 0,6 pmol GST-MYC και 20 pmol His-MAX (γραμμομοριακή αναλογία GST-MYC/His-MAX=3/100) δείχνει δυναμικό εύρος σχηματισμού συμπλόκου. Έτσι, αυτές οι συνθήκες ανάλυσης φαίνεται να είναι βέλτιστες για τη διαλογή νέων αναστολέων κατά τον σχηματισμού συμπλόκου GST-MYC/MAX και την αξιολόγηση της ανασταλτικής τους δράσης.

2.2.4 Δοσοεξαρτώμενη δημιουργία του συμπλόκου

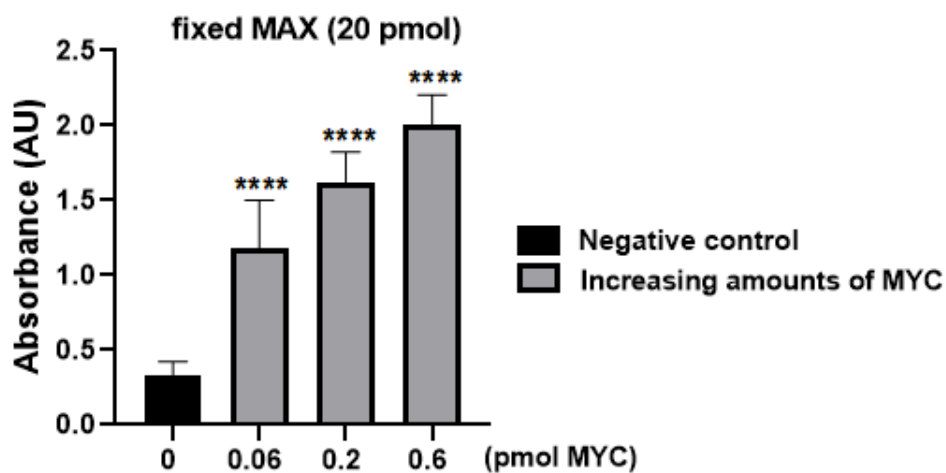
Είναι πολύ σημαντικό στο πείραμα ο καθορισμός των κατάλληλων ποσοτήτων GST-MYC και MAX που θα χρησιμοποιηθούν έτσι ώστε να επιτευχθεί μέγιστη τιμή του σχηματισμένου συμπλόκου, καθώς και ελάχιστη τιμή θορύβου. Η ποσότητες αυτές πρέπει να είναι ιδανικές για τον έλεγχο καινούργιων αναστολέων.

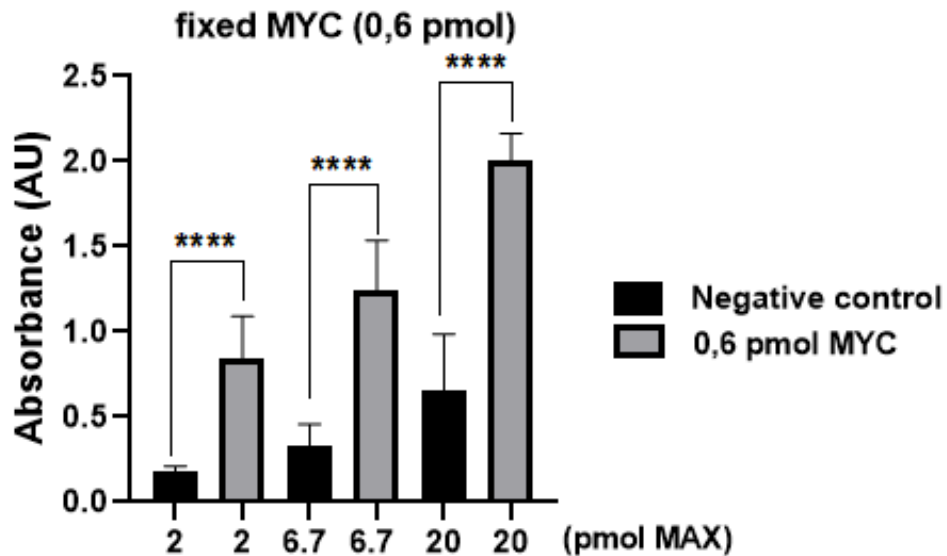
Από την παρατήρηση της Εικόνας 10, μπορεί να εξαχθεί ένα σημαντικό συμπέρασμα, το οποίο αφορά στη δημιουργία του συμπλόκου, η οποία συνδέεται αναλογικά με την ποσότητα μίας από τις πρωτεΐνες που προστίθενται. Έτσι, η μείωση της συγκέντρωσης είτε της GST-MYC, είτε της MAX, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του σχηματισμού του συμπλόκου. Αυτό είναι σημαντικό καθώς μας βοηθάει να ποσοτικοποιήσουμε την αναστολή που προκύπτει από τον έλεγχο πιθανών αναστολέων.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα η μείωση της συγκέντρωσης της GST-MYC στο 1/3 οδηγεί στη μείωση της ποσότητας του συμπλόκου που δημιουργείται, αλλά όχι με ανάλογη μείωση της ποσότητάς του. Για αυτόν τον λόγο δοκιμάστηκε η χρήση μειωμένων συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης MAX. Στην περίπτωση αυτή, η μείωση του σχηματισμού

του συμπλόκου συμβαίνει σε ένα σημαντικό βαθμό, ωστόσο και πάλι δεν είναι ανάλογη της μείωσης την συγκέντρωσης της MAX, το οποίο είναι αναμενόμενο, εφόσον η συγκέντρωση της MAX είναι μεγαλύτερη της GST-MYC σε όλες της περιπτώσεις. Η μείωση αυτή συμβαίνει ως αποτέλεσμα του ομοδιμερισμού της MAX, με τον ανταγωνισμό της MAX για πρόσδεση στην MYC σε υψηλότερη συγκέντρωση να είναι εντονότερος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία υψηλότερου ποσοστού συμπλόκου. Με τη μείωση της συγκέντρωσης της MAX, παρατηρείται μείωση του ανταγωνισμού για την MYC, με αποτέλεσμα τη μειωμένη δημιουργία του συμπλόκου, παρά το γεγονός ότι η συγκέντρωση της MAX υπερβαίνει την τιμή της MYC σε κάθε περίπτωση.

Από τις δύο αυτές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, κρίθηκε καταλληλότερη η δεύτερη, καθώς το αποτέλεσμα είναι πιο αντιπροσωπευτικό και συμβάλλει στην ποσοτικοποίηση της αναστολής των χημικών μορίων που θα εξεταστούν.





Εικόνα 10 - Στο πάνω μέρος της εικόνας φαίνεται η μείωση του σήματος, δηλαδή του συμπλόκου που σχηματίζεται, δοκιμάζοντας τρεις διαφορετικές συνθήκες στις οποίες προσθέτουμε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις GST-MYC στη κάθε μια. Στο κάτω μέρος της εικόνας παρατηρείται το ίδιο αλλά αυτή τη φορά με μειωμένη συγκέντρωση της πρωτεΐνης MAX.

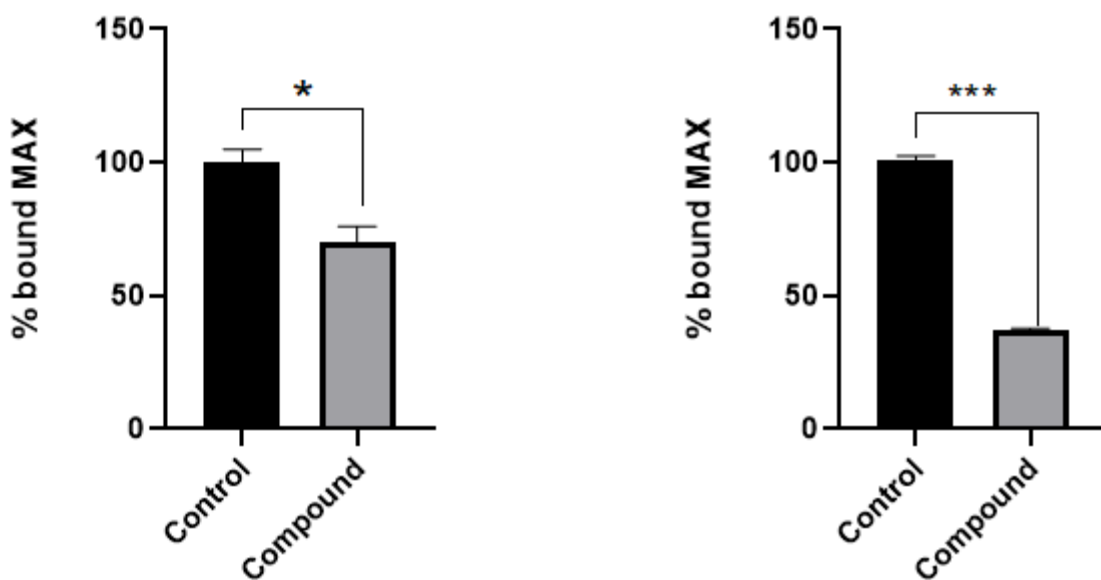
4.2.5 Επώαση με τους πιθανούς αναστολείς

Κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων πέρα από τους παράγοντες που καθορίζουν τον σχηματισμό του συμπλόκου, διαπιστώθηκε πως και η επώαση με τον πιθανό αναστολέα παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση της μεθοδολογίας. Αρχικά η επώαση με τους πιθανούς αναστολείς γινόταν σε δύο στάδια.

Η πρώτη επώαση λαμβάνει χώρα μετά την πρόσδεση της GST-MYC στην γλουταθειόνη και μετά της πλύσεις που ακολουθούν την πρόσδεση της GST-MYC. Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνεται η περίσσεια τις πρωτεΐνης που δεν έχει προσδεθεί. Ακολουθεί επώαση με blocking buffer για 15 λεπτά ώστε να δεσμευτούν τυχόν μη ειδικές θέσεις και ακολουθεί επώαση με τον πιθανό αναστολέα για 10 λεπτά. Μετά την πρώτη επώαση ακολουθούν ξανά πλύσεις με διάλυμα πλύσης και μια 5λεπτη επώαση με blocking

buffer. Αμέσως μετά ακολουθεί επώαση με την πρωτεΐνη MAX η οποία βρίσκεται σε blocking buffer και στην οποία έχει προστεθεί και ο πιθανός αναστολέας. Η επώαση διαρκεί για 2 λεπτά και ακολουθείται από πλύσεις ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της MAX.

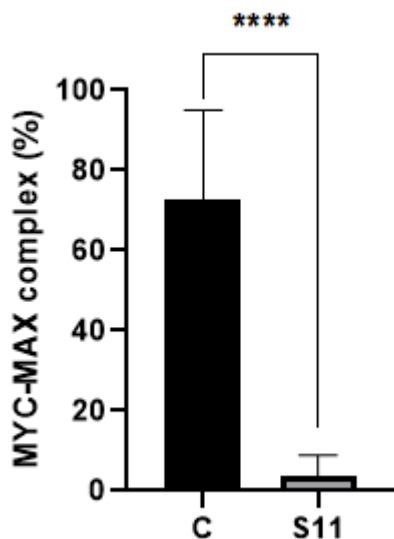
Δεδομένου ότι ο πιθανός αναστολέας είναι σχεδιασμένος ώστε να δρα στην περιοχή αλληλεπίδρασης GST-MYC/MAX θεωρήθηκε σημαντικό η επώαση να γίνει σε 3 στάδια: α) να γίνει η επώαση με MYC και τον πιθανό αναστολέα 15 λεπτά πριν ακολουθήσει η επώαση της MYC στα πιάτα. β) Μετά από την πρώτη επώαση ακολουθούν πλύσεις έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια MYC και αναστολέα, λαμβάνει χώρα η επώαση μόνο με τον αναστολέα για 10 λεπτά και γ) δίλεπτη επώαση μαζί με την MAX χωρίς ενδιάμεσες πλύσεις. Πράγματι, ο αναστολέας στην δεύτερη περίπτωση φαίνεται να έχει μεγαλύτερη ανασταλτική δράση σε σύγκριση με την πρώτη περίπτωση που γινόταν μόνο δύο επώσεις. Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 11.



Εικόνα 11 - Στο γράφημα αριστερά φαίνεται η περίπτωση όπου η επώαση με τον αναστολέα S11 έγινε σε δύο στάδια και η αναστολή δεν έχει επιτευχθεί σε μεγάλο βαθμό. Στα δεξιά φαίνεται η περίπτωση όπου η επώαση με τον αναστολέα έχει γίνει σε τρία στάδια και η αναστολή που έχει επιτευχθεί είναι μεγαλύτερη από την πρώτη περίπτωση.

4.2.6 Δοκιμασία γνωστών αναστολέων του συμπλόκου GST-MYC/MAX

Για τη διασφάλιση της ορθότητας των πειραμάτων μετά την καθιέρωση της μεθόδου, εξετάστηκε εάν οι αναστολείς που έχουν αξιολογηθεί με προηγούμενη μέθοδο θα εμφανίσουν τα ίδια αποτελέσματα με τη χρήση του καινούργιου πρωτοκόλλου που έχει καθιερωθεί.



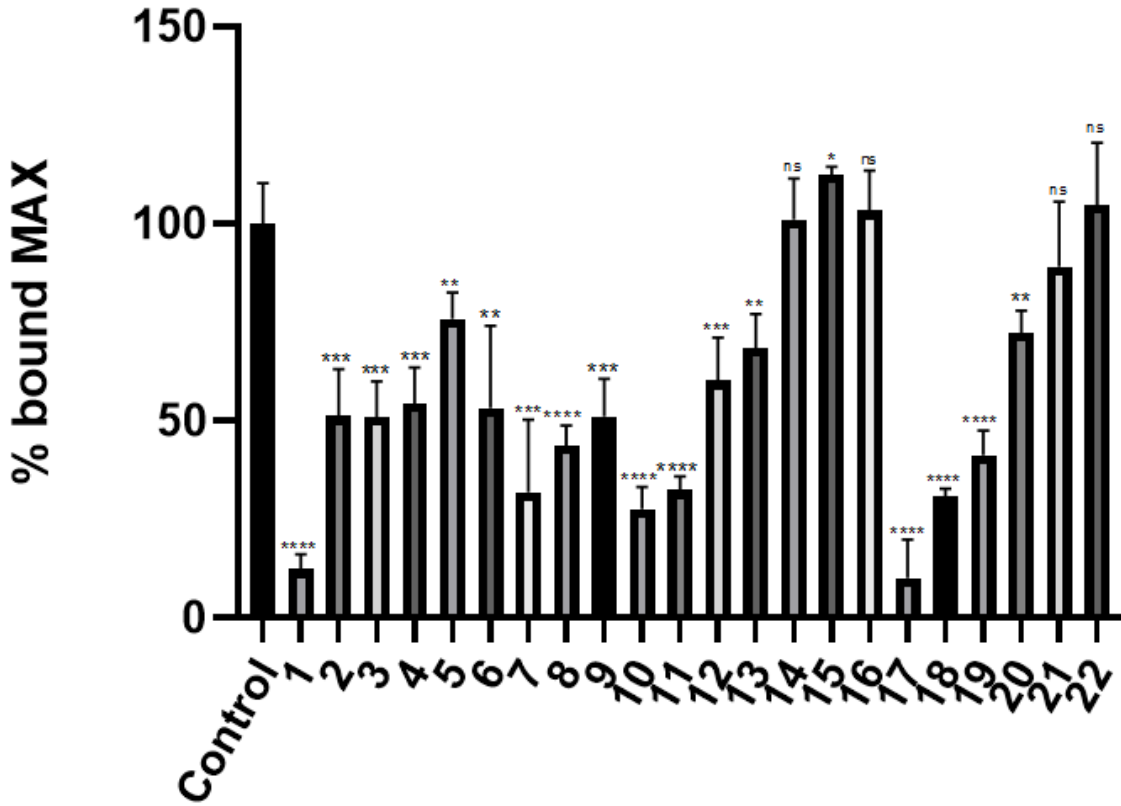
Εικόνα 12 - Ποσοστό αναστολής από γνωστό αναστολέα που έχουμε εντοπίστηκε με προηγούμενη μέθοδο. Όπως ήταν αναμενόμενο ο αναστολέας S11 δείχνει μεγάλο ποσοστό αναστολής του συμπλόκου.

4.2.7 Δοκιμασία καινούργιων πιθανών αναστολέων για το σύμπλοκο GST-MYC/MAX

Η δοκιμασία καινούργιων αναστολέων με την μέθοδο ELISA είναι αρκετά εύκολη και γρήγορη διαδικασία. Η επαναληψιμότητα των πειραμάτων αποτελεί ένα στοιχείο που μας διαβεβαιώνει για την ορθότητα και την αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου"

Στην Εικόνα 13 απεικονίζονται ορισμένα καινούργια χημικά μόρια που έχουν σχηματιστεί ειδικά για την αναστολή του συμπλόκου MYC/MAX, τα οποία τα εξετάζονται για την ανασταλτική τους δράση. Μερικά από τα χημικά μόρια φαίνονται αρκετά

υποσχόμενα και αναστέλλουν σε μεγάλο βαθμό την δημιουργία του συμπλόκου (10-50% αναστολή).



Εικόνα 13 - Έλεγχος της αναστολής πιθανών αναστολέων για το σύμπλοκο GST-MYC/MAX.

5. Συζήτηση

Η πρωτεΐνη MYC είναι μία ογκοπρωτεΐνη που λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας. Μέλη της οικογένειας MYC στον άνθρωπο εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια μεταξύ τους αλλά και με μέλη της οικογένειας MYC σε άλλα είδη. Αυτό υποδηλώνει πως η MYC είναι πολύ σημαντική πρωτεΐνη που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ομαλή λειτουργία του κυττάρου. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη c-MYC είναι στο επίκεντρο της έρευνας τα τελευταία χρόνια διότι όταν η έκφρασή της διαταράσσεται, οδηγεί στην δημιουργία του καρκίνου.

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η εγκαθίδρυση μιας μεθοδολογίας που βασίστηκε στην ήδη υπάρχουσα, με σκοπό να βελτιωθούν ορισμένοι παράμετροι που θα επιτρέπουν μια πιο πρακτική και εφικτή διαχείριση και επιλογή νέων αναστολέων για το σύμπλεγμα MYC/MAX. Για την επίτευξη του στόχου αυτού αποφασίστηκε η μεθοδολογία να βασίζεται στην αρχή της ELISA. Μέσω της αρχής ELISA μπορούμε να πετύχουμε την εξέταση ενός μεγάλου αριθμού πιθανών αναστολέων σε περιορισμένο χρόνο.

Για να είναι εφικτός ο έλεγχος της αναστολής νέων πιθανών αναστολέων έπρεπε αρχικά να οριστούν οι ιδανικές ποσότητες των πρωτεϊνών GST-MYC και MAX που θα χρησιμοποιηθούν. Μετά από πολλές δοκιμές, διαπιστώθηκε ότι ο συνδυασμός 0,6μmol MYC και 20μmol MAX είναι ο ιδανικός συνδυασμός ώστε να δημιουργηθεί επαρκής ποσότητα συμπλόκου και να μπορέσουμε να αξιολογήσουμε την αναστολή των χημικών μορίων.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας συνδέεται με τον χρόνο επώασης των πρωτεϊνών που σχηματίζουν το σύμπλοκο. Ενώ η πρωτεΐνη MYC απαιτεί μακρύτερο χρόνο επώασης σε πιάτα με γλουταθειόνη, η MAX αλληλεπιδρά με την MYC και σχηματίζει το σύμπλοκο σε μόλις 2 λεπτά.

Άλλοι παράγοντες όπως είναι ο αριθμός των πλύσεων μεταξύ των επώασεων με τις πρωτεΐνες και τους πιθανούς αναστολείς αλλά και η σύσταση των διαλυμάτων πλύσεις και δέσμευσης παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Με την πλέον εγκαθιδρυμένη μέθοδο, η αναστολή πολλών μικρών μορίων ελέγχθηκε και διαπιστώθηκε ότι πολλά εξ αυτών προκαλούν σημαντική αναστολή στη δημιουργία του συμπλόκου. Τα μόρια τα οποία δείχνουν μεγάλα ποσοστά αναστολής με την δοκιμασία *in vitro*, επιλέγονται για να μελετηθούν περαιτέρω με *in vitro* και *in vivo* πειράματα έτσι ώστε να αξιολογηθούν για το αν είναι κατάλληλα για την θεραπεία του καρκίνου.

Κλείνοντας, η εγκαθίδρυση της μεθόδου η οποία βασίζεται στην αρχή της ELISA λειτουργεί ως πρώτη γραμμή ελέγχου για τα καινούργια μόρια που προτείνονται για την θεραπεία του καρκίνου που προκαλείται από την δυσλειτουργία της πρωτεΐνης MYC. Για αυτό τον λόγο, σημαντικά κριτήρια εγκαθίδρυσης αυτής της μεθόδου ήταν η μέθοδος να είναι γρήγορη, οικονομική και πάνω από όλα αποτελεσματική. Ωστόσο, η μέθοδος παρουσιάζει κάποιους περιορισμούς καθώς πέρα από τον έλεγχο μορίων που δρουν ειδικά στην περιοχή μεταξύ των πρωτεϊνών MYC και MAX, δεν είναι δυνατό να ελεγχθούν μόρια που θα παρεμποδίζουν την πρόσδεση του συμπλόκου στο DNA ή άλλες διεργασίες που οδηγούν στη δημιουργία καρκίνου.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Suva, M. L., Riggi, N. & Bernstein, B. E. (2013). Epigenetic Reprogramming in Cancer. *Science* 339, 1567–1570.
2. Cooper, G. Tumor Suppressor Genes. in *The Cell A Molecular Approach*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9894/> (2000).
3. Kanwal, Shahzina. (2013). Effect of O-GlcNAcylation on tamoxifen sensitivity in breast cancer derived MCF-7 cells.
4. Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 6;92(12):5258-65.
5. Michor, Franziska & Iwasa, Yoh & Nowak, Martin. (2004). Dynamics of cancer progression. *Nature reviews. Cancer*. 4. 197-205. 10.1038/nrc1295.
6. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, Diakosavvas M, Angelou K, Tsatsaris G, Pagkalos A, Ntounis T, Fasoulakis Z. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res*. 2020 Nov;40(11):6009-6015.
7. Joyce C, Rayi A, Kasi A. Tumor-Suppressor Genes. [Updated 2023 Aug 28]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532243/>
8. Chen, H., Liu, H. & Qing, G. Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Sig Transduct Target Ther* **3**, 5 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0008-7>
9. Ahmadi, S.E., Rahimi, S., Zarandi, B. *et al*. MYC: a multipurpose oncogene with prognostic and therapeutic implications in blood malignancies. *J Hematol Oncol* **14**, 121 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01111-4>
10. DePinho R, Mitsock L, Hatton K, Ferrier P, Zimmerman K, Legouy E, Tesfaye A, Collum R, Yancopoulos G, Nisen P, et al. Myc family of cellular oncogenes. *J Cell Biochem*. 1987 Apr;33(4):257-66.
11. Tansey, William P., Mammalian MYC Proteins and Cancer, *New Journal of Science*, 2014, 757534, 27 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/757534>

12. Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol*. 1999 Jan;19(1):1-11.
13. Kato GJ, Dang CV. Function of the c-Myc oncoprotein. *FASEB J*. 1992 Sep;6(12):3065-72.
14. Ahmadi, Seyed Esmail & Rahimi, Samira & Zarandi, Bahman & Chegeni, Rouzbeh & Safa, Majid. (2021). MYC: a multipurpose oncogene with prognostic and therapeutic implications in blood malignancies. *Journal of Hematology & Oncology*. 14. 10.1186/s13045-021-01111-4.
15. Elbadawy M, Usui T, Yamawaki H, Sasaki K. Emerging Roles of C-Myc in Cancer Stem Cell-Related Signaling and Resistance to Cancer Chemotherapy: A Potential Therapeutic Target Against Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(9):2340. <https://doi.org/10.3390/ijms20092340>
16. Hoffman, B., Liebermann, D. Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* **27**, 6462–6472 (2008). <https://doi.org/10.1038/onc.2008.312>
17. Xiaomeng Gao, Jieqiong You, Yanling Gong, Meng Yuan, Haiying Zhu, Liang Fang, Hong Zhu, Meidan Ying, Qiaojun He, Bo Yang, Ji Cao, WSB1 regulates c-Myc expression through β -catenin signaling and forms a feedforward circuit, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Volume 12, Issue 3, 2022, Pages 1225-1239, ISSN 2211-3835, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.10.021>.
18. Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res*. 2012 Oct 15;18(20):5546-53.
19. Dang, Chi. (2010). Enigmatic MYC Conducts an Unfolding Systems Biology Symphony. *Genes & cancer*. 1. 526-531.
20. Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res*. 2012 Oct 15;18(20):5546-53.
21. Chi V. Dang, Kathryn A. O'Donnell, Karen I. Zeller, Tam Nguyen, Rebecca C. Osthus, Feng Li, The c-Myc target gene network, *Seminars in Cancer Biology*, Volume 16, Issue 4, 2006, Pages 253-264, ISSN 1044-579X

22. D'Avola A, Kluckova K, Finch AJ, Riches JC. Spotlight on New Therapeutic Opportunities for MYC-Driven Cancers. *Onco Targets Ther*. 2023 Jun 7; 16:371-383.
23. Madden SK, de Araujo AD, Gerhardt M, Fairlie DP, Mason JM. Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc. *Mol Cancer*. 2021 Jan 4;20(1):3.
24. Llombart V, Mansour MR. Therapeutic targeting of "undruggable" MYC. *EBioMedicine*. 2022 Jan; 75:103756.
25. Wang, C., Zhang, J., Yin, J. *et al*. Alternative approaches to target Myc for cancer treatment. *Sig Transduct Target Ther* **6**, 117 (2021).