

## **ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ – ΟΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΣΤΑ ΟΠΩΡΟΚΗΠΕΥΤΙΚΑ**

Π. Καλαϊτζής, Μ. Μανιουδάκη & Χ. Μπαζάκος

Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων, Τμήμα Γεωργικής Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Αλσύλλιον Αγροκηπίου,  
73100 Χανιά

**Λέξεις κλειδιά:** ελιά, καταπόνηση αλατότητας, γονιδιακή έκφραση, μεταγραφικά ρυθμιστικά δίκτυα

### **Εισαγωγή**

Η βιολογία συστημάτων, προσφάτως, έχει μετατοπίσει το ερευνητικό ενδιαφέρον από την μελέτη μεμονωμένων βιομορίων στην ολοκληρωμένη μελέτη ομάδων βιομορίων τα συστατικά των οποίων αλληλεπιδρούν συνεργιστικά για την εκτέλεση και ολοκλήρωση βιολογικών λειτουργιών. Η αλλαγή αυτή οφείλεται εν μέρει, στις ραγδαίες αλλαγές στην παραγωγή μεγάλου όγκου δεδομένων χρησιμοποιώντας τεχνολογίες μεγάλης κλίμακας (-ομικές τεχνολογίες).

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες –ομικές τεχνολογίες είναι η τρασκριπτομική, όπου μετρώνται τα επίπεδα έκφρασης των mRNAs, η πρωτεομική όπου μελετώνται ολές οι πρωτεΐνες και η μεταβολομική όπου μετρώνται οι ποσότητες μικρών κυτταρικών μεταβολιτών.

Η ανάγκη επεξεργασίας όλου του όγκου της πληροφορίας που προκύπτει από αυτές τις τεχνολογίες οδήγησε στην ανάπτυξη κατάλληλων υπολογιστικών μεθόδων ικανές να εξάγουν βιολογικά-σχετικά συμπεράσματα. Η ανάλυση δεδομένων που προκύπτουν από την τρασκριπτομική (κυρίως δεδομένα μικροσυστοιχίας και μεγάλης κλίμακας αλληλούχιση) συνιστούν αρχικά εντοπισμό γονιδίων με διαφορική έκφραση σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες και θεωρούνται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτές τις συνθήκες. Τα δεδομένα της γονιδιακής έκφρασης αναλύονται είτε ξεχωριστά είτε σε συνδυασμό με δεδομένα που προέκυψαν από άλλη μελέτη μεγάλης κλίμακας, χρησιμοποιώντας κατάλληλη υπολογιστικά εργαλεία. Έτσι μπορεί να κατασκευαστούν ολόκληρα δίκτυα με αλληλεπιδράσεις που ρυθμίζονται μεταγραφικά. Τέτοια δίκτυα θεωρούνται το κύριο σύστημα ελέγχου όλων των βιολογικών λειτουργιών και έχει διοθεί ιδιαίτερη προσοχή τα τελευταία χρόνια.

### **Αποτελέσματα**

Προκειμένου να κατανοήσουμε την απόκριση των ποικιλιών ελιάς στο στρες αλατότητας χρησιμοποιήσαμε δεδομένα έκφρασης από μικροσυστοιχίες και ένα αλγόριθμο εύρεσης υπομονάδων ώστε να βρεθούν οι λειτουργικές υπομονάδες και οι αντίστοιχοι ρυθμιστές των υπομονάδων αυτών. Καθώς ένας ρυθμιστής μπορεί να είναι κοινός για περισσότερες από μία υπομονάδες, οι υπομονάδες συνδέονται μεταξύ τους και δημιουργείται έτσι ένα δίκτυο. Καθώς το δίκτυο αυτό αποτελείται από συν-εκφραζόμενα και συν-ρυθμιζόμενα γονίδια καλείται μεταγραφικό ρυθμιστικό δίκτυο. Σχηματικά ένα τέτοιο δίκτυο αποτελείται από κόμβους και κατευθυνόμενες ακμές όπου οι κόμβοι αναπαριστούν τα ρυθμιζόμενα γονίδια και οι ακμές ορίζουν ρυθμιστικές σχέσεις μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων και των ρυθμιζόμενων γονιδίων (γονιδίων-στόχων) (Hartwell et.al., 1999, Michoel et.al., 2009).

Στην εργασία αυτή δύο ποικιλίες ελιάς, η ποικιλία ‘Κα-

λαμών’ και η ποικιλία ‘Μανάκι’ μελετώνται για την απόκρισή τους σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας. Είναι γνωστό από φυσιολογικές μελέτες ότι οι δύο ποικιλίες παρουσιάζουν διαφορές στην αντοχή τους σε αλατότητα (Vigo κ.ά., 2001). Η ποικιλία Καλαμών θεωρείται γενικά μια ανθεκτική ποικιλία ενώ η Μανάκι εμφανίζει μειωμένη ανθεκτικότητα. Στόχος της εργασίας αυτής είναι να μελετηθεί και να αναλυθεί σε μεταγραφικό επίπεδο η απόκριση κάθε ποικιλίας σε συνθήκες αλατότητας. Η μελέτη αυτή καθώς και η σύγκριση της απόκρισης των ποικιλιών αναμένεται να δώσει στοιχεία για τα μεταγραφήματα που συνεισφέρουν στο μηχανισμό ανθεκτικότητας στην αλατότητα και τη ρυθμιστική σχέση που τα μεταγραφήματα αυτά έχουν μεταξύ τους καθορίζοντας ένα μέρος του μοριακού μονοπατιού που ακολουθείται σε τέτοιες συνθήκες στρες.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε την τεχνολογία μικροσυστοιχιών κατά την οποία πραγματοποιήθηκαν υβριδισμοί σε διάφορες χρονικές στιγμές από δείγματα ρίζας σε δέντρα που είχαν υποστεί αλατότητα και δείγματα ρίζας μάρτυρα (δέντρα που δεν είχαν υποστεί αλατότητα αλλά αναπτύχθηκαν σε ίδιες συνθήκες με τα στρεσσαρισμένα). Οι χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν ήταν οι 30 και 90 ημέρες μετά την εφαρμογή της αλατότητας και οι 15 ημέρες του διαστήματος επαναφοράς για την ποικιλία Μανάκι ενώ για την ποικιλία Καλαμών μελετήθηκαν οι χρονικές στιγμές 30 και 90 ημέρες κατά την εφαρμογή της αλατότητας και οι 15 και 45 ημέρες του διαστήματος επαναφοράς. Τα αποτέλεσματα αποτελούνται από τις εντάσεις φθορισμού του δείγματος και του μάρτυρα για κάθε μεταγράφημα που αντιστοιχούν με τη σειρά τους στα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφήματος αυτού τη χρονική στιγμή που μελετάται. Το τελικό αποτέλεσμα λοιπόν είναι ένας πίνακας οι γραμμές του οποίου αντιστοιχούν στα μεταγραφήματα που μελετώνται ενώ οι στήλες αντιστοιχούν στις χρονικές στιγμές του πειράματος. Στην περίπτωσή μας έχουμε ένα πίνακα για κάθε ποικιλία με μερικές εκατοντάδες γραμμές και 4 στήλες.

Η ανάλυση τέτοιου όγκου δεδομένων (που είναι ο κανόνας σε τεχνολογίες μεγάλης κλίμακας όπως οι μικροσυστοιχίες και απαντώνται με το γενικό όρο –ομικές τεχνολογίες) απαιτεί τη χρήση νέων μεθόδων ανάλυσης που διαφέρουν από τις συμβατικές ανάλυσης ενός γονιδίου και αποτελούν τμήμα αυτού που συνολικά καλείται βιολογία συστημάτων. Σκοπός είναι να εξαχθεί μια συνολική εικόνα για το υπό μελέτη σύστημα και να μελετηθούν ως σύνολο τα σημαντικά χαρακτηριστικά του.

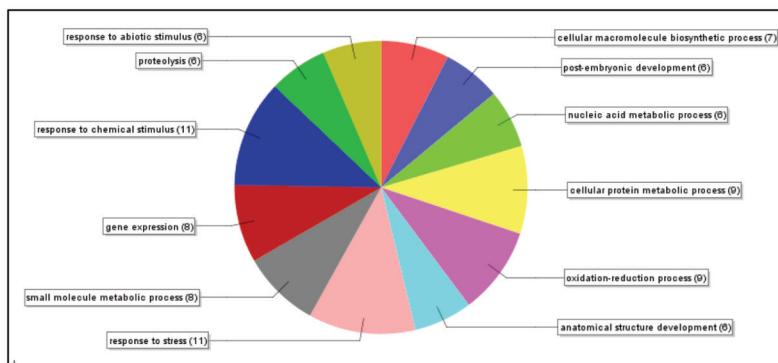
Στην παρούσα εργασία θα χρησιμοποιήσουμε δύο τρόπους ανάλυσης όπου ο καθένας συνεισφέρει συμπληρωματικά στο συνολικό αποτέλεσμα. Έτσι αρχικά θα αναζητήσουμε μεταγραφήματα με σημαντικά διαφορετική έκφραση στις συνθήκες του πειράματος και για τις δύο ποικιλίες. Στη συνέχεια θα χρησιμοποιήσουμε ένα αλγόριθμο ώστε αφενός να ομαδοποιήσουμε τα μεταγραφήματα σε ομάδες συν-εκφραζόμενων γονιδίων μεταγραφήματων και αφετέρου να καθορίσουμε τους ρυθμιστές των ομάδων αυτών.

Οι ομάδες αυτές θερωρούμε ότι είναι λειτουργικά ομαδοποιημένες και αποτελούν έτσι λειτουργικές υπομονάδες (functional modules).

**Μεταγραφήματα με σημαντικά διαφορετική έκφραση στις δύο ποικιλίες**

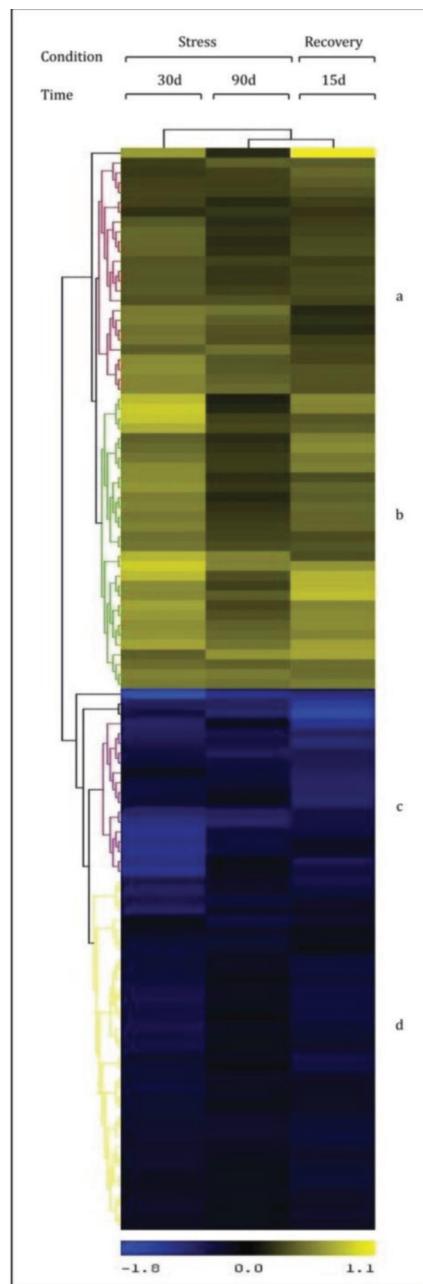
Χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο SAM (Significant Analysis

of Microarrays) (Tusher et.al., 2001) βρήκαμε τα μεταγραφήματα εκείνα με σημαντικά διαφορετική έκφραση σε όλες τις συνθήκες του πειράματος. Στην ποικιλία Μανάκι, 110 μεταγραφήματα παρουσιάζουν σημαντικά διαφορετική έκφραση. Ανάλυση blastx αυτών των μεταγραφημάτων δείχνει ότι σχετίζονται με διαδικασίες απόκρισης στο στρες όπως οι ‘response to abiotic stimulus’, ‘response to chemical stimulus’ και ‘response to stress’ (Εικ. 1).



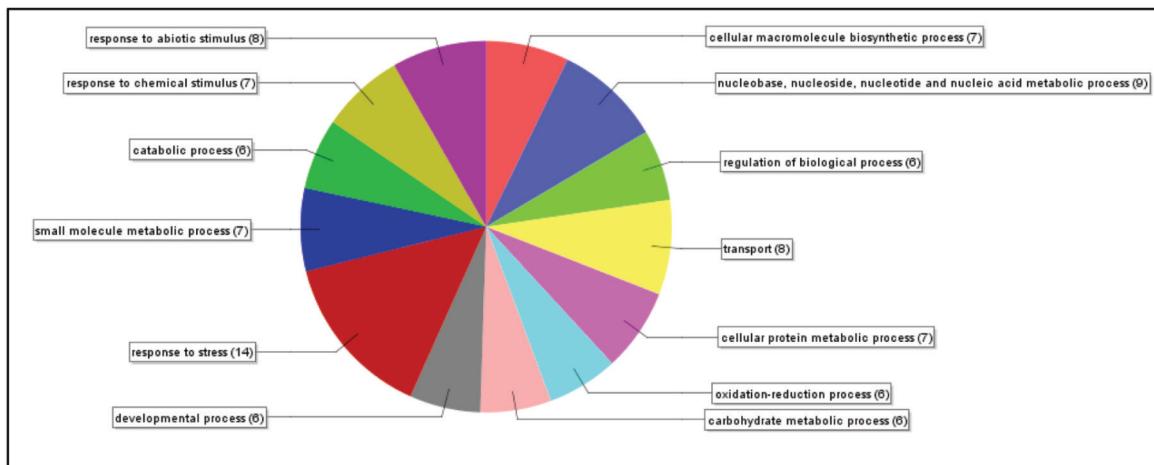
**Εικ. 1.** Κυκλικό διάγραμμα των επισημάνσεων των 110 σημαντικά διαφοροποιημένων μεταγραφημάτων της ποικιλίας Μανάκι.

Στα μεταγραφήματα αυτά έγινε στη συνέχεια ιεραρχική ομαδοποίηση (hierarchical clustering). Σχηματικά η ομαδοποίηση αυτή φαίνεται στην Εικ. 2. Διακρίνονται δύο βασικές ομάδες, η ομάδα με αυξημένη έκφραση (κίτρινο χρώμα, 55 μεταγραφήματα) και η ομάδα με μειωμένη έκφραση (μπλε χρώμα, 55 μεταγραφήματα).



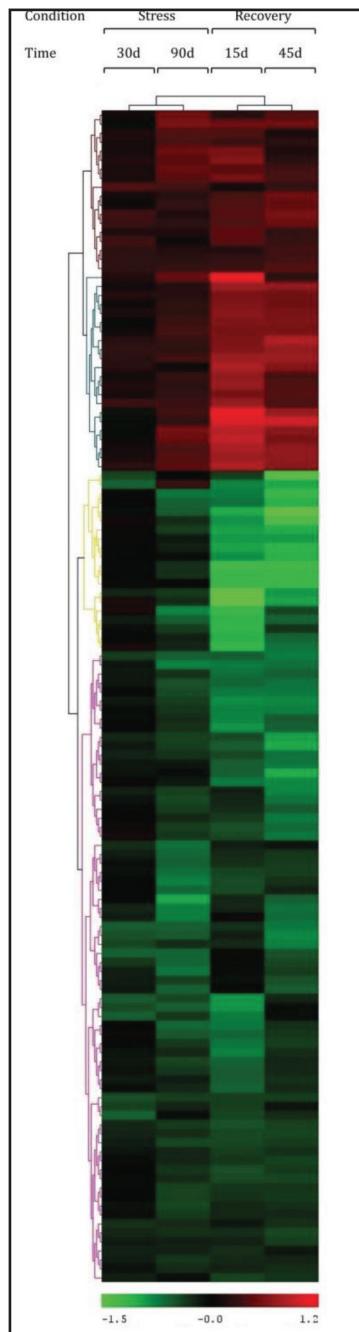
**Εικ. 2.** Ιεραρχική ομαδοποίηση των μεταγραφημάτων που παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στην ποικιλία ‘Μανάκι’.

Στην ποικιλία Καλαμών βρέθηκαν 130 μεταγραφήματα με σημαντικά διαφοροποιημένη έκφραση. Τα μεταγραφήματα αυτά σχετίζονται με απόκριση σε διάφορες συνθήκες στρες όπως 'response to abiotic stimulus', 'response to chemical stimulus' και 'response to stress' όπως φαίνεται από το κυκλικό διάγραμμα της Εικ. 3.



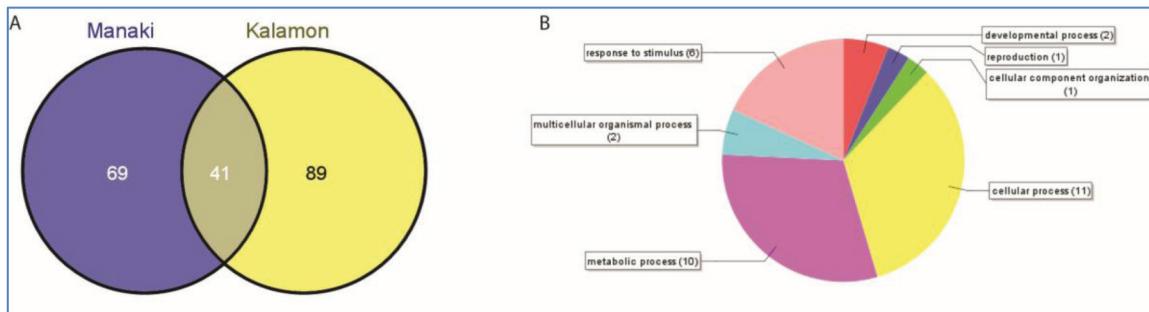
**Εικ. 3.** Κυκλικό διάγραμμα των επισημάνσεων των 130 σημαντικά διαφοροποιημένων μεταγραφημάτων της ποικιλίας 'Καλαμών'.

Αντίστοιχα με την ποικιλία Μανάκι, στα 130 μεταγραφήματα της ποικιλίας Καλαμών εγίνει ιεραρχική ομαδοποίηση η οποία φαίνεται στην Εικ. 4. Έχουμε και εδώ δύο βασικές ομάδες. Την ομάδα με αυξημένη έκφραση (κόκκινο) που περιλαμβάνει 40 μεταγραφήματα και την ομάδα με μειωμένη έκφραση (πράσινο) που περιλαμβάνει 90 μεταγραφήματα. Παρατηρούμε επίσης ότι οι στήλες ομαδοποιούνται ξεκάθαρα σε καταστάσεις στρες και καταστάσεις επαναφοράς.



**Εικ. 4.** Ιεραρχική ομαδοποίηση των μεταγραφημάτων που παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στην ποικιλία Καλαμών.

Συγκρίνοντας τα μεταγραφήματα με σημαντικά διαφορετική έκφραση στις δύο ποικιλίες βλέπουμε από το αντίστοιχο διάγραμμα Venn ότι 41 μεταγραφήματα είναι κοινά (Εικ. 5A). Τα μεταγραφήματα αυτά εμπλέκονται κυρίως σε κυτταρικές και μεταβολικές διεργασίες καθώς και σε συνθήκες σε στρεσ (Εικ. 5B).

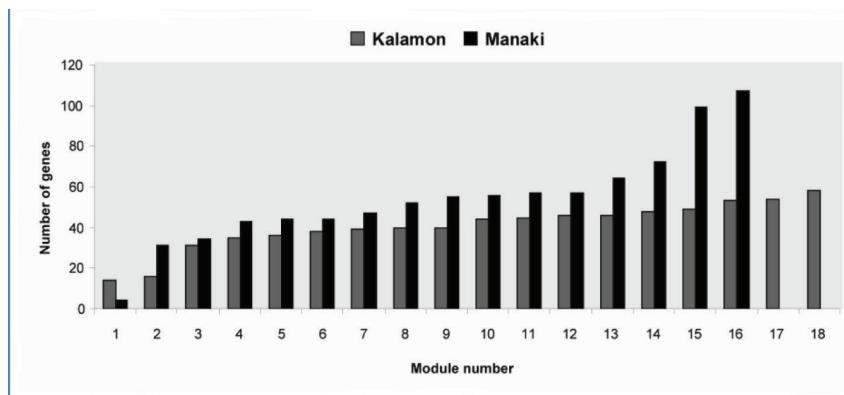


**Εικ. 5.** Κοινά μεταγραφήματα με σημαντικά διαφορετική έκφραση στις ποικιλίες Καλαμών και Μανάκι. [A] Διάγραμμα Venn των κοινών μεταγραφημάτων [B] Κυκλικό διάγραμμα των διαργασιών που εμπλέκονται τα 41 κοινά γονίδια (blastx).

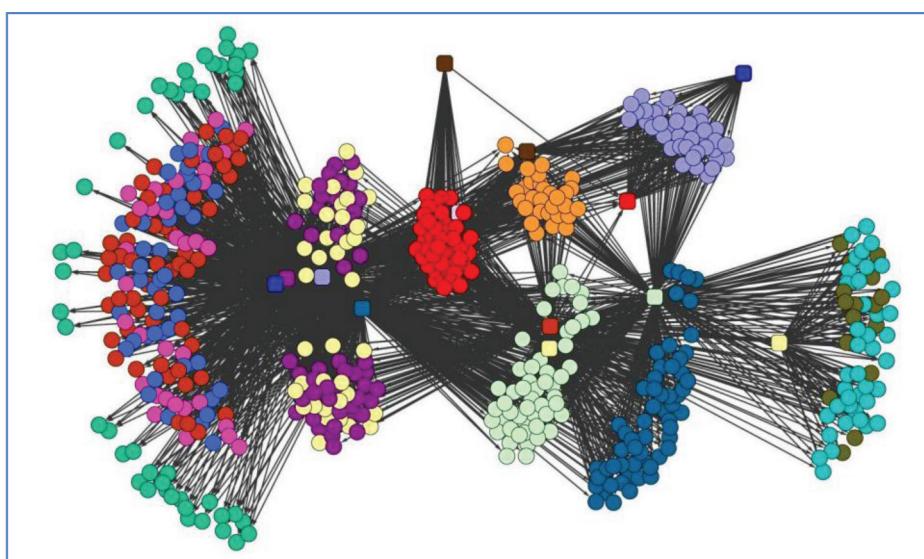
#### Ρυθμιστικά μεταγραφικά δίκτυα

Στη μετα-γενομική εποχή δεδομένα transcriptomics χρησιμοποιούνται για την αποσαφήνιση μοριακών μονοπατιών και την διαλεύκανση ρυθμιστικών δικτύων. Στην παρούσα εργασία τα ρυθμιστικά μεταγραφικά δίκτυα των δύο ποικιλών ελιάς σε συνθήκες στρεσ κατασκευάστηκαν με τον αλγόριθμο LeMoNe (Michoel κ.ά., 2007) που απαιτεί δεδομένα μεταγραφικής έκφρασης ως δεδομένα εισόδου. Στόχος της εφαρμογής αυτής είναι να μελετηθούν τα βιοχημικά γεγονότα που συμβαίνουν κατά την απόκριση της ελιάς στην αλατότητα χρησιμοποιώντας το φορμαλισμό της θεωρίας δικτύων.

Συνολικά, για την ποικιλία Καλαμών βρέθηκαν 18 υπομονάδες, κάθε μια από τις οποίες περιείχε 14-58 μεταγραφήματα (Εικ. 6). Για 13 από αυτές τις υπομονάδες, ο αλγόριθμος LeMoNe κατέταξε ένα τουλάχιστον ρυθμιστή. Συγκεκριμένα, συνολικά 552 μεταγραφήματα οργανώνονται σε ένα ρυθμιστικό πρόγραμμα και ομαδοποιούνται σε 13 μη-αλληλεπικαλυπτόμενες υπομονάδες. Συνολικά οι ρυθμιζόμενες υπομονάδες δύνονται σχηματικά στην εικόνα 7. Στην εικόνα αυτή κάθε κύκλος αντιπροσωπεύει ένα μεταγράφημα και κάθε τετράγωνο αντιπροσωπεύει ένα μεταγραφικό παράγοντα. Το χρώμα κάθε συστατικού του δικτύου είναι ανάλογο της υπομονάδας στην οποία ανήκει.

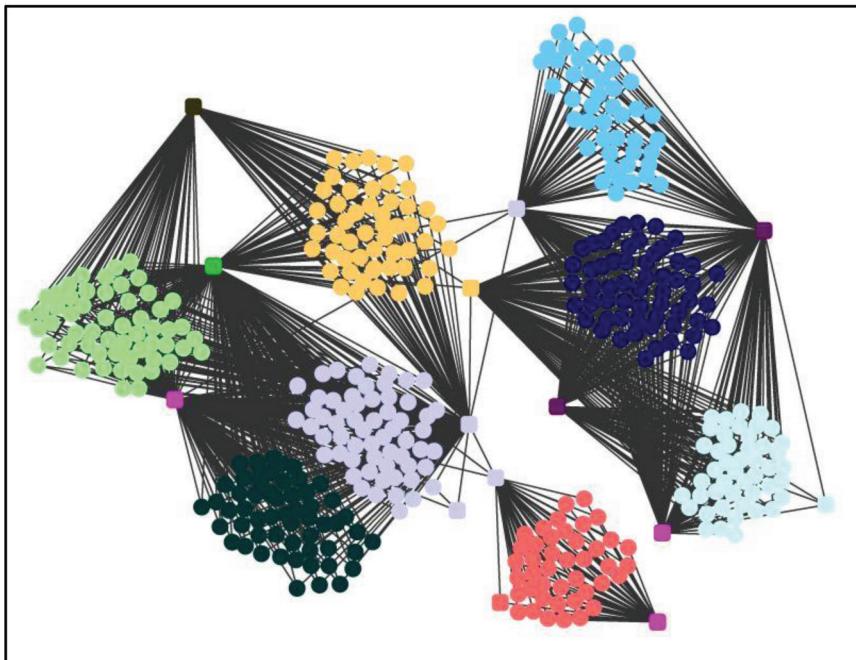


**Εικ. 6.** Κατανομή του αριθμού των μεταγραφημάτων στα ρυθμιστικά δίκτυα στις ποικιλίες Καλαμών (γκρι) και Μανάκι (μαύρο). Τα μεταγραφήματα στην Μανάκι είναι οργανωμένα σε λιγότερες αλλά μεγαλύτερες συν-ρυθμιζόμενες υπομονάδες.



**Εικ. 7.** Ρυθμιστικό δίκτυο της ποικιλίας 'Καλαμών'

Στην ποικιλία Μανάκι τα 866 γονίδια για τα οποία υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα έκφρασης για όλες τις χρονικές στιγμές ομαδοποιούνται σε 16 μη-αλληλεπικαλυπτόμενες υπομονάδες. 8 από τις υπομονάδες αυτές οι οποίες περιλαμβάνουν συνολικά 428 γονίδια ρυθμίζονται από τουλάχιστον ένα μεταγραφικό παράγοντα. Το αντίστοιχο ρυθμιστικό δίκτυο φαίνεται στην Εικ. 9.



Εικ. 8. Ρυθμιστικό δίκτυο της ποικιλίας 'Μανάκι'.

## Βιβλιογραφία

- Hartwell, L.H., Hopfield, J.J., Leibler, S. and Murray, W. 1999. From molecular to modular cell biology. *Nature* 402: C47-52
- Michoel, T., Maere, S., Bonnet, E., Joshi, A., Saeys, Y., Van den Bulcke, T., Van Leemput, K., van Remortel, P., Kuiper, M., Marchal, K. κ.ά. 2007 Validating module network learning algorithms using simulated data. *BMC Bioinformatics* 8 Suppl 2: S5
- Michoel, T., De Smet, R., Joshi, A., Marchal, K. and Van de Peer, Y. 2009. Reverse-engineering transcriptional modules from gene expression data. *Annals New York Acad. Sci.* 1158:36-43
- Tusher, V.G., Tibshirani, R. and Chu, G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *PNAS* 98:5116-5121
- Vigo, C. Παπαδάκης I. και Θεριός, I. 2001. Αντοχή τριών ποικιλών ελιάς ("Καρυδολιά Χαλκιδικής", "Μανάκι" και "Gordal Sevillana") στην αλατότητα με NaCl και CaCl<sub>2</sub>. Πρακτικά 20ου Πανελλήνιου Επιστημονικού Συνεδρίου, Ελληνική Εταιρία Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, 29 Οκτωβρίου-1 Νοεμβρίου 2001.