



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**



**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

# **ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΑΡΓΥΡΑΚΗ ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ**

## **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ**

**ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2017**

**ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΜΕ ΑΠΑΛΕΙΦΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ  
*FRA10AC1***

**GENOTYPING OF *FRA10AC1* KNOCK OUT MICE**

# **ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΜΕ ΑΠΑΛΕΙΦΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *FRA10AC1***

**ΑΡΓΥΡΑΚΗ ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ :**

**ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Σαραφίδου Θεολογία (Επιβλέπουσα),** Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Λιαδάκη Καλιόπη,** Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Μαμούρης Ζήσης,** Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Contents

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	4
ABSTRACT .....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	6
1.1. Κλωνοποίηση του γονιδίου <i>FRA10AC1</i> του ανθρώπου και χαρτογράφησή του στην εύθραυστη θέση <i>FRA10A</i> .....	6
1.2. Η εύθραυστη θέση <i>FRA10A</i> και συσχέτιση με πιθανό παθολογικό φαινότυπο .....	10
1.3. Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου <i>FRA10AC1</i> του ανθρώπου.....	11
1.4. Πρωτεΐνη <i>FRA10C1</i> .....	13
1.5. Ποντίκια knock out και χρήση τους ως ζωικά μοντέλα.....	14
1.6. Διαδικασία παραγωγής ποντικών knock out .....	14
1.7 Σκοπός της εργασίας .....	20
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	20
2.1 Υλικά.....	20
2.2. Απομόνωση γενωμικού DNA από ποντίκια .....	20
2.3. Καθαρισμός γενωμικού DNA με φαινόλη - χλωροφόρμιο .....	21
2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	21
2.5. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης.....	22
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	24
3.1. Ποσοτικοποίηση γενωμικού DNA ποντικών .....	24
3.2. Αποτελέσματα PCR.....	24
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	27
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	29

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *FRA10A* είναι μια σπάνια εύθραυστη θέση ευαίσθητη στο φυλλικό οξύ και έχει χαρτογραφηθεί στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3. Διάφορες μελέτες αναφέρουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ήπιας νοητικής και αναπτυξιακής υστέρησης σε άτομα φορείς της *FRA10A*. Η έκφραση αυτής της εύθραυστης θέσης οφείλεται στην επέκταση μιας τρινουκλεοτιδικής επανάληψης CGG στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *FRA10AC1*. Η επέκταση αυτής της επανάληψης οδηγεί στην υπερμεθυλίωση της περιοχής και την αποσιώπηση του γονιδίου *FRA10AC1*. Η πρωτεΐνη *FRA10AC1* είναι πυρηνική, αποτελεί συστατικό του σωματίου συναρμογής και αλληλεπιδρά άμεσα με τις πρωτεΐνες SF3B2 και DGCR14 που αποτελούν παράγοντες συναρμογής. Συνεπώς είναι πιθανό ότι η *FRA10AC1* συμμετέχει στη συναρμογή ή σε άλλες διαδικασίες σχετικές με την επεξεργασία του mRNA.

Για να ελεγχθεί η συσχέτιση της έκφρασης της *FRA10A* και, συνεπώς, η ετερόζυγη αποσιώπηση του γονιδίου *FRA10AC1*, με την εμφάνιση ήπιας νοητικής και αναπτυξιακής υστέρησης, δημιουργήθηκαν, στο πλαίσιο της υποδομής Infrafrontier-GR, ποντίκια knock out που προσομοιάζουν την απενεργοποίηση του ενός αλληλόμορφου στους φορείς της *FRA10A*.

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η γονοτύπηση δειγμάτων ποντικών που προήλθαν από διασταυρώσεις ετερόζυγων ποντικών knock out με ποντίκια αγρίου τύπου. Απώτερος σκοπός είναι ο έλεγχος της συμπεριφοράς αυτών των ποντικών με δοκιμασίες που αφορούν την ικανότητα μάθησης και μνήμης.

## ABSTRACT

*FRA10A*, a rare folate sensitive fragile site was mapped in the 10q23.3 chromosomal region. Several studies report increased frequency of manifesting mild mental and developmental retardation in *FRA10A* carriers. Expression of this fragile site is caused by the expansion of CGG trinucleotide repeat in the 5' untranslated region of *FRA10AC1* gene. Expansion of this repeat leads to hypermethylation of this region and silencing of *FRA10AC1* gene. *FRA10AC1* is a nuclear protein, constitutes a spliceosomal component and interacts with two splicing factors, SF3B2 and DGCR14. Consequently, it is possible that *FRA10AC1* participates in splicing or in other mRNA processing procedures

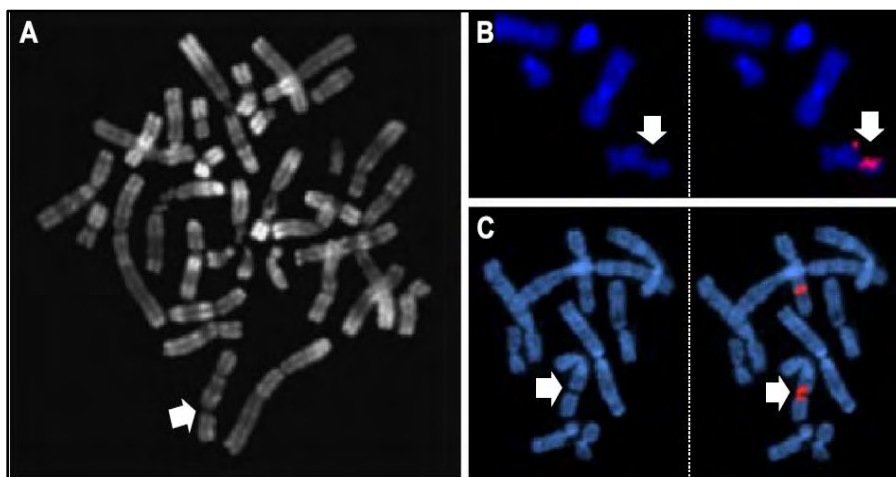
In the context of Infrafrontier-GR, heterozygous knockout mice that simulate the silencing of one allele in *FRA10A* carriers were developed. This procedure was done in order to associate the expression of *FRA10A* and, consequently, the heterozygous silencing of *FRA10AC1* gene with the manifestation of mild mental and developmental delay.

The purpose of this study was the genotyping of mice which resulted from mating heterozygous knockout with wild type mice. Additionally, a further purpose is the behavioral testing of these mice with learning and memory tests.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Κλωνοποίηση του γονιδίου *FRA10AC1* του ανθρώπου και χαρτογράφησης του στην εύθραυστη θέση *FRA10A*

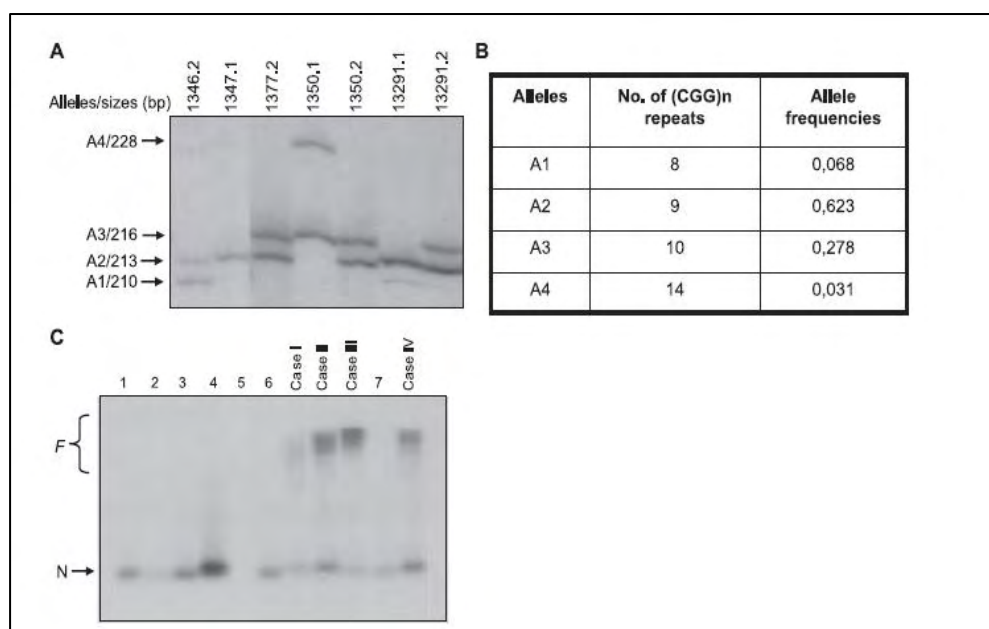
Η σπάνια ευαίσθητη στο φυλλικό οξύ εύθραυστη θέση *FRA10A* είχε χαρτογραφηθεί κυτταρογενετικά στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3. Όλες οι ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ εύθραυστες θέσεις που είχαν κλωνοποιηθεί, όπως η *FRA3A*, οφείλονται στην επέκταση τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων CGG (T. Lukusa et al 2008). Με βάση αυτό έγινε διερεύνηση της αλληλουχίας της περιοχής 10q23.3 για ταυτοποίηση επαναλήψεων του τύπου CGG. Έτσι, εντοπίστηκαν τέτοιες επαναλήψεις στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR) ενός γονιδίου. Για να ελεγχθεί η χαρτογράφηση αυτού του γονιδίου στην εύθραυστη θέση *FRA10A*, χρησιμοποιήθηκε υβριδοποίηση φθορισμού *in situ* (FISH) σε χρωμοσωμικά παρασκευάσματα ατόμων-φορέων της *FRA10A* χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το γονιδιωματικό κλώνο BAC RP11-437J2 που περιελάμβανε αυτό το γονίδιο. Έτσι επιβεβαιώθηκε η χαρτογράφηση αυτού του γονιδίου, το οποίο ονομάστηκε *FRA10AC1*, στην εύθραυστη θέση *FRA10A* (Sarafidou et al. 2004).



Εικόνα 1: Κυτταρογενετική έκφραση της *FRA10A* και αποτελέσματα ανάλυσης FISH. (A) Ζώνωση R μεταφασικών χρωμοσωμάτων ατόμων που εκφράζουν την *FRA10A* στην χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3. (B), (C) Με κόκκινο φθορισμό φαίνεται η χαρτογράφηση του κλώνου στην *FRA10A* (Sarafidou et al. 2004).

Για να ελεγχθεί αν η μοριακή βάση της έκφρασης της *FRA10A* είναι η ίδια με αυτήν των άλλων εύθραυστων θέσεων αυτής της κατηγορίας, έγινε έλεγχος του

αν αυτές οι επαναλήψεις είναι πολυμορφικές στο γενικό πληθυσμό και επομένως έχουν τη δυνατότητα να επεκτείνονται. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση αυτών των επαναλήψεων με PCR σε 81 άτομα από το γενικό πληθυσμό και ταυτοποιήθηκαν 4 αλληλόμορφα (A1-A4) με αριθμό επαναλήψεων 8, 9, 10 και 14 αντίστοιχα. Το πιο συχνό αλληλόμορφο (A2) περιελάμβανε 9 επαναλήψεις CGG. Η ίδια ανάλυση έγινε και σε άτομα που έφεραν κυτταρογενετικά την *FRA10A*. Σε δείγματα από αυτά τα άτομα προέκυψαν πολύ μεγαλύτερα προϊόντα PCR, τα οποία παρατηρήθηκαν ως πολλές μη διακριτές ζώνες μεγαλύτερου μοριακού μεγέθους, αποδεικνύοντας έτσι την επέκταση της επανάληψης κατά τουλάχιστον 200 φορές. Ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο εντοπίστηκε σε όλους τους φορείς της *FRA10A*, αφού η επέκταση της επανάληψης βρίσκεται σε ετερόζυγη κατάσταση (Εικόνα 2).



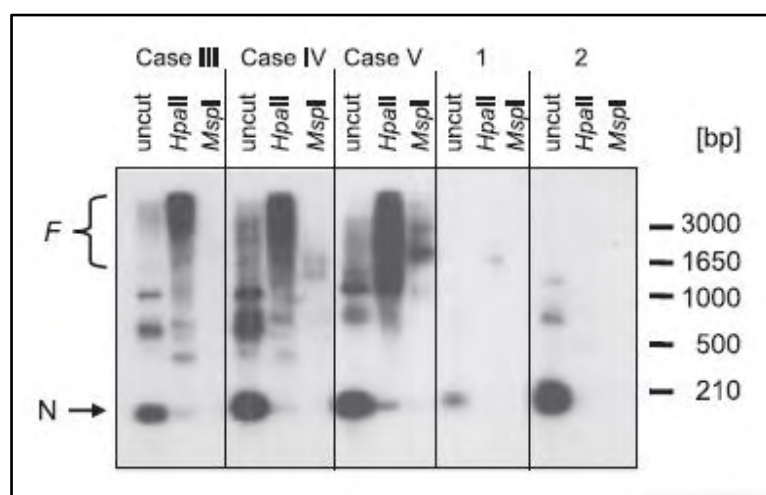
**Εικόνα 2: Ανάλυση πολυμορφικών επαναλήψεων CGG σε άτομα γενικού πληθυσμού και φορέων.** (A) Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των επαναλήψεων που ενισχύθηκαν με PCR. (B) Αλληλόμορφα που εντοπίστηκαν στο γενικό πληθυσμό με τον αριθμό επαναλήψεων και τη συχνότητα εμφάνισης του καθενός. (C) Τα δείγματα 1-7 προέρχονται από άτομα ελέγχου ενώ τα case I-IV από δείγματα ατόμων που εκφράζουν την *FRA10A*. Ως N συμβολίζονται τα φυσιολογικά αλληλόμορφα ενώ με F τα προϊόντα PCR μεγαλύτερου μεγέθους (Sarafidou et al. 2004).

Έχει παρατηρηθεί ότι περιοχές του γονιδιώματος που είναι πλούσιες σε νουκλεοτίδια C και G μεθυλιώνονται, με αποτέλεσμα να είναι μεταγραφικά ανενεργές σε περίπτωση που περιέχουν κάποιο γονίδιο. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η εύθραυστη θέση *FRAXA*, που συνδέεται με το σύνδρομο του εύθραυστου X. Σε αυτή την περίπτωση το γονίδιο *FMR1* που χαρτογραφείται σε



αυτήν αποσιωπείται μεταγραφικά εξαιτίας της μεθυλίωσης των επαναλήψεων CGG (Assam El-Osta 2002).

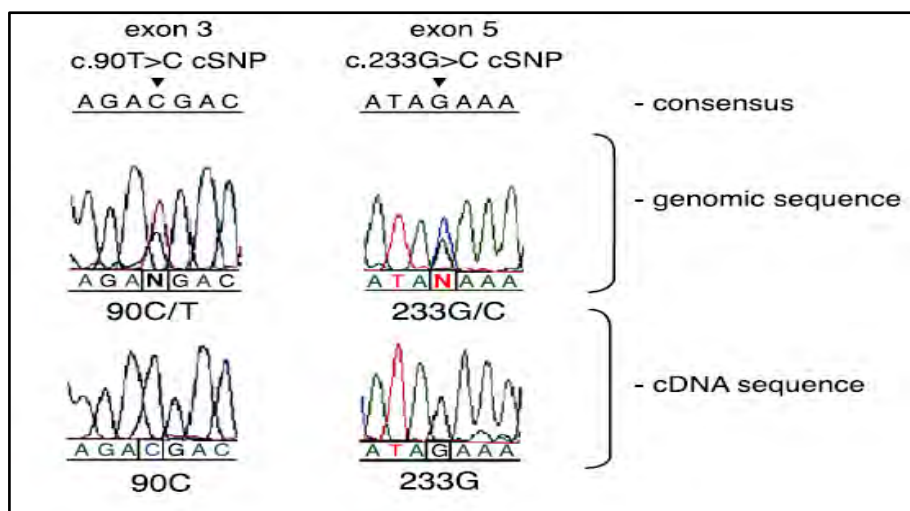
Προκειμένου να ελεγχθεί αν και στην περίπτωση του γονιδίου *FRA10AC1* η εκτεταμένη επανάληψη CGG υπόκειται σε μεθυλίωση, έγινε πέψη του γονιδιωματικού DNA από φορείς της *FRA10A* και άτομα ελέγχου με το ένζυμο περιορισμού *HpaII* (ευαίσθητο στην μεθυλίωση) και το *MspI* (μη-ευαίσθητο στη μεθυλίωση). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR η οποία δεν παράγει προϊόν όταν η αλληλουχία μεταξύ των εκκινητών έχει τεμαχιστεί. Επειδή το *MspI* μπορεί να κόψει και μεθυλιωμένες αλληλουχίες, η PCR μετά την πέψη με *MspI*, δεν παράγει κάποιο προϊόν. Αντίθετα, όταν έγινε πέψη με το ένζυμο *HpaII*, παρατηρήθηκε προϊόν PCR που υποδεικνύει ότι οι επαναλήψεις είναι μεθυλιωμένες (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3:** Έλεγχος μεθυλίωσης των επαναλήψεων CGG της *FRA10A* με τα ένζυμα περιορισμού *HpaII* και *MspI*. Τα δείγματα DNA από φορείς της *FRA10A* συμβολίζονται ως Case III, IV και V, ενώ τα δείγματα ελέγχου ως 1 και 2 (Sarafidou et al. 2004).

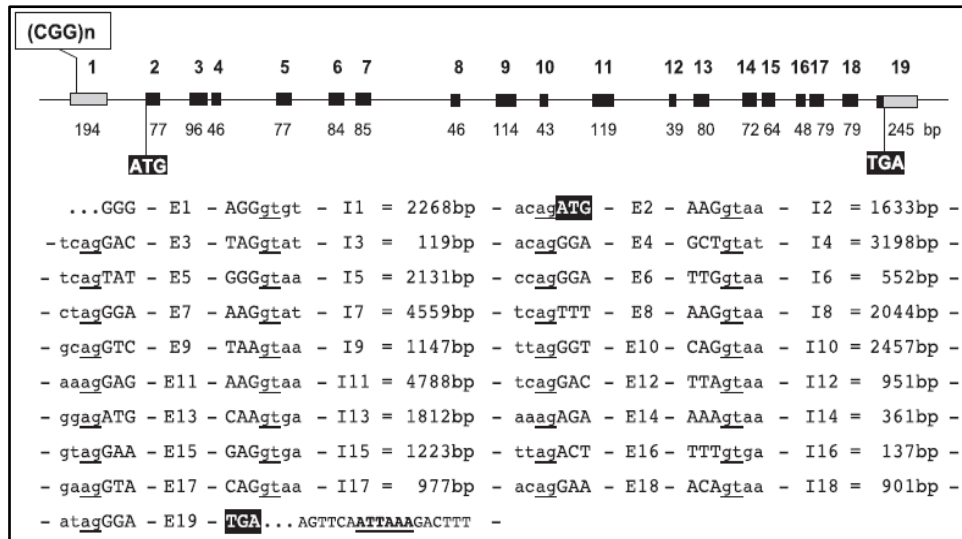
Εξαιτίας της μεθυλίωσης που συμβαίνει στην εύθραυστη θέση *FRA10A* το ένα αλληλόμορφο του γονιδίου *FRA10AC1* αποσιωπείται μεταγραφικά. Για να ελεγχθεί αυτό έγινε αντίστροφη μεταγραφή ακολουθούμενη από PCR στο cDNA φορέων της *FRA10A* για εύρεση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (ανάλυση cSNP/RT-PCR, c: coding). Με ανάλυση αλληλουχιών διαθέσιμων ESTs ανιχνεύτηκαν τουλάχιστον 3 cSNPs στο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου. Ένας πολυμορφισμός εντοπίστηκε στη θέση 47 στο εξόνιο 2 (c.47G → A), ο δεύτερος στη θέση 90 στο εξόνιο 3 (c.90T → C) και ο τρίτος στη θέση 233 στο εξόνιο 5 (c.233 G → C). Με αλληλούχηση του γονιδιωματικού DNA από διαθέσιμες κυτταρικές σειρές φορέων της *FRA10A* έγινε έλεγχος για ύπαρξη αυτών των 3 cSNPs και σε έναν φορέα βρέθηκε ο γονότυπος g.47A–g.90T/C–g.233C/G. Ακολούθησε RT-PCR με εκκινητές που υβριδοποιούνται μεταξύ των εξονίων 2 και 5 και έγινε αλληλούχηση

των προϊόντων της RT-PCR. Τελικά ανιχνεύτηκε μόνο ένα αλληλόμορφο (c.47A–c.90C–c.233G), γεγονός που αποδεικνύει ότι το άλλο αλληλόμορφο (c.47A–c.90T–c.233C) δεν μεταγράφηκε (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ανάλυση cSNP/RT-PCR σε φορέα της *FRA10A* (Sarafidou et al. 2004).

Η ανάλυση της γονιδιωματικής αλληλουχίας του γονιδίου *FRA10AC1* έδειξε ότι αυτό καλύπτει περιοχή περίπου 33 Kb. Με βάση την γονιδιωματική αλληλουχία και αλληλουχίες διάφορων ESTs, σχεδιάστηκαν εκκινητές και πραγματοποιήθηκε PCR σε προϊόντα αντίστροφης μεταγραφής από ολικό RNA από όρχεις. Έτσι, κλωνοποιήθηκε το cDNA πλήρους μήκους του γονιδίου *FRA10AC1* του ανθρώπου το οποίο έχει μέγεθος 1344 bp. Αυτό αντιστοιχεί στο κύριο μετάγραφο ενώ, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια, το γονίδιο παράγει και εναλλακτικά μετάγραφα τα οποία είχαν προβλεφθεί με βάση τις αλληλουχίες των ESTs. Έτσι, το γονίδιο περιλαμβάνει 19 εξόνια από τα οποία το πρώτο δεν μεταφράζεται και 5 από αυτά (13, 14, 15, 16 και 17) υπόκεινται σε εναλλακτική συναρμογή (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Γονιδωματική οργάνωση του *FRA10A1* (Sarafidou et al. 2004).

## 1.2. Η εύθραυστη θέση *FRA10A* και συσχέτιση με πιθανό παθολογικό φαινότυπο

Οι εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις είναι κληρονομήσιμες περιοχές στα χρωμοσώματα, στις οποίες εμφανίζονται κενά ή θραύσματα σε μεταφασικά χρωμοσώματα όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας. Διακρίνονται σε συνήθεις και σπάνιες ανάλογα με τη συχνότητα εμφάνισής τους στον πληθυσμό. Οι συνήθεις εύθραυστες θέσεις εντοπίζονται σε όλα τα χρωμοσώματα, ενώ οι σπάνιες κληρονομούνται από τον έναν γονέα ή εμφανίζονται *de novo* στο άτομο (Debacker K. et al. 2007). Οι συνήθεις και οι σπάνιες εύθραυστες θέσεις ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας στις οποίες εμφανίζονται κατηγοριοποιούνται περαιτέρω. Οι συνήθεις εύθραυστες θέσεις διακρίνονται σε αυτές που επάγονται παρουσία 5-αζακυτιδίνης (5-azacytidine), σε αυτές που επάγονται από την βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU) και σε αυτές που επάγονται από την αφιδικολίνη (aphidicolin). Οι σπάνιες εύθραυστες θέσεις διακρίνονται στις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, δηλαδή εμφανίζονται απουσία φυλλικού οξέος και σε αυτές που επάγονται παρουσία δισταμικίνης A (distamycin A) ή βρωμοδεοξουριδίνης (T. Lukusa et al 2008).

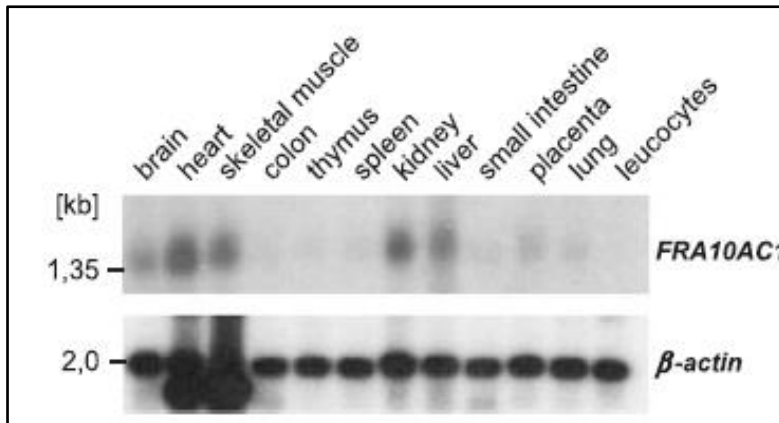
Όπως προαναφέρθηκε η *FRA10A*, εντοπίζεται στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3 και είναι η πιο συχνή από τις σπάνιες ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ αυτοσωματικές εύθραυστες θέσεις στο γονιδίωμα του ανθρώπου, με συχνότητα που εκτιμάται στα 1/500 άτομα. Παρόλο που η έκφρασή της δεν συσχετίζεται άμεσα με κάποιο παθολογικό φαινότυπο, διάφορες μελέτες αναφέρουν αυξημένη

συχνότητα εμφάνισης ήπιας νοητικής και αναπτυξιακής υστέρησης όπως δυσμορφικά χαρακτηριστικά, μικρό ανάστημα και δυσχέρεια λόγου, στα άτομα-φορείς. Συγκεκριμένα, έγινε κυτταρογενετική ανάλυση χρωμοσωμάτων ατόμου που παρουσίαζε δυσκολία λόγου και εμφάνιζε χαρακτηριστικά αυτισμού και βρέθηκε ότι το 66 % των κυττάρων του εξέφραζαν την *FRA10A*. Εξετάστηκαν άλλα 3 άτομα, εξαιτίας της αναπτυξιακής υστέρησης που εμφάνιζαν οι ίδιοι ή κάποιο μέλος της οικογένειάς τους και μέσω χρωμοσωμικής ανάλυσης βρέθηκε ότι εκφράζουν την *FRA10A* (Sarafidou et al. 2004).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, στα άτομα φορείς της *FRA10A* το ένα αλληλόμορφο του γονιδίου *FRA10AC1* είναι απενεργοποιημένο και και σε κάποιους από αυτούς παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικά ήπιας νοητικής και αναπτυξιακής υστέρησης σε αυτούς. Για την πιο λεπτομερή εξέταση αυτού του συσχετισμού, δημιουργήθηκε ένα μοντέλο ετερόζυγου knock-out που προσομοιάζει τα άτομα φορείς στα οποία έχει απενεργοποιηθεί το ένα από τα δύο αλληλόμορφα, ώστε να παρατηρηθούν αν υπάρχουν αλλαγές στο φαινότυπο. Το ποντίκι δημιουργήθηκε στο πλαίσιο της Υποδομής Infrafrontier-GR στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ" (επικεφαλής Δρ. Δημήτριος Κοντογιάννης).

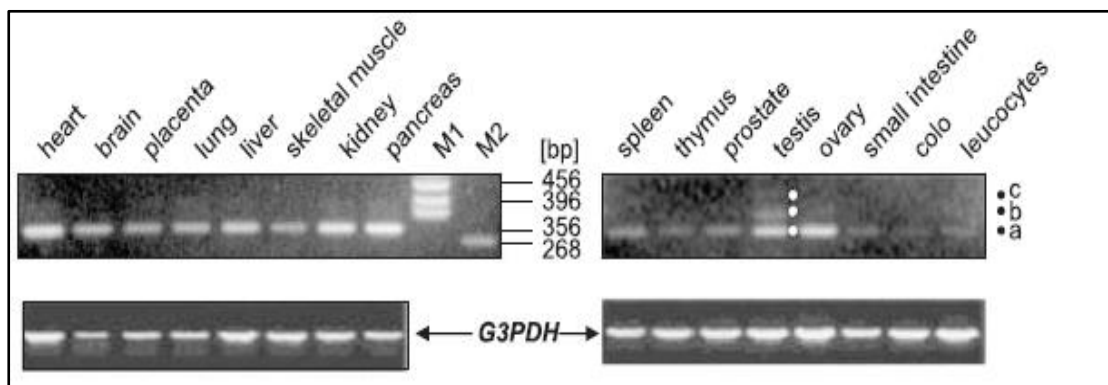
### 1.3. Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1* του ανθρώπου

Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1* αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση του ολικού RNA από διάφορους ιστούς ανθρώπου σε πηκτή και υβριδοποίηση του (Northern blot). Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής που περιελάμβανε τα πρώτα 616 bp της 5' κωδικής περιοχής του γονιδίου και ένας άλλος που υβριδοποιείται σε τμήμα του εξονίου 19. Παρατηρήθηκε πανομοιότυπο πρότυπο υβριδοποίησης και για τους 2 ανιχνευτές. Ανιχνεύτηκε σε όλους τους ιστούς ένα απλό μετάγραφο περίπου 1450 bp, το οποίο ανταποκρίνεται στο εκτιμώμενο μέγεθος του cDNA, υποδηλώνοντας καθολική έκφραση του *FRA10AC1*. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη, η οποία εκφράζεται στα ίδια επίπεδα σε όλους τους ιστούς. Παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου σε ιστούς όπως η καρδιά, οι σκελετικοί μύες, ο εγκέφαλος, το ήπαρ και το πάγκρεας, ενώ χαμηλότερη έκφραση σε σπλήνα, θύμο αδένα, πλακούντα και πνεύμονες (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1* με ανάλυση Northern. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός έλεγχος (Sarafidou et al. 2004).

Για την περαιτέρω μελέτη του προτύπου έκφρασης του *FRA10AC1* έγινε RT-PCR σε cDNA από ιστούς ανθρώπου χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδοποιούνται στα εξόνια 11 και 19. Η ενίσχυση έγινε σε λίγους σχετικά κύκλους, επιτρέποντας την εκτίμηση των σχετικών επιπέδων των μεταγράφων του *FRA10AC1*. Το G3PDH χρησιμοποιήθηκε ως θετικός έλεγχος και ενισχύθηκε σε όλους τους ιστούς. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 7, παρατηρήθηκε προϊόν σε όλους τους ιστούς που ελέγχθηκαν. Με αυτό το πείραμα επιβεβαιώθηκε η καθολική έκφραση του γονιδίου *FRA10AC1* σε όλους τους ιστούς. Σε κάποιους ιστούς παρατηρήθηκαν και επιπλέον ζώνες διαφορετικού μεγέθους. Ανάλυση αλληλουχίας αυτών έδειξε ότι αυτά τα εναλλακτικά μετάγραφα προέκυψαν από την εναλλακτική συναρμογή των εξονίων 13-16 (Sarafidou et al. 2004).



Εικόνα 7: Πρότυπο έκφρασης του *FRA10AC1* με RT-PCR σε cDNA από διάφορους ιστούς ανθρώπου. Τα δείγματα M1 και M2 χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες μοριακού μεγέθους του DNA (Sarafidou et al. 2004).

## 1.4. Πρωτεΐνη FRA10C1

Η πρωτεΐνη FRA10AC1 έχει μοριακή μάζα 37,55 kD και αποτελείται από 315 αμινοξέα. Φωσφορυλιώνεται σε επτά κατάλοιπα σερίνης στο καρβοξυτελικό της άκρο στις θέσεις 248, 251, 252, 273, 278, 283, 285 (Park et al. 2015, Sharma et al. 2014). Περιέχει ένα διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού στην περιοχή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 223 – 238 και 245 – 262 η οποία ανήκει σε μια ευρύτερη περιοχή πλούσια σε λυσίνη. Πράγματι με μικροσκοπία φθορισμού φάνηκε ότι εντοπίζεται αποκλειστικά στο πυρηνόπλασμα. Ωστόσο δεν περιέχει κάποια άλλη χαρακτηριστική επικράτεια. Με ανάλυση BLAST εντοπίστηκαν πολλά ορθόλογα μόρια της FRA10AC1 αποκλειστικά σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ζωικούς και φυτικούς. Αυτό δείχνει ότι μπορεί να υπήρχε κοινός πρόγονος πριν την απόκλιση φυτών και ζώων. Επιπλέον, το κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης (105-240 αμινοξέα στον άνθρωπο) παρουσιάζει 45-67% ομοιότητα σε όλα τα ορθόλογα που εξετάστηκαν γεγονός που δείχνει ότι είναι μια υψηλά συντηρημένη επικράτεια με πιθανώς σημαντική λειτουργία (Sarafidou et al. 2004).

Μέσω υγρής χρωματογραφίας–φασματομετρίας μάζας (LC-MSMS), η FRA10C1 ταυτοποιήθηκε ως συστατικό του σωματίου συναρμογής (spliceosome). Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι αποτελεί συστατικό των υποσυμπλόκων B<sub>act</sub> (ενεργοποιημένο) (Bessonov et al. 2010), C (Bessonov et al. 2008, Bessonov et al. 2010, Ilagan et al. 2013, Schmidt et al. 2014) και P (Ilagan et al. 2013). Επιπλέον, η FRA10AC1 βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά άμεσα με τις πρωτεΐνες SF3B2 και DGCR14, οι οποίες λειτουργούν ως παράγοντες συναρμογής. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις επιβεβαιώθηκαν με δοκιμές αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών *in vitro* σε σφαιρίδια γλουταθειόνης–σεφαρόζης (GST “pull-down”) και πειράματα ανοσοκατακρήμνισης.

Το σωματίο συναρμογής (spliceosome) είναι ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο καταλύει την συναρμογή του πρόδρομου mRNA (pre-mRNA) για τη δημιουργία του ώριμου mRNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το spliceosome αποτελείται από εκατοντάδες συστατικά, στα οποία συμπεριλαμβάνονται και 5 μικρά πυρηνικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια (snRNPs) τα U1, U2, U4, U5, U6 στα οποία το RNA που περιέχουν είναι πλούσιο σε ουριδίνη. Κατά τη διάρκεια της συναρμογής τα snRNPs στρατολογούνται στο πρόδρομο mRNA και υφίστανται ανακατατάξεις σχηματίζοντας σταδιακά τα ενδιάμεσα σύμπλοκα E, A, B, Bact, B\*, και C για να σχηματίσουν τελικά τα σωματίο συναρμογής, (Ilagan et al. 2013, Schmidt et al. 2014).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δοκιμές ανοσοκατακρήμνισης, GST “pull-down” και φασματομετρίας μάζας, οι οποίες αναφέρθηκαν στη δεύτερη

παράγραφο, συνάδουν με τον υποκυτταρικό εντοπισμό της FRA10C1 και με το γεγονός ότι η πρωτεΐνη είναι συντηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι οποίοι σε αντίθεση με τους προκαρυωτικούς, χρησιμοποιούν τη διαδικασία της συναρμογής για την ωρίμανση των πρόδρομων μορίων mRNA. Έτσι λαμβάνοντας υπόψη και τις αλληλεπιδράσεις της με τις πρωτεΐνες SF3B2 και DGCR14, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η FRA10C1 είναι πιθανό να συμμετέχει στη συναρμογή ή σε άλλες διαδικασίες σχετικές με την επεξεργασία του mRNA.

### **1.5. Ποντίκια knockout και χρήση τους ως ζωικά μοντέλα**

Τα ποντίκια knockout είναι εργαστηριακά ποντίκια στα οποία ένα ή περισσότερα γονίδια έχουν απενεργοποιηθεί ή εξαλειφθεί. Χρησιμοποιούνται για να ελεγχθεί αν η απώλεια λειτουργίας γονιδίων προκαλεί αλλαγές στο φαινότυπο του ποντικιού. Τα ποντίκια αποτελούν ένα καλό ζωικό μοντέλο επειδή τα γονίδια τους στην πλειοψηφία τους (99 %) είναι κοινά με των ανθρώπων. Επιπλέον ο μικρός κύκλος ζωής των ποντικιών, η σχετικά γρήγορη αναπαραγωγή και ο εύκολος χειρισμός τους τα καθιστά κατάλληλα για τη μελέτη τους. Έτσι η στοχευμένη εξάλειψη ενός γονιδίου παρέχει στους γενετιστές χρήσιμες πληροφορίες για τον καθορισμό του βιολογικού ρόλου αυτού του γονιδίου στους ανθρώπους. Επιπλέον τα ποντίκια χρησιμοποιούνται ως ζωικά μοντέλα για γενετικές ασθένειες του ανθρώπου. Όταν μια μετάλλαξη στο γονιδίωμα του ανθρώπου απενεργοποιεί μια πρωτεΐνη, το αντίστοιχο ποντίκι knockout μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο μέσο για τη μελέτη της παθοφυσιολογίας μιας γενετικής ασθένειας και την ανάπτυξη θεραπειών για την αντιμετώπιση της (Majzoub and Muglia 1996, Bradford Hall et al. 2009).

### **1.6. Διαδικασία παραγωγής ποντικιών knockout**

Αρχικά γίνεται η κατασκευή του ανασυνδυασμένου φορέα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Ο φορέας συνήθως αποτελείται από ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό (π.χ. neo<sup>r</sup>) στο κέντρο του και εκατέρωθεν αυτού από ομόλογες αλληλουχίες με το γονίδιο στόχο. Επιπλέον, στο δεξί του άκρο μετά την ομόλογη αλληλουχία περιέχεται και ένα γονίδιο αρνητικής επιλογής (Mario R. Caprecchi et al. 2007).



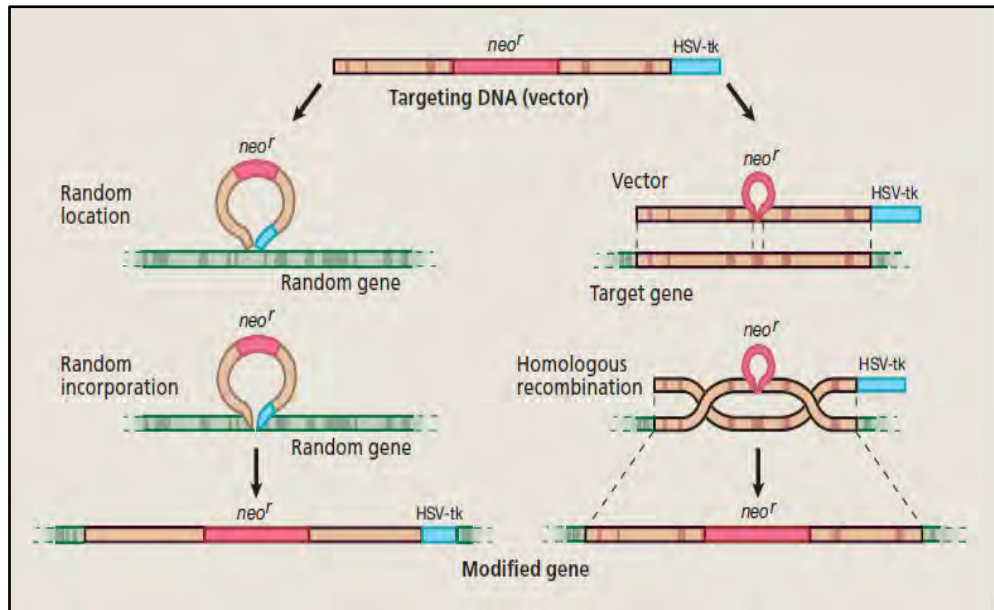
**Εικόνα 8: Ενδεικτικό τμήμα ανασυνδυασμένου φορέα.** Περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη και το γονίδιο της κινάσης της θυμιδίνης καθώς και αλληλουχίες ομόλογες με το γονίδιο στόχο (Mario R. Capecchi et al. 2007).

Το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη,  $neo^r$ , (εικόνα 8), χρησιμοποιείται συχνά ως αλλιώς ως γονίδιο θετικής επιλογής. Φυσιολογικά, το  $neo^r$  δεν υπάρχει στα κύτταρα ποντικών και έτσι το αντιβιοτικό νεομυκίνη είναι τοξικό για αυτά. Όμως όταν συμβεί ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ του ανασυνδυασμένου φορέα και του γονιδίου στόχου. Το  $neo^r$  εισέρχεται στο γονιδίωμα και προσδίδει ανθεκτικότητα στα βλαστοκύτταρα (Kirk R. Thomas and Capecchi M.R. 1987, ).

Όσον αφορά το γονίδιο – δείκτη αρνητικής επιλογής, το πιο συνηθισμένο είναι η κινάση της θυμιδίνης (TK) το οποίο προέρχεται από τον ιό του απλού έρπητα (HSV). Φυσιολογικά τα κύτταρα των ποντικών μπορούν να αναπτυχθούν παρουσία του αντιϊκού φαρμάκου γκανσικλοβίρη (ganciclovir). Τα κύτταρα που αποκτούν το γονίδιο TK μετατρέπουν τη γκανσικλοβίρη σε μια θανατηφόρα τοξίνη. Το γονίδιο αρνητικής επιλογής χρησιμοποιείται για να επιβεβαιωθεί ότι ο ανασυνδυασμός έγινε στη σωστή θέση στο γονιδίωμα. Για την εισαγωγή του φορέα χρησιμοποιούνται τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (ES) επειδή είναι πολυδύναμα. Αυτό σημαίνει ότι έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται προς κάθε τύπο κυττάρου στον ενήλικο οργανισμό. Επομένως, αν ένα γονίδιο εξαλειφθεί σε ένα εμβρυϊκό βλαστοκύτταρο, αυτό θα ισχύει σε κάθε ιστό του ενήλικου ποντικίου (Kirk R. Thomas and Capecchi M.R. 1987).

Έτσι απομονώνονται βλαστοκύτταρα από βλαστοκύστη ποντικίου δότη και αναπτύσσονται σε καλλιέργεια. Στη συνέχεια γίνεται διαμόλυνση των βλαστοκυττάρων με τον ανασυνδυασμένο φορέα. Μετά από αυτή τη διαδικασία, τα κύτταρα στα οποία έχει συμβεί ομόλογος ανασυνδυασμός εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη και στη γκανσικλοβίρη. Αντίθετα, τα κύτταρα που ενσωματώνουν το φορέα σε κάποιο τυχαίο σημείο στο γονιδίωμα είναι ανθεκτικά στη νεομυκίνη αλλά όχι και στη γκανσικλοβίρη αφού περιέχουν και το γονίδιο TK (Εικόνα 9).

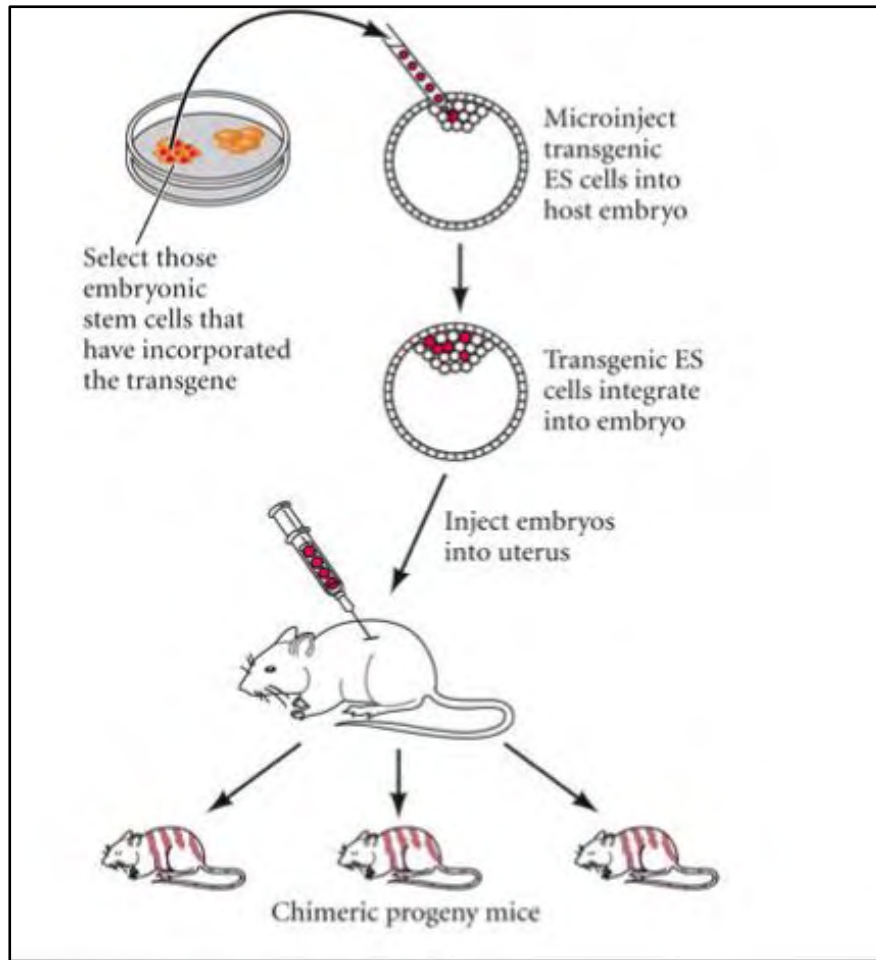




**Εικόνα 9: Ανασυνδυασμός του φορέα στο γονιδίωμα των βλαστοκυττάρων ποντικών**

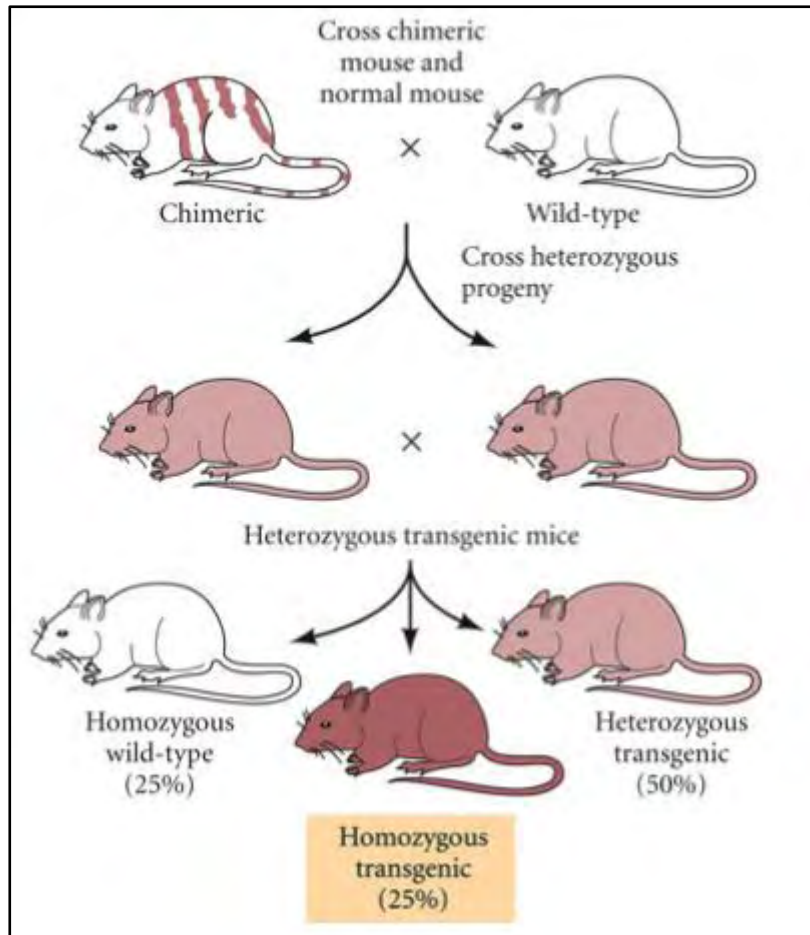
Τυχαία ενσωμάτωση του φορέα στο γονιδίωμα των βλαστοκυττάρων (αριστερά). Ενσωμάτωση του φορέα σε συγκεκριμένο σημείο στο γονιδίωμα λόγω του ομόλογου ανασυνδυασμού (δεξιά) (Mario R. Capecchi et al. 2007).

Στη συνέχεια, τα βλαστοκύτταρα αναπτύσσονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό παρουσία νεομυκίνης ώστε να γίνει η επιλογή των κυττάρων που έχουν ενσωματώσει τον φορέα. Τα ανθεκτικά στη νεομυκίνη κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία γκανσικλοβίρης για να επιλεγθούν αυτά που έχουν ενσωματώσει το φορέα στη σωστή θέση στο γονιδίωμα του ποντικού. Αυτά τα κύτταρα που έχουν επιλεγεί, είναι ανθεκτικά στη νεομυκίνη και στην γκανσικλοβίρη και είναι ετερόζυγα ως προς τη μετάλλαξη knockout. Τα βλαστοκύτταρα που επιλέχθηκαν εισάγονται με μικροένεση σε βλαστοκύστη ενός άλλου ποντικού και εμφυτεύονται στη μήτρα ενός ψευδοέγκκου ποντικού. Καθώς τα τροποποιημένα βλαστοκύτταρα διαιρούνται μπορούν να δώσουν κάθε τύπο ιστού στο αναπτυσσόμενο ποντίκι. Από την διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως θα παραχθούν χιμικά ποντίκια. Αυτό σημαίνει ότι ένα ποσοστό από τα κύτταρα των χιμαιρικών ποντικών θα προέρχεται από την κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης του ξενιστή και ένα άλλο ποσοστό προέρχεται από τα βλαστοκύτταρα που τροποποιήθηκαν (Gilbert, Barresi, Developmental biology) (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10:** Παραγωγή χμαιρικών ποντικών για το *knockout* γονίδιο (Gilbert, Barresi, Developmental biology).

Αν τα χμαιρικά ποντίκια ζευγαρώσουν με ποντίκια αγρίου τύπου, τότε κάποιοι από τους απογόνους θα έχουν ένα αντίγραφο του γονιδίου *knockout*. Όταν αυτά τα ετερόζυγα ποντίκια διασταυρώνονται, το 25 % περίπου των απογόνων που προκύπτουν θα είναι ομόζυγα (Εικόνα 11).



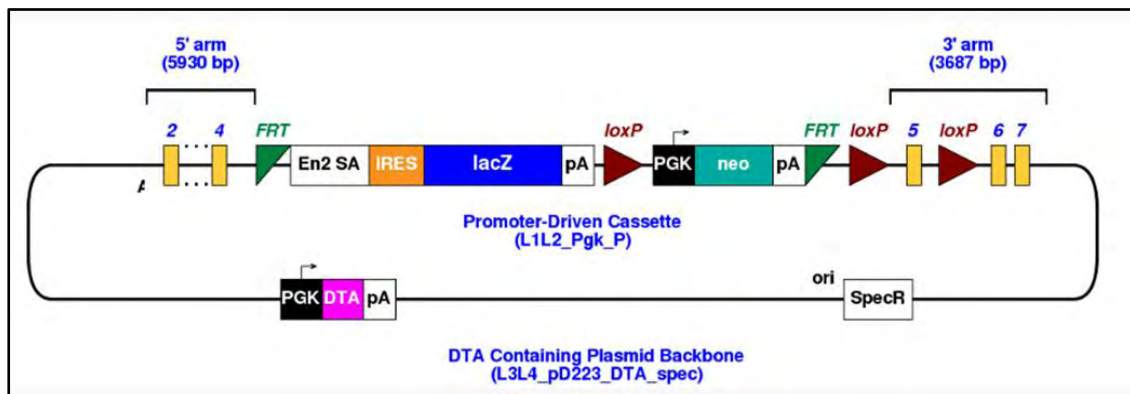
**Εικόνα 11:** Συνεχείς διασταυρώσεις ποντικών για την παραγωγή ομόζυγων ποντικών **knockout** (Gilbert, Barresi, Developmental biology).

Στη συνέχεια πραγματοποιείται ο χαρακτηρισμός των φαινοτύπων που σχετίζονται με την απώλεια του γονιδίου που μελετάται. Κάθε μετρήσιμος φαινότυπος πρέπει να εξεταστεί ώστε να προσδιοριστεί κάθε πιθανή λειτουργία του γονιδίου που εξαλείφθηκε. Θα πρέπει να γίνει σύγκριση του φαινοτύπου των ποντικών **knockout** με αυτόν των ποντικών αγρίου τύπου, ώστε να ταυτοποιηθούν οι λειτουργίες που τροποποιήθηκαν στο ποντίκι **knockout**.

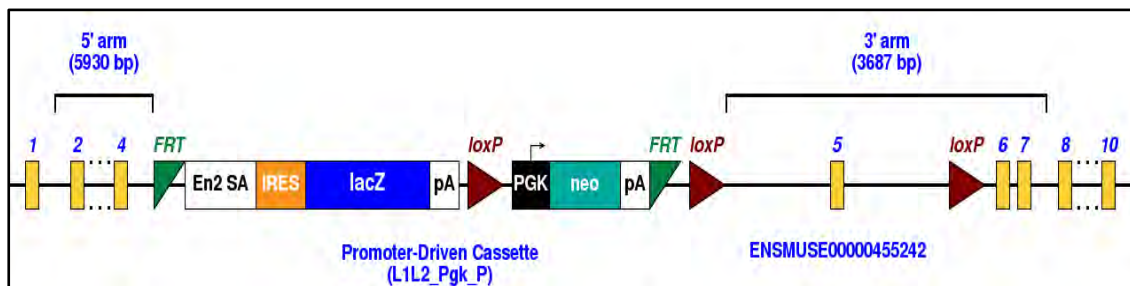
Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος, βάρος, μεταβολισμός, ανάπτυξη οστών, αναπαραγωγή, γήρανση, μπορούν εύκολα να μετρηθούν. Όμως αν το γονίδιο που έχει εξαλειφθεί είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη, τα ποντίκια **knockout** θα πεθάνουν ενώ είναι ακόμα έμβρυα, πριν προλάβουν οι ερευνητές να τα μελετήσουν. Σε αυτή την περίπτωση μπορεί να γίνει μελέτη των ετερόζυγων **knockout** ή να δημιουργηθούν άλλοι τύποι **knockout** όπως τα κατά συνθήκη ποντίκια **knockout** και τα ιστο-ειδικά **knockout**. Στα κατά συνθήκη ποντίκια **knock out**, το γονίδιο στόχος απενεργοποιείται ως απόκριση σε κάποιο ερέθισμα, ενώ στα

ιστο-ειδικά ποντικά knock-out το γονίδιο στόχος απενεργοποιείται μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς (Bradford Hall et al 2009).

Όσον αφορά την παραγωγή ποντικών knock-out ως προς το γονίδιο *FRA10AC1*, για τη διαμόλυνση των ES χρησιμοποιήθηκε ο ανασυνδυασμένος φορέας που παρουσιάζεται στην Εικόνα 12. Η δημιουργία αυτών των ποντικών έγινε από την υποδομή Infrafrontier-GR στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ" (επικεφαλής Δρ. Δημήτριος Κοντογιάννης). Επίσης στην Εικόνα 12 φαίνονται τα εξόνια 2-4 και 5-7 του γονιδίου *FRA10AC1* καθώς και το σημείο που αυτό διακόπτεται από τον φορέα. Στην Εικόνα 13 φαίνεται η περιοχή του γονιδιώματος των κυττάρων ES μετά τον ομόλογο ανασυνδυασμό.



Εικόνα 12: Κατασκευή ανασυνδυασμένου φορέα για τη δημιουργία ποντικών knock-out ως προς το γονίδιο *FRA10AC1*.



Εικόνα 13: Τμήμα του ανασυνδυασμένου φορέα που έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα των ES των ποντικών.

## 1.7 Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η γονοτύπηση ποντικών που προήλθαν από διασταύρωση ετερόζυγων knockout με ποντίκια αγρίου τύπου. Η γονοτύπηση έγινε μέσω της αντίδρασης αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR) σε δείγματα που απομονώθηκαν από ουρές των ποντικών, ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των ποντικών που φέρουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο από αυτά αγρίου τύπου.

## 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Υλικά

#### Για την PCR

Εκκινητές: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι από την εταιρία Eurofins Genomic

F1': 5' GTG TTT TAT TTT GAA ACC TTA ATG TTC 3'

LAR3: 5' CAC AAC GGG TTC TTC TGT TAG TCC 3'

R1': 5' GTC ATC TGA ATC CTA TGT CAA GTG 3'

Ρυθμιστικό διάλυμα: Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις PCR είναι από την εταιρία Karra Biosystems.

Buffer A KAPA taq 1,5 mM Mg 1x

Πολυμεράση Taq KAPA 5u /μl

13 Δείγματα DNA από ποντικούς

### 2.2. Απομόνωση γενωμικού DNA από ποντίκια

Αφαιρέθηκε 1 mm τμήματος ουράς από 13 ποντίκια που προήλθαν από διασταυρώσεις ετερόζυγων knockout με ποντίκια αγρίου τύπου. Ο ιστός τοποθετήθηκε αντίστοιχα σε 13 eppendorfs με πρωτεΐνάση K και ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνάσης K τελικού όγκου 150 μl. Όλες οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Δρ. Αποστόλου Κλινάκη στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών.

### 2.3. Καθαρισμός γενωμικού DNA με φαινόλη - χλωροφόρμιο

- Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης – χλωροφορμίου και ανάδευση καλή.
- Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 20' στους 4 °C.
- Μεταφορά υδατικής φάσης σε καινούριο errendorf και ξανά προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης – χλωροφορμίου και ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 20' στους 4 °C.
- Μεταφορά υδατικής φάσης σε καθαρό errendorf προσθήκη χλωροθορμίου και ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 5' στους 4 °C.
- Μεταφορά της υδατικής φάσης σε άλλο errendorf και προσθήκη 1/10 του όγκου CH<sub>3</sub>COONa (pH =5,3) και αιθανόλη 100 % όσο το διπλάσιο του όγκου και έγινε ανάδευση.
- Επάωση για 20' στους -80 °C
- Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 20' στους 4 °C προκειμένου να κατακρημνιστεί το DNA.
- Προσθήκη αιθανόλης 70 % και φυγοκέντρηση στις 12.000 για 10' στους 4 °C
- Αφαίρεση υπερκειμένου και επάωση στους 55 °C, ώστε να στεγνώσει το ίζημα
- Επαναδιάλυση σε καθαρό H<sub>2</sub>O.

### 2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Έγινε PCR προκειμένου να ανιχνευθεί το μεταλλαγμένο (knockout) ή το φυσιολογικό γονίδιο και αν αυτό βρίσκεται σε ομόζυγη ή ετερόζυγη κατάσταση, σε κάθε δείγμα. Κατά την αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 2 ζεύγη εκκινητών. Το F1'-LAR3 χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου. Ενώ με το ζεύγος F1'-R1' μπορεί να γίνει ανίχνευση του φυσιολογικού αλληλομόρφου στα δείγματα. Τα δύο ζεύγη εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν ώστε να είμαστε βέβαιοι για την αξιοπιστία των αντιδράσεων PCR και ότι δεν υπάρχουν ψευδή αποτελέσματα. Επιπλέον, για να εξασφαλιστεί αυτό έγιναν επαναληπτικές PCR και με διαφορετικές ποσότητες DNA, οι οποίες ακολουθούν παρακάτω.

Οι αντιδράσεις αυτές έγιναν σε τελικό όγκο 25 μl, ενώ οι συνθήκες που επιλέχθηκαν ήταν οι εξής :

Στάδιο 1 → 95 °C για 4 min

Στάδιο 2 → 95 °C για 30 sec

58 °C για 30 sec (για το ζεύγος εκκινητών F1')

59 °C για 30 sec (για το ζεύγος εκκινητών F1' - R1)

72 °C για 45 sec

Στάδιο 3 → 72 °C για 10 min

Για τις PCR που ακολούθησαν ετοιμάστηκαν 2 μίγματα με τα αντιδραστήρια για τα 2 ζεύγη των εκκινητών και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής :

Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) : 2,5μl

dNTPs: 0,6 μl (40mM)

F1': 1 μl (50pmole)

R1: 1 μl (50pmole)

Taq: 0,3 μl (5 units/μl)

H<sub>2</sub>O: 15,6 μl

Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) : 2,5μl

dNTPs: 0,6 μl

F1': 1 μl

LAR3 : 1 μl

Taq: 0,3 μl

H<sub>2</sub>O : 15,6 μl

## 2.5. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ηλεκτρικά φορτισμένων μακρομορίων όπως το DNA ή οι πρωτεΐνες. Κατά την

ηλεκτροφόρηση διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων σε πηκτή αγαρόζης. Ως αποτέλεσμα τα αρνητικά φορτισμένα σωματίδια μετατοπίζονται προς το θετικό πόλο. Ο ρυθμός με τον οποίο μετατοπίζεται το DNA εξαρτάται κυρίως από το μέγεθός του, τη διαμόρφωσή του, τη συγκέντρωση της αγαρόζης και την τάση του ηλεκτρικού πεδίου. Τα πιο μικρά τμήματα DNA μετακινούνται πιο εύκολα στο gel σε αντίθεση με τα μεγαλύτερα τμήματα. Επίσης χρησιμοποιώντας κάποιο μάρτυρα (DNA ladder) μπορεί να προσδιοριστεί το μοριακό μέγεθος των τμημάτων DNA που «τρέχουν» στο gel αγαρόζης.

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτές με συγκέντρωση 1 % αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE, ενώ προστέθηκε και η χρωστική Serva. Αυτή η χρωστική χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση των τμημάτων DNA κατά την έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η χρωστική Serva χρησιμοποιείται όπως το βρωμιούχο αιθίδιο αλλά έχει μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση DNA ή RNA και δεν είναι καρκινογόνα.

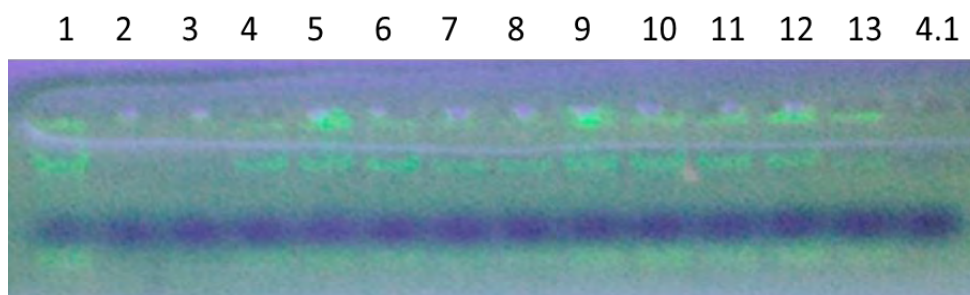
Αρχικά έγινε ηλεκτροφόρηση για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων DNA 1-13, ώστε να γνωρίζουμε τι ποσότητα από αυτά θα χρησιμοποιηθεί για τις αντιδράσεις PCR, ενώ οι ηλεκτροφορήσεις που ακολούθησαν μετά τις PCR, έγιναν ώστε να ανιχνευθεί αν στα δείγματα ενισχύθηκε το μεταλλαγμένο ή το φυσιολογικό γονίδιο ή και τα δύο.



## 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1. Ποσοτικοποίηση γενωμικού DNA ποντικών

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA και από τα 13 δείγματα ποντικών. Η ποσοτικοποίηση του γενωμικού DNA που απομονώθηκε από τα ποντίκια έγινε ώστε να επιβεβαιωθεί ότι υπάρχει DNA στα δείγματα και να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή του ώστε να γνωρίζουμε τι ποσότητα από το κάθε δείγμα θα χρησιμοποιηθεί για τις αντιδράσεις PCR. Όπως φαίνεται στην εικόνα έγινε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων 1-13 και του θετικού ελέγχου 4.1 από το γενωμικό DNA και χρησιμοποιήθηκαν 3 μl από το καθένα. Με βάση την εικόνα, φαίνεται ότι όλα τα δείγματα έχουν DNA. Ωστόσο, τα δείγματα 2 και 3 έχουν μειωμένη ποσότητα το οποίο λήφθηκε υπ' όψιν κατά την PCR.



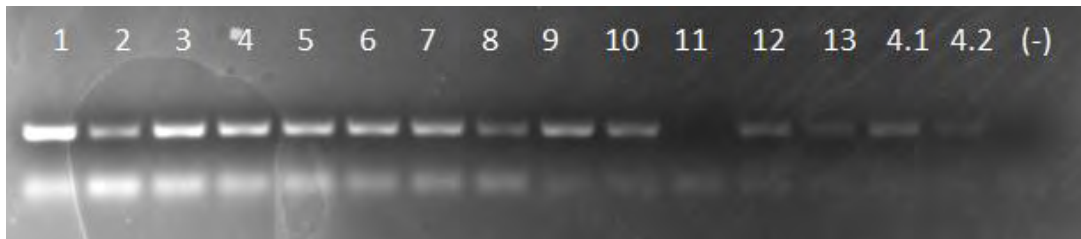
Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση γενωμικού DNA ποντικών.

### 3.2. Αποτελέσματα PCR

Η πρώτη PCR έγινε στα δείγματα 1-13, ενώ χρησιμοποιήθηκαν 2 δείγματα θετικού ελέγχου (4.1 και 4.2) και καθαρό νερό ως αρνητικός έλεγχος. Τα δείγματα θετικού ελέγχου, τα οποία δίνουν προϊόν και για τα δύο ζεύγη εκκινητών, χρησιμοποιήθηκαν ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η αντίδραση είναι επιτυχής. Η χρήση του δείγματος αρνητικού ελέγχου εξασφαλίζει ότι δεν παράχθηκε προϊόν εξαιτίας κάποιας διαμόλυνσης. Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν 4 μl DNA από όλα τα δείγματα και τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης φαίνονται στις παρακάτω δύο εικόνες.



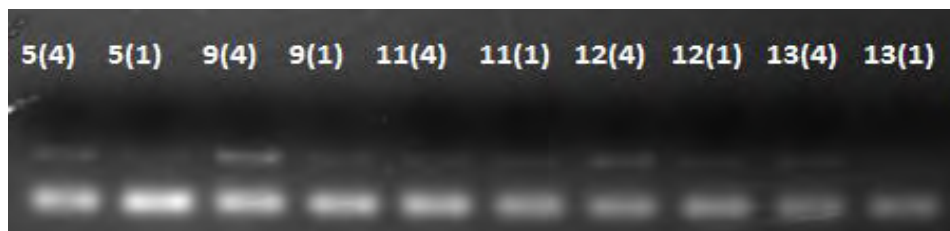
**Εικόνα 15: Δείγματα DNA που ενισχύθηκαν με το ζεύγος εκκινητών για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου, F1'-R1.** Σε κάθε πηγαδάκι φορτώθηκαν από περίπου 15 μl δείγματος.



**Εικόνα 16: Δείγματα DNA που ενισχύθηκαν με το ζεύγος εκκινητών για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, F1' - LAR3.**

Όπως φαίνεται στις εικόνες 15 και 16, τα δείγματα #5, #9 και #13 δεν έδωσαν προϊόν για τους εκκινητές F1'- R1, ενώ το δείγμα # 13 δεν έδωσε αποτελέσματα για τους εκκινητές F1' - LAR3.

Η επόμενη PCR έγινε στα δείγματα #5, #9, #11, #12, #13 με 2 διαφορετικές ποσότητες (1μl και 4μl) από το καθένα από αυτά. Σε κάθε πηγαδάκι φορτώθηκαν από 10 μl δείγματος.



**Εικόνα 17: Προϊόντα PCR που ενισχύθηκαν από τους εκκινητές F1'-R1'(πάνω) και F1'-LAR3.** Στις παρενθέσεις απεικονίζονται τα μl των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR. Ως (-) L απεικονίζεται ο αρνητικός μάρτυρας για τους εκκινητές F1'-LAR3 ενώ ως (-) R ο αρνητικός μάρτυρας για το ζεύγος εκκινητών F1'-R1'.

Στην εικόνα 17 δεν παρατηρήθηκε προϊόν για τους εκκινητές F1'-R1' στα δείγματα #5, #9 και #13, ενώ για τους εκκινητές F1'-LAR3 παρατηρήθηκε προϊόν σε όλα τα δείγματα. Επίσης συμπεραίνεται ότι η PCR λειτουργεί καλύτερα για την ποσότητα DNA 4μl. Μία τελική αντίδραση PCR έγινε στα δείγματα #5, #9, #11 και #13 με δύο διαφορετικές ποσότητες DNA (5μl και 8μl). Φορτώθηκαν από περίπου 18 μl DNA από το κάθε δείγμα στο πήκτωμα.



**Εικόνα 18: Προϊόντα PCR που ενισχύθηκαν από τους εκκινητές F1'-LAR3.**

Για το ζεύγος εκκινητών F1-LAR3 παρατηρήθηκε προϊόν σε όλα τα δείγματα, ενώ δείγμα #11 η ζώνη φαίνεται ελάχιστα, λόγω κάποιου λάθους κατά τη φόρτωση του δείγματος. Συνδυαστικά, όλα τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1: Αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων**

Δείγματα	Ζεύγος εκκινητών	
	F1' – LAR3	F1' – R1
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	-
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	-
10	+	+
11	+	+
12	+	+
13	+	-

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων τα οποία παρουσιάζονται συνοπτικά στον παραπάνω πίνακα, φαίνεται ότι όλα τα ποντίκια είναι ετερόζυγα. Το ότι για κάποια δείγματα η PCR δεν ήταν θετική με τους εκκινητές F1-R1 δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα γιατί αυτά τα δείγματα προέρχονται από διασταύρωση ετερόζυγου knockout ποντικού με ποντίκι αγρίου τύπου, συνεπώς δεν αναμένεται ομόζυγο knockout. Αμφιβολία υπάρχει μόνο για το δείγμα 11, λόγω της μειωμένης έντασης του προϊόντος της PCR.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συγκεκριμένη εργασία έγινε στο πλαίσιο της συσχέτισης γονοτύπου - φαινοτύπου γενετικά τροποποιημένων ποντικών ως προς το γονίδιο *FRA10AC1*. Είχαν ήδη παραχθεί ποντίκια knockout σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην Εισαγωγή. Τα ποντίκια που γονοτυπήθηκαν σε αυτήν την εργασία προέκυψαν με διασταυρώσεις ετερόζυγων ατόμων με άτομα αγρίου τύπου. Έτσι 20 περίπου μέρες μετά τη γέννηση των ποντικών, έγινε απομόνωση DNA από 13 από αυτούς με αφαίρεση τμήματος 1mm από τις ουρές τους και τοποθέτηση τους σε erpendorfs με διάλυμα πρωτεΐνάσης K. Στη συνέχεια αφού παραλάβουμε τα erpendorfs με τα δείγματα, έγινε καθαρισμός του DNA με φαινόλη - χλωροφόρμιο, αιθανόλη και επαναδιάλυση σε καθαρό νερό. Ακολούθησαν αντιδράσεις PCR με 2 ζεύγη εκκινητών για να ελέγξουμε αν θα ενισχυθεί το μεταλλαγμένο ή το φυσιολογικό αλληλόμορφο ή και τα 2. Τα αποτελέσματα των PCR φάνηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη. Τελικά μέσω αυτής της διαδικασίας βρέθηκε ότι τα 12 από αυτά είναι ετερόζυγα ως προς το μεταλλαγμένο *FRA10AC1* ενώ ένα δείγμα χρειάζεται επιβεβαίωση.

Όσον αφορά τα ετερόζυγα άτομα τα οποία εντοπίστηκαν με την γονοτύπηση, θα πρέπει να ελεγχθεί αν όντως η έλλειψη του ενός αλληλόμορφου σχετίζεται με νοητική υστέρηση. Τα επόμενα βήματα είναι να συλλεχθεί ικανός αριθμός ετερόζυγων ποντικών καθώς και ποντικών αγρίου τύπου ώστε να γίνουν δοκιμασίες συμπεριφοράς που αφορούν τη μνήμη και τη μάθηση. Για την αξιολόγηση του φαινοτύπου χρειάζονται περίπου 10-20 ποντίκια ετερόζυγα ως προς τη μετάλλαξη και για κάθε φύλο, ώστε τα αποτελέσματα να είναι αρκετά αξιόπιστα. Επιπλέον θα πρέπει να εξασφαλιστεί ότι οι εξωτερικοί παράγοντες (συνθήκες στέγασης, περιβάλλον, διατροφή) που μπορεί να επηρεάσουν τα

αποτελέσματα είναι ελαχιστοποιημένοι για όλα τα ποντίκια του πειράματος (Bailey R. et al. 2006, Crawley N. et al. 2008). Ένα είδος δοκιμασίας συμπεριφοράς είναι ο υδάτινος λαβύρινθος του Morris κατά την οποία αξιολογείται η ικανότητα χωρικής μάθησης των τρωκτικών. Πραγματοποιείται σε μια μία κυκλική δεξαμενή κολύμβησης στην οποία το νερό δεν είναι διαυγές εξαιτίας μιας χρωστικής. Τα πειραματόζωα αφήνονται να κολύπησουν στη δεξαμενή και βασιζόμενα σε σημεία αναφοράς του εξωτερικού περιβάλλοντος πρέπει να εντοπίσουν μια βυθισμένη πλατφόρμα διαφυγής σε αυτήν. Συνήθως αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές τη μέρα ενώ κάθε φορά τα ποντίκια ξεκινούν από διαφορετικό σημείο εκκίνησης και έχει διάρκεια περίπου 5-6 μέρες (20-24 δοκιμές συνολικά). Καθ' όλη τη διάρκεια αυτών των επαναλαμβανόμενων δοκιμών αξιολογείται η ικανότητα χωρικής μάθησης των ποντικών ανάλογα με το πόσο χρόνο χρειάζονται ώστε να εντοπίσουν την πλατφόρμα διαφυγής. Για τον προσδιορισμό της χωρικής μνήμης των πειραματοζώων, η πλατφόρμα διαφυγής αφαιρείται από την δεξαμενή και συγκρίνεται ο χρόνος παραμονής των ποντικών στο σημείο που είχε τοποθετηθεί προηγουμένως η πλατφόρμα με τον χρόνο παραμονής τους στα υπόλοιπα σημεία της δεξαμενής (Crawley N. 1999).

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bessonov S. et al. "Characterization of purified human B<sub>act</sub> spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis." *RNA*, 2010 16(12): p. 2384-403
2. Bessonov S. et al.. "Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core" *Nature*, 2008 452(7189): p. 846-50
3. Debacker K. et al. "Fragile sites and human disease" *Human Molecular Genetics* 2007 16 (2): p. 150–158
4. Mario R. Capecchi et al. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine" 2007
5. Kirk R. Thomas and Capecchi M.R. "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells" *Cell*, 1987 51: p. 503-12
6. Gilbert, Barresi *Developmental biology* 11th edition, chapter 3
7. Park et al. "Integrated analysis of global proteome, phosphoproteome, and glycoproteome enables complementary interpretation of disease-related protein networks" *Sci Rep.* 2015 5: 18189
8. Sharma et al. "Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling" *Cell Rep.* 2014 8(5):1583-94
9. Ilagan et al. "Rearrangements within human spliceosomes captured after exon ligation" *RNA* 2013 19 (3): p. 400–412
10. Schmidt et al. "Mass spectrometry–based relative quantification of proteins in precatalytic and catalytically active spliceosomes by metabolic labeling (SILAC), chemical labeling (iTRAQ), and label-free spectral count" *RNA* 2014 20 (3): p. 406-420
11. Sarafidou T. et al. "Folate-sensitive fragile site FRA10A is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, FRA10AC1, encoding a nuclear protein" *Genomics* 2004 84 (1): p. 69-81
12. Lukusa T. Fryns JP. " Human chromosome fragility " *Biochimica Biophys Acta* 2008 1779 (1): p.3-16
13. Assam El-Osta "FMR1 silencing and the signals to chromatin: a unified model of transcriptional regulation" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002 295 (3): p. 575–581
14. Bailey R. et al. "Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: practical concerns and potential pitfalls" *ILAR Journal* 2006 47 (2): p. 124–131
15. Crawley N. "Behavioral Phenotyping Strategies for Mutant Mice" *Neuron* 2008 57 (6): p. 809-18

16. Crawley N. "Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice: Experimental Design and Evaluation of General Health, Sensory Functions, Motor Abilities, and Specific Behavioral Tests" *Brain Research* 1999 835: p. 18-26
17. Majzoub and Muglia "Knockout Mice" *Engl J Med* 1996 334: p.904-7
18. Bradford Hall et al. "Overview: Generation of Gene Knockout Mice" *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2009 chapter: unit-19.1217