

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Γονοτύπηση και μελέτη ποντικών με απαλοιφή του γονιδίου *FRA10AC1*

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΛΑΖΟΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ
ΛΑΡΙΣΑ
2018**

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ: ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΛΙΑΔΑΚΗ ΚΑΛΛΙΟΠΗ:

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ:

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της Επίκουρος Καθηγήτριας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Σαραφίδου Θεολογίας, την οποία θέλω να ευχαριστήσω για τις πολύτιμες συμβουλές της, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ανάθεση της παραπάνω πτυχιακής εργασίας. Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω την Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας και τον Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή και τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Γαλλιοπούλου Ελένη, Γιαννούλη Θέμη και Τσιπουρλιάνο Ανδρέα, καθώς και το Σταμάτη Κώστα για την εποικοδομητική συνεργασία μας το τελευταίο εξάμηνο και τις πολύτιμες συμβουλές τους. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για την άριστη συνεργασία τους.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω σε όλους τους καθηγητές που είχα όλα τα χρόνια της μέχρι στιγμής ακαδημαϊκής μου ζωής, για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν και με έκαναν καλύτερο άνθρωπο.

Τέλος ένα μεγάλο και εγκάρδιο ευχαριστώ αξίζουν δύο ήρωες της καθημερινότητάς μου, οι γονείς μου Λάζος Αθανάσιος και Εύα Τζούλη, που με στηρίζουν ηθικά και οικονομικά όλα αυτά τα χρόνια, δίνοντάς μου κουράγιο να προχωρώ και να υπερπηδώ κάθε εμπόδιο για να φτάσω στο στόχο μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	[4]
2. ABSTRACT.....	[5]
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	[6]
3.1 Εύθραστες χρωμοσωματικές θέσεις.....	[6]
3.2 Ταξινόμηση εύθραυστων χρωμοσωματικών θέσεων.....	[6]
3.3 Μοριακή βάση εύθραυστων χρωμοσωματικών θέσεων.....	[7]
3.4 Κλινική σημασία εύθραυστων χρωμοσωματικών θέσεων.....	[8]
3.5 Η σπάνια εύθραυστη χρωμοσωματική θέση FRA10A.....	[9]
3.6 Κλινική σημασία της εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης FRA10A....	[10]
3.7 Μοριακή βάση της εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης FRA10A.....	[11]
3.8 Το γονίδιο FRA10AC1.....	[11]
3.9 Η πρωτεΐνη FRA10AC1.....	[13]
3.10 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης FRA10AC1.....	[15]
3.11 IKMC (International Knockout Mouse Consortium).....	[17]
3.12 Στρατηγική γονιδιακής στόχευσης του EUCOMM.....	[17]
3.13 Παραγωγή ετερόζυγων ποντικών για το αλληλόμορφο tm1b.....	[19]
3.14 Παραγωγή ετερόζυγων ποντικών για το αλληλόμορφο tm1c.....	[20]
3.15 Παραγωγή Knockout ποντικών.....	[20]
3.16 Σκοπός της εργασίας.....	[21]
4. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	[22]
4.1 Απομόνωση πυρηνικού DNA.....	[22]
4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	[24]
4.3 PCR πολλαπλών εκκινήτων (Multiplex PCR).....	[28]
4.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	[30]
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	[32]
5.1 Σχεδιασμός γονοτύπησης.....	[32]
5.1.1 Σχεδιασμός γονοτύπησης των υποψήφιων δειγμάτων για το αλληλόμορφο tm1c.....	[33]
5.1.2 Σχεδιασμός γονοτύπησης των υποψήφιων δειγμάτων για το αλληλόμορφο tm1b.....	[34]
5.2 Απομόνωση DNA.....	[35]
5.3 Γονοτύπηση δειγμάτων υποψήφιων για το αλληλόμορφο tm1c.....	[38]
5.4 Γονοτύπηση δειγμάτων υποψήφιων για το αλληλόμορφο tm1b.....	[39]
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	[43]
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	[45]

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *FRA10AC1* είναι ένα γονίδιο, το οποίο χαρτογραφείται στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3 στη σπάνια χρωμοσωματική εύθραυστη θέση *FRA10A* του ανθρώπου. Η έκφρασή της *FRA10A* οφείλεται στην επέκταση των τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων (CGG)_n στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του *FRA10AC1*, προκαλώντας υπερμεθυλίωση της περιοχής και μεταγραφική καταστολή του γονιδίου. Το γονίδιο *FRA10AC1* εκφράζεται ευρέως σε όλους τους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφάλου και κωδικοποιεί τη συντηρημένη πυρηνική πρωτεΐνη FRA10AC1. Έχει αναφερθεί ότι η εμφάνιση της *FRA10A* σχετίζεται με ήπια νοητική υστέρηση και αναπτυξιακές ανωμαλίες που παρατηρούνται σε άτομα φορείς της εύθραυστης θέσης *FRA10A*. Αν και η λειτουργία της είναι μέχρι σήμερα άγνωστη, πιθανή είναι η συνεισφορά της στη διαδικασία συναρμογής, λόγω αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή ή/και πιθανόν σε άλλες στενά συσχετιζόμενες λειτουργίες. Η πρωτεΐνη FRA10AC1 είναι εξελικτικά συντηρημένη σε πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Η παρούσα εργασία στοχεύει στη γονοτύπηση δειγμάτων DNA ποντικών, στα οποία έχει γίνει προσπάθεια αποσιώπησης του ενδογενούς γονιδίου *FRA10AC1*.

2. ABSTRACT

FRA10AC1 gene is mapped at 10q23.3 region at human chromosomal rare fragile site *FRA10A*. The expression of *FRA10A* is associated with the expansion of a (CGG)_n repeat located in the 5' UTR region of *FRA10AC1*, resulting in hypermethylation of the region and gene silencing. *FRA10AC1* is widely expressed, including the brain and encodes a conserved nucleoplasmic protein, FRA10AC1. It has been reported that the appearance of *FRA10A* is associated with mild mental retardation and developmental abnormalities observed in individual carriers of fragile site *FRA10A*. Although its function remains until today unclear, it is possibly implicated in splicing, due to interactions with other proteins involved in this procedure or/and other related procedures. FRA10AC1 is conserved among multicellular eukaryotic organisms.

This work aims at genotyping DNA samples of mice that have been attempted to silence the endogenous *FRA10AC1* gene.

3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.1 Εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις

Οι εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις είναι συγκεκριμένοι κληρονομικοί τόποι ιδιαίτερα επιρρεπείς σε θραύση (Lagana et al. 2010, Lukusa & Fryns 2008). Αποτελούν περιοχές χρωματίνης που αποτυγχάνουν να συμπυκνωθούν κατά τη διάρκεια της μίτωσης (Lukusa & Fryns 2008). Ως αποτέλεσμα προκαλείται θραύση στο μεταφασικό χρωμόσωμα και δημιουργία ελλείματος από την περιοχή της θραύσης μέχρι το άκρο του χρωμοσώματος (Smith et al. 2010). Αποτελέσματα ερευνών δείχνουν ότι, κατά μέσο όρο, οι εύθραυστες θέσεις είναι πυκνότερες σε miRNAs και σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Lagana et al. 2010). Επίσης, βρέθηκε μια θετική συσχέτιση μεταξύ ευθραυστότητας και επαναλήψεων (Lagana et al. 2010).

3.2 Ταξινόμηση εύθραυστων χρωμοσωματικών θέσεων

Οι εύθραυστες θέσεις ταξινομούνται σε σπάνιες και σε κοινές, ανάλογα με τη συχνότητα εμφάνισής τους στον πληθυσμό και υποδιαιρούνται περαιτέρω σύμφωνα με τον τρόπο επαγωγής της έκφρασής τους σε καλλιέργειες κυττάρων (Lukusa & Fryns 2008, Burrow et al. 2009). Η συχνότητα των σπάνιων εύθραυστων χρωμοσωματικών θέσεων στον πληθυσμό είναι < 5% (Lukusa & Fryns 2008, Kremer et al. 1991, Sutherland et al. 1998) και κληρονομούνται με μενδελικό τρόπο (Kremer et al. 1991, Sutherland et al. 1998, Durkin and Glover 2007). Μοριακά έχουν χαρακτηριστεί 7 εύθραυστες θέσεις, ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ (*FRA10A*, *FRA11B*, *FRA12A*, *FRA16A*, *FRAXA*, *FRAXE* και *FRAXF*) και 2 μη ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ (*FRA10B* και *FRA16B*) (Lukusa & Fryns 2008). Το φυλλικό οξύ δρα ως συνένζυμο στις αντιδράσεις μεταφοράς, κατά τη σύνθεση πουρινών. Οι μη ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ εύθραυστες θέσεις επάγονται είτε από τη δισταμικίνη Α, ένα ολιγοπεπτίδιο – αντιβιοτικό, είτε από τη βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU), ένα χημικό ανάλογο της θυμιδίνης, το οποίο ενσωματώνεται στο DNA κατά την αντιγραφή του και εμποδίζει τη σύνθεσή του.

Οι κοινές εύθραυστες θέσεις είναι παρούσες σε όλα τα άτομα και επομένως πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύουν ένα φυσιολογικό συστατικό της δομής του χρωμοσώματος (Glover 2006). Οι κοινές εύθραυστες θέσεις κατηγοριοποιούνται με βάση την επαγωγή τους από διάφορα χημικά μόρια. Έτσι, προκύπτουν οι εξής κατηγορίες: α) Επαγόμενες από αφιδικολίνη. Η αφιδικολίνη (aphidicolin) είναι ένας ειδικός αναστολέας της DNA πολυμεράσης α (Glover 1984). β)

Επαγόμενες από 5-αζακυτιδίνη, ένα χημικό ανάλογο της κυτιδίνης (5-azacytidine). Η 5-αζακυτιδίνη ενσωματώνεται στο DNA και αναστέλλει τη μεθυλίωσή του (Christman 2002). Μελέτες έδειξαν ότι η 5-αζακυτιδίνη (ZCyd) είναι ένας επαγωγέας θραύσης χρωμοσωμάτων και μεταλλαξιογόνο (Halle 1968, Karon and Benedict 1972, Landolph and Jones, 1982, Paul 1982, Viegas-Pequignot and Dutrillaux 1976). γ) Επαγόμενες από βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU). Οι κοινές εύθραυστες θέσεις κανονικά είναι σταθερές σε σωματικά κύτταρα (Glover 2006). Ωστόσο, μετά από την δοκιμή (treatment) των καλλιεργημένων κυττάρων με αναστολείς αναδιπλασιασμού, οι εύθραυστες θέσεις εμφανίζουν κενά, θραύσεις, αναδιατάξεις και άλλα χαρακτηριστικά του ασταθούς DNA (Glover 2006). Παρά τις πρόσφατες εξελίξεις, παραμένουν πολλά ερωτήματα σχετικά με την κανονική λειτουργική σημασία αυτών των διατηρημένων περιοχών και τη βάση της ευθραυστότητάς τους (Glover et al. 2005).

3.3 Μοριακή βάση εύθραυστων χρωμοσωματικών θέσεων

Η συσχέτιση των εύθραυστων χρωμοσωματικών θέσεων με γενετικές διαταραχές στον άνθρωπο και με τον καρκίνο (Lagana et al. 2010) υποδεικνύει τη σημασία που έχει η διερεύνηση της μοριακής τους βάσης. Για αυτό το λόγο, έγινε μία προσπάθεια να κατανοηθούν οι μηχανισμοί που οδηγούν στην ευθραυστότητα σε κάθε κατηγορία εύθραυστων θέσεων. Αν και η μοριακή βάση των εύθραυστων χρωμοσωματικών θέσεων δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως, πολλοί είναι οι παράγοντες, οι οποίοι συμβάλλουν στη γονιδιωματική αστάθειά τους.

Σε όλες τις σπάνιες εύθραυστες θέσεις εμφανίζεται επέκταση ενός επαναλαμβανόμενου μοτίβου, το οποίο εμφανίζει πολυμορφισμό στο γενικό πληθυσμό. Στις ευαίσθητες στο φυλλικό εύθραυστες θέσεις γίνεται επέκταση πολυμορφικών CCG / CGG τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων, ενώ στις μη ευαίσθητες στο φυλλικό εύθραυστες θέσεις γίνεται επέκταση πλούσιων σε δινουκλεοτίδια A/T μινιδροφύρων (Lukusa & Fryns 2008). Αυτές οι επεκτεινόμενες επαναλήψεις μπορούν να σχηματίσουν δευτεροταγείς δομές, οι οποίες εμποδίζουν την αντιγραφή και έχουν μειωμένη αποτελεσματικότητα στη συναρμολόγηση νουκλεοσωμάτων, με αποτέλεσμα ελαττώματα στην αποσυμπύκνωση της χρωματίνης που θεωρούνται εύθραυστες θέσεις (Lukusa & Fryns 2008). Μπορούν να σχηματιστούν διαφόρων μορφών δευτεροταγείς δομές, όπως η B-DNA, ενδοκλωνικές φουρκέτες και τετραελικοειδείς δομές (Lukusa & Fryns 2008).

Στις συνήθεις εύθραυστες θέσεις περιέχονται περιοχές με μεγάλη ευκαμψία, δηλαδή δυνατότητα στροφής, οι οποίες ονομάζονται κορυφές ευκαμψίας. Αποτελούνται από διακεκομμένες ακολουθίες πλούσιες σε δινουκλεοτίδια AT, διαφόρων μεγεθών, οι οποίες ονομάζονται νησίδες ευκαμψίας πλούσιες σε δινουκλεοτίδια AT. Οι νησίδες αυτές έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν

ασυνήθιστες δευτεροταγείς δομές στο DNA, όπως στις σπάνιες εύθραυστες θέσεις και να παρεμποδίζουν έτσι την αντιγραφή του DNA (Lukusa & Fryns 2008).

Μελετώντας και συγκρίνοντας μοριακά τις διαφορετικές κατηγορίες εύθραυστων θέσεων, αναμένονταν η ταυτοποίηση κάποιων κοινών χαρακτηριστικών. Με βάση όμως τα παραπάνω δεδομένα, δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποια ακολουθία – μοτίβο DNA για όλες τις κατηγορίες εύθραυστων θέσεων, καθώς κάθε κατηγορία έχει διαφορετική ακολουθία – μοτίβο. Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχει ένας κοινός μοριακός μηχανισμός, ο οποίος βασίζεται στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που εμποδίζουν την αντιγραφή του DNA και τη συναρμολόγηση των νουκλεοσωμάτων και οδηγεί στην ευθραυστότητά τους (Lukusa & Fryns 2008). Όλες οι εύθραυστες θέσεις διαθέτουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά, όπως ο σχηματισμός δευτεροταγών δομών που οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα στη συναρμολόγηση νουκλεοσωμάτων, με αποτέλεσμα ελαττώματα αποσυμπύκνωσης. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό που μοιράζονται οι εύθραυστες θέσεις είναι η υψηλή ευκαμψία στο DNA τους. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά μπορούν να εμποδίσουν την πρόοδο της αντιγραφής και να οδηγήσουν σε ευθραυστότητα. Τέλος, η μείωση ή η έλλειψη πρωτεϊνών στο εξαρτώμενο από την κινάση ATR σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου αυξάνει δραματικά τη θραύση των εύθραυστων θέσεων (Durkin and Glover 2007). Αυτή η κινάση είναι ιδιαίτερα σημαντική στο συγκεκριμένο σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, καθώς αντιλαμβάνεται και αποκρίνεται στις βλάβες του DNA. Έτσι, η έλλειψή της μπορεί να οδηγήσει σε θραύσματα σε αυτές τις θέσεις (Burrow et al. 2009).

3.4 Κλινική σημασία εύθραυστων χρωμοσωματικών θέσεων

Από κλινική άποψη, η ευαίσθητη σε φυλλικό σπάνια εύθραυστη θέση *FRAXA* είναι η σημαντικότερη εύθραυστη θέση, καθώς συνδέεται με το σύνδρομο του εύθραυστου X, την πιο κοινή μορφή οικογενούς νοητικής υστέρησης, που επηρεάζει περίπου το 1/4000 αρσενικά και τα 1/6000 θηλυκά (Lukusa & Fryns 2008). Η νοητική υστέρηση σε αυτό το σύνδρομο θεωρείται ότι προκύπτει από την κατάργηση της έκφρασης του γονιδίου *FMR1*, λόγω υπερμεθυλίωσης των CpG νησίδων του γονιδίου δίπλα στην επεκτεινόμενη τρινουκλεοτιδική επανάληψη. Η σπάνια εύθραυστη θέση *FRAXE* σχετίζεται με μια συνδεδεμένη με το X ήπια μορφή νοητικής υστέρησης (Sutherland & Baker 2000) και η σπάνια εύθραυστη θέση *FRA11B* με το σύνδρομο Jacobsen (Lukusa & Fryns 2008). Υπάρχουν επίσης κάποιες ενδείξεις ότι οι εύθραυστες θέσεις και ιδιαίτερα οι κοινές είναι υπεύθυνες για τις *in vivo* χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που σχετίζονται με τον καρκίνο (Lukusa & Fryns 2008). Για όλες τις υπόλοιπες σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις, δεν έχει αποδειχθεί κάποια συσχέτιση με παθολογικούς φαινότυπους (Lukusa & Fryns

2008). Επιπρόσθετα, τρεις σπάνιες εύθραυστες θέσεις, οι *FRA10B*, *FRA16B*, *FRA17A*, έχουν βρεθεί και σε ομοζυγωτία. Οι ομοζυγώτες αυτών των εύθραυστων θέσεων έχουν φυσιολογικό φαινότυπο, γεγονός που υποδεικνύει ότι αυτές οι θέσεις δεν επηρεάζουν τη λειτουργία γονιδίων που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη (Sutherland & Baker 2000). Τέλος, κάποιες σπάνιες εύθραυστες θέσεις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ δε συναντώνται σε ομοζυγωτία. Τέτοια άτομα θα ήταν αναμενόμενο να ταυτοποιηθούν λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή συχνότητα εμφάνισης των ετεροζυγωτών στον πληθυσμό. Αυτό υποδηλώνει ότι η ομοζυγωτία δεν είναι βιώσιμη (Sutherland & Baker 2000).

Μερικές από τις κοινές εύθραυστες θέσεις βρίσκονται μέσα σε γονίδια που έχουν εμπλακεί στον καρκίνο, αλλά δεν είναι σαφές εάν οι εύθραυστες θέσεις ή τα γονίδια στα οποία βρίσκονται είναι σημαντικά για την εμφάνιση καρκίνου (Sutherland & Baker 2000). Αυτό μπορεί να αποδίδεται στο ότι οι κοινές εύθραυστες θέσεις είναι περιοχές γονιδιωματικής αστάθειας, η οποία παρατηρείται αυξημένη σε μικροδορυφορικούς τόπους σε έναν αριθμό όγκων (Sutherland & Baker 2000). Έχει προταθεί ακόμη, ότι οι εύθραυστες θέσεις μπορεί να συμβάλλουν στη γενετική αστάθεια που παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα (O'Keefe et al. 2006, Lagana et al. 2010), αλλά ακόμη δεν έχει αποδειχθεί άμεσος ρόλος. Συχνά, τα γονίδια που βρίσκονται σε εύθραυστες θέσεις εμπλέκονται σε μεταθέσεις που οδηγούν είτε σε έκφραση μεταλλαγμένων ογκογονιδίων, είτε σε μη έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, με αποτέλεσμα την έναρξη του καρκίνου (Lagana et al. 2010). Ακόμη, ευρύματα μελετών υποδηλώνουν ότι οι κοινές εύθραυστες θέσεις μπορεί να χρησιμεύσουν ως δείκτες χρωμοσωμικής βλάβης που προκαλείται από το αντιγραφικό στρες κατά τα αρχικά στάδια της ογκογένεσης (Glover et al. 2005). Οι περισσότερες εύθραυστες θέσεις μπορούν να επαχθούν από περιβαλλοντικούς παράγοντες και χημικά, όπως η καφεΐνη, το αλκοόλ και ο καπνός του τσιγάρου (Burrow et al. 2009). Επιπρόσθετα, αυξανόμενα στοιχεία συνδέουν τη γονιδιωματική και επιγενετική αστάθεια, συμπεριλαμβανομένων των εύθραυστων θέσεων με νευροψυχιατρικές ασθένειες, όπως η σχιζοφρένεια και ο αυτισμός (Smith et al. 2010).

3.5 Η σπάνια εύθραστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A*

Η *FRA10A* ανήκει στις σπάνιες εύθραυστες θέσεις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, δηλαδή εμφανίζεται όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν απουσία φυλλικού οξέος στο θρεπτικό μέσο. Η *FRA10A* χαρτογραφείται στην περιοχή 23.3 του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 10 (10q23.3) και έχει μήκος περίπου 50kb. Αποτελεί την πιο συχνή από τις σπάνιες εύθραυστες θέσεις στο ανθρώπινο γονιδίωμα, με συχνότητα εμφάνισης 1 στα 500 άτομα (Petit et al. 1986, Sarafidou et al. 2004). Ωστόσο μέχρι σήμερα, απ'όσα είναι γνωστά δεν έχει αναφερθεί ομόζυγος *FRA10A*. Αυτό

θα ήταν πολύ χρήσιμο για τον προσδιορισμό της λειτουργίας και του σχετικού φαινοτύπου, εφόσον υπάρχει του γονιδίου *FRA10A1*. Εντούτοις, αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη ρύθμιση της έκφρασης του *FRA10A1* σε οποιονδήποτε από τους οργανισμούς – μοντέλα με *fra10ac1* ορθόλογα, συμπεριλαμβανομένης της μύγας, του σκουληκιού ή του ποντικιού.

3.6 Κλινική σημασία της εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης *FRA10A*

Μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί παθολογικοί φαινότυποι που να σχετίζονται με την εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A*. Ωστόσο, σύμφωνα με μελέτες η έκφρασή της έχει συσχετιστεί με μαθησιακές δυσκολίες ή με καθυστέρηση στην ανάπτυξη (Sarafidou et al. 2004). Από έρευνες αποδείχθηκε ότι η έκφραση της *FRA10A* έχει συνδεθεί με την εμφάνιση νοητικής υστέρησης (Kähkönen et al. 1989, Μανρου et al. 1991). Ακόμη, αποδείχθηκε ότι η συχνότητα εμφάνισης της εύθραυστης θέσης *FRA10A* ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε άτομα με νοητική υστέρηση σε σχέση με φυσιολογικά άτομα (Kähkönen et al. 1989). Επιπρόσθετα, μελέτες έδειξαν πιθανή σύνδεσή της με την ογκογένεση (Lacombe et al. 1996, Kim et al. 1998) και με νευρολογικές διαταραχές, όπως η σχιζοφρένεια (Mowry et al. 2000). Ο συσχετισμός της εύθραυστης θέσης *FRA10A* με τις διάφορες διαταραχές έγινε με τη σύγκριση της συχνότητας εμφάνισής της σε υγιή άτομα και σε άτομα που εμφανίζουν την εκάστοτε διαταραχή. Μελέτες ανίχνευσαν την *FRA10A* σε υγιή άτομα φορείς (Kähkönen et al. 1989), γεγονός που πιθανώς υποδηλώνει ότι σε ετεροζυγωτία αυτή η θέση δε συσχετίζεται με παθολογικό φαινότυπο. Μία ακόμη πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι η μειωμένη διεισδυτικότητα του παθολογικού φαινότυπου στον πληθυσμό. Ως αποτέλεσμα δεν εμφανίζονται κλινικά συμπτώματα σε ένα ποσοστό ατόμων φορέων. Το φαινόμενο της μειωμένης διεισδυτικότητας έχει δειχθεί στην περίπτωση του σύνδρομου του εύθραυστου X, που σχετίζεται με την εκδήλωση νοητικής υστέρησης κατά την εμφάνιση της εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης *FRAXA* (Annemieke et al. 1991). Σε μελέτες οικογενειών οι αυτοσωμικές σπάνιες εύθραυστες θέσεις, στις οποίες ανήκει και η *FRA10A* κληρονομούνται κυρίως από τη μητέρα. Ωστόσο η εμφάνιση αυτών των εύθραυστων θέσεων στα αρσενικά άτομα δεν είναι πιο δύσκολη σε σχέση με τα θηλυκά (Kähkönen et al. 1989).

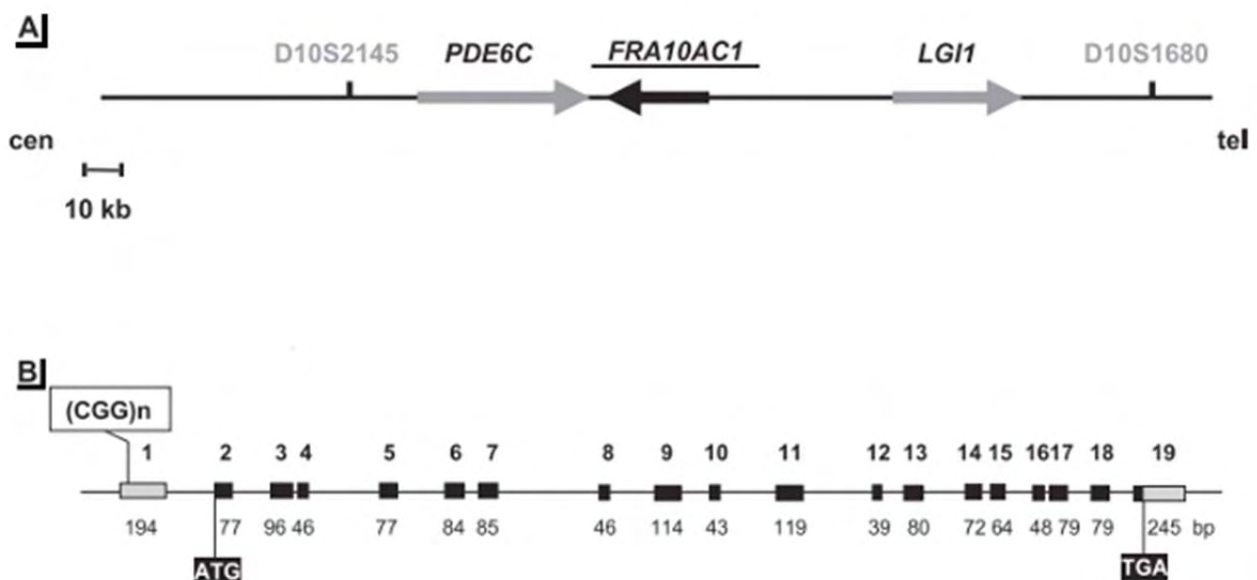
3.7 Μοριακή βάση της εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης *FRA10A*

Η μοριακή βάση εμφάνισης της σπάνιας εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης *FRA10A* έγκειται στην επέκταση των ασταθών τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων τύπου CGG, οι οποίες εδράζονται στις CpG νησίδες της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής του γονιδίου *FRA10AC1*. Έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερα φυσιολογικά αλληλόμορφα, A1 – A4 των 8, 9, 10 και 14 επαναλήψεων, αντίστοιχα. Το πιο κοινό αλληλόμορφο A2, περιέχει 9 επαναλήψεις. Αποδείχθηκε με PCR ότι οι φορείς της *FRA10A* εμφανίζουν μεγαλύτερα προϊόντα PCR, γεγονός που αποδεικνύει την επέκταση των επαναλήψεων αυτών. Πιο συγκεκριμένα, οι επαναλήψεις CGG μπορούν να επεκταθούν μέχρι και 200 φορές (600 – 800bp) και η επέκταση αυτών των επαναλήψεων οδηγεί σε υπερμεθυλίωση, γεγονός που οδηγεί σε μεταγραφική καταστολή του αντίστοιχου αλληλομόρφου του γονιδίου *FRA10AC1* (Sarafidou et al. 2004).

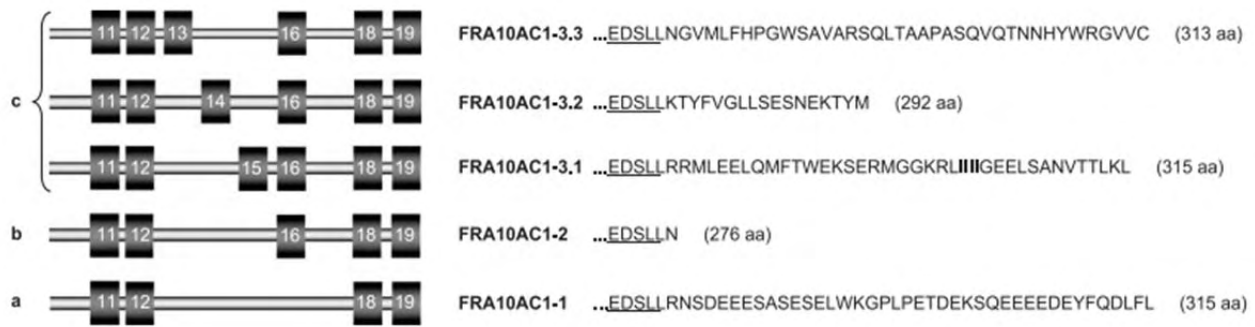
3.8 Το γονίδιο *FRA10AC1*

Το γονίδιο *FRA10AC1* αποτελείται από 19 εξόνια, εκ των οποίων το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης βρίσκεται στην αρχή του εξονίου 2, ενώ το κωδικόνιο λήξης στο εξόνιο 19 (Εικ. 3.8α), εκείνεται σε μία περιοχή 33kb και μεταγράφεται από το τελομερές προς το κεντρομερές (Εικ. 3.8α). Όλα τα όρια των ιντρονίων του *FRA10AC1* ακολουθούν τον κανόνα AG/GT των συντηρημένων θέσεων συναρμογής. Συνδυάζοντας *in silico* δεδομένα με αποτελέσματα από RT-PCRs συναρμολογήθηκε το πλήρες μήκος cDNA του γονιδίου *FRA10AC1*, το οποίο αποτελείται από μία αλληλουχία 1344 ζευγών βάσεων, η οποία κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 315 αμινοξέων (GenBank Accession No. AJ431721). Με ανάλυση Northern αποκαλύφθηκε ότι το γονίδιο *FRA10AC1* είναι μεταγραφικά ενεργό σε όλους τους ιστούς των ενήλικων ατόμων. Το κύριο μετάγραφο των περίπου 1450 νουκλεοτιδίων εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και κωδικοποιεί μια εξαιρετικά συντηρημένη πρωτεΐνη, την FRA10AC1, της οποίας η λειτουργία είναι άγνωστη. Υψηλή έκφραση του *FRA10AC1* βρέθηκε σε όργανα με υψηλή μεταγραφική δραστηριότητα όπως στον εγκέφαλο, στην καρδιά, στους σκελετικούς μύες, στο νεφρό και στο συκώτι. Ενώ, χαμηλή έκφρασή του βρέθηκε στο παχύ έντερο, στο θύμο αδένα, στο σπλήνα, στο λεπτό έντερο, στον πλακούντα και στους πνεύμονες. Στα λεμφοκύτταρα, η μεταγραφή του γονιδίου είναι ιδιαίτερα χαμηλή. Έχουν ταυτοποιηθεί πέντε εναλλακτικά μετάγραφα, εκ των οποίων το κύριο μετάγραφο περιλαμβάνει τα εξόνια 1 – 12, 18 και 19. Ένα από τα εναλλακτικά μετάγραφα, το οποίο εντοπίστηκε σχεδόν σε όλους τους ιστούς περιλαμβάνει τα εξόνια 13 – 16. Ακόμη, βρέθηκαν τρία εναλλακτικά μετάγραφα αποκλειστικά στις γονάδες, τα οποία περιλαμβάνουν το εξόνιο 16 σε συνδυασμό με τα εξόνια 13,

14 και 15 αντίστοιχα. Αυτά τα εναλλακτικά μετάγραφα οδηγούν σε εναλλακτικά 3' άκρα (Εικ. 3.8β), και πιθανόν σε ισομορφές της πρωτεΐνης FRA10AC1. Ως αποτέλεσμα δημιουργούνται πρωτεΐνες FRA10AC1, με τροποποιημένα καρβοξυτελικά άκρα. Εκτός από τους ιστούς που ελέγχθηκαν με ανάλυση Northern, ανιχνεύθηκαν ειδικά μετάγραφα *FRA10AC1* στο πάγκρεας, στους όρχεις, στις ωοθήκες και σε χαμηλότερα επίπεδα, στον προστάτη και στα λευκοκύτταρα. Αποδείχθηκε ότι το 1 αλληλόμορφο του γονιδίου *FRA10AC1* δε μεταγράφεται σε άτομα φορείς της εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης *FRA10A*, ως συνέπεια της παρουσίας της σ' αυτό το χρωμόσωμα. Είναι περίεργο ωστόσο, το γεγονός ότι η έλλειψη ενός αντιγράφου του γονιδίου *FRA10AC1* δεν παρέχει κανένα παθολογικό φαινότυπο στους ιστούς στους οποίους εκφράζεται (Sarafidou et al. 2004).



Εικόνα 3.8α: Γενωμική οργάνωση του γονιδίου *FRA10AC1*. Α) Αναπαράσταση της γενωμικής περιοχής που περιέχει τα γονίδια *FRA10AC1*, *PDE6C* και *LGI1* καθώς και δύο δείκτες μικροδορυφόρων. Τα γονίδια επισημαίνονται με μεγάλα βέλη. Ο προσανατολισμός 5' – 3' του κάθε γονιδίου προσδιορίζεται από τον προσανατολισμό του βέλους. Ακόμη, φαίνεται ο προσανατολισμός της μεταγραφής του γονιδίου *FRA10AC1* από το τελομερές προς το κεντρομερές. Β) Δομή εξονίων – ιντρονίων του *FRA10AC1*. Τα εξόνια αναπαριστούνται με κουτιά. Οι κωδικές περιοχές των εξονίων εμφανίζονται με μαύρο χρώμα, ενώ οι μη κωδικές με γκρι. Ο αριθμός κάθε εξονίου αναγράφεται από πάνω, ενώ το μέγεθος από κάτω. Υποδεικνύονται επίσης το κωδικόνιο έναρξης ATG και λήξης TGA της μετάφρασης με μαύρα κουτιά, καθώς και η επανάληψη (CGG)_n (Sarafidou et al. 2004).

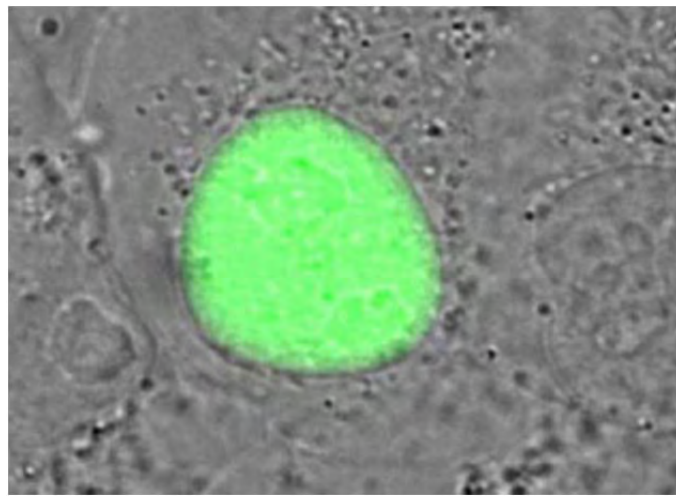


Εικόνα 3.8β: Προσδιορισμός εναλλακτικών παραλλαγών ματίσματος του γονιδίου *FRA10AC1*. Στην εικόνα φαίνονται τα εναλλακτικά μετάγραφα a, b και c του γονιδίου *FRA10AC1* (αριστερά) και οι παραγόμενες αμινοξικές αλληλουχίες τους (δεξιά). Τα εξόνια παρατίθενται ως σκούρα γκρι κουτιά και αριθμούνται. Τα ιντρόνια απεικονίζονται ως παχύ γκρι γραμμές. Τα αμινοξέα που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 12, το οποίο είναι κοινό σε όλες τις παραλλαγές του *FRA10AC1*, υπογραμμίζονται (Sarafidou et al. 2004).

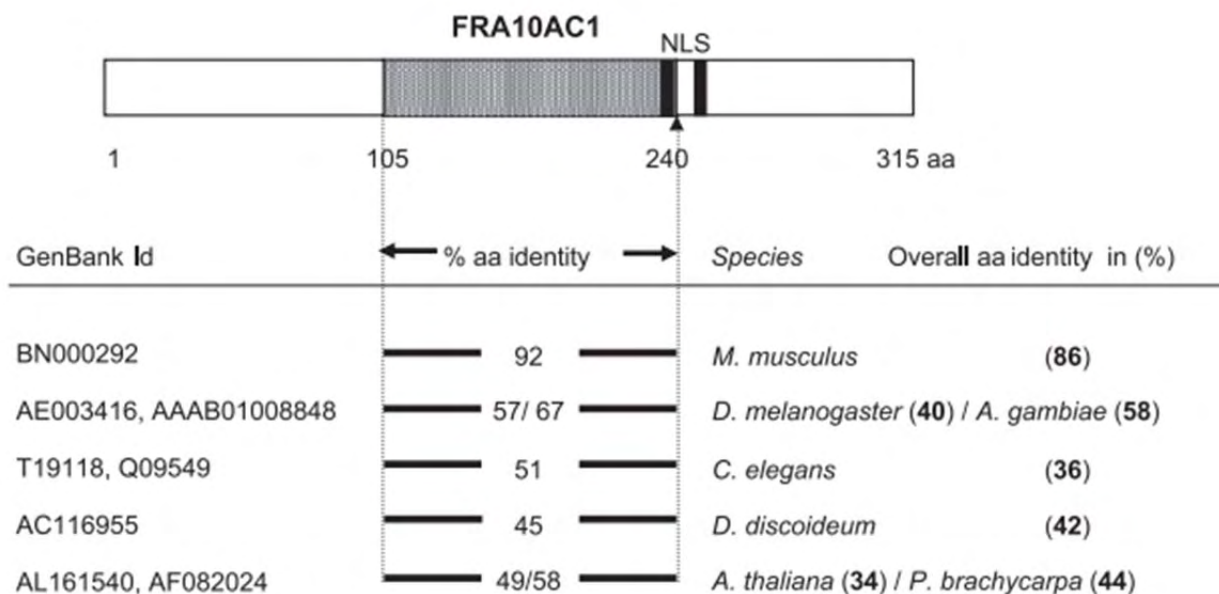
3.9 Η πρωτεΐνη FRA10AC1

Η FRA10AC1 είναι μια συντηρημένη πρωτεΐνη, 315 αμινοξέων, με μοριακό βάρος 37.548 kDa και θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο pI 8,25. Μέσω αναζήτησης στις βάσεις δεδομένων Pfam και Smart δεν έχουν βρεθεί σημαντικές ομοιότητες της FRA10AC1 με καμία από τις γνωστές πρωτεϊνικές επικράτειες ή επαναλήψεις. Ωστόσο, έχει προσδιοριστεί ένα διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού στις περιοχές που περιλαμβάνουν τα αμινοξέα 223 – 238 και 245 – 262, το οποίο ανήκει σε μία ευρύτερη περιοχή πλούσια σε λυσίνη (αμινοξέα 129 – 269). Με ανάλυση ανοσοφθορισμού του πλήρους μήκους της ανασυνδυασμένης με EGFP πρωτεΐνης FRA10AC1 αποδείχθηκε ότι ήταν παρούσα αποκλειστικά στο νουκλεόπλασμα (Εικ. 3.9α). Με στόχο την αναζήτηση ορθόλογων ESTs στις βάσεις δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη αλληλουχία cDNA του *FRA10AC1*. Βρέθηκαν αρκετά αλληλεπικαλυπτόμενα ESTs, εκ των οποίων τρία (GenBank Accession Nos. BQ939866, AA840143, και BE946023) επιλέχθηκαν για τη συναρμολόγηση του ορθόλογου *fra10ac1* του ποντικού (μέγεθος 1380 bp, GenBank Accession Nos. BN000292). Το *fra10ac1* εδράζεται στο χρωμόσωμα 19C2 – C3 του ποντικού, σε μια περιοχή συνταινική στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 10q23 – q24. Το γονίδιο *fra10ac1* του ποντικού κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ίδιου μεγέθους (315 αμινοξέων) με την πρωτεΐνη του ανθρώπου και οι δύο πρωτεΐνες είναι ταυτόσημες κατά 86% και παρουσιάζουν ομολογία της τάξεως του 92%. Επίσης, αποκαλύφθηκε με την ανάλυση BLASTP ότι υπάρχουν πολυάριθμα ορθολόγα *fra10ac1*, τόσο σε ζωικά, όσο και σε φυτικά είδη (Εικ. 3.9β). Οι πρωτεΐνες *fra10ac1* που εντοπίστηκαν σε φυτά (*Arabidopsis thaliana* και *Pimpinella brachycarpa*) και στο σκουλήκι (*Caenorhabditis elegans*) έδειξαν ότι είναι περίπου 35% ταυτόσημες με την πρωτεΐνη του ανθρώπου, ενώ των εντόμων (*Anopheles gambiae*) 58% (Εικ. 3.9β). Αυτά τα δεδομένα απέδειξαν ότι υπήρχε ένα κοινό

προγονικό γονίδιο προτού τα φυτά και τα ζώα αποκλίνουν, το οποίο στη συνέχεια διαφοροποιήθηκε. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης (αμινοξέα 105-240) είναι αυτή που εμφανίζει τον υψηλότερο βαθμό ταυτότητας μεταξύ όλων των ορθόλογων γονιδίων, που κυμαίνεται από 45 έως 67% (Εικ. 3.9β), υποδεικνύοντας έτσι ότι είναι ένα εξαιρετικά συντηρημένο τμήμα (domain) με σημαντική λειτουργία. Κανένα από τα ορθόλογα γονίδια δεν έχει μελετηθεί για τη λειτουργία του και δε φέρει κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο που να εντάσσει την πρωτεΐνη σε συγκεκριμένη οικογένεια πρωτεϊνών. Ωστόσο, το γεγονός ότι η πρωτεΐνη δεν ανιχνεύθηκε σε προκαρυώτες, πιθανώς υποδηλώνει ότι σχετίζεται με μία λειτουργία που αφορά αποκλειστικά τους ευκαρυώτες (Sarafidou et al. 2004).



Εικόνα 3.9α: Υποκυτταρικός εντοπισμός της **FRA10AC1**. Στην εικόνα φαίνεται ο υποκυτταρικός εντοπισμός της χιμαιρικής πρωτεΐνης FRA10AC1 – GFP, ο οποίος ανιχνεύθηκε με μικροσκοπία φθορισμού. Το κύτταρο αυτό είναι ένα αντιπροσωπευτικό κύτταρο της σειράς COS – 7, η οποία διαμολύνθηκε παροδικά με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (EGFP) – FRA10AC1 (Sarafidou et al. 2004).



Εικόνα 3.9β: Συντήρηση της πρωτεΐνης FRA10AC1. Στην εικόνα παρουσιάζεται η συντήρηση της ανθρώπινης πρωτεΐνης FRA10AC1 σε σχέση με άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Πάνω φαίνεται με γκρι χρώμα η κεντρική συντηρημένη περιοχή (αμινοξέα 105 – 240). Το διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού απεικονίζεται με δύο μαύρες ράβδους (NLS, αμινοξέα 223 – 238 και 245 – 262). Κάτω – αριστερά δίνονται οι κωδικοί αριθμοί των ορθόλογων γονιδίων στη βάση GenBank. Στη μέση της εικόνας δίνεται το ποσοστό που είναι ταυτόσημες οι πρωτεΐνες στη συντηρημένη κεντρική περιοχή, ενώ στα δεξιά φαίνεται το συνολικό ποσοστό ταυτότητας των πρωτεϊνών (Sarafidou et al. 2004).

3.10 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης FRA10AC1

Το γεγονός ότι δεν είναι γνωστή μέχρι σήμερα η βιολογική λειτουργία κάποιας από τις ορθόλογες πρωτεΐνες, σε συνδυασμό με το ότι η FRA10AC1 δεν παρουσιάζει κάποιο χαρακτηριστικό μοτίβο, δυσκολεύουν τον εντοπισμό του βιολογικού της ρόλου. Εξετάζοντας πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις της FRA10AC1 με άλλα πρωτεϊνικά μόρια ίσως εξαχθούν κάποια συμπεράσματα σχετικά με το βιολογικό της ρόλο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα, με το οποίο ανιχνεύονται αποκλειστικά δυαδικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Ενώ υπάρχει πλήθος δεδομένων από πειράματα μεγάλης κλίμακας πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε αντίστοιχες βάσεις δεδομένων, τα δεδομένα αυτά δεν μπορούν να θεωρηθούν πλήρως αξιόπιστα γιατί παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και αντιπροσωπεύουν ένα σχετικά μικρό ποσοστό του συνόλου των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του ανθρώπου (Von Mering et al. 2002, Suthram et al. 2006). Ως αποτέλεσμα, θα πρέπει να εφαρμόζονται συνδυαστικά, στοχευμένα πειράματα μικρής κλίμακας, τα αποτελέσματα των οποίων να επιβεβαιώνονται με συμπληρωματικές προσεγγίσεις.

Στο πλαίσιο αυτό, με το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα και με πειράματα

συνκατακρήμνισης ταυτοποιήθηκε ότι η FRA10AC1 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες DGCR14 και SF3B2. Τα αποτελέσματα αυτά, των αλληλεπιδράσεων είναι σε συμφωνία με τον υποκυτταρικό εντοπισμό στο πυρηνόπλασμα των τριών πρωτεϊνών FRA10AC1, DGCR14 και SF3B2.

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν μελέτες που να προσδιορίζουν το λειτουργικό ρόλο της πρωτεΐνης DGCR14. Ωστόσο, υπάρχουν πληροφορίες από βιοχημικά πειράματα απομόνωσης του σωματίου συναρμογής και χαρακτηρισμού των συστατικών του με φασματομετρία μάζας που υποδεικνύουν την πιθανή λειτουργία της πρωτεΐνης. Έτσι, από πέντε ανεξάρτητες μελέτες, η DGCR14 προσδιορίστηκε κατ' επανάληψη ως πρωτεΐνη – συστατικό του σωματίου συναρμογής (Rappsilber et al. 2002, Zhou et al. 2002, Makarova et al. 2004, Bessonov et al. 2008, Bessonov et al. 2010) και μάλιστα ως συστατικό του συμπλόκου C (Bessonov et al. 2008, Bessonov et al. 2010).

Όσον αφορά την πρωτεΐνη SF3B2, κωδικοποιείται από το γονίδιο SF3B2 και αποτελεί την υπομονάδα 2 του παράγοντα συναρμογής 3b, ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου του σωματίου συναρμογής. Κι αυτή χαρακτηρίστηκε ως πρωτεΐνη – συστατικό του σωματίου συναρμογής σε όλες τις μελέτες που περιλαμβάνουν βιοχημικά πειράματα απομόνωσης του σωματίου συναρμογής και χαρακτηρισμού των συστατικών του με φασματομετρία μάζας (Rappsilber et al. 2002, Zhou et al. 2002, Jurica et al. 2002, Hartmuth et al. 2002, Makarov et al. 2002, Makarova et al. 2004, Chen et al. 2007, Bessonov et al. 2008, Bessonov et al. 2010) και μάλιστα επίσης ως συστατικό του συμπλόκου C (Jurica et al. 2002, Bessonov et al. 2008, Bessonov et al. 2010).

Επιπρόσθετα, από βάσεις δεδομένων, οι οποίες περιλαμβάνουν καταχωρήσεις σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών του ανθρώπου (HPRD, <http://www.hprd.org/>), προκύπτει ότι η FRA10AC1 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη (HABP4 Ki-1/57), η οποία είναι πυρηνική και έχει συσχετιστεί με τη διαδικασία της συναρμογής (Bressan GC et al. 2009).

Με βάση τις παραπάνω πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της FRA10AC1 εξάγεται το συμπέρασμα, ότι ίσως σχετίζεται με τη διαδικασία της συναρμογής. Το γεγονός ότι ταυτοποιήθηκε και η ίδια ως συστατικό του σωματίου συναρμογής, και ειδικότερα του συμπλόκου C (Bessonov et al. 2008, Bessonov et al. 2010), συνάδει με τον υποκυτταρικό εντοπισμό της. Ακόμη, συνηγορεί με το γεγονός ότι πρωτεΐνη είναι ιδιαίτερα συντηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι οποίοι σε αντίθεση με τους προκαρυωτικούς, χρησιμοποιούν τη διαδικασία της συναρμογής για την ωρίμανση των πρόδρομων μορίων mRNA.

3.11 IKMC (International Knockout Mouse Consortium)

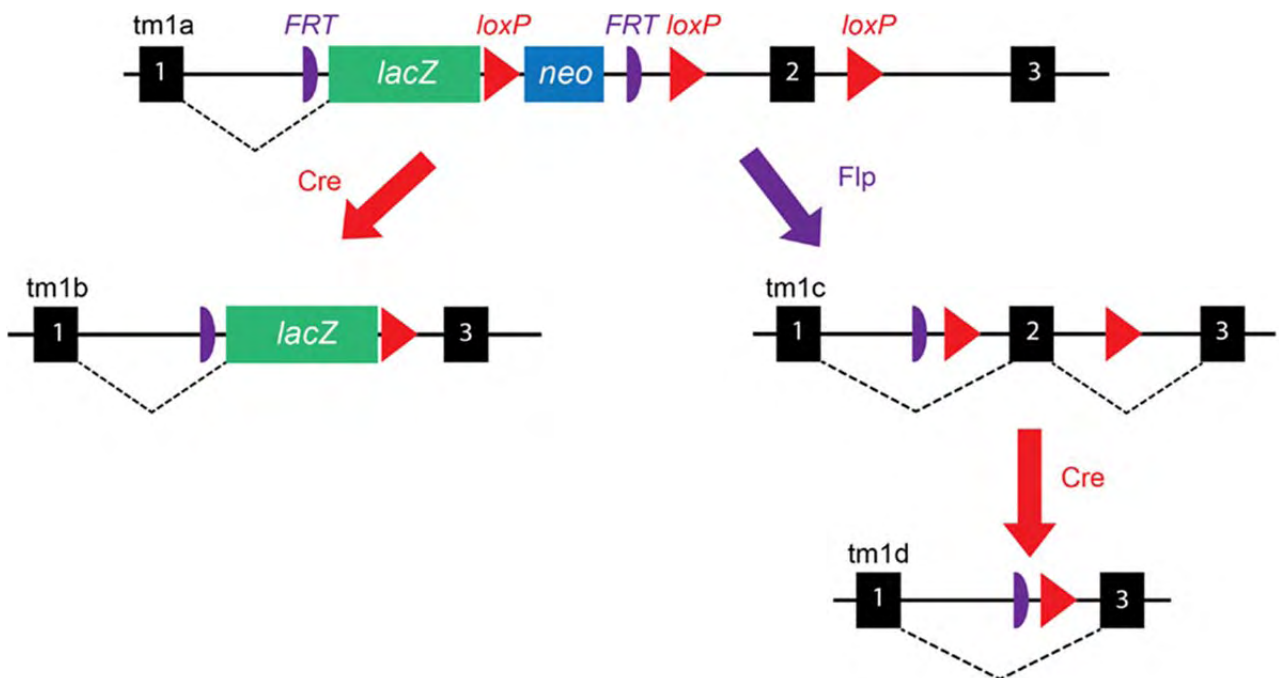
Η IKMC δημιουργήθηκε το 2007 με σκοπό τη μετάλλαξη όλων των κωδικών περιοχών των γονιδίων του γονιδιώματος του ποντικού με χρήση μεθόδων γονιδιακής στόχευσης και γονιδιακής παγίδευσης (gene trapping) σε εμβρυονικά πολυδύναμα (ES) κύτταρα ποντικού C57BL / 6 (Collins FS et al. 2007). Πρόκειται για μία κοινοπραξία που περιλαμβάνει τα παρακάτω ερευνητικά προγράμματα: Knockout Mouse Project (KOMP) (ΗΠΑ), European Conditional Mouse Mutagenesis Program (EUCOMM) (Ευρώπη), EUCOMM: (Tools for Functional Annotation of the Mouse Genome) (EUCOMMTOOLS) (Ευρώπη), North American Conditional Mouse Mutagenesis Project (NorCOMM) (Καναδάς) και Texas A & M Institute for Genomic Medicine (TIGM) (ΗΠΑ) (Bradley A et al. 2012). Η ιεράρχηση των επιμέρους στόχων αυτής της κοινοπραξίας έχει βασιστεί στις απαιτήσεις της επιστημονικής κοινότητας, σε επιτροπές εμπειρογνώμων και στην αξιολόγηση μεμονωμένων γονιδίων, με μικρό περιθώριο αλληλοεπικάλυψης μεταξύ των προγραμμάτων (Collins FS et al. 2007). Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την ανάπτυξη της IKMC και τη γονιδιακή στόχευση, ο αναγνώστης παραπέμπεται στις βιβλιογραφικές πηγές: Capecchi 2005, Skarnes et al. 2011 και Bradley et al. 2012. Από το 2012, περισσότερες από 17.400 εμβρυονικές πολυδύναμες κυτταρικές γραμμές έχουν δημιουργηθεί από την IKMC για στοχευμένη απενεργοποίηση γονιδίων (Bradley et al. 2012).

3.12 Στρατηγική γονιδιακής στόχευσης του EUCOMM

Μία από τις προκλήσεις που αντιμετώπισε η IKMC ήταν ο σχεδιασμός απλών και ευρέως εφαρμόσιμων φορέων γονιδιακής στόχευσης. Το πρόγραμμα EUCOMM επικεντρώνεται στη χρήση φορέων στόχευσης τύπου «κασέτας» (Coleman et al. 2015). Η κύρια στρατηγική του προγράμματος είναι η στόχευση αλληλόμορφων γονιδίων μέσω μιας διαδικασίας σταδιακού αποκλεισμού (knock-out first allele) (Skarnes Et al. 2011), σε C57BL / 6N εμβρυονικά πολυδύναμα κύτταρα (Pettitt et al. 2009), μια δυναμική προσέγγιση που επιτρέπει τόσο τη σήμανση με γονίδιο αναφοράς, όσο και την, υπό συνθήκες, μετάλλαξη ενός καθορισμένου γονιδίου (gene – of – interest, GOI). Η διαδικασία βασίζεται στην ταυτοποίηση του «κρίσιμου» εξονίου που υπάρχει σε όλα τα εναλλακτικά μετάγραφα, η διαγραφή του οποίου προκαλεί μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου (Coleman et al. 2015). Η ανάπτυξη των διαφορετικών φορέων στόχευσης περιγράφεται λεπτομερώς στο πρωτότυπο άρθρο (Skarnes et al. 2011). Εδώ, παρέχεται μια περιγραφή του τρόπου με τον οποίο αυτή η προσέγγιση μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα πρωτότυπο γονίδιο ενδιαφέροντος (GOI) που περιέχει τρία εξόνια, με το εξόνιο 2 να έχει ταυτοποιηθεί ως «κρίσιμο» για τη γονιδιακή

λειτουργία (Coleman et al. 2015).

Στην Εικόνα 3.12α, μία κασέτα παγίδευσης τύπου IRES: lacZ (όπου η εσωτερική θέση εισόδου στα ριβοσώματα, IRES, βρίσκεται πριν το γονίδιο lacZ) τοποθετείται δίπλα στο 5' άκρο μίας αλληλουχίας loxP, η οποία βρίσκεται δίπλα σε ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη, η οποία βρίσκεται ανοδικά του εξονίου 2. Το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη διευκολύνει την *in vitro* επιλογή των ES κυττάρων – στόχων, ενώ το γονίδιο lacZ χρησιμοποιείται για τη σήμανση των ποντικών τα οποία εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο στους ιστούς που εκφράζεται και το γονίδιο ενδιαφέροντος (GOI). Μια τρίτη αλληλουχία loxP εισάγεται αμέσως μετά το εξόνιο 2 για να διευκολύνει την απομάκρυνσή του και επομένως τη δημιουργία πειραματικών ζώων knock-out. Για να πραγματοποιηθεί η ταυτόχρονη απομάκρυνση και των δύο γονιδίων (lacZ και ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη), εισάγονται δύο αλληλουχίες αναγνώρισης της φλιπάσης (flippase recognition target, FRT) στο αλληλόμορφο: μία ανοδικά της κασέτας lacZ και μία ανάμεσα στην κασέτα ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη και στην 2η αλληλουχία loxP που βρίσκεται πριν από το εξόνιο 2. Το συγκεκριμένο αλληλόμορφο αναφέρεται ως tm1a (targeted mutation 1a) και χαρακτηρίζεται "knockout-first", επειδή η εισαγωγή της κασέτας lacZ αναμένεται να διαταράξει τη συναρμογή του GOI. Ωστόσο, και οι δύο κασέτες που έχουν εισαχθεί πριν από το εξόνιο 2 πρέπει να απομακρυνθούν προτού γίνει η αξιολόγηση του φαινοτύπου knockout (Coleman et al. 2015).



Εικόνα 3.12α: Κατασκευή φορέων στόχευσης EUCOMM. Στην εικόνα φαίνεται ο φορέας στόχευσης του EUCOMM, καθώς και οι ανασυνδυασμοί που μπορούν να συμβούν με την αναγνώριση των αλληλουχιών loxP και FRT από τις Cre και Flp recombinases αντίστοιχα. Απεικονίζεται ένα πρωτότυπο γονίδιο με τρία εξόνια, τα οποία αναπαριστώνται ως μαύρα κουτιά (Skarnes et al. 2011).

3.13 Παραγωγή ετερόζυγων ποντικών για το αλληλόμορφο tm1b

Εκτός από τη στοχευμένη γονιδιακή σίγαση, η μέθοδος σχεδιασμού αλληλομόρφων του προγράμματος EUCOMM εισάγει τη δυνατότητα αντικατάστασης της μετάφρασης του γονιδίου ενδιαφέροντος (GOI) με την έκφραση ενός ενζύμου, της β-γαλακτοσιδάσης, (από την κασέτα lacZ). Αυτή η αντικατάσταση παρέχει ένα μέσο εντοπισμού της έκφρασης του γονιδίου ενδιαφέροντος (GOI) καθώς η έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης μπορεί να εκτιμηθεί στην ανάλυση ιστών και κυτταρικών τύπων, χρησιμοποιώντας μεθόδους ιστοχημικής χρώσης ή ανοσοϊστοχημείας. (Seymour & Sander 2007). Η χρήση ανοσοϊστοχημείας για την ανίχνευση της πρωτεΐνης β-γαλακτοσιδάση, αντί του πρωτεϊνικού προϊόντος που προκύπτει από τη μετάφραση του GOI, επιτρέπει στους ερευνητές να βασιστούν σε καθορισμένα πρωτόκολλα ανοσοϊστοχημείας με ευαισθησία προς τη β-γαλακτοσιδάση, αντί να σχεδιάσουν νέα πρωτόκολλα για τα δικά τους GOI, τα οποία σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να μην έχουν υποβληθεί σε λεπτομερή αξιολόγηση και να εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα αντισωμάτων υψηλής ποιότητας (Coleman et al. 2015). Αυτή η απλοποίηση της διαδικασίας είναι ιδιαίτερα σημαντική σε μόρια όπως οι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες υποδοχείς, όπου ο καθορισμός των "ειδικών" αντισωμάτων είναι συχνά ελλειπής, όπως φαίνεται σε παραδείγματα από τη βιβλιογραφία που εξετάζουν παρόμοια πρότυπα χρώσης τόσο σε άγριου τύπου, όσο και σε knockout ποντίκια (Beerman et al. 2012, Hafko et al. 2013, Herrera et al. 2013).

Η διασταύρωση ετερόζυγου ποντικού για το αλληλόμορφο tm1a με ένα ποντίκι, το οποίο εκφράζει σε όλους τους ιστούς την Cre ρεκομπινάση "Cre deleter" [ένα διαγονιδιακό B6.C-Tg (CMV-Cre) 1Cgn / J (The Jackson Laboratory, USA, Stock number 006054)], υπό τον έλεγχο του εκκινητή του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (CMV), οδηγεί σε ανασυνδιασμό των αλληλουχιών loxP που έχει ως αποτέλεσμα τη διαγραφή τόσο της κασέτας νεομυκίνης όσο και του εξονίου 2. Τελικό αποτέλεσμα είναι η παραγωγή ετερόζυγων ποντικών για το αλληλόμορφο tm1b, δηλαδή ποντικών που εκφράζουν τη β-γαλακτοσιδάση (lacZ) σε κύτταρα όπου το GOI θα εκφραζόταν κανονικά (Εικ. 3.12α). Το ένζυμο Cre είναι συνδεδεμένο με το χρωμόσωμα X σε αυτή τη σειρά ποντικών, λόγω της τυχαίας ενσωμάτωσης του διαγονιδίου στο χρωμόσωμα X. Ωστόσο, η έκφραση της Cre ρεκομπινάσης προηγείται της απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X, οπότε η γονιδιακή εκτομή προχωρά αποτελεσματικά τόσο στους αρσενικούς όσο και στους θηλυκούς ποντικούς (Schwenk et al. 1995). Όταν οι απόγονοι κληρονομούν τόσο το αλληλόμορφο tm1a, όσο και το αλληλόμορφο wt^{Cre}, οι αλληλουχίες loxP κόβονται και ανασυνδυάζονται, απομακρύνοντας την κασέτα επιλογής ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη και το εξόνιο 2 του GOI, διατηρώντας ταυτόχρονα την κασέτα lacZ (Coleman et al. 2015).

3.14 Παραγωγή ετερόζυγων ποντικών για το αλληλόμορφο *tm1c*

Ως πρώτο βήμα προς την παραγωγή της knockout σειράς και την επαναφορά της έκφρασης του GOI σε εκείνη ενός ψευδοαγρίου τύπου ζώου τα ετερόζυγα ποντίκια *tm1a* διασταυρώνονται με διαγονιδιακά ποντίκια C57BL / 6J. Οι διαγονιδιακοί ποντικοί εκφράζουν μία ενισχυμένη παραλλαγή της ανασυνδυασμένης FLP1 ρεκομπινάσης του *Saccharomyces Cerevisiae* (FlpE) σε όλους τους ιστούς, υπό τον ανθρώπινο υποκινητή της β-ακτίνης (transgenic B6.Cg-Tg (ACTFlpE) 9205Dym / J, διαθέσιμο από The Jackson Laboratory, USA, Stock number 005703) (Rodriguez et al. 2000). Στις περιπτώσεις όπου οι απόγονοι κληρονομούν τόσο το αλληλόμορφο *tm1a*, όσο και το αλληλόμορφο wt^{Flp} , η περιοχή ανάμεσα στα στοιχεία FRT του αλληλομόρφου *tm1a* αποκόπτεται και ανασυνδυάζεται, απομακρύνοντας την κασέτα που προσδίδει ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη και περιέχει το γονίδιο *lacZ*, επαναφέροντας την έκφραση του GOI. Τα ποντίκια αυτά αναφέρονται ως *tm1c* ή "floxed" και λειτουργούν ως θεμελιώδης σειρά για την παραγωγή knockout ποντικών και ως σειρά ελέγχου για πειράματα. Τα *tm1c* ποντίκια είναι ουσιαστικά άγριου τύπου, καθώς η μόνη διαφορά μεταξύ του αλληλόμορφου τους και του αλληλομόρφου του αγρίου τύπου C57BL / 6 ποντικού είναι η εισαγωγή δύο αλληλουχιών *loxP* που πλαισιώνουν το εξόνιο 2. Ωστόσο, αυτό θα πρέπει να επιβεβαιωθεί πειραματικά για να αποκλειστεί η πιθανότητα ότι οι αλληλουχίες *loxP* έχουν διαταράξει τη συναρμογή γονιδίων ή ένα σημαντικό ρυθμιστικό στοιχείο ή ενισχυτή εντός των ιντρονίων (Coleman et al. 2015).

3.15 Παραγωγή Knockout ποντικών (*tm1d*)

Τέλος, η διασταύρωση ετερόζυγου ποντικού για το αλληλόμορφο *tm1c*, είτε με το ίδιο ποντίκι (Cre deleter) που διασταυρώθηκε με το *tm1b* ή εναλλακτικά, με ποντικό που εκφράζει ιστοειδικά ή επαγόμενα την Cre ρεκομπινάση, οδηγεί στη δημιουργία σειράς ποντικών "*tm1d*", δηλαδή ποντίκια στα οποία το εξόνιο 2 του γονιδίου ενδιαφέροντος (GOI) έχει απαλειφθεί και το μετάγραφο που απομένει πιθανόν αποικοδομείται ως αποτέλεσμα της α-νοηματικής μεσολαβούμενης αποσύνθεσης (Εικ. 3.12α).

Στο συγκεκριμένο πείραμα το γονίδιο ενδιαφέροντος ήταν το *FRA10AC1*. Η κασέτα εισήχθη ανάμεσα στα εξόνια 4 και 6 (Εικ. 5.1α). Οι διασταυρώσεις που επιλέχθηκαν ήταν όμοιες με το πρωτότυπο πείραμα (Coleman et al. 2015), το οποίο αναφέρεται παραπάνω και πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Δρ. Κλινάκη Απόστολου (Ιατροβιολογικό Ίδρυμα Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών). Ακολούθως, οι απόγονοι που προέκυψαν από τις παραπάνω διασταυρώσεις, ονομάστηκαν όμοια με τους απόγονους των διασταυρώσεων του πρωτότυπου

πειράματος.

3.16 Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας προπτυχιακής εργασίας ήταν η γονοτύπηση ποντικών ετερόζυγων για τα αλληλόμορφα tm1b (LacZ reporter mice) και tm1c (“Floxed” mice) από διασταυρώσεις ετερόζυγων ποντικών για το αλληλόμορφο tm1a με ποντικούς ομόζυγους αγρίου τύπου που εκφράζουν είτε την Cre, είτε την Flp ρεκομπινάση αντίστοιχα. Η εργασία αποτελεί κομμάτι της ευρύτερης ερευνητικής προσπάθειας για την παραγωγή knockout ποντικών για το γονίδιο *FRA10AC1*. Ο τελικός σκοπός της ευρύτερης ερευνητικής προσπάθειας, μετά την παραγωγή knockout ποντικών για το ένα αλληλόμορφο του γονιδίου *FRA10AC1* (tm1b), είναι η παραγωγή μεγάλης αποικίας ποντικών με αυτό το γονότυπο.

4. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Απομόνωση πυρηνικού DNA

Η απομόνωση των βιομορίων DNA, RNA και πρωτεϊνών αποτελεί την πιο κρίσιμη μέθοδο που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία. Είναι το σημείο εκκίνησης για μετέπειτα διαδικασίες και ανάπτυξη προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των διαγνωστικών κιτ. Μπορούν να απομονωθούν από οποιοδήποτε βιολογικό υλικό, όπως ζωντανοί ή διατηρημένοι ιστοί (Wink M 2006). Επίσης, μπορεί να απομονωθεί γενωμικό DNA από προκαρυωτικούς ή ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ο επιτυχής καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων απαιτεί 4 σημαντικά βήματα: α) την αποτελεσματική διάρρηξη κυττάρων ή ιστών, β) την αποδιάταξη των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, γ) την απενεργοποίηση νουκλεασών (RNAase για εξαγωγή RNA και DNAase για εξαγωγή DNA), δ) την προσοχή για την αποφυγή επιμόλυνσης (Doyle K 1996). Το νουκλεϊκό οξύ στόχος θα πρέπει να είναι ελεύθερο πρωτεϊνών, υδατανθράκων, λιπιδίων κ άλλων νουκλεϊνικών οξέων, δηλαδή το DNA να είναι απαλλαγμένο από RNA και το RNA αντίστοιχα από DNA (Buckingham and Flaws 2007). Η ποιότητα και η ακεραιότητα του απομονωμένου νουκλεϊνικού οξέος θα επηρεάσει άμεσα τα αποτελέσματα όλων των διαδοχικών πειραμάτων (Cseke et al. 2004).

Απομονώθηκε DNA από 29 δείγματα ποντικών, τα οποία προέρχονται από το εργαστήριο του Δρ. Απόστολου Κλινάκη (Ιατροβιολογικό Ίδρυμα Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών). Τα στάδια που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση του DNA από τα δείγματα, συνοψίζονται παρακάτω:

- 1) Απομόνωση ζωικού ιστού με κοπή 1mm από την ουρά κάθε ποντικού
- 2) Επώαση του ιστού σε 100μl ρυθμιστικού διαλύματος πρωτεϊνάσης K (50 mM Tris- pH 7.5, 0.1M EDTA pH 8.0, 1% (v/v) SDS και 0.68 mg/ml proteinase K) στους 56°C για 24 h και στη συνέχεια καλή ανάδευση. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει δεδεκυλοθειϊκό νάτριο 1% (1% SDS), το οποίο χρησιμοποιείται για τη λύση των κυτταρικών μεμβρανών και της μεμβράνης του πυρήνα, ώστε να απελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα. Επίσης, περιέχει την πρωτεϊνάση K, η οποία είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που χρησιμοποιείται για την αποικοδόμηση κυτταρικών πρωτεϊνών. Αυτά τα βήματα πραγματοποιήθηκαν στην Αθήνα και έπειτα τα δείγματα στάλθηκαν στη Λάρισα, όπου πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω.
- 3) Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες. Πραγματοποιήθηκε με οργανική εκχύλιση με διάλυμα φαινόλης-χλωροφορμίου. Τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με μία ή περισσότερες εκχυλίσεις με τους οργανικούς διαλύτες φαινόλη και χλωροφόρμιο. Η διαδικασία πραγματοποιείται ως εξής:

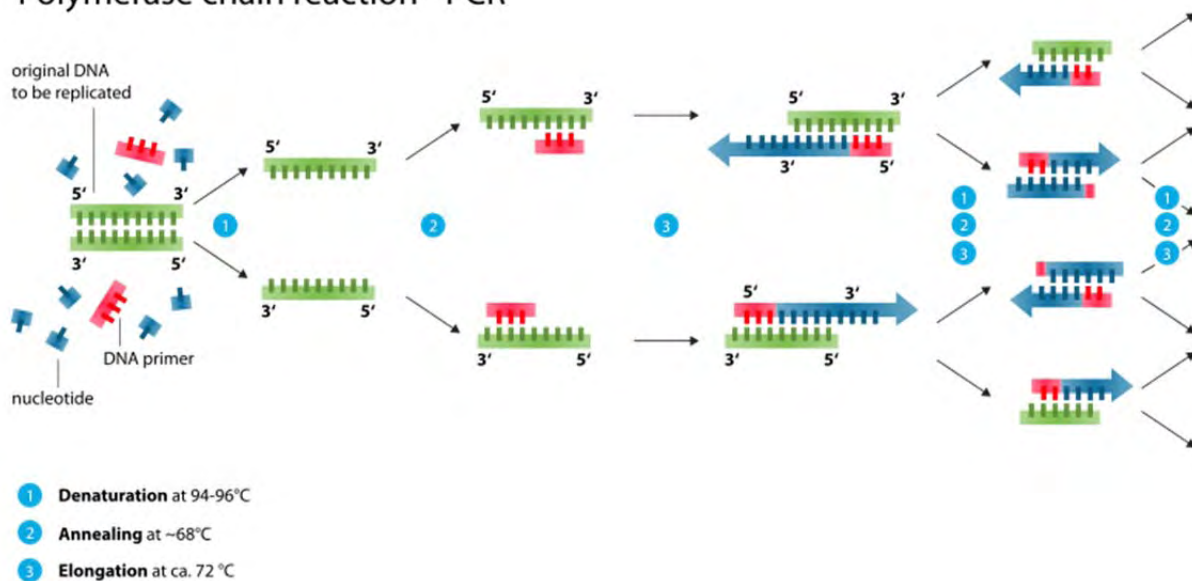
- ◆ Λαμβάνονται 100μl από κάθε δείγμα
- ◆ Προστίθενται 300μl απεσταγμένο H₂O, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 400μl
- ◆ Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφορμίου 1:1, 200μl φαινόλης και 200μl χλωροφορμίου
- ◆ Φυγοκέντρωση για 10 min σε 10.000 rpm. Η φυγοκέντρωση του μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ νουκλεϊκών οξέων έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία τριών φάσεων: α) την κατώτερη φάση, την οργανική που περιέχει λιπίδια και πρωτεΐνες, β) την ενδιάμεση φάση, η οποία είναι λευκή και ιξώδης και στην οποία συγκεντρώνεται συνήθως το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης, καθώς αποτελείται και από υδρόφοβες και από υδρόφιλες περιοχές και γ) την ανώτερη φάση, την υδατική (πολική) που περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα.
- ◆ Συλλέγεται η υδατική φάση, περίπου 300μl από κάθε δείγμα και μεταφέρεται σε νέους σωλήνες (ependorfs)
- ◆ Εισάγονται 300μl χλωροφορμίου στους νέους σωλήνες (ependorfs)
- ◆ Φυγοκέντρωση για 10 min στις 10.000 rpm
- ◆ Συλλέγεται η υδατική φάση (διαυγής), περίπου 200μl από κάθε δείγμα και μεταφέρεται σε νέους σωλήνες
- ◆ Προστίθεται 1/10 του όγκου οξικό νάτριο (CH₃COONa), 3M pH=5,2. Πιο συγκεκριμένα, προστίθενται 20μl σε κάθε δείγμα και 550μl αιθανόλη 100%
- ◆ Ανάδευση, αναποδογυρίζοντας κάθε σωλήνα περίπου 10 φορές
- ◆ Τοποθέτηση στους -80°C για 20 min
- ◆ Φυγοκέντρωση για 20 min στις 12.000 rpm, στους 4°C
- ◆ Καθαρισμό με προσθήκη 300μl αιθανόλης 70%
- ◆ Φυγοκέντρωση για 20 min, στις 12.000 rpm, στους 4°C
- ◆ Απόχυση του υπερκειμένου
- ◆ Τοποθέτηση των σωλήνων στο φούρνο, ανοιχτών, στους 55°C, ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη
- ◆ Εισάγονται 50μl H₂O σε κάθε σωλήνα και αφήνονται να διαλυτοποιηθούν για 15 min
- ◆ Ήπιο πιετάρισμα, περίπου 15 φορές για κάθε δείγμα, με στόχο την ανάμιξη του DNA με το H₂O

Όλα τα δείγματα αραιώθηκαν 1/10 ώστε να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα που ακολουθούν.

4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μια απλή, αλλά κομψή, ενζυμική δοκιμασία, η οποία επιτρέπει την ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA για την περαιτέρω μελέτη του με διάφορες μεθόδους, όπως η αλληλούχηση, η πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η ηλεκτροφόρηση κ.ά. Η PCR ανακαλύφθηκε από τον Δρ. Kary Mullis. Η PCR μπορεί να εκτελεστεί χρησιμοποιώντας DNA από μια ποικιλία ιστών και οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου του περιφερικού αίματος, του δέρματος, των μαλλιών, του σάλιου και των μικροβίων. Κάθε ανάλυση PCR απαιτεί την παρουσία δείγματος DNA, εκκινητών, νουκλεοτιδίων και DNA πολυμεράσης. Οι εκκινητές προσδιορίζουν το ακριβές προϊόν DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Η ταχύτητα, η ειδικότητα, η μεγάλη ευαισθησία και το χαμηλό της κόστος την έχουν κάνει μια από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους σε ερευνητικό και διαγνωστικό επίπεδο. Η αντίδραση εκτελείται σε τρία επαναλαμβανόμενα στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά (εικ. 6.2α): α) την αποδιάταξη του γενετικού υλικού, β) τον υβριδισμό των εκκινητών στη συμπληρωματική τους αλληλουχία στο προς μελέτη DNA και γ) την επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA. Το τελικό αποτέλεσμα μίας αντίδρασης PCR μετά από n κύκλους είναι η παραγωγή, θεωρητικά, 2^n δίκλωνων μορίων DNA, που είναι πιστά αντίγραφα της αλληλουχίας του DNA, η οποία περικλείεται μεταξύ των εκκινητών. Είναι μία ευαίσθητη δοκιμασία, καθώς μπορεί να εκτελεστεί-ξεκινήσει από ίχνη DNA (Garibyan & Avashia 2013).

Polymerase chain reaction - PCR



Εικόνα 6.2α: Στάδια μίας τυπικής PCR.

(<https://microbeonline.com/polymerase-chain-reaction-pcr-steps-types-applications/>)

Πιο αναλυτικά, τα στάδια της PCR είναι:

1) Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA αποδιατάσσονται με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.

2) Υβριδισμός εκκινητών: Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο DNA.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρίας Bio Supplies. Επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο, ώστε με την PCR να ενισχύεται είτε το αλληλόμορφο tm1b που προκύπτει από την κοπή του αλληλομόρφου tm1a από την Cre ρεκομπινάση, είτε το αλληλόμορφο tm1c που προκύπτει από την κοπή του αλληλομόρφου tm1a από την Flp ρεκομπινάση (εικ. 7.1α). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές, οι οποίοι υβριδοποιούνται στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου.

- ◆ Εκκινητές που υβριδοποιούνται στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου, στο αλληλόμορφο tm1a και στο αλληλόμορφο tm1c:

I) Εμπρόσθιος (F1'):

5' - GTGTTTTATTTTTGAAACCTTAATGTTC -3'

II) Ανάστροφος (R5'):

5' - TGTAATCATGTACGACAACCTACAC -3'

III) Ανάστροφος (LAR3):

5' - CACAACGGGTCTTCTGTAGTCC -3'

Ως θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών αυτών, επιλέχθηκαν οι 58° C.

- ◆ Εκκινητές, οι οποίοι υβριδοποιούνται στο αλληλόμορφο tm1b:

I) Εμπρόσθιος (F_LacZ-loxP):

5' - AATAATAACCGGGCAGGGGG -3'

II) Ανάστροφος (R_intron5_4):

5' - TATGTCAAGTGTCTGGTGTCC -3'

Ως θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών αυτών, επιλέχθηκαν οι 64° C.

3) Επιμήκυνση: Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνεται η θερμοκρασία στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η Taq πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε είναι η Kara Taq DNA Polymerase (5 Un/μl) με 15mM MgCl₂. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs 20x), χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp/min. Επίσης, στην PCR χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα Kara Taq Buffer 10x με MgCl₂.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), μία συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία μπορεί να ρυθμιστεί η επιθυμητή θερμοκρασία και η διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και η διαδοχή τους.

Συγκριμένα, οι PCR που πραγματοποιήθηκαν, καθώς και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που περιελάμβαναν παρατίθενται στους πίνακες 4.2α, 4.2β, 4.2γ. Ακόμη, οι διάρκειες των σταδίων των PCR, συνοψίζονται στους πίνακες 4.2δ και 4.2ε.

Πίνακας 4.2α: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR με εκκινητές F1' και R5'.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες – Συγκεντρώσεις
Δείγμα DNA + H ₂ O	10μl
Kara Taq Buffer 10x w MgCl ₂	2,5μl
dNTPS 20x	0,5μl
F1'	0,5μl – 25pmol (50pmol/μl)
R5'	0,5μl – 25pmol (50pmol/μl)
Taq Polymerase	0,3μl – 1,5Un (5Un/μl)
H ₂ O	10,7μl

Πίνακας 4.2β: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR με εκκινητές F1' και LAR3.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες – Συγκεντρώσεις
Δείγμα DNA + H ₂ O	10μl
Kara Taq Buffer 10x w MgCl ₂	2,5μl
dNTPS 20x	0,5μl
F1'	0,5μl – 25pmol (50pmol/μl)
LAR3	0,5μl – 1,5pmol (3pmol/μl)
Taq Polymerase	0,3μl – 1,5Un (5Un/μl)
H ₂ O	10,7μl

Πίνακας 4.2γ: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR με εκκινητές F_LacZ-loxP και R_intron5_4.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες – Συγκεντρώσεις
Δείγμα DNA + H ₂ O	10μl
Kapa Taq Buffer 10x w MgCl ₂	2,5μl
dNTPS 20x	0,5μl
F_LacZ-loxP	0,5μl – 25pmol (50pmol/μl)
R_intron5_4	0,5μl – 25pmol (50pmol/μl)
Taq Polymerase	0,3μl – 1,5Un (5Un/μl)
H ₂ O	10.7

Πίνακας 4.2δ: Χρόνοι σταδίων PCR, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές: F1' - R5' ή LAR3.

Στάδια	Χρόνος	Θερμοκρασία
Αρχική αποδιάταξη	5 min	95° C
Αποδιάταξη επαναλαμβανόμενων κύκλων	40 secs	95° C
Υβριδοποίηση	40 secs	58° C
Επιμήκυνση	45 secs	72° C
Τελική επιμήκυνση	10 min	72° C

Πίνακας 4.2ε: Χρόνοι σταδίων PCR, στην οποία επιλέχθηκαν οι εκκινητές: F_LacZ-loxP – R_intron5_4.

Στάδια	Χρόνος	Θερμοκρασία
Αρχική αποδιάταξη	5 min	95° C
Αποδιάταξη επαναλαμβανόμενων κύκλων	40 secs	95° C
Υβριδοποίηση	40 secs	64° C
Επιμήκυνση	45 secs	72° C
Τελική επιμήκυνση	10 min	72° C

4.3 PCR με πολλαπλούς εκκινητές (Multiplex PCR)

Στην PCR πολλαπλών εκκινητών μπορούν να ενισχυθούν περισσότερες από μία αλληλουχίες στόχοι με την ενσωμάτωση περισσότερων από ένα ζευγών εκκινητών στην αντίδραση. Η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε πολλούς τομείς της διάγνωσης νουκλεϊνικών οξέων, συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης γονιδιακής διαγραφής (Chamberlain et al. 1988, Chamberlain et al. 1989), μετάλλαξης και πολυμορφισμού (Shuber et al. 1993, Rithidech et al. 1997) ποσοτικής ανάλυσης (Zimmermann et al. 1996, Sherlock et al. 1998) και ανίχνευσης RNA (Jin et al. 1996, Zou et al. 1998). Στον τομέα των μολυσματικών ασθενειών, η τεχνική έχει αποδειχθεί ότι είναι μια πολύτιμη μέθοδος για την αναγνώριση-ταυτοποίηση ιών, βακτηρίων, μυκήτων και/ή παράσιτων.

Βελτιστοποίηση, μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα της PCR πολλαπλών εκκινητών

Η βελτιστοποίηση της PCR πολλαπλών εκκινητών μπορεί να αποβεί δύσκολη, συμπεριλαμβανομένης της κακής ευαισθησίας ή της εξειδίκευσης και / ή της προνομιακής ενίσχυσης ορισμένων συγκεκριμένων στόχων. Η παρουσία περισσότερων από ένα, ζευγών εκκινητών στην PCR αυτή αυξάνει την πιθανότητα λήψης ψευδών προϊόντων ενίσχυσης, κυρίως λόγω του σχηματισμού των διμερών εκκινητών. Αυτά τα μη ειδικά προϊόντα μπορούν να ενισχυθούν πιο αποτελεσματικά από τον επιθυμητό στόχο, καταναλώνοντας συστατικά της αντίδρασης και δημιουργώντας μειωμένα ποσοστά υβριδοποίησης και επέκτασης του επιθυμητού στόχου. Έτσι, η βελτιστοποίηση της τεχνικής αυτής θα πρέπει να στοχεύει στην ελαχιστοποίηση ή τη μείωση τέτοιων μη ειδικών αλληλεπιδράσεων. Εντούτοις, πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην ομολογία των εκκινητών με τις αλληλουχίες των νουκλεϊνικών οξέων στόχων, το μήκος τους, η περιεκτικότητα σε GC και η συγκέντρωσή τους. Ιδανικά, όλα τα ζεύγη εκκινητών θα πρέπει να έχουν παρόμοιες αποδόσεις ενίσχυσης για τον αντίστοιχο στόχο τους. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση εκκινητών με σχεδόν ταυτόσημες θερμοκρασίες υβριδοποίησης (μήκος εκκινητών 18 έως 30 βάσεις ή περισσότερο και περιεκτικότητα σε GC 35-60% μπορεί να αποδειχθεί ικανοποιητική). Τα τμήματα DNA που ενισχύονται θα πρέπει να είναι αρκετά διαφορετικά στο μήκος τους, σε ζεύγη βάσεων, ώστε να σχηματίζουν ξεχωριστές ζώνες σε ηλεκτροφόρηση πηκτώματος. Μία βελτιστοποιημένη PCR πολλαπλών εκκινητών πλεονεκτεί έναντι της απλής PCR όσον αφορά στο χρόνο που απαιτεί, το κόστος και την παροχή πληροφοριών από κάθε αντίδραση. Αυτό επίσης σημαίνει λιγότερους χειρισμούς με την πιπέτα και κατ'επέκταση μειωμένο ρίσκο για σφάλματα.

Πραγματοποιήθηκαν multiplex PCR, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές F1', R5' και LAR3. Πιο συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις που προστέθηκαν σε κάθε tube από κάθε αντιδραστήριο και οι διάρκειες κάθε κύκλου που επιλέχθηκαν στην PCR πολλαπλών εκκινητών φαίνονται στους πίνακες 4.3α και 4.3β αντίστοιχα.

Πίνακας 4.3α: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πολλαπλών εκκινητών. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι F1', R5' και LAR3.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες – Συγκεντρώσεις
Δείγμα DNA + H ₂ O	10μl
Kapa Taq Buffer 10x w MgCl ₂	2,5μl
dNTPS 20x	0,5μl
F1'	0,5μl – 25pmol (50pmol/μl)
R5'	0,5μl – 25pmol (50pmol/μl)
LAR3	1μl – 3pmol ή 1,33μl – 4pmol (3pmol/μl)
Taq Polymerase	0,3μl – 1,5Un (5Un/μl)
H ₂ O	9,7μl

Πίνακας 4.3β: Διάρκειες σταδίων της PCR πολλαπλών εκκινητών.

Στάδια	Χρόνος	Θερμοκρασία
Αρχική αποδιάταξη	5 min	95° C
Αποδιάταξη επαναλαμβανόμενων κύκλων	40 secs	95° C
Υβριδοποίηση	40 secs	58° C
Επιμήκυνση	45 secs	72° C
Τελική επιμήκυνση	10 min	72° C

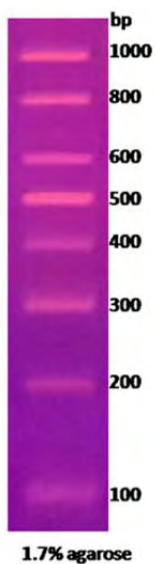
4.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως για το διαχωρισμό πρωτεϊνών, DNA ή RNA (Kryndushkin et al. 2003). Τα μόρια DNA διαχωρίζονται με τη βοήθεια ενός ηλεκτρικού πεδίου, όπου τα αρνητικά φορτισμένα μόρια μεταναστεύουν προς την άνοδο – θετικό πόλο. Η ταχύτητα μετανάστευσης καθορίζεται αποκλειστικά από το μοριακό βάρος, όπου τα μόρια με μικρό μοριακό βάρος μεταναστεύουν ταχύτερα από τα μόρια με μεγαλύτερο μοριακό βάρος (Sambrook & Russel 2001). Εκτός από το διαχωρισμό με βάση το μέγεθος, με την ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει κλασματοποίηση νουκλεϊνικού οξέος, η οποία μπορεί να αποτελεί ένα αρχικό βήμα για περαιτέρω καθαρισμό μιας ζώνης ενδιαφέροντος. Κατ' επέκταση αποκόπτεται η ζώνη ενδιαφέροντος από το πήκτωμα ενόσω βρίσκεται σε μηχανήμα UV transilluminator (Sharp et al. 1973).

Η συγκέντρωση της αγαρόζης σε ένα πήκτωμα μπορεί να κυμαίνεται από 0,8 έως 2,5. Η αύξηση της συγκέντρωσης μειώνει την ταχύτητα μετανάστευσης και έτσι διαχωρίζει πιο εύκολα τα μικρότερα μόρια DNA, ενώ η αύξηση της τάσης, την επιταχύνει. Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να διαχωριστούν μόρια από 500bp έως 25kb. Η ηλεκτροφόρηση χωρίζεται σε 2 στάδια. Το πρώτο αποτελείται από την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης και τη χρώση του, ενώ το δεύτερο από την τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα και την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης.

Αρχικά, για τη δημιουργία πηκτώματος 2% αναμίχθηκαν 0,6g αγαρόζης, (UltraPure™ Agarose, Invitrogen Kat. -Nr 16500500) σε 45ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x, ενώ για τη δημιουργία πηκτώματος 1% αναμίχθηκαν 0,3g αγαρόζης σε 45ml TAE 1x και το μίγμα θερμάνθηκε σε φούρνο μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το μίγμα να γίνει διαυγές. Το πήκτωμα αγαρόζης 1% χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση γενωμικού DNA, ενώ το πήκτωμα αγαρόζης 2% χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR. Για την παρατήρηση των διαχωρισμένων μορίων DNA που ηλεκτροφορήθηκαν στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας προστέθηκε η φθορίζουσα χρωστική Serva Kat.-Nr. 39803. Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Tris-acetate-EDTA) 50x περιέχει: 200mM Tris, 200mM CH₃COOH, 1mM EDTA. Από το πυκνό 50x έγινε αραιώση μέχρι την τελική συγκέντρωση 1x, η οποία χρησιμοποιήθηκε. Στη συνέχεια, το μίγμα τοποθετήθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο. Όταν κρύωσε η αγαρόζη δημιούργησε ένα πήκτωμα, καθώς δεσμοί υδρογόνου συνέδεσαν τα μόρια της αγαρόζης. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα TAE, μέχρι την κάλυψη του πηκτώματος. Οι συσκευές ηλεκτροφόρησης για πηκτώματα αγαρόζης είναι οριζόντια δοχεία τα οποία φέρουν στα άκρα τους δύο ηλεκτρόδια από πλατίνα. Έπειτα, τα δείγματα εισήχθησαν στο

πήκτωμα, αφού αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA (loading buffer). Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 10μl, τα οποία αναμίχθηκαν με 3μl διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το κυανό του ξυλενίου, το οποίο περιέχει 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 30% γλυκερόλη σε H₂O. Στη συνέχεια με τη βοήθεια του τροφοδοτικού, εφαρμόστηκε ηλεκτρική τάση (100 – 150V). Το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργήθηκε οδήγησε τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA να κινηθούν προς τον θετικό πόλο. Η ηλεκτρική τάση ασκήθηκε για το βέλτιστο χρόνο που επιλέχθηκε για το διαχωρισμό των μορίων του DNA (περίπου 15 – 20 min). Για την ταυτοποίηση του μεγέθους των τμημάτων DNA σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακών μεγεθών, από τον οποίο προστέθηκαν 1μl ανεμειγμένο με 3 μl ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης σε μία υποδοχή του πήκτωματος. Ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Minotech 100bp DNA ladder (εικ. 4.4.1)

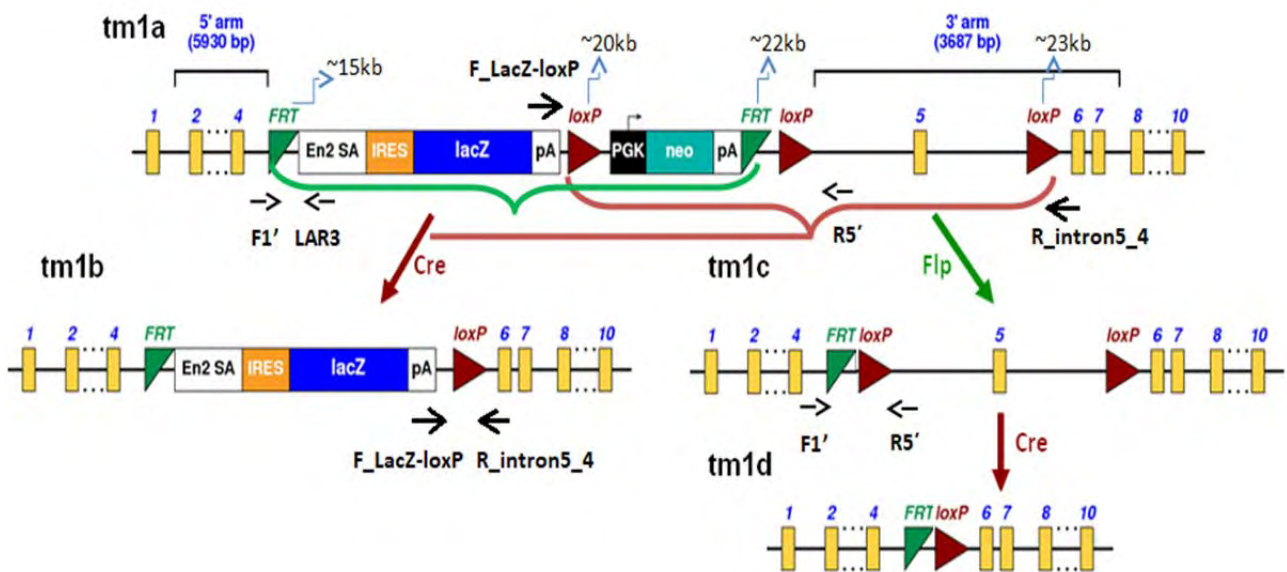


Αποτελέσματα

5.1 Σχεδιασμός γονοτύπησης

Συνολικά εξετάστηκαν 23 δείγματα από ουρές ποντικών, με στόχο τον προσδιορισμό του γονότυπού τους. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκαν 6 δείγματα υποψήφια για το αλληλόμορφο tm1c, το οποίο προκύπτει από την κοπή του αλληλομόρφου tm1a από την Flp recombinase και 17 δείγματα υποψήφια για το αλληλόμορφο tm1b, το οποίο προκύπτει από την κοπή του αλληλομόρφου tm1a από την Cre recombinase (Εικ. 5.1α).

Εικόνα 5.1α: Κοπή του αλληλομόρφου tm1a από τις Cre και Flp recombinases. Στην εικόνα φαίνονται τα αλληλόμορφα tm1b και tm1c που προκύπτουν από την κοπή του αλληλομόρφου tm1a από τις Cre και Flp recombinases αντίστοιχα. Επίσης, φαίνονται οι περιοχές υβριδοποίησης των εκκινητών F1', R5', LAR3, F_LacZ-loxP και R_intron5_4 στα αλληλόμορφα tm1a, tm1b και tm1c.



5.1.1 Σχεδιασμός γονοτύπησης των υποψήφιων δειγμάτων για το αλληλόμορφο *tm1c*

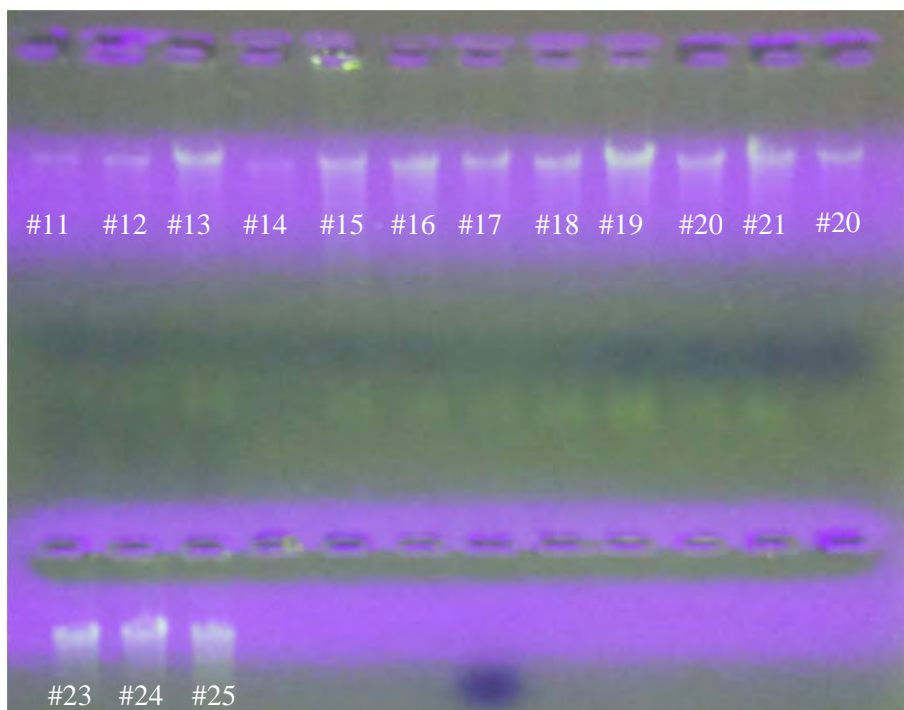
Για τη γονοτύπηση των 6 δειγμάτων (#11 - #16), τα οποία προέκυψαν από διασταυρώσεις ομόζυγων ποντικών wt^{Flp}/wt^{Flp} και ετερόζυγων ποντικών $wt/tm1a$ χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές $F1$, $R5$ και $LAR3$, οι οποίοι δίνουν διαφορετικό μέγεθος προϊόντων σε αλληλόμορφα αγρίου τύπου, $tm1a$ και $tm1c$. Τα δείγματα #11 - #13 είναι αρσενικά, ενώ τα δείγματα #14 - #16 είναι θυληκά. Το αλληλόμορφο $tm1c$ προκύπτει από την κοπή του αλληλομόρφου $tm1a$ από την Flp ρεκομπινάση. Οι εκκινητές $F1' - R5'$ υβριδοποιούνται στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου και ενισχύουν μία αλληλουχία DNA μήκους 361bp. Επίσης, οι εκκινητές $F1' - R5'$ υβριδοποιούνται στο αλληλόμορφο $tm1c$ και ενισχύουν μία αλληλουχία μήκους 495bp. Από τις 495bp, οι 218bp προκύπτουν από τις αλληλουχίες των στοιχείων FRT και $loxP$, ενώ οι 277bp από την αλληλουχία αγρίου τύπου. Οι εκκινητές $F1' - R5'$ δεν μπορούν να ενισχύσουν την αλληλουχία του αλληλομόρφου $tm1a$, καθώς στο αλληλόμορφο αυτό η απόσταση μεταξύ τους είναι μεγάλη, λόγω της ύπαρξης της κασέτας ανάμεσά τους. Ως αποτέλεσμα, λόγω των συνθηκών που επιλέγονται στην PCR (χρόνος επιμήκυνσης) δεν μπορούν να ενισχύσουν την αλληλουχία του αλληλομόρφου $tm1a$. Οι εκκινητές $F1' - LAR3$ υβριδοποιούνται στο αλληλόμορφο $tm1a$ και ενισχύουν μία αλληλουχία DNA μήκους 234bp (Εικ. 7.1α). Οι εκκινητές $F1' - LAR3$ δεν ενισχύουν την αλληλουχία του αλληλομόρφου αγρίου τύπου, καθώς ο εκκινητής $LAR3$ δεν υβριδοποιείται στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου. Μέσω της Multiplex PCR, με τη χρησιμοποίηση και των τριών εκκινητών ($F1' - R5' - LAR3$) σε κάθε tube - δείγμα, μπορεί να καταστεί δυνατή η ταυτόχρονη υβριδοποίηση και των εκκινητών $F1' - R5'$ και των εκκινητών $F1' - LAR3$ στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα αλληλόμορφα των δειγμάτων DNA των ζώων. Οπότε μέσω της Multiplex PCR μπορούν να πραγματοποιηθούν ταυτόχρονα και οι δύο παραπάνω αντιδράσεις και να προκύψουν στην ηλεκτροφόρηση όλες οι προαναφερθείσες ζώνες σε μία στήλη για κάθε δείγμα.

5.1.2 Σχεδιασμός γονοτύπησης των υποψήφιων δειγμάτων για το αλληλόμορφο **tm1b**

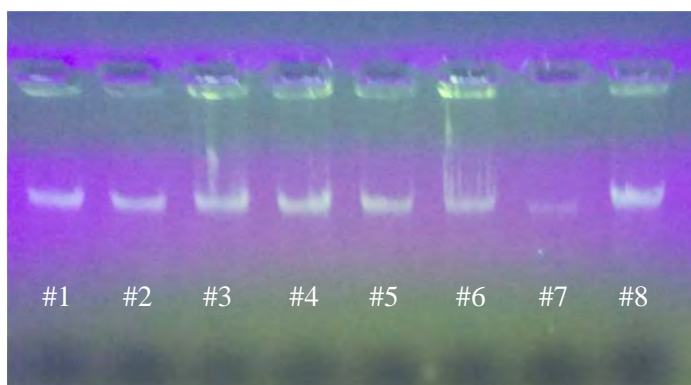
Για τη γονοτύπηση των 17 δειγμάτων (#1 - #8 και #17 - #25), τα οποία προέκυψαν από διασταυρώσεις ομόζυγων ποντικών wt^{Cre}/wt^{Cre} και ετερόζυγων ποντικών $wt/tm1a$ πραγματοποιήθηκαν PCR με εκκινητές, οι οποίοι υβριδοποιούνται πριν την 1^η αλληλουχία loxP, ο εμπρόσθιος και μετά την 3^η ο ανάστροφος. Τα δείγματα #5 - #8 και #17 - #22 είναι αρσενικά, ενώ τα δείγματα #1 - #4 και #23 - #25 είναι θηλυκά. Ο εκκινητής F_LacZ-loxP χρησιμοποιήθηκε ως εμπρόσθιος και ο εκκινητής R_intron5_4 ως ανάστροφος. Τα ζώα στα οποία αναγνωρίζονται από την Cre ρεκομπινάση η 1^η και η 3^η loxP και απομακρύνεται το ενδιάμεσο DNA, είναι τα επιθυμητά **tm1b** (Εικ. 7.1α). Στα δείγματα αυτά παρατηρείται στην ηλεκτροφόρηση μία ζώνη στις 395bp. Στα δείγματα στα οποία αναγνωρίζονται από την Cre ρεκομπινάση η 1^η - 2^η loxP ή η 2^η - 3^η loxP τα παραγόμενα προϊόντα των εκκινητών αυτών από την PCR είναι 700bp και 2000bp μεγαλύτερα αντίστοιχα από το επιθυμητό **tm1b**. Ως αποτέλεσμα, λόγω των συνθηκών που επιλέγονται στην PCR (χρόνος επιμήκυνσης) δεν ενισχύονται τα προϊόντα αυτά.

5.2 Απομόνωση DNA

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση 1μl γονιδιωματικού DNA από τα 50μl που υπάρχουν συνολικά από κάθε δείγμα, για τα δείγματα #11 – #25 (Εικ. 5.2α) και για τα δείγματα #1 – #8 (Εικ. 5.2β), για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη DNA έπειτα από την απομόνωσή του.



Εικόνα 5.2α: Ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικού DNA. Δείγματα #11 - #16, υποψήφια για το αλληλόμορφο tm1c. Δείγματα #17 - #25, υποψήφια για το αλληλόμορφο tm1b.



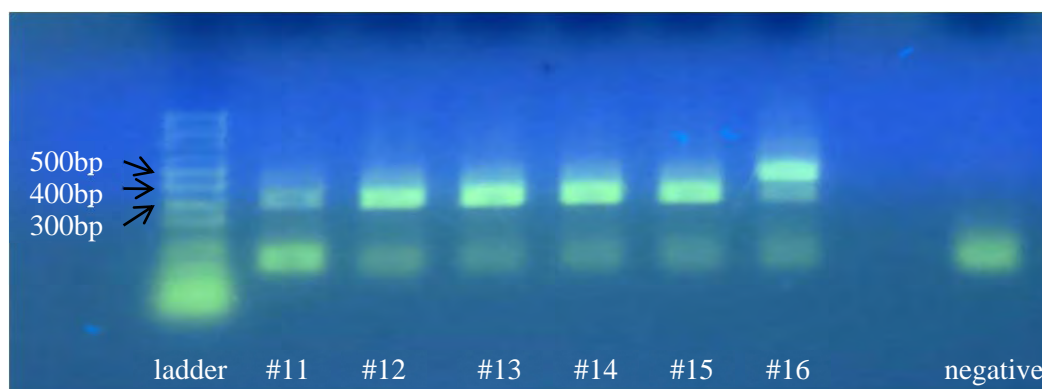
Εικόνα 5.2β: Ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικού DNA. Δείγματα #1 – #8, υποψήφια για το αλληλόμορφο tm1b.

Από τις παραπάνω ηλεκτροφορήσεις αποδείχθηκε ότι η απομόνωση του DNA ήταν αποτελεσματική, καθώς παρατηρήθηκε ζώνη DNA σε όλα τα δείγματα. Επίσης φάνηκε ότι το DNA ήταν ακέραιο. Ακόμη, με βάση την ένταση των ζωνών των παραπάνω δειγμάτων, υπολογίστηκαν αδρά οι ποσότητες DNA από κάθε δείγμα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στις περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες.

PCR

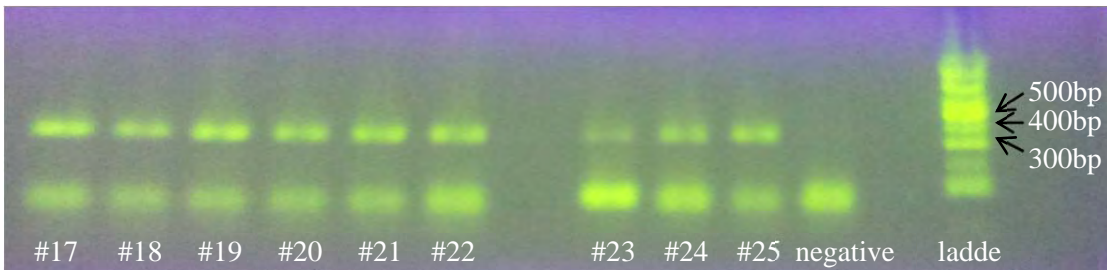
Οι ποσότητες DNA ρυθμίζονται με βάση την ένταση των ζωνών των δειγμάτων στις ηλεκτροφορήσεις των PCR, με στόχο την καλύτερη δυνατή παρατήρηση των ζωνών αυτών.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα DNA αραιώση 1/10, καθώς η ένταση των ζωνών όλων των δειγμάτων DNA στις ηλεκτροφορήσεις του γονιδιωματικού DNA ήταν ιδιαίτερα αυξημένη. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν διαφορετικές ποσότητες από κάθε δείγμα με σκοπό την εξισσορόπηση της έντασης των ζωνών όλων των δειγμάτων DNA, ανάλογα με την παρατηρούμενη ποσότητα στο πήκτωμα αγαρόζης. Πραγματοποιήθηκαν 3 PCR, μία για τα δείγματα #11 – #16, μία για τα δείγματα #17 – #25 και μία για τα δείγματα #1 – #8, με εκκινητές τους F1' και R5'. Οι PCR αυτές έγιναν με σκοπό να ελεγχθεί εάν οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε δείγμα ήταν επαρκείς (Εικ. 5.2γ, 5.2δ, 5.2ε). Οι παραπάνω PCR, πραγματοποιήθηκαν στη βέλτιστη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών F1' - R5', η οποία είναι οι 58 °C.



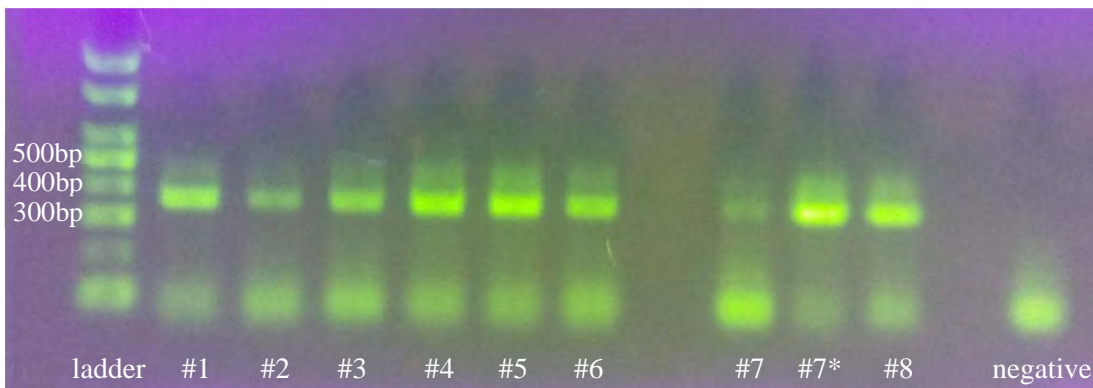
Εικόνα 5.2γ: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR με εκκινητές F1' - R5', για τα δείγματα #11 - #16. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα δείγματα #11 - #16. Στο δείγμα negative δεν προστέθηκε γονιδιωματικό DNA.

Η παραπάνω ηλεκτροφόρηση απέδειξε ότι τα δείγματα #11 – #15 είναι ομόζυγα ως προς το αλληλόμορφο αγρίου τύπου, καθώς παρατηρείται μόνο μία ζώνη, στις 361bp, η οποία είναι χαρακτηριστική για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου. Ταυτόχρονα αποδείχθηκε ότι το δείγμα #16 είναι ετερόζυγο ως προς το αλληλόμορφο tm1c, διότι παρουσιάζει δύο ζώνες στην ηλεκτροφόρηση, μία στις 361bp, η οποία οφείλεται στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου και μία στις 495bp, η οποία οφείλεται στο αλληλόμορφο tm1c. Ακόμη, από την ηλεκτροφόρηση της παραπάνω PCR φάνηκε ότι οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε δείγμα ήταν επαρκείς. Από τα δείγματα #11, #12 και #14 προστέθηκαν 10μl, από το δείγμα #13, 3μl, ενώ από τα δείγματα #15 και #16, 5μl.



Εικόνα 5.2δ: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR με εκκινήτες F1' - R5', για τα δείγματα #17 - #25. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα δείγματα #17 - #25. Στο δείγμα negative δεν προστέθηκε γονιδιωματικό DNA.

Με βάση την ανωτέρω εικόνα παρατηρήθηκε ότι οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν από τα δείγματα #17 - #22 #24 και #25 ήταν επαρκείς. Ακόμη, φάνηκε ότι η ποσότητα του δείγματος #23 δεν ήταν επαρκής. Από τα δείγματα #17, #18 και #20 προστέθηκαν 5μl, από τα δείγματα #19, #21, #23, #24 και #25, 1.5μl, ενώ από το δείγμα #22, 10μl.

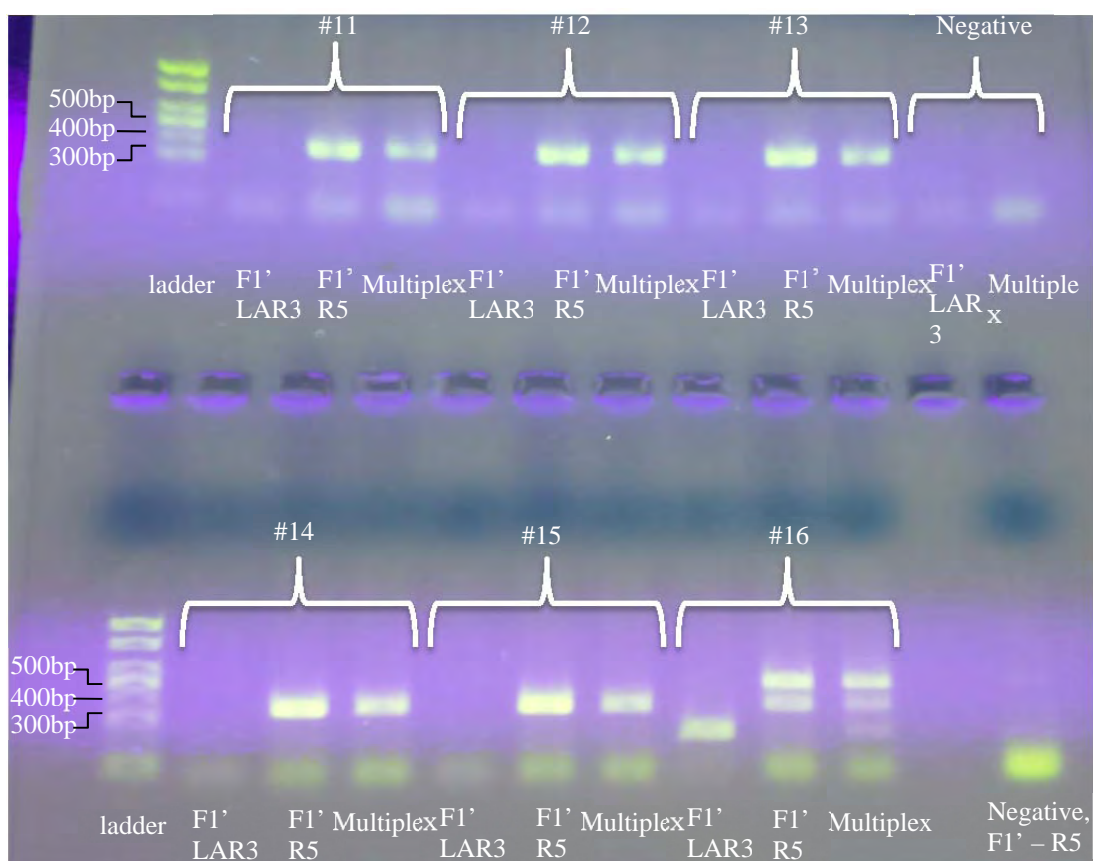


Εικόνα 5.2ε: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR με εκκινήτες F1' - R5', για τα δείγματα #1 - #8. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα δείγματα #1 - #8. Στο δείγμα negative δεν προστέθηκε γονιδιωματικό DNA.

Με βάση την παραπάνω εικόνα παρατηρήθηκε ότι οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν από τα δείγματα #1, #3 - #6, #7* και #8 ήταν επαρκείς. Επίσης, φάνηκε ότι η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε από τα δείγματα #2 και #7 δεν ήταν επαρκής. Από το δείγμα #1 προστέθηκαν 5μl, από τα δείγματα #2 και #5, 6μl, από τα δείγματα #3, #4, #6, #8, 4μl, από το δείγμα #7, 10μl, ενώ από το δείγμα #7* 2μl. Στο δείγμα 7* δεν έχει πραγματοποιηθεί η αραίωση 1/10.

5.3 Γονοτύπηση δειγμάτων #11 - #16

Για τη γονοτύπηση των δειγμάτων #11 - #16 πραγματοποιήθηκε PCR με πολλαπλούς εκκινητές (Multiplex PCR), με τους F1', R5' και LAR3. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της multiplex PCR, πραγματοποιήθηκαν δύο επιπλέον PCR, η μία με εκκινητές τους F1' - R5' και η άλλη με εκκινητές τους F1' - LAR3. Οι τρεις αυτές ανεξάρτητες αντιδράσεις ηλεκτροφορήθηκαν στο ίδιο πήκτωμα αγαρόζης, το οποίο παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.3α.



Εικόνα 5.3α: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των PCR με εκκινητές F1' - LAR3, F1' - R5' και της Multiplex PCR με εκκινητές F1', LAR3, R5', για τα δείγματα #11 - #16. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των τριών αντιδράσεων. Από αριστερά προς τα δεξιά απεικονίζονται με τη σειρά για κάθε δείγμα (#11 - #16), τα προϊόντα των αντιδράσεων F1' - LAR3, F1' - R5' και της Multiplex. Στο δείγμα negative δεν προστέθηκε γονιδιωματικό DNA.

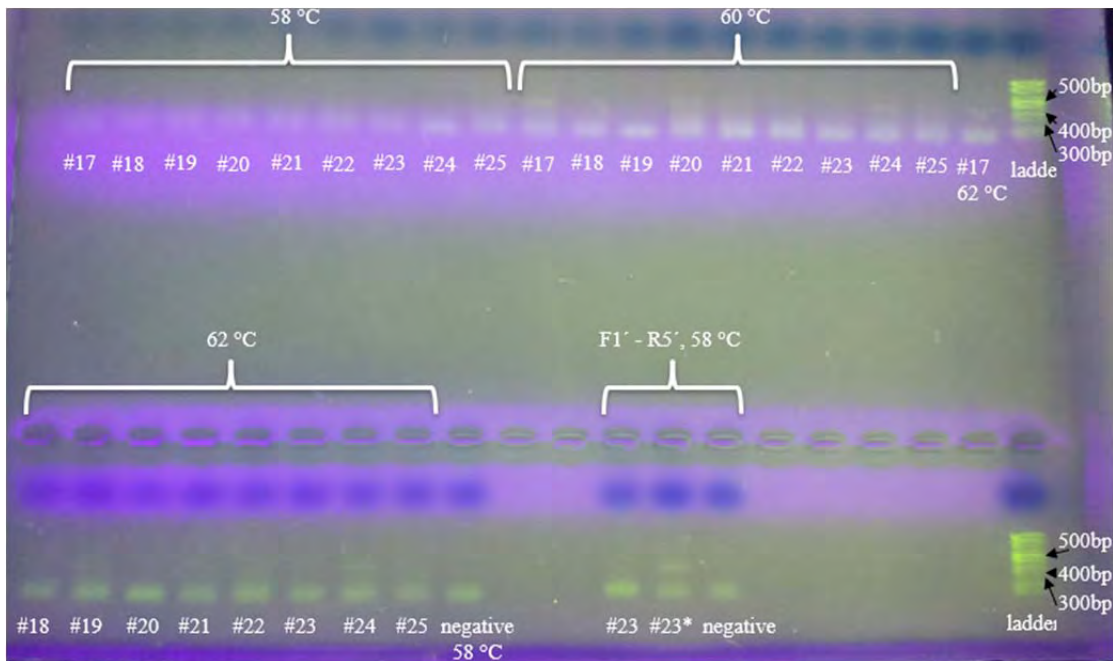
Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι τα δείγματα #11 - #15 είναι ομόζυγα αγρίου τύπου. Αυτό γίνεται αντιληπτό από το γεγονός ότι παρουσιάζουν μόνο μία ζώνη στις 361bp στις αντιδράσεις F1' - R5' και Multiplex, η οποία είναι χαρακτηριστική για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου, ενώ στην αντίδραση F1' - LAR3 δεν παρουσιάζουν κάποια ζώνη, το οποίο αποδεικνύει ότι σε κανένα από αυτά τα δείγματα δεν υπάρχει το αλληλόμορφο tm1a. Το δείγμα #16 είναι ετερόζυγο, διότι στις αντιδράσεις F1' - R5' και Multiplex εμφανίζει τις δύο αναμενόμενες ζώνες,

μία στις 361bp, η οποία οφείλεται στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου και μία στις 495bp, η οποία οφείλεται στο αλληλόμορφο tm1c. Ωστόσο, στην αντίδραση F1' - LAR3 το δείγμα #16 εμφανίζει μία ζώνη στις 234bp, η οποία παρατηρείται και στη Multiplex. Η ζώνη στις 234bp αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο tm1a. Αυτό υποδηλώνει ότι η Flp ρεκομπινάση αναγνώρισε και ανασυνδύασε τις αλληλουχίες FRT του αλληλομόρφου tm1a σε κάποια κύτταρα του ζώου από το οποίο προήλθε το δείγμα #16 και όχι σε όλα, καθώς εάν είχε αναγνωρίσει και ανασυνδύσει τις περιοχές FRT σε όλα τα κύτταρα δεν θα είχε παρατηρηθεί στην ηλεκτροφόρηση η ζώνη στις 234bp.

5.4 Γονοτύπηση δειγμάτων #1 - #8 και #17 - #25.

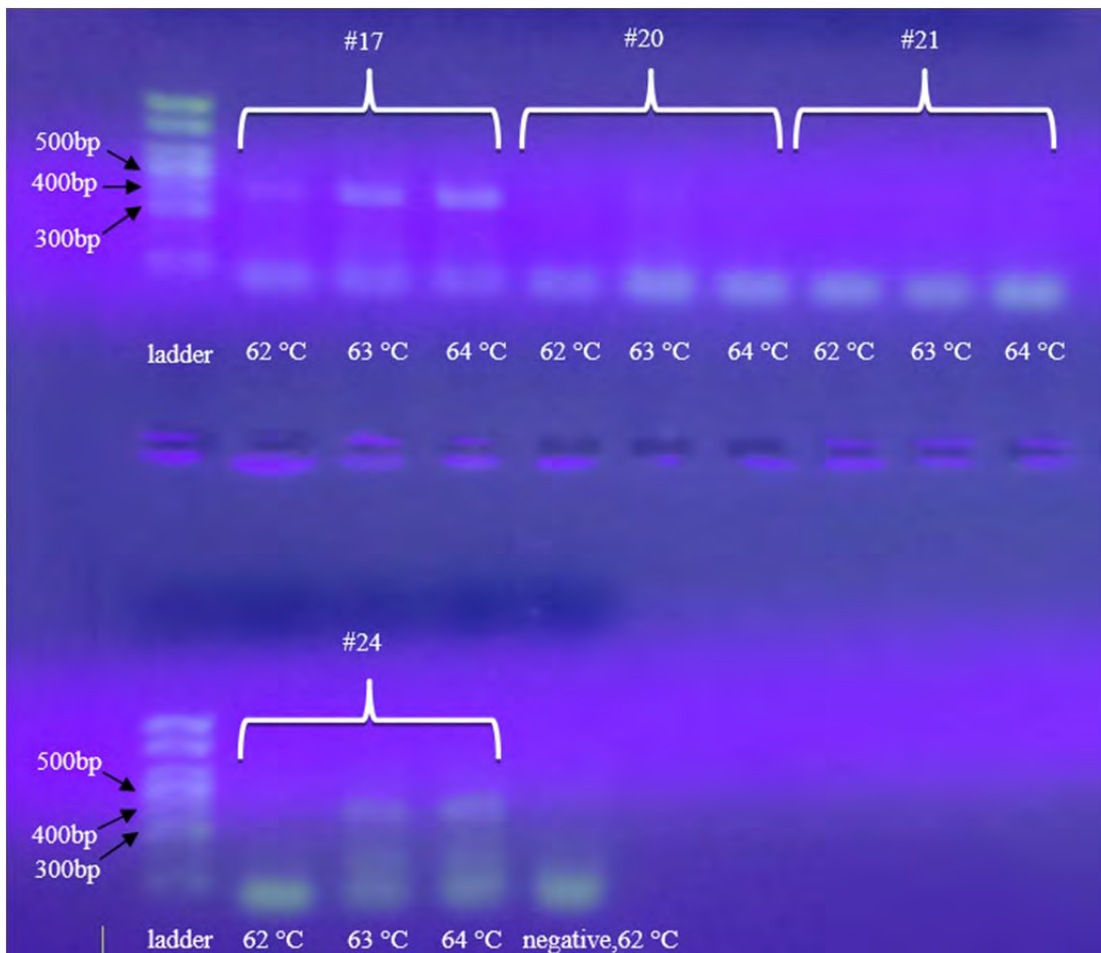
Η θεωρητική βέλτιστη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών F_LacZ-loxP - R_intron5_4, είχε υπολογιστεί με βάση τον τύπο: $(G+C)*4 + (A+T)*2$ και ήταν γνωστή (64 °C). Ωστόσο έπρεπε να βρεθεί και η πραγματική βέλτιστη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών αυτών, καθώς αυτοί χρησιμοποιούνταν για πρώτη φορά. Έτσι, πραγματοποιήθηκε Gradient PCR (κλίσης θερμοκρασίας) σε θερμοκρασίες υβριδοποίησης 58 °C, 60 °C και 62 °C για την εξεύρεση της πραγματικής βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών αυτών.

Αρχικά, για τη γονοτύπηση των δειγμάτων #17 - #25 πραγματοποιήθηκαν τρεις PCR με διαφορετική θερμοκρασία υβριδοποίησης εκκινητών στην καθεμία, με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών. Οι ποσότητες που προστέθηκαν από κάθε δείγμα είναι ίδιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση με εκκινητές τους F1' - R5' που αναφέρθηκε προηγουμένως (Εικ. 5.2δ). Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε ήταν το F_LacZ-loxP - R_intron5_4. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε μία PCR για τη βελτιστοποίηση της ποσότητας του δείγματος #23, καθώς στην προηγούμενη PCR (Εικ. 5.2δ) η ποσότητά του δεν ήταν επαρκής, με εκκινητές τους F1 και R5, σε θερμοκρασία 58 °C (ίδια αντίδραση με αυτήν που ηλεκτροφορήθηκε στην Εικόνα 5.2δ). Οι ποσότητες που προστέθηκαν από το δείγμα #23 ήταν το 1μl στη θέση #23 και τα 3μl στη θέση #23*. Οι θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν ήταν οι 58 °C, οι 60 °C και οι 62 °C. Οι παραπάνω αντιδράσεις ηλεκτροφορήθηκαν στο ίδιο πήκτωμα αγαρόζης, το οποίο παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.4α.



Εικόνα 5.4α: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων των τριών PCR με εκκινητές F_LacZ-loxP – R_intron5_4, για τα δείγματα #17 - #25. Από αριστερά προς τα δεξιά απεικονίζονται με τη σειρά για τα δείγματα #17 - #25, τα προϊόντα των αντιδράσεων με θερμοκρασίες υβριδοποίησης εκκινητών 58 °C, 60 °C και 62 °C αντίστοιχα. Στα δείγματα negative δεν προστέθηκε γονιδιωματικό DNA.

Με βάση την παραπάνω εικόνα φάνηκε ότι οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης των εκκινητών που επιλέχθηκαν δεν ήταν οι ιδανικές, καθώς οι εντάσεις των ζωνών δεν ήταν ιδιαίτερα έντονες. Ωστόσο φάνηκε ότι στη μεγαλύτερη θερμοκρασία (62 °C) τα δείγματα έδωσαν τις πιο έντονες ζώνες. Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι τα δείγματα #18, #19, #22, #23 και #25 δεν είναι φορείς του αλληλομόρφου tm1b, καθώς δεν εμφανίζουν κάποια ζώνη. Επίσης, φάνηκε ότι τα δείγματα #17, #20, #21 και #24 πιθανώς είναι φορείς του αλληλομόρφου tm1b. Όμως, το αποτέλεσμα δεν ήταν ικανοποιητικό όσον αφορά την θερμοκρασία υβριδοποίησης, γι'αυτό πραγματοποιήθηκε ένα επιπλέον πείραμα με άλλες τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδοποίησης, 62 °C, 63 °C και 64 °C. Οι παραπάνω αντιδράσεις ηλεκτροφορήθηκαν στο ίδιο πήκτωμα αγαρόζης, το οποίο παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.4β. Επιπλέον, από την αντίδραση βελτιστοποίησης της ποσότητας DNA του δείγματος #23, φάνηκε ότι τα 3μl λειτούργησαν καλύτερα (Εικ. 5.4α).



Εικόνα 5.4β: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων των τριών PCR με εκκινητές F_LacZ-loxP – R_intron5_4, για τα δείγματα #17, #20, #21 και #24. Από αριστερά προς τα δεξιά απεικονίζονται με τη σειρά για κάθε δείγμα, τα προϊόντα των αντιδράσεων με θερμοκρασίες υβριδοποίησης εκκινητών 62 °C, 63 °C και 64 °C αντίστοιχα. Στο δείγμα negative δεν προστέθηκε γονιδιωματικό DNA.

Από το πείραμα αυτό αποδείχθηκε ότι τα δείγματα #20 και #21 δεν είναι φορείς του επιθυμητού αλληλομόρφου tm1b, καθώς δεν εμφανίζουν κάποια ζώνη. Ακόμη, φάνηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών ήταν οι 64 °C. Επίσης, έγινε σαφές ότι το δείγμα #17 είναι ετερόζυγο, διότι εμφανίζει την αναμενόμενη για το αλληλόμορφο tm1b ζώνη στις 395bp. Ακόμη, παρατηρήθηκε η επιθυμητή ζώνη του αλληλομόρφου tm1b στο δείγμα #24, ωστόσο η εικόνα της ζώνης αυτής στην ηλεκτροφόρηση δεν ήταν τόσο ξεκάθαρη. Γι'αυτό το λόγο κρατήθηκε μόνο το δείγμα #17 για τα επακόλουθα πειράματα της ευρύτερης έρευνας.

Για τη γονοτύπηση των δειγμάτων #1 - #8 πραγματοποιήθηκε μία PCR, με εκκινητές τους F_LacZ-loxP - R_intron5_4. Η αντίδραση ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης, το οποίο παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.4γ.



Εικόνα 5.4γ: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με εκκινητές F_LacZ-loxP – R_intron5_4, για τα δείγματα #1 - #8. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα δείγματα #1 - #8. Στο δείγμα negative δεν προστέθηκε γονιδιωματικό DNA.

Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι τα ζώα #3 - #8 δεν είναι φορείς του αλληλομόρφου tm1b, καθώς δεν παρατηρείται κάποια ζώνη στην ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων τους. Παρ'όλα αυτά στο δείγμα #3 παρατηρείται μία αχνή ζώνη, η οποία δεν μπορεί να αποδώσει με βεβαιότητα το πόρισμα ότι το δείγμα #3 είναι φορέας του αλληλομόρφου tm1b. Επιπρόσθετα, αποδείχθηκε ότι τα δείγματα #1 και #2 είναι ετερόζυγα ως προς το αλληλόμορφο tm1b, καθώς εμφανίζουν την αναμενόμενη για το αλληλόμορφο tm1b ζώνη στις 395bp. Οι ποσότητες που προστέθηκαν από τα δείγματα #1, #3, #6 και #8 είναι τα 4μl, από το δείγμα #2, 8μl, από το δείγμα #4, 3μl, από το δείγμα #5, 5μl, ενώ από το δείγμα #7*, 1.8μl. Στο δείγμα 7* δεν έχει πραγματοποιηθεί η αραίωση 1/10.

6. Συζήτηση

Από τη γονοτύπηση των υποψήφιων δειγμάτων για το αλληλόμορφο *tm1c* (δείγματα #11 - #16), τα οποία προέκυψαν από διασταυρώσεις ομόζυγων ποντικών wt^{Flp}/wt^{Flp} και ετερόζυγων ποντικών *wt/tm1a* απεδείχθη ότι το δείγμα #16 είναι ετερόζυγο για το αλληλόμορφο *tm1c*, διότι στην ηλεκτροφόρηση της PCR με εκκινητές τους F1' - R5' και της Multiplex PCR με εκκινητές τους F1' - R5' - LAR3 εμφάνισε τις δύο αναμενόμενες ζώνες, μία στις 361bp, η οποία αντιπροσωπεύει το αλληλόμορφο αγρίου τύπου και μία στις 495bp, η οποία αντιπροσωπεύει το αλληλόμορφο *tm1c* (Εικ. 7.3α). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι στο δείγμα #16 η Flp ρεκομπινάση αναγνώρισε και ανασυνδύασε τις αλληλουχίες FRT στο αλληλόμορφο *tm1a*, το ενδιάμεσο τμήμα DNA αποκόπηκε και προέκυψε το αλληλόμορφο *tm1c*. Ωστόσο, στην ηλεκτροφόρηση της PCR με εκκινητές τους F1' - LAR3 το δείγμα #16 εμφάνισε μία ζώνη στις 234bp, η οποία παρατηρήθηκε και στην ηλεκτροφόρηση της Multiplex PCR. Η εμφάνιση της ζώνης στις 234bp έδειξε ότι το δείγμα #16 ήταν φορέας του αλληλομόρφου *tm1a*, καθώς αυτή η ζώνη αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο *tm1a*. Από τα παραπάνω αποτελέσματα εξήχθη το συμπέρασμα ότι η Flp ρεκομπινάση αναγνώρισε και ανασυνδύασε τις αλληλουχίες FRT του αλληλομόρφου *tm1a* σε κάποια κύτταρα και όχι σε όλα, καθώς εάν είχε αναγνωρίσει και ανασυνδυάσει τις αλληλουχίες FRT σε όλα τα κύτταρα δεν θα είχε παρατηρηθεί η ζώνη στις 234bp. Το ποντίκι #16 θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ετερόζυγων ποντικών *tm1d*, οι οποίοι θα προκύψουν από τη διασταύρωση ετερόζυγων ποντικών *wt/tm1c* με ομόζυγους ποντικούς wt^{Cre}/wt^{Cre} , δηλαδή ποντίκια στα οποία το εξόνιο 5 του γονιδίου *FRA10AC1* θα έχει απαλειφθεί και το μετάγραφο που δεν περιλαμβάνει το εξόνιο 5 του γονιδίου πιθανόν θα αποικοδομείται. Στη συνέχεια τα ποντίκια φορείς του αλληλομόρφου *tm1d* (*wt/tm1d*) θα μελετηθούν ως προς το φαινότυπό τους και την παραγωγή με διασταυρώσεις *wt/tm1d* - *wt/tm1d* ομόζυγων knockout ποντικών για το γονίδιο *FRA10AC1* (*tm1d/tm1d*). Στα ποντίκια αυτά θα μελετηθεί το ποσοστό βιωσιμότητάς τους, καθώς και ο φαινότυπός τους.

Από τη γονοτύπηση των υποψήφιων δειγμάτων για το αλληλόμορφο *tm1b* (δείγματα #1 - #8 και #17 - #25), τα οποία προέκυψαν από διασταυρώσεις ομόζυγων ποντικών wt^{Cre}/wt^{Cre} και ετερόζυγων ποντικών *wt/tm1a* απεδείχθη ότι τα δείγματα #1, #2, #17 και #24 είναι ετερόζυγα για το αλληλόμορφο *tm1b*, διότι στις ηλεκτροφορήσεις των PCR με εκκινητές τους *F_LacZ-loxP* και *R_intron5_4* εμφάνισαν την αναμενόμενη για το αλληλόμορφο *tm1b* ζώνη στις 395bp (Εικ. 7.4β, Εικ. 7.4γ). Τα ζώα #1, #2, #17 και #24 κληρονόμησαν τόσο το αλληλόμορφο *tm1a*, όσο και το αλληλόμορφο wt^{Cre} από τους γονείς τους, οι αλληλουχίες *loxP* αναγνωρίστηκαν, κόπηκαν και ανασυνδύαστηκαν από την Cre ρεκομπινάση, απομακρύνοντας την κασέτα επιλογής ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη και το εξόνιο 5 του *FRA10AC1*, διατηρώντας ταυτόχρονα την κασέτα *lacZ*. Τα ποντίκια αυτά εκφράζουν τη β-γαλακτοσιδάση σε κύτταρα όπου το *FRA10AC1* θα εκφραζόταν κανονικά. Ο επακόλουθος στόχος είναι η παραγωγή μεγάλου αριθμού ποντικών *wt/tm1b*. Έπειτα, τα ποντίκια αυτά μπορεί να υποβληθούν σε πειράματα συμπεριφοράς με στόχο την επιβεβαίωση του φαινοτύπου της νοητικής υστέρησης, με την οποία έχει συσχετιστεί η έκφραση της εύθραστης θέσης *FRA10A*. Ωστόσο, θα πρέπει να εκμηδενιστεί η πιθανότητα να επηρεάζει η κασέτα έκφρασης *lacZ*, τη ρύθμιση άλλων γονιδίων, τα οποία μπορεί να είναι υπεύθυνα για το φαινότυπο της νοητικής υστέρησης του ποντικού. Ακόμη, οι απόγονοι αυτοί μπορούν να διασταυρωθούν μεταξύ τους και να παραχθούν απόγονοι *tm1b/tm1b*. Σε αυτούς τους ομόζυγους knockout ποντικούς μπορεί να μελετηθεί το ποσοστό βιωσιμότητάς τους. Παράλληλα στα ποντίκια *wt/tm1b*, ακόμα και στους ομόζυγους ποντικούς, εφόσον είναι βιώσιμοι, μπορεί να εφαρμοστούν ομικές τεχνολογίες, για παράδειγμα αλληλούχηση RNA νέας γενιάς (RNA seq), σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου ποντίκια, με στόχο την επιβεβαίωση του ρόλου της *FRA10AC1* στη διαδικασία της συναρμογής.

7. Βιβλιογραφία

- Annemieke J.M.H.Verkerk, MauraPieretti, James S.Sutcliffe, Ying-HuiFu, Derek P.A.Kuhl, AntonioPizzuti, OrlyReiner, StephenRichards, Maureen F.Victoria, FupingZhang, Bert E.Eussen, Gert-Jan B.van Ommen, Lau A.J.Blonden, Gregory J.Riggins, Jane L.Chastain, Catherine B.Kunst, HansGaljaard, C.Thomas Caskey, Stephen T.Warren. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* Volume 65, Issue 5, 31 May 1991, Pages 905-914
- B.J. Mowry, Ewen K.R., Nancarrow D.J., Lennon D.P., Nertney D.A., Jones H.L., O'Brien M.S., Thornley C.E., Walters M.K., Crowe R.R., Silverman J.M., Endicott J., Sharpe L., Hayward N.K., Gladis M.M., Foote S.J., Levinson D.F., Second stage of a genome scan of schizophrenia: study of five positive regions in an expanded sample, *Am. J. Med. Genet.* 96 (2000) 864 – 869.
- Beermann S, Seifert R, Neumann D. Commercially available antibodies against human and murine histamine H(4)-receptor lack specificity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (2012) 385(2):125–35. doi:10.1007/s00210-011-0700-4
- Bessonov S., Anokhina M., Krasauskas A., Golas M. M., Sander B., Will C. L., Urlaub H., Stark H., Lührmann R. (2010) Characterization of purified human Bact spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis. *RNA*, 16(12):2384-403.
- Bessonov S., Anokhina M., Will C. L., Urlaub H., Lührmann R. (2008) Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature*, 452(7189):846-50.
- Bradley A, Anastassiadis K, Ayadi A, Battey JF, Bell C, Birling MC, et al. The mammalian gene function resource: the international knockout mouse consortium. *Mamm Genome* (2012) 23(9–10):580–6. doi:10.1007/s00335-012-9422-2
- Bressan GC, Quaresma AJ, Moraes EC, Manfiolli AO, Passos DO, Gomes MD, Kobarg J. Functional association of human Ki-1/57 with pre-mRNA splicing events. *FEBS J.* 2009 Jul;276(14):3770-83. Epub 2009 Jun 11.
- Buckingham L. & Flaws M.L., *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, & Clinical Applications*, F.A. Davis, Philadelphia, Pa, USA, 2007.
- Burrow A.A, Williams L.E., Pierce L.C.T., Wang Y.H. (2009). Over half of breakpoints in gene pairs involved in cancer specific recurrent translocations are mapped to human chromosomal fragile sites. *BMC Genomics*, doi:10.1186/1471-2164-10-59.
- Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genetics* (2005) 6(6):507–12. doi:10.1038/nrg1619
- Chamberlain J. S., Gibbs R.A., Ranier J.E., Nguyen P.N., Caskey C.T., 1989. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy, p. 272–281. In D. H. Gelfand, M. A. Innis, J. J. Shinsky, and T. J. White (ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, Calif.
- Chamberlain J. S., Gibbs R.A., Ranier J.E., Nguyen P.N., Caskey C.T., 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16:11141–11156
- Chen Y. I., Moore R. E., Ge H.Y., Young M. K., Lee T.D., Stevens S. W. (2007). Proteomic analysis of in vivo-assembled pre-mRNA splicing complexes expands the catalog of participating factors. *Nucleic Acids Res.* 35(12):3928-44.
- Coleman J.L.J., Brennan K., Ngo T., Balaji P., Graham R.M., Smith N.J. Rapid knockout and reporter mouse line generation and breeding colony establishment using EUCOMM conditional-ready embryonic stem cells: a case study. *Front. Endocrinol.*, 30 June 2015 <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00105>
- Cseke L.J., Kaufman P.B., Podila G.K., Tsai C.-J., *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2nd edition, 2004.
- Debacker K, Winnepeninckx B, Longman C, Colgan J, Tolmie J, Murray R, van Luijk R, Scheers S, Fitzpatrick D, Kooy F. “The molecular basis of the folate-sensitive fragile site FRA11A at 11q13.” *Cytogenet Genome Res.* 2007; 119(1-2):9-14. Epub 2007 Dec 14.
- Doyle K., *The Source of Discovery: Protocols and Applications Guide*, PROMEGA, Madison, Wis, USA, 1996.
- Durkin S.G., Glover T.W.: Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet.* 2007, 41: 169-192. 10.1146/annurev.genet.41.042007.165900.
- Gariyban L, Avashia N., 2013. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol.* 2013 Mar; 133(3): e6. doi: 10.1038/jid.2013.1
- Glover T.W.: Common fragile sites. *Cancer Lett.* 2006, 232 (1): 4-12. 10.1016/j.canlet.2005.08.032.
- Glover T.W., Arlt M.F., Casper A.M., Durkin S.G., Mechanisms of common fragile site instability, *Hum. Molec. Genet.* 14 Issue suppl_2, 15 October 2005, Pages R197–R205, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi265>
- Glover, T.W., Berger, C., Coyle, J. et al. , 1984. DNA polymerase α inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. July 1984, Volume 67, Issue 2, pp 136–142. doi: 10.1007/BF00272988

Gong W., Emanuel B. S., Galili N., Kim D. H., Roe B., Driscoll D. A., Budarf M. L. (1997). Structural and mutational analysis of a conserved gene (DGSI) from the minimal DiGeorge syndrome critical region. *Hum Mol Genet.* 1997, 6(2):267-76.

Hafko R, Villapol S, Nostramo R, Symes A, Sabban EL, Inagami T, et al. Commercially available angiotensin II At(2) receptor antibodies are nonspecific. *PLoS One* (2013) 8(7):e69234. doi:10.1371/journal.pone.0069234

Halle S., 5-Azacytidine as a mutagen for arboviruses, *Journal Virol.* 1968, 2: 1228–1229

Hartmuth K., Urlaub H., Vornlocher H. P., Will C.L., Gentzel M., Wilm M., Lührmann R. (2002) Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinityselection method. *Proc Natl Acad Sci*, 99(26):16719-24.

Herrera M, Sparks MA, Alfonso-Pecchio AR, Harrison-Bernard LM, Coffman TM. Lack of specificity of commercial antibodies leads to misidentification of angiotensin type 1 receptor protein. *Hypertension* (2013) 61(1):253–8. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00982

Hewett DR, Handt O, Hobson L, Mangelsdorf M, Eyre HJ, Baker E, Sutherland GR, Schuffenhauer S, Mao JJ, Richards RI. “FRA10B structure reveals common elements in repeat expansion and chromosomal fragile site genesis.” *Mol Cell.* 1998 May; 1(6):773-81.

International Mouse Knockout Consortium, Collins FS, Rossant J, Wurst W. A mouse for all reasons. *Cell* (2007) 128(1):9–13. doi:10.1016/j.cell.2006.12.018

Jin, L., Richards A., Brown D.W.G., 1996. Development of a dual target-PCR for detection and characterization of measles virus in clinical specimens. *Mol. Cell. Probes* 10:191–200.

Jones C, Slijepcevic P, Marsh S, Baker E, Langdon WY, Richards RI, Tunnacliffe A. Physical linkage of the fragile site FRA11B and a Jacobsen syndrome chromosome deletion breakpoint in 11q23.3. *Hum Mol Genet.* 1994 Dec; 3(12):2123-30.

Jurica M. S., Licklider L.J., Gygi S. R., Grigorieff N., Moore M.J. (2002). Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *RNA*, 8(4):426-39.

Kähkönen M, Tengström C, Alitalo T, Matilainen R, Kaski M, Airaksinen E. (1989). Population cytogenetics of folate-sensitive fragile sites. II. Autosomal rare fragile sites. *Hum Genet*, 82(1):3-8.

Karon M, Benedict WF., Chromatid Breakage: Differential Effect of Inhibitors of DNA Synthesis during G2 Phase, *Science* 1972, 178: 62. 10.1126/science.178.4056.62

Kim S.K., Ro J.Y., Kemp B.L., Lee J.S., Kwon T.J., Hong W.K. & Mao L., Identification of two distinct tumor-suppressor loci on the long arm of chromosome 10 in small cell lung cancer, *Oncogene* 17 (1998) 1749 – 1753

Knight SJL, Flannery AV, Hirst MC, Campbell L, Christodoulou Z, Phelps SR, Pointon J, Middleton-Price HR, Barnicoat A, Pembrey ME, et al. “Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation.” *Cell.* 1993 Jul 16; 74(1):127-34.

Koontz L, 2013. Agarose gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 2013;529:35-45. doi: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00004-5.

Kremer E.J., Pritchard M., Lynch M., Yu S., Holman K., Baker E., Warren S.T., Schlessinger D., Sutherland G.R., Richards R.I. Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n *Science* 21 Jun 1991: Vol. 252, Issue 5013, pp. 1711-1714 DOI: 10.1126/science.1675488

Kryndushkin DS, Alexandrov IM, Ter-Avanesyan MD & Kushnirov VV (2003). Yeast [PSI+] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp10. *Journal of Biological Chemistry.*278 (49): 49636.

Lacombe L., Orlov I., Reuter V.E., Fair W.R., Dalbagni G., Zhang Z.F., Cardo C.C., Microsatellite instability and deletion analysis of chromosome 10 in human prostate cancer, *Int. J. Cancer* 69 (1996) 110 – 113.

Lagana A., Russo F., Sismeiro C., Giugno R., Pulvirenti A., Ferro A. (2010). Variability in the Incidence of miRNAs and Genes in Fragile Sites and the Role of Repeats and CpG Islands in the Distribution of Genetic Material. *PLoS ONE* 5(6): e11166. doi:10.1371/journal.pone.0011166.

Landolph JR, Jones PA., Mutagenicity of 5-Azacytidine and Related Nucleosides in C3H/10T½ Clone 8 and V79 Cells, *Cancer Res.* 1982, 42: 817–823

Lukusa T., Fryns J.P. (2008). Human chromosome fragility. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779, 3–16.

Makarov E. M., Makarova O. V., Urlaub H., Gentzel M., Will C. L., Wilm M., Lührmann R. (2002). Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science*, 298(5601):2205-8.

Makarova O.V., Makarov E. M., Urlaub H., Will C.L., Gentzel M., Wilm M., Lührmann R. (2004). A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. *EMBO J.*, 23(12):2381-91.

Mavrou A, Syrrou M, Tsenghi C, Metaxotou C. (1991). Autosomal folate sensitive fragile sites in normal and mentally retarded individuals in Greece.” *Am J Med Genet.*, 38(2-3):437-9.

Mitelman F, Mertens F, Johansson B: A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet.* 1997, 417-474. 10.1038/ng0497supp-417. 15

Nancarrow JK, Kremer E, Holman K, Eyre H, Doggett NA, Le Paslier D, Callen DF, Sutherland GR, Richards RI. “Implications of FRA16A structure for the mechanism of chromosomal fragile site genesis.” *Science.* 1994 Jun 24; 264(5167):1938-41.

O’Keefe LV, Richards RI: Common chromosomal fragile sites and cancer: focus on FRA16D. *Cancer Lett.* 2006, 232 (1): 37-47. 10.1016/j.canlet.2005.07.041.

Parrish JE, Oostra BA, Verkerk AJ, Richards CS, Reynolds J, Spikes AS, Shaffer LG, Nelson DL. “Isolation of a GCC repeat showing expansion in FRAXF, a fragile site distal to FRAXA and FRAXE.” *Nat Genet.* 1994 Nov;8(3):229-35

Paul P. 1982 Kobe J., Mutagenesis and transformation of C3H.10T1/2 mouse embryo fibroblasts with ultraviolet light and 5-azacytidine, *Med. Sci.* 1982, 28: 181–196

Petit P., Fryns J.P., Van den Berghe H., Hecht F., Population cytogenetics of autosomal fragile sites, *Clin. Genet.* 29 (1986) 96 – 100.

Pettitt SJ, Liang Q, Rairdan XY, Moran JL, Prosser HM, Beier DR, et al. Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nat Methods* (2009) 6(7):493–5. doi:10.1038/nmeth.1342

Popescu NC: Genetic alterations in cancer as a result of breakage at fragile sites. *Cancer Lett.* 2003, 192: 1-17. 10.1016/S0304-3835(02)00596-7.

Rappsilber J., Ryder U., Lamond A. I., Mann M. (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* 12(8):1231-45.

Rithidech, K. N., Dunn J.J., Gordon C.R., 1997. Combining multiplex and touchdown PCR to screen murine microsatellite polymorphisms. *BioTechniques* 23:36–45

Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, et al. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* (2000) 25(2):139–40. doi:10.1038/75973

Sambrook J & Russel DW(2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Sarafidou T., Kahl C., Martinez-Garay I., Mangelsdorf M., Gesk S., Baker E., Kokkinaki M., Talley P., Maltby E.L., French L., Harder L., Hinzmann B., Nobile C., Richkind K., Finnis K., Deloukas P., Sutherland R.G, Kutsche K., Moschonas KN., Siebert R., Gecz J. (2004). Folate-sensitive fragile site FRA10A is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, FRA10AC1, encoding a nuclear protein. *Genomics* 84, 69–81.

Schwartz M., Zlotorynski E., Kerem B. (2006). The molecular basis of common and rare fragile sites. *Cancer Letters* 232, 13–26.

Schwenk F, Baron U, Rajewsky K. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* (1995) 23(24):5080–1. doi:10.1093/nar/23.24.5080

Seymour PA, Sander M. Immunohistochemical detection of beta-galactosidase or green fluorescent protein on tissue sections. *Methods Mol Biol* (2007) 411:13–23. doi:10.1007/978-1-59745-549-7_2

Sharp P.A., Sugden B. & Sambrook J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry.* 12:3055-3063.

Sherlock, J., Cirigliano V., Petrou M., Tutschek B., Adinolfi M., 1998. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Ann. Hum. Genet.* 62:9–23.

Shuber, A. P., Skoletsky J., Stern R., Handelin B.L., 1993. Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. *Hum. Mol. Genet.* 2:153–158.

Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, et al. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* (2011) 474(7351):337–42. doi:10.1038/nature10163

Smith C. L., Bolton A., Nguyen G. (2010). Genomic and Epigenomic Instability, Fragile Sites, Schizophrenia and Autism. *Current Genomics*, 11, 447-469.

Sutherland GR, Baker E, Richards RI: Fragile sites still breaking. *Trends Genet.* 1998, 14 (12): 501-506. 10.1016/S0168-9525(98)01628-X.

Sutherland GR, Richards RI: Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science.* 1991, 252 (5013): 1711-1714. 10.1126/science.1675488.

Sutherland GR., Baker E. 2000. The clinical significance of fragile sites on human chromosomes. *Clin Genet.*, 58(3):157-61.

Suthram S, Shlomi T, Ruppim E, Sharan R, Ideker T. “A direct comparison of protein interaction confidence assignment schemes.” *BMC Bioinformatics.* 2006 Jul 26; 7:360 .

Viegas-Pequignot E, Dutrillaux B., Segmentation of human chromosomes induced by 5-ACR (5-azacytidine), *Hum. Genet.* 1976, 34: 247–254

Von Mering C, Krause R, Snel B, Cornell M, Oliver SG, Fields S, Bork P. Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature.* 2002 May 23;417(6887):399-403. Epub 2002 May 8

Weterings E, Chen DJ: The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res.* 2008, 18 (1): 114-124. 10.1038/cr.2008.3.

Wink M., FitzRoy R., *An Introduction to Molecular Biotechnology: Molecular Fundamentals, Methods and Application in Modern Biotechnology*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2006.

Winnepeninckx B., Debacker K., Ramsay J., Smeets D., Smits A., FitzPatrick D.R., Kooy D.F., CGG-repeat expansion in the DIP2B gene is associated with the fragile site FRA12A on chromosome 12q13.1, *Am. J. Hum. Genet.* 80 (2007) 221–231.

Yu S, Mangelsdorf M, Hewett D, Hobson L, Baker E, Eyre HJ, Lapsys N, Le Paslier D, Doggett NA, Sutherland GR, Richards RI. “Human chromosomal fragile site FRA16B is an amplified AT-rich minisatellite repeat.” *Cell.* 1997 Feb 7; 88(3):367-74.

Zhou Z., Licklider L.J., Gygi S.P., Reed R. (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*, 419(6903):182-5.

Zimmermann, K., Schogl D., Plaimauer B., Mannhalter J.W., 1996. Quantitative multiple competitive PCR of HIV-1 DNA in a single reaction tube. *BioTechniques* 21:480–484.

Zou, S., Stansfield C., Bridge J., 1998. Identification of new influenza B virus variants by multiplex reverse transcription-PCR and the heteroduplex mobility assay. *J. Clin. Microbiol.* 36:1544–1548.