



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική εργασία με τίτλο:

«Βελτιστοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης
για την γονοτύπηση ποντικών με απαλοιφή του γονιδίου
Fra10ac1»

της

Αντωνίας Κομπογεννιτάκη

Εργαστήριο Γενετικής Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας

Λάρισα, Φεβρουάριος 2019

«Optimization of polymerase chain reaction for genotyping of mice with deletion of the *Fra10ac1* gene.»

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Σαραφίδου Θεολογία: Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών

Μαμούρης Ζήσης: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Μούτου Αικατερίνη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών

Περίληψη

Το γονίδιο *FRA10AC1* του ανθρώπου εντοπίζεται στην σπάνια εύθραυστη θέση *FRA10A* του χρωμοσώματος 10 και η μεταγραφική καταστολή του ενός αλληλομόρφου του σχετίζεται με ήπια νοητική υστέρηση. Η απώλεια λειτουργίας του επέρχεται λόγω επέκτασης της τρινουκλεοτιδικής αλληλουχίας CGG που περιέχεται στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή. Προκειμένου να ελεγχθεί και μελετηθεί εκτενέστερα η συσχέτιση της εύθραυστης θέσης *FRA10A* με την νοητική υστέρηση έχει δημιουργηθεί ένα ζωικό μοντέλο ποντικού με απαλοιφή του ορθόλογου γονιδίου *Fra10ac1* με την χρήση εμβρυικών βλαστικών κυττάρων από την EUCOMM (European Conditional Mouse Mutagenesis Program). Τα πρώτα άτομα που προκύπτουν περιέχουν την κασέτα στόχευσης του γονιδίου *Fra10ac1* και ονομάζονται *tm1a*. Αυτά στην συνέχεια μέσω διασταύρωσης με διαγονιδιακά ποντίκια για το γονίδιο της *Cre* ρεκομπινάσης δίνουν απογόνους *tm1b* στους οποίους έχει αφαιρεθεί τμήμα της κασέτας μετά την αναγνώριση των δύο αλληλουχιών loxP από την ρεκομπινάση. Αντίστοιχα διασταύρωση των *tm1a* με διαγονιδιακά ποντίκια για το γονίδιο της *Flp* ρεκομπινάσης δίνουν απογόνους *tm1c* στους οποίους έχουν αναγνωρισθεί οι αλληλουχίες FRT από την ρεκομπινάση *Flp* με αποτέλεσμα την αφαίρεση του τμήματος μεταξύ αυτών και τέλος διασταύρωση ποντικών *tm1c* με διαγονιδιακά ποντίκια για το γονίδιο της *Cre* ρεκομπινάσης δημιουργούν απογόνους *tm1d* οι οποίοι περιέχουν μικρότερο τμήμα της κασέτας μετά την αναγνώριση των αλληλουχιών loxP από την ρεκομπινάση *Cre*. Οι ποντικοί *tm1d* αποτελούν τα άτομα με πλήρη αποσιώπηση του αλληλομόρφου του γονιδίου *Fra10ac1* και θα χρησιμοποιηθούν περαιτέρω. Στο πλαίσιο αυτής της πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκαν βελτιστοποιήσεις αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης προκειμένου αυτές να εφαρμοστούν στην συνέχεια για την γονοτύπηση ποντικών. Οι βελτιστοποιήσεις περιελάμβαναν το σχεδιασμό εκκινητών και τη διερεύνηση των συνθηκών της PCR προκειμένου να πραγματοποιείται ειδική ανίχνευση των αλληλομόρφων *tm1a*, *tm1b*, *tm1c* και *tm1d*. Με βάση αυτές τις αντιδράσεις γονοτυπήθηκαν δέκα ποντικοί για το αλληλόμορφο *tm1d*, τρεις για το *tm1a* και τρεις για το *tm1b*. Ο επόμενος στόχος είναι η δημιουργία αποικίας ετερόζυγων και, αν είναι η κατάσταση βιώσιμη, ομόζυγων ποντικών για το αλληλόμορφο *tm1d* οι οποίοι θα ελεγχθούν σε δοκιμασίες που θα αξιολογήσουν χαρακτηριστικά όπως η μνήμη και η συμπεριφορά τους, προκειμένου να ελεγχθεί η συσχέτιση της απλοανεπάρκειας του γονιδίου *FRA10AC1* με την εκδήλωση της νοητικής υστέρησης.

Abstract

The human *FRA10AC1* gene is located at the rare fragile *FRA10A* at chromosomal region 10q23 and the transcriptional repression of one of its alleles is associated with mild mental retardation. Loss of function occurs due to the expansion of the CGG trinucleotide repeat contained in the 5' untranslated region. In order to study the correlation of the *FRA10A* fragile site with mental retardation, a knockout animal mouse model for the *Fra10ac1* orthologous gene was developed using embryonic stem cells from EUCOMM (European Conditional Mouse Mutagenesis Program). The resulting knockout heterozygous mice are named tm1a which through crossing with transgenic mice for the *Cre* recombinase gene produce tm1b to which part of the cassette has been removed due to the recognition of the two loxP sequences from the recombinase. Correspondingly, crossing the tm1a with transgenic mice for the *Flp* recombinase gene yields tm1c progeny to which the FRT sequences have been identified by the Flp recombinase resulting in the removal of the fragment between them. Finally, crossing the tm1c mice with transgenic mice for the *Cre* recombinase gene generate tm1d progeny that contain a smaller portion of the cassette after recognition of the loxP sequences by the Cre recombinase. Tm1d mice are the mice with complete silencing of the *Fra10ac1* gene and will be used further. In the context of this dissertation, polymerase chain reaction optimizations were performed in order to apply them for genotyping. The optimizations included primer design and investigation of the PCR conditions in order to specifically detect the alleles tm1a, tm1b, tm1c and tm1d. Based on these reactions, ten mice were genotyped for the tm1d allele, four for tm1a and three for tm1b. The next aim is to create an heterozygous as well as an homozygous tm1d colony, if the homozygous condition is viable , in order to be tested in assays that will assess memory and learning, .

Πίνακας περιεχομένων

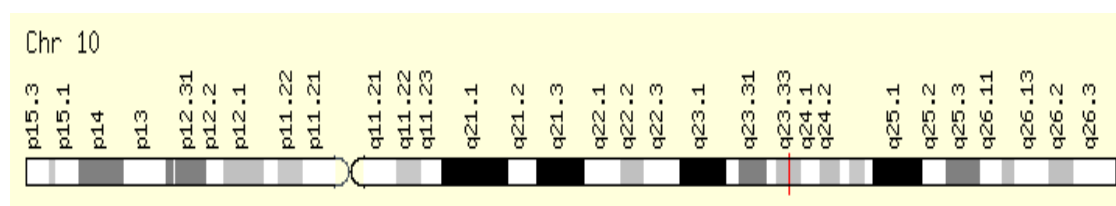
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1. Το γονίδιο <i>Fra10ac1</i>	7
2. Εύθραυστες θέσεις των χρωμοσωμάτων	8
3. Κλινική εκδήλωση της εύθραυστης θέσης <i>FRA10A</i>	10
4. Ποντικός-μοντέλο με απαλοιφή του γονιδίου <i>Fra10ac1</i>	11
4. 1. Δημιουργία των ποντικών <i>tm1a</i>	12
4. 2. Δημιουργία ποντικών <i>tm1b</i>	14
4. 3. Δημιουργία ποντικών <i>tm1c</i>	15
4. 4. Δημιουργία ποντικών <i>tm1d</i>	16
5. Σκοπός	17
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
1. Υλικά	19
2. Μέθοδοι.....	20
Απομόνωση γονιδιωματικού DNA	20
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction PCR)	21
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	24
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	26
1. Απεικόνιση των αλληλομόρφων <i>tm1a</i> , <i>tm1b</i> , <i>tm1c</i> και <i>tm1d</i> και οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών.....	27
2. Βελτιστοποίηση PCR με το ζεύγος εκκινητών <i>Fneo-Rintron_4</i> για την ανίχνευση του αλληλομόρφου <i>tm1a</i>	28
3. Βελτιστοποίηση PCR με το ζεύγος εκκινητών <i>FlacZ_LoxP-Rintron_5_4</i> για την ανίχνευση του αλληλομόρφου <i>tm1b</i>	28
4. Δοκιμαστική PCR με πολλαπλούς εκκινητές	29
5. Βελτιστοποίηση PCR για την εύρεση ειδικών εκκινητών για το αλληλόμορφο <i>tm1d</i>	30
6. Γονοτύπηση δειγμάτων υποψήφιων για <i>tm1d</i> Δ4-Δ9 και Δ13-Δ16.....	31
7. Γονοτύπηση των δειγμάτων Δ1-Δ3.....	36
8. Γονοτύπηση του δείγματος Δ11.....	38
5. Έλεγχος ύπαρξης γονιδίου που κωδικοποιεί την <i>Cre</i> ρεκομπινάση	40
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46

Στον σύζυγο μου, Δημήτρη...

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

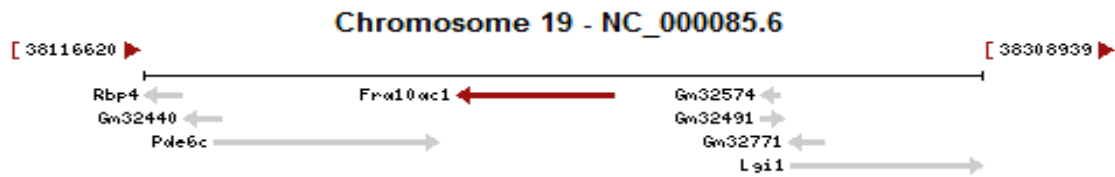
1. Το γονίδιο *Fra10ac1*

Το γονίδιο *FRA10AC1* του ανθρώπου (*FRA10A* associated CGG repeat 1), χαρτογραφήθηκε στην σπάνια, εύθραυστη χρωμοσωμική θέση *FRA10A*. Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10 και συγκεκριμένα στη θέση 10q23.33 (Εικ. 1). Το γονίδιο περιέχει επαναλαμβανόμενες τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες CGG στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του (5'-UTR), με τον αριθμό τους κατά μέσο όρο να είναι 8-14, με το πιο κοινό αλληλόμορφο του γονιδίου να φέρει εννέα επαναλήψεις CGG (Sarafidou et al. 2004). Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, ο αριθμός των επαναλήψεων μπορεί να ξεπεράσει τις 200 οπότε και εμφανίζεται κυτταρογενετική εύθραυστη θέση *FRA10A*, με αποτέλεσμα το αντίστοιχο αλληλόμορφο να μην μεταγράφεται. Η επέκταση του αριθμού των επαναλήψεων μπορεί να οδηγήσει στην θραύση λόγω ρήξης της διπλής έλικας του DNA (Sarafidou et al. 2004). Υπάρχουν μελέτες που συσχετίζουν αυτήν την εύθραυστη θέση με τη νοητική υστέρηση. Το βασικό μετάγραφο *FRA10AC1* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 315 αμινοξέων με μοριακό βάρος 37,5kD, η οποία όπως αποδείχθηκε από δύο μελέτες ανάλυσης του φωσφοπρωτεϊνόματος, με την μέθοδο χωματογραφίας ιοντοανταλλαγής και υγρής φασματοφωτομετρίας μάζας περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα σερίνης και εντοπίζεται στον πυρήνα. (Park et al. 2015, Sharma et al. 2014). Σε πολλαπλές πρόσφατες μελέτες η πρωτεΐνη *FRA10AC1* έχει απομονωθεί ως συστατικό του μείζονος σωματίου συναρμογής συγκεκριμένα, του σωματίου συναρμογής B *act* (activated) (Bessonov et al. 2010), C (Bessonov et al. 2008, 2010, Pagan et al. 2013, Schmidt et al. 2014) και P (Pagan et al. 2013) αποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη αυτή σχετίζεται με τον μηχανισμό επεξεργασίας του πρόδρομου mRNA. Έχει δειχθεί ότι το γονίδιο *FRA10AC1* εκφράζεται σε όλους τους ιστούς ενήλικων ατόμων με μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης σε όργανα με αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα όπως είναι ο εγκέφαλος, η καρδιά και το ήπαρ (Sarafidou et al. 2004).



Εικόνα 1: Εντοπισμός του γονιδίου *FRA10AC1* του ανθρώπου στο χρωμόσωμα 10 (UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly, <https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?redirect=manual&source=genome.ucsc.edu>).

Το *Fra10ac1* είναι το ορθόλογο γονίδιο στο ποντικό το οποίο εμφανίζει κατά 86% ταυτόσημη αλληλουχία με το *FRA10AC1* στον άνθρωπο. Υπάρχει μία κεντρική νουκλεοτιδική αλληλουχία του *FRA10AC1* η οποία είναι εξαιρετικά συντηρημένη. Το γονίδιο *Fra10ac1* στον ποντικό δείχθηκε ότι βρίσκεται στη χρωμοσωματική περιοχή 19C2-C3 (Εικ. 2), η οποία είναι συνταϊνική με την 10q23-q24 του ανθρώπου. Η πρωτεΐνη *Fra10ac1* εντοπίζεται σε διάφορους ιστούς συμπεριλαμβανομένου του νευρικού συστήματος ενήλικων ποντικών.



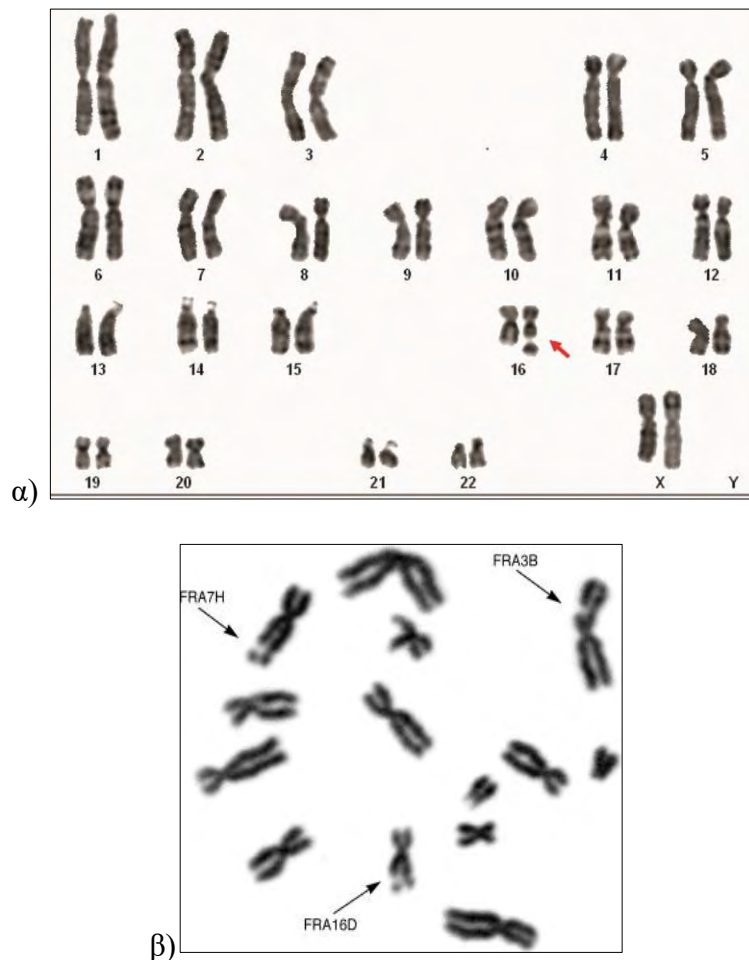
Εικόνα 2: Εντοπισμός του *Fra10ac1* στο χρωμόσωμα 19 του *Mus musculus*, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

2. Εύθραυστες θέσεις των χρωμοσωμάτων

Ως εύθραυστες θέσεις στα χρωμοσώματα αναφέρονται τα σημεία που εμφανίζουν χάσματα κατά την μετάφαση της μίτωσης, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων και είναι επιρρεπή σε θραύση. Αυτές χωρίζονται στις κοινές και σπάνιες βάσει της συχνότητας εμφάνισής τους. Οι κοινές εύθραυστες θέσεις βρίσκονται στα χρωμοσώματα των ανθρώπων φυσιολογικά και έχουν δομές που τους προσδίδουν ευκαμψία (Lukusa & Fryns 2008). Αυτές οι δομές συχνά αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα δινουκλεοτίδια A-T και εμποδίζουν την διεξαγωγή της ορθής αντιγραφής του DNA, διότι δημιουργούν δευτεροταγείς δομές που δεν συναντώνται στην διπλή έλικα του DNA. Αυτές οι δομές επίσης συμβάλλουν στην ευθραυστότητα του DNA (Dillon L. W. *et al.* 2010). Οι σπάνιες εύθραυστες θέσεις μπορούν να προκληθούν από την επίδραση συγκεκριμένων χημικών ουσιών σε καλλιέργειες κυττάρων κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. (Gunasekaran B, *et al.* 2017). Σε αντίθεση με τις κοινές, οι σπάνιες εύθραυστες θέσεις εμφανίζονται σε ένα μικρό μόνο ποσοστό του πληθυσμού (<5%). Η μελέτη ορισμένων σπάνιων εύθραυστων θέσεων απέδειξε ότι περιέχουν αυξημένο αριθμό νουκλεοτιδικών επαναλήψεων. Συγκεκριμένα, δήχθηκε ότι περιέχουν τρι- ή τετρανουκλεοτιδικές ακολουθίες που επαναλαμβάνονται. Ο αριθμός των επαναλήψεων παρουσιάζει μία μικρή διακύμανση στον γενικό πληθυσμό ωστόσο παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός αυτών αυξανόταν κατακόρυφα σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Έτσι προσδιορίστηκε μία νέα κατηγορία γενετικών νοσημάτων τα οποία προκύπτουν από επέκταση ασταθών νουκλεοτιδικών επαναλήψεων (Thomson and Thomson, *έβδομη έκδοση*, 2011).

Η συνηθέστερη αυτοσωματική σπάνια εύθραυστη θέση είναι η *FRA16B* η οποία προκύπτει από την επέκταση της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας AT (Εικ. 3α) και την έκθεση των κυττάρων που καλλιεργούνται σε δισταμυκίνη (distamycin). Η πρώτη χαρτογράφηση της θέσης *FRA16B* έγινε το 1970 και βρέθηκε στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 16 (Sutherland GR. *et al.* 1979). Ακόμη μία σπάνια εύθραυστη θέση που επάγεται όμως διαφορετικά (χωρίς φυλλικό οξύ στο θρεπτικό της καλλιέργειας των κυττάρων) είναι η *FRAXA*. Η συχνότητα εμφάνισής είναι 1/4000 γεννήσεις, και σχετίζεται με την εμφάνιση του συνδρόμου του εύθραυστου X. Το σύνδρομο οφείλεται στην επέκταση της τρινουκλεοτιδικής αλληλουχίας CGG, ο αριθμός της οποίας φυσιολογικά είναι έως 60 επαναλήψεις, στην 5'-αμετάφραστη περιοχή του πρώτου εξονίου, του γονιδίου *FMRI*. Η αύξηση του αριθμού των

επαναλήψεων πάνω από 200 σχετίζεται με την εμφάνιση του παθολογικού φαινοτύπου. (Thomson and Thomson, έβδομη έκδοση, 2011).

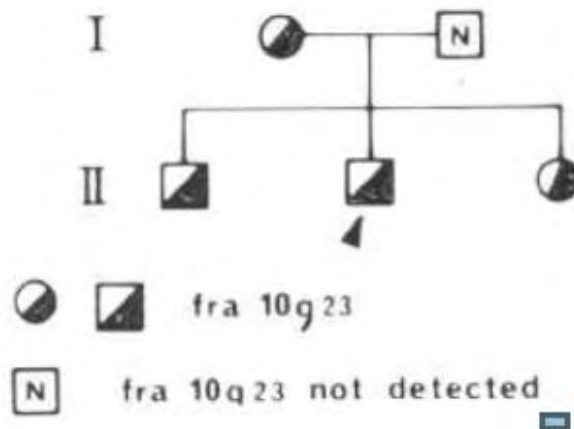


Εικόνα 3: α) Καρυότυπος ατόμου με σπάνια εύθραυστη θέση *FRA16B*, το βέλος υποδεικνύει το χρωμόσωμα 16 που φέρει την εύθραυστη θέση (Gunasekaran B, *et al.* 2017), β) σπάνιες εύθραυστες θέσεις *FRA7H*, *FRA3B* και *FRA16D* στα χρωμοσώματα 7, 3 και 16 αντίστοιχα (Grant R Sutherland *et al.* 1998),

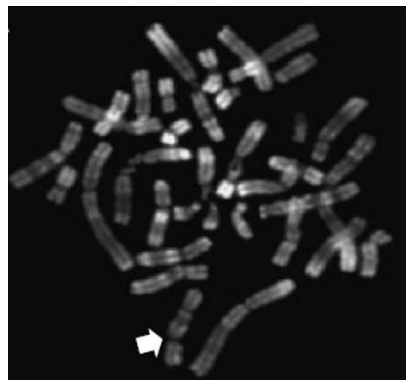
Ασθένειες των οποίων η εμφάνιση εξαρτάται από την επέκταση ολιγονουκλεοτιδικών επαναλήψεων συνήθως έχουν φαινότυπο ο οποίος συνοδεύεται από το φαινόμενο της επίσπευσης. Κατά το φαινόμενο αυτό ο φαινότυπος των απογόνων που νοσούν εμφανίζεται σε πιο νεαρή ηλικία και τα συμπτώματα της ασθένειας είναι πιο έντονα. Το φαινόμενο της επέκτασης των επαναλήψεων οφείλεται στην ολίσθηση της πολυμεράσης, η οποία κατά την αντιγραφή του DNA στο σημείο των ολιγονουκλεοτιδικών επαναλήψεων ολισθαίνει με αποτέλεσμα να πολυμερίζει περισσότερες επαναλήψεις σε σχέση με τον μητρικό κλώνο.

3. Κλινική εκδήλωση της εύθραυστης θέσης *FRA10A*

Μέχρι και σήμερα δύο σπάνιες εύθραυστες θέσεις που παρουσιάζουν ευαισθησία στο φυλλικό οξύ έχουν συσχετιστεί με παθολογικό φαινότυπο, η *FRAXA* και η *FRAXE*, οι οποίες βρίσκονται στο χρωμόσωμα X. Η *FRAXA* αποτελεί την πιο συχνή αιτία νοητικής υστέρησης στον άνθρωπο, μετά το σύνδρομο Down και η *FRAXE* επίσης σχετίζεται με νοητική υστέρηση σε μία πιο ήπια μορφή της (Bagni et al. 2012, Kremer et al. 1991). Μέχρι και σήμερα η εύθραυστη θέση *FRA10A* και άρα η απλοανεπάρκεια του *FRA10AC1* δεν έχουν συσχετιστεί απόλυτα με την εμφάνιση συγκεκριμένου φαινοτύπου. Ωστόσο αρκετές μελέτες την συσχετίζουν με νοητική υστέρηση, αναπτυξιακές ανωμαλίες, μικρό ανάστημα και δυσκολία έκφρασης λόγου (Εικ. 4) (Mavrou et al. 1991, Sarafidou et al. 2004). Αυτή η συσχέτιση προέκυψε μετά την σύγκριση καρυότυπων ατόμων με νοητική υστέρηση, οι οποίοι παρουσίασαν την εύθραυστη θέση *FRA10A* και υγιών ατόμων που δεν την εμφάνιζαν (Εικ. 5).



Εικόνα 4: Γενεαλογικό δέντρο οικογένειας με νοητική υστέρηση. Υπάρχει έκφραση της εύθραυστης θέσης *FRA10A* η οποία απεικονίζεται με μαύρο χρώμα δηλώνοντας τα άτομα που πάσχουν. Το βέλος υποδεικνύει το άτομο δείκτη (Sutherland, 1979).



Εικόνα 5: Απεικόνιση της σπάνιας εύθραυστης θέσης *FRA10A* σε καρυότυπο (Sarafidou et al. 2004).

4. Ποντικός-μοντέλο με απαλοιφή του γονιδίου *Fra10ac1*

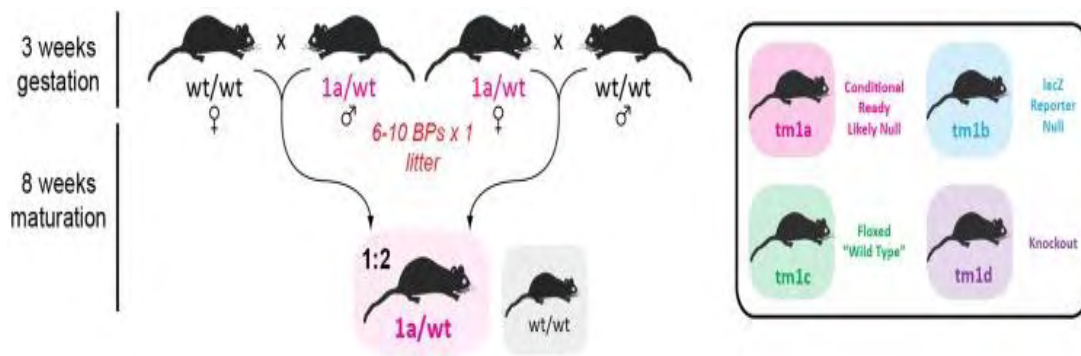
Με στόχο τη συσχέτιση του πιθανού παθολογικού φαινοτύπου νοητικής υστέρησης που εμφανίζουν οι φορείς της εύθραυστης θέσης *FRA10A* με την απλοανεπάρκεια του γονιδίου *FRA10AC1* έχει δημιουργηθεί ένα ζωικό μοντέλο ποντικού με απαλοιφή του ορθόλογου γονιδίου. Η δημιουργία του ποντικού knockout έγινε στο πλαίσιο της Υποδομής Infrafrontier GR (επικεφαλής: Δρ. Δ. Κοντογιάννης).

Το ποντίκι χρησιμοποιείται ως πειραματόζωο για την μελέτη ανθρωπίνων ασθενειών λόγω του μεγάλου ποσοστού ομολογίας μεταξύ του γονιδιώματός του και του ανθρώπου (98%). Ο κύκλος ζωής του είναι 2 μήνες και οι απόγονοι του 6-15, γεγονός που το καθιστούν εξαιρετικό ζωικό μοντέλο. Αυτά τα χαρακτηριστικά, καθώς και το μικρό του μέγεθος επιτρέπουν την ανάπτυξή του μέσα σε χώρο εργαστηρίου (*Suckow M, 2001*). Για την δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών είναι απαραίτητη η χρήση και ο σχεδιασμός κατάλληλων φορέων, εμβρυικών βλαστικών κυττάρων και η επακόλουθη χειρουργική εμφύτευσή τους.

Το 2007 δημιουργήθηκε η κοινοπραξία International Knockout Mouse Consortium, τα μέλη του οποίου ήταν τα, Knockout Mouse Project (KOMP) (ΗΠΑ), European Conditional Mouse Mutagenesis Program (EUCOMM), North American Conditional Mouse Mutagenesis (NorCOMM) (Canada) και Texas A&M Institute for Genomic Medicine (TIGM) (USA). Στόχος της κοινοπραξίας ήταν η συστηματική δημιουργία ποντικών knockout για όλα τα γονίδια και η διάθεση των αντίστοιχων εμβρυικών βλαστικών κυττάρων ή ποντικών, εφόσον ήταν διαθέσιμα (*Bradley A, 2012*). Η στόχευση του γονιδίου *Fra10ac1* πραγματοποιήθηκε με εμβρυικά βλαστικά κύτταρα από την EUCOMM.

Για την δημιουργία των ποντικών *tm1a*-knockout first δημιουργούνται τέσσερις κλώνοι βλαστικών κυττάρων και επιλέγεται ο κλώνος που έχει υποστεί με επιτυχία ενσωμάτωση του διαγονιδίου. Στην συνέχεια αναμένεται η αποτελεσματική συμμετοχή των τροποποιημένων βλαστικών κυττάρων στο έμβρυο, με σκοπό τη δημιουργία ενός χιμαιρικού ποντικού με ένα ποσοστό των γαμετικών του κυττάρων να περιέχουν το αλληλόμορφο *tm1a*. Στη συνέχεια το άτομο αυτό διασταυρώνεται με ποντίκι αγρίου τύπου ώστε ένα ποσοστό των απογόνων του να λάβουν το αλληλόμορφο *tm1a* και να έχουν γονότυπο *tm1a/wt*. (*Cotton LM, et al. 2015*)

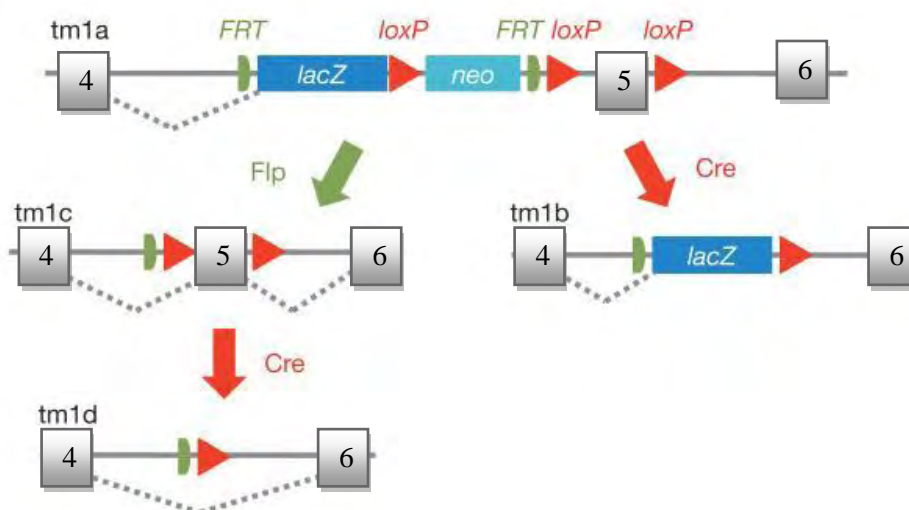
Από την ημερομηνία που ήταν διαθέσιμα τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα, μέχρι την γέννηση του πρώτου *tm1a* απαιτούνται κατά μέσο όρο 28 μήνες. Μετά την γέννηση ποντικών με γονότυπο *tm1a/wt* ποντικών απαιτούνται 3-4 εβδομάδες έως ότου αυτά μπορούν να αναπαραχθούν. Η διάρκεια της κύησης είναι περίπου 20 ημέρες, οπότε 8 εβδομάδες μετά την γέννησή τους έχουν δώσει τους πρώτους απογόνους. Οι πρώτες διασταυρώσεις είναι μεταξύ ατόμων με γονότυπο *tm1a/wt* και *wt/wt* προκειμένου να αυξηθεί ο αριθμός των ετερόζυγων ποντικών για το αλληλόμορφο *tm1a*. (Εικ. 6)



Εικόνα 6: Αύξηση του πληθυσμού των *tm1a/wt* ποντικών που προκύπτουν από διασταυρώσεις με ποντίκια αγρίου τύπου (James L. Ιούνιος 2015).

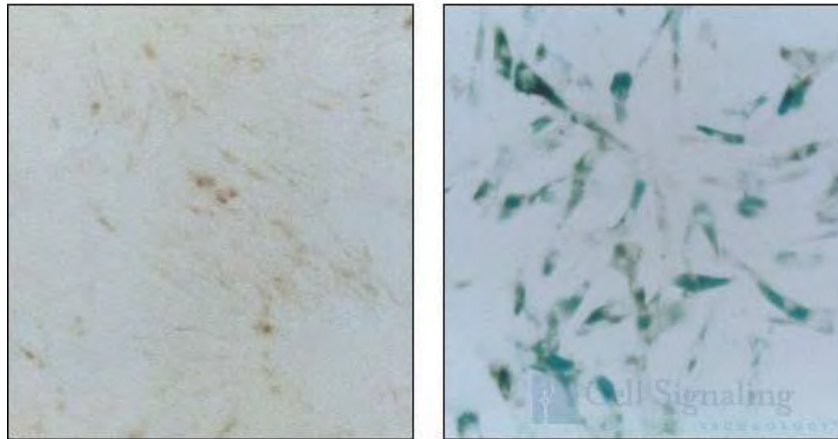
4. 1. Δημιουργία των ποντικών *tm1a*

Ο ποντικός που πρωτοδημιουργήθηκε ήταν με την προσέγγιση knockout-first και ονομάζεται *tm1a* (Εικ. 7). Αυτό το αρχικό αλληλόμορφο *tm1a* αποτελείται από το γονίδιο *Fra10ac1*, στο οποίο έχει ενσωματωθεί η κασέτα του γονιδίου της β-γαλακτοζιδάσης (*lacZ*) που αποτελεί το γονίδιο αναφοράς και η κασέτα του γονιδίου νεομυκίνης (*neo*) που αποτελεί το γονίδιο επιλογής. Το γονίδιο επιλογής διευκολύνει την *in vitro* επιλογή των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων τα οποία έχουν λάβει με ομόλογο ανασυνδυασμό την κατασκευή με το τροποποιημένο γονίδιο *Fra10ac1*. Το γεγονός ότι τα ποντίκια *tm1a* χαρακτηρίζονται ως knockout-first υποδηλώνει ότι ο φαινότυπος ορίζεται χωρίς επιπρόσθετα βήματα αναπαραγωγής. Το χαρακτηριστικό αυτό αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου, ιδιαιτέρως για φαινοτυπικές μελέτες μεγάλης κλίμακας.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση των διασταυρώσεων για την δημιουργία απογόνων *tm1a*, *tm1b*, *tm1c* και *tm1d* (Skarnes WC, et al 2011).

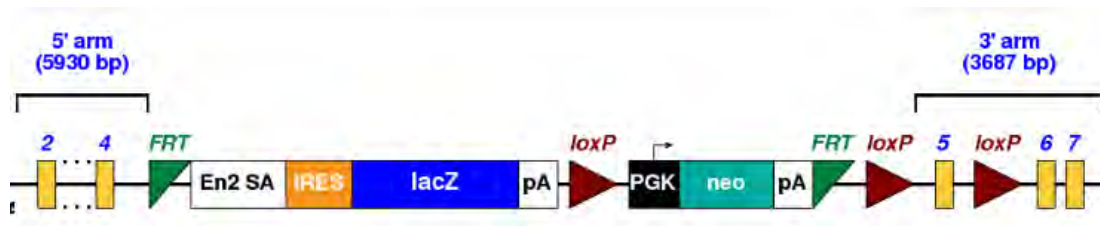
Η κασέτα lacZ δίνει την δυνατότητα παρακολούθησης της έκφρασης του γονιδίου *Fra10ac1* (Εικ. 8). Η έκφραση της β-γαλακτοζιδάσης μπορεί να προσδιοριστεί με την μέθοδο της ανασοιστοχημείας παρουσία του υποστρώματος X-gal, σε διαφορετικούς ιστούς και κυτταρικούς τύπους. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η μακροχρόνια εφαρμογή της μέσω συγκεκριμένων πρωτόκολλων γεγονός που την χαρακτηρίζει εύχρηστη και αξιόπιστη (Seymour PA, 2007).



Εικόνα 8: Ενδεικτική απεικόνιση ιστού που εκφράζει το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης. Η χρώση της β-γαλακτοσιδάσης σε φυσιολογικά κύτταρα WI38 (αριστερά) και σε γηρασμένα κύτταρα (δεξιά). (<https://www.cellsignal.com/products/cellular-assay-kits/senescence-b-galactosidase-staining-kit/9860>).

Το αλληλόμορφο *tm1a* του γονιδίου *Fra10ac1* παρουσιάζεται στην Εικόνα 9 και περιέχει τα ακόλουθα τμήματα:

- Τα κίτρινα τετράγωνα αποτελούν τα εξόνια του γονιδίου *Fra10ac1*. Τα πράσινα βέλη είναι οι αλληλουχίες που αναγνωρίζει η *F1p* ρεκομπινάση και αποκόπτει το τμήμα ανάμεσά τους.
- Τα κόκκινα βέλη είναι οι αλληλουχίες που αναγνωρίζει η Cre ρεκομπινάση και αποσπά το τμήμα ανάμεσά τους.
- LacZ: το γονίδιο που κωδικοποιεί την β-γαλακτοσιδάση.
- Neo: το γονίδιο επιλογής που προσδίδει ανθεκτικότητα στην νεομυκίνη.
- En2SA-IRES θέση συναρμογής του γονιδίου engrailed 2 του ποντικού και αλληλουχία υποβοήθησης της μετάφρασης (Internal ribosome entry site), αντίστοιχα.
- PGK: υποκινητής του γονιδίου της 3-φωσφογλυκερικής κινάσης που ελέγχει την έκφραση του γονιδίου neo.

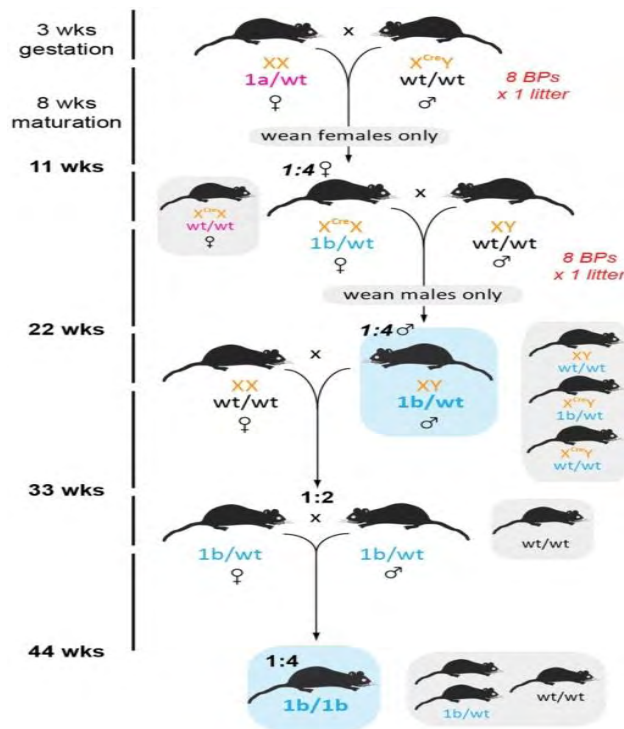


Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της τροποποιημένης αλληλουχίας του γονιδίου Fra10ac1. Εκτός από τα εξόνια του γονιδίου φαίνονται και οι εξής αλληλουχίες: η κασέτα lacZ , η κασέτα neo, οι αλληλουχίες loxP και οι αλληλουχίες FRT (Jacqueline K *et al*, 2013).

Εκτός από τις κασέτες lacZ και neo, το αλληλόμορφο tm1a περιέχει τις αλληλουχίες FRT και loxP οι οποίες αναγνωρίζονται από τις αντίστοιχες ρεκομπινάσες Flp και Cre. Ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες FRT υπάρχουν η κασέτα lacZ και η neo προκειμένου να αφαιρούνται ταυτόχρονα και οι δύο κασέτες μετά την δράση της ρεκομπινάσης Flp. Μετά την αλληλουχία του εξονίου 5 υπάρχει μία τρίτη θέση loxP η οποία αναγνωρίζεται από την ρεκομπινάση Cre σε ένα δεύτερο βήμα που αναφέρεται παρακάτω (Testa G, *et al*. 2004). Οι ποντικοί tm1a είναι knockout αλλά φέρουν στο γονιδίωμά τα γονίδια lacZ και neo που μπορούν να οδηγήσουν σε κάποιο φαινότυπο ανεξάρτητα από το γονίδιο που έχει στοχευθεί. Επίσης, έχει δειχθεί ότι σε κάποιο ποσοστό αλληλομόρφων tm1a, η επεξεργασία του πρόδρομου mRNA γίνεται φυσιολογικά. Γι' αυτό οι ποντικοί tm1a διασταυρώνονται κατάλληλα ώστε να προκύψουν εναλλακτικά τροποποιημένα αλληλόμορφα (Cotton LM *et al*, 2015).

4. 2. Δημιουργία ποντικών tm1b

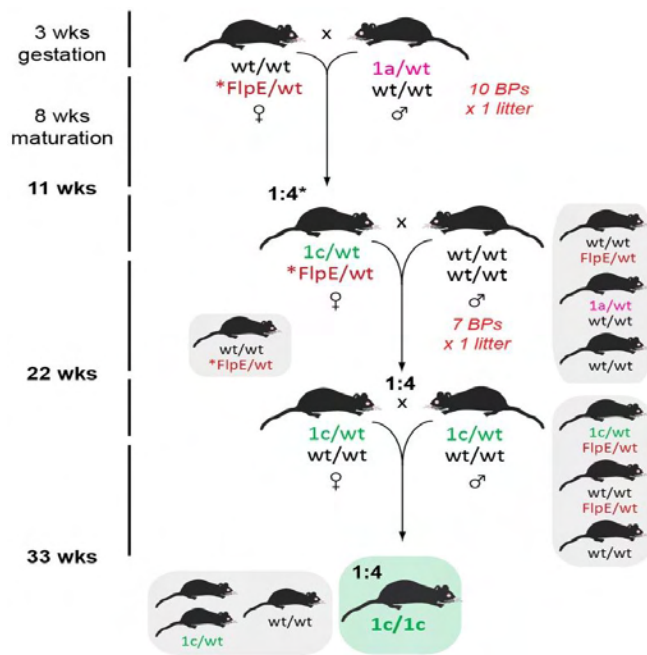
Διασταύρωση ενός ποντικού tm1a με ένα διαγονιδιακό ποντίκι το οποίο φέρει το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης έχει ως αποτέλεσμα το ένζυμο να αναγνωρίσει τις αλληλουχίες loxP και να αφαιρεί την περιοχή ανάμεσά τους. Από αυτή την διασταύρωση προκύπτουν άτομα με το αλληλόμορφο tm1b. Για την δημιουργία ενός ετερόζυγου ποντικού tm1b απαιτείται κατά μέσο όρο το χρονικό διάστημα των έξι μηνών (Εικ. 10). Αρχικά πραγματοποιείται διασταύρωση μεταξύ ενός ποντικού με γονότυπο tm1a/wt και ενός διαγονιδιακού αρσενικό, για το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης. Προκειμένου να απομακρυνθεί το γονίδιο της ρεκομπινάσης από το γονιδίωμα των ποντικών η επόμενη διασταύρωση που συμβαίνει είναι μεταξύ ενός ατόμου με γονότυπο tm1b/wt ετερόζυγου για το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης με ένα ποντίκι αγρίου τύπου (wt/wt) (Schwenk F, *et al*, 1995).



Εικόνα 10: Δημιουργία ποντικών με γονότυπο *tm1b/tm1b* (James L. Ιούνιος 2015).

4. 3. Δημιουργία ποντικών *tm1c*

Στην συνέχεια, τα ετερόζυγα *tm1a* (*tm1a/wt*) διασταυρώνονται με ένα διαγονιδιακό ποντίκι το οποίο παράγει την ρεκομπινάση Flp (*Rodriguez CI, et al 2000*) (Εικ. 12). Ένα τέταρτο των απογόνων που θα προκύπτουν θα έχουν γονότυπο *tm1c/wt* καθώς θα έχει δράσει η ρεκομπινάση αναγνωρίζοντας τις αλληλουχίες FRT. Μετέπειτα οι απόγονοι αυτοί διασταυρώνονται με ποντίκια αγρίου τύπου. Σκοπός είναι ο πολλαπλασιασμός και η αύξηση του πληθυσμού των ετερόζυγων ποντικών *tm1c*. Οι απόγονοι που προκύπτουν από αυτή τη διασταύρωση δεν θα έχουν στο γονιδίωμα τους την αλληλουχία που βρίσκεται ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες FRT συμπεριλαμβανομένων των κασετών *lacZ* και *neo*. Το αλληλόμορφο των απογόνων είναι το *tm1c* το οποίο είναι όμοιο με το αλληλόμορφο αγρίου τύπου με την διαφορά ότι αυτό περιέχει και τις αλληλουχίες *loxP* εκατέρωθεν ενός σημαντικού εξονίου. Στην περίπτωση του *Fra10ac1* αυτό είναι το εξόνιο 5 (Εικ. 6). Στην συνέχεια ακολουθούν διασταυρώσεις των ατόμων με γονότυπο *tm1c/wt* και αναμένεται ένα ποσοστό των απογόνων να είναι ομόζυγο για το αλληλόμορφο *tm1c* (*Brennan K. et al.2011*).



Εικόνα 11: Δημιουργία ποντικών με γονότυπο $tm1c/tm1c$ (James L. Ιούνιος 2015).

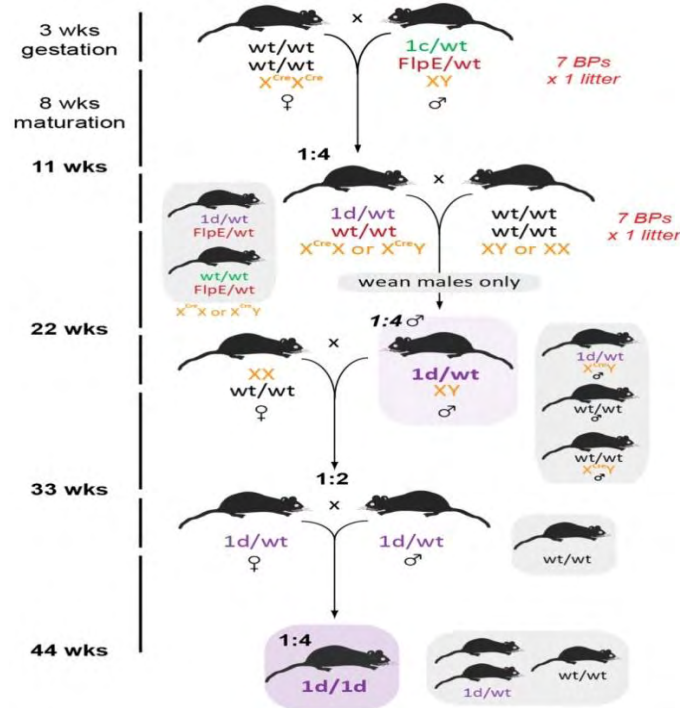
Προτού χαρακτηριστούν τα ποντίκια με την απαλοιφή του γονιδίου που μας ενδιαφέρει πρέπει να έχουν αφαιρεθεί τα γονίδια των ρεκομπινασών Cre και Flp, καθώς και οι κασέτες της νεομυκίνης και της β-γαλακτοσιδάσης. Τα ποντίκια $tm1c$ δεν περιέχουν το γονίδιο αναφοράς και το γονίδιο επιλογής καθώς η αλληλουχία τους είναι όμοια με την αλληλουχία των ποντικών αγρίου τύπου. Τα ποντίκια αυτά περιέχουν επίσης τις αλληλουχίες loxP και FRT που αναγνωρίζονται από τις ρεκομπινάσες Cre και Flp αντίστοιχα. Είναι γνωστό ότι η Cre ρεκομπινάση μπορεί να αναγνωρίσει κρυφές αλληλουχίες loxP μέσα στο γονιδίωμα των θηλαστικών οι οποίες δεν έχουν ακριβή γνωστή τοποθεσία (Pham CT. *et al*, 1996). Γι' αυτούς τους λόγους θεωρείται απαραίτητο τα ποντίκια να πολλαπλασιαστούν για αρκετές γενιές προκειμένου να απαλλαγθούν από τα εξωγενή γονίδια που περιέχει το γονιδίωμά τους.

4. 4. Δημιουργία ποντικών $tm1d$

Για να δημιουργηθεί μία αποικία ποντικών $tm1d$, τα οποία αποτελούν τα τελικά ποντίκια με πλήρη αποσιώπηση του γονιδίου *Fra10a1*, τα οποία θα είναι απαλλαγμένα από τα δύο γονίδια των ρεκομπινασών Cre και Flp ακολουθείται η διαδικασία που απεικονίζεται στην Εικόνα 13 (Skarnes WC, *et al* 2011). Η αρχική διασταύρωση συμβαίνει μεταξύ ενός ατόμου με γονότυπο $tm1c/wt$ με ένα διαγονιδιακό ποντίκι για το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης. Ένα ποσοστό των απογόνων θα έχει το αλληλόμορφο $tm1d$ καθώς θα έχει δράσει η ρεκομπινάση Cre και θα έχει αφαιρέσει το τμήμα μεταξύ των αλληλουχιών loxP. Οι απόγονοι αυτοί ωστόσο θα είναι φορείς για το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης. Σε επόμενο βήμα διασταυρώνονται οι απόγονοι με γονότυπο $tm1d/wt$ με ποντίκια αγρίου τύπου προκειμένου ένα ποσοστό των απογόνων να έχει κληρονομήσει το αλληλόμορφο $tm1d$ αλλά να μην περιέχει στο γονιδίωμά του το γονίδιο της ρεκομπινάσης. Στην

συνέχεια ακολουθούν διασταυρώσεις μεταξύ ποντικών με γονότυπο *tm1d/wt* προκειμένου να πολλαπλασιαστεί η συγκεκριμένη σειρά με το αλληλόμορφο *tm1d* και να προκύψουν άτομα ομόζυγα για το αλληλόμορφο αυτό.

Για την παραλαβή του πρώτου *tm1d* ετερόζυγου απαιτείται χρόνος τουλάχιστον 11 εβδομάδων (Εικ. 12). Προκειμένου να δημιουργηθεί ένα ομόζυγο ποντίκι *tm1d*, με πλήρη αποσιώπηση του επιθυμητού γονιδίου, κατά μέσω όρο απαιτείται χρονικό διάστημα ενός έτους.



Εικόνα 12: Απεικονίζεται ο χρόνος που απαιτείται προκειμένου να δημιουργηθεί το πρώτο ποντίκι με γονότυπο *tm1d/tm1d* (James L. et. al. 2015).

5. Σκοπός

Σκοπός αυτής της διπλωματικής μελέτης είναι η βελτιστοποίηση αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης προκειμένου αυτές να χρησιμοποιηθούν για την γονότυπηση δειγμάτων ποντικών με απαλοιφή του γονιδίου *Fra10ac1*. Τελικός στόχος είναι η δημιουργία ποντικών με γονότυπο *tm1d* ετερόζυγα ποντίκια και αν είναι βιώσιμα, ομόζυγα με πλήρη αποσιώπηση του γονιδίου. Το ορθόλογο γονίδιο στον άνθρωπο είναι το *FRA10AC1* και η απώλεια του έχει συσχετιστεί με νοητική υστέρηση. Τα ποντίκια *tm1d* θα αποτελέσουν το ζωικό μοντέλο για την μελέτη συσχέτισης γονότυπου-φαινοτύπου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται με αλφαβητική σειρά στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Υλικά-διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, εταιρεία, κωδικός προϊόντος καθώς και αρχικές συγκεντρώσεις.

Υλικά	Εταιρεία/κωδικός/αρχική συγκέντρωση
Αγαρόζη	(UltraPure™ Agarose, Catalog number: 16500500)
dH ₂ O	
dNTPs (νουκλεοτίδια)	50X (ανάμιξη ίσων όγκων από τα στοκ δείγματα 100 mM dATP, dTTP, dCTP και dGTP.)
Εκκινητές	Eurofins Genomics 50pmol/μl
MgCl ₂	KAPABIOSYSTEMS KB1001 25 mM
Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης LB για αγαρόζη	(γλυκερόλη 50%, 1 mM EDTA pH 8.0, μπλε της βρωμοφαινόλης 0,25%)
TAE ρυθμιστικό διάλυμα	1X (TAE 50x: 200mM Tris, 200 mM οξικό οξύ, 1 mM EDTA pH 8.0)
Taq ρυθμιστικό διάλυμα	KAPABIOSYSTEMS (10X) με 1,5 mM Mg σε 1X
Taq πολυμεράση	KAPA BIOSYSTEMS KE1000 5units/μl
Φαινόλη	Panreac 90% aqueous solution PRS 141323.1611
Χλωροφόρμιο	AnalaR NORMAPUD 0.6% ethanol 15C130503
Xpert Green DNA Strain	20000X (grisp, GS01.0001)

Δείγματα

Όλες οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Δρ. Α. Κλινάκη στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑ). Όλα τα δείγματα της γονοτύπησης που ήταν τμάχια ουράς των ζώων (50-100mg) αποστάλθηκαν σε διάλυμα πρωτεϊνάσης (~150μl)

2. Μέθοδοι

Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Η μέθοδος βασίζεται στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών από την πρωτεΐνάση. Ακολουθεί εκχύλιση των δειγμάτων με φαινόλη και χλωροφόρμιο, προκειμένου να απομακρυνθούν λιπίδια και πρωτεϊνικά μόρια. Το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη απόλυτης αιθανόλης η οποία παρουσία του NaCl μειώνει τη διαλυτότητά του. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται στον απαγωγό και τα βήματά της είναι τα ακόλουθα:

- I. Από τα 100-150μl των δειγμάτων, τα 40μl τοποθετούνται σε νέα erpendorf. Στην συνέχεια προσθέτονται 160μl dH₂O ώστε ο τελικός όγκος των δειγμάτων να γίνει 200μl.
 - II. Προσθήκη 100μl φαινόλη και 100μl χλωροφόρμιο.
 - III. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
 - IV. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης στα δείγματα έχουν σχηματιστεί τρεις διακριτές φάσεις. Η πάνω φάση (πολική) παραλαμβάνεται και τοποθετείται σε νέα erpendorfs καθώς περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα.
 - V. Γίνεται επανεκχύλιση προσθέτοντας στα αρχικά erpendorfs 100-150μl dH₂O, ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
 - VI. Επαναλαμβάνεται η συλλογή μόνο του υπερκειμένου και τοποθέτησή του στα καινούρια erpendorfs.
 - VII. Ακολουθεί η προσθήκη χλωροφορμίου για να απομακρυνθεί η φαινόλη σε αναλογία 1:1 (χλωροφόρμιο: δείγμα).
 - VIII. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
 - IX. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης παραλαμβάνεται το υπερκείμενο.
- Σε αυτό το στάδιο γίνεται εξισορρόπηση των όγκων δειγμάτων με dH₂O σε περίπτωση που οι όγκοι τους διαφέρουν.*
- X. Ακολουθεί προσθήκη απόλυτης αιθανόλης σε αναλογία 2,5:1, ανάδευση και προσθήκη 3M οξικού νατρίου pH 5,2 σε αναλογία 1:10.
 - XI. Τοποθέτηση των δειγμάτων στους -80°C για 30 min, για να κατακρημνιστούν τα νουκλεϊκά οξέα.
 - XII. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 20 min.
 - XIII. Απομάκρυνση σχεδόν όλου του υγρού τμήματος των δειγμάτων.
 - XIV. Προσθήκη 300μl αιθανόλης (70%), ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 20 min.
 - XV. Απομάκρυνση όλου του υγρού τμήματος των δειγμάτων. Επώαση των δειγμάτων στους 55°C ή 37°C έως ότου στεγνώσουν.
 - XVI. Ενυδάτωση με προσθήκη 50μl dH₂O και διατήρηση στους 4°C ολονύχτια.
 - XVII. Ανάδευση των δειγμάτων προκειμένου να διαλυτοποιηθεί το DNA.
 - XVIII. Αποθήκευση στους -20°C.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction PCR)

Η μέθοδος της PCR έφερε επανάσταση στην μοριακή γενετική μετά την επινοήσή της στα μέσα της δεκαετίας του 1980 από τον Kary Mullis στον οποίο το 1993 απονεμήθηκε το Nobel Χημείας (Mullis K 1993). Μέσω αυτής επιτρέπεται η παραγωγή εκατομμυρίων αντιγράφων μίας αλληλουχίας DNA, *in vitro*. Βασίζεται στον πολλαπλασιασμό του DNA ενισχύοντας επιθυμητές αλληλουχίες ενός αρχικού δείγματος. Το DNA μπορεί να είναι οποιασδήποτε προέλευσης (Mullis KB, 1990). Ο πολλαπλασιασμός του επιθυμητού τμήματος επιτυγχάνεται μέσω πολλαπλών κύκλων αντιγραφής. Αφού προηγηθεί η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, ένα ζεύγος εκκινητών (ολιγονουκλεοτίδια), υβριδίζονται στη μονόκλωνη πλέον αλυσίδα του DNA συμπληρωματικά. Το μήκος των εκκινητών είναι 18-24 νουκλεοτίδια και η αλληλουχία τους θα πρέπει να εμφανίζει συμπληρωματικότητα μόνο ως προς την αλληλουχία στόχο. (Chien A. 1976)

Τα στάδια της PCR

- *Αποδιάταξη εκμαγείου*

Πρώτο βήμα αποτελεί η αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας DNA, η οποία περιέχει και την αλληλουχία στόχο που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Αυτή επιτυγχάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας, συνήθως στους 94-95 °C.

- *Υβριδοποίηση των εκκινητών*

Έπειτα ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας μεταξύ 50-65°C προκειμένου να συνδεθούν οι δύο εκκινητές (εμπρόσθιος και ανάστροφος) συμπληρωματικά στο αποδιατεταγμένο μονόκλωνο DNA. Ο ακριβής προσδιορισμός της θερμοκρασίας υβριδοποίησης εξαρτάται από το μήκος των εκκινητών και την περιεκτικότητά τους σε G-C. Ο κάθε εκκινητής συνδέεται στην μία από τις δύο αλυσίδες της μήτρας DNA, με μεγάλη εξειδίκευση. Η πρόσδεσή τους γίνεται με προσανατολισμό 5'-3', έτσι ώστε η επιμήκυνση να συνεχιστεί από το 3' ελεύθερο άκρο.

- *Επιμήκυνση αλυσίδας*

Η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 70-75°C. Σκοπός είναι η επιμήκυνση των εκκινητών από μία θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση. Χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση η οποία φυσιολογικά υπάρχει στον θεμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*) (Carballeira N, 1990).

Η διαδικασία της αποδιάταξης επαναλαμβάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας στους 94-95°C, ομοίως με το πρώτο στάδιο. Ακολουθεί η πρόσδεση των εκκινητών σε όλους τους αποδιατεταγμένους κλώνους (μητρικοί και αυτοί που προέκυψαν από τον πρώτο κύκλο της PCR).

Στην συνέχεια ακολουθεί η επιμήκυνση των εκκινητών από την Ταq πολυμεράση. Σε αυτό το στάδιο οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες οριοθετούνται από τους δύο εκκινητές και έχουν το επιθυμητό μέγεθος.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με την ίδια σειρά, αποδιάταξης της διπλής έλικας DNA, υβριδοποίησης των εκκινητών και επιμήκυνση αυτών, σε επαναλαμβανόμενους κύκλους (Πίν. 3). Από τον τρίτο κιάλας κύκλο έχουν ήδη παραχθεί δίκλιωνα μόρια DNA με το επιθυμητό μέγεθος, τα οποία περιβάλλονται από τις αλληλουχίες των εκκινητών. Σε κάθε νέο κύκλο χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο και τα προϊόντα των προηγούμενων κύκλων. Έτσι, η ποσότητα των δίκλωνων επιθυμητών προϊόντων παρουσιάζει εκθετική αύξηση. Πιο συγκεκριμένα μετά την ολοκλήρωση του πρώτου κύκλου από ένα μόριο έχουν παραχθεί δύο, μετά την ολοκλήρωση του δεύτερου κύκλου, τέσσερα, μετά την ολοκλήρωση του τρίτου κύκλου, οκτώ και ούτω καθεξής. Ο υπολογισμός των τελικών αλληλουχιών ανά κύκλο προκύπτει από το 2^n , όπου n οι κύκλοι της PCR. Κατά μέσο όρο ο συνολικός αριθμός των κύκλων σε μία αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι τριάντα πέντε.

Η συσκευή στην οποία διεξάγεται η όλη διαδικασία ονομάζεται *θερμοκυκλοποιητής* (Εικ. 13). Δέχεται τις απαραίτητες ρυθμίσεις προκειμένου να εναλλάσσει τις επιθυμητές θερμοκρασίες σε συγκεκριμένους χρόνους. Αν υποθέσουμε ότι ο κάθε κύκλος διαρκεί από 1-3min η συσκευή χρειάζεται 35-105min για να ολοκληρώσει μία PCR 35 κύκλων.



Εικόνα 13: Θερμοκυκλοποιητής SimpliAmp της, Appliedbiosystems που χρησιμοποιήθηκε στις PCR.

Πίνακας 3: Τα στάδια μίας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

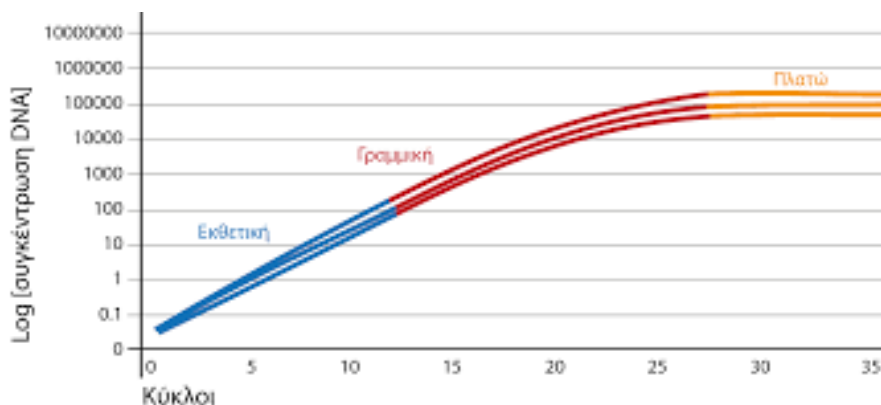
Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94-95°C	5min	1
Αποδιάταξη	95°C	40min	35
Υβριδισμός	T _{primers}	40min	
Επιμήκυνση	72°C	1kb/sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5min	
Διατήρηση	4°C	-	-

Πίνακας 4: Υλικά που προσθέτονται σε μία PCR.

Υλικά
• dH ₂ O
• DNA
• Taq πολυμεράση
• Taq ρυθμιστικό διάλυμα
• DNTPs
• εκκινητές (εμπρόσθιος και ανάστροφος)
• MgCl ₂

Μία PCR μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις.

- 1) Εκθετική φάση, κατά την οποία σε κάθε κύκλο τα προϊόντα διπλασιάζονται (εφόσον η απόδοση του συστήματος είναι 100%).
- 2) Γραμμική φάση, όπου τα συστατικά της αντίδρασης έχουν αρχίσει να εξαντλούνται και η απόδοση του συστήματος να μεταβάλλεται. Συμβαίνει καθώς μειώνεται η ταχύτητα με την οποία παράγονται τα προϊόντα.
- 3) Φάση κορεσμού-Plateau, κατά την οποία παύουν να παράγονται νέα προϊόντα.



Εικόνα 14: Φάσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. (Δ. Παλαιολόγου, Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

Για την υλοποίηση μίας PCR χρειάζονται όπως προαναφέρθηκε τα υλικά τα οποία θα προστεθούν στις σωστές συγκεντρώσεις και αντίστοιχα σωστούς όγκους. Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 25μl. Ο όγκος του DNA ανά αντίδραση καθορίζει και τον όγκο του dH₂O. Η ποσότητα του γονιδιωματικού DNA ανά αντίδραση ήταν 100ng-200ng. Οι όγκοι των συστατικών φαίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις και ποσότητες υλικών μίας PCR.

Υλικά	Όγκοι (συγκεντρώσεις)
DNA	3μl (100ng-200ng)
dH ₂ O	17,7μl
DNA Taq πολυμεράση	0,3μl(5U/μL)
Taq ρυθμιστικό διάλυμα	2,5μl (10x)
dNTPs	0,5μl (10mM)
εκκινητές (εμπρόσθιος και ανάστροφος)	0,5μl έκαστος (50pmol/μl)

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR φαίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Ονόματα και αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR.

Εκκινητής	Αλληλουχία 5' - 3'
F1	5'- GTG TTT TAT TTT TGA AAC CTT AAT GTTC - 3'
R5	5'- GTG TAG TTG TCG TAC ATG ATT TACA - 3'
Fneo	5'- CCG CTA TCA GGA CAT AGC GTT - 3'
Rintron_4	5'- CAG ACT AGA AAG CTC CCT CTTT - 3'
FlacZ_loxP	5'- AAT AAT AAC CGG GCA GGG GG - 3'
Rintron_5_4	5'- GGA CAC CAG ACA CTT GAC ATA - 3'
CreF2	5'-AAA ATT TGC CTG CAT TAC CG - 3'
CreR2	5'- ATG TTT AGC TGG CCC AAA TG - 3'
Rintron_5_3	5'- TTCC TTCC TAAG GGCT ACCT - 3'
LAR3	5'- GGA CTA AC AGA AGA ACC CGT TGTG - 3'

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης δίνει την δυνατότητα διαχωρισμού και χαρακτηρισμού τους βάσει μεγέθους. Η κατεύθυνση με την οποία τα μόρια κινούνται μέσα στο πήκτωμα εξαρτάται από το φορτίο και η ταχύτητά τους από το μέγεθος. Η μέθοδος βασίζεται στο αρνητικό φορτίο του DNA λόγω των φωσφορικών του ομάδων. Υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου το DNA θα μετακινηθεί προς τον θετικά φορτισμένο πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Τα δίκλινα μόρια DNA μετακινούνται σε ένα πήκτωμα διανύοντας μία απόσταση η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού τους βάρους. Η συγκέντρωση της αγαρόζης, η στερεοδιαμόρφωση του DNA καθώς και η τάση που εφαρμόζεται είναι παράγοντες που επηρεάζουν την απόσταση που διανύουν τα δίκλινα τμήματα DNA.

Προκειμένου να γίνει ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των τμημάτων DNA που προέκυψαν από την PCR, μέσω ενίσχυσης από συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Robert Koch, το 1882. Είναι ένας πολυσακχαρίτης που απομονώθηκε από φύκη και χρησιμοποιήθηκε από τον Koch ως καλλιεργητικό μέσο για τα βακτήρια της φυματίωσης.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης χωρίζεται στα ακόλουθα τρία στάδια:

- 1) Παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης.
- 2) Τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής του πηκτώματος (πηγαδάκια) και εφαρμογή της κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης.
- 3) Παρατήρηση των ζωνών του DNA υπό την επίδραση υπερϊώδους ακτινοβολίας.

Ανάλογα το μέγεθος των διαχωρισθέντων τμημάτων η συγκέντρωση αγαρόζης διαφέρει. Στην παρούσα μελέτη κατασκευάστηκαν πηκτώματα 2% περιεκτικότητας σε αγαρόζη για προϊόντα PCR και 1% για γονιδιωματικό DNA.

Πίνακας 7: Υλικά και συγκεντρώσεις για την κατασκευή του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης.

Υλικά και ποσότητες αυτών:
• 50ml 1X TAE
• 1 ή 2gr αγαρόζης
• 4μl Xpert green χρωστική

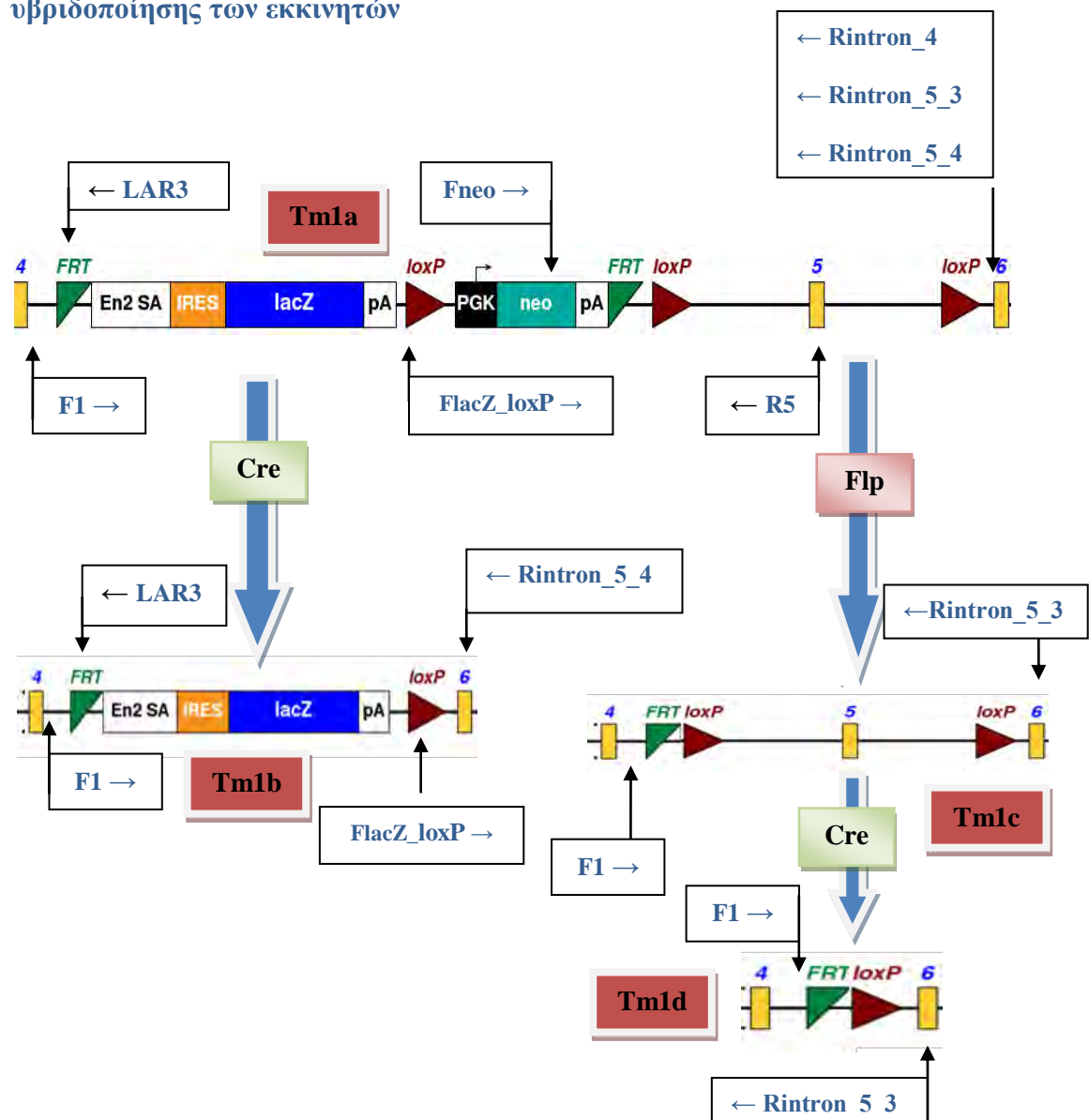
Η διαδικασία έχει ως εξής. Προσθέτονται τα 50ml TAE με την αγαρόζη σε μία κωνική φιάλη των 500ml η οποία τοποθετείται στον φούρνο μικροκυμάτων προκειμένου να λιώσει η αγαρόζη στο ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολουθεί ελαφριά ψύξη του διαλύματος με τρεχούμενο νερό στα εξωτερικά τοιχώματα της φιάλης και προσθήκη 4μl Xpert green χρωστικής στον απαγωγό με ταυτόχρονη ελαφριά ανάδευση. Τέλος το διάλυμα περιχύνεται στο ειδικό καλούπι στο οποίο έχουν τοποθετηθεί τα χτενάκια. Η σταθεροποίηση του πηκτώματος χρειάζεται 20-30 min. Μετά την πήξη του μεταφέρεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE τόσο ώστε να καλύπτει πλήρως το πήκτωμα.

Η τοποθέτηση των προϊόντων PCR στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης γίνεται ταυτόχρονα με την χρωστική LB. Συγκεκριμένα 12μl προϊόντος PCR μαζί με 4μl LB τοποθετείται σε κάθε πηγαδάκι του πηκτώματος. Εκτός από τα τμήματα που πρόκειται να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση τοποθετείται στο πήκτωμα και ένας δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών (ladder). Ανάλογα με την σχετική μετακίνηση των τμημάτων αυτών στο πήκτωμα μπορεί να γίνει προσδιορισμός του μεγέθους των υπό μελέτη τμημάτων DNA. Η ποσότητα του ladder που χρησιμοποιήθηκε είναι 1μl μαζί με 3μl LB agarose. Η τάση του ηλεκτρικού πεδίου ορίζεται στα 100-150 Vt και η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι 20-30min. Μετά το πέρας της ακολουθεί παρατήρηση των ζωνών DNA σε συσκευή UV.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκαν βελτιστοποιήσεις PCR ώστε να χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια σε άγνωστα δείγματα. Μέσω αυτών των διαδικασιών προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες των αντιδράσεων και τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή τους για τον προσδιορισμό άγνωστων γονοτύπων. Όλες οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Δπ. Α. Κλινάκη στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

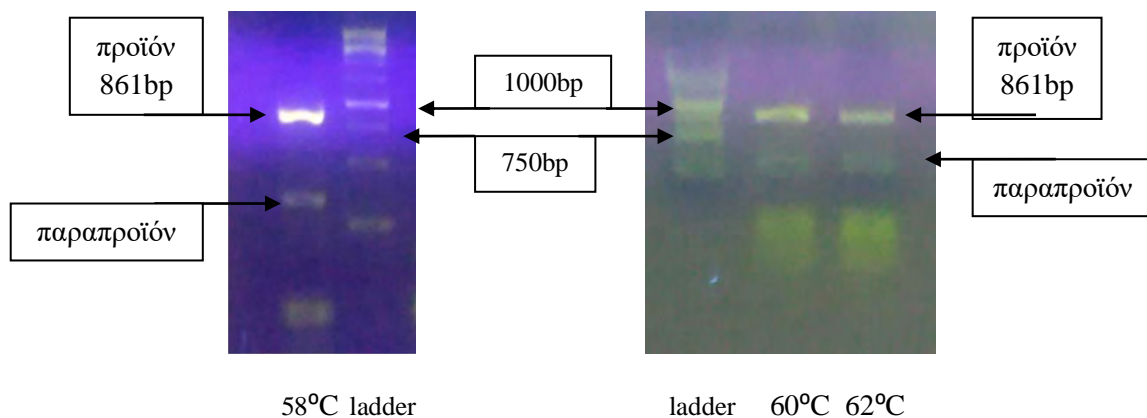
1. Απεικόνιση των αλληλομόρφων *tm1a*, *tm1b*, *tm1c* και *tm1d* και οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών



Εικόνα 15: Περιοχές υβριδοποίησης εκκινητών στα αλληλόμορφα *tm1a*, *tm1b*, *tm1c* και *tm1d*, του τροποποιημένου γονιδίου *Fra10a1*. Φαίνονται τα ονόματα και ο προσανατολισμός των εκκινητών.

2. Βελτιστοποίηση PCR με το ζεύγος εκκινητών Fneo-Rintron_4 για την ανίχνευση του αλληλομόρφου tm1a

Το ζεύγος εκκινητών Fneo-Rintron_4 είναι ειδικό για το αλληλόμορφο tm1a. Από προηγούμενες μελέτες η ανίχνευση αυτού του αλληλομόρφου ήταν δυνατή με το ζεύγος εκκινητών F1-LAR3. Ωστόσο αυτό δεν ήταν ειδικό για το αλληλόμορφο tm1a καθώς ενισχυόταν προϊόν και για το αλληλόμορφο tm1b με μέγεθος ίδιο με αυτό του αλληλομόρφου tm1a. Για την βελτιστοποίηση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα DNA (#6) με γνωστό γονότυπο wt/tm1a. Ο όγκος που προστέθηκε ανά αντίδραση ήταν 3μl (≈150ng), ποσότητα που είχε προσδιοριστεί σε προηγούμενη μελέτη. Ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδοποίησης εκκινητών με PCR διαβάθμισης θερμοκρασίας οι οποίες ήταν 58°C, 60°C και 62°C. Το μέγεθος του προϊόντος σύμφωνα με τις θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών (Εικ. 15) ήταν 861bp γι' αυτό και ο χρόνος του πολυμερισμού ρυθμίστηκε στο 1min. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 16, και στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ενισχύθηκε προϊόν, σωστού μεγέθους. Εκτός από το κύριο προϊόν παρατηρείται και η ενίσχυση ενός παραπροϊόντος το οποίο όμως δεν επηρεάζει τα συμπεράσματα του πειράματος.

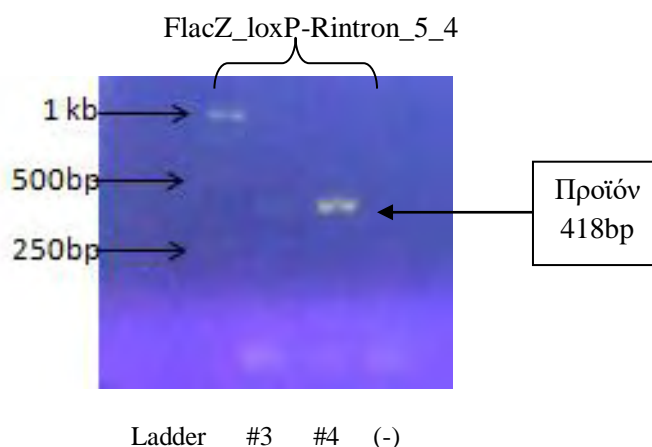


Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης προϊόντων PCR με τους εκκινητές Fneo-Rintron_4 σε δείγμα με γονότυπο wt/tm1a και θερμοκρασίες υβριδοποίησης εκκινητών 58°C, 60°C και 62°C.

3. Βελτιστοποίηση PCR με το ζεύγος εκκινητών FlacZ_LoxP-Rintron_5_4 για την ανίχνευση του αλληλομόρφου tm1b

Για την ανίχνευση του αλληλομόρφου tm1b χρησιμοποιήθηκε το ειδικό ζεύγος εκκινητών FlacZ_LoxP-Rintron_5_4, το οποίο παράγει προϊόν μεγέθους 418bp, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 15. Για την PCR που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα DNA με γνωστούς γονότυπους tm1a/tm1b (#3) και tm1b/tm1b (#4) προκειμένου να επαληθευτεί η εξειδίκευση των εκκινητών για το αλληλόμορφο tm1b. Ο όγκος DNA που χρησιμοποιήθηκε από το κάθε δείγμα ήταν 2μl (~150ng) και είχε προσδιοριστεί από προηγούμενες μελέτες. Η θερμοκρασία

υβριδοποίησης των εκκινητών ρυθμίστηκε στους 64°C και ο χρόνος πολυμερισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στα 40sec. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 17 η αντίδραση είναι επιτυχής καθώς πραγματοποιείται ενίσχυση προϊόντος, σωστού μεγέθους. Η απόδοση στο δείγμα #3 δεν ήταν ικανοποιητική, εφόσον όμως είναι στο δείγμα #4 πιθανός οφείλεται σε μικρότερη ποσότητα DNA στο δείγμα #3.



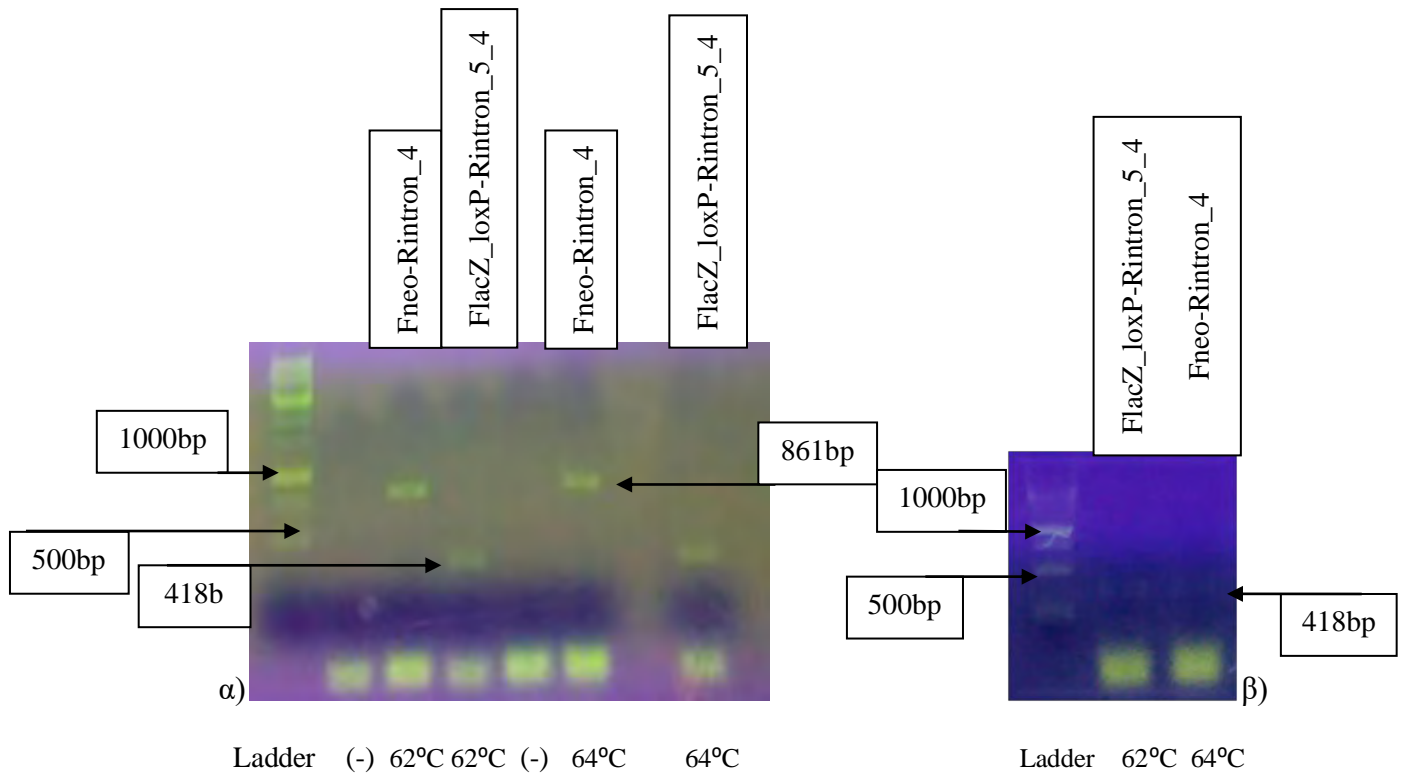
Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης προϊόντων PCR με τους εκκινητές FlacZ_loxP/Rintrron_5_4 σε δείγματα με γονότυπο *tmla/tmlb* (#3) και *tmlb/tmlb* (#4) και θερμοκρασίες υβριδοποίησης εκκινητών 58°C, 60°C και 62°C.

4. Δοκιμαστική PCR με πολλαπλούς εκκινητές

Για μελλοντική εξακρίβωση του ετερόζυγου γονότυπου *tmla/tmlb* είναι προτιμότερη η ταυτόχρονη ταυτοποίηση των δυο επιμέρους αλληλομόρφων, μέσω προσθήκης των δύο ζευγών εκκινητών *Fneo-Rintrron_4* και *FlacZ_loxP-Rintrron_5_4* σε μία αντίδραση. Η αντίδραση με τους πολλαπλούς εκκινητές έχει το πλεονέκτημα ότι περιέχει εσωτερικό έλεγχο για τα προϊόντα της. Μέσω αυτής παρέχεται η δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης και των δύο αλληλομόρφων με αποτέλεσμα η ανίχνευση του ενός μόνο να αποδεικνύει την απουσία του άλλου, καθώς η ενίσχυση προϊόντος δεν πραγματοποιείται λόγω απουσίας του αλληλομόρφου. Έτσι, δοκιμάστηκε PCR και με τους τέσσερις παραπάνω εκκινητές, με το δείγμα #3 να αποτελεί το δείγμα θετικού ελέγχου, που ήταν γνωστό ότι είχε γονότυπο *tmla/tmlb*. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε αντίδραση με το κάθε ζεύγος εκκινητών μεμονωμένα. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 18, συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις, με το ζεύγος εκκινητών *Fneo-Rintrron_4*, το ζεύγος εκκινητών *FlacZ_loxP-Rintrron_5_4* και τα δύο ζεύγη εκκινητών ταυτόχρονα. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 2μl DNA, όγκος που είχε προσδιοριστεί από παλαιότερες μελέτες. Στην PCR με το ζεύγος εκκινητών *Fneo-Rintrron_4* καθώς και στην αντίδραση με τα δύο ζεύγη εκκινητών το στάδιο του πολυμερισμού ρυθμίστηκε στο 1min καθώς το μέγεθος του προϊόντος που αναμενόταν να ενισχυθεί ήταν 861bp.

Με βάση τα αποτελέσματα των PCR παρατηρούμε ότι (Εικ. 18α) στις αντιδράσεις που τα ζεύγη των εκκινητών έχουν προστεθεί μεμονωμένα παράγεται ένα προϊόν σωστού μεγέθους, στην κάθε αντίδραση. Η ενίσχυση των προϊόντων αυτών

πραγματοποιείται τόσο σε θερμοκρασία υβριδοποίησης 62°C όσο και 64°C. Στην PCR με τα πολλαπλά ζεύγη των εκκινητών η ενίσχυση προϊόντος συμβαίνει μόνο με το ζεύγος εκκινητών FlacZ_loxP-Rintron_5_4. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι τα μικρά προϊόντα γενικώς ευνοούνται, άρα δεν μπορεί να επιτευχθεί αποτελεσματική ενίσχυση μεγαλύτερων προϊόντων παρουσία μικρότερων. Μία πιθανή πρόταση για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος θα ήταν η χρήση εναλλακτικών εκκινητών γι' αυτά τα αλληλόμορφα, έτσι ώστε να παράγονται παρόμοιου σχετικού μεγέθους προϊόντα στην ίδια αντίδραση.

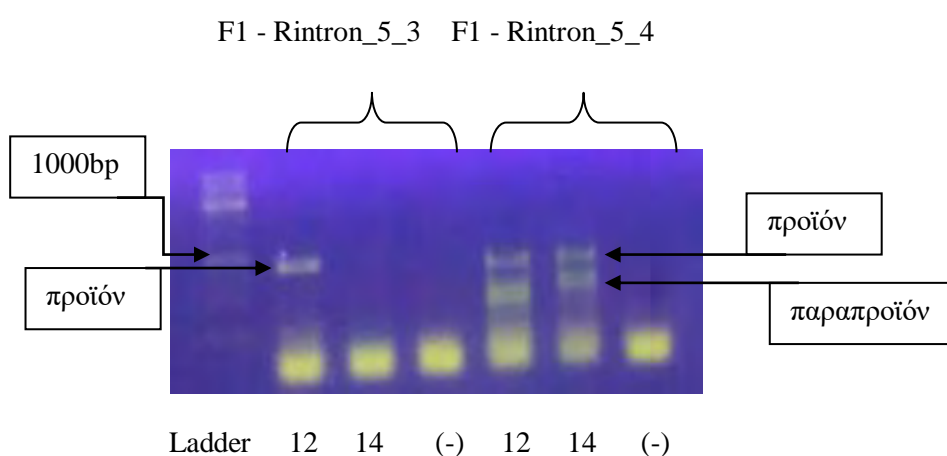


Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης των προϊόντων PCR με τα ζεύγη εκκινητών Fneo-Rintron_4 και FlacZ_loxP-Rintron_5_4 μεμονωμένα και μαζί σε θερμοκρασίες υβριδοποίησης 62°C και 64°C.

5. Βελτιστοποίηση PCR για την εύρεση ειδικών εκκινητών για το αλληλόμορφο tm1d

Με βάση την Εικόνα 15 και την αλληλουχία του τροποποιημένου γονιδίου *Fra10ac1*, επιλέχθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών για την ανίχνευση του αλληλομόρφου tm1d. Τα δύο εναλλακτικά ζεύγη εκκινητών ήταν τα F1-Rintron_5_3 και F1-Rintron_5_4 τα οποία ενισχύουν και παράγουν προϊόντα διαφορετικού μεγέθους σε αλληλόμορφα αγρίου τύπου, tm1c και tm1d. Ειδικότερα με το ζεύγος εκκινητών F1-Rintron_5_3 η ενίσχυση τμήματος του αλληλομόρφου αγρίου τύπου παράγει προϊόν μεγέθους 928bp, του αλληλομόρφου tm1c 1086bp και του tm1d 293bp. Τα προϊόντα που παράγονται από το ζεύγος εκκινητών F1-Rintron_5_4 είναι κατά 55bp μικρότερα και

στα τρία διαφορετικά αλληλόμορφα. Η PCR πραγματοποιήθηκε με δείγμα DNA από ποντίκια αγρίου τύπου, καθώς δείγματα DNA ποντικών *tm1d* δεν ήταν ακόμη διαθέσιμα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα (#12 και #14 με 10μl DNA αραιωμένο 1:10) προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες των αντιδράσεων, για μία μελλοντική αποτελεσματική ανίχνευση του αλληλόμορφου *tm1d*. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών ρυθμίστηκε στους 58°C καθώς ο εμπρόσθιος εκκινητής παρουσιάζει αυτήν την θερμοκρασία ως βέλτιστη. Έτσι δοκιμάστηκαν και τα δύο υποψήφια ζεύγη σε αυτήν την θερμοκρασία. Με βάση την Εικόνα 19 οι εκκινητές F1-Rintron_5_3 φαίνονται καταλληλότεροι καθώς παράγουν προϊόν σωστού μεγέθους χωρίς την παραγωγή παραπροϊόντων.

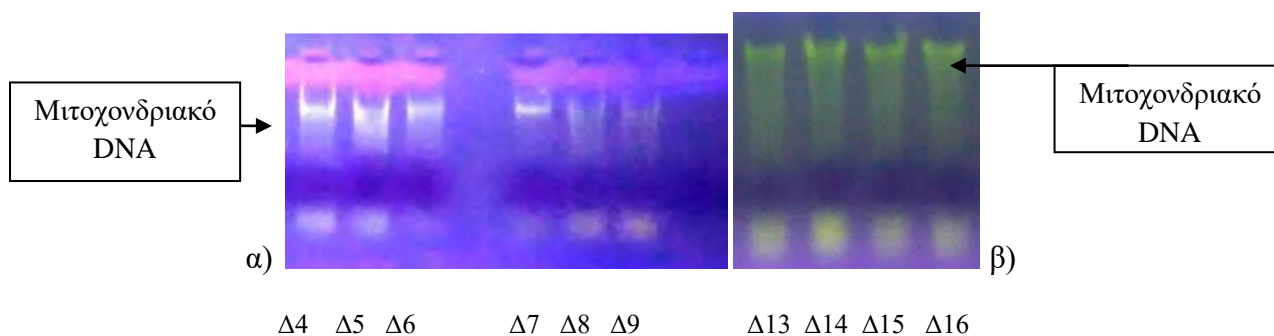


Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με DNA ποντικών αγρίου τύπου και τα ζεύγη εκκινητών F1 - Rintron_5_3 και F1 - Rintron_5_4 .

6. Γονοτύπηση δειγμάτων υποψήφιων για *tm1d* Δ4-Δ9 και Δ13-Δ16

Τα δείγματα Δ4-Δ9 και Δ13-Δ16 είναι απόγονοι διασταύρωσης ενός θηλυκού *tm1c/wt* και ενός αρσενικού διαγονιδιακού ποντικού *wt/wt* για το γονίδιο της *Cre* ρεκομπινάσης. Σκοπός αυτής της διασταύρωσης ήταν η δημιουργία ποντικών *tm1d*. Ωστόσο τα άτομα αυτά είναι πιθανόν να είναι χμιαρικά για τα αλληλόμορφα *tm1c* και *tm1d* καθώς η ρεκομπινάση μπορεί να μην έχει δράσει σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού. Σε αυτήν την περίπτωση, ένα ποσοστό των κυττάρων θα έχουν μετατραπεί σε *tm1d*, μετά την δράση του ενζύμου και ένα μέρος αυτών θα έχουν το αλληλόμορφο *tm1c* καθώς η ρεκομπινάση δεν θα έχει δράσει. Για να προκύψει αμιγής σειρά *tm1d* θα πρέπει ένας απόγονος πρώτης γενιάς να έχει σε ένα ποσοστό των γαμετικών του κυττάρων το αλληλόμορφο *tm1d*. Αν αυτά τα γαμετικά κύτταρα γονιμοποιηθούν θα προκύψει απόγονος δεύτερης γενιάς αμιγής για το αλληλόμορφο *tm1d*.

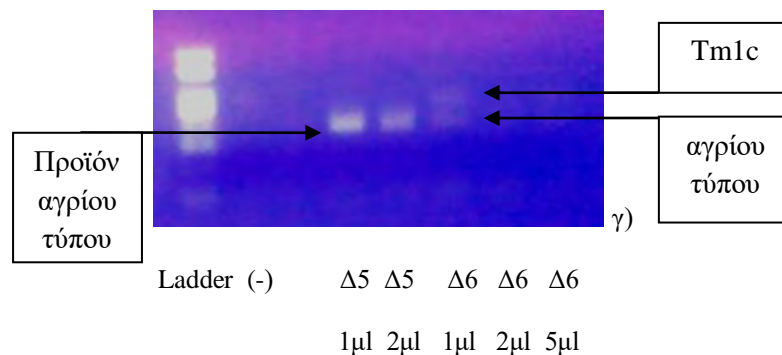
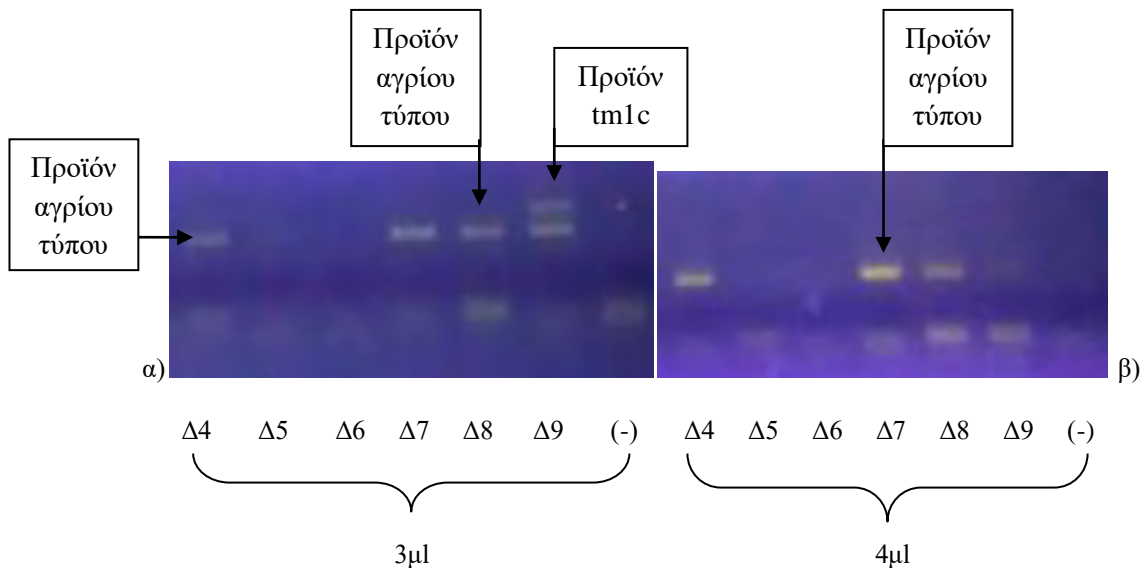
Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA των δειγμάτων και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Ο όγκος DNA που φορτώθηκε ήταν 2μl ανά δείγμα και αποτελούσε το 4% του συνολικού DNA που απομονώθηκε (Εικ. 20). Τα δείγματα Δ4, Δ5 και Δ6 φαίνεται να έχουν παρόμοιες ποσότητες DNA, το δείγμα Δ7 μικρότερη ποσότητα και τα δείγματα Δ8 και Δ9 ακόμη μικρότερη. Τα δείγματα αραιώθηκαν σε αραιώση 1:5 προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στις PCR. Τα δείγματα Δ13-Δ16 φαίνεται επίσης να έχουν παρόμοιες και μεγάλες συγκεντρώσεις. Έτσι αραιώθηκαν και τα δείγματα Δ13-Δ16 σε αραιώση 1:10 για να χρησιμοποιηθούν στις PCR.

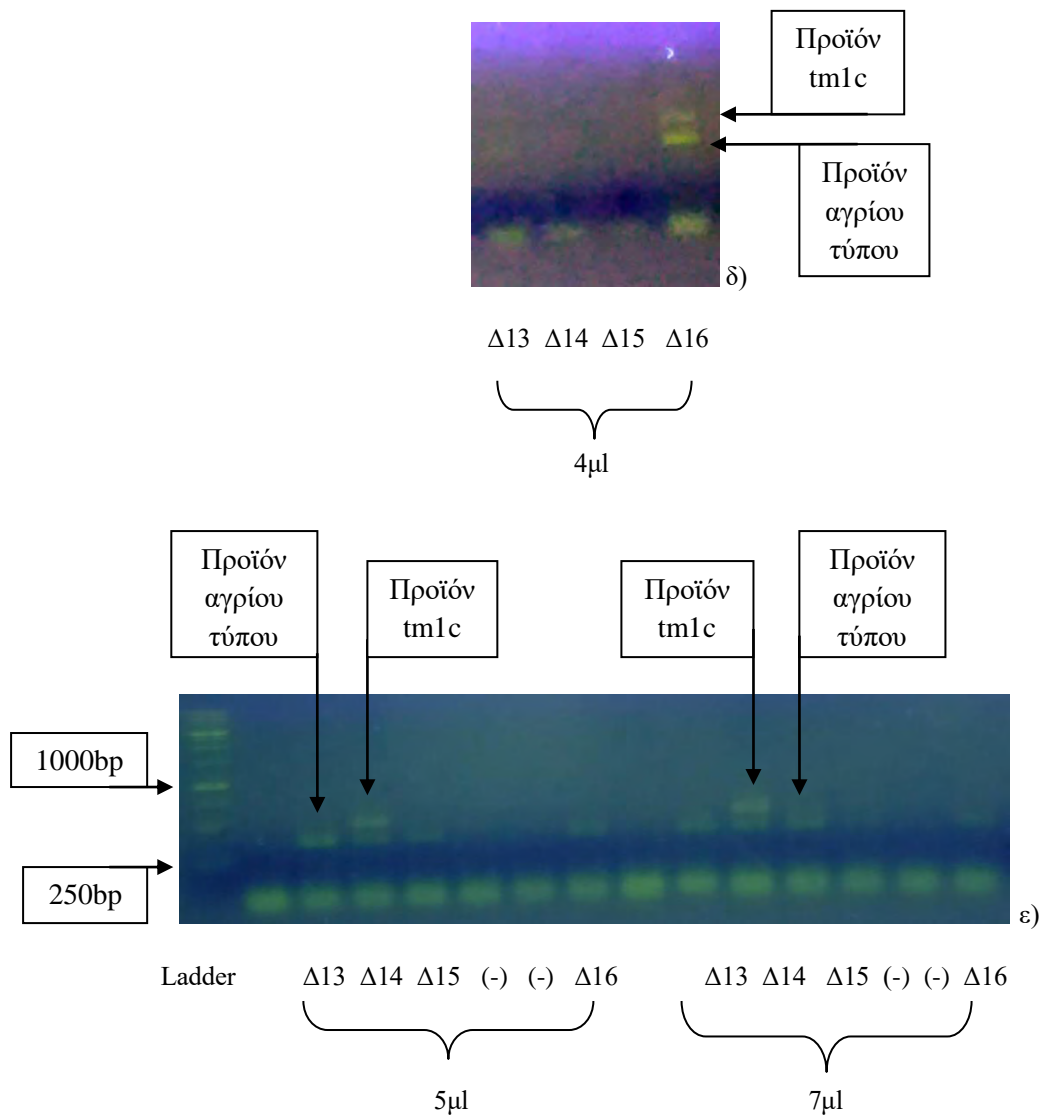


Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση αгарόζης 1% γονιδιωματικού DNA των δειγμάτων α) Δ4-Δ9 και β) Δ13-Δ17.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί γονοτύπηση των δειγμάτων Δ4-Δ9 και Δ13-Δ17 ακολούθησε PCR με το ζεύγος εκκινητών F1-R5. Με βάση την διασταύρωση που προέκυψαν, όλα τα δείγματα θα έχουν το αλληλόμορφο αγρίου τύπου από το διαγονιδιακό ποντίκι που παράγει την Cre ρεκομπινάση. Το ζεύγος αυτό αναγνωρίζει τα αλληλόμορφα αγρίου τύπου και tm1c. Σύμφωνα με την αλληλουχία των αλληλομόρφων το προϊόν που θα ενισχυθεί στο αλληλόμορφο tm1c θα έχει μέγεθος 495bp και για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου 361bp. Η PCR με το ζεύγος εκκινητών F1-R5 προσδιορίζει και την ποσότητα DNA που προστίθεται ανά αντίδραση. Η πληροφορία αυτή αξιοποιείται στις PCR για την ανίχνευση του αλληλομόρφου tm1d. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών ήταν 58°C, πληροφορία που ήταν γνωστή από προηγούμενες μελέτες. Για τα δείγματα Δ4-Δ9 οι αρχικοί όγκοι DNA που προστέθηκαν ανά αντίδραση ήταν 3μl (Εικ. 21α) και 4μl (Εικ. 21β) και με αυτές τις ποσότητες παρήχθησαν προϊόντα στα δείγματα Δ4, Δ7-Δ9. Συγκεκριμένα τα δείγματα Δ4, Δ7 και Δ8 παρήγαγαν προϊόντα και με τους δύο όγκους DNA που αντιστοιχούν στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου, ωστόσο η ένταση των ζωνών τους ήταν μεγαλύτερη με την προσθήκη των 4μl. Το δείγμα Δ9 παρήγαγε δύο προϊόντα μόνο στην αντίδραση με την προσθήκη των 3μl τα οποία αντιστοιχούν στα αλληλόμορφα tm1c και αγρίου τύπου. Τα δείγματα Δ5-Δ6 δεν έδωσαν προϊόν με την προσθήκη αυτών των ποσοτήτων DNA. Έτσι έγιναν δοκιμές με εναλλακτικές ποσότητες DNA προκειμένου να εντοπιστούν οι βέλτιστες (Εικ. 21γ). Συγκεκριμένα για το δείγμα Δ5 δοκιμάστηκαν οι ποσότητες 1μl και 2μl και για το δείγμα Δ6 1μl,

2μl και 5μl. Το δείγμα Δ5 έδωσε προϊόν με 1μl και 2μl, με την απόδοση να φαίνεται μεγαλύτερη στο 1μl. Το δείγμα Δ6 παρήγαγε δύο προϊόντα με 1μl, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζει καλή απόδοση, βέβαια αυτή ήταν αρκετή για να χαρακτηριστεί ο γονότυπος του δείγματος. Για τα δείγματα Δ13-Δ16, η αρχική ποσότητα DNA που προστέθηκε ανά αντίδραση ήταν 4μl. Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 21δ, το δείγμα Δ16 παρήγαγε δύο προϊόντα που αντιστοιχούν στα αλληλόμορφα αγρίου τύπου και tm1c. Καθώς τα δείγματα Δ13-Δ15 δεν παρήγαγαν κάποιο προϊόν έγινε επαναληπτική PCR των δειγμάτων αυτών με εναλλακτικές ποσότητες DNA. Συγκεκριμένα, στην Εικόνα 21ε απεικονίζονται τα προϊόντα PCR των δειγμάτων Δ13-Δ15 με την προσθήκη 5μl και 7μl DNA. Τα δείγματα Δ13-Δ15 παρήγαγαν προϊόν και με τις δύο ποσότητες, συγκεκριμένα, τα δείγματα Δ13 και Δ15 παρήγαγαν ένα προϊόν το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου και το δείγμα Δ14 παρήγαγε δύο προϊόντα τα οποία αντιστοιχούν στα αλληλόμορφα tm1c και αγρίου τύπου.

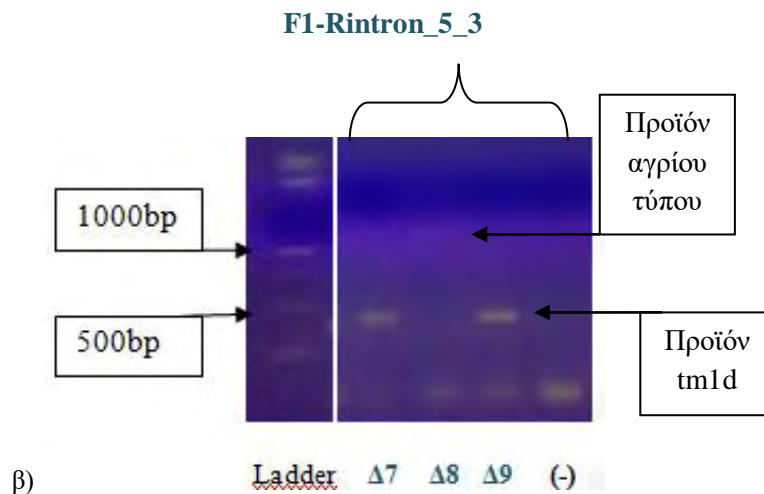
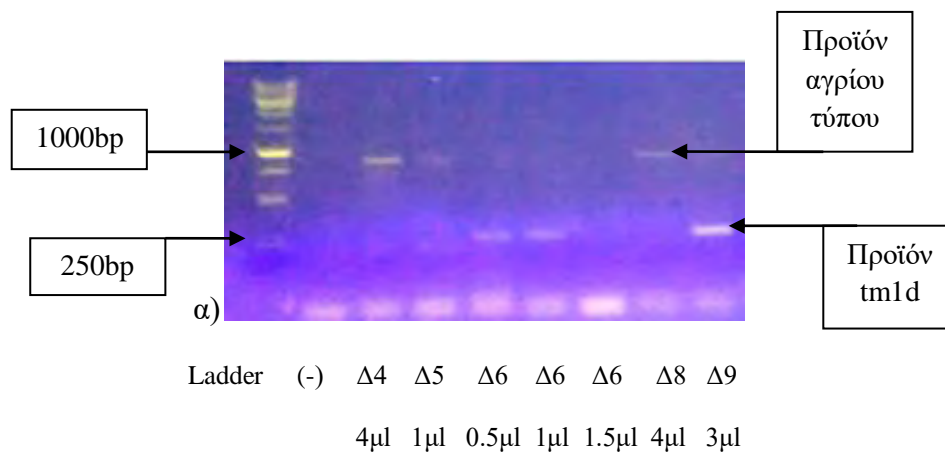


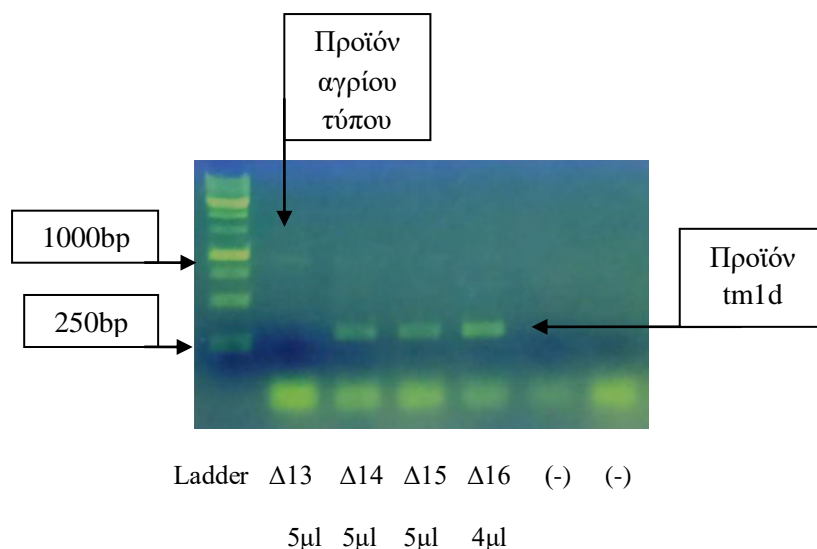


Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR των δειγμάτων Δ4-Δ9 με το ζεύγος εκκινητών F1-R5(α, β και γ), των δειγμάτων Δ13-Δ16 με το ζεύγος εκκινητών F1-R5 (δ) και των δειγμάτων Δ13-Δ16 με το ζεύγος εκκινητών F1-R5 (ε).

Στην συνέχεια ελέγχθηκαν όλα τα δείγματα με το ζεύγος εκκινητών F1-Rintrin_5_3 προκειμένου να διερευνηθεί η παρουσία του αλληλομόρφου tm1d. Οι εκκινητές αυτοί παράγουν προϊόν και για τα αλληλόμορφα αγρίου τύπου και tm1c, αλλά μπορεί να γίνει διάκριση βάσει μεγέθους. Όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο Γ.5. όπου περιγράφεται η βελτιστοποίηση της PCR με αυτό το ζεύγος εκκινητών το μέγεθος του προϊόντος για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου είναι 928bp, για το αλληλόμορφο 1086bp και για το tm1d 293bp. Οι ποσότητες DNA που προστέθηκαν στις PCR ήταν αυτές που προσδιορίστηκαν ως βέλτιστες στις αντιδράσεις με το ζεύγος εκκινητών F1-R5 που προηγήθηκαν. Συγκεκριμένα, στην Εικόνα 22α, τα Δ4, Δ5 και Δ8 έδωσαν μία ζώνη το μέγεθος της οποίας αντιστοιχεί σε αλληλόμορφο αγρίου τύπου, με την ζώνη του Δ5 να μην παρουσιάζει καλή απόδοση, ωστόσο αρκεί για να γίνει ανίχνευση του γονοτύπου. Τα δείγματα Δ6 και Δ9 παρήγαγαν προϊόντα με μέγεθος

που αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο tm1d. Δοκιμάστηκαν διαφορετικοί όγκοι του δείγματος Δ6 καθώς στην PCR που προηγήθηκε με το ζεύγος εκκινητών F1-R5 η απόδοση με την προσθήκη του 1μl δεν ήταν ικανοποιητική. Στην Εικόνα 22β, το Δ7, παράγαγε μία ζώνη το μέγεθος της οποίας αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο tm1d. Σε αυτήν την PCR επαναλήφθηκε η δοκιμή του δείγματος Δ8 καθώς και του Δ9 το οποίο και αποτελούσε τον θετικό έλεγχο. Τέλος στην Εικόνα 22γ εμφανίζονται τα προϊόντα PCR των δειγμάτων Δ13-Δ16 με το ζεύγος εκκινητών F1-Rintron_5_3. Στα δείγματα Δ13-Δ15 έγινε η προσθήκη 5μl DNA και στο δείγμα Δ16 4μl DNA. Όπως διακρίνεται τα δείγματα Δ14-Δ16 παράγουν προϊόν το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο tm1d (293bp).





Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης προϊόντων PCR των δειγμάτων Δ4-Δ9 με το ζεύγος εκκινητών F1-Rintron_5_3 (α και β). και των δειγμάτων Δ13-Δ16 με το ίδιο ζεύγος εκκινητών (γ).

Πίνακας 9: Γονότυποι των δειγμάτων Δ4- Δ9.

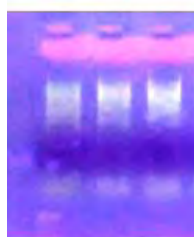
Δείγματα	Γονότυποι
Δ4	wt/wt
Δ5	wt/wt
Δ6	wt/tm1c-tm1d (χμαιρικό)
Δ7	wt/tm1d
Δ8	wt/wt
Δ9	wt/tm1c-tm1d (χμαιρικό)

Πίνακας 8: Γονότυποι των δειγμάτων Δ13-Δ16.

Δείγματα	Γονότυποι
Δ13	wt/wt
Δ14	wt/tm1c-tm1d
Δ15	wt/tm1d
Δ16	wt/tm1c-tm1d

7. Γονοτύπηση των δειγμάτων Δ1-Δ3

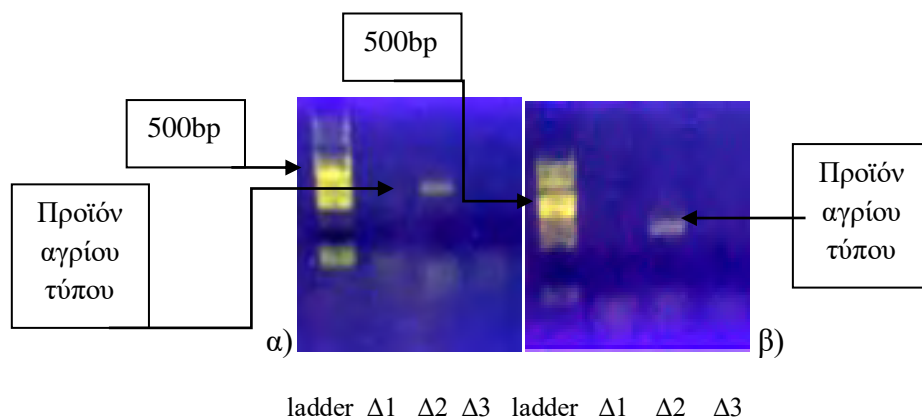
Τα δείγματα Δ1, Δ2 και Δ3 είναι απόγονοι της διασταύρωσης ενός θηλυκού tm1b/wt και ενός αρσενικού tm1b/tm1a. Σκοπός αυτής της διασταύρωσης είναι η αύξηση του πληθυσμού των ποντικών tm1b. Μετά την απομόνωση του DNA ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η ποσότητα DNA που ηλεκτροφορήθηκε ήταν 2μl και αποτελούσε το 4% της συνολικής ποσότητας DNA που απομονώθηκε (Εικ. 23). Καθώς κρίθηκε ότι τα δείγματα περιείχαν μεγάλη ποσότητα DNA ακολούθησε αραιώση αυτών 1:5 για να χρησιμοποιηθούν στις PCR..



Δ1 Δ2 Δ3

Εικόνα 23: Ηλεκτροφόρηση αгарόζης 1% γονιδιακού DNA των δειγμάτων Δ1, Δ2 και Δ3.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR στα δείγματα Δ1, Δ2 και Δ3 με το ζεύγος εκκινητών F1-R5 το οποίο αναγνωρίζει το αλληλόμορφο αγρίου τύπου με μέγεθος 361bp. Χρησιμοποιήθηκαν δύο εναλλακτικές ποσότητες DNA ανά αντίδραση, 3μl και 4μl, ενώ η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών, που ήταν ήδη γνωστή από προηγούμενες μελέτες, ρυθμίστηκε στους 58°C. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24, προϊόν παράγεται μόνο στο Δ2, υποδηλώνοντας ότι το δείγμα αυτό έχει το αλληλόμορφο αγρίου τύπου χωρίς να μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα τα δείγματα Δ1 και Δ3 να έχουν επίσης αυτό το αλληλόμορφο.

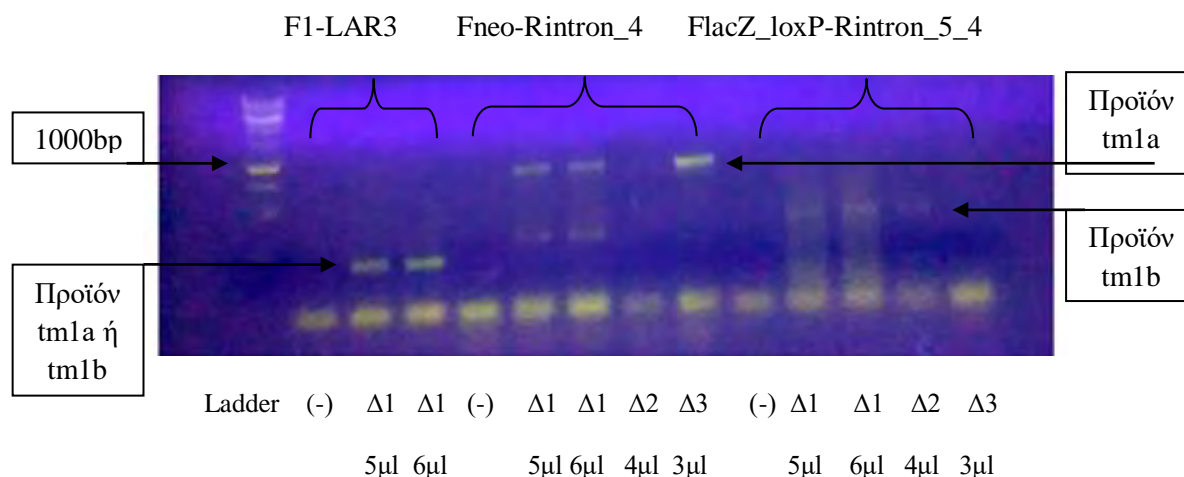


ladder Δ1 Δ2 Δ3 ladder Δ1 Δ2 Δ3

Εικόνα 24: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR με το ζεύγος εκκινητών F1-R5 α) 3μl DNA β) 4μl DNA.

Στην συνέχεια ελέγχθηκαν αυτά τα δείγματα με τα ζεύγη εκκινητών F1-LAR3 το οποίο παράγει προϊόν τόσο για το αλληλόμορφο tm1a όσο και για το tm1b, το ζεύγος εκκινητών Fneo-Rintron_4 το οποίο παράγει προϊόν μόνο για το αλληλόμορφο tm1a και τέλος το ζεύγος εκκινητών FlacZ_loxP-Rintron_5_4 το οποίο είναι ειδικό για το αλληλόμορφο tm1b, προκειμένου να διασαφηνιστεί αν έχουν τα αλληλόμορφα tm1a και tm1b. Οι ποσότητες των DNA που προστέθηκαν ήταν 5μl και 6μl για το δείγμα Δ1, 4μl για το δείγμα Δ2, η οποία προσδιορίστηκε από την αντίδραση με το ζεύγος εκκινητών F1-R5 που προηγήθηκε και 3μl για το δείγμα Δ3. Οι ποσότητες για τα δείγματα Δ1 και Δ3 προσδιορίστηκαν με βάση την εικόνα ηλεκτροφόρησης του γονιδιωματικού DNA (Εικ. 23). Αναλυτικά, στην Εικόνα 25 φαίνεται ότι η PCR με το ζεύγος εκκινητών F1-LAR3 παρήγαγε προϊόν με το δείγμα Δ1, άρα αυτό περιέχει το αλληλόμορφο tm1a ή tm1b. Η PCR με το ζεύγος εκκινητών Fneo-Rintron_4

επιβεβαίωσε ότι τα δείγματα Δ1 και Δ3 περιέχουν το αλληλόμορφο tm1a. Και τέλος η PCR με το ζεύγος εκκινητών FlacZ_loxP-Rintrron_5_4 που παρήγαγε προϊόν για τα δείγματα Δ1 και Δ2 έδειξε ότι περιέχουν το αλληλόμορφο tm1b.



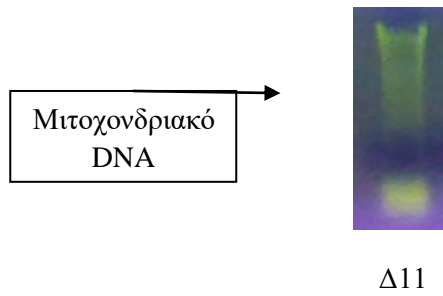
Εικόνα 25: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR των δειγμάτων Δ1-Δ3 με τα ζεύγη εκκινητών F1-LAR3, Fneo-Rintrron_4 και FlacZ_loxP-Rintrron_5_4.

Πίνακας 9: Γονότυποι των δειγμάτων Δ1, Δ2 και Δ3

Δείγματα	Γονότυποι
Δ1	tm1a/tm1b
Δ2	tm1b/wt
Δ3	tm1a/tm1a

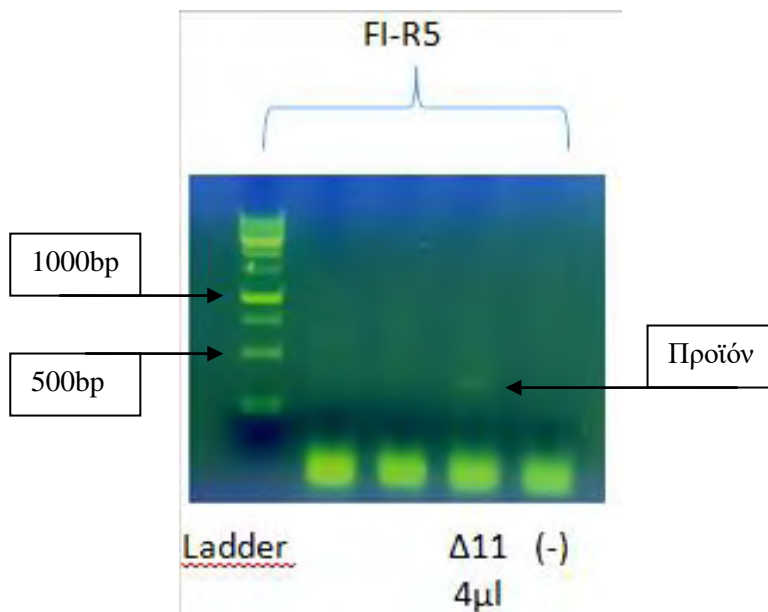
8. Γονοτύπηση του δείγματος Δ11

Το δείγμα Δ11 είναι απόγονος της διασταύρωσης ενός θηλυκού ποντικού με γονότυπο tm1a/tm1a και ενός αρσενικού ποντικού με γονότυπο wt/wt, οπότε ο γονότυπός του αναμένεται να είναι wt/tm1a. Σκοπός αυτής της διασταύρωσης είναι η διατήρηση του πληθυσμού των ποντικών tm1a. Μετά την απομόνωση του DNA ακολούθησε ηλεκτροφόρηση αυτού σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η ποσότητα DNA που προστέθηκε ήταν 2μl και αποτελούσε το 4% της συνολικής ποσότητας DNA που απομονώθηκε (Εικ.26). Το δείγμα παρουσίασε μεγάλη συγκέντρωση DNA, έτσι ακολούθησε αραιώση αυτού 1:10 για να χρησιμοποιηθεί στις PCR.



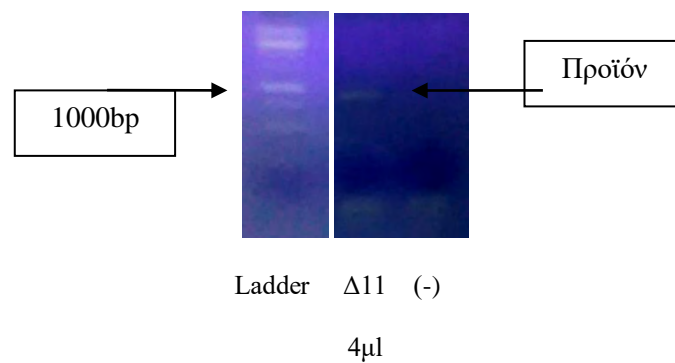
Εικόνα 26: Ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικού DNA σε αγαρόζη 1%.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR με το ζεύγος εκκινητών F1-R5 προκειμένου να γίνει η ανίχνευση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών ήταν 58°C ενώ για κάθε δείγμα προστέθηκαν πολλαπλές ποσότητες DNA ανά αντίδραση προκειμένου να ανιχνευθούν οι βέλτιστες. Στην Εικόνα 27 παρουσιάζεται το προϊόν που ενισχύθηκε μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης με 4μl DNA με μέγεθος που αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου (361bp).



Εικόνα 27: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR του δείγματος Δ11 με το ζεύγος εκκινητών F1-R5.

Έπειτα το δείγμα δοκιμάστηκε με το ζεύγος εκκινητών Fneo-Rintron_4 προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανίχνευση του αλληλομόρφου tmla. Η ποσότητα για το Δ11 είχε προσδιοριστεί στην PCR που προηγήθηκε με τους εκκινητές F1-R5 (Εικ. 27. Με βάση τα αποτελέσματα της Εικόνας 28, υπήρξε παραγωγή προϊόντος, σωστού μεγέθους, αποδεικνύοντας την παρουσία του αλληλομόρφου tmla.



Εικόνα 28: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του δείγματος Δ11 με το ζεύγος εκκινητών Fneo-Rintron_4.

Πίνακας 10: Γονότυποι του δείγματος Δ11.

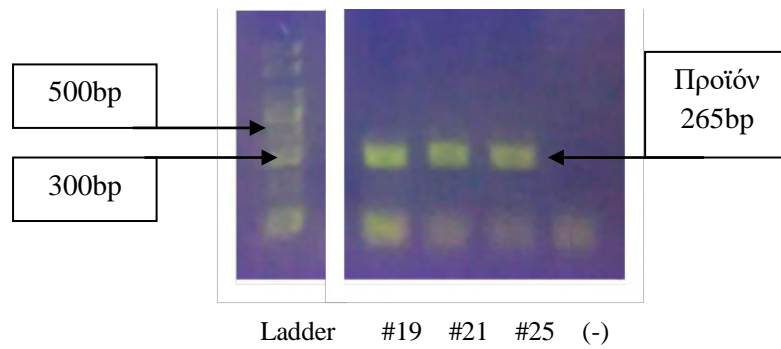
Δείγμα	Γονότυπος
Δ11	wt/tm1a

5. Έλεγχος ύπαρξης γονιδίου που κωδικοποιεί την Cre ρεκομπινάση

Όπως προαναφέρθηκε τα ποντίκια tm1b και tm1d πρώτης γενιάς θα περιέχουν στο γονιδιώμα τους το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης, καθώς θα το έχουν κληρονομήσει από τον διαγονιδιακό γονέα που το έφερε. Το γονίδιο της ρεκομπινάσης μπορεί να ανιχνευθεί από μία PCR με το ζεύγος εκκινητών CreF2-CreR2 με θερμοκρασία υβριδοποίησης 60°C, πληροφορίες οι οποίες είναι γνωστές από παλαιότερες μελέτες. Έτσι, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποτελεσματικότητας αυτού του ζεύγους εκκινητών σε δείγματα ποντικών με το αλληλόμορφο tm1b. Ο λόγος για τον οποίο πραγματοποιήθηκε αυτός ο έλεγχος ήταν η επαλήθευση προκειμένου αυτοί να χρησιμοποιηθούν σε PCR με DNA από ποντίκια tm1d δεύτερης γενιάς. Τα ποντίκια tm1d δεύτερης γενιάς ιδανικά θα πρέπει να μην περιέχουν στο γονιδιώμα τους εξωγενή γονίδια. Ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μία ρεκομπινάση μπορεί να εκφραστεί και στην συνέχεια, το ένζυμο μπορεί να αναγνωρίσει κρυφές αλληλουχίες στο γονιδιώμα του οργανισμού. Σε πολλές των περιπτώσεων αυτό οδηγεί στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων. Σε αυτό το στάδιο δεν πραγματοποιήθηκε καμία βελτιστοποίηση αλλά μόνον έλεγχος της PCR με αυτό το ζεύγος εκκινητών. Η δοκιμή τους σε ποντίκια tm1d δεύτερης γενιάς θα πραγματοποιηθεί μόλις αυτά θα είναι διαθέσιμα.

Διασταύρωση μεταξύ ποντικών tm1a με διαγονιδιακά ποντίκια για το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης δημιουργούν χιμαιρικούς απογόνους για τα αλληλόμορφα tm1a και tm1b οι οποίοι έχουν κληρονομήσει και το γονίδιο της ρεκομπινάσης. Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητάς του ζεύγους εκκινητών έγινε σε ποντίκια tm1b (Εικ. 29). Οι ποσότητες DNA των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ανά PCR ήταν 1,5μl για τα δείγματα #19, #21 και #25 με τον προσδιορισμό τους να έχει πραγματοποιηθεί σε

παλαιότερες μελέτες. Τα δείγματα #19, #21 και #25 έδωσαν ζώνη, με το σωστό μέγεθος που ήταν 265bp αποδεικνύοντας την παρουσία του γονιδίου της ρεκομπινάσης στο γονιδίωμα των ζώων.



Εικόνα 29: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR με το ζεύγος εκκινητών CreF2-CreR2 σε ποντίκια tm1b.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκαν βελτιστοποιήσεις αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης σε δείγματα ποντικών με αποσιώπηση του γονιδίου *Fra10ac1* και στην συνέχεια εφαρμόστηκαν οι συνθήκες PCR για την γονοτύπηση άγνωστων δειγμάτων. Συνολικά εφαρμόστηκαν για την γονοτύπηση δέκα δειγμάτων για το αλληλόμορφο *tm1d*, τεσσάρων για το αλληλόμορφο *tm1a* και τριών για το αλληλόμορφο *tm1b*.

Στην μελέτη αυτή προέκυψαν απόγονοι ετερόζυγοι για το αλληλόμορφο *tm1d*. Τα ετερόζυγα ποντίκια *tm1d* προσομοιάζουν τον γονότυπο των ανθρώπων με την εύθραυστη θέση *FRA10A* καθώς έχει συμβεί απενεργοποίηση του ενός αλληλομόρφου. Το επόμενο βήμα της έρευνας πρέπει να εστιάσει στην αξιολόγηση αυτών των ποντικών σε δοκιμασίες συμπεριφοράς προκειμένου να αξιολογηθεί η μνήμη και η μάθησή τους, χρησιμοποιώντας και ποντίκια αγρίου τύπου για θετικό έλεγχο. Στην συνέχεια μπορεί να γίνει προσπάθεια δημιουργίας ομόζυγης σειράς ποντικών *tm1d* προκειμένου να μελετηθεί και η ολική έλλειψη της πρωτεΐνης *FRA10AC1*, εφόσον αυτή η κατάσταση είναι βιώσιμη.

Ο έλεγχος μπορεί να γίνει με δοκιμασίες ελέγχου μνήμης και μάθησης και σε ποντίκια με γονότυπο *tm1d/tm1d*, εάν αυτή η κατάσταση είναι βιώσιμη, παράλληλα με ποντίκια αγρίου τύπου. Για να επιτευχθεί αυτό θα πρέπει να διασταυρωθούν ποντίκια με γονότυπο *wt/tm1d* μεταξύ τους και να δώσουν ένα ποσοστό ομόζυγων απογόνων *tm1d*. Τα ομόζυγα έμβρυα ενδέχεται να μην γεννιούνται και το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε παθολογικές καταστάσεις που έχουν ως αποτέλεσμα τον θάνατο του εμβρύου ποντικού σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια. Εάν αυτό το φαινόμενο επαναλαμβάνεται σε παραπάνω από μία εγκυμοσύνες που προκύπτουν από διαφορετικά ζευγάρια, τότε τα έμβρυα θα πρέπει να παραληφθούν και να αναλυθούν προκειμένου να διαπιστωθεί σε ποιο αναπτυξιακό στάδιο επέρχεται ο θάνατος και για ποιον λόγο.

Στην συνέχεια, θα πρέπει να ελεγχθεί η βιωσιμότητα των ομόζυγων ατόμων *tm1d*. Ένα ομόζυγο ποντίκι *tm1d* ενδέχεται να γεννιέται αλλά να παρουσιάζει μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας σύντομα μετά την γέννησή του. Ομοίως, αν αυτό το γεγονός παρατηρηθεί σε ένα μεγάλο ποσοστό απογόνων, αυτοί μπορούν αναλυθούν περαιτέρω προκειμένου να εντοπιστεί ο λόγος που οδηγεί στην θνησιμότητα, παραδείγματος χάριν αυτό μπορεί να οφείλεται σε ανατομικές ανωμαλίες. Εφόσον τα άτομα αυτά γεννιούνται και επιβιώνουν, θα πρέπει να παρακολουθείται ο ρυθμός ανάπτυξής τους, συγκρίνοντάς τον με την ανάπτυξη ποντικών αγρίου τύπου. Ενδέχεται τα γενετικώς τροποποιημένα ποντίκια να παρουσιάζουν μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης, έτσι θα πρέπει να εντοπιστούν οι λόγοι που επιβραδύνουν τους ρυθμούς ανάπτυξής τους και να αξιολογηθούν. Τέλος, η έλλειψη του γονιδίου *Fra10ac1* ενδέχεται να μην επηρεάσει την βιωσιμότητα ή τον ρυθμό με τον οποίο αναπτύσσονται τα ομόζυγα ποντίκια *tm1d*, αλλά να επιδρά άμεσα ή έμμεσα στην γονιμότητά αυτών. Έτσι, ώριμα ηλικιακά ομόζυγα ποντίκια *tm1d* θα πρέπει να μουν σε δοκιμασία διασταύρωσης και να δώσουν απογόνους.

Για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν πολλαπλές διασταυρώσεις μεταξύ ετερόζυγων ποντικών wt/tm1d και να μελετηθούν όλοι οι απόγονοι που γεννιούνται και παρουσιάζουν ενδιαφέρον, σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξής τους καθώς και στην ενήλικη ζωή. Κάθε άτομο tm1d/tm1d μπορεί να εμφανίζει φαινότυπο με διαφορετική βαρύτητα. Γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να υπάρξει και μεμονωμένη αξιολόγηση όλων των ατόμων με το αλληλόμορφο tm1d, εκτός από την μαζική που όλα τα άτομα αξιολογούνται συνολικά.

Στην συνέχεια τα άτομα αυτά, με γονότυπο tm1d/tm1d θα πρέπει να υποβληθούν σε δοκιμασίες προκειμένου να αξιολογηθούν χαρακτηριστικά όπως η μάθηση και η μνήμη. Με βάσει τις αποδόσεις που θα παρουσιάζουν θα αξιολογηθεί ο φαινότυπός τους, αν αυτός επηρεάζεται από την έλλειψη του γονιδίου *Fra10ac1* και σε τι βαθμό. Υπάρχει μία ευρεία ποικιλία συμπεριφορικών δοκιμών για εργαστηριακά τρωκτικά, από δοκιμές βασικής κινητικής και αισθητηριακής λειτουργίας έως ανάλυσης συμπεριφοράς που εξαρτώνται από συναισθηματικούς και γνωσιακούς παράγοντες. Αρχικά, είναι βασικό να ελεγχθούν τα γενετικώς τροποποιημένα ζώα αρχικά στο περιβάλλον του κλουβιού τους με παρακολούθηση των κινήσεων τους προτού συμμετάσχουν σε κάποια εξειδικευμένη δοκιμασία εκτός αυτού. (Crawley JN, 2007). Επίσης ο υδάτινος λαβύρινθος Morris, ο οποίος εφαρμόζεται από την δεκαετία του '80 αποτελεί την πιο γνωστή δοκιμασία μνήμης κατά την οποία το τρωκτικό τοποθετείται μέσα σε δεξαμενή με νερό, η οποία περιέχει μία κρυφή έξοδο διαφυγής που οδηγεί σε κρυμμένη πλατφόρμα. Μέσω επαναλαμβανόμενων δοκιμών το ζώο εντοπίζει την έξοδο της πλατφόρμας. Η ταχύτητα με την οποία το τρωκτικό διαφεύγει καταμετράται και αποτελεί δείκτη μάθησης (D Hooge R, 2001). Επιπρόσθετα η μνήμη και η εκμάθηση του χώρου επίσης μπορούν να αξιολογηθούν από την δοκιμασία του T λαβύρινθου (λαβύρινθος ακτινικού βραχίονα). Ο λαβύρινθος αυτός αποτελείται από μία κεντρική πλατφόρμα και οκτώ βραχίονες. Το ζώο καλείται να βρει την έξοδο του λαβύρινθου και ο χρόνος που χρειάζεται για να το επιτελέσει, καθώς και σφάλματα του καταμετρώνται (Crawley JN, 2008). Τέλος μία συνήθη δοκιμασία αποτελεί η αναγνώριση νέου αντικείμενου ή αναγνώριση νέας θέσης, η οποία δεν βασίζεται σε χωρικές ενδείξεις καθώς το ζώο εκπαιδεύεται να αναγνωρίζει ορισμένα αντικείμενα. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, ένα από τα γνωστά αντικείμενα αντικαθίσταται από ένα νέο αντικείμενο. Ένα ζώο χωρίς παθολογικό φαινότυπο θα πρέπει να ξοδέψει περισσότερο χρόνο προκειμένου να επεξεργαστεί και να διερευνήσει το νέο αντικείμενο (Crawley JN, 2008).

Εκτός από τις δοκιμασίες που αναφέρθηκαν, τα ποντίκια tm1d εφόσον παρουσιάζουν παθολογικό φαινότυπο στη μνήμη και τη μάθηση θα πρέπει να εξεταστούν εκτενέστερα. Μία αρχική αδρή εκτίμηση της μορφολογίας όλων των οργάνων θα ήταν απαραίτητη, ούτως ώστε να αξιολογηθούν τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Όργανα τα οποία παρουσιάζουν βασικές διαφορές στην δομή τους σε σχέση με όργανα από αγρίου τύπου ποντίκια, μπορούν να μελετηθούν μεμονωμένα. Η μελέτη τους μπορεί για παράδειγμα να περιλαμβάνει την λήψη τομών του ιστού και στη συνέχεια παρατήρησή τους. Το γεγονός ότι η έλλειψη του γονιδίου

FRA10AC1 του ανθρώπου έχει συσχετιστεί με νοητική υστέρηση υποδεικνύει ότι η μελέτη εγκεφάλων των ποντικών tm1d κρίνεται απαραίτητη. Αρχικά οι εγκεφαλοι αξιολογούνται μακροσκοπικά και συγκρίνονται με εγκεφάλους ποντικών αγρίου τύπου. Μπορεί να μελετηθούν αδρά ελέγχοντας τη δομή και το βάρος τους και επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ιστοπαθολογικές μελέτες προκειμένου να ανιχνευθούν αλλοιώσεις του ιστού που οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου και πιθανότατα είναι αποτέλεσμα της έλλειψης του γονιδίου *Fra10ac1*. Επιπλέον, τομές ιστών μπορούν να μελετηθούν με ανοσοϊστοχημεία, με την προσθήκη ειδικών αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων κυττάρων ή πρωτεϊνικών μορίων.

Η μελέτη μπορεί να εστιαστεί σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με τη μνήμη και τη μάθηση όπως ο ιππόκαμπος, ο οποίος ανήκει στο μεταιχμιακό τμήμα του εγκεφάλου, με συμμετοχή της μεταφοράς των πληροφοριών από την βραχυπρόθεσμη μνήμη στην μακροπρόθεσμη και η αμυγδαλή, που αποτελεί μία ομάδα νευρώνων κοντά στο εγκεφαλικό στέλεχος και παίζει πρωτεύοντα ρόλο στην μνήμη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Annu Rev Genet. Chromosome fragile sites. (2007) ; 41:169-92.
- 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)
- Bagni, C., Tassone, F., Neri, G., & Hagerman, R.. Fragile X syndrome: Causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *Journal of Clinical Investigation*. (2012)
- Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C. L., Urlaub, H., & Lührmann, R. Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature*, (2008) *452*(7189), 846–850.
- Brennan K. Colony management. First ed. In: Pease S, Saunders TL, editors. *Advanced Protocols for Animal Transgenesis*. Berlin: Springer. (2011) p. 535–76.
- Carballeira N¹, Nazabal M, Brito J, Garcia O. Purification of a thermostable DNA polymerase from *Thermus thermophilus* HB8, useful in the polymerase chain reaction. *Sep*. (1990)
- 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)
- Chien A, Edgar DB, Trela JM "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*". *J. Bacteriol.* (1976). **127** (3): 1550–1557. [PMC 232952](#). [PMID 8432](#).
- Cotton LM, Meilak ML, Templeton T, Gonzales JG, Nenci A, Cooney M, et al. Utilising the resources of the international knockout mouse consortium: the Australian experience *Mamm0020Genome*(2015) **26**(3–4):142–53. doi:10.1007/ s00335-015-9555-1
- Crawley JN, Gerfen CR, Rogawski RA, Sibley DR, Skolnick P, Wray S, editors. *Short protocols in neuroscience: systems and behavioral methods*. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons, Inc. (2007)
- Crawley J. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron*. (2008)*57*:809-18
- Dillon L.W., Burrow A.A., Wang Y.H.. DNA Instability at Chromosomal Fragile Sites in Cancer. *Current Genomics*, (2010) *11*, 326-337.
- Espallergues J, Teegarden S, Veerakumar A, Boulden J, Challis C, Jochems J, et al. HDAC6 regulates glucocorticoid receptor signaling in serotonin pathways with critical impact on stress resilience. *J Neurosci*. (2012);*32*:4400-16
- Fanselow M, Poulos A. The neuroscience of mammalian associative learning. *Annu Rev Psychol*.(2005);*56*:207
- Grant R, Sutherland¹, Elizabeth Baker², Robert I Richards³ *Reviews* (2005) Fragile sites still breaking, *science direct*, Pages 501-506, (1998)
- Gunasekaran Bhavani¹, S Sivaprakash², Chandra R Samuel³, Sathiyavedu Thyagarajan Santhiya⁴ Enhanced Expression of FRA16B using AT-Rich DNA Binding Chemicals in a Woman with Secondary Amenorrhoea(2017)

Hooge R, De Deyn P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev.*; (2001)36:60-90

Jacqueline K. White, Genome-wide Generation and Systematic Phenotyping of Knockout Mice Reveals New Roles for Many Genes, (2013)

James L. J. Coleman , Karen Brennan , Tony Ngo , Poornima Balaji , Robert M. Graham and Nicola J. Smith *Rapid knockout and reporter mouse line generation and breeding colony establishment using EUCOMM conditional-ready embryonic stem cells: a case study. (2015)

Jacqueline K. White, Allele Design, Genome-wide Generation and Systematic Phenotyping of Knockout Mice Reveals New Roles for Many Genes, figure S1 (2013)

Ilagan, J. O., Chalkley, R. J., Burlingame, A. L., & Jurica, M. S.. Rearrangements within human spliceosomes captured after exon ligation. *Rna*, (2013)19(3), 400–412.

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

Kremer, E. J., Yu, S., Pritchard, M., Nagaraja, R., Heitz, D., Lynch, M., ... et al. (1991). Isolation of a human DNA sequence which spans the fragile X. *Am J Hum Genet*, 49(3), 656–661.

Lukusa, T., & Fryns, J. P. Human chromosome fragility. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* (2008).

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

Mullis, Kary. "The unusual origin of the polymerase chain reaction". *Scientific American*. (1990)262 (4): 56–61, 64–5. [doi:10.1038/scientificamerican0490-56](https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56). PMID 2315679.

Mullis K ["Kary B. Mullis – Nobel Lecture: The Polymerase Chain Reaction"](#) (1993)

Παλαιολόγου Δ., Κατσαρέλη Ε. και Παπανικολάου Γ., Κεφάλαιο 7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, σελ. 136

Park, J. M., Park, J. H., Mun, D. G., Bae, J., Jung, J. H., Back, S., ... Lee, S. W. Integrated analysis of global proteome, phosphoproteome, and glycoproteome enables complementary interpretation of disease-related protein networks (2015).

Pham CT, MacIvor DM, Hug BA, Heusel JW, Ley TJ(1996) Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23):13090–5. [doi:10.1073/pnas.93.23.13090](https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13090)

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](https://doi.org/10.1038/75973)

Sarafidou, T., Kahl, C., Martinez-Garay, I., Mangelsdorf, M., Gesk, S., Baker, E., Kokkinaki, M., Talley, P., Maltby, EL, French, L. , Harder, L., Hinzmann, B. Folate-sensitive fragile site FRA10A is due to an expansion of a CGG-repeat in a novel gene FRA10AC1, encoding a nuclear protein. *Genomics* (2004)84: 69-81.

Schmidt, A., Langbein, L., Rode, M., Prätzel, S., Zimbelmann, R., & Franke, W. W. (1997). Plakophilins 1a and 1b: Widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell and Tissue Research*, 290(3), 481–499.

Schmidt, C., Grønberg, M., & Deckert, J.. Mass spectrometry – based relative quantification of proteins in precatalytic and catalytically active spliceosomes by metabolic count Mass spectrometry – based relative quantification of proteins in precatalytic and catalytically active spliceosomes by m. *Rna*, (2014)20(6), 406–420.

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

Sharma, K., D'Souza, R. C. J., Tyanova, S., Schaab, C., Wiśniewski, J. R., Cox, J., & Mann, M. Ultradeep Human Phosphoproteome Reveals a Distinct Regulatory Nature of Tyr and Ser/Thr-Based Signaling. *Cell Reports*, (2014) 8(5), 1583–1594.

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

Suckow MA, Danneman P, Brayton C. First ed. In: Suckow MA, editor. *The Laboratory Mouse*. CRC (2000) Press. p. 1–5.)

Sutherland GR. Heritable Fragile Sites on Human Chromosomes II. Distribution, Phenotypic Effects, and Cytogenetics. *Am J Hum Genet* (2001)31:136-148. (1979).

Sutherland GR. Heritable fragile sites on human chromosomes. VIII. Preliminary population cytogenetic data on the folic-acid-sensitive fragile sites. *Am J Hum Genet*. (1982), 34(3):452-8.

Testa G, et al. A reliable lacZ expression reporter cassette for multipurpose, knockout-first alleles. *Genesis*. (2004); 38:151–158.

Thomson and Thomson, *Genetics in Medicine*) Seventh edition, Κεφ. 7 Πρότυπα Μονογονιδικής κληρονομιάς, σελ: 176-179

Thomson and Thomson, *Genetics in Medicine*) Seventh edition, Κεφ. 12, Μοριακή, Βιοχημική και Κυτταρική Βάση Γενετικών Νοσημάτων, σελ: 456-457

White JK, Gerdin AK, Karp NA, Ryder E, Buljan M, Bussell JN, et al. Genome-wide generation and systematic phenotyping of knockout mice reveals new roles for many genes. *Cell* 154(2) (2013) : 452–64. doi:10.1016/j.cell.2013.06.022

Yikang S. Rong, Kent G. Golic, Gene Targeting by Homologous Recombination in *Drosophila* *Science* (2000)

Zambrowicz BP, et al. Wnk1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: a gene-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* (2003);100:14109–14114.

Ιστοσελίδες που χρησιμοποιήθηκαν για την άντληση δεδομένων:

https://mpi2.github.io/IKMCknowledgebase/ikmc/screens_and_quality_control/wtsi_mouse_clinic_quality_control_tests_mice/ διεθνή βάση δεδομένων Knockout ποντικών.

<http://www.knockoutmouse.org/kb/25/>

<https://www.cellsignal.com/products/cellular-assay-kits/senescence-b-galactosidase-staining-kit/9860> Senescence β-Galactosidase Staining Kit #9860