



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΚΝΟΣΚΟΥΤ  
ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *FRA10AC1*



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
της Ελένης Μουράτη

ΛΑΡΙΣΑ 2018

«ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΚΝΟΚΚΟΥΤ  
ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *FRA10AC1*»

«GENOTYPING AND ANALYSIS OF KNOCKOUT MICE FOR THE  
*FRA10AC1* GENE»

**Τριμελής εξεταστική επιτροπή:**

- **Σαραφίδου Θεολογία:** Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Λιαδάκη Καλλιόπη:** Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Μαμούρης Ζήσης:** Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η παρούσα προπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, κα. Σαραφίδου Θεολογίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την κα. Σαραφίδου για τον χρόνο που μου αφιέρωσε, την σωστή ερευνητική καθοδήγηση που μου παρείχε, την υπομονή και την κατανόησή της κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων και γενικότερα καθόλη την διάρκεια εκπόνησης αυτής της πτυχιακής εργασίας. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών και την κα. Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, τον Σταμάτη Κώστα, την Γαλλιοπούλου Ελένη, τον Γιαννούλη Θεμιστοκλή, την Μαρκαντώνη Μαρία και τον Τσιπουρλιάνο Ανδρέα για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την υπομονή τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, που ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, καθώς και για την θετική ενέργεια και το αστείρευτο χιούμορ τους, που αποτέλεσαν έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες της ευχάριστης παραμονής μου στο εργαστήριο. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου, που με στήριξαν όλο αυτό το διάστημα, έδειξαν κατανόηση και μου έδιναν δύναμη και πείσμα να ξεπερνάω τις αναποδιές και να συνεχίζω να σπρώχνω τα όριά μου κάθε φορά ακόμα παραπέρα.

## Περιεχόμενα

|   |    |
|---|----|
| 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ-ABSTRACT.....   | 1  |
| 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....  | 3  |
| 2.1 Εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις.....   | 3  |
| 2.2 Ταξινόμηση εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων.....  | 3  |
| Α. Κοινές εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις.....   | 3  |
| Β. Σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις.....  | 4  |
| 2.3 Κλινική σημασία σπάνιων εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων ευαίσθητων στο φυλλικό οξύ.....  | 6  |
| 2.4 Η εύθραυστη χρωμοσωμική θέση FRA10A.....  | 6  |
| 2.5 Κλινική σημασία εύθραυστης χρωμοσωμικής θέσης FRA10A.....   | 7  |
| 2.6 Ανάλυση του γονιδίου FRA10AC1, που εντοπίζεται στην εύθραυστη χρωμοσωμική θέση FRA10A.....  | 8  |
| 2.7 Πρωτεΐνη FRA10AC1.....  | 10 |
| 2.8 Στρατηγική δημιουργίας ποντικών knockout.....   | 13 |
| 3. ΣΚΟΠΟΣ.....  | 19 |
| 4. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....   | 20 |
| 4.1 Απομόνωση DNA από ιστό.....   | 20 |
| 4.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....  | 23 |
| 4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....  | 27 |
| 4.4 Πολλαπλή PCR (Multiplex PCR).....   | 31 |
| 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....  | 33 |
| 5.1 Απομόνωση DNA από ιστό ποντικού.....  | 33 |
| 5.2 Βελτιστοποίηση της πολλαπλής PCR.....   | 36 |
| 5.3 Γονοτύπηση δειγμάτων.....   | 39 |
| Α. Αποτελέσματα PCR απογόνων διασταύρωσης μεταξύ αγρίου τύπου ποντικών και ετερόζυγων knockout-tm1a: 1 <sup>ο</sup> σύνολο δειγμάτων..... | 39 |
| Β. Αποτελέσματα PCR απογόνων διασταύρωσης μεταξύ ετερόζυγων knockout-tm1a ποντικών: 2 <sup>ο</sup> σύνολο δειγμάτων.....                  | 41 |
| Γ. Αποτελέσματα PCR απογόνων διασταύρωσης μεταξύ ετερόζυγων knockout-tm1a ποντικών: 3 <sup>ο</sup> σύνολο δειγμάτων.....                  | 43 |

|                      |    |
|----------------------|----|
| 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....     | 46 |
| 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 49 |
| 8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....    | 54 |

## 1. Περίληψη

Το γονίδιο *FRA10AC1* εντοπίζεται στην εύθραυστη χρωμοσωμική θέση, *FRA10A* του ανθρώπου. Η *FRA10A* είναι μία σπάνια αυτοσωμική εύθραυστη χρωμοσωμική θέση, ευαίσθητη στο φυλλικό οξύ, που χαρτογραφείται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23.3. Σε άτομα-φορείς που έχουν μελετηθεί έχει δειχθεί ότι η *FRA10A* πιθανώς σχετίζεται με νοητική υστέρηση και με αναπτυξιακές ανωμαλίες. Η επέκταση μιας πολυμορφικής (CGG)<sub>8-14</sub> επανάληψης, που εντοπίζεται στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *FRA10AC1* έχει ως συνέπεια την κυτταρογενετική επαγωγή της θέσης *FRA10A*. Σε άτομα-φορείς της *FRA10A*, ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μονάδων CGG/CCG ανέρχεται τουλάχιστον στις 200, γεγονός που οδηγεί στην υπερμεθυλίωση της περιοχής και τη μεταγραφική καταστολή του αντίστοιχου αλληλομόρφου. Το γονίδιο *FRA10AC1* καταλαμβάνει περίπου 33kb και συνίσταται από 19 εξόνια, εκ των οποίων τα 4, τα εξόνια 13, 14, 15 και 16, υφίστανται εναλλακτική συναρμογή. Το κύριο μετάγραφο του γονιδίου *FRA10AC1*, το οποίο εντοπίστηκε σε όλους τους ιστούς ενήλικου άτομου, που αναλύθηκαν, υποδεικνύοντας την καθολική έκφραση του γονιδίου, έχει μήκος περίπου 1450bp. Η πρωτεΐνη *FRA10AC1* αποτελείται από 315 αμινοξέα, και έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό του σωματίου συναρμογής, και ειδικότερα των υποσυμπλόκων Bactivated, C και P γεγονός που συνάδει με τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης στον πυρήνα. Υπάρχουν επιπλέον ενδείξεις ότι η *FRA10AC1* συμμετέχει στη συναρμογή του πρόδρομου mRNA ή σε κάποια άλλη στενά σχετιζόμενη λειτουργία με τη διαδικασία μεταβολισμού του mRNA. Η διερεύνηση των μοριακών μονοπατιών, που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της απλοανεπάρκειας του γονιδίου *FRA10AC1* μπορεί να επιτευχθεί με το ζωικό μοντέλο ποντικού knockout για το ορθόλογο γονίδιο, το οποίο έχει ήδη δημιουργηθεί. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση δειγμάτων από ουρές ποντικών, τα οποία έχουν προέλθει από διασταύρωση μεταξύ ποντικών αγρίου τύπου και ετερόζυγων knockout, έπειτα από μία διαδικασία επαναπαραγωγής, καθώς και μεταξύ ετερόζυγων ποντικών-knockout. Για τη γονοτύπηση αναπτύχθηκε μία PCR με πολλαπλούς εκκινητές, η οποία ελέγχει ταυτόχρονα την ύπαρξη, τόσο του αλληλομόρφου αγρίου τύπου, όσο και του knockout, η οποία και εφαρμόστηκε σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν.

## Abstract

The *FRA10AC1* gene is located in the *FRA10A* fragile human chromosomal site. *FRA10A* is a rare autosomal fragile chromosomal site, sensitive to folic acid which is mapped to the chromosomal region 10q23.3. In *FRA10A* carriers that have been studied, it has been proposed that the fragile site expression might be associated with mental retardation and developmental anomalies. The extension of a normal polymorphic repeat (CGG)<sub>8-14</sub>, which is located in the 5' untranslated region of the *FRA10AC1* gene, results in the expression of *FRA10A*. In *FRA10A* carriers the polymorphic repeat is expanded by at least 200 copies, which leads to hypermethylation, resulting in the silence of the corresponding allele of the *FRA10AC1* gene by suppressing its transcription. The *FRA10AC1* gene occupies approximately 33 kb and consists of 19 exons, of which 4, exons 13, 14, 15 and 16, undergo alternative splicing. The major transcript of the *FRA10AC1* gene, which was detected in all adult human tissues, analyzed, indicating the universal expression of the gene, is about 1450 bp in size. The *FRA10AC1* protein consists of 315 amino acids, and has been identified as a component of the spliceosome, and in particular the Bactivated, C and P complex, which is consistent with the subcellular localization of the protein in the nucleus. There are also indications that the *FRA10AC1* protein is involved in the assembly of the mRNA precursor or some other closely related function with the mRNA metabolism process. Investigation of the molecular pathways involved in the pathophysiology of the *FRA10AC1* gene can be conducted with an animal model of a knockout mouse, which was created by silencing the *Fra10ac1* ortholog gene. In the present work genotyping of samples coming from mouse tails was performed, that derived from crossings of wild-type and knockout heterozygous mice, after a rederivation process, as well as crossings among knockout heterozygous mice. For genotyping a PCR was developed which simultaneously controls the existence of both the wild-type allele and the knockout (multiplex), which was applied to all samples analyzed.

## 2. Εισαγωγή

### 2.1 Εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις

Οι εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις είναι κληρονομήσιμοι γενετικοί τόποι, που εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα μη-τυχαίων χασμάτων ή και θραύσεων στα χρωμοσώματα του ανθρώπου κατά τη μετάφραση της μίτωσης, όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας-μη ευνοϊκές για την ομαλή έκβαση της αντιγραφής του DNA. Οι εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις συνιστούν περιοχές της χρωματίνης που αποτυγχάνουν να συμπυκνωθούν κατά την διάρκεια της μίτωσης (Lukusa and Fryns 2008).

Θραύσεις είναι δυνατόν να δημιουργηθούν από παράγοντες που επηρεάζουν την πρωταρχική δομή της διπλής έλικας, είτε ενδογενείς, όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, είτε εξωγενείς, όπως ιονίζουσα ακτινοβολία (Weterings and Chen 2008). Στην περίπτωση των εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων, ο μηχανισμός με τον οποίο μπορεί να προκληθούν οι θραύσεις δεν είναι ακόμα σαφής. Αξίζει να αναφερθεί, ωστόσο, ότι ο πλειονότητα των εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων είναι δυνατόν να επαχθεί και από περιβαλλοντικούς παράγοντες και χημικά (Burrow et al. 2009).

### 2.2 Ταξινόμηση εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων

Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 120 εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις στο γονιδίωμα του ανθρώπου (Schwartz et al. 2006). Αυτές οι εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις κατατάσσονται αρχικά σε δύο κατηγορίες, σε σπάνιες και σε κοινές, με βάση την συχνότητα με την οποία εμφανίζονται στον πληθυσμό, ενώ διαχωρίζονται στη συνέχεια περαιτέρω σύμφωνα με το συγκεκριμένο τρόπο επαγωγής τους *in vitro*, δηλαδή τις κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας (Sutherland and Richards 1995; Schwartz et al. 2006; Lukusa and Fryns 2008).

#### A. Κοινές εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις

Οι κοινές εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις είναι παρούσες σε όλα τα άτομα και ως εκ τούτου θεωρείται ότι συνιστούν ένα φυσιολογικό συστατικό της χρωμοσωμικής δομής. Ωστόσο, το ποσοστό των κυττάρων με κυττογενετική έκφραση ποικίλλει μεταξύ των ατόμων, φτάνοντας σε ορισμένα άτομα μέχρι και το 30%, το οποίο είναι μικρό σχετικά ποσοστό (Sutherland and Richards 1995). Σε αντίθεση, επίσης, με τις σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις, η



κυτταρογενετική έκφραση καταλαμβάνει μεγάλες χρωμοσωμικές περιοχές μεγέθους Mb. Συνεπώς, οι κοινές εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις φαίνεται ότι συνιστούν περιοχές ευθραυστότητας, παρά συγκεκριμένο γενετικό τόπο (Handt, Sutherland, and Richards 2000). Μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί περίπου 90 κοινές εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις. Οι κοινές εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις, ανάλογα με τις συνθήκες επαγωγής τους, ταξινομούνται σε τρεις ομάδες:

- Στις θέσεις που επάγονται από την αφιδικολίνη, που αποτελούν και την πλειοψηφία, η οποία αποτελεί αναστολέα των DNA πολυμερασών  $\alpha$ ,  $\delta$  και  $\epsilon$ , και παρεμβαίνει στην πορεία της διχάλας αντιγραφής. Οι θέσεις αυτής της ομάδας μπορούν, επίσης, να επαχθούν έπειτα από προσθήκη φθοροδεοξουριδίνης (FrdU), του αναστολέα της σύνθεσης της θυμιδίνης, προκαλώντας τελικά έλλειψη στη δεξαμενή των νουκλεοτιδίων. Τέλος, η έκφραση των θέσεων αυτών ενισχύεται, χρησιμοποιώντας θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, που παρουσιάζει έλλειψη φυλλικού οξέος ή θρεπτικό μέσο καλλιέργειας εμπλουτισμένο με μεθοτρεξάτη (Glover et al. 1984; Yunis et al. 1984).
- Στις θέσεις που επάγονται από την βρώμοδεοξουριδίνη (BrdU), όπως οι *FRA4B* και *FRA10C*, η οποία αποτελεί ανάλογο της θυμιδίνης, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, που ενσωματώνεται στο DNA, αντικαθιστώντας την.
- Στις θέσεις που επάγονται από την 5-αζακυτιδίνη, όπως οι *FRA1H* και *FRA9F*, η οποία αποτελεί ανάλογο της κυτισίνης, που ενσωματώνεται στην αλληλουχία του DNA, αντικαθιστώντας την κυτοσίνη κατά την διαδικασία της αντιγραφής (Sutherland et al. 1985).

Όσον αφορά την μοριακή βάση καθεμιάς από τις τρεις ομάδες των κοινών εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων, μόνο οι επαγόμενες από την αφιδικολίνη είναι αυτές που έχουν χαρακτηριστεί σε μοριακό επίπεδο. Οι κοινές εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις, που έχουν αναλυθεί έως σήμερα, περιλαμβάνουν πολλές περιοχές DNA με υψηλή ευελιξία περιστροφής. Αυτές απαρτίζονται από μη-συνεχόμενες αλληλουχίες πλούσιες σε δινουκλεοτίδια A/T, ποικίλων μεγεθών, και έχουν την δυνατότητα να σχηματίσουν ασυνήθιστες δευτερογενείς δομές DNA, που είναι ικανές να παρεμποδίσουν την επιμήκυνση της αντιγραφής (Zlotorynski et al. 2003), επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τον βαθμό αναδίπλωσης της χρωματίνης και τελικά συμβάλλοντας στον μηχανισμό ευθραυστότητας (Krajewski 1995; Krajewski and Ausió 1997).

### **B. Σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις**

Οι σπάνιες χρωμοσωμικές θέσεις εντοπίζονται σε ποσοστό μικρότερο του 5%, του πληθυσμού, ενώ κληρονομούνται με μεντελικό τρόπο (Sutherland 2003).

Μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί περίπου 30 σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις (Schwartz et al. 2006). Η συντριπτική πλειοψηφία αυτών είναι θέσεις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ. Πιο αναλυτικά:

- Οι ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις, στις οποίες ανήκουν μεταξύ άλλων οι *FRAXA*, *FRAXE* και *FRA10A*, επάγονται σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας το οποίο παρουσιάζει έλλειψη φυλλικού οξέος και θυμιδίνης και κατ'επέκταση αποτελεί θρεπτικό μέσο με μειωμένα επίπεδα τριφωσφορικής θυμιδίνης (dTTP) ή τριφωσφορικής κυτιδίνης (dCTP), δύο απαραίτητα συστατικά του DNA. Επίσης, η επαγωγή είναι δυνατόν να επιτευχθεί με θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο, είτε με μεθοτρεξάτη, που αποτελεί αναστολέα του μεταβολισμού του φυλλικού οξέος, είτε με φθοροδεοξουριδίνη (FrdU), που αποτελεί αναστολέα της σύνθεσης της θυμιδίνης.
- Οι μη-ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις, στις οποίες ανήκουν μεταξύ άλλων οι *FRA16B* και *FRA10B*, κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τις συνθήκες επαγωγής τους. Αυτές είναι:
  - α) οι θέσεις που επάγονται από την δισταμυκίνη A και συγγενικές ενώσεις, που είναι γνωστό ότι προσδένονται με υψηλή συγγένεια στην μικρή αύλακα του DNA των αλληλουχιών που είναι πλούσιες σε A/T, παρεμποδίζοντας την αντιγραφή του DNA.
  - β) οι θέσεις που επάγονται από την βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU), η οποία μπορεί να προκαλέσει παύση της αντιγραφής του DNA, μέσω ενσωμάτωσής της σε αυτό, αντικαθιστώντας την θυμιδίνη, αφού αποτελεί ανάλογό της.
  - γ) οι θέσεις που επάγονται τόσο από την δισταμυκίνη A, όσο και από την βρωμοδεοξουριδίνη (Sutherland and Richards 1995; Schwartz et al. 2006; Lukusa and Fryns 2008).

Όσον αφορά την μοριακή βάση καθεμιάς από τις 2 ομάδες σπάνιων εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων, οι ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ παρουσιάζουν επέκταση του επαναλαμβανόμενου τρινουκλεοτιδίου CCG/CGG, με τον αριθμό των αντιγράφων να ποικίλλει μεταξύ των ατόμων (Sutherland and Richards 1995; Sutherland 2003). Οι μη-ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, από την άλλη, εμφανίζουν επέκταση μινιδουροφόρου πλούσιου σε δινουκλεοτίδια A/T (Yu et al. 1997; Hewett et al. 1998). Και στις δύο περιπτώσεις, όσο μεγαλύτερη είναι η επέκταση της επανάληψης, τόσο μεγαλύτερη είναι η γονιδιωματική αστάθεια, καθώς και η πιθανότητα για περαιτέρω επέκταση, ενώ ευνοϊκός είναι και ο ρόλος της καθαρότητας της επέκτασης, δηλαδή το κατά πόσο μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μοτίβων παρεμβάλλονται άλλες αλληλουχίες, στην ανάπτυξη της αστάθειας (Eichler et al. 1995; Nancarrow et al. 1995). Άμεση συνέπεια είναι η δημιουργία ασυνήθιστων δευτεροταγών δομών DNA, που

παρεμποδίζουν την επιμήκυνση της αντιγραφής και τελικά οδηγούν σε μη αποτελεσματικό σχηματισμό των νουκλεοσωμάτων και σε φαινόμενα αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης (Usdin and Woodford 1995; Samadashwily et al. 1997). Ο σχηματισμός των δομών αυτών εξαρτάται από το μήκος της επαναλαμβανόμενης περιοχής, καθώς και την καθαρότητά της, με τον ίδιο τρόπο με τον οποίο επηρεάζουν την επέκταση της επανάληψης. Δηλαδή, όσο μεγαλύτερη και καθαρότερη είναι η επέκταση της επανάληψης, τόσο πιθανότερο είναι να διαμορφωθούν αυτές οι δευτεροταγείς δομές (Gacy et al. 1995; Pearson et al. 1998).

### **2.3 Κλινική σημασία σπάνιων εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων ευαίσθητων στο φυλλικό οξύ**

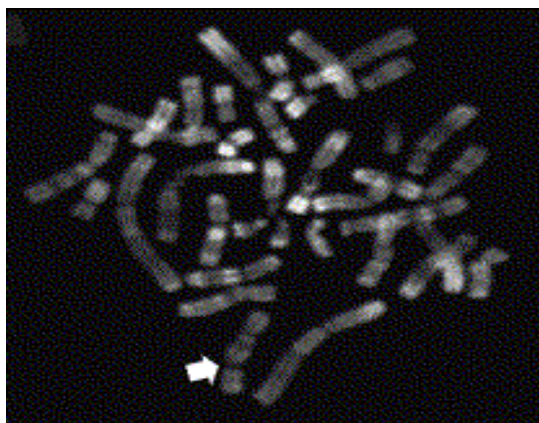
Υπάρχουν δύο σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις ευαίσθητες στο φυλλικό, που έχει αποδειχθεί ότι έχουν κλινική σημασία. Η πρώτη και πιο γνωστή είναι η θέση *FRAXA* (Xq27.3), που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X και σχετίζεται με το σύνδρομο εύθραυστου χρωμοσώματος X. Το σύνδρομο αυτό συνιστά την πιο κοινή μορφή οικογενούς νοητικής καθυστέρησης (Verkerk et al. 1991), επηρεάζοντας 1 στα 4000 θηλυκά άτομα και 1 στα 6000 αρσενικά άτομα (Turner et al. 1996). Το γονίδιο που παρουσιάζει βλάβη στο σύνδρομο αυτό είναι το *FMR1* (Verkerk et al. 1991), το οποίο έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στο 15-20% των διάφορων μορφών νοητικής υστέρησης, που σχετίζονται με το χρωμόσωμα X (Turner et al. 1996). Έχουν αναγνωρισθεί ασθενείς με σύνδρομο εύθραυστου χρωμοσώματος X, που παρουσιάζουν ελλείμματα εσωτερικά του γονιδίου *FMR1* (Gedeon et al. 1992; Wohrle et al. 1992) ή σημειακές μεταλλάξεις σε αυτό (Kristel De Bouille et al. 1993), γεγονός που υποδεικνύει ότι το σύνδρομο αυτό αποτελεί διαταραχή στην οποία εμπλέκεται ένα μόνο γονίδιο, το *FMR1*, του οποίου η λειτουργία εξαλείφεται, ανεξάρτητα του εμπλεκόμενου μηχανισμού (Lukusa and Fryns 2008). Η δεύτερη είναι η θέση *FRAXE* (Xq28), που επίσης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X κοντά στην εύθραυστη θέση *FRAXA*, που έχει συσχετιστεί με ήπια μορφή νοητικής υστέρησης, ενώ το εμπλεκόμενο γονίδιο στην περίπτωση αυτή είναι το *FMR2* (Gecz et al. 1996). Για τις υπόλοιπες σπάνιες εύθραυστες θέσεις, ευαίσθητες και μη στο φυλλικό οξύ, συμπεριλαμβανομένου και της εύθραυστης χρωμοσωμικής θέσης *FRA10A*, έχει βρεθεί συσχέτιση με παθολογικό φαινότυπο, χωρίς όμως να υπάρχουν επαρκείς μελέτες για να την επιβεβαιώσουν (Lukusa and Fryns 2008).

### **2.4 Η εύθραυστη χρωμοσωμική θέση *FRA10A***

Στην κατηγορία των σπάνιων εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων του ανθρώπου, που παρουσιάζουν ευαισθησία στο φυλλικό οξύ, ανήκει η θέση *FRA10A*, η οποία χαρτογραφείται στην περιοχή 23.3 του μεγάλου βραχίονα του

χρωμοσώματος 10 (10q23.3) (Εικόνα 2.4.1) (Sarafidou et al. 2004). Η θέση *FRA10A* είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη στον πληθυσμό μεταξύ των σπάνιων αυτοσωμικών εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων με ευαισθησία στο φυλλικό οξύ, με συχνότητα εμφάνισης περίπου 1 στα 500 άτομα (Sutherland 1982).

Χαρτογράφηση με την μέθοδο FISH (Fluorescent in situ hybridization) τοποθέτησε την εύθραυστη χρωμοσωμική θέση *FRA10A* σε μια περιοχή περίπου 50kb με μία μοναδική (CGG)<sub>n</sub> επανάληψη, η οποία έχει δειχθεί ότι εντοπίζεται στην 5' αμετάφραστη περιοχή ενός γονιδίου, του *FRA10AC1*. Η επανάληψη αυτή φαίνεται να είναι πολυμορφική, με τέσσερα διαφορετικά αλληλόμορφα να έχουν αναγνωριστεί μεταξύ των ατόμων, καθένα από τα οποία φέρει 8, 9, 10 και 14 επαναλήψεις του τρινουκλεοτιδίου CGG/CCG, αντίστοιχα. Η επέκταση αυτής της επανάληψης έχει ως άμεση συνέπεια την επαγωγή της θέσης *FRA10A*. Τα αλληλόμορφα με την επέκταση ξεπερνούν σε μέγεθος τα φυσιολογικά αλληλόμορφα κατά 600-800bp, οπότε ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μονάδων CGG/CCG στην θέση *FRA10A* εκτιμάται ότι ανέρχεται τουλάχιστον στις 200, γεγονός που οδηγεί στην υπερμεθυλίωση της περιοχής και τη μεταγραφική καταστολή του αντίστοιχου αλληλομόρφου (Sarafidou et al. 2004).



**Εικόνα 2.4.1:** Κυτταρογενετικός εντοπισμός της σπάνιας εύθραυστης θέσης *FRA10A* με ζώνωση R σε μεταφασικά χρωμοσώματα. Φαίνεται η *FRA10A* ως ένα σαφές χάσμα (βέλος) στη χρωμοσωμική θέση 10q23.3 (Sarafidou et al. 2004).

### 2.5 Κλινική σημασία εύθραυστης χρωμοσωμικής θέσης *FRA10A*

Όπως συμβαίνει και με κάποιες άλλες αυτοσωμικές εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις αυτής της κατηγορίας, έχει δειχθεί ότι πιθανώς σχετίζεται με νοητική υστέρηση και με αναπτυξιακές ανωμαλίες, όπως πολλαπλές δυσμορφίες, μικρό ανάστημα και υποσπαδία. Στην συντριπτική πλειοψηφία, παρατηρείται μητρική κληρονομηση, όταν μελετήθηκαν και οι οικογένειες των ασθενών ατόμων (Sutherland 1982; Sutherland 1985; Petit et al. 1986; Mavrou et al. 1991). Τα

επίπεδα μωσαϊκισμού, ωστόσο, μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των ατόμων της ίδιας οικογένειας, καθώς και ανάμεσα στους διαφορετικούς ιστούς ενός ατόμου (Leon-Luis et al. 2005).

### **2.6 Ανάλυση του γονιδίου *FRA10AC1*, που εντοπίζεται στην εύθραυστη χρωμοσωμική θέση *FRA10A***

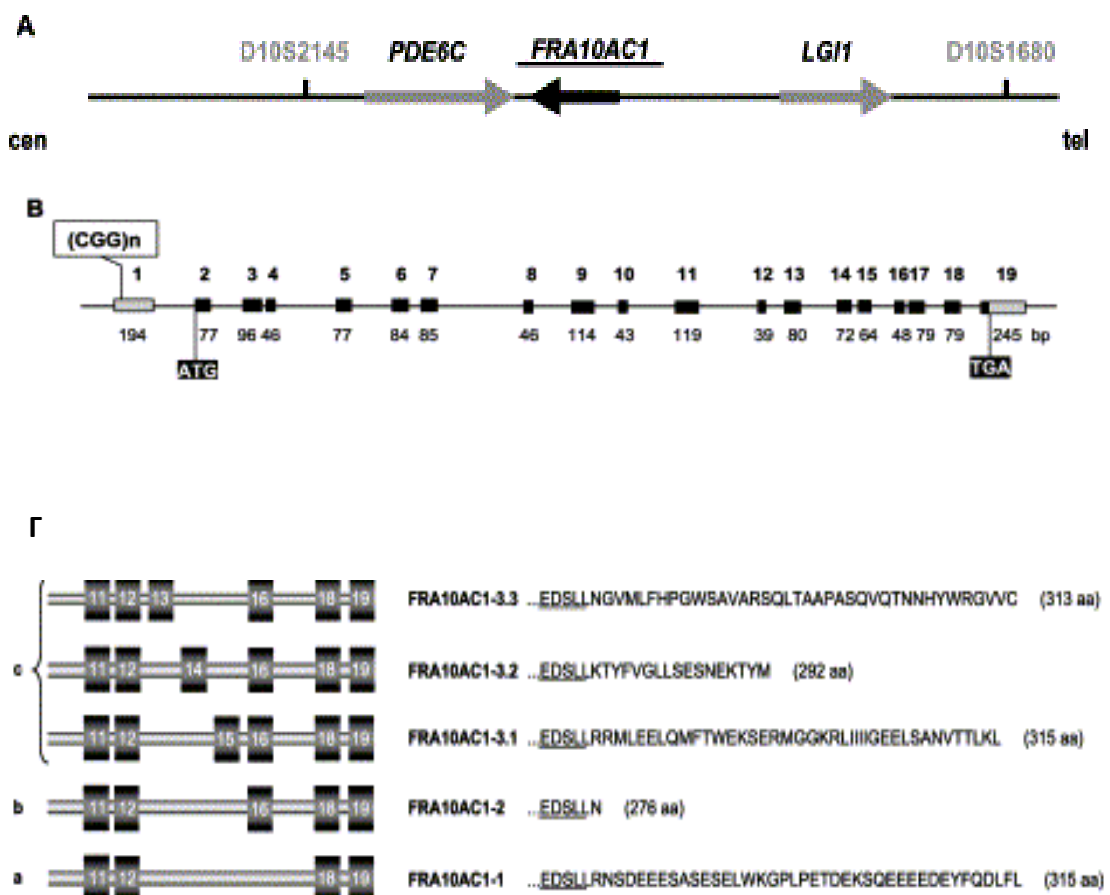
Η επανάληψη του τρινουκλεοτιδίου CGG/CCG, εντοπίζεται στο εξόνιο 1 του γονιδίου *FRA10AC1* εντός της 5' αμετάφραστης περιοχής κι αποτελεί κομμάτι της νησίδας CpG, που υφίσταται υπερμεθυλίωση, έπειτα από την επέκταση της επανάληψης.

Το γονίδιο *FRA10AC1* καταλαμβάνει περίπου 33kb και χαρτογραφείται ανάμεσα στο γονίδιο *PDE6C*, το οποίο κωδικοποιεί τη φωσφοδιεστεράση 6C και στο γονίδιο *LGI1*, που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη πλούσια σε λευκίνη, η οποία σχετίζεται με μία αυτοσωμική επικρατή μορφή επιληψίας (Εικόνα 2.6.1.A). Το γονίδιο περιλαμβάνει 19 εξόνια, εκ των οποίων τα 4, (13, 14, 15 και 16), υφίστανται εναλλακτική συναρμογή (alternative splicing), ενώ το εξόνιο 17 έχει εντοπιστεί σε αλληλουχία μόνο EST από βάσεις δεδομένων. Όλα τα όρια ιντρονίων ακολουθούν τον κανόνα AG/GT στη θέση που πραγματοποιείται το συναρμογή, δηλαδή στα άκρα τους εντοπίζονται καλά συντηρημένες, πρότυπες αλληλουχίες, οι οποίες προσδιορίζουν τη φορά του εκάστοτε ιντρονίου, ώστε το συναρμογή να πραγματοποιείται τελικά μεταξύ των 5' και 3' θέσεων του ίδιου ιντρονίου.

Η μεταγραφή του γονιδίου *FRA10AC1* πραγματοποιείται με προσανατολισμό από το τελομερές προς το κεντρομερές. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, ξεκινά από το νουκλεοτίδιο 195bp, στην αρχή του εξονίου 2, ενώ το κωδικόνιο λήξης, ξεκινά από το νουκλεοτίδιο 1140bp, στο τέλος του εξονίου 19 (Εικόνα 2.6.1.B). Το κύριο μετάγραφο κωδικοποιεί πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από 315 αμινοξέα.

Έπειτα από ανάλυση Northern, χρησιμοποιώντας δύο ανιχνευτές εκ των οποίων ο πρώτος περιείχε τις πρώτες 616bp της 5' κωδικής περιοχής, ενώ ο δεύτερος κομμάτι του εξονίου 19, βρέθηκε ένα κύριο μετάγραφο, μήκους περίπου 1450bp, το οποίο εντοπίστηκε σε όλους τους ιστούς ενήλικου ατόμου, που αναλύθηκαν, υποδεικνύοντας την καθολική έκφραση του γονιδίου. Ωστόσο, υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου παρατηρήθηκαν στον εγκέφαλο, την καρδιά, τους σκελετικούς μύες, τους νεφρούς και το συκώτι, ενώ χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου βρέθηκαν στο κόλον, τον θύμο αδένα, τον σπλήνα, το λεπτό έντερο, τον πλακούντα και τους πνεύμονες. Παράλληλα, στα λεμφοκύτταρα το συγκεκριμένο μετάγραφο ήταν οριακά ανιχνεύσιμο.

Ωστόσο, με RT-PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδοποιούνται στα εξόνια 11 και 19, εντοπίστηκαν εναλλακτικά μετάγραφα τα οποία δεν είχαν ταυτοποιηθεί με την ανάλυση Northern, στο πάγκρεας, τις ωθήκες, τον προστάτη και τα λευκοκύτταρα σε χαμηλότερα όμως επίπεδα. Έπειτα και από ανάλυση των αλληλουχιών, προέκυψε ότι τα 5 αυτά εναλλακτικά μετάγραφα είναι αποτέλεσμα εναλλακτικής συναρμογής μεταξύ των εξονίων 13 και 16. Πιο αναλυτικά, το πιο άφθονο μετάγραφο, περιλαμβάνει τα εξόνια 1-12, 18 και 19. Το δεύτερο μετάγραφο που εντοπίστηκε σχεδόν σε όλους τους ιστούς, περιλαμβάνει το εξόνιο 16 μεταξύ των εξονίων 12 και 18. Τέλος, βρέθηκαν τρία εναλλακτικά μετάγραφα, αποκλειστικά στις ωθήκες, που περιλαμβάνουν το εξόνιο 16 σε συνδυασμό με τα εξόνια 13, 14 και 15 αντίστοιχα. Όλα αυτά τα εναλλακτικά μετάγραφα οδηγούν σε διαφορετική ακολουθία αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο, γεγονός που συνεπάγεται αντίστοιχο αριθμό ισομορφών της πρωτεΐνης FRA10AC1 (Εικόνα 2.6.1.Γ) (Sarafidou et al. 2004).



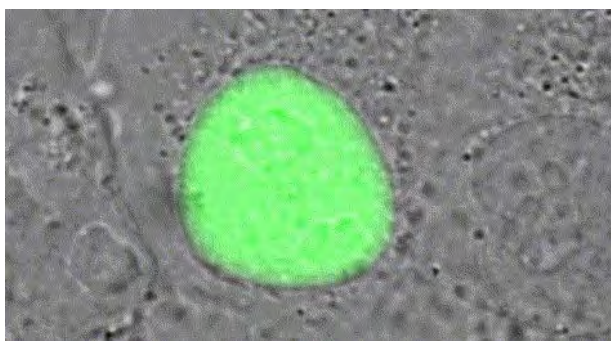
**Εικόνα 2.6.1:** **A)** Σχηματική αναπαράσταση της γονιδιωματικής περιοχής, που περιλαμβάνει τα γονίδια FRA10AC1, PDE6C και LGI1, καθώς και την κατεύθυνση μεταγραφής τους. **B)** Η δομή εξονίων - ιντρονίων του γονιδίου FRA10AC1. Τα εξόνια παρουσιάζονται με κουτάκια, οι κωδικές και μη κωδικές περιοχές των εξονίων με μαύρο και γκρι χρώμα αντίστοιχα. Επίσης φαίνεται το μέγεθος κάθε

εξονίου, ενώ απεικονίζονται τα κωδικόνια έναρξης και λήξης της μετάφρασης, καθώς και η επανάληψη  $(CGG)_n$ . Γ) Σχηματική αναπαράσταση των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου (αριστερά) και των παραγόμενων πρωτεϊνών (δεξιά). Τα αμινοξέα, που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 12, κοινά για όλα τα εναλλακτικά μεταγραφα του γονιδίου *FRA10AC1*, είναι υπογραμμισμένα (Sarafidou et al. 2004).

Το γονίδιο *FRA10AC1* είναι πολύ συντηρημένο και με ευρεία έκφραση στους μονοκύτταρους και πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ενώ δεν έχει παράλογα γονίδια στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

### 2.7 Πρωτεΐνη *FRA10AC1*

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη *FRA10AC1*, εντοπίζεται στον πυρήνα, όπως έχει δειχθεί με παροδική διαμόλυνση με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, που εξέφραζε την χιμαιρική πρωτεΐνη *FRA10AC1*-EGFP (enhanced green fluorescent protein) σε κυττάρων COS-7, που προέρχονται από νεφρικό ιστό του πιθήκου *Cercopithecus aethiops* (Εικόνα 2.7.1).



**Εικόνα 2.7.1:** Υποκυτταρικός εντοπισμός της χιμαιρικής πρωτεΐνης *FRA10AC1*-EGFP στον πυρήνα, με μικροσκόπιο φθορισμού. Το κύτταρο που απεικονίζεται είναι της σειράς COS-7 και έχει διαμολυνθεί παροδικά με το αντίστοιχο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (Sarafidou et al. 2004).

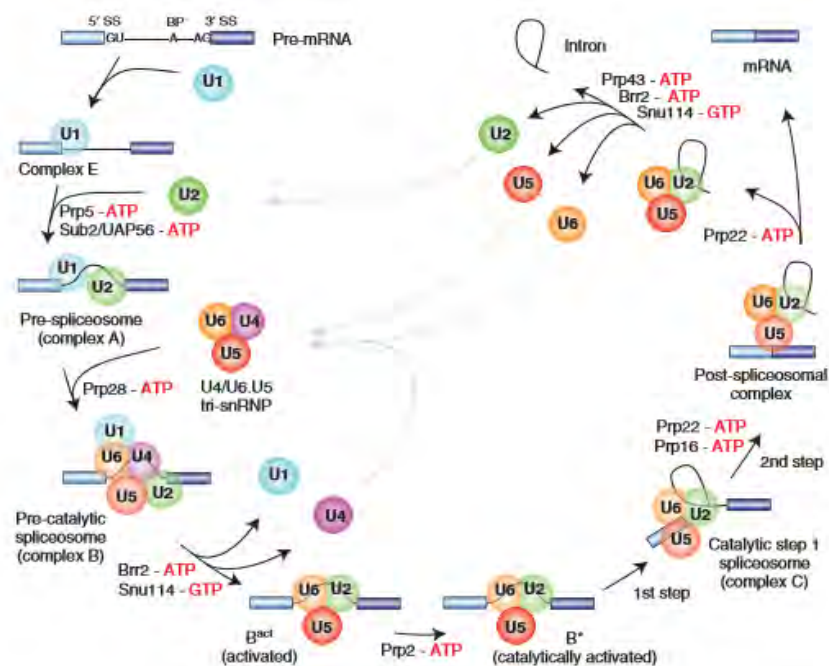
Η πρωτεΐνη *FRA10AC1*, έπειτα από απομόνωση παρασκευασμάτων του σωματίου συναρμογής (spliceosome) και ανάλυση φασματομετρίας μάζας, με στόχο τον προσδιορισμό και την ανάλυση των συστατικών του σωματίου, ταυτοποιήθηκε ως συστατικό του σωματίου συναρμογής, και ειδικότερα των συμπλόκων  $B_{act}$  (Bessonov et al. 2010), C (Bessonov et al. 2008, 2010, Ilagan et al. 2013, Schmidt et al. 2014, Wahl and Lührmann 2015,) και P (Ilagan et al. 2013). Επίσης έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά άμεσα με παράγοντες συναρμογής, αλλά και γενικότερα με πρωτεΐνες που σχετίζονται με την επεξεργασία του πρόδρομου mRNA (Διδακτορική διατριβή Ελένης Γαλλιοπούλου, Τμήμα

Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας 2018). Το γεγονός αυτό είναι σε συμφωνία με τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης FRA10AC1 στον πυρήνα, καθώς και με το ότι η πρωτεΐνη είναι συντηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι οποίοι χρησιμοποιούν τη διαδικασία της συναρμογής για την ωρίμανση των πρόδρομων μεταγράφων, σε αντίθεση με τους προκαρυωτικούς οργανισμούς και υποδεικνύει ότι πιθανότατα συμμετέχει στην επεξεργασία mRNA.

Το U2-εξαρτώμενο σωματίο συναρμογής, με το οποίο συσχετίζεται και η πρωτεΐνη FRA10AC1, είναι ένα σύμπλεγμα ριβονουκλεοπρωτεϊνών (RNP), το οποίο συνίσταται από πέντε μικρά πυρηνικά μόρια RNA (snRNA), τα U1, U2, U4, U5 και U6, τα οποία συνδέονται το καθένα με επτά ειδικές πρωτεΐνες, τις λεγόμενες Sm πρωτεΐνες, διαμορφώνοντας, με αυτόν τον τρόπο, τα αντίστοιχα μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (snRNP), U1, U2, U4, U5 και U6, τα οποία αλληλεπιδρούν με το πρόδρομο mRNA. Εξαιρεση αποτελεί το U6 snRNA, που συνδέεται με μια ομάδα πρωτεϊνών παρόμοιων με τις Sm, που ονομάζονται Sm-like ή LSm. Άλλες μη-snRNP πρωτεΐνες, παίζουν επίσης σπουδαίο ρόλο στη συναρμολόγηση και τη λειτουργία του σωματίου συναρμογής και φαίνεται ότι ποικίλουν μεταξύ των διάφορων συμπλόκων snRNP. Η στρατολόγηση αυτών των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (snRNP) πάνω στο πρόδρομο mRNA πραγματοποιείται σταδιακά και με καθορισμένη σειρά. Αρχικά, το U1 snRNP προσδένεται στο πρόδρομο mRNA, μέσω αλληλεπίδρασης του 5' άκρου του U1 snRNA με την 5' θέση ματίσματος του ιντρονίου. Η πρώτη αυτή φάση περιλαμβάνει, επίσης, την πρόσδεση του βοηθητικού παράγοντα U2AF, καθώς και της μη- snRNP πρωτεΐνης SF1/BBP με την περιοχή ανάμεσα στην θέση διακλάδωσης (BS) και στην αλληλουχία πολυπυριμιδινών (PPT), που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω της καρβοξυτελικής περιοχής του RNA. Οι μοριακές αυτές αλληλεπιδράσεις οδηγούν στην διαμόρφωση του **συμπλόκου E** και παίζουν κρίσιμο ρόλο στην πρωταρχική αναγνώριση των 5' και 3' θέσεων συναρμογής του ιντρονίου. Μετά τον σχηματισμό του συμπλόκου E, το U2 snRNA αλληλεπιδρά με την θέση διακλάδωσης (BS) του πρόδρομου mRNA, οδηγώντας στην δημιουργία του **συμπλόκου A** (Wahl, Will, and Lührmann 2009, Will and Lührmann 2011). Η δομή αυτή σταθεροποιείται κυρίως με την βοήθεια πρωτεϊνών του U2 snRNP, των SF3a και SF3b (Gozani et al. 1996). Οι πρωτεΐνες αυτές έχει προταθεί ότι παρεμποδίζουν την πρόωρη πυρηνόφιλη προσβολή, πριν την πρώτη αντίδραση εστεροποίησης, παρέχοντας στο σωματίο συναρμογής τον απαραίτητο χρόνο, ώστε να διαμορφώσει κατάλληλα το καταλυτικό του κέντρο (Lardelli et al. 2010). Στη συνέχεια, στο πρόδρομο αυτό σωματίο συναρμογής συνδέεται ένα τριμερές σύμπλοκο (tri-snRNP), τα οποία αποτελείται από τα U5 και U4/U6 snRNP, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του **συμπλόκου B**. Παρόλο που όλα τα snRNP είναι παρόντα στο σύμπλοκο B, αυτό



παραμένει καταλυτικά ανενεργό και απαιτεί σημαντικές τροποποιήσεις, όσον αφορά στην σύσταση και στην διαμόρφωση του, ώστε να καταστεί ικανό να διευκολύνει το πρώτο βήμα της συναρμογής. Πραγματοποιούνται, συνεπώς, αλλαγές όσον αφορά στις αλληλεπιδράσεις RNA-RNA και RNA-πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τα U1 και U4 snRNP να αποσταθεροποιούνται ή να απελευθερώνονται, δημιουργώντας το ενεργοποιημένο σωματίο συναρμογής (**σύμπλοκο B<sup>act</sup>**). Η επακόλουθη καταλυτική ενεργοποίηση από την RNA ελικάση της οικογένειας DEAD-Box, την Prp2, οδηγεί στον σχηματισμό του **συμπλόκου B\***, το οποίο καταλύει το πρώτο εκ των δύο βημάτων της συναρμογής, δίνοντας γένεση στο **σύμπλοκο C**, το οποίο με τη σειρά του καταλύει το δεύτερο βήμα της συναρμογής, έπειτα από επιπρόσθετες ανακατατάξεις (Wahl, Will, and Lührmann 2009, Will and Lührmann 2011). Πριν την ολοκλήρωση και του δεύτερου βήματος της συναρμογής, δηλαδή μετά την συνένωση δύο εξονίων και πριν την απελευθέρωση του παραγόμενου mRNA, σχηματίζεται το μετα-καταλυτικό **σύμπλοκο P**, το οποίο έχει δείχθει ότι δεν φέρει νέες πρωτεΐνες, σε σχέση με αυτές του συμπλόκου C (Ilagan et al. 2013). Ακολούθως, το σωματίο συναρμογής διαλύεται και τα U2, U5 και U6 snRNP ανακυκλώνονται για επιπλέον κύκλους συναρμογής (Εικόνα 2.7.3) (Wahl, Will, and Lührmann 2009, Will and Lührmann 2011).



**Εικόνα 2.7.3:** Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού συναρμογής του πρόδρομου mRNA. Τα κουτιά και οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τα εξόνια και τα ιντρόνια, αντίστοιχα, ενώ στην εικόνα αναπαριστώνται, τόσο οι snRNP, όσο και οι μη-snRNP παράγοντες που συμμετέχουν στην διαδικασία (Will and Lührmann 2011).

Για να πραγματοποιηθεί συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου, δηλαδή για να προσδιοριστεί εάν η κατάσταση απλοανεπάρκειας σχετίζεται με νοητική υστέρηση, είναι απαραίτητη η δημιουργία ενός ζωικού μοντέλου ποντικού knockout με απαλοιφή του ορθόλογου γονιδίου *Fra10ac1*. Επιπλέον, Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να προσδιοριστεί και ο βιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης FRA10AC1. Σε αυτό το πλαίσιο έχει δημιουργηθεί μοντέλο ποντικού knockout με απενεργοποιημένο το ορθόλογο γονίδιο *Fra10ac1*, έπειτα από στόχευση του ενδογενούς αλληλομόρφου, μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Embryonic stem cells, ES) ποντικού στελέχους C57BL6/N, τα οποία προήλθαν από το European Conditional Mouse Mutagenesis Program (EUCOMM). Η δημιουργία του ζωικού μοντέλου πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της Υποδομής INFRAFRONTIER GR (<http://www.infrafrontier.gr/>), ενώ κατεψυγμένα σπερματοζωάρια από αρσενικά ετερόζυγα *Fra10Ac1* knockout ενήλικα ζώα έχουν κατατεθεί στην EMMA (European Mouse Mutant Archive).

## **2.8 Στρατηγική δημιουργίας ποντικών knockout**

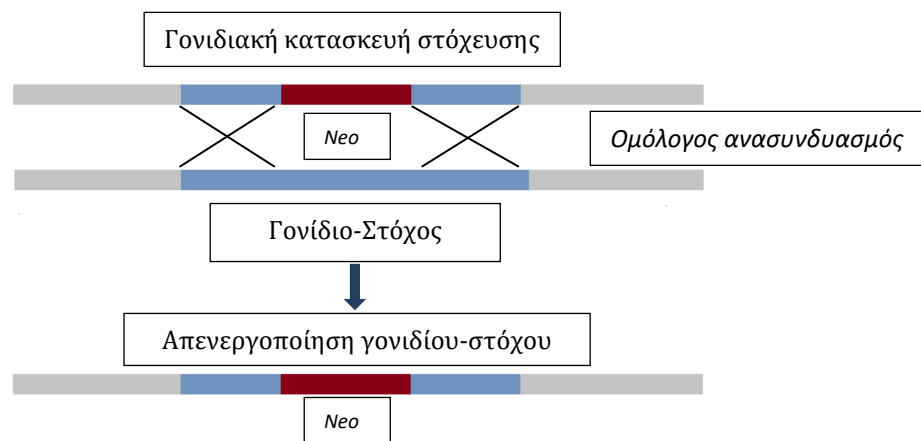
Ο ποντικός συνιστά καλό μοντέλο για τις περισσότερες ανθρώπινες βιολογικές διαδικασίες και αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την μελέτη γενετικών νόσων και την ανάπτυξη κατάλληλης θεραπείας για αυτές, εφόσον πάνω από το 90% των γονιδιωμάτων του ποντικού και του ανθρώπου φέρει συνταϊνιακές περιοχές, που αντιπροσωπεύουν τμήματα στα οποία η διάταξη και ο προσανατολισμός των γονιδίων έχει διατηρηθεί και στα δύο είδη (Waterston et al. 2002). Επίσης, σε σχέση με άλλα θηλαστικά, η χρήση ποντικών για ερευνητικούς σκοπούς προτιμάται λόγω: α) του μικρού μεγέθους τους, β) της μειωμένης απαίτησης πόρων για την συντήρησή του, γ) της καταλληλότητας τους για αναπαραγωγή εντός εργαστηριακού περιβάλλοντος, δ) του μικρού χρόνου παραγωγής τους και τέλος ε) του σύντομου χρόνου ζωής τους (Coleman et al. 2015).

Πιο αναλυτικά, τα βήματα που ακολουθούνται για την δημιουργία ποντικών knockout είναι τα εξής:

1. Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem cells, ES cells) απομονώνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα (inner cell mass) της βλαστοκύστης, δηλαδή του εμβρύου 3.5 ημερών, το οποίο δεν έχει ακόμα εμφυτευθεί. Η βλαστοκύστη αποτελείται από δύο διακριτά μέρη: α) την εξωτερική επιφάνεια (τροφοεξώδερμα), από την οποία προέρχονται οι μεμβράνες, που περιβάλλουν το έμβρυο και β) την εσωτερική κυτταρική μάζα από την οποία προέρχονται τα κύτταρα που συνιστούν το έμβρυο. Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν και υπό ειδικές

συνθήκες παραμένουν αδιαφοροποίητα, έχοντας τη δυνατότητα, όταν εισάγονται σε άλλες βλαστοκύστες, να συμβάλουν στη παραγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων συμπεριλαμβανομένου κυττάρων της γαμετικής σειράς.

2. Η γονιδιακή απενεργοποίηση επιτυγχάνεται με την εισαγωγή γονιδιακής κατασκευής στόχευσης σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα, που περιλαμβάνει μεταξύ άλλων ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, καθώς και δύο περιοχές με αλληλουχίες ομόλογες ως προς αυτές που βρίσκονται στα άκρα του γονιδίου-στόχου, όπου θα γίνει ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ αυτών και του ενδογενούς γονιδίου. Επειδή ο ομόλογος ανασυνδυασμός, ωστόσο, αποτελεί ένα σπάνιο φαινόμενο στα ευκαρυωτικά κύτταρα (1 ομόλογος : 1000 ετερόλογους στα θηλαστικά), η χρήση δεικτών θετικής και αρνητικής επιλογής κρίνεται απαραίτητη για τον εμπλουτισμό των καλλιεργειών σε ανασυνδυασμένους κλώνους ES. Για να επιτευχθεί η στόχευση του γονιδίου η γονιδιακή κατασκευή εισάγεται με ηλεκτροπαλμό σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα, όπου αντικαθιστά το ενδογενές γονίδιο, μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Εικόνα 2.8.1) (Ντούνη, *Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας* 2009).

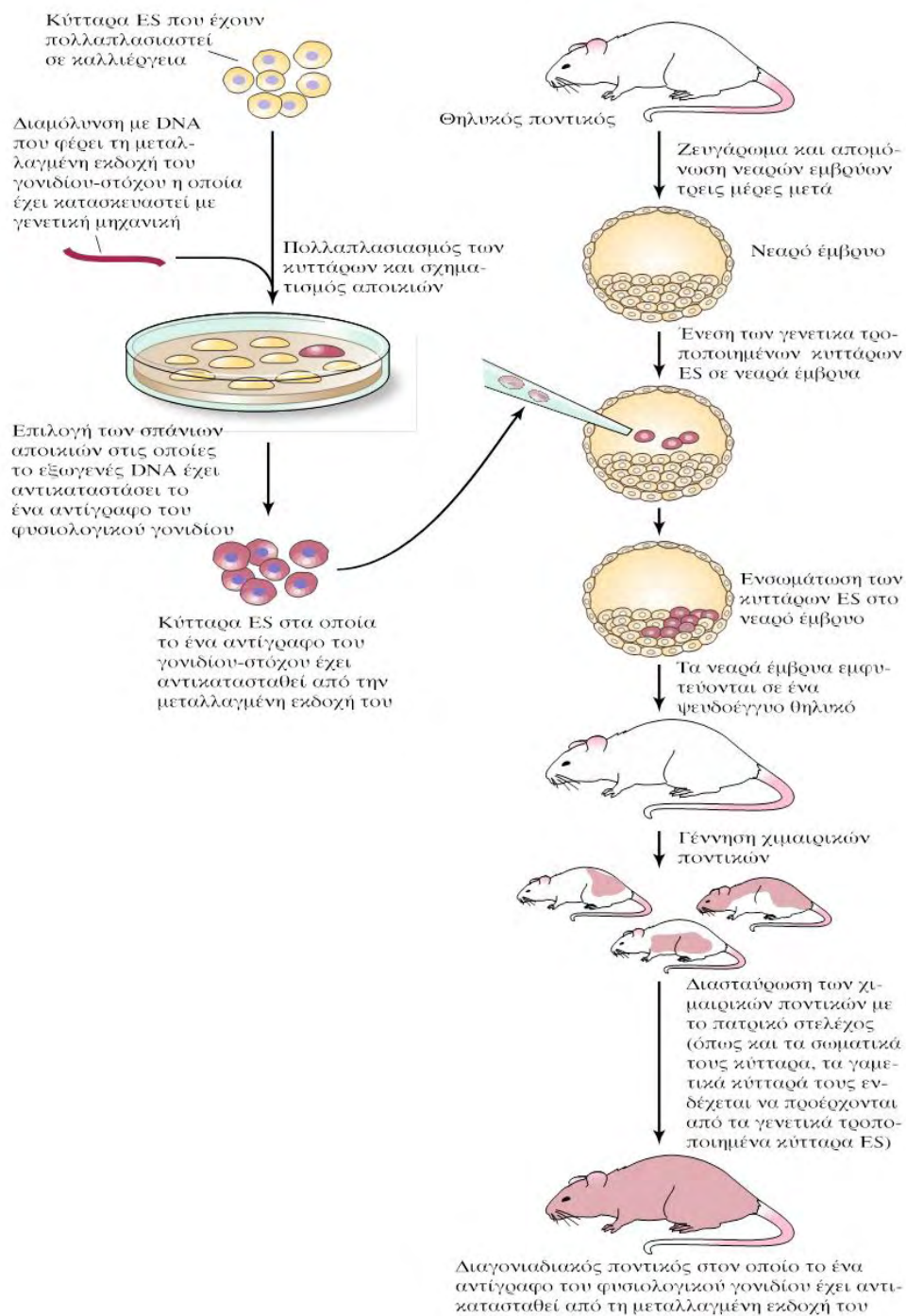


**Εικόνα 2.8.1:** Ομόλογος ανασυνδυασμός για την ένθεση της γονιδιακής κατασκευής στόχευσης, που περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό, την νεομυκίνη (Neo).

3. Παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών, τα περισσότερα κύτταρα πεθαίνουν, λόγω της μη-πρόσληψης ξένου DNA, ενώ από κάθε ένα κύτταρο που επιβιώνει δημιουργείται μία αποικία, η οποία επιλέγεται, απομονώνεται και καλλιεργείται, με στόχο την παραγωγή αρκετών κυττάρων της ίδιας γενετικής σύστασης και τον έλεγχο του ανασυνδυασμού.
4. Τα ανασυνδυασμένα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα, εισάγονται στο βλαστοκόκκο της βλαστοκύστης. Η μεταφορά των βλαστοκύστεων αυτών σε παρένθετες μητέρες θα οδηγήσει στη δημιουργία χιμαιρικών απογόνων, που θα φέρουν, δηλαδή, κύτταρα, τόσο από τη βλαστοκύστη, όσο και από τα τροποποιημένα κύτταρα ES.

5. Η κληρονομηση των τροποποιημένων γονιδίων στους απογόνους εξασφαλίζεται με την παραγωγή γαμετών, που προέρχονται από τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, ενώ με κατάλληλες διασταυρώσεις παράγονται ομόζυγα ζώα για τη μεταλλαγή που εισάχθηκε (Ντούνη, Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας 2009).

Η διαδικασία δημιουργίας ποντικών knockout, τέλος, συνοψίζεται στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 2.8.2):



**Εικόνα 2.8.2:** Η διαδικασία δημιουργίας ποντικών knockout (Watson et al. , *Ανασυνδυασμένο DNA* 2007).

Όσον αφορά στον ποντικό knockout για το γονίδιο *Fra10ac1*, η γονιδιακή κατασκευή στόχευσης, περιλαμβάνει, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.8.3 τα εξής:

- Τους 5' και 3' βραχίονες (5'arm και 3'arm, αντίστοιχα), που αποτελούν τις ομόλογες αλληλουχίες προς αυτές του γονιδίου-στόχου, οι οποίες είναι αναγκαίες, ώστε να πραγματοποιηθεί ο ομόλογος ανασυνδυασμός.
- Την κασέτα παγίδευσης lacZ (lacZ), η οποία περιέχει το γονίδιο *lacZ* του βακτηρίου *Escherichia coli*, που κωδικοποιεί το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση και κατά συνέπεια, εμβρυικά βλαστικά κύτταρα, που έχουν ενσωματώσει την γονιδιακή κατασκευή, μπορούν εύκολα να διακριθούν μετέπειτα από το χρώμα των αποικιών τους σε τρυβλία-δείκτες.
- Την κασέτα ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη (neo), η οποία προσδίδει ανθεκτικότητα στο φάρμακο και διευκολύνει την επιλογή των επιθυμητών εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, αφού τα κύτταρα που δεν ενσωμάτωσαν τη γονιδιακή κατασκευή θανατώνονται με την προσθήκη της νεομυκίνης στο μέσο καλλιέργειας.
- Την περιοχή IRES, που συνιστά ρυθμιστικό στοιχείο έκφρασης και βρίσκεται ανοδικά της κασέτας lacZ.
- Δύο περιοχές FRT (Flippase Recognition Target), που αποτελούν στόχο αναγνώρισης μιας τοποειδικής ρεκομπινάσης, της φλιπάσης (Flp), που καταλύει τον ανασυνδυασμό μεταξύ αυτών των ειδικών θέσεων, εντός των οποίων εντοπίζονται η κασέτα ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη και η κασέτα lacZ.
- Τρεις περιοχές loxP, οι οποίες που αποτελούν στόχο αναγνώρισης μιας άλλης τοποειδικής ρεκομπινάσης, της Cre, που καταλύει, επίσης, τον ανασυνδυασμό μεταξύ αυτών των ειδικών θέσεων, αφαιρώντας το τμήμα του DNA, που περικλείεται μεταξύ αυτών (Coleman et al. 2015).

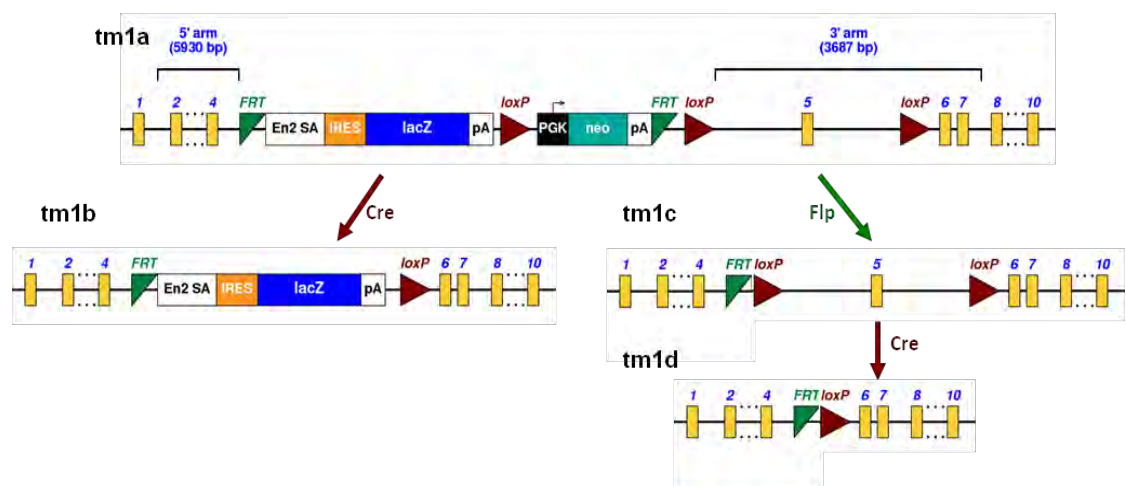
Το παραπάνω αλληλόμορφο, που προκύπτει, αναφέρεται ως "στοχευμένη μετάλλαξη 1α" (targeted mutation 1a) ή πιο σύντομα **tm1a** και ορίζεται ως το "πρώτο knockout", επειδή η ίδια η εισαγωγή της γονιδιακής κατασκευής στόχευσης αναμένεται να διαταράξει τη συναρμογή του γονιδίου-στόχου. Ο ανασυνδυασμός των περιοχών FRT και loxP επιτρέπει περαιτέρω χειρισμούς για αυτό το αλληλόμορφο (Coleman et al. 2015), οπότε μπορούν να πραγματοποιούνται κατάλληλες διασταυρώσεις, ώστε να απομακρυνθεί α) η κασέτα lacZ και η κασέτα neo, που έχει αναφερθεί ότι μπορούν να διαταράξουν ρυθμιστικές αλληλουχίες άλλων γονιδίων, οι οποίες εντοπίζονται ακόμα και σε

μεγάλη απόσταση (έως και 2.4 Mb) από το σημείο ένθεσης και να οδηγήσουν τελικά σε φαινοτυπικές επιδράσεις ανεξάρτητα από το γονίδιο που στοχεύεται (Pham et al. 1996) και β) το εξόνιο 5, που χαρακτηρίζεται ως κρίσιμης σημασίας, αφού εντοπίζεται στο πρώτο μισό της κωδικής περιοχής του γονιδίου, συμμετέχει σε όλα τα εναλλακτικά μετάγραφα και η αφαίρεσή του αλλάζει το πλαίσιο ανάγνωσης (Bradley et al. 2012).

Με την διασταύρωση ποντικών **tm1a** με ποντικούς που εκφράζουν την ρεκομπινάση Cre καθολικά, υπό τον έλεγχο του υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού του ανθρώπου (Cytomegalovirus, CMV), ο ανασυνδυασμός στις θέσεις loxP, έχει ως αποτέλεσμα τη απομάκρυνση, τόσο της κασέτας neo, όσο και του κρίσιμου εξονίου, οδηγώντας στην παραγωγή των ποντικών **tm1b**, που φέρουν το γονίδιο *lacZ*.

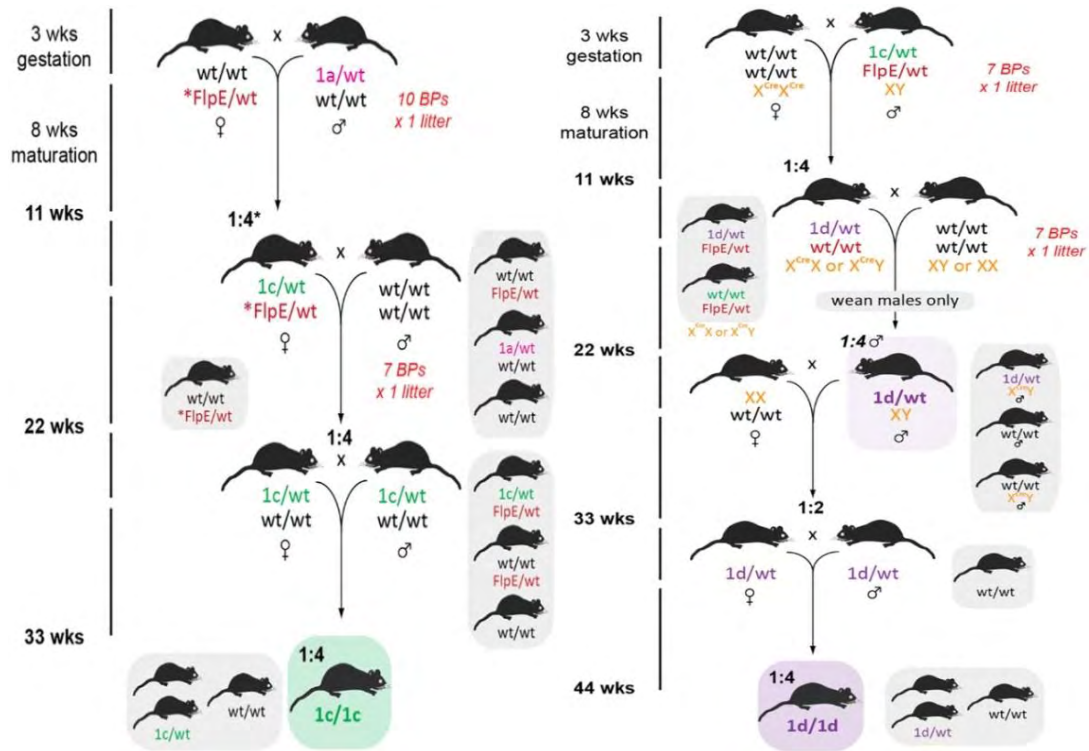
Για τη δημιουργία των ποντικών **tm1c** οι ποντικοί **tm1a** διασταυρώνονται με διαγονιδιακούς ποντικούς C57BL/6J, που εκφράζουν την ρεκομπινάση FLP1 (FlpE) σε όλους τους ιστούς, υπό τον έλεγχο του υποκινητή της β-ακτίνης του ανθρώπου. Όταν οι απόγονοι κληρονομούν, τόσο το αλληλόμορφο **tm1a**, όσο και το αλληλόμορφο FlpE, η περιοχή του **tm1a**, που πλαισιώνεται από θέσεις FRT, ανασυνδυάζεται και αποκόπτεται, με αποτέλεσμα την αφαίρεση της κασέτας *lacZ* και της κασέτας neo, καθώς και την αποκατάσταση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου. Αυτοί οι ποντικοί αναφέρονται και ως "floxed" και είναι ουσιαστικά αγρίου τύπου, με μόνη διαφορά μεταξύ του αλληλομόρφου τους και εκείνου των αγρίου τύπου, C57BL/6 ποντικών, να είναι η εισαγωγή των δύο loxP θέσεων, που πλαισιώνουν το κρίσιμο εξόνιο.

Η διασταύρωση των ποντικών **tm1c**, με ποντικούς που εκφράζουν την ρεκομπινάση Cre σε επιθυμητό ιστό ή κυτταρικό τύπο, υπό τον έλεγχο κατάλληλου υποκινητή, οδηγεί στην δημιουργία των ποντικών **tm1d**, δηλαδή, κατά συνθήκη knockout (conditional knockout) (Εικόνα 2.8.3 και 2.8.4) (Coleman et al. 2015).



**Εικόνα 2.8.3:** Το αλληλόμορφο tm1a, μετά από ομόλογο ανασυνδυασμό και τα αλληλόμορφα tm1b, tm1c και tm1d, έπειτα από την δράση των ρεκομπινασών Cre και Flp

(<https://www.mousephenotype.org/data/search/allele2?kw=%22FRA10Ac1%22#order2>).



**Εικόνα 2.8.4:** Παραγωγή της γενιάς των ποντικών tm1c και tm1d (Coleman et al. 2015).

### 3. Σκοπός

Η εργασία εντάσσεται στην ευρύτερη προσπάθεια κατανόησης της λειτουργίας του ανθρώπινου γονιδίου *FRA10AC1* και ειδικότερα της συσχέτισης της απλοανεπάρκειας με φαινότυπο νοητικής υστέρησης και αναπτυξιακών ανωμαλιών για τα άτομα-φορείς της εύθραυστης χρωμοσωμικής θέσης *FRA10A* στην οποία χαρτογραφείται το γονίδιο *FRA10AC1*. Για το λόγο αυτό δημιουργήθηκε ένα μοντέλο ποντικού knockout με απενεργοποιημένο το ορθόλογο γονίδιο *Fra10ac1*. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες διασταυρώσεις μεταξύ αγρίου τύπου και ετερόζυγων ποντικών-knockout, με στόχο να μεγαλώσουν οι αποικίες, καθώς και μεταξύ ετερόζυγων ποντικών-knockout, ώστε να διευκρινιστεί εάν η ομόζυγη knockout κατάσταση είναι συμβατή με τη ζωή ή όχι και να μπορέσουν τελικά να διενεργηθούν οι απαραίτητες δοκιμασίες συμπεριφοράς. Σκοπός στην παρούσα εργασία, συνεπώς, ήταν η γονοτύπηση δειγμάτων, τα οποία προέρχονταν από διασταυρώσεις, είτε μεταξύ αγρίου τύπου και ετερόζυγων ποντικών-knockout, έπειτα από μία διαδικασία επαναπαραγωγής (rederivation), είτε μεταξύ ετερόζυγων ποντικών-knockout και η βελτιστοποίηση της πολλαπλής PCR με στόχο την γονοτύπηση.



## 4. Υλικά-Μέθοδοι

### 4.1 Απομόνωση DNA από ιστό

Στην παρούσα εργασία απομονώθηκε ολικό DNA από ιστό ποντικού, 1mm της ουράς του. Τα δείγματα –στο σύνολο 29- συλλέχθηκαν και αποστάληκαν από το εργαστήριο του Δρ. Απόστολου Κλινάκη στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, όπου πραγματοποιούνται και όλες οι διασταυρώσεις των ζώων. Τα δείγματα αυτά είχαν επωαστεί με πρωτεΐνάση K σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

#### Υλικά:

- Απορρυπαντικό: Δωδεκασουλφουρικό νάτριο 1% (1% SDS)
- Πρωτεΐνάση K
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- ddH<sub>2</sub>O ("double-distilled water"/ δις απεσταγμένο νερό)
- Φαινόλη (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH ή PhOH)
- Χλωροφόρμιο (CHCl<sub>3</sub>)
- Οξικό Νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa)
- Αιθανόλη 70% (70% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH ή EtOH)

#### Μέθοδος:

Πιο αναλυτικά, η απομόνωση ολικού DNA, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα:

#### **1. Απομόνωση ζωικού ιστού, 1mm της ουράς του ποντικού.**

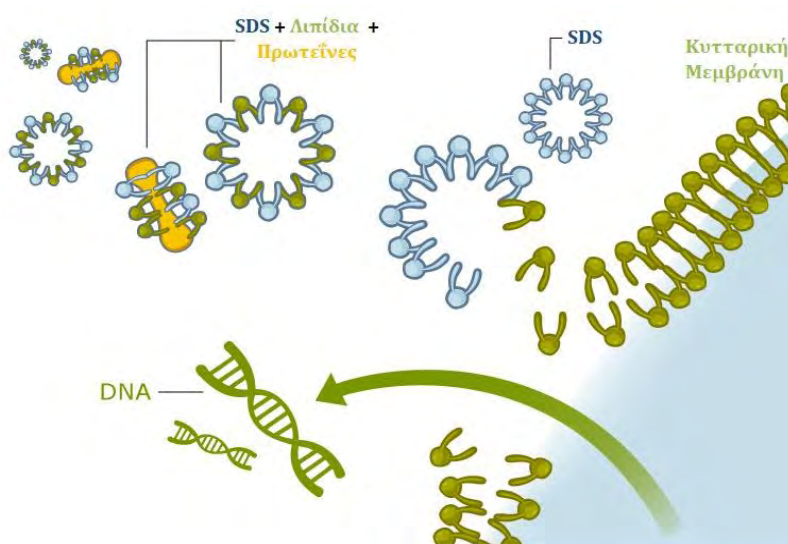
#### **2. Λύση των κυττάρων του ζωικού ιστού.**

Ακολούθησε, επώαση του ιστού σε 100μl κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος στους 56°C, ενώ την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε καλή ανάδευση ώστε να ακολουθήσουν τα επόμενα στάδια της απομόνωσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιλαμβάνει μεταξύ άλλων το δωδεκασουλφουρικό νάτριο τελικής συγκέντρωσης 1% w/v (1% SDS), καθώς και την πρωτεΐνάση K, ο ρόλος των οποίων διασαφηνίζεται παρακάτω:

- **1% SDS: Λύση των κυτταρικών μεμβρανών και της μεμβράνης του πυρήνα για να ελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα.**

Το 1% SDS προκαλεί λύση των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ δύναται να απομακρύνει, επίσης, τις ιστόνες από τα μόρια του DNA. Το SDS είναι

αμφιφατικό μόριο, το οποίο αποτελείται από μια υδρόφοβη ουρά και μια υδρόφιλη κεφαλή και δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας, διαταράσσοντας τους δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών. Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από μια διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών, καθώς και μικρής ποσότητας υδατανθράκων. Τα φωσφολιπίδια έχουν τις υδρόφιλες πολικές κεφαλές προς την εξωτερική υδατική φάση και τις υδρόφοβες λιπαρές ουρές προς το εσωτερικό της διπλοστιβάδας. Το SDS διασπά τη συνοχή των φωσφολιπιδίων, υδrolύοντας τα λιπαρά οξέα και διαλυτοποιεί τις πρωτεΐνες σχηματίζοντας σύμπλοκα ανάμεσα σ' αυτές και στο υδρόφοβο τμήμα του (Εικόνα 4.1.1). Οι δεσμευμένες με SDS πρωτεΐνες χάνουν την τριτοταγή δομή τους και επομένως τη λειτουργικότητά τους.



**Εικόνα 4.1.1:** Δράση απορρυπαντικού στην κυτταρική μεμβράνη

- **Πρωτεΐνάση K: Αποικοδόμηση κυτταρικών πρωτεϊνών με επίδραση πρωτεολυτικών ενζύμων.**

Η πρωτεΐνάση K αποτελεί το ένζυμο-κλειδί για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης. Η πρωτεΐνάση K δρα έναντι ενός ευρέος φάσματος ενδογενών πρωτεϊνών του κυττάρου και πήρε το όνομά της από την ιδιότητά της να διασπά την κερατίνη. Αποτελεί μια πρωτεάση σερίνης, που αναγνωρίζει και καταλύει τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού δίπλα στην καρβοξυλομάδα αλειφατικών, αρωματικών και άλλων υδρόφοβων αμινοξέων. Η πρωτεΐνάση K ενεργοποιείται από το ασβέστιο και ενώ τα ιόντα ασβεστίου δεν επηρεάζουν την ενζυμική δραστηριότητα, συνεισφέρουν σημαντικά στη σταθερότητά του ενζύμου. Ένα πλεονέκτημα της πρωτεΐνάσης K είναι ότι παραμένει δραστική ακόμη και παρουσία απορρυπαντικών, όπως το SDS,

καθώς και χηλικών παραγόντων, όπως το Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), το οποίο δεσμεύει μέταλλα, όπως το  $Mg^{2+}$ , που είναι απαραίτητα για τη δράση των ενδογενών νουκλεασών (DNAσων) του κυττάρου, που μπορεί να κατακερματίσουν το DNA κατά τη διαδικασία απομόνωσης, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τα νουκλεϊκά οξέα. Η πέψη των πρωτεϊνών, τελικά, θα ολοκληρωθεί μόνο εάν η περίοδος επώασης είναι μακρά και η συγκέντρωση του ενζύμου υψηλή αρκετά.

### **3. Απώλεια ηλεκτρικού φορτίου του DNA.**

Τα ιόντα  $Na^+$  του NaCl συνδέονται με τις φωσφορικές ομάδες των μορίων του DNA, εξουδετερώνοντας το ηλεκτρικό φορτίο των μορίων του DNA. Πραγματοποιήθηκε, συνεπώς, προσθήκη 37,5μl NaCl, το οποίο επιτρέπει στα μόρια του DNA να πλησιάσουν αντί να απομακρύνονται, διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο την καταβύθιση του DNA στο διάλυμα μετά την προσθήκη της αλκοόλης. Το μίγμα υπόκειται σε καλή ανάδευση και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα.

### **4. Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες.**

Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε μέσω οργανική εκχύλιση με διάλυμα φαινόλης-χλωροφορμίου. Τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με μία ή περισσότερες διαδοχικές εκχυλίσεις με τους οργανικούς διαλύτες φαινόλη και χλωροφόρμιο. Πιο αναλυτικά, η διαδικασία πραγματοποιείται ως εξής:

- Λαμβάνεται η μισή ποσότητα από το κάθε δείγμα, όπου τα κύτταρα έχουν ήδη λυθεί και σε αυτή συμπληρώνουμε με απεσταγμένο νερό μέχρι να συμπληρωθεί ο όγκος των 400μl.
- Ακολουθεί στιγμιαία φυγοκέντρηση (spin) για 2min στις 12.000rpm.
- Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης/χλωροφορμίου 1:1, 200μl φαινόλης και 200μl χλωροφορμίου και ύστερα από καλή ανάμιξη το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 10min σε 10.000rpm. Η φαινόλη ευνοεί την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό τους από το DNA ή το RNA. Η παράλληλη χρήση χλωροφορμίου ενισχύει την αποδιάταξη των πρωτεϊνών, ενώ συμβάλει ουσιαστικά στην απομάκρυνση των λιπιδίων. Η φυγοκέντρηση 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 μεσόφαση, η οποία είναι λευκή και ιξώδης και στην οποία συγκεντρώνεται συνήθως το μεγαλύτερο μέρος των πρωτεϊνών, καθώς αποτελείται και από υδρόφοβες

και από υδρόφιλες περιοχές και γ) την ανώτερη φάση, την υδατική (πολική) που περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα.

- Η υδατική φάση, περίπου 360μl, μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και επαναλαμβάνεται η διαδικασία, δηλαδή η προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης/χλωροφορμίου 1:1, 180μl φαινόλης και 180μl χλωροφορμίου αυτή τη φορά και στη συνέχεια, έπειτα από καλή ανάμιξη πάλι, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 10min στις 10.000rpm.
- Η υδατική φάση, περίπου 300μl, μεταφέρεται πάλι σε νέο σωλήνα και προστίθενται 2.5 όγκοι 70% αιθανόλης και 1/10 όγκοι 3M οξικού νατρίου pH 5,2. Το μίγμα επωάζεται στους -80°C για 20min. Κατά τον χρόνο αυτό τα μόρια του DNA συσσωματώνονται σε αδιάλυτα σύμπλοκα. Το προστεθέν άλας επίσης υποβοηθά την συσσωμάτωση λόγω του φαινομένου της εξαλάτωσης του DNA. Όμως, η αλκοόλη είναι η κύριος παράγοντας δημιουργίας συσσωματωμάτων, λόγω της αφυδάτωσης που προκαλεί. Προτιμάται οξικό άλας λόγω της εύκολης εξαέρωσής του κατά την φάση της αποξήρανσης του DNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στις 12.000rpm.
- Το DNA δημιουργεί ίζημα. Το υπερκείμενο αποχύνεται και στο ίζημα προστίθεται 1ml 70% αιθανόλης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C για 10min στις 11.000rpm. Η πλύση αυτή αποσκοπεί στο να απομακρυνθούν ίχνη του άλατος.
- Το υπερκείμενο αποχύνεται πάλι και επωάζεται στους 37°C για περίπου μία ώρα ή σε θερμοκρασία δωματίου ολονύκτια.
- Η διαδικασία ολοκληρώνεται με επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100μl απεσταγμένου νερού και φυλάσσεται σε θερμοκρασία -20°C.

#### **4.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**

##### Υλικά:

- Αγαρόζη
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Acetate Acid-EDTA 1x (TAE 1x) από πυκνό διάλυμα 50x [200mM Trishydroxymethyl aminomethane, 200mM Acetic Acid, 1mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) pH 8.0]
- Διάλυμα φθορίζουσας χρωστικής παρατήρησης [Serva Blue G (Kat.-Nr 39803)]

- Διάλυμα φόρτωσης [μπλε της βρωμοφαινόλης ή κυανό του ξυλενίου 6x (Bromophenol blue 1ml, 1% w/v TBE 20x 0,5ml, Glycerol 5ml και ddH<sub>2</sub>O έως τα 10ml)]
- DNA Ladder με κατάλληλο εύρος μοριακού βάρους

#### Μέθοδος:

Ο συνηθέστερος τρόπος ποσοτικού και ποιοτικού προσδιορισμού, τόσο του ολικού DNA που απομονώθηκε, όσο και των προϊόντων της PCR περιλαμβάνει ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel), η συγκέντρωση του οποίου εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA που ηλεκτροφορείται. Η μέθοδος είναι απλή και αποτελεσματική και επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA μεγέθους από 150 bp έως 25 kb.

Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης, που προέρχεται από φύκη (redalgae) και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στη βιολογία από τον Robert Koch, το 1882, ως καλλιεργητικό μέσο για τα βακτήρια της φυματίωσης. Τα πηκτώματα αγαρόζης φέρουν ευμεγέθεις πόρους και είναι κατάλληλα για τον διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA και RNA.

Κατά την προετοιμασία του πηκτώματος ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Επιλέγεται η κατάλληλη συγκέντρωση του πηκτώματος.

Συνήθως τα πηκτώματα αγαρόζης παρασκευάζονται σε συγκεντρώσεις 0,7-2,5%, ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που θα διαχωριστούν. Δηλαδή, σε πηκτώματα χαμηλής συγκέντρωσης ευνοείται ο διαχωρισμός μεγάλων τμημάτων DNA, ενώ σε πηκτώματα υψηλής συγκέντρωσης ευνοείται ο διαχωρισμός μικρών τμημάτων DNA. Ένα πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% θα παρασκευαστεί και θα χρησιμοποιηθεί συνήθως για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό του DNA, που απομονώθηκε από ιστό. Ένα πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% απεναντίας θα παρασκευαστεί και θα χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), που είναι μικρότερα σε μέγεθος.

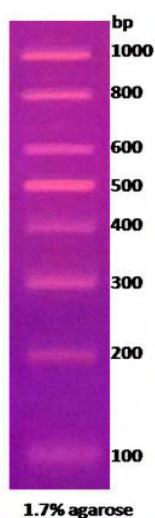
2. Ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης- 0,4gr για 1% και 0,8gr για 2% περιεκτικότητα πηκτώματος σε αγαρόζη- και προστίθεται σε επαρκή ποσότητα του διαλύματος ηλεκτροφόρησης (TAE 1x) - 40ml - σε κωνική φιάλη.
3. Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως και το διάλυμα να γίνει διαυγές.

4. Η κωνική φιάλη με την αγαρόζη ψύχεται. Στο στάδιο αυτό προστίθεται 1μl χρωστικής παρατήρησης του DNA, της Serva Blue G, η οποία, όπως και το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA και φθορίζει στο υπεριώδες φως.
5. Τοποθέτηση της ρευστής αγαρόζης στο εκμαγείο. Το εκμαγείο έχει προετοιμαστεί κλείνοντας τις ανοικτές πλευρές του με χαρτοταινία και τοποθετώντας τα «χτενάκια», που χρησιμεύουν, ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων («πηγαδάκια»). Η ρευστή αγαρόζη χύνεται στο εκμαγείο με προσοχή, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Αν δημιουργηθούν φυσαλίδες, φροντίζουμε να τις απομακρύνουμε με τη βοήθεια ενός tip. Ακολουθεί αναμονή έως ότου πήξει η ρευστή αγαρόζη. Ανάλογα με τη συγκέντρωση της αγαρόζης, το πήκτωμα σχηματίζεται σε χρονικό διάστημα 10-30 λεπτά και το χρώμα του γίνεται γαλακτόχρωμο.
6. Στο τέλος αφαιρείται η χαρτοταινία που περιμετρικά, καθώς και τα «χτενάκια», με μεγάλη προσοχή, για να αποφευχθεί τυχόν διάτρηση του πυθμένα των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων.

Μετά το πέρας της παρασκευής του πηκτώματος ακολουθεί η προετοιμασία των δειγμάτων και η μεταφορά του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης ακολουθώντας τα εξής βήματα:

1. Μεταφορά του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης: Το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στη δεξαμενή προστίθεται TAE 1x σε ποσότητα, ώστε να υπερκαλύψει το πήκτωμα, ενώ εξασφαλίζεται ότι δεν έχει παγιδευτεί αέρας στο εσωτερικό των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων.
2. Προετοιμασία δειγμάτων: Τα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν αναμειγνύονται με 3μl διαλύματος φόρτωσης. Τα διαλύματα φόρτωσης περιέχουν μία ουσία υψηλής πυκνότητας (συνήθως γλυκερόλη) και μία ή δύο χρωστικές που μετακινούνται στο πήκτωμα με ταχύτητα περίπου ίδια με του DNA, το μπλε της βρωμοφαινόλης ή το κυανό του ξυλενίου. Η παρουσία της γλυκερόλης διασφαλίζει ότι τα δείγματα έχουν πυκνότητα μεγαλύτερη του υδατικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης και μπορούν να καθιζάνουν στις θέσεις υποδοχής. Επιπλέον, οι δύο χρωστικές χρωματίζουν τα δείγματα, γεγονός που διευκολύνει τη διαδικασία του φορτώματος στο πήκτωμα αγαρόζης.

3. Τοποθέτηση των δειγμάτων: Τα δείγματα τοποθετούνται στις θέσεις υποδοχής με τη βοήθεια πιπέτας ρυθμιζόμενου όγκου, όπως και το DNA Ladder, από το οποίο προστίθεται 1μl και το οποίο αποτελεί μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους, που μετακινείται μαζί με τα δείγματα και χρησιμεύει στην αναγνώριση του μεγέθους της ζώνης του DNA του δείγματος. Ανάλογα με το επίπεδο του DNA Ladder που βρίσκεται η ζώνη του δείγματος θα έχει και το ανάλογο μοριακό βάρος (Εικόνα 4.2.1). Το DNA Ladder που χρησιμοποιήθηκε είχε κωδικό από την εταιρεία 100bp.



**Εικόνα 4.2.1:** Απεικόνιση του DNA Ladder από την εταιρεία Minotech 100bp, που χρησιμοποιήθηκε στις PCRs της πειραματικής διαδικασίας.

4. Εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης: Τα ηλεκτρόδια του τροφοδοτικού συνδέονται στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης. Το θετικό ηλεκτρόδιο (κάθοδος) τοποθετείται απέναντι από τις θέσεις υποδοχής των δειγμάτων, προκειμένου τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA (λόγω των φωσφορικών ομάδων) να μετακινηθούν κατά τη σωστή φορά στο πήκτωμα και ρυθμίζεται η κατάλληλη τάση στο τροφοδοτικό, συνήθως 150V.
5. Τερματισμός της ηλεκτροφόρησης: Η πρόοδος της μετακίνησης των μορίων DNA στο πήκτωμα εκτιμάται από τη μετακίνηση των χρωστικών του διαλύματος φόρτωσης και από την παρατήρηση του πηκτώματος στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Με την έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία τα τμήματα του DNA έχουν εμφάνιση φωτεινών γραμμών και κάθε μια απ' αυτές αντιστοιχεί σε μόρια DNA συγκεκριμένου μεγέθους. Η ηλεκτροφόρηση τερματίζεται όταν κριθεί ότι έχει επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός των μορίων DNA του δείγματος.

### 4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

#### Υλικά:

- Δείγμα DNA
- Ρυθμιστικό διάλυμα (KapaTaq Buffer 10x με MgCl<sub>2</sub>)
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs 20x)
- Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (Primers): Εμπρόςθιος, Οπίσθιος (Forward, Reverse)
- Taq DNA πολυμεράση (KapaTaq DNA Polymerase)
- ddH<sub>2</sub>O ("double-distilled water"/ δις απεσταγμένο νερό)

#### Μέθοδος:

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μία μέθοδος για την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Μέσω της PCR καθίσταται δυνατή η παραγωγή τεράστιου αριθμού πιστών αντιγράφων μια συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με σχετικά απλό τρόπο. Η PCR σχεδιάστηκε και παρουσιάστηκε από τον Dr Kary Mullis το 1983 και εκμεταλλεύεται ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του DNA με στόχο την *in vitro* ενίσχυση καθορισμένης αλληλουχίας DNA. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για την σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλιωνα μόρια μπορούν να παραχθούν με απλό τρόπο από δίκλιωνα μόρια DNA, όταν αυτά θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες, οπότε αποχωρίζονται. Η DNA πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Το σημείο έναρξης της σύνθεσης καθορίζεται με τη χρήση ενός εκκινητή (primer), που συνδέεται με τη μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο.

Το πρώτο σημαντικό χαρακτηριστικό της PCR είναι ότι είναι δυνατόν μέσω των κατάλληλων εκκινητών η DNA πολυμεράση να συνθέσει σε συγκεκριμένη περιοχή DNA. Και οι δύο κλώνοι του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία για την σύνθεση DNA, εφόσον υπάρχει ένας εκκινητής για την καθεμία. Για κάθε PCR, συνεπώς, επιλέγονται εκκινητές παρακείμενοι της περιοχής που είναι επιθυμητό να ενισχυθεί, ώστε οι νέοι κλώνοι, που ξεκινούν από κάθε εκκινητή, να προεκτείνονται πέρα από την θέση του εκκινητή στην αντίθετη αλυσίδα. Κάθε επανάληψη της σύνθεσης νέου κλώνου αποτελεί ένα κύκλο ενίσχυσης, ενώ κάθε νεοσυντιθέμενος αποτελεί εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο ενίσχυσης. Επομένως, στους νεοσυντιθέμενους κλώνους υπάρχουν πάντα θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται ξανά για να αποχωριστούν οι παλαιοί και οι νέοι κλώνοι και επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία.



Το δεύτερο σημαντικό χαρακτηριστικό της PCR είναι η εκθετική ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου. Το τελικό αποτέλεσμα μιας 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.

Το αρχικό υλικό για μία PCR είναι δείγμα DNA το οποίο περιέχει την αλληλουχία-στόχο. Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR, που αναπαρίσταται και στην εικόνα 4.3.1, περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα:

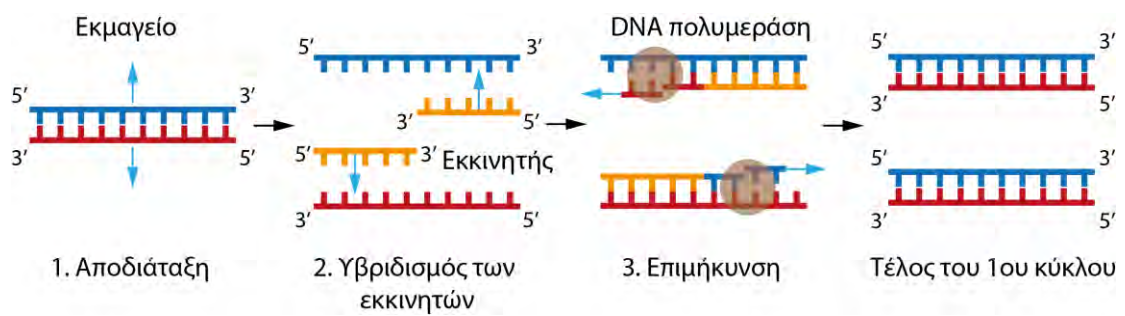
1. Αποδιάταξη (denaturation): Το μίγμα θερμαίνεται αρχικά στους  $95^{\circ}\text{C}$ . Σε αυτή τη θερμοκρασία τα δίκλιωνα μόρια DNA αποχωρίζονται τελείως με αποτέλεσμα να παράγονται οι μονόκλωνες αλυσίδες, που θα χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία για τους εκκινητές και τη DNA πολυμεράση

2. Υβριδοποίηση (annealing): Η θερμοκρασία μειώνεται, ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στα μονόκλιωνα μόρια. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εξειδίκευση της PCR. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών, που ποικίλλει για κάθε ζεύγος εκκινητών. Συνήθως κυμαίνεται μεταξύ  $55$  και  $65^{\circ}\text{C}$ .

3. Επιμήκυνση (elongation): Η θερμοκρασία αυξάνεται στους  $72^{\circ}\text{C}$ , βέλτιστη θερμοκρασία δράσης για την Taq DNA πολυμεράση, η οποία απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, ώστε να εκτελέσει τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας, μέσω προσθήκης νέου νουκλεοτιδίου στην 3'-υδροξυλομάδα του προηγούμενου νουκλεοτιδίου. Ο χρόνος επώασης στους  $72^{\circ}\text{C}$  ποικίλλει ανάλογα με το μήκος της αλληλουχίας-στόχου.

Τέλος, η θερμοκρασία επιστρέφει και πάλι στους  $95^{\circ}\text{C}$ , για κάποια δευτερόλεπτα, ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA (που αποτελούνται από την αρχική και τη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα συμπληρωματική αλυσίδα) να αποχωριστούν και πάλι. Αυτές οι μονόκλωνες αλυσίδες αποτελούν τα εκμαγεία για τον επόμενο γύρο σύνθεσης DNA και επαναλαμβάνονται για 25-35 κύκλους συνήθως -στην προκειμένη περίπτωση 35 κύκλους- αποχωρισμού των αλυσίδων, υβριδοποίησης των εκκινητών και σύνθεσης DNA.

Ο χρόνος επέκτασης του τελικού κύκλου είναι συνήθως μεγαλύτερος, έτσι ώστε να δοθεί χρόνος στην πολυμεράση για την ολοκλήρωση της επιμήκυνσης όλων των προϊόντων.



**Εικόνα 4.3.1:** Στάδια μίας τυπικής PCR.

Στην παρούσα εργασία, ειδικότερα, ο χρόνος αρχικής αποδιάταξης ρυθμίστηκε στα 4min, ενώ ο χρόνος αποδιάταξης για τους 35 κύκλους, που ορίστηκαν, ήταν 30sec. Ο χρόνος υβριδοποίησης, στη συνέχεια, ρυθμίστηκε στα 30sec για τα διάφορα ζεύγη εκκινήτων, ενώ ο χρόνος επιμήκυνσης ρυθμίστηκε στα 45sec. Ολοκληρώνοντας, ο χρόνος επέκτασης του τελικού κύκλου, που είναι συνήθως μεγαλύτερος, ορίστηκε στα 10min.

Οι εκκινήτες, που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR, οι οποίοι ήταν σχεδιασμένοι, ώστε να αναγνωρίζουν συμπληρωματικές αλληλουχίες του γονιδίου Fra10ac1 και να τις ενισχύουν, παρατίθενται στον πίνακα 4.3.α ακολούθως και είχαν τις αλληλουχίες, που αναγράφονται παρακάτω.

**Πίνακας 4.3.α:** Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR.

| Εκκινήτης | Αλληλουχία εκκινήτη                         |
|-----------|---|
| F1'       | 5'-GTG TTT TAT TTT TGA AAC CTT AAT GTT C-3' |
| R1'       | 5'-CAC TTG ACA TAG GAT TCA GAT GAC-3'       |
| R1new'    | 5'-TGT ACG ACA ACT ACA CAG CAG AC-3'        |
| R2new'    | 5'-TGT ACG ACA ACT ACA CAG CAG-3'           |
| R3new'    | 5'-TCA TGT ACG ACA ACT ACA CAG C-3'         |
| R4new'    | 5'-TCA TGT ACG ACA ACT ACA CAG CAG-3'       |
| R5new'    | 5'-TGT AAA TCA TGT ACG ACA ACT ACA C-3'     |
| LAR3      | 5'-CAC AAC GGG TTC TTC TGT TAG TCC-3'       |

Ο εκκινήτης F1' αποτελεί εμπρόσθιο εκκινήτη, ενώ οι υπόλοιποι αποτελούν οπίσθιους εκκινήτες. Τα ζεύγη εκκινήτων, επιπρόσθετα, που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και οι θερμοκρασίες τήξης καθενός από αυτά συνοψίζονται στον πίνακα 4.3.β.

**Πίνακας 4.3.β:** Οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης καθενός από τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

| Ζεύγος εκκινητών | Θερμοκρασία υβριδοποίησης |
|------------------|---------------------------|
| F1'-R1'          | 59°C                      |
| F1'-R1new'       | 59°C                      |
| F1'-R2new'       | 59°C                      |
| F1'-R3new'       | 59°C                      |
| F1'-R4new'       | 59°C                      |
| F1'-R5new'       | 59°C                      |
| F1'-LAR3         | 58°C                      |

Το πρώτο ζεύγος του πίνακα 4.3.α χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση μίας αλληλουχίας μεγέθους 826bp στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου, τα επόμενα πέντε ζεύγη για την ενίσχυση μίας αλληλουχίας μεγέθους 356bp επίσης στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου, ενώ το τελευταίο ζεύγος για την ενίσχυση μιας αλληλουχίας μεγέθους 234bp στο αλληλόμορφο knockout (βλέπε παράρτημα).

Τέλος, οι ακριβείς ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την περάτωση της PCR παρουσιάζονται στον πίνακα 4.3.γ παρακάτω:

**Πίνακας 4.3.γ:** Ποσότητες των συστατικών της απλής PCR

| Αντιδραστήριο                            | Όγκος ανά αντίδραση |
|--|---------------------|
| DNA                                      | 1-5μl               |
| Ρυθμιστικό δ/μα 10x με MgCl <sub>2</sub> | 2,5μl               |
| Δεοξυριβονουκλεοτίδια 20x                | 0,5μl               |
| Εμπρόσθιος εκκινητής (50pmol/μl)         | 1μl                 |
| Οπίσθιος εκκινητής (50pmol/μl)           | 1μl                 |
| Taq DNA Πολυμεράση (5 units/μl)          | 0,2μl               |
| Νερό                                     | 14,8-18,8μl         |
| Τελικός όγκος                            | 25μl                |

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, οι ποσότητες του DNA, που χρησιμοποιούνταν στις PCR, δεν ήταν σταθερές, αλλά κυμαίνονταν μεταξύ 1μl και 5μl, που αντιστοιχούν σε 50-200ng από κάθε δείγμα. Οι ποσότητες του DNA τροποποιούνταν, ώστε τα αποτελέσματα της PCR να είναι όσο το δυνατόν πιο ξεκάθαρα, δηλαδή άλλαζαν ανάλογα με την συγκέντρωση του DNA για την οποία είχαμε κάποια εικόνα από την ηλεκτροφόρηση ολικού DNA. Η ποσότητα του νερού, κατ' επέκταση, που εξαρτάται από την ποσότητα του DNA κάθε

φορά, μεταβάλλεται ανάλογα με τις ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας, δεδομένου ότι ο τελικός όγκος είναι 25μl. Στην περίπτωση της πολλαπλής PCR υπήρχε και διαφοροποίηση όσον αφορά στις ποσότητες των εκκινητών ανά αντίδραση. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 1μl εμπρόσθιου εκκινητή, που ήταν ο ίδιος για τους διάφορους οπίσθιους εκκινητές, 0,5μl του ενός οπίσθιου και 0,5μl του δεύτερου οπίσθιου εκκινητή.

Η PCR για τα δείγματα προς εξέταση λαμβάνει χώρα στους θερμικούς κυκλοποιητές (Thermal cyclers), ενώ ένα ειδικό λογισμικό πρόγραμμα ελέγχει το σύστημα ψύξης/θέρμανσης, το οποίο είναι υπεύθυνο για τις αλλαγές της θερμοκρασίας, ανάλογα με το βήμα της αντίδρασης.

#### **4.4 Πολλαπλή PCR (Multiplex PCR)**

Η πολλαπλή PCR αποτελεί μία παραλλαγή της PCR, κατά την οποία είναι δυνατή η ταυτόχρονη ενίσχυση διαφορετικών αλληλουχιών DNA σε μία μόνο PCR. Η μέθοδος αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση αλληλουχιών DNA σε δείγματα, μέσω χρήσης πολλαπλών εκκινητών, καθώς και της δράσης της DNA πολυμεράσης σε θερμικό κυκλοποιητή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων, ποικίλου μεγέθους, ειδικών για τις διαφορετικές αλληλουχίες που ενισχύθηκαν. Οι βασικές αρχές, καθώς και τα στάδια σύμφωνα με τα οποία πραγματοποιείται η πολλαπλή PCR είναι τα ίδια με την απλή PCR, δηλαδή: α) Αποδιάταξη, β) Υβριδοποίηση και γ) Επιμήκυνση.

#### **Βελτιστοποίηση της πολλαπλή PCR:**

Κάποιες από τις παραμέτρους, που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, για μία πετυχημένη πολλαπλή PCR:

- Ο σχεδιασμός των εκκινητών αποτελεί διαδικασία μείζονος σημασίας, αφού όλοι οι εκκινητές πρέπει να έχουν την ίδια θερμοκρασία τήξης, δηλαδή ίδια θερμοκρασία υβριδοποίησης, σε μία PCR.
- Ο σχεδιασμός των εκκινητών πρέπει επίσης να είναι ιδιαίτερα προσεκτικός, ώστε οι εκκινητές να ενισχύουν την επιθυμητή αλληλουχία-στόχο στην αντίδραση και να μην υπάρχει αλληλεπίδραση με άλλες αλληλουχίες εκτός της αλληλουχίας-στόχου.

- Οι εκκινητές πρέπει να οδηγούν στην παραγωγή προϊόντων παρόμοιου μεγέθους, αφού οι μεγαλύτερες σε μήκος αλληλουχίες-στόχοι ενισχύονται λιγότερο αποτελεσματικά από τις μικρότερες σε μήκος.
- Αν μία αλληλουχία-στόχος, τέλος, είναι πιο άφθονη από κάποια άλλη, περιορίζεται η συγκέντρωση του εκκινητή, που στοχεύει σε αυτήν την αλληλουχία, ώστε να αποφευχθεί ο ανταγωνισμός μεταξύ των εκκινητών και ο εκτοπισμός αυτού που στοχεύει στην λιγότερο άφθονη αλληλουχία.

Η πολλαπλή PCR αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο, που σε σχέση με την απλή PCR παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα. Αρχικά, τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, που μπορεί να παρατηρηθούν κατά την απλή PCR, εξαιτίας αποτυχίας της αντίδρασης, στην πολλαπλή PCR είναι εύκολο να διακριθούν, εφόσον κάθε προϊόν της αντίδρασης μπορεί να λειτουργήσει ως εσωτερικός μάρτυρας για τις υπόλοιπες αλληλουχίες-στόχους. Για παράδειγμα, στην περίπτωση ενίσχυσης πολλαπλών εξονίων σε μελέτες που εξετάζουν για γονιδιακά ελλείμματα, εκτός κι αν έχει αφαιρεθεί ολόκληρη η περιοχή που ελέγχεται από την πολλαπλή PCR, η ενίσχυση κάποιων τμημάτων υποδηλώνει ότι η αντίδραση δεν ήταν αποτυχημένη.

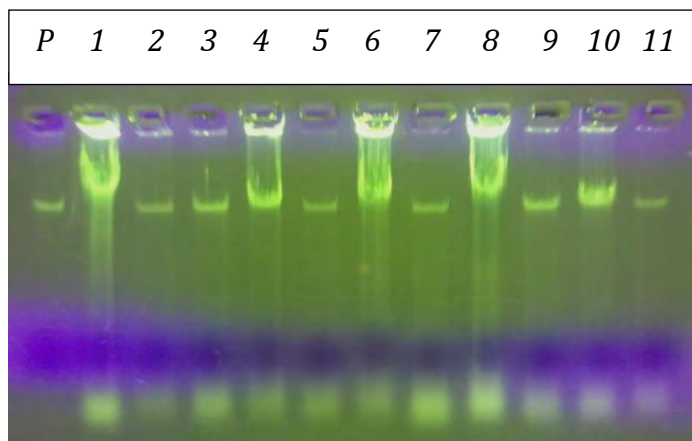
Επίσης, η δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης πολλαπλών αλληλουχιών-στόχων σε μία μόνο αντίδραση, στην περίπτωση της πολλαπλής PCR, επιτρέπει την εξοικονόμηση πολύτιμων πρώτων υλών, όπως δειγμάτων ανθρώπινων ή ζωικών ιστών, καθώς επίσης και μειωμένη χρήση αντιδραστηρίων (πχ. ένζυμα, dNTPs κλπ.). Αυτό σημαίνει πρακτικά ότι μια βελτιστοποιημένη πολλαπλή PCR πλεονεκτεί έναντι της απλής PCR, όσον αφορά στον χρόνο που απαιτεί, το κόστος, την παροχή πληροφοριών από κάθε αντίδραση και την χρήση αντιδραστηρίων. Αυτό επίσης σημαίνει λιγότερους χειρισμούς με την πιπέτα και κατ'επέκταση μειωμένο ρίσκο για σφάλματα. Η βελτιστοποίηση της πολλαπλής PCR, ωστόσο, προϋποθέτει ότι αφιερώνεται ο χρόνος και οι πόροι, ώστε να βελτιστοποιηθεί και να επικυρωθεί η μέθοδος. Παρόλο που υπάρχει μεγάλη διεργασία για να επιτευχθεί η βελτιστοποίηση, το αποτέλεσμα αντισταθμίζει τον αρχικό κόπο, χρόνο και κόστος που απαιτήθηκαν.

## 5. Αποτελέσματα

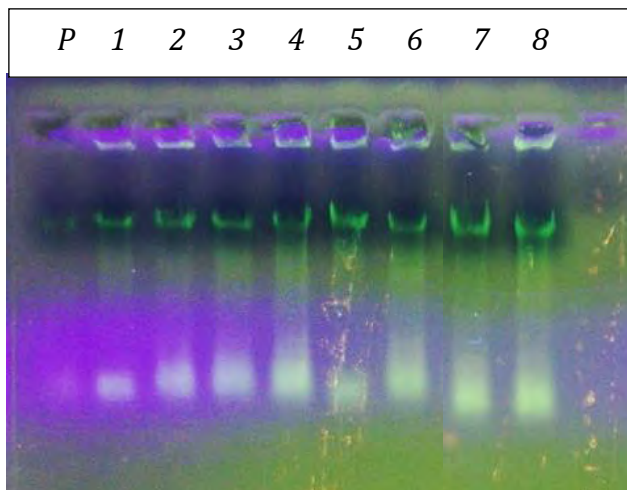
### 5.1 Απομόνωση DNA από ιστό ποντικού

Αρχικά έγινε απομόνωση DNA από ιστό ποντικού, 1mm της ουράς του ζώου, από τρία σύνολα δειγμάτων, που πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε πιο αναλυτικά στην ενότητα Υλικά-Μέθοδοι, ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR και ακολούθως ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% για το ολικό DNA, το οποίο απομονώθηκε, με στόχο τον έλεγχο της ποσότητας και της ποιότητας του DNA. Στις εικόνες 5.1.1 και 5.1.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων αυτών για το δεύτερο και το τρίτο σύνολο δειγμάτων, αντίστοιχα. Και στις δύο περιπτώσεις ως θετικός μάρτυρας (P) χρησιμοποιήθηκε δείγμα DNA σε ποσότητα, που έχει δειχθεί ότι είναι αποτελεσματική κατά την PCR.

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της εικόνας 5.1.1, ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 6 από το πρώτο σύνολο δειγμάτων σε ποσότητα 3μl εκ των 40-50μl, ενώ στην περίπτωση της εικόνας 5.1.2, χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 5 από το δεύτερο σύνολο δειγμάτων σε ποσότητα 1μl εκ των 30-40μl.



**Εικόνα 5.1.1:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% για το δεύτερο σύνολο δειγμάτων. Απεικονίζονται με τη σειρά ο θετικός μάρτυρας (P) και τα δείγματα 1 έως 11 από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν από το καθένα 5μL δείγματος DNA εκ των 100μl μαζί με 3μL διαλύματος φόρτωσης, μπλε της βρωμοφαινόλης.



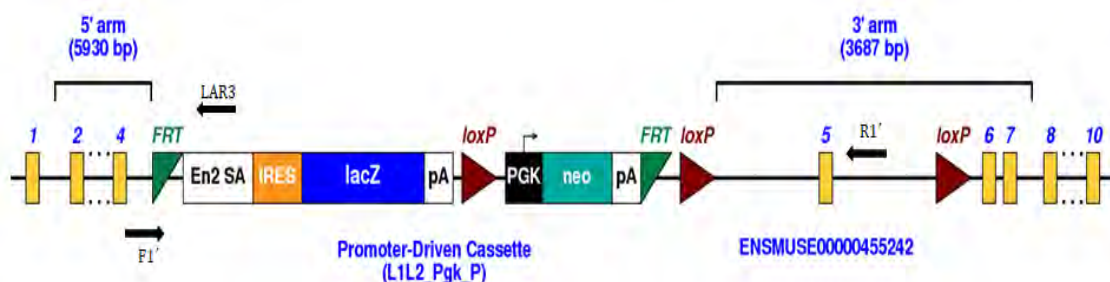
**Εικόνα 5.1.2:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% για το τρίτο σύνολο δειγμάτων. Απεικονίζονται με τη σειρά ο θετικός μάρτυρας (P) και τα δείγματα 1 έως 8 από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν 5μL δείγματος DNA εκ των 100μl μαζί με 3μL διαλύματος φόρτωσης, μπλε της βρωμοφαινόλης.

Σύμφωνα με την εικόνα 5.1.1, η ηλεκτροφόρηση για τα δείγματα 1 έως 11 του δεύτερου συνόλου έδωσε ζώνες για όλα αυτά τα δείγματα. Ωστόσο, τα δείγματα 1, 4, 6 και 8 παρουσιάζουν πολύ πιο έντονο φθορισμό σε σχέση με τα υπόλοιπα, γεγονός που υποδηλώνει την αυξημένη πυκνότητα DNA στα δείγματα αυτά, ενώ καθιστά απαραίτητη, για τους επακόλουθους χειρισμούς, την μετέπειτα αραίωση τους. Σύμφωνα με την εικόνα 5.1.2, η ηλεκτροφόρηση για τα δείγματα 1 έως 8 του τρίτου συνόλου έδωσε ζώνες για όλα αυτά τα δείγματα. Όλα τα δείγματα, επίσης, παρουσιάζουν την ίδια περίπου ένταση φθορισμού, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει η ίδια περίπου ποσότητα DNA στα δείγματα αυτά. Εφόσον, λοιπόν, υπάρχουν ζώνες, ενώ δεν υπάρχουν ενδείξεις αποικοδόμησης, τα αποτελέσματα των παραπάνω ηλεκτροφορήσεων επιβεβαιώνουν την ύπαρξη επαρκούς ποσότητας, καθώς και καλής ποιότητας DNA στα δείγματα αυτά.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν PCRs για όλα τα δείγματα από τρία σύνολα, κατά την οποία ενισχύθηκε η επιθυμητή αλληλουχία, είτε στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου, είτε στο αλληλόμορφο knockout του γονιδίου Fra10ac1, το οποίο προέκυψε με την ενσωμάτωση της κασέτας IRES/lacZ-neo ανοδικά του κρίσιμου εξονίου 5. Η ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου επιτυγχάνεται με την χρήση των ακόλουθων ζευγών εκκινητών: α) F1'-R1', β) F1'-R1new', γ) F1'-R2new', δ) F1'-R3new', ε) F1'-R4new', στ) F1'-R5new' και ζ) F1'-LAR3. Τα έξι πρώτα ζεύγη που αναγράφονται παραπάνω αναγνωρίζουν και ενισχύουν το αλληλόμορφο αγρίου τύπου, ενώ το τελευταίο ζεύγος αναγνωρίζει και ενισχύει το αλληλόμορφο knockout. Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω ζεύγη εκκινητών πραγματοποιούνται PCR, ώστε να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε εάν ο -προς μελέτη- οργανισμός

είναι αγρίου τύπου, ετερόζυγος ή ομόζυγος. Σε πρώτη φάση χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών F1'-R1' για την αναγνώριση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου, το οποίο δίνει προϊόν μεγέθους 826bp, σε σχέση με το ζεύγος F1'-LAR3, που δίνει προϊόν μεγέθους 234bp (Εικόνα 5.1.3). Οι εκκινητές R1new', R2new', R3new', R4new' και R5new', στη συνέχεια, σχεδιάστηκαν με σκοπό να αντικαταστήσουν τον εκκινητή R1' και να χρησιμοποιηθούν στην πολλαπλή PCR, κατά την οποία οι εκκινητές που εφαρμόζονται κρίνεται αναγκαίο να οδηγούν στην παραγωγή προϊόντων παρόμοιου μεγέθους, αφού οι μεγαλύτερες σε μήκος αλληλουχίες-στόχοι ενισχύονται λιγότερο αποτελεσματικά από τις μικρότερες σε μήκος. Οι νέοι αυτοί εκκινητές δίνουν προϊόν παρόμοιου μεγέθους περίπου 350bp.

Σε κάθε PCR, που πραγματοποιείται, χρησιμοποιείται ένας αρνητικός μάρτυρας (Neg) και ένας θετικός μάρτυρας (P). Η χρήση του αρνητικού μάρτυρα αποσκοπεί στη διερεύνηση της επιμόλυνσης των συστατικών της αντίδρασης. Συνεπώς, αν όλα τα αντιδραστήρια είναι μη-επιμολυσμένα, εφόσον έχει προστεθεί, αντί του DNA του δείγματος που εξετάζουμε, νερό στην ίδια ποσότητα, τότε λογικά θα πρέπει το αποτέλεσμα της αντίδρασης του αρνητικού μάρτυρα να είναι αρνητικό. Η χρήση του θετικού μάρτυρα, από την άλλη, αποσκοπεί στη διερεύνηση της επάρκειας της διαδικασίας προετοιμασίας της αντίδρασης και συνήθως χρησιμοποιείται κάποιο δείγμα που έχει ήδη υποστεί ανάλυση. Άρα, αν όλα τα αντιδραστήρια έχουν συμπεριληφθεί στην αντίδραση στην σωστή ποσότητα και είναι ενεργά, τότε αφού έχει προστεθεί DNA του δείγματος που εξετάζουμε, λογικά θα πρέπει το αποτέλεσμα της αντίδρασης του θετικού μάρτυρα να είναι θετικό. Να σημειωθεί ότι για κάθε ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2% χρησιμοποιήθηκαν 15μl προϊόντων PCR με 3μl διαλύματος φόρτωσης, μπλε της βρωμοφαινόλης.

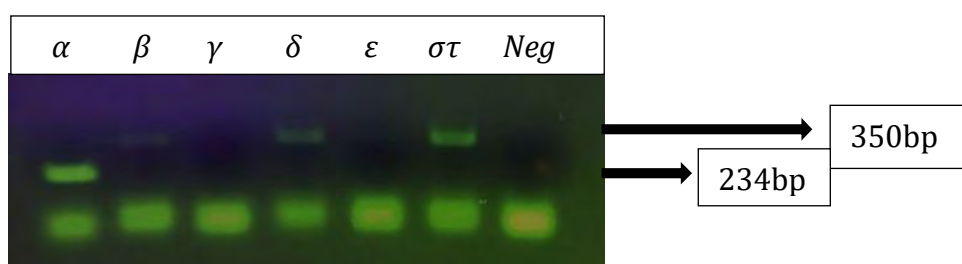


**Εικόνα 5.1.3:** Οι -κατά προσέγγιση- θέσεις υβριδισμού των εκκινητών F1', R1' και LAR3 στο γονίδιο Fra10ac1, όπου έχει εισαχθεί η γονιδιακή κατασκευή στόχευσης, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η γονιδιακή σίγηση (<https://www.mousephenotype.org/data/search/allele2?kw=%22FRA10Ac1%22#order2>).



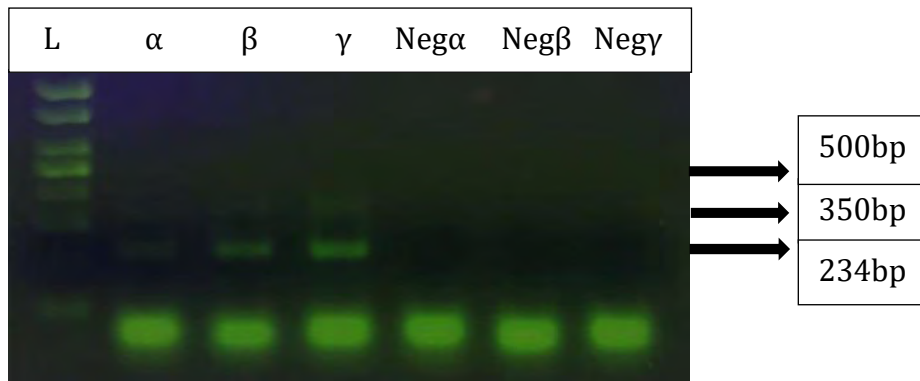
## 5.2 Βελτιστοποίηση της πολλαπλής PCR (multiplex PCR)

Πραγματοποιήθηκε πολλαπλή PCR, πέραν της απλής PCR, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών τη φορά, ένα που αναγνωρίζει και ενισχύει το αλληλόμορφο αγρίου τύπου και ένα που αναγνωρίζει και ενισχύει το αλληλόμορφο knockout. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην βελτιστοποίηση της μεθόδου αυτής, διαδικασία, η οποία μπορεί να καταστήσει την πολλαπλή PCR αρκετά πιο αποδοτική, συγκριτικά με την απλή PCR, από άποψη κόστους, χρόνου, κόπου, ρίσκου σφαλμάτων κοκ., όπως αναλύθηκε στην ενότητα Υλικά-Μέθοδοι. Μία βελτιστοποιημένη πολλαπλή PCR απαιτεί, μεταξύ άλλων, εκκινητές που να έχουν την ίδια θερμοκρασία τήξης και να οδηγούν στην παραγωγή προϊόντων παρόμοιου μεγέθους, όπως αναλύθηκε στην ενότητα Υλικά-Μέθοδοι, οπότε σχεδιάστηκαν νέοι εκκινητές, ικανοί να αντικαταστήσουν τον οπίσθιο εκκινητή R1', ο οποίος δίνει προϊόντα μεγέθους 826bp. Αυτοί οι εκκινητές είναι οι R1new', R2new', R3new', R4new' και R5new', που θεωρητικά αναγνωρίζουν και ενισχύουν το αλληλόμορφο αγρίου τύπου και δίνουν όλοι προϊόντα μεγέθους περίπου 350bp. Αυτοί οι νέοι εκκινητές ελέγχθηκαν για το αν δίνουν τελικά προϊόν και τα αποτελέσματα της PCR για ποσότητα DNA 1μl συνοψίζονται στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 5.2.1):



**Εικόνα 5.2.1:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για το δείγμα 6 του πρώτου συνόλου, το οποίο έχει δειχθεί ότι είναι ετερόζυγο, για όλα τα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών ξεχωριστά. Στην εικόνα αναπαριστώνται τα αποτελέσματα PCR με τα ζεύγη: α) F1'-LAR3, β) F1'-R1new', γ) F1'-R2new', δ) F1'-R3new', ε) F1'-R4new' και στ) F1'-R5new'.

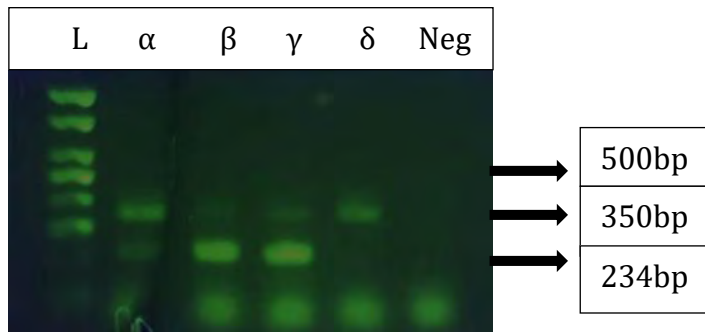
Έχοντας αποκλείσει, συνεπώς, κάποιους από τους νέους εκκινητές, τους R2new' και R4new', πραγματοποιείται πολλαπλή PCR με τους υπόλοιπους. Τα αποτελέσματα της PCR για ποσότητα DNA 1μl συνοψίζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 5.2.2):



**Εικόνα 5.2.2:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για το δείγμα 6 του πρώτου συνόλου, το οποίο έχει δειχθεί ότι είναι ετερόζυγο, για όλα τα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών ξεχωριστά. Στην εικόνα αναπαριστώνται τα αποτελέσματα πολλαπλή PCR με τους εκκινητές: α) F1'-R1new'-LAR3, β) F1'-R3new'-LAR3 και γ) F1'-R5new'-LAR3.

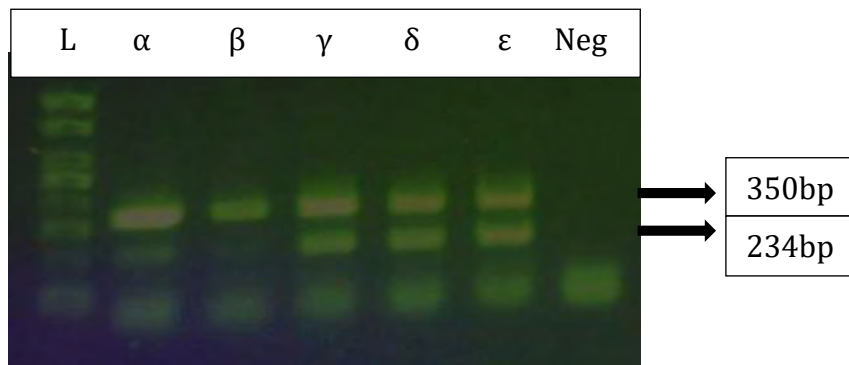
Παρατηρώντας, συνεπώς, τις εικόνες 5.2.1 και 5.2.2 προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο εκκινητής R5new' είναι εκείνος που επιλέγεται για την ενίσχυση του αλληλόμορφου αγρίου τύπου στις επακόλουθες PCR (απλές και πολλαπλές).

Η βελτιστοποίηση της πολλαπλής PCR προχωρά ακόμα ένα βήμα στη συνέχεια, εφόσον παρατηρήθηκε ότι η ζώνη, που αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο knockout, σε όλες τις πολλαπλές PCR που πραγματοποιήθηκαν, είναι πάντοτε πιο έντονη από αυτή που αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των εκκινητών και εκτοπισμός αυτού που στοχεύει στην λιγότερο άφθονη αλληλουχία, που στην προκειμένη περίπτωση φαίνεται ότι είναι το αλληλόμορφο αγρίου τύπου. Κρίνεται, συνεπώς, επιτακτική ανάγκη να περιοριστεί η συγκέντρωση του εκκινητή που αναγνωρίζει και ενισχύει το αλληλόμορφο knockout, δηλαδή του εκκινητή LAR3. Γι' αυτό το σκοπό, λοιπόν, πραγματοποιήθηκε PCR για το δείγμα 5 του δεύτερου συνόλου, που χρησιμοποιήθηκε σε ποσότητα που έχει δειχθεί αποδοτική σε PCR (1μl) και το οποίο προέρχεται από άτομο ετερόζυγο, όπου δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκκινητή LAR3. Τα αποτελέσματα της PCR για τις διαφορετικές αυτές συγκεντρώσεις για ποσότητα DNA 1μl απεικονίζονται στην επόμενη εικόνα (Εικόνα 5.2.3):



**Εικόνα 5.2.3:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για τα προϊόντα της PCR του δείγματος 5 του δεύτερου συνόλου με το ζεύγος εκκινητών F1'-LAR3 σε συγκέντρωση α) 1 pmol/μl, β) 5 pmol/μl και γ) 10 pmol/μl, καθώς και δ) με το ζεύγος εκκινητών F1'-R5new'.

Με βάση την εικόνα 5.2.3, συνεπώς, δημιουργείται η ανάγκη να διερευνηθεί το εύρος συγκεντρώσεων μεταξύ 1 pmol/μl και 5 pmol/μl, ώστε να επιλεγεί η κατάλληλη συγκέντρωση για τον εκκινητή LAR3, που θα επιτρέπει συγκρίσιμες εντάσεις μεταξύ των ζωνών, που αντιστοιχούν στα δύο αλληλόμορφα. Έτσι, πραγματοποιήθηκε PCR για το δείγμα 5 του δεύτερου συνόλου πάλι, όπου ελέγχθηκαν οι συγκεντρώσεις ενδιάμεσα αυτών των τιμών. Τα αποτελέσματα της PCR για ποσότητα DNA 1μl για τις συγκεντρώσεις αυτές αναπαριστώνται στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 5.2.4):



**Εικόνα 5.2.4:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για τα προϊόντα της PCR του δείγματος 5 του δεύτερου συνόλου με το ζεύγος εκκινητών F1'-LAR3 σε συγκέντρωση α) 1 pmol/μl, β) 2 pmol/μl, γ) 3 pmol/μl, δ) 4 pmol/μl και ε) 5 pmol/μl.

Με βάση την εικόνα 5.2.4, όπου παρατηρείται ο ίδιος φθορισμός μεταξύ των ζωνών σε συγκεντρώσεις 3-5pmol/μl, επιλέγουμε για τον εκκινητή LAR3 συγκέντρωση 3pmol/μl και πραγματοποιείται πολλαπλή PCR για όλα τα δείγματα του τρίτου συνόλου. Τα αποτελέσματα της βελτιστοποιημένης

πολλαπλής PCR για το τρίτο σύνολο δειγμάτων απεικονίζονται στην εικόνα 5.3.3, που παρατίθεται παρακάτω.

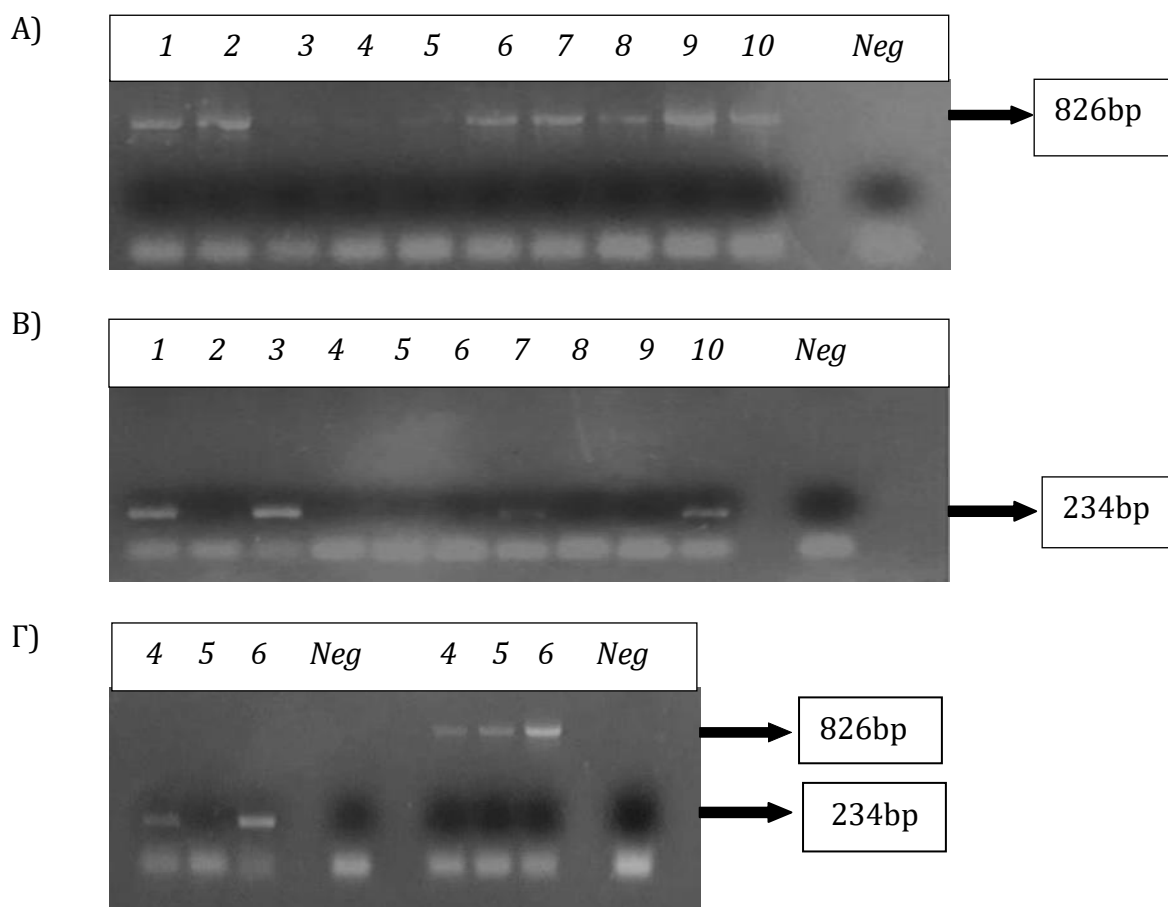
### **5.3 Γονοτύπηση δειγμάτων**

#### **A. Αποτελέσματα PCR απογόνων διασταύρωσης μεταξύ αγρίου τύπου ποντικών και ετερόζυγων knockout-tm1a: 1<sup>ο</sup> σύνολο δειγμάτων**

Τα δείγματα DNA του πρώτου συνόλου, που είναι 10 στον αριθμό, προέρχονται από ποντίκια-απογόνους διασταύρωσης μεταξύ αγρίου τύπου ποντικών και ετερόζυγων knockout-tm1a. Αυτά τα δείγματα DNA, ωστόσο, είναι δείγματα που έχουν προκύψει, έπειτα από μία διαδικασία επαναπαραγωγής (rederivation). Η διαδικασία αυτή αποτελεί ουσιαστικά μία μέθοδο αποκατάστασης των αποθεμάτων των ποντικών, που έχουν μολυνθεί από κάποιον παθογόνο μικροοργανισμό και επαναφοράς σε κατάσταση, η οποία χαρακτηρίζεται από απουσία παθογόνων (Specific Pathogen Free ή SPF status). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η διαδικασία επαναπαραγωγής (rederivation) συνιστά μία μέθοδο με την οποία εξασφαλίζεται ότι οι ποντικοί δεν θα είναι μολυσμένοι από οποιονδήποτε παθογόνο μικροοργανισμό, έπειτα από αλλαγή ζωοτροφείου, που έλαβε χώρα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω χειρουργικής μεταφοράς εμβρύων σε θηλυκά άτομα-αποδέκτες, τα οποία δεν έχουν μολυνθεί από οποιονδήποτε παθογόνο μικροοργανισμό. Τα -προς μεταφορά- έμβρυα έχουν προέλθει από διασταύρωση ανάμεσα σε υπερδιεγερμένα θηλυκά άτομα-δότες ωαρίων, τα οποία απελευθερώνουν δηλαδή μεγαλύτερο αριθμό ώριμων ωαρίων από το φυσιολογικό, κατά την περίοδο της ωορρηξίας και σε αρσενικά άτομα με τον επιθυμητό γονότυπο, δηλαδή άτομα ετερόζυγα για την αλληλουχία-στόχο, στην προκειμένη περίπτωση. Σημαντικός παράγοντας, ο οποίος συντελεί στην επιτυχία της διαδικασίας αυτής είναι η επιλογή των εμβρύων, αφού είναι μείζονος σημασίας να διατηρούν το γλυκοπρωτεϊνικό περίβλημα, που καλύπτει την πλασματική μεμβράνη του ωοκυττάρου (zona pellucida), άθικτο, εφόσον είναι αυτό που παρεμποδίζει την επαφή μεταξύ πλασματικής μεμβράνης και ιικών σωματιδίων. Παράλληλα, έχει δειχθεί ότι η επώαση ωαρίων με άθικτο αυτό το πρωτεϊνικό περίβλημα σε μέσο καλλιέργειας εμβρύου, το οποίο δεν μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών, οδηγεί και σε εξάλειψή τους. Το περίβλημα αυτό, δηλαδή, εμποδίζει την μόλυνση να συμβεί και κατ'επέκταση προστατεύει το έμβρυο. Αυτό έχει ως άμεση συνέπεια ότι οι απόγονοι, που θα προκύψουν, μετά από μεταφορά εμβρύων σε μη μολυσμένες παρένθετες μητέρες, να είναι και αυτοί απαλλαγμένοι από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η μεταφορά εμβρύων, λοιπόν, συνιστά μία ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδο εξάλειψης ασθενειών, που μπορεί να προκληθούν από

διάφορα παθογόνα, όπως ιούς (MHV, EDIM, TMEV, MAD), βακτήρια (*Helicobacter* spp., *M. Pulmonis*), καθώς και διάφορα ενδο και εξωπαράσιτα (εντερικά παράσιτα και ακάρεια γούνας αντίστοιχα) (Van Keuren and Saunders 2004).

Τα αποτελέσματα της PCR για τα δείγματα του πρώτου συνόλου από τα οποία χρησιμοποιήθηκε 1μl για την αντίδραση με κάποια από τα ζεύγη εκκινητών, που προαναφέρθηκαν, αναπαριστώνται στην εικόνα (Εικόνα 5.3.1) που ακολουθεί:



**Εικόνα 5.3.1:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για τα προϊόντα της PCR των δειγμάτων του πρώτου συνόλου: A) με το ζεύγος εκκινητών F1'-R1' και B) με το ζεύγος εκκινητών F1'-LAR3. Γ) Επαναληπτική PCR για ορισμένα εκ των δειγμάτων με τα ζεύγη εκκινητών F1'-R1' δεξιά και F1'-LAR3 αριστερά.

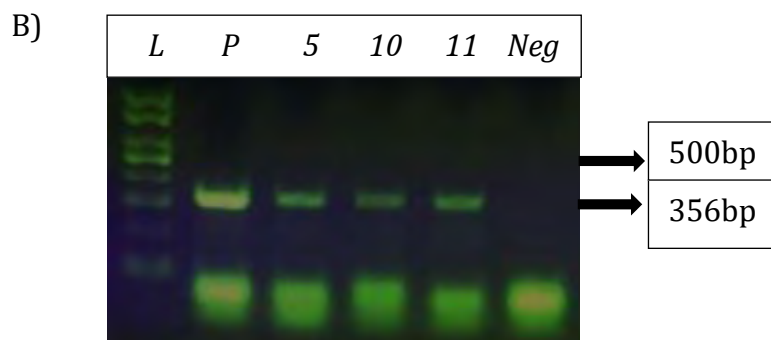
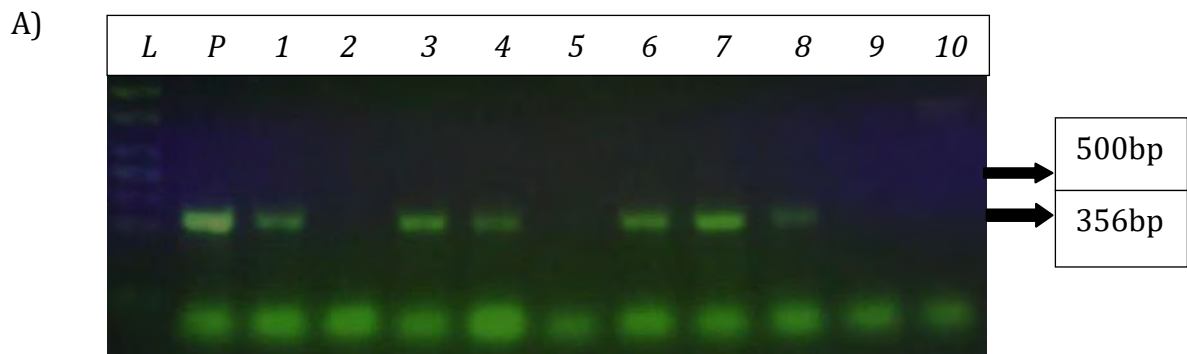
Παρατηρώντας τις παραπάνω εικόνες καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

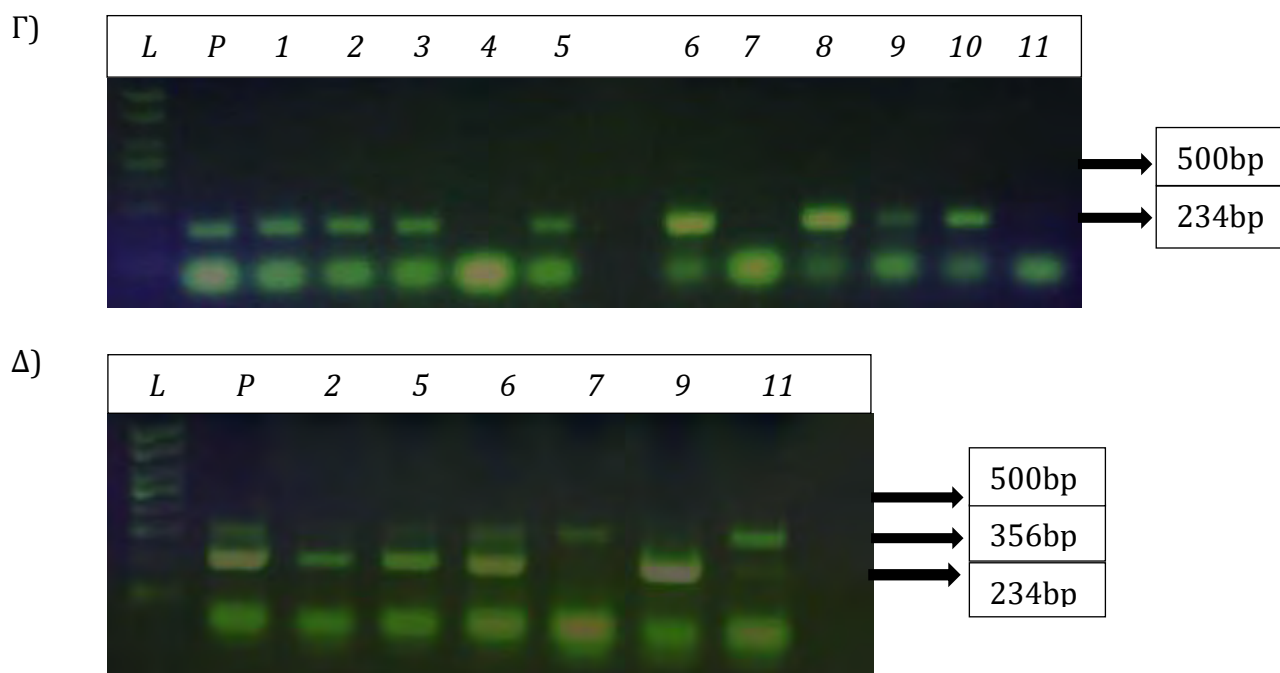
- Το δείγμα 2, 5, 8 και 9 είναι αγρίου τύπου, αφού έχει δώσει προϊόν στην PCR με το ζεύγος εκκινητών F1'-R1' μόνο.
- Τα δείγματα 1, 3, 4, 6, 7 και 10 είναι ετερόζυγα, εφόσον έχουν δώσει προϊόν στην PCR, τόσο με το ζεύγος εκκινητών F1'-R1', όσο και με το ζεύγος F1'-LAR3.

***B. Αποτελέσματα PCR απογόνων διασταύρωσης μεταξύ ετερόζυγων knockout-tm1a ποντικών: 2<sup>ο</sup> σύνολο δειγμάτων***

Τα δείγματα DNA του δευτέρου συνόλου, που είναι 11 στον αριθμό, προέρχονται από ποντίκια-απογόνους διασταύρωσης μεταξύ ετερόζυγων knockout-tm1a ποντικών. Στις PCRs που πραγματοποιήθηκαν ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 6 από το πρώτο σύνολο δειγμάτων και όταν πλέον δεν υπήρχε ποσότητα από αυτό χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 7 από το ίδιο σύνολο δειγμάτων. Τόσο το δείγμα 6, όσο και το δείγμα 7 έχει δείξει ότι προέρχονται από άτομα ετερόζυγα.

Τα αποτελέσματα της PCR για το δεύτερο σύνολο δειγμάτων με κάποια από τα ζεύγη εκκινητών, που αναφέρθηκαν παραπάνω, αναπαριστώνται στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 5.3.2):





**Εικόνα 5.3.2:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για τα προϊόντα της PCR των δειγμάτων του δευτέρου συνόλου: Α) με το ζεύγος εκκινητών F1'-R5new', Β) επαναληπτική για το ζεύγος εκκινητών F1'-R5new', Γ) με το ζεύγος εκκινητών F1'-LAR3 και Δ) με τους F1'-R5new'- LAR3 σε πολλαπλή PCR.

Από όλα τα παραπάνω δείγματα χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 1μl, με εξαίρεση τα 1, 4 και 6, τα οποία από την εικόνα 5.1.1 φαίνεται ότι είναι ιδιαίτερα πυκνά, οπότε πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:10 και ποσότητα 5μl από το αραιωμένο δείγμα χρησιμοποιήθηκε για τις επακόλουθες PCR. Ο αρνητικός μάρτυρας ήταν καθαρός σε όλες τις περιπτώσεις.

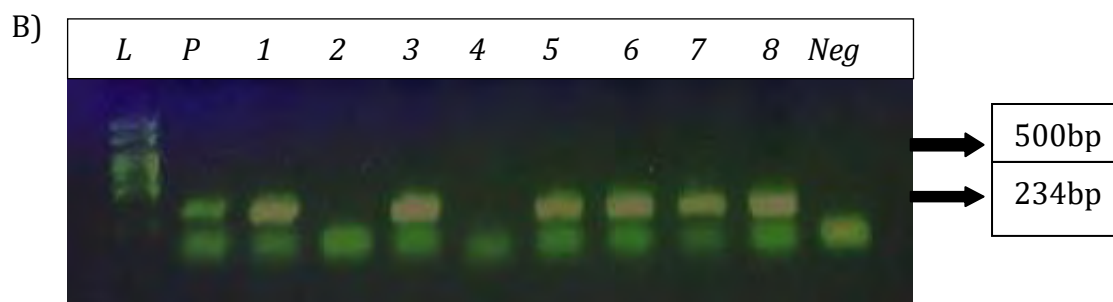
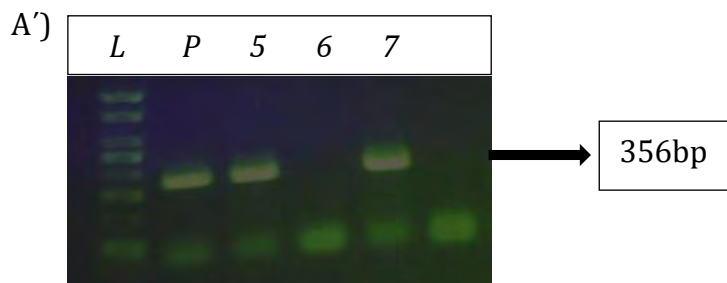
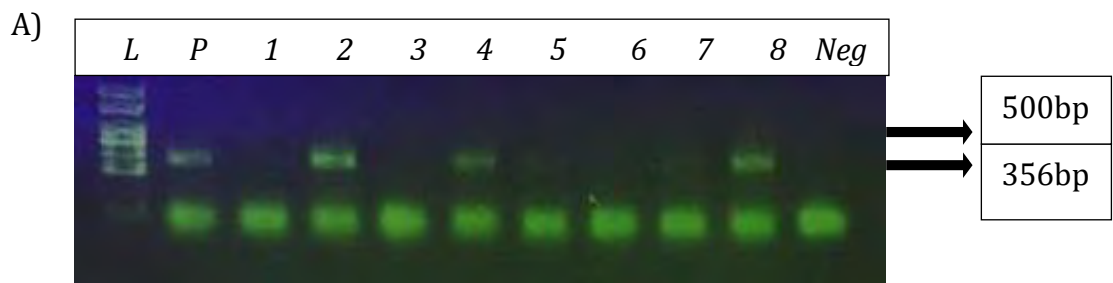
Παρατηρώντας τις παραπάνω εικόνες καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Τα δείγματα 4, 7 και 11 είναι αγρίου τύπου, αφού έχουν δώσει προϊόν στην PCR με το ζεύγος εκκινητών F1'-R5new' μόνο.
- Τα δείγματα 1, 3, 5, 6, 8 και 10 είναι ετερόζυγα, εφόσον έχουν δώσει προϊόν στην PCR, τόσο με το ζεύγος εκκινητών F1'-R5new', όσο και με το ζεύγος F1'-LAR3.
- Τα δείγματα 2 και 9 είναι ομόζυγα, αφού έχουν δώσει προϊόν στην PCR με το ζεύγος εκκινητών F1'-LAR3 μόνο.

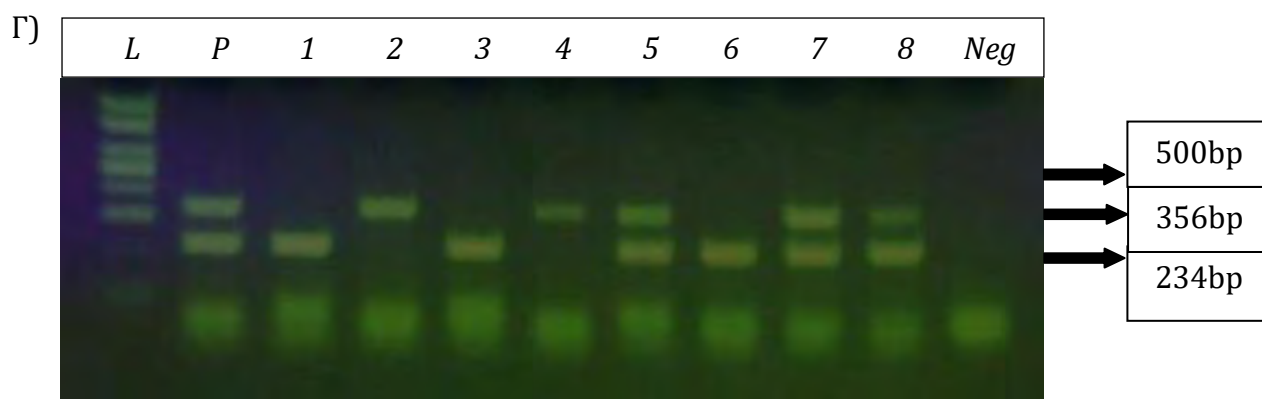
**Γ. Αποτελέσματα PCR απογόνων διασταύρωσης μεταξύ ετερόζυγων *knockout-tm1a* ποντικών: 3<sup>ο</sup> σύνολο δειγμάτων**

Τα δείγματα DNA του τρίτου συνόλου, που είναι 8 στον αριθμό, προέρχονται επίσης από ποντίκια-απογόνους διασταυρώσεων μεταξύ ετερόζυγων *knockout-tm1a* ποντικών. Στις PCRs που πραγματοποιήθηκαν ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 5 από το δεύτερο σύνολο δειγμάτων, το οποίο έχει δειχθεί ότι προέρχεται από άτομο ετερόζυγο.

Τα αποτελέσματα της PCR για το τρίτο σύνολο δειγμάτων για κάποια από τα ζεύγη εκκινητών, που προαναφέρθηκαν, αναπαριστώνται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 5.3.3):







**Εικόνα 5.3.3:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για τα προϊόντα της PCR των δειγμάτων του τρίτου συνόλου: Α) με το ζεύγος εκκινητών F1'-R5new', Α') με το ζεύγος εκκινητών F1'-R5new' ως επαναληπτική PCR για ορισμένα εκ των δειγμάτων Β) με το ζεύγος εκκινητών F1'-LAR3 και Γ) με τους εκκινητές F1'-R5new'- LAR3 από πολλαπλή PCR.

Από όλα τα δείγματα του συνόλου αυτού χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 1μl, συμπεριλαμβανομένου και των 5, 6 και 7, τα οποία από την εικόνα 5.3.4.A φαίνεται ότι δεν δίνουν ξεκάθαρα αποτελέσματα, οπότε και πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:1 και ποσότητα από το αραιωμένο δείγμα χρησιμοποιήθηκε για τις επακόλουθες PCR.

Παρατηρώντας τις παραπάνω εικόνες καταλήγουμε με σιγουριά στα εξής συμπεράσματα:

- Τα δείγματα 2 και 4 είναι αγρίου τύπου, αφού έχουν δώσει προϊόν στην PCR με το ζεύγος εκκινητών F1'-R5new' μόνο.
- Τα δείγματα 5, 7 και 8 είναι ετερόζυγα, εφόσον έχουν δώσει προϊόν στην PCR, τόσο με το ζεύγος εκκινητών F1'-R5new', όσο και με το ζεύγος F1'-LAR3.
- Τα δείγματα 1, 3 και 6 είναι ομόζυγα, αφού έχουν δώσει προϊόν στην PCR με το ζεύγος εκκινητών F1'-LAR3 μόνο.

Οι γονότυποι των ποντικών και για τα τρία σύνολα δειγμάτων συνοψίζονται στο πίνακα 5.3.α που ακολουθεί:

**Πίνακας 5.3.α:** Γονότυποι ποντικών από όλα τα σύνολα δειγμάτων

| Σύνολο δειγμάτων                             | Δείγμα   | Φύλο      | Γονότυπος        |
|--|----------|-----------|------------------|
| 1 <sup>ο</sup> σύνολο δειγμάτων (21/11/2017) | 1        | αρσενικό  | ετερόζυγο        |
|  | 2        | αρσενικό  | αγρίου τύπου     |
|  | 3        | αρσενικό  | αγρίου τύπου     |
|  | 4        | θηλυκό    | αγρίου τύπου     |
|  | 5        | αρσενικό  | αγρίου τύπου     |
|  | 6        | αρσενικό  | ετερόζυγο        |
|  | 7        | θηλυκό    | ετερόζυγο        |
|  | 8        | θηλυκό    | αγρίου τύπου     |
|  | 9        | αρσενικό  | αγρίου τύπου     |
|  | 10       | αρσενικό  | ετερόζυγο        |
| 2 <sup>ο</sup> σύνολο δειγμάτων (22/12/2017) | 1        | θηλυκό    | ετερόζυγο        |
|  | 2        | θηλυκό    | ομόζυγο knockout |
|  | 3        | θηλυκό    | ετερόζυγο        |
|  | 4        | ?         | αγρίου τύπου     |
|  | 5        | αρσενικό  | ετερόζυγο        |
|  | 6        | αρσενικό  | ετερόζυγο        |
|  | 7        | ?         | αγρίου τύπου     |
|  | 8        | αρσενικό  | ετερόζυγο        |
|  | 9        | αρσενικό  | ομόζυγο knockout |
|  | 10       | αρσενικό  | ετερόζυγο        |
| 3 <sup>ο</sup> σύνολο δειγμάτων (05/02/2018) | 11       | ?         | αγρίου τύπου     |
|  | 1        | θηλυκό    | ομόζυγο knockout |
|  | 2        | θηλυκό    | αγρίου τύπου     |
|  | 3        | θηλυκό    | ομόζυγο knockout |
|  | 4        | θηλυκό    | αγρίου τύπου     |
|  | 5        | αρσενικό  | ετερόζυγο        |
|  | 6        | αρσενικό  | ομόζυγο knockout |
|  | 7        | αρσενικό  | ετερόζυγο        |
| 8  | αρσενικό | ετερόζυγο |                  |

Συνεπώς, συνοψίζοντας τα αποτελέσματα για τους απογόνους των διασταύρωσεων μεταξύ ετερόζυγων knockout-tm1a ποντικών (2<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> σύνολο δειγμάτων) προκύπτει ότι είναι:

- 9 οι ετερόζυγοι knockout-tm1a ποντικοί,
- 5 οι ομόζυγοι knockout-tm1a ποντικοί και
- 5 οι αγρίου τύπου ποντικοί.

## 6. Συζήτηση

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στη γονοτύπηση ποντικών knockout, με στόχο την μελέτη του ρόλου του γονιδίου *Fra10ac1* του ποντικού, που είναι ορθόλογο με το ανθρώπινο γονίδιο *FRA10AC1*. Το γονίδιο *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην εύθραυστη χρωμοσωμική θέση *FRA10A* στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23.3, η οποία έχει συσχετιστεί, μεταξύ άλλων, με νοητική υστέρηση και αναπτυξιακές ανωμαλίες για τα άτομα-φορείς. Αρχικά, δημιουργήθηκε ένα μοντέλο ποντικού knockout με απαλοιφή του γονιδίου *Fra10ac1* και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες διασταυρώσεις, είτε ανάμεσα σε αγρίου τύπου και ετερόζυγους knockout-tm1a ποντικούς, είτε μεταξύ ετερόζυγων knockout-tm1a ποντικών, ώστε να πραγματοποιηθεί, τελικά, γονοτύπηση μέσω μίας σειράς από PCR, όπως τονίστηκε και σε προηγούμενες ενότητες και ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η γονοτύπηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δύο ζευγών εκκινητών σε κάθε PCR, ένα το οποίο αναγνώριζε το αλληλόμορφο αγρίου τύπου του γονιδίου *Fra10ac1* του ποντικού και ένα άλλο το οποίο αναγνώριζε το αλληλόμορφο knockout, δηλαδή το αλληλόμορφο στο οποίο έχει ενσωματωθεί η γονιδιακή κατασκευή στόχευσης. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης παρέχει την δυνατότητα οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων της PCR και αποσκοπούσε στην αναγνώριση του γονοτύπου του εκάστοτε δείγματος, ανάλογα με τα μεγέθη των ζωνών, το οποίο μπορεί να ήταν αγρίου τύπου, ετερόζυγο ή ομόζυγο, ανάλογα από την διασταύρωση από την οποία προέκυψε. Απώτερος σκοπός είναι να διενεργηθούν οι κατάλληλες δοκιμασίες συμπεριφοράς σε ποντικούς knockout, ετερόζυγους και ομόζυγους, καθώς και σε αγρίου τύπου ποντικούς, που θα χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες. Μερικές από τις διαφορετικές δοκιμασίες συμπεριφοράς, που μπορούν να διενεργηθούν σε ποντικούς, με στόχο την άντληση χρήσιμων πληροφοριών για τον φαινότυπο, που σχετίζεται με γνωστό γονότυπο, είναι:

- Το «Open field test», μέσω του οποίου εξετάζεται το άγχος και η κινητικότητα των ποντικών.
- Το «Rotarod» με το οποίο μπορεί να ελεγχθεί ο συντονισμός των κινήσεων των ποντικών και η ισορροπία τους.
- Το «Contextual and cued fear conditioning», μέσω του οποίου εξετάζονται η μνήμη και τα επίπεδα φόβου στους ποντικούς.
- Το «Morris water task», που υποδεικνύει την χωρική μάθηση.
- Το «Forced to swim test», που μπορεί να υποδείξει την απόγνωση της συμπεριφοράς των ποντικών.

- Το «Acoustic startle and prepulse inhibition», που αφορά στην δοκιμή της ακοής και της λειτουργίας του ιππόκαμπου των ποντικών (Bailey, Rustay, and Crawley 2006; Crawley 2008) (<https://medicine.yale.edu/compmed/mrp/resources/overview.asp>).

Η διεξαγωγή κάποιων από τις δοκιμασίες συμπεριφοράς, συνεπώς, στοχεύει στον έλεγχο της συμπεριφοράς των ποντικών knockout, είτε ετερόζυγων είτε ομόζυγων knockout. Οι διεργασίες αυτές κρίνονται αναγκαίες, αφού στον άνθρωπο, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, έχουν εντοπιστεί ετεροζυγώτες για την σίγηση του γονιδίου *FRA10AC1*, χωρίς όμως να είναι ξεκάθαρο εάν σε κατάσταση απλοανεπάρκειας, υπάρχουν παθολογικές συνέπειες στους ιστούς, όπου εκφράζεται το γονίδιο. Το γεγονός αυτό αξίζει βέβαια να αναφερθεί ότι θα μπορούσε να οφείλεται σε ατελή διεισδυτικότητα ή και μεταβλητή εκφραστικότητα του παθολογικού φαινοτύπου, που σχετίζεται με τη εύθραυστη χρωμοσωμική θέση *FRA10A* στον πληθυσμό, έτσι ώστε να μην εμφανίζονται σε ένα ποσοστό ατόμων-φορέων τα κλινικά συμπτώματα. Παράλληλα, ομοζυγώτες για την αποσιώπηση του γονιδίου και κατ'επέκταση ομοζυγώτες για την εύθραυστη χρωμοσωμική θέση *FRA10A*, δεν έχουν βρεθεί, γ'αυτό και είναι απαραίτητο να διενεργηθούν περαιτέρω μελέτες, ώστε να καθοριστεί ο φαινότυπος για την αποσιώπηση του γονιδίου, δηλαδή εάν η κατάσταση αυτή είναι συμβατή με τη ζωή ή όχι. Η διαδικασία αυτή είναι μείζονος σημασίας, διότι αρκετές από τις σπάνιες αυτοσωμικές εύθραυστες θέσεις-ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ- δεν έχουν βρεθεί σε ομοζυγωτία, παρόλο που, με βάση τη συχνότητα των ετεροζυγωτών, τέτοια άτομα θα ήταν αναμενόμενο να ταυτοποιηθούν, γεγονός που πιθανώς υποδηλώνει ότι μία τέτοια κατάσταση δεν είναι συμβατή με τη ζωή. Το μοντέλο ποντικού knockout με απαλοιφή του γονιδίου *Fra10ac1*, συνεπώς, είναι αυτό που μπορεί να «ρίξει φως» σε όλα αυτά τα ερωτήματα, εφόσον τα φαινοτυπικά αποτελέσματα στον ποντικό μπορούν να αναχθούν σε φαινοτυπικά αποτελέσματα, που θα έχει η κατάσταση αυτή στον άνθρωπο.

Ωστόσο, πέρα από τις διάφορες δοκιμασίες συμπεριφοράς, οι ιστολογικές αναλύσεις σε ποντικούς knockout, ετερόζυγους και ομόζυγους, καθώς και σε αγρίου τύπου ποντικούς-μάρτυρες, σε ιστούς, όπου έχει βρεθεί ότι το *Fra10ac1* παρουσιάζει αυξημένη έκφραση, όπως πχ. ο εγκέφαλος, η καρδιά, το ήπαρ, οι νεφροί και οι σκελετικοί μύες, μπορούν να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες για την επίδραση της μερικής ή ολικής απώλειας της πρωτεΐνης, που κωδικοποιείται από το γονίδιο, στην μορφολογία των δομών αυτών και κατ'επέκταση στις λειτουργίες που επιτελούνται σε αυτές τις δομές. Σκόπιμο θα ήταν, στην προκειμένη περίπτωση, οι ιστολογικές αναλύσεις να επικεντρωθούν σε ιστό εγκεφάλου, εφόσον μελετάται η συσχέτιση ή μη της εύθραυστης χρωμοσωμικής

θέσης *FRA10A* με νοητική υστέρηση. Για τη μικροσκοπική παρατήρηση των ιστών, εφόσον οι περισσότεροι είναι άχρωμοι, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές για τη χρώση των παρασκευασμάτων (staining), που επιτρέπουν τόσο την παρατήρηση των επιμέρους συστατικών τού ιστού αλλά και τη διάκριση ανάμεσά τους. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μιγμάτων χρωστικών που επιτρέπουν την αύξηση της αντίθεσης, ώστε να εντοπιστούν κύτταρα και ιστοί και να παρατηρηθεί η μορφολογία τους. Οι περισσότερες χρωστικές συμπεριφέρονται σαν βασικές ή όξινες ενώσεις και έχουν την τάση να σχηματίζουν άλατα με τις ιονίζουσες ρίζες των ιστών. Η χρώση επιτρέπει την ανίχνευση συγκεκριμένων χημικών ομάδων και ενώσεων σε κύτταρα και ιστούς. Οι ιστολογικές αναλύσεις στους ποντικούς knockout μπορούν να πραγματοποιηθούν, επίσης, με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας (IHC) κατά την οποία αναγνωρίζονται φυσιολογικά ή παθολογικά συστατικά των κυττάρων και των ιστών, μέσω της χρήσης ειδικών ανοσοσεσημασμένων (αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες, ένζυμα, ραδιοϊσότοπα) αντισωμάτων εναντίον πρωτεϊνών-στόχων, που καθιστούν τελικά ορατό το σύμπλεγμα, που δημιουργείται όταν το ειδικό αντίσωμα αναγνωρίσει την πρωτεΐνη-στόχο.

Ολοκληρώνοντας την παρούσα εργασία μπορούμε να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι η ομόζυγη knockout κατάσταση, με τα μέχρι στιγμής πειραματικά ευρήματα, πιθανότατα είναι συμβατή με τη ζωή, αφού στα σύνολα δειγμάτων, που προήλθαν από διασταυρώσεις μεταξύ ετερόζυγων ποντικών-knockout, προέκυψαν ομόζυγοι knockout απογόνοι για την σίγηση του γονιδίου *Fra10ac1*. Σε αυτή τη φάση, είναι μείζονος σημασίας να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή σε αυτούς τους ομόζυγους knockout απογόνους, αφού δεν είναι απίθανο να πεθαίνουν μετά τη γέννησή τους, γεγονός που μπορεί να μας δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τον φαινότυπο που σχετίζεται με την σίγηση του γονιδίου και συνεπώς την εύθραυστη χρωμοσωμική θέση *FRA10A*. Επίσης, αναμένεται να καθοριστεί, σε ένα μεγαλύτερο -στατιστικά σημαντικό- σύνολο δειγμάτων, εάν οι κλασικές μεντελικές αναλογίες ισχύουν. Αν το ποσοστό ομοζυγωτίας στους απογόνους, δηλαδή, παρουσιάζει σημαντική απόκλιση από το αναμενόμενο, τότε πρέπει να εξεταστεί και το ενδεχόμενο ένα ποσοστό των ομόζυγων knockout απογόνων να πεθαίνει σε εμβρυϊκό στάδιο. Υπάρχουν, συνεπώς, αρκετοί παράγοντες που είναι αναγκαίο να ληφθούν υπόψη προκειμένου να καταλήξουμε με σιγουριά σε συμπεράσματα, όσον αφορά στις συνέπειες τις ομοζυγωτίας για την απαλοιφή του γονιδίου *Fra10ac1*. Μόνο όταν εξεταστούν όλες οι παράμετροι μπορούμε να καταλήξουμε με βεβαιότητα στον φαινότυπο που σχετίζεται με τον -υπό εξέταση- γονότυπο, αποτέλεσμα το οποίο θα αντικατοπτρίζει και το φαινοτυπικό αποτέλεσμα που θα είχε αυτή η κατάσταση στον άνθρωπο, που είναι και το ζητούμενο.

## 7. Βιβλιογραφία

### Δημοσιευμένα άρθρα:

- Bailey Kathleen R., Nathan R. Rustay and Jacqueline N. Crawley. 2006. "Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice: Practical Concerns and Potential Pitfalls." *ILAR Journal* 47 (2): 124–31. <https://doi.org/10.1093/ilar.47.2.124>.
- Bessonov Sergey, Maria Anokhina, Andrius Krasauskas, Monika M Golas, Bjoern Sander, Cindy L Will, Henning Urlaub, Holger Stark and Reinhard Lu. 2010. "Characterization of Purified Human B," 2384–2403. <https://doi.org/10.1261/rna.2456210.observed>.
- Bessonov Sergey, Maria Anokhina, Cindy L. Will, Henning Urlaub and Reinhard Lührmann. 2008. "Isolation of an Active Step I Spliceosome and Composition of Its RNP Core." *Nature* 452 (7189): 846–50. <https://doi.org/10.1038/nature06842>.
- Burrow Allison A., Laura E. Williams, Levi C.T. Pierce and Yuh Hwa Wang. 2009. "Over Half of Breakpoints in Gene Pairs Involved in Cancer-Specific Recurrent Translocations Are Mapped to Human Chromosomal Fragile Sites." *BMC Genomics* 10: 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-59>.
- Coleman James L.J., Karen Brennan, Tony Ngo, Poornima Balaji, Robert M. Graham, and Nicola J. Smith. 2015. "Rapid Knockout and Reporter Mouse Line Generation and Breeding Colony Establishment Using EUCOMM Conditional-Ready Embryonic Stem Cells: A Case Study." *Frontiers in Endocrinology* 6 (JUN): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00105>.
- Crawley Jacqueline N. 2008. "Behavioral Phenotyping Strategies for Mutant Mice." *Neuron* 57 (6): 809–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.001>.
- Eichler E. E., Holden J. J. A., Popovich B. W., Reiss A. L., Snow K., Thibodeau S. N., Richards C. S., Ward P.A., Nelson D. L. 1995. "Length of Uninterrupted CGG Repeats Determines Instability in the FMR1 Gene." *Nature Genetics*, 8(1), 88–94. Doi:10.1038/Ng0994-88.
- Gacy A Marquis, Geoffrey Goellner, Nenad Juranic, Slobodan Macura and Cynthia T McMurray. 1995. "Trinucleotide Repeats That Expand in Human Disease Form Hairpin Structures In Vitro" 91: 533–40.
- Gecz Jozef, Gedeon A. K., Sutherland G. R. & Mulley John C. 1996. "Identification of the Gene FMR2, Associated with FRAXE Mental Retardation." *Nature Genetics* Volume 13, Pages 105–108.
- Gedeon A.K., E. Baker, H. Robinson, M.W. Partington, B. Gross, A. Manca, B. Korn, A. Poustka, S. Yu, G.R. Sutherland & J.C. Mulley. 1992. "Fragile X Syndrome without CCG Amplification Has an FMR1 Deletion." *Nature Genetics* Volume 1, Pages 341–344.

- Glover Thomas W., Carol Berger, Jane Coyle, and Barbara Echo. 1984. "DNA Polymerase  $\alpha$  Inhibition by Aphidicolin Induces Gaps and Breaks at Common Fragile Sites in Human Chromosomes." *Human Genetics* 67 (2): 136–42. <https://doi.org/10.1007/BF00272988>.
- Gozani Or, Rebecca Feld and Robin Reed. 1996. "Evidence That Sequence-Independent Binding of Highly Conserved U2 Sn . RN . P Proteins Upstream of the Branch Site Is Required for Assembly of Spliceosomal Complex A," 233–43.
- Handt Oliva, Grant R Sutherland and Robert I. Richards. 2000. "Fragile Sites and Minisatellite Repeat Instability" 105: 99–105. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.2996>.
- Hewett Duncan R, Oliva Handt, Lynne Hobson, Marie Mangelsdorf, Helen J Eyre, Elizabeth Baker, Grant R Sutherland, Simone Schuffenhauer, Jen-i Mao, and Robert I Richards. 1998. "FRA10B Structure Reveals Common Elements in Repeat Expansion and Chromosomal Fragile Site Genesis" 1: 773–81.
- Ilagan Janine O, Robert J Chalkley, A L Burlingame, and Melissa S Jurica. 2013. "Rearrangements within Human Spliceosomes Captured after Exon Ligation," 1–14. <https://doi.org/10.1261/rna.034223.112.4>.
- Yunis J.J., Soreng A.L. 1984. "Constitutive Fragile Sites and Cancer." *Science* Vol. 226, Issue 4679, Pp. 1199-1204 DOI: 10.1126/Science.6239375 605 (December): 1199–1204.
- Keuren Margaret L. Van, and Thomas L. Saunders. 2004. "Rederivation of Transgenic and Gene-Targeted Mice by Embryo Transfer." *Transgenic Research* 13 (4): 363–71. <https://doi.org/10.1023/B:TRAG.0000040040.82536.a5>.
- Krajewski Wladyslaw A. 1995. "Alterations in the Internucleosomal DNA Helical Twist in Chromatin of Human Erythroleukemia Cells in Vivo Influences the Chromatin Higher-Order Folding" 361: 149–52.
- Krajewski Wladyslaw A, and Juan Ausió. 1997. "Relationship Between Chromatin High-Order Folding and Nucleosomal Linker Twist in Nuclei of Human HeLa S3 Cells" 1102 (May). <https://doi.org/10.1080/07391102.1997.10508164>.
- Kristel De Boulle, Annemieke J.M.H. Verkerk, Edwin Reyniers, Lieve Vits, Jan Hendrickx, Bernadette Van Roy, Feikje Van Den Bos, Esther de Graaff, Ben A. Oostra & Patrick J. Willems. 1993. "A Point Mutation in the FMR-1 Gene Associated with Fragile X Mental Retardation." *Nature Genetics* Volume 3, Pages 31–35.
- Lardelli R. M., J. X. Thompson, J. R. Yates, and S. W. Stevens. 2010. "Release of SF3 from the Intron Branchpoint Activates the First Step of Pre-mRNA Splicing." *Rna* 16 (3): 516–28. <https://doi.org/10.1261/rna.2030510>.
- Leon-Luis Juan De, Joaquin Santolaya-Forgas, Gregory May, Vijay Tonk, Doug Shelton, and Isabel Galan. 2005. "Prenatal Diagnosis of FRA10A: A Case Report and Literature Review." *American Journal of Medical Genetics Part A* 136A

- (1): 63–65. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30093>.
- Lukusa T., and J. P. Fryns. 2008. "Human Chromosome Fragility." *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1779 (1): 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2007.10.005>.
- Mavrou A., M. Syrrou, C. Tsenghi, and C. Metaxotou. 1991. "Autosomal Folate Sensitive Fragile Sites in Normal and Mentally Retarded Individuals in Greece." *American Journal of Medical Genetics* 38 (2–3): 437–39. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320380259>.
- Morel Chantal F., A. M V Duncan, and Valérie Désilets. 2005. "A Fragile Site at 10q23 (FRA10A) in a Phenytoin-Exposed Fetus: A Case Report and Review of the Literature." *Prenatal Diagnosis* 25 (4): 318–21. <https://doi.org/10.1002/pd.1134>.
- Nancarrow J. K., K Holman, M. Mangelsdorf, T. Hori, M. Denton, G. R. Sutherland, and R. I. Richards. 1995. "Molecular Basis of p ( CCG ) n Repeat Instability at the FRA16A Fragile Site Locus" 4 (3): 367–72.
- Pearson Christopher E., Evan E. Eichler, Diego Lorenzetti, Shannon F Kramer, Huda Y. Zoghbi, David L. Nelson, and Richard R. Sinden. 1998. "Interruptions in the Triplet Repeats of SCA1 and FRAXA Reduce the Propensity and Complexity of Slipped Strand DNA ( S-DNA ) Formation †" 2960 (97): 2701–8.
- Petit P., J. P. Fryns, H. van den Berghe, and F. Hecht. 1986. "Population Cytogenetics of Autosomal Fragile Sites." *Clinical Genetics* 29 (2): 96–100. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1986.tb01229.x>.
- Pham C. T., D. M. MacIvor, B. A. Hug, J. W. Heusel and T. J. Ley. 1996. "Long-Range Disruption of Gene Expression by a Selectable Marker Cassette." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (23): 13090–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13090>.
- Samadashwily G. M., Raca G., & Mirkin S. M. 1997. "Trinucleotide Repeats Affect DNA Replication in Vivo." *Nature Genetics*, 17(3), 298–304. Doi:10.1038/Ng1197-298.
- Sarafidou Theologia, Christina Kahl, Isabel Martinez-Garay, Marie Mangelsdorf, Stefan Gesk, Elizabeth Baker, Maria Kokkinaki, et al. 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 (1): 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.12.017>.
- Schwartz Michal, Eitan Zlotorynski, and Batsheva Kerem. 2006. "The Molecular Basis of Common and Rare Fragile Sites" 232: 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.07.039>.
- Sutherland G. R. 1982. "Heritable Fragile Sites on Human Chromosomes. VIII. Preliminary Population Cytogenetic Data on the Folic-Acid-Sensitive Fragile Sites." *Hum Genet* 53 (1): 29–30.
- Sutherland G. R. 2003. "Rare Fragile Sites" 84: 77–84.



<https://doi.org/10.1159/000072840>.

- Sutherland G. R., M. I. Parslow, and Elizabeth Baker. 1985. "New Classes of Common Fragile Sites Induced by 5-Azacytidine and Bromodeoxyuridine," 233–37.
- Sutherland G. R. 1985. "Heritable Fragile Sites on Human Chromosomes XII. Population Cytogenetics." *Hum Genet* 53 (1): 29–30.
- Sutherland G. R. and Robert I. Richards. 1995. "The Molecular Basis of Fragile Sites in Human Chromosomes." *Current Opinion in Genetics & Development* 5 (3): 323–27. [https://doi.org/10.1016/0959-437X\(95\)80046-8](https://doi.org/10.1016/0959-437X(95)80046-8).
- Turner G. T. Webb, S. Wake, and H. Robinson. 1996. "Prevalence of Fragile X Syndrome" 197.
- Usdin K. and K. J. Woodford. 1995. "CGG Repeats Associated with DNA Instability and Chromosome Fragility Form Structures That Block DNA Synthesis in Vitro" 23 (20): 4202–9.
- Verkerk A. J., Maura Pieretti, James S. Sutcliffe, Ying-HuiFu, Derek P. Kuhl, Antonio Pizzuti, Orly Reiner, Stephen Richards, Maureen F. Victoria, Fuping Zhang, Bert E. Eussen, Gert-Jan B. van Ommen, Lau A. J. Blonden, Gregory J. Riggins, Jane L. Chastain, Catheri, Stephen T. Warren. 1991. "Identification of a Gene (FMR-1) Containing a CGG Repeat Coincident with a Breakpoint Cluster Region Exhibiting Length Variation in Fragile X Syndrome" 65: 905–14.
- Wahl Markus C., Cindy L. Will and Reinhard Lührmann. 2009. "The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine." *Cell* 136 (4): 701–18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009>.
- Wahl Markus C. and Reinhard Lührmann. 2015. "SnapShot : Spliceosome Dynamics II SnapShot : Spliceosome Dynamics II." *Cell* 162 (2). Elsevier: 456–456.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.061>.
- Waterston Robert H., Kerstin Lindblad-Toh, Ewan Birney, Jane Rogers, Josep F. Abril, Pankaj Agarwal, Richa Agarwala, et al. 2002. "Initial Sequencing and Comparative Analysis of the Mouse Genome." *Nature* 420 (6915): 520–62. <https://doi.org/10.1038/nature01262>.
- Weterings Eric, and David J. Chen. 2008. "The Endless Tale of Non-Homologous End-Joining" 18 (1): 114–24. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.3>.
- Will Cindy L., and Reinhard Lührmann. 2011. "Spliceosome Structure and Function. TL - 3." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 VN-re (7): 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707>.
- Wohrle Doris, Dieter Kotzott, Mark C. Hirst, Antonella Manca, Bernhard Korn, Angela Schmidt, Gotthold Barbi, Hans-dieter Rott Annemarie Poustka, Kay E Davies, and Peter Steinbach. 1992. "A Microdeletion of Less than 250 Kb , Including the Proximal Part of the FMR-I Gene and the Fragile-X Site , in a Male with the Clinical Phenotype of Fragile-X Syndrome," 299–306.
- Yu Sui, Marie Mangelsdorf, Duncan Hewett, Lynne Hobson, Elizabeth Baker, Helen J.

Eyre, Naras Lapsys et al. 1997. "Human Chromosomal Fragile Site FRA16B Is an Amplified AT-Rich Minisatellite Repeat" 88: 367–74.

Zlotorynski Eitan, Ayelet Rahat, Jennifer Skaug, Neta Ben-porat, Efrat Ozeri, Ruth Hershberg, Ayala Levi, Stephen W. Scherer, Hanah Margalit and Batsheva Kerem. 2003. "Molecular Basis for Expression of Common and Rare Fragile Sites" 23 (20): 7143–51. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.20.7143>.

### **Βιβλία:**

Watson James D., Myers Richard M., Caudy Amy A., Witkowski Jan A. (2007), "Ανασυνδρασμένο DNA"

Ελένη Ντούνη (2009-2010), Σημειώσεις βιοτεχνολογίας ζώων, Κεφάλαια 2 και 3, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ελένη Γαλλιοπούλου (2018), Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Διαδίκτυο:**

<https://www.mousephenotype.org/data/search/allele2?kw=%22FRA10Ac1%22#order2>

<https://medicine.yale.edu/compmed/mrp/resources/overview.asp>

## Παράρτημα

- Στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου για το γονίδιο Fra10ac1 από το NCBI (Gene ID: 70567) αναπαριστώνται οι θέσεις υβριδισμού ορισμένων εκ των εκκινητών:

8101 tgctgagcca ttcaccagc ctctctctgg ctcttatgt **tggtttat tttgaaacc** → Εκκινητής F1'

8161 **ttaatgttc**a tggcatttaa tttataaac atatactatt tttatatact ttattattaa

8221 ttattacatt gtataacagt agaagataaa ttttaatttt ttatctttaa ttagaagcc

8281 gcagtttatt tgtaatatta ttattagact gaataaaaga ataaagctgt gtgcagtcta

8341 gaagcagact agaaagctcc ctcttcccc tgggtggtat atattttat cccaagaata

8401 atgtattcat gaaaaagatt ccaaacattt taggtaatac atgcttgaag gatttcagc

8461 agaaagtga agct**gctgt gtagtgcg tacatga**ttt acacatttaa aatgataga → Εκκινητής R3new

8521 ctcataccat gctttctttt tatttaatag tatgttacag tggacaact tctgaacagt

8581 tacagaagtc cttaatgttt tgcatttcag tatcaaaggc acaccaagtt tgtaaagcagc

8641 tatattttgt actatgggtg caaaagagag gactttaagc ggttgggta agtattgtca

8701 agttcacatg gcacggtagg gcaagtacaa atgattttct aggcctgtt gtaactttct

8761 tggcgacagg agcatttca tgattgaacc aggtgtgatg ctggaagag cagtacactt

8821 gagcaatgct ttgtgtcttg ttgaatgaga ccattgaaac gacgacacac ttagactata

8881 gtgtccagga ttgcttttcg aaaattaaag caatgtcaa aagactcccc aatataggc

8941 tattgccgtt gcctgggtg ctccctaggc attgaagata agtcctactg ctgaggacac

9001 caga**cacttg acataggatt cagatgac**ct gagatgtctg acctaaagc ttccttcta → Εκκινητής R1'

9061 agggctacct ttctggtac aattgaaaaa gtagccagga tgggctggtg agatggctca

9121 gtgggtaaga gcaccgact gctcttccga aggtccagag ttcaaatccc agcaaccaca

- Στο αλληλόμορφο knockout για το γονίδιο Fra10ac1 από το EUCOMM (Design ID: 85004) αναπαριστώνται οι θέσεις υβριδισμού των εκκινήτων:

15001 tctctctggc ttcttatggt **gtgttttatt tttgaaacct taatgttc**at aaggcgcata ➔ Εκκινήτης F1'

15061 acgataccac gatatacaaca agtttgataca aaaaagcagg ctggcgccgg aaccgaagtt

15121 cctattccga agttcctatt ctctagaaag tataggaact tcgaaccctt tcccacacca

15181 ccctccacac ttgccccaaa cactgccaac tatgtaggag gaaggggttg **ggactaacag** ➔ Εκκινήτης LAR3

15241 **aagaaccctgt** tgtggggaag ctgttgggag ggtcacttta tgttcttgcc caaggtcagt

15301 tgggtggcct gcttctgatg aggtgtgccc aaggtctggg gtagaaggtg agagggacag

15361 gccaccaagg tcagcccccc cccctatcc cataggagcc aggtccctct cctggacagg

15421 aagactgaag gggagatgcc agagactcag tgaagcctgg ggtaccctat tggagtctct

15481 caaggaaca aacttggcct caccaggcct cagccttggc tcctcctggg aactctactg

15541 cccttgggat ccctttag tagttgtgggta cataggaagg gggacgggat tccccttgac

15601 tggctagcct actcttttct tcagtcttct ccactcctc tcacctgtct ctcgaccctt

15661 tccttaggat agacttgga aagataagg ggagaaaaca aatgcaaacg aggccagaaa

15721 gatattggct gggcattcct tccgtagct ttattggga tcccctagtt tgtgataggc

15781 ctttagcta catctgcaa tccatctcat ttccacacac acacacacca ctttcttct

15841 ggtcagtggg cacatgtcca gcctcaagtt tatatcacca ccccaatgc ccaacacttg

15901 tatggccttg ggcgggtcat cccccccc accccagta tctgcaacct caagctagct

15961 tgggtgcggtt ggttgtggat aagtagctag actccagcaa ccagtaacct ctgcccttc

16021 tcctcatga caaccaggtc ccaggctccg aaaaccaaag aagaagaacc ctaacaaaga