ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΠΑΜΠΟΥ ΠΗΝΕΛΟΠΗ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2022

Τίτλος πτυχιακής εργασίας:

Μελέτη ποντικών knockout για το γονίδιο *Fra10ac1* με PCR πραγματικού χρόνου

Thesis title:

Study of knockout mice for the *Fra10ac1* gene with real-time PCR

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- Σαραφίδου Θεολογία (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια): Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

- Μούτου Α. Αικατερίνη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

- Λιαδάκη Καλλιόπη: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καθώς η πτυχιακή εργασία έφτασε στο τέλος της, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα όλα τα άτομα τα οποία ήταν δίπλα μου και με βοήθησαν το καθένα με τον δικό του τρόπο να ολοκληρώσω αυτήν την προσπάθεια. Πρώτα απ’ όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κυρία Σαραφίδου Θεολογία, επίκουρο Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών που μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ πάνω στο συγκεκριμένο αντικείμενο μελέτης καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε, τις συμβουλές και καθοδήγηση που μου παρείχε καθ’ όλη τη διάρκεια της πτυχιακής. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Μούτου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών και την κυρία Καλλιόπη Λιαδάκη, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας τα οποία με βοήθησαν να προσαρμοστώ μέσα στον εργαστηριακό χώρο σε ένα πολύ ευχάριστο και δημιουργικό κλίμα. Ακόμη, θα ήθελα να τους ευχαριστήσω και για όλες τις συμβουλές, την βοήθεια και κατεύθυνση που μου παρείχαν για την ολοκλήρωση του πειράματός μου καθώς και για την άριστη συνεργασία τους μαζί μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου για την στήριξη και την εμψύχωση σε στιγμές ιδιαίτερου άγχους καθώς και την οικογένειά μου για την συμπαράσταση, την βοήθεια και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν μέχρι το τέλος των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γονίδιο *FRA10AC1* εντοπίζεται στη σπάνια εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A*, η οποία επάγεται απουσία φυλλικού οξέος στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων, στην χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3 του ανθρώπου. Η εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A* του ανθρώπου έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση ήπιας νοητικής και αναπτυξιακής υστέρησης σε άτομα-φορείς. Επίσης, σε πρόσφατη έρευνα αναφέρεται ότι ομόζυγες μεταλλάξεις στο *FRA10AC1* προκαλούν νευροαναπτυξιακή διαταραχή. Η μοριακή βάση της κυτταρογενετικής εμφάνισής της είναι η επέκταση, κατά τουλάχιστον ~200 φορές, τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων του τύπου (CGG)n που εντοπίζονται στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *FRA10AC1*. Η συγκεκριμένη επέκταση οδηγεί στην υπερμεθυλίωση της περιοχής αυτής και στη μεταγραφική καταστολή του αντίστοιχου αλληλομόρφου. Το κύριο μετάγραφο του γονιδίου *FRA10AC1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 315 αμινοξέων που εμφανίζει αποκλειστικά πυρηνική τοπολογία. Η πρωτεΐνη FRA10AC1 έχει ταυτοποιηθεί επανειλημμένα ως συστατικό του μείζονος σωματίου συναρμογής και των επιμέρους υποσυμπλόκων του, B act (activated), C και P. Επίσης, έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με συστατικά του σωματίου συναρμογής υποδεικνύοντας τη συμμετοχή της στη διαδικασία της συναρμογής ή σε κάποια άλλη σχετιζόμενη διαδικασία επεξεργασίας του mRNA.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει ως στόχο την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου *Fra10ac1* καθώς και του *Ess2* σε ποντικούς knockout, γονίδιο του οποίου η έκφραση φαίνεται πως επηρεάζεται αντιστρόφως ανάλογα με την έκφραση του *Fra10ac1*. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ιστούς ετερόζυγων ποντικών knockout για το γονίδιο *Fra10ac1* και σε ποντικούς αγρίου τύπου.

Λέξεις – Κλειδιά: *FRA10AC1*, PCR πραγματικού χρόνου, επίπεδα έκφρασης γονιδίων, ποντικοί knockout

ABSTRACT

The *FRA10AC1* gene is located at the rare fragile *FRA10A* chromosomal site, which is induced in the absence of folic acid in the cell culture medium, in the human chromosomal region 10q23.3. Human fragile *FRA10A* chromosomal locus has been associated with the development of mild mental and developmental retardation in carriers. Recent research has also shown that homozygous mutations in *FRA10AC1* cause neurodevelopmental disorder. The molecular basis of its cytogenetic appearance is the extension, at least ~ 200 times, of trinucleotide replicates of the formula (CGG)n located in the 5 'untranslated region of the *FRA10AC1* gene. This expansion leads to the hypermethylation of this region and consequent transcriptional repression of the corresponding allele. The major transcript of the *FRA10AC1* gene encodes a 315 amino acid protein that exhibits exclusively nuclear topology. The FRA10AC1 protein has been repeatedly identified as a component of the major coupling body and its individual subcomponents, B act (activated), C and P. It has also been shown to interact with components of the splicing body indicating its involvement in the splicing process or some other related mRNA processing.

The present dissertation aims to analyze the gene expression of the *Fra10ac1* gene as well as *Ess2* in knockout mice, a gene whose expression appears to be inversely affected by *Fra10ac1* expression. The assay was performed on tissues of heterozygous knockout mice for the *Fra10ac1* gene and on wild – type mice.

Keywords: *FRA10AC1*, Real Time PCR, gene expression levels, knockout mice

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

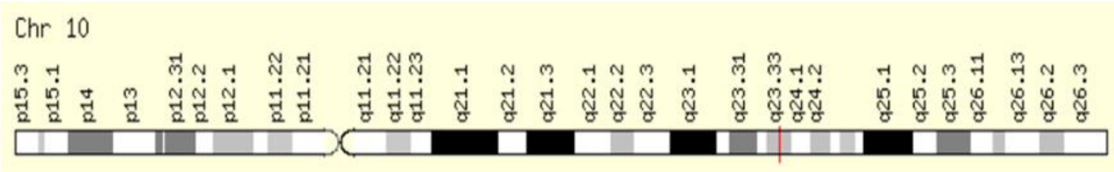
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 <u>Το γονίδιο *FRA10AC1*</u>

Η ταυτοποίηση του γονιδίου *FRA10AC1* (fragile site, folic acid type, rare, fra(10)(q23.3) or fra(10)(q24.2) candidate 1) έγινε βάσει της χρωμοσωματικής του θέσης καθώς εντοπίζεται στην σπάνια εύθραυστη θέση *FRA10A* η οποία επάγεται απουσία φυλλικού οξέος στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων. Η έκφραση της εύθραυστης θέσης *FRA10A* έχει συσχετιστεί με νοητική υστέρηση, νευρολογικές διαταραχές και αναπτυξιακές ανωμαλίες. Το *FRA10A* χαρτογραφείται στον άνθρωπο στην χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3 (Εικόνα 1), ενδιάμεσα των γονιδίων *LGII* και *PDE6C*. Εκτιμάται ότι περίπου 1 στα 500 άτομα εκδηλώνουν την εύθραυστη θέση *FRA10A* (Sarafidou et al., 2004).



Εικόνα 1: Θέση εντοπισμού του γονιδίου *FRA10AC1* στο χρωμόσωμα 10 (Gene Cards Human Gene Database).

Η έκφραση της εύθραυστης θέσης *FRA10A* προκαλείται από επέκταση μιας πολυμορφικής επανάληψης, CGG, στη 5΄ αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *FRA10AC1*. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, ATG, εντοπίζεται στην αρχή του εξονίου 2 ενώ το κωδικόνιο τερματισμού της μετάφρασης, TGA, βρίσκεται στο εξόνιο 19. Το εξόνιο 1 αντιστοιχεί στην 5' αμετάφραστη περιοχή και περιλαμβάνει τις τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις CGG. Οι συγκεκριμένες επαναλήψεις είναι πολυμορφικές στον γενικό πληθυσμό, δηλαδή ο αριθμός τους ποικίλλει μεταξύ των ατόμων, και κυμαίνονται από 8 έως 14. Η ανάλυση των τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων CGG στους φορείς της *FRA10A* έδειξε ότι, εκτός απ' το φυσιολογικό αλληλόμορφο, εμφανίζονται στην PCR και ζώνες μεγαλύτερου μεγέθους, γεγονός που υποδεικνύει την επέκταση της επανάληψης έως και 200 φορές (Sarafidou et al., 2004).

Το γονίδιο *FRA10AC1* αποτελείται από 19 εξόνια, 5 από τα οποία (εξόνια 13, 14, 15, 16 και 17) υφίστανται εναλλακτική συναρμογή και μεταγράφεται από το τελομερές προς το κεντρομερές κωδικοποιώντας μια πρωτεΐνη μεγέθους 315 αμινοξέων, ενώ εκτείνεται σε μήκος 33 kb. Το κύριο μετάγραφο περιλαμβάνει τα εξόνια 1-12 και 18-19, έχει μέγεθος περίπου 1,45 kb και εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς ενήλικων ατόμων με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στον εγκέφαλο, στην καρδιά, στους σκελετικούς μύες, στα νεφρά και στο ήπαρ, δηλαδή σε μεταβολικά ενεργούς ιστούς. Τα εναλλακτικά μετάγραφα περιλαμβάνουν συνδυασμούς των εξονίων 13-16 και η έκφραση των τριών εναλλακτικών μεταγράφων φαίνεται να είναι ιστοειδική, ενώ ανιχνεύονται κυρίως στην ωοθήκη και στους όρχεις (Sarafidou et al., 2004).

1.1.1 Εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις

Οι εύθραυστες θέσεις γενικά ταξινομούνται ως σπάνιες ή συνήθεις, ανάλογα με τη συχνότητά τους εντός του πληθυσμού.

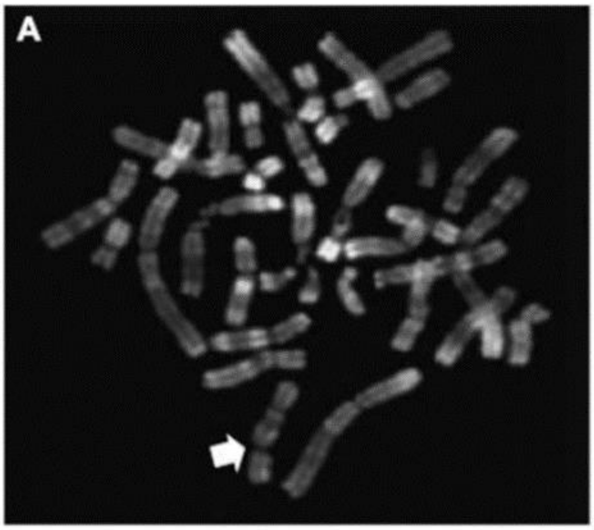
Οι συνήθεις εύθραυστες θέσεις αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα εύθραυστων θέσεων και αποτελούν χαρακτηριστικό των χρωμοσωμάτων όλων των ανθρώπων, σε αντίθεση με τις σπάνιες εύθραυστες θέσεις, και δεν είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων επέκτασης νουκλεοτιδικών επαναλήψεων. Οι συνήθεις εύθραυστες περιοχές είναι χρωμοσωμικές περιοχές πολύ ασταθείς και παρουσιάζουν χρωμοσωμικά χάσματα υπό την παρουσία αναστολέων της σύνθεσης του DNA. Αναστέλλουν εν μέρει την αντιγραφή και δεν σταματούν τον κυτταρικό κύκλο. Έχει δειχθεί ότι μετά από in vitro επαγωγή, οι εύθραυστες θέσεις συχνά εμπλέκονται σε απαλοιφές, διπλασιασμούς και μετατοπίσεις και παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα ανταλλαγής αδελφών χρωματίδων. Οι περισσότερες συνήθεις εύθραυστες θέσεις επάγονται από την αφιδοκολίνη, ενώ άλλες από την βρωμοδεοξυριδίνη (BrdU) ή την 5 - αζακυτιδίνη. Δεκατρείς κοινές εύθραυστες θέσεις, όλες επαγόμενες από αφιδικολίνη, έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα: *FRA3B, FRA16D, FRA7G, FRA7H, FRA7I, FRAXB, FRA6F, FRA2G, FRA6E, FRA7E, FRA9E, FRA4F* και *FRA8C* (Schwartz et al., 2006) (Glover, 2006).

Η δεύτερη ομάδα εύθραυστων θέσεων, οι σπάνιες εύθραυστες θέσεις, εμφανίζονται σε ποσοστό μικρότερο του 5% στον ανθρώπινο πληθυσμό και συνήθως οφείλονται σε επέκταση νουκλεοτιδικών επαναλήψεων. Αυτές οι εύθραυστες θέσεις μπορούν να προκληθούν έπειτα από καλλιέργεια των κυττάρων σε μέσο με ανεπάρκεια φυλλικού οξέος, ή από αναστολείς του μεταβολισμού του φυλλικού οξέος, όπως η μεθοτρεξάτη. Εναλλακτικά, αυτές οι εύθραυστες θέσεις μπορεί να προκληθούν από αναστολείς της σύνθεσης dTTP, όπως φθοροδεοξυουριδίνη (FdU). Όλοι οι παραπάνω τρόποι επηρεάζουν τον μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων και έτσι διαταράσσεται η σύνθεση του DNA. Μέχρι σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί οκτώ σπάνιες εύθραυστες θέσεις οι οποίες είναι ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ και δύο που εκδηλώνονται παρουσία δισταμυκίνης ή/και BrdU (Schwartz et al., 2006) (Glover, 2006).

Οι περισσότερες σπάνιες εύθραυστες περιοχές είναι ευαίσθητες σε φυλλικό οξύ και σχετίζονται με επέκταση επαναλήψεων CGG. Σε αυτές ανήκουν η *FRAXA* στο γονίδιο *FMR1* που σχετίζεται με το σύνδρομο εύθραυστου Χ, και η *FRAXE* στο γονίδιο *FMR2* που σχετίζεται με νοητική υστέρηση. Επιπλέον, και άλλες αυτοσωμικές ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ εύθραυστες θέσεις, όπως η *FRA10A*, έχουν συσχετιστεί με νοητική υστέρηση. Άλλες εύθραυστες θέσεις, μη ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, χαρακτηρίζονται από μεγάλες επαναλήψεις μικροδορυφόρων, είναι πλούσιες σε A-T και επάγονται με βρομοδεοξυουριδίνη (BrdU) ή δισταμυκίνη, όπως οι *FRA10B* και *FRA16B* (Schwartz et al., 2006) (Glover, 2006).

1.1.2 Η εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A* του ανθρώπου

Η *FRA10A* αποτελεί μια σπάνια αυτοσωματική εύθραυστη θέση που απαντάται στο χρωμόσωμα 10q23.3 και είναι ευαίσθητη στο φυλλικό οξύ. Ως αποτέλεσμα, εμφανίζεται όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν σε θρεπτικό μέσο απουσία φυλλικού οξέος. Οι εύθραυστες θέσεις εμφανίζονται οπτικά ως μη χρωματισμένα κενά στα χρωμοσώματα (Sarafidou et al., 2004).



Εικόνα 2: Σπάνια αυτοσωμική εύθραυστη θέση *FRA10A* στο χρωμόσωμα 10q23.3 (Sarafidou et al. 2004)

Όπως και σε άλλες γνωστές εύθραυστες θέσεις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, ανιχνεύτηκε και στην περιοχή που εκτείνεται στη θέση *FRA10A* μια επανάληψη CGG. Αυτή αποτελεί μέρος της νησίδας CpG στο εξόνιο 1, εντός της 5' αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου *FRA10AC1*. Έχει αποδειχθεί ακόμη, ότι τα αλληλόμορφα του *FRA10AC1* με αυξημένο αριθμό επαναλήψεων σιγούνται μεταγραφικά, ενώ σε χρωμοσωματικό επίπεδο εμφανίζεται η εύθραυστη θέση *FRA10A*. Όπως ισχύει και για τις άλλες εύθραυστες θέσεις αυτής της κατηγορίας, η κυτταρογενετική έκφραση της *FRA10A* οφείλεται στην επέκταση πάνω από 200 φορές της πολυμορφικής επανάληψης (CGG)n η οποία οδηγεί στην υπερμεθυλίωση της περιοχής, με αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής του αντίστοιχου αλληλομόρφου. Η επανάληψη *FRA10A* είναι παρόμοια με αυτές που εντοπίστηκαν σε άλλες πέντε ευαίσθητες σε φυλλικό οξύ εύθραυστες θέσεις (*FRAXA, FRAXE, FRAXF, FRA11B* και *FRA16A*) οι οποίες έχουν κλωνοποιηθεί μέχρι σήμερα (Sarafidou et al., 2004).

1.1.3 Συσχετισμός της εύθραυστης θέσης *FRA10A* και του γονιδίου *FRA10AC1* με νοσήματα

Η έκφραση της εύθραυστης θέσης *FRA10A* έχει συσχετιστεί με μια σειρά παθολογικών καταστάσεων, όπως νοητική υστέρηση, νευρολογικές διαταραχές και αναπτυξιακές ανωμαλίες, ενώ αποτελεί την πιο συχνά εμφανίσιμη στο ανθρώπινο γονιδίωμα με συχνότητα 1:500 στα έμβρυα. Επιπλέον, σε όλες τις περιπτώσεις που έγινε έλεγχος της γονεϊκής προέλευσης της *FRA10A*, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κληρονόμησή της ήταν μητρικής προέλευσης (Sarafidou et al., 2004).

Ακόμη, σε πρόσφατη έρευνα αναφέρεται χαρακτηριστικά ότι ομόζυγες μεταλλάξεις στο *FRA10AC1* προκαλούν μια νευροαναπτυξιακή διαταραχή που χαρακτηρίζεται από αναπτυξιακή καθυστέρηση, ήπια έως βαριά διανοητική αναπηρία, υποτονία και μικροκεφαλία (von Elsner et al., 2021).

Επίσης, σε μελέτη συσχέτισης πολυμορφισμών σε επίπεδο γονιδιώματος (genome-wide association study) με τα επίπεδα βιοδεικτών του εγκεφαλονωτιαίου υγρού σε ασθενείς με Alzheimer που πραγματοποιήθηκε πρόσφατα, ταυτοποιήθηκαν δυο πολυμορφισμοί του γονιδίου *FRA10AC1* οι οποίοι εμφάνισαν την υψηλότερη συσχέτιση με τα επίπεδα του Aβ1–42, ο οποίος αποτελεί βιοδείκτη για τη νόσο Alzheimer. Οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου (rs10509663 και rs116953792) *FRA10AC1* εντοπίζονται στο ιντρόνιο 12 και στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου (Li et al., 2015).

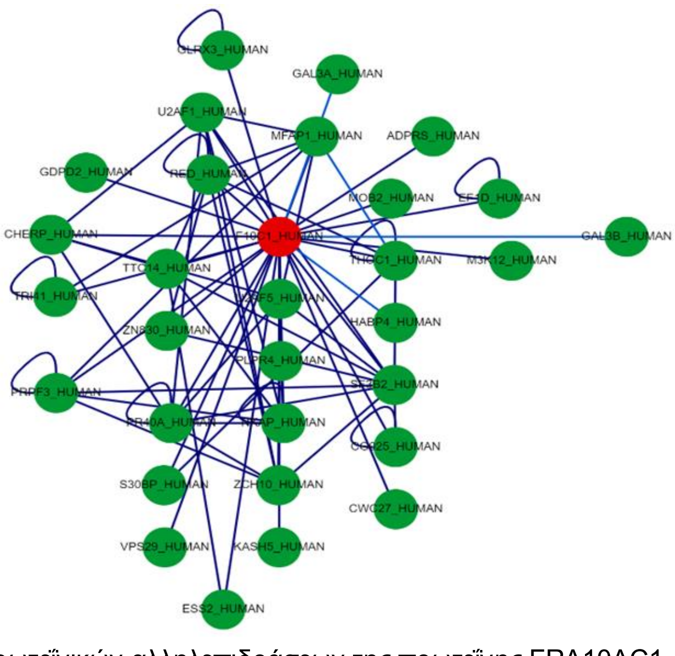
1.2 Η πρωτεΐνη FRA10AC1

Το κύριο μετάγραφο του γονιδίου *FRA10AC1* κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη 315 αμινοξέων με υπολογιζόμενο μοριακό βάρος 37,5kD. Η FRA10AC1 είναι μια συντηρημένη πρωτεΐνη καθώς εμφανίζει ορθόλογα μόρια σε πλήθος ευκαρυωτικών, ζωικών και φυτικών οργανισμών, αλλά όχι σε προκαρυωτικούς οργανισμούς. Η ακολουθία της πρωτεΐνης του ανθρώπου είναι ταυτόσημη κατά 86% με την ακολουθία της ορθόλογης πρωτεΐνης του ποντικού και παρουσιάζει ομολογία 92%. Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί ορθόλογα μόρια στα φυτά με ποσοστό ταυτότητας από 42% έως 55%, στα έντομα με ποσοστό ταυτότητας από 40% έως 57%, και στους οργανισμούς-μοντέλα *Caenorhabditis elegans* και *Drosophila melanogaster* σε ποσοστό 36% και 43%. Υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας (45-67%) παρατηρείται στην κεντρική περιοχή των ορθόλογων μορίων (αμινοξέα 105-240 στην πρωτεΐνη του ανθρώπου), γεγονός που πιθανώς υποδηλώνει μια περιοχή σημαντικής λειτουργίας. Ο πυρηνικός εντοπισμός της πρωτεΐνης, και πιο συγκεκριμένα στο πυρηνόπλασμα, αποδείχθηκε τόσο για την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη μετά από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων θηλαστικών, όσο και για την ενδογενή πρωτεΐνη, η οποία ανιχνεύθηκε με ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα (Sarafidou et al., 2004).

Επίσης, η πρωτεΐνη FRA10AC1 ταυτοποιήθηκε ως συστατικό των υποσυμπλόκων του μείζονος σωματίου συναρμογής στα καταλυτικά και τελικά στάδια του μηχανισμού συναρμογής, γεγονός που υποδεικνύει ότι σχετίζεται με το μηχανισμό επεξεργασίας και ωρίμανσης του πρόδρομου mRNA (pre-mRNA). Ωστόσο, χαρακτηρίστηκε ως πρωτεΐνη χαμηλής αφθονίας (non-core) σε σχέση με την αφθονία των υπόλοιπων συστατικών του σωματίου συναρμογής. Έτσι, προκύπτει ότι έχει πιθανόν δευτερεύοντα ρόλο στη διαδικασία της συναρμογής ή συμμετέχει σε άλλες διαδικασίες που συνδέονται με τη συναρμογή, όπως οι διαδικασίες της μεταγραφής, αυτές που έπονται της μεταγραφής, δηλαδή η μεταφορά των ώριμων mRNAs έξω από τον πυρήνα, ή η αποικοδόμηση των μη νοηματικών mRNAs στο κυτταρόπλασμα (Sarafidou et al., 2004).

1.2.1 Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης FRA10AC1

Από αναλύσεις του δικτύου αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης FRA10AC1 προκύπτει ότι η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν άμεσα με την FRA10AC1 είτε συμμετέχουν στη συναρμογή είτε σε συναφείς με αυτή διαδικασίες. Για παράδειγμα, σε αναλύσεις πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων προσδιορίστηκε η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης FRA10AC1 με τις πρωτεΐνες DGCR14 και SF3B2 οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής και έχουν επιβεβαιωμένο ρόλο στη διαδικασία της συναρμογής (Εικόνα 3). Πιο συγκεκριμένα, έρευνα που έγινε στον οργανισμό-μοντέλο *Caenorhabditis elegans* έδειξε ότι η πρωτεΐνη DGCR14 εξασφαλίζει την ακριβή συναρμογή του mRNA όταν η θέση συναρμογής δεν είναι η σωστή (Noma et al., 2014) ενώ η πρωτεΐνη SAP145 κωδικοποιείται από το γονίδιο *SF3B2* και αποτελεί συστατικό του συμπλόκου U2 snRNP και βοηθάει το σύμπλοκο αυτό να συνδεθεί στο πρόδρομο mRNA κατά την διαδικασία της συναρμογής (Sarafidou et al., 2004). Επίσης, έχει δειχθεί ότι η FRA10AC1 αλληλεπιδρά με άλλες 25 πρωτεΐνες που εντοπίζονται, στην πλειοψηφία τους, στον πυρήνα του κυττάρου. Από αυτές τις πρωτεΐνες, οι 17 έχουν ταυτοποιηθεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής, ενώ 10 από αυτές εμπλέκονται λειτουργικά στην συναρμογή, όπως οι PRPF40A (Wang et al, 2019), SF3B2, U2AF1 (Kawamura et al., 2019), DGCR14, PRPF3, MFAP1, IK (Vigevani et al., 2015), η CHERP και η HABP4 (Melo-hanchuk et al., 2020). Άλλες ακόμη εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής, όπως NKAP και SAP30BP (Burgute et al., 2014), και στην έξοδο του mRNA απ' τον πυρήνα, όπως η THOC1 (Song et al., 2013).



Εικόνα 3: Δίκτυο πρωτεΐνικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης FRA10AC1.
(http://www.pickle.gr/Visualize/Display?ids=11168&normalizationLevel=uniprot&queryType=firstNeighborGroup&dataset=crosschecked&org=9606)

1.3 Η FRA10AC1 στην επεξεργασία του mRNA

Η πρωτεΐνη FRA10AC1 έχει απομονωθεί επανειλημμένα ως συστατικό του μείζονος σωματίου συναρμογής σε βιοχημικές μελέτες απομόνωσης της ριβονουκλεοπρωτεϊνικής αυτής μηχανής, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι η πρωτεΐνη αυτή σχετίζεται με τον μηχανισμό επεξεργασίας του πρόδρομου mRNA. Ειδικότερα, έχει ταυτοποιηθεί στα επιμέρους υποσύμπλοκα του μείζονος σωματίου συναρμογής B act (activated), C και P, κατά τη συναρμολόγηση των οποίων λαμβάνουν χώρα τα δυο καταλυτικά βήματα της συναρμογής (σύμπλοκο B act και C) και η ολοκλήρωση της διαδικασίας (απομάκρυνση ιντρονίου, σύμπλοκο P) (Bessonov et al., 2008) (Hegele et al., 2012) (Ilagan et al., 2013).

Η συμμετοχή της FRA10AC1 στη συναρμογή φαίνεται να είναι συντηρημένη καθώς σε μια πρόσφατη ερευνητική μελέτη στο μονοκύτταρο οργανισμό *Chlamydomonas reinhardtii,* αποδείχθηκε ότι μια μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *FRA10AC1* αποκαθιστά τη σωστή εξέλιξη της συναρμογής του mRNA ενός συγκεκριμένου γονιδίου που έχει μεταλλαγμένη 3’ θέση συναρμογής, γεγονός που υποδεικνύει τη συνεισφορά της πρωτεΐνης στην αναγνώριση των θέσεων συναρμογής. Ακόμη, στον ίδιο μονοκύτταρο οργανισμό, δείχθηκε ότι μία μετάλλαξη κέρδους λειτουργίας του γονιδίου *DGCR14* αποκαθιστά τη σωστή εξέλιξη της συναρμογής των mRNA ενός συγκεκριμένου γονιδίου που είναι μεταλλαγμένο στην 5’ θέση συναρμογής, υποδεικνύοντας τη συντηρημένη λειτουργία της πρωτεΐνης στην αναγνώριση των θέσεων συναρμογής. Έτσι, τα παραπάνω στοιχεία υποδεικνύουν αφενός τον ρόλο της DGCR14 στη διαδικασία της συναρμογής και αφετέρου την πιθανή συμμετοχή της FRA10AC1 στο μηχανισμό αυτό με βάση τον συνεντοπισμό τους στα τελικά στάδια του μηχανισμού συναρμογής. Στην έρευνα αυτή υποδεικνύεται η πιθανή συνεισφορά ή «συνεργασία» των δυο αυτών πρωτεϊνών στη διαδικασία της συναρμογής στο μονοκύτταρο οργανισμό *Chlamydomonas reinhardtii*, δείχνοντας έτσι την συντηρημένη βιολογική λειτουργία των δυο πρωτεϊνών στην αναγνώριση των θέσεων συναρμογής ακόμα και σε απλούστερους οργανισμούς (Lin et al., 2018).

Τέλος, πρόσφατα, πραγματοποιήθηκε ομική ανάλυση σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο ώστε να μελετηθούν οι επιπτώσεις της καταστολής του γονιδίου *FRA10AC1* σε κλώνους κυττάρων HeLa. Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε έδειξε ότι, μεταξύ άλλων, επηρεάζεται η έκφραση αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με την επεξεργασία του mRNA και γενικότερα η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε υπό το πρίσμα της συμμετοχής της FRA10AC1 στην επεξεργασία του mRNA και στο σωμάτιο συναρμογής. Όλα τα παραπάνω δεδομένα ενισχύουν την υπόθεση της συμμετοχής της FRA10AC1 στη διαδικασία επεξεργασίας του mRNA (Sarafidou et al., 2004).

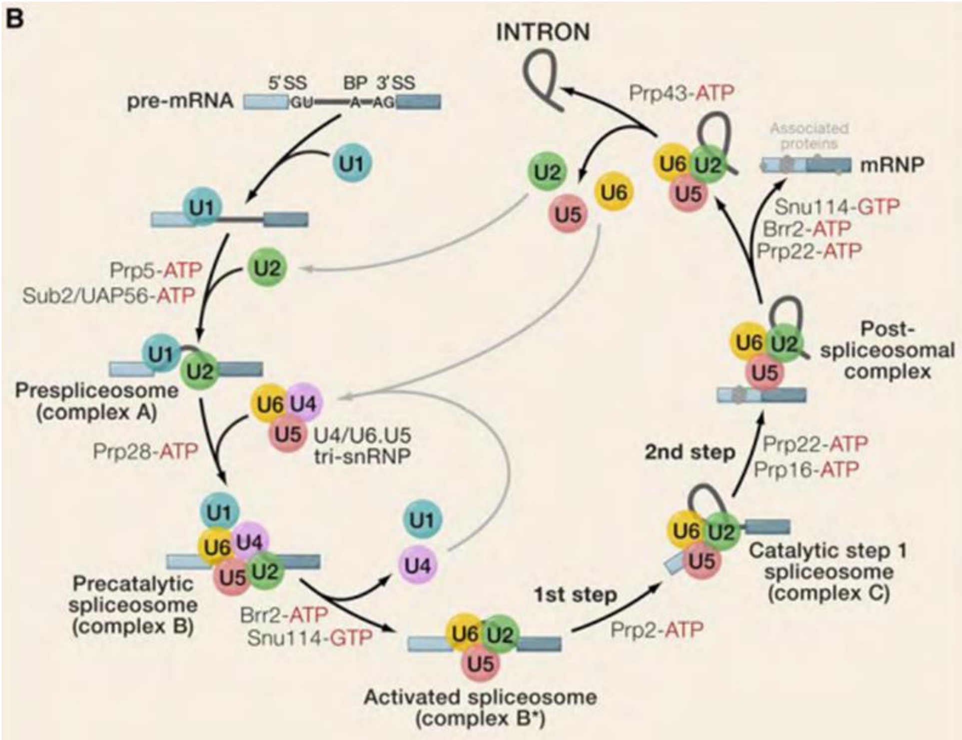
1.3.1 Επεξεργασία και ωρίμανση του mRNA

Πολλά βήματα ωρίμανσης του πυρηνικού πρόδρομου mRNA απαιτούνται πριν από τη μετάφραση του ώριμου mRNA στα ριβοσώματα στο κυτταρόπλασμα. Μεταξύ αυτών, απαιτείται η εκτομή των ιντρονίων και η συρραφή των εξονίων μεταξύ τους, μια διαδικασία που είναι γνωστή ως συναρμογή, και η οποία λαμβάνει χώρα στον πυρήνα ταυτόχρονα ή αμέσως μετά τη μεταγραφή και καταλύεται από ένα ιδιαίτερα δυναμικό μακρομοριακό μηχάνημα που ονομάζεται σωμάτιο συναρμογής. Πρόσθετα βήματα ωρίμανσης περιλαμβάνουν ακόμη, την τροποποίηση του 5΄ άκρου με προσθήκη καλύπτρας και το άκρο 3' με πολυαδενυλιωμένη "ουρά" (Potter et al., 2013) (Pol & Ctd, 2020).

Το σωμάτιο συναρμογής (spliceosome, αποτελείται από τουλάχιστον 200 πρωτεΐνες και πέντε μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια ή αλλιώς μικρά, πυρηνικά RNA (snRNPs), τα U1, U2, U4, U5 και U6 (Potter et al., 2013) (Ilagan et al., 2013). Αρκετές πρωτεΐνες παίζουν βασικό ρόλο στη διαδικασία αναγνώρισης των θέσεων συναρμογής, συμμετέχουν αποτελεσματικά στη δυναμική αλληλεπιδράσεων RNA – RNA, RNA – πρωτεΐνης και πρωτεΐνης – πρωτεΐνης του σωματίου συναρμογής και βοηθούν το πρόδρομο mRNA να τοποθετηθεί κατάλληλα για κατάλυση. Επίσης, πολλές από τις δυαδικές αλληλεπιδράσεις RNA – RNA, RNA – πρωτεΐνης ή πρωτεΐνης – πρωτεΐνης είναι σχετικά αδύναμες. Παρ 'όλα αυτά, πολλές αδύναμες αλληλεπιδράσεις μαζί εξασφαλίζουν τη συνολική σταθερότητα των συμπλεγμάτων snRNP που σχηματίζονται (Pol & Ctd, 2020) (Hegele et al., 2012).

1.3.2 Μηχανισμός συναρμογής

Εντός του σωματίου συναρμογής, η αφαίρεση των ιντρονίων απ' το πρόδρομο mRNA προχωρά με δύο αντιδράσεις μετεστεροποίησης. Ενδιάμεσα των δύο αντιδράσεων κρίσιμο ρόλο, τόσο στην αναγνώριση των θέσεων συναρμογής όσο και στην καταλυτική ενεργοποίηση του σωμάτιου συναρμογής, παίζουν το RNA και οι πρωτεΐνες που αποτελούν τα snRNP (small nuclear Ribonucleoprotein). Πιο συγκεκριμένα, αρχικά, η υπομονάδα U1 snRNP αλληλεπιδρά με την 5' θέση συναρμογής του προδρόμου mRNA για να σχηματίσει το λεγόμενο σύμπλοκο E (early). Στη συνέχεια, η υπομονάδα U2 snRNP δεσμεύεται στη θέση διακλάδωσης εντοπίζοντας την πρωτεΐνη BBP (branch binding protein) σχηματίζοντας το σύμπλοκο A. Έπειτα, γίνεται αναδιάταξη του συμπλόκου A ώστε να αλληλεπιδράσει με τις υπομονάδες U4/U6 και U5 snRNP, οι οποίες αποτελούν το tri-snRNP, δημιουργώντας το, απενεργοποιημένο ακόμα, σύμπλοκο B. Μετά από αναδιατάξεις και την απελευθέρωση των υπομονάδων U1 και U4 σχηματίζεται το ενεργοποιημένο σύμπλοκο B (B-activated). Αυτό, μέσω συγκεκριμένων αναδιατάξεων μετασχηματίζεται σε καταλυτικό υποσύμπλοκο B (B*). Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται η πρώτη αντίδραση μετεστεροποίησης και σχηματίζεται το υποσύμπλοκο C. Η δεύτερη αντίδραση μετεστεροποίησης πραγματοποιείται όταν η υπομονάδα U5 φέρνει σε επαφή τα δύο εξώνια και στη συνέχεια το προϊόν mRNA απελευθερώνεται, ενώ το αποκομμένο ιντρόνιο παραμένει δεσμευμένο σε θηλιά στις υπομονάδες U2, U5 και U6 αποτελώντας το υποσύμπλοκο C. Τέλος, αυτά τα snRNPs διαχωρίζονται και μπορούν να συμμετάσχουν στον επόμενο γύρο συναρμογής (Hegele et al., 2012) (Ilagan et al., 2013).



Εικόνα 4: Ο κύκλος της συναρμογής (Wahl, Will, and Lührmann 2009). Απεικονίζονται τα στάδια συναρμολόγησης του μείζονος σωματίου συναρμογής και τα υποσύμπλοκα που αποτελούν το σωμάτιο συναρμογής.

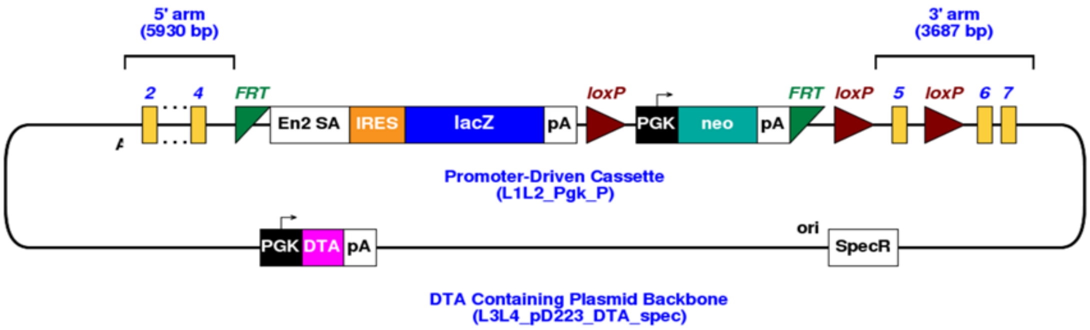
1.4 Δημιουργία ποντικών knockout

Τα τελευταία χρόνια διάφορες τεχνολογίες έχουν χρησιμοποιηθεί από τους ερευνητές για τη δημιουργία ποντικών – μοντέλων που επιτρέπουν τη μελέτη ενός μεγάλου εύρους ασθενειών, καθώς και τη μελέτη της λειτουργίας στοχευμένων γονιδίων. Μία από αυτές τις μεθόδους αποτελεί η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών κατά την οποία ένα νέο γονίδιο εισάγεται στη γαμετική σειρά του ζώου. Συγκεκριμένα, με την χρήση του ομόλογου ανασυνδιασμού και την ανάπτυξη τεχνολογιών στόχευσης γονιδίων (gene targeting), δηλαδή τη δημιουργία μη λειτουργικών γονιδίων με χρήση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού ES (αδιαφοροποίητα κύτταρα που προέρχονται από το εσωτερικό βλαστοκύστης ποντικού ηλικίας 3 – 5 ημερών), οι ερευνητές πλέον έχουν αποκτήσει την ικανότητα να μεταλλάξουν επιλεκτικά το γονιδίωμα του ποντικού σε τόπους της επιλογής τους. Η τεχνολογία αυτή περιλαμβάνει το σχεδιασμό του φορέα στόχευσης, την απομόνωση των κυττάρων ES, την καλλιέργεια των κυττάρων ES και για τη χειρουργική εμφύτευση του εμβρύου. Καθώς όμως αυτή η διαδικασία είναι χρονοβόρα και δαπανηρή, οι ερευνητές που προτίθενται να ξεκινήσουν μελέτες σε ζώα, επωφελούνται από μια βιβλιοθήκη προμεταλλαγμένων κυττάρων ποντικού ES η οποία δημιουργήθηκε μέσω της ίδρυσης του International Knockout Mouse Consortium (IKMC) (Coleman et al., 2015). Το IKMC ιδρύθηκε το 2007 με στόχο τη μετάλλαξη όλων των περιοχών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του γονιδιώματος του ποντικού χρησιμοποιώντας γονιδιακή στόχευση και παγίδευση γονιδίων σε κύτταρα ES ποντικού C57BL/6. Το IKMC είναι μια κοινοπραξία προγραμμάτων συνεργατών: Knockout Mouse Project (KOMP) (ΗΠΑ), European Conditional Mouse Mutagenesis

Program (EUCOMM) (Ευρώπη), EUCOMM: Tools for Functional Annotation of the Mouse Genome (EUCOMMTOOLS) (Ευρώπη), North American Conditional Mouse Mutagenesis Project (NorCOMM) (Καναδάς), and Texas A&M Institute for Genomic Medicine (TIGM) (ΗΠΑ) (Coleman et al., 2015). Η κοινοπραξία IKMC έχει δημιουργήσει κυρίως μεταλλάξεις που επιτρέπουν την αδρανοποιήση του γονιδίου σε συγκεκριμένο ιστό (conditional), αλλά και μεταλλάξεις που επιτρέπουν την αδρανοποίηση του γονιδίου σε ολόκληρο τον οργανισμό (constitutive) μεταλλάξεις. Η πρώτη κατηγορία μεταλλάξεων είναι πιο συχνή και χρησιμοποιούνται καθώς διευκολύνουν τον προσδιορισμό της γονιδιακής λειτουργίας σε συγκεκριμένους ιστούς (Skarnes et al., 2011).

1.4.1 Σχεδιασμός φορέα στόχευσης

Το 1ο βήμα της κατασκευής ποντικού knock-out είναι ο εντοπισμός της περιοχής του γονιδίου που θα πρέπει να διαγραφεί. Μόλις χαρτογραφηθεί το τμήμα του γονιδίου που θα διαγραφεί, πρέπει επίσης να ταυτοποιηθούν οι αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων των τμημάτων DNA που εμφανίζονται στο χρωμόσωμα πριν και μετά από αυτό το γονίδιο. Μόλις ολοκληρωθούν αυτές οι εργασίες, δημιουργείται ένας φορέας στόχευσης ειδικά προσαρμοσμένος στο γονίδιο ενδιαφέροντος. Στη συνέχεια, προκειμένου να καταστεί ανιχνεύσιμος ο φορέας στόχευσης, εισάγεται ένα γονίδιο-δείκτης στη μέση του φορέα. Η εισαγωγή ενός φορέα στόχευσης γονιδίων διαταράσσει τη γονιδιακή λειτουργία, δείχνει την έκφραση του γονιδίου και παρέχει μια κατάλληλη ετικέτα για την ταυτοποίηση της θέσης εισαγωγής του φορέα στο γονιδίωμα. Ο φορέας μπορεί να εισαχθεί σε κύτταρα ES με ηλεκτροδιάτρηση. Τα κύτταρα ES όταν εγχέονται σε βλαστοκύστη ποντικού μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλους τους τύπους κυττάρων ενός χιμαιρικού ποντικού. Ένα χιμαιρικό ποντίκι που περιέχει κύτταρα που προέρχονται από τον στοχευόμενο ES κλώνο κυττάρων μπορεί στη συνέχεια να δημιουργήσει ένα ποντίκι που περιέχει την επιθυμητή στοχευμένη μετάλλαξη. (Limaye et al., 2009).



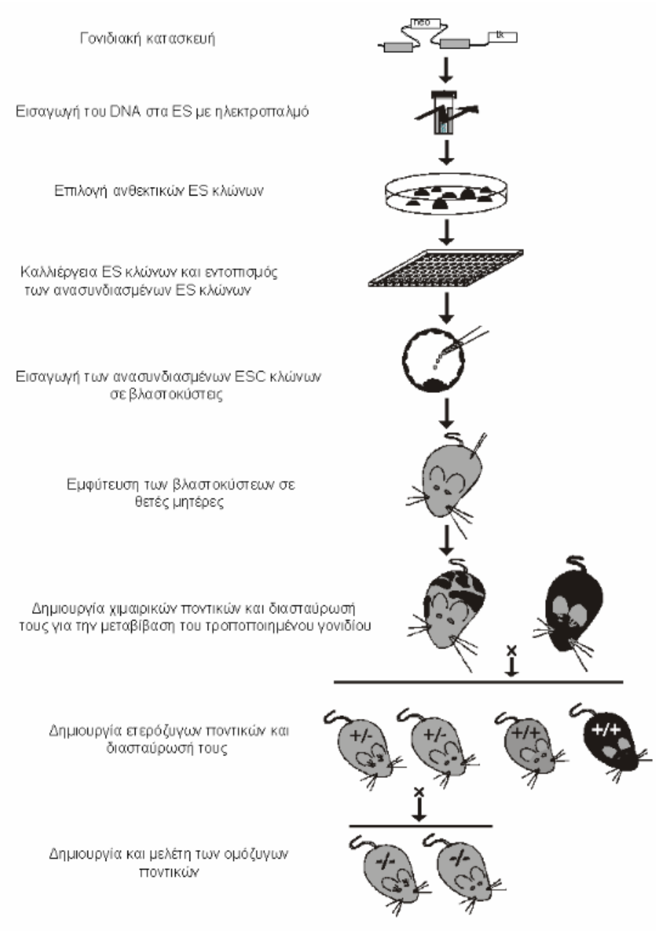
Εικόνα 5: Φορέας στόχευσης που περιέχει την αλληλουχία στόχευσης (https://www.eummcr.org).

Συγκεκριμένα, ο φορέας στόχευσης για το γονίδιο *Fra10ac1* αποτελείται από:

- Κασέτα επιλογής ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη (NeoR): Το αντιβιοτικό νεομυκίνη είναι τοξικό για τα κύτταρα ποντικού εκτός αν έχει εντεθεί το γονίδιο NeoR, οπότε σε αυτή την περίπτωση τα κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν παρουσία νεομυκίνης. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να ελεγχθεί εάν έχει γίνει ο ομόλογος ανασυνδυασμός αφού μπορούν εύκολα να επιλεχθούν τα κύτταρα που θα έχουν επιβιώσει.
- Βραχίονες (arms) ομολογίας: Πρόκειται για τον «δεξιό βραχίονα» και τον «αριστερό βραχίονα» του φορέα στόχευσης που έχουν αλληλουχία ίδια με του ενδογενούς γονιδίου *Fra10ac1* (Εικόνα 3). Το δεξί και το αριστερό τμήμα του φορέα στόχευσης διευκολύνουν τον ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ του φορέα στόχευσης και του γονιδίου-στόχου, επιτρέποντας έτσι στο γονίδιο NeoR να αντικαταστήσει τμήμα του γονιδίου (Limaye et al., 2009).
- Κασέτα lacZ: Ένα από τα γονίδια αναφοράς για την παρακολούθηση της έκφρασης ενός γονιδίου είναι το γονίδιο lacZ που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση. Αυτό το ένζυμο διασπά τη λακτόζη στα πιο απλά σάκχαρα γλυκόζη και γαλακτόζη (Alfonita et al. 2018). Για να μπορέσει να εντοπιστεί το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου ενδιαφέροντος, τοποθετείται το lacz, το οποίο εισάγεται επιπλέον στο γονίδιο ενδιαφέροντος και όταν αυτό εκφράζεται έχει ως αποτέλεσμα τομές του ποντικού να αποκτήσουν ένα μπλε χρώμα όταν αναπτύσσονται σε υπόστρωμα β – γαλακτοσιδάσης, το οποίο ανιχνεύεται με ανοσοιστοχημικές μεθόδους (Ho, n.d.).
- Θέσεις LoxP: Οι θέσεις LoxP είναι αλληλουχίες 34 bp που αποτελούνται από δύο θέσεις αναγνώρισης 13 bp που διαχωρίζονται από μια περιοχή 8 bp. Οι αλληλουχίες δεν υπάρχουν φυσιολογικά στα γονιδιώματα εκτός από το βακτηριοφάγο P1. Οι θέσεις LoxP χρησιμοποιούνται πάντα σε ζεύγη και αναγνωρίζονται από την ρεκομπινάση Cre η οποία αποκόπτει το DNA που περικλείεται από αυτές τις θέσεις (Kim et al., 2019). Ο φορέας στόχευσης περιλαμβάνει τρείς θέσεις LoxP. Η μια βρίσκεται ενδιάμεσα της κασέτας επιλογής ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη και της κασέτας lacZ και οι άλλες δύο θέσεις βρίσκονται εκατέρωθεν του εξονίου 5 εξασφαλίζοντας την διαγραφή του εξονίου (Εικόνα 3).
- Θέσεις FRT: Το σύστημα FLP / FRT λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο με το σύστημα ανασυνδυασμού Cre-LoxP. Περιλαμβάνει τη χρήση της ρεκομπινάσης FLP που προέρχεται από τον *Saccharomyces cerevisiae* και αναγνωρίζει ένα ζευγάρι αλληλουχιών στόχου FRT, ένα ζεύγος 34 βάσεων (bp), που πλαισιώνουν μια γονιδιωματική περιοχή ενδιαφέροντος, και αποκόπτει το τμήμα DNA μεταξύ τους, όταν οι θέσεις FRT βρίσκονται στον ίδιο προσανατολισμό (Ji et al., 2017). Στον φορέα στόχευσης εισάγονται δύο θέσεις FRT: η μία πριν την κασέτα επιλογής ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη και η άλλη μεταξύ των δύο θέσεων LoxP, πριν το εξόνιο 5 (Εικόνα 3).

1.4.2 Δημιουργία γενετικά τροποποιημένων ποντικών

Ο φορέας στόχευσης που αναφέρεται παραπάνω εισέρχεται σε εμβρυϊκα βλαστικά κύτταρα ποντικού μέσω της ηλεκτροδιάτρησης. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία νεομυκίνης ώστε να επιλεχθούν αυτά τα οποία έχουν λάβει τον φορέα και είναι ανθεκτικά στη νεομυκίνη. Αυτά τα ES κύτταρα είναι ετερόζυγα ως προς την μετάλλαξη knockout. Ακολουθεί ένεση αυτών των κυττάρων σε βλαστοκύστη ώστε τα ετερόζυγα knockout κύτταρα ES να γίνουν μέρος του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Με τον τρόπο αυτό, προκύπτει ένα χιμαιρικό ποντίκι το οποίο περιέχει ένα μείγμα από τα δικά του αρχικά κύτταρα και τα ετερόζυγα knockout κύτταρα (Sharma & Zhu, 2014). Τα χιμαιρικά ποντίκια στη συνέχεια διασταυρώνονται με wild type ποντίκια και προκύπτουν τελικά ετερόζυγα knockout μη χιμαιρικά και ομόγυζα wild type. Ακολουθεί διασταύρωση των ετερόζυγων μη χιμαιρικών knockout και το 25% των ποντικών που θα προκύψουν από αυτή τη διασταύρωση θα είναι ομόζυγα ποντίκια knockout τα οποία είναι αυτά που επιλέγονται για περαιτέρω ελέγχους (David P. Clark, Nanette J.Pazdernik, 2016).



Εικόνα 6: Βήματα για τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων ποντικών (Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας Ζώων, Ελένη Ντούνη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2009-2010).

1.4.3 Δημιουργία ποντικών tm1a

Το αλληλόμορφο που προκύπτει έπειτα από τον ομόλογο ανασυνδυασμό του φορέα στόχευσης με το αντίστοιχο ενδογενές γονίδιο, αναφέρεται ως στοχευμένη μετάλλαξη 1α (targeted mutation 1a ή tm1a) και ονομάζεται knockout-first επειδή η εισαγωγή του αλληλόμορφου παγίδευσης lacZ αναμένεται από μόνη της να διαταράξει τη συναρμογή του γονιδίου (Εικόνα 3). Προκειμένου όμως να αξιολογηθεί ο φαινότυπος της καταστροφής του γονιδίου, πρέπει να αφαιρεθούν οι κασέτες ανθεκτικότητας της νεομυκίνης και το lacZ καθώς έχουν συσχετιστεί με φαινοτυπικά αποτελέσματα ανεξάρτητα από την απενεργοποίηση του προς μελέτη γονιδίου. Αν και οι ποντικοί που φέρουν το αλληλόμορφο tm1a θα έχουν ουσιαστικά ανενεργό το γονίδιο Fra10ac1, απαιτούνται πρόσθετα βήματα διασταύρωσης για τη δημιουργία κατάλληλων πειραματόζωων που δεν θα φέρουν εξωγενείς αλληλουχίες (Coleman et al., 2015).

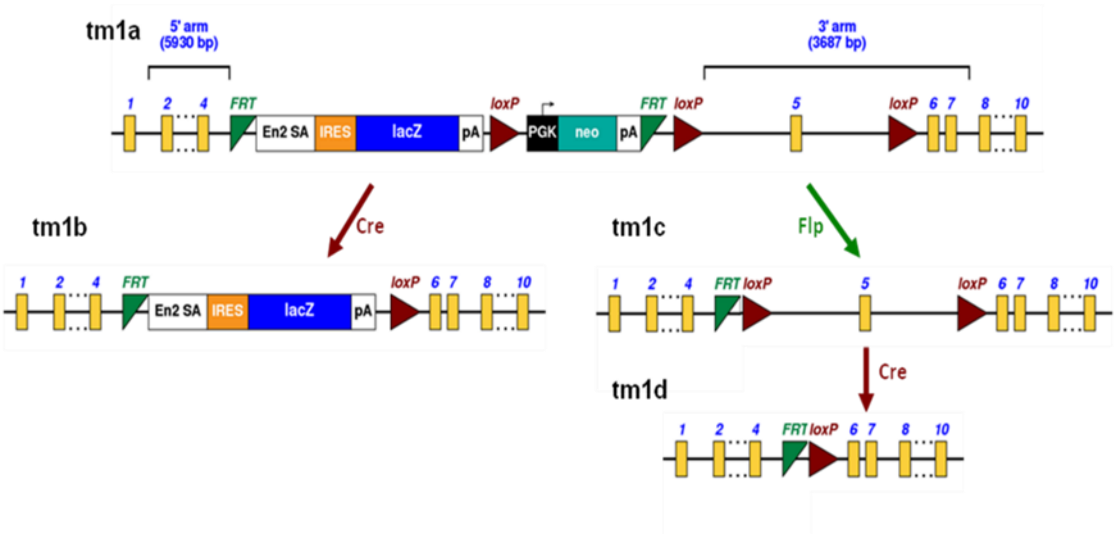
1.4.4 Δημιουργία ποντικών floxed (tm1c)

Ως ενδιάμεσο βήμα για τη δημιουργία της τελικής σειράς knockout, ετερόζυγοι ποντικοί tm1a διασταυρώνονται με διαγονιδιακούς ποντικούς που εκφράζουν την ρεκομπινάση Flp1 (FlpE) του *Saccharomyces cerevisiae* σε όλους τους ιστούς, υπό τον υποκινητή της ανθρώπινης β-ακτίνης. Έτσι, στους απόγονους που κληρονομούν τόσο το αλληλόμορφο tm1a όσο και το αλληλόμορφο FLPE, η περιοχή μεταξύ των θέσεων FRT του tm1a αποκόπτεται και ανασυνδυάζεται, αφαιρώντας έτσι τις κασέτες lacZ και ανθεκτικότητας νεομυκίνης και αποκαθιστώντας την έκφραση του γονιδίου (Εικόνα 3). Αυτοί οι ποντικοί αναφέρονται ως ποντικοί tm1c ή floxed και χρησιμεύουν τόσο ως ιδρυτική σειρά για τη δημιουργία ποντικών knockout tm1d όσο και ως σειρά ελέγχου για πειράματα. Οι ποντικοί tm1c είναι ουσιαστικά άγριου τύπου, καθώς η μόνη διαφορά μεταξύ του αλληλόμορφου τους και εκείνου των ποντικών άγριου τύπου είναι η εισαγωγή μιας θέσης FRT και δύο θέσεων loxP εκατέρωθεν του εξονίου 5 που δεν διαταράσσουν κάποια ρυθμιστική αλληλουχία ή πρότυπο συναρμογής. Με τη διαδικασία αυτή αρχικά δημιουργούνται χιμαιρικοί ποντικοί tm1a/tm1c και έπειτα, με τις κατάλληλες διασταυρώσεις, οι ποντικοί tm1c (Coleman et al., 2015).

1.4.5 Δημιουργία ποντικών knockout (tm1d)

Η διασταύρωση ετερόζυγων ποντικών tm1c με ποντίκια που εκφράζουν την Cre ρεκομπινάση θα οδηγήσει σε κάποιους απογόνους που θα κληρονομήσουν τόσο το γονίδιο tm1c όσο και το διαγονίδιο που εκφράζει την Cre. Στο ζυγωτό όπου εκφράζεται η Cre, το τμήμα DNA που πλαισιώνεται από τις αλληλουχίες loxP, θα αποκοπεί. Ωστόσο, το στοχευμένο γονίδιο που πλαισιώνεται από αλληλουχίες loxP παραμένει ενεργό στα κύτταρα και τους ιστούς που δεν εκφράζουν την Cre.

Στη διασταύρωση ποντικών tm1c με διαγονιδιακούς ποντικούς Cre προκύπτουν χιμαιρικοί ποντικοί tm1c/tm1d διότι η ρεκομπινάση Cre δεν δρα συνήθως στο ζυγωτό. Για αυτό το λόγο πραγματοποιείται γονοτύπηση (σε επόμενη γενεά) για το γονίδιο της ρεκομπινάσης Cre σε ποντικούς tm1d ώστε να αποκλειστούν από τα πειράματα οι χιμαιρικοί ποντικοί (Coleman et al., 2015). Οι ποντικοί tm1d που προκύπτουν τελικά χαρακτηρίζονται ως knockout και είναι αυτοί που χρησιμοποιούνται στα πειράματα καθώς σε αυτούς έχει διαγραφεί το εξόνιο 5 και έχουν αφαιρεθεί πλήρως οι κασέτες lacz και NeoR οι οποίες δεν πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στα knockout ποντίκια που θα μελετηθούν γιατί συχνά προκαλούν διαφορετικά φαινοτυπικά αποτελέσματα.



Εικόνα 7: Διαδικασία δημιουργίας ποντικών knockout (tm1d) για το γονίδιο *Fra10ac1*, από ποντικούς knockout – first (tm1a) μέσω διαδοχικών διασταυρώσεων με διαγονιδιακούς ποντικούς που έφεραν τη ρεκομπινάση Cre και FlpE.

1.4.6 Το φαινόμενο του μωσαϊκισμού στα ποντίκια

Ως γενετικός μωσαϊκισμός ορίζεται η παρουσία δύο ή περισσότερων κυτταρικών σειρών με διαφορετικούς γονότυπους που προκύπτουν από ένα μόνο ζυγωτό σε ένα μόνο άτομο (Conlin, Spiner, 2014).

Συγκεκριμένα, στην διαδικασία που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη στην οποία εντάσσεται η παρούσα διπλωματική εργασία, το ποντίκι το οποίο είναι tm1a διασταυρώνεται με ένα διαγονιδιακό ποντίκι που υπερεκφράζει την Flp ρεκομπινάση. Έτσι, κάποιοι από τους απογόνους θα κληρονομήσουν το αλληλόμορφο tm1a αλλά και την Flp ρεκομπινάση. Στη συνέχεια, αν η συγκεκριμένη ρεκομπινάση παραχθεί και δράσει σε επίπεδο ζυγωτού, αναγνωρίζοντας τις θέσεις FRT θα αφαιρέσει το τμήμα που περιλαμβάνει τις κασέτες lacz και neoR (Εικόνα 7) και ως αποτέλεσμα το ζυγωτό, και άρα το ποντίκι που θα προκύψει δεν θα είμαι μωσαϊκό και χαρακτηρίζεται ως tm1c.

Ωστόσο, σε αρκετές περιπτώσεις οι ρεκομπινάσες δεν δρουν στο στάδιο του ζυγωτού. Έτσι, παρόλο που το ζυγωτό φέρει το αλληλόμορφο tm1a και την Flp ρεκομπινάση, αυτή δεν δρα άμεσα αλλά αφού έχει πραγματοποιηθεί μίτωση κι έχουν προκύψει πολλά κύτταρα. Στη συνέχεια, η Flp δρα σε συγκεκριμένα μόνο από αυτά τα κύτταρα που έχουν προκύψει και στους απογόνους αυτών. Με τη διαδικασία αυτή δημιουργούνται χιμαιρικοί ποντικοί tm1a/tm1c. Έπειτα, αν αυτά τα κύτταρα, στα οποία έχει δράσει η Flp, δώσουν γαμέτες, τότε στην επόμενη γενιά θα κληρονομηθεί το tm1c. Αντίθετα, αν στα κύτταρα από τα οποία θα προκύψουν οι γαμέτες δεν έχει δράσει η Flp, μπορεί να κληρονομηθεί και πάλι το tm1a και η Flp σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Με τον ίδιο τρόπο λειτουργεί και η διασταύρωση tm1c ποντικού με διαγονιδιακό ποντίκι Cre.

1.5 Σκοπός της εργασίας

Στο πλαίσιο διερεύνησης των επιπτώσεων της καταστολής της έκφρασης του *FRA10AC1* in vivo και με στόχο τη διαλεύκανση του ρόλου του στο κεντρικό νευρικό σύστημα, αναπτύχθηκε ένα μοντέλο ποντικού knockout στο οποίο θα μελετηθούν μοριακές και φαινοτυπικές συνέπειες των μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *FRA10AC1* σε ομόζυγη και σε ετερόζυγη κατάσταση.

Σκοπός της εργασίας, η οποία εντάσσεται στην παραπάνω μελέτη, είναι η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *Fra10ac1* και *Ess2* (οι πρωτεΐνες FRA10AC1 και DGR14/Ess2 έχουν χαρακτηριστεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής και αλληλεπιδρούν στενά μεταξύ τους) σε ιστούς καρδιάς, εγκεφάλου, ήπατος και νεφρών ετερόζυγων ποντικών knockout συγκριτικά με τα επίπεδα έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων σε αντίστοιχους ιστούς αγρίου τύπου ποντικών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγματα

Τα δείγματα προήλθαν από ποντικούς που εκτρέφονται στο ζωοτροφείο του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) υπό την επίβλεψη του Δρ. Α. Κλινάκη. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν ιστοί εγκεφάλου, καρδιάς, ήπατος και νεφρών έξι διαφορετικών ποντικών. Τα δύο ποντίκια ήταν αγρίου τύπου και τα τέσσερα (Δ80, Δ81, 103, 104) ήταν ετερόζυγα knockout για το γονίδιο *Fra10ac1*. Τα Δ80, Δ81 και 104 ήταν θετικά στην PCR για Cre ρεκομπινάση, ενώ το 103 ήταν αρνητικό για την Cre.

2.2 Σχεδιασμός και έλεγχος εκκινητών για τα γονίδια στόχους *Fra10ac1* και *Ess2* και τα ιδιοσύστατα γονίδια *Gapdh* και *Actb* για PCR πραγματικού χρόνου.

2.2.1 Σχεδιασμός εκκινητών

Η PCR πραγματικού χρόνου είναι μια ευαίσθητη και ειδική μέθοδος για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μικρής ποσότητας μορίων cDNA. Η αποτελεσματικότητα και η ευαισθησία της εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την αποτελεσματικότητα των εκκινητών. Οι εκκινητές πρέπει να είναι μοναδικοί, να υβριδοποιούνται αποκλειστικά με την ακολουθία-στόχο και να μην είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών. Επίσης, για τον σχεδιασμό εκκινητών πρέπει να ληφθούν υπόψιν ορισμένα βασικά κριτήρια όπως το μήκος, η θερμοκρασία τήξης, το περιεχόμενό τους σε G – C, η ικανότητά τους να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές, κλπ (Rodríguez et al., 2015). Στο συγκεκριμένο πείραμα σχεδιάστηκαν εκκινητές για τα γονίδια-στόχους *Fra10ac1* και *Ess2* των ποντικών, και για τα ιδιοστατικά γονίδια της ακτίνης β (*Actnb*), της 3 - φωσφορικής αφυδρογονάσης της γλυκεραλδεΰδης (*Gapdh*) και της ριβοσωμικής πρωτεΐνης L13a (*Rpl13a*), τα οποία αποτελούν συχνά χρησιμοποιούμενα γονίδια ελέγχου για πειράματα PCR πραγματικού χρόνου που αφορούν ποντικούς.

Διαδικασία:

- Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η ιστοσελίδα του NCBI (National Center for Biotechnology Information, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ώστε να ανακτηθούν οι αλληλουχίες των μορίων mRNA των τεσσάρων γονιδίων.
- Καθώς τα γονίδια *Gapdh*, *Fra10ac1* και *Ess2* έχουν από δύο εναλλακτικά μετάγραφα, συγκρίθηκαν οι αλληλουχίες τους μεταξύ τους και επιλέχθηκε το κοινό τμήμα τους πάνω στο οποίο σχεδιάστηκαν οι εκκινητές. Η σύγκριση των αλληλουχιών ανά δύο έγινε μέσω του blastn (blast 2 sequences) του NCBI.
- Στη συνέχεια, αναζητήθηκαν πιθανά ζεύγη εκκινητών μέσω του Primer – Blast του NCBI. Στις παραμέτρους του προγράμματος ορίστηκε το μέγεθος του προϊόντος της PCR, 100 – 200 bp, η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (Tm)

σε 58oC – 62ºC , με μέγιστη διαφορά θερμοκρασίας 2 και το μέγεθος των εκκινητών, 18 – 22 bp. Το πρόγραμμα εμφανίζει κάποια υποψήφια ζεύγη εκκινητών τα οποία πρέπει να ελεγχθούν κάθε ένα ξεχωριστά ώστε να επιλεγεί το ζεύγος που ικανοποιεί τα περισσότερα κριτήρια. Επιλέχθηκε έτσι το ζεύγος εκείνο που έδινε τις μικρότερες τιμές self complementarity (κάτω από 4).

- Πραγματοποιήθηκε επιπλέον έλεγχος ώστε να ελεγθεί η πιθανότητα δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Η διαδιακασία αυτή γίνεται μέσω του Beacon Designer (http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1) και επιλέχθηκε το ζεύγος το οποίο έδωσε χαμηλότερες τιμές για σχηματισμό διμερών και hairpins (τιμές κάτω από 4).

Πίνακας 1: Τα ζεύγη των εκκινητών για το γονίδιο *Fra10ac1* μαζί με τις αλληλουχίες και τα χαρακτηριστικά του κάθε εκκινητή

Ονομασία	***Fra10ac1***	
Αλληλουχία	Forward: 5’TGGTGGCAAAAGAGAGGACT3’	Reverse: 5’TGCTTCATCCTCCTCATTCCAAA3’
Μήκος	20	23
Tm	58.86	59.99
GC%	50.00	43.48
Self Complementarity	3.00	2.00
Self 3’ Complementarity	2.00	1.00
Hairpin	0.0	0.0
Self Dimer	0.0	0.0

Πίνακας 2: Τα ζεύγη των εκκινητών για το γονίδιο *Ess2* μαζί με τις αλληλουχίες και τα χαρακτηριστικά του κάθε εκκινητή

Ονομασία	***Ess2***	
Αλληλουχία	Forward: 5’GTCTCAGGGTTGGAAGCAAG3’	Reverse: 5’GGTCCTGGTGAGCCTGATATG3’
Μήκος	20	21
Tm	58.47	59.93
GC%	55.00	57.14
Self Complementarity	3.00	4.00
Self 3’ Complementarity	0.00	2.00
Hairpin	0.7	0.0
Self Dimer	0.7	0.5

Πίνακας 3: Τα ζεύγη των εκκινητών για το γονίδιο *Gapdh* μαζί με τις αλληλουχίες και τα χαρακτηριστικά του κάθε εκκινητή

Ονομασία	*Gapdh*	
Αλληλουχία	Forward: 5'TGGAAAGCTGTGGCGTGAT3'	Reverse: 5'GGGTAGGAACACGGAAGGC3'
Μήκος	19	19
Tm	59.93	60.08
GC%	52.63	63.16
Self Complementarity	4.00	2.00
Self 3' Complementarity	2.00	2.00
Hairpin	0.0	0.0
Self Dimer	3.0	0.0

Πίνακας 4: Τα ζεύγη των εκκινητών για το γονίδιο *Actb* μαζί με τις αλληλουχίες και τα χαρακτηριστικά του κάθε εκκινητή

Ονομασία	*Actb*	
Αλληλουχία	Forward: TGAGCTGCGTTTTACACCCT	Reverse: 5'GCCTTCACCGTTCCAGTTTT3'
Μήκος	20	20
Tm	59.89	58.97
GC%	50.00	50.00
Self Complementarity	1.00	0.00
Self 3' Complementarity	2.00	2.00
Hairpin	0.0	0.0
Self Dimer	3.0	0.0

Πίνακας 5: Τα ζεύγη των εκκινητών για το γονίδιο *Rpl13a* μαζί με τις αλληλουχίες και τα χαρακτηριστικά του κάθε εκκινητή

Ονομασία	*Rpl13a*	
Αλληλουχία	Forward: 5'GGGGCAGGTTCTGGTATTGG3'	Reverse: 5'TCGGGAGGGGTTGGTATTCA3'
Μήκος	20	20
Tm	60.40	60.25
GC%	60.00	55.00
Self Complementarity	3.00	2.00
Self 3' Complementarity	0.00	1.00
Hairpin	1.1	0.0
Self Dimer	1.1	0.0

2.2.2 Προετοιμασία εκκινητών

Τα ζεύγη των εκκινητών παραλήφθησαν σε λυοφιλοποιημένη μορφή μαζί με ένα έντυπο πληροφοριών σχετικά με την ποσότητα νερού που θα πρέπει να προστεθεί στον κάθε ένα, με βάση το μοριακό τους βάρος, ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 100 pmol/μl. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν επιθυμητή η συγκέντρωση 50 pmol/μl, οπότε προστέθηκε διπλάσια ποσότητα νερού από την αναγραφόμενη για κάθε εκκινητή. Οι εκκινητές σε αυτή την συγκέντρωση αποτελούσαν τα πυκνά διαλύματα. Από τα διαλύματα αυτά λαμβάνεται κατάλληλη ποσότητα (80μl καθαρού νερού και 20μl από κάθε εκκινητή) για την παρασκευή διαλυμάτων εκκινητών συγκέντρωσης 10 pmol/μl που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου. Οι εκκινητές μαζί με τα πυκνά διαλύματά τους αποθηκεύονται στους -20^oC.

2.2.3 Έλεγχος εκκινητών με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Επόμενο βήμα αποτέλεσε ο πειραματικός έλεγχος των εκκινητών που σχεδιάστηκαν, με PCR ώστε να επιβεβαιωθεί ο σωστός σχεδιασμός, δηλαδή ότι παράγουν σωστά μεγέθη προϊόντων και όχι παραπροϊόντα. Για το σκοπό αυτό, αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές με γονιδιωματικό DNA από δείγματα ποντικών σε συμβατική PCR.

Έτσι, πραγματοποιήθηκαν 5 PCR για τα 5 γονίδια για τα οποία σχεδιάστηκαν εκκινητές με υπόστρωμα γονιδιωματικό DNA ποντικού. Για κάθε PCR χρησιμοποιήθηκε από ένας αρνητικός μάρτυρας. Στον Πίνακα 5 φαίνονται οι ποσότητες και οι συγκεντρώσεις των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε PCR.

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις και όγκοι των συστατικών της PCR ελέγχου των εκκινητών

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΑΡΧΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ	ΟΓΚΟΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ
Εμπρόσθιος εκκινητής (Forward Primer)	10pmol/μl	0,5μl
Ανάστροφος εκκινητής (Reverse Primer)	10pmol/μl	0,5μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)Taq Πολυμεράσης	10x	2,5μl
Νουκλεοτίδια (dNTPs)	50x	0,5μl
Taq πολυμεράση	5u/μl	0,3μl
DNA	50 ng/μl	1μl
H_2O	-	19,7μl

Τελικός όγκος & τελικές συγκεντρώσεις εκκινητών

Η κάθε αντίδραση περιλαμβάνει ένα δείγμα με τους εκκινητές και έναν αρνητικό μάρτυρα, οπότε για το mastermix οι όγκοι της αντίδρασης που αναγράφονται στον Πίνακα 5 πολλαπλασιάστηκαν x3 και για τυχόν μικρές αποκλίσεις στο πιπετάρισμα. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης της PCR για κάθε γονίδιο ορίστηκε στους 57^{o}C.

2.2.4 Πέψεις με ένζυμα περιορισμού σε προϊόντα PCR πραγματικού χρόνου για έλεγχο των εκκινητών του γονιδίου *Fra10ac1*.

Επειδή οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *Fra10ac1* υβριδοποιούνται σε διαφορετικά εξόνια, με αποτέλεσμα μεγάλο μήκος προϊόντος PCR με γονιδιωματικό DNA, ελέγχθησαν προϊόντα PCR πραγματικού χρόνου σε cDNA που παρήχθη από RNA που απομονώθηκε από ιστούς ποντικών (βλ. ενότητα 2.3.1). Ο έλεγχος αυτός έγινε με πέψη με τα ένζυμα περιορισμού HinfI και MseI τα οποία τεμαχίζουν το προϊόν μία φορά (γιατί είναι μικρό το μέγεθος προϊόντος) και τα μεγέθη που προκύπτουν είναι 78bp και 28bp και 85bp και 21bp, αντίστοιχα. Τα ένζυμα αυτά επιλέχθηκαν μέσω του διαδικτυακού εργαλείου webcutter (http://heimanlab.com/cut2.html) στο οποίο τοποθετήθηκε η αλληλουχία του γονιδίου που κόβουν οι εκκινητές που θα ελεγχθούν (αναμενόμενο μέγεθος 106bp).

Διαδικασία:

- Το διαθέσιμο δείγμα DNA μετά τον καθαρισμό ήταν 23μl. Από αυτό, χρησιμοποιήθηκαν 8μl για τεμαχισμό με την HinfI και 8μl με την MseI. Το υπόλοιπο άκοπο DNA ηλεκτοφορήθηκε μαζί με τις πέψεις για να συγκριθούν τα αποτελέσματα.
- Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν με την αντίστοιχη σειρά ήταν: 8μl DNA, 4,5μl νερό, 1,5μl NEBuffer 2.1 (1X Buffer Components: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl2, 100 μg/ml Recombinant Albumin, pH 7.9/25°C), 1μl ένζυμο (10,000 units/ml) ,της εταιρείας NEB σε τελικό όγκο 15μl.
- Επωάστηκαν τα δείγματα στους 37^{o}C όλονύχτια και την επόμενη μέρα οι πέψεις (7μl) μπήκαν για ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μαζί με το άκοπο DNA (5μl) και τον ladder (4μl).

Πριν τις πέψεις πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των προϊόντων της PCR πραγματικού χρόνου από τα αντιδραστήρια της PCR. Χρησιμοποιήθηκαν 7 αντιδράσεις οι οποίες ενώθηκαν σε ένα τελικό δείγμα (τελικός όγκος 140 μl). Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο καθαρισμού προϊόντων PCR της εταιρίας Macherey – Nagel NucleoSpin® Geland PCR Clean-up (αριθμός καταλόγου: 740609.50), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά τον καθαρισμό ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (2,5%) του δείγματος που καθαρίστηκε ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη προϊόντος μετά τον καθαρισμό.

2.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των εκκινητών σε προϊόντα PCR σε γονιδιωματικό DNA για τα γονίδια *Ess2*, *Gapdh* και *Actb* και για τον έλεγχο προϊόντων PCR πραγματικού χρόνου (βλ. ενότητα 2.4) για το γονίδιο *Fra10ac1*.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό τρόπο διαχωρισμού θραυσμάτων DNA διαφόρων μεγεθών που κυμαίνονται από 100 bp έως 25 kb. Για να διαχωριστεί το DNA τοποθετείται στις κατάλληλες θέσεις υποδοχής του στο πήκτωμα στο οποίο εφαρμόζεται κατάλληλη ηλεκτρική τάση για τη βέλτιστη χρονική περίοδο. Ο φωσφορικός σκελετός του μορίου DNA (και RNA) είναι φορτισμένος αρνητικά, επομένως όταν τοποθετείται σε ηλεκτρικό πεδίο, τα θραύσματα DNA θα μεταναστεύσουν στην θετικά φορτισμένη άνοδο. Ο διαχωρισμός βασίζεται στο μέγεθος και το σχήμα. Μετά το διαχωρισμό, τα μόρια DNA μπορούν να οπτικοποιηθούν σε υπεριώδες φως μετά από κατάλληλη χρώση (Warren et al., 2003).

Προετοιμασία του πηκτώματος:

- Τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων ήταν 100 – 200 bp για όλα τα ζεύγη εκκινητών, οπότε παρασκευάστηκε διάλυμα αγαρόζης 2,5%, αφού πήκτωμα υψηλής συγκέντρωσης αγαρόζης ευνοεί τον διαχωρισμό μικρότερων τμημάτων DNA. Ζυγίστηκαν 1,25 gr αγαρόζης και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη.
- Προστέθηκαν 50ml TBE 0,5x (TBE 1x: 0,089 M Tris-βορικό, 0,089 M βορικό οξύ 0,002 M EDTA) στη φιάλη που περιέχει την αγαρόζη και αναδεύτηκαν καλά.
- Το μείγμα αγαρόζης/ρυθμιστικού διαλύματος τοποθετήθηκε στον φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει.
- Το διάλυμα αφαιρέθηκε από τον φούρνο και τοποθετήθηκε κάτω από τη βρύση χωρίς όμως να κρυώσει πολύ ώστε να μην πήξει πριν προλάβει να τοποθετηθεί στο ειδικό καλούπι. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4 μl φθορίζουσας χρωστικής Xpert Green DNA Stain της εταιρίας Grisp, και ανακινήθηκε καλά το διάλυμα ώστε να ομογενοποιηθεί.
- Το διάλυμα τοποθετήθηκε στο ειδικό καλούπι όπου αφέθηκε να πήξει για 20 περίπου λεπτά.

Τοποθέτηση δειγμάτων στο πήκτωμα:

- Προστέθηκαν 3μl loading buffer (6x: 10 mM Tris HCl (pH 7,6), 0.03% κυανό του ξυλένιου, 60% γλυκερόλη, 60 mM EDTA) στα δείγματα.
- Αναμείχθηκαν 4μl ladder (100bp PLUS BLUE DNA ladder – purple coding Cat. –No: 304-105, 50μg / 500μl της εταιρίας GeneON) με 3μl loading buffer και τοποθετήθηκαν στο πήκτωμα. Ο ladder είναι ένα μίγμα μορίων DNA με διαφορετικά γνωστά μήκη. Τοποθετείται στο πήκτωμα και ηλεκτροφορείται μαζί με τα δείγματα. Με τον τρόπο αυτό, συγκρίνοντας το προϊόν με τις ζώνες του ladder μπορεί να ελεγχθεί εάν παράγεται το επιθυμητό προϊόν βάσει μεγέθους.

- Στη συνέχεια, φορτώθηκαν τα δείγματα στο πήκτωμα και ηλεκτροφορήθηκαν για περίπου μια ώρα στα 150V ώστε να διαχωριστούν οι εκκινητές από τα προϊόντα της PCR.
- Τέλος, αφαιρέθηκε το πήκτωμα και έγινε έκθεσή του σε υπεριώδες φως ώστε να οπτικοποιηθούν τα αποτελέσματα.

2.3 Απομόνωση και έλεγχος RNA από ιστούς ποντικού

2.3.1 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση έγινε με τη χρήση του κιτ απομόνωσης RNA της εταιρίας Qiagen (Rneasy® Plus Universal Handbook, Mini Kit). Οι ιστοί διατηρούνταν στους -80^oC και πριν την απομόνωση του RNA ο κάθε ιστός έγινε σκόνη με τη χρήση υγρού αζώτου ώστε να μπορέσει στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί.

Διαδικασία:

- Μεταφέρθηκε μικρή ποσότητα ιστού (περίπου 50 mgr) σε νέο eppendorf.
- Προστέθηκαν 900μl Qiazol Lysis Reagent και με τη βοήθεια ενός Tissue Lyser, έγινε πίεση του ιστού για 2 – 3 min ώστε να γίνει λύση των κυττάρων και διάλυση του ιστού και να ομογενοποιηθεί το δείγμα.
- Ακολούθησε επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου (15^oC – 25^oC) για 5 min.
- Προστέθηκαν 100μl gDNA Eliminator Solution και στη συνέχεια έγινε vortex για 15 sec.
- Προστέθηκαν 180 μl χλωροφόρμιο και ανακινήθηκαν καλά για 15sec.
- Επωάστηκε το δείγμα για 2 – 3 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12.000g για 15 min, στους 4^oC.
- Μεταφέρθηκε η επάνω φάση σε νέο eppendorf με προσοχή ώστε να μην περάσει η ενδιάμεση φάση που περιέχει πρωτεΐνες και άλλα ανεπιθύμητα μόρια στο δείγμα.
- Προστέθηκαν 600 μl 70% αιθανόλης και ακολούθησε σύντομο vortex.
- Μεταφέρθηκαν 700 μl δείγματος σε ένα Rnase Mini Spin Column 2 ml Collection Tube και φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 sec στις > 8.000g. Απορρίφθηκε το υλικό που απομακρύνθηκε από την κολόνα και επανατοποθετήθηκε η κολόνα στο ίδιο collection tube.
- Χρησιμοποιώντας το ίδιο collection tube επαναλήφθηκε το προηγούμενο βήμα.
- Προστέθηκαν 700μl Buffer RWT στην κολόνα και φυγοκεντρήθηκαν για 15 sec στις > 8.000g και απορρίφθηκε το υλικό που απομακρύνθηκε από την κολόνα.
- Προστέθηκαν 500μl Buffer RPE στην κολόνα και έγινε φυγοκέντρηση για 15 min στις > 8.000g και απορρίφθηκε το υλικό που απομακρύνθηκε από την κολόνα.
- Επαναλήφθηκε το προηγούμενο βήμα.

- Προστέθηκε η κολόνα σε νέο σωληνάριο των 2 ml και φυγοκεντρήθηκε σε μέγιστη ταχύτητα (12.000g) για 1 min, ώστε να στεγνώσει καλύτερα η μεμβράνη που βρίσκεται στην κολόνα.
- Τοποθετήθηκε η κολόνα σε νέο σωληνάριο των 1,5 ml, προστέθηκαν 50 μl Rnase – free water και φυγοκεντρήθηκαν για 1 min στις 8.000g.
- Επαναλήφθηκε το προηγούμενο βήμα προσθέτοντας 30μl Rnase – free water και μετά την φυγοκέντρηση απορρίφθηκε η κολόνα. Το RNA πέρασε στο σωληνάριο το οποίο αποθηκεύτηκε στους -80^{o}C.

2.3.2 Επώαση δειγμάτων RNA με Dnase

Μετά την απομόνωση του RNA από τους ιστούς των ποντικών, ακολούθησε επώαση με Dnase ώστε να απομακρυνθεί οποιοδήποτε ίχνος DNA που μπορεί να υπήρχε μέσα στα δείγματα. Χρησιμοποιήθηκε το DNA-free™ Kit της Ambion by life technologies (Αριθμός καταλόγου: AM1906).

Διαδικασία:

- Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο του Routine Dnase Treatment που είναι για <200 μg νουκλεϊκών οξέων ανά ml.
- Τα δείγματα που είχαν συγκέντρωση > 200μg/μl αραιώθηκαν σε τελική συγκέντρωση περίπου 4μg/μl RNA και σε τελικό όγκο 20μl για όλα τα δείγματα.
- Παρασκευάσθηκε master mix που περιείχε 0,1 του όγκου των δειγμάτων 10X Dnase I Buffer και 1μl rDNase I για κάθε δείγμα.
- Σε κάθε tube προστέθηκαν 3 μl master mix, φτάνοντας ποσότητα 23 μl για κάθε δείγμα.
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα της PCR όπου επωάστηκαν για 30min στους 37^{o}C.
- Μετά την επώαση προστέθηκαν 2 μl Dnase Inactivation Reagent σε όλα τα δείγματα και ανακινήθηκαν καλά για περίπου 2 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απενεργοποιηθεί η Dnase και να εγκλωβιστούν τα υπολείμματα του DNA.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10.000g για 1,5 min ώστε να συλλεγεί το καθαρό RNA (20μl) το οποίο μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέο eppendorf.

Αμέσως μετά τον καθαρισμό των δειγμάτων RNA πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου προκειμένου να επαληθευτεί η καθαρότητα των δειγμάτων από DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν από 1,5 μl κάθε δείγματος RNA και 18,5 μl master mix για το γονίδιο *Actb* σε συγκέντρωση 200 nM. Για την διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν και ένας θετικός (περιείχε DNA) και ένας αρνητικός (περιείχε νερό) μάρτυρας. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα Rotor Gene της QIAGEN επαληθεύοντας την καθαρότητα των δειγμάτων, ώστε να συνεχιστεί το πείραμα.

2.3.3 Υπολογισμός Συγκέντρωσης Δειγμάτων RNA

Μετά τον καθαρισμό των δειγμάτων ακολούθησε ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA που υπήρχε εκ νέου στα δείγματα με τη βοήθεια της συσκευής QUAWELL. Αρχικά, η συσκευή μηδενίστηκε με προσθήκη 2 μl καθαρού νερού. Στη συνέχεια, από κάθε δείγμα RNA λήφθηκε ποσότητα 2 μl, τοποθετήθηκε στην ειδική θύρα της συσκευής και υπολογίστηκε η αντίστοιχη συγκέντρωση. Κάθε 10 δείγματα, περίπου, η συσκευή μηδενιζόταν με την χρήση καθαρού νερού, έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη αξιοπιστία στους υπολογισμούς.

Για την συνέχεια του πειράματος επεξεργάστηκαν όλα τα δείγματα RNA, έτσι ώστε από όλα να χρησιμοποιηθεί η ίδια ποσότητα RNA σε ng. Σύμφωνα με τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων, όπου η χαμηλότερη βρέθηκε στα 90,5 ng/μl, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν συνολικά 900 ng RNA από κάθε δείγμα και τροποποιήθηκαν κατάλληλα τα δείγματα ώστε να φτάσουν στη συγκέντρωση αυτή σε τελικό όγκο 10μl για το κάθε δείγμα.

2.4 Αντίστροφη μεταγραφή για δημιουργία cDNA

Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων RNA, ακολούθησε η αντίστροφη μεταγραφή για την παραγωγή cDNA ώστε να χρησιμοποιηθεί αργότερα για την PCR πραγματικού χρόνου. Για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit από την Invitrogen.

Διαδικασία:

- Παρασκευάστηκε master mix το οποίο για κάθε αντίδραση περιείχε 2 μl 10x RT Buffer, 0,8 μl 25x dNTP Mix (100 mM), 2μl 10x RT Random Primers, 1 μl Multiscribe Reverse Transcriptase, 1 μl RNase Inhibitor και 3,2 μl Nuclease-free water. Άρα σύνολο 10μl για κάθε αντίδραση. Το πείραμα περιλαμβάνει 23 δείγματα με επιπλέον ποσότητα στους υπολογισμούς 2 δειγμάτων για αποφυγή δειγματοληπτικού σφάλματος, οπότε οι παραπάνω ποσότητες πολλαπλασιάστηκαν 25 φορές για κάθε συστατικό. Τα συστατικά του κιτ και τα δείγματα RNA διατηρούνται στον πάγο σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.
- Το master mix φυγοκεντρήθηκε για περίπου 15 sec στις 8000g.
- Σε 22 eppendorf των 0,2 ml, που χρησιμοποιούνται ειδικά για το μηχάνημα της PCR, προστέθηκαν από 10 μl κάθε δείγματος RNA και 10 μl του master mix που παρασκευάστηκε.
- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για περίπου 15 sec στις 8000 g, προκειμένου να απομακρυνθούν πιθανές φυσαλίδες οι οποίες θα παρεμπόδιζαν την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής στο μηχάνημα της PCR.
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα της PCR, σε ειδικό πρόγραμμα (10min στους 25^{o}C, 2h στους 37^{o}C, 5min στους 85^{o}C, 4^{o}C στο τέλος), ενώ ο όγκος της αντίδρασης στο μηχάνημα ορίσθηκε σε 20 μl, όσο δηλαδή και ο όγκος των δειγμάτων.
- Μετά το τέλος της διαδικασίας τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20^{o}C για μελλοντική χρήση αφού πλέον περιείχαν cDNA.

2.5 PCR πραγματικού χρόνου

2.5.1 Αρχή της μεθόδου

Η διαδικασία χωρίζεται σε 3 φάσεις και κάθε κύκλος πραγματοποιείται σε τρία στάδια: αποδιάταξη - υβριδοποίηση - επιμήκυνση. Κατά την αποδιάταξη η τήξη πρέπει να είναι επαρκής, ώστε να διαχωριστούν πλήρως οι δύο κλώνοι του εκμαγείου, διαφορετικά θα αναδιαταχθούν όταν η θερμοκρασία μειωθεί και δεν θα γίνει σύνδεση των εκκινητών. Για την ανάλυση των ποσοτικών δεδομένων, χρησιμοποιείται μία πρότυπη καμπύλη, η οποία παρασκευάζεται από μία σειρά αραιώσεων προτύπου δείγματος γνωστής συγκέντρωσης. Η πρότυπη καμπύλη δημιουργείται κάνοντας διαδοχικές αραιώσεις στο μάρτυρα γνωστής συγκέντρωσης και εφαρμόζοντας τις ίδιες συνθήκες στην PCR πραγματικού χρόνου με τα υπό μελέτη δείγματα. Στους αρχικούς κύκλους, το προϊόν δεν είναι ανιχνεύσιμο λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα και έτσι δεν υπάρχει σημαντική αλλαγή στην ένταση φθορισμού, παρά μόνο ένα ελάχιστο σήμα που ανιχνεύεται και αναφέρεται ως baseline. Το baseline θα πρέπει να οριστεί προσεκτικά, ώστε να συμπεριλάβει αρκετούς κύκλους της αντίδρασης, για να αποκλειστεί ο «θόρυβος» της αντίδρασης που υπάρχει στους αρχικούς κύκλους της ενίσχυσης, αλλά ταυτόχρονα να μην συμπεριληφθούν κύκλοι στους οποίους έχει αρχίσει η ενίσχυση και υφίσταται το κανονικό σήμα φθορισμού.

Η βασική αρχή που χρησιμοποιείται στην ανάλυση των δεδομένων της PCR πραγματικού χρόνου, βασίζεται στον αριθμό των κύκλων που χρειάζονται ώστε να φτάσει η αλληλουχία στόχος μία συγκεκριμένη συγκέντρωση στην αντίδραση. Το σημείο ανίχνευσης του σήματος φθορισμού πάνω από το «θόρυβο» της αντίδρασης ορίζεται ως threshold, και ο αριθμός των κύκλων που αντιστοιχεί σε αυτό το σημείο ονομάζεται threshold cycle ή Ct. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του αρχικού DNA στόχου στο δείγμα, τόσο πιο γρήγορα θα διασχίσει η καμπύλη το όριο threshold. Για αυτό το λόγο το threshold ορίζεται σ’ ένα σημείο όπου όλα τα δείγματα που αναλύονται έχουν τον ίδιο ρυθμό αύξησης στην ένταση φθορισμού και παράλληλα βρίσκονται στην εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τις τιμές Ct των άγνωστων δειγμάτων με αυτές της πρότυπης καμπύλης, καθίσταται εφικτή η ποσοτικοποίηση του αρχικού αριθμού των αντιγράφων (Fraga et al., 2008) (Valasek & Repa, 2022).

Στο συγκεκριμένο πείραμα η PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκε για:

1. Έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων των εκκινητών του *Fra10ac1*

2. Έλεγχο δειγμάτων cDNA αραιώσεων από pool και αποδοτικότητας εκκινητών

3. έλεγχο έκφρασης μεμονωμένων δειγμάτων cDNA

2.5.2 PCR πραγματικού χρόνου για έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων των εκκινητών του *Fra10ac1*

Πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου με τις αραιώσεις του pool των δειγμάτων (εξηγείται η διαδικασία αναλυτικά παρακάτω) με τους εκκινητές του *Fra10ac1* και στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (2,5% γιατί το αναμενόμενο μέγεθος προϊόντων είναι μικρό). Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκε και ο ladder ώστε να γίνει σύγκριση των ζωνών που προκύπτουν και να επιβεβαιωθεί το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων.

2.5.3 Έλεγχος δειγμάτων cDNA αραιώσεων από pool και αποδοτικότητας εκκινητών με PCR πραγματικού χρόνου

Σε αυτό το στάδιο του πειράματος πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της έκφρασης των δειγμάτων cDNA και της αποδοτικότητας των εκκινητών για τα γονίδια *Ess2, Fra10ac1*, *Actb* και *Gapdh*. Το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο πριν το τελικό πειραματικό στάδιο για τον έλεγχο της έκφρασης των προς μελέτη γονιδίων κάθε δείγματος ξεχωριστά. Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται ώστε να βρεθεί η καλύτερη εφικτή απόδοση για την αντίδραση, δηλαδή σε ποια αραίωση των δειγμάτων και ποια συγκέντρωση κάθε εκκινητή ξεχωριστά αποδίδει καλύτερα η αντίδραση, ώστε να ληφθούν όσο πιο αξιόπιστα αποτελέσματα γίνεται.

Διαδικασία:

- Αρχικά, δημιουργήθηκε ένα pool από τα δείγματα cDNA, που παρασκευάστηκαν σε προηγούμενο στάδιο, με προσθήκη 3 μl από κάθε δείγμα ξεχωριστά. Από την στιγμή που στο πείραμα υπάρχουν 22 δείγματα, ο συνολικός όγκος του pool ήταν περίπου 63 μl.
- Αυτό το pool των δειγμάτων υπέστη 7 διαδοχικές αραιώσεις των 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/50, 1/100 και 1/200. Για κάθε νέα αραίωση πραγματοποιούνταν δειγματοληψία από την αμέσως προηγούμενη αραίωση, έτσι ώστε ο τελικός όγκος κάθε μίας να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερος μετά την προθήκη της απαραίτητης ποσότητας νερού, όπως φαίνεται και στον πίνακα:

Πίνακας 7: Αναλογίες δειγμάτων και νερού (μl) και οι τελικοί όγκοι των αραιώσεων του pool

ΑΡΑΙΩΣΗ	ΑΡΧΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ (μl)	ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ (μl)
1/5	41 (pool) + 164 (νερό) = 205	205 – 102,5 = 102,5
1/10	102,5 (1/5) + 102,5 (νερό) = 205	205 – 105 = 100
1/20	105 (1/10) + 105 (νερό) = 210	210 – 105 = 105
1/40	110 (1/20) + 110 (νερό) = 220	220 – 120 = 100
1/50	120 (1/40) + 30 (νερό) = 150	150 – 50 = 100
1/100	50 (1/50) + 50 (νερό) = 100	100 – 30 = 70
1/200	30 (1/100) + 30 (νερό) = 60	60

- Μετά την δημιουργία κάθε αραίωσης, φυγοκεντρήθηκαν για περίπου 15 sec στις 8000 g.
- Στη συνέχεια παρασκευάστηκε ειδικό master mix για τους εκκινητές κάθε γονιδίου ξεχωριστά στο οποίο η συγκέντρωση νοηματικού (F) και αντινοηματικού (R) εκκινητή ήταν στα 200nM (χρησιμοποιείται 0,4μl από τον κάθε εκκινητή αρχικής συγκέντρωσης 10pmol/μl). Για την αντίδραση της PCR σε συνολικό όγκο 20μl, χρησιμοποιήθηκαν 0,4μl από τον κάθε εκκινητή, 10μl SYBR®Green και 7,2μl νερό ενώ προστέθηκαν 2μl από κάθε αραίωση. Για δοκιμές της αντίδρασης όπου η συγκέντρωση των εκκινητών έπρεπε να είναι 300 nM, τα master mix παρασκευάστηκαν με προσθήκη 0,6μl από κάθε εκκινητή. Το πείραμα πραγματοποιείται για 7 αραιώσεις μαζί με ένα αρνητικό μάρτυρα. Τα δείγματα χρησιμοποιούνται εις διπλούν για μεγαλύτερη αξιοπιστία ώστε να ελέγχονται πιθανά δειγματοληπτικά σφάλματα. Οι ποσότητες των συστατικών πολλαπλασιάστηκαν επί 18 για τη δημιουργία του master mix της αντίδρασης.

Πίνακας 8: Master mix για συγκέντρωση εκκινητών 200 nM

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ (μl)
SYBR®Green	18 X 10 = 180
Εκκινητής F	18 X 0,4 = 40
Εκκινητής R	18 X 0,4 = 40
ΝΕΡΟ	18 X 7,2 = 129,6

Πίνακας 9: Master mix για συγκέντρωση εκκινητών 300nM

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ (μl)
SYBR®Green	18 X 10 = 180
Εκκινητής F	18 X 0,6 = 60
Εκκινητής R	18 X 0,6 = 60
ΝΕΡΟ	18 X 8,8 = 158,4

- Κάθε master mix φυγοκεντρήθηκε για περίπου 15 sec στις 8000 g.
- Σε eppendorf προστέθηκαν από 2μl δείγματος της κάθε αραίωσης του pool των cDNA και 18μl του επιθυμητού master mix, ανάλογα με το γονίδιο που έπρεπε να μελετηθεί κάθε φορά και αναδεύτηκαν καλά με πιπέτα για την καλή ομογενοποίηση των συστατικών της αντίδρασης. Για τα αρνητικά δείγματα ελέγχου προστέθηκε 2μl νερού αντί δείγματος.
- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για περίπου 15sec στις 8000g, ώστε να απομακρυνθούν πιθανές φυσαλίδες.

- Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιλαμβάνει ένα στάδιο στους 95°C για 10min, 40 κύκλους της αντίδρασης με καθέναν να χαρακτηρίζεται από 95°C για 30sec, 61°C για 1min και 72°C για 1min και τέλος το στάδιο της καμπύλης αποδιάταξης με 95°C για 1min, 55°C για 30sec και 95°C για 30sec.

2.5.4 Έλεγχος έκφρασης μεμονωμένων δειγμάτων cDNA με PCR πραγματικού χρόνου

Μετά την επίτευξη των επιθυμητών αποδόσεων για τα 4 γονίδια από συγκεκριμένες συγκεντρώσεις εκκινητών για το καθένα, το πείραμα προχώρησε στο τελικό στάδιο για τον έλεγχο της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων στόχων στα 23 δείγματα cDNA.

Διαδικασία:

- Αρχικά, όλα τα δείγματα υπέστησαν αραίωση 1/40 με προσθήκη 5μl δείγματος από το cDNA και 195μl καθαρού νερού σε νέα eppendorf (σύνολο 200μl αραιωμένου cDNA για κάθε δείγμα).
- Όλα τα δείγματα αραιωμένου cDNA αναδεύτηκαν καλά με πιπέτα και φυγοκεντρήθηκαν για 15sec στις 8000g.
- Έπειτα, δημιουργήθηκαν master mix για τα 4 γονίδια σε ποσότητα 50 δειγμάτων για το καθένα και με συγκέντρωση εκκινητών αντίστοιχη με αυτήν που έδωσε την επιθυμητή απόδοση για κάθε γονίδιο ξεχωριστά. Σε 46 eppendorf προστέθηκαν 2 φορές (μία για κάθε duplicate δείγματος) από 2μl κάθε δείγματος αραίωσης 1/40 και 18μl του master mix για το γονίδιο που ήταν να μελετηθεί κάθε φορά. Χρησιμοποιήθηκαν και από 2 αρνητικά δείγματα ελέγχου για κάθε γονίδιο.
- Κατά την διάρκεια της αντίδρασης, ήταν δυνατή η παρακολούθηση των επιπέδων έκφρασης του κάθε γονιδίου σε κάθε δείγμα ξεχωριστά.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

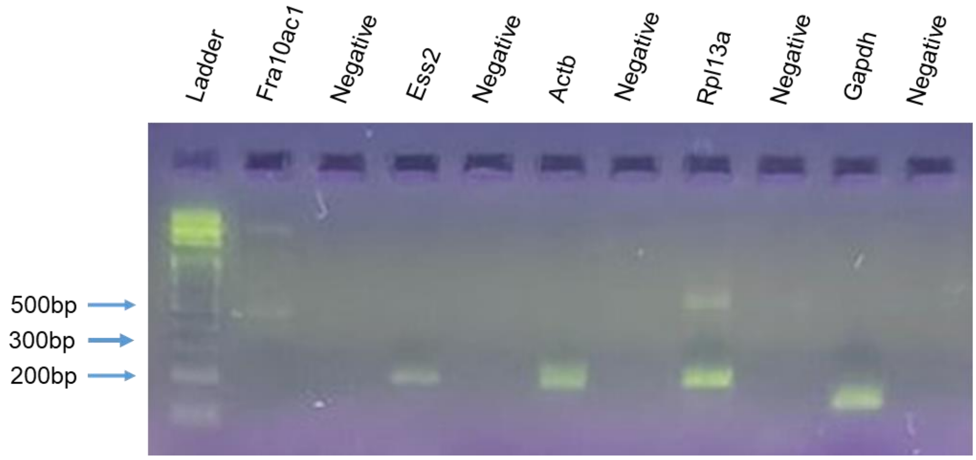
Στόχος της παρούσας διατριβής είναι αρχικά η μελέτη του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Fra10ac1* σε διάφορους ιστούς ποντικών αγρίου τύπου και ετερόζυγων knockout ως προς το γονιδίο αυτό, και ακολούθως ο έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου *Ess2* στους ίδιους ποντικούς καθώς το συγκεκριμένο γονίδιο φαίνεται πως σχετίζεται με την έκφραση του *Fra10ac1* (βλέπε Εισαγωγή 1.2.1). Για το σκοπό αυτό, έγινε απομόνωση RNA από 23 ιστούς 6 διαφορετικών ποντικών (2 αγρίου τύπου και 4 ετερόζυγοι) και στη συνέχεια επώαση των δειγμάτων με DNase ώστε να απομακρυνθεί οποιοδήποτε ίχνος DNA υπήρχε στα δείγματα. Έπειτα, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του RNA στα δείγματα, ελέχθηκαν για παρουσία γονιδιωματικού DNA και ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή ώστε να παραχθεί cDNA και τελικά να γίνει ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων-στόχων, αφού πρώτα έγινε ο έλεγχος των ιδιοστατικών γονιδίων, με PCR πραγματικού χρόνου. Τα αποτελέσματα των διαδικασιών αυτών αναλύονται στη συνέχεια.

3.1 Έλεγχος εκκινητών για την PCR πραγματικού χρόνου

Μετά τον σχεδιασμό των εκκινητών τα στοιχεία που προκύπτουν για τον κάθε εκκινητή είναι:

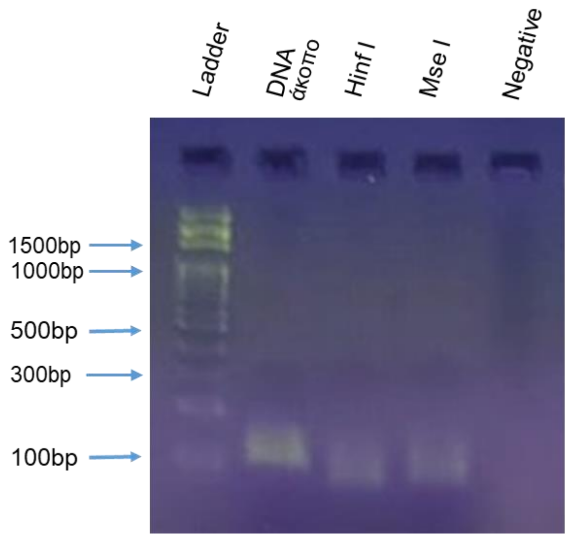
- Για το *Fra10ac1*, οι εκκινητές υβριδοποιούνται σε δύο διαφορετικά εξόνια ενώ ενδιάμεσα παρεμβάλλεται ιντρόνιο. Επομένως, όταν χρησιμοποιείται γονιδιωματικό DNA ως μήτρα, ενισχύεται το παρεμβαλλόμενο ιντρόνιο και το αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος είναι 1479 bp. Στην περίπτωση όμως που χρησιμοποιείται cDNA ως μήτρα, το οποίο έχει προκύψει από την αντίστροφη μεταγραφή του RNA, όπως αναλύεται παραπάνω, το αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος είναι 106 bp καθώς στο ώριμο mRNA δεν παρατηρούνται ιντρόνια.
- Για το *Ess2*, το *Gapdh*, το *Rpl13a* και την *Actb*, υβριδοποιούνται όλα τα ζεύγη εκκινητών στο ίδιο εξόνιο με αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος για το κάθε ένα αντίστοιχα: 200bp, 138bp, 205bp και 198bp. Εφόσον η υβριδοποίηση των εκκινητών είναι σε εξόνια, το μέγεθος προϊόντος είναι το ίδιο στην περίπτωση χρήσης γονιδιωματικού DNA αλλά και cDNA.

Έτσι, αρχικά, για τον έλεγχο των εκκινητών πραγματοποιήθηκε PCR σε γονιδιωματικό DNA ώστε να παρατηρηθεί εάν αυτοί δίνουν το αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος και άρα αν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια. Τα αποτελέσματα της PCR φαίνονται στην Εικόνα 8:



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης με στόχο τον έλεγχο των εκκινητών.

Οι εκκινητές για τα γονίδια *Ess2*, *Actb* και *Gapdh* δίνουν σωστό μέγεθος προϊόντος, όπως φαίνεται στην εικόνα αν συγκριθεί η ζώνη που προκύπτει για κάθε δείγμα με τις αντίστοιχες ζώνες του ladder (Εικόνα 8). Ακόμη, οι εκκινητές για το γονίδιο *Rpl13a* δίνουν δύο ζώνες, με την κύρια ζώνη να μην αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος (Εικόνα 8). Επομένως, οι συγκεκριμένοι εκκινητές δεν χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια του πειράματος. Επίσης, για το *Fra10ac1* παρατηρούνται διάφορες ζώνες χωρίς να υπάρχει κάποια κύρια, έντονη ζώνη με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η αξιολόγηση του αποτελέσματος. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε πέψη στο προϊόν της PCR πραγματικού χρόνου (από το ποίο απουσιάζει το ιντρόνιο) που έχει αναμενόμενο μέγεθος 106bp, με τα περιοριστικά ένζυμα *HinfI* και *MseI*, τα οποία δίνουν αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος 78bp και 28bp και 85bp και 21bp αντίστοιχα. Μετά την ηλεκτροφόρηση των πέψεων παρατηρήθηκε μικρότερο μέγεθος προϊόντος, το οποίο παρόλο που δεν μπορεί να αξιολογηθεί με ακρίβεια θεωρήθηκε σύμφωνα με το αναμενόμενο (Εικόνα 9).



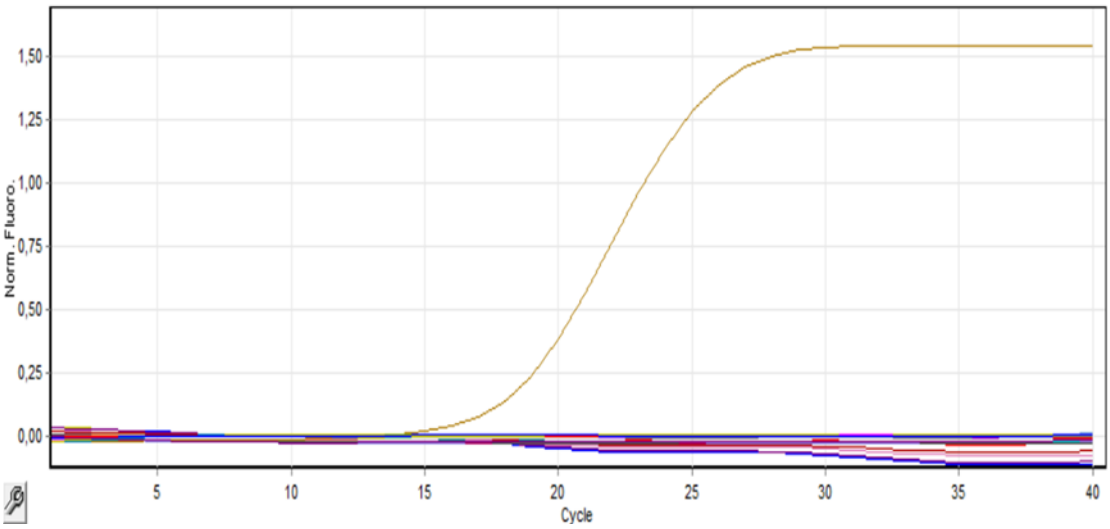
Εικόνα 9: Πέψη cDNA προϊόντος της PCR πραγματικού χρόνου για το γονίδιο *Fra10ac1* με τα ένζυμα *HinfI* και *MseI*. Για τον αρνητικό μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό.

3.2 Επώαση δειγμάτων RNA με DNase και έλεγχος παρουσίας DNA

Μετά την επώαση των δειγμάτων RNA με DNase ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα DNA, ακολούθησε έλεγχος της παρουσίας DNA σε αυτά τα δείγματα με PCR πραγματικού χρόνου καθώς σε αυτή ενισχύονται μόνο μόρια DNA και όχι RNA. Γι' αυτό το λόγο άλλωστε, πρέπει να προηγηθεί μετατροπή των μορίων RNA σε cDNA. Παράλληλα με τα 23 δείγματα, ελέγχθηκε και ένας θετικός (γονιδιωματικό DNA ποντικού) και ένας αρνητικός μάρτυρας (νερό).

Στο διάγραμμα της Εικόνας 3 φαίνεται η καμπύλη ενίσχυσης του θετικού μάρτυρα, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται η απουσία παραγωγής προϊόντων του αρνητικού μάρτυρα και ενδεικτικά κάποιων δειγμάτων RNA μετά την επώασή τους με DNase. Στον άξονα x φαίνονται οι κύκλοι της αντίδρασης και στον άξονα y φαίνεται το σήμα της χρωστικής SYBR®Green το οποίο είναι αντίστοιχο με την ενίσχυση του κάθε δείγματος. Στον αρνητικό μάρτυρα και στα δείγματα RNA δεν παρατηρείται καθόλου ενίσχυση, ενώ ο θετικός μάρτυρας, γονιδιωματικό DNA ποντικού, ενισχύεται από τον 15ο κύκλο περίπου της αντίδρασης, όπως ήταν και το αναμενόμενο αποτέλεσμα.

Με τη συγκεκριμένη διαδικασία, και αφού ελέγχθηκαν όλα τα δείγματα και έδωσαν το ίδιο αποτέλεσμα μη ενίσχυσης, αυτά κρίθηκαν ως καθαρά από υπολείμματα DNA. Έτσι, στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA για κάθε δείγμα.



Εικόνα 10: Έλεγχος ανίχνευσης DNA στα δείγματα και σε γονιδιωματικό DNA ποντικού. Η καμπύλη του θετικού μάρτυρα είναι η μόνη στην οποία φαίνεται ενίσχυση.

3.3 Υπολογισμός συγκέντρωσης δειγμάτων RNA από ιστούς ποντικών

Με τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA στα 23 δείγματα ιστών ποντικών, προέκυψαν οι τιμές που φαίνονται στον Πίνακα 1. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αραίωση όλων των δειγμάτων RNA σε τελική συγκέντρωση 90 ng/μl και συνολικό τελικό όγκο 10 μl για κάθε δείγμα με σκοπό να αποκτήσουν όλα τα δείγματα την ίδια συγκέντρωση για το στάδιο της σύνθεσης του cDNA.

Πίνακας 10: Τιμές των συγκεντρώσεων των δειγμάτων RNA από 4 διαφορετικά όργανα ετερόζυγων knockout, και αγρίου τύπου ποντικών

ΤΥΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ RNA
Wt1 Kidney	93 ng/μl
Wt1 Liver	140 ng/μl
Wt1 Heart	100,5 ng/μl
Wt1 Brain	135,5 ng/μl
Wt2 Kidney	148 ng/μl
Wt2 Liver	178 ng/μl
Wt2 Heart	90,5 ng/μl
Wt2 Brain	173 ng/μl
103 Kidney	154 ng/μl
103 Liver	138 ng/μl
103 Heart	94 ng/μl
103 Brain	161 ng/μl
104 Kidney	158 ng/μl
104 Liver	243 ng/μl
104 Heart	108 ng/μl
104 Brain	202 ng/μl
Δ80 Kidney	241 ng/μl
Δ80 Liver	170 ng/μl
Δ80 Heart*	-
Δ80 Brain	163 ng/μl
Δ81 Kidney	264 ng/μl
Δ81 Liver	248 ng/μl
Δ81 Heart	268 ng/μl
Δ81 Brain	226 ng/μl

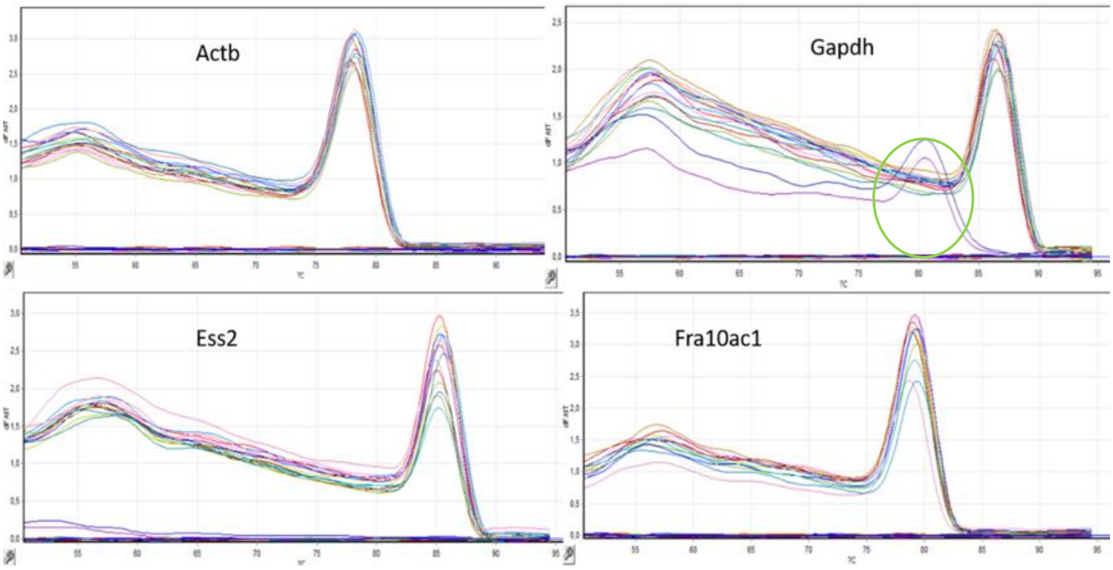
*Το δείγμα Δ80 Heart έδωσε μηδενική ποσότητα RNA έπειτα από επαναλαμβανόμενες απομονώσεις κι επομένως δεν χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια του πειράματος. Πιθανώς το RNA αποικοδομήθηκε είτε κατά τη συλλογή του δείγματος από το ζώο, είτε στο στάδιο επεξεργασίας με υγρό άζωτο.

3.4 Έλεγχος αποδοτικότητας εκκινητών

Μετά την αραίωση των δειγμάτων με σκοπό την ίδια συγκέντρωσή τους σε RNA (90 ng/μl), ακολούθησε μετατροπή τους σε cDNA. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκε ένα μείγμα όλων των επιμέρους cDNAs (pool) το οποίο περιείχε 3 μl (270ng/μl) από το κάθε δείγμα, από το οποίο παρασκευάστηκαν 7 διαδοχικές αραιώσεις (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/50, 1/100, 1/200) που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση της αποδοτικότητας των ιδιοστατικών γονιδίων και των γονιδίων – στόχων. Οι εκκινητές δοκιμάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις ώστε να βρεθεί εκείνη η συγκέντρωση για τον κάθε εκκινητή στην οποία δίνει την καλύτερη απόδοση στην αντίδραση, ενώ σε κάθε αντίδραση τα δείγματα ελέγχθηκαν από 2 φορές (duplicates) ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη αξιοπιστία στο πείραμα.

Έτσι, τα δύο ιδιοστατικά γονίδια δοκιμάστηκαν για συγκέντρωση εκκινητών 200 nM, ενώ οι συγκεντρώσεις των εκκινητών για τα γονίδια-στόχους δοκιμάστηκαν στα 150 nM, στα 200 nM, στα 250 nM, στα 300 nM και στα 350 nM. Για το γονίδιο *Ess2* βρέθηκε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση εκκινητών είναι στα 300nM, ενώ για τα υπόλοιπα γονίδια στα 200 nM.

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η ύπαρξη επιμόλυνσης των αντιδράσεων με την παρατήρηση των καμπυλών αποδιάταξης (melting curve) των δειγμάτων αρνητικού ελέγχου. Συγκεκριμένα, στα διαγράμματα των καμπυλών αποδιάταξης απεικονίζεται η θερμοκρασία αποδιάταξης στον άξονα x και το σήμα της χρωστικής SYBR®Green στον άξονα y.

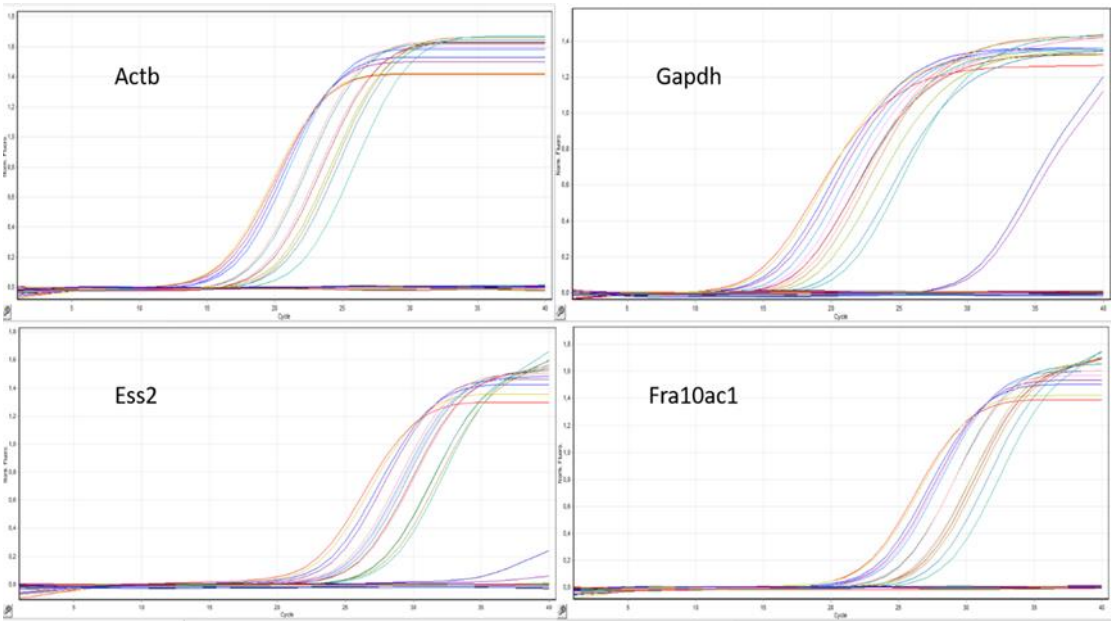


Εικόνα 11: Καμπύλες αποδιάταξης για τα ιδιοστατικά γονίδια και τα γονίδια στόχους. Για το *Gapdh* φαίνονται οι καμπύλες των δειγμάτων αρνητικού ελέγχου, όπως σημειώνονται με πράσινο χρώμα.

Όπως φαίνεται στις καμπύλες των γονιδίων *Actb, Ess2* και *Fra10ac1*, όλες οι καμπύλες εντοπίζονται σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία και δεν προκύπτει δεύτερη καμπύλη η οποία θα υποδείκνυε παραπροϊόντα ή διμερή εκκινητών. Για τα αρνητικά δείγματα δεν υπήρξε καμία ενίσχυση και στις τρεις περιπτώσεις.

Ωστόσο, στην καμπύλη του γονιδίου *Gapdh*, εκτός από τις βασικές καμπύλες των δειγμάτων, εμφανίζονται και δυο καμπύλες των αρνητικών μαρτύρων οι οποίες όμως εμφανίζονται στους 80^{o}C περίπου, και αποκλειστικά σε αυτά τα δείγματα. Επομένως, προκύπτει το συμπέρασμα ότι σχηματίζουν διμερή οι εκκινητές και δεν πρόκειται για παραπροϊόντα ή κάποια επιμόλυνση.

Καθώς δεν υπήρξε κάποια επιμόλυνση σε καμία αντίδραση, το επόμενο βήμα ήταν να ληφθούν οι τιμές Ct των δειγμάτων και των duplicates μαζί, από τις καμπύλες ενίσχυσης (Εικόνα 12). Οι τιμές Ct είναι οι κύκλοι που χρειάζεται κάθε δείγμα μέχρι να φτάσει σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο έκφρασης το οποίο ορίζεται με βάση ένα κατώφλι, ίδιο για όλα τα γονίδια ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση της έκφρασής τους. Στο συγκεκριμένο πείραμα το κατώφλι ορίσθηκε σε 0,3 που αντιστοιχεί στο σημείο έναρξης της εκθετικής φάσης των καμπυλών ενίσχυσης. Στην Εικόνα 12 φαίνονται οι καμπύλες ενίσχυσης των δειγμάτων διαδοχικών αραιώσεων για τα γονίδια *Actb, Gapdh, Ess2*, και *Fra10ac1*, με βάση τις οποίες και για κατώφλι 0,3 λήφθηκαν οι αντίστοιχες τιμές Ct.



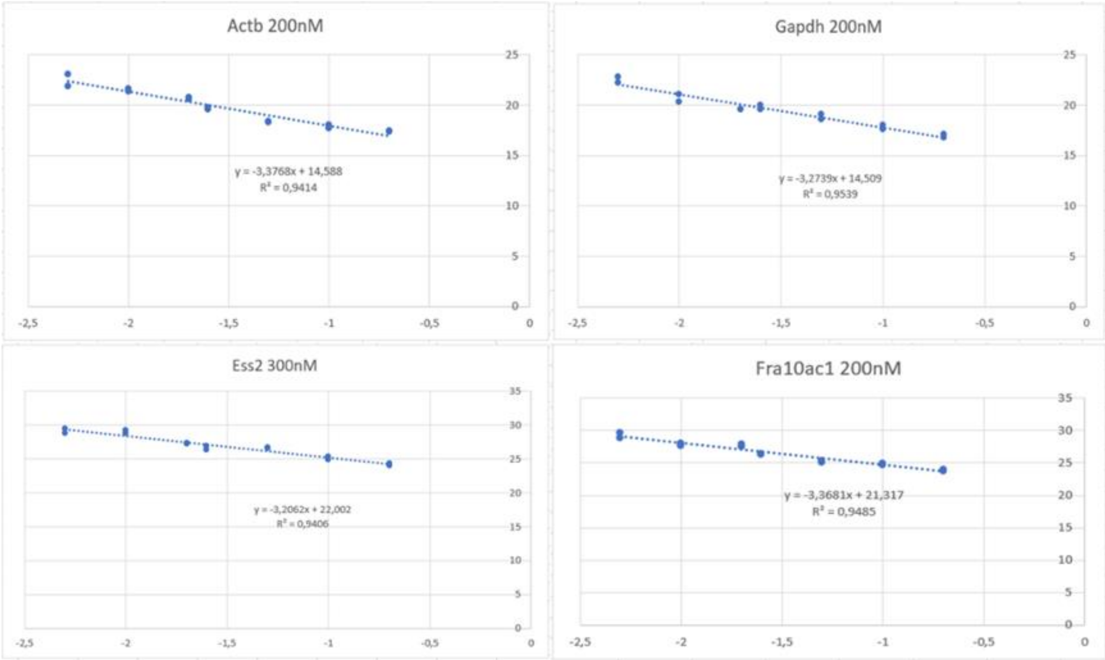
Εικόνα 12: Καμπύλες ενίσχυσης για τις διαδοχικές αραιώσεις των ιδιοστατικών γονιδίων και γονιδίων-στόχων.

Με βάση τις τιμές Ct που λήφθησαν από τις καμπύλες ενίσχυσης των δειγμάτων (Πίνακας 11) κατασκευάστηκαν και οι αντίστοιχες πρότυπες καμπύλες για την εύρεση των αποδόσεων των τεσσάρων γονιδίων. Κάθε φορά η ευθεία της πρότυπης καμπύλης σχεδιάζεται από τα σημεία των λογαρίθμων των 7 διαδοχικών αραιώσεων και των τιμών Ct που αντιστοιχούν σε κάθε αραίωση. Το R^2 υποδηλώνει το πόσο καλά είναι τα duplicates των δειγμάτων και θα πρέπει να είναι όσο πιο υψηλό γίνεται (αποδεκτές τιμές > 90%), ενώ το α είναι η κλίση της ευθείας. Η απόδοση (Efficiency) υπολογίζεται από τον τύπο Efficiency = 10(-1/slope) – 1, όπου slope είναι η κλίση της ευθείας (α). Η τιμή της απόδοσης θεωρείται αποδεκτή για το εύρος 0,95-1,05.

Πίνακας 11: Τιμές Ct των διαδοχικών αραιώσεων των εκκινητών των ιδιοστατικών γονιδίων και των γονιδίων-στόχων, με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση. Στον πίνακα φαίνονται και οι τιμές των duplicates της κάθε αραίωσης

Αραιώσεις	Actb (200Nm)	Gapdh (200nM)	Ess2 (300nM)	Fra10ac1 (200nM)
1/5	17,48	16,79	24,02	23,78
1/5	17,35	17,1	24,4	23,95
1/10	18,04	17,63	24,94	24,63
1/10	17,74	17,99	25,34	24,93
1/20	18,32	19,11	26,67	25,11
1/20	18,37	18,57	26,55	25,32
1/40	19,72	19,63	26,9	26,37
1/40	19,55	19,98	26,3	26,34
1/50	20,56	19,62	27,35	27,46
1/50	20,76	19,59	27,24	27,83
1/100	21,59	20,37	29,2	28,09
1/100	21,36	21,1	28,78	27,6
1/200	23,1	22,82	29,49	29,64
1/200	21,9	22,25	28,83	28,81

Στην Εικόνα 13 παρουσιάζονται επίσης οι πρότυπες καμπύλες για κάθε γονίδιο με τον άξονα x να αντιπροσωπεύει τις τιμές των λογαρίθμων των διαδοχικών αραιώσεων και τον y τις τιμές των Ct για κατώφλι 0,3. Κάτω από την ευθεία παρουσιάζονται επίσης η εξίσωση y = αx + β και το R^2. Πιο συγκεκριμένα, για κατώφλι 0,3, το γονίδιο *Actb* έδωσε R^2 = 0,9414, κλίση = -3,3768 και E = 0,97 σε συγκέντρωση εκκινητών 200 nM, το γονίδιο *Gapdh* έδωσε R^2 = 0,9539, κλίση = -3,2739 και E = 1,02 σε συγκέντρωση εκκινητών 200 nM, το γονίδιο *Ess2* έδωσε R^2 = 0,9406, κλίση = -3,2062 και E = 1,05 σε συγκέντρωση εκκινητών 300 nM και το γονίδιο *Fra10ac1* έδωσε R^2 = 0,9485, κλίση = -3,3681 και E = 0,98 σε συγκέντρωση εκκινητών 200 nM (Πίνακας 13).



Εικόνα 13: Πρότυπες καμπύλες των εκκινητών των ιδιοστατικών γονιδίων και γονιδίων στόχων.

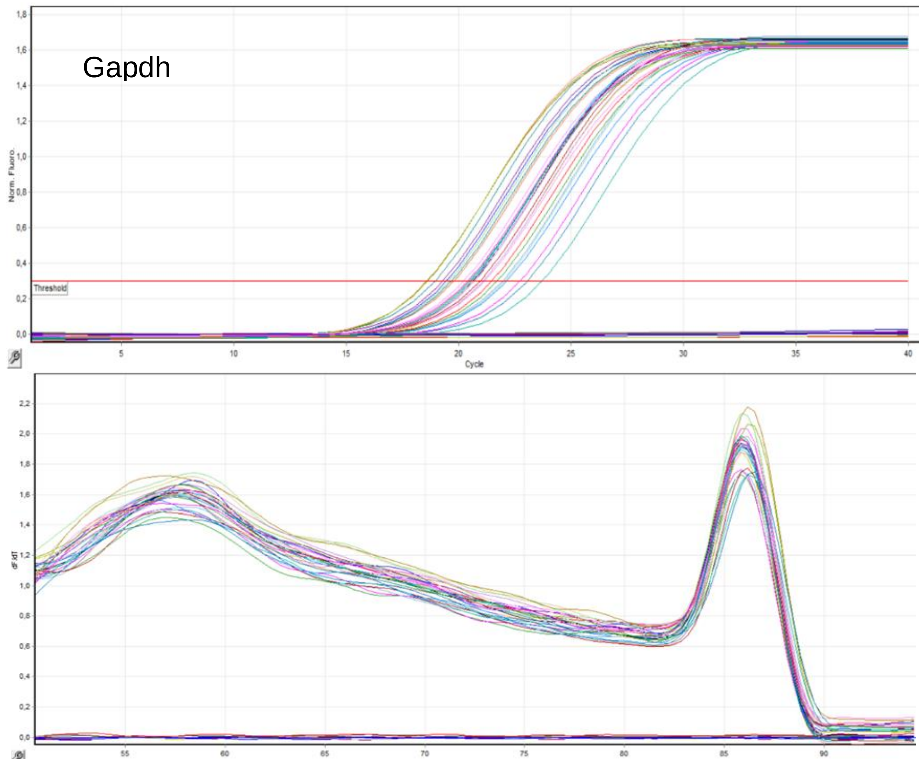
Πίνακας 12: Τιμές R^2, κλίσης και αποδοτικότητας των εκκινητών των ιδιοστατικών και των γονιδίων-στόχων, με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους

	Actb **(200Nm)**	***Gapdh*** **(200nM)**	***Ess2*** **(300nM)**	***Fra10ac1*** **(200nM)**
R^2	0,9414	0,9539	0,9406	0,9485
Κλίση	-3,3768	-3,2739	-3,2062	-3,3681
Efficiency	0,97	1,02	1,05	0,98

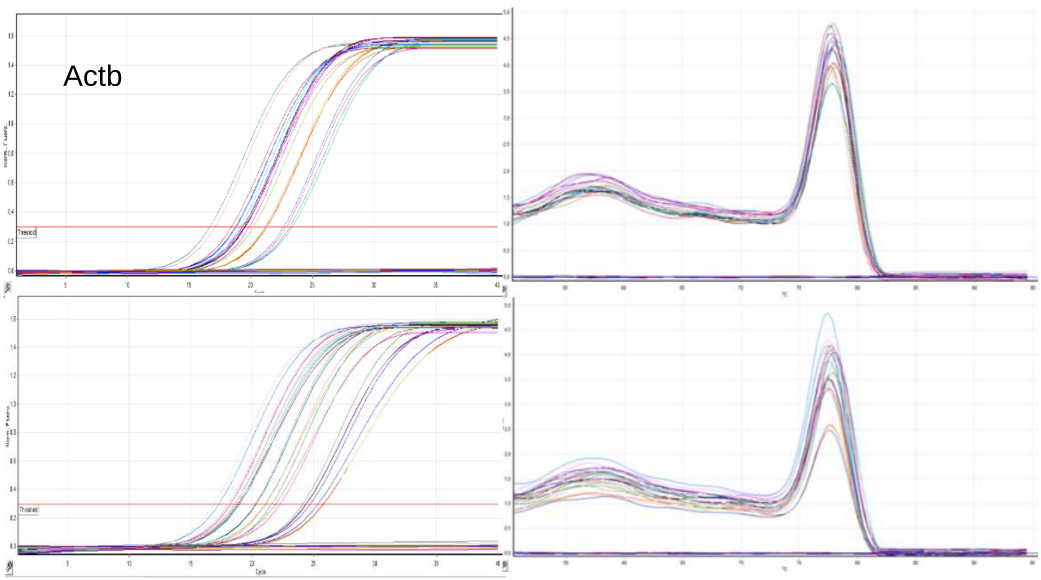
Έτσι, αφού προσδιορίστηκε η απόδοση της αντίδρασης για κάθε γονίδιο σε συγκεκριμένη συγκέντρωση εκκινητών, ακολούθησε ο έλεγχος της έκφρασης κάθε δείγματος cDNA μεμονωμένα για κάθε γονίδιο με τη δεδομένη συγκέντρωση εκκινητών, όπως προέκυψε παραπάνω.

3.5 Έλεγχος έκφρασης μεμονωμένων δειγμάτων cDNA

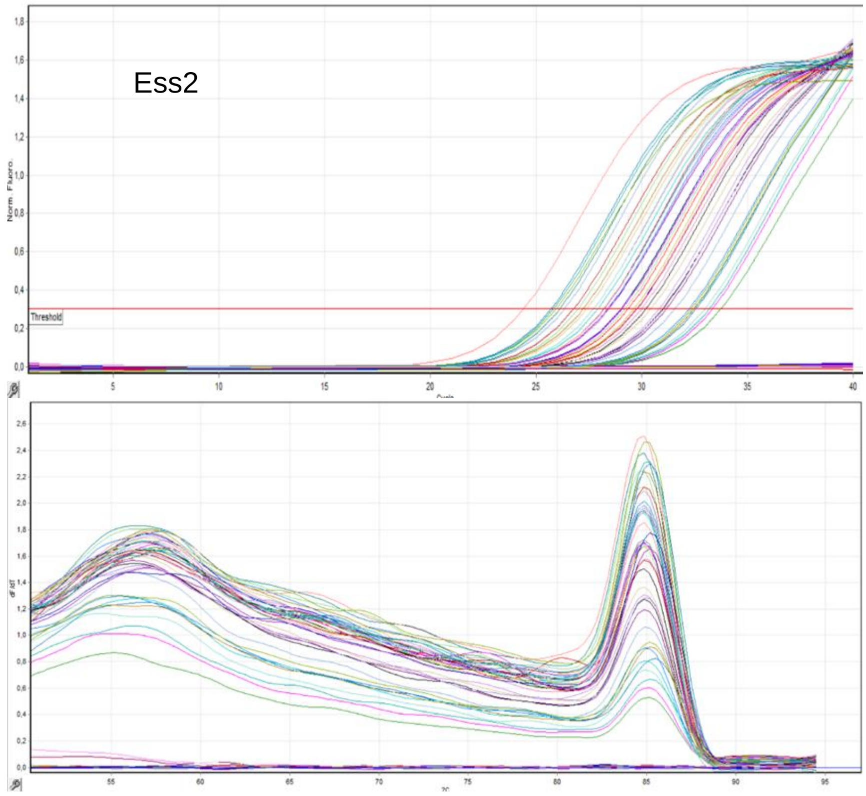
Για το στάδιο αυτό, αρχικά επιλέχθηκε συγκεκριμένη αραίωση για τα δείγματα cDNA, η οποία ήταν η 1/40 (στην οποία τα ιδιοστατικά γονίδια και τα γονίδια – στόχοι παρουσιάζουν τιμές Ct ανάμεσα από 20 και 30). Έτσι, προετοιμάστηκαν όλα τα δείγματα σε αυτή την αραίωση και πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις στις συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν σύμφωνα με τις προηγούμενες διαδικασίες, για το κάθε ζευγάρι εκκινητών ξεχωριστά. Σε κάθε αντίδραση το κάθε δείγμα ενισχύθηκε δύο φορές (duplicates). Στις Εικόνες 14, 15, 16 και 17 παρουσιάζονται οι καμπύλες αποδιάταξης και ενίσχυσης για τα δείγματα cDNA αραίωσης 1/40 στα γονίδια *Actb, Gapdh, Ess2* και *Fra10ac1*.



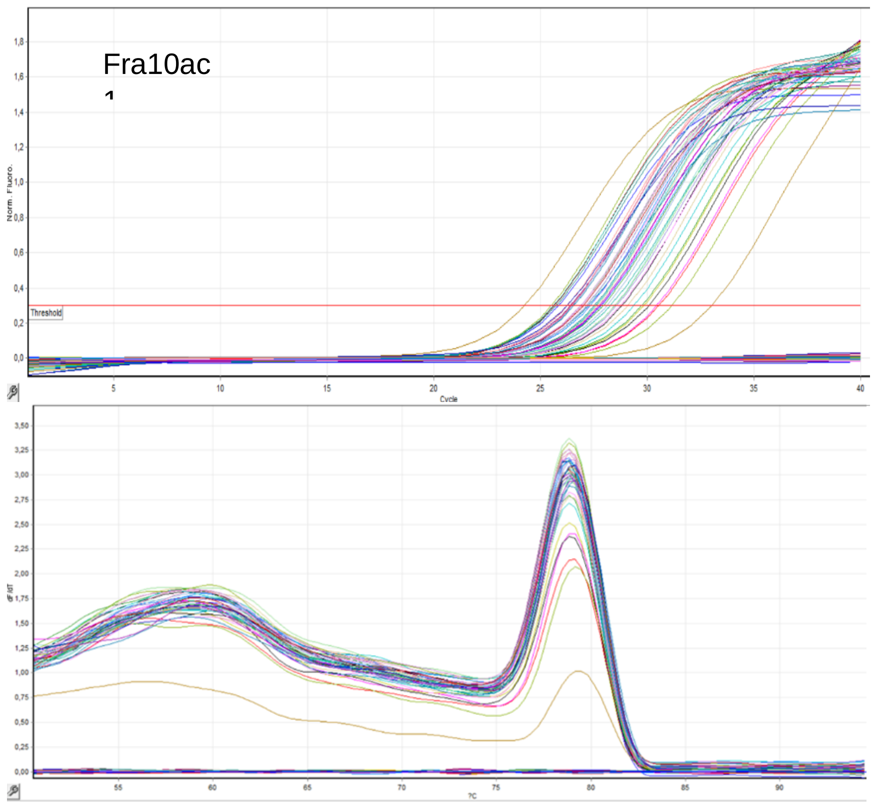
Εικόνα 14: Καμπύλες ενίσχυσης με κατώφλι 0,3 (επάνω), και καμπύλες αποδιάταξης (κάτω), όλων των δειγμάτων για το γονίδιο *Gapdh* με συγκέντρωση εκκινητών 200 nM.



Εικόνα 15: Καμπύλες ενίσχυσης (αριστερά) με κατώφλι 0,3 και αποδιάταξης (δεξιά) των δειγμάτων για το γονίδιο *Actb* με συγκέντρωση εκκινητών 200 nM. Πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές αντιδράσεις καθώς και μια επιπλέον αντίδραση με όλα τα δείγματα μαζί με επαναλήψιμα αποτελέσματα.



Εικόνα 16: Καμπύλες ενίσχυσης με κατώφλι 0,3 (επάνω), και καμπύλες αποδιάταξης (κάτω), των δειγμάτων για το γονίδιο *Ess2* με συγκέντρωση εκκινητών 300 nM.



Εικόνα 17: Καμπύλες ενίσχυσης με κατώφλι 0,3 (επάνω), και καμπύλες αποδιάταξης (κάτω), των δειγμάτων για το γονίδιο *Fra10ac1* με συγκέντρωση εκκινητών 200 nM. Δείγματα για τα οποία δεν προέκυψαν καλά duplicates (μεταξύ τους διαφορά > 1) επαναλήφθηκαν.

Σε κάθε άλλη αντίδραση των δειγμάτων cDNA αραίωσης 1/40 για οποιοδήποτε γονίδιο (οι αντίστοιχες καμπύλες δεν παρουσιάζονται), οι καμπύλες αποδιάταξης έδιναν παρόμοιο αποτέλεσμα με τις παραπάνω. Επομένως, προκύπτει ότι δεν υπήρξε καμία επιμόλυνση των δειγμάτων και ήταν δυνατή η χρήση των τιμών Ct για περαιτέρω ανάλυση από τις αντίστοιχες καμπύλες ενίσχυσης για κατώφλι 0,3. Αξίζει να σημειωθεί ότι για το γονίδιο *Fra10ac1* επαναλήφθηκαν τα δείγματα τα οποία δεν έδιναν καλές τιμές Ct μεταξύ των δύο επαναλήψεων (duplicates) ώστε να επιλεγεί η τιμή Ct που έχει επαναληψιμότητα.

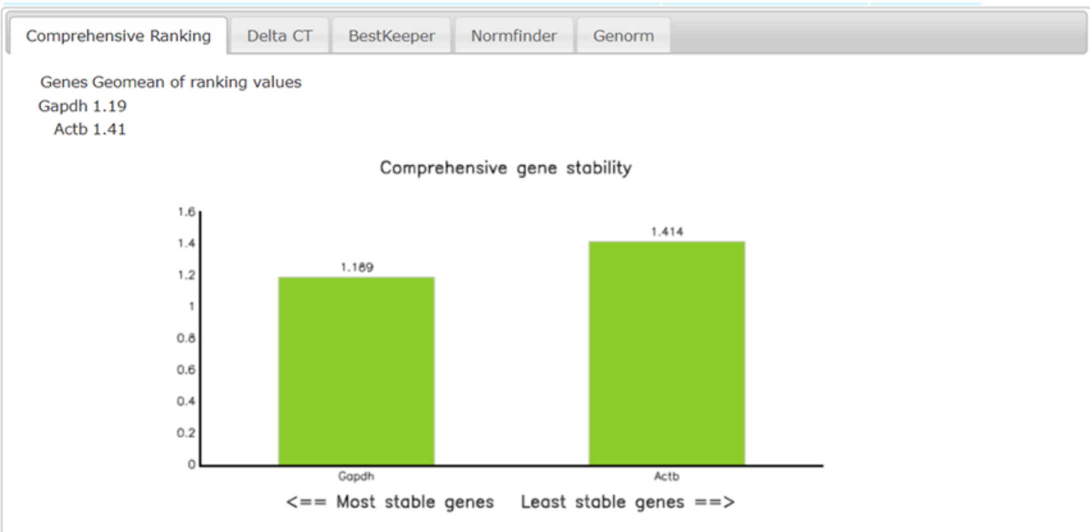
Για κάθε δείγμα cDNA αραίωσης 1/40 που υποβλήθηκε στην PCR πραγματικού χρόνου κάθε γονιδίου στην συγκέντρωση εκκινητών που είχε προσδιοριστεί, προέκυψαν 2 τιμές Ct. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η μέση τιμή Ct για κάθε δείγμα σε κάθε γονίδιο, το οποίο και αντιπροσωπεύει τον κύκλο στον οποίο η έκφραση του γονιδίου στο συγκεκριμένο δείγμα φτάνει το κατώφλι το οποίο είχε οριστεί (0,3).

Πίνακας 13: Οι τιμές των μέσων τιμών Ct για τα 4 γονίδια σε κάθε δείγμα

Δείγμα	Actb (200nM)	Gapdh (200Nm)	Ess2 (300Nm)	Fra10ac1 (200nM)
Δ81 Liver	21,24	21,29	21,14	29,495
Δ81 Kidney	19,19	19,39	19,47	30,47
Δ81 Brain	19,14	20,415	21,28	29,07
Δ81 Heart	16,92	18,8	20,98	25,265
Δ80 Liver	23,04	22,23	21,92	33,54
Δ80 Kidney	19,355	20,6	19,77	29,07
Δ80 Brain	18,905	19,675	20,10	27,195
Wt1 Liver	20,74	21,99	23,10	32,275
Wt1 Kidney	23,045	20,865	23,89	28,34
Wt1 Brain	19,64	20,835	21,12	27,245
Wt1 Heart	19,215	18,62	22,54	26,59
Wt2 Liver	25,85	23,4	26,16	32,885
Wt2 Kidney	24,905	21,65	24,94	32,24
Wt2 Brain	17,715	19,75	20,75	28,205
Wt2 Heart	21,405	20,45	22,61	29,05
103 Liver	23,24	22,94	24,17	31,74
103 Kidney	20,32	20,335	21,59	29,82
103 Brain	18,915	19,27	22,27	27,02
103 Heart	21,515	20,005	22,70	30,92
104 Liver	18,955	18,535	17,79	29,885
104 Kidney	24,62	23,505	24,06	32,405
104 Brain	17,61	18,99	19,40	25,765
104 Heart	18,635	19,09	20,78	28,7

3.6 Αξιολόγηση των ιδιοστατικών γονιδίων

Στη συνέχεια, έγινε αξιολόγηση των ιδιοστατικών γονιδίων μέσω του διαδικτυακού εργαλείου RefFinder. Το RefFinder χρησιμοποιείται για τον έλεγχο και την αξιολόγηση ιδιοστατικών γονιδίων με τέσσερα υπολογιστικά προγράμματα (Genorm, Normfinder, Bestkeeper και Comparative delta – CT method) για να συγκρίνει και να ταξινομήσει τα υπό μελέτη ιδιοστατικά γονίδια. Βάσει της σειράς ταξινόμησης από κάθε πρόγραμμα, σε κάθε γονίδιο ορίζεται μια κατάλληλη τιμή (appropriate weight) και υπολογίζεται ο γεωμετρικός μέσος όρος των τιμών αυτών ώστε να προκύψει η τελική κατάταξη καταλληλότητας χρήσης των ιδιοστατικών γονιδίων.



Εικόνα 18: Αποτελέσματα αξιολόγησης των ιδιοστατικών γονιδίων μέσω του RefFinder. Το γονίδιο *Gapdh* φαίνεται ως το πιο αξιόπιστο σε σύγκριση με την *Actb*.

Μετά την ανάλυση των δεδομένων μέσω του RefFinder και σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί ως ιδιοστατικό γονίδιο μόνο το *Gapdh* και όχι η *Actb* καθώς κρίθηκε ως μη αξιόπιστο ιδιοστατικό γονίδιο σύμφωνα με τις τιμές Ct που προέκυψαν (Εικόνα 18). Ως δεύτερο ιδιοστατικό γονίδιο για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων των γονιδίων – στόχων χρησιμοποιήθηκε το *Tbp* (Πτυχιακή Εργασία Δήμου Αικατερίνη, 2022, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

3.7 Κανονικοποίηση των ιδιοστατικών γονιδίων και των γονιδίων – στόχων και έλεγχος των επιπέδων έκφρασής τους

Το επόμενο βήμα περιλάμβανε τη μετατροπή των αποτελεσμάτων αυτών στην κατάλληλη μορφή, έτσι ώστε να είναι δυνατή η μετέπειτα σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του κάθε γονιδίου – στόχου σε κάθε δείγμα σε σχέση με τα ιδιοστατικά γονίδια. Αρχικά, από τις μέσες τιμές Ct που προέκυψαν από κάθε δείγμα υπολογίστηκε το R0 (Πίνακας 14) που αντιστοιχεί στα επίπεδα του αρχικού φθορισμού, τα οποία και αναλογούν στα αρχικά επίπεδα mRNA.

- Το R0 υπολογίζεται από τον τύπο R0 = RCt / (E+1)^Ct, όπου: RCt είναι τα επίπεδα φθορισμού που αντιστοιχούν στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου μέχρι αυτά να φτάσουν στο κατώφλι που ορίστηκε, δηλαδή RCt = 0,3. Στον τύπο χρησιμοποιήθηκε x100, δηλαδή τιμή 300 για καλύτερες τιμές των αποτελεσμάτων.
- Ε είναι η απόδοση (efficiency) του κάθε γονιδίου και Ct είναι οι μέσες τιμές Ct που βρέθηκαν για κάθε δείγμα σε κάθε γονίδιο (Πίνακας 13).

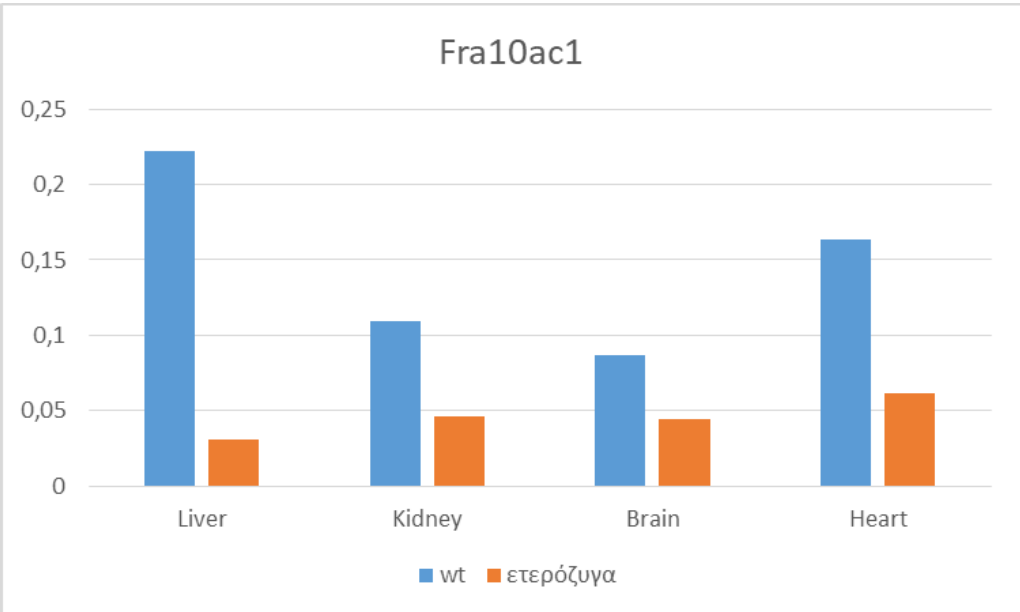
Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο παράγοντας κανονικοποίησης (NF) από τα δύο ιδιοστατικά γονίδια για κάθε δείγμα σύμφωνα με τον τύπο NF = (R0(ACTB) + R0(RPS18)) / 2. Έπειτα η κάθε τιμή R0 για τα δύο γονίδια ενδιαφέροντος διαιρέθηκε με το NF (Πίνακας 14).

Πίνακας 14: Οι τιμές R0 των 4 γονιδίων, οι τιμές NF και οι τιμές των R0 των γονιδίων στόχων προς το αντίστοιχο NF

Δείγμα	Gapdh (R0)	Tbp (R0)	NF	Fra10ac1 (R0)	Fra10ac1 (R0)/NF	Ess2 (R0)	Ess2(R0)/NF
Δ81 Liver	0,000163519	3,81842E-06	2,49877E-05	3,2724E-07	0,013096026	1,914E-07	1,46151E-05
Δ81 Kidney	0,000592314	3,40837E-05	4,49314E-05	5,25787E-06	0,11702	9,50563E-08	8,12309E-07
Δ81 Brain	0,000295798	6,51709E-06	4,39061E-05	2,30849E-06	0,052577953	2,59679E-07	4,93893E-06
Δ81 Heart	0,000883347	5,66381E-06	7,07327E-05	2,91202E-06	0,041169386	3,98713E-06	9,68469E-05
Δ80 Liver	8,65007E-05	2,25978E-06	1,39812E-05	3,47989E-07	0,024889871	1,04929E-08	4,21574E-07
Δ80 Kidney	0,000260957	4,76051E-06	3,52461E-05	1,2655E-06	0,035904754	2,59679E-07	7,23244E-06
Δ80 Brain	0,00048832	1,14244E-05	7,46911E-05	2,37244E-06	0,031763353	9,97643E-07	3,14086E-05
wt1 Liver	0,000101772	9,78532E-07	9,97933E-06	1,21054E-06	0,121304851	2,60175E-08	2,1448E-07
wt1 Kidney	0,000218074	1,96391E-06	2,06949E-05	1,81139E-06	0,087528369	4,38548E-07	5,01035E-06
wt1 Brain	0,000222552	1,19715E-05	5,16166E-05	5,47785E-06	0,106125727	9,6247E-07	9,06915E-06
wt1 Heart	0,000997901	1,7766E-06	4,21055E-05	1,23493E-05	0,293293662	1,54023E-06	5,2515E-06
wt2 Liver	3,91565E-05	7,21985E-07	5,31699E-06	1,71506E-06	0,322561806	1,67917E-08	5,20574E-08
wt2 Kidney	0,000128132	6,4986E-07	9,12511E-06	1,1982E-06	0,131308116	2,66794E-08	2,03182E-07
wt2 Brain	0,00046413	1,58503E-05	8,57705E-05	5,7658E-06	0,067223562	4,83174E-07	7,18757E-06
wt2 Heart	0,000288867	8,0709E-06	4,82848E-05	1,61279E-06	0,033401728	2,63434E-07	7,88683E-06
103 Liver	5,34732E-05	1,38511E-06	8,60619E-06	4,49588E-07	0,052240111	3,81992E-08	7,31223E-07
103 Kidney	0,000312271	9,99516E-06	5,58677E-05	8,51524E-07	0,015241803	1,51573E-07	9,94454E-06
103 Brain	0,000642475	1,18521E-05	8,7262E-05	3,22622E-06	0,036971664	1,13118E-06	3,05959E-05
103 Heart	0,000390497	1,23019E-06	2,19177E-05	1,61279E-06	0,073584023	6,88164E-08	9,35208E-07
104 Liver	0,001057048	7,15622E-06	8,69739E-05	2,95208E-06	0,033942103	1,44663E-07	4,26205E-06
104 Kidney	3,64681E-05	6,9477E-07	5,03358E-06	9,02926E-08	0,017938048	2,36994E-08	1,32118E-06
104 Brain	0,000776663	1,22343E-05	9,74779E-05	5,38509E-06	0,055244254	2,78473E-06	5,04076E-05
104 Heart	0,000725793	1,38743E-06	3,17331E-05	2,90209E-06	0,091453264	3,38677E-07	3,70328E-06

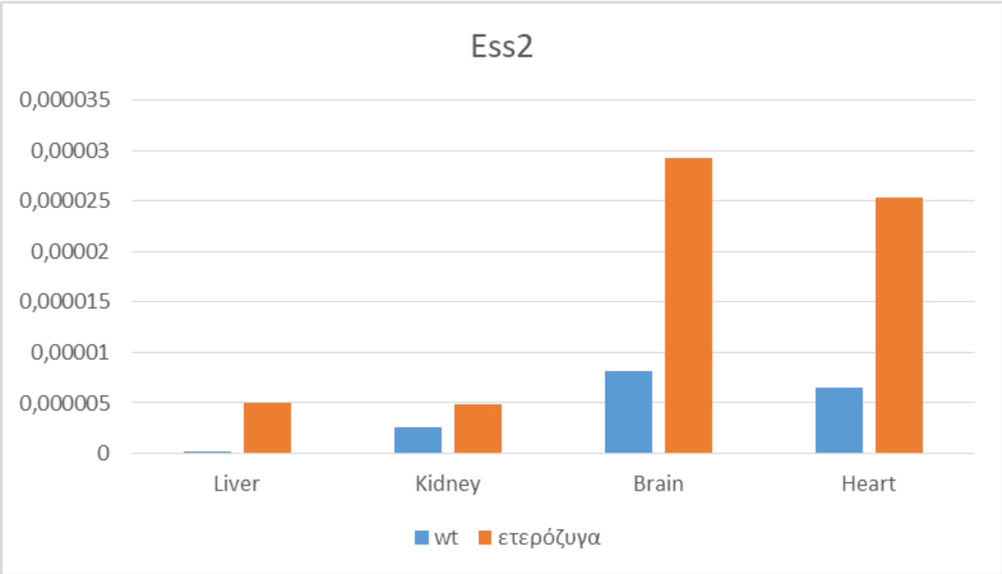
Από τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτει ότι τα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων – στόχων, *Fra10ac1* και *Ess2*, καθώς και η τιμή του μεταξύ τους λόγου (Πίνακας 14) παρουσιάζουν έντονη διακύμανση ανάμεσα στους τέσσερις διαφορετικούς ιστούς καθώς και στα διαφορετικά είδη ποντικών που μελετήθηκαν (αγρίου τύπου και ετερόζυγοι knockout). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται μείωση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *Fra10ac1* μεταξύ των ποντικών αγρίου τύπου και ετερόζυγων σε ποσοστό 86% για το ήπαρ, 57% για το συκώτι, 49% για τον εγκέφαλο και 62% για την καρδιά. Ταυτόχρονα παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *Ess2* στους ίδιους ποντικούς σε ποσοστό 97% για το ήπαρ, 46% για το συκώτι, 72% για τον εγκέφαλο και 74% για την καρδιά.

Αρχικά, για το γονίδιο *Fra10ac1* παρατηρούνται διαφορές στην έκφραση του γονιδίου μεταξύ των ποντικών αγρίου τύπου και των ετερόζυγων ποντικών. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται μείωση της έκφρασης του γονιδίου στους ετερόζυγους knockout ποντικούς, όπως ήταν αναμενόμενο, σε σύγκριση με την έκφραση στους ποντικούς αγρίου τύπου. Επίσης, φαίνεται πως η έκφραση δεν είναι σταθερή στους τέσσερις ιστούς αλλά μεταβάλλεται ανάλογα με τον τύπο του ιστού, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως τα επίπεδα έκφρασης δεν είναι ίδια σε ολόκληρο τον ποντικό αλλά αλλάζουν ανάλογα με τον ιστό (ιστοειδική έκφραση και όχι καθολική) (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται οι αλλαγές έκφρασης του γονιδίου Fra10ac1 στους τέσσερις ιστούς μεταξύ των ετερόζυγων και αγρίου τύπου ποντικών

Για το γονίδιο *Ess2* παρατηρούνται πολύ μικρές τιμές R0/NF επειδή οι τιμές Ct των δειγμάτων προέκυψαν πολύ μεγαλύτερες συγκριτικά με τις τιμές Ct από το μίγμα των δειγμάτων που είχε δημιουργηθεί αρχικά (pool). Συγκεκριμένα, κάποια δείγματα εμφάνιζαν τιμές Ct περίπου 33, που πρακτικά σημαίνει πως σε αυτή την τιμή Ct τα δείγματα δεν βρίσκονταν πλέον στην εκθετική φάση. Δηλαδή, παρά το γεγονός ότι στην αραίωση 1/40 τα δείγματα έδιναν τιμές Ct μεταξύ 20 και 30, όπως κανονικά θα πρέπει να γίνεται για να επιλεχθεί η συγκεκριμένη αραίωση για την ανάλυση των δειγμάτων, μεμονωμένα τα δείγματα έδιναν μεγαλύτερες τιμές. Ακόμη και σε αυτή την περίπτωση όμως, προκύπτει ότι παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του γονιδίου στα ετερόζυγα σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου ποντίκια, όπως ήταν αναμενόμενο. Αντίστοιχα με το γονίδιο *Fra10ac1* επίσης, παρατηρείται και σε αυτή την περίπτωση διακύμανση της έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών ιστών που μελετήθηκαν (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται οι αλλαγές έκφρασης του γονιδίου *Ess2* στους τέσσερις ιστούς μεταξύ των ετερόζυγων και αγρίου τύπου ποντικών.

Θα πρέπει να τονιστεί ωστόσο, ότι για το λόγο που αναφέρεται παραπάνω, τα συγκεκριμένα αποτελέσματα θα πρέπει να βελτιωθούν ώστε να μπορέσουν να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα. Συγκεκριμένα, προτείνεται επανάληψη όλων των αντιδράσεων σε μικρότερη αραίωση, όπως για παράδειγμα την 1/20, ώστε να μειωθεί ο κύκλος ανίχνευσης και τα δείγματα να βρίσκονται στην εκθετική φάση. Επίσης, θα μπορούσε να γίνει προσπάθεια της βελτίωσης της αποδοτικότητας των εκκινητών (efficiency) καθώς για το συγκεκριμένο γονίδιο, αυτή βρισκόταν στο όριο αποδοχής (105%). Δοκιμές με διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών πιθανόν να οδηγούσαν σε βελτίωση της αποδοτικότητας με τιμές πιο κοντά στο 100 που θεωρείται το ιδανικό. Επίσης, λόγω περιορισμών χρόνου, για το γονίδιο *Ess2* η αντίδραση πραγματοποιήθηκε μια φορά ενώ σε κάποια δείγματα τα duplicates είχαν διαφορά μεγαλύτερη από 1. Επομένως, θα έπρεπε να επαναληφθεί η αντίδραση μέχρι τα duplicates να είναι σωστά για όλα τα δείγματα ώστε να προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα. Τέλος, προτείνεται να χρησιμοποιηθούν περισσότερα γονίδια αναφοράς ώστε να είναι πιο αξιόπιστα και συγκρίσιμα τα αποτελέσματα για τα γονίδια στόχους.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, με την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης μελέτης έχουν προκύψει κάποια βασικά συμπεράσματα τα οποία θα μπορούσαν να διευκολύνουν στο μέλλον την διαδικασία πραγματοποίησης άλλων παρόμοιων πειραμάτων. Πιο συγκεκριμένα:

- Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν ιστοί από δύο ποντικούς αγρίου τύπου και τέσσερις ετερόζυγους knockout ποντικούς για το γονίδιο *Fra10ac1*, με στόχο τη μελέτη και τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *Fra10ac1* και *Ess2*, τα οποία έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν στενά μεταξύ τους. Ειδικότερα, παρατηρείται σε σχετικές μελέτες ότι η μείωση της έκφρασης του *Fra10ac1*, οδηγεί στην αύξηση της έκφρασης του *Ess2*. Η παραπάνω παρατήρηση μπορεί να επιβεβαιωθεί και από τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία και λαμβάνοντας πάντα υπόψιν τους περιορισμούς που αναλύονται παραπάνω. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης του *Fra10ac1* στους ετερόζυγους ποντικούς συγκριτικά με τους ποντικούς αγρίου τύπου ενώ ταυτόχρονα φαίνεται επίσης πως τα επίπεδα έκφρασης δεν είναι σταθερά μεταξύ των διαφορετικών ιστών του ίδιου ζώου. Αντίστοιχα, για το *Ess2* μπορεί να παρατηρηθεί μια αύξηση των επιπέδων έκφρασης όσο μειώνεται η έκφραση του *Fra10ac1*, χωρίς όμως τα αποτελέσματα αυτά να είναι απολύτως αποδεκτά καθώς χρήζουν περαιτέρω μελέτης.
- Σε περίπτωση μελλοντικής επανάληψης του πειράματος για την αποσαφήνιση της έκφρασης του γονιδίου *Ess2*, προτείνεται η επιλογή μικρότερης αραίωσης (για παράδειγμα αραίωση 1/20), ώστε κατά την ανάλυση των δειγμάτων να μην προκύπτουν τιμές Ct μεγαλύτερες από 30 στις οποίες τα δείγματα παύουν να είναι στην εκθετική φάση. Επίσης, προτείνεται η δοκιμή διαφορετικών συγκεντρώσεων των εκκινητών του ίδιου γονιδίου για βελτίωση της αποδοτικότητας (efficiency) της αντίδρασης. Τονίζεται επίσης ότι για όλες τις αντιδράσεις, θα πρέπει τα duplicates των δειγμάτων να έχουν την ελάχιστη δυνατή απόκλιση μεταξύ τους. Τέλος, προτείνεται η δοκιμή και χρήση περισσότερων γονιδίων αναφοράς για πιο αξιόπιστα και συγκρίσιμα αποτελέσματα.
- Όσον αφορά πιθανές μελλοντικές προσεγγίσεις για τη διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *FRA10AC1*, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε επίσης η μελέτη και ο προσδιορισμός της έκφρασης άλλων γονιδίων τα οποία έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με το *FRA10AC1*. Όπως αναφέρεται στην εισαγωγή, το δίκτυο των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης *Fra10ac1* είναι αρκετά εκτεταμένο επομένως, ίσως θα είχε ενδιαφέρον η μελέτης της έκφρασης διαφόρων γονιδίων που έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με το *Fra10ac1* στις διαφορετικές καταστάσεις έκφρασης του. Με αυτό τον τρόπο πιθανόν να αποσαφηνιστούν μοριακοί μηχανισμοί οι οποίοι ευθύνονται για διάφορα συμπτώματα που εμφανίζονται σε φορείς της εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης *FRA10A*.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Alfonita, F. (2018). Title. *Computers and Industrial Engineering*, *2*(January), 6. http://ieeeauthorcenter.ieee.org/wp-content/uploads/IEEE-Reference Guide.pdf%0Ahttp://wwwlib.murdoch.edu.au/find/citation/ieee.html%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.cie.2019.07.022%0Ahttps://github.com/ethereum/wiki/wiki/White-Paper%0Ahttps://tore.tuhh.de/hand

Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C. L., Urlaub, H., & Lu, R. (2008). *Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core*. *452*(April). https://doi.org/10.1038/nature06842

Burgute, B. D., Peche, V. S., Steckelberg, A., Glo, G., Gaßen, B., Gehring, N. H., & Noegel, A. A. (2014). *NKAP is a novel RS-related protein that interacts with RNA and RNA binding proteins*. *42*(5), 3177–3193. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1311

Coleman, J. L. J., Brennan, K., Ngo, T., Balaji, P., Graham, R. M., & Smith, N. J. (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

Conlin, L. K. (2014). *Mosaicism and Clinical Genetics*. https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31421

Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2008). *Real-Time PCR*. 1–34.

Glover, T. W. (2006). Common fragile sites. *Cancer Letters*, *232*(1), 4–12. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.08.032

Hegele, A., Kamburov, A., Grossmann, A., Sourlis, C., Wowro, S., Weimann, M., Will, C. L., Pena, V., & Lu, R. (2012). *Article Dynamic Protein-Protein Interaction Wiring of the Human Spliceosome*. 567–580. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.034

Ho, R. M. (n.d.). *Mouse Genetics*.

Ilagan, J. O., Chalkley, R. J., Burlingame, A. L., & Jurica, M. S. (2013). *Rearrangements within human spliceosomes captured after exon ligation*. 400–412. https://doi.org/10.1261/rna.034223.112.4

Ji, X., Wang, Y., Li, J., Rong, Q., Chen, X., & Zhang, Y. (2017). *Application of FLP-FRT System to Construct Unmarked Deletion in Helicobacter pylori and Functional Study of Gene hp0788 in Pathogenesis*. *8*(November), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02357

Kawamura, N., Nimura, K., Saga, K., Ishibashi, A., Kitamura, K., Nagano, H., Yoshikawa, Y., & Ishida, K. (2019). *SF3B2-Mediated RNA Splicing Drives Human Prostate Cancer Progression*. *79*(20). https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3965

Kim, H., Kim, M., Im, S., & Fang, S. (2019). *Mouse Cre-LoxP system :*

general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *6055*(4), 147–159.

Li, Q. S., Parrado, A. R., Samtani, M. N., & Narayan, V. A. (2015). Variations in the FRA10AC1 fragile site and 15q21 are associated with Cerebrospinal fluid Aβ1-42 level. *PLoS ONE*, *10*(8), 1–17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134000

Limaye, A., Hall, B., & Kulkarni, A. B. (2009). *Manipulation of Mouse Embryonic Stem Cells for Knockout Mouse Production*. *September*, 1–24. https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1913s44

Lin, H., Zhang, Z., Iomini, C., & Dutcher, S. K. (2018). Identifying RNA splicing factors using IFT genes in Chlamydomonas reinhardtii. *Open Biology*, *8*(3). https://doi.org/10.1098/rsob.170211

Melo-hanchuk, T. D., Colleti, C., Saito, Â., Carolina, M., Mendes, S., Barreto, J., Carvalheira, C., & Vassallo, J. (2020). *Intracellular hyaluronic acid-binding protein 4 (HABP4): a candidate tumor suppressor in colorectal cancer*. *11*(46), 4325–4337.

Noma, K., Goncharov, A., & Jin, Y. (2014). Systematic analyses of rpm-1 suppressors reveal roles for ESS-2 in mRNA splicing in Caenorhabditis elegans. *Genetics*, *198*(3), 1101–1115. https://doi.org/10.1534/genetics.114.167841

Pol, R. N. A., & Ctd, I. I. (2020). *RNA processing 10*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814855-6.00010-9

Potter, K., Cremona, N., Wise, J. A., & Western, C. (2013). Messenger RNA Processing in Eukaryotes. In *Encyclopedia of Biological Chemistry* (2nd ed.). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00627-7

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J., & Andrade, M. J. (2015). *Chapter 3 Real-Time PCR Methods*. *1275*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6

Sarafidou, T., Kahl, C., Martinez-Garay, I., Mangelsdorf, M., Gesk, S., Baker, E., Kokkinaki, M., Talley, P., Maltby, E. L., French, L., Harder, L., Hinzmann, B., Nobile, C., Richkind, K., Finnis, M., Deloukas, P., Sutherland, G. R., Kutsche, K., Moschonas, N. K., … Gécz, J. (2004). Folate-sensitive fragile site FRA10A is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, FRA10AC1, encoding a nuclear protein. *Genomics*, *84*(1), 69–81. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.12.017

Schwartz, M., Zlotorynski, E., & Kerem, B. (2006). The molecular basis of common and rare fragile sites. *Cancer Letters*, *232*(1), 13–26. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.07.039

Sharma, S., & Zhu, J. (2014). *SECTION VIII Immunologic Applications of Conditional Gene Modification Technology in the Mouse*. *April*, 1–13. https://doi.org/10.1002/0471142735.im1034s105

Skarnes, W. C., Rosen, B., West, A. P., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., Mujica, A. O., Thomas, M., Harrow, J., Cox, T., Jackson, D., Severin, J., Biggs, P., Fu, J., Nefedov, M., De Jong, P. J., Stewart, A. F., & Bradley, A. (2011). A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*, *474*(7351), 337–344. https://doi.org/10.1038/nature10163

Song, F., Fan, C., Wang, X., & Goodrich, D. W. (2013). *The Thoc1 Encoded Ribonucleoprotein Is a Substrate for the NEDD4-1 E3 Ubiquitin Protein Ligase*. *8*(2), 1–5. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057995

Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2022). *The power of real-time PCR*. 151–159. https://doi.org/10.1152/advan.00019.2005.

Vigevani, L., Valca, J., Papasaikas, P., & Ramo, J. (2015). *Extensive Regulatory Potential of the Core Spliceosomal Machinery*. 7–22. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.030

von Elsner, L., Chai, G., Schneeberger, P. E., Harms, F. L., Casar, C., Qi, M., Alawi, M., Abdel-Salam, G. M. H., Zaki, M. S., Arndt, F., Yang, X., Stanley, V., Hempel, M., Gleeson, J. G., & Kutsche, K. (2021). Biallelic FRA10AC1 variants cause a neurodevelopmental disorder with growth retardation. *Brain : A Journal of Neurology*, *2021*, 2–38. https://doi.org/10.1093/brain/awab403

Wang, Y. (2019). *PRPF40A as a potential diagnostic and prognostic marker is upregulated in pancreatic cancer tissues and cell lines : an integrated bioinformatics data analysis*. 5037–5051.

Warren, C. M., Krzesinski, P. R., & Greaser, M. L. (2003). *Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins*. 1695–1702. https://doi.org/10.1002/elps.200305392