



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας**



**Πτυχιακή Εργασία – Bachelor’s Thesis**

**«Έλεγχος διαφορικής έκφρασης γονιδίων σε knockout ποντίκια για το γονίδιο *Fra10ac1*»**

**“Investigation of differential gene expression in *Fra10ac1* knockout mice”**

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Κ. ΔΗΜΟΥ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2022**

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

### **ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ**

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

### **ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ**

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

### **ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος  
Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας είναι το μεγαλύτερο έργο που αναλαμβάνει ένας προπτυχιακός φοιτητής και είμαι πραγματικά ευγνώμων για την ευκαιρία που μου δόθηκε να είμαι για «λίγο» μέλος του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρο Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την καθοδήγηση, τη συνεργασία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς η βοήθεια της υπήρξε πολύτιμο εφόδιο για την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, και την κυρία Μούτου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, για την συμμετοχή τους στην συμβουλευτική επιτροπή. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μπάμπου Πηνελόπη για την αμέριστη βοήθειά της και την άψογη συνεργασία. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω, επίσης, σε όλα τα μέλη που απαρτίζουν το Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, για τη βοήθεια και τη συνεργασία τους καθώς και για τη συνεισφορά τους στη δημιουργία ενός πολύ ευχάριστου εργαστηριακού περιβάλλοντος, το οποίο υπήρξε αρωγός στη διεκπεραίωση της εργασίας μου. Τέλος, θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη στήριξή τους και την πίστη τους σε μένα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γονίδιο *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην περιοχή 10q23.3 της σπάνιας χρωμοσωματικής εύθραυστης θέσης *FRA10A* του ανθρώπου. Η *FRA10A* επάγεται απουσία φυλλικού οξέος στο θεραπευτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων λόγω επέκτασης των τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων του τύπου (CGG)<sub>n</sub>, στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του *FRA10AC1*. Ως συνέπεια συμβαίνει υπερμεθυλίωση της περιοχής και μεταγραφική καταστολή του γονιδίου. Η εμφάνιση της *FRA10A* έχει συσχετιστεί με φαινότυπο ήπιας νοητικής και αναπτυξιακής υστέρησης ενώ ομόζυγες μεταλλάξεις στο γονίδιο προκαλούν πιο βαριά συμπτώματα. Η πρωτεΐνη FRA10AC1 είναι μια συντηρημένη πυρηνική πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και έχει ταυτοποιηθεί ως συστατικό του σωματίου συναρμογής (spliceosome). Στο πλαίσιο του δικτύου αλληλεπιδράσεων της εντός του σωματίου συναρμογής, η FRA10AC1 αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταγραφή και τη συναρμογή του πρόδρομου mRNA καθώς και την έξοδο του ώριμου mRNA από τον πυρήνα.

Η παρούσα εργασία εντάσσεται στο ευρύτερο πλαίσιο της λειτουργικής ανάλυσης του γονιδίου *FRA10AC1* και της διαφορικής έκφρασης γονιδίων, των οποίων τα προϊόντα αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη FRA10AC1 εντός του σωματίου συναρμογής, όταν η έκφραση του *FRA10AC1* είναι κατεσταλμένη. Η ανάλυση έγινε σε ετερόζυγα knockout ποντίκια για το *Fra10ac1* σε δείγματα cDNA ιστών εγκεφάλου, καρδιάς, νεφρού και ήπατος και σε αντίστοιχους ιστούς από ποντίκια αγρίου τύπου. Πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου και φάνηκε ότι το γονίδιο *Eef1a1*, το οποίο συμμετέχει στην έξοδο ορισμένων πρωτεϊνών από τον πυρήνα, αυξήθηκε σε επίπεδο μεταγράφου στα ετερόζυγα knockout ποντίκια.

## ABSTRACT

The *FRA10AC1* gene is mapped region at human folate-sensitive chromosomal rare fragile site *FRA10A* which is localized at 10q23.3. *FRA10A* is expressed due to an expansion of a (CGG)<sub>n</sub> repeat located in the 5'UTR region of *FRA10AC1* gene resulting in hypermethylation of the region and gene silencing. The expression of *FRA10A* has been associated with mild mental and developmental retardation, while biallelic *FRA10AC1* homozygous loss of function mutations cause more severe symptoms. The FRA10AC1 protein is a conserved nucleoplasmic protein which is ubiquitously expressed and has been identified as a component of the spliceosome. In the spliceosome, FRA10AC1 interacts with proteins involved in the transcription and splicing of the precursor mRNA as well as the export of the mature mRNA from the nucleus.

This work is in the context of the functional analysis of the gene and the investigation of the differential expression of specific spliceosomal components after silencing of *FRA10AC1* expression.. The analysis was conducted on cDNA samples from brain, heart, kidney and liver tissues derived from *Fra10ac1* heterozygous-knockout mice as well as wild type mice. The differential expression of the target genes was investigated through real-time PCR which showed that the expression of *Eef1a1*, which is involved in the export of specific proteins from the nucleus, was increased in the heterozygous *Fra10ac1*-knockout mice.

# Περιεχόμενα

<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>8</b>
1.1 Εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις.....	8
1.1.1 Σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις .....	9
1.1.2 Συνήθεις εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις .....	9
1.2 Κλινική σημασία εύθραυστων θέσεων .....	10
1.3 Η σπάνια εύθραυστη χρωμοσωμική θέση <i>FRA10A</i> .....	11
1.4 Το γονίδιο <i>FRA10C1</i> του ανθρώπου.....	12
1.4.1 Το <i>FRA10AC1</i> χαρτογραφείται στην θέση <i>FRA10A</i> .....	13
1.4.2 Γονιδιωματική οργάνωση του <i>FRA10AC1</i> .....	13
1.4.3 Πρότυπο έκφρασης του <i>FRA10AC1</i> .....	14
1.5 Πρωτεΐνη <i>FRA10AC1</i> .....	16
1.6 Συμμετοχή της <i>FRA10AC1</i> στην επεξεργασία και ωρίμαση του πρόδρομου mRNA και πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις .....	16
1.7 Αξιοποίηση ποντικών knockout ως μοντέλα ανθρώπινων νοσημάτων .....	19
1.7.1 Το εργαστηριακό ποντίκι <i>Mus musculus</i> στην βιοϊατρική έρευνα του <i>Fra10ac1</i> .....	19
1.7.2 Δημιουργία ποντικών knockout σύμφωνα με το σύστημα της EUCOMM .....	20
1.7.3 Δημιουργία “knockout-first” ποντικών για το <i>Fra10ac1</i> .....	22
1.7.4 Δημιουργία knockout ποντικών για το <i>Fra10ac1</i> .....	23
1.8 Σκοπός της εργασίας .....	26
<b>2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>27</b>
2.1 Σχεδιασμός εκκινητών για τα γονίδια στόχους, <i>Puf60</i> , <i>Pcbp2</i> , <i>Ilf3</i> και <i>Eef1a1</i> , και για τα ιδιοσύστατα ενεργά γονίδια <i>Hprt</i> και <i>Tbr</i> του Ποντικού .....	27
2.2 Ποσοτική PCR (qPCR) .....	30
2.2.1 Αρχή της μεθόδου.....	30
2.2.2 Έλεγχος απόδοσης εκκινητών σε διαδοχικές αραιώσεις του μίγματος (pool) των cDNA .....	32
2.2.3 Έλεγχος έκφρασης μεμονωμένων δειγμάτων cDNA με PCR πραγματικού χρόνου ...	35
2.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης .....	36

<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>39</b>
3.1 Έλεγχος απόδοσης εκκινητών σε διαδοχικές αραιώσεις του μίγματος (pool) των cDNA .	39
3.2 Έλεγχος έκφρασης μεμονωμένων δειγμάτων cDNA με PCR πραγματικού χρόνου .....	42
3.3 Έλεγχος προϊόντων PCR πραγματικού χρόνου με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης .....	49
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>50</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>53</b>

# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις

Η δημιουργία εύθραυστων χρωμοσωματικών θέσεων είναι ένα ιδιαίτερο φαινόμενο που συμβαίνει στα μεταφασικά κύτταρα και σχετίζεται με την εμφάνιση πολλών ανθρώπινων ασθενειών, από νευρολογικές διαταραχές μέχρι ακόμα και καρκίνο. Συγκεκριμένα, ως εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις αναφέρονται τα κενά, οι στενώσεις ή οι θραύσεις που δημιουργούνται στα μεταφασικά χρωμοσώματα, όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται υπό συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας ή παρουσία συγκεκριμένων χημικών παραγόντων. Ύστερα από έκθεση τους σε αυτούς τους αναστολείς, οι περιοχές χρωματίνης αποτυγχάνουν να συσπειρωθούν σωστά δημιουργώντας κενά στα χρωμοσώματα αποτρέποντας, τελικά, την επιμήκυνση της αντιγραφής του DNA. Ο τρόπος δράσης τους έχει να κάνει με την αναστολή της δράσης της πολυμεράσης του DNA ή μείωση των επιπέδων των νουκλεοτιδίων της θυμίνης και της κυτοσίνης (Lukusa & Fryns, 2008). Αυτές οι θέσεις είναι υψηλά συντηρημένες κατά την εξέλιξη των χρωμοσωμάτων και μάλιστα πολλές από αυτές είναι κληρονομήσιμες. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό τους είναι η γενετική αστάθεια. Ο όρος αυτός αναφέρεται στον αυξημένο ρυθμό δημιουργίας μεταλλάξεων στο DNA, με τη μορφή χρωμοσωμικών ανωμαλιών, μετατοπίσεων, μεγάλων ή μικρών ενθέσεων ή ελλείψεων και αλλαγών των βάσεων (Smith et al., 2010). Βέβαια, οι εύθραυστες θέσεις ως χρωμοσωμικές ανωμαλίες θεωρούνται ασυνήθιστες, γιατί, αν και κληρονομήσιμες, δεν εμφανίζονται σε όλα κύτταρα παρά μόνο σε ένα υποσύνολο αυτών και συνήθως μόνο όταν τηρούνται οι συνθήκες που τους επιτρέπουν να εμφανιστούν. Σύμφωνα με το HUGO Gene Nomenclature Committee, (HGNC), κάθε εύθραυστη θέση ονοματίζεται αρχικά με το “FRA”, το οποίο ακολουθείται από τον αριθμό του χρωμοσώματος που βρίσκεται και στη συνέχεια ένα γράμμα που υποδηλώνει τη σειρά της ονοματολογίας της (Feng & Chakraborty, 2017), παραδείγματος χάριν “FRA10A”.

Οι εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν αρχικά ως συνήθεις ή σπάνιες, σύμφωνα με την συχνότητα εμφάνισής τους στον πληθυσμό (Schwartz et al., 2006), και στη συνέχεια ακολουθεί περαιτέρω διαφοροποίηση τους ανάλογα με τον τρόπο που εκδηλώνονται In vitro (Sutherland & Richards, 1995).



### 1.1.1 Σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις

Οι σπάνιες εύθραυστες θέσεις παρατηρούνται σε ένα πολύ μικρό ποσοστό του πληθυσμού, της τάξης του 5%, και διαχωρίζονται σε θέσεις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ και σε θέσεις μη ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ. Οι πρώτες επάγονται από θυμιδυλικό στρες και σχετίζονται με την επέκταση τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων CCG σε περιοχές όπου υπάρχουν νησίδες CpG. Μάλιστα, οι περισσότερες από αυτές τις περιοχές έχει διαπιστωθεί να βρίσκονται εντός των 5' αμετάφραστων περιοχών γονιδίων, επηρεάζοντάς την έκφρασή τους, ενώ παράλληλα ο αριθμός των επαναλήψεων της τριπλέτας διαφέρει αισθητά σε σύγκριση με τα φυσιολογικά αλληλόμορφα (Lukusa & Fryns 2008, Metsu et al. 2014). Μια τέτοια περίπτωση είναι αυτή της εύθραυστης θέσης *FRA10A* η οποία έχει 8-13 αντίγραφα της τριπλέτας CGG και βρίσκεται στο 5' άκρο του γονιδίου *FRA10AC1* που είναι το υπό μελέτη γονίδιο αυτής της εργασίας. Η εμφάνιση αυτών των πολλαπλών αντιγράφων του τύπου (CGG)<sub>n</sub> είναι καθοριστική για την σταθερότητα της διπλής έλικας του DNA, καθώς αυτές οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μπορούν να σχηματίζουν σταθερές δευτεροταγείς δομές, όπως ενδοκλωνικές δομές φουρκέτας και τετραπλή έλικα, οι οποίες, στη συνέχεια, συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και προκαλούν αποδιάταξη των αλυσίδων του DNA και άρα θραύσεις (Lukusa & Fryns, 2008). Από την άλλη οι σπάνιες θέσεις που δεν είναι ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, επάγονται από βρομοδεοξουριδίνη (BrdU) ή δισταμυκίνη A και αποτελούν την πλειοψηφία, αφού από τις 31 που έχουν ανιχνευθεί έως σήμερα οι 24 ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. (Schwartz et al., 2006, Lukusa & Fryns, 2008).

### 1.1.2 Συνήθεις εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις

Αντίθετα με τις σπάνιες, οι συνήθεις εύθραυστες θέσεις είναι εγγενές χαρακτηριστικό των χρωμοσωμάτων όλων των ανθρώπων (Lukusa & Fryns, 2008). Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί περίπου 200 συνήθεις εύθραυστες θέσεις στα χρωμοσώματα του ανθρώπου, εκ των οποίων οι 125 περιέχουν 4921 περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και είναι συγκεντρωμένες σε μια βάση δεδομένων, την HumCFS (Human Chromosomal Fragile Sites), (Kumar et al., 2019). Στην περίπτωση των εύθραυστων θέσεων, οι πιο συνηθισμένοι επαγωγείς είναι 5-αζακυτιδίνη, η δισταμυκίνη-A και η αμφικολίνη (Zlotorynski et al., 2003), οι οποίοι εμποδίζουν την επιμήκυνση του DNA κατά την αντιγραφή αλλά δεν διακόπτουν τον κυτταρικό κύκλο. Επιπλέον, οι θέσεις αυτές βρίσκονται σε κάθε άνθρωπο στη φυσιολογικής δομή του χρωμοσώματος, αλλά το ποσοστό

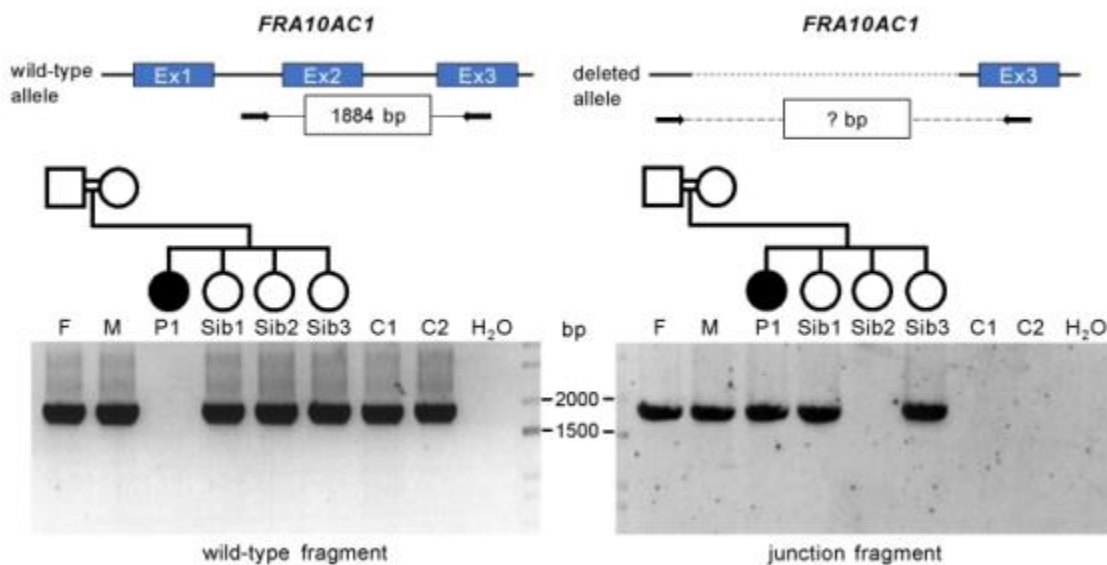
των κυττάρων που τις εκφράζει ως εύθραυστες διαφέρει από άτομο σε άτομο, φτάνοντας σε μερικούς ακόμα και το 30% (Sutherland & Richards, 1995). Σε αντίθεση με τις σπάνιες, στις συχνές εύθραυστες θέσεις η δημιουργία της θραύσης δεν δημιουργείται σε ένα συγκεκριμένο σημείο της αλληλουχίας αλλά καλύπτει μια μεγαλύτερη περιοχή της τάξης των κιλοβάσεων (kb), (Savelyeva et al. 2005). Τέλος, αρκετές κοινές εύθραυστες περιοχές περιέχουν πολύ μεγάλα γονίδια και συχνά μπορεί να είναι εστία δημιουργίας μεταλλάξεων σε διάφορους τύπους καρκίνου (Gao, 2017).

## 1.2 Κλινική σημασία εύθραυστων θέσεων

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η παρουσία συνήθων εύθραυστων θέσεων είναι χαρακτηριστικό των χρωμοσωμάτων όλων των ανθρώπων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την πιθανότητα ύπαρξης ομοζυγωτών υποδεικνύει ότι κατά πάσα πιθανότητα αυτές οι θέσεις δεν έχουν μεγάλη κλινική σημασία. Δεν αναιρείται, βέβαια, ότι όλες οι θέσεις χαρακτηρίζονται από γονιδιωματική αστάθεια η οποία αυξάνεται στα καρκινικά κύτταρα (Tsantoulis et al. 2008). Από την άλλη πλευρά, δύο σπάνιες εύθραυστες θέσεις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, η *FRAXA* και η *FRAXE*, έχουν πράγματι συσχετιστεί με τον παθολογικό φαινότυπο της νοητικής υστέρησης (Bagni et al., 2012, Verkerk et al., 1991). Σε άλλες περιπτώσεις ασθενών έχουν παρατηρηθεί ελλείματα κοντά σε γνωστές σπάνιες εύθραυστες θέσεις αλλά χωρίς να έχει αποδειχθεί άμεση συσχέτιση του ελλείματος με τον παθολογικό φαινότυπο (Penny et al. 1995, Michaelis et al. 1998). Αυτό όμως που τις καθιστά θέσεις μεγαλύτερης κλινικής σημασίας είναι το γεγονός ότι δεν έχουν ταυτοποιηθεί άτομα ομόζυγα για ορισμένες αυτοσωμικές σπάνιες εύθραυστες θέσεις, ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, και άρα ότι κατά πάσα πιθανότητα πρόκειται για μια θνησιγόνα κατάσταση (Sutherland & Baker 1998).

Σε μία πρόσφατη μελέτη του 2021, επιβεβαιώθηκε η κλινική σημασία και άλλης μια σπάνια εύθραυστης θέσης, της *FRA10A*. Η ερευνητική ομάδα ταυτοποίησε 5 άτομα, προερχόμενα από 3 ομομικτικές οικογένειες, τα οποία φέρουν ομόζυγα αλληλόμορφα του παθογόνου μεταλλαγμένου γονιδίου *FRA10AC1* που βρίσκεται εντός της θέσης *FRA10A* (Εικ. 1). Τα άτομα αυτά παρουσίασαν κοινό παθολογικό φαινότυπο (αναπτυξιακή καθυστέρηση, ήπια έως και βαριά νοητική υστέρηση, δυσπλασία του μεσολοβίου, κρανιοπροσωπικοί δυσμορφισμοί) γεγονός που

ενισχύει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τη θέση *FRA10A* και την καθιστά την περαιτέρω μελέτη της απαραίτητη (von Elsner et al., 2021).



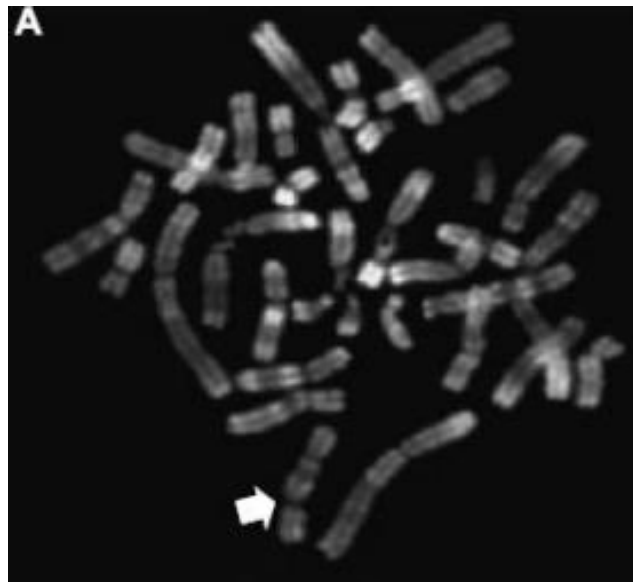
**Εικόνα 1:** Πειραματική απόδειξη της ομοζυγωτίας της μεταλλαγής απώλειας λειτουργίας στο γονίδιο *FRA10AC1*. Για την αξιολόγηση της ομοζυγωτίας σχεδιάστηκαν εκκινητές για την ενίσχυση ενός τμήματος του γονιδίου του αγρίου τύπου (1884bp, σχήμα πάνω αριστερά) και ενός τμήματος αγνώστου μεγέθους εκατέρωθεν της περιοχής που εκλείπει (εξώνια 2 και 3) στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (σχήμα πάνω δεξιά). Στον πρώτο ασθενή δεν ενισχύθηκε το φυσιολογικό αλληλόμορφο, εν αντιθέσει με τους γονείς, τα τρία αδέρφια και τα δύο δείγματα θετικού ελέγχου (εικόνα κάτω αριστερά). Εν συνεχεία στην δεύτερη PCR που πραγματοποιήθηκε, ένα τμήμα μεγέθους ~1900bp ενισχύθηκε στον πρώτο ασθενή γεγονός που επιβεβαιώνει ότι είναι ομόζυγος για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *FRA10C1*. Παρόμοια ενίσχυση ανιχνεύθηκε και στους γονείς και στα αδέρφια 1 και 3 ταυτοποιώντας τους ως ετερόζυγους. C1 και C2: θετικά δείγματα ελέγχου, F: πατέρας ασθενή, M: μητέρα ασθενή, P1: ασθενής, S1-3: υγιή αδέρφια ασθενούς (von Elsner et al., 2021).

### 1.3 Η σπάνια εύθραυστη χρωμοσωμική θέση *FRA10A*

Η θέση *FRA10A* ανήκει στην κατηγορία των σπάνιων εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων, και πιο συγκεκριμένα σε αυτές που είναι ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, δηλαδή εμφανίζονται όταν το τελευταίο απουσιάζει από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Όπως υποδηλώνεται και από το όνομά της βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10, στην περιοχή 23.3 του μεγάλου βραχίονα (10q23.3), και έχει μήκος περίπου 50kb.

Η *FRA10A* ύστερα από διάφορες μελέτες σε ένα ευρύ φάσμα πληθυσμού, περίπου 30.000 ατόμων προερχόμενων από διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες, φάνηκε να είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη σπάνια εύθραυστη θέση με τη συχνότητα να εκτιμάται στο 1/500 (Kähkönen et al. 1989). Βέβαια, ανά μελέτη η εν λόγω συχνότητα βρέθηκε να ποικίλλει από 0% (Takahashi et al. 1988) έως και 2% (Petit et al. 1986) μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμιακών ομάδων, γεγονός που μπορεί να οφείλεται είτε στην διαφορετική προέλευση των ατόμων είτε σε διαφορές μεταξύ των μεθόδων που εφαρμόστηκαν (Sutherland 1982).

Η απεικόνιση της *FRA10A* κυτταρογενετικά μπορεί να επιτευχθεί με τη μέθοδο FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) σε χρωμοσώματα που βρίσκονται στη μετάφαση (Sarafidou et al. 2004), (Εικ. 2). Ακόμα, από παλαιότερες μελέτες διαπιστώθηκε ότι η κληρονόμηση της *FRA10A* είναι μητρικής προέλευσης (Sutherland 1982, Sutherland 1985).



**Εικόνα 2:** Κυτταρογενετική απεικόνιση της σπάνια εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης *FRA10A* με τη μέθοδο FISH. Με βέλος φαίνεται το «κενό» που δημιουργείται στο χρωμόσωμα 10 όταν εκφράζεται η εύθραυστη θέση *FRA10A* (Sarafidou et al. 2004).

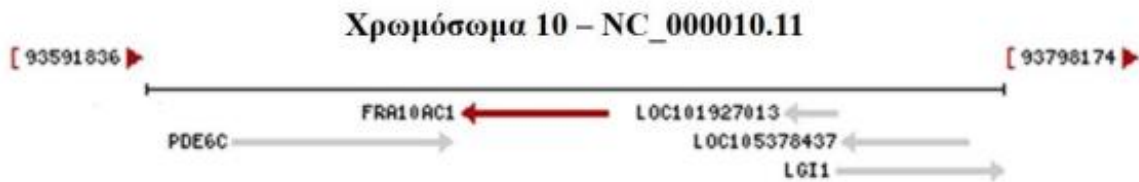
#### **1.4 Το γονίδιο *FRA10C1* του ανθρώπου**

Το γονίδιο *FRA10C1* του ανθρώπου εντοπίζεται μέσα στην εύθραυστη θέση *FRA10A* και έχει συσχετιστεί από διάφορες μελέτες με τον φαινότυπο της νοητικής υστέρησης, νευρολογικών διαταραχών και αναπτυξιακών ανωμαλιών, όπως δυσμορφικά χαρακτηριστικά, μικρό ανάστημα,

υποσπαδία και δυσχέρεια λόγου (Mavrou et al. 1991, Petit et al. 1986, Kähkönen et al. 1989, Sarafidou et al. 2004)

#### 1.4.1 Το *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην θέση *FRA10A*

Ανάλυση της αλληλουχίας σε άτομα φορείς για τη θέση *FRA10A* με τη μέθοδο FISH έδειξε ότι η θέση καλύπτει περίπου ~50kb και χρήση του κλώνου BAC clone RP11-437J2, που περιέχει το γονίδιο *FRA10AC1*, ως ιχνηθέτη έδειξε να ανιχνεύει ολόκληρη την θέση *FRA10A*. Έρευνες σε βάσεις δεδομένων ταυτοποίησαν εντός της *FRA10A* το 3' άκρο του γονιδίου *PDE6C*, που κωδικοποιεί την φωσφοδιεστεράση 6C, και τα δύο πρώτα εξώνια από το 5' άκρο του γονιδίου *LGII*, που σχετίζεται με μια αυτοσωμική επικρατή μορφή επιληψίας (Εικ. 3). Στο κέντρο της περιοχής, ακόμα, βρέθηκαν 8 επαναλήψεις της τριπλέτας CGG, οι οποίες αποτελούν μέρος του νησίδων CpG του γονιδίου *FRA10C1* (Sarafidou et al. 2004).

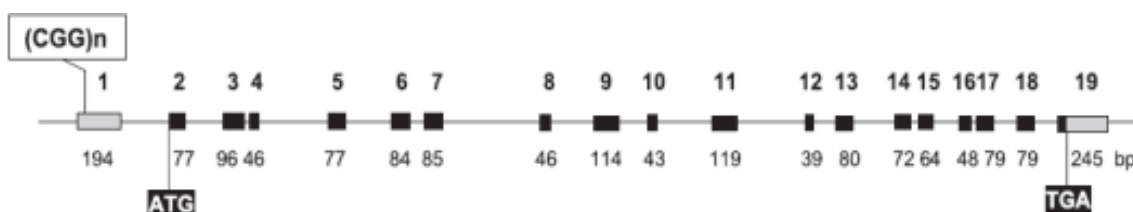


Εικόνα 3: Το γονίδιο *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην εύθραυστη θέση *FRA10A* και μεταγράφεται με κατεύθυνση από το τελομερές προς το κεντρομερές. Με κόκκινο βέλος απεικονίζεται η κατεύθυνση μεταγραφής του *FRA10AC1*, ενώ με γκρι βέλη απεικονίζονται οι κατευθύνσεις μεταγραφής των εκατέρωθεν γονιδίων, *PDE6C* και *LGI1*. Επίσης, στην εικόνα παρουσιάζονται η αρίθμηση και ο κωδικός της νουκλεοτιδικής αλυσίδας καθώς και μη χαρακτηρισμένοι γενετικοί τόποι, LOC (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/118924>).

#### 1.4.2 Γονιδιωματική οργάνωση του *FRA10AC1*

Το *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην περιοχή 10q23.3, έχει μήκος 33Kb, περιλαμβάνει 19 εξώνια και μεταγράφεται με κατεύθυνση από το τελομερές προς το κεντρομερές. Πέντε από τα 19 εξώνια του, τα 13, 14, 15, 16 και 17, υπόκεινται σε εναλλακτική συρραφή οδηγώντας σε 4 εναλλακτικά μετάγραφα, πέρα από το κύριο. Όλα τα όρια των ιντρονίων περιέχουν τις συντηρημένες αλληλουχίες AG/GT στις δυο θέσεις συναρμογής (5' και 3' του ιντρονίου). Επιπλέον, στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή, εκεί όπου εντοπίζεται και το πρώτο εξώνιο, παρατηρούνται οι

επαναλήψεις της τριπλέτας (CGG)<sub>n</sub> οι οποίες αποτελούν μέρος των νησίδων CpG του *FRA10AC1* (Sarafidou et al. 2004). Το συνολικό μήκος του cDNA του γονιδίου *FRA10AC1* είναι 1344bp, ενώ ακόμα το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης και το κωδικόνιο λήξης βρίσκονται στην αρχή του εξωνίου 2 και στο εξώνιο 19 αντίστοιχα (Εικ. 4).



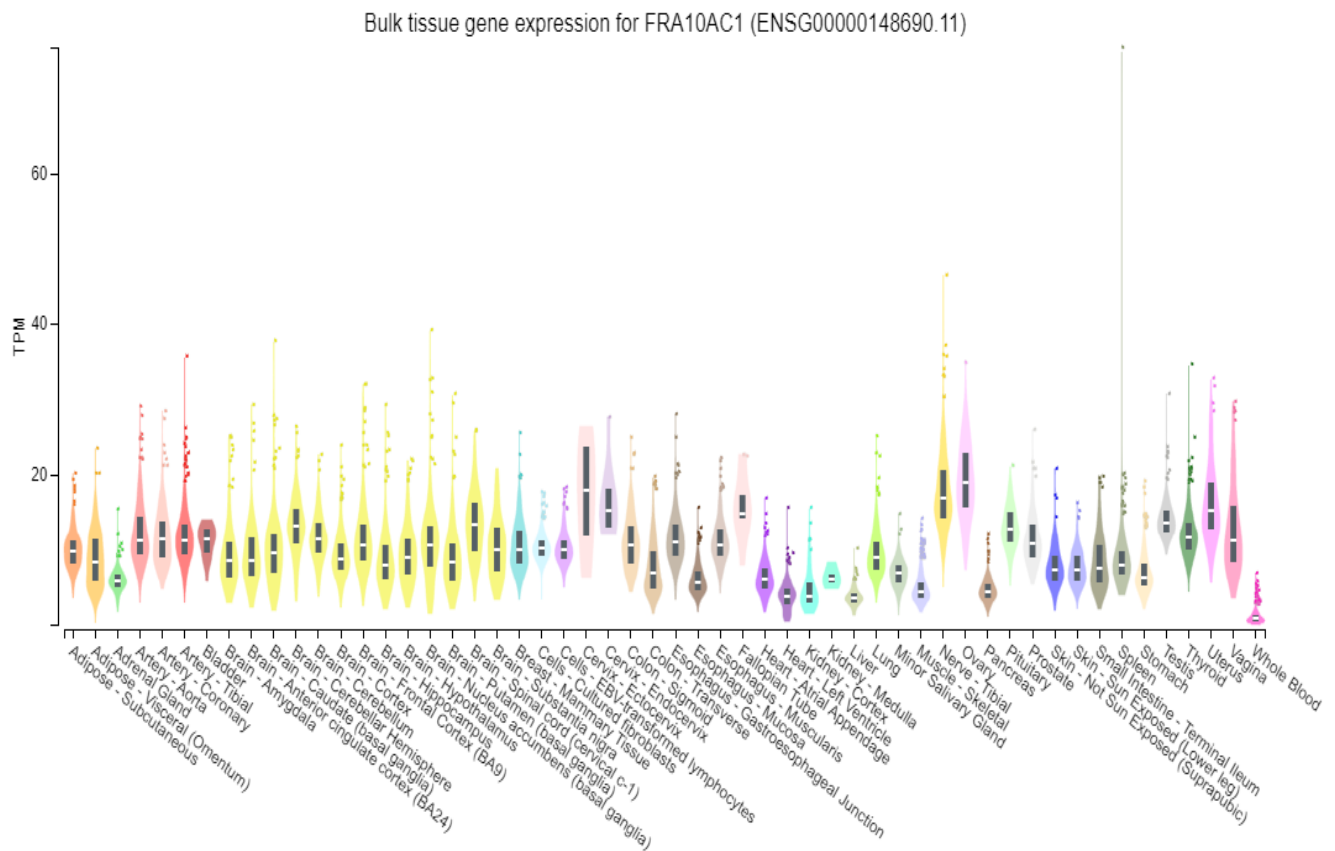
**Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της γονιδιοματικής οργάνωσης του *FRA10AC1*.** Τα εξόνια απεικονίζονται αριθμημένα ως κουτάκια, με μαύρο χρώμα αυτά που συμμετέχουν στην κωδικοποίηση της πρωτεΐνης *FRA10C1* και με γκρι τα μη κωδικά εξόνια. Το μέγεθος κάθε εξωνίου παρουσιάζεται κάτω από κάθε κουτάκι. Τα ιντρόνια παρουσιάζονται ως λεπτές μαύρες γραμμές μεταξύ των εξωνίων. Στην αρχή του 2<sup>ου</sup> εξωνίου εντοπίζεται το κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής (ATG) και στην αρχή του 19<sup>ου</sup> το κωδικόνιο λήξης (TGA). Οι τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις (CGG)<sub>n</sub> εντοπίζονται στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του στο εξώνιο 1 (Sarafidou et al. 2004).

### 1.4.3 Πρότυπο έκφρασης του *FRA10AC1*

Προκειμένου να διερευνηθεί το πρότυπο έκφρασης του *FRA10AC1* πραγματοποιήθηκε ανάλυση Northern blot, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν δύο ειδικοί ανιχνευτές για το *FRA10AC1*. Ο πρώτος αναγνώριζε τις πρώτες 616 βάσεις της 5' κωδικής περιοχής και ο δεύτερος ένα μέρος του εξωνίου 19. Σε όλους τους ιστούς ανιχνεύθηκε ένα μετάγραφο μήκους σχεδόν 1450bp, που ήταν ίσο με το αναμενόμενο μήκος του cDNA του γονιδίου, υποδεικνύοντας έτσι ότι το αυτό εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Μεγαλύτερη έκφραση φάνηκε να έχει σε όργανα με υψηλή μεταβολική δραστηριότητα όπως ο εγκέφαλος, η καρδιά, οι σκελετικοί μύες, τα νεφρά και το συκώτι, ενώ πιο χαμηλή στο παχύ έντερο, στον θύμο αδένα, στη σπλήνα, στο λεπτό έντερο, στον πλακούντα και στους πνεύμονες (Sarafidou et al. 2004). Η μεταγραφική ενεργότητα του *FRA10AC1* επιβεβαιώθηκε και με άλλες τεχνικές, με RT-PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδοποιούνται στα εξόνια 11 και 19 καθώς και με RNA *in situ* υβριδοποίηση χρησιμοποιώντας σημασμένο ανιχνευτή RNA που υβριδοποιείται στα νουκλεοτίδια 250-743 του cDNA του γονιδίου *FRA10AC1*. Σύμφωνα, μάλιστα, με τη βάση δεδομένων Genotype-Tissue Expression (GTEx), που περιλαμβάνει δεδομένα ιστο-ειδικής έκφρασης και ρύθμισης των γονιδίων του

ανθρώπου, έχει βρεθεί το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1* και σε άλλους ιστούς (Εικ. 5). Τα δεδομένα προέρχονται από αλληλούχηση RNA (RNA-Seq), WGS (Whole Genome Sequencing) και WES (Whole Exome Sequencing) σε 54 ιστούς από σχεδόν 1000 άτομα (The GTEx Consortium, 2020).

Τα 5 εναλλακτικά μετάγραφα ταυτοποιήθηκαν με RT-PCR, και η αλληλούχηση τους έδειξε ότι το κύριο μετάγραφο περιλαμβάνει τα εξόνια 1-12 και 18-19. Τα υπόλοιπα τέσσερα εναλλακτικά μετάγραφα αποτελούνται από συνδυασμούς των εξονίων 13-16. Μάλιστα, συγκρίνοντας τις αμινοξικές ακολουθίες όλων των εναλλακτικών μεταγράφων προέκυψε ότι αυτά εμφανίζουν ετερογένεια στο καρβοξυτελικό τους άκρο (Sarafidou et al. 2004).

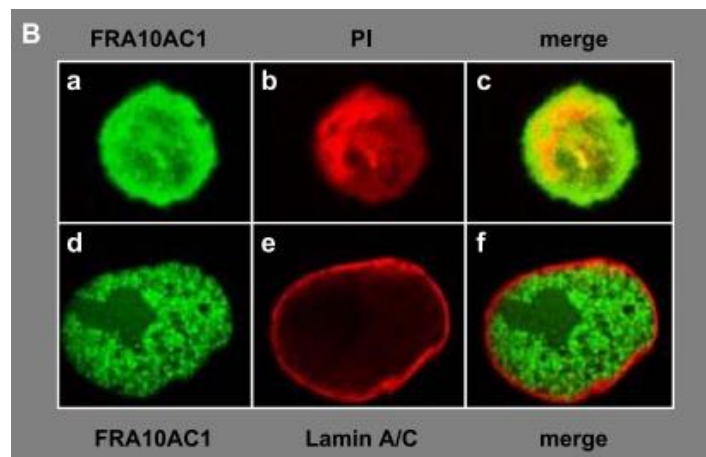


Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του προτύπου έκφρασης της *FRA10AC1*. Στον οριζόντιο άξονα εντοπίζονται οι 54 διαφορετικοί ιστοί και στον κάθετο άξονα η μονάδα μέτρησης της γονιδιακής έκφρασης TPM (Transcript Per Million), (<https://gtexportal.org/home/>).

## 1.5 Πρωτεΐνη FRA10AC1

Η πρωτεΐνη FRA10AC1, το προϊόν της έκφρασης του κύριου μεταγράφου του γονιδίου *FRA10AC1*, αποτελείται από 315 αμινοξέα και είναι εξελικτικά συντηρημένη στους πολυκύτταρους αλλά και μονοκύτταρους ευκαρυώτες.

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *FRA10AC1* έχει πυρηνική τοπολογία και συγκεκριμένα εντοπίζεται στο πυρηνόπλασμα. Ο εντοπισμός της υποκυτταρικά επιβεβαιώθηκε με τη διαμόλυνση κυττάρων της σειράς COS-7 με ανασυνδυασμένα πλασμίδια τα οποία εκφράζουν το γονίδιο *FRA10AC1* καθώς και μία πράσινη φθορίζουσα χρωστική, την GFP. Κατά την παροδική διαμόλυνση ο φθορισμός ανιχνεύθηκε έντονα στον πυρήνα αλλά στο 10% των διαμολυσμένων κυττάρων παρατηρήθηκε ένα μοτίβο με διάφορα σημεία φθορισμού. Με τη συνδυαστική χρήση ανοσολογικής χρώσης και του αντισώματος για την λαμίνη A/C που εντοπίζεται στον πυρηνικό φάκελο βρέθηκε ότι πράγματι η πρωτεΐνη FRA10AC1 εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρηνόπλασμα (Εικ. 6), (Sarafidou et al. 2004).



Εικόνα 6: Υποκυτταρική απεικόνιση της θέσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης FRA10AC1 σε νεφρικά κύτταρα πιθήκου (COS-7). Η FRA10AC1 εντοπίζεται αποκλειστικά στο πυρηνόπλασμα με πράσινο χρώμα, όπως φαίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου, λαμίνη A/C (Sarafidou et al. 2004).

## 1.6 Συμμετοχή της FRA10AC1 στην επεξεργασία και ωρίμαση του πρόδρομου mRNA και πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις

Παρότι η βιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης FRA10AC1 και των ορθόλογών της δεν έχουν αποσαφηνιστεί ακόμα, υπάρχουν κάποιες αξιοσημείωτες πληροφορίες σχετικά με τις πρωτεϊνικές



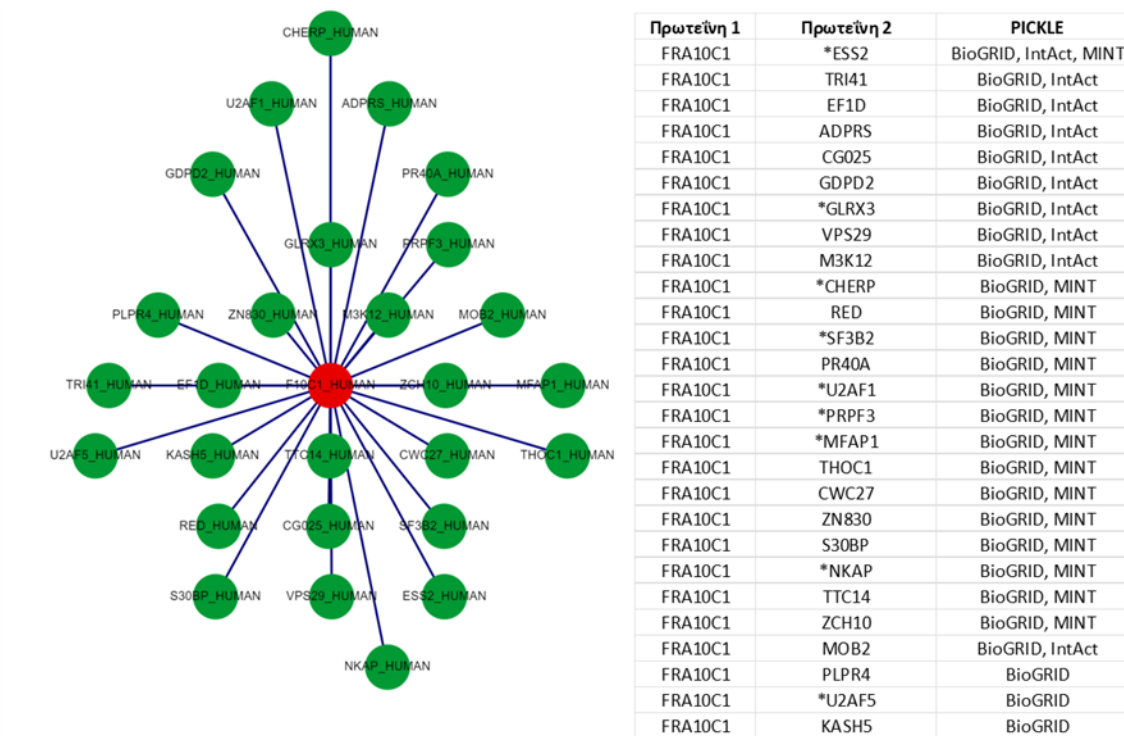
αλληλεπιδράσεις τους. Η FRA10AC1 σύμφωνα με πολλαπλές βιοχημικές μελέτες απομόνωσης του μείζονος σωματίου συναρμογής βρέθηκε να αποτελεί συστατικό των επιμέρους υποσυμπλόκων του, B act, C και P (Bessonov et al. 2008, Bessonov et al. 2010, Pagan et al. 2013), υποδεικνύοντας, έτσι, τον πιθανό λειτουργικό της ρόλο στην επεξεργασία και την ωρίμαση του πρόδρομου mRNA. Τα υποσύμπλοκα B act και C παίζουν καθοριστικό ρόλο στα καταλυτικά βήματα της συναρμογής και το σύμπλοκο P συμβάλλει την ολοκλήρωση της διαδικασίας μέσω της απομάκρυνσης των ιντρονίων. Λαμβάνοντας υπόψιν, ακόμα, το γεγονός ότι η πρωτεΐνη FRA10AC1 εντοπίζεται στο πυρηνόπλασμα και ότι είναι συντηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ο πιθανός λειτουργικός της ρόλος στο σωματίο συρραφής συνάδει με τα υπάρχοντα δεδομένα.

Με το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα, εξετάζονται δυαδικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Ωστόσο, σε πολλές βάσεις δεδομένων αν και υπάρχει μεγάλος όγκος πληροφοριών από πειράματα μεγάλης κλίμακας (high-throughput) που ερευνούν αυτές τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, οι πληροφορίες δεν είναι αξιόπιστες. Μέσα από τα πειράματα αυτά αντιπροσωπεύεται μικρό ποσοστό του συνόλου των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του ανθρώπου και πολλά από τα αποτελέσματα είναι ψευδώς θετικά (Von Mering et al. 2002, Suthram et al. 2006). Ήταν, λοιπόν, απαραίτητο να διενεργηθούν πειράματα μικρότερης κλίμακας, πιο στοχευμένα και συνδυαστικά με άλλες μεθόδους. Έτσι, με το σύστημα υβριδίων του σακχαρομύκητα πραγματοποιήθηκε από μέλη του εργαστηρίου και συν-ανοσοκατακρήμνιση, και διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη FRA10AC1 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες DGCR14 και SF3B2, ενώ παράλληλα χαρακτηρίστηκε ως πρωτεΐνη χαμηλής αφθονίας σε σύγκριση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που συνιστούν το σωματίο (Hegele et al. 2012).

Επιπλέον διερεύνηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης FRA10AC1 μέσω της μετα-βάσης PICKLE (<http://www.pickle.gr/>), η οποία ενσωματώνει το σύνολο πληροφοριών από πέντε βάσεις δεδομένων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του ανθρώπου και του ποντικίου (MINT, DIP, IntAct, BioGRID, HPRD), επιβεβαιώνει την αλληλεπίδρασή της με πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην διαδικασία του μεταβολισμού του mRNA. Η PICKLE κατατάσσει τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις σε τρεις κλάσεις σύμφωνα με τη πειραματική διαδικασία που έχουν ανακαλυφθεί και αποδίδει σε κάθε πρωτεϊνική αλληλεπίδραση μία τιμή που αντιπροσωπεύει τον βαθμό αξιοπιστίας (confidence score). Οι αλληλεπιδράσεις της 1<sup>ης</sup> κατηγορίας έχουν τον

μεγαλύτερο βαθμό αξιοπιστίας, τιμή που έχει οριστεί ως 1, και χαρακτηρίζονται ως «άμεσες», αλληλεπιδρούν δηλαδή χωρίς τη μεσολάβηση μιας «τρίτης» πρωτεΐνης (Dimitrakopoulos et al., 2021). Σύμφωνα, με την PICKLE επιβεβαιώθηκε ότι η FRA10AC1 αλληλεπιδρά άμεσα με τις πρωτεΐνες DGCR14 (κωδικοποιείται από το γονίδιο *ESS2*) και SF3B2, καθώς ακόμα και με άλλες 25 πρωτεΐνες άμεσα (Εικ. 7). Αυτές οι συνολικά 27 πρωτεΐνες μπορούν να ομαδοποιηθούν σύμφωνα με τις κοινές λειτουργικές διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν (Διδακτορική διατριβή Ε. Γαλλιοπούλου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2018).

Ακόμα, σύμφωνα με μία μελέτη του 2018 στο μονοκύτταρο οργανισμό *Chlamydomonas reinhardtii*, η πρωτεΐνη FRA10AC1 φάνηκε να έχει συντηρημένη λειτουργία και να παίζει καθοριστικό ρόλο στην αναγνώριση των θέσεων συναρμογής. Έπειτα από μια μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας στο γονίδιο *FRA10AC1* η σωστή επεξεργασία και συναρμογή του mRNA αποκαταστάθηκε για ένα γονίδιο το οποίο έφερε μεταλλαγμένη την 3' θέση συναρμογής (Dutcher et al. 2018).



**Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 σύμφωνα με τη μετα-βάση PICKLE.** Παρουσιάζονται οι 27 πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν άμεσα με την FRA10AC1. Στον πίνακα δεξιά καταγράφονται συγκεκριμένα οι βάσεις από τις οποίες συγκέντρωσε τις πληροφορίες η PICKLE για κάθε πρωτεΐνη. Με αστερίσκο σημειώνονται οι πρωτεΐνες που συνδέονται με RNA (RNA binding) (<http://www.pickle.gr/>).

Επιπλέον, από συνδυαστικές ομικές αναλύσεις μεγάλης κλίμακας σε επίπεδο μεταγράφων, πρωτεϊνών και μεταβολικών διεργασιών και μονοπατιών σε ένα κυτταρικό μοντέλο *HeLa* με κατεσταλμένη την έκφραση του γονιδίου *FRA10AC1*, μέσω τεχνολογίας παρεμβολής RNA (RNAi, RNA interference), δείχθηκε ότι 39 μόρια, που αποτελούν συστατικά του δικτύου συναρμογής, εμφάνισαν αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης τους. Αυτές ταξινομήθηκαν σε τέσσερις ομάδες σύμφωνα με την λειτουργία τους: α) στην καταλυτική διαδικασία της συναρμογής, β) στην εναλλακτική συναρμογή, γ) στη μεταγραφή και δ) στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (Διδακτορική διατριβή Ε. Γαλλιοπούλου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2018). Ο παθολογικός φαινότυπος της απλοανεπάρκειας του *FRA10AC1*, μπορεί να σχετίζεται με τις αλλαγές στην έκφραση αυτών των 39 μορίων και τις συνέπειες που φέρουν. Το πρότυπο της έκφρασής τους και τα αποτελέσματα σε συνδυασμό με την καταστολή της έκφρασης του *FRA10AC1*, μπορούν να μελετηθούν περαιτέρω σε ποντίκια knockout για το *Fra10ac1*.

## **1.7 Αξιοποίηση ποντικών knockout ως μοντέλα ανθρώπινων νοσημάτων**

### **1.7.1 Το εργαστηριακό ποντίκι *Mus musculus* στην βιοϊατρική έρευνα του *Fra10ac1***

Η επιστημονική κοινότητα προκειμένου να μελετήσει πολλές ανθρώπινες νόσους και να βελτιώσει την υγεία, τη διάρκεια και την ποιότητα ζωής του ανθρώπου στηρίζεται, στη χρήση ζωικών προτύπων. Τα περισσότερα βιοϊατρικά επιτεύγματα σήμερα βασίζονται στην πειραματική βιοϊατρική έρευνα σε ειδικά ζωικά πρότυπα ανθρώπινων νοσημάτων. Έτσι, κατά αντίστοιχο τρόπο, μπορεί να μελετηθεί ο παθολογικός φαινότυπος της απλοανεπάρκειας του *FRA10CA1* στον άνθρωπο με τη χρήση ποντικών knockout για το συγκεκριμένο γονίδιο. Το εργαστηριακό ποντίκι (*Mus musculus*) υπήρξε ανέκαθεν από τον 16ο αιώνα και μετά μια ατέρμονη πηγή γνώσης για την επιστημονική κοινότητα, αφού ως θηλαστικό παρουσιάζει πολλά κοινά στοιχεία με τη φυσιολογία και την παθολογία του ανθρώπου, έχει μικρό μέγεθος, μπορεί να διαχειριστεί εύκολα και οικονομικά στο εργαστήριο, έχει μικρό κύκλο κύησης (21 μέρες), διασταυρώνεται με ευκολία ενώ ακόμα ενηλικιώνεται γρήγορα (5-7 εβδομάδες) και έχει μικρό κύκλο ζωής (12-18 μήνες), (Suckow et al., 2001). Μάλιστα, η δυνατότητα που υπάρχει σήμερα, χάρη στη γενετική μηχανική, για επέμβαση στο γονιδίωμα και εισαγωγή διαγονιδίων ή δημιουργία στοχευμένων γονιδιακών

μεταλλάξεων στα ενδογενή γονίδια, έχει καταστήσει το εργαστηριακό ποντίκι, εκτός των άλλων και, ως το πιο ευρέως διαδεδομένο πειραματικό μοντέλο μέχρι σήμερα.

Η διάγνεση μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους. Η γονιδιακή στόχευση ενδογενούς γενετικού τόπου (gene targeting) είναι μία μέθοδος δημιουργίας διαγονιδιακών ζώων και αποτελεί μια επαναστατική τεχνολογία για την μελέτη της βιολογίας των θηλαστικών και της ανθρώπινης ιατρικής (Carpacchi, 2005). Τα ενδογενή γονίδια ενός οργανισμού μπορούν να τροποποιηθούν με κατάλληλες τεχνικές και οι ειδικοί φορείς μπορεί να είναι είτε πλασμίδια είτε ιοί. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει πάρα πολλά πλεονεκτήματα, καθώς επιτρέπει την στοχευμένη μετάλλαξη ενός συγκεκριμένου γενετικού τόπου στο γονιδίωμα, εκμεταλλεύεται την γνώση που έχει αποκτηθεί για τα γονιδιώματα του ανθρώπου και του ποντικού και ο ερευνητής έχει τον πλήρη έλεγχο για το πως να σχεδιάσει την μετάλλαξη ώστε να μπορέσει να λύσει ένα βιολογικό ερώτημα (Carpacchi, 2001). Για την διερεύνηση, λοιπόν, του παθολογικού φαινοτύπου της απώλειας λειτουργίας του *FRA10A1*, όταν εκφράζεται η εύθραυστη θέση *FRA10A* και των επιμέρους αλλαγών στο πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με αυτό, δημιουργήθηκαν ποντίκια knockout για το *Fra10ac1* σύμφωνα με το σύστημα της EUCOMM.

### **1.7.2 Δημιουργία ποντικών knockout σύμφωνα με το σύστημα της EUCOMM**

Το 2007 εγκαθιδρύθηκε ένα πρόγραμμα, το International Knockout Mouse Consortium (IKMC), με στόχο τη δημιουργία μιας «βιβλιοθήκης» με τα βλαστικά κύτταρα ποντικών του στελέχους C57BL/6 τα οποία έχουν μεταλλαχθεί σε κωδικές περιοχές του γονιδιώματος (Collins et al., 2007). Το συγκεκριμένο στέλεχος επιλέχθηκε γιατί θεωρείται από τα καλύτερα στελέχη αναπαραγωγής. Σε αυτό χαρτογραφήθηκε για πρώτη φορά το γονιδίωμα του ποντικού (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002), ενώ έχει τροποποιηθεί πολλές φορές με την τεχνολογία Cre/loxP και χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα καθώς οι αποκρίσεις του σε διάφορες ασθένειες είναι καλά χαρακτηρισμένες (Coleman et al., 2015). Έτσι με το IKMC, θα ήταν εφικτό να υπάρχει εύκολη πρόσβαση στη μελέτη του γονιδιώματος του ποντικού χάρη στην αποφυγή της χρονοβόρας και ακριβής διαδικασίας δημιουργίας στοχευμένων μεταλλάξεων εκ νέου κάθε φορά. Το European Conditional Mouse Mutagenesis program, EUCOMM, αποτελεί την ευρωπαϊκή συμμετοχή σε αυτό το παγκόσμιο ερευνητικό έργο και έχει αναπτύξει την δικιά του στρατηγική

για τον εύκολο σχεδιασμό ειδικών φορέων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ευρέως (Skarnes et al., 2011).

Σύμφωνα με το σύστημα EUCOMM, κύριος στόχος είναι ο σχεδιασμός μιας γονιδιακής κατασκευής (construct), η οποία μέσω της μεταφοράς της στα βλαστικά κύτταρα-στόχους με ειδικούς φορείς, θα οδηγεί σε κατά συνθήκη knockout αλληλόμορφα για το εκάστοτε επιθυμητό γονίδιο (Skarnes et al., 2011). Προκειμένου, η διαγένεση της να είναι επιτυχής πρέπει η γενετική κατασκευή να επηρεάζει την λειτουργία μόνο του γονιδίου στόχου και το αποτέλεσμα αυτό να είναι με κάποιον τρόπο ανιχνεύσιμο, ενώ ακόμα θα πρέπει να έχει κατασκευαστεί κατάλληλα, ώστε να συνδυάζει τόσο γενετικά όσο και πρωτεϊνικά στοιχεία. Τα στοιχεία αυτά είναι υποκινητές, εξώνια, εσώνια, IRES [Internal Ribosome Entry Site, νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που επιτρέπουν την έναρξη της μετάφρασης ακόμα και από τη μέση του μορίου του mRNA κατά την πρωτεϊνοσύνθεση (Internal Ribosome Entry Site – an Overview | ScienceDirect Topics, n.d.)], βραχίονες ομολογίας, γονίδια επιλογής, γονίδια αναφοράς, ειδικές θέσεις αναδυνδασμού και επαγώγιμα συστήματα (Houdebine, 2002). Για τον σχεδιασμό, λοιπόν, κατάλληλων φορέων, αρχικά πρέπει να εντοπιστεί το εξώνιο το οποίο όταν εξαλείφεται τότε το γονίδιο παύει να είναι λειτουργικό. Συγκεκριμένα, αλλάζει το πλαίσιο ανάγνωσης, και δημιουργείται ένα μετάγραφο με πρόωρη αλληλουχία τερματισμού (Premature-Termination Codon, PTC), η οποία αναγνωρίζεται από έναν μηχανισμό «παρακολούθησης» του mRNA. Ο μηχανισμός αυτός είναι γνωστός και ως μη-νοηματικά διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (Nonsense-Mediated Decay, NMD), και στοχεύει στην μείωση των λαθών της γονιδιακής έκφρασης, αποικοδομώντας τα ελαττωματικά mRNAs, αυτά που έχουν PTC (Kurosaki et al., 2019). Το σύστημα EUCOMM με τη βοήθεια υπολογιστικών εργαλείων μπορεί και ταυτοποιεί το 5' πιο κρίσιμο εξώνιο. Στη συνέχεια, αφού έχει ταυτοποιηθεί, μέσω ενός αλγορίθμου επιλέγονται περιοχές ιντρονίων μεγέθους περίπου 50 βάσεων που μπορούν να συμμετέχουν στον ανασυνδυασμό χωρίς να διακόπτουν την μεταγραφή. Βέβαια, αυτό είναι εφικτό μόνο α) όταν το γονίδιο έχει πάνω από 2 εξώνια, β) στην περίπτωση ισομορφών δεν λείπει από καμία ισομορφή κάποιο εξώνιο και γ) όταν δεν υπάρχουν εναλλακτικές 5' περιοχές. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα υπόλοιπα προγράμματα που συμμετέχουν στο IKMC έχουν αναλάβει να βρουν ανάλογες μεθόδους σχεδιασμού φορέων (Coleman et al., 2015).

Πολύ σημαντικά κατά τον σχεδιασμό φορέων είναι τα γονίδια επιλογής και τα γονίδια αναφοράς. Τα γονίδια επιλογής, όπως είναι το γονίδιο ανθεκτικότητας στην νεομυκίνη (*neo<sup>r</sup>*), τοποθετούνται

μέσα στις γονιαδιακές κατασκευές προκειμένου να είναι δυνατός ο προσδιορισμός στα κύτταρα-στόχους της επιτυχίας της ενσωμάτωσης της κατασκευής στο DNA τους. Τα γονίδια αναφοράς από την άλλη, όπως είναι το γονίδιο της β γαλακτοζιδάσης (*LacZ*) της *E.coli*, χρησιμεύουν στην ανίχνευση των κυττάρων τα οποία εκφράζουν την κατασκευή (Schrott, 1995).

### 1.7.3 Δημιουργία “knockout-first” ποντικών για το *Fra10ac1*

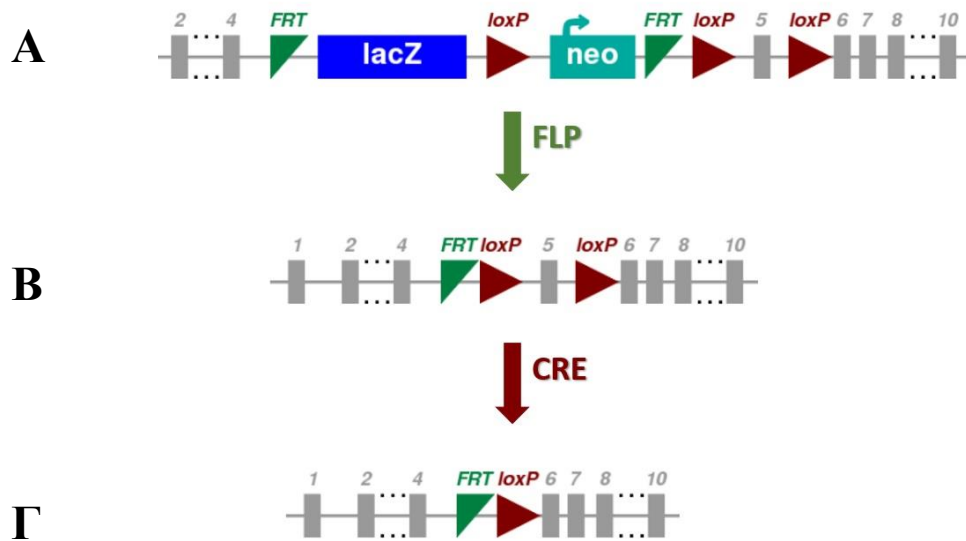
Σύμφωνα με το σύστημα EUCOMM σχεδιάστηκε κατάλληλος πλασμιδιακός φορέας για το γονίδιο που μελετάται στην παρούσα εργασία, το *Fra10ac1*. Το εξώνιο 5 του *Fra10ac1* ταυτοποιήθηκε ως κρίσιμο για την ομαλή έκφραση και λειτουργία του γονιδίου και έτσι επιλέχθηκε για στόχευση με το πλασμίδιο. Στα ιντρόνια γύρω από αυτό τοποθετήθηκαν τα κατάλληλα στοιχεία, ώστε να είναι δυνατή μετέπειτα η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου. Αρχικά, στο 4<sup>ο</sup> ιντρόνιο τοποθετήθηκε το γονίδιο αναφοράς *LacZ*, υπό τον έλεγχο μιας περιοχής IRES, στο 5' άκρο μιας αλληλουχίας loxP. Οι αλληλουχίες loxP έχουν μοναδική δομή με παλινδρομικές επαναλήψεις 13bp εκατέρωθεν της κεντρικής 8bp αλληλουχίας (σύνολο 34bp) και αναγνωρίζονται από ανασυνδυάσεις ειδικής θέσης. Η ρεκομπινάση Cre, συγκεκριμένα, αναγνωρίζει τις θέσεις loxP και καταλύει τον ανασυνδυασμό μεταξύ των δύο περιοχών (Kim et al., 2018). Ακόμα, στο 3' άκρο της ίδιας αλληλουχίας loxP τοποθετήθηκε το γονίδιο επιλογής neo<sup>r</sup> ανοδικά του εξωνίου 5. Στη συνέχεια, μια ακόμα αλληλουχία loxP τοποθετήθηκε στο 5<sup>ο</sup> ιντρόνιο καθοδικά του 5<sup>ου</sup> εξωνίου. Η δεύτερη και η τρίτη αλληλουχία loxP θα χρησιμεύσουν στην συνέχεια για την απομάκρυνση του εξωνίου και κατ' επέκταση στην απενεργοποίηση του γονιδίου. Επιπλέον, για την απομάκρυνση ταυτόχρονα των *lacZ* και neo<sup>r</sup> τοποθετήθηκαν ανοδικά του γονιδίου αναφοράς και καθοδικά του γονιδίου επιλογής (πριν την αλληλουχία loxP) δύο νέες ειδικές θέσεις ανασυνδυασμού, γνωστές ως αλληλουχίες FRT. Αυτές έχουν διαφορετική αλληλουχία από τις loxP, αλλά ίδια δομή και αναγνωρίζονται από την ρεκομπινάση FLP, η οποία αλλάζει θέσεις στις θέσεις FRT (Gates & Cox, 1988). Έτσι, δημιουργήθηκε σε πρώτη φάση ένα αλληλόμορφο το οποίο αναφέρεται ως “tm1a”, “targeted mutation 1a” (Εικ. 8Α). Το tm1a αποτελεί το “knockout-first” αλληλόμορφο στο ποντίκι, καθώς, όπως θα συζητηθεί στη συνέχεια, μπορεί να γίνει κατά συνθήκη knockout όταν αυτό διασταυρωθεί με ποντίκια τα οποία εκφράζουν τις ρεκομπινάσες Cre και FLP, αλλά σε πρώτη φάση μπορεί να θεωρηθεί από μόνο του knockout αφού η παρουσία της κασέτας *lacZ* μπορεί να διακόψει το μάτισμα του *FRA10AC1* (Coleman et al., 2015).

Με την δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που φέρουν το αλληλόμορφο “tm1a” με το σύστημα της EUCOMM μπορούν πλέον να παραχθούν knockout ποντίκια που μπορούν να απαντήσουν σε διάφορα βιολογικά ερωτήματα, όπως για παράδειγμα σε ποιους ιστούς εκφράζεται το *Fra10ac1* ή τι συμβαίνει όταν αυτό καταστέλλεται.

#### **1.7.4 Δημιουργία knockout ποντικών για το *Fra10ac1***

Στην παρούσα εργασία στόχος είναι η μελέτη της διαφορικής έκφρασης γονιδίων σε knockout ποντίκια για το *Fra10ac1*. Πρώτο βήμα για την δημιουργία αυτών ήταν η διασταύρωση διαγονιδιακών ποντικών με το αλληλόμορφο “tm1a” με διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την ρεκομπινάση FLP (FlpE), από τον σακχαρομύκητα *Cerevisiae*, σε όλους τους ιστούς, υπό τον έλεγχο του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της β-ακτίνης (Rodríguez et al., 2000). Το νεογνό ποντίκι έχοντας κληρονομήσει σε διαφορετικά χρωμοσώματα το γονίδιο της ρεκομπινάσης FLP και το αλληλόμορφο “tm1a”, έχει τελικά ένα νέο αλληλόμορφο, το “tm1c”. Το “tm1c” προκύπτει μετά από τον ανασυνδυασμό των περιοχών FRT και άρα την απομάκρυνση της μεταξύ τους περιοχής (Εικ. 8B). Πρακτικά, αυτό το αλληλόμορφο είναι σαν αυτό του αγρίου τύπου με την μόνη διαφορά ότι υπάρχουν οι αλληλουχίες loxP και τα ποντίκια που το φέρουν λειτουργούν σαν γενιά ελέγχου για τα πειράματα που θα ακολουθήσουν, καθώς αυτά θα δώσουν, τελικά, τα knockout ποντίκια (Coleman et al., 2015).

Η διασταύρωση ποντικών που φέρουν το αλληλόμορφο “tm1c” με διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν και εκφράζουν το γονίδιο της ρεκομπινάσης Cre οδηγεί σε απαλοιφή του 5<sup>ο</sup> εξωνίου που είναι κρίσιμο για τη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης *Fra10ac1*. Το αλληλόμορφο “tm1d” είναι το επιθυμητό knockout που θα φέρουν τα νεογνά ποντίκια (Skarnes et al., 2011). Υπολείμματα των αλληλουχιών loxP και FRT που μένουν στο “tm1d” είναι αμελητέα και το αλληλόμορφο θεωρείται καθαρό knockout (Εικ. 8Γ). Προκύπτει, λοιπόν, μια γενιά ποντικών στην οποία η έκφραση του γονιδίου *Fra10ac1* είναι κατεσταλμένη. Προκειμένου να μελετηθούν τα φαινοτυπικά αποτελέσματα της απενεργοποίησης του γονιδίου προτείνεται να έχουν απομακρυνθεί τα γονίδια της *neo<sup>r</sup>*, *Cre* και *Flp* διασταυρώνοντας τα διαγονιδιακά ποντίκια με ποντίκια αγρίου τύπου, καθώς έχουν συσχετιστεί με άλλα φαινοτυπικά αποτελέσματα ανεξάρτητα από την απενεργοποίηση του επιθυμητού γονιδίου (Coleman et al., 2015).



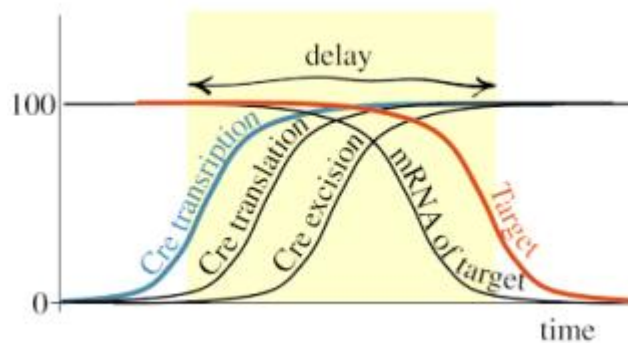
**Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση του “knockout-first” αλληλομόρφου του *Fra10ac1*.** Α) Το “knockout-first” αλληλομόρφο (“tm1a”) περιέχει ανοδικά του κρίσιμου εξωνίου το γονίδιο αναφοράς *LacZ* και το γονίδιο επιλογής *neo<sup>r</sup>*, παρεμποδίζοντας την φυσιολογική έκφραση του *Fra10ac1*. Β) Έκφραση της ρεκομπινάσης FLP, μέσω διαστάυρωσης με διαγονιδιακά ποντίκια που την εκφράζουν, μετατρέπει το “tm1a” σε κατά συνθήκη knockout (“tm1c”), πραγματοποιώντας την απομάκρυνση των περιοχών FLP και άρα των δύο γονιδίων που προηγουμένως εμπόδιζαν την φυσιολογική έκφραση του *Fra10ac1*. Γ) Διασταύρωση με διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την ρεκομπινάση Cre οδηγεί σε κληρονόμηση και έκφραση της Cre. Πραγματοποιείται απομάκρυνση των περιοχών loxP και αφαίρεση του 5<sup>ου</sup> εξωνίου, προκαλώντας μια μετάλλαξη αλλαγής του πλαισίου ανάγνωσης που πυροδοτεί την ανερμηνεύσιμα διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (Nonsense-Mediated Decay) του μεταλλαγμένου μεταγράφου και συνεπώς καταστολή της έκφρασής του. Γκρι πλαίσια: εξώνια *Fra10ac1*, πράσινα τρίγωνα: περιοχές FRT, κόκκινα τρίγωνα: περιοχές loxP, μπλε πλαίσιο: γονίδιο *lacZ*, γαλάζιο πλαίσιο: γονίδιο *neo<sup>r</sup>*. Τροποποιημένη εικόνα από [www.mousephenotype.org](http://www.mousephenotype.org) (The International Mouse Phenotyping Consortium et al., 2016).

Ωστόσο, κατά τη διαδικασία δημιουργίας των διαγονιδιακών knockout ποντικών ένα πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί είναι η δημιουργία χμαιρικών ποντικών. Ο χμαιρισμός είναι μία ειδική κατηγορία μωσαϊκισμού, κατά την οποία στον οργανισμό υπάρχουν πάνω από δύο διακριτοί τύποι κυττάρων σε γενετικό επίπεδο, τα οποία προκύπτουν στα αρχικά στάδια της γονιμοποίησης (Spinner & Conlin, 2014). Το πρόβλημα έγκειται στο γεγονός ότι στο στάδιο δημιουργίας των ποντικών “tm1d” η απομάκρυνση των περιοχών loxP από την ρεκομπινάση Cre δεν συμβαίνει την ίδια χρονική στιγμή σε όλα τα κύτταρα. Αντιθέτως, το ποσοστό των κυττάρων που υπόκεινται σε ανασυνδυασμό σε συνάρτηση με το χρόνο ακολουθεί μια σιγμοειδή καμπύλη (Εικ. 9). Υπάρχει μια χρονική καθυστέρηση από την στιγμή που αρχίζει η έκφραση της Cre έως



και την απομάκρυνση των περιοχών loxP. Πρώτον, ο ανασυνδυασμός των περιοχών loxP είναι μια χρονοβόρα διαδικασία και δεύτερον, η συγκέντρωση της Cre αυξάνεται σταδιακά από τη στιγμή που θα μεταγραφεί το γονίδιο έως και τη στιγμή που θα σταθεροποιηθούν τα επίπεδα της ώστε να πραγματοποιεί τον ανασυνδυασμό (Nagy, 1999).

Κατά την διασταύρωση των ποντικών που φέρουν τα αλληλόμορφα “tm1a” και “tm1c” με διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν, σε διαφορετικά χρωμοσώματα, τα αλληλόμορφα της ρεκομπινάσης Cre και Flp αντίστοιχα, η παραγωγή και η δράση των τελευταίων για την απομάκρυνση των περιοχών ανασυνδυασμού μπορεί να συμβεί στο ζυγωτό, ή αργότερα κατά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Στην πρώτη περίπτωση, όλα τα κύτταρα του νέου οργανισμού θα φέρουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, συμπεριλαμβανομένων των γαμετών, ενώ στη δεύτερη περίπτωση κάποια κύτταρα θα φέρουν το αρχικό αλληλόμορφο του *Fra10ac1*, “tm1a” ή “tm1c”, και κάποια άλλα, στα οποία έχει δράσει η ρεκομπινάση, το μεταλλαγμένο, “tm1c” ή “tm1d” αντίστοιχα. Η χμιαρική έκφραση των γονιδίων των ρεκομπινάσων μπορεί να επηρεάσει την ερμηνεία του πειράματος (Sauer, 1998) κι για αυτό πρέπει να γίνεται γονοτύπηση των ποντικών ώστε να ελέγχεται αν έχουν τα γονίδια των ρεκομπινάσων ή όχι.



**Εικόνα 9:** Υποθετική αναπαράσταση της χρονικής καθυστέρησης της δράσης της ρεκομπινάσης Cre. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ενζύμου της Cre, τόσο αυξάνεται η πιθανότητα διενέργειας του ανασυνδυασμού μεταξύ των περιοχών loxP. Η συνολική καθυστέρηση μεταξύ της έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου της Cre και τελικά της δράσης της επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες και μπορεί να διαρκέσει από ώρες μέχρι μέρες, ποντικών (Nagy, 1999).

## 1.8 Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εντάσσεται σε μια ευρύτερη ερευνητική προσπάθεια για την λειτουργική ανάλυση του γονιδίου *FRA10AC1* και την μελέτη των αλλαγών που επιφέρει η τροποποιημένη έκφρασή του στις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά εντός του σωματίου συναρμογής. Αναλυτικότερα, στοχεύει στον έλεγχο της διαφορικής έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, για τα οποία υπάρχουν προηγούμενες ενδείξεις ότι αλλάζει η έκφραση τους όταν καταστέλλεται το γονίδιο, σε δείγματα διαφόρων ιστών ετερόζυγων knockout ποντικών για το *Fra10ac1*, καθώς και σε ποντίκια αγρίου τύπου (wild type).

## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Σχεδιασμός εκκινητών για τα γονίδια στόχους, *Puf60*, *Pcbp2*, *Ilf3* και *Eef1a1*, και για τα ιδιοσυστάτα ενεργά γονίδια *Hprt* και *Tbp* του Ποντικού

Προκειμένου να γίνει εφικτή η μελέτη των γονιδίων στόχων, μέσω της ενίσχυσή τους με PCR πραγματικού χρόνου, έγινε σχεδιασμός εκκινητών τόσο για αυτά όσο και για τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς. Αρχικά, για κάθε γονίδιο επιλέχθηκε η αλληλουχία του mRNA του από τη βάση δεδομένων NCBI (“Database Resources of the National Center for Biotechnology Information,”), και στην περίπτωση που κάποιο από αυτά είχε πολλαπλά εναλλακτικά μετάγραφα επιλέχθηκαν όλα τα mRNAs τους ενώ οι κοινές περιοχές τους εντοπίστηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα Clustal Omega (Madeira et al., 2019). Η αλληλουχία mRNA ή οι κοινές αλληλουχίες μεταξύ των εναλλακτικών μεταγράφων αντίστοιχα, ελέγχθηκαν για πιθανούς εκκινητές μέσω του εργαλείου της NCBI, Primer-Blast (Ye et al., 2012). Το εργαλείο αυτό επιτρέπει την ανάλυση της υπό μελέτη αλληλουχίας και την ανίχνευση πιθανών ζευγών εκκινητών, παρέχοντας πληροφορίες για το μέγεθος του προϊόντος που θα παραχθεί, το μέγεθος και την αλληλουχία των εκκινητών, το ποσοστό GC% τους, την Tm τους, την θέση τους πάνω στην αλληλουχία αλλά και την συμπληρωματικότητα τόσο με τον εαυτό τους όσο και με το 3’ άκρο τους. Εξετάζεται επίσης το ενδεχόμενο συμπληρωματικότητάς τους με αλληλουχίες άλλες εκτός του στόχου. Κάποιες βασικές παράμετροι που ορίστηκαν ήταν α) το μέγεθος του προϊόντος να είναι 100-200bp, β) η μέγιστη διαφορά στις θερμοκρασίες Tm να είναι 3, γ) η θερμοκρασία Tm να κυμαίνεται από 58.0°C έως 62.0°C ενώ στην αξιολόγηση των εκκινητών επιλέχθηκαν οι εκκινητές των οποίων οι τιμές της συμπληρωματικότητας δεν ξεπερνούσαν κατά πολύ το 0, κυρίως για το 3’ άκρο. Η αξιολόγηση των εκκινητών έγινε επιπλέον και μέσω του προγράμματος Beacon Designer (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) για το κατά πόσο σχηματίζουν διμερή μεταξύ τους ή με τον εαυτό τους, ή ακόμα και φουρκέτες. Πάλι, οι τιμές έπρεπε να είναι όσο πιο κοντά στο 0 γινόταν προκειμένου οι εκκινητές να γίνουν δεκτοί. Τα αποτελέσματα για κάθε ζεύγος εκκινητών παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 1.

### **Poly-U binding splicing Factor 60 (*Puf60*)**

Το γονίδιο *Puf60* παράγει συνολικά 7 εναλλακτικά μετάγραφα στα οποία βρέθηκαν 2 κοινές περιοχές. Μόνο η μία, ωστόσο, έδωσε σχετικά καλούς εκκινητές. Η επιλογή αυτή των εκκινητών αναγκαστικά δεν έγινε με πολύ αυστηρά κριτήρια. Οι τιμές στο Beacon Designer έδειξαν -2,4 για Cross Dimer και για τους δύο εκκινητές, -2,4 για Self-Dimer και Hairpin για τον εμπρόσθιο και -0,6 και 0 για τον ανάστροφο εκκινητή αντίστοιχα.

### **Poly(rC) Binding BrPotein 2 (*Pcbp2*)**

Το γονίδιο *Pcbp2* παράγει 5 εναλλακτικά μετάγραφα. Επιλέχθηκε ένα ζεύγος εκκινητών που ήταν πιο κοντά, αλλά όχι ιδανικά πάλι, στα κριτήρια που ορίστηκαν στην αρχή. Στο Beacon Designer οι τιμές για Cross Dimer ήταν -0,9 και για τους δυο εκκινητές, για Self-Dimer -2.0 και -2.3 και Hairpin -1.0 και 0 για τον εμπρόσθιο και ανάστροφο εκκινητή αντίστοιχα.

### **Interleukin Enhancer binding Factor 3 (*Ilf3*)**

Το γονίδιο *Ilf3* παράγει 6 εναλλακτικά μετάγραφα και αυτά παρουσιάζουν μια εκτεταμένη κοινή περιοχή. Το ζεύγος εκκινητών που επιλέχθηκε έδειξε στο Beacon Designer τιμές -1,1 και για τους δυο εκκινητές για Cross Dimer, -1,1 και -3,5 για Self-Dimer και -1,1 και -3,5 για Hairpin, αντίστοιχα για τον εμπρόσθιο και ανάστροφο εκκινητή.

### **Eukaryotic translation Elongation Factor 1 Alpha 1 (*Eef1a1*)**

Το γονίδιο *Eef1a1* παράγει ένα μετάγραφο, και έτσι Primer Blast πραγματοποιήθηκε για όλη την αλληλουχία του mRNA του γονιδίου. Οι τιμές στο Beacon Designer για το ζεύγος εκκινητών που επιλέχθηκε ήταν -1,9 και για τους δυο εκκινητές για το Cross Dimer. Ο εμπρόσθιος εμφάνισε τιμές -1,9 και για Self-Dimer και για Hairpin ενώ ο ανάστροφος -2.0 και 0 αντίστοιχα.

**Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά εκκινητών για τα γονίδια στόχους**

Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με FRA10AC1 μέσα στο σωματίο συναρμογής	Εμπρόσθιος Εκκινητής 5'-3' <b>Tm</b>	Ανάστροφος Εκκινητής 5'-3' <b>Tm</b>	Μήκος προϊόντος	Αλληλουχία αναφοράς στο NCBI
<b><i>Puf60</i> – Poly-U binding Splicing Factor 60</b>	GCATAAGGGCTT TGCCTTCG  59,90	GGGCTTGTCCAA TGTTGCTG  60,04	131	<a href="#">NM_001164600.1</a> <a href="#">NM_001356629.1</a> <a href="#">NM_001378984.1</a> <a href="#">NM_001378985.1</a> <a href="#">NM_001378986.1</a> <a href="#">NM_028364.2</a> <a href="#">NM_133691.5</a>
<b><i>Pcbp2</i>- Poly(Rc) Binding Protein 2</b>	AGAGAGTACAGG GGCTCAGG  60,03	TCCAACATGACC ACGCAGAT  59,68	132	<a href="#">NM_001103165.1</a> <a href="#">NM_001103166.1</a> <a href="#">NM_001174073.1</a> <a href="#">NM_001374771.1</a> <a href="#">NM_011042.2</a>
<b><i>Ilf3</i>- Interleukin Enhancer Binding Factor 3</b>	CCCCTTGTCTTG ACCATCC  60,03	TTCTGCCTGTCCA GAACGTC  59,97	117	<a href="#">NM_001042707.2</a> <a href="#">NM_001042708.2</a> <a href="#">NM_001042709.2</a> <a href="#">NM_001277321.1</a> <a href="#">NM_001277322.1</a> <a href="#">NM_010561.3</a>
<b><i>Eef1a1</i>- Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha 1</b>	CATCGTCGTAAT CGGACACG  58,89	CCCAGGCGTACT TGAAGGAG  60,11	149	<a href="#">NM_010106.2</a>

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον σχεδιασμό εκκινητών για τα ιδιοσυστατικά γονίδια, των οποίων η έκφραση είναι σταθερή και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γονίδια ελέγχου στην PCR πραγματικού χρόνου. Η επιλογή των γονιδίων έγινε βάσει βιβλιογραφικών αναφορών στην αποτελεσματικότητά τους ως γονίδια αναφοράς σε πειράματα qPCR.

### **Hypoxanthine guanine Phosphoribosyl Transferase (*Hprt*)**

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *Hprt* είναι μία τρανσφεράση η οποία καταλύει την μετατροπή της υποξανθίνης σε μονοφωσφορική ινοσίνη και της γουανίνης σε μονοφωσφορική γουανοσίνη και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση πουρινών μέσω του μονοπατιού

περίσωσης (The UniProt Consortium, 2021). Όλες οι τιμές στο Beacon Designer ήταν 0 εκτός από το Cross Dimer που ήταν -0,3 και για τους δύο εκκινητές.

### TATA box binding protein (*Tbp*)

Το γονίδιο *Tbp* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία προσδέεται στη ρυθμιστική περιοχή TATA box που υπάρχει πριν από την αρχή πολλών γονιδίων. Όταν η πρωτεΐνη προσδεθεί σε αυτή την περιοχή, προσελκύει τα υπόλοιπα απαραίτητα ένζυμα για την αναγνώριση του γονιδίου που θα μεταγραφεί (The UniProt Consortium, 2021). Μελέτες έχουν δείξει ότι το *Tbp* είναι από τα πιο σταθερά γονίδια για πειράματα RT-qPCR (Ho & Patrizi, 2021). Οι τιμές στο Beacon Designer ήταν όλες 0, εκτός από το Self-Dimer και Hairpin για τον ανάστροφο εκκινητή που ήταν -0,6.

**Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά εκκινητών για τα ιδιοσυστατικά γονίδια.**

Ιδιοσυστατικά Γονίδια	Εμπρόσθιος Εκκινητής 5'-3'  Tm	Ανάστροφος Εκκινητής 5'-3'  Tm	Μήκος προϊόντος	Αλληλουχία αναφοράς στο NCBI
<i>Hprt</i> - Hypoxanthine guanine Phosphoribosyl Transferase	GTGGGGCTTAC CTCACTGCT  59,96	TAATCACGACG CTGGGACTG  59,83	125	<a href="#">NM_013556.2</a>
<i>Tbp</i> - TATA Box Binding Protein	GGTATCTGCTG GCGGTTTGG  61.38	GTGGAAGGCT GTTGTTCTGGT  60,75	196	<a href="#">NM_013684.3</a>

## 2.2 Ποσοτική PCR (qPCR)

### 2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Μια από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις στο πεδίο της Μοριακής Βιολογίας υπήρξε η ανάπτυξη της τεχνολογίας της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction), το 1983 από τον Mullis, ο οποίος 10 χρόνια αργότερα απέσπασε βραβείο Νόμπελ για αυτή του την ανακάλυψη. Έκτοτε, η PCR έχει βρει αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε διαγνωστικό όσο και

σε ερευνητικό επίπεδο. Η τεχνική της βασίζεται στην ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων μέσα από μια σειρά επαναλαμβανόμενων κύκλων αντιδράσεων όπου κάθε κύκλος απαιτεί ορισμένες βασικές προϋποθέσεις για να πραγματοποιηθεί, τελικά, ο εμπλουτισμός της αλληλουχίας-στόχου.

Μια παραλλαγή της PCR, η οποία παρακολουθεί σε πραγματικό χρόνο την ποσότητα του DNA που ενισχύεται, είναι η ποσοτική (q) PCR (quantitative PCR) ή PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). Η qPCR, όπως και η συμβατική, για να λειτουργήσει χρειάζεται ένα ρυθμιστικό διάλυμα, νουκλεοτίδια, ζεύγος εκκινητών, υπόστρωμα DNA και DNA πολυμέραση. Αυτό που την ξεχωρίζει, όμως, από τη συμβατική είναι η χρήση μίας φθορίζουσας χρωστικής, συνήθως της SYBRGREEN, η οποία στηρίζεται στην επιλεκτική πρόσδεσή της στο δίκλωνο DNA έναντι του μονόκλωνου και παράγει φθορισμό (φως) σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (522nm). Η πρόσδεση της χρωστικής γίνεται με τρόπο ανάλογο της ποσότητας του δίκλωνου DNA στο δείγμα, ώστε να είναι εφικτή η άμεση παρακολούθηση της ποσότητας του DNA κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης του πολλαπλασιασμού.

Συγκεκριμένα, η χρωστική αυτή όταν υπάρχει στο διάλυμα δίκλωνο DNA, συνδέεται με αυτό και αλλάζει διαμόρφωση, εκπέμποντας φθορισμό μέχρι και 200 φορές περισσότερο σε σχέση με όταν δεν είναι δεσμευμένη και βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα. Με το πέρασ, λοιπόν, κάθε κύκλου στην PCR, παράγεται διπλάσια ποσότητα DNA και θεωρητικά ο φθορισμός θα έπρεπε να είναι εμφανής από την αρχή. Ωστόσο, η ανίχνευση του φθορισμού δεν συμβαίνει τότε, καθώς η ποσότητα του δίκλωνου DNA είναι ακόμα πολύ μικρή. Όταν η αντίδραση περάσει στην εκθετική φάση και το δείγμα έχει ενισχυθεί σημαντικά (περάσει το κατώφλι φθορισμού, Cycle Threshold ή Ct), τότε αρχίζει κι η εκπομπή του φθορισμού που καταγράφεται από την συσκευή. Η εκθετική φάση ακολουθείται από την επιπέδωση της καμπύλης εξαιτίας της κατανάλωσης των αντιδραστηρίων, της φθοράς του ενζύμου της πολυμεράσης λόγω των πολύ υψηλών θερμοκρασιών και της μείωσης του φθορισμού της χρωστικής ουσίας εξαιτίας της παραγωγής πολλών αντιγράφων DNA που έχουν παραχθεί. Βέβαια, η SYBERGREEN μπορεί να προσδεθεί μη ειδικά σε DNAs διαφορετικού μεγέθους και να δώσει φθορισμό, στην περίπτωση που οι εκκινητές προσδεθούν σε άλλη αλληλουχία που δεν είναι στόχος ή να σχηματίσουν μεταξύ τους διμερή. Αυτό ελέγχεται με την ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης, η οποία δείχνει τη διαφορετική θερμοκρασία στην οποία αποδιάσσονται τα δίκλιωνα μόρια DNA. Συγκεκριμένα, στηρίζεται στο γεγονός ότι τα προϊόντα διαφορετικού μεγέθους αποδιάσσονται σε διαφορετικές

θερμοκρασίες και έτσι αν υπάρχουν παραπροϊόντα θα προκύψουν καμπύλες σε διαφορετικές θερμοκρασίες από την καμπύλη του κύριου προϊόντος.

Το κατώφλι φθορισμού (Ct) ορίζεται αυτόματα από το λογισμικό του θερμοκυκλοποιητή qPCR ή από τον χειριστή. Κάθε δείγμα χρειάζεται διαφορετικό αριθμό κύκλων για να ξεπεράσει το κατώφλι και ο τελευταίος εξαρτάται από την συγκέντρωση DNA στο δείγμα αυτό. Συνεπώς, μικρότερες συγκεντρώσεις DNA στο αρχικό δείγμα απαιτούν περισσότερους κύκλους αντιγραφής για να ξεπεράσουν το κατώφλι σε σχέση με άλλα δείγματα με μεγαλύτερη συγκέντρωση.

### **2.2.2 Έλεγχος απόδοσης εκκινητών σε διαδοχικές αραιώσεις του μίγματος (pool) των cDNA**

Η πειραματική εκτίμηση της απόδοσης της αντίδρασης (efficiency) είναι αναγκαία καθώς η αντίδραση στην πραγματικότητα τείνει προς την εκθετική φάση αλλά μια σειρά παραγόντων δεν επιτρέπουν την εκθετική ενίσχυση του αρχικού δείγματος. Οι παράγοντες αυτοί αφορούν α) την ποιότητα των εκκινητών, β) την αρχική ποσότητα του δείγματος, γ) το είδος του αρχικού δείγματος και δ) το μήκος του επιθυμητού προϊόντος προς ενίσχυση. Ο προσδιορισμός της αποτελεσματικότητας στηρίζεται στην χρήση αραιώσεων του πρότυπου δείγματος DNA.

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 23 δείγματα τα οποία προήλθαν από 6 ποντίκια, εκ των οποίων δύο ήταν (wt1, wt2) ήταν αγρίου τύπου (wild type) και τα υπόλοιπα 4 (Δ80, Δ81, 103 και 104) ήταν «ετερόζυγα knockout» καθώς βρέθηκαν θετικά με γονοτύπηση για τα αλληλόμορφα “tm1d” και “wild type” και αρνητικά για “tm1c”. Επιπλέον, στα ετερόζυγα knockout Δ80, Δ81 και 104 εντοπίστηκε το γονίδιο της Cre. Τα ποντίκια προήλθαν από το Εργαστήριο του Δρ. Α. Κλινάκη στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Εφαρμογών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), όπου διατηρούνται και διασταυρώνονται. Από κάθε ποντικό απομονώθηκαν 4 δείγματα από τους ιστούς της καρδιάς, του εγκεφάλου, του ήπατος και του νεφρού, με εξαίρεση το ποντίκι Δ80 για το οποίο δεν υπάρχει διαθέσιμο δείγμα από την καρδιά (Πιν. 3). Στα πλαίσια της μεταπτυχιακής εργασίας ενός μέλους του εργαστηρίου (Μεταπτυχιακή Εργασία, Π. Μπάμπου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2022), πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από τους ιστούς, επώαση με DNase, υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA και αντίστροφη μεταγραφή για την παραγωγή cDNA. Τα 23 δείγματα cDNA αραιώθηκαν σε 7 διαδοχικές αραιώσεις 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/50, 1/100 και 1/200, για γίνει έλεγχος της απόδοσης των εκκινητών που



σχεδιάστηκαν. Επιπλέον, ο έλεγχος των εκκινητών πραγματοποιείται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτών προκειμένου να βρεθεί σε ποια συγκέντρωση η αντίδραση της qPCR έχει την καλύτερη απόδοση.

**Πίνακας 3: Το σύνολο των 23 δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.** Wt: Ποντίκι αγρίου τύπου, Het: ετερόζυγο knockout Ποντίκι για το *Fra10ac1*.

<b>Καρδιά</b>	<b>Εγκέφαλος</b>	<b>Ήπαρ</b>	<b>Νεφρό</b>
Wt1(h)	Wt1(b)	Wt1(l)	Wt1(k)
Wt2(h)	Wt2(b)	Wt2(l)	Wt2(k)
-	HetΔ80(b)	HetΔ80(l)	HetΔ80(k)
HetΔ81(h)	HetΔ81(b)	HetΔ81(l)	HetΔ81(k)
Het103(h)	Het103(b)	Het103(l)	Het103(k)
Het104(h)	Het104(b)	Het104(l)	Het104(k)

## Υλικά

- 7 διαδοχικές αραιώσεις pool cDNA, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/50, 1/100 και 1/200
- Εκκινητές γονιδίων *Puf60*, *Pcbp2*, *Ilf3*, *Eef1a1*, *Hprt*, και *Tbp* σε συγκέντρωση 50pmol/μl
- H<sub>2</sub>O
- Χρωστική SYBR®Green  
Φυγόκεντρος
- Μηχάνημα qPCR Rotor-Gene Q
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής και λογισμικό Q-Rex

## Μέθοδος

Δεδομένου ότι υπήρχαν 7 αραιώσεις και 1 αρνητικό δείγμα ελέγχου, κάθε δείγμα παρασκευάστηκε για αντίδραση επί δύο φορές για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των αντιδράσεων. Συνεπώς, η ποσότητα του master mix παρασκευάστηκε για 2 x 8 (δείγματα) + 1 (επιπλέον για να αποφευχθούν πιθανά λάθη που έχουν συμβεί στο πιπετάρισμα), δηλαδή 17 δείγματα.

- Σε ένα eppendorf των 0,5ml προστίθενται στα συστατικά του master mix σύμφωνα με τον Πίνακα 5, ώστε τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20 μl.

**Πίνακας 4: Ποσότητες συστατικών του master mix για qPCR με συγκέντρωση εκκινητών 150nM, 200nM, 250nM και 300nM.**

<b>Συστατικά του master mix</b>	<b>150nM</b>	<b>200nM</b>	<b>250nM</b>	<b>300nM</b>
<b>Εκκινητής F</b>	0,3 x 17 (5,1μl)	0,4 x 17	0,5 x 17 (8,5μl)	0,6 x 17 (10,2μl)
<b>Εκκινητής R</b>	0,3 x 17 (5,1μl)	0,4 x 17	0,5 x 17 (8,5μl)	0,6 x 17 (10,2μl)
<b>SYBR®Green</b>	10 x 17 (170μl)	10 x 17	10 x 17 (170μl)	10 x 17 (170μl)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	7,4 x 17 (125,8μl)	7,2 x 17	7 x 17 (119μl)	6,8 x 17 (115,6μl)

- Ανάδευση του master mix με την πιπέτα
- Προσθήκη σε eppendorfs των 0,2ml από 2μl από κάθε αραιώση ενώ για τα αρνητικά δείγματα ελέγχου έγινε προσθήκη 2μl H<sub>2</sub>O.
- Προσθήκη στα ίδια eppendorfs 18μl από το master mix και ανάδευση με την πιπέτα
- Φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα στις 10000g, ώστε να απομακρυνθούν πιθανές φυσαλίδες ή δείγμα στα τοιχώματα
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στην ειδική κεφαλή του μηχανήματος Rotor-Gene Q της QIAGEN και πραγματοποίηση της αντίδρασης σύμφωνα με το λογισμικό Q-Rex
- Αποθήκευση και ανάλυση αποτελεσμάτων

Όλα τα βήματα πραγματοποιήθηκαν σε πάγο για την προστασία των δειγμάτων. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για δοκιμή όλων των συγκεντρώσεων εκκινητών που αναφέρθηκαν σύμφωνα με διαφορετικές αναλογίες συστατικών στο master mix σύμφωνα με τον Πίνακα 4. Συγκεκριμένα, στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις εκκινητών που ελέγχθηκαν για κάθε γονίδιο.

**Πίνακας 5:** Παρουσίαση των ιδιοσυστατικών γονιδίων και των γονιδίων ενδιαφέροντος καθώς και των συγκεντρώσεων των εκκινητών που ελέγχθηκαν για τον έλεγχο της αποδοτικότητας τους PCR πραγματικού χρόνου.

Ιδιοσυστατικά γονίδια	150nM	200nM	250nM	300nM	Εμπρόσθιος-300nM Ανάστροφος 250nM	Εμπρόσθιος-250nM Ανάστροφος 300nM
<i>Tbp</i>	-	✓	-	-	-	-
<i>Hprt</i>	-	✓	-	-	-	-
<b>Γονίδια στόχοι</b>						
<i>Puf60</i>	✓	✓	✓	✓	-	-
<i>Pcbp2</i>	-	✓	✓	✓	✓	✓
<i>If3</i>	-	✓	-	-	-	-
<i>Eef1a1</i>	-	✓	-	-	-	-

### 2.2.3 Έλεγχος έκφρασης μεμονωμένων δειγμάτων cDNA με PCR πραγματικού χρόνου

Ο έλεγχος της διαφορικής συγκέντρωσης των γονιδίων στόχων πραγματοποιείται με την αντίδραση της ποσοτικής PCR στα 23 δείγματα μεμονωμένα και έπεται το έλεγχου της αποτελεσματικότητας των εκκινητών. Όλα τα δείγματα αραιώθηκαν σε συγκέντρωση 1/40 καθώς σε αυτή τη συγκέντρωση όλα τα γονίδια, τόσο τα ιδιοσυστατικά όσο και τα γονίδια στόχοι, είχαν τιμές Ct μεταξύ 20 και 30.

Η ποσότητα του master mix παρασκευάστηκε για 50 αντιδράσεις, 48 (24 x 2 δείγματα) και 2 (επιπλέον σε περίπτωση που υπήρχαν απώλειες κατά το πιπετάρισμα).

#### Υλικά:

- Δείγματα cDNA
- Εκκινητές (εμπρόσθιος και ανάστροφος) *Tbp* και *Eef1a1*
- SYBR®Green
- H<sub>2</sub>O
- Φυγόκεντρος
- Μηχάνημα qPCR Rotor-Gene Q
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής και λογισμικό Q-Rex

## Μέθοδος

Παρασκευάστηκε κατάλληλη ποσότητα master mix, ώστε για κάθε δείγμα η αντίδραση να πραγματοποιηθεί δύο φορές. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα ίδια με αυτά της ενότητας 2.2.2 με άλλες ποσοτικές αναλογίες σύμφωνα με τον Πίνακα 6. Αυτή τη φορά, όμως, για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν eppendorfs των 0,2μl και η ανάδευση πραγματοποιήθηκε χειροκίνητα καθώς δεν ήταν δυνατή η φυγοκέντρηση για αυτό το μέγεθος eppendorfs. Τα eppendorfs τοποθετήθηκαν στην μεγάλη κεφαλή του μηχανήματος Rotor Gene Q και το πρόγραμμα Q-Rex ενεργοποιήθηκε.

**Πίνακας 6: Ποσότητες συστατικών του master mix για qPCR με τελική συγκέντρωση εκκινητών 200nM.**

Συστατικά	Συνολικός όγκος στο master mix (μl)
Εκκινητής F	0,4 x 50 (20μl)
Εκκινητής R	0,4 x 50 (20μl)
SYBR®Green	10 x 50 (500μl)
H <sub>2</sub> O	7,2 x 50 (360μl)

## 2.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

### Αρχή της μεθόδου

Η ανάλυση και οπτικοποίηση των προϊόντων ενίσχυσης από την PCR ή την ποσοτική PCR μπορεί να πραγματοποιηθεί με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Εφευρέτης της ηλεκτροφόρησης υπήρξε ο Tiselius, ο οποίος μελετώντας την κίνηση πρωτεϊνών σε ηλεκτρικό πεδίο το 1930, κατάφερε να κερδίσει βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1948.

Η αγαρόζη αποτελεί αυτό το στερεό πορώδες υπόστρωμα μέσα στο οποίο γίνεται ο διαχωρισμός μετά από εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης στα άκρα. Φυσιολογικά, η αγαρόζη εντοπίζεται στο άγαρ, το οποίο απομονώνεται από φύκη (red algae) και είναι ένα γραμμικό πολυμερές. Η ίδια πολυμερίζεται και δημιουργεί πόρους μεταξύ των μορίων της. Κατά την ηλεκτροφόρηση τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα διαχωρίζονται μέσα από τους πόρους του πηκτώματος

βάσει μεγέθους και μετακινούνται από τον αρνητικά φορτισμένο πόλο (-κάθοδο) προς το θετικά φορτισμένο πόλο (+άνοδο). Το ουδέτερο φορτίο της αγαρόζης, μάλιστα, την καθιστά μια πολύ καλή επιλογή ως υλικό καθώς δεν αλληλεπιδρά με τα υπό μελέτη μακρομόρια όσο αυτά μετακινούνται μέσα από αυτή. Παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα στο πήκτωμα αγαρόζης είναι:

1. **Το μέγεθος των νουκλεϊκών οξέων** – όσο μικρότερο μέγεθος έχει, τόσο περισσότερο μετατοπίζεται στο πήκτωμα το βιομόριο
2. **Το δυναμικό** –όσο υψηλότερο δυναμικό εφαρμόζεται, τόσο επιταχύνονται τα μόρια DNA (υπερβολικά υψηλή τάση, ωστόσο, μπορεί να οδηγήσει σε λιώσιμο του πηκτώματος)
3. **Η συγκέντρωση της αγαρόζης** –όσο πιο μεγάλη είναι η περιεκτικότητα σε αγαρόζη, τόσο πιο εύκολα διαχωρίζονται μόρια μικρότερου μήκους (2-4% για μικρά μόρια DNA , 0.7-1% για μεγάλα μόρια DNA)
4. **Η διαμόρφωση του μορίου** – το υπερελικωμένο DNA (πλασμιδιακό) κινείται με μεγαλύτερη ταχύτητα από το γραμμικό.

Η παρατήρηση των ζωνών που δημιουργούν τελικά τα νουκλεϊκά οξέα μπορεί να γίνει ορατή με την προσθήκη ειδικών φθορίζουσων ουσιών κατά την δημιουργία του πηκτώματος.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση για τον έλεγχο του προϊόντος που παράχθηκε στην PCR πραγματικού χρόνου για τα δύο γονίδια που ελέγχθηκαν, *Tbp* και *Eef1a1*.

#### **Υλικά**

- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X
- Αγαρόζη σε σκόνη
- Ladder (100bp PLUS BLUE DNA ladder – purple coding Cat. –No: 304-105, 50μg / 500μl της εταιρίας GeneON)
- Χρωστική φόρτωσης (Loading Buffer) 6x περιέχει 10 mM Tris HCl (pH 7,6), 0.03% ξυλένιο, 60% γλυκερόλη, 60 mM EDTA
- Φθορίζουσα χρωστική Xpert Green DNA Stain της εταιρίας Grisp
- Δείγματα qPCR για τα γονίδια *Tbp* και *Eef1a1*, Δ81 (L), Wt1 (K), Δ80 (B), Wt2 (H)

## Μέθοδος

Παρασκευάστηκαν 50ml πηκτώματος αγαρόζης 2,5% καθώς το αναμενόμενο μέγεθος προϊόντων είναι μικρό και συγκεκριμένα 196bp και 149bp για το *Tbp* και *Eef1a1* αντίστοιχα.

- Ζυγίστηκε 1,25gr αγαρόζης σε σκόνη και προστέθηκε σε κωνική φιάλη
- Στην ίδια φιάλη προστέθηκαν 50ml TBE
- Διαλυτοποιήθηκε η αγαρόζη στο TBE με θέρμανση στο φούρνο μικροκυμάτων και αναδεύτηκε ανά τακτά διαστήματα
- Το διάλυμα ψύχθηκε σε τρεχούμενο νερό έως θερμοκρασία ~55°C ώστε να μην πήξει η αγαρόζη
- Προστέθηκαν 4μl φθορίζουσας χρωστικής Xpert Green DNA Stain και αναδεύτηκαν
- Το διάλυμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε καλούπι στο οποίο είχε προσαρμοστεί ειδικό «χτενάκι» για την δημιουργία των θέσεων φόρτωσης του DNA
- Αναμονή μέχρι την σταθεροποίηση του πηκτώματος
- Αφαίρεση της «χτένας» από το καλούπι

## Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

- Τοποθέτηση πηκτώματος με τα πηγάδια προς τον θετικό πόλο
- Έλεγχος αν το TBE καλύπτει πλήρως το πήκτωμα
- Ανάμειξη 3μl χρωστικής φόρτωσης (loading buffer) με 10μl δείγματος και φόρτωση στο πήκτωμα
- Φόρτωση 4μl ladder
- Τοποθέτηση των ηλεκτροδίων της συσκευής στο τροφοδοτικό και ρύθμιση
- Ορισμός της τάσης ηλεκτροφόρησης σε 150 Volt

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής εργασίας επιχειρήθηκε διερεύνηση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων *Eef1a1*, *Puf60*, *Pcbp2* και *Ilf3*, τα οποία έχει δειχθεί από προηγούμενη μελέτη ότι υπο- ή υπερεκφράζονται μετά την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1* σε κύτταρα HeLa και ότι κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την *FRA10AC1* μέσω μιας μόνο άλλης πρωτεΐνης (Διδακτορική διατριβή Ε. Γαλλιοπούλου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2018), μέσω PCR πραγματικού χρόνου.

Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε αρχικά σχεδιασμό εκκινητών για τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις πρωτεΐνες καθώς και για τα υποψήφια γονίδια αναφοράς *Hprt* και *Tbp*. (βλ. Υλικά & Μέθοδοι, ενότητα 2.1). Ακολούθησε έλεγχος της απόδοσής και της έκφρασής τους με PCR πραγματικού χρόνου και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της qPCR για την επιβεβαίωση της ενίσχυσης του σωστού προϊόντος. Τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου αναλύθηκαν και κανονικοποιήθηκαν βάσει των γονιδίων αναφοράς μέσω του υπολογιστικού εργαλείου Microsoft excel 365.

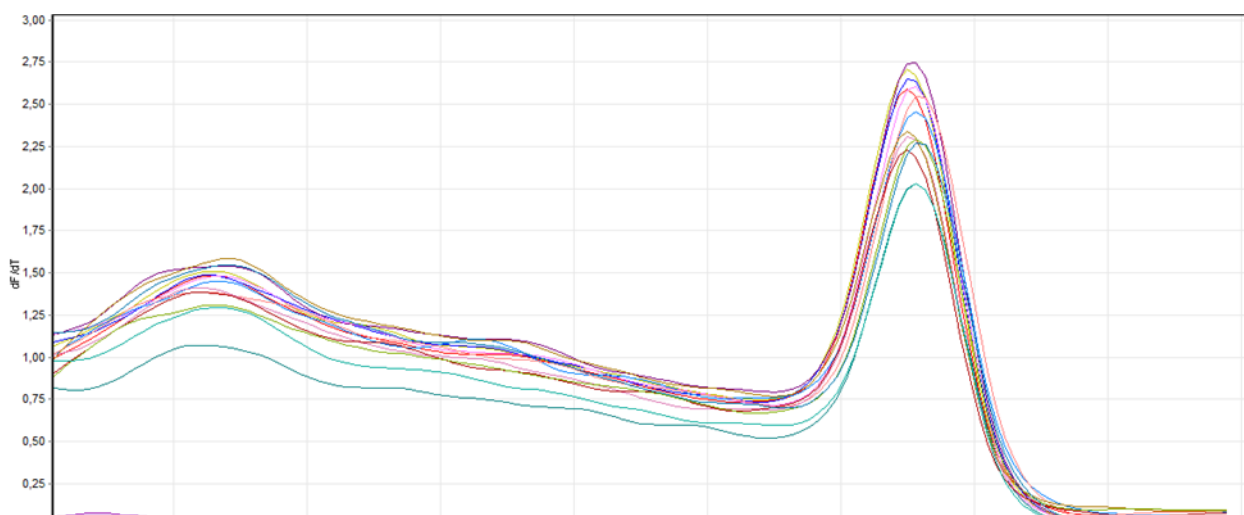
Τα 23 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα προήλθαν από ιστούς της καρδιάς, του εγκεφάλου, του ήπατος και του νεφρού από ποντίκια αγρίου τύπου (wild type), ομόζυγα και ετερόζυγα ποντίκια knockout για το *Fra10ac1*. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα (βλ. Υλικά & Μέθοδοι, ενότητα 2.2.2) στα δείγματα είχε πραγματοποιηθεί απομόνωση του RNA, επώαση με DNase, υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA και αντίστροφη μεταγραφή για την παραγωγή cDNA (Μεταπτυχιακή Εργασία, Π. Μπάμπου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2022).

#### 3.1 Έλεγχος απόδοσης εκκινητών σε διαδοχικές αραιώσεις του μίγματος (pool) των cDNA

Προκειμένου, να ελεγχθεί η απόδοση των εκκινητών που σχεδιάστηκαν δημιουργήθηκε ένα μίγμα (pool) από τις 7 διαδοχικές αραιώσεις, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/50, 1/100 και 1/200, των επιμέρους δειγμάτων cDNA και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου. Τα ζεύγη εκκινητών για τα ιδιοσυστατικά γονίδια *Hprt* και *Tbp*, δοκιμάστηκαν σε συγκέντρωση εκκινητών

200nM, ενώ τα ζεύγη εκκινητών για τα 4 γονίδια στόχους, *Eef1a1*, *Puf60*, *Pcbp2* και *Ilf3*, δοκιμάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η δοκιμή των διαφορετικών συγκεντρώσεων αποσκοπεί στην εύρεση της ιδανικής συγκέντρωσης των εκκινητών όπου η PCR πραγματικού χρόνου θα έχει την μέγιστη απόδοση.

Πριν τον υπολογισμό της απόδοσης (efficiency) της αντίδρασης απαραίτητος είναι ο έλεγχος ενίσχυσης του επιθυμητού προϊόντος και του σχηματισμού διμερών των εκκινητών τα οποία μπορεί να επηρεάζουν την απόδοση. Έτσι, μελετήθηκαν οι καμπύλες τήξης (melting curve) των διαδοχικών αραιώσεων των cDNAs για κάθε γονίδιο. Παρουσία δύο ή περισσότερων καμπυλών σε διαφορετικές θερμοκρασίες υποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει μόνο ένα κύριο προϊόν αλλά και παραπροϊόντα ή διμερή. Συγκεκριμένα, στα διαγράμματα αποδιάταξης στον άξονα x αντιστοιχούν οι τιμές θερμοκρασίας που αποδιάτασσονται τα προϊόντα της qPCR ενώ στον άξονα y αντιστοιχούν οι τιμές που δείχνουν το σήμα της χρωστικής SYBR®Green. Πράγματι, για όλα τα γονίδια σε κάθε αντίδραση που πραγματοποιήθηκε, εκτός του *Hprt*, φάνηκε να μην υπάρχει παραπροϊόν ούτε σχηματισμός διμερών εκκινητών. Στο διάγραμμα αποδιάταξης του γονιδίου *Hprt* φαίνεται μια πολύ μικρή καμπύλη, διαφορετική από αυτή του κύριου προϊόντος που αντιστοιχεί στο ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται σε επιμόλυνση κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας της αντίδρασης και όχι στη δημιουργία διμερών εκκινητών καθώς το άλλο δείγμα αρνητικού ελέγχου δεν έδειξε καμία καμπύλη, και σε επανάληψη της αντίδρασης δεν υπήρξε ενίσχυση του αρνητικού δείγματος. Ενδεικτικά στην Εικόνα 10 φαίνεται η καμπύλη τήξης του *Tbp*.



**Εικόνα 10:** Οι καμπύλες τήξης των διαδοχικών αραιώσεων από το pool για το γονίδιο *Tbp* με συγκέντρωση εκκινητών 200nM.



Στη συνέχεια ακολούθησε ο υπολογισμός της απόδοσης των εκκινητών των διαφορετικών γονιδίων. Για να γίνει αυτό, μετά την αντίδραση, αποδόθηκαν οι τιμές Ct σε όλα τα δείγματα, και τις επαναλήψεις (duplicates) αυτών, από τις καμπύλες ενίσχυσης κάθε γονιδίου. Οι τιμές Ct αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κύκλων που χρειάζεται κάθε δείγμα ώστε να ξεπεράσει το κατώφλι φθορισμού που έχει οριστεί για το πείραμα. Δεδομένου ότι η συγκεκριμένη εργασία στηρίζεται σε παλαιότερα δείγματα (Μεταπτυχιακή Εργασία, Π. Μπάμπου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2022), για να είναι δυνατή η σύγκριση και ο σχολιασμός των αποτελεσμάτων για όλα τα γονίδια το κατώφλι φθορισμού ορίστηκε κοινά σε 0,3 και αντιστοιχεί σε κάποιο σημείο της εκθετικής φάσης των καμπυλών ενίσχυσης.

Προκειμένου να υπολογιστεί η απόδοση καθενός από τα 7 ζεύγη εκκινητών που ελέγχθηκαν δημιουργήθηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα του Excel οι πρότυπες καμπύλες μέσω δημιουργίας των διαγραμμάτων διασποράς. Στα διαγράμματα διασποράς στον άξονα y τοποθετήθηκαν οι τιμές Ct που λήφθηκαν για κάθε δείγμα και αντίγραφό του, ενώ στον άξονα x οι τιμές των λογαρίθμων των διαδοχικών αραιώσεων του συλλεκτικού μίγματος (pool) των cDNAs. Έτσι, προέκυψε για κάθε ζεύγος εκκινητών, που δοκιμάστηκε σε διαφορετική συγκέντρωση μια πρότυπη καμπύλη. Η εμφάνιση της εξίσωσης της ευθείας του γραφήματος ( $y=ax + \beta$ ) και της τιμής  $R^2$ , έδωσε πληροφορίες για την κλίση της ευθείας ( $\alpha$ ) και την αξιοπιστία των duplicates αντίστοιχα. Όσο πιο κοντά στο 1 είναι το  $R^2$  τόσο πιο καλά είναι τα duplicates και για να γίνουν δεκτές οι τιμές της απόδοσης το  $R^2$  έπρεπε να είναι εντός των τιμών 0,95-1,05.

Η απόδοση (E) της αντίδρασης της qPCR υπολογίζεται από τον τύπο **Efficiency =  $10^{(-1/slope)} - 1$** , όπου slope είναι η κλίση της ευθείας ( $\alpha$ ). Οι τιμές E οι οποίες έγιναν αποδεκτές για την εξέλιξη του πειράματος ήταν μεταξύ 95%-105%, και η αντίστοιχη συγκέντρωση των εκκινητών που έδωσε αυτή την απόδοση θεωρήθηκε η βέλτιστη. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται οι τιμές E που έδωσε κάθε γονίδιο σε κάθε δοκιμή που πραγματοποιήθηκε. Τα ιδιοσυστατικά γονίδια των οποίων η αποτελεσματικότητα βρέθηκε εντός του αποδεκτού εύρους ήταν τα *Tbp* και *Hprt* (95,07% και 104,59% αντίστοιχα). Όσον αφορά τα γονίδια στόχους μόνο το γονίδιο *Eef1a1* βρέθηκε να έχει αποδεκτή τιμή αποτελεσματικότητας (96,88%). Τα γονίδια αναφοράς *Tbp* και *Hprt* και το γονίδιο στόχος *Eef1a1* επιλέχθηκαν για την εξέλιξη του πειράματος και τον έλεγχο της έκφρασης των μεμονωμένων δειγμάτων cDNA με PCR πραγματικού χρόνου.

**Πίνακας 7: Τιμές απόδοσης (E) κάθε γονιδίου με βάση συγκέντρωση εκκινητών που δοκιμάστηκε.**  
Με αστερίσκο σημειώνονται οι τιμές που βρίσκονται εντός του αποδεκτού εύρους.

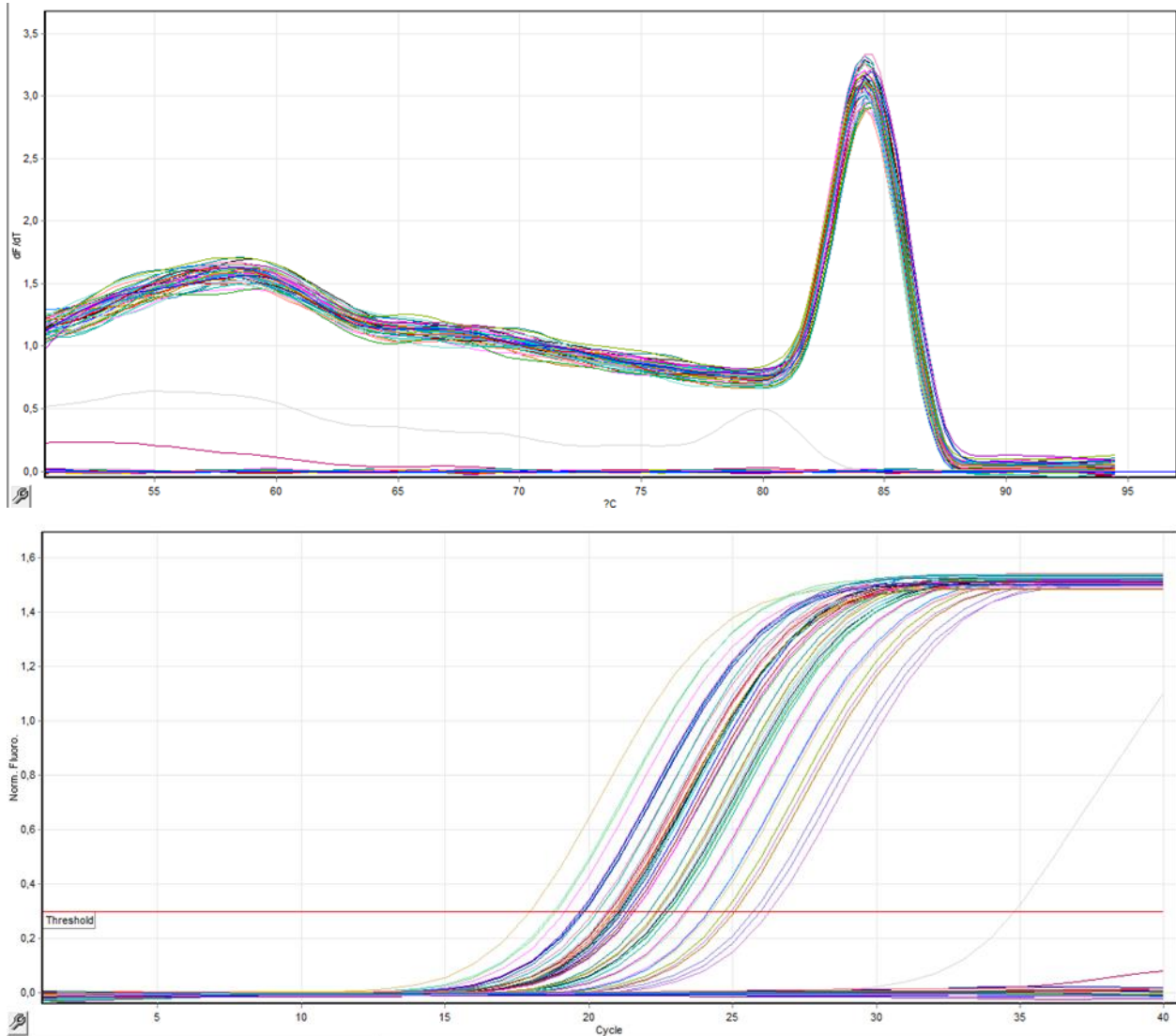
Ιδιοσύστατα ενεργά γονίδια	150nM	200nM	250nM	300nM	Εμπρόσθιος-300nM Ανάστροφος 250nM	Εμπρόσθιος-250nM Ανάστροφος 300nM
<i>Tbp</i>	-	*95,07%	-	-	-	-
<i>Hprt</i>	-	*104,59%	-	-	-	-
<b>Γονίδια στόχοι</b>						
<i>Puf60</i>	83,09%	91,79%	82,15%	70,77%	-	-
<i>Pcbp2</i>	-	82,32%	90,59%	87,16%	84,51%	87,76%
<i>If3</i>	-	82,98%	-	-	-	-
<i>Eef1a1</i>	-	*96,88%	-	-	-	-

### 3.2 Έλεγχος έκφρασης μεμονωμένων δειγμάτων cDNA με PCR πραγματικού χρόνου

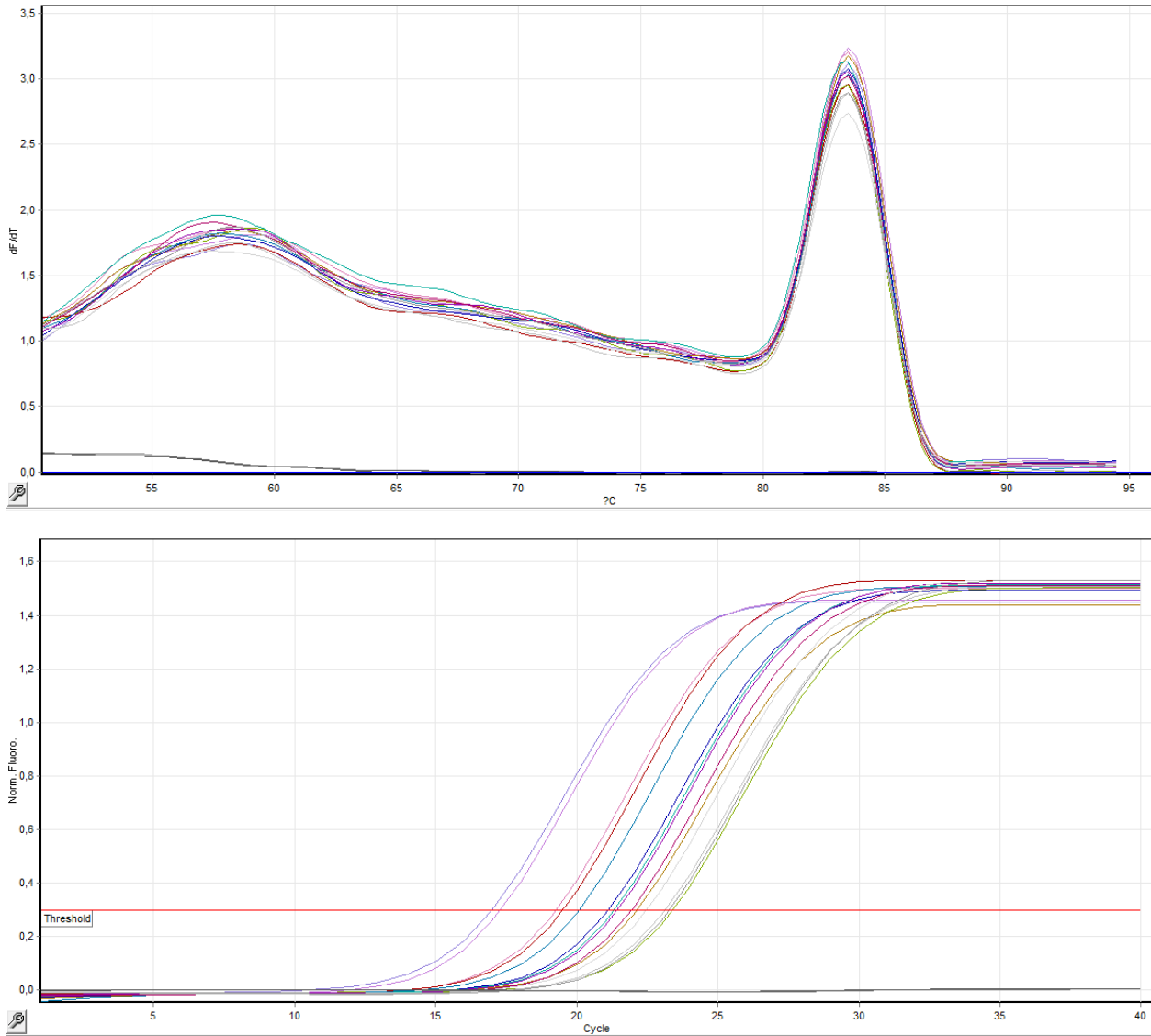
Αρχικά, προκειμένου να γίνει έλεγχος της έκφρασης στα μεμονωμένα δείγματα cDNA έγινε αραίωση των 23 δειγμάτων σε συγκέντρωση 1/40. Η αραίωση αυτή επιλέχθηκε επειδή σε αυτή την αραίωση όλα τα γονίδια έχουν τιμές Ct μεταξύ 20 και 30 και παράλληλα είναι συμβατή με άλλα αποτελέσματα (Μεταπτυχιακή Εργασία, Π. Μπάμπου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2022). Τα 23 μεμονωμένα δείγματα και το δείγμα αρνητικού ελέγχου ελέγχθηκαν εις διπλούν με PCR πραγματικού χρόνου για τα γονίδια *Tbp* και *Hprt* και *Eef1a*, με τη συγκέντρωση εκκινητών που προσδιορίστηκε προηγουμένως να έχει την μεγαλύτερη απόδοση η αντίδραση (95,07%, 104,59% και 96,88% αντίστοιχα, σε συγκέντρωση εκκινητών 200nM).

Για κάθε δείγμα λήφθηκαν οι τιμές Ct από τις καμπύλες ενίσχυσης με κατώφλι φθορισμού σε 0,3. Ορισμένα δείγματα έδειξαν να έχουν διαφορά στις τιμές Ct πάνω από 0,6 κύκλους με τις επαναλήψεις τους, γεγονός που δεν τα καθιστά αξιόπιστα και για αυτό επαναλήφθηκαν. Παράλληλα, στην επανάληψη περιλήφθηκε και ένα δείγμα θετικού ελέγχου που είχε αξιόπιστες επαναλήψεις με πολύ μικρή διαφορά στις τιμές Ct τους (<0,2), την πρώτη φορά, ώστε να αξιολογηθεί η εγκυρότητα της επανάληψης. Στις Εικόνες 11 και 12 φαίνονται ενδεικτικά οι

καμπύλες τήξης και οι καμπύλες ενίσχυσης των δειγμάτων την πρώτη φορά που ελέγχθηκαν καθώς και οι καμπύλες των δειγμάτων που επαναλήφθηκαν για το γονίδιο *Eef1a1*.



**Εικόνα 11:** Οι καμπύλες τήξης (πάνω) και οι καμπύλες ενίσχυσης (κάτω) όλων των δειγμάτων cDNA για το γονίδιο *Eef1a1* (κατώφλι φθορισμού=0,3, συγκέντρωση εκκινητών=200nM). Με διαφορετικό χρώμα φαίνεται η καμπύλη για κάθε δείγμα. Στο ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου (μπλε βέλη), που δεν υπάρχει υπόστρωμα, έχει ενισχυθεί μικρή ποσότητα διμερών εκκινητών (δεν υπάρχει παραπροϊόν, όπως επιβεβαιώθηκε από ηλεκτροφόρηση του αρνητικού δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης).

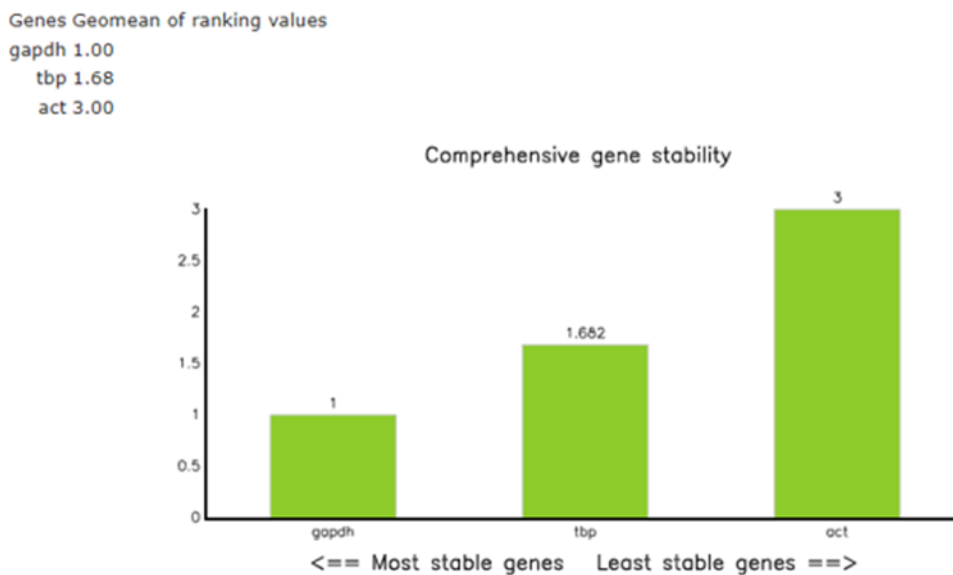


**Εικόνα 12:** Οι καμπύλες τήξης (πάνω) και οι καμπύλες ενίσχυσης (κάτω) των δειγμάτων cDNA που επαναλήφθηκαν για το γονίδιο *Eef1a1* (κατώφλι φθορισμού=0,3, συγκέντρωση εκκινητών=200nM). Δεν έχουν ενισχυθεί διμερή εκκινητών.

Τόσο στο γονίδιο *Tbr* όσο και στο *Eef1a1* το δείγμα θετικού ελέγχου κατά την επανάληψη είχε εξίσου καλές επαναλήψεις (duplicates) με την πρώτη φορά και συγκρίσιμες τιμές Ct, για αυτόν τον λόγο οι αντιδράσεις θεωρήθηκαν αξιόπιστες και για τα υπόλοιπα δείγματα. Στα δείγματα που την πρώτη φορά είχαν διαφορά στις τιμές Ct μικρότερη από 0,6 κύκλους ο μέσος όρος των τιμών τους υπολογίστηκε κανονικά από τις δύο αυτές τιμές. Στα δείγματα που επαναλήφθηκαν, για όσα δείγματα είχαν διαφορά στις νέες τιμές Ct μικρότερη από 0,6 κύκλους ο μέσος όρος των τιμών τους υπολογίστηκε από τις δύο νέες τιμές Ct. Αντίθετα όσα δείγματα είχαν για δεύτερη φορά μεγάλη διαφορά στις τιμές Ct με τα duplicates τους, ο μέσος όρος υπολογίστηκε από τις 4 τιμές

Ct των δειγμάτων των δύο αντιδράσεων. Ο μέσος όρος των τιμών Ct των 23 δειγμάτων για το γονίδιο *Tbp* παρουσιάζεται στον Πίνακα 8. Για το γονίδιο *Hprt* τα 11 από τα 23 δείγματα μεταξύ των αντιγράφων (duplicates) τιμές Ct με διαφορά αρκετά μεγαλύτερη των 0,6 κύκλων και για αυτό δεν ερευνήθηκε περαιτέρω.

Για τον έλεγχο καταλληλότητας του γονιδίου *Tbp* ως γονίδιο αναφοράς, εξετάστηκαν τα αποτελέσματα της qPCR συνδυαστικά με αντίστοιχα αποτελέσματα για τα γονίδια αναφοράς *Actin b* και *Gapdh* (Μεταπτυχιακή Εργασία, Π. Μπάμπου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2022). Η αξιολόγηση έγινε με τη χρήση του διαδικτυακού εργαλείου RefFinder. Το RefFinder περιλαμβάνει τα κύρια εναλλακτικά υπολογιστικά προγράμματα - Genorm, Normfinder, Bestkeeper και Comparative delta – CT method, και για κάθε πρόγραμμα συγκρίνει και ταξινομεί τα υπό μελέτη γονίδια αναφοράς. Σύμφωνα με τη σειρά ταξινόμησης κάθε προγράμματος, σε κάθε γονίδιο δίνεται μια κατάλληλη τιμή (appropriate weight) και υπολογίζεται ο γεωμετρικός μέσος όλων των τιμών αυτών ώστε να προκύψει η τελική κατάταξη των γονιδίων αναφοράς (Xie et al., 2012). Από τα ιδιοσυστατικά γονίδια *Tbp*, *Gapdh* και *Actb* την πιο μικρή τιμή γεωμετρικού μέσου όρου και άρα την πιο σταθερή έκφραση φάνηκε να έχουν τα *Tbp* και *Gapdh* (Εικ. 13) και για αυτό χρησιμοποιήθηκαν στην επακόλουθη συγκριτική ποσοτικοποίηση.



**Εικόνα 13:** Αξιολόγηση γονιδίων αναφοράς μέσω του προγράμματος RefFinder. Στον άξονα y αντιστοιχούν οι τιμές του γεωμετρικού μέσου ενώ στον άξονα x παρατίθενται τα υποψήφια γονίδια αναφοράς (Xie et al., 2012).

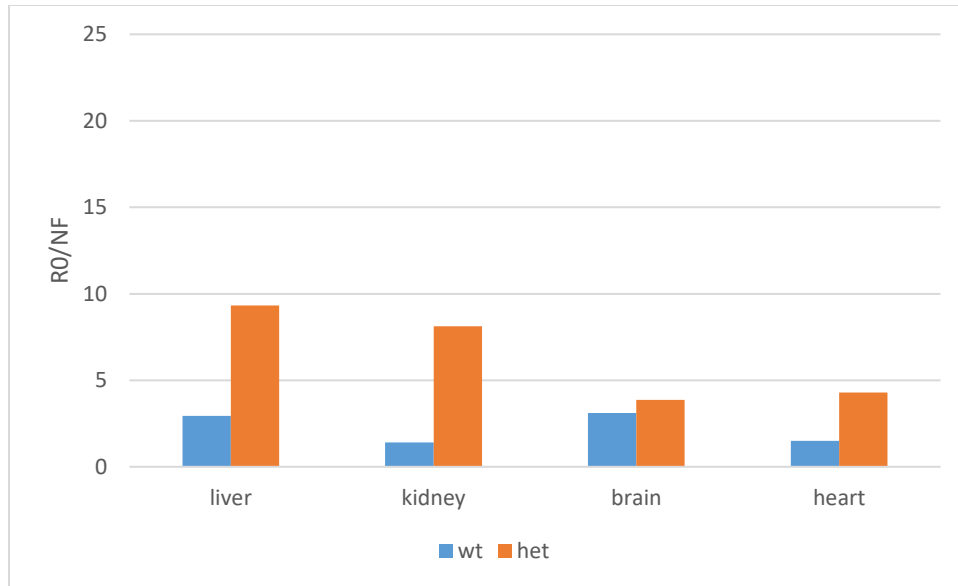
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *Eef1a1* έγινε μετά από κανονικοποίηση με βάση τα γονίδια αναφοράς, μέσω του υπολογιστικού φύλλου Microsoft excel 365, υπολογίζοντας, αρχικά, το R0 τόσο για τα ιδιοσυστάτα ενεργά γονίδια, *Tbp* και *Gapdh* (Μεταπτυχιακή Εργασία, Π. Μπάμπου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας 2022), και το γονίδιο στόχο *Eef1a1*, από τύπο  $R0 = \frac{Threshold}{(1+efficiency)^a}$ . Στη συνέχεια προσδιορίστηκε ο παράγοντας κανονικοποίησης ( $NF = \frac{R0Tbp + R0Gapdh}{2}$ ), ώστε να υπολογισθούν τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης του *Eef1a1* ( $RO_{Eef1a1}/NF$ ), όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Τα αποτελέσματα για κάθε ιστό των ποντικών αγρίου τύπου και των ετερόζυγων συγκεντρώθηκαν και οπτικοποιήθηκαν μέσω του υπολογιστικού προγράμματος Excel σε διαγράμματα ομαδοποιημένης στήλης. Για την δημιουργία αυτών, χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των τιμών κανονικοποίησης κάθε δείγματος ανάλογα με τον ιστό και το ποντίκι που προήλθε (Εικ. 14). Παρατηρούμε αύξηση της έκφρασης του *Eef1a1* σε όλους τους ιστούς στα ετερόζυγα knockout ποντίκια. Συγκεκριμένα, στο νεφρό παρατηρούμε αύξηση σχεδόν 6 φορές περισσότερο σε σχέση με την έκφραση στα ποντίκια αγρίου τύπου. Στην καρδιά και στο ήπαρ η έκφραση αυξάνεται περίπου 3 φορές ενώ στον εγκέφαλο αυξάνεται κατά το 1/5 περίπου. Στην συνέχεια υπολογίστηκαν τα περιγραφικά μέτρα (μέση τιμή, διάμεσος, τυπική απόκλιση, κλπ.) και τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή θηκογράμματος (box-plot) που είναι ένας τρόπος ελέγχου της κατανομής των δεδομένων.

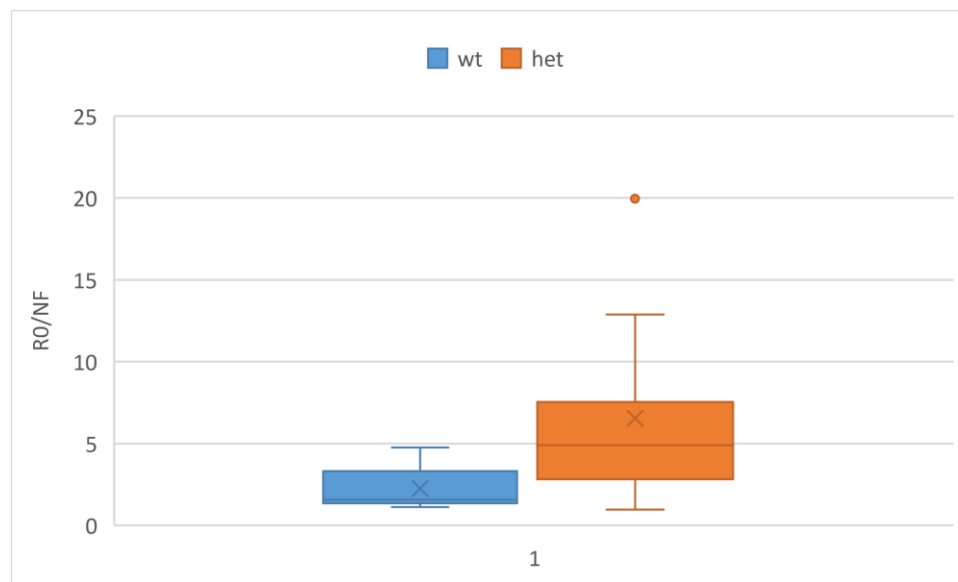
Πίνακας 8: Ο μέσος όρος των τιμών Ct και R0 όλων των δειγμάτων για το γονίδιο αναφοράς *Tbp* και το γονίδιο στόχο *Eef1a1*. Παρουσιάζεται ακόμα ο παράγοντας κανονικοποίησης (NF) και ο λόγος  $R0_{Eef1a1}/NF$ , που δείχνει τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *Eef1a1*.

Δείγμα	Γονίδιο Αναφοράς <i>Tbp</i>		NF	Γονίδιο Στόχος <i>Eef1a1</i>		
	M.O Ct	R0		M.O Ct	R0	R0/NF
hetΔ81 (L)	27,21	3,81842E-06	2,49877E-05	21,14	0,000178995	7,16333190
hetΔ81 (K)	27,38	3,40837E-06	4,49314E-05	19,47	0,000554452	12,33996900
hetΔ81 (B)	26,41	6,51709E-06	4,39061E-05	21,28	0,000163062	3,71387830
hetΔ81 (H)	26,62	5,66381E-06	7,07327E-05	20,98	0,000199168	2,81578669
hetΔ80 (L)	27,99	2,25978E-06	1,39812E-05	21,92	0,000105298	7,53144844
hetΔ80 (K)	*26,88	4,76051E-06	3,52461E-05	19,77	0,000453938	12,87909402
hetΔ80 (B)	25,57	1,14244E-05	7,46911E-05	20,10	0,000361701	4,84263279
wt1 (L)	*29,24	9,78532E-07	9,97933E-06	23,10	4,74705E-05	4,75688040
wt1 (K)	28,20	1,96391E-06	2,06949E-05	23,89	2,769E-05	1,33801132
wt1 (B)	25,50	1,19715E-05	5,16166E-05	21,12	0,000181132	3,50917858
wt1 (H)	28,35	1,7766E-06	4,21055E-05	22,54	6,93945E-05	1,64810996
wt2 (L)	*29,70	7,21985E-07	5,31699E-06	26,16	5,96152E-06	1,12122070
wt2 (K)	*29,86	6,4986E-07	9,12511E-06	24,94	1,36335E-05	1,49405903
wt2 (B)	25,08	1,58503E-05	8,57705E-05	20,75	0,000233571	2,72321079
wt2 (H)	26,09	8,0709E-06	4,82848E-05	22,61	6,61778E-05	1,37057270
het103 (L)	*28,72	1,38511E-06	8,60619E-06	24,17	2,2902E-05	2,66110178
het103 (K)	*25,77	9,99516E-06	5,58677E-05	21,59	0,000131703	2,35740752
het103 (B)	*25,51	1,18521E-05	8,7262E-05	22,27	8,33356E-05	0,95500465
het103 (H)	*28,90	1,23019E-06	2,19177E-05	22,70	6,20494E-05	2,83101630
het104 (L)	26,27	7,15622E-06	8,69739E-05	17,79	0,001735015	19,94868329
het104 (K)	29,76	6,9477E-07	5,03358E-06	*24,06	2,46336E-05	4,89385263
het104 (B)	*25,46	1,22343E-05	9,74779E-05	19,40	0,000583376	5,98470539
het104 (H)	28,72	1,38743E-06	3,17331E-05	*20,78	0,000228868	7,21229490

\*Με αστερίσκο σημειώνονται οι μέσοι όροι των δειγμάτων που επαναλήφθηκαν και προέκυψαν και από τις τέσσερις επαναλήψεις.



Εικόνα 14: Οπτικοποίηση της διαφορικής έκφρασης του γονιδίου *Eef1a1* στους τέσσερις διαφορετικούς ιστούς (από αριστερά προς τα δεξιά: ήπαρ, νεφρό, εγκέφαλος, καρδιά) σε ποντίκια αγρίου τύπου (μπλε στήλες) και ετερόζυγα knockout για *Fra10a1*.

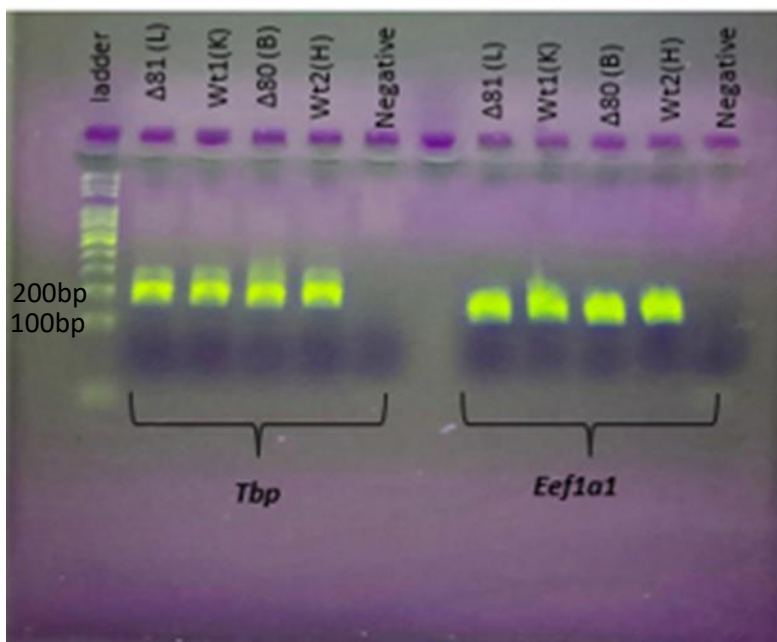


Εικόνα 15: Θηκόγραμμα (box-plot) για την σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *Eef1a1* στα ποντίκια αγρίου τύπου και στα ετερόζυγα knockout για το *Fra10a1*.



### 3.3 Έλεγχος προϊόντων PCR πραγματικού χρόνου με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι τα προϊόντα που ενισχύθηκαν με την PCR πραγματικού χρόνου έχουν το σωστό μήκος πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% ενδεικτικά στα δείγματα Δ81(L), Wt1(K), Δ80(B), Wt2(H) και στα δείγματα αρνητικού ελέγχου των γονιδίων *Tbp* και *Eef1a1*. Τα αναμενόμενα προϊόντα για τα γονίδια *Tbp* και *Eef1a1* έχουν μέγεθος 196bp και 149bp αντίστοιχα. Σύμφωνα με τον δείκτη μοριακών βαρών DNA (ladder) που χρησιμοποιήθηκε ήταν εφικτή η σύγκριση των ζωνών των μορίων DNA στο πήκτωμα. Πράγματι, τα προϊόντα που ενισχύθηκαν με την qPCR επιβεβαιώθηκαν με την ηλεκτροφόρηση ότι έχουν το αναμενόμενο μέγεθος (Εικ. 16)



**Εικόνα 16 :** Το πρώτο δείγμα είναι ο ladder και ακολουθούν τα δείγματα που ενισχύθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου. Συγκρίνοντας το μέγεθος των προϊόντων με τις ζώνες του ladder, προκύπτει ότι τα προϊόντα έχουν το αναμενόμενο μέγεθος.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε η διαφορική έκφραση του γονιδίου *Eef1a1* σε δύο ποντίκια αγρίου τύπου και σε τέσσερα ετερόζυγα knockout για το γονίδιο *Fra10ac1*. Χρησιμοποιήθηκαν 23 δείγματα τα οποία αντιστοιχούσαν σε ιστούς της καρδιάς, του εγκεφάλου, του ήπατος και του νεφρού. Στα ετερόζυγα ποντίκια, η έκφραση του *Fra10ac1* καθορίζεται από το ένα μόνο αλληλόμορφο αγρίου τύπου και συνεπώς είναι μειωμένη. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR πραγματικού χρόνου για τον έλεγχο της έκφρασης του *Eef1a1* έγινε σύμφωνα με την έκφραση ιδιοσυστατικών γονιδίων και έδειξε αύξηση της έκφρασης σε επίπεδο μεταγράφου στα ετερόζυγα knockout, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από πειράματα σε ανθρώπινα κύτταρα HeLa, όταν η έκφραση του *FRA10AC1* είναι κατεσταλμένη (Διδακτορική διατριβή Ε. Γαλλιοπούλου, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2018).

Ο ευκαρυωτικός παράγοντας επιμήκυνσης της μετάφρασης στα θηλαστικά eEF1A (Eukaryotic Elongation Factor 1A) είναι η δεύτερη σε σειρά πιο άφθονη πρωτεΐνη μέσα στα κύτταρα, μετά την ακτίνη, και στα θηλαστικά κωδικοποιείται από δύο παράλογα γονίδια, το *eEF1A1* και το *eEF1A2*, των οποίων οι αλληλουχίες είναι 98% όμοιες και 92% πανομοιότυπες σε αμινοξικό επίπεδο, αλλά έχουν διαφορετικό μοτίβο έκφρασης -μη επικαλυπτόμενο (Lee et al., 1992). Ο παράγοντας επιμήκυνσης της μετάφρασης eEF1A είναι υπεύθυνος για την μεταφορά των αμινοακετυλιωμένων tRNAs στη θέση A του ριβοσώματος 80S μέσω μιας GTP-εξαρτώμενης διαδικασίας, η οποία διαμεσολαβείται από τον παράγοντα επιμήκυνσης της μετάφρασης eEF1B (eukaryotic elongation factor 1B), ενώ η μεταφορά του πολυπεπτιδίου στη θέση P του ριβοσώματος επιτυγχάνεται μέσω του παράγοντα eEF2 (eukaryotic elongation factor 2), (Abbott, 2004). Η eEF1A1 εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα. Στον εγκέφαλο η έκφραση της eEF1A1 στους νευρώνες είναι χαμηλή και ενώ στα νευρογλοιακά κύτταρα μειώνεται με την ηλικία. Από την άλλη η eEF1A2, έχει πιο αυστηρό πρότυπο έκφρασης, στους νευρώνες, τους σκελετικούς μυς και την καρδιά. (Lee et al., 1992).

Η πρωτεΐνη eEF1A1 υποκυτταρικά εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα (Takata et al., 2009) και χαρακτηρίζεται ως “moonlighting”, καθώς έχει βρεθεί να έχει περισσότερες λειτουργίες πέρα από αυτή του ρόλου της στη μετάφραση. “Moonlighting” χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες οι

οποίες έχουν πάνω από μια λειτουργία, έχουν πανομοιότυπες αλληλουχίες και δομές, αλλά διαφορετικούς ρόλους, που συχνά σχετίζονται με τη θέση τους στο κύτταρο. (Huberts & van der Klei, 2010). Η eEF1A1 συμμετέχει επιπλέον, στην ρύθμιση του κυτταροσκελετού στοχεύοντας πρωτεΐνες για αποικοδόμηση (Chuang et al., 2005), στη μεταγραφή γονιδίων σε απόκριση στο θερμικό σοκ (Vera et al., 2014), στην ιϊκή αντιγραφή και αναπαραγωγή (Li et al., 2009), στο σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης και της ογκογένεσης (Schulz et al., 2014; Abbas et al., 2015) και στην έξοδο πρωτεϊνών από τον πυρήνα μέσω ενός μονοπατιού ανεξάρτητου από το μονοπάτι των εξαπορτινών (Khacho et al., 2008).

Όσον αφορά τον ρόλο της eEF1A1 στην έξοδο πρωτεϊνών από τον πυρήνα, ο παράγοντας eEF1A δρα στην κυτταροπλασματική πλευρά του πυρηνικού φακέλου αναγνωρίζοντας πρωτεΐνες που φέρουν μια αλληλουχία-σήμα για την έξοδο τους από τον πυρήνα, γνωστή ως TD-NEM (Transcription-Dependent Nuclear Export Motif), και, υδρολύοντας το GTP σε GDP, τις απελευθερώνει στο κυτταρόπλασμα. Η διαδικασία αυτή εξαρτάται από τη μεταγραφή από την πολυμεράση II του RNA. (Khacho et al., 2008). Έχει βρεθεί, ακόμα, ότι η eEF1A1 ρυθμίζει και την υποκυτταρική τοποθέτηση πρωτεϊνών που φέρουν ένα νέο σήμα εξόδου από τον πυρήνα NES (Nuclear Export Signal), μια πολύ-A ουρά. Αν μάλιστα για κάποιο λόγο η αλληλεπίδραση με αυτά τα σήματα διακοπεί μπορεί να οδηγήσει στη λανθασμένη τοποθέτηση πολλών μεταγραφικών παραγόντων στο κύτταρο και να οδηγήσει σε ασθένεια (Li et al., 2017). Ακόμα, στα θηλαστικά η ακετυλιωμένη eEF1A1 μεταφέρεται στον πυρήνα των κυττάρων του νευρικού συστήματος όπου συνδέεται με τον μεταγραφικό παράγοντα Sox10 και προωθεί την έξοδό του από τον πυρήνα (Duman et al., 2020).

Όταν η έκφραση του γονιδίου *Fra10ac1*, που παίζει ρόλο στη μεταγραφή ως συστατικό του υποσυμπλόκων B act, P και C του μείζονος σωματίου συναρμογής, εξαρτάται από ένα μόνο αλληλόμορφο η έκφραση του γονιδίου *Eef1a1* φάνηκε να αυξορρυθμίζεται. Η αύξηση της έκφρασης του *Eef1a1* μπορεί να οφείλεται στην αδυναμία αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης *Fra10ac1* με την πρωτεΐνη *Eef1a1*, και ίσως έχει σαν αποτέλεσμα την συσσώρευσή της στο κύτταρο. Αυτό μπορεί να επηρεάζεται, ακόμα, μέσω της τρίτης πρωτεΐνης που αλληλεπιδρούν εντός του δικτύου συναρμογής και για αυτό πρέπει να μελετηθεί πως επηρεάζεται η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί αυτή την πρωτεΐνη. Καταστολή της έκφρασης του *Fra10ac1* στο ένα αλληλόμορφο μπορεί να επηρεάζει, επίσης, τη μεταγραφή από την πολυμεράση II του RNA και

τη συναρμογή και έτσι να αποδιοργανώνει την έξοδο των πρωτεϊνών από τον πυρήνα, μέσω της *Eef1a1* που αναγνωρίζει την αλληλουχία σήμα TD-NEM. Μπορεί, επίσης, η αύξηση σε επίπεδο μεταγράφου του *Eef1a1* να μην σημαίνει και αύξηση σε πρωτεϊνικό επίπεδο, κι προτείνεται περαιτέρω διερεύνηση επί του θέματος.

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία προέκυψαν κάποια τεχνικά προβλήματα τα οποία μπορούν σε επόμενη φάση να επιλυθούν ώστε να βελτιωθούν τα αποτελέσματα. Αρχικά, προτείνεται η επανάληψη της PCR πραγματικού χρόνου σε όλα τα δείγματα για το ιδιόσυστατα ενεργό γονίδιο *Hprt*. Κατά τον έλεγχο της απόδοσης του ζεύγους των εκκινητών που σχεδιάστηκαν για αυτό, οι επαναλήψεις των δειγμάτων και η απόδοση της αντίδρασης ήταν αποδεκτές και έτσι η εμφάνιση κακών επαναλήψεων (duplicates), όταν το γονίδιο ελέγχθηκε στα 23 δείγματα, μπορεί να οφείλεται σε λανθασμένο χειρισμό κατά την προετοιμασία της αντίδρασης. Ακόμα, για την εξασφάλιση της ορθότητας του ελέγχου της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων στόχων θα μπορούσαν να εξεταστούν παραπάνω γονίδια αναφοράς. Το γονίδιο *L38*, που κωδικοποιεί μια ριβοσωμική πρωτεΐνη και το γονίδιο *Eif3* που κωδικοποιεί για τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης έχουν βρεθεί ότι εκφράζονται συνεχώς και σταθερά σε όλους τους ιστούς στα ποντίκια και θα μπορούσαν να αποτελέσουν καλά γονίδια αναφοράς (Kouadio et al., 2007). Όσον αφορά τον έλεγχο των γονιδίων στόχων *Ruf60*, *Ilf3* και *Pcbp2*, συνίσταται η περαιτέρω διερεύνηση της απόδοσης των ζευγών εκκινητών που σχεδιάστηκαν και σε άλλες συγκεντρώσεις ή, αν κριθεί απαραίτητος, ο σχεδιασμός νέων εκκινητών. Επίσης, συνίσταται η αύξηση των βιολογικών επαναλήψεων, και άρα των δειγμάτων, και δημιουργία ομόζυγων knockout ποντικών για το *Fra10ac*. Παράλληλα, κρίνεται σημαντικό τα ποντίκια να έχουν βρεθεί αρνητικά με γονοτύπηση για τα γονίδια των ρεκομπινασών *Flp* και *Cre*, ώστε τα ποντίκια που θα ελεγχθούν να έχουν σίγουρα μόνο τα αλληλόμορφα “tm1c” και “tm1d” αντίστοιχα.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abbas, W., Kumar, A., & Herbein, G. (2015). The eEF1A Proteins: At the Crossroads of Oncogenesis, Apoptosis, and Viral Infections. *Frontiers in Oncology*, 5, 75. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00075>
2. Abbott, C. (2004). Translation factors: In sickness and in health. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.11.006>
3. Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), 209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
4. Bagni, C., Tassone, F., Neri, G., & Hagerman, R. (2012). Fragile X syndrome: Causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *Journal of Clinical Investigation*, 122(12), 4314–4322. <https://doi.org/10.1172/JCI63141>
5. Capecchi, M. R. (2001). Generating mice with targeted mutations. *Nature Medicine*, 7(10), 1086–1090. <https://doi.org/10.1038/nm1001-1086>
6. Capecchi, M. R. (2005). Gene targeting in mice: Functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Reviews Genetics*, 6(6), 507–512. <https://doi.org/10.1038/nrg1619>
7. Chuang, S.-M., Chen, L., Lambertson, D., Anand, M., Kinzy, T. G., & Madura, K. (2005). Proteasome-Mediated Degradation of Cotranslationally Damaged Proteins Involves Translation Elongation Factor 1A. *Molecular and Cellular Biology*, 25(1), 403–413. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.1.403-413.2005>
8. 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. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00105>
9. Collins, F., Rossant, J., & Wurst, W. (2007). A mouse for all reasons. *Cell*, 128(1), 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.018>
10. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. (2016). *Nucleic Acids Research*, 44(Database issue), D7–D19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1290>
11. Dimitrakopoulos, G. N., Klapa, M. I., & Moschonas, N. K. (2021). PICKLE 3.0: Enriching the human meta-database with the mouse protein interactome extended via mouse–human orthology. *Bioinformatics*, 37(1), 145–146. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa1070>
12. Duman, M., Vaquié, A., Nocera, G., Heller, M., Stumpe, M., Siva Sankar, D., Dengjel, J., Meijer, D., Yamaguchi, T., Matthias, P., Zeis, T., Schaeren-Wiemers, N., Hayoz, A., Ruff, S., & Jacob, C. (2020). EEF1A1 deacetylation enables transcriptional activation of remyelination. *Nature Communications*, 11(1), 3420. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17243-z>
13. Feng, W., & Chakraborty, A. (2017). Fragility Extraordinaire: Unsolved Mysteries of Chromosome Fragile Sites. In H. Masai & M. Foiani (Eds.), *DNA Replication* (Vol. 1042, pp. 489–526). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-6955-0\\_21](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6955-0_21)
14. Gates, C. A., & Cox, M. M. (1988). FLP recombinase is an enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(13), 4628–4632.
15. Hegele, A., Kamburov, A., Grossmann, A., Sourlis, C., Wowro, S., Weimann, M., Will, C. L., Pena, V., Lüthmann, R., & Stelzl, U. (2012). Dynamic Protein-Protein Interaction Wiring of the

- Human Spliceosome. *Molecular Cell*, 45(4), 567–580. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.034>
16. Houdebine, L.-M. (2002). The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *Journal of Biotechnology*, 98(2–3), 145–160. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00129-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00129-3)
  17. Huberts, D. H. E. W., & van der Klei, I. J. (2010). Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(4), 520–525. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.022>
  18. Internal Ribosome Entry Site—An overview | ScienceDirect Topics. (n.d.). Retrieved November 11, 2021, from <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/internal-ribosome-entry-site>
  19. Kähkönen, M., Tengström, C., Alitalo, T., Matilainen, R., Kaski, M., & Airaksinen, E. (1989). Population cytogenetics of folate-sensitive fragile sites: II. Autosomal rare fragile sites. *Human Genetics*, 82(1), 3–8. <https://doi.org/10.1007/BF00288261>
  20. Khacho, M., Mekhail, K., Pilon-Larose, K., Pause, A., Côté, J., & Lee, S. (2008). EEF1A Is a Novel Component of the Mammalian Nuclear Protein Export Machinery. *Molecular Biology of the Cell*, 19(12), 5296–5308. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-06-0562>
  21. Kim, H., Kim, M., Im, S.-K., & Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: General principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Laboratory Animal Research*, 34(4), 147–159. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.147>
  22. Kouadjo, K. E., Nishida, Y., Cadrin-Girard, J. F., Yoshioka, M., & St-Amand, J. (2007). Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues. *BMC Genomics*, 8(1), 127. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-127>
  23. Kumar, R., Nagpal, G., Kumar, V., Usmani, S. S., Agrawal, P., & Raghava, G. P. S. (2019). HumCFS: A database of fragile sites in human chromosomes. *BMC Genomics*, 19(S9), 985. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5330-5>
  24. Kurosaki, T., Popp, M. W., & Maquat, L. E. (2019). Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(7), 406–420. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0126-2>
  25. Lee, S., Francoeur, A. M., Liu, S., & Wang, E. (1992). Tissue-specific expression in mammalian brain, heart, and muscle of S1, a member of the elongation factor-1 alpha gene family. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 24064–24068.
  26. Li, L., Ng, N. K. L., Koon, A. C., & Chan, H. Y. E. (2017). Expanded polyalanine tracts function as nuclear export signals and promote protein mislocalization via eEF1A1 factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(14), 5784–5800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.763599>
  27. Lukusa, T., & Fryns, J. P. (2008). Human chromosome fragility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1779(1), 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2007.10.005>
  28. Madeira F, Park YM, Lee J, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*. 2019 Jul;47(W1):W636-W641. DOI: 10.1093/nar/gkz268. PMID: 30976793; PMCID: PMC6602479.
  29. Mouse Genome Sequencing Consortium. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520–562. <https://doi.org/10.1038/nature01262>
  30. Nagy, A. (1999.). Cre Recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring. 11.

31. 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>
32. Sauer, B. (1998). Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/loxSystem. *Methods*, 14(4), 381–392. <https://doi.org/10.1006/meth.1998.0593>
33. Savelyeva L., Sagulenko E., Schmitt G. J., Schwab M. (2006). Low-frequency common fragile sites: Link to neuropsychiatric disorders? Elsevier Ireland Ltd. doi:10.1016/j.canlet.2005.08.033
34. Schrott, M. (1995). Selectable Marker and Reporter Genes. In I. Potrykus & G. Spangenberg (Eds.), *Gene Transfer to Plants* (pp. 325–336). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-79247-2\\_31](https://doi.org/10.1007/978-3-642-79247-2_31)
35. Schulz, I., Engel, C., Niestroj, A. J., Kehlen, A., Rahfeld, J.-U., Kleinschmidt, M., Lehmann, K., Roßner, S., & Demuth, H.-U. (2014). A non-canonical function of eukaryotic elongation factor 1A1: Regulation of interleukin-6 expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(5), 965–975. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.022>
36. 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>
37. Smith, C., Bolton, A., & Nguyen, G. (2010). Genomic and Epigenomic Instability, Fragile Sites, Schizophrenia and Autism. *Current Genomics*, 11(6), 447–469. <https://doi.org/10.2174/138920210793176001>
38. Spinner, N. B., & Conlin, L. K. (2014). Mosaicism and clinical genetics: AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART C (SEMINARS IN MEDICAL GENETICS). *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 166(4), 397–405. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31421>
39. Suckow, M. A., Danneman, P., & Brayton, C. (2001). *The laboratory mouse*. CRC Press. p. 1-5
40. Sutherland, G. R. (1982). Heritable fragile sites on human chromosomes. VIII. Preliminary population cytogenetic data on the folic-acid-sensitive fragile sites. *American Journal of Human Genetics*, 34(3), 452–458.
41. Sutherland, G. R., & Richards, R. I. (1995). The molecular basis of fragile sites in human chromosomes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 5(3), 323–327. [https://doi.org/10.1016/0959-437X\(95\)80046-8](https://doi.org/10.1016/0959-437X(95)80046-8)
42. Sutherland, G. R., Baker, E., & Richards, R. I. (1998). Fragile sites still breaking. *Trends in Genetics*, 14(12), 501–506. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(98\)01628-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(98)01628-X)
43. Suthram, S., Shlomi, T., Ruppin, E., Sharan, R., & Ideker, T. (2006). A direct comparison of protein interaction confidence assignment schemes. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 360. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-360>
44. Takata, H., Nishijima, H., Ogura, S., Sakaguchi, T., Bubulya, P. A., Mochizuki, T., & Shibahara, K. (2009). Proteome Analysis of Human Nuclear Insoluble Fractions. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 14(B), 975–990. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01324.x>
45. The GTEx Consortium. (2020). The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. *Science*, 369(6509), 1318–1330. <https://doi.org/10.1126/science.aaz1776>

46. The International Mouse Phenotyping Consortium, Dickinson, M. E., Flenniken, A. M., Ji, X., Teboul, L., Wong, M. D., White, J. K., Meehan, T. F., Weninger, W. J., Westerberg, H., Adissu, H., Baker, C. N., Bower, L., Brown, J. M., Caddle, L. B., Chiani, F., Clary, D., Cleak, J., Daly, M. J., ... Murray, S. A. (2016). High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. *Nature*, 537(7621), 508–514. <https://doi.org/10.1038/nature19356>
47. The UniProt Consortium. (2021). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
48. Tsantoulis, P. K., Kotsinas, A., Sfrikakis, P. P., Evangelou, K., Sideridou, M., Levy, B., Mo, L., Kittas, C., Wu, X.-R., Papavassiliou, A. G., & Gorgoulis, V. G. (2008). Oncogene-induced replication stress preferentially targets common fragile sites in preneoplastic lesions. A genome-wide study. *Oncogene*, 27(23), 3256–3264. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210989>
49. Vera, M., Pani, B., Griffiths, L. A., Muchardt, C., Abbott, C. M., Singer, R. H., & Nudler, E. (2014). The translation elongation factor eEF1A1 couples transcription to translation during heat shock response. *ELife*, 3, e03164. <https://doi.org/10.7554/eLife.03164>
50. Verkerk, A. J. M. H., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y.-H., Kuhl, D. P. A., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M. F., Zhang, F., Eussen, B. E., van Ommen, G.-J. B., Blonden, L. A. J., Riggins, G. J., Chastain, J. L., Kunst, C. B., Galjaard, H., Thomas Caskey, C., Nelson, D. L., ... Warren, S. T. (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, 65(5), 905–914. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90397-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90397-H)
51. 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*, awab403. <https://doi.org/10.1093/brain/awab403>
52. von Mering, C., Krause, R., Snel, B., Cornell, M., Oliver, S. G., Fields, S., & Bork, P. (2002). Comparative assessment of large-scale data sets of protein–protein interactions. *Nature*, 417(6887), 399–403. <https://doi.org/10.1038/nature750>
53. Voytas, D. (2001). Agarose gel electrophoresis. *Current Protocols in Immunology*, Chapter 10, Unit 10.4. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1004s02>
54. Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>
55. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
56. Zlotorynski E, Rahat A, Skaug J, Ben-Porat N, Ozeri E, Hershberg R, et al. Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. *Mol Cell Biol*. 2003;23:7143–51 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14517285>. Accessed 15 July 2018