

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

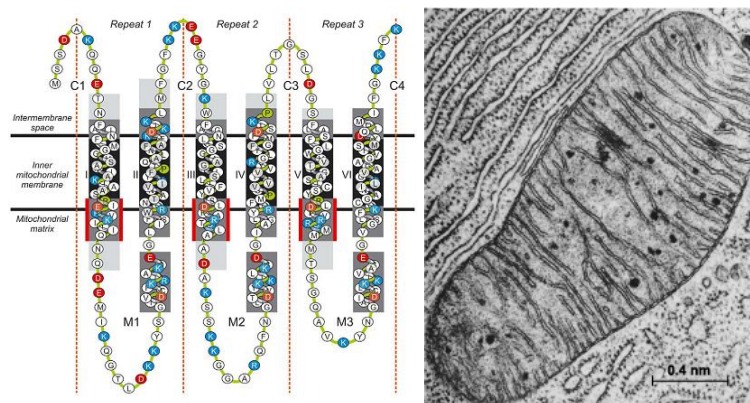
ΠΜΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ & ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ SLC25A46 ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΕ
ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



TOSHIMI KANO

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΛΕΝΗ ΝΤΟΥΝΗ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2013

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

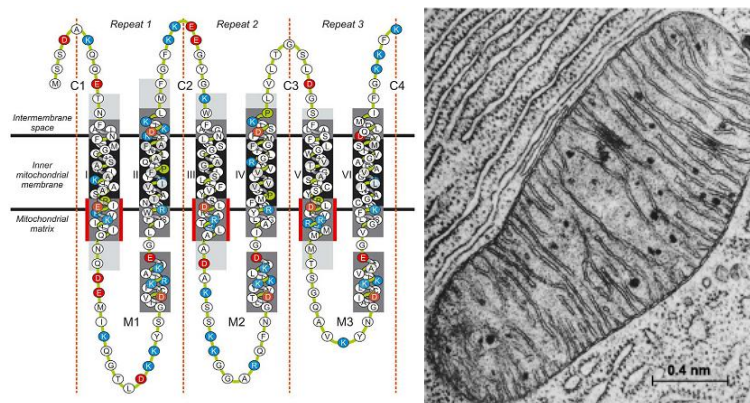
ΠΜΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ & ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ SLC25A46 ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΕ
ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



TOSHIMI KANO

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΛΕΝΗ ΝΤΟΥΝΗ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2013

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΜΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ & ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ

ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ SLC25A46 ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΕ

ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

TOSHIMI KANO

Επιβλέπουσα

Ελένη Ντούνη, Επίκουρος Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Μέλη

Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Νικόλαος Κοσμίδης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Στην 13^η Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύνοψης (Γ.Σ.Ε.Σ.) που πραγματοποιήθηκε στις 07-06-2013 ορίστηκε η τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή:

Επίκουρη Καθηγήτρια Ε. Ντούνη (Επιβλέπουσα)

Καθηγητής Η. Ηλιόπουλος (Μέλος)

Επίκουρος Καθηγητής Ν. Κοσμίδης (Μέλος)

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια κυρία Ελένη Ντούνη, τον Καθηγητή κύριο Ηλία Ηλιόπουλο, και τον Επίκουρο Καθηγητή κύριο Νικόλαο Κοσμίδη ως μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής που επέβλεψαν την μεταπτυχιακή μου μελέτη.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια κυρία Ελένη Ντούνη για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την μεταπτυχιακή μου μελέτη στο εργαστήριό της, στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ» και στο εργαστήριο Γενετικής του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τόσο για την συνεχή επίβλεψη, την καθοριστική βοήθεια, τις πολύτιμες γνώσεις πάνω στο αντικείμενο της έρευνας, την μεγάλη υπομονή που επέδειξε καθ' όλη την διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο αλλά και για τις διορθώσεις στο κείμενο της μεταπτυχιακής μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ε.ΚΕ.Β.Ε. Φλέμιγκ για την διάθεση των υποδομών του στα πλαίσια της παρούσας μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Βαγγέλη Ρηνώτα, τον Φώτη Ιωακειμίδα και ιδιαίτερα τη Μαρήνη Τερζενίδου για την πολύτιμη βοήθειά τους στον χειρισμό και εξοικείωση των μηχανημάτων, στην επίδειξη των τεχνικών, και για τις συμβουλές τους που με βοήθησαν ιδιαίτερα κατά την εκτέλεση των πειραμάτων. Στο τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την υποστήριξη.

Περίληψη

Το γονίδιο Slc25a46 αποτελεί ένα νέο μέλος της SLC25 (solute carrier family) οικογένειας μιτοχονδριακών μεταφορέων με πλήρως άγνωστη λειτουργία και για το οποίο δεν έχει αναφερθεί κάποια λειτουργική μετάλλαξη ή συσχετισμός με την παθογένεση ασθενειών σε ζωικούς οργανισμούς μέχρι σήμερα. Τα περισσότερα μέλη της SLC25 οικογένειας βρίσκονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και εξειδικεύονται ανάλογα με τα είδη των υποστρωμάτων που μεταφέρουν προς και από την μήτρα του μιτοχονδρίου. Υπάρχουν αρκετές ασθένειες που προκαλούνται από μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακούς μεταφορείς που εμπλέκονται είτε άμεσα στην οξειδωτική φωσφορυλίωση είτε στον ενδιάμεσο μεταβολισμό. Η ερευνητική ομάδα της Δρ Ελένης Ντούνη δημιούργησε πρόσφατα με τυχαία μεταλλαξογένεση χρησιμοποιώντας τον αλκυλιωτικό παράγοντα N-αιθυλ-N-νιτροζουρία (ENU), ένα νέο μοντέλο υπολειπόμενης αυτοσωμικής νευρολογικής νόσου με χαρακτηριστικά αταξίας και επιληψίας στο ποντίκι που οφείλεται σε μια σημειακή μετάλλαξη χωρίς νόημα στο γονίδιο Slc25a46. Προηγούμενες μελέτες μας έδειξαν ότι η υπεύθυνη μετάλλαξη αφορά μια αλλαγή από C (κυτοσίνη) σε T (θυμίνη) στην κωδική περιοχή του γονιδίου Slc25a46 προκαλώντας ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης. Ως αποτέλεσμα παράγεται μια πρωτεΐνη 95 αμινοξέων αντί της άγριου τύπου πρωτεΐνης SLC25A46 που έχει 418 αμινοξέα και εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Παρά το γεγονός ότι η μετάλλαξη στο γονίδιο Slc25a46 δεν επηρεάζει τα επίπεδα του mRNA, η άγριου τύπου 46kDa SLC25A46 πρωτεΐνη παράγεται μόνο στα ποντίκια άγριου τύπου και όχι στα ποντίκια με τον νευρολογικό φαινότυπο αταξίας.

Ο σκοπός της παρούσα μελέτης ήταν η δημιουργία και χαρακτηρισμός διαγονιδιακών ποντικών που φέρουν το ανθρώπινο Slc25a46 γονίδιο (TgSlc25a46) ώστε σε πειράματα γενετικής αναπλήρωσης να επιβεβαιωθεί γενετικά εάν η μετάλλαξη στο γονίδιο Slc25a46 είναι υπεύθυνη για τον φαινότυπο που παρατηρείται στα αταξικά ζώα. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση του Slc25a46 διαγονιδίου τόσο στο επίπεδο του mRNA όσο και στο επίπεδο της παραγόμενης πρωτεΐνης σε διάφορους ιστούς δύο TgSlc25a46 διαγονιδιακών σειρών και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική ανάλυση και διασταυρώσεις για την διάσωση του αταξικού φαινοτύπου παρουσία του διαγονιδίου. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι

1) το ανθρώπινο Slc25a46 διαγονίδιο ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς Slc25a46 γονιδίου με κύρια έκφραση σε ιστούς του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος όπως εγκέφαλο, παρεγκεφαλίδα και νωτιαίο μυελό τόσο στο επίπεδο του mRNA όσο και της πρωτεΐνης, 2) η έκφραση του Slc25a46 διαγονιδίου είναι ανάλογη με τον αριθμό αντιγράφων του, 3) τα διαγονιδιακά ποντίκια ομόζυγα για τη μετάλλαξη (TgSlc25a46 m/m) εμφανίζουν υγιή φαινότυπο και παράγουν την ανθρώπινη SLC25A46 πρωτεΐνη με φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης και 4) υπεύθυνη για τον αταξικό φαινότυπο είναι πράγματι η μετάλλαξη στο γονίδιο Slc25a46 (γενετική επιβεβαίωση της μετάλλαξης). Η μελέτη της λειτουργίας του Slc25a46 γονιδίου θα συμβάλει στην κατανόηση των μοριακών παθογενετικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην συγκεκριμένη νευρολογική νόσο και πιθανώς στην αποκάλυψη νέων μεταβολικών μονοπατιών στις οποίες τα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο.

ABSTRACT

The Slc25a46 gene is a member of the SLC25 (solute carrier family 25) family, which consists of mitochondrial carrier proteins. Its function is totally unknown and neither functional mutations nor correlations with disease pathogenesis in animal organisms have been reported so far. Most of the SLC25 members are located in the inner mitochondrial membrane and transport specific substrates inside and outside of the mitochondrial matrix. Several diseases are caused by the mutations in the mitochondrial carrier proteins that affect either directly oxidative phosphorylation or metabolism. Dr. Eleni Douni's research group has recently created, through random mutagenesis using N-ethyl-N nitrosourea (ENU), a new mouse model of recessive autosomal neurological disease characterized by ataxia and epilepsy that is caused by a nonsense point mutation in the Slc25a46 gene. Our previous studies showed that this mutation replaced a C (cytosine) by a T (thymine) in the coding region of the Slc25a46 gene introducing a premature stop codon. As a result, the truncated protein has only 95 amino acids instead of the 418 amino acids displayed by the SLC25A46 wild type protein, which has mitochondrial localization. Although this mutation does not affect the expression of Slc25a46 at the mRNA level, the 46kDa SLC25A46 wild type protein is not produced in ataxic mice.

The aim of the present study was the creation and characterization of human Slc25a46 transgenic mice (TgSlc25a46) in order to genetically confirm that the mutation in the Slc25a46 gene is responsible for the ataxic phenotype through genetic replacement experiments. In this work, the expression of the Slc25a46 transgene was studied at the mRNA and the protein levels in different tissues among two TgSlc25a46 lines, the phenotype of the transgenic mice was analysed and crosses were established for the rescue of the ataxic phenotype in the presence of the human Slc25a46 transgene. Our results showed that 1) the human Slc25a46 transgene follows the expression pattern of the endogenous Slc25a46 gene which is mainly expressed in the tissues of the Central Nerve System such as brain, cerebellum, and spinal cord, both at the mRNA and protein levels, 2) the expression of the Slc25a46 transgene depends on its copy number, 3) the transgenic mice carrying the nonsense mutation (TgSlc25a46 m/m) rescued the ataxic phenotype and displayed a physiological expression pattern of the human SLC25A46 protein, and 4) the mutation in the Slc25a46 gene is indeed

responsible for the ataxic phenotype (genetical confirmation for the mutation). Further studies on the Slc25a46 gene's function will reveal the molecular mechanism involved in disease pathogenesis displayed by the ataxic model and identify possibly novel metabolic pathways where mitochondria play important role.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφαλαίο 1:	Εισαγωγή.....	13
1.1	Εύρεση ενός μοντέλου αταξίας στο ποντίκι με τυχαία μεταλλαξογένεση ..	13
1.1.1	Πρόσθια Γενετική και Χημική Μεταλλαξογένεση με ENU.....	13
1.1.2	Εύρεση του φαινοτύπου της αταξίας	15
1.1.3	Γενετική ανάλυση και εύρεση της μετάλλαξης στο γονίδιο Slc25a46	15
1.1.4	Το γονίδιο Slc25a46.....	16
1.1.5	Έκφραση του γονιδίου Slc25a46	16
1.1.6	Η μετάλλαξη στην SLC25A46 πρωτεΐνη	17
1.2	Η οικογένεια μεταφορέων SLC	19
1.3	Η οικογένεια μιτοχονδριακών μεταφορέων SLC25 (SLC25, Solute Carrier Family 25).....	19
1.3.1	Μιτοχόνδρια – Δομή και λειτουργία	19
1.3.2	Η οικογένεια μιτοχονδριακών μεταφορέων SLC (SLC25, Solute Carrier Family 25).....	22
1.3.3	Λειτουργικές ιδιότητες της SLC25 οικογένειας	24
1.3.4	Δομή.....	26
1.3.5	Ανάλυση της ευθυγράμμισης ακολουθίας.....	28
1.3.6	Μηχανισμός μεταφοράς.....	30
1.3.7	Φυλογενετική ανάλυση.....	31
1.3.8	Εξέλιξη της οικογένειας SLC25	32
1.3.9	Ασθένειες που προκαλούνται από μιτοχονδριακούς μεταφορείς SLC25	33
1.3.9.1	Η ανεπάρκεια του PiC (OMIM 610773).....	35
1.3.9.2	Η ανεπάρκεια του ACC1 (OMIM 192600)	36
1.3.9.3	Αυτοσωμική επικρατής προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (OMIM 609283).....	36
1.3.9.4	Η ανεπάρκεια του AGC1 (OMIM 612949)	36
1.3.9.5	Η ανεπάρκεια του AGC2 (OMIM 603471 και OMIM 605814).....	37
1.3.9.6	Το σύνδρομο HHH (OMIM 238970)	37
1.3.9.7	Εκ γενετής μικροκεφαλία Amish (OMIM 607196).....	37

1.3.9.8	Νευροπάθεια με αμφίπλευρη νέκρωση του ραβδωτού σώματος (OMIM 613710).....	38
1.3.9.9	Η ανεπάρκεια του CAC (OMIM 212138)	38
1.3.9.10	Πρόωρη επιληπτική εγκεφαλοπάθεια (OMIM 609304).....	38
1.3.9.11	Συγγενής σιδηροβλαστική αναιμία (OMIM 205950).....	39
1.3.10	Μεταλλάξεις για το γονίδιο Slc25a46	39
1.4	Τεχνολογία διαγονιδιακών ζώων	40
1.4.1	Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών.....	41
1.4.1.1	Χρήση του BAC στην μικροένεση	42
1.5	Στόχοι της παρούσας μελέτης.....	45
Κεφαλαίο 2:	Πειραματική διαδικασία	46
2.1	Υλικά και μέθοδοι.....	46
2.2	Στελέχη ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν	47
2.3	Σειρές των διαγονιδιακών ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν.....	47
2.4	Παραλαβή ιστών από ποντίκια για την απομόνωση γενωμικού DNA	48
2.5	Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών.....	49
2.6	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	51
2.7	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	54
2.8	Απομόνωση ολικού RNA με τη μέθοδο ουρίας/χλωριούχου λιθίου (Urea / LiCl).....	56
2.9	Απομόνωση ολικού RNA με τη μέθοδο Tri Reagent	59
2.10	Μέτρηση νουκλεϊνικών οξέων.....	60
2.11	Απομάκρυνση υπολειμμάτων γενωμικού DNA με DNase και σύνθεση cDNA	61
2.12	PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)	62
2.13	Απομόνωση πρωτεϊνών.....	65
2.13.1	Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης.....	65
2.13.2	Υποκυτταρική κλασμάτωση (subcellular fractionation).....	66
2.14	Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting).....	67
2.14.1	Ανοσοαποτύπωμα Western (Western blot).....	69
2.14.2	Επώαση με αντισώματα (Indirect Enzyme Immunoassay) έναντι της πρωτεΐνης Slc25a46	71
2.14.3	Επώαση με αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης GRP75	72
Κεφαλαίο 3:	Αποτελέσματα.....	75

3.1	Χαρακτηριστικά του Slc25a46 ^{m/m} μοντέλου αταξίας και σκοπός της μελέτης.....	75
3.2	Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών και εκτίμηση του αριθμού αντιγραφών	76
3.3	Ποσοτική ανάλυση της έκφρασης του ανθρώπινου Slc25a46 διαγονιδίου σε επίπεδο mRNA.....	78
3.4	Η έκφραση του διαγονιδίου Slc25a46 στο επίπεδο της πρωτεΐνης	82
3.5	Αναστροφή του αταξικού φαινοτύπου παρουσία του ανθρώπινου Slc25a46 διαγονιδίου.....	86
Κεφαλαίο 4: Συμπεράσματα		92
4.1	Δημιουργία και μελέτη της έκφρασης του ανθρώπινου Slc25a46 διαγονιδίου στο επίπεδο του mRNA.....	92
4.2	Η έκφραση του διαγονιδίου Slc25a46 στο επίπεδο της πρωτεΐνης	94
4.3	Διάσωση του αταξικού φαινοτύπου παρουσία του huSlc25a46 διαγονιδίου - Γενετική επιβεβαίωση.....	95
4.4	Μελλοντικοί στόχοι	96
Κεφαλαίο 5: Βιβλιογραφία		97

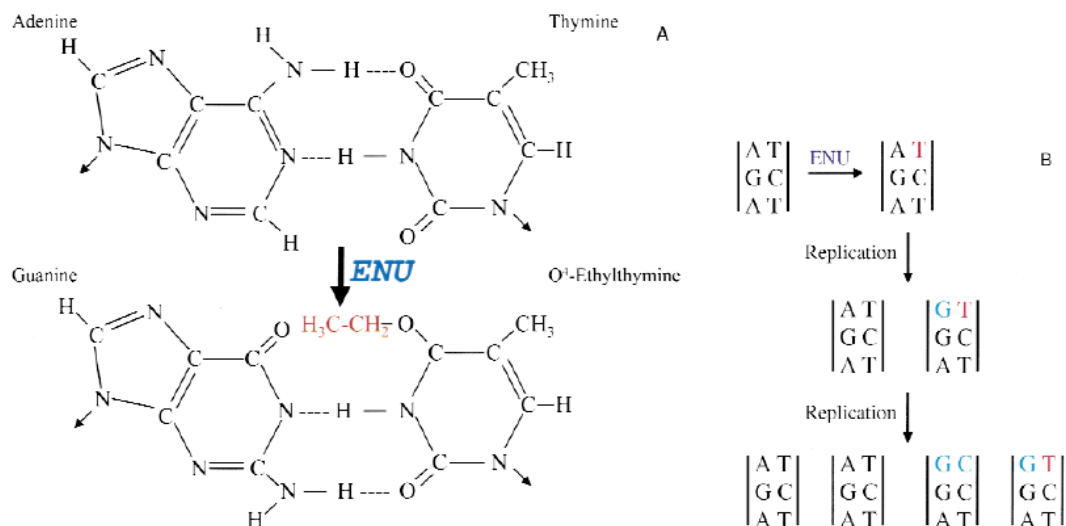
Κεφαλαίο 1: Εισαγωγή

1.1 Εύρεση ενός μοντέλου αταξίας στο ποντίκι με τυχαία μεταλλαξογένεση

1.1.1 Πρόσθια Γενετική και Χημική Μεταλλαξογένεση με ENU

Η Πρόσθια Γενετική (Forward Genetics) αποτελεί ένα σημαντικό κλάδο της Λειτουργικής Γονιδιωματικής (Functional Genomics) που στοχεύει στην εύρεση του γονοτύπου που ευθύνεται για την εκδήλωση ενός φαινοτύπου. Η προσέγγιση αυτή ξεκινά από τον φαινότυπο, και ακολουθούν η γενετική χαρτογράφηση, ο εντοπισμός του υπεύθυνου γονιδίου σε χρωμοσωμική περιοχή και τέλος η ταυτοποίηση της υπεύθυνης μετάλλαξης. Η επαγωγή νέων φαινοτύπων πραγματοποιείται με τυχαία μεταλλαξογένεση από ουσίες όπως η N-αιθυλ-N-νιτροζουρία (N-ethyl-N-nitrosourea, ENU).

Η ENU δημιουργεί σημειακές μεταλλάξεις στο γονιδίωμα, μεταφέροντας την αιθυλομάδα της σε ρίζες οξυγόνου ή αζώτου στις βάσεις του DNA με αποτέλεσμα να γίνει λάθος κατά το ζευγάρωμα και υποκατάσταση (Εικόνα 1.1). Η ENU τροποποιεί κυρίως A / T ζεύγη βάσεων, με 44% A / T -> T / A, 38% A / T -> G / C, 8% G / C -> A / T, 3% G / C -> C / G, 5% A / T -> C / G και 2% G / C -> T / A. Στο επίπεδο της πρωτεΐνης, αυτές οι αλλαγές μπορεί να οδηγήσουν κατά 64% σε μεταλλάξεις με λάθος νόημα (missense mutations) δηλαδή αντικατάσταση αμινοξέων, 10% σε μεταλλάξεις χωρίς νόημα (nonsense mutations) δηλαδή σε εισαγωγή ενός πρόωρου κωδικωνίου λήξης και 26% σε λάθη κατά τη διαδικασία του ματίσματος (splicing errors) (Justice et al., 1999). Οι σημειακές μεταλλάξεις που προκαλούνται από την ENU, επιτρέπουν την ανακάλυψη των λειτουργιών των γονιδίων με ανεπηρέαστο τρόπο και τη δυνατότητα εμφάνισης μιας σειράς αλληλομόρφων από την πλήρη ή μερική απώλεια της λειτουργίας έως την υπερβολική λειτουργία της πρωτεΐνης. Τέτοιες προσεγγίσεις είναι εξαιρετικά σημαντικές για την κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών στις κληρονομήσιμες ανθρώπινες ασθένειες.



Εικόνα 1.1: Η δράση της αιθυλνιτροζουρίας. Το μεταλλαξογόνο ENU προσθέτει μια αλκυλοομάδα στις βάσεις του DNA (A) δημιουργώντας ζεύγη μη συμπληρωματικών βάσεων κατά την αντιγραφή του DNA με αποτέλεσμα την επαγωγή σημειακών μεταλλάξεων (B).

Η ουσία ENU δρα σε όλους τους κυτταρικούς τύπους αλλά κυρίως στα προμειωτικά σπερματογόνια βλαστικά κύτταρα. Επίσης αυξάνει τον αριθμό των μεταλλάξεων έως και 12 φορές σε σχέση με την δράση των ακτίνων X (Cook, et al., 2006). Τα υψηλότερα ποσοστά της μετάλλαξης συμβαίνουν σε προ-μειωτικά σπερματογόνια βλαστικά κύτταρα, και $1,5-6 \cdot 10^{-3}$ είναι η συχνότητα της μετάλλαξης σε μια συγκεκριμένη θέση. Αυτό είναι ισοδύναμο με την απόκτηση μιας μετάλλαξης σε ένα μεμονωμένο γονίδιο της επιλογής σε ένα στους 175-655 γαμέτες μετά την σάρωση.

Η μεταλλαξογένεση επιτυγχάνεται με ενδοπεριτονιακή χορήγηση ENU σε αρσενικό ποντίκι (Γενιά G₀), πραγματοποιώντας με αυτό τον τρόπο ένα μεγάλο αριθμό σημειακών μεταλλάξεων στα σπερματογόνια βλαστικά κύτταρα (Cook, et al., 2006). Η χημική ουσία ENU προκαλεί παροδική στειρότητα περίπου 12 εβδομάδων στο ποντίκι, διότι καταστρέφονται τα υπάρχοντα σπερματοζώαρια και χρειάζονται πάνω από 8 εβδομάδες για να παραχθούν σπερματοζώαρια με ENU-επαγόμενες σημειακές μεταλλάξεις. Στην συνέχεια ο G₀ αρσενικός ζευγαρώνει με άγριου τύπου θηλυκά ποντίκια έτσι ώστε να προκύψουν απόγονοι πρώτης γενιάς για κάποια μετάλλαξη (G₁) που είναι ετερόζυγοι. Για το εντοπισμό των επικρατών κληρονομικών μεταλλαγών η φαινοτυπική ανάλυση μπορεί να γίνει άμεσα στα G₁ άτομα ή στους απογόνους της δεύτερης γενιάς G₂ που προέρχονται από διασταύρωσή του G₁ με θηλυκές φυσικού τύπου. Για τον εντοπισμό των υπολειπόμενων μεταλλάξεων απαιτείται η δημιουργία

και φαινοτυπική ανάλυση απογόνων τρίτης γενιάς G3, που προέρχονται από διασταύρωση του G1 με τις θηλυκές απογόνους του δεύτερης γενιάς G2 (Ντούνη 2011). Στην G3 γενιά υπάρχει 12.5% (1/8) πιθανότητα να βρίσκεται σε ομοζυγωτία κάθε ξεχωριστή μετάλλαξη που μεταφέρει ο G1 αρσενικός (Nelms, et. al., 2001).

1.1.2 Εύρεση του φαινοτύπου της αταξίας

Η ερευνητική ομάδα της Δρ. Ντούνη δημιούργησε στο παρελθόν με ENU-επαγόμενη τυχαία μεταλλαξογένεση στο ποντίκι ένα μοντέλο νευρολογικής νόσου με έντονη αταξία κατά την βάδιση και επιληπτικές κρίσεις που εμφάνισε αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας. Ο φαινότυπος εμφανίζεται μεταξύ της 2^{ης} – 3^{ης} εβδομάδας της ζωής τους και τα ποντίκια ζουν μέχρι 4 μηνών. Τα χαρακτηριστικά της αταξίας είναι πλάγιασμα κατά το περπάτημα με απροσδιόριστα συνεχή αλλαγή κατεύθυνσης, επιληπτικές κρίσεις, μειωμένο βάρος, μειωμένη δραστηριότητα και υπερανάπτυξη των δοντιών (malocclusion). Ο φαινότυπος αυτός εμφανίζεται ταυτόχρονα σε αρσενικά και θηλυκά ποντίκια.

1.1.3 Γενετική ανάλυση και εύρεση της μετάλλαξης στο γονίδιο Slc25a46

Η εύρεση της υπεύθυνης μετάλλαξης πραγματοποιήθηκε με γενετική ανάλυση σαρώνοντας όλο το γονιδίωμα ποντικών είτε με νευρολογικό φαινότυπο είτε χωρίς φαινότυπο με πολυμορφικούς γενετικούς δείκτες. Για να επιτευχθεί γενετική ανάλυση το στέλεχος της μεταλλαξογένεσης (C57BL/6x129SV6) διασταυρώθηκε με το στέλεχος DBA/2J της χαρτογράφησης και προέκυψε η F1 γενιά που ήταν ετερόζυγη ως προς την μετάλλαξη. Τα ποντίκια που ελέγχθησαν γενετικά ήταν F2 γενιάς προερχόμενα από ενδοδιασταύρωση F1 X F1 ετερόζυγων ατόμων (Douni et al., 2012). Σαρώνοντας το γονιδίωμα του ποντικού με γενετικούς δείκτες SSPLs και SNPs η υπεύθυνη μετάλλαξη για τον φαινότυπο της αταξίας εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 18 μέσω της ανάλυσης γενετικής σύνδεσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα R-QTL. Στην συνέχεια, η μετάλλαξη βρέθηκε σε μια περιοχή μεγέθους 48.4 Mb μεταξύ των περιοχών 23.7Mb και 72.1 Mb, που περιέχει 300 γονίδια. Χρησιμοποιώντας περισσότερους γενετικούς δείκτες (SSLPs, SNPs) και μεγαλύτερο αριθμό ατόμων, η μετάλλαξη περιορίστηκε μια περιοχή 2.85 Mb που περιέχει 24 γονίδια. Στο τέλος, με αλληλούχιση των γονιδίων αυτών εντοπίστηκε η υπεύθυνη μετάλλαξη σε ένα νέο

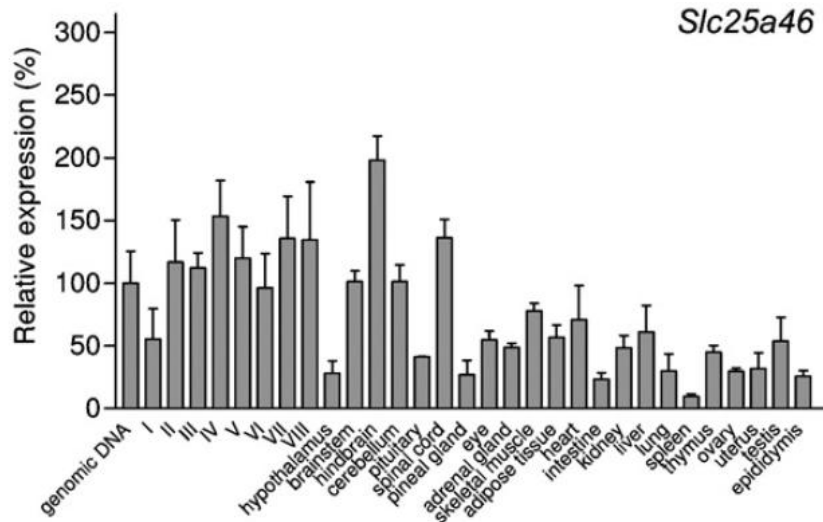
γονίδιο, το Slc25a46, το οποίο ανήκει στην SLC25 (solute carrier family 25) οικογένεια που είναι μιτοχονδριακοί μεταφορείς. Η μετάλλαξη αφορά μια αλλαγή από C (κυτοσίνη) σε T (θυμίνη) στην κωδική περιοχή του γονιδίου Slc25a46 οδηγώντας σε ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης (stop codon) με αποτέλεσμα να παράγεται μια πρωτεΐνη 95 αμινοξέων αντί της άγριου τύπου πρωτεΐνης που έχει 418 αμινοξέα (Καρακώστας, 2010). Η μετάλλαξη αυτή χρησιμοποιείται πλέον για την γονοτυπική ανάλυση όλων των αταξικών απογόνων και την αναγνώριση των ετερόζυγων ατόμων που δεν έχουν τον αταξικό φαινότυπο.

1.1.4 Το γονίδιο Slc25a46

Το γονίδιο SLC25A46 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 (5q22.1) για τον άνθρωπο (*Homo sapiens*) και έχει 27.021 βάσεις από 110.073.837 έως 110.100.857 bp. Για το ποντίκι (*Mus musculus*) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 18 και είναι 29.735 βάσεις από 31.739.822 έως 31.769.556 bp. Ορθόλογα γονίδια Slc25a46 υπάρχουν σε *Caenorhabditis Elegans* (Y40B1B.8), *Drosophila melanogaster* (CG8931, CG5755), αμφίβια (*Xenopus laevis*: 48028059), πτηνά (slc25a46), ερπετά και θηλαστικά (slc25a46) με υψηλό βαθμό συντηρητικότητας. Το γονίδιο Slc25a46 έχει 8 εξόνια και κωδικοποιεί πρωτεΐνη 418 αμινοξέων.

1.1.5 Έκφραση του γονιδίου Slc25a46

Η μελέτη των Haitina et al., 2006, αναφέρει ότι η έκφραση του Slc25a46 στον αρουραίο είναι υψηλότερη στον οπίσθιο εγκέφαλο και την σπονδυλική στήλη (Εικόνα 1.2). Στην μελέτη αυτή φαίνεται ότι τα επίπεδα έκφρασης του Slc25a46 στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) είναι από τα υψηλότερα μεταξύ των μελών της οικογένειας SLC25 και υψηλότερα από τους ιστούς στην περιφέρεια. Άλλη μελέτη (Nishimura et al., 2008), όμως, στην οποία mRNA απομονώθηκε από ανθρώπινους ιστούς έδειξε μεγαλύτερη έκφραση στο σκελετικό μυ και ακολουθούν οι λείοι μύες και η καρδιά, αν και φαίνεται ότι το Slc25a46 γονίδιο εκφράζεται σε όλους τους ιστούς.



Εικόνα 1.2 Σχετική έκφραση του *Slc25a46* γονιδίου σε επίπεδο mRNA στον αρουραίο (Haitina et al., 2006).

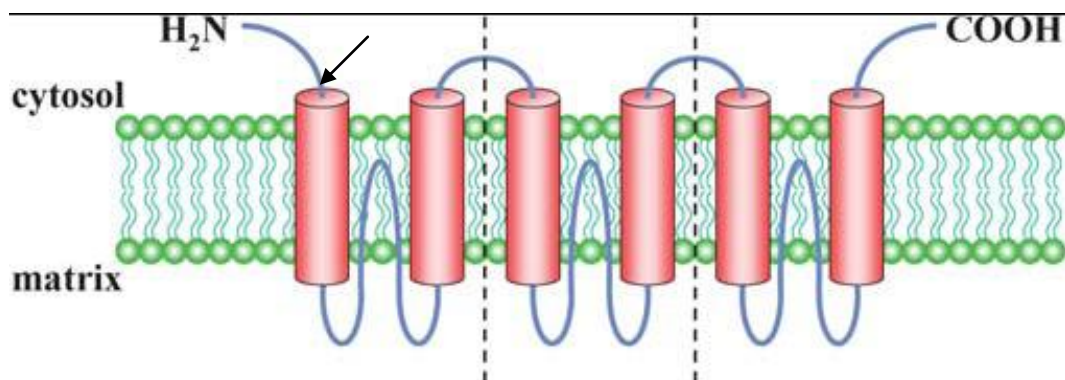
1.1.6 Η μετάλλαξη στην SLC25A46 πρωτεΐνη

Η πρωτεΐνη SLC25A46 κωδικοποιείται από το γονίδιο SLC25A46 (*Homo sapiens*) / *Slc25a46* (*Mus musculus*) και ανήκει στην οικογένεια των μιτοχονδριακών μεταφορέων, SLC25. Έχει 418 αμινοξέα τόσο στο ποντίκι όσο και στον άνθρωπο με αμινοξική ομολογία 89%. Η SLC25A46 πρωτεΐνη όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας αναμένεται να βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, έχει έξι α-έλικες και η λειτουργία της είναι άγνωστη.

Η μετάλλαξη που εντοπίστηκε στο γονίδιο *Slc25a46* αλλάζει ένα νουκλεοτίδιο κυτοσίνης σε θυμίνη, ενώ σε αμινοξικό επίπεδο το 96^ο αμινοξύ, η γλουταμίνη, αλλάζει σε κωδικόνιο λήξης (Εικόνα 1.3). Αυτό βρίσκεται ακριβώς στο αμινοξύ από το οποίο ξεκινάει η πρώτη από τις έξι α-έλικες που εισχωρούν στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Ως αποτέλεσμα η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη αποτελείται από 95 αμινοξέα και περιέχει μόνο το αμινοτελικό άκρο που βρίσκεται στην μεριά του κυτταροπλάσματος (Εικόνα 1.4). Αυτό σημαίνει ότι η εν λόγω πρωτεΐνη έχει χάσει την λειτουργικότητά της και την φυσιολογική της δομή και δεν ενσωματώνεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Καρακώστας, 2010).

10	20	30	40	50	60
MHPRRPEGFD	GLGYRGGVVRD	DPAFGGPFHA	RSFGSGTELG	HWVTTPPDIP	GSRNLHWGEK
70	80	90	100	110	120
SPSYGVPSAP	PTLEGSAAEFP	FPGGGEGPRP	GPSSE ^Q LNRF	AGFGIGLASL	FTENVLAHPC
IVLRRQCQVN	YHARHYHLTP	FSIINIMYSF	NKTQGPRALW	KMGSTFIVQ	GVTLGAEGII
SEFTPLPREV	SHKLNPKQIG	EHLKCLTY	MVAMPFYSAS	LIETVQSEII	RDNTGILECV
KEGIGRVIGL	GVPHSKRLLP	LFSLIFPTVL	HGVLHYIISS	IIQKIVLLIL	KRKTYNшла
ESTSPMQNML	DAYFPELIAN	FAASLCSVDI	LYPLETVLHR	LHIQGTRTII	DNTDLGYEVL
PINTQYEGMR	DCINTIKQEE	GVFGFYKGGF	AVIIQYTLHA	TILQITKMIY	STLLQNSI

Εικόνα 1.3 : Η θέση της μετάλλαξης στην **SLC25A46** πρωτεΐνη: Το 96^ο αμινοξύ που είναι η γλουταμίνη (σε κόκκινο γράμμα) αλλάζει σε κωδικόνιο λήξης (stop codon). (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9CQS4>)



Εικόνα 1.4: Δομικό μοντέλο της **SLC25** οικογένειας των μιτοχονδριακών μεταφορέων. Έξι α-έλικες διαπερνούν την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου με τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα της πρωτεΐνης να βρίσκονται προς την μεριά του κυτταροπλάσματος. Όλη η αλληλουχία διακρίνεται σε τρία όμοια τμήματα με δύο διαμεμβρανικές α-έλικες. Μεταξύ των τμημάτων αυτών οι δύο αυτές α-έλικες ενώνονται με μία μεγάλη υδρόφιλη ενδομιτοχονδριακή δομή (loop) που εισχωρεί μέσα στην μεμβράνη (Palmieri, 2004). Η θέση του κωδικονίου λήξης φαίνεται με τόξο.

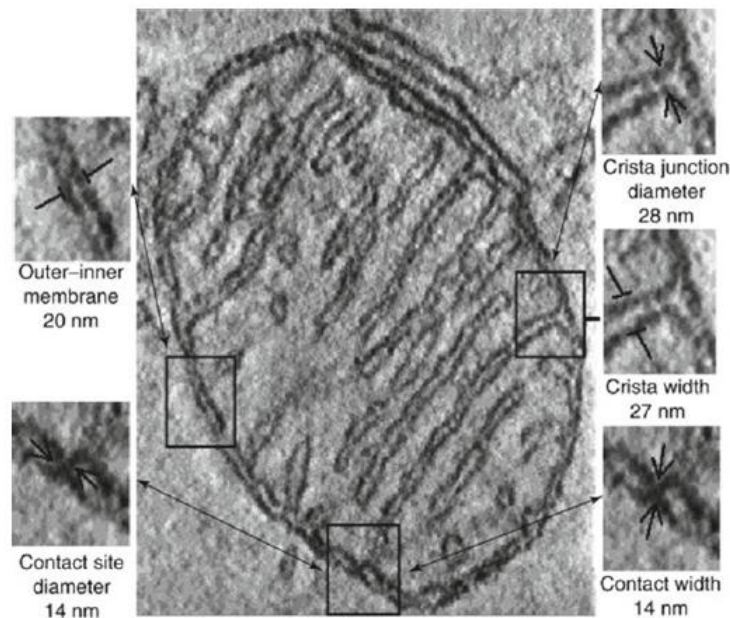
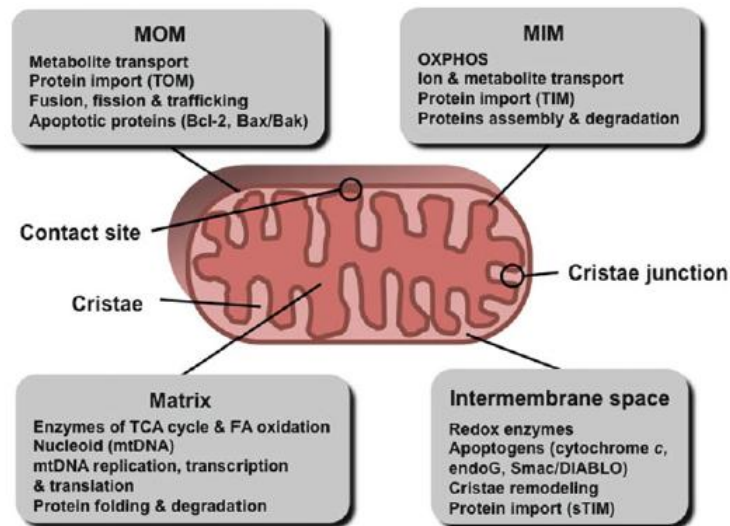
1.2 Η οικογένεια μεταφορέων SLC

Οι μεταφορείς SLC είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες των ευκαρυωτικών κυττάρων και είναι η δεύτερη μεγαλύτερη οικογένεια των μεμβρανικών πρωτεϊνών με τουλάχιστον 384 πρωτεΐνες στο άνθρωπο (Fredriksson, et al. 2008). Οι οικογένειες των SLC μεσολαβούν στη ροή των διαφόρων ουσιών, όπως σάκχαρα, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, ανόργανα ιόντα και φάρμακα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Τα γονίδια SLC ονομάζονται συχνά "υπεροικογένεια" επειδή μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε δεκάδες μικρότερες οικογένειες ανάλογα με το είδος των μορίων των οποίων οι αντίστοιχες πρωτεΐνες μεταφέρουν. Οι οικογένειες αυτές υποδεικνύονται από έναν αριθμό, το γράμμα «Α» και ένα δεύτερο αριθμό που δηλώνει το συγκεκριμένο γονίδιο της οικογένειας αυτής. Για παράδειγμα, το SLC39A1, δείχνει το πρώτο μέλος της οικογένειας 39, που πρόκειται για μεταφορείς ιόντων μετάλλου.

1.3 Η οικογένεια μιτοχονδριακών μεταφορέων SLC25 (SLC25, Solute Carrier Family 25)

1.3.1 Μιτοχόνδρια – Δομή και λειτουργία

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια των ευκαρυωτικών οργανισμών. Αναφέρονται και ως εργοστάσια των κυττάρων, λόγω των μεταβολικών διεργασιών που επιτελούν αποδίδοντας μεγάλα ποσά ενέργειας. Στα μιτοχόνδρια, ο μεταβολισμός των σακχάρων ολοκληρώνεται: το πυροσταφυλικό εισάγεται στο μιτοχόνδριο και οξειδώνεται από το O_2 σε CO_2 και H_2O . Αυτό παράγει 15 φορές περισσότερο ATP από εκείνο που παράγεται από τη γλυκόλυση. Ο αριθμός τους ποικίλει ανάλογα με το είδος των οργανισμών και των κυτταρικών τύπων. Είναι εξαιρετικά κινητικά και πλαστικά οργανίδια, αλλάζοντας συνεχώς το σχήμα τους. Ανάλογα με την κατάσταση του κυττάρου μπορεί να γίνεται σύζευξη μεταξύ διαφορετικών μιτοχονδρίων και στη συνέχεια να χωρίζονται και πάλι (Alberts et al., 2002). Αποτελούνται από δύο μεμβράνες, την εξωτερική που είναι λεία, και την εσωτερική που είναι αναδιπλωμένη και σχηματίζει πολυάριθμες δισκοειδείς ή δακτυλιοειδείς πτυχώσεις (cristae) (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5: Σχηματική αναπαράσταση των μιτοχονδριακών διαμερισμάτων. (Πάνω) Εμφανίζονται οι κύριοι χώροι με τις συγκεκριμένες διεργασίες και τους παράγοντες. Συντομογραφία ως εξής: MIM μιτοχονδριακή εσωτερική μεμβράνη, MOM μιτοχονδριακή εξωτερική μεμβράνη, mtDNA μιτοχονδριακό DNA. (Κάτω) Μία τομή μέσα από την 3D τομογραφία του μιτοχόνδριου (Marin-Garcia, 2013).

Η εξωτερική μεμβράνη (outer membrane) περιέχει πολλά αντίγραφα μιας πρωτεΐνης μεταφοράς που ονομάζεται Porin, η οποία αποτελεί μεγάλα κανάλια μέσα στην διπλοστιβάδα λιπιδίων. Αυτή η μεμβράνη μοιάζει με ένα κόσκινο και είναι διαπερατή σε όλα τα μόρια μέχρι 5000 dalton, συμπεριλαμβανομένων των μικρών πρωτεϊνών. Τέτοια μόρια μπορούν να εισέλθουν στο χώρο μεταξύ των μεμβρανών

(intermembrane), αλλά τα περισσότερα από αυτά δεν μπορούν να περάσουν την αδιαπέραστη εσωτερική μεμβράνη. Έτσι, ενώ ο χώρος ανάμεσα στις δύο μεμβράνες είναι χημικά ισοδύναμος με το κυτταρόπλασμα σε σχέση με τα μικρά μόρια που περιέχει, η μήτρα περιέχει μια επιλογή σε μεγάλο βαθμό από αυτά τα μόρια (Alberts et al., 2002).

Η εσωτερική μεμβράνη (inner membrane) είναι πολύ εξειδικευμένη. Η διπλοστιβάδα των λιπιδίων της περιέχει ένα υψηλό ποσοστό των διπλών φωσφολιπιδίων, της καρδιολιπίνης, η οποία έχει τέσσερα λιπαρά οξέα αντί για δύο και μπορεί να βοηθήσει να γίνει η μεμβράνη πολύ αδιαπέραστη στα ιόντα. Αυτή η μεμβράνη περιέχει επίσης μια ποικιλία των πρωτεϊνών μεταφοράς, που την καθιστούν επιλεκτικά διαπερατή στα μικρά μόρια, τα οποία μεταβολίζονται ή απαιτούνται από τα πολλά μιτοχονδριακά ένζυμα τα οποία συγκεντρώνονται στη μήτρα. Περιέχει πρωτεΐνες με τρεις τύπους λειτουργιών: 1) εκείνες που εκτελούν τις αντιδράσεις της οξειδωτικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, 2) η ATP συνθάση που παράγει ATP στη μήτρα, και 3) οι πρωτεΐνες μεταφοράς που επιτρέπουν το πέρασμα των μεταβολιτών τους μέσα και έξω από την μήτρα. Μια ηλεκτροχημική κλίση H^+ πραγματοποιείται σε αυτή τη μεμβράνη, έτσι ώστε η μεμβράνη να είναι αδιαπέραστη στα ιόντα και στα περισσότερα μικρά φορτισμένα μόρια. Οι αναδιπλώσεις (cristae) αυξάνουν σημαντικά τη συνολική επιφάνεια της εσωτερικής μεμβράνης (Alberts et al., 2002).

Ο χώρος ανάμεσα στις δύο μεμβράνες (intermembrane) περιέχει διάφορα ένζυμα που χρησιμοποιούν το ATP που περνάει έξω από την μήτρα για να φωσφορυλιώσει άλλα νουκλεοτίδια. Η μήτρα περιέχει ένα μείγμα υψηλής συγκέντρωσης των εκατοντάδων ενζύμων, καθώς επίσης και τα αντίγραφα του μιτοχονδριακού DNA, ειδικά μιτοχονδριακά ριβοσώματα, tRNA, και διάφορα ένζυμα που απαιτούνται για την έκφραση των γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA (Alberts et al., 2002).

Παρόλο που η κύρια λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι η σύνθεση του ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αυτά τα οργανίδια επιτελούν και πολλές άλλες λειτουργίες. Λειτουργούν σ' αυτά αρκετά μεταβολικά μονοπάτια, όπως ο κύκλος του κιτρικού οξέος όπου δημιουργούνται και οι ελεύθερες ρίζες (ROS) που παράγονται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, αλλά και άλλες θεμελιώδεις βιολογικές λειτουργίες όπως η Ca^+ κυτταρική σηματοδότηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ο κυτταρικός θάνατος και η κυτταρική απόπτωση. Επίσης αρκετά ένζυμα που εμπλέκονται στην διαχείριση των ελεύθερων ριζών (ROS), στον καταβολισμό των

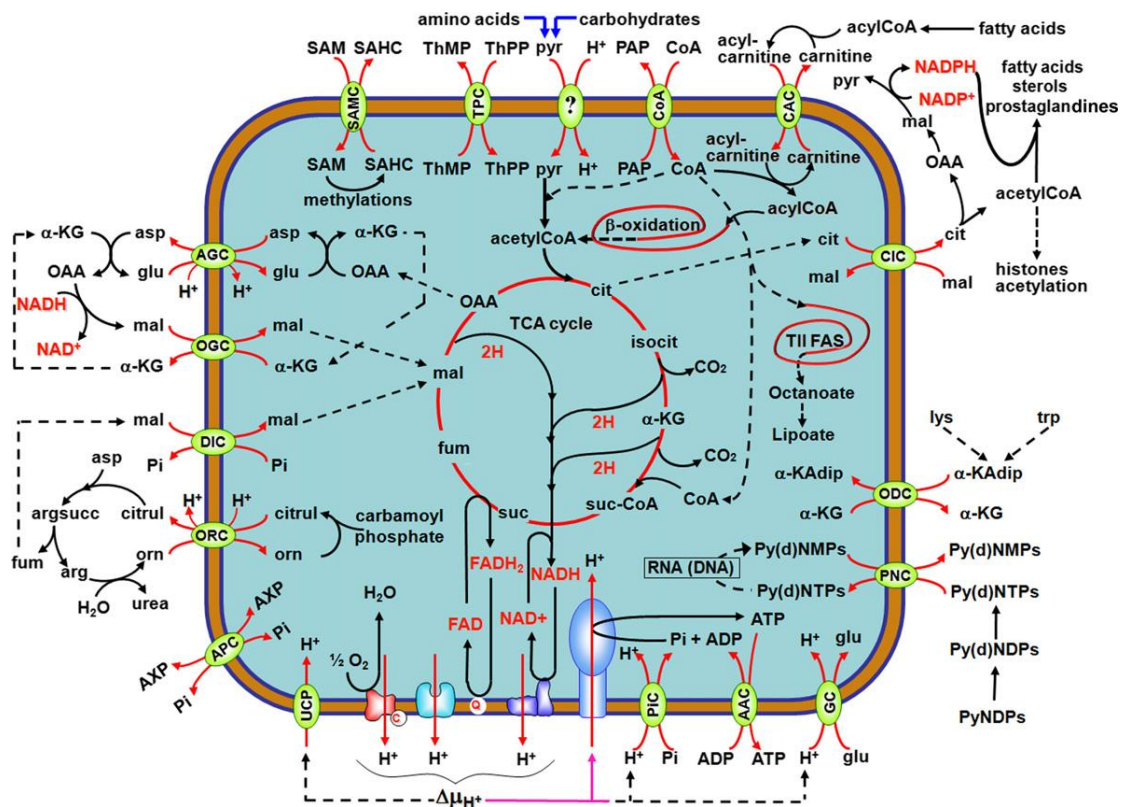
αμινοξέων και στην βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, της χοληστερόλης, των στεροειδών ορμονών, των ουβικουιτινών κ.α. βρίσκονται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Η επικοινωνία των μιτοχονδρίων με άλλα τμήματα του κυττάρου πραγματοποιείται κυρίως από πρωτεΐνες μεταφορείς που βρίσκονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και επιτρέπουν επιλεκτικά την μεταφορά στοιχείων μέσα και έξω από την μιτοχονδριακή μήτρα. Όλοι αυτοί οι μεταφορείς κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρήνα του κυττάρου που μεταφράζονται στο κυτταρόπλασμα απο όπου μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια (Palmieri, 2008).

1.3.2 Η οικογένεια μιτοχονδριακών μεταφορέων SLC (SLC25, Solute Carrier Family 25)

Η SLC25 οικογένεια μεταφορέων είναι η μεγαλύτερη οικογένεια των μεταφορέων διαλυτών ουσιών και περιλαμβάνει τα προϊόντα 53 ανθρώπινων γονιδίων. Τα ανθρώπινα γονίδια SLC25 κατανέμονται αρκετά ομοιόμορφα σε όλα σχεδόν τα χρωμοσώματα αλλά διαφέρουν σημαντικά ως προς την οργάνωση και το μέγεθός τους. Τα γονίδια των SLC25 είναι διαδεδομένα σε ευκαρυωτικά κύτταρα (από πρώτιστα μέχρι μετάζωα). Είναι επίσης παρόντα σε μερικούς ιούς και βακτήρια (*Mimiviridae mimivirus*, *Legionella* και *Neorickettsia spp*), πιθανότατα ως αποτέλεσμα της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων από ένα ευκαρυωτικό ξενιστή σε ένα παθογόνο. Επιπλέον, αυτή η υπεροικογένεια των μεταφορέων δεν περιορίζεται μόνο στα μιτοχόνδρια. Μερικά μέλη της οικογένειας βρίσκονται σε άλλα κυτταρικά οργανίδια, όπως υπεροξυσώματα (SLC25A7) (Agrimi et al., 2012), χλωροπλάστες και μιτοσώματα. Υπάρχουν συνήθως σε πολύ μικρές ποσότητες στις μεμβράνες των οργανιδίων. Τα επίπεδα έκφρασης των MCs (Mitochondrial Carriers) είναι ιδιαίτερα μεταβλητά. Μερικοί MCs κατανέμονται ευρέως σε όλους σχεδόν τους ιστούς ενώ άλλοι είναι ιστοειδικοί και άρα σημαντικοί σε συγκεκριμένες λειτουργίες (Palmieri, 2012).

Τα γνωστά μέλη της SLC25 οικογένειας μεταφέρουν μια ποικιλία διαλυτών ουσιών (κετο οξέα, αμινοξέα, νουκλεοτίδια και συνένζυμα / συμπαραγοντες) κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Εκτός από το να παρέχουν σύνδεση μεταξύ των μιτοχονδρίων και των άλλων κυτταρικών διαμερισμάτων, οι μιτοχονδριακοί μεταφορείς παίζουν ρόλο στη ρύθμιση και τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ του κυτταροπλάσματος και της μιτοχονδριακής μήτρας, για παράδειγμα στις διαδικασίες

της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και της οξειδοαναγωγής (Εικόνα 1.6). Μερικοί μεταφορείς (carriers), είναι ευρέως καταναμημένοι σε όλους ή σχεδόν όλους τους ιστούς, ενώ άλλοι βρίσκονται σε συγκεκριμένους ιστούς και η περιορισμένη κατανομή τους αντικατοπτρίζει τη σημασία τους στους ιστούς αυτούς π.χ. για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων ή τη θερμογένεση.



Εικόνα 1.6: Μεταβολικοί ρόλοι των μιτοχονδριακών μεταφορέων: Φαίνονται 16 μεταφορείς στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη που εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (AAC, PiC, UCP), μονοπάτια οξείδωσης/αναγωγής (AGC, OGC, DIC, CIC, CAC, PyC), ομοίωση της ενδομιτοχονδριακής αποθήκης των νουκλεοτιδίων αδενίνης (APC), μεθυλίωση του μιτοχονδριακού DNA, RNA και μερικών ενδομιτοχονδριακών πρωτεϊνών (SAMC), εισαγωγή της πυροφωσφορικής θειαμίνης (ThPP) και τέλος μπορεί να εμπλέκονται στο μεταβολισμό των αμινοξέων (AGC, ORC, GC, ODC) (Palmieri, 2012).








Οι μιτοχονδριακοί μεταφορείς είναι μικρές πρωτεΐνες οι οποίες συνήθως έχουν μοριακό βάρος περίπου 30-34 kDa. Ένα κύριο χαρακτηριστικό είναι η παρουσία τριών επαναλαμβανόμενων ομόλογων δομών μεγέθους περίπου 100 αμινοξέων η καθεμία (Εικόνα 1.4). Κάθε δομή περιλαμβάνει δύο υδρόφοβες περιοχές που διαπερνούν την εσωτερική μεμβράνη ως α-έλικες με μια χαρακτηριστική ακολουθία

που έχει το μοτίβο P-X-[DE]-X-X-[K/R]-X-[K/R]-(20-30 κατάλοιπα)-[DE]-G-X-X-X-X-[WYF]-[KR]-G. Κάθε μονομερές μιτοχονδριακού μεταφορέα έχει 6 έλικες που διασχίζουν την μεμβράνη και συνδέονται με υδρόφιλους βρόγχους με την αμινοτελική ή την καρβοξυτελική περιοχή. Τα υποστρώματα που μεταφέρονται από τους μιτοχονδριακούς μεταφορείς σαφώς διαφέρουν όχι μόνο στη φύση (ανιόντα, κατιόντα) και στη δομή, αλλά και σε μέγεθος, από το μικρότερο, H^+ , μέχρι το μεγαλύτερο και πιο πολύ φορτισμένο από τα μεταφερόμενα είδη μέσω μεμβρανών, π.χ., NAD^+ , FAD και το συνένζυμο A. Επιπλέον, η πλειονότητα των μιτοχονδριακών μεταφορέων καταλύουν αντιδράσεις ανταλλαγής υποστρώματος με αναλογία 1:1. Μόνο λίγα μεσολαβούν για τη μεταφορά των υποστρωμάτων με μονή κατεύθυνση. Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί περίπου 53 SLC25 μιτοχονδριακούς μεταφορείς. Από αυτούς 30 έχουν μελετηθεί ως προς τη λειτουργία και τη μεταφορά υποστρώματος. Η πρωτεΐνη SLC25A46 που μελετάται στην παρούσα εργασία έχει χαρακτηριστικά μιτοχονδριακού μεταφορέα αλλά η λειτουργία της παραμένει άγνωστη.

1.3.3 Λειτουργικές ιδιότητες της SLC25 οικογένειας

Το μεγάλο μέρος των πληροφοριών σχετικά με τις λειτουργικές ιδιότητες των MCs προέρχεται από τις μελέτες σε λιπώματα τα οποία ανασυστάθηκαν είτε με τους καθαρισμένους μητρικούς μεταφορείς από τα μιτοχόνδρια ή, πιο συχνά, με τους μεταφορείς που εκφράζονται ετερόλογα (Palmieri et al., 1993, 2011, Palmieri και Pierri, 2010). Ίσως το πιο εντυπωσιακό χαρακτηριστικό μεταξύ των SLC25 μελών είναι η ποικιλία των διαλυτών ουσιών που μεταφέρουν. Τα χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας SLC25 μεταφέρουν ένα ευρύ φάσμα διαλυτών ουσιών που ποικίλουν ευρέως στη δομή και το μέγεθος. Τα περισσότερα από τα υποστρώματα που μεταφέρονται είναι αρνητικά φορτισμένα, αλλά μερικά είναι θετικά φορτισμένα ή διπολικά ιόντα (zwitterions) σε φυσιολογικές τιμές pH. Σύμφωνα με την ειδικότητα του υποστρώματος τους, οι MCs μπορούν να χωριστούν σε φορείς για καρβοξυλικά, κέτο οξέα, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, δινουκλεοτίδια και άλλα υποστρώματα. Κάθε ομάδα διαιρείται περαιτέρω σε αρκετές υπο-οικογένειες. Μέχρι τώρα, οι 24 MC υπο-οικογένειες έχουν αποκαλυφθεί και χαρακτηριστεί με βάση την εξειδίκευση του υποστρώματος και των κινητικών ιδιοτήτων. Συνήθως υπάρχουν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, αυτές οι υπο-οικογένειες αποτελούνται από: τους φορείς για

την ADP και ATP, CoA και αδενοσίνη 3',5'-διφωσφορική (PAP), ATP-Mg και φωσφορικά (Pi), πυροφωσφορική θειαμίνη, νουκλεοτίδια της πυριμιδίνης, FAD και φυλλικού οξέος, νουκλεοτίδια της αδενίνης (σε υπεροξεισώματα), NAD⁺, GTP και GDP, οξογλουταρικό, δι-και τρι-καρβοξυλικά, ηλεκτρικό και φουμαρικό, κιτρικό, οξαλοξικό και το θεικό, γλουταμικό, ασπαρτικό και γλουταμικό, ορνιθίνη και άλλα θετικά φορτισμένα αμινοξέα, καρνιτίνη και ακυλοκαρνιτίνες, SAM, Pi και τους μεταφορείς του H⁺ (UCPs) (Palmieri et al., 2011), και τον μεταφορέα των CoA / FAD / NAD⁺ στα υπεροξεισώματα (Agrimi et al., 2012). Καθε μία από αυτές τις υπο-οικογένειες χαρακτηρίζεται όχι μόνο από την ειδικότητα του υποστρώματος, αλλά επίσης και από τους ιδιαίτερους συνδυασμούς αμινοξέων (Robinson et al, 2008, Palmieri et al, 2011). Αξίζει να σημειωθεί ότι το καλύτερο υπόστρωμα που μεταφέρεται με τα ανασύσταμενα λιποσωμάτα μπορεί να μην είναι πάντα το πραγματικό υπόστρωμα κάτω από τις φυσιοπαθολογικές συνθήκες. Ένας λόγος είναι ότι μπορεί να υπάρχουν περισσότερα από ένα μεταφερόμενα υποστρώματα στο κυτταρόπλασμα και / ή στην μιτοχονδριακή μήτρα και οι αναλογίες της συγκέντρωσής τους μπορεί να διαφέρουν στα διαφορετικά κύτταρα ή στο ίδιο το κύτταρο. Επιπλέον, υπάρχει πιθανότητα ορισμένες υπο-οικογένειες να μεταφέρουν πρόσθετα υποστρώματα που ακόμη δεν έχουν δοκιμαστεί (Marobbio et al., 2008).

	Transport mode	Driving force	Mitochondrial carrier
	<i>cytosol</i> <i>matrix</i>		
uniport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \log \left(\frac{[S_c]}{[S_m]} \right)$	carnitine / acylcarnitine
symport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \log \left(\frac{[S_c^-]}{[S_m^-]} \right) + 2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \Delta pH$	glutamate, phosphate
antiport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \log \left(\frac{[S_m^+]}{[S_c^+]} \right) + 2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \Delta pH$	ornithine / H ⁺ (in yeast)
antiport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \log \left(\frac{[S_{1c}^{2-}][S_{2m}^{2-}]}{[S_{1m}^{2-}][S_{2c}^{2-}]} \right)$	oxoglutarate / malate
antiport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \left[\log \left(\frac{[S_{1c}^{3-}][S_{2m}^{4-}]}{[S_{1m}^{3-}][S_{2c}^{4-}]} \right) \right] + \Delta \Psi$	ADP / ATP
antiport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \left[\log \left(\frac{[S_{1c}^-][S_{2m}^-]}{[S_{1m}^-][S_{2c}^-]} \right) \right] + 2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \Delta pH + \Delta \Psi$	aspartate / glutamate
antiport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \left[\log \left(\frac{[S_{1c}^{4-}][S_{2m}^{3-}]}{[S_{1m}^{4-}][S_{2c}^{3-}]} \right) \right] + 2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \Delta pH$	GTP / GDP

Εικόνα 1.7: Οι τρόποι των μεταφορών στους μιτοχονδριακούς μεταφορείς (Palmieri, 2012).

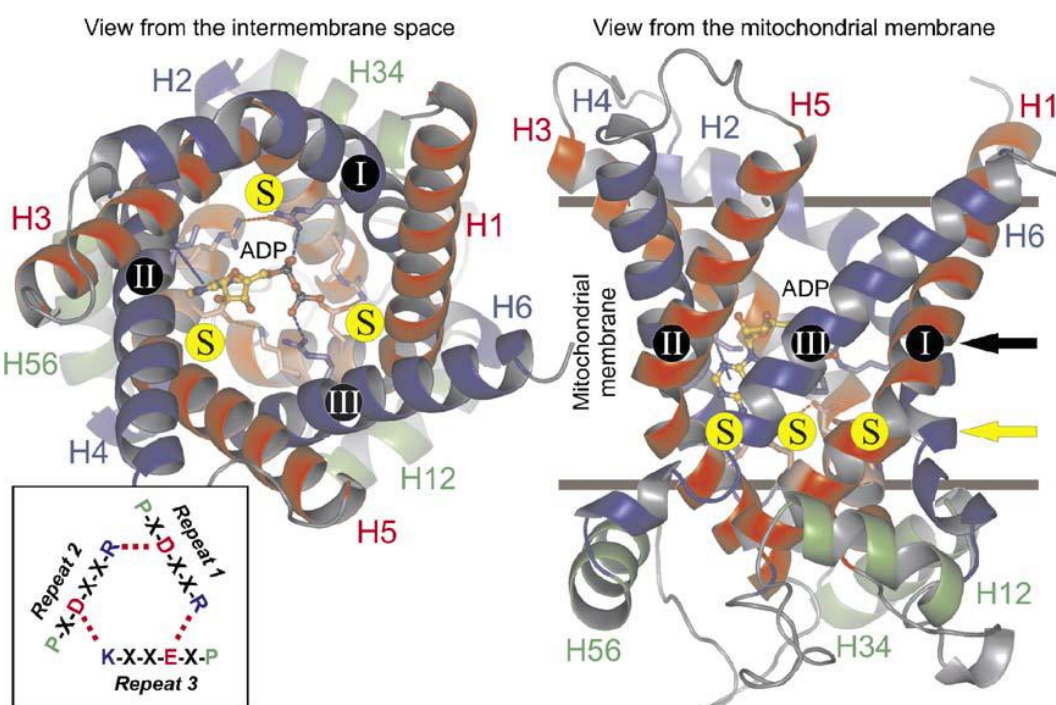
Οι MCs, επίσης, διαφέρουν ως προς τον τρόπο μεταφοράς που καταλύουν (Εικόνα 1.7). Η πλειοψηφία των MCs μεσολαβούν στην ανταλλαγή υποστρωμάτων (αντιμεταφορείς, antiports) από αντίθετες πλευρές της μεμβράνης, άλλοι συµμεταφέρουν H^+ και ένα υποστρώμα (symports) από τη μία πλευρά της μεμβράνης στην άλλη και μερικοί MCs καταλύουν μεταφορές μονής κατεύθυνσης (συµμεταφορείς, uniports). Αυτοί οι τρόποι μεταφοράς μπορεί να είναι ηλεκτροφορητικοί (ηλεκτρογενής), όταν ένα ηλεκτρικό φορτίο μετατοπίζεται κατά την αντίδραση μεταφοράς, ή ηλεκτρο-ουδέτεροι. Η ηλεκτρο-ουδετερότητα γενικά επιτυγχάνεται με ταυτόχρονη κίνηση H^+ , με την ανταλλαγή διαλυτών ουσιών με ισότιμο φορτίο, ή ηλεκτρικά ουδέτερων διαλυτών ουσιών. Κατά συνέπεια, ως κινητήρια δύναμη οι MCs χρησιμοποιούν (i) τη διαβάθμιση συγκέντρωσης των μεταφερόμενων διαλυτών ουσιών και (ii) είτε τη διαβάθμιση H^+ που δημιουργείται κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης από τη δράση της αναπνευστικής αλυσίδας.

1.3.4 Δομή

Οι περισσότερες από τις απομονωμένες πρωτεΐνες των μιτοχονδριακών μεταφορέων σχηματίζουν ομοδιμερή με πιθανό ρόλο στον μηχανισμό μεταφοράς μέσω της δημιουργίας καναλιών. Αν πράγματι οι μιτοχονδριακοί μεταφορείς λειτουργούν ως διμερή, η δομή τους αποτελείται από 12 διαμεμβρανικά τμήματα, όπως στην πλειοψηφία των μεταφορέων πρωτεϊνών (Palmieri, 2004).

Σύμφωνα με την προτεινόμενη δομή και τα υδρόφοβα προφίλ της αμινοξικής ακολουθίας των μεταφορέων, προτάθηκε ότι κάθε μία από τις τρεις επαναλήψεις περιέχει δύο α-έλικες που διασχίζουν τη μεμβράνη σχηματίζοντας μια δομή με ένα σύνολο από έξι α-έλικες. Τα N- και C-τελικά άκρα εκτίθενται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης, οι βρόγχοι που συνδέουν τις δύο α-έλικες της κάθε επανάληψης βρίσκονται στην πλευρά της μήτρας, και τα δύο μικρότερα τμήματα που συνδέουν τις τρεις επαναλήψεις βρίσκονται στην κυτταροπλασματική πλευρά (Palmieri, 1994; Capobianco, et. al., 1995). Το 2003 προσδιορίστηκε η 3D δομή του μιτοχονδριακού μεταφορέα του ADP / ATP μαζί με

έναν αναστολέα του (Pebay-Peyroula, et. al., 2003) δείχνοντας ότι η βασική δομή των 6 α -ελίκων παρουσιάζει μια τριμερή ψευδοσυμμετρία (Εικόνα 1.8). Οι 6 διαμεμβρανικές α -έλικες (H1-H6) σχηματίζουν μια κοιλότητα χωνιού η οποία είναι ανοικτή προς το κυτταρόπλασμα αριστερόστροφα. Οι προλίνες του χαρακτηριστικού μοτίβου κλείνουν την κοιλότητα στην πλευρά της μήτρας, ενώ οι α -έλικες συγκρατούνται μεταξύ τους με γέφυρες άλατος που σχηματίζονται μεταξύ των φορτισμένων αμινοξέων του χαρακτηριστικού μοτίβου (Εικόνα 1.8). Η αναδιευθέτηση των δεσμών αυτών μπορεί να ανοίξει την κοιλότητα στην πλευρά της μιτοχονδριακής μήτρας. Η τριτοταγής αυτή δομή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για την μοντελοποίηση άλλων μιτοχονδριακών μεταφορέων.

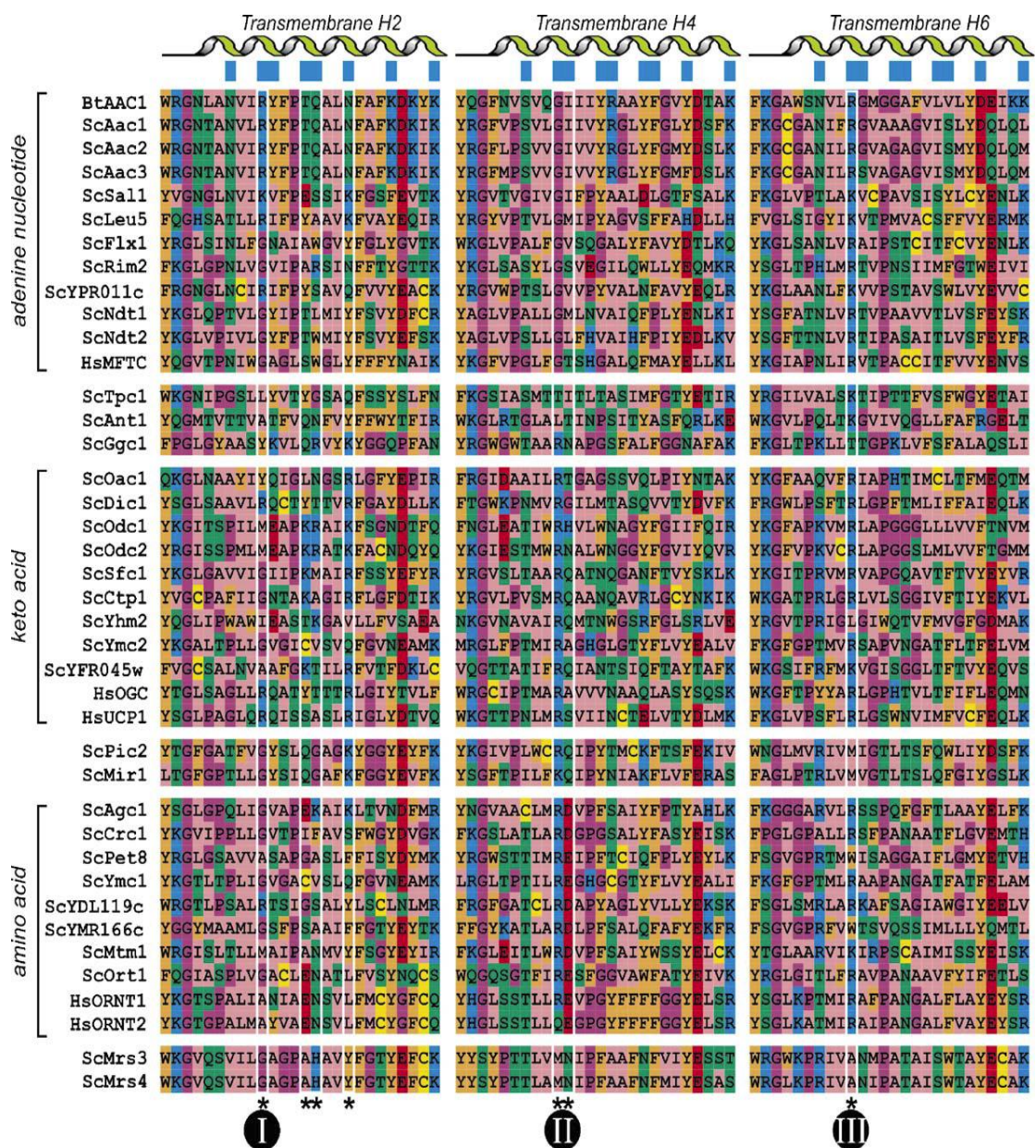


Εικόνα 1.8: Η τριτοταγής πρόβλεψη για τον μεταφορέα της ADP / ATP. Η δομή του μεταφορέα ADP / ATP, BtAAC1 (βοός), όπως φαίνεται από τον ενδιάμεσο μεμβρανικό χώρο (αριστερά) και από τη μεμβράνη (δεξιά). Οι μονές, ζυγές και μητρικές α -έλικες είναι χρωματισμένες με κόκκινο, μπλε και πράσινο, αντίστοιχα. Το δίκτυο της γέφυρας άλατος στο κάτω μέρος της κοιλότητας υποδεικνύεται με το γράμμα S και από τις κόκκινες διακεκομμένες γραμμές μεταξύ των θετικών και αρνητικών αμινοξέων του μοτίβου. Επίσης, εμφανίζεται η σχηματική απεικόνιση του δικτύου της γέφυρας άλατος στο κάτω μέρος της κοιλότητας. Ένα μόριο ADP συνδέεται με το προτεινόμενο σημείο σύνδεσης του υποστρώματος στα σημεία επαφής I, II, και III (Kunji et al., 2006).

1.3.5 Ανάλυση της ευθυγράμμισης ακολουθίας

Με την εξέταση των διατηρημένων αμινοξέων στις ευθυγραμμίσεις των μιτοχονδριακών μεταφορέων με γνωστή ειδικότητα του υποστρώματος και τη χρήση συγκριτικών μοντέλων, οι Robinson και Kunji πρότειναν ένα "κοινό σημείο δέσμευσης του υποστρώματος" στους μιτοχονδριακούς μεταφορείς (Εικόνα 1.9) (Robinson et al., 2006). Η θέση αυτή σχηματίζεται από τα αμινοξέα των τριών διαμεμβρανικών α-ελίκων του ζυγού αριθμού που προεξέχουν στην κοιλότητα του μεταφορέα προς το μέσον της μεμβράνης, πάνω από την γέφυρα άλατος που κλείνει την κοιλότητα. Μεταξύ των προτεινόμενων τριών σημείων επαφής, το σημείο II στην 4^η έλικα είναι το πιο σημαντικό, διότι μόνο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάκριση μεταξύ των αμινοξέων, των καρβοξυλικών οξέων (συμπεριλαμβανομένων των κετο οξέων) και των νουκλεοτιδίων. Στην πραγματικότητα, το σημείο II αναπαρίσταται από R-[D E] στους μεταφορείς αμινοξέων, από R-[QHNTAV] στους μεταφορείς καρβοξυλικών οξέων και G-[IVLMT] στην μεταφορείς νουκλεοτιδίων. Υπάρχουν, ωστόσο, ορισμένες εξαιρέσεις. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι τα αμινοξικά κατάλοιπα των διαμεμβρανικών α-ελίκων του μονού αριθμού που προεξέχουν στην κοιλότητα στο επίπεδο των σημείων της επαφής I, II και III μπορούν επίσης να συμμετάσχουν στη δέσμευση του υποστρώματος. Επιπλέον, ορισμένες μεταλλάξεις στα κατάλοιπα της έλικας του μονού αριθμού στο ύψος των σημείων της επαφής (π.χ., G133, A134 και S237 για τον μεταφορέα του οξογλουταρικού και H32 για τον μεταφορέα του Pi) αναστέλλουν τις δραστηριότητες των μεταφορών (Carrello et al., 2007; Phelps et al., 1996).

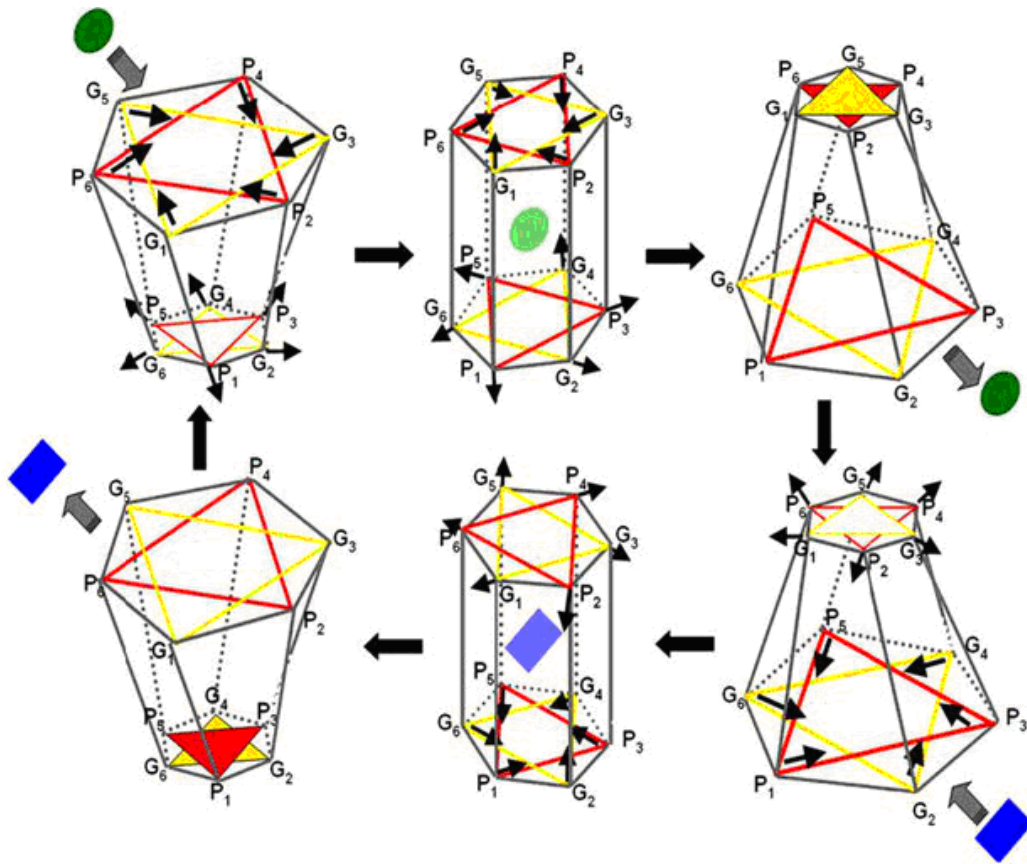
Η σύγκριση των περιοχών ανάμεσα στα επαναλαμβανόμενα χαρακτηριστικά μοτίβα μεταξύ των μιτοχονδριακών μεταφορέων με γνωστή λειτουργία (ειδικότητα του υποστρώματος) αποκάλυψε τριπλέτες οι οποίες μπορεί να είναι συμμετρικές, που αποτελούνται από τα τρία όμοια αμινοξέα, ή ασύμμετρες, που αποτελούνται από διαφορετικά αμινοξέα (Robinson et al., 2008). Οι εξαιρετικά συμμετρικές και διατηρημένες τριπλέτες είναι σημαντικές για τη δομή και / ή τον μηχανισμό μεταφοράς, ενώ οι ασύμμετρες τριπλέτες είναι σημαντικές για την αναγνώριση ή / και πρόσδεση του υποστρώματος (που έχει συνήθως μια ασύμμετρη κατανομή των λειτουργικών ομάδων).



Εικόνα 1.9: Η ευθυγράμμιση ακολουθίας των αμινοξέων των ζυγών διαμεμβρανικών α-έλκων των μιτοχondριακών μεταφορέων της ζύμης και του ανθρώπου που ομαδοποιήθηκαν από τον τύπο του υποστρώματος. Το μπλε κουτί πάνω από την ευθυγράμμιση δείχνει τα κατάλοιπα που βλέπουν την κοιλότητα. Η ευθυγράμμιση είναι στο σύστημα του χρωματισμού ZAPPO. Τα τρία σημεία επαφής σημειώνονται με αστερίσκο και με ένα λευκό πλαίσιο γύρω από τα σχετικά κατάλοιπα. Η συντομογραφίες Bt είναι για τα βοοειδή (*Bos taurus*), Hs για τον άνθρωπο (*Homo sapiens*), και Sc για τη ζύμη (*Saccharomyces cerevisiae*) (Kunji et al., 2006).

1.3.6 Μηχανισμός μεταφοράς

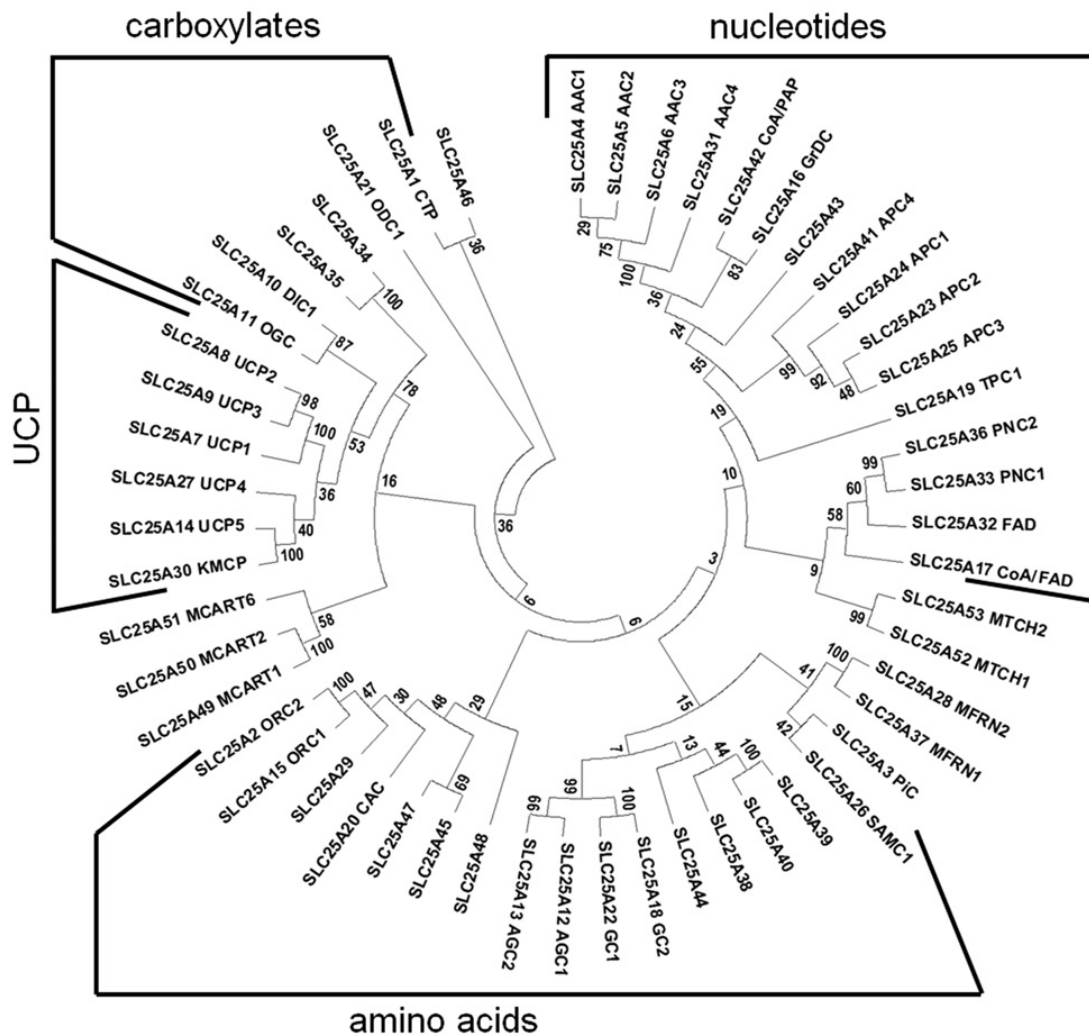
Κατά τη διάρκεια του κύκλου της μεταφοράς του υποστρώματος, ο μεταφορέας υποβάλλεται σε μια αναστρέψιμη αλλαγή της διαμόρφωσή του μεταξύ της c-κατάστασης και της m-κατάστασης. Στην πρώτη περίπτωση, η θέση σύνδεσης με το υπόστρωμα εκτίθεται προς το κυτταρόπλασμα και στη δεύτερη προς τη μιτοχονδριακή μήτρα. Η κύρια ιδέα αυτής της υπόθεσης είναι η παρουσία μιας και μόνης θέσης δέσμευσης του υποστρώματος (στην κοιλότητα), όπου σύμφωνα με αυτό το μηχανισμό η σύνδεση του υποστρώματος σε μία πλευρά προκαλεί δομικές αλλαγές στον μεταφορέα του οποίου ο αναπροσανατολισμός της δέσμευσης γίνεται προς την αντίθετη πλευρά (Klingenberg, 1976). Το υπόστρωμα τώρα απομακρύνεται από την θέση μεταφοράς και επιτρέπεται σε άλλο υπόστρωμα να δεσμευθεί και να μεταφερθεί στην αντίθετη κατεύθυνση (Εικόνα 1.10). Ο μηχανισμός αυτός προτάθηκε αρχικά για τον μεταφορέα της ADP / ATP λόγω της ύπαρξης υψηλής συγγένειας των αναστολέων που συνδέονται με το μεταφορέα είτε στην κυτταροπλασματική πλευρά ή στην πλευρά της μήτρας. Αν και η ύπαρξη της c-κατάστασης έχει αποδειχθεί με την κρυσταλλική δομή, η τριαδιασταστική δομή των μιτοχονδριακών μεταφορέων στην m-κατάσταση δεν είναι ακόμη διαθέσιμη.



Εικόνα 1.10: Σχηματική αναπαράσταση των διαμορφωτικών αλλαγών στον μιτοχονδριακό μεταφορέα που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του κύκλου μεταφοράς. Τα υποστρώματα εισέρχονται είτε από το κυτταρόπλασμα προς την μήτρα (πράσινο οβάλ) είτε από την μήτρα στην κυτταροπλασματική πλευρά (μπλε παραλληλόγραμμο) (Palmieri et al., 2009).

1.3.7 Φυλογενετική ανάλυση

Το φυλογενετικό δέντρο της ανθρώπινης οικογένειας SLC25 δείχνει μια σαφή ομαδοποίηση των μεταφορέων οι οποίοι μεταφέρουν το ίδιο υπόστρωμα (Εικόνα 1.11). Μελέτη για την οικογένεια SLC6 στο παρελθόν δείχνει ότι πρωτεΐνες που σχετίζονται φυλογενετικά έχουν τα ίδια ή παρόμοια υποστρώματα. Γι' αυτό μπορεί κανείς να κάνει υποθέσεις σχετικά με την πιθανή προτίμηση του υποστρώματος και τις λειτουργικές ιδιότητες στους πρόσφατα εντοπιζόμενους της SLC25 οικογένειας μέλη (Haitina et al, 2006). Αξίζει να σημειωθεί ότι ούτε με την φυλογενετική ανάλυση αναδεικνύεται μια ομαδοποίηση της SLC25A46 πρωτεΐνης με άλλους μεταφορείς που έχουν γνωστά υποστρώματα.



Εικόνα 1.11: Η φυλογενετική ανάλυση αμινοξικών ακολουθιών των 53 ανθρώπινων SLC25 πρωτεϊνών. Το όνομα του γονιδίου και ψευδώνυμο που περιγράφει τη λειτουργία φορέα αναφέρονται σε κάθε κόμβο φύλλου. Τονίζονται οι κλάδοι των αποσυνδέσεων πρωτεϊνών (UCP) και των φορέων που μεταφέρουν νουκλεοτίδια, καρβοξυλικά και αμινοξέα. (Palmieri, 2012).

1.3.8 Εξέλιξη της οικογένειας SLC25

Τα διαφορετικά μέλη της οικογένειας μιτοχondριακών μεταφορέων SLC25 διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους γιατί έχουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Η πλειοψηφία των μελών της οικογένειας SLC25 βρίσκονται σε οργανισμούς που εκτείνονται σε όλο το βασίλειο ευκαρυωτικών, και συνήθως δεν εντοπίζονται σε συγκεκριμένους ιστούς, κάτι που είναι σύμφωνο με την καθολική ανάγκη για μιτοχondριακές ενεργειακές διαδικασίες (Schlessinger et al., 2010).

Η οικογένεια SLC25 είναι μια αρχαία οικογένεια που βρίσκεται και στα προκαρυωτικά και μονοκυτταρικά ευκαρυωτικά κύτταρα, έτσι δεν είναι έκπληξη το γεγονός ότι έχει παρεκκλίνει από άλλες οικογένειες μεταφορέων αρκετά ώστε να μην ανιχνεύεται ομοιότητα αλληλουχίας μεταξύ τους. Αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν πιθανή απόκτηση σύντομων μοτίβων υπεύθυνων για τις διαφορετικές λειτουργίες των διαφόρων μελών της οικογένειας. Είναι ενδιαφέρον ότι οι ακολουθίες SLC25 είναι σε σχετικά υψηλό βαθμό διατηρημένες μέσα στη οικογένεια, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί για την εξέλιξή τους παρά τις ποικίλες ιδιαιτερότητες υπόστρωμα τους (Schlessinger et al., 2010).

Με πλήρη ευθυγράμμιση των ανθρωπίνων MCs εμφανίζονται μόνο 5 θέσεις στις οποίες παρατηρούνται ταυτόσημα κατάλοιπα και μόλις 9 θέσεις στις οποίες βρίσκονται ιδιαίτερα συντηρημένες υποκαταστάσεις (Palmieri et al., 2012). Δεδομένου ότι οι MCs του *H. sapiens*, του *S. cerevisiae* και *A. thaliana* βρίσκονται στους ίδιους κλάδους με πολύ λίγες εξαιρέσεις, μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι ένας κοινός πρόγονος για όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα κατείχε ήδη πολλές λειτουργίες του MCs που έχουν διατηρηθεί στα φυτά, στους μύκητες και στα ζώα (Palmieri et al., 2011). Όσον αφορά την πρόιμη εξέλιξη των MCs, τα δομικά χαρακτηριστικά τους δείχνουν σαφώς ότι προκύπτουν από τον τριπλασιασμό της αρχέγονης δομής των δύο α-ελίκων. Επιπλέον, δεδομένου ότι υπάρχει μια μικρή ομοιότητα μεταξύ των δύο ελίκων, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η αρχέγονη αυτή δομή μπορεί να εξελίχθηκε από το διπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA που κωδικοποιεί για ένα μόνο διαμεμβρανικό τμήμα (Fiermonte et al., 1999).

1.3.9 Ασθένειες που προκαλούνται από μιτοχονδριακούς μεταφορείς SLC25

Οι ασθένειες που σχετίζονται με τους μιτοχονδριακούς μεταφορείς είναι σπάνιες διαταραχές του μεταβολισμού και προκαλούνται από μεταλλάξεις στα πυρηνικά γονίδια που κωδικοποιούν για μιτοχονδριακούς μεταφορείς. Υπάρχουν αρκετές ασθένειες που προκαλούνται από μεταλλάξεις στους μιτοχονδριακούς μεταφορείς της οικογένειας SLC25 (Πίνακας 1.1). Όλες αυτές οι ασθένειες ακολουθούν μεντελιανή κληρονομικότητα και συγκεκριμένα κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο

τρόπο, με εξαίρεση την αυτοσωμική επικρατή προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (adPEO).

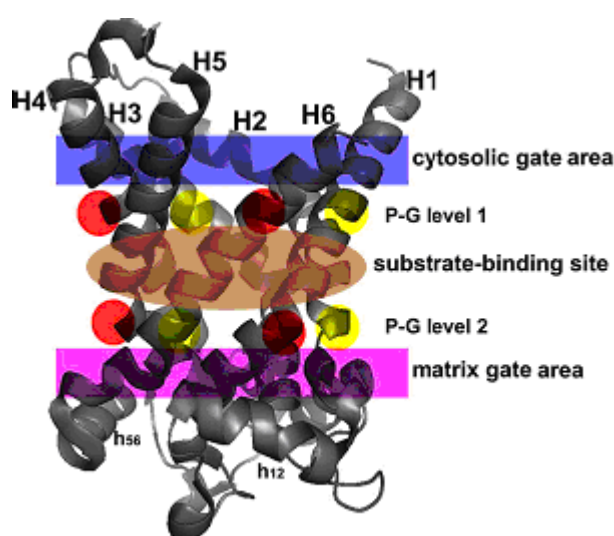
Ασθένεια	Γονίδιο	Μεταφορέας	Υπόστρωμα
Ανεπάρκεια PiC	SLC25A3	PiC	Φωσφορικό
Ανεπάρκεια ACC1	SLC25A4	AAC1	ADP/ATP
Αυτοσωμική επικρατής προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία	SLC25A4	AAC1	ADP/ATP
Ανεπάρκεια AGC1	SLC25A12	AGC1	Ασπαρτικό/ γλουταμινικό
Ανεπάρκεια AGC2	SLC25A13	AGC2	Ασπαρτικό/ γλουταμινικό
Σύνδρομο HHH	SLC25A15	ORC1	Ορνιθίνη/ κιτροουλίνη
Εκ γενετής μικροκεφαλία Amish	SLC25A19	TPC	Πυροφωσφορική θειαμίνη
Νευροπάθεια με αμφίπλευρη νέκρωση του ραβδωτού σώματος	SLC25A19	TPC	Πυροφωσφορική θειαμίνη
Ανεπάρκεια CAC	SLC25A20	CAC	Καρνιτίνη/ ακυλοκαρνιτίνη
Πρόωρη επιληπτική εγκεφαλοπάθεια	SLC25A22	GC1	Γλουταμινικό
Συγγενής σιδηροβλαστική αναιμία	SLC25A38	–	?

Πίνακας 1.1 Οι ασθένειες που σχετίζονται με μιτοχονδριακούς μεταφορείς της οικογένειας SLC25.

Οι μιτοχονδριακές ασθένειες που οφείλονται σε μεταλλάξεις των μιτοχονδριακών μεταφορέων SLC25 χωρίζονται σε δύο ομάδες. Η πρώτη αφορά μεταλλάξεις στους μιτοχονδριακούς μεταφορείς που συνδέονται άμεσα με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, όπως ο ADP / ATP μεταφορέας και ο PiC. Η συμπτωματολογία των ασθενειών αυτών χαρακτηρίζεται από μειωμένη παραγωγή ενέργειας στους ιστούς όπου εκφράζονται οι μεταφορείς και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η δεύτερη ομάδα ασθενειών οφείλεται σε μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν για μιτοχονδριακούς μεταφορείς που συμμετέχουν σε μιτοχονδριακές λειτουργίες εκτός από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η

συμπτωματολογία τους εξαρτάται από το μεταβολικό μονοπάτι που επηρεάζεται και τη σημασία του σε συγκεκριμένους ιστούς.

Είναι ενδιαφέρον ότι μεταξύ των 48 παρερμηνεύσιμων μεταλλάξεων που βρέθηκαν μέχρι τώρα σε ασθενείς που πάσχουν από τις ασθένειες που σχετίζονται με SLC25 μιτοχονδριακούς μεταφορείς, οι 30 αναφέρονται σε αμινοξέα που εξέχουν στην εσωτερική κοιλότητα του μεταφορέα. Αυτές οι 30 μεταλλάξεις βρίσκονται στις ακόλουθες περιοχές: 7 στην περιοχή της μιτοχονδριακής μήτρας, 10 στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος, 8 στον PG επίπεδο 1, 2 στον PG επίπεδο 2 και 3 στην κυτταροπλασματική περιοχή (Εικόνα 1.12) (Palmieri et al., 2009).



Εικόνα 1.12: Δομικές περιοχές στα SLC25 μέλη όπου εντοπίζονται πολλές παθογενετικές μεταλλάξεις. Εμφανίζεται η 3D κρυσταλλική δομή του ADP/ATP μεταφορέα όπου φαίνονται: η κυτταροπλασματική περιοχή (μπλε), η θέση πρόσδεσης του υποστρώματος (πορτοκαλί) και η περιοχή της μιτοχονδριακής μήτρας (μωβ). Στο P-G επίπεδο 1 και στο P-G επίπεδο 2, οι προλίνες εμφανίζονται με κόκκινο και οι γλυκίνες με κίτρινο (Palmieri et al., 2009).

1.3.9.1 Η ανεπάρκεια του PiC (OMIM 610773)

Μετάλλαξη στο γονίδιο SLC25A3 προκαλεί ανεπάρκεια του μεταφορέα του φωσφορικού (Phosphate carrier, PiC) (Mayr et al., 2007, 2011). Η ανεπάρκεια του PiC χαρακτηρίζεται από μυϊκή υποτονία, προοδευτική υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια, αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος στο πλάσμα και γαλακτική οξέωση.

1.3.9.2 Η ανεπάρκεια του ACC1 (OMIM 192600)

Το γονίδιο SLC25A4 κωδικοποιεί για το μεταφορέα ADP/ATP (ADP/ATP carrier 1, AAC1). Η ανεπάρκεια του AAC1 χαρακτηρίζεται από δυσανοχή στην άσκηση, με εύκολη κόπωση και μυϊκό πόνο από την πρώιμη παιδική ηλικία, προοδευτική υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια, ήπια μυοπάθεια χωρίς προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (PEO), και γαλακτική οξέωση. Είναι ενδιαφέρον ότι η συμπτωματολογία των ασθενών μοιάζει πολύ με εκείνη των Slc25a4 knock-out ποντικών (Palmieri et al., 2005, Echaniz-Laguna et al., 2012, Palmieri, 2013).

1.3.9.3 Αυτοσωμική επικρατής προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (OMIM 609283)

Η αυτοσωμική επικρατής προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (adPEO, PEOA2) είναι κλινικά και γενετικά μια ετερογενής διαταραχή η οποία συνήθως κληρονομείται ως επικρατής. Τα τυπικά συμπτώματα της διαταραχής αυτής είναι η προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία λόγω της αδυναμίας των εξωτερικών μυών των ματιών, αστάθεια και ήπια πτωτική μυοπάθεια. Επιπλέον συμπτώματα περιλαμβάνουν αταξία, κινητική περιφερική νευροπάθεια, γενική μυϊκή αδυναμία και Παρκινσονισμό. Η PEO αποτελεί μία από τις πιο κοινές ασθένειες που προκαλείται από ελλείψεις του μιτοχονδριακού DNA. Παρόλα αυτά ανακαλύφθηκαν μεταλλάξεις σε τρία πυρηνικά γονίδια τα οποία έχουν δείξει ότι συσχετίζονται και είναι υπεύθυνα για της adPEO προκαλώντας δευτερεύουσες ελλείψεις στο μιτοχονδριακό DNA. Ένα από αυτά τα γονίδια είναι το SLC25A4 το οποίο κωδικοποιεί έναν μυο-καρδιακό μιτοχονδριακό ACC1 μεταφορέα (Kaukonen et al., 2000).

1.3.9.4 Η ανεπάρκεια του AGC1 (OMIM 612949)

Η ασθένεια αυτή προκαλείται από μια μετάλλαξη στο SLC25A12 γονίδιο που κωδικοποιεί για την ισομορφή 1 του μεταφορέα ασπαρτικού/γλουταμινικού (Aspartate/glutamate carrier 1, AGC1) (Wibom et al., 2009). Οι ασθενείς εκδηλώνουν σοβαρή υποτονία, αναστολή ψυχοκινητικής ανάπτυξης σύλληψη, επιληπτικές κρίσεις και σπαστικότητα. Είναι ενδιαφέρον ότι η συμπτωματολογία των ασθενών μοιάζει πολύ με εκείνη των Slc25a12 knock-out ποντικών (Palmieri, 2013).

1.3.9.5 Η ανεπάρκεια του AGC2 (OMIM 603471 και OMIM 605814)

Το γονίδιο SLC25A13 προσδιορίστηκε ως το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την κίτρουλλιναιμία τύπου ΙΙ (CTLN2) (Kobayashi et al., 1999) και κωδικοποιεί για την ισομορφή 2 του μεταφορέα ασπαρτικού/γλουταμινικού (Aspartate/glutamate carrier 2, AGC2). Η έλλειψη του ασπαρτικού στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων προκαλεί κίτρουλλιναιμία, υποπρωτεϊναιμία και υπεραμμωναιμία με αποτέλεσμα εγκεφαλοπάθεια και νευροψυχιατρικά συμπτώματα. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 56 μεταλλάξεις (Palmieri, 2013).

1.3.9.6 Το σύνδρομο HHH (OMIM 238970)

Το σύνδρομο HHH (hyperammonemia, hyperornithinemia, homocitrullinuria) προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC25A15, το οποίο κωδικοποιεί το μεταφορέα ορνιθίνης 1 (Ornithine carrier 1, ORC1) (Camacho et al., 1999) και χαρακτηρίζεται από υπερορνιθιναιμία, υπεραμμωναιμία και ομοκίτρουλλινουρία. Μεταξύ άλλων κλινικών συμπτωμάτων οι ασθενείς εμφανίζουν επιληπτικές κρίσεις, αταξία και μυοκλονικούς σπασμούς (J. Camacho et al., 2006). Μέχρι σήμερα, έχουν βρεθεί 33 μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC25A15.

1.3.9.7 Εκ γενετής μικροκεφαλία Amish (OMIM 607196)

Η μικροκεφαλία Amish είναι μια διαταραχή του μεταβολισμού που χαρακτηρίζεται από ανικανότητα προσανατολισμού στην όραση ή στον ήχο, μεταβολική οξέωση, δυσκολία στην διατήρηση φυσιολογικής θερμοκρασίας σώματος και ευερεθιστότητα. Αυτή η σοβαρή διαταραχή προκαλείται από μια μετάλλαξη στο γονίδιο SLC25A19 (Rosenberg et al., 2002), που κωδικοποιεί για το φορέα της πυροφωσφορικής θειαμίνης (Thiamine pyrophosphate carrier, TPC) (Dolce et al., 2001., Lindhurst et al., 2006). Τα Slc25a19 knock-out ποντίκια εμφανίζουν εμβρυϊκή θνησιμότητα και αναστολή του σχηματισμού του εγκεφάλου στο επίπεδο του κλεισίματος του νευρικού σωλήνα. Επιπλέον, οι μεταβολικές διαταραχές είναι πιο σοβαρές στο μοντέλο του ποντικού από ότι σε ασθενείς (Lindhurst et al., 2006).

1.3.9.8 Νευροπάθεια με αμφίπλευρη νέκρωση του ραβδωτού σώματος (OMIM 613710)

Μια άλλη ασθένεια που συνδέεται με το γονίδιο SLC25A19 περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενα επεισόδια παράλυσης και εγκεφαλοπάθεια που σχετίζεται με αμφίπλευρη νέκρωση του ραβδωτού σώματος και χρονικά προοδευτική πολυνευροπάθεια (Spiegel et al., 2009).

1.3.9.9 Η ανεπάρκεια του CAC (OMIM 212138)

Η ανεπάρκεια του μεταφορέα της καρνιτίνης/ακυλοκαρνιτίνης (Carnitine/acylcarnitine carrier, CAC) είναι η πρώτη διαταραχή που συσχετίστηκε με την οικογένεια των γονιδίων SLC25. Ο μεταφορέας αυτός κωδικοποιείται από το γονίδιο SLC25A20. Τα κλινικά συμπτώματα αντανakλούν ένα συνδυασμό της έλλειψης ενέργειας και της ενδογενούς τοξικότητας επειδή υψηλά επίπεδα ακυλοκαρνιτίνων είναι τοξικά για την καρδιά και τη λειτουργία των μυών και μπορεί να οδηγήσουν σε νευρολογική δυσλειτουργία. Από την πρώτη μετάλλαξη που αναφέρθηκε το 1997 (Huizing et al., 1997), 35 άλλες μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο SLC25A20 (Palmieri, 2013).

1.3.9.10 Πρόωρη επιληπτική εγκεφαλοπάθεια (OMIM 609304)

Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπιστεί δύο παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC25A22 που κωδικοποιεί για την ισομορφή 1 του γλουταμινικού μεταφορέα (Glutamate carrier 1, GC1) (Fiermonte et al, 2002). Ο GC1 καταλύει τη συνμεταφορά γλουταμινικού/H⁺ με πολύ μεγάλη εξειδίκευση. Τα συμπτώματα της ασθένειας που προκαλείται από την έλλειψή του περιλαμβάνουν εκδηλώσεις πρώιμων μυοκλονικών επιληπτικών κρίσεων, υποτονία, προοδευτική μικροκεφαλία και ταχεία εξέλιξη σε εγκεφαλοπάθεια και σπαστικότητα. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου, ο GC1 εκφράζεται πρώτα στον εγκέφαλο και συγκεκριμένα στις περιοχές που σχετίζονται με τη μυοκλονική επιληψία. Η έκφρασή του είναι πολύ μεγαλύτερη στα αστροκύτταρα από τα νευρικά κύτταρα. Τα μιτοχόνδρια των αστροκυττάρων δεν περιέχουν ασπαρτικούς/γλουταμινικούς μεταφορείς και γι' αυτό η εισαγωγή του γλουταμινικού πραγματοποιείται μόνο μέσω του GC1. Το γλουταμινικό είναι σημαντικός διεγερτικός νευροδιαβιβαστής και μετά την απελευθέρωσή του στις

συνάψεις συνεχίζει να λαμβάνεται από τα αστροκύτταρα. Πιθανά λοιπόν η επιληψία που προκαλείται λόγω της μετάλλαξης του GC1 είναι αποτέλεσμα της ανεπάρκειας των γλουταμινικών μιτοχονδριακών μεταφορέων στα αστροκύτταρα που οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοσυναπτικού γλουταμινικού. (Molinari et al., 2005).

1.3.9.11 Συγγενής σιδηροβλαστική αναιμία (OMIM 205950)

Η συγγενής σιδηροβλαστική αναιμία προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC25A38 (Guernsey et al., 2009). Όπως υποδηλώνει το όνομά της, αυτή η ασθένεια χαρακτηρίζεται από βαριά αναιμία και υποχρωμία, μικροκύττωση και δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες στο μυελό των οστών. Μέχρι τώρα έχουν βρεθεί 11 μεταλλάξεις στο γονίδιο SLC25A38 (Palmieri, 2013).

1.3.10 Μεταλλάξεις για το γονίδιο Slc25a46

Μέχρι σήμερα δεν έχουν εντοπιστεί λειτουργικές μεταλλάξεις για το γονίδιο Slc25a46 ούτε στον άνθρωπο ούτε και σε κάποιο άλλο ζωικό οργανισμό εκτός από την μετάλλαξη που ανιχνεύτηκε στο ποντίκι που εμφανίζει νευρολογική νόσο από την ερευνητική ομάδα της Δρ Ντούνη (Καρακώστας, 2010; Kano et al., 2012).

Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια διάφορες μελέτες που σκοπεύουν στον εντοπισμό γενετικών θέσεων σε ασθένειες ποσοτικού χαρακτήρα (QTLs) δηλαδή στις οποίες εμπλέκονται διάφορα γονίδια, έχουν αποκαλύψει πολυμορφισμούς στην περιοχή του Slc25a46 γονιδίου στον άνθρωπο. Η μελέτη των Sun et al., δείχνει ότι το γονίδιο Slc25a46 ως QTL σχετίζεται με την ατοπική δερματίτιδα στον κινεζικό πληθυσμό Χαν (Sun et al., 2011). Η μελέτη των Morrison et al., για την θνησιμότητα της καρδιακής ανεπάρκειας μεταξύ των ατόμων με ευρωπαϊκή καταγωγή δείχνει έναν πολυμορφισμό κοντά στο γονίδιο Slc25a46 (Morrison et al., 2010). Η μελέτη των Ramasamy et al., για την αλλεργική ρινίτιδα και την εποχιακή αλλεργική ρινίτιδα δείχνουν επίσης μια συσχέτιση με περιοχή κοντά στο γονίδιο Slc25a46 (Ramasamy et al., 2011).

Επίσης, έχει δειχθεί ότι το γονίδιο Slc25a46 ως QTL σχετίζεται με την αλλεργική ευαισθητοποίηση με την παρουσία της ανοσοσφαιρίνης IgE (Bonnelykke et al., 2012). Επιπλέον, η μελέτη της καρδιακής δομής και λειτουργίας των Vasan et al., για την

αύξηση της μάζας και του πάχους του τοιχώματος στην υπερτροφία της αριστερής κοιλίας της καρδιάς (LVH) δείχνει έναν πολυμορφισμό κοντά στο γονίδιο Slc25a46 (Vasan et al., 2009). Τέλος, η μελέτη των Parry et al., για την υπερτροφία της αριστερής κοιλίας της καρδιάς (LVH), η οποία προκαλείται συχνά από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (T2DM), μεταξύ των ατόμων της Καυκάσιας φυλής στην Σκωτία (Tayside) δείχνει έναν πολυμορφισμό κοντά στο γονίδιο Slc25a46 (Parry et al., 2013). Αυτοί οι δυο πολυμορφισμοί είναι ίδιοι (rs17132261) και βρίσκεται στο γονίδιο TMEM232 (transmembrane protein 232).

1.4 Τεχνολογία διαγονιδιακών ζώων

Η τεχνολογία διαγονιδιακών ζώων είναι μια από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους τομείς της βιοτεχνολογίας. Χρησιμοποιείται για την ενσωμάτωση εξωγενών γονιδίων στα γονιδιώμα των ζώων με την τεχνολογία της γενετικής μηχανικής, ώστε αυτά τα γονίδια να εκφράζονται και να κληρονομείται από τους απογόνους. Το ξένο γενετικό υλικό μεταβιβάζεται στη συνέχεια μέσω των γεννητικών κυττάρων στους απογόνους όπου όλα τα κύτταρα περιέχουν το ίδιο τροποποιημένο γενετικό υλικό. Η διαγονιδιακή αποδοτικότητα και ο ακριβής έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης είναι οι βασικοί παράγοντες που περιορίζουν την παραγωγή των διαγονιδιακών ζώων. Υπάρχει ποικιλία των διαγονιδιακών τεχνικών διαθέσιμη. Όμως καθεμία έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και χρειάζεται περαιτέρω μελέτη λόγω των τεχνικών και θεμάτων ασφάλειας. Οι διαγονιδιακοί οργανισμοί συνήθως υπερεκφράζουν μια πρωτεΐνη οπότε αποτελούν ιδανικά συστήματα μελέτης διαδικασιών και λειτουργικών που πιθανόν απορρυθμίζονται και οδηγούν στην ασθένεια. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να μελετηθούν και να κατανοηθούν οι μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθογένεση των ασθενειών αυτών ενώ τα διαγονιδιακά μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για δοκιμές φαρμακευτικών ουσιών σε προκλινικό επίπεδο. Επίσης, τα διαγονιδιακά ζώα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοαντιδραστήρες για την παραγωγή εξαιρετικά χρήσιμων ουσιών τόσο για την ιατρική, όσο και για την γεωργία ή την κτηνοτροφία. (Xiangyang Miao 2012, Ντούνη 2011)

Οι πρόσφατες χρησιμοποιημένες μέθοδοι είναι η μέθοδος μικροενέσεως (microinjection), η μέθοδος του σπερματικού φορέα, τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Embryonic stem cell), η μέθοδος της μεταμόσχευσης των σωματικών κυτταρικών

πυρήνων, η μέθοδος του φορέα ρετροϊού, η μέθοδος της μεσολάβησης των βλαστικών κυττάρων για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας, η γονιδιακή στόχευση (gene targeting) για να βελτιωθεί η ακρίβεια, η παρέμβαση RNA με τη μεσολάβηση του γονιδίου αποσιώπηση της τεχνολογίας, ψευδαργύρου-δακτύλου νουκλεάσες-γονιδιακής στόχευσης τεχνική και η τεχνολογία των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (pluripotent stem cell).

1.4.1 Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών

Το πρώτα διαγονιδιακά ποντίκια δημοσιεύθηκαν το 1982, στα οποία είχε γίνει παρέμβαση στα γονίδια που καθορίζουν την ανάπτυξη. Σήμερα, σχεδόν όλα τα διαγονιδιακά ποντίκια δημιουργούνται με μικροένεση του ξένου DNA σ' έναν από τους δύο προπυρήνες του γονιμοποιημένου ωαρίου, έναν προερχόμενο από το σπερματοζώαριο και έναν από το ωάριο, που με την σύντηξή τους θα προκύψει ο πυρήνας του εμβρύου στο στάδιο του ενός κυττάρου. Στην συνέχεια τα ζυγωτά μεταφέρονται στον ωαγωγό μιας θετής μητέρας όπου και αναπτύσσονται φυσιολογικά και οι απόγονοι που θα γεννηθούν ελέγχονται για την παρουσία του διαγονιδίου (Ντούνη 2011).

Ένα οποιοδήποτε κλωνοποιημένο τμήμα DNA, είτε cDNA, είτε γονιδιωματικό, μπορεί να εισαχθεί με μικροένεση στον προπυρήνα αφού απομακρυνθεί πρώτα απ' αυτό η περιοχή του φορέα κλωνοποίησης. Η ενσωμάτωση γίνεται τυχαία σε μία ή περισσότερες θέσεις του γονιδιώματος του ζυγωτού. Επίσης, μπορεί να ενσωματωθεί ένα μόνο αντίγραφο ή περισσότερα που συνήθως είναι διευθετημένα στην σειρά με κοινό προσανατολισμό κεφαλής-ουράς (head to tail) μέσω σχηματισμού concatemers πριν την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα με τον μηχανισμό ένωσης μη-ομόλογων άκρων (NHEJ, non-homologous end joining) (Capecchi, 2005, Jun et al., 2010).

Η επιλογή ενός ιστοειδικού υποκινητή εξασφαλίζει τη δυνατότητα έκφρασης του διαγονιδίου επιλεκτικά σε συγκεκριμένα κύτταρα του διαγονιδιακού ζώου. Παρόλα αυτά η έκφραση ενός διαγονιδίου επηρεάζεται αρκετά συχνά από την μεταγραφική κατάσταση της γειτονικής χρωματίνης με αποτέλεσμα είτε την εκτοπική έκφραση του διαγονιδίου δηλαδή έκφραση και σε άλλους ιστούς είτε την αναστολή της έκφρασής του. Αν ένα γονίδιο ενσωματωθεί σε ετεροχρωματίνη, δηλαδή σε ανενεργό

χρωματίνη, τότε το γονίδιο δεν θα εκφραστεί. Επίσης, η ύπαρξη ενός ισχυρού ενισχυτή κοντά στη θέση ενσωμάτωσης του διαγονιδίου κατευθύνει την έκφραση του σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ως διαγονίδια μεγάλα τμήματα γονιδιωματικού DNA π.χ. μεγέθους 200kb έχει φανεί ότι η έκφραση του διαγονιδίου είναι ανάλογη του αριθμού των αντιγράφων και δεν εξαρτάται από τη θέση ενσωμάτωσης του (Van Keuren et al., 2009). Η απομόνωση μεγάλου μεγέθους DNA τμημάτων επιτυγχάνεται με την χρησιμοποίηση φορέων BAC (Bacterial artificial chromosome).

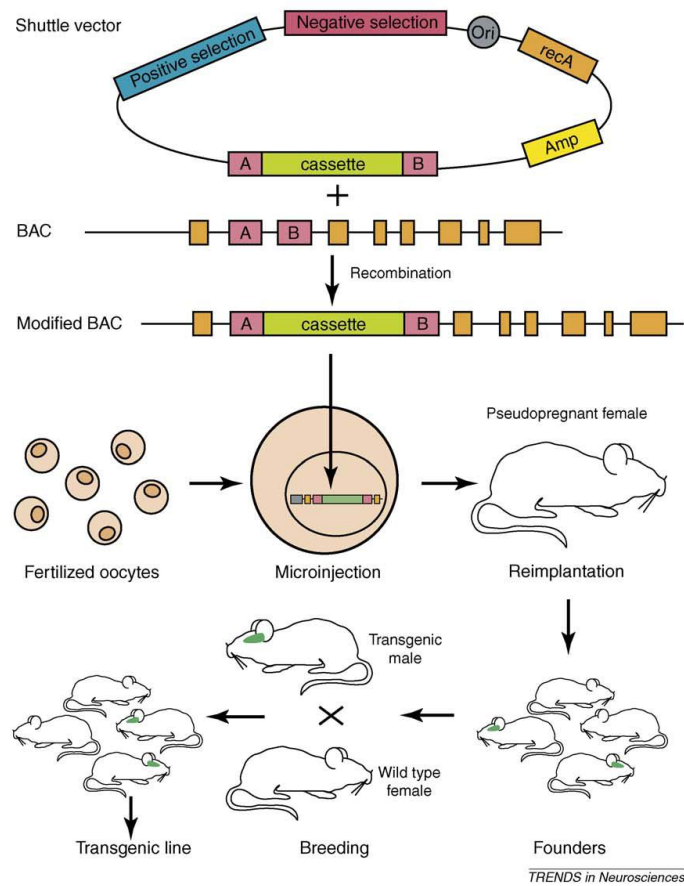
1.4.1.1 Χρήση του BAC στην μικροένεση

Τμήματα DNA μεγέθους μέχρι 350 kb μπορεί να κλωνοποιηθούν στο βακτηριακό τεχνητό χρωμόσωμα (BAC). Τα BACs διατηρούνται σε *E. coli* με αριθμό αντιγράφων μόνο ένα ανά κύτταρο (Casali και Preston, 2003). Το BAC έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με το παραδοσιακό μεγάλο σύστημα κλωνοποίησης του DNA δηλαδή το τεχνητό χρωμόσωμα ζύμης (YAC, Yeast Artificial Chromosome) που μπορεί να φέρει μέχρι 3.000kb. Τα πλεονεκτήματα αυτά είναι η μεγάλη φορτικότητα (100-300 kb), η υψηλή κλωνική σταθερότητα, το χαμηλό ποσοστό του χιμαιρισμού, και ο εύκολος χειρισμός που αποτρέπει το σπάσιμό του σε μικρότερα κομμάτια (Monaco Larin, 1994, Birren et al., 1999).

Η διαγένεση με το BAC DNA απαιτεί την δημιουργία γραμμικών μορίων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, την απομάκρυνση του φορέα BAC, την απομόνωση και τον καθαρισμό του γονιδιωματικού τμήματος. Η χρήση πολυαμίνης (PA buffer) στο διάλυμα της μικροένεσης προστατεύει το BAC DNA από τον κατακερματισμό και *in vitro* δεν παρεμβαίνει στην ανάπτυξη των αυγών στα οποία έγινε μικροένεση (Van Keuren et al., 2009).

Η ενσωμάτωση του BAC διαγονιδίου στο γονιδίωμα με την μέθοδο της μικροένεσης γίνεται σε τυχαία θέση (Εικόνα 1.13). Η πλήρης ενσωμάτωση του BACs είναι πιθανόν να προσφέρει τα φυσιολογικά σχετικά πρότυπα της έκφρασης. Τα επίπεδα της έκφρασης εξαρτώνται από τον αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου (Chandler et al 2007). Υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της αύξησης των αριθμού αντιγράφων και μιας αυξημένης διαγονιδιακής έκφρασης σε διαγονιδιακά ποντίκια.

Επίσης, μπορεί να ενσωματωθούν όχι μόνο ακέραια τμήματα DNA αλλά και τα θραύσματα του. Η εξέταση των κατακερματισμένων BACs μπορεί να είναι χρήσιμη για τον εντοπισμό ρυθμιστικών αλληλουχιών του DNA. Επίσης, η ενσωμάτωση τους μπορεί να γίνει σε μία θέση ή περισσότερες (Chandler et al 2007). Στην πλειοψηφία τους τα διαγονιδιακά ποντίκια που έχουν δημιουργηθεί με BAC κλώνους, περιέχουν λιγότερα από δώδεκα αντίγραφα (Camper και Saunders 2000, Giraldo και Montoliu 2001). Γενικώς, στην διαγένεση με BAC παρατηρούνται οι χαμηλότεροι αριθμοί αντιγράφων. Αυτό πιθανότατα αντανάκλα στον μικρότερο αριθμό μορίων του DNA που χρησιμοποιείται για την μικροένεση σε κάθε γονιμοποιημένο ωάριο. Οι εκτιμήσεις της μικροένεσης με μερικές εκατοντάδες πλασμιδικά μόρια ανά γονιμοποιημένο ωάριο ποντικού είναι σύμφωνες με την μικροένεση με μερικές δεκάδες BAC μόρια ανά γονιμοποιημένο ωάριο (Brinster et al. 1985). Ακόμα κι αν η μικροένεση περιλαμβάνει λιγότερα μόρια, η διαγονιδιακή αποδοτικότητα με BAC είναι συγκρίσιμη με εκείνη των μικρότερων πλασμιδικών διαγονιδίων. Επίσης παρόλο που οι εκτιμήσεις του αριθμού αντιγράφων για τον ιδρυτή και τους απόγονους F1 είναι διαφορετικές, οι εκτιμήσεις για τις διαδοχικές γενιές από τους F2 είναι σταθερές (Chandler et al, 2007).



Εικόνα 1.13: Δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών με BAC. Το τροποποιημένο BAC χορηγείται με ένεση σε γονιμοποιημένα ωοκύτταρα και ενσωματώνεται τυχαία στο χρωμοσωμικό DNA. Τα μικροενεθέντα αυγά στη συνέχεια μεταμοσχεύονται εντός του ωαγωγού ενός θηλυκού. Για τη δημιουργία των σειρών των διαγονιδιακών ποντικών, οι ιδρυτές στη συνέχεια ζευγαρώνουν με ποντικά άγριου τύπου, και το 50% των απογόνων θα κληρονομήσουν το BAC (Valjent et al., 2009).

1.5 Στόχοι της παρούσας μελέτης

Ο σκοπός της παρούσα μελέτης είναι η δημιουργία και χαρακτηρισμός διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν το ανθρώπινο Slc25a46 γονίδιο (TgSlc25a46) ώστε σε πειράματα γενετικής αναπλήρωσης να επιβεβαιωθεί εάν η μετάλλαξη στο γονίδιο Slc25a46 είναι υπεύθυνη για τον φαινότυπο που παρατηρείται στα αταξικά ζώα.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφρασή του Slc25a46 διαγονιδίου τόσο στο επίπεδο του mRNA όσο και στο επίπεδο της παραγόμενης πρωτεΐνης σε διάφορους ιστούς ποντικών άγριου τύπου και δύο TgSlc25a46 διαγονιδιακών σειρών. Επίσης, πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική ανάλυση στα TgSlc25a46 διαγονιδιακά ποντίκια και έγιναν οι κατάλληλες διασταυρώσεις αταξικών ποντικών (Slc25a46^{m/m}) και διαγονιδιακών ποντικών (TgSlc25a46) ώστε να μελετηθεί εάν στα ποντίκια ομόζυγα για την μετάλλαξη στα οποία έχει ενσωματωθεί το διαγονίδιο που κωδικοποιεί την ανθρώπινη πρωτεΐνη SLC25A46 (Slc25a46^{m/m}/ TgSlc25a46) αναστρέφεται ο αταξικός φαινότυπος.

Κεφαλαίο 2: Πειραματική διαδικασία

2.1 Υλικά και μέθοδοι

Για το χαρακτηρισμό του φαινοτύπου, καταγράφηκε η θνησιμότητα των αγρίου τύπου, διαγονιδιακών, αταξικών και διαγονιδιακών ομόζυγων για τη μετάλλαξη ποντικών και μετρήθηκαν το σωματικό βάρος (Body weight) και η μυϊκή τους δύναμη (Grip strength). Για το σωματικό βάρος μετρήθηκαν τα ποντίκια από την ηλικία 2 εβδομάδων έως 11 εβδομάδων μια φορά κάθε εβδομάδα. Για την δύναμη μετρήθηκαν τα ποντίκια από την ηλικία 3 εβδομάδων έως 11 εβδομάδων μια φορά με 3 επαναλήψεις κάθε εβδομάδα.

Για την ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *Slc25a46* στο επίπεδο του mRNA απομονώθηκε ολικό RNA από 7 ιστούς (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός, σπλήνα, καρδιά, ήπαρ, μυς) τόσο από ποντίκια άγριου τύπου όσο και από διαγονιδιακά ποντίκια των δυο σειρών (Tg1332 και Tg1351) που φέρουν το ανθρωπινό (human) γονίδιο *Slc25a46*. Χρησιμοποιήθηκαν τρία ποντίκια (αρσενικά / θηλυκά) ανά ομάδα, ηλικίας 5 εβδομάδων. Από αυτά τα δείγματα έγινε σύνθεση cDNA. Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς σύνθεσης cDNA πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις PCR με εκκινητές για το γονίδιο GAPDH (house keeping gene) καθώς και για το ανθρώπινο (human) γονίδιο *Slc25a46* και το γονίδιο του ποντικού (mouse) για τα δείγματα των 7 ιστών. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις πραγματικού χρόνου PCR (Real-Time PCR) με εκκινητές για τα γονίδια:

1. B2M (house keeping gene)
2. *Slc25a46* του ανθρώπου και του ποντικού (κοινοί, common) και
3. *Slc25a46* του ανθρώπου (human)

για τα δείγματα των 8 ιστών του άγριου τύπου και των δυο διαγονιδιακών σειρών.

Για την ανάλυση της έκφρασης της πρωτεΐνης SLC25A46 απομονώθηκαν πρωτεΐνες από το κυτταροπλασματικό και το μιτοχονδριακό κλάσμα 8 ιστών (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός, θύμος, σπλήνα, καρδιά, ήπαρ, μυς). Χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια (αρσενικά / θηλυκά) άγριου τύπου, διαγονιδιακά ηλικίας 5 εβδομάδων και διαγονιδιακά ομόζυγα για τη μετάλλαξη ποντίκια ηλικίας 10 εβδομάδων. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν τα ανοσοαποτυπώματα κατά Western

με πρώτο αντίσωμα είτε για το Slc25a46 είτε για την GRP75 και τα αντίστοιχα δεύτερα αντισώματα.

Για την ταυτοποίηση του γονοτύπου (άγριος τύπος, ετερόζυγος ή ομόζυγος για την μετάλλαξη) απομονώθηκε γενωμικό DNA και πραγματοποιήθηκε πυροαλληλούχιση (Pyrosequencing) για να εντοπιστεί η σημειακή μετάλλαξη ως πολυμορφισμός SNP.

2.2 Στελέχη ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν

Η χρήση των τρωκτικών (ποντίκια, αρουραίοι κ.α.) από όλα τα ζώα στις βιοϊατρικές έρευνες εκτιμάται 95%. Τα πλεονεκτήματα είναι τα εξής:

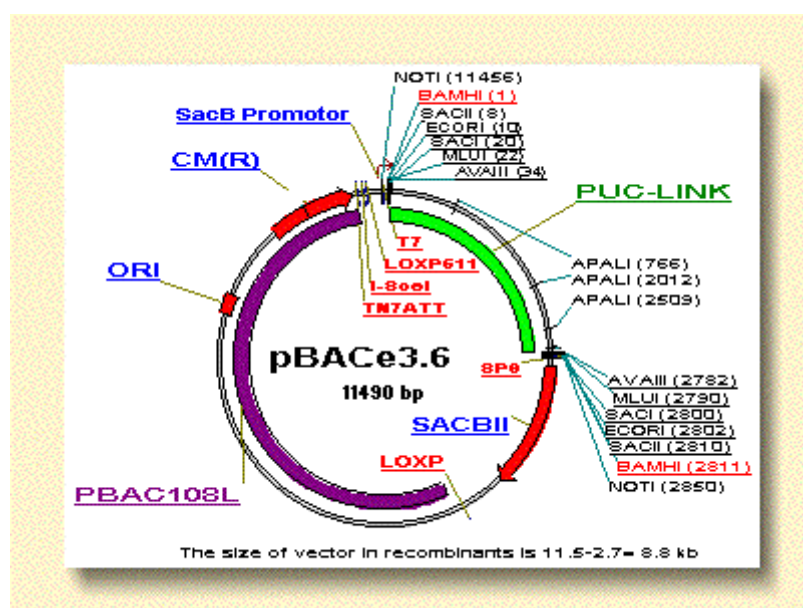
- 1) εύκολη φροντίδα και εύκολος χειρισμός
- 2) χαμηλό κόστος συντήρησης
- 3) υψηλή αναπαραγωγική ικανότητα
- 4) σύντομος χρόνος γενιάς και διάρκεια ζωής
- 5) πλούσιες πληροφορίες για το γονιδίωμά τους
- 6) μεγάλος αριθμός των γενετικά καθαρών στελεχών
- 7) ως θηλαστικά έχουν ομοιότητες με τον άνθρωπο στην ανατομία, την γενετική και τη φυσιολογία
- 8) τα τρωκτικά και ιδιαίτερα τα ποντίκια μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν γενετικά και να αποτελέσουν μοντέλα ανθρώπινων ασθενειών (Kamber, Simmons, 2008)

Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της χρήσης του ποντικού (*Mus musculus*) είναι η ύπαρξη πολλών γενετικά καθαρών στελεχών. Συγκεκριμένα ως γενετικό υπόβαθρο (background) της δημιουργίας των αταξικών ποντικών με την μετάλλαξη του γονιδίου Slc25a46 χρησιμοποιήθηκε το μικτό υπόστρωμα C57BL/6J και 129S6. Στην συνέχεια αυτά τα ποντίκια που έφεραν την μετάλλαξη είχαν διασταυρωθεί πάνω από 10 γενιές με το καθαρό στέλεχος C57BL/6J ώστε να επιτευχθεί γενετική ομοιομορφία. Για την δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη C57BL/6J και CBA.

2.3 Σειρές των διαγονιδιακών ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν

Τα διαγονιδιακά ποντίκια δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο της μικροένεσης (micro-injection). Χρησιμοποιήθηκε ένας φορέας BAC (pBACe3.6) (Εικόνα 2.1) και πραγματοποιήθηκε πέψη με ένζυμα περιορισμού για την απομόνωση της

γονιδιωματικής περιοχής (RP11-671K7, chr5, 200 kb) του ανθρώπινου γονιδίου Slc25a46. Η εκτίμηση του αριθμού αντιγράφων του διαγονιδίου πραγματοποιήθηκε με PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιώντας το γενωμικό DNA που απομονώθηκε. Ως αποτέλεσμα, ταυτοποιήθηκαν δύο διαγονιδιακές, η σειρά Tg1332 και η σειρά Tg1351 με 1 και 2 αντίγραφα του διαγονιδίου αντίστοιχα. Οι ιδρυτές της κάθε σειράς διασταυρώθηκαν με ποντίκια άγριου τύπου C57 ή τα ετερόζυγα ποντίκια της αταξικής σειράς, έτσι ώστε να αποκτηθούν οι απόγονοι τους.



Εικόνα 2.1: BAC (pBACe3.6) που χρησιμοποιήθηκε.

<http://escience.ws/b572/L18/L18.htm>

2.4 Παραλαβή ιστών από ποντίκια για την απομόνωση γενωμικού DNA

Το γενωμικό DNA απομονώνεται από τις άκρες των ουρών των ποντικών. Πρώτα γίνεται σήμανση του ζώου και καταχωρείται με έναν αύξοντα αριθμό. Η κοπή της ουράς πραγματοποιείται περίπου στην ηλικία των 10 ημερών.

2.5 Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών

A. Με φαινόλη

- 1) Τοποθέτηση της κομμένης ουράς του ζώου περίπου 0,5cm σε ένα άδειο erpendorf 1.5ml.
- 2) Προσθήκη 400μl του tail buffer «διάλυμα για ουρές» και 2 μl της πρωτεΐνάσης K.
- 3) Επώαση όλη τη νύχτα σε υδατόλουτρο 55 °C.
- 4) Την επόμενη μέρα: έντονη ανάμιξη για 10 δευτερόλεπτα για να διαλυθεί η ουρά.
- 5) Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης (400 μl) και έντονη ανάμιξη για 5 λεπτά.
- 6) Φυγοκέντρηση σε 12000rpm για 10 λεπτά.
- 7) Προσθήκη 300-350 μl της υδάτινης φάσης (πάνω μέρος) στην ισοπροπανόλη (290 μl) για την κατακρήμνιση του DNA.
- 8) Ελαφριά ανάμιξη και «ψάρεμα» του DNA με κλειστή στην άκρη γυάλινη πιπέτα Pasteur.
- 9) Εμβάπτιση της πιπέτας σε 70% αιθανόλη (4-8 φορές).
- 10) Εμβάπτιση σε 100% αιθανόλη (4-8 φορές).
- 11) Αφήνεται η πιπέτα να στεγνώσει στον αέρα για 10 λεπτά.
- 12) Τοποθέτηση της πιπέτας μέσα σε ένα erpendorf που περιέχει ddH₂O (~100 μl) για περίπου 30 λεπτά ώστε να διαλυθεί το DNA.
- 13) Αποθήκευση στους 4 ή -20 °C.

B. Με άλατα (6M NaCl)

- 1) Τοποθέτηση της κομμένης ουράς του ζώου περίπου 0,5cm σε ένα άδειο erpendorf 1.5ml.
- 2) Προσθήκη 400μl του tail buffer «διάλυμα για ουρές» και 2 μl της πρωτεΐνάσης K.
- 3) Επώαση όλη τη νύχτα σε υδατόλουτρο 55 °C.
- 4) Την επόμενη μέρα: έντονη ανάμιξη για 10 δευτερόλεπτα για να διαλυθεί η ουρά.
- 5) Προσθήκη 111 μl του 6M NaCl και 400 μl της φαινόλης και έντονη ανάμιξη για 5 λεπτά.
- 6) Φυγοκέντρηση σε 13000rpm για 10 λεπτά.

- 7) Μεταφορά 450 μl του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα eppendorf, χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση.
- 8) Προσθήκη ίσου όγκου της παγωμένης 95% αιθανόλης (450 μl) και ελαφριά ανάμιξη για την κατακρήμνιση του DNA.
- 9) Φυγοκέντρηση σε 13000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 10) Απομάκρυνση όλου του υπερκείμενου.
- 11) Προσθήκη 100 μl της 70% αιθανόλης για τον καθαρισμό.
- 12) Αφήνεται το eppendorf ανοιχτό να στεγνώσει για 5-10 λεπτά.
- 13) Προσθήκη ddH₂O (100~200 μl) στο eppendorf και επώαση σε υδατόλουτρο 55 °C για περίπου 5-10 λεπτά ώστε να διαλυθεί το DNA.
- 14) Αποθήκευση στους 4 ή -20 °C.

Διαλύματα

Διάλυμα για ουρές (tail buffer) σε τελικό όγκο 500ml:

0.5M (25ml Tris 1M pH 8.0)

0.1M (100ml EDTA 0.5M)

0.1M (1-ml NaCl 5M)

1% (50ml SDS 10%)

Στην αντίδραση χρησιμοποιούμε 400 μl από το παραπάνω διάλυμα.

Πρωτεΐνάση K : Διάλυμα stock 10mg / ml σε 50mM Tris pH 8.0

Αιθανόλη: 70%, 95% και 100%

Ισοπροπανόλη

Φαινόλη

6M NaCl: 17.53gr NaCl σε τελικό όγκο 50ml με ddH₂O

Πλαστικά – Γυαλικά

Πιπέτες Pasteur

Αποστειρωμένα eppendorfs 1.5 ml

Αποστειρωμένα κίτρινα και μπλε tips

Συσκευές

Υδατόλουτρο

Φυγόκεντρος

Αναδευτήρας

2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αντίδραση PCR αποτελεί μια *in vitro* μέθοδο για την ενζυμική σύνθεση εξειδικευμένων αλληλουχιών DNA με την χρήση δυο ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές για την αντιγραφή της μήτρας του DNA μέσω της δράσης του ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης. Τα ζεύγη των εκκινητών σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι συμπληρωματικά ως προς τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA που πρόκειται να αντιγραφεί.

A. Για τη γονοτυπική ανάλυση των διαγονιδιακών ποντικών με το γονίδιο Human Slc25a46 και το ενδογενές γονίδιο OPGL/RANKL.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Συστατικά Αντίδρασης	Όγκος (μl)
DNA μήτρα	1.0
Taq DNA πολυμεράση	0.3
10 x Ρυθμιστικό Διάλυμα PCR (Taq buffer)	2.0
dNTPs	1.5
MgCl ₂	1.6
Εκκινητής Forward και Reverse (Slc25a46 human), 10pmol/λ	Καθεμία 1.0
Εκκινητής Forward και Reverse (OPGL/RANKL), 4pmol/λ	Καθεμία 0.3
ddH ₂ O	11.0
Τελικός όγκος αντίδρασης	20.0

Εκκινητές

Όνομα	Μήκος	Ακολουθία
OPGL/RANKL F	20 bp	5'- AGGAGCTCCAGGTAACCTATG -3'
OPGL/RANKL R	20 bp	5'- GGCAAGGTAGGGTTCAACTG -3'
Human slc25a46 5' F	20 bp	5'-AATCACGTGCTCCGAAGACT-3'
Human slc25a46 5' R	20 bp	5'-TAACCCCTCATCCCTGTGTGTC-3'

- 1) 1μl DNA από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε σωληνάρια 0.2ml.
- 2) Προετοιμάστηκε Μητρικό Διάλυμα αντίδρασης για τα δείγματα.
- 3) 19μl από το Μητρικό Διάλυμα μεταφέρθηκαν στα σωληνάρια 0.2ml που ήδη περιείχαν 1μl DNA από κάθε δείγμα ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μl για όλα τα δείγματα.
- 4) Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων PCR με το γονίδιο Human Slc25a46 εφαρμόστηκε το ακόλουθο πρόγραμμα κύκλων:

Κύκλοι	Στάδιο	Θερμοκρασία / χρόνος
1 x	Αποδιάταξη	στους 94 °C για 4 λεπτά
30 x	Αποδιάταξη	στους 94 °C για 30 δευτερόλεπτα
	Υβριδισμός εκκινητών	στους 57 °C για 30 δευτερόλεπτα
	Επιμήκυνση	στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα
1 x	Επιμήκυνση	στους 72 °C για 10 λεπτά
1 x	Διατήρηση	στους 16 °C για 30 δευτερόλεπτα

- 5) Προστέθηκαν 5μl του orangeG σε κάθε σωλήνα που περιείχε το προϊόν της αντίδρασης PCR.
- 6) Αναλύθηκαν σε 2% πήκτωμα αγαρόζης.

Δαλύματα

Taq Buffer 10x: 500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 9, 1% Triton-X

B. Για SNP60

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Συστατικά Αντίδρασης	Όγκος (μl)
DNA μήτρα	1.0
Taq DNA πολυμεράση	0.375
10 x Ρυθμιστικό Διάλυμα PCR (Taq buffer)	2.5

dNTPs	2.5
MgCl ₂	1.8
Εκκινητής Forward και Reverse (SNP60F + SNP60R)	2.5
ddH ₂ O	15.0
Τελικός όγκος αντίδρασης	25.0

Εκκινητές

Όνομα	Μήκος	Ακολουθία
SNP60 F	24	5'- CTCCTGTTCATATCAGAATTG -3'
SNP60 R	24	5'- AGATTACCTTGCAAGTCCAATACC -3'

- 1) 1μl DNA από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε σωληνάρια 0.2ml.
- 2) Προετοιμάστηκε Μητρικό Διάλυμα αντίδρασης για τα δείγματα.
- 3) 24μl από το Μητρικό Διάλυμα μεταφέρθηκαν στα σωληνάρια 0.2ml που ήδη περιείχαν 1μl DNA από κάθε δείγμα ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 25μl για όλα τα δείγματα.
- 4) Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων PCR για τον πολυμορφισμό SNP60 που χρησιμοποιείται για την γονοτύπηση των αταξικών ποντικών (ομόζυγων, ετερόζυγων) εφαρμόστηκε το ακόλουθο πρόγραμμα κύκλων:

Κύκλοι	Στάδιο	Θερμοκρασία / χρόνος
1 x	Αποδιάταξη	στους 94 °C για 3 λεπτά
30 x	Αποδιάταξη	στους 94 °C για 30 δευτερόλεπτα
	Υβριδισμός εκκινητών	στους 55 °C για 30 δευτερόλεπτα
	Επιμήκυνση	στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα
1 x	Επιμήκυνση	στους 72 °C για 10 λεπτά
1 x	Διατήρηση	στους 16 °C για 30 δευτερόλεπτα

- 5) Τοποθετήθηκαν 5μl από το προϊόν της αντίδρασης σε καθαρό eppendorf που περιείχε 5μl του orangeG.

6) Αναλύθηκαν σε 2% πήκτωμα αγαρόζης.

Δαλύματα

Taq Buffer 10x: 500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 9, 1% Triton-X

PCR

Stock εργαστηρίου – aliquots	Συγκεντρώσεις στην αντίδραση
ddH ₂ O	ddH ₂ O
10x Buffer	1x Buffer
dNTPs 2.5mM	dNTPS 0.25mM
MgCl ₂ 25mM	MgCl ₂ 1.5mM
Taq 10U / μl	Taq 1U
Primers (R and F) 10pmol / μl	Primers (R and F) 1-pmol

Πλαστικά – Γυαλικά

Αποστειρωμένα eppendorfs 0.2 και 1.5 ml

Αποστειρωμένα κίτρινα και μπλε tips

Συσκευές

Biorad thermal cycler

2.7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού των προϊόντων της αντίδρασης PCR και βασίζεται στην διαφορά του μοριακού βάρους των τμημάτων αυτών. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με την βοήθεια της ιδιότητας που έχει το DNA να αντιδρά στο ηλεκτρικό πεδίο. Το DNA περιέχει αρνητικές φωσφορικές ομάδες δίνοντας έτσι στο μόριο αυτό αρνητικό φορτίο. Τα δείγματα λοιπόν που τοποθετούνται στο πήκτωμα αγαρόζης δέχονται την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου και κινούνται προς το θετικό πόλο. Κατά την κίνησή τους αυτή διαχωρίζονται, αφού τα τμήματα χαμηλότερου μοριακού βάρους κινούνται πιο γρήγορα μέσα στο πήκτωμα.

Παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης 2% (w/v)

1) Αραίωση 100ml 10x TBE διαλύματος σε τελικό όγκο 1000ml (1x TBE).

- 2) Τοποθέτηση 5g αγαρόζης σε κωνική φιάλη που περιέχει 250ml του διαλύματος 1x TBE.
- 3) Διάλυση της αγαρόζης μέχρι να γίνει διαφανής (περίπου 5 λεπτά) στο φούρνο μικροκυμάτων.
- 4) Προσθήκη 20ml βρωμιούχου αιθιδίου και ελαφριά ανάμιξη.
- 5) Τοποθέτηση του διαλύματος στην ειδική συσκευή με τις χτένες (tray) για περίπου 15 λεπτά έως να στερεοποιηθεί το πήκτωμα.
- 6) Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία είχε ήδη τοποθετηθεί το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x TBE).
- 7) Τοποθέτηση 10μl από το μίγμα του προϊόντος της PCR αντίδρασης και του διαλύματος καταβύθισης (orangeG, 5 μl) στο «πηγαδάκι».
- 8) Εφαρμογή τάσης 100 – 120V για χρονική διάρκεια ανάλογα του είδους των δειγμάτων (μεγάλο μοριακό βάρος και μικρή διαφορά χρειάζεται περισσότερη ώρα από δείγματα μικρότερου μοριακού βάρους και μεγάλης διαφοράς βάσεων).
- 9) Φωτογράφιση σε λάμπα UV και αποθήκευση σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Διαλύματα

TBE 10x:

323.4g Tris

165g Βορικό οξύ

27.9g EDTA

Σε τελικό όγκο 3L με ddH₂O και το διάλυμα έχει αυτόματα pH = 8.0. Για το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (buffer) χρησιμοποιούμε 1.5 1x TBE, αραιώνονται 150ml 10x TBE με 1350ml ddH₂O.

Βρωμιούχο αιθίδιο: 1g / 100ml ddH₂O

Αγαρόζη (Sigma)

OrangeG (Διάλυμα καταβύθισης): 15g Ficoll 400 σε 30ml ddH₂O (σε υδατόλουτρο 55°C), προσθήκη 250mg OrangeG. Τελικός όγκος 100ml.

Πλαστικά – Γυαλικά

Κωνική φιάλη 500ml για το πήκτωμα

Ογκομετρικοί κύλινδροι 500 και 1000ml

Δοχείο 3L για την παρασκευή του 10x TBE

Συσκευές

Τροφοδοτικό BIO-RAD
Συσκευή ηλεκτροφόρησης OWL
Φούρνος μικροκυμάτων
Ζυγαριά ακριβείας
Σύστημα φωτογράφισης με UV

2.8 Απομόνωση ολικού RNA με τη μέθοδο ουρίας/χλωριούχου λιθίου (Urea / LiCl)

- 1) Λήψη ιστών από το ποντίκι. Γρήγορη πλύση σε 1x PBS για να απομακρυνθεί το αίμα. Κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε σημειωμένο erpendorf και άμεσα σε υγρό άζωτο.
- 2) Τοποθέτηση 3ml κρύου διαλύματος ουρίας/χλωριούχου λιθίου (Urea / LiCl) σε σωληνάρια στον πάγο.
- 3) Ο κατεψυγμένος ιστός τοποθετείται στο σωληνάριο αυτό ώσπου να ξεπαγώσει.
- 4) Ομογενοποίηση σε μέγιστη ταχύτητα σε πάγο.
- 5) Χρήση υπερήχων για 30 δευτερόλεπτα με μέγιστη δύναμη στο πάγο ώστε να σπάσουν τα μεγαλομοριακά μόρια (DNA, πρωτεΐνες) .
- 6) Επώαση στους 4 °C όλη τη νύχτα πάνω στον ανακινητή (shaker).
- 7) Μεταφορά του ομογενοποιημένου υλικού δυο σωλήνες erpendorf, 1.5 ml σε καθένα.
- 8) Φυγοκέντρηση στις 13800 στροφές / λεπτό για 20 λεπτά, στους 4 °C.
- 9) Απομάκρυνση υπερκείμενου.
- 10) Προσθήκη 1ml διαλύματος Urea / LiCl και επαναιώρηση του ιζήματος.
- 11) Φυγοκέντρηση στις 13800 στροφές / λεπτό για 15 λεπτά, στους 4 °C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 12) Προσθήκη 200μl διαλύματος RNA-TES, διάλυση του ιζήματος και επανένωση του δείγματος σε ένα erpendorf.
- 13) Προσθήκη 400μl RNA-φαινόλης και έντονη ανάμειξη του δείγματος για 5 λεπτά.

- 14) Φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές / λεπτό για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 15) Μεταφορά 360μl του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα erpendorf, χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση.
- 16) Προσθήκη 40μl διαλύματος 2M NaOAc και 1ml 100% αιθανόλης. Ανάμιξη του δείγματος.
- 17) Επάωση στους -20 °C για 2 ώρες ή όλη τη νύχτα.
- 18) Φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές / λεπτό για 10 λεπτά, στους 4 °C.
- 19) Προσεκτική απομάκρυνση όλου του υπερκειμένου και τοποθέτηση στον πάγο.
- 20) Προσθήκη στο ίζημα που περιέχει το RNA 400μl διαλύματος 70% αιθανόλης για να απομακρυνθούν τα άλατα και επαναιώρηση.
- 21) Φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές / λεπτό για 10 λεπτά, στους 4 °C.
- 22) Απομάκρυνση όλου του υπερκειμένου και τοποθέτηση στον πάγο.
- 23) Εξάτμιση και διαλυτοποίηση σε ανάλογο όγκο του ddH₂O.

Διαλύματα

Νερό με DEPC για την αποφυγή των ενζύμων RNase

Προσθήκη 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) σε απεσταγμένο νερό, ανάμιξη όλη τη νύχτα, και αποστείρωση 20min για την καταστροφή του DEPC.

10x PBS (για 1 λίτρο)

80g NaCl

2g KCl

11.5g Na₂HPO₄

2g KH₂PO₄

Ανάμιξη NaCl με KCl.

Ανάμιξη Na₂HPO₄ με KH₂PO₄

Ανάμιξη όλων μαζί.

Το pH πρέπει να είναι ~6.8

Αποστείρωση

Αποθήκευση στην θερμοκρασία δωματίου.

10% SDS (για 1 λίτρο)

100g SDS στα 900ml του H₂O

Θερμαίνεται στους 68 °C για να διαλυθεί.

Ρυθμίζεται ο όγκος μέχρι 1 λίτρο με το H₂O.

3M Sodium acetate, pH=5.2 (για 1 λίτρο)

408.1g of sodium acetate 3H₂O στα 800ml του H₂O

Ρυθμίζεται το pH σε 5.2 με glacial acetic acid.

Ρυθμίζεται ο όγκος μέχρι 1 λίτρο με το dH₂O.

5M NaCl (για 1 λίτρο)

292.2g NaCl στα 800ml του H₂O

Ρυθμίζεται ο όγκος μέχρι 1 λίτρο με το H₂O.

Αποστείρωση.

1M Tris pH=7.5 (για 1 λίτρο)

121.1g Trizma base στα 800ml του dH₂O

Ρυθμίζεται το pH σε 7.5 προσθέτοντας το πυκνό HCl.

Ρυθμίζεται ο όγκος μέχρι 1 λίτρο με H₂O.

Αποστείρωση

RNA-TES (10mM Tris, 1mM EDTA, 0.5%SDS, pH=7.6) (για 1L)

10ml 1M Tris pH=7.6

2ml EDTA 0.5M

50ml SDS 10%

938ml sterile ddH₂O

Αποστείρωση και αποθήκευση στην θερμοκρασία δωματίου

LiCl / Urea (3m LiCl, 6M Urea solution) (για 500 ml)

63g LiCl

180g Urea

ddH₂O

Φιλτράρισμα με φίλτρο 0.22μm

Αποθήκευση στους 4 °C

RNA-Phenol

Phenol 25 μέρη

Chloroform 24 μέρη

Isoamyl alcohol 1 μέρος

Saturated with RNA-TES

Πλαστικά – Γυαλικά

Αποστειρωμένα σωληνάρια erppendorfs 1.5 ml

Αποστειρωμένα κίτρινα και μπλε tips

Ποτήρι ζέσεως

Συσκευές

Ομογενοποιητής

Πηγή υπερήχων

Ψυχόμενη φυγόκεντρος

Φυγόκεντρος

Ανακινητής

2.9 Απομόνωση ολικού RNA με τη μέθοδο Tri Reagent

Η εναλλακτική αυτή μέθοδος προσφέρεται για ιστούς που έχουν μικρή μάζα.

- 1) Λήψη ιστών από το ποντίκι. Πλύση σε 1x PBS για να απομακρυνθεί το αίμα. Κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε σημειωμένο erppendorf και άμεσα σε υγρό άζωτο.
- 2) Τοποθέτηση 1ml διαλύματος Tri Reagent σε ειδικό σωληνάριο σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3) Ο κατεψυγμένος ιστός τοποθετείται στο σωληνάριο αυτό ώσπου να ξεπαγώσει.
- 4) Ομογενοποίηση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- 5) Προσθήκη 0.2 ml χλωροφόρμιου και έντονη ανάμιξη για 15 δευτερόλεπτα.
- 6) Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
- 7) Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές / λεπτό για 15 λεπτά, στους 4 °C.

- 8) Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erpendorf.
- 9) Προσθήκη 0.5ml ισοπροπανόλης για να καταβυθιστεί το RNA.
- 10) Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5–10 λεπτά.
- 11) Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές / λεπτό για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 12) Απομάκρυνση υπερκείμενου.
- 13) Προσθήκη 1ml διαλύματος 70% αιθανόλης και επαναιώρηση του ιζήματος που περιέχει το RNA .
- 14) Φυγοκέντρηση στις 7500 - 12000 στροφές / λεπτό για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- 15) Απομάκρυνση υπερκείμενου και εξάτμιση της αιθανόλης .
- 16) Διάλυση του ιζήματος σε ανάλογο όγκο του ddH₂O με DEPC.
- 17) Επώαση στους 50 - 60 °C για 10 - 15 λεπτά.

Πλαστικά – Γυαλικά

Αποστειρωμένα σωληνάρια 10 ml και erpendorfs 1.5 ml

Αποστειρωμένα κίτρινα και μπλε tips

Συσκευές

Ομογενοποιητής

Ψυχόμενη φυγόκεντρος

Φυγόκεντρος

Ανακινητής

2.10 Μέτρηση νουκλεϊνικών οξέων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στα 260nm. Είναι γνωστό ότι οπτική απορρόφηση στα 260nm ίση με τη μονάδα (O.D260 = 1.0) αντιστοιχεί σε συγκέντρωση RNA ίση με 40 μg/ml. Συνεπώς ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA βασίζεται στην εξίσωση

$$40\mu\text{g/ml (RNA)} \times \text{O.D260 του δείγματος} \times \text{Συντελεστής αραίωσης}$$

Πλαστικά – Γυαλικά

Αποστειρωμένα κίτρινα και μπλε tips

Συσκευές

Φωτόμετρο (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000)

2.11 Απομάκρυνση υπολειμμάτων γενωμικού DNA με DNase και σύνθεση cDNA

Η διαδικασία της απομάκρυνσης υπολειμμάτων γενωμικού DNA με το ένζυμο DNase πραγματοποιήθηκε πριν την ανάστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription) του απομονωμένου ολικού RNA έτσι ώστε να καταστραφεί το DNA που περιέχεται στο δείγμα για να μην δράσει ως ανταγωνιστικό υπόστρωμα του cDNA κατά την αντίδραση PCR. Κατά τη διαδικασία της σύνθεσης cDNA από το RNA χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Ανάστροφη Μεταγραφάση (Reverse Transcriptase). Μετά την απομόνωση του ολικού RNA απομακρύνθηκε το γενωμικό DNA με τη βοήθεια του ενζύμου DNase και ακολούθησε σύνθεση cDNA ως εξής:

- 1) Σε αποστειρωμένο eppendorf μεταφέρθηκαν 2μg ολικού RNA και προστέθηκε ddH₂O με DEPC για να φτάσει ο τελικός όγκος στα 8μl για κάθε δείγμα.
- 2) Προστέθηκε 1μl από το διάλυμα αντίδρασης (reaction buffer) και 1μl DNase.
- 3) Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Προσθήκη 1μl διαλύματος τερματισμού (stop solution).
- 5) Θέρμανση σε 70 °C για 10 λεπτά.
- 6) Άμεση μεταφορά στον πάγο.
- 7) Προσθήκη 1μl dNTPs και 1μl εκκινητών (oligo 'dT 12-15').
- 8) Θέρμανση σε 70 °C για 10 λεπτά.
- 9) Άμεση μεταφορά στον πάγο.
- 10) Προσθήκη 2μl διαλύματος αντίδρασης, 1μl Ανάστροφης Μεταγραφάσης M-MLV και 4μl ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μl.
- 11) Θέρμανση σε 37 °C για 50 λεπτά.
- 12) Η αντίδραση τερματίστηκε με θέρμανση στους 70 °C για 15 λεπτά.

Πλαστικά – Γυαλικά

Αποστειρωμένα eppendorfs 0.2 και 1.5 ml

Αποστειρωμένα κίτρινα και μπλε tips

Συσκευές

BioRad thermal cycler

2.12 PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) είναι μια μέθοδος για την ποσοτικοποίηση mRNA στόχων όπου η συσσώρευση των προϊόντων της PCR μετρίεται σε πραγματικό χρόνο, καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ενίσχυσης. Στην πράξη ένας αναλυτής (OCD βίντεο κάμερα), καταγράφει την δευτερογενή ακτινοβολία φθορισμού που εκπέμπεται από μία φθορίζουσα ομάδα η οποία ενσωματώνεται στο νεοσχηματιζόμενο προϊόν της αντίδρασης PCR. Η διέγερση της φθορίζουσας ομάδας γίνεται μέσω ακτινοβολίας διέγερσης (συνήθως μονοχρωματική ακτινοβολία laser) η οποία εκπέμπεται προς το δείγμα από ειδική λυχνία, η οποία περιλαμβάνεται στη συσκευή. Συνεπώς, η μέθοδος επιτρέπει την παρακολούθηση της συσσώρευσης του προϊόντος της ενίσχυσης σε πραγματικό χρόνο σε όλες τις φάσεις της διαδικασίας (εκθετική φάση, γραμμική φάση, πλατώ). Η ακριβής παρακολούθηση της καμπύλης συσσώρευσης των προϊόντων της PCR, επιτρέπει τον προσδιορισμό της αποδοτικότητας της αντίδρασης, καθιστώντας δυνατό τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης της αρχικής μήτρας που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση PCR (Φλεμετάκης, 2009).

Μέθοδος σύγκρισης τιμών Ct

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων της αρχικής μήτρας κατά την αντίδραση PCR είναι αξιόπιστη όταν η μέτρηση της συγκέντρωσης των προϊόντων της γίνεται κατά την εκθετική φάση της ενίσχυσης. Για το σκοπό αυτό, η ποσοτικοποίηση γίνεται με βάση τον αριθμό του κύκλου της PCR που απαιτούνται για να φθάσει η συγκέντρωση των προϊόντων μία συγκεκριμένη τιμή (threshold), η οποία βρίσκεται μέσα στην εκθετική φάση. Η αλγεβρική τιμή του κύκλου, κατά τον οποίο η συγκέντρωση των προϊόντων φτάνει την τιμή αναφοράς, ορίζεται ως κύκλος αναφοράς (threshold cycle, Ct) και αποτελεί το μέγεθος το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύγκριση και την ποσοτικοποίηση των επιπέδων αρχικής μήτρας στα βιολογικά δείγματα. Όσο

μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αρχικής μήτρας, τόσο μικρότερη τιμή Ct θα λαμβάνεται κατά την ενίσχυση. Ο πλέον διαδεδομένος τρόπος ποσοτικοποίησης βασίζεται στην έκφραση των επιπέδων των μεταγραφημάτων του γονιδίου στόχου, ως κλάσμα των επιπέδων των μεταγραφημάτων ενός γονιδίου αναφοράς στο ίδιο δείγμα. Η σύγκριση επιτυγχάνεται με την ενίσχυση και των δύο μεταγραφημάτων και τον προσδιορισμό των αντίστοιχων τιμών Ct (Φλεμετάκης, 2009). Ο λόγος σχετικής έκφρασης ενός γονιδίου στόχου (target) ως προς το γονίδιο αναφοράς (reference) υπολογίζεται βάση των αποδόσεων (E) της PCR πραγματικού χρόνου και της διαφοράς των τιμών Ct του άγνωστου δείγματος (sample) και του δείγματος αναφοράς (control) (Pfaffle) ως εξής:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{t target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{t ref}}(\text{control-sample})}}$$

B2M (β2 μικροσφαιρίνη)

Η β₂ μικροσφαιρίνη, επίσης γνωστή και ως B2M, είναι ένα συστατικό των MHC μορίων τάξης I, τα οποία βρίσκονται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα (εξαιρούνται τα ερυθρά αιμοσφαίρια). Στους ανθρώπους, η πρωτεΐνη β₂ μικροσφαιρίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο B2M. Το γονίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς στην PCR πραγματικού χρόνου κατά την παρούσα μελέτη.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- 1) 2μg RNA από ιστό εγκεφάλου χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των cDNA δειγμάτων.
- 2) Το κάθε cDNA δείγμα αραιώθηκε 1:3 με ddH₂O.
- 3) Ακολούθως σειριακές αραιώσεις των αθροιστικά συγκεντρωμένων cDNA (pooled) δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία των πρότυπων καμπύλων τόσο για το γονίδιο στόχο όσο και για το γονίδιο αναφοράς.
- 4) Πραγματοποιήθηκε η Real-Time PCR για την καμπύλη αναφοράς με τους εκκινητές RT-B2M, RT-common slc25a46 και RT-human slc25a46.

		B2M	slc25a46
1 x	Αποδιάταξη	στους 95°C για 2	στους 95°C για 2

		λεπτά	λεπτά
40 x	Αποδιάταξη	στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα	στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα
	Υβριδισμός εκκινητών	στους 58 °C για 15 δευτερόλεπτα	στους 55 °C για 15 δευτερόλεπτα
	Επιμήκυνση	στους 72 °C για 20 δευτερόλεπτα	στους 72 °C για 20 δευτερόλεπτα

- 5) Με βάση τις πρότυπες καμπύλες για τα τρία γονίδια (B2M, common slc25a46 και human slc25a46) επιλέχθηκε η αραιώση 1:10 για την ανάλυση των cDNA (που περιλαμβάνεται μέσα στην γραμμικότητα της πρότυπης καμπύλης). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η Real-Time PCR των προς εξέταση δειγμάτων ως εξής:

Συστατικά Αντίδρασης	Όγκος (μl)
cDNA μήτρα	1.0
Ssofast EvaGreen Supermix	5.0
Εκκινητής Forward (RT-B2M ή RT-slc25a46) 5pmol / μl	1.0
Εκκινητής Reverse (RT-B2M ή RT-slc25a46) 5pmol / μl	1.0
ddH ₂ O	2.0
Τελικός όγκος αντίδρασης	10.0

Εκκινητές

Όνομα	Μήκος	Ακολουθία
RT-common Slc25a46F	20bp	5'-CAGACCTTGGCTATGAAGTGC-3'
RT-common Slc25a46R	20bp	5'-CAGTCTCTCATTCCTCATA-3'
RT-human Slc25a46F	23bp	5'-TGAAATCCCTAACTTACGTGGTG-3'
RT-human Slc25a46R	21bp	5'-CACTCCCATGCCTATCACTCT-3'
RT-B2MF	21bp	5'-TTCTGGTGCTTGTCTCACTGA-3'
RT-B2MR	22bp	5'-CAGTATGTTTCGGCTTCCCATTC-3'

- 6) Αναλύθηκαν τα αποτελέσματα στην ειδική εφαρμογή Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 και περαιτέρω με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος GraphPad Prism 5(column statistics-one way ANOVA).

Πλαστικά – Γυαλικά

Αποστειρωμένα eppendorfs 0.2 και 1.5 ml

Αποστειρωμένα σωλήνες της Real-Time PCR και καπάκια τους

Αποστειρωμένα κίτρινα και μπλε tips

Συσκευές

Rotor-Gene, QIAGEN

2.13 Απομόνωση πρωτεϊνών

2.13.1 Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης

- 1) Λήψη ιστών από το ποντίκι. Γρήγορη πλύση σε 1x PBS για να απομακρυνθεί το αίμα. Κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε σημειωμένο eppendorf και άμεσα σε υγρό άζωτο.
- 2) Τοποθέτηση 1m κρύου διαλύματος λύσης (lysis buffer) με αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitors) σε ειδικά σωληνάκια στον πάγο.
- 3) Ο κατεψυγμένος ιστός τοποθετείται στο σωληνάριο αυτό ώσπου να ξεπαγώσει.
- 4) Ομογενοποίηση σε μέγιστη ταχύτητα σε πάγο.
- 5) Χρήση υπερήχων για 15 δευτερόλεπτα στον πάγο τρεις φορές.
- 6) Μεταφορά του ομογενοποιημένου υλικού σε ένα φρέσκο σωλήνα eppendorf.
- 7) Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές / λεπτό για 15 λεπτά, στους 4 °C.
- 8) Μεταφορά του υπερκείμενου σε ένα φρέσκο σωλήνα eppendorf.
- 9) Αποθήκευση στους -20 °C.
- 10) Υπολογισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford.

Διαλύματα

Lysis buffer (for kinases)

50mM Tris HCl pH 7.4

1mM EDTA

150mM NaCl

0.2% NP40

Protease inhibitors

PI cocktail	10μl
Sodium orthovanadate	10μl
Total volume of lysis buffer	1ml

2.13.2 Υποκυτταρική κλασμάτωση (subcellular fractionation)

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία απομονώθηκε το κυτταροπλασματικό κλάσμα από το μιτοχονδριακό ως εξής:

- 1) Λήψη ιστών (50 – 100mg) από το ποντίκι. Γρήγορη πλύση σε 1x PBS για να απομακρυνθεί το αίμα. Κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε σημειωμένο erppendorf και άμεσα σε υγρό άζωτο.
- 2) Τοποθέτηση 300μl κρύου διαλύματος απομόνωσης (isolation buffer) με αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitors) σε ένα γυάλινο γουδί στο πάγο.
- 3) Τοποθέτηση του παγωμένου ιστού στο γυάλινο γουδί.
- 4) Ομογενοποίηση με γουδοχέρι στο γυάλινο γουδί σε πάγο.
- 5) Μεταφορά του ομογενοποιημένου υλικού σε ένα φρέσκο σωλήνα erppendorf και ξανά στο πάγο.
- 6) Φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές / λεπτό για 5 λεπτά στους 4 °C.
- 7) Μεταφορά του υπερκείμενου σε ένα φρέσκο σωλήνα erppendorf και διατήρηση στο πάγο. (sup1).
- 8) Τοποθέτηση 250μl κρύου διαλύματος απομόνωσης (isolation buffer) ώστε να διαλυθεί το ίζημα.
- 9) Φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές / λεπτό για 5 λεπτά στους 4 °C.
- 10) Μεταφορά του υπερκείμενου σε ένα φρέσκο σωλήνα erppendorf και διατήρηση στον πάγο (sup2).
- 11) Τα δυο υπερκείμενα (sup1 + sup2) τοποθετήθηκαν μαζί και έγινε φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές / λεπτό για 10 λεπτά στους 4 °C.
- 12) Μεταφορά του υπερκείμενου σε ένα νέο σωλήνα erppendorf και διατήρηση στο πάγο. (sup3) Το υπερκείμενο αυτό περιέχει το κυτταροπλασματικό κλάσμα.
- 13) Τοποθέτηση 20 -50μl κρύου διαλύματος απομόνωσης ώστε να διαλυθεί το ίζημα. Αυτό περιέχει το μιτοχονδριακό κλάσμα.
- 14) Αποθήκευση στους -20 °C.
- 15) Υπολογισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford.

Διαλύματα

Isolation buffer

320mM sucrose

1mM EDTA

10mM Trizma -Base

dH₂O

Ρύθμιση του pH μέχρι 7.4 με το HCl

Αποστείρωση του διαλύματος με διήθηση μέσω φίλτρου 0.2μm.

Πλαστικά – Γυαλικά

Αποστειρωμένα eppendorfs 1.5 ml

Αποστειρωμένα κίτρινα και μπλε tips

Γυάλινο γουδί 1 ml με γουδοχέρι

Πιπέττες Pasteur

Συσκευές

Φυγόκεντρος

Ζυγαριά ακριβείας

2.14 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting)

Η μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western Blot) είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική της ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών στο κυτταρικό εκχύλισμα ενός ιστού. Χρησιμοποιεί την ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων για το διαχωρισμό πρωτεϊνών βάση του μήκους τους σε συνθήκες που οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται. Οι πρωτεΐνες στη συνέχεια μεταφέρονται σε μια μεμβράνη, η οποία είναι συνήθως νιτροκυτταρίνης ή PVDF, και στην συνέχεια ανιχνεύεται μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη με χρήση ειδικών αντισωμάτων για την πρωτεΐνη-στόχο.

Η ηλεκτροφόρηση σε ασυνεχή πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιείται σε δύο κάθετα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου τοποθετημένα σε σειρά το ένα πάνω στο άλλο. Τα πρωτεϊνικά δείγματα εισάγονται στο σύστημα στο επάνω πηκτώμα, που ονομάζεται πηκτώμα συσσώρευσης (stacking gel). Το πηκτώμα συσσώρευσης έχει χαμηλή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου (5%) και προκαλεί συσσώρευση σε στενές ζώνες του πρωτεϊνικού δείγματος πριν εισέλθει στο δεύτερο πηκτώμα που ονομάζεται πηκτώμα διαχωρισμού (separating gel). Το πηκτώμα διαχωρισμού έχει υψηλότερη

συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου (συνήθως 8-15%) και πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του δείγματος κατά την κίνηση τους σε αυτό (Λάμπρου, 2010).

Τα συστήματα ηλεκτροφόρησης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (sodium dodecyl sulphate, SDS) χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Το SDS είναι ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας (ισχυρό απορρυπαντικό) το οποίο αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες και προκαλεί ολική αποδιάταξη της δομής τους. Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται έχουν σταθερό λόγο ανιοντικού φορτίου προς μάζα και κατά την ηλεκτροφόρηση όλα τα πρωτεϊνικά μόρια κινούνται προς το θετικά φορτισμένο πόλο. Παράλληλα το πήκτωμα δρα σαν μοριακός ηθμός όπου το μέγεθος των πόρων της καθορίζει την κινητικότητα της πρωτεΐνης. Η ταχύτητα της μετακίνησης εξαρτάται από το μέγεθος του μορίου σε σχέση με τους πόρους του πηκτώματος. Όσο μικρότερα τα μόρια τόσο μετακινούνται γρήγορα ενώ τα μεγαλύτερα μόρια μετακινούνται πιο αργά (Λάμπρου, 2010).

Πριν την ηλεκτροφόρηση, τα πρωτεϊνικά δείγματα επεξεργάζονται με μία θειόλη, όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη ($\text{HO-CH}_2\text{CH}_2\text{-SH}$). Η β-μερκαπτοαιθανόλη ανάγει όλους τους δισουλφιδικούς δεσμούς που υπάρχουν στα πρωτεϊνικά μόρια έτσι ώστε οι πρωτεΐνες να είναι ολικά αποδιαταγμένες χωρίς διαμοριακές ή ενδομοριακές διασυνδέσεις.

Τα αντισώματα (antibodies ή Abs) ή ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulins, Igs) είναι αμυντικές πρωτεΐνες που παράγονται από τα ζώα εξαιτίας της εισβολής στον οργανισμό κάποιας ξένης ουσίας. Τα αντισώματα εκκρίνονται από τα πλασματοκύτταρα που προέρχονται από τα Β λεμφοκύτταρα. Τα αντισώματα αναγνωρίζουν, αλληλεπιδρούν και δεσμεύουν ανιστρεπτά (αμφίδρομα) την ξένη ουσία που έχει προκαλέσει τη σύνθεση τους. Κάθε ξένη ουσία που έχει την ικανότητα να προκαλέσει τη σύνθεση αντισώματος ονομάζεται αντιγόνο (antigen ή Ag) και μπορεί να είναι πρωτεΐνες, πεπτίδια, πολυσακχαρίτες, νουκλεϊκά οξέα ή και άλλα συνθετικά μόρια μικρότερου μοριακού βάρους. Τα αντισώματα αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν συνήθως με τον επίτοπο / αντιγονικό καθοριστή που είναι η μικρή περιοχή του αντιγόνου. Τα αντισώματα έχουν δυο κατηγορίες, πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα. Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι τα καθαρά αντισώματα που αναγνωρίζουν αποκλειστικά ένα αντιγονικό καθοριστή και είναι εξειδικευμένα. Τα πολυκλωνικά αντισώματα είναι το μίγμα των αντισώματων που

αναγνωρίζουν το ίδιο αντιγόνο μέσω διαφορετικών αντιγονικών καθοριστών του και παράγονται με την ανοσοποίηση ενός ζώου με το συγκεκριμένο αντιγόνο και την συλλογή του ορού που περιέχει τα πολυκλωνικά αντισώματα (Λάμπρου, 2010; Ντούνη 2011).

2.14.1 Ανοσοαποτύπωμα Western (Western blot)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- 1) Πλύθηκαν οι γυάλινες πλάκες, οι χτένες και οι πλαστικές συσκευές με dH_2O και στεγνώθηκαν στο αέρα. Συναρμολογήθηκε ο θάλαμος του πηκτώματος στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- 2) Ετοιμάστηκε το διάλυμα του πηκτώματος διαχωρισμού (Resolving Gel) και προστέθηκε στο κενό μεταξύ των γυάλινων πλακών, αφήνοντας επαρκή χώρο για το πήκτωμα συσσώρευσης (Stacking Gel). Προσεκτικά επικαλύφτηκε το διάλυμα του ακρυλαμιδίου με ισοπροπανόλη (για το πήκτωμα που περιέχει < 10% ακρυλαμίδιο) ή 0.1% SDS (για το πήκτωμα που περιέχει < 8% ακρυλαμίδιο).

Resolving Gel (bottom gel)

	10%	12%
30% Achylamide	3.3ml	4ml
1.5M Tris pH 8.8	2.5ml	2.5ml
10% SDS	0.1ml	0.1ml
dH_2O	4ml	3.3ml
10% APS	100μl	100μl
TEMED	5μl	5μl
Total	10ml	10ml

Μετά την προσθήκη του TEMED, τοποθετήθηκε το διάλυμα στο χώρο μεταξύ των γυάλινων πλακών όσο πιο γρήγορα γίνεται.

- 3) Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, πλύθηκε αρκετές φορές το πάνω μέρος του πηκτώματος με απιονισμένο νερό για να φύγει το ακρυλαμίδιο που δεν έχει πολυμεριστεί. Στραγγίστηκε όσο το δυνατόν περισσότερο υγρό από

το πάνω μέρος του πηκτώματος, και στη συνέχεια απομακρύνθηκε το νερό που παρέμεινε με την άκρη μιας χαρτοπετσέτας.

- 4) Προστέθηκε το διάλυμα του πηκτώματος συσσώρευσης (Stacking Gel) πάνω στην επιφάνεια του πηκτώματος διαχωρισμού και αμέσως τοποθετήθηκε η χτένα στο διάλυμα πηκτώματος συσσώρευσης.

Stacking Gel (top gel, 4%)

dH ₂ O	30.25ml
0.5M Tris pH 6.8	12.5ml
10% SDS	0.5ml
30% Acrylamide	6.7ml
Total	50 ml

Για τα 2ml προστέθηκαν 20μl 10% και 2μl TEMED

- 5) Κατά τον πολυμερισμό του πηκτώματος συσσώρευσης, προετοιμάστηκαν τα δείγματα. Θερμάνθηκαν στους 100°C για 3 λεπτά σε 5 x SDS gel-loading buffer για τη μετουσίωση των πρωτεϊνών.
- 6) Μόλις ολοκληρώθηκε ο πολυμερισμός, αφαιρέθηκε η χτένα προσεκτικά και πλύθηκαν τα πηγάδια με απιονισμένο νερό για να φύγει το μη πολυμερισμένο ακρυλαμίδιο. Τοποθετήθηκε το πήκτωμα στην συσκευή της ηλεκτροφόρησης και η δεξαμενή της γεμίστηκε με το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (Tris-glycine electrophoresis buffer).
- 7) Φορτώθηκαν τα δείγματα και πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους (Bio-rad prestained SDS-PAGE standards. Broad range, 5μl/well)
- 8) Η ηλεκτρόφορηση έτρεξε σε 90V μέχρι το κυανό της βρωμοφαινόλης που υπάρχει σε κάθε δείγμα να βγει από το κάτω μέρος του πηκτώματος και μετά 1 ώρα επιπλέον (περίπου 2.5-3 ώρες). Η συσκευή αποσυναρμολογήθηκε και προετοιμάστηκε για western blot.
- 9) Τοποθετήθηκαν τα διηθητικά χαρτιά και η νιτροκυτταρίνη στο διάλυμα μεταφοράς 10 λεπτά νωρίτερα.
- 10) Τοποθετήθηκε το πήκτωμα του SDS πολυακρυλαμιδίου που μόλις ηλεκτροφορήθηκε σε διάλυμα μεταφοράς (χρήση μόνο μία φορά). Στην άνοδο τοποθετήθηκαν απευθείας ένα σφουγγάρι, δυο διηθητικά χαρτιά και το πήκτωμα πάνω σε αυτά. Επικαλύφθηκε με την μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης

και στην συνέχεια τοποθετήθηκαν δυο βρεγμένα διηθητικά χαρτιά και ένα σφουγγάρι στην κάθοδο. Αφαιρέθηκαν οι φυσαλίδες μεταξύ των διαφορετικών στρωμάτων .

- 11) Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε σε τάση 110V για 60 λεπτά (ή όλη τη νύκτα στα 24V, 4°C).
- 12) Αποσυναρμολογήθηκε η διάταξη μεταφοράς και ξεπλύθηκε η μεμβράνη σε PBS.

2.14.2 Επώαση με αντισώματα (Indirect Enzyme Immunoassay) έναντι της πρωτεΐνης Slc25a46

Η πρωτεΐνη Slc25a46 (46kDa) εντοπίστηκε με τη χρήση κατάλληλου πολυκλωνικού αντισώματος όπως περιγράφεται στη συνέχεια:

- 1) Ξεπλύθηκε σύντομα η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης στο διάλυμα μεταφοράς, στη συνέχεια, επώαστηκε για 3 ώρες πάνω σε πλατφόρμα ανακίνησης σε θερμοκρασία δωματίου (22°C) με το ρυθμιστικό διάλυμα παρεμπόδισης (blocking buffer, 1x PBS - 5% BSA - 0,1% Tween-20).
- 2) Σύνδεση του ειδικού αντισώματος στις πρωτεΐνες: Επώαση του αντισώματος (πρώτο αντίσωμα για SLC25A46 αραιωμένο 1 / 2500 με παρεμποδιστικό ρυθμιστικό διάλυμα, SantaCruz Biotechnology Inc.) σε κλειστό κουτί όλη τη νύκτα στους 4°C πάνω σε πλατφόρμα ανακίνησης.
- 3) Σύνδεση του δεύτερου αντισώματος (1 ώρα): Επώαση του δεύτερου αντισώματος (αντίσωμα έναντι της αιγός αραιωμένο 1 / 5000 σε ρυθμιστικό διάλυμα παρεμπόδισης) σε κλειστό κουτί για 1 ώρα πάνω σε πλατφόρμα ανακίνησης σε θερμοκρασία δωματίου (22°C).
- 4) Πλύσιμο: Η μεμβράνη πλύθηκε με διάλυμα PBS - 0,1% Tween-20 τρεις φορές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 5) Ανίχνευση της σύνδεσης του αντισώματος: Εφαρμόστηκε το διάλυμα ανίχνευσης ECL στην μεμβράνη που επώαστηκε για 1 - 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τυλίχτηκε η μεμβράνη με διαφανές περιτύλιγμα και ακολούθησε εμφάνιση με χημειοφωταύγεια.

2.14.3 Επώαση με αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης GRP75

Η πρωτεΐνη Grp75 είναι μια πρωτεΐνη που ρυθμίζεται από τη γλυκόζη και έχει μοριακό βάρος 75kDa. Είναι μία πρωτεΐνη της μιτοχονδριακή μήτρας που γενικά αναγνωρίζεται ως μέλος της κατηγορίας των πρωτεϊνών του θερμικού σοκ 70 (HSP70). Η Grp75 επάγεται σε συνθήκες έλλειψης γλυκόζης και άλλες θρεπτικές και περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Η Grp75 είναι μία συνοδός πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη μεταφορά πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια. Η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια, όμως οι συναφείς μορφές μπορούν να βρεθούν στο κυτταρόπλασμα ή στην επιφάνεια της εξωκυτταρικής μεμβράνης.

Η ίδια νιτροκυτταρίνη χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστούν τα επίπεδα της GRP75 (75kDa) ως μιτοχονδριακή πρωτεΐνη αναφοράς για τις ποσότητες πρωτεϊνών που φορτώθηκαν στο πήκτωμα.

- 1) Ξεπλύθηκε σύντομα η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης στο διάλυμα μεταφοράς, στη συνέχεια, επώαστηκε για 3 ώρες πάνω σε πλατφόρμα ανακίνησης σε θερμοκρασία δωματίου (22 °C) με το ρυθμιστικό διάλυμα παρεμπόδισης (blocking buffer, 5% αποβουτυρομένο γάλα – 1x TBS).
- 2) Επώαση με αντίσωμα έναντι της GRP75 (αραιωμένο 1:1000 σε 5% αποβουτυρομένο γάλα – 1x TBS, SantaCruz Biotechnology Inc.) σε κλειστό κουτί όλη τη νύκτα στους 4°C πάνω σε πλατφόρμα ανακίνησης.
- 3) Πλύσιμο τρεις φορές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με το διάλυμα 1x TBS.
- 4) Με το δεύτερο αντίσωμα (anti-rabbit, αραιωμένο 1:2000 σε 5% αποβουτυρομένο γάλα – 1x TBS) για 1 ώρα στην θερμοκρασία δωματίου.
- 5) Πλύσιμο τρεις φορές για 10 λεπτά στην θερμοκρασία δωματίου με το διάλυμα 1x TBS.
- 6) Εμφάνιση με χημειοφωταύγεια.

Διαλύματα

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris-glycine electrophoresis buffer)

25mM Tris Base	3g
192mM Glycine	14.4g
0.1% SDS	10% SDS 10ml

dH₂O μέχρι 1000ml

σύνολο 1000ml

αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί 3 - 4 φορές.

Διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer)

25mM Tris Base 3g

192mM Glycine 14.4g

Methanol 200ml

dH₂O μέχρι 1000ml

σύνολο 1000ml

μόνο μια χρήση

Διάλυμα ECL

Stock solutions

Luminol 250mM

0.44g Luminol (3-aminophthalhydrazide; sigma A8511)

DMSO μέχρι 10ml

Aliquot 0.5ml / tube. αποθήκευση στο σκοτάδι στους -20 °C

Coumaric acid 90mM

0.15g p-Coumaric acid (sigma C9008)

100% ETOH to 10ml

Aliquot 0.5ml / tube. αποθήκευση στο σκοτάδι στους -20 °C

Tris-HCl, 2M pH 8.5

8.72g Tris base

ddH₂O to 50ml. Ρυθμίζεται το pH με το HCl σε 8.8.

Hydrogen peroxide, 30%

Working solutions

Διάλυμα 1

Ουσία	Όγκος	Όγκος
ddH ₂ O	9 ml	2.33 ml

2M Tris-HCl	0.5 ml	125 ml
Coumaric acid	45 uL	11 uL
Luminol	100 uL	25 uL
Total	10 ml	2.5 ml

Διάλυμα 2

Ουσία	Όγκος	Όγκος
ddH ₂ O	9 ml	2.375 ml
2M Tris-HCl	0.5 ml	125 ml
Hydrogen Peroxide, 30%	6 uL	1.5 uL
Σύνολο	10 ml	2.5 ml

Πλαστικά – Γυαλικά

Αποστειρωμένα σωληνάρια erpendorfs 0.2 και 1.5 ml

Αποστειρωμένα κίτρινα και μπλε tips

Σωληνάτια τύπου Falcon tube 15ml & 50ml

Συσκευές

Western blot equipment (Bio-Rad)

Τροφοδοτικό

Thermoblock (AccuBlock, Digital Dry Bath, Labnet)

Φυγόκεντρος

Πλατφόρμα ανακίνησης

Κεφαλαίο 3: Αποτελέσματα

3.1 Χαρακτηριστικά του Slc25a46^{m/m} μοντέλου αταξίας και σκοπός της μελέτης

Σε προηγούμενες μελέτες επιτεύχθηκε μέσω τυχαίας μεταλλαξογένεσης η δημιουργία ενός νέου μοντέλου αταξίας-επιληψίας στο ποντίκι και με γενετική ανάλυση εντοπίστηκε μία χωρίς νόημα μετάλλαξη (nonsense) στο γονίδιο Slc25a46 (Καρακώστας, 2010). Η μετάλλαξη του γονιδίου Slc25a46 αλλάζει το νουκλεοτίδιο της κυτοσίνης σε θυμίνη, ενώ σε αμινοξικό επίπεδο το 96^ο αμινοξύ, η γλουταμίνη, αλλάζει σε κωδικόνιο λήξης. Ως αποτέλεσμα παράγεται μια πρωτεΐνη 95 αμινοξέων αντί της άγριου τύπου SLC25A46 πρωτεΐνης που έχει 418 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη αυτή αναμένεται να έχει χάσει την λειτουργικότητα της και την φυσιολογική της δομή μιας και λείπει η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την ενσωμάτωση της πρωτεΐνης στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.

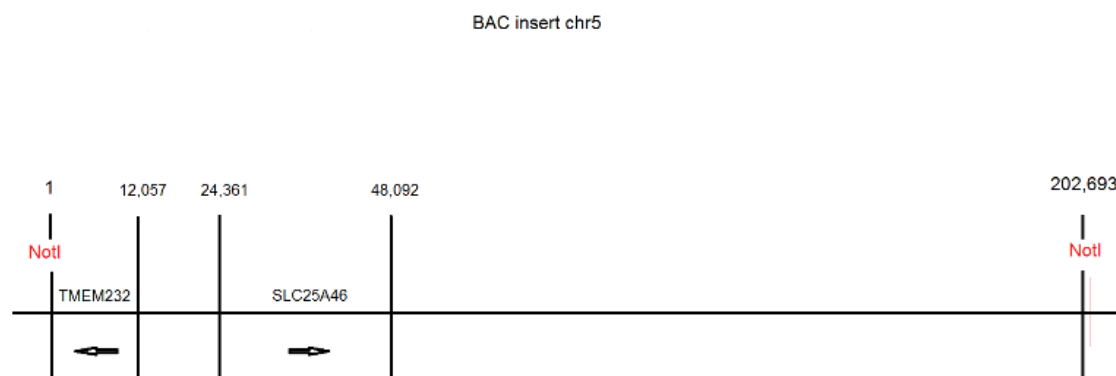
Τα ποντίκια που φέρουν τη μετάλλαξη στο γονίδιο Slc25a46 (Slc25a46^{m/m}) έχουν έντονη αταξία (και ως εκ τούτου αναφέρονται ως αταξικά) κατά την βάδιση και εμφανίζουν επιληπτικές κρίσεις. Ο φαινότυπος χαρακτηρίζεται από αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας και εμφανίζεται μεταξύ της 2^{ης} – 3^{ης} εβδομάδας της ζωής των ποντικίων με ένα ποσοστό περίπου 60% να εμφανίζει πρόωρη θνησιμότητα σε ηλικία 2 μηνών ενώ τα υπόλοιπα ζουν μέχρι 4 μηνών. Τα χαρακτηριστικά της αταξίας είναι πλάγιασμα κατά το περπάτημα με απροσδιόριστη συνεχή αλλαγή κατεύθυνσης, επιληπτικές κρίσεις, μειωμένο βάρος, μειωμένη δραστηριότητα και υπερανάπτυξη των δοντιών (malocclusion). Ο φαινότυπος αυτός εμφανίζεται εξίσου σε αρσενικά και θηλυκά ποντίκια (Καρακώστας, 2010; Kano, 2012).

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η δημιουργία και χαρακτηρισμός διαγονιδιακών ποντικίων που εκφράζουν το ανθρώπινο Slc25a46 γονίδιο (TgSlc25a46) ώστε σε πειράματα γενετικής αναπλήρωσης να επιβεβαιωθεί εάν η μετάλλαξη στο γονίδιο Slc25a46 είναι υπεύθυνη για τον φαινότυπο που παρατηρείται στα αταξικά ζώα. Αυτό επιτυγχάνεται με την διασταύρωση αταξικών ποντικίων (Slc25a46^{m/m}) και διαγονιδιακών ποντικίων (TgSlc25a46) ώστε να μελετηθεί εάν στα ποντίκια ομόζυγα για την μετάλλαξη στα οποία έχει ενσωματωθεί το γονίδιο που

κωδικοποιεί την ανθρώπινη πρωτεΐνη SLC25A46 (Slc25a46^{m/m}/ TgSlc25a46) αναστρέφεται ο αταξικός φαινότυπος.

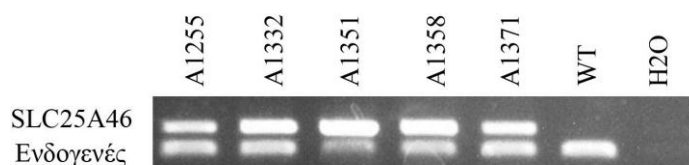
3.2 Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών και εκτίμηση του αριθμού αντιγραφών

Τα TgSlc25a46 διαγονιδιακά ποντικά δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο της μικροένεσης (micro-injection) σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων (Douni et al., 2004). Για την δημιουργία της διαγονιδιακής κατασκευής χρησιμοποιήθηκε ένας φορέας BAC (pBACe3.6) και πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο περιορισμού NotI για την απομόνωση της γονιδιοματικής περιοχής μεγέθους 202,7 kb (RP11-671K7). Αυτή η περιοχή περιέχει ολόκληρο το Slc25a46 γονίδιο του ανθρώπινου (27kb) που εκτός από τις κωδικές περιοχές περιλαμβάνονται και οι ρυθμιστικές ώστε να επιτευχθεί σωστή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Επίσης, περιλαμβάνεται και ένα τμήμα του ανθρώπινου γονιδίου TMEM232 που δεν φέρει κωδικές περιοχές (Εικόνα 3.1).



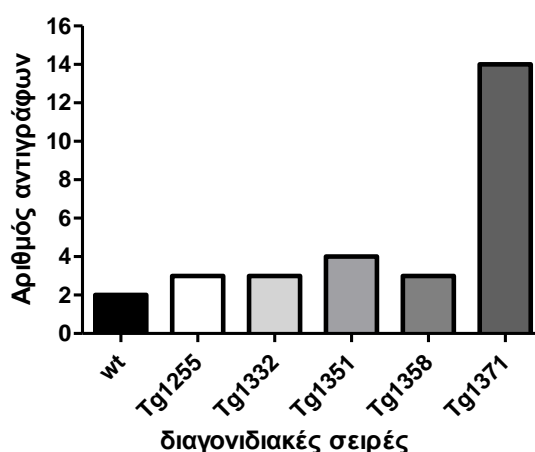
Εικόνα 3.1: Η γονιδιοματική περιοχή του ανθρώπινου γονιδίου **Slc25a46** (202,7 kb) που χρησιμοποιήθηκε στην μικροένεση. Τα βέλη δείχνουν τον προσανατολισμό των γονιδίων.

Με απομόνωση γενωμικού DNA και αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για το ανθρώπινο Slc25a46 γονίδιο ταυτοποιήθηκαν πέντε διαγονιδιακές σειρές (TgSlc25a46) : Tg1255, Tg1332, Tg1351, Tg1358 και Tg1371 (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: Ταυτοποίηση των TgSlc25a46 διαγονιδιακών ποντικών. Πραγματοποιήθηκαν PCR αντιδράσεις με ειδικούς εκκινητές για το Slc25a46 γονίδιο του ανθρώπου. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το ενδογενές γονίδιο RANKL. Tg1255, Tg1332, Tg1351, Tg1358 και Tg1371: διαγονιδιακές σειρές (TgSlc25a46), WT: άγριος τύπος (θετικός μάρτυρας), H2O: νερό (αρνητικός μάρτυρας).

Η εκτίμηση του αριθμού αντιγράφων του διαγονιδίου πραγματοποιήθηκε με PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) χρησιμοποιώντας ως μήτρα γενωμικό DNA (1ng/μl) και εκκινητές που «πολλαπλασιάζουν» το γονίδιο Slc25a46 του ανθρώπου και του ποντικού και το γονίδιο αναφοράς HuR. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι ο αριθμός αντιγράφων σε καθεμία διαγονιδιακή σειρά ήταν ως εξής: Tg1255, Tg1332 και Tg1358 (1 αντίγραφο), Tg1351 (2 αντίγραφα), και Tg1371 (12 αντίγραφα) (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Ο αριθμός αντιγράφων στις TgSlc25a46 διαγονιδιακές σειρές. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές για το γονίδιο Slc25a46 του ανθρώπου και του ποντικού και το γονίδιο αναφοράς HuR ποντικού σε qPCR.

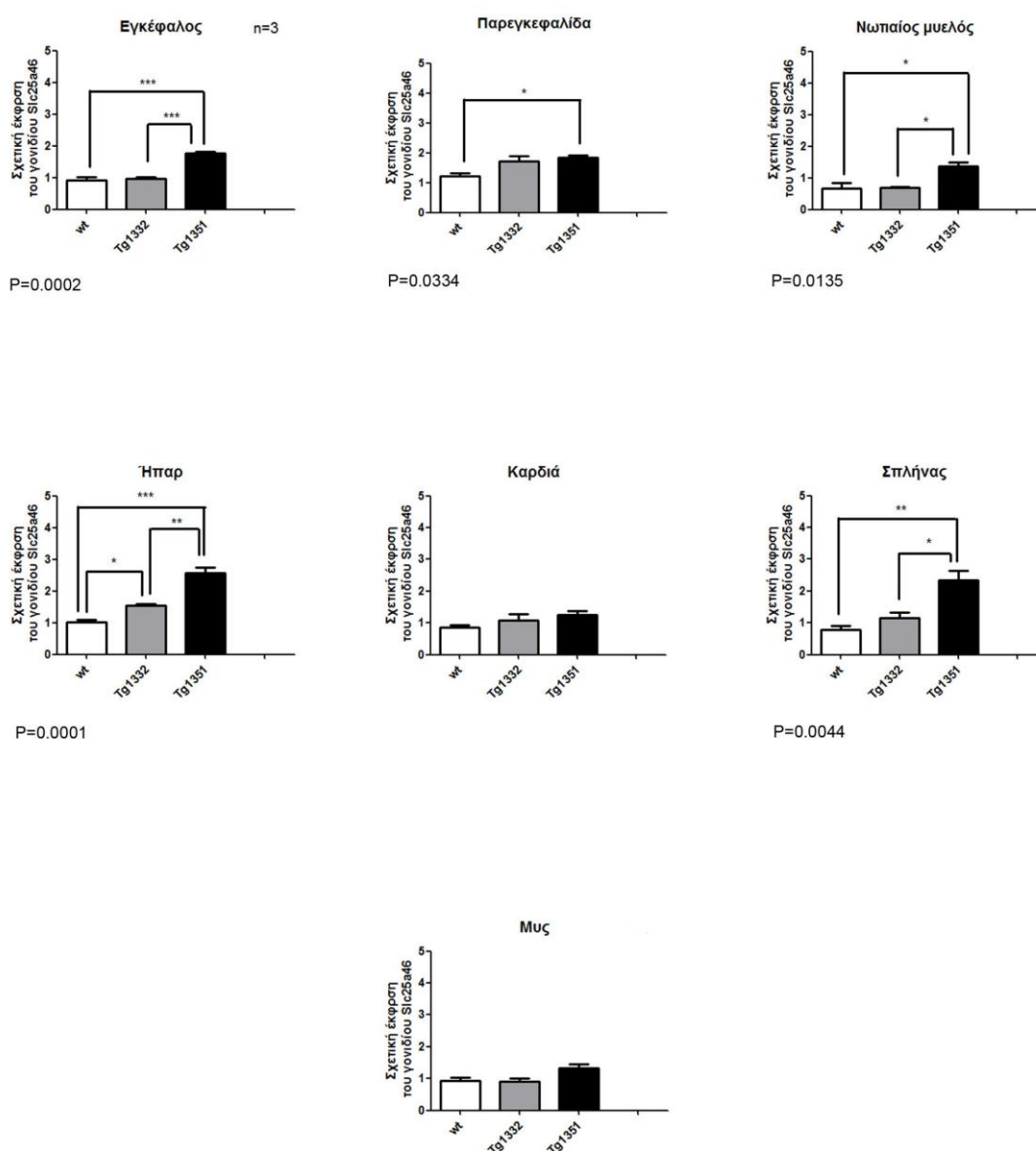
3.3 Ποσοτική ανάλυση της έκφρασης του ανθρώπινου Slc25a46 διαγονιδίου σε επίπεδο mRNA

Στο παρόν πείραμα μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του ανθρώπινου Slc25a46 διαγονιδίου στις Tg1332 και Tg1351 σειρές. Η ποσοτική ανάλυση της έκφρασης πραγματοποιήθηκε με PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) που είναι μία πολύ ευαίσθητη ποσοτική μέθοδος όπου η συσσώρευση των προϊόντων της PCR μετριέται σε πραγματικό χρόνο, καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ενίσχυσης.

Για την ανάλυση της έκφρασης του διαγονιδίου Slc25a46 σε επίπεδο mRNA απομονώθηκε RNA από 7 ιστούς (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός, σπλήνα, καρδιά, ήπαρ, μυς) τόσο από ποντίκια άγριου τύπου όσο και από διαγονιδιακά ποντίκια των δύο σειρών, Tg1332 και Tg1351. Χρησιμοποιήθηκαν τρία ποντίκια (αρσενικά / θηλυκά) ανά ομάδα, ηλικίας 5 εβδομάδων. Από αυτά τα δείγματα συντέθηκε cDNA με τη βοήθεια αντίστροφης μεταγραφάσης. Αφού έγινε σύνθεση cDNA πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις Real Time PCR με ζεύγη εκκινητών που αναγνωρίζουν και ενισχύουν α) και το ενδογενές Slc25a46 γονίδιο του ποντικού και το ανθρώπινο διαγονίδιο, β) μόνο το ανθρώπινο γονίδιο Slc25a46 και γ) το γονίδιο αναφοράς B2M του ποντικού. Κάθε δείγμα επαναλήφθηκε δύο φορές, ενώ χρησιμοποιήθηκαν 3 βιολογικά δείγματα. Οι τιμές Ct αναλύθηκαν στην ειδική εφαρμογή Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 ενώ η βάση των Ct αναλύθηκε στην ειδική εφαρμογή Bio-Rad Gene Expression Relative Quantitation και περαιτέρω πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος GraphPad Prism 5.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν οι κοινοί εκκινητές για τα Slc25a46 γονίδια ποντικού και ανθρώπου έγινε σύγκριση μεταξύ του άγριου τύπου και των δυο διαγονιδιακών σειρών σε κάθε ιστό με βάση μια τιμή του άγριου τύπου για το κοινό γονίδιο Slc25a46 και το γονίδιο αναφοράς B2M. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση του γονιδίου Slc25a46 ανάμεσα στα ποντίκια άγριου τύπου και στην διαγονιδιακή σειρά Tg1351 στον εγκέφαλο (P=0.0002), στην παρεγκεφαλίδα (P=0.0334), στο νωτιαίο μυελό (P=0.0135), στον σπλήνα (P=0.0044) και στο ήπαρ (P=0.0001). Η έκφραση του γονιδίου Slc25a46 ήταν ελαφρώς αυξημένη στους ιστούς ποντικών της διαγονιδιακής

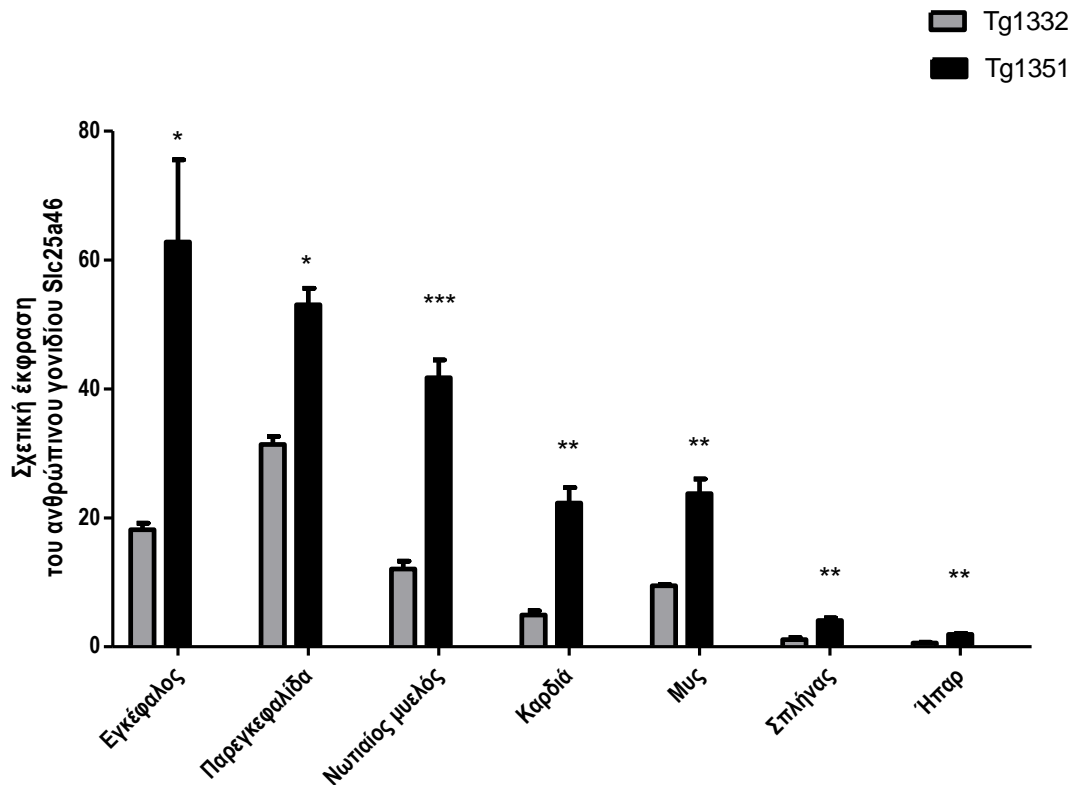
σειράς Tg1332 σε σχέση τα άγριου τύπου ποντίκια και σαφώς μικρότερη από αυτή στην σειρά Tg1351 (Εικόνα 3.4). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της έκφρασης είναι ανάλογη με τον αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου δηλαδή τα διαγονίδια τα οποία ενσωματώθηκαν, εκφράζονται. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην καρδιά και στο μυ μεταξύ διαγονιδιακών και άγριου τύπου ποντικών (Εικόνα 3.4). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι στα διαγονιδιακά ποντίκια τα επίπεδα mRNA του Slc25a46 διαγονιδίου αυξάνονται ανάλογα με τον αριθμό αντιγράφων.



Εικόνα 3.4: Ποσοτική ανάλυση της έκφρασης του mRNA του διαγονιδίου Slc25a46 μεταξύ των ποντικών άγριου τύπου και δύο διαγονιδιακών σειρών, Tg1332 και Tg1351, σε

επτά ιστούς, (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός, σπλήνας, καρδιά, ήπαρ, μυς). Τα δείγματα είναι τρία ανά ομάδα. Αυτά τα δείγματα απομονώθηκαν από τα ποντίκια (αρσενικά / θηλυκά) ηλικίας 5 εβδομάδων και από αυτά συντέθηκε cDNA με τη βοήθεια αντίστροφης μεταγραφάσης. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

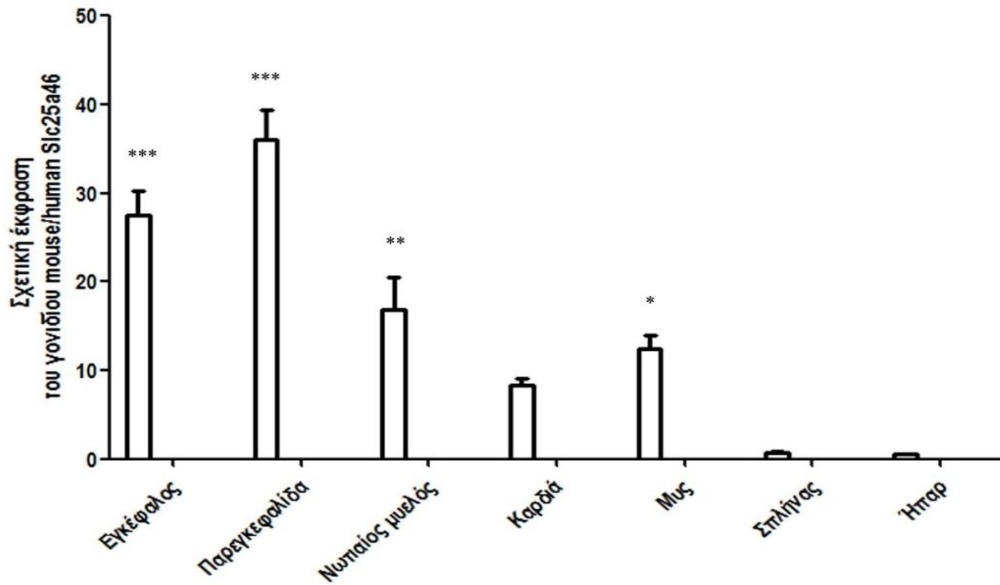
Για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκε ένα δεύτερο ζεύγαρι εκκινητών που αναγνωρίζει αποκλειστικά το ανθρώπινο Slc25a46 γονίδιο. Η σύγκριση μεταξύ των δυο διαγονιδιακών σειρών έγινε σε όλους ιστούς με βάση μια τιμή του δείγματος του σπλήνα της διαγονιδιακής σειράς Tg1332 για το ανθρώπινο διαγονίδιο Slc25a46 και το γονίδιο αναφοράς B2M. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση του διαγονιδίου ανάμεσα στα ποντίκια των δυο διαγονιδιακών σειρών σε όλους τους ιστούς, δηλαδή στον εγκέφαλο ($P=0.0251$), στην παρεγκεφαλίδα ($P=0.0353$), στον νωτιαίο μυελό ($P=0.0006$), στον σπλήνα ($P=0.0053$), στο ήπαρ ($P=0.0026$), στην καρδιά ($P=0.0022$) και στο μυ ($P=0.0035$). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι αυτό το ζεύγος εκκινητών επιτρέπει καλύτερη ποσοτικοποίηση και ανίχνευση των διαφορών μεταξύ των δειγμάτων σε σχέση με το πρώτο ζεύγος, κάτι που πιθανόν εξηγεί τις διαφορές σε ιστούς όπως η καρδιά και ο μυς. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα δηλαδή σε εγκέφαλο, παρεγκεφαλίδα και νωτιαίο μυελό, χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης σε καρδιά και μυς ενώ η έκφραση του διαγονιδίου σε σπλήνα και ήπαρ ήταν συγκριτικά χαμηλή (Εικόνα 3.5). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της έκφρασης είναι ανάλογη του αριθμού των αντιγράφων του διαγονιδίου (Εικόνα 3.5) επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα όπου χρησιμοποιήθηκε ο κοινός εκκινητής (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.5: Ποσοτική ανάλυση της έκφρασης του mRNA του διαγονιδίου *Slc25a46* μεταξύ των δυο διαγονιδιακών σειρών, Tg1332 και Tg1351, σε επτά ιστούς (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός, καρδιά, μυς, σπλήνας, ήπαρ). Τα δείγματα είναι τρία ανά ομάδα. Αυτά τα δείγματα απομονώθηκαν από τα ποντίκια (αρσενικά / θηλυκά) ηλικίας 5 εβδομάδων και από αυτά συντέθηκε cDNA με τη βοήθεια αντίστροφης μεταγραφάσης. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Στην συνέχεια μελετήσαμε το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς *Slc25a46* γονιδίου σε διάφορους ιστούς και είδαμε ότι όπως και στην περίπτωση του διαγονιδίου, το *Slc25a46* γονίδιο του ποντικού εκφράζεται περισσότερο στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός) και ακολουθεί έκφραση σε μυς και καρδιά, ενώ τα επίπεδα έκφρασης σε σπλήνα και ήπαρ είναι συγκριτικά χαμηλά (Εικόνα 3.6).

Από τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης έκφρασης επιβεβαιώνεται ότι η έκφραση του ανθρώπινου *Slc25a46* διαγονιδίου ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς *Slc25a46* γονιδίου του ποντικού και ότι η έκφραση του *Slc25a46* διαγονιδίου αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό αντιγράφων του.



Εικόνα 3.6: Ποσοτική ανάλυση της έκφρασης του mRNA του ενδογενούς γονιδίου **Slc25a46** στα ποντίκια του άγριου τύπου σε επτά ιστούς (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός, καρδιά, μυς, σπλήνας, ήπαρ). Τα δείγματα είναι τρία ανά ομάδα. Αυτά τα δείγματα απομονώθηκαν από τα ποντίκια (αρσενικά / θηλυκά) ηλικίας 5 εβδομάδων και από αυτά συντέθηκε cDNA με τη βοήθεια αντίστροφης μεταγραφάσης. Η σύγκριση μεταξύ των άγριων τύπων έγινε σε όλους ιστούς με βάση μια τιμή του δείγματος του σπλήνα για το κοινό γονίδιο Slc25a46 και το γονίδιο αναφοράς B2M. * P<0.05, ** P<0.01, *** P < 0.001

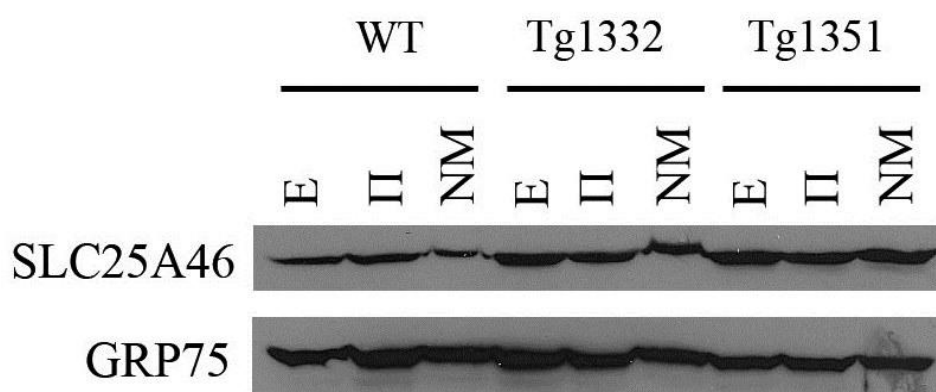
3.4 Η έκφραση του διαγονιδίου **Slc25a46** στο επίπεδο της πρωτεΐνης

Τα πειράματα αυτής της ενότητας σκοπεύουν να διασαφηνίσουν εάν παράγεται η ανθρώπινη SLC25A46 πρωτεΐνη στα διαγονιδιακά ποντίκια. Επίσης, εξετάζεται εάν η παραγωγή της SLC25A46 πρωτεΐνης διαφέρει μεταξύ 1) των ποντικών άγριου τύπου και των δύο διαγονιδιακών σειρών (Tg1332, Tg1351), 2) των διάφορων ιστών των δύο διαγονιδιακών σειρών (Tg1332, Tg1351) και 3) μεταξύ των διάφορων ιστών ποντικών άγριου τύπου και των διαγονιδιακών ομόζυγων για τη μετάλλαξη ποντικών (Tg1332 m/m, Tg1351 m/m).

Για την ανάλυση της παραγωγής της SLC25A46 πρωτεΐνης απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες με την μέθοδο της υποκυτταρικής κλασμάτωσης (subcellular fractionation) όπου μελετήθηκε το μιτοχονδριακό και το κυτταροπλασματικό κλάσμα από 8 ιστούς (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός, θύμος, σπλήνας, καρδιά, ήπαρ, μυς)

από ποντίκια (αρσενικά / θηλυκά) άγριου τύπου και διαγονιδιακά ηλικίας 5 εβδομάδων και από τα διαγονιδιακά ομόζυγα για τη μετάλλαξη ποντίκια ηλικίας 10 εβδομάδων. Χρησιμοποιήθηκαν 20μg πρωτεΐνης από μιτοχονδριακά κλάσματα σε κάθε δείγμα αφού προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η πρωτεΐνη SLC25A46 εντοπίζεται μόνο στα μιτοχόνδρια (Kano, 2012). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν ανοσοαποτυπώματα κατά Western με πρώτο αντίσωμα για την SLC25A46 πρωτεΐνη ποντικού και ανθρώπου (πολυκλωνικό αντίσωμα που παράχθηκε σε αίγα (goat)) και δεύτερο αντίσωμα (anti-goat) σημασμένο με HRP (Horseradish Peroxidase). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης GRP75 του ποντικού που βρίσκεται αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια οπότε αποτελεί πρωτεΐνη αναφοράς του μιτοχονδριακού κλάσματος (Εικόνα 3.7, Εικόνα 3.8, Εικόνα 3.9).

Το ανοσοαποτύπωμα κατά Western σε δείγματα των τριών ιστών που εξετάστηκαν (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός) ποντικών άγριου τύπου και των δύο διαγονιδιακών σειρών (Tg1332, Tg1351) (Εικόνα 3.7) έδειξε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης SLC25A46 είναι υψηλότερη στις διαγονιδιακές σειρές σε σύγκριση με τα ποντίκια αγρίου τύπου. Επιπλέον, η έκφραση είναι υψηλότερη στη σειρά Tg1351 που φέρει δύο αντίγραφα του διαγονιδίου σε σχέση με τη σειρά Tg1332 που φέρει ένα. Επιβεβαιώνεται λοιπόν και στο επίπεδο της πρωτεΐνης πως η έκφραση του διαγονιδίου είναι ανάλογη με τον αριθμό αντιγράφων.



Εικόνα 3.7: Σύγκριση των επιπέδων της πρωτεΐνης SLC25A46 τριών ιστών από ποντίκια άγριου τύπου και των δυο διαγονιδιακών σειρών. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western σε δείγματα μιτοχονδριακών κλασμάτων τριών ιστών (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός) από ποντίκια του άγριου τύπου (WT) και των δυο διαγονιδιακών σειρών,

Tg1332 και Tg1351, ηλικίας 5 εβδομάδων. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι της SLC25A46 και της GRP75. Ε: εγκέφαλος, Π: παρεγκεφαλίδα, ΝΜ: νωτιαίος μυελός

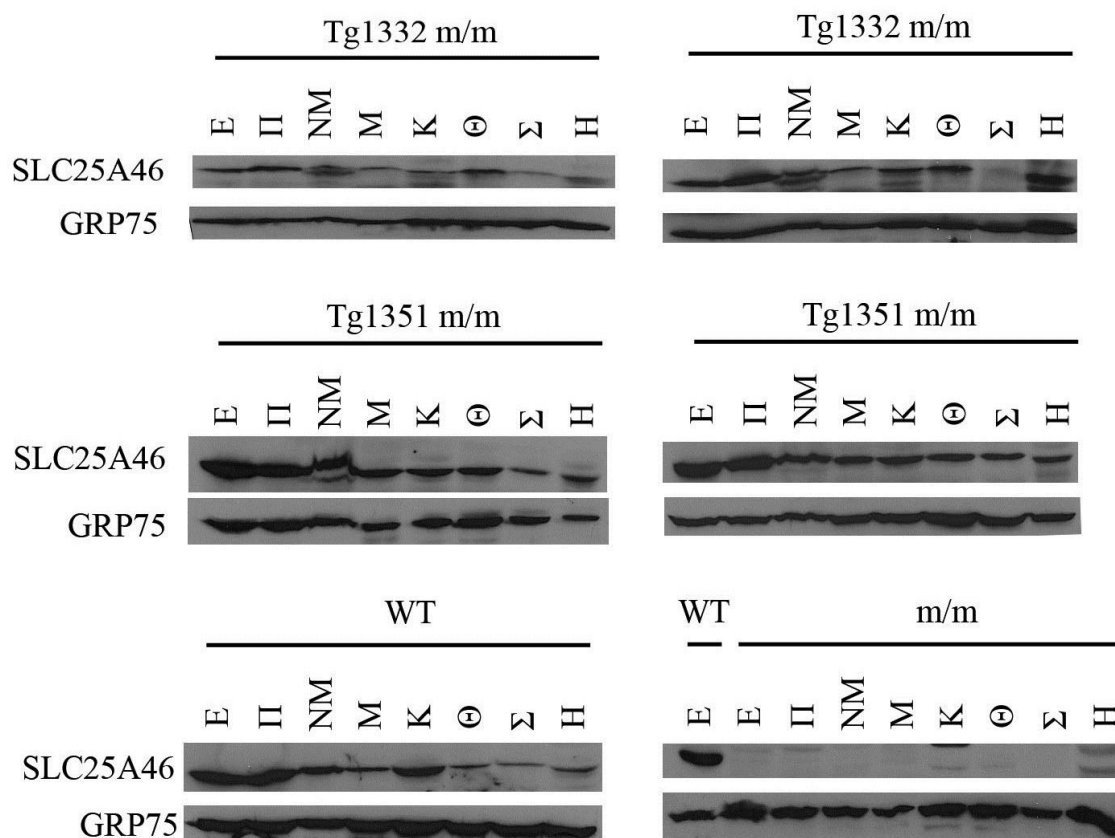
Στη συνέχεια εξετάσαμε την έκφραση της πρωτεΐνης SLC25A46 σε επτά ιστούς (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός, σπλήνα, καρδιά, ήπαρ και μυς) από ποντίκια των δυο διαγονιδιακών σειρών (Tg1332, Tg1351) συγκρίνοντάς τη με δυο ιστούς (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα) ποντικών άγριου τύπου (Εικόνα 3.8). Το ανοσοαποτύπωμα κατά Western έδειξε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης SLC25A46 είναι υψηλότερη στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός) των διαγονιδιακών ποντικών, ενώ στο μυ, στην καρδιά και στον σπλήνα η έκφραση είναι χαμηλότερη. Στο ήπαρ η πρωτεΐνη εμφανίζεται μια μικρότερου μοριακού βάρους πρωτεΐνη. Συγκρίνοντας με την έκφραση του άγριου τύπου, η έκφραση είναι υψηλότερη και στις δυο διαγονιδιακές σειρές.



Εικόνα 3.8: Σύγκριση των επιπέδων της πρωτεΐνης SLC25A46 στα μιτοχόνδρια διαφόρων ιστών από ποντίκια των δυο διαγονιδιακών σειρών. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western σε δείγματα μιτοχονδριακών κλασμάτων οκτώ ιστών (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός, θύμος, σπλήνα, καρδιά, ήπαρ και μυς) από ποντίκια άγριου τύπου (WT) και των δυο διαγονιδιακών σειρών, Tg1332 και Tg1351, ηλικίας 5 εβδομάδων. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι της SLC25A46 και της GRP75. Ε: εγκέφαλος, Π: παρεγκεφαλίδα, ΝΜ: νωτιαίος μυελός, Μ: μυς, Κ: καρδιά, Σ: σπλήνα, Η: ήπαρ

Τέλος, εξετάσαμε το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης SLC25A46 στα διαγονιδιακά ομόζυγα για τη μετάλλαξη ποντίκια (Tg1332 m/m, Tg1351 m/m) σε οκτώ ιστούς (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός, θύμος, σπλήνα, καρδιά, ήπαρ, μυς) και

το συγκρίναμε με αυτό των ποντικών άγριου τύπου και των αταξικών. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.9 η 46 kDa SLC25A46 πρωτεΐνη δεν εντοπίζεται στους ιστούς των αταξικών ποντικών λόγω του πρόωρου τερματισμού της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Αντιθέτως, τα TgSlc25a46 m/m ποντίκια παράγουν μόνο την ανθρώπινη SLC25A46 πρωτεΐνη και μάλιστα το πρότυπο έκφρασης ακολουθεί εκείνο των ποντικών αγρίου τύπου.



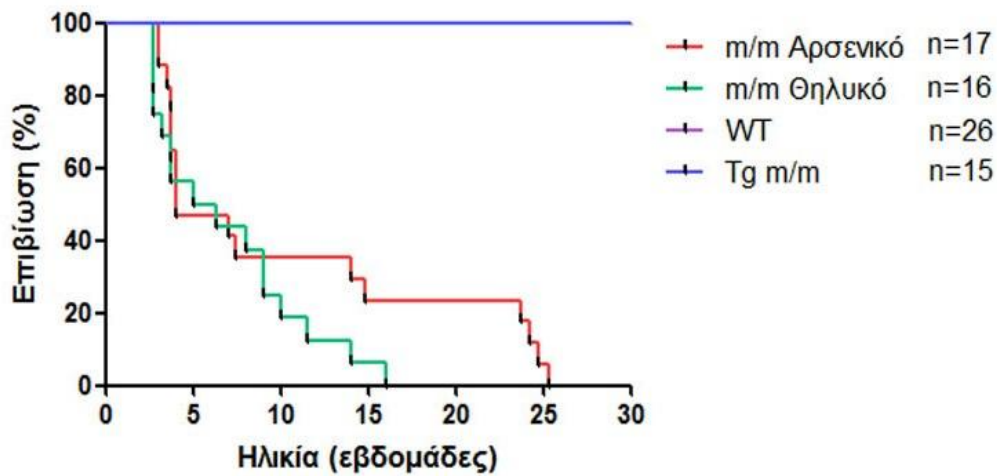
Εικόνα 3.9: Στα TgSlc25a46 m/m ποντίκια η παραγωγή της ανθρώπινης πρωτεΐνης SLC25A46 ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western σε δείγματα μιτοχondριακών κλασμάτων οκτώ ιστών (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός, θύμος, σπλήνα, καρδιά, ήπαρ και μυς) από ένα ποντίκι άγριου τύπου (WT), ένα αταξικό ποντίκι (m/m) και δύο διαγονιδιακών ομόζυγων για τη μετάλλαξη ποντικών των δυο διαγονιδιακών σειρών, Tg1332 m/m και Tg1351 m/m. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι της SLC25A46 και της GRP75. E: εγκέφαλος, Π: παρεγκεφαλίδα, NM: νωτιαίος μυελός, M: μυς, K: καρδιά, Θ: θύμος, Σ: σπλήνα, H: ήπαρ

3.5 Αναστροφή του αταξικού φαινοτύπου παρουσία του ανθρώπινου Slc25a46 διαγονιδίου

Τα TgSlc25a46 διαγονιδιακά ποντίκια δεν εμφανίζουν κάποιο κλινικό φαινότυπο. Αρχικά, οι ιδρυτές της κάθε σειράς διασταυρώθηκαν με ποντίκια του άγριου τύπου ώστε να προκύψουν διαγονιδιακοί απόγονοι. Στην συνέχεια, οι διαγονιδιακοί απόγονοι τους (TgSlc25a46) διασταυρώθηκαν με ετερόζυγα ποντίκια της αταξικής σειράς (Slc25a46^{m/+}). Οι απόγονοι αυτών (TgSlc25a46/ Slc25a46^{m/+}) διασταυρώθηκαν με ετερόζυγα ποντίκια της αταξικής σειράς (Slc25a46^{m/+}), και ένα μέρος των ζώων που προέκυψαν (TgSlc25a46/ Slc25a46^{m/m} ή σε συντομογραφία TgSlc25a46 m/m) ήταν ομόζυγα για τη μετάλλαξη και περιείχαν το ανθρώπινο Slc25a46 γονίδιο. Για την μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν οι διαγονιδιακές σειρές Tg1332 (1 αντίγραφο) και Tg1351 (2 αντίγραφα).

Για τη φαινοτυπική ανάλυση των ποντικών άγριου τύπου, TgSlc25a46 διαγονιδιακών, αταξικών (Slc25a46^{m/m} ή m/m) και διαγονιδιακών ομόζυγων για τη μετάλλαξη ποντικών (TgSlc25a46 m/m) μετρήθηκαν: 1) η θνησιμότητα (Lethality), 2) το σωματικό βάρος (Body Weight) και 3) η μυϊκή δύναμη (Grip Strength). Ο έλεγχος για την επιβίωση όπως και οι μετρήσεις για το σωματικό βάρος πραγματοποιήθηκαν από την ηλικία των 2 εβδομάδων έως την ηλικία των 11 εβδομάδων μια φορά κάθε εβδομάδα. Οι μετρήσεις για τη σωματική δύναμη πραγματοποιήθηκαν από την ηλικία των 3 εβδομάδων έως την ηλικία των 11 εβδομάδων μια φορά κάθε εβδομάδα με ειδικό μηχάνημα (Grip Strength Test Meter Model GS3, BIOSEB). Στη συνέχεια παρατίθενται τα διαγράμματα της καμπύλης επιβίωσης (Εικόνα 3.10), του σωματικού βάρους (Εικόνα 3.11) και της μυϊκής δύναμης (Εικόνα 3.12).

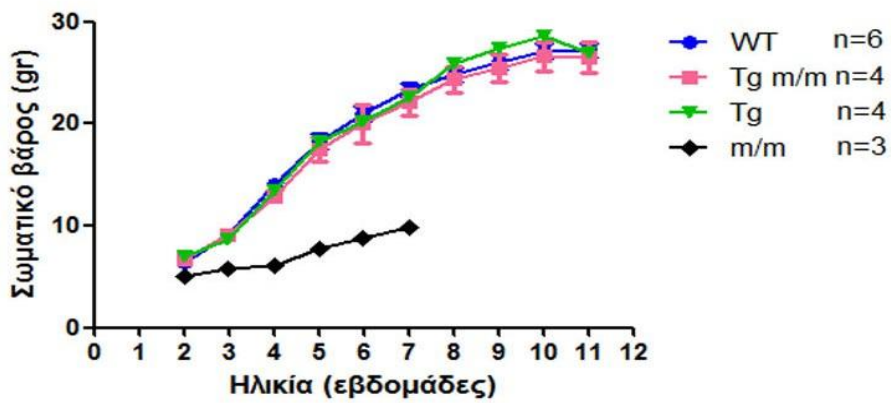
Το διάγραμμα επιβίωσης (Εικόνα 3.10) δείχνει ότι το 100% των διαγονιδιακών ομόζυγων για τη μετάλλαξη ποντικών (TgSlc25a46 m/m) επιβιώνουν σε σύγκριση με τα αταξικά ποντίκια (m/m).



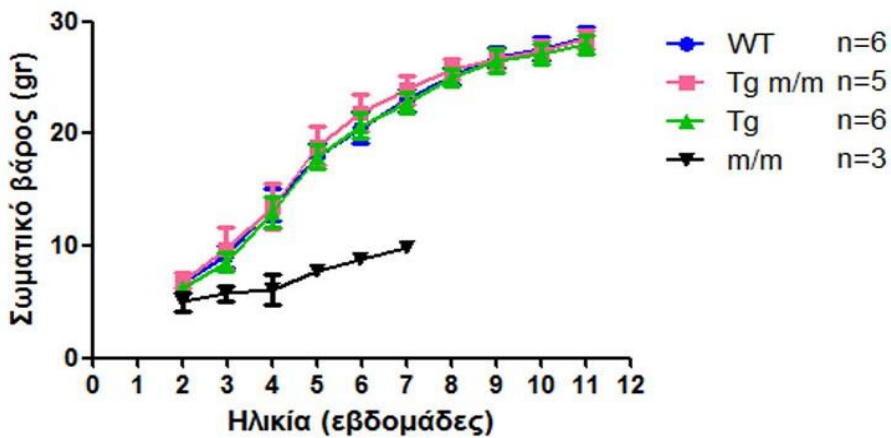
Εικόνα 3.10: Διάγραμμα επιβίωσης (Survival Curve) μεταξύ των ποντικών άγριου τύπου (WT), των αταξικών (m/m) και των διαγονιδιακών ομόζυγων για τη μετάλλαξη (Tg m/m) των δυο σειρών. Ο άξονας Y αναφέρεται στο ποσοστό επιβίωσης %, ενώ ο X σε εβδομάδες ζωής.

Στη συνέχεια καταγράφηκε το σωματικό βάρος σε ποντίκια άγριου τύπου, αταξικά, διαγονιδιακά (Tg1332, Tg1351) και διαγονιδιακά ομόζυγα για τη μετάλλαξη (TgSlc25a46/ Slc25a46^{m/m}) από την ηλικία των 2 εβδομάδων έως 11 εβδομάδων και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αύξηση του σωματικού βάρους των δύο διαγονιδιακών σειρών και των διαγονιδιακών ομόζυγων για τη μετάλλαξη ποντικών ακολουθεί το φυσιολογικό πρότυπο σε αρσενικά και θηλυκά ποντίκια.

α) Tg1332

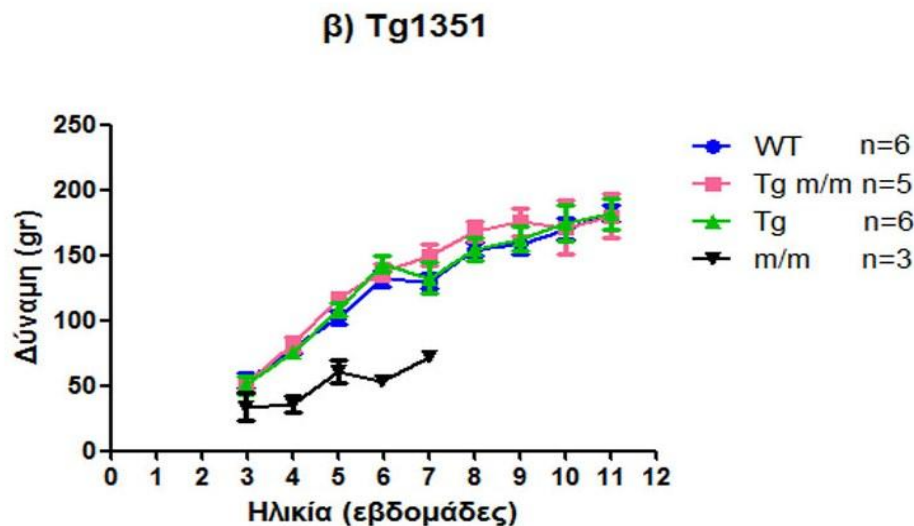
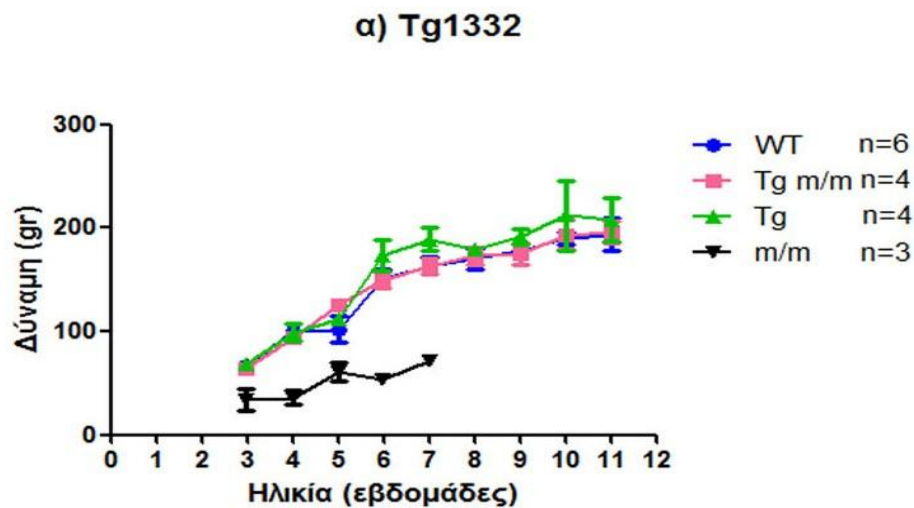


β) Tg1351



Εικόνα 3.11: Διαγράμματα του σωματικού βάρους μεταξύ των ποντικών άγριου τύπου (WT), των αταξικών (m/m), των διαγονιδιακών (Tg) και των διαγονιδιακών ομόζυγων για τη μετάλλαξη (Tg m/m). α) σειρά Tg1332, β) σειρά Tg1351.

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό των αταξικών ποντικών είναι η μειωμένη δύναμη των άκρων που εμφανίζουν σε σχέση με τα ποντίκια άγριου τύπου. Για να μελετηθεί αυτός ο φαινότυπος μετρήθηκε η μυϊκή δύναμη ποντικών όλων των γονοτύπων από την ηλικία των 3 εβδομάδων έως τις 11 εβδομάδες. Προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι στα αταξικά ποντίκια εμφανίζεται μειωμένη η δύναμη από την 3^η εβδομάδα σε σύγκριση με τα ποντίκια άγριου τύπου ενώ κατά την διάρκεια του χρόνου η μείωση γίνεται με όλο και μεγαλύτερη απόκλιση (Καρακώστας, 2010). Αυτό πιθανόν οφείλεται στη νευροεκφυλιστική αταξική ασθένεια και στην μυϊκή δυσλειτουργία, αλλά κυρίως στην μεγάλη διαφορά βάρους που εμφανίζουν σε σχέση με τα ποντίκια άγριου τύπου με αποτέλεσμα την μείωση της μυϊκής τους μάζας και κατ' επέκταση της μυϊκής τους δύναμης. Τα διαγράμματα της μυϊκής δύναμης (Εικόνα 3.12) δείχνουν ότι στις δύο διαγονιδιακές σειρές και στα διαγονιδιακά ομόζυγα για τη μετάλλαξη ποντίκια, η αύξηση της μυϊκής δύναμης είναι φυσιολογική και ανάλογη της φυσιολογικής αύξησης του σωματικού βάρους όπως και στα άγριου τύπου ποντίκια.



Εικόνα 3.12: Δοκιμή μυϊκής δύναμης (Grip Strength Test) των ποντικών άγριου τύπου (WT), των αταξικών (m/m), των διαγονιδιακών (Tg) και των διαγονιδιακών ομόζυγων για τη μετάλλαξη (Tg m/m). α) σειρά Tg1332, β) σειρά Tg1351.

Στα διαγονιδιακά ποντίκια ομόζυγα για τη μετάλλαξη (TgSlc25a46 m/m) (είτε αρσενικά είτε θηλυκά) δεν εμφανίζονται οι φαινότυποι της αταξίας όπως πλάγιασμα κατά το περπάτημα με απροσδιόριστα συνεχή αλλαγή κατεύθυνσης, επιληπτικές κρίσεις, μειωμένη δραστηριότητα και υπερανάπτυξη των δοντιών. Επίσης από τις αναλύσεις της θνησιμότητας, του σωματικού βάρους και της μυϊκής δύναμης (Grip

strength), είναι φανερό ότι τα TgSlc25a46 m/m ποντίκια δεν εμφανίζουν τον αταξικό φαινότυπο και αναπτύσσονται φυσιολογικά μολονότι το ενδογενές Slc25a46 γονίδιο φέρει την χωρίς νόημα μετάλλαξη που προκαλεί τον αταξικό φαινότυπο. Συνεπώς, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η παρουσία του ανθρώπινου γονιδίου Slc25a46 συμβάλει καθοριστικά στην πλήρη διάσωση του αταξικού φαινοτύπου.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα TgSlc25a46 m/m ποντίκια εμφάνισαν φυσιολογικό φαινότυπο χωρίς παθολογικά συμπτώματα ακολουθώντας το κανονικό πρότυπο ανάπτυξης σε αντίθεση με τα αταξικά ποντίκια (m/m) που προέρχονται από την ίδια γέννα και εκδηλώνουν πλήρως τον φαινότυπο. Ο παθολογικός φαινότυπος αναστρέφεται εξίσου σε αρσενικά και θηλυκά ποντίκια. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα μας που αφορούν στο φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης του ανθρώπινου Slc25a46 διαγονιδίου καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η έκφραση του ανθρώπινου διαγονιδίου υποκαθιστά πλήρως την έλλειψη της ενδογενούς Slc25a46 πρωτεΐνης του ποντικού επαναφέροντας έτσι τον υγιή φαινότυπο στα διαγονιδιακά ομόζυγα για τη μετάλλαξη ποντίκια. Συνεπώς, τα πειράματα γενετικής διάσωσης δείχνουν ότι για την εκδήλωση του αταξικού φαινοτύπου ευθύνεται η χωρίς νόημα μετάλλαξη στο Slc25a46 γονίδιο.

Κεφαλαίο 4: Συμπεράσματα

4.1 Δημιουργία και μελέτη της έκφρασης του ανθρώπινου Slc25a46 διαγονιδίου στο επίπεδο του mRNA

Στο παρελθόν η ερευνητική ομάδα της Δρ Ντούνη δημιούργησε με τυχαία μεταλλαξογένεση ένα νέο μοντέλο αυτοσωμικής υπολειπόμενης νευρολογικής νόσου στο ποντίκι που οφείλεται σε μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο Slc25a46 που ανήκει στην οικογένεια των μιτοχονδριακών μεταφορέων SLC25 (Slc25a46^{m/m} ή εν συντομία m/m). Η βιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης SLC25A46 είναι άγνωστη και δεν υπάρχουν δεδομένα για την έκφραση του γονιδίου Slc25a46 στο ποντίκι. Επίσης, μέχρι σήμερα δεν έχουν αναφερθεί λειτουργικές μεταλλάξεις για αυτό το γονίδιο ούτε σε ζωικούς οργανισμούς ούτε στον άνθρωπο. Ο σκοπός της παρούσα μελέτης ήταν η δημιουργία και χαρακτηρισμός διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν το ανθρώπινο Slc25a46 γονίδιο (TgSlc25a46) ώστε σε πειράματα γενετικής αναπλήρωσης να επιβεβαιωθεί εάν η μετάλλαξη στο γονίδιο Slc25a46 είναι υπεύθυνη για τον φαινότυπο που παρατηρείται στα αταξικά ζώα.

Για την υπερέκφραση του ανθρώπινου Slc25a46 γονιδίου στο ποντίκι χρησιμοποιήθηκε ένας κλώνος BAC που περιλαμβάνει την γονιδιωματική περιοχή του ανθρώπινου Slc25a46 γονιδίου μεγέθους περίπου 200kb. Ο BAC φορέας χρησιμοποιήθηκε επειδή επιτρέπει την απομόνωση μεγάλου μεγέθους γονιδιωματικών περιοχών που εκτός τις κωδικές περιλαμβάνουν και τις ρυθμιστικές περιοχές υπεύθυνες για την σωστή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Όταν μεγάλου μεγέθους γονιδιωματικά τμήματα χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών, συνήθως επιτυγχάνεται ένα φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης όπου η έκφραση του διαγονιδίου είναι αντίστοιχη του αριθμού των αντιγράφων του ανεξάρτητα από τη θέση ενσωμάτωσης (Van Keuren et al., 2009). Επειδή η ύπαρξη προκαρυωτικών αλληλουχιών στο διαγονίδιο παρεμποδίζουν την έκφρασή του, ο BAC φορέας απομακρύνθηκε από την γονιδιωματική περιοχή η οποία στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή διαγονιδιακών ποντικών με την τεχνική της μικρόνεσης σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων. Με τη διαδικασία της διαγένεσης εντοπίστηκαν 5 διαγονιδιακές σειρές από τις οποίες επιλέξαμε να

μελετήσουμε τη σειρά Tg1332 (με ένα αντίγραφο του διαγονιδίου) και τη σειρά Tg1355 (με δύο αντίγραφα).

Για την ποσοτική ανάλυση της έκφρασης του ανθρώπινου διαγονιδίου Slc25a46 σε επίπεδο mRNA μελετήθηκαν άγριου τύπου και διαγονιδιακά ποντίκια, Tg1332 και Tg1351. Τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης έκφρασης έδειξαν ότι η έκφραση του ανθρώπινου Slc25a46 διαγονιδίου ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς Slc25a46 γονιδίου του ποντικού και ότι η έκφραση του Slc25a46 διαγονιδίου αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό αντιγράφων του. Συγκεκριμένα, η έκφραση του Slc25a46 διαγονιδίου είναι υψηλότερη στις διαγονιδιακές σειρές σε σύγκριση με τα ποντίκια άγριου τύπου και μεταξύ των δυο διαγονιδιακών σειρών, η έκφραση είναι υψηλότερη στη σειρά Tg1351 που φέρει δύο αντίγραφα του διαγονιδίου σε σχέση με τη σειρά Tg1332 που φέρει ένα (Εικόνα 3.4, Εικόνα 3.5). Επίσης, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα δηλαδή σε εγκέφαλο, παρεγκεφαλίδα και νωτιαίο μυελό και χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σπλήνα και ήπαρ (Εικόνα 3.5). Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με το πρότυπο έκφρασης στα ποντίκια άγριου τύπου. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα της μελέτης των Haitina et al., κατά την οποία μελετήθηκε η έκφραση μελών της οικογένειας μιτοχονδριακών μεταφορέων SLC25 σε ιστούς αρουραίων, και δείχθηκε ότι το γονίδιο Slc25a46 εκφράζεται κυρίως στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα όπως στον οπισθεγέφαλο (hindbrain) που περιλαμβάνει την παρεγκεφαλίδα, τον προμήκη μυελό και το στέλεχος (Haitina et al., 2006). Στο παρελθόν έχει αναφερθεί ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του αριθμού αντιγράφων του διαγονιδίου και της έκφρασης του διαγονιδίου σε διαγονιδιακά ποντίκια (Chandler et al 2007). Αυτό επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη, όπου η Tg1351 σειρά με δύο αντίγραφα του διαγονιδίου εμφανίζει μεγαλύτερη έκφραση από την Tg1332 σειρά με ένα αντίγραφο. Αυτό πιθανόν οφείλεται, όπως προαναφέραμε, στο γεγονός ότι το διαγονίδιο έχει μεγάλο μέγεθος οπότε εκτός από το ότι περιλαμβάνει τις κωδικές και τις ρυθμιστικές περιοχές δεν επηρεάζεται σε επίπεδο έκφρασης από την περιοχή ενσωμάτωσης. Συνεπώς, η πλήρης ενσωμάτωση του διαγονιδίου είναι πιθανόν να οδηγήσει σε φυσιολογική έκφραση που να προσομοιάζει το ενδογενές πρότυπο. Από τα αποτελέσματα των δυο συγκρίσεων επιβεβαιώνεται ότι το διαγονίδιο Slc25a46 εκφράζεται στο επίπεδο του mRNA φυσιολογικά και η έκφραση του αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό αντιγράφων του.

4.2 Η έκφραση του διαγονιδίου Slc25a46 στο επίπεδο της πρωτεΐνης

Στην συνέχεια εξετάσαμε την παρουσία της πρωτεΐνης SLC25A46 στο μιτοχondριακό κλάσμα οκτώ ιστών (εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός, θύμος, σπλήνα, καρδιά, ήπαρ και μυς) από ποντίκια άγριου τύπου και των δύο διαγονιδιακών σειρών (Tg1332 και Tg1351) (Εικόνα 3.8) Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η SLC25A46 πρωτεΐνη παράγεται φυσιολογικά σε όλους τους ιστούς των δυο διαγονιδιακών σειρών όπως στα ποντίκια άγριου τύπου. Η έκφραση της SLC25A46 πρωτεΐνης είναι υψηλότερη στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα δηλαδή στον εγκέφαλο, την παρεγκεφαλίδα και το νωτιαίο μυελό, ακολουθεί χαμηλότερη έκφραση σε μυ και καρδιά ενώ τα επίπεδα έκφρασης είναι ακόμα χαμηλότερα σε σπλήνα και θύμο. Στο ήπαρ εμφανίζεται μια μικρότερου μοριακού βάρους πρωτεΐνη που αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω. Επίσης, τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης SLC25A46 είναι υψηλότερη στις διαγονιδιακές σειρές σε σύγκριση με τα ποντίκια άγριου τύπου και ότι η έκφραση είναι υψηλότερη στη σειρά Tg1351 που φέρει δύο αντίγραφα του διαγονιδίου σε σχέση με τη σειρά Tg1332 που φέρει ένα. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της έκφρασης του γονιδίου Slc25a46 στα διαγονιδιακά ποντίκια σε επίπεδο mRNA και σε επίπεδο πρωτεΐνης φαίνεται ότι υπάρχουν ομοιότητες. Για παράδειγμα, και στις δύο περιπτώσεις φαίνεται ότι α) το διαγονίδιο ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου, β) υπάρχει υψηλή έκφραση στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και χαμηλή έκφραση στον σπλήνα και στο ήπαρ, και γ) η έκφραση του διαγονιδίου είναι ανάλογη του αριθμού των αντιγράφων του διαγονιδίου.

Επειδή το αντίσωμα που χρησιμοποιήσαμε αναγνωρίζει την SLC25A46 πρωτεΐνη τόσο σε ποντίκι όσο και στον άνθρωπο, στην παραπάνω ανάλυση δεν είναι εύκολη η εκτίμηση της έκφρασης του διαγονιδίου αποκλειστικά. Για τον λόγο αυτό μελετήσαμε την έκφραση του διαγονιδίου σε διαγονιδιακά ποντίκια ομόζυγα για τη μετάλλαξη (TgSlc25a46 m/m) (Εικόνα 3.9), όπου δεν εντοπίζεται η άγριου τύπου SLC25A46 πρωτεΐνη. Εξετάσαμε με τον τρόπο αυτό εάν διαφέρει η έκφραση της πρωτεΐνης SLC25A46 μεταξύ των ποντικών άγριου τύπου και των δύο διαγονιδιακών σειρών (Tg1332 και Tg1351). Η SLC25A46 πρωτεΐνη δεν εκφράζεται στα αταξικά ποντίκια (m/m) επειδή η σημειακή μετάλλαξη οδηγεί σε πρόωρο κωδικόνιο λήξης (stop codon) και ως αποτέλεσμα παράγεται μια πρωτεΐνη 95 αμινοξέων αντί της

άγριου τύπου SLC25A46 πρωτεΐνης που έχει 418 αμινοξέα. Συνεπώς, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη είναι αρκετά μικρότερη της φυσιολογικής, δεν ενσωματώνεται στην μιτοχονδριακή μεμβράνη και στερείται λειτουργικότητας. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι στα ομόζυγα για τη μετάλλαξη διαγονιδιακά ποντίκια (TgSlc25a46 m/m) εκφράζεται η ανθρώπινη SLC25A46 πρωτεΐνη και μάλιστα ακολουθώντας ένα φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης.

4.3 Διάσωση του αταξικού φαινοτύπου παρουσία του huSlc25a46 διαγονιδίου - Γενετική επιβεβαίωση

Στην συνέχεια μελετήθηκε ο φαινότυπος των TgSlc25a46 διαγονιδιακών ποντικών και των διαγονιδιακών ποντικών ομόζυγων για τη μετάλλαξη (TgSlc25a46 m/m) σε σύγκριση με τα ποντίκια άγριου τύπου και τα αταξικά. Καταρχήν, τα TgSlc25a46 διαγονιδικά ποντίκια αναπτύσσονται φυσιολογικά και δεν εμφανίζουν κάποιο παθολογικό φαινότυπο. Επίσης, τα πειράματα γενετικής αναπλήρωσης έδειξαν ότι τα αρσενικά και θηλυκά διαγονιδιακά ομόζυγα για τη μετάλλαξη ποντίκια (TgSlc25a46 m/m) δεν εμφανίζουν κανένα από τα παθολογικά συμπτώματα των αταξικών ποντικών που περιλαμβάνουν πλάγιασμα κατά το περπάτημα με απροσδιόριστα συνεχή αλλαγή κατεύθυνσης, επιληπτικές κρίσεις, μειωμένη δραστηριότητα και υπερανάπτυξη των δοντιών. Ο υγιής φαινότυπος επιβεβαιώνεται και από τις αναλύσεις της θνησιμότητας (Εικόνα 3.10), του σωματικού βάρους (Εικόνα 3.11) και της μυικής δύναμης (Εικόνα 3.12) όπου φαίνεται ότι τα διαγονιδιακά ομόζυγα για τη μετάλλαξη ποντίκια (TgSlc25a46 m/m) ακολουθούν το φυσιολογικό πρότυπο ανάπτυξης όμοιο με των ποντικών άγριου τύπου.

Αυτό σημαίνει πως ο νευρολογικός φαινότυπος στα αταξικά ποντίκια αναστρέφεται πλήρως παρουσία του ανθρώπινου διαγονιδίου Slc25a46. Το γεγονός αυτό αποτελεί την γενετική επιβεβαίωση ότι ο αταξικός φαινότυπος οφείλεται στην χωρίς νόημα μετάλλαξη του Slc25a46 γονιδίου. Φαίνεται λοιπόν ότι το σωστό πρότυπο έκφρασης του Slc25a46 διαγονιδίου είναι ικανό να αναπληρώσει την έλλειψη της ενδογενούς SLC25A46 πρωτεΐνης.

4.4 Μελλοντικοί στόχοι

Μελλοντικά θα μελετηθούν: α) η λειτουργία της SLC25A46 πρωτεΐνης με την ανακάλυψη των υποστρωμάτων που μεταφέρονται, β) εάν η μετάλλαξη στο Slc25a46 γονίδιο επηρεάζει την δομή και την λειτουργία των μιτοχονδρίων, γ) το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα με σκοπό να εντοπιστεί η πρωτογενής ιστική βλάβη που οδηγεί στον νευρολογικό φαινότυπο αταξίας και δ) εάν υπάρχουν πολυμορφισμοί ή λειτουργικές μεταλλάξεις στο SLC25A46 γονίδιο σε ασθενείς με νευρολογικές ασθένειες που χαρακτηρίζονται από επιληψία και αταξία.

Το σημαντικότερο βήμα στην κατανόηση της λειτουργίας του μεταφορέα SLC25A46 είναι η ανακάλυψη των υποστρωμάτων που μεταφέρει από το κυτταρόπλασμα στην μιτοχονδριακή μήτρα και αντίστροφα. Μία από τις πιο αποτελεσματικές μεθόδους για τον προσδιορισμό της εξειδίκευσης υποστρώματος είναι η έκφραση των γονιδίων σε *Escherichia coli* ή / και *Saccharomyces cerevisiae*, ο καθαρισμός της SLC25A46 πρωτεΐνης και η ανασύστασή της σε λιποσώματα (Palmieri, 2004). Παρουσία του κατάλληλου σημασμένου υποστρώματος μπορεί να προσδιοριστεί εάν η SLC25A46 πρωτεΐνη μπορεί να το μεταφέρει στο εσωτερικό των λιποσωμάτων. Η φυλογενετική ομαδοποίηση, οι γενετικές πληροφορίες, η γνώση του μεταβολισμού των κυττάρων και η αλληλοσυμπλήρωση των φαινοτύπων συχνά παρέχουν τις ενδείξεις για την επιλογή του υποστρώματος που πρόκειται να δοκιμαστεί. Όμως, τα δεδομένα αυτά δεν αποτελούν απόδειξη και η ειδικότητα του υποστρώματος παραμένει να προσδιοριστεί με αναλύσεις μεταφορών. Με την ανακάλυψη των υποστρωμάτων του μεταφορέα SLC25A46 μπορεί να κατανοηθεί ο βιολογικός ρόλος του και θα αποκαλυφθεί το μεταβολικό μονοπάτι στο οποίο εμπλέκεται. Με τον τρόπο αυτό θα διαλευκανθεί ο παθογενετικός ρόλος του Slc25a46 γονιδίου στο νευρολογικό φαινότυπο της αταξίας και θα εξεταστεί εάν υπάρχουν αντίστοιχες ασθένειες του ανθρώπου με παρόμοια παθολογία. Η γνώση αυτή είναι απαραίτητη για την διάγνωση και τη θεραπεία αντίστοιχων ανθρώπινων ασθενειών. Επίσης, τα αταξικά ποντίκια που φέρουν την μετάλλαξη στο γονίδιο Slc25a46 αποτελούν πολύτιμα ζωικά μοντέλα, μοναδικά παγκοσμίως, για την κατανόηση των εμπλεκόμενων παθογενετικών μηχανισμών και την εφαρμογή νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Κεφαλαίο 5: Βιβλιογραφία

Agrimi G, Russo A, Scarcia P, Palmieri F. The human gene SLC25A17 encodes a peroxisomal transporter of coenzyme A, FAD and NAD⁺. *Biochem. J.* 2012; 443: 241–247.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell* fourth edition. Garland Science (Taylor & Francis Group), New York, 2002; ISBN 0-8153-4072-9.

Birren B, Mancino V, Shizuya H. Bacterial artificial chromosomes. In: Green ED, Birren B, Klapholz S, Myers RM, Hieter P (eds) *Genome Analysis. A Laboratory Manual* (Vol. III, Cloning Systems), Cold Spring Harbor laboratory Press, USA. 1999

Bønnelykke K, Matheson MC, Pers TH, Granell R, Strachan DP; Alves AC, Linneberg AR, Curtin JA, Warrington NM, Standl M et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies ten loci influencing allergic sensitization. *Nature Genetics.* 2013; 45(8). doi:10.1038/ng.2694

Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK, Palmiter RD. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82:4438–4442.

Camacho JA, Obie C, Biery B, Goodman BK, Hu CA, Almashanu S, Steel G, Casey R, Lambert M, Mitchell GA, Valle D. Hyperornithinaemia-hyperammonaemia-homocitrullinuria syndrome is caused by mutations in a gene encoding a mitochondrial ornithine transporter. *Nat. Genet.* 1999; 22, 151–158.

Camacho JA, Rioseco-Camacho N. The human and mouse SLC25A29 mitochondrial transporters rescue the deficient ornithine metabolism in fibroblasts of patients with the hyperornithinemia–hyperammonemia–homocitrullinuria (HHH) syndrome. *Pediatr. Res.* 2009; 66: 35–41.

Camper SA, Saunders TL. Transgenic rescue of mutant phenotypes using large DNA fragments. In: Accili D, editor. *Genetic manipulation of receptor expression and function.* Wiley-Liss; New York: 2000; 1–22.

Cappello A, Miniero DV, Curcio R, Ludovico A, Daddabbo L, Stipani I, Robinson A, Kunji E, Palmieri F. Functional and structural role of amino acid residues in the odd-numbered transmembrane alpha-helices of the bovine mitochondrial oxoglutarate carrier. *J. Mol. Biol.* 2007; 369: 400–412.

Casali N, Preston A. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 235: *E. coli Plasmid Vectors*. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2003; ISBN 1-58829-15-0.

Chandler KJ, Chandler RL, Broeckelmann EM, Yue H, Southard-Smith E, Michelle, Mortlock DP. Relevance of BAC transgene copy number in mice: transgene copy number variation across multiple transgenic lines and correlations with transgene integrity and expression. *Mamm Genome.* 2007; 18(10): 693–708. doi:10.1007/s00335-007-9056-y

Cook MC, Vinuesa CG, Goodnow CC. ENU-mutagenesis: insight into immune function and pathology. *Current Opinion in Immunology* 2006; 18:627–633.

Dolce V, Fiermonte F, Runswick MJ, Palmieri F, Walker JE. The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in toxicity of nucleoside antivirals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2001; 98, 2284–2288.

Douni E, Alexiou M, Kollias G. (2004). Genetic engineering in the mouse: Tuning TNF/TNFR expression. In *Methods in Molecular Medicine: Tumor Necrosis Factor*. Eds A. Corti and P. Ghezzi. Humana Press Inc; 98: p139-171.

Douni E, Rinotas V, Makrinou E, Zwerina J, Penninger J M., Eliopoulos E, Schett G, Kollias G. A RANKL G278R mutation causing osteopetrosis identifies a functional amino acid essential for trimer assembly in RANKL and TNF. *Human Molecular Genetics.* 2012; 21(4): 784-798.

Echaniz-Laguna A, Chassagne M, Ceresuela J, Rouvet I, Padet S, Acquaviva C, Nataf S, Vinzio S, Bozon D, Mousson de Camaret B. Complete loss of expression of the ANT1 gene causing cardiomyopathy and myopathy. *J. Med. Genet.* 2011; 49, 146–150.

Fiermonte G, Palmieri L, Todisco S, Agrimi G, Palmieri F, Walker JE. Identification of the mitochondrial glutamate transporter: bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 19289–19294.

Giraldo P, Montoliu L. Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals, *Transgenic Research*. 2001; 10(2):83-103.

Guernsey DL, Jiang H, Campagna DR, Evans SC, Ferguson M, Kellogg MD, Lachance M, Matsuoka, M, Nightingale M, Rideout A, Saint-Amant L, Schmidt PJ, Orr A, Bottomley SS, Fleming MD, Ludman M, Dyack S, Fernandez CV, Samuels ME. Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. *Nat. Genet*. 2009; 41: 651–653.

Haitina T, Lindblom J, Renström T, Fredriksson R. Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system, *Genomics*. 2006; 88: 779–790.

Huizing M, Iacobazzi V, Ijlst L, Savelkoul P, Ruitenbeek W, van den Heuvel LP, Indiveri C, Smeitink J, Trijbels FJM, Wanders RJA, Palmieri F. Cloning of the human carnitine-acylcarnitine carrier cDNA, and identification of the molecular defect in a patient. *Am. J. Hum. Genet*. 1997; 61: 1239–1245.

Jun D, Xiaojuan C, Zuoyan Z, Wei H. Non-Homologous End Joining Plays a Key Role in Transgene Concatemer Formation in Transgenic Zebrafish Embryos. *International Journal of Biological Sciences*. 2010; 6(7):756-768.

Justice MJ, Noveroske JK, Weber JS, Binhai Z, Bradley A. Mouse ENU mutagenesis. *Human Molecular Genetics*. 1999; 8(10): 1955–1963.

Kamber M. The art and science of housing laboratory mice, “Alexander Fleming” Biomedical Sciences Research Center.

Kano T. Μελέτη της έκφραση του γονιδίου σε ένα μοντέλο υπολειπόμενης νευρολογικής νόσου στο ποντίκι, Πτυχιακή μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών 2012.

Kano T, Karakostas A, Ioakeimidis F, Rinotas V, Kollias G, Douni E. A Novel SLC25 Member of Mitochondrial Carriers Causes Autosomal Recessive Neurological Disease in Mice, Mitochondria in life, death and disease FEBS/EMBO course, 9-13 May 2012 Heraklion, Greece.

Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V, Kyttälä A, Zeviani M, Comi GP, Keränen S, Peltonen L, Suomalainen A. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science*. 2000; 289 (2000): 782–785.

Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, Boright AP, Begum L, Lee JR, Yasuda T, Ikeda S, Hirano R, Terazono H, Crackower MA, Kondo I, Tsui LC, Scherer SW, Saheki T. The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat. Genet.* 1999; 22: 159–163.

Kunji ERS, Robinson AJ. The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics.* 2006; 1757(9–10): 1237–1248.

LD Sun, FL Xiao, Y Li, WM Zhou, HY Tang et al. Genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Chinese Han population. *Nature Genetics.* 2011; 43: 690–694. doi:10.1038/ng.851.

Lindhurst MJ, Fiermonte G, Song S, Struys E, De Leonardis F, Schwartzberg PL, Chen A, Castegna A, Verhoeven N, Mathews CK, Palmieri F, Biesecker LG. Knockout of *Slc25a19* causes mitochondrial thiamine pyrophosphate depletion, embryonic lethality, CNS malformations, and anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103: 15927–15932.

Marin-Garcia J. *Mitochondria and their role in cardiovascular disease.* Springer, 2013; ISBN 978-1-4614-4598-2

Mayr JA, Merkel O, Kohlwein SD, Gebhardt BR, Böhles H, Fötschl U, Koch J, Jaksch M, Lochmüller H, Horvath R, Freisinger P, Sperl W. Mitochondrial phosphate-carrier deficiency: a novel disorder of oxidative phosphorylation. *Am. J. Hum. Genet.* 2007; 80: 478–484.

Mayr JA, Zimmermann FA, Horvath R, Schneider H-C, Schoser B, Holinski-Feder E, Czermin B, Freisinger P, Sperl W. Deficiency of the mitochondrial phosphate carrier presenting as myopathy and cardiomyopathy in a family with three affected children. *Neuromuscul. Disord.* 2011; 21, 803–808.

Molinari F, Raas-Rothschild A, Rio M, Fiermonte G, Encha-Razavi F, Palmieri L, Palmier, F, Ziva-Ben-Neriah, Khadom N, Vekemans M, Attit-Bitach T, Munnich A, Rustin P, Colleaux L. Impaired mitochondrial glutamate transport in autosomal recessive neonatal myoclonic epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* 2005; 76: 334–339.

Monaco AP, Larin Z. YACs, BACs, PACs and MACs: Artificial chromosomes as research tools. *Trend in Biotechnology.* 1994; 12(7): 280–286.

Morrison AC; Felix JF, Cupples A, Glazer NL, Loehr LR, Dehghan A, Demissie S, Bis JC, Rosamond WD; Aulchenko YS et al. Genomic variation associated with mortality among adults of European and African ancestry with heart failure, the cohorts for heart and aging research in Genomic Epidemiology Consortium. *Circ Cardiovascular Genetic*. 2010; 3:248-255.

Nelms KA, Goodnow CC. Genome-wide ENU mutagenesis to reveal immune regulators. *Immunity*. 2001; 15: 409-418.

Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab. Pharmacokinet*. 2008; 23 (1): 22–44.

Palmieri F. Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett*. 1994; 346: 48–54.

Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Eur J Physiol*. 2004; 447:689-709.

Palmieri F. Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: A review. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008; 1777: 564-578.

Palmieri F. The mitochondrial transporter family SLC25: Identification, properties and physiopathology. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013; 34 (2013): 465–484

Palmieri F, Indiveri C, Bisaccia F, Krömer R. Functional properties of purified and reconstituted mitochondrial metabolite carriers. *J. Bioenerg.Biomembr*. 1993; 25, 525–535.

Palmieri F, Pierri CL. Structure and function of mitochondrial carriers – Role of the transmembrane helix P and G residues in the gating and transport mechanism. *FEBS Lett*. 2010; 584(9): 1931-1939

Palmieri F, Pierri CL, De Grassi A, Nunes-Nesi A, Fernie AR. Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights. *Plant J*. 2011; 66: 161–181.

Palmieri L, Alberio S, Pisano I, Lodi T, Meznaric Petrusa M, Zidar J, Santoro A, Scarcia P, Fontanesi F, Lamantea E, Ferrero I, Zeviani M. Complete loss-of-function of the heart-/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Hum. Mol. Genet*. 2005; 14, 3079-3088.

Parry HM, Donnelly LA, Van Zuydam N, Doney ASF, Elder DHJ, Morris AD, Struthers AD, Palmer CNA, Lang CC and on behalf of the Wellcome Trust Case Control Consortium. Genetic variants predicting left ventricular hypertrophy in a diabetic population: a Go-DARTS study including meta-analysis. *Cardiovascular Diabetology* 2013; 12:109. doi:10.1186/1475-2840-12-109

Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, Trézéguet V, Lauquin G, Brandolin G. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* 2003; 426: 39–44.

Pfaffle MW, A – Z of Quantitative PCR (Editor: S. A. Bustin) Chapter 3. Quantification strategies in real-time PCR, International University Line (IUL), USA.

Phelps A, Briggs C, Mincone L, Wohlrab H. Mitochondrial phosphate transport protein. Replacements of glutamic, aspartic, and histidine residues affect transport and protein conformation and point to a coupled proton transport path. *Biochemistry*. 1996; 35: 10757–10762.

Ramasamy A, Curjurić I, Coin LJ, Kumar A, McArdle WL., Imboden M, Leynaert B, Kogevinas M, Schmid-Grendelmeier P, Pekkanen J, Wjst M, Bircher AJ, Sovio U, Rochat T, Hartikainen A, Balding DJ, Jarvelin M, Probst-Hensch N, Strachan DP, Jarvis DL. A genome-wide meta-analysis of genetic variants associated with allergic rhinitis and grass sensitization and their interaction with birth order. *J Allergy Clin Immunology*. 2011; 128(5), 996-1005.

Robinson A, Kunji E. Mitochondrial carriers in the cytoplasmic state have a common substrate binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103: 2617–2622.

Robinson A, Overy C, Kunji E. The mechanism of transport by mitochondrial carriers based on analysis of symmetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105: 17766–17771.

Rosenberg MJ, Agarwala R, Bouffard G, Davis J, Fiermonte G, Hilliard MS, Koch T, Kalikin LM, Makalowska I, Morton DH, Petty EM, Weber JL, Palmieri F, Kelley RI, Schaffer AA, Biesecker LG. Mutant deoxynucleotide carrier is associated with congenital microcephaly. *Nat. Genet*. 2002; 32: 175–179.

Schlessinger A, Matsson P, Shima JE, Pieper U, Sook WY, Kelly L, Apeltsin L, Stroud RM, Ferrin TE, Giacomini KM, Sali A. Comparison of human solute carriers. *PROTEIN SCIENCE*. 2010; 19: 412-428.

Simmons D. The use of animal models in studying genetic disease: Transgenesis and induced mutation. *Nat. Educ.* 2008; 1:1.

Spiegel R, Shaag A, Edvardson S, Mandel H, Stepensky P, Shalev SA, Horovitz Y, Pines O, Elpeleg O. SLC25A19 mutation as a cause of neuropathy and bilateral striatal necrosis. *Annual Neurol.* 2009; 66: 419–424.

Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Hervé D, Fisone G, Girault J. Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends in Neurosciences.* 2009; 32(10): 538-547. doi:10.1016/j.tins.2009.06.005

Van Keuren ML, Gavrilina GB, Filipiak WE, Zeidler MG, Saunders TL. Generating transgenic mice from Bacterial Artificial Chromosomes: Transgenesis efficiency, integration and expression outcomes. *Transgenic Res.* 2009; 18(5): 769–785. doi: 10.1007/s11248-009-9271-2

Vasan RS, Glazer NL, Felix JF, Lieb W, Wild PS, Felix SB, Watzinger N, Larson M G., Smith NL, Dehghan A et al. Genetic variants associated with cardiac structure and functionA meta-analysis and replication of genome-wide association data. *JAMA.* 2009; 302(2):168-178. doi:10.1001/jama.2009.978-a

Wibom R, Lasorsa FM, Τρήφνην V, Barbaro M, Sterky FH, Kucinski T, Naess K, Jonsson, M., Pierri CL, Palmieri F, Wedell A. AGC1 deficiency associated with global cerebral hypomyelination. *New Engl. J. Med.* 2009; 361, 489–495.

Xiangyang M. Recent Advances and Applications of Transgenic Animal Technology, Polymerase Chain Reaction, Dr Patricia Hernandez-Rodriguez (Ed.), InTech, 2012, ISBN: 978-953-51-0612-8

Καρακώστας Α. Λεπτομερής γενετική ανάλυση στο χρωμόσωμα 18 του ποντικού για τον εντοπισμό ενός νέου παθογενετικού στόχου που προκαλεί θνησιγόνο νευρολογικό φαινότυπο. Μεταπτυχιακή εργασία, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. 2010

Λάμπρου Ν. Σημειώσεις Ανάλυσης Βιομορίων, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. 2010

Ντούνη Ε. ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. 2011

Φλεμετάκης Ε, Κατινάκης Π. Σημειώσεις στην Τεχνολογία του Ανασυνδρασμένου DNA, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. 2009