ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης

ΜΠΙΛΙΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΟΜΟΖΥΓΗ ΕΛΛΕΙΨΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ERF (ETS2 REPRESSOR FACTOR)

Επιβλέπων Καθηγητής: Μαυροθαλασσίτης Γεώργιος
Τομέας Βασικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Η παρούσα εργασία με θέμα τη δημιουργία βλαστικών κυττάρων, ομόζυγων για την έλλειψη του γονιδίου του Erf, πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Μοριακής Βιολογίας - Βιοϊατρικής των Τμημάτων Βιολογίας και Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας , ΙΤΕ. Η εκπόνηση της εργασίας έγινε στο Εργαστήριο Χημείας του Τομέα Βασικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής κατά το ακαδημαϊκό έτος 2003-2004.

Θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή ευγνωμοσύνη μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μαυροθαλασσίτη Γεώργιο, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του και για τη συνεχή και πολύτιμη καθοδήγησή του. Θερμά ευχαριστώ για την συνεργασία μας την υποψήφια διδάκτορα Χαρούλα Παπαδάκη, η οποία μου πρόσφερε απλόχερα τη βοήθεια, τις γνώσεις και εμπειρίες της σχετικά με το ερευνητικό θέμα. Η καθοδήγησή της ήταν καθοριστικής σημασίας. Δε θα μπορούσα να παραλείψω τη συμβολή όλων στο εργαστήριο για τη δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος, και ιδιαίτερα το Μιχάλη και τη Maryline που, αν και τους κούραζα κάποιες φορές, με βοήθησαν σε οτιδήποτε με προβλημάτιζε. Τέλος, ευχαριστώ τις φίλες μου (Βαρβάρα, Δάφνη, Αλεξάνδρα, Τερέζα, Γεωργία και Έφη) για όσα ζήσαμε και μοιραστήκαμε τα δύο τελευταία χρόνια, ευχάριστα ή δυσάρεστα. Θα μου μείνουν όλα αξέχαστα.

Δεν έχω λόγια να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την αδερφή μου Γιώτα, που είναι πάντα παρόντες δίπλα μου και με κάθε τρόπο με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα. Η αγάπη τους είναι η κινητήριος δύναμή μου. Αυτή την εργασία την αφιερώνω με όλη μου την ψυχή στη Ράνια, που πίστευε σε μένα και με προέτρεπε να κάνω τα όνειρά μου πραγματικότητα. Έφυγε τόσο νωρίς από κοντά μας όμως είναι παντοτινά μέσα στην καρδιά μας.

Ηράκλειο 2004 Μπιλίτου Αικατερίνη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γονίδιο του Erf (Ets-2 Repressor Factor) κωδικοποιεί για ένα μεταγραφικό καταστολέα της Ets (E26 Transformation Specific) οικογένειας και έχει δειχθεί ότι αποτελεί μεσολαβητή του μιτογενετικού Ras/MAPK μονοπατιού. Η απενεργοποίηση του γονιδίου σε ομόζυγη κατάσταση στο ποντίκι έχει σαν αποτέλεσμα τον εμβρυϊκό θάνατο την ημέρα E10 λόγω ανωμαλιών στον πλακούντα. Συγκεκριμένα, παρατηρείται πλήρης απουσία του λαβυρίνθου, εκτεταμένο χόριο και αύξηση του στρώματος των τροφοβλαστικών γιγαντιαίων κυττάρων.

Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου είναι απαραίτητη η δημιουργία βλαστικών κυττάρων με ομόζυγη έλλειψη του Erf. Ετερόζυγα βλαστικά κύτταρα, στα οποία το ένα αλλήλιο έχει απενεργοποιηθεί μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, χρησιμοποιήθηκαν σε ένα δεύτερο γύρο στόχευσης για την παραγωγή ομόζυγων κλώνων. Απομονώθηκε ένας κλώνος ES κυττάρων, στον οποίο το δεύτερο λειτουργικό αλλήλιο έχει απαλοιφθεί μέσω αντικατάστασης από κασέτα υγρομυκίνης. Η καλλιέργεια αυτών των κυττάρων επιτρέπει τη μελέτη του αναπτυξιακού τους δυναμικού αλλά και την in vitro διαφοροποίησή τους προς μια από τις κυτταρικές τύχες.

Περαιτέρω, ο φαινότυπος της έλλειψης του Erf στον πλακούντα του ποντικού υποδεικνύει ότι το γονίδιο πιθανόν εμπλέκεται στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων. Γι αυτό το σκοπό, προχωρήσαμε στην απομόνωση βλαστοκύστεων και την καθιέρωση τροφοβλαστικών κυτταρικών σειρών. Από τη διαδικασία προέκυψε και καθιερώθηκε τελικά μια τροφοβλαστική κυτταρική σειρά αγρίου τύπου.

ABSTRACT

The Erf (Ets-2 Repressor Factor) gene codes for a transcriptional repressor of the Ets2 (E26 Transformation Specific) family of transcriptional regulators and has been shown to be an effector of the mitogenic Ras/MAPK pathway. Homozygous deletion of the gene in mouse results in embryonic death at day 10p.c. due to placental defects. In particular, there is complete loss of the labyrinthe, expanded chorion and increase in the trophoblast giant cell layer.

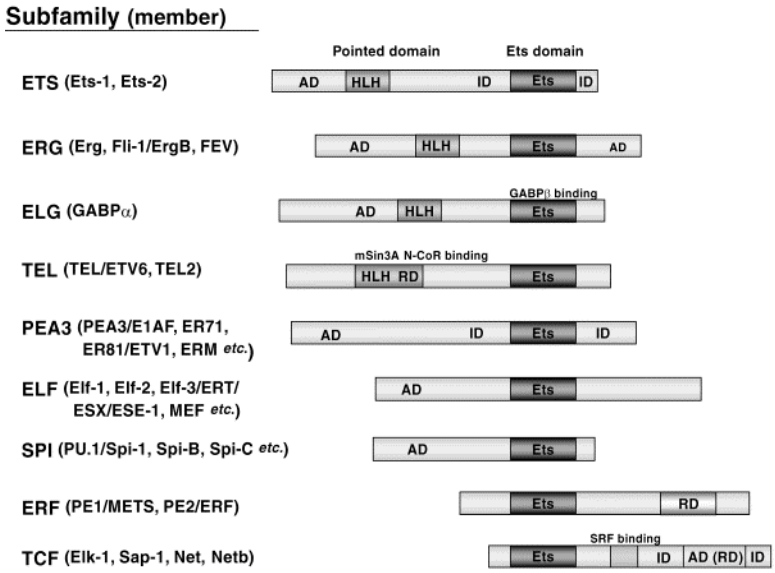
In order to further investigate the role of the gene, it is necessary to create embryonic stem cells homozygous for the Erf gene deletion. Heterozygous ES cells lacking one functional allele have been used in a second round of targeting to obtain homozygous clones. We have isolated an ES clone in which the second allele has been deleted by the replacement of the hygromycin cassette. Culture of these cells will allow the study of their developmental potential and in vitro differentiation towards the different cell fates.

Furthermore, the phenotype of Erf knockout in the placenta of mouse syggests that the gene is involved in the maintenance and differentiation of trophoblast stem cells. For this reason, we have tried to isolate blastocysts and establish trophoblast stem cell lines. From the procedure, one wild type trophoblast stem cell line has been produced and established successfully.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η οικογένεια των Ets παραγόντων

Η Ets (E26 Transformation-Specific) οικογένεια αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες μεταγραφικών ρυθμιστών που περιλαμβάνει τουλάχιστον 30 ομόλογα μέλη σε όλους τους πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το πρώτο μέλος των ets γονιδίων, το v-ets, ταυτοποιήθηκε ως ένα gag-myb-ets υβριδικό ογκογονίδιο του ρετροϊού E26 που προκαλεί μυελοβλαστικές και ερυθροβλαστικές λευχαιμίες στο κοτόπουλο. Το κοινό χαρακτηριστικό των μελών της οικογένειας είναι ότι περιέχουν μια εξελικτικά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA (Ets domain) με δομή έλικα-στροφή-έλικα περίπου 85 αμινοξέων με την οποία αναγνωρίζουν DNA ακολουθίες με το κεντρικό μοτίβο GGAA/T. Με βάση τη δομή τους αλλά και την ομολογία τους ως προς την περιοχή πρόσδεσης στο DNA, οι Ets παράγοντες χωρίζονται σε υποοικογένειες (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της δομής των Ets μεταγραφικών παραγόντων ανά υποοικογένεια. Ets, DNA-binding (Ets) domain; HLH, Helix-loop-helix domain; AD, Activation domain; RD, Repressor domain; ID, Auto-inhibitory domain (από Oikawa and Yamada, 2003)

Οι Ets μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν ενδιάμεσους μεσολαβητές των Ras-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα μονοπάτια αυτά μεταδίδουν εξωκυττάρια ερεθίσματα από αυξητικούς παράγοντες και μιτογόνα (ERK μονοπάτι) ή κυτοκίνες και κυτταρικό στρες (μονοπάτι JNK και p38) προς τον πυρήνα για τη ρύθμιση βασικών κυτταρικών λειτουργιών (Yordy and Muise-Helmericks, 2000). Έχει δειχθεί ότι κατά την ενεργοποίηση των MAPK μονοπατιών τα περισσότερα μέλη της Ets οικογένειας φωσφορυλιώνονται από MEK κινάσες και το γεγονός αυτό μπορεί να ρυθμίζει την ικανότητα πρόσδεσής τους στο DNA, τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους, την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες και τελικά τη μεταγραφική τους δράση (Oikawa and Yamada, 2003).

Η δράση των Ets πρωτεϊνών έγκειται στη θετική ή αρνητική ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την ενδοκυτταρική σηματοδότηση, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση (Sementchenko and Watson, 2000; Hsu et al., 2004). Με τον τρόπο αυτό, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε καίριες αναπτυξιακές διαδικασίες κατά την εμβρυογένεση και ενήλικη ζωή των θηλαστικών. Στην αιμοποίηση, ελέγχουν την επιβίωση, την ανάπτυξη, τον καθορισμό της κυτταρικής τύχης και τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων (Bories et al., 1995; Bartel et al., 2000). Η διαφοροποίηση των κυττάρων της μυελοειδούς σειράς ελέγχεται από το PU1 μαζί με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, ενώ άλλα μέλη της οικογένειας (Ets1, Erg, Fli1, Elf1, SpiB) εκφράζονται επιλεκτικά σε Β και Τ λεμφοκύτταρα και ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση της λεμφοειδικής σειράς. Ο μεταγραφικός καταστολέας TEL είναι απαραίτητος τόσο για την εμβρυϊκή αγγειογένεση (Wang et al., 1997), όσο και για την αιμοποιητική λειτουργία του μυελού των οστών στο ενήλικο (Wang et al, 1998).

Άλλες λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν Ets παράγοντες είναι η αγγείωση του κεντρικού νευρικού συστήματος (Ets1, Fli1), η λειτουργική σύνδεση μεταξύ κινητικών και αισθητικών νεύρων (Er81, PEA3) και η οστεογένεση (Maroulakou and Bowe, 2000). Το Ets2 είναι απαραίτητο κατά την εμβρυογένεση για την ανάπτυξη εξωεμβρυϊκών δομών του

τροφοεκτοδέρματος, όπως το άμνιο και το χόριο, αλλά και για τη μετανάστευση των τροφοβλαστικών κυττάρων (Yamamoto et al., 1998).Υπερέκφραση του Ets2 προκαλεί αυξημένη απόπτωση σε λεμφοκύτταρα και κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος, μια κατάσταση που συμβαίνει κατά την εκδήλωση του συνδρόμου Down στον άνθρωπο (Wolvetang et al., 2003a,b).

Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν Ets παράγοντες στην αγγειογένεση και λεμφαγγειογένεση, αφού μέλη της οικογένειας (Ets1, Fli1, Erg, TEL, NET) εκφράζονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και στους προγόνους τους (Ayadi et al., 2001; Oikawa and Yamada, 2003). Η δράση τους συνίσταται στη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων όπως το Tie, ο υποδοχέας VEGFR, η VE-καδερίνη, επηρεάζοντας έτσι την ανάπτυξη των αγγείων, την πυκνότητα, τη μεταναστευτικότητα και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων και λεμφαγγείων.

Παράλληλα, οι Ets μεταγραφικοί παράγοντες εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο κυτταρικός μετασχηματισμός κατά την ογκογένεση, η μετάσταση, η εκδήλωση αυτοάνοσων ασθενειών, η ίνωση και η επούλωση πληγών (Trojanowska, 2000). Μέλη της οικογένειας σχετίζονται με περιπτώσεις καρκίνου στον άνθρωπο και σε ζώα, είτε επηρεάζοντας την έκφραση ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Αυξημένη έκφραση Ets γονιδίων (Ets1, ESE1, PEA3) έχει βρεθεί σε αρκετούς τύπους ανθρώπινων καρκίνων. Γονίδια, όπως το Fli1 και TEL, ευθύνονται για καρκίνους όπως το σάρκωμα Ewing και χρόνιες μυελογενείς ή λεμφοβλαστικές λευχαιμίες, που προέρχονται από χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, παράγοντας υβριδικές πρωτεΐνες με τροποποιημένες ιδιότητες (Mavrothalassitis and Ghysdael, 2000; Truong and Ben-David Y, 2000).

1.2 Ο μεταγραφικός καταστολέας ERF

Ο ERF (Ets2 Repressor Factor) είναι ένας μεταγραφικός καταστολέας της οικογένειας Ets, που ταυτοποιήθηκε λόγω της ικανότητας του να αλληλεπιδρά in vitro με το στοιχείο H1 του υποκινητή του Ets2 γονιδίου. Το γονίδιο του Erf (περίπου 10kb) αποτελείται από 4 εξώνια και παρουσιάζει 90% ομολογία μεταξύ του ποντικού και του ανθρώπου (Liu et al., 1997). Κωδικοποιεί για μια 75kDa πρωτεΐνη που περιέχει την συντηρημένη Ets-περιοχή πρόσδεσης στο DNA (N-τελικό άκρο) και μια διακριτή περιοχή, μέσω της οποίας καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων (C-τελικό άκρο). Μια περιοχή υψηλής περιεκτικότητας σε προλίνη περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης από την Erk και cdc2 κινάσες καθώς και θέσεις αναγνώρισης από SH3 μοτίβα. Πέρα από την DNA-binding περιοχή, ο ERF δεν παρουσιάζει καμία ιδιαίτερη ομολογία με άλλα μέλη της οικογένειας, παρά μόνο με το PE-1/METS, με το οποίο σχηματίζουν μια υποοικογένεια.

Το γονίδιο του Erf εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και ιστούς που έχουν εξεταστεί. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης, ωστόσο, μεταβάλλονται στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και ως απόκριση στην ενεργοποίηση του Ras/Raf/Mek/Erk μονοπατιού. Η Erk2 έχει δειχθεί ότι προσδένεται άμεσα στον ERF και τον φωσφορυλιώνει σε πολλαπλά κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης, γεγονός που ρυθμίζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του και άρα τη δυνατότητα μεταγραφικής δράσης του (Le Gallic et al., 1999). Ο φωσφορυλιωμένος ERF μετακινείται συνεχώς μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, περιέχει δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) αλλά κανένα από τα γνωστά σήματα πυρηνικής εξόδου (Le Gallic et al., 2004). Σε κύτταρα εκθετικά αυξανόμενα εντοπίζεται κυρίως στο κυτόπλασμα φωσφορυλιωμένος, ενώ μετά από στέρηση ορού συσσωρεύεται στον πυρήνα όπου αποφωσφορυλιώνεται. Σε αυτή τη φάση η Erk κινάση είναι επίσης πυρηνική και μη φωσφορυλιωμένη. Επαγωγή με ορό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της Erk και την συνεπακόλουθη φωσφορυλίωση του ERF από αυτήν σε πολλαπλές θέσεις, γεγονός κριτικό για την έξοδό του από τον

πυρήνα με CRM1-εξαρτώμενο μηχανισμό. Φαίνεται λοιπόν ότι ο ERF αποτελεί στόχο του MAPK/ERK μονοπατιού και μάλιστα η δράση του αντικατοπτρίζει την ενεργότητα ή μη της Erk κινάσης.

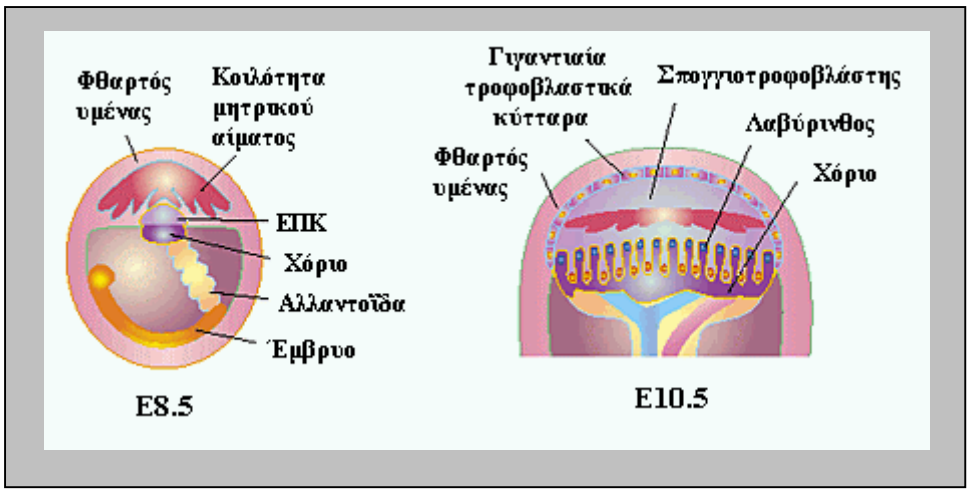
Η γρήγορη μετατόπιση του ERF στον πυρήνα μετά από στέρηση αυξητικών παραγόντων και η άμεση έξοδός του μετά από μιτογενετικό ερέθισμα υποδηλώνουν ότι ο ERF αποκρίνεται στα ερεθίσματα αυτά και συμμετέχει στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Le Gallic et al., 2004). Έχει δειχθεί ότι μεταλλαγμένη μορφή του ERF που εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα και δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί από Erk (μίμηση ανενεργούς Erk) επάγει δέσμευση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1 σε ινοβλάστες (Ref-1, MEFs, NIH 3T3). Μάλιστα, η δέσμευση αυτή εξαρτάται από την ύπαρξη λειτουργικού Rb, που ως γνωστό εμπλέκεται στη ρύθμιση της G1/S μετάβασης. Ενδεικτικό του ρόλου του Erf στον πολλαπλασιασμό είναι και η αδυναμία καθιέρωσης κυτταρικών σειρών που υπερεκφράζουν ERF ή να εκφράζουν σταθερά πυρηνικές μορφές του.

Περαιτέρω, ο ERF μπορεί να καταστείλει τον νεοπλαστικό μετασχηματισμό που προκαλείται σε κύτταρα από το ets-ογκογονίδιο του ME26 ιού, και σε μικρότερο βαθμό το μετασχηματισμό που προκαλείται από το v-fos ογκογονίδιο (Sgouras et al., 1995). Αντίθετα, δεν φαίνεται να επιδρά σε ras-μετασχηματισμένα κύτταρα, ενώ τα ενεργοποιημένα Ha-ras και raf μπορούν να καταστέλλουν την ικανότητα μεταγραφικής καταστολής του. Ο νεοπλαστικός φαινότυπος ras μετασχηματισμένων κυττάρων αναστρέφεται μόνο όταν εκφραστούν μεταλλαγμένες μορφές του ERF που καταστρέφουν θέσεις φωσφορυλίωσής του.

1.3 Στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου του Erf στο ποντίκι

Το ένα αλλήλιο του Erf έχει απενεργοποιηθεί σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού (Embryonic Stem cells, ES) μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού με κατάλληλα ανασυνδυασμένο ισογενές DNA. Συγκεκριμένα, τα εξώνια II και III που κωδικοποιούν για την περιοχή πρόσδεσης στο DNA καθώς και τμήμα του εξωνίου IV αντικαταστάθηκαν με γονίδιο ανθεκτικότητας σε νεομυκίνη κάτω από υποκινητή. Με τη μέθοδο της ένεσης εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε βλαστοκύστες και επανεμφύτευσής τους σε ζώα παρήχθησαν διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν τη μετάλλαξη στο γονίδιο του Erf.

Η απενεργοποίηση του γονιδίου σε ομόζυγη κατάσταση στο ποντίκι έχει σαν αποτέλεσμα τον εμβρυϊκό θάνατο την ημέρα E10. Ο φαινότυπος εντοπίζεται στον πλακούντα, ένα όργανο απαραίτητο για την ανταλλαγή θρεπτικών, αερίων, ορμονών και υγρών που προκύπτει από τη συγχώνευση τροφοβλαστικών κύτταρων του εμβρύου με το ενδομήτριο της μητέρας. Φυσιολογικά, την ημέρα 8.5 της εμβρυϊκής ανάπτυξης, η αλλαντοΐδα, που προέρχεται από το εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα συμφύεται με το χόριο, τροφοεκτοδερμικής προέλευσης σε μια δομή, όπου αναπτύσσονται τα πρώτα εμβρυο-πλακουντικά αγγεία (Εικόνα 2). Ο τροφοβλάστης επιδέχεται εκτενείς πτυχώσεις και δημιουργεί τη δομή του λαβυρίνθου που υποστηρίζεται δομικά και λειτουργικά από το περιβάλλον στρώμα των σπογγιοτροφοβλαστών. Τα πρόδρομα τροφοβλαστικά κύτταρα υπερκείμενα του χορίου, διαφοροποιούνται σε συγκυτιοτροφοβλάστες και συμμετέχουν στο σχηματισμό του λαβυρίνθου. Άλλα τροφοβλαστικά κύτταρα δημιουργούν το στρώμα των γιγαντιαίων τροφοβλαστικών κυττάρων, τα οποία είναι μεγάλα πολυπλοειδή κύτταρα που εισβάλλουν στη μήτρα και προωθούν τη σύνδεση του πλακούντα με το μητρικό περιβάλλον.



Εικόνα 2. Οι βασικές δομές που περιβάλλουν το έμβρυο και οι εξωεμβρυϊκοί ιστοί την ημέρα E8.5 και E10.5 της εμβρυϊκής ανάπτυξης του ποντικού. ΕΠΚ, Εξωπλακουντικός κώνος. (Τροποποιημένο από Rinkenberger and Werb, 2000).

Τα ομόζυγα ως προς την έλλειψη του Erf ποντίκια εμφανίζουν μορφολογικές ανωμαλίες σε δομές του πλακούντα, και συγκεκριμένα πλήρη απουσία του λαβύρινθου, εκτεταμένο χόριο και αύξηση του στρώματος των τροφοβλαστικών γιγαντιαίων κυττάρων. Βιοχημικές αναλύσεις έδειξαν την απουσία μετα-μιτωτικών κυττάρων στις δομές αυτές και την παρατεταμένη έκφραση γονιδίων-δεικτών της πρώιμης φάσης διαφοροποίησης των τροφοβλαστικών κυττάρων. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι ο ERF εμπλέκεται στη διαδικασία της τελικής διαφοροποίησης του τροφοεκτοδέρματος προς τους διάφορους υποπληθυσμούς τροφοβλαστικών κυττάρων (γιγαντιαία, συγκυτιοτροφοβλάστες και σπογγιοτροφοβλάστες).

1.4 Αντικείμενο της εργασίας

Η στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου του Erf στο ποντίκι οδηγεί σε εμβρυϊκό θάνατο των ομόζυγων ζώων την ημέρα Ε10, με αποτέλεσμα να γίνεται δυνατή η ανάλυση μόνο του πρώιμου φαινοτύπου, δηλαδή αυτού στον πλακούντα. Το γεγονός αυτό δεν επιτρέπει τη διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου στα διαγονιδιακά ζώα σε μετέπειτα στάδια της ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι ο Erf φυσιολογικά εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και όργανα του ενήλικου ζώου και όπως έχει δειχθεί, από πειράματα με κυτταροκαλλιέργειες, αποτελεί μεσολαβητή του Ras/Erk μονοπατιού με πιθανό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Le Gallic et al., 1999; 2004). Ταυτόχρονα η μελέτη του ρόλου άλλων ets γονιδίων καταδεικνύει ότι η Ets οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζει καίριες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η διαφοροποίηση, η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός, και η απόπτωση (Oikawa and Yamada, 2003). Η εμπλοκή της οικογένειας σε παθολογικές καταστάσεις, με κυριότερη αυτή στον καρκινικό μετασχηματισμό και τη μετάσταση, αλλά και τα μέχρι τώρα δεδομένα σχετικά με τη λειτουργία του Erf, κάνουν επιτακτική την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης του ρόλου του γονιδίου.

1.4.1 Παραγωγή εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων με ομόζυγη έλλειψη του Erf

Για τη διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου είναι απαραίτητο να δημιουργηθούν πρόδρομα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα τα οποία θα φέρουν απενεργοποιημένα και τα δυο αλλήλια του γονιδίου. Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα φυσιολογικά προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα (ΕΚΜ) της βλαστοκύστης. Ο πολυδύναμος χαρακτήρας τους συνίσταται στο γεγονός ότι δίνουν γένεση στους τρεις βλαστικούς τύπους του εμβρύου και συμμετέχουν στο σχηματισμό των εμβρυϊκών ιστών και κάποιων εξωεμβρυϊκών μεμβρανών (αλλαντοϊδα, άμνιο). Τα κύτταρα αυτά μπορούν να διατηρούνται επ' άπειρον σε αδιαφοροποίητη μορφή σε κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας παρουσία της

κυτοκίνης LIF (Leukemia Inhibitory Factor) και υποστρώματος εμβρυϊκών ινοβλαστών (Evans and Kaufman, 1981). Η καλλιέργεια των πρόδρομων αυτών κυττάρων επιτρέπει τη μελέτη του αναπτυξιακού τους δυναμικού αλλά και την in vitro διαφοροποίησή τους προς μια από τις αναπτυξιακές τύχες (Loebel et al., 2003). Με άλλα λόγια είναι δυνατή η κατευθυνόμενη διαφοροποίηση προς τους κυτταρικούς τύπους του μεσοδέρματος, ενδοδέρματος ή εξωδέρματος. Επομένως, η τεχνολογία αυτή αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη του ρόλου που διαδραματίζει ο μεταγραφικός καταστολέας Erf τόσο στην διατήρηση του δυναμικού των πρόδρομων βλαστικών κυττάρων, στα οποία είναι γνωστό ότι φυσιολογικά εκφράζεται, όσο και στην πορεία διαφοροποίησης τους.

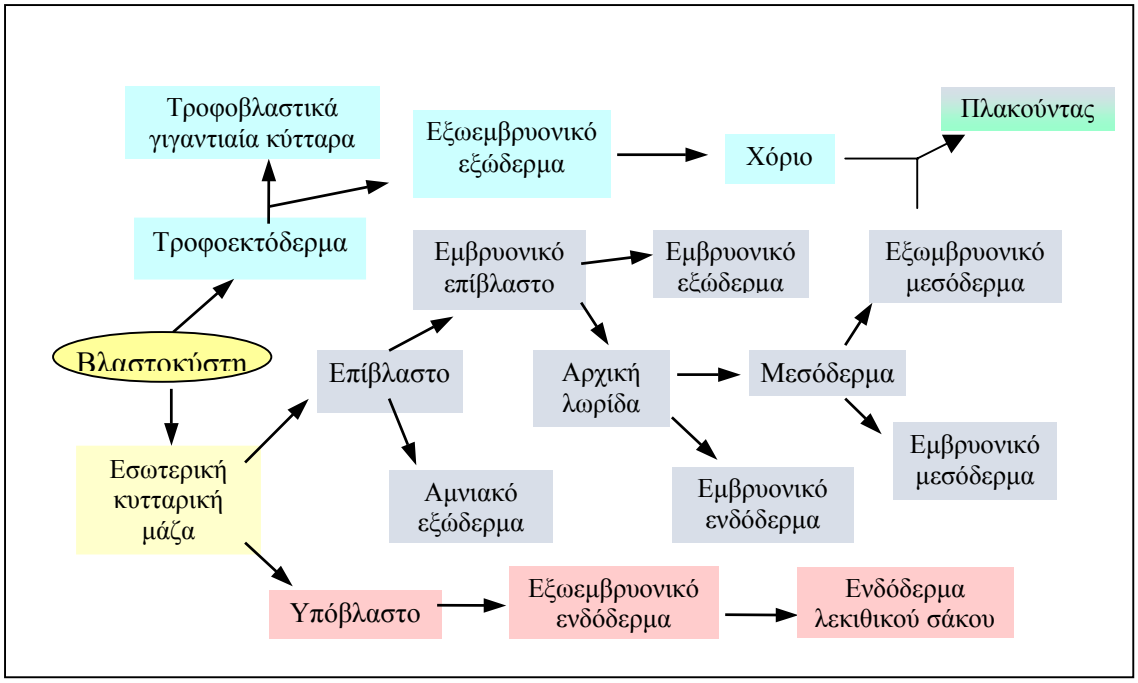
Η στρατηγική της στόχευσης γονιδίων μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Thomas and Capecchi, 1987; Mansour et al., 1998) έχει ήδη επιτρέψει την απενεργοποίηση του ενός λειτουργικού αλληλίου του Erf σε βλαστικά κύτταρα. Έχει δειχθεί ότι κύτταρα που έχουν στοχευτεί με κασέτα ανθεκτικότητας σε νεομυκίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ομόζυγα μεταλλαγμένων κυττάρων χωρίς τη μεσολάβηση δεύτερου γύρου στόχευσης με νέο φορέα (Mortensen et al., 1992). Από την καλλιέργεια των ετερόζυγων ($neo^R/+$) κυττάρων σε υψηλές συγκεντρώσεις νεομυκίνης προκύπτουν ανθεκτικοί κλώνοι που φέρουν και τα δύο αλλήλια του γονιδίου απενεργοποιημένα. Σε αυτή την περίπτωση, το δεύτερο λειτουργικό αλλήλιο απαλοίφεται με μιτωτικό ανασυνδυασμό, χρωμοσωμική απώλεια και επαναδιπλασιασμό ή γονιδιακή μετατροπή (Lefebvre et al., 2001). Αυτή η μεθοδολογία ωστόσο προβλέπει την χρησιμοποίηση στο φορέα στόχευσης ενός μεταλλαγμένου γονιδίου νεομυκίνης, το οποίο παρέχει χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας των ετερόζυγων κυττάρων σε υψηλές συγκεντρώσεις νεομυκίνης (Yenofsky et al., 1990). Καθώς τα ετερόζυγα $Erf^{+/neo}$ ES κύτταρα που έχουν παραχθεί φέρουν το αγρίου τύπου γονίδιο νεομυκίνης, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ομόζυγων κυττάρων με αυτό τον τρόπο.

Ένας εναλλακτικός τρόπος παραγωγής ομόζυγα μεταλλαγμένων βλαστικών κυττάρων από ετερόζυγα είναι η στόχευση του λειτουργικού αλληλίου σε ένα δεύτερο γύρο απενεργοποίησης (Mortensen et al., 1991). Αυτό γίνεται με τη μεταφορά στα κύτταρα ενός νέου φορέα στόχευσης, ο οποίος θα

φέρει ένα διαφορετικό γονίδιο επιλογής από το πρώτο. Το γονίδιο επιλογής ενσωματώνεται μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού στην περιοχή στόχευσης, απαλοίφει τμήμα του λειτουργικού αλληλίου και ταυτόχρονα προσδίδει στα ανασυνδυασμένα κύτταρα ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η παραγωγή εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων στα οποία θα είναι απενεργοποιημένα τα δύο αλλήλια του Erf ακολουθώντας την παραπάνω στρατηγική. Αρχικό υλικό αποτελούν τα ετερόζυγα ES κύτταρα που ήδη φέρουν ένα αλλήλιο απενεργοποιημένο μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού με κασέτα ανθεκτικότητας σε νεομυκίνη. Η δεύτερη στόχευση γίνεται με φορέα που περιλαμβάνει κασέτα ανθεκτικότητας σε υγρομυκίνη.

1.4.2 Παραγωγή τροφοβλαστικών κυττάρων με έλλειψη του Erf

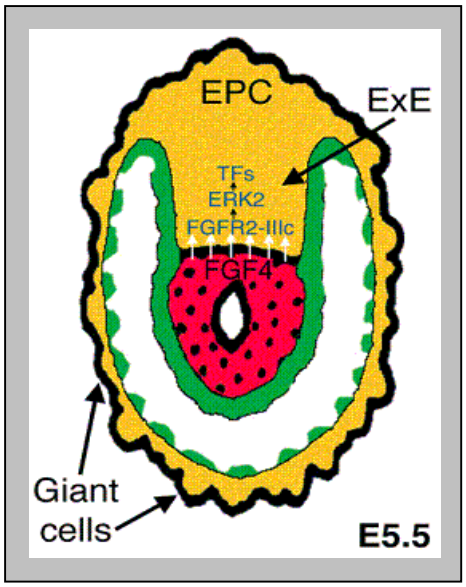
Όπως προαναφέρθηκε, ο εμβρυϊκός θάνατος των ομόζυγων $Erf^{-/-}$ ζώων οφείλεται σε ανωμαλίες του πλακούντα, και συγκεκριμένα στις δομές του λαβυρίνθου και των τροφοβλαστικών στρωμάτων. Οι δομές αυτές προκύπτουν φυσιολογικά από κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος της βλαστοκύστης (Εικόνα 3). Τα κύτταρα αυτά είναι διπλοειδή επιθηλοειδή με ανανεωτική ικανότητα που διαφοροποιούμενα προς διάφορους κυτταρικούς τύπους συμβάλλουν στη γένεση των επιθηλιακών δομών του πλακούντα και άλλων εξωεμβρυικών δομών (Rossant, 2001). Ταυτόχρονα, έχει δειχτεί ότι η έκφραση του γονιδίου του Erf στον πλακούντα εντοπίζεται στα τροφοβλαστικά κύτταρα του χορίου. Επομένως είναι απαραίτητο να γίνει περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών.



Εικόνα 3. Η προέλευση των ιστών του εμβρύου του ποντικού. Διακρίνεται η μικτή προέλευση του πλακούντα από το τροφοβλαστικό χόριο και την αλλαντοΐδα του εξωεμβρυϊκού μεσοδέματος. Οι ιστοί κοινής προέλευσης μετά το στάδιο της βλαστοκύστης χρωματίζονται με το ίδιο χρώμα. Ιστοί του τροφοεκτοδέρματος, πράσινο; Ιστοί του επίβλαστου, μπλε; Ιστοί του υπόβλαστου, ανοιχτό κόκκινο.

Τα πρόδρομα κύτταρα της τροφοβλαστικής σειράς εντοπίζονται το στάδιο της βλαστοκύστης, την ημέρα Ε3.5 της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος που βρίσκονται σε επαφή με την εσωτερική κυτταρική μάζα πολλαπλασιάζονται και δίνουν γένεση στον τροφοβλαστικό ιστό, ενώ τα υπόλοιπα διαφοροποιούνται σε γιγαντιαία τροφοβλαστικά κύτταρα. Για την διατήρηση της αδιαφοροποίητης μορφής των τροφοβλαστικών κυττάρων φαίνεται ότι καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει η σηματοδότηση του αυξητικού παράγοντα FGF4 με τον υποδοχέα FGFR2IIIc (Arman et al., 1998; Kunath et al., 2004) (Εικόνα 4). Η γνώση αυτή στην πράξη έχει επιτρέψει την απομόνωση των πολυδύναμων κυττάρων του τροφοεκτοδέρματος από έμβρυα 3.5 ημερών και τη διατήρησή τους σε καλλιέργεια παρουσία του παράγοντα FGF-4 και ηπαρίνης πάνω σε υπόστρωμα πρωτογενών εμβρυϊκών ινοβλαστών (Tanaka et al., 1998). Καθιερωμένες σειρές τροφοβλαστικών κυττάρων μπορούν να καλλιεργούνται χωρίς την παρουσία των ινοβλαστών σε θρεπτικό

εμπλουτισμένο κατά 70% με το υπερκείμενο της πρωτογενούς καλλιέργειας (Conditioned Medium, CM). Αυτό υποδεικνύει ότι εκτός από τον παράγοντα FGF4, υπάρχει και κάποιος άλλος παράγοντας που εκκρίνεται από τους εμβρυϊκούς ινοβλάστες και συμβάλλει στη διατήρηση των τροφοβλαστικών κυττάρων. Απομάκρυνση από το θρεπτικό του παράγοντα FGF4 ή του εμπλουτισμένου CM επάγει τη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων προς τους διάφορους υποπλυθυσμούς, των συγκυτιο- και σπογγο-τροφοβλαστικών αλλά κυρίως των γιαγαντιαίων κυττάρων (Hemberger, 2004). Επομένως, η καλλιέργεια τροφοβλαστικών κυττάρων και η δυνατότητα διαφοροποίησής τους αποτελούν χρήσιμα εργαλεία στην προσπάθεια διερεύνησης του ρόλου του Erf στην ανάπτυξη και το δυναμικό των κυττάρων αυτών.



Εικόνα 4. Μοντέλο διατήρησης της αδιαφοροποίητης μορφής τροφοβλαστικών κυττάρων στο έμβρυο του ποντικού. Ο FGF4 παράγεται από το επίβλαστο (κόκκινο) και σηματοδοτεί στο υπερκείμενο εξωεμβρυονικό εξώδερμα (ExE) μέσω του υποδοχέα FGFR2 IIIc. Η Erk2 φαίνεται ότι είναι ο κύριος σηματοδοτικός μεσολαβητής που άμεσα ή έμμεσα ενεργοποιεί απαραίτητους μεταγραφικούς παράγοντες (TFs). Το εξωεμβρυονικό ενδόδερμα φαίνεται με πράσινο (Από Kunath et al., 2004)

Σκοπός της εργασίας είναι να απομονωθούν βλαστοκύστες από ποντίκια και μετά από καλλιέργειά τους να καθιερωθούν κυτταρικές σειρές τροφοβλαστικών κυττάρων. Μάλιστα, από τη διασταύρωση ετερόζυγων ως προς την έλλειψη του Erf ζώων αναμένεται να προκύψουν έμβρυα αγρίου τύπου, ετερόζυγα και ομόζυγα σε αναλογία 1:2:1. Με αυτό το τρόπο είναι δυνατό να παραχθούν κυτταρικές σειρές στις οποίες το γονίδιο του Erf θα είναι λειτουργικό ή απενεργοποιημένο. Κάτι τέτοιο επιτρέπει τη συγκριτική ανάλυση του φαινοτύπου και του αναπτυξιακού δυναμικού των κυττάρων ανάλογα με το γενότυπο τους. Επιπλέον, είναι ενδιαφέρον να εξεταστεί κατά πόσο η έλλειψη του γονιδίου του Erf από τροφοβλαστικά κύτταρα σε in vitro καλλιέργεια επηρεάζει την πορεία διαφοροποίησης τους προς τους διάφορους κυτταρικούς τύπους του τροφοεκτοδέρματος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικές αρχές χειρισμού κυτταροκαλλιεργειών και ζώων

Όλα τα πλαστικά, τα θρεπτικά μέσα και τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στις κυτταροκαλλιέργειες είναι αποστειρωμένα. Τα χημικά διαλύματα παρασκευάζονται σε δις απιονισμένο νερό (ddH_2O) και μαζί με τα γυαλικά αποστειρώνονται σε κλίβανο στους 121° C, 1.1Atm για 20λεπτά. Ο χειρισμός των κυτταροκαλλιεργειών γίνεται μέσα σε ειδικό απαγωγό που αποστειρώνεται, πριν από κάθε χρήση, με UV ακτινοβόληση για 10 λεπτά. Οι καλλιέργειες αναπτύσσονται σε επωαστήρα 37° C, 7% CO_2.

Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer μετά από ανάμιξη ποσότητας του κυτταρικού εναιωρήματος με διάλυμα trypan blue σε αναλογία 1:1. Ο συνολικός αριθμός κυττάρων υπολογίζεται με βάση τον τύπο [Όγκος κυτταρικού εναιωρήματος x παράγοντας διάλυσης x Μ.Ο κυττάρων x 10^4] ενώ η % βιωσιμότητα υπολογίζεται από το λόγο των ζωντανών κυττάρων προς το συνολικό αριθμό κυττάρων x 100%.

Τα ποντίκια που χρησιμοποιούνται στα πειράματα είναι του στελέχους 129Sv/Ev (εκτός αν αναφέρονται εξαιρέσεις στο κείμενο) και εκτρέφονται σε καραντίνα του IMBB, ITE κάτω από αυστηρές συνθήκες. Η θανάτωση των ζώων για τη διεξαγωγή πειραμάτων γίνεται με αυχενική εξάρθρωση.

2.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα ή ιστούς

Τα κύτταρα ή ο ιστός επαναδιαλύονται σε διάλυμα λύσης [50mM Tris, pH 8; 100mM EDTA; 100mM NaCl; 1% SDS] και 0,5mg/ml πρωτεϊνάση K και επωάζονται για 12 ώρες στους 55°C. Στο εναιώρημα προστίθενται 50μg/ml RNase και επωάζεται στους 37°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται ½ όγκου κορεσμένο NaCl (6M) και αφήνεται στον πάγο για 10 λεπτά. Το εναιώρημα φυγοκεντρείται σε 12,500rpm, 4°C, 10min και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάκι, όπου προστίθενται 0,6 όγκοι ισοπροπανόλης. Αναδεύεται και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε 12,500rpm, 4°C, 10min. Το ίζημα

πλένεται με 70% αιθανόλη και τελικά επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE [10mM Tris-HCl, pH 7.4; 1mM EDTA].

2.3 Εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού

2.3.1 Απομόνωση και καλλιέργεια εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού

Οι εμβρυϊκοί ινοβλάστες απομονώνονται από 14,5 ημερών έμβρυα, τα οποία προέρχονται από τη διασταύρωση ποντικών αγρίου τύπου του στελέχους 129Sv/Ev. Για την απομόνωση των ανθεκτικών σε υγρομυκίνη ινοβλαστών έγιναν διασταυρώσεις θηλυκών αγρίου τύπου ποντικών του στελέχους 129Sv/Ev με αρσενικά DR3 ποντίκια μικτού γενετικού υποβάθρου που εκφράζουν συστατικά τα γονίδια ανθεκτικότητας σε υγρομυκίνη, G418 και πυρομυκίνη (Tucker et al., 1997). Τα έμβρυα απομονώθηκαν την ημέρα 14.5 της κύησης με το πρωτόκολλο που παρατίθεται παρακάτω.

Συγκεκριμένα, το έγκυο θηλυκό ποντίκι θανατώνεται και γίνεται τομή στο υπογάστριο. Από τη μήτρα απομονώνονται τα έμβρυα και τοποθετούνται σε πιάτο με 1xPBS, όπου αποκόπτεται η καρδιά και το συκώτι. Οι σάρκες ξεπλένονται σε φρέσκο 1xPBS και τοποθετούνται σε πιάτο με πλήρες MEFs θρεπτικό με τελική σύσταση:

1x DMEM με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη (4500mg/l) (Gibco 31966)

10% εμβρυϊκός βοδινός ορός (θερμική απενεργοποίηση στους 56°C για 30 λεπτά) (Biochrom S0115)

1x πενικιλλίνη/στρεπτομυκίνη (Gibco 15140)

Οι σάρκες κομματιάζονται με τη βοήθεια λαβίδας και το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε φλάσκα κυτταροκαλλιέργειας. Το θρεπτικό ανανεώνεται μετά από 4 ώρες και στο εξής κάθε δεύτερη μέρα. Μετά το πρώτο πέρασμα, ποσότητα κυττάρων ελέγχεται για μόλυνση από το βακτήριο Mycoplasma με τη μέθοδο χρώσης με DAPI.

2.3.2 Χρώση με DAPI για τη διαπίστωση βακτηριακής μόλυνσης των κυττάρων από mycoplasma

Η χρώση κυττάρων με DAPI αποτελεί ένα τρόπο διαπίστωσης πιθανής μόλυνσης των ευκαρυωτικών κυτταρικών καλλιεργειών από το βακτήριο Mycoplasma. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια μέσα σε πιάτο, πλένονται με 1xPBS δύο φορές και μονιμοποιούνται με μεθανόλη. Στη συνέχεια προστίθεται DAPI 1μg/ml διαλυμένο σε μεθανόλη και επωάζεται στους 37°C για 15 λεπτά. Τα κύτταρα ξεπλένονται αρχικά με μεθανόλη και μετά με 1xPBS, οπότε είναι έτοιμα για παρατήρηση κάτω από ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού.

2.3.3 γ-απενεργοποίηση εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού

Η απενεργοποίηση των ινοβλαστών εξυπηρετεί τη χρησιμοποίησή τους ως τροφικών κυττάρων σε καλλιέργειες ES και TS κυττάρων αλλά και την παραγωγή εμπλουτισμένου TS θρεπτικού. Γι αυτούς τους σκοπούς, ινοβλάστες πρόωρου περάσματος που βρίσκονται σε καλλιέργεια με πυκνότητα 80-90% μέσα σε φλάσκες τρυψινοποιούνται και το κυτταρικό εναιώρημα συλλέγεται σε σωλήνα 15ml τύπου Falcon με πλήρες θρεπτικό. Η ακτινοβόληση γίνεται στα 4000-5000rad σε ραδιενεργή πηγή. Για τα πειράματα η ακτινοβόληση έγινε σε πηγή κοβαλτίου στο Τμήμα Βιολογίας. Τα ακτινοβολημένα κύτταρα μετρούνται μετά από χρώση με trypan blue και απλώνονται σε πιάτα κυτταροκαλλιεργειών. Στην περίπτωση καλλιέργειας ES κυττάρων, οι ινοβλάστες απλώνονται στα πιάτα με πυκνότητα $6x10^4$ ζωντανά κύτταρα/cm^2, ενώ στην περίπτωση καλλιέργειας TS κυττάρων η πυκνότητα είναι $3x10^4$ ζωντανά κύτταρα/cm^2.

2.4 Στόχευση εμβρυικών βλαστικών κυττάρων

2.4.1 Καλλιέργεια εμβρυικών βλαστικών κυττάρων

Κλώνοι ES κυττάρων προέλευσης 129Sv/Ev στους οποίους τμήμα του ενός αλληλίου του Erf έχει απαλοιφθεί με αντικατάσταση κασέτας νεομυκίνης ($Erf^{+/neo}$) έχουν παραχθεί από την Χ. Παπαδάκη. Οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι c.130 και c.169 καθώς και τα πατρικά αγρίου τύπου PC3 ES κύτταρα προέλευσης 129Sv/Ev παραχωρήθηκαν για τα πειράματα.

Τα ES κύτταρα καλλιεργούνται σε πλήρες ES θρεπτικό μέσο με τελική σύσταση:

1x KnockOut DMEM (Gibco 10829)
1x L-Γλουταμίνη (Gibco 25030)
1x Πενικιλλίνη/Στρεπτομυκίνη
1x Μη απαραίτητα αμινοξέα (Gibco 11140)
15% Εμβρυϊκός βοδινός ορός (Hyclone)
100μM β-Μερκαπτοαιθανόλη (Gibco 31350)
1000U/ml Leukaemia Inhibitory Factor (ESGRO)

Η καλλιέργεια γίνεται πάνω σε στρώμα τροφικών γ-ακτινοβολημένων εμβρυϊκών ινοβλαστών ή όταν αυτό δεν είναι δυνατό, σε πιάτα επικαλυμένα με 0,1% ζελατίνη. Το θρεπτικό ανανεώνεται κάθε μέρα. Τα κύτταρα αποκολλώνται με 0.25% τρυψίνη/EDTA έως το επίπεδο μονού κυττάρου και περνώνται σε πιάτα σε αναλογία 1:3 με 1:6 κάθε 2-3 μέρες.

2.4.2 Πλασμιδιακός φορέας στόχευσης με δείκτη επιλογής την υγρομυκίνη

Ο φορέας KSTK9Lx59A/pMC-Hygro έχει κατασκευαστεί από την Χ.Παπαδάκη και παραχωρήθηκε για το πείραμα απενεργοποίησης του δεύτερου αλληλίου του Erf σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, σε πλασμίδιο pBluescript KS είναι κλωνοποιημένο το γενωμικό τμήμα λ59*NotI του γονιδίου του mErf, στο οποίο τα εξώνια II, III και τμήμα του IV (συνολικά 800bp) έχουν αντικατασταθεί με κασέτα ανθεκτικότητας σε υγρομυκίνη. Η κασέτα pMC-Hygro, μεγέθους 1.6Kb, πλαισιώνεται εκατέρωθεν από θέσεις

LoxP. Στα άκρα του ανασυνδυασμένου τμήματος μεγέθους 7.8Kb έχουν εισαχθεί δύο κασέτες κινάσης της θυμιδίνης HSV-TK1 και HSV-TK2 για αρνητική επιλογή με Gancyclovir. Ο φορέας έχει συνολικό μέγεθος 14.8Kb, απομονώθηκε σε μεγάλη κλίμακα από βακτηριακή καλλιέργεια και καθαρίστηκε με τη μέθοδο της υπερφυγοκέντρησης σε διαβάθμιση χλωριούχου καισίου όπως περιγράφεται στους Sambrook et al, 1989. Για την ταυτοποίηση του φορέα έγιναν διαγνωστικές πέψεις με κατάλληλα ένζυμα ενώ η γραμμοποίησή του με το ένζυμο PmeI. Το προϊόν καθαρίστηκε με τη μέθοδο της φαινόλης-χλωροφορμίου και το DNA επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό TE

2.4.3 <u>Ηλεκτρομεταφορά DNA σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα και επιλογή των κλώνων</u>

Κύτταρα $Erf^{+/neo}$ των κλώνων c.130 και c.169 και πατρικά PC3 σε καλλιέργεια, μέσα σε πιάτο διαμέτρου 10cm, ξεπλένονται με 1xPBS και τρυψινοποιούνται με 0.25% Τρυψίνη/EDTA. Αφού μετρηθούν τα κύτταρα, περίπου 10^7 κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση σε 1200rpm, 3λεπτά και επαναδιαλύονται σε διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Electroporation Buffer, EB) [6mM Δεξτρόζη, 20mM Hepes, 1x PBS, 100μM β-μερκαπτοαιθανόλη] σε πυκνότητα $1.5x10^7$ κύτταρα/ml διαλύματος. Στο εναιώρημα προστίθενται 27-30μg DNA διαλυμένου σε TE, αναμιγνύεται και μεταφέρεται με πιπέττα Pasteur σε κυψελίδα 0,4cm (BioRad 165-2081). Η ηλεκτρομεταφορά γίνεται στα 400V, 25μF σε συσκευή BioRad Gene Pulser II. Τα κύτταρα συλλέγονται από την κυψελίδα σε σωλήνα και εκτιμάται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων μετά από χρώση με trypan blue. Επαναδιαλύονται σε πλήρες ES θρεπτικό μέσο και στρώνονται σε 4 πιάτα 10-cm επικαλυμμένα με ζελατίνη ή πάνω σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ανθεκτικούς σε υγρομυκίνη.

Η επιλογή των στοχευμένων κυττάρων ξεκινάει μια ημέρα μετά την ηλεκτρομεταφορά, προσθέτοντας στο θρεπτικό 150μg/ml Υγρομυκίνη B (Sigma H-7772) και 2μM Gancyclovir (Roche). Το θρεπτικό ανανεώνεται κάθε μέρα και η επιλογή διαρκεί 7-8 ημέρες, οπότε έχει πεθάνει ο μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων και έχουν δημιουργηθεί ανθεκτικές αποικίες. Καθεμία αποικία

απομονώνεται χωριστά, μεταφέρεται σε 30μl τρυψίνης σε πιάτο 96-well, όπου αποσυγκροτείται και το εναιώρημα μεταφέρεται σε πιάτο 96-well με πλήρες ES θρεπτικό πάνω σε στρώμα ινοβλαστών. Μετά από 2-3 μέρες καλλιέργειας, η μισή ποσότητα κυττάρων μεταφέρεται σε πιάτο 96-well και ψύχεται για φύλαξη στους -80°C. Τα υπόλοιπα κύτταρα χρησιμοποιούνται για επέκταση της καλλιέργειας προς απομόνωση DNA και ανάλυση του γενοτύπου του κάθε κλώνου.

2.5 Ανάλυση των στοχευμένων κυττάρων

2.5.1 Ανάλυση του γενοτύπου ανθεκτικών ES κλώνων με PCR

Οι αποικίες ES κυττάρων που επιβιώνουν την επιλογή σε υγρομυκίνη και gancyclovir ανακαλλιεργούνται σε μεγάλη κλίμακα. Από κάθε κλώνο απομονώνεται γενωμικό DNA για γονοτυπική ανάλυση με PCR. Χρησιμοποιείται το σύστημα πολυμεράσης υψηλής πιστότητας Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim) και οι εκκινητές 5mErf και Bam3. Ο εκκινητής 5mErf [5'-ATGCCCATACGGTTACTCTCA-3'] είναι εσωτερικός του διαγονιδίου και υβριδοποιείται στο 5'άκρο του εξωνίου II. Ο εκκινητής Bam3 είναι εξωτερικός του ανασυνδυασμένου διαγονιδίου και υβριδοποιείται σε περιοχή του 3' UTR.

Στην αντίδραση που πραγματοποιείται με hot start περιλαμβάνονται σε τελική συγκέντρωση:

100-750ng DNA διαλυμένου σε TE

200μM dNTPs

300nM εκκινητής 5mErf

300nM εκκινητής Bam3

1x Expand PCR ρυθμιστικό διάλυμα με $MgCl_2$

2.6U Expand μίγμα ενζύμου

ddH_2O έως τελικό όγκο 50μl

Το πρόγραμμα εκτέλεσης της αντίδρασης είναι:

1. 94° C, 6min
2. 94° C, 30sec
3. 60° C, 30sec
4. 68° C, 3min [βήματα 2-4 x10 κύκλοι]
5. 94° C, 30sec
6. 60° C, 30sec
7. 68° C, 3min [βήματα 5-7 x25 κύκλοι με 5sec επέκταση/κύκλο]
8. 72° C, 7min

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1,2% σε ρυθμιστικό TBE. Από το αγρίου τύπου αλλήλιο προκύπτει ζώνη 3.8Kb, ενώ η απαλοιφή τμήματος του Erf με την κασέτα neo δίνει μια ζώνη 4.2Kb. Στοχευμένα κύτταρα στα οποία το ένα αλλήλιο έχει αντικατασταθεί από κασέτα hygro αναγνωρίζονται από την ύπαρξη ζώνης 4.6Kb.

Η δομή του διαγονιδίου στους θετικούς κλώνους επιβεβαιώνεται περαιτέρω με ανάλυση κατά Southern.

2.5.2 <u>Χρωμοσωμική ανάλυση ES κυττάρων (καρυότυπος)</u>

Σε ES κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια με πυκνότητα 50-75% σε πιάτο διαμέτρου 60mm προστίθενται στο θρεπτικό μέσο 20ng/ml Demecolcine και αφήνεται για 2 ώρες. Τα κύτταρα στη συνέχεια πλένονται με 1xPBS, τρυψινοποιούνται ως μονά κύτταρα και κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση σε 1200rpm, 3min. Το ίζημα πλένεται με 1xPBS και επαναδιαλύεται σε 5ml 0.56% (w/v) KCl. Το υποτονικό διάλυμα αφήνεται για 5 λεπτά και στη συνέχεια τα κύτταρα κατακρημνίζονται σε 750rpm, 5min. Στο ιζημα προστίθενται 5ml παγωμένου διαλύματος μεθανόλη:οξικό οξύ (3:1) στάγδην με ταυτόχρονη ανακίνηση του κυτταρικού εναιωρήματος. Το μονιμοποιητικό αφήνεται για 5 λεπτά και η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές, ώστε τελικά το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1ml μεθανόλης-οξικού οξέος. Το εναιώρημα ρίχνεται με πιπέττα Pasteur στάγδην και από ύψος πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες

μέσα σε απαγωγό. Οι πλάκες αφού στεγνώσουν, βάφονται με διάλυμα 10% Giemsa σε 1xPBS για 20 λεπτά και μετά ξεπλένονται σε νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό. Οι αντικειμενοφόροι στεγνώνουν στους 37° C και καλύπτονται με καλυπτρίδα. Κάτω από οπτικό μικροσκόπιο μετράται ο αριθμός χρωμοσωμάτων ανά κύτταρο σε ικανό αριθμό κυττάρων.

2.6 Τροφοβλαστικά κύτταρα ποντικού

2.6.1 Προετοιμασία θρεπτικού μέσου για την καλλιέργεια τροφοβλαστικών κυττάρων και βλαστοκύστεων

Το TS θρεπτικό έχει την εξής τελική σύσταση :

1x RPMI 1640 με L-Γλουταμίνη και Hepes (Gibco 52400)

20% Εμβρυϊκός βοδινός ορός (Biochrom)

1mM Πυροσταφυλικό οξύ (Gibco 11360)

100μM β-Μερκαπτοαιθανόλη

1x Πενικιλλίνη/Στρεπτομυκίνη

Ο παράγοντας FGF4 σε μορφή λυοφιλιομένης σκόνης επαναδιαλύεται σε PBS/0.1% BSA σε συγκέντρωση 25μg/ml (1000x) και μοιράζεται σε ποσότητες των 100μl, οι οποίες φυλάσσονται στους -80°C. Η ηπαρίνη επαναδιαλύεται σε PBS σε συγκέντρωση 10mg/ml (10,000x), μοιράζεται σε ποσότητες των 500μl και φυλάσσεται στους -80°C. Για την παρασκευή πλήρους TS θρεπτικού (TS+F4H) προστίθενται σε τελική συγκέντρωση 25ng/ml FGF-4 (Peprotech 100-31 ή Sigma F8424) και 1μg/ml Ηπαρίνη (Sigma H-3149).

Για την προετοιμασία εμπλουτισμένου θρεπτικού (Feeder-conditoned medium, CM), γ-ακτινοβολημένοι εμβρυϊκοί ινοβλάστες περάσματος 1 (Passage1, P1) απλώνονται σε πυκνότητα $2x10^5$ κύτταρα/ml θρεπτικού σε πιάτα διαμέτρου 10cm. Προστίθενται 10ml TS θρεπτικού και οι καλλιέργειες αφήνονται για 72 ώρες. Το θρεπτικό συλλέγεται, φυγοκεντρείται σε 1200rpm για 3λεπτά για την κατακρήμνιση των νεκρών κυττάρων και το υπερκείμενο εκλούεται μέσα από φίλτρα 0.45μm. Το CM θρεπτικό φυλάσσεται στους -20°C και ξεπαγώνεται πριν τη χρήση του, οπότε διατηρείται στους 4°C. Τα πιάτα με

τους εμβρυϊκούς ινοβλάστες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μιας ακόμη σειράς θρεπτικού.

2.6.2 Απομόνωση και καλλιέργεια βλαστοκύστεων ποντικού

Θηλυκά ποντίκια του στελέχους 129Sv/Ev ηλικίας δύο μηνών υπόκεινται σε πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας με ορμόνες (superovulation). Συγκεκριμένα, με ενδοπεριτοναϊκή ένεση χορηγούνται 5U γοναδοτροπίνης PMSG (Pregnant Mares Serum Gonadotrophin, Folligon) και 46ώρες αργότερα 5U χοριονικής γοναδοτροπίνης (Chorionic Gonadotropin, Ghorulon). Τα θηλυκά αμέσως μετά τη δεύτερη ένεση τοποθετούνται με αρσενικούς για ζευγάρωμα και την επόμενη μέρα ελέγχονται για την ύπαρξη κολπικής πλάκας. Η ημέρα αυτή ορίζεται ως 0.5 μέρα της κύησης αν διαπιστωθεί κολπική πλάκα, οπότε τα ποντίκια αποχωρίζονται από τα αρσενικά και τοποθετούνται σε ένα κλουβί. Την ημέρα 3.5 της κύησης τα θηλυκά ποντίκια θανατώνονται και γίνεται τομή στη μεσοκοιλιακή χώρα. Από τη σπλαχνική κοιλότητα αποκόπτονται οι μήτρες και τοποθετούνται σε πιάτο 35mm με θρεπτικό RPMI. Με λαβίδες απομακρύνονται οι αποθέσεις λίπους, ξεπλένονται οι μήτρες και τοποθετούνται σε πιάτο με TS θρεπτικό μέσα στον απαγωγό. Με σύριγγα που περιέχει TS θρεπτικό εκτοπίζονται οι βλαστοκύστεις από τον εσωτερικό αυλό της μήτρας στο πιάτο. Κάτω από το στερεοσκόπιο συλλέγεται κάθε μια βλαστοκύστη με αναρρόφηση σε τριχοειδές (Borosilicate glass capillaries 1.2mm, Harvard Apparatus Inc.), ξεπλένεται σε θρεπτικό TS+F4H και μεταφέρεται σε πιάτο τύπου 24-well με γ-ακτινοβολημένους ινοβλάστες.

Η καλλιέργεια και ανάπτυξη των βλαστοκύστεων παρακολουθείται καθημερινά με μικροσκοπική παρατήρηση. Το συσσωμάτωμα κυττάρων που δημιουργείται μετά από 2-3 μέρες καλλιέργειας διασπάται με τρυψίνη και καλλιεργείται στο ίδιο πιάτο με τον ακόλουθο τρόπο: Το θρεπτικό απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται με 1xPBS. Στο πιάτο προστίθενται 100μl 0.1% τρυψίνη/EDTA και επωάζεται στους 37°C, 5%CO_2 για 5 λεπτά. Με γυάλινη πιπέττα Pasteur το συσσωμάτωμα τρυψινοποιείται σε μικρότερα κομμάτια λίγων κυττάρων. Στο πιάτο προστίθενται 400μl 70%CM+1.5xF4H και

η καλλιέργεια συνεχίζεται. Το θρεπτικό ανανεώνεται με 70%CM+F4H 16 ώρες αργότερα και στο εξής ανά δύο μέρες.

2.6.3 Καλλιέργεια τροφοβλαστικών κυττάρων ποντικού

Τα τροφοβλαστικά κύτταρα καλλιεργούνται πάνω σε γ-ακτινοβολημένους ινοβλάστες σε θρεπτικό TS+F4H. Οι πρώτες αποικίες τροφοβλαστικών κυττάρων εμφανίζονται 7-11 ημέρες μετά την απομόνωση των βλαστοκύστεων. Το πρώτο πέρασμα γίνεται όταν οι αποικίες έχουν καλύψει το 50% του πιάτου.

Τα κύτταρα περνώνται σε πιάτο μεγαλύτερης επιφάνειας (1:2 έως 1:5) όταν η πυκνότητα φτάσει περίπου στο 80%. Μετά από κάθε πέρασμα το θρεπτικό εμπλουτίζεται με 1.5xF4H. Τα τροφοβλαστικά κύτταρα μπορούν να καλλιεργούνται μετά τα πρώτα κρίσιμα περάσματα σε πιάτο χωρίς γ-ακτινοβολημένους ινοβλάστες αλλά με εμπλουτισμένο θρεπτικό. Συγκεκριμένα η καλλιέργεια γίνεται σε 70% θρεπτικό CM, 30% πλήρες TS θρεπτικό, 1xFGF4/Ηπαρίνη. Η ταυτοποίηση του γενοτύπου των τροφοβλαστικών κυττάρων γίνεται με ανάλυση PCR με πρωτόκολλο που περιγράφεται σε επόμενη παράγραφο.

Για το πάγωμα των κυττάρων παρασκευάζεται 2x θρεπτικό μέσο παγώματος [30% πλήρες θρεπτικό, 50% ορός, 20% DMSO] και αναμιγνύεται με πλήρες θρεπτικό μέσο που περιέχει τα κύτταρα σε αναλογία 1:1.

2.6.4 Ανάλυση του γενοτύπου των τροφοβλαστικών κυττάρων και των ποντικών

Ο γενότυπος των τροφοβλαστικών κυττάρων και των ζώων γίνεται με ανάλυση PCR σε γενωμικό DNA, το οποίο απομονώνεται από τμήμα της ουράς του ζώου ή από κύτταρα. Η τελική σύσταση της αντίδρασης PCR είναι:

50-100ng γενωμικό DNA

1μM Primer 1930 [5'-ACAGCAGAGAAGAGAGAAGAG-3']

1μM Primer 898 [5'-GTGGGGCAGGACATAAAAACT-3']

1x PCR buffer (Minotech)

2% DMSO

200nM dNTPs

2,5U Taq Polymerase (Minotech)

ddH_2O εως τελικό όγκο 50μl

και το πρόγραμμα που εκτελείται είναι:

1. 94° C, 6min
2. 94° C, 45sec
3. 58° C, 45sec
4. 72° C, 2min [βήματα 2-4 x35κύκλοι]
5. 72° C, 7min

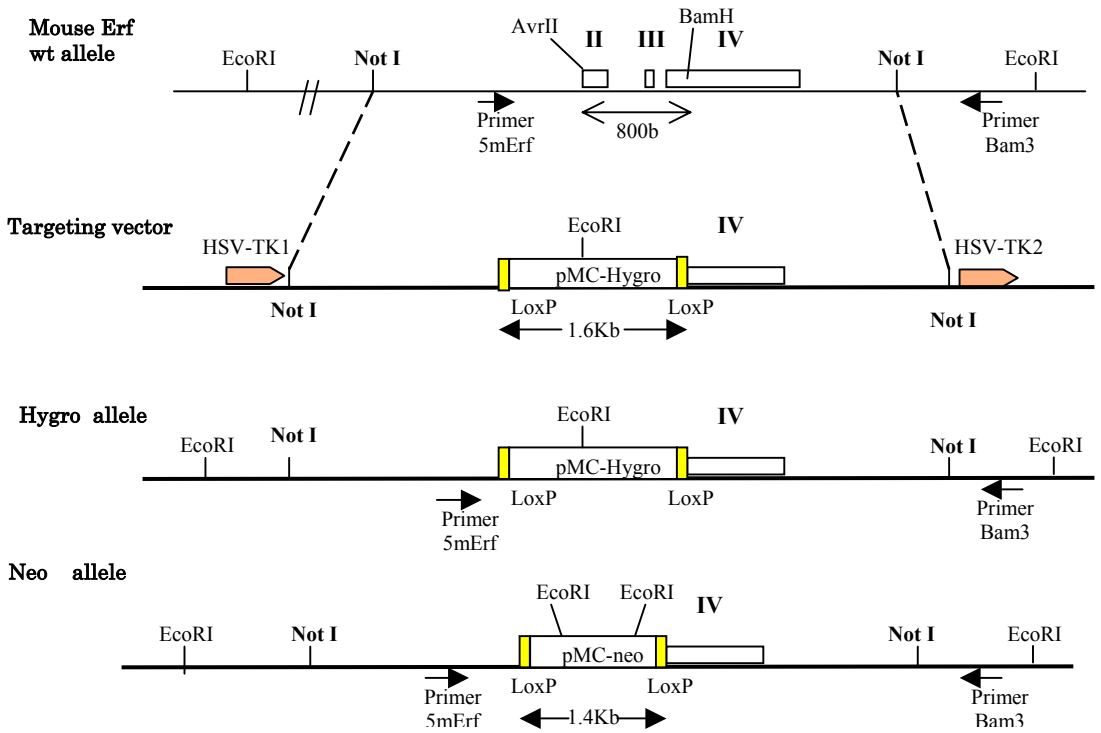
Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,2% TBE.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Παραγωγή στοχευμένων ES κυττάρων

Το ένα αλλήλιο του Erf έχει απενεργοποιηθεί προηγούμενα σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (κλώνοι 130 και 169) μέσω αντικατάστασης τμήματος του γονιδίου με κασέτα ανθεκτικότητας σε νεομυκίνη. Οι κλώνοι αυτοί είναι ετερόζυγοι ως προς την απαλοιφή του γονιδίου του Erf, καθώς φέρουν ένα λειτουργικό αλλήλιο και ένα ανασυνδυασμένο, από το οποίο έχει ελεγχθεί ότι δεν προκύπτει μετάγραφο. Για την παραγωγή βλαστικών κυττάρων που θα έχουν απενεργοποιημένα και τα δυο αλλήλια του γονιδίου χρησιμοποιούνται οι κλώνοι 130 και 169 ES κυττάρων σε ένα δεύτερο γύρο απενεργοποίησης.

Ο φορέας στόχευσης είναι ο ίδιος με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε κατά τον πρώτο γύρο, με τη διαφορά ότι η κασέτα αντθεκτικότητας αντικαταστάθηκε με αυτή της υγρομυκίνης. Συγκεκριμένα, το NotI-NotI γενωμικό τμήμα του Erf, στο οποίο τα εξώνια II, III και τμήμα του IV έχουν αντικατασταθεί από την κασέτα υγρομυκίνης pMC-Hygro, είναι κλωνοποιημένο σε φορέα Bluescript KS. Ο φορέας, KSTK9L x59A/pMC-Hygro συνολικού μεγέθους 14.8kb, περιέχει 2 κασέτες κινάσης θυμιδίνης (HSV-TK) εκατέρωθεν του ανασυνδυασμένου γενωμικού τμήματος. Με μεταφορά της γραμμοποιημένης πλασμιδιακής κατασκευής στα κύτταρα στοχεύεται η επαγωγή ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ των θέσεων NotI των δυο ισογενών τμημάτων και αντικατάσταση του ενδογενούς τμήματος του γονιδίου από το ανασυνδυασμένο τμήμα (Εικόνα 4).



Εικόνα 4.. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του ενδογενούς τμήματος του γονιδίου του Erf του ποντικού, του φορέα στόχευσης και των δυο ανασυνδυασμένων αλληλίων όπως προκύπτουν μετά τον ομόλογο ανασυνδυασμό. Φαίνονται τα εξώνια II, III, IV (ορθογώνια) με τις ενδιάμεσες ιντρονικές περιοχές, οι θέσεις εκκινητών 5mErf και Bam3 (βέλη). Με τις διακεκομμένες γραμμές περικλείεται η περιοχή του ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ των NotI θέσεων. pMC-neo, η κασέτα ανθεκτικότητας σε νεομυκίνη; pMC-Hygro, η κασέτα ανθεκτικότητας σε υγρομυκίνη; LoxP, οι θέσεις ανασυνδυασμού Cre/LoxP; HSV-TK1,2 οι κασέτες αρνητικής επιλογής κινάσης της θυμιδίνης.

Για τη γραμμοποίηση του φορέα γίνεται πέψη ποσότητας του πλασμιδιακού DNA με το ένζυμο PmeI, για το οποίο υπάρχει μόνο μία θέση αναγνώρισης στον πολυσυνδέτη της κατασκευής. Το προϊόν καθαρίζεται και επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό TE. Κύτταρα των κλώνων 130 και 169 ξεπαγώνουν και καλλιεργούνται σε υπόστρωμα ινοβλαστών με θρεπτικό παρουσία LIF. $9x10^6$ κύτταρα από κάθε κλώνο επαναδιαλύονται σε 0.7ml διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς και στο εναιώρημα προστίθενται 27μg του γραμμοποιημένου DNA (53μl TE). Η ηλεκτρομεταφορά γίνεται με ένα παλμό τάσης 400V και χωρητικότητας 25μF. Παράλληλα στις ίδιες συνθήκες έγινε το πείραμα ελέγχου με αγρίου τύπου πατρικά ES PC3 κύτταρα (Πίνακας 1).

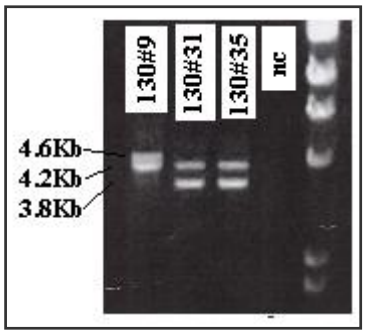
Πίνακας 1. Οι συνθήκες ηλεκτρομεταφοράς του πλασμιδιακού DNA στις τρεις κυτταρικές σειρές των ES κλώνων 130, 169 και των πατρικών PC3. Φαίνεται ο αριθμός του περάσματος των κυττάρων κατά τη στιγμή του πειράματος.

	Κλώνος	Συνολικός αριθμός κυττάρων ($x10^6$)	Βιωσιμότητα %	Σταθερά χρόνου (msec)
25μF, 400V	130 (P7)	9,04	46%	0,52
	169 (P6)	9,8	45%	0,6
	PC3 (P16)	9,17	44%	0,68

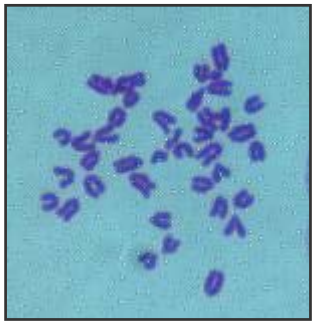
Τα κύτταρα μετά την ηλεκτρομεταφορά καλλιεργούνται σε ένα πιάτο 10cm επικαλυμμένο με ζελατίνη και καλλιεργούνται σε πλήρες ES θρεπτικό μέσο χωρίς ινοβλάστες, καθώς δεν είναι ανθεκτικοί στο μέσο επιλογής με αντιβιοτικά. Η επιλογή γίνεται 24 ώρες αργότερα προσθέτοντας στο θρεπτικό υγρομυκίνη (150μg/ml) και Gancyclovir (2μM). Η προσθήκη Gancyclovir έχει ως στόχο την αρνητική επιλογή των κλώνων που έχουν ενσωματώσει τυχαία το διαγονίδιο με τις κασέτες κινάσης της θυμιδίνης. Την έβδομη ημέρα της επιλογής έχει πεθάνει ο μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων στα πιάτα και έχουν σχηματιστεί αποικίες ανθεκτικών κυττάρων, οι οποίες απομονώνονται. Συνολικά απομονώθηκαν 35 αποικίες από κάθε κλώνο. Ανθεκτικές αποικίες εμφανίστηκαν στα ίδια ποσοστά και στα πατρικά PC3 κύτταρα, αλλά δεν έγινε απομόνωση και ανάλυση κλώνων. Τα κύτταρα από τη στόχευση του κλώνου 130 και 169 καλλιεργήθηκαν σε μεγαλύτερη κλίμακα, ενώ μια ποσότητά τους φυλάχτηκε στους -80°C.

Η απομόνωση γενωμικού DNA έγινε επιτυχώς από τους 59 κλώνους και ο γενότυπος αναλύθηκε με αντίδραση PCR με τους εκκινητές Bam3 και 5mErf. Από τους δυο εκκινητές, ο ένας είναι εσωτερικός του NotI τμήματος του διαγονιδίου και ο άλλος είναι εξωτερικός. Πολυμερισμός του αγρίου τύπου τμήματος, δίνει προϊόν PCR μεγέθους 3.8Kb, ενώ το αλλήλιο με την κασέτα νεομυκίνης (neo) 4.2Kb. Το ανασυνδυασμένο αλλήλιο που φέρει την κασέτα υγρομυκίνης (hygro) δίνει ένα προϊόν μεγέθους 4.6Kb. Από την ανάλυση 44 κλώνων προέκυψε ότι ένας κλώνος, ο 130#9 δεν εμφανίζει την αγρίου τύπου ζώνη, αλλά τα δύο ανασυνδυασμένα προϊόντα (Εικόνα 5). Αυτό καταδεικνύει ότι στον κλώνο 130#9 έχει στοχευτεί και το δεύτερο αλλήλιο του Erf. Για να

γίνουν περαιτέρω αναλύσεις, κύτταρα του κλώνου που είχαν ψυχθεί κατάλληλα, ξεπάγωσαν και καλλιεργήθηκαν σε μεγαλύτερη κλίμακα. Τα κύτταρα στην καλλιέργεια είχαν την τυπική μορφολογία ES αποικιών με σαφή όρια, χωρίς έντονα σημάδια διαφοροποίησης. Μία ποσότητα κυττάρων χρησιμοποιήθηκε για καρυοτυπική ανάλυση με χρώση των χρωμοσωμάτων με διάλυμα Giemsa (Εικόνα 6). Διαπιστώθηκε ότι το 80% των κυττάρων του κλώνου είχαν 40 χρωμοσώματα, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό ήταν ανευπλοειδίες με 39 ή 38 χρωμοσώματα. Μια ποσότητα κυττάρων χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση γενωμικού DNA και επανάληψη της αντίδρασης της πολυμεράσης για επιβεβαίωση του αποτελέσματος.



Εικόνα 5. Ανάλυση του γενοτύπου των ES κλώνων με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε 1,2% αγαρόζη/TBE. Ο κλώνος 130#9 εμφανίζει τις ζώνες 4.2Kb και 4.6Kb που αντιστοιχούν στα neo και hygro ανασυνδυασμένα αλλήλια. Οι κλώνοι 130#31 και 130#35 έχουν την αγρίου τύπου ζώνη 3.8Kb και το αλλήλιο με την κασέτα νεομυκίνης. nc, αρνητικό control της αντίδρασης PCR.



Εικόνα 6. Καρυότυπος κυττάρων του διπλά ανασυνδυασμένου κλώνου 130#9 μετά από χρώση των χρωμοσωμάτων με Giemsa.

3.2 Βελτιστοποίηση συνθηκών ηλεκτρομεταφοράς

Ένας από τους στόχους της εργασίας είναι να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος στοχευμένης απενεργοποίησης του γονιδίου σε βλαστικά κύτταρα. Για το σκοπό αυτό έγιναν πειραματικοί έλεγχοι τόσο στις συνθήκες τις ηλεκτρομεταφοράς, όσο και στις συνθήκες χειρισμού και καλλιέργειας των κυττάρων. Αρχικά ελέγχθηκε κατά πόσο ο τελικός όγκος και η σύσταση του διαλύματος επηρεάζει τις συνθήκες ηλεκτρομεταφοράς. Διαφορετικοί όγκοι σταθερής σύστασης του διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς EB μεταφέρθηκαν σε κυβέττες και υποβλήθηκαν σε ένα παλμό τάσης 400V και χωρητικότητας 25μF. Μετράται η βιωσιμότητα των κυττάρων και σημειώνεται η αναγραφόμενη από τη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς σταθερά χρόνου, που εκφράζει τη διάρκει του παρεχόμενου παλμού (Πίνακας 2). Τα κύτταρα δεν καλλιεργούνται περαιτέρω για επιλογή ανθεκτικών κλώνων.

Σε ένα επόμενο πείραμα ελέγχθηκε κατά πόσο η σύσταση του διαλύματος επηρεάζει τη σταθερά χρόνου. Συγκεκριμένα ελέγχθηκε αν η προσθήκη του διαλύματος TE [10mM Tris-HCl, pH 7.4; 0,1mM EDTA], μέσα στο οποίο είναι επαναδιαλυμένο το πλασμιδιακό DNA, επιδρά στην αγωγιμότητα του μέσου και επομένως στη σταθερά. Διαφορετικοί όγκοι TE διαλύματος αναμίχθηκαν με διάλυμα EB και υποβλήθηκαν σε ένα παλμό τάσης 400V και χωρητικότητας 25μF. Στο εναιώρημα δεν περιέχονται κύτταρα, οπότε καταγράφεται μόνο η διάρκεια του παλμού. Από το πείραμα φαίνεται ότι το TE διάλυμα επηρεάζει την ηλεκτρομεταφορά από ένα όριο και μετά (Πίνακας 3).

Πίνακας 2. Σχέση του τελικού όγκου του διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς και της διάρκειας του παλμού. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς.

400V, 25μF, 0.4cm κυψελίδα	
Όγκος διαλύματος (μl)	Σταθερά χρόνου (msec)
100	2.90
300	0.98
500	0.66
800	0.42

Πίνακας 3. Επίδραση της τελικής σύστασης του διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς στη σταθερά χρόνου.

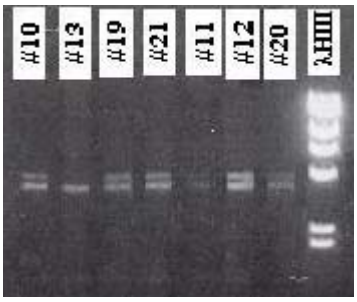
400V, 25μF, 0.4cm κυψελίδα, τελικός όγκος 800 μl	
Σύσταση διαλύματος	**Σταθερά χρόνου (msec)**
800 μl EB	**0.42**
50 μl TE + 750 μl EB	**0.42**
100 μl TE + 700 μl EB	**0.42**
200 μl TE + 600 μl EB	**0.58**
400 μl TE + 400 μl EB	**0.68**

Σε ένα επόμενο στάδιο, θέλαμε να ελέγξουμε τη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την ηλεκτρομεταφορά σε σχέση με τις συνθήκες τάσης και χωρητικότητας. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ηλεκτρομεταφοράς του πλασμιδιακού DNA KSTK9L σε κύτταρα του κλώνου 130, με γενότυπο $Erf^{+/neo}$, υπό διαφορετικές συνθήκες τάσης ρεύματος και χωρητικότητας. Συγκεκριμένα, κύτταρα περάσματος 6 (P6) επαναδιαλυμένα σε 700μl διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς και 27μg του φορέα στόχευσης σε 50μl TE μεταφέρονται σε κυψελίδα 0.4cm. Γίνονται διαφορετικές ηλεκτροδιατρήσεις ενός παλμού σε διαφορετικές συνθήκες τάσης και χωρητικότητας και μετράται η σταθερά χρόνου και η εκατοστιαία βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την ηλεκτρομεταφορά. Η βιωσιμότητα των κυττάρων σε συνθήκες καλλιέργειας και πριν το πείραμα κυμαινόταν σε επίπεδα 95-97%. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Μέτρηση της βιωσιμότητας και σταθεράς χρόνου μετά από ηλεκτρομεταφορά πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα υπό διαφορετικές συνθήκες.

	Τάση (volt)	Συνολικός αριθμός κυττάρων σε 0.75ml EB ($x10^6$)	Βιωσιμότητα %	Σταθερά χρόνου (msec)
25μF	300	10,29	89,14	0,5
	400	8,82	83,15	0,52
	500	10,29	80,11	0,5
50μF	300	10,2	87,7	0,98
	400	7,4	84,75	1

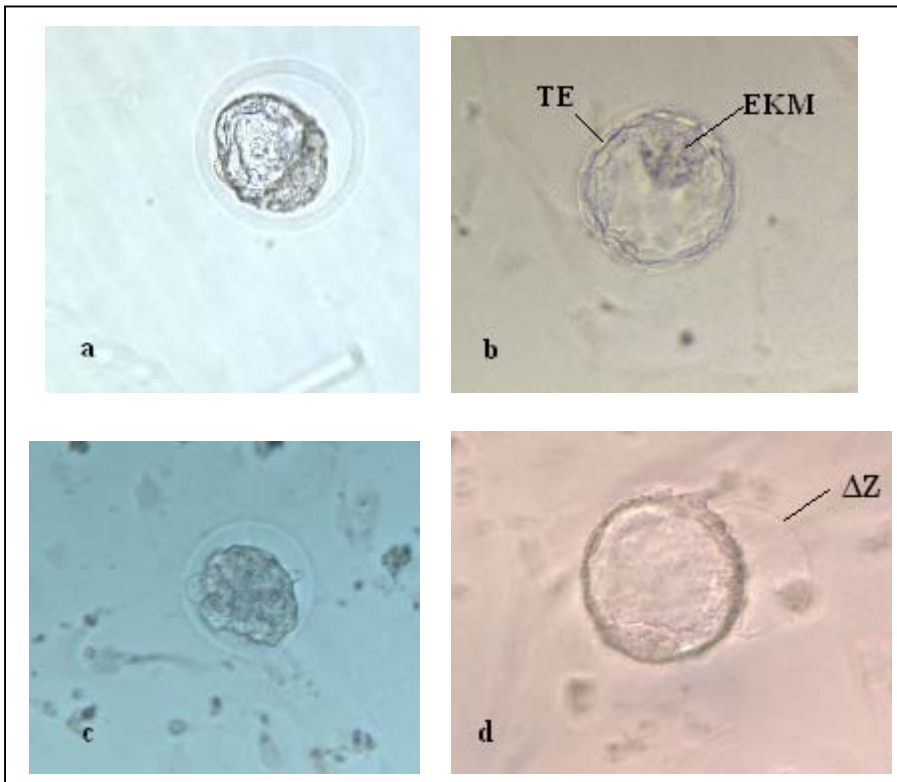
Τέλος, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα στόχευσης στο οποίο κατά τη διαδικασία της επιλογής χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες ανθεκτικοί σε υγρομυκίνη ως υπόστρωμα καλλιέργειας των στοχευμένων κυττάρων. Αυτό έγινε για να εξεταστεί αν η παρουσία των ινοβλαστών παρέχει ένα καλύτερο υπόστρωμα στις ανθεκτικές αποικίες. 10^7 ES κύτταρα του κλώνου 130 περάσματος 5 (P5) επαναδιαλύθηκαν σε 0.5ml διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς και αναμίχθηκαν με 30μg φορέα (45μl TE) μέσα σε κυψελίδα. Η ηλεκτροδότηση έγινε με ένα παλμό τάσης 400V και χωρητικότητας 25μF. Η σταθερά χρόνου ήταν 0.62msec, ενώ η βιωσιμότητα των κυττάρων 85%. Το ένα τέταρτο των ES κυττάρων απλώθηκε σε ένα πιάτο με υπόστρωμα DR3 ανθεκτικών ινοβλαστών και πλήρες θρεπτικό και καλλιεργήθηκε κατά τις κλασσικές συνθήκες. Η επιλογή έγινε με 150μg/ml Υγρομυκίνη B και 2μM Gancyclovir και την έβδομη ημέρα απομονώθηκαν 24 ανθεκτικοί κλώνοι. Η ανάλυση του γενοτύπου έδειξε ότι κανένας κλώνος δεν έφερε το μεταλλαγμένο hygro αλλήλιο (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Ανάλυση του γενοτύπου των ES κλώνων με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR.. Ο κλώνος #13 εμφανίζει μόνο την αγρίου τύπου ζώνη 3.8Kb, ενώ οι υπόλοιποι εμφανίζουν επιπλέον τη ζώνη 4.2Kb που αντιστοιχεί στο neo ανασυνδυασμένο αλλήλιο.

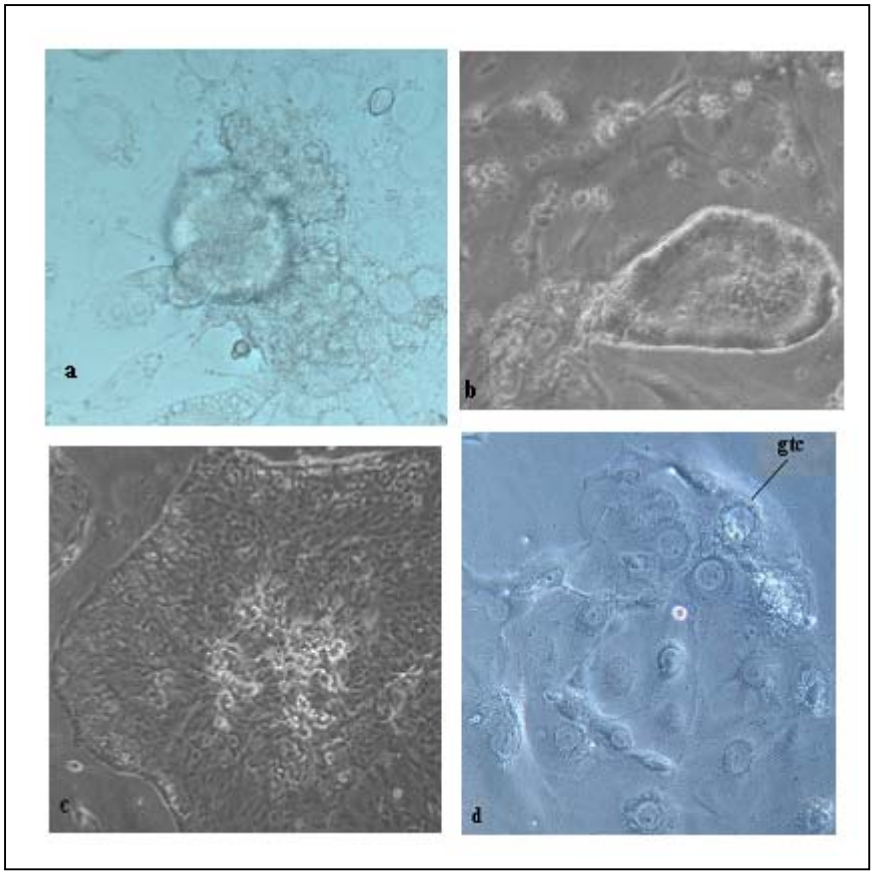
3.3 Καθιέρωση τροφοβλαστικών κυτταρικών σειρών

Ένας από τους στόχους της παρούσας εργασίας είναι η καθιέρωση σταθερών σειρών τροφοβλαστικών κυττάρων αγρίου τύπου, ομόζυγων ή ετερόζυγων για την έλλειψη του Erf. Γι αυτό το σκοπό, έγιναν διασταυρώσεις μεταξύ ετερόζυγων ποντικών ($Erf^{+/-}$) και απομονώθηκαν έμβρυα την ημέρα 3,5 της κύησης. Συνολικά, από τρία έγκυα θηλυκά απομονώθηκαν 34 έμβρυα και καλλιεργήθηκαν χωριστά το καθένα πάνω σε γ-ακτινοβολημένους ινοβλάστες σε θρεπτικό με ηπαρίνη και FGF4. Τα έμβρυα την ημέρα της απομόνωσης (ημέρα 1) είχαν τη μορφή βλαστοκύστεων, περιβαλλόμενες από το κάλυμμα της διαφανούς ζώνης (Εικόνα 8). Η πορεία ανάπτυξης των βλαστοκύστεων παρακολουθούνταν με μικροσκοπική παρατήρηση καθημερινά. Τρεις από τις βλαστοκύστες που απομονώθηκαν ήταν εκφυλισμένες, δηλαδή δεν παρουσίαζαν την τυπική μορφολογία. Αυτές δεν αναπτύχθηκαν σε επόμενο στάδιο ανάπτυξης και η καλλιέργειά τους διακόπηκε. Οι υπόλοιπες βλαστοκύστες προχώρησαν στο επόμενο στάδιο της εκκόλαψης (hatching), κατά το οποίο γίνεται απελευθέρωση της βλαστοκύστης μέσα από τη διαφανή ζώνη. Η εκκόλαψη έγινε 36-48 ώρες μετά την απομόνωση, οπότε οι βλαστοκύστες αποδεσμεύτηκαν και επικάθισαν στο πιάτο της καλλιέργειας. Σ' αυτή τη φάση, διακρίνεται η κοιλότητα του βλαστόκοιλου που δημιουργείται από τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος και η εσωτερική κυτταρική μάζα.



Εικόνα 8. Μορφολογία βλαστοκύστεων μετά την απομόνωσή τους από τη μήτρα.
a) Βλαστοκύστη αμέσως μετά την απομόνωση από τη μήτρα και b) αφότου έχει επικαθίσει στο πιάτο καλλιέργειας. c) Εκφυλισμένη βλαστοκύστη με καθυστερημένη ανάπτυξη και d) βλαστοκύστη που αποδεσμεύεται από τη διάφανη ζώνη κατά την εκκόλαψη. ΤΕ, Τροφοεκτόδερμα; ΕΚΜ, Εσωτερική κυτταρική μάζα; ΔΖ, Διάφανη ζώνη

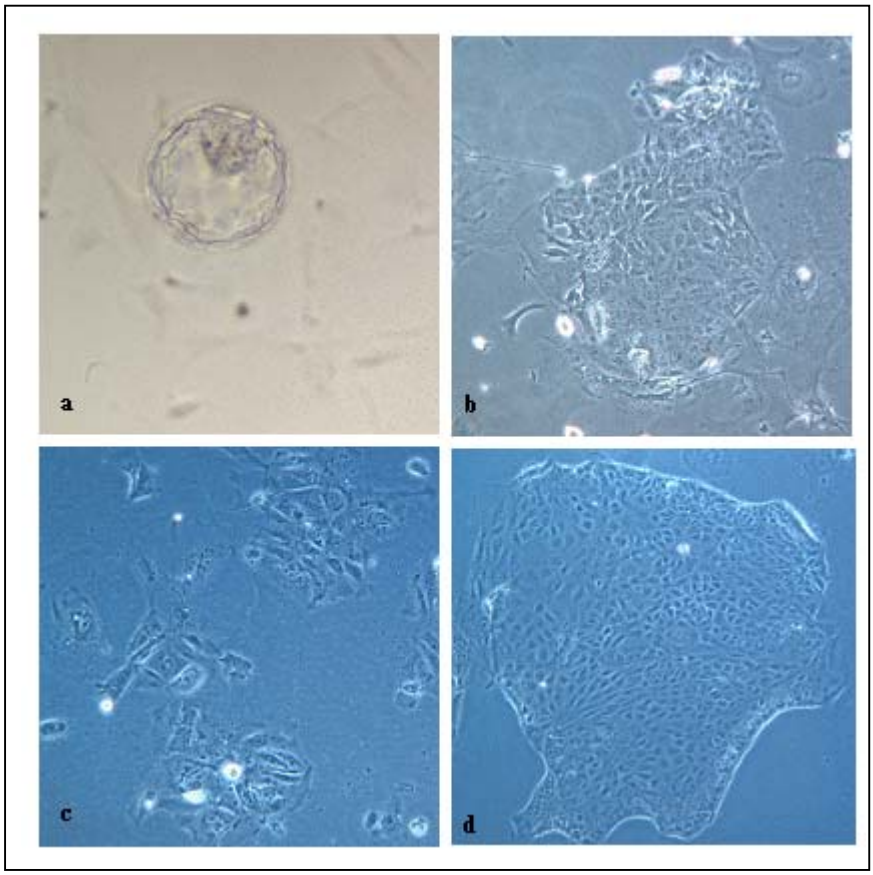
Αφότου οι βλαστοκύστες προσκολληθούν, κατά την ημέρα 4, σχηματίζεται ένα συσσωμάτωμα κυττάρων (outgrowth), στην κορυφή του οποίου διακρίνεται ο πυρήνας με τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας, ενώ τα τροφοβλαστικά κύτταρα προσκολλώνται και αναπτύσσονται στον πάτο (Εικόνα 9). Το συσσωμάτωμα αποσυγκροτήθηκε με τρυψίνη την ημέρα 5. Οι πρώτες αποικίες πρόδρομων τροφοβλαστικών κυττάρων με επιθηλιοειδή μορφή και διακριτά όρια άρχισαν να διακρίνονται τις μέρες 8-11. Πολλές από τις αποικίες κυττάρων διαφοροποιούνταν έντονα, κυρίως μετά από κάθε πέρασμα, προς γιγαντιαία τροφοβλαστικά και δεν παρατηρούνταν περαιτέρω πολλαπλασιασμός τους. Ενδεικτικό είναι ότι περίπου οι μισές καλλιέργειες εκφυλίστηκαν μέσα στις πρώτες 20 ημέρες καλλιέργειας, ενώ άλλες συνέχιζαν να αυξάνονται περαιτέρω.



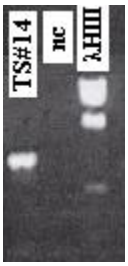
Εικόνα 9. Αποικίες τροφοβλαστικών κυττάρων.
a) Συσσωμάτωμα κυττάρων 4 ημέρες μετά την απομόνωση της βλαστοκύστης. Αποικία πρόδρομων τραφοβλαστικών κυττάρων b) 3 μέρες μετά την τρυψινοποίηση του συσσωματώματος και c) 7 μέρες μετά. d) Διαφοροποιημένα τροφοβλαστικά κύτταρα μετά από καλλιέργεια 1 μήνα (gtc, giant trophoblast cells).

Η καλλιέργεια των κυττάρων διήρκησε 2 μήνες, διάστημα στο οποίο τελικά επιβίωσε μια μόνο καλλιέργεια. Οι περισσότερες αποικίες που αναπτύσσονταν μετά από κάθε πέρασμα διαφοροποιούνταν και δεν ήταν δυνατή η επέκταση της καλλιέργειάς τους. Δεν στάθηκε δυνατό να απομονωθεί γενωμικό DNA από τα κύτταρα αυτά, λόγω του μικρού αριθμού κυττάρων και άρα δεν έγινε γνωστός ο γενότυπος τους. Κύτταρα προερχόμενα από την βλαστοκύστη #14 είχαν τη μορφή αποικιών που διατηρούνταν σε αδιαφοροποίητη μορφή καθόλη τη διάρκεια της καλλιέργειας (Εικόνα 10). Κάποια σημάδια διαφοροποίησης ήταν εμφανή κυρίως στις άκρες των αποικιών. Η ανάλυση του γενοτύπου των κυττάρων μετά από απομόνωση γενωμικού DNA

έδειξε ότι πρόκειται για αγρίου τύπου τροφοβλαστικά κύτταρα (Εικόνα 11). Τα κύτταρα ψύχθηκαν και φυλάχτηκαν σε κατάλληλες συνθήκες για μελλοντική τους χρήση.



Εικόνα 10. Καθιέρωση τροφοβλαστικών κυττάρων από τη βλαστοκύστη αγρίου τύπου. a) Η βλαστοκύστη τη μέρα 1 της απομόνωσης και αποικίες τροφοβλαστικών κυττάρων b) την ημέρα 44, c) την ημέρα 60 μετά από πέρασμα και d) την ημέρα 68.



Εικόνα 11. Ανάλυση του γενοτύπου των τροφοβλαστικών κυττάρων προερχόμενα από τη βλαστοκύστη #14 με PCR. Η ζώνη μεγέθους 1000bp αντιστοιχεί στο αγρίου τύπου αλλήλιο του Erf. (nc, negative control; λHIII, λ HindIII δείκτης μεγεθών).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 Η στόχευση του δεύτερου αλληλίου του Erf σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα

Το ένα αλλήλιο του γονιδίου του Erf έχει ήδη απενεργοποιηθεί σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Η απαλοιφή έγινε μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού των κριτικών εξωνίων II, III και τμήματος του IV του γονιδίου με κασέτα ανθεκτικότητας σε νεομυκίνη. Αναλύσεις ως προς τη δομή του ανασυνδυασμένου τμήματος και την παραγωγή μεταγράφου έχει δείξει ότι το ένα αλλήλιο στα βλαστικά κύτταρα των κλώνων 130 και 169 είναι απενεργοποιημένο. Για την απαλοιφή του δεύτερου αλληλίου στα κύτταρα αυτά έγινε ένας δεύτερος γύρος απενεργοποίησης βασιζόμενος στην ίδια στρατηγική. Η στόχευση έγινε με φορέα στον οποίο τμήμα του γονιδίου έχει αντικατασταθεί από κασέτα ανθεκτικότητας σε υγρομυκίνη. Μια από τις βασικές παραμέτρους που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των πειραμάτων στόχευσης είναι το μέγεθος του φορέα και το ποσοστό ομολογίας με το ενδογενές γενωμικό τμήμα προς στόχευση (Muller, 1999). Γι αυτό το σκοπό, η κατασκευή και το μέγεθος του φορέα δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά, παρά μόνο κατά 200 νουκλεοτιδικές βάσεις. Τα άκρα του φορέα, εκατέρωθεν της κασέτας pMC-Hygro, έχουν 3kb ομολογία στο 3'άκρο με το ενδογενές αλλήλιο και 3.3kb στο 5' άκρο, δηλαδή όπως και στην περίπτωση της πρώτης στόχευσης.

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός συμβαίνει περίπου 1000 φορές λιγότερο συχνά σε σχέση με τα γεγονότα τυχαίας ενσωμάτωσης. Για να γίνει εμπλουτισμός των κλώνων που προκύπτουν από ομόλογο ανασυνδυασμό χρησιμοποιείται το σύστημα της θετικής και αρνητικής επιλογής. Η θετική επιλογή γίνεται με προσθήκη στο θρεπτικό υγρομυκίνης, οπότε επιλέγονται θετικά οι κλώνοι που εκφράζουν το γονίδιο ανθεκτικότητας. Οι δύο κασέτες αρνητικής επιλογής HSV-TK έχουν εισαχθεί στα άκρα του γραμμοποιημένου φορέα, γεγονός που έχει δειχθεί ότι δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητα του ομόλογου ανασυνδυασμού. Κύτταρα στα οποία γίνεται ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ του ενδογενούς τμήματος με την κατασκευή, χάνουν τις κασέτες, ενώ κύτταρα στα οποία έγινε τυχαία ενσωμάτωση διατηρούν τα δύο γονίδια. Οι

τελευταίοι κλώνοι πεθαίνουν σε μέσο επιλογής με 2μM gancyclovir, καθώς μετατρέπουν το νουκλεοτιδικό ανάλογο σε τοξικό. Το gancyclovir όταν χρησιμοποιείται σε συγκεντρώσεις 0.01μM έως 10μM δεν είναι κυτοτοξικό για τα ES κύτταρα που δεν έχουν τις κασέτες (Mansour et al, 1988). Με τον τρόπο αυτό γίνεται εμπλουτισμός των κλώνων που έχουν ανασυνδυαστεί με ομόλογο ανασυνδυασμό έναντι των τυχαίων ενθέσεων κατά 5-10 φορές (Ledermann, 2000).

Κατά το πρώτο πείραμα που πραγματοποιήσαμε απομονώθηκαν 35 ανθεκτικές αποικίες από κάθε υποκλώνο (130 και 169) μετά από επταήμερη επιλογή. Από τους 44 κλώνους που αναλύθηκαν με PCR βρέθηκε ένας κλώνος με το επιθυμητό πρότυπο προϊόντων, δηλαδή να έχει χάσει την αγρίου τύπου ζώνη. Ανάλυση της δομής του στοχευμένου αλληλίου με τεχνικές Southern ανοσοαποτύπωσης και εκκινητές εκατέρωθεν του διαγονιδίου αναμένεται να δείξουν αν το αλλήλιο έχει μεταλλαχθεί μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Συνολικά, το ποσοστό επιτυχίας στο πείραμα από το οποίο προέκυψε ο ομόζυγα μεταλλαγμένος κλώνος αντιστοιχεί σε 2,3%. Παρόμοια πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί δείχνουν ότι η αποτελεσματικότητα της μεθόδου κυμαίνεται περίπου στο ποσοστό 5% (Mortensen et al., 1991). Γι αυτό προκειμένου να αυξηθεί η αποδοτικότητα της μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι ως προς τις συνθήκες ηλεκτρομεταφοράς.

4.2 Βελτιστοποίηση του πειράματος στόχευσης σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα

Η τεχνολογία της ηλεκτρομεταφοράς σε κύτταρα βασίζεται στη χρήση μικρών παλμών υψηλής τάσης προκειμένου να ξεπεραστεί ο φραγμός της κυτταρικής μεμβράνης (Gehl, 2003). Εφαρμόζοντας εξωτερικά ένα ηλεκτρικό πεδίο που μόλις ξεπερνά τη χωρητικότητα της κυτταρικής μεμβράνης, είναι δυνατή η παροδική και αναστρέψιμη αύξηση της διαπερατότητας. Ο σχηματισμός διαπερατών περιοχών στην μεμβράνη με την ηλεκτροδιάτρηση συμβαίνει σε ένα χρονικό διάστημα μικρότερο του δευτερολέπτου, ενώ η επαναφορά διαρκεί μερικά λεπτά. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η είσοδος

των επιθυμητών DNA μορίων στο εσωτερικό των κυττάρων. Η βελτιστοποίηση της τεχνικής συνίσταται στον καθορισμό των συνθηκών που συνδυάζουν τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ως προς τη μεταφορά του DNA και τη μικρότερη θνησιμότητα των κυττάρων.

Σε μια προσπάθεια μελέτης των παραμέτρων που επηρεάζουν την ηλεκτρομεταφορά, αρχικά ελέγχθηκε σε ποιο βαθμό ο τελικός όγκος και η σύσταση του διαλύματος επηρεάζουν τις συνθήκες του πειράματος. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο τελικός όγκος του διαλύματος επηρεάζει την διάρκεια του παλμού που εκφράζεται από τη σταθερά χρόνου. Η σταθερά χρόνου αποτελεί συνάρτηση της αντίστασης του μέσου και της χωρητικότητας, και εκφράζει το χρόνο που απαιτείται για να μειωθεί η τάση στο 37% (1/e) της αρχικής τιμής. Όπως έχουν δείξει προηγούμενα πειράματα η επιθυμητή τιμή της σταθεράς χρόνου κυμαίνεται μεταξύ 0.4-0.6 msec, τιμές που επιτυγχάνονται σε όγκο διαλύματος 600-700μl. Σε ένα επόμενο πείραμα ελέγχθηκε κατά πόσο η σύσταση του διαλύματος επηρεάζει τη σταθερά χρόνου. Η προσθήκη του διαλύματος TE μέσα στο οποίο είναι επαναδιαλυμένο το πλασμιδιακό DNA, επιδρά στην αγωγιμότητα του μέσου και επομένως στη σταθερά. Διαφορετικοί όγκοι TE διαλύματος αναμίχθηκαν με διάλυμα EB και υποβλήθηκαν σε ένα παλμό τάσης 400V και χωρητικότητας 25μF. Από το πείραμα προέκυψε ότι το TE διάλυμα επηρεάζει την ηλεκτρομεταφορά όταν ξεπεράσει το 25% του τελικού όγκου.

Σε ένα επόμενο στάδιο, θέλαμε να ελέγξουμε τη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την ηλεκτρομεταφορά σε σχέση με τις συνθήκες τάσης και χωρητικότητας. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ηλεκτρομεταφοράς του πλασμιδιακού DNA σε ES κύτταρα με γενότυπο $Erf^{+/neo}$, υπό διαφορετικές συνθήκες τάσης ρεύματος και χωρητικότητας. Η μέτρηση των κυττάρων μετά την ηλεκτροδότηση δείχνει ότι η βιωσιμότητα δεν μεταβάλλεται σημαντικά όταν η τάση κυμαίνεται μεταξύ 300-500V. Ωστόσο, ο διπλασιασμός της χωρητικότητας επηρεάζει σημαντικά τη σταθερά χρόνου και μάλιστα την αυξάνει σχεδόν κατά δυο φορές από το επιθυμητό. Επομένως, η χωρητικότητα των 25μF δίνει καλύτερα αποτελέσματα από τα 50μF.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα στόχευσης στο οποίο κατά τη διαδικασία της επιλογής χρησιμοποιήθηκαν DR3 ινοβλάστες ανθεκτικοί σε υγρομυκίνη ως υπόστρωμα καλλιέργειας των στοχευμένων κυττάρων. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιήθηκε στις ίδιες συνθήκες τάσης και χωρητικότητας. Η παρουσία των ινοβλαστών αφενός συνέβαλε θετικά στην ανάπτυξη των αποικιών σε ότι αφορά τη μορφολογία των αποικιών, αλλά δυσχεραίνει τη διαδικασία απομόνωσής τους από το πιάτο. Πάντως, από το πείραμα αυτό προέκυψαν περισσότεροι ανθεκτικοί σε υγρομυκίνη κλώνοι σε σχέση με τα προηγούμενα πειράματα. Συνολικά απομονώθηκαν 24 αποικίες από την επίστρωση του ¼ των κυττάρων που ηλεκτροπορώθηκαν. Αυτό σημαίνει ότι σε πραγματικές συνθήκες θα προέκυπταν αναλογικά 24x4=96 αποικίες, δηλαδή 2.2 φορές περισσότερες από το πρώτο πείραμα. Αυτό σημαίνει ότι η παρουσία του υποστρώματος των ινοβλαστών κατά την επιλογή των κυττάρων πιθανόν να ενισχύει την ανάπτυξη των κυττάρων και άρα τη δημιουργία αποικιών. Επομένως, κάτω από τις συνθήκες αυτές αναπτύσσονται περισσότερες αποικίες και αυξάνεται η πιθανότητα να βρεθούν ανάμεσα στους ανθεκτικούς κλώνους κάποιοι ομόλογα ανασυνδυασμένοι.

4.3 Καθιέρωση τροφοβλαστικής κυτταρικής σειράς

Στην προσπάθεια μας να καθιερώσουμε σταθερές σειρές τροφοβλαστικών κυττάρων, απομονώσαμε βλαστοκύστες 3.5 ημερών από έγκυα ποντίκια. Από τη διασταύρωση μεταξύ ετερόζυγων ως προς τη μετάλλαξη του Erf ποντικών προκύπτουν απόγονοι αγρίου τύπου, ετερόζυγοι και ομόζυγοι σε Μεντελική αναλογία 1:2:1. Επομένως από τις 34 βλαστοκύστες που απομονώθηκαν αναμένεται περίπου 8 από αυτές να είναι ομόζυγες, 8 αγρίου τύπου και οι υπόλοιπες ετερόζυγες. Η καλλιέργεια των κυττάρων ήταν μια χρονοβόρα και λεπτή διαδικασία, κατά την οποία τελικά καθιερώθηκε μόνο μία τροφοβλαστική σειρά αγρίου τύπου. Στα πρώτα στάδια καλλιέργειας των βλαστοκύστεων, δεν παρατηρήθηκαν μορφολογικές διαφορές μεταξύ τους. Αυτό ήταν κάτι

αναμενόμενο, καθώς στα διαγονιδιακά ζώα, η έλλειψη του Erf δεν φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη των εμβρύων κατά την προ-εμφυτευτική περίοδο και λίγο αργότερα. Ωστόσο, οι αποικίες των τροφοβλαστικών κυττάρων που αναπτύχθηκαν κατά τις πρώτες δέκα ημέρες μετά την τρυψινοποίηση του συσσωματώματος ήταν αρκετά ετερογενείς μεταξύ τους. Δηλαδή, υπήρχαν αποικίες με επιθηλιοειδή μορφή που αυξάνονταν πολύ και άλλες που διαφοροποιούνταν έντονα προς γιγαντιαία τροφοβλαστικά και σταματούσαν να αναπτύσσονται.

Από τα μέχρι τώρα δεδομένα, υπάρχει η γνώση ότι ο Erf εμπλέκεται στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στην διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων. Η μελέτη του γονιδίου σε άλλα κυτταρικά συστήματα δείχνει ότι ο Erf επάγει δέσμευση του κυτταρικού κύκλου όταν εντοπίζεται στον πυρήνα, ενώ μετά από φωσφορυλίωση από την Erk2 μετατοπίζεται στο κυτόπλασμα. Επίσης είναι γνωστό ότι η κινάση Erk2 συμμετέχει στην ανάπτυξη του εξω-εμβρυονικού εκτοδέρματος και εκφράζεται στα τροφοβλαστικά κύτταρα (Corson et al., 2003; Saba El Leil et al., 2003). Μάλιστα φαίνεται ότι η Erk2 είναι μια από τις κύριες κινάσες που μεταδίδουν το σήμα ενεργοποίησης του υποδοχέα Fgfr2 από τον αυξητικό παράγοντα FGF4 κατά την επαγωγή της τροφοβλαστικής σειράς. Αν δεχτούμε ότι ο Erf είναι στόχος της Erk2 σε αυτό το αναπτυξιακό μονοπάτι, τότε έλλειψη του γονιδίου από τα τροφοβλαστικά κύτταρα θα είχε ως πιθανή συνέπεια την αδυναμία δέσμευσης του κυτταρικού κύκλου και άρα τη μη διαφοροποίηση προς τους τροφοβλαστικούς τύπους. Το γεγονός ότι δεν απομονώθηκε DNA για την ανάλυση του γενοτύπου των κυττάρων δεν επιτρέπουν την εξαγωγή συμπερασμάτων. Επίσης, δεν είναι δυνατό να γνωρίζουμε κατά πόσο οι ετερόζυγες τροφοβλαστικές σειρές θα εμφάνιζαν κάποιο φαινότυπο. Παρολαυτά, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου παραγωγής τροφοβλαστικών κυττάρων από βλαστοκύστες αναφέρεται ότι είναι περίπου 64% (Tanaka et al., 1998). Αυτό σημαίνει ότι θα έπρεπε να είχαν επιβιώσει και καθιερωθεί περισσότερες από μία τροφοβλαστικές σειρές. Για το λόγο αυτό χρειάζεται να γίνει βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας, ως προς την επιλογή των κατάλληλων χρησιμοποιούμενων υλικών (ορός, ηπαρίνη), την ποιότητα του

εμπλουτισμένου από ινοβλάστες θρεπτικού αλλά και το γενικό πρωτόκολλο χειρισμού των κυττάρων.

4.4 Μελλοντικές προοπτικές

Η δημιουργία εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων με ομόζυγη έλλειψη του Erf έχει επιτευχθεί. Τα κύτταρα αυτά χρειάζεται να ελεγχθούν περαιτέρω με τεχνικές Southern ανοσοαποτύπωσης για την απενεργοποίηση του γονιδίου μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Εφόσον αυτό επιβεβαιωθεί, τα κύτταρα είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου του Erf. Αρχικά πρέπει να ελεγχθεί κατά πόσο επηρεάζεται η ανάπτυξή τους και η διατήρηση του αδιαφοροποίητου χαρακτήρα τους από την έλλειψη του Erf. Αυτό θα γίνει με τη συγκριτική φαινοτυπική ανάλυση των ES κλώνων αγρίου τύπου με τους ετερόζυγους και ομόζυγους. Περαιτέρω, είναι απαραίτητη η in vitro διαφοροποίηση των κλώνων κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες προς διάφορους ώριμους κυτταρικούς τύπους. Η πορεία της διαφοροποίησης καθορίζεται από τις συνθήκες της καλλιέργειας και γίνεται μέσω της δημιουργίας σφαιρικών μορφωμάτων κυττάρων που αποκαλούνται «εμβρυϊκά σώματα» (embryoid bodies) και περιέχουν τους 3 βασικούς τύπους κυττάρων (Burdon et al., 2002). Αποδόμηση των «εμβρυϊκών σωμάτων» και καλλιέργεια στα κατάλληλα μέσα επιτρέπει την παραγωγή σε καλλιέργεια των περισσότερων ώριμων κυτταρικών τύπων ενδοδερμικής, μεσοδερμικής και εξωδερμικής προέλευσης.

Ο φαινότυπος της απενεργοποίησης του Erf στο ποντίκι δείχνει ότι το γονίδιο εμπλέκεται στα φαινόμενα ανάπτυξης και διαφοροποίησης των κυττάρων της τροφοβλαστικής σειράς. Επομένως, επιβάλλεται να γίνει περαιτέρω διερεύνηση στο αναπτυξιακό δυναμικό αυτών των κυττάρων. Γι αυτό το σκοπό, χρειάζεται να γίνει απομόνωση και καθιέρωση τροφοβλαστικών κυττάρων ετερόζυγων και ομόζυγων για την έλλειψη του Erf. Στις σειρές αυτές προτείνεται να διεξαχθούν συγκριτικές αναλύσεις της μορφολογίας των κυττάρων αλλά και της έκφρασης γονιδίων-δεικτών. Τα γονίδια των

μεταγραφικών παραγόντων Cdx2, Eomes και του πυρηνικού υποδοχέα ορμονών Err2 αποτελούν δείκτες της πρόδρομης τροφοβλαστικής σειράς, καθώς απαιτούνται για την ανάπτυξη και διατήρηση των κυττάρων (Russ et al., 2000; Rossant and Cross, 2001). Απομάκρυνση του FGF4 από το θρεπτικό της καλλιέργειας θα επιτρέψει την αυθόρμητη διαφοροποίηση των κυττάρων προς τους διάφορους υποπληθυσμούς. Τα διαφοροποιημένα τροφοβλαστικά κύτταρα έχουν χαρακτηριστική μορφολογία και εκφράζουν γονίδια δείκτες, επιτρέποντας έτσι τη μελέτη της διαφοροποιητικής πορείας (Knofler et al., 2001). Ενδεικτικά, ο μεταγραφικός παράγοντας Mash2 απαιτείται για τη διαφοροποίηση των σπογγιοτροφοβλαστών, ο Hand1 για τα γιαγαντιαία τροφοβλαστικά και ο Gcm1 για τους συγκυτιοτροφοβλάστες (Hughes et al., 2004). Η στρατηγική αυτή θα επιτρέψει τη μελέτη της διαφοροποίησης των τροφοβλαστικών κυττάρων και τη διερεύνηση του ρόλου του Erf σε αυτή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✓ Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, Heath JK and Lonai P., 1998. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **95**: 5082-7
- ✓ Ayadi A, Zheng H, Sobieszczuk P, Buchwalter G, Moerman P, Alitalo K and Wasylyk B, 2001. Net-targeted mutant mice develop a vascular phenotype and up-regulate egr-1. *The EMBO Journal* **20**(18): 5139-5152
- ✓ Bartel F, Higuchi T and Spyropoulos D, 2000. Mouse models in the study of the Ets family of transcription factors. *Oncogene* **19**: 6443-6454
- ✓ Bories JC, Willeford DM, Grevin D, Davidson L, Camus A, Martin P, Stehelin D and Alt FW., 1995. Increased T cell apoptosis and terminal B cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature* **377**: 635-8
- ✓ Burdon T, Smith A and Savatier P, 2002. Signaling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol* **12**: 432-8
- ✓ Corson LB, Yamanaka Y, Venus Lai K and Rossant J., 2003. Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development* **130**: 4527-4537
- ✓ Evans MJ and Kaufman MH., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154-6
- ✓ Gehl J., 2003. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* **177**: 437-447
- ✓ Hemberger M, Hughes M and Cross JC., 2004. Trophoblast stem cells differentiate in vitro into invasive trophoblast giant cells. *Developmental Biology* **271**: 362-71
- ✓ Hsu T, Trojanowska M and Watson DK, 2004. Ets Proteins in biological control and cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* **91**: 896-903
- ✓ Hughes M, Dobric N, Scott IC, Su L, Starovic M, St-Pierre B, Egan SE, Kingdom J and Cross JC., 2004. The Hand1, Stra13 and Gcm1 transcription

factors override FGF signaling to promote terminal differentiation of trophoblast stem cells. *Developmental Biology* **271**(1):26-37

✓ Knofler M, Vasicek R and Schreiber M., 2001. Key Regulatory transcription factors involved in placental trophoblast development-a review. Placenta, Supplement A, Trophoblast Research **22**: S83-92

✓ Kunath T., Stumpf D and Rossant J., 2004. Early Trophoblast determination and Stem Cell maintenance in the mouse. *Placenta*, Supplement A, Trophoblast Research **18**: S32-38

✓ Lefebvre L, Dionne N, Karaskova J, Squire JA and Nagy A., Selection for transgene homozygosity in embryonic stem cells results in extensive loss of heterozygosity. *Nature Genetics* **27**: 257-8

✓ Le Gallic L, Sgouras D, Beal G and Mavrothalassitis G, 1999. Transcriptional repressor ERF is a Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase Target that regulates cellular proliferation. *Molecular and Cellular Biology* **19**(6): 4121-4133

✓ Le Gallic L, Virgilio L, Cohen P, Biteau B and Mavrothalassitis G, 2004. ERF nuclear shuttling, a continuous monitor of Erk activity that links it to cell cycle progression. *Molecular and Cellular Biology* **24**(3): 1206-1218

✓ Liu D, Pavlopoulos E, Modi W, Moschonas N and Mavrothalassitis G, 1997. ERF: Genomic organization, chromosomal localization and promoter analysis of the human and mouse genes. *Oncogene* **14**: 1445-1451

✓ Loebel D, Watson CM, De Young A and Tam P., 2003. Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. *Developmental Biology* **264**: 1-14

✓ Mansour SL, Thomas KR and Capecchi MR., 1998. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* **336**: 348-352

✓ Maroulakou IG and Bowe DB, 2000. Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene* **19**: 6432-6442

✓ Mavrothalassitis G and Ghysdael J, 2000. Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. *Oncogene* **19**: 6524-6532

✓ Mortensen RM, Zubiaur M, Neer EJ and Seidman JG., 1991. Embryonic stem cells lacking a functional inhibitory G-protein subunit (a_{i2}) produced by gene targeting of both alleles. *Procceedings of National Academy of Sciences* **88**: 7036-7040

✓ Mortensen RM, Conner D, Chao S, Geisterfer-Lowrance A and Seidman JG., 1992. Production of homozygous mutant ES cells with a single targeting construct. *Molecular and Cellular Biology* **12**(5): 2391-2395

✓ Muller U., 1999. Ten years of gene targeting: Targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mechanisms of Development* **82**: 3-21

✓ Oikawa T and Yamada T., 2003. Molecular Biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* **303**: 11-34

✓ Rinkenberger J. and Werb Z., 2000. The labyrinthine placenta. *Nature Genetics* **25**: 248-250

✓ Rossant J., 2001. Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem Cells* **16**: 477-82

✓ Rossant J, and Cross JC., 2000. Placental Development: Lessons from mouse mutants. *Nature Reviews Genetics* **2**: 538-48

✓ Russ AP, Wattler S, Colledge WH, Aparicio S, Carlton M, Pearce JJ, Barton S, Surani M, Ryan K, Nehis M, Wilson V and Evans MJ., 2000. Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesodermin formation. *Nature* **404**: 95- 99

✓ Saba El Leil M, Vella F, Vernay B, Voisin L, Chen L, Labrecque N, Ang SL and Meloche S., An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *Embo Reports* **4**(10):964-8

✓ Sambrook J., Fritsch EF and Maniatis T., 1989. In: Molecular Cloning, A laboratory manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

✓ Sementchenko VI and Watson DK, 2000. Ets target genes: Past, present and future. *Oncogene* **19**: 6533-6548

✓ Sgouras D, Athanasiou M, Beal G, Fisher R, Blair D and Mavrothalasitis G, 1995. ERF: an ETS domain protein with strong transcriptional repressor activity, can suppress ets-associated tumorigenesis and is regulated by phosphorylation during cell-cycle and mitogenic stimulation. *The EMBO Journal* **14**(19): 4781-4793

✓ Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A and Rossant J., 1998. Promotion of Trophoblast Stem Cell proliferation by FGF-4. *Science* **282**: 2072-5

✓ Thomas KR and Capecchi M., 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**: 503-12

✓ Trojanowska M, 2000. Ets factors and regulation of the extracellular matrix. *Oncogene* **19**: 6464-6471

✓ Truong A and Ben-David Y, 2000. The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene* **19**: 6482-6489

✓ Tucker KL, Wang Y, Dausman J and Jaenisch R., 1997. A transgenic mouse strain expressing four drug-selectable marker genes. *Nucleic Acids Research* **25**(18): 3745-6

✓ Wang LC, Kuo F, Fujiwara Y, Gilliland DG, Golup TR and Orkin SH, 1997. Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *The EMBO Journal* **16**(14): 4374-4383

✓ Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, Davidson L, Visvader J, Kuo F, Alt FW, Gilliland DG, Golup TR and Orkin SH, 1998. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes and Development* **12**: 2392-2402

✓ Wolvetang EJ, Bradfield OM, Hatzistavrou T, Crack PJ, Busciglio J, Kola I and Hertzog PJ, 2003a. Overexpression of the chromosome 21 transcription factor Ets2 induces neuronal apoptosis. *Neurobiology of Disease* **14**: 349-356

✓ Wolvetang EJ, Wilson TJ, Sanij E, Busciglio J, Hatzistavrou T, Seth A, Hertzog PJ and Kola I, 2003b. ETS2 overexpression in transgenic models and in Down syndrome predisposes to apoptosis via the p53 pathway. *Human Molecular Genetics* **12**(3): 247-255

✓ Yamamoto H, Flannery ML, Kupriyanov S, Pearce J, McKercher SR, Henkel GW, Maki RA, Werb Z and Oshima RG, 1998. Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. *Genes and Development* **12**: 1315-1326

✓ Yenofsky RL, Fine M and Pellow JW., 1990. A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure. *Procceedings of National Academy of Sciences* **87**: 3435-3439

✓ Yordy JS and Muise- Helmericks RC, 2000. Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene* **19**: 6503-6513