

*Διατριβή μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης
στη Μοριακή Βιολογία και Γενετική*

*«Υψηλής ευκρίνειας φυσική χαρτογράφηση της
πλούσιας σε γονίδια χρωμοσωμικής περιοχής
10q24 – q25.1 του ανθρώπου»*

Σαραφίδου Θεολογία

Υπεύθυνος καθηγητής: Ν.Κ. Μοσχονάς

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Οκτώβριος 1998

Στους καλύτερους γονείς

Με την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, θέλω να ευχαριστήσω ορισμένα άτομα που ήταν δίπλα μου όλον αυτόν τον καιρό και που με βοήθησαν σε αρκετές πειραματικές διαδικασίες. Την Μαρία Κοκκινάκη, με τη συνεργασία της οποίας έγινε ο προσδιορισμός των μεγεθών των κλώνων ΥΑC. Αυτό είναι το λιγότερο- το πιο σημαντικό είναι ότι βρήκα μία πολύ συζητήσιμη και έξυπνη συνεργάτισσα και μία πολύ καλή φίλη. Την Αγγέλα Πασπαράκη για την συνεργασία της στη διερεύνηση της βιβλιοθήκης ΒΑC, την φιλία της και για την ασφάλεια που μας παρέχει όσον αφορά την οργάνωση του εργαστηρίου. Τον Αλέξανδρο Αργυροκαστρίτη για την καλή διάθεσή του να μας βοηθά στις δυσκολίες μας με την πείρα που διαθέτει. Τον καθηγητή Γιώργο Χαλεπάκη για τον ενδιαφέρον του στη διόρθωση αυτής της εργασίας και τις συμβουλές του. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον καθηγητή μου Νίκο Μοσχονά για την εντυπωσιακή υπομονή και επιμονή του, και την προσπάθειά του να μου μάθει να σκέφτομαι να γράφω και να παρουσιάζω επιστημονικά.

Περιεχόμενα

Περίληψη	1-2
Εισαγωγή	3-25
• Γενετική χαρτογράφηση	3
• Φυσική χαρτογράφηση	3-9
• Μέθοδοι ταυτοποίησης γονιδίων	9-11
• Κατανομή γονιδίων στα χρωμοσώματα	11
• Το χρωμόσωμα 10 του ανθρώπου	12-22
• Σκοπός της εργασίας	22-25
Υλικά και μέθοδοι	26-55
• Παρασκευή DNA από κύτταρα σακχαρομύκητα μετασχηματισμένα με YACs και εγκλεισμός σε αγαρόζη (Agarose blocks)	26-28
• Ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (PFGE)	28-30
• Ανάλυση κατά Southern	30-33
• Ραδιοσήμανση νουκλεϊκών οξέων με την μέθοδο των τυχαίων εκκινητών (random priming)	34-36
• Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	36-40
• Παγίδευση εξονίων (exon trapping)	40-46
• Διερεύνηση cDNA βιβλιοθήκης φάγων	47-49
• Μεταγραφική χαρτογράφηση	50-55
Αποτελέσματα	56-75
• Φυσική χαρτογράφηση κλώνων YAC και PAC του χρωμοσώματος 10, με έμφαση στην περιοχή 10q24/q25.1	56-70
• Προσπάθειες ανίχνευσης γονιδίων από τη χρωμοσωμική περιοχή 10q24/q25.1	71
• Φυσική χαρτογράφηση κλώνων BAC στην ευρύτερη χρωμοσωμική περιοχή 10q24 - q25.1	72-75

Συζήτηση	76-85
• Γενικά	76
• Χαρακτηρισμός κλώνων YAC	77
• Η χρήση και η αξιοποίηση των κλώνων PAC και BAC	77-78
• Προσπάθεια ανίχνευσης γονιδίων στη χρωμοσωμική περιοχή 10q24/q25.1	79-80
• Φυσική χαρτογράφηση στην περιοχή 10q24 - q25.1 με βάση τον μεταγραφικό χάρτη	80-82
• Σχέδια για το άμεσο μέλλον – προοπτικές	82-85
Βιβλιογραφία	86-92

Περίληψη

Η εργασία αυτή εντάσσεται στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος του εργαστηρίου μας για τη γονιδιωματική χαρτογράφηση του χρωμοσώματος 10 του ανθρώπου. Στηρίχθηκε στον προκαταρκτικό συνδυαστικό χάρτη του χρωμοσώματος 10, όπου ενσωματώνονται τρέχοντα δεδομένα γενετικής, φυσικής και μεταγραφικής χαρτογράφησης. Σκοπός της είναι η συμβολή στην κατασκευή ενός λεπτομερούς φυσικού χάρτη στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23-q25.1, η προσπάθεια προσδιορισμού και απομόνωσης κωδικών αλληλουχιών, καθώς και η συσχέτιση, όσο το δυνατό περισσότερων, προϋπαρχόντων ESTs με γενωμικούς κλώνους αυτής της χρωμοσωμικής περιοχής. Η περιοχή αυτή έχει μεγάλο ενδιαφέρον, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς της σε γονίδια και του συσχετισμού της με την εμφάνιση αρκετών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων μορφών καρκίνου, αναπτυξιακών ανωμαλιών και νευροεκφυλιστικών συνδρόμων. Για την κατασκευή του χάρτη, απομονώθηκαν γενωμικοί κλώνοι YAC, PAC και BAC (περίπου 500 συνολικά), χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές, γενετικούς δείκτες ή ESTs. Έχουν ήδη κατασκευαστεί επιμέρους contigs από τους παραπάνω γενωμικούς κλώνους, ενώ, τελικός στόχος είναι η κατασκευή ενός ευρύτερου, καλά χαρακτηρισμένου ενιαίου contig, μήκους περίπου 20Mb, από κλώνους BAC, κυρίως. Το contig αυτό θα αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής και θα συνεισφέρει σημαντικά στην μελέτη της οργάνωσης και της ανάλυσης των γονιδίων που εντοπίζονται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23-q25.1.

Abstract

This work is part of our project concerning human chromosome 10 genomic mapping. It has been based on a preliminary integrated genetic, cytogenetic and physical map constructed in our lab for this chromosome. The aim was to contribute to the construction of a detailed physical and expression map of 10q23-q25.1 chromosomal region. This region is under intensive investigation by many groups, because of its high gene-content and its correlation with diseases, including cancer, developmental abnormalities and neurological syndromes. For this purpose, a collection of approximately 500 YAC, PAC and BAC clones were isolated, based on their content in ESTs and genetic markers. Several groups of the above mentioned clones have been organised in high resolution contigs by a variety of approaches, including detailed fingerprinting by restriction enzymes. High resolution fingerprinting contigs were constructed for some of the genomic clones, based mainly on BACs. Our ultimate aim is to build a sufficient composite (physical and transcriptional) map in a region of about 20Mb, representing most of the 10q23-q25 region. This will be the basis for the construction of a sequence-ready tilling path to be used for the determination of gene organization therein. Furthermore, it will contribute to the analysis of interesting genes of the region and elucidation of their possible role in human diseases.

Εισαγωγή

*«Ποιος γονιός δεν πήρε το παιδί του, στα χέρια
και δεν προσπάθησε να αναγνωρίσει στο
πρόσωπό του τα δικά του χαρακτηριστικά;»*

(Standfield)

Ανέκαθεν, η εμπειρία δίδασκε ότι πολλά από τα γνωρίσματα των ζώντων όντων - καλά και κακά – είναι κληρονομιά των προγόνων. Από τότε, κύλησε πολύ νερό στ' αυλάκι... Πολλά μυστικά του τρόπου κληρονόμησης είναι πλέον γνωστά. Ως φορέας της κληρονομικότητας, αναγνωρίστηκε το μόριο DNA και το 1953, προσδιορίστηκε η δομή του. Η μονάδα της διαβιβαζόμενης πληροφορίας καλείται «γονίδιο». Η τελική οντογένεση είναι η ενορχηστρωμένη έκφραση όλων των γονιδίων του οργανισμού. Σκοπός πλέον της μοριακής βιολογίας είναι η ταυτοποίηση γενετικών μονάδων - τόπων, η εξακρίβωση της λειτουργίας τους και ει δυνατόν, η κατανόηση της φυσιολογικής της ρύθμισης.

Μεγάλο κεφάλαιο έρευνας της μοριακής βιολογίας και γενετικής του ανθρώπου, αποτελεί η μελέτη κληρονομήσιμων ασθενειών. Η πορεία συσχετισμού ασθένειας - γονιδίου/ων, περιλαμβάνει πολλά βήματα. Προϋποθέτει, αρχικά, έναν αδρό συσχετισμό, αυτόν της ασθένειας - χρωμοσώματος ή υποπεριοχής αυτού. Πλήθος γενετικών ασθενειών, έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένα χρωμοσώματα. Η ικανότητα γονιδιακής χαρτογράφησης είναι επίτευγμα της τελευταίας εικοσαετίας, με δραματική όμως αύξηση στα χρόνια του '90. Προφανώς, ο προσδιορισμός του γονιδιακού τόπου, που σχετίζεται με εκδήλωση κάποιας ασθένειας, είναι σημαντικός για την κατανόηση της παθογένεσης της νόσου, της πρόβλεψης προδιάθεσης, της έγκαιρης διάγνωσης και της θεραπείας της.

Στη συνέχεια παραθέτουμε εν συντομεία τους όρους και τις προσεγγίσεις που σήμερα χρησιμοποιούνται για τη γονιδιακή χαρτογράφηση στον άνθρωπο, η οποία αποτελεί την πρώτη φάση της δομικής γονιδιωματικής ανάλυσης (structural genomics).

Γενετική χαρτογράφηση

Η γενετική χαρτογράφηση στηρίζεται στον πολυμορφισμό που υπάρχει στο ανθρώπινο είδος. Γενετικοί τόποι (γονίδια, τεμάχια γονιδίων ή μοναδιαίες αλληλουχίες) που εμφανίζονται να έχουν διαφορετικά αλληλόμορφα στον πληθυσμό, χρησιμεύουν ως γενετικοί δείκτες, των οποίων η παρακολούθηση της κάθετης μεταβίβασής τους (Μενδελική κληρονόμηση) είναι δυνατή, επειδή είναι δυνατή η αναπαραγωγή της αλληλουχίας τους, π.χ. με PCR, και η διάκριση μεταξύ των διαφορετικού μεγέθους αλληλομόρφων τους. Η απόσταση μεταξύ τους και η αμφιμονοσήμαντη διάταξή τους πάνω στο γενετικό χάρτη, καθορίζεται από το παρατηρούμενο ποσοστό ανασυνδυασμού τους, που καταγράφεται από μία πληθώρα γονοτυπικών δεδομένων σε μεγάλες πληροφοριακές οικογένειες τριών γενεών. Ο τελευταίος γενετικός χάρτης για όλο το ανθρώπινο γονιδίωμα, δημοσιεύτηκε το 1996 (Dib *et al*, 1996). Περιέχει 5264 μικροδορυφορικούς δείκτες από τους οποίους, λιγότεροι από τους μισούς είναι τοποθετημένοι με lod score>3. Η γονοτυπική ανάλυση στηρίχτηκε σε δεδομένα 8 μεγάλων οικογενειών CEPH, ενώ η μέση γενετική απόσταση του χάρτη είναι 1,8 cM.

Για τα περισσότερα χρωμοσώματα έχουν κατασκευαστεί επιπρόσθετοι γενετικοί χάρτες μεγάλης διακριτικής ικανότητας.

Εφόσον, με γενετική ανάλυση σύνδεσης και με μελέτες απώλειας ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity) έχει καθορισθεί και περιοριστεί στο ελάχιστο η κρίσιμη περιοχή για κάποια ασθένεια και εφόσον υπάρχει διαθέσιμος ένας γενετικός χάρτης μεγάλης διακριτικής ικανότητας για αυτήν την περιοχή, είναι εφικτό το επόμενο βήμα: η φυσική χαρτογράφηση.

Φυσική χαρτογράφηση

Με τον όρο αυτόν, εννοούμε την κάλυψη της περιοχής που μας ενδιαφέρει με μία σειρά αλληλοεπικαλυπτόμενων γενωμικών κλώνων (contig). Η κατασκευή ενός

contig ξεκινάει με την απομόνωση γενωμικών κλώνων, χρησιμοποιώντας ως μόρια-ανιχνευτές, γενετικούς δείκτες από την υπό εξέταση περιοχή. Τυχόν κενά στην αλληλοεπικάλυψη των γενωμικών κλώνων είναι δυνατόν να καλυφθούν με τη διαδικασία του “χρωμοσωμικού περπατήματος” (chromosome walking). Κατ’αυτήν χρησιμοποιούνται αλληλουχίες από τα άκρα των, ήδη τοποθετημένων στο contig, γενωμικών κλώνων, για τη διερεύνηση κάποιας βιβλιοθήκης, ώστε να απομονωθούν νέοι γειτονικοί κλώνοι, που θα καλύψουν τα κενά. Ο προσδιορισμός της αλληλοεπικάλυψης των γενωμικών κλώνων μπορεί να γίνει μετά από τεμαχισμό αυτών με διάφορα περιοριστικά ένζυμα (fingerprinting) ή με σύγκριση των προτύπων που παράγονται από PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές Alu. Οι αλληλουχίες Alu, ανήκουν στις διασκορπισμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του γονιδιώματος (SINES), οι οποίες ονομάζονται έτσι, από την περιοριστική θέση Alu I που φέρουν και δεν συναντιώνται στους κατώτερους οργανισμούς (ζύμη, βακτήρια) (Nelson DL *et al*, 1989). Οι αλληλουχίες αυτές μπορούν να διαφέρουν μεταξύ τους, σε ποσοστό μέχρι και 15%. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 10^6 τέτοια αντίγραφα στο ανθρώπινο γένωμα. Από τη σύγκριση τέτοιων αλληλουχιών μπορεί να προκύψει ένα consensus και βάσει αυτού, έχουν σχεδιαστεί αντίστοιχοι εκκινητές. Εφόσον αναφερόμαστε στο ανθρώπινο γονιδίωμα, του οποίου το μέγεθος είναι της τάξεως του 3×10^9 bp, είναι προφανές ότι στη διαδικασία της φυσικής χαρτογράφησης, απαιτούνται κλώνοι με μεγάλα μεγέθη ενθεμάτων ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πολυπλοκότητα. Τέτοιοι κλώνοι είναι τα τεχνητά χρωμοσώματα του σακχαρομύκητα, YACs (Schlessinger D, 1990) και οι βακτηριακοί φορείς PACs (Ioannou PA *et al*, 1994) και BACs (Shizuya H *et al*, 1992). Τα μεγέθη των ενθεμάτων των κλώνων YAC φθάνουν το 1Mb, αλλά έχουν το μειονέκτημα της αστάθειας και του μεγάλου ποσοστού χημαιρισμού. Εναλλακτικά, με τη χρήση κλώνων PACs και BACs, των οποίων ο χειρισμός είναι πολύ ευκολότερος, ξεπερνιούνται τα προηγούμενα μειονεκτήματα, όμως το μέγιστο μέγεθος ενθέματός τους είναι 170Kb.

Φυσικοί χάρτες του ανθρώπινου γονιδιώματος

Έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για τη φυσική χαρτογράφηση μεγάλων χρωμοσωμικών περιοχών καθ’όλο το μήκος του ανθρώπινου γονιδιώματος. Χαρακτηριστικά αναφέρονται:

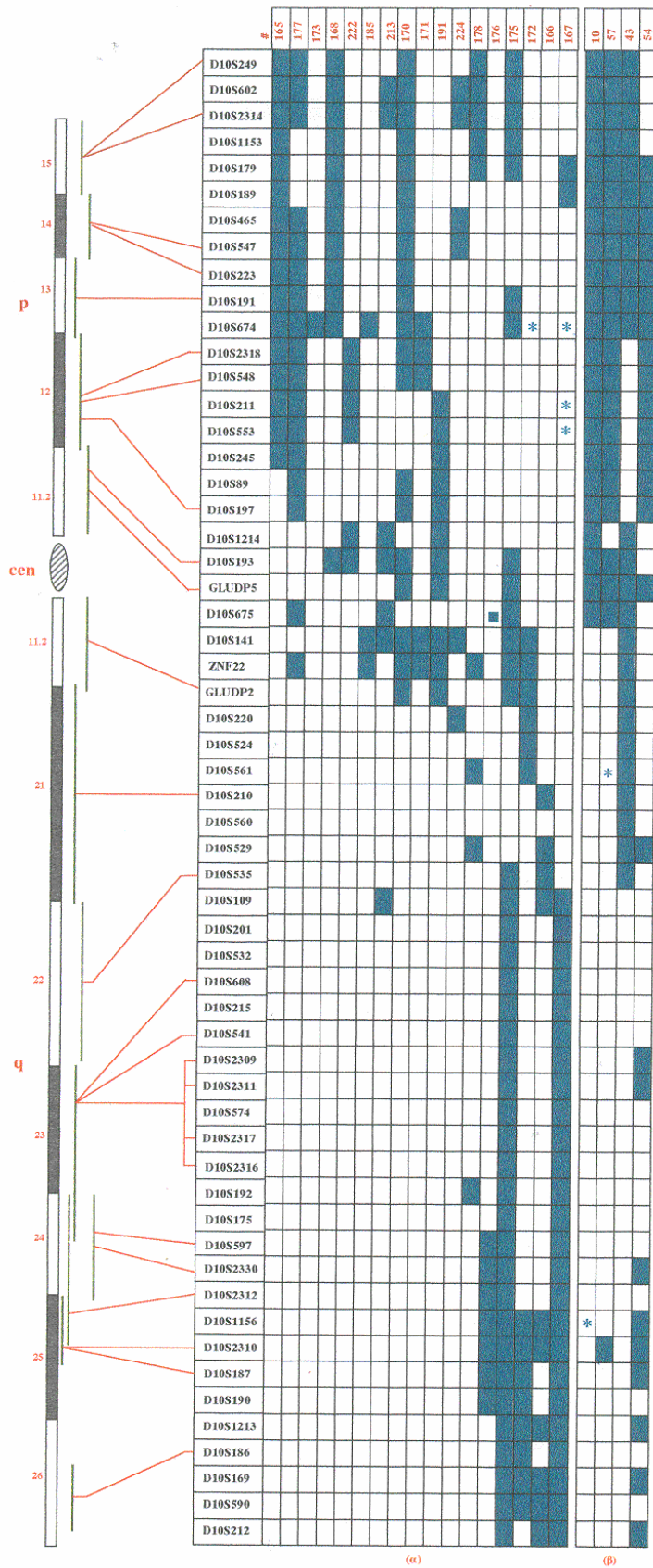
- Μετά από διερεύνηση ανθρώπινης γενωμικής βιβλιοθήκης YAC, με διάφορες μεθόδους, έχουν δημιουργηθεί 225 contig με αλληλοεπικαλυπτόμενους γενωμικούς κλώνους, κατά μήκος όλου του ανθρώπινου γονιδιώματος

(Chumakov *et al*, 1995). Το μέσο μέγεθος των ενθεμάτων των κλώνων, είναι 1Mb, ενώ το μέσο μέγεθος της φυσικής απόστασης που καλύπτει το κάθε contig, είναι περίπου 10Mb. Υπολογίζεται ότι όλοι αυτοί οι γενωμικοί κλώνοι, καλύπτουν το 75% περίπου, του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ο χάρτης αυτός είναι αξιόπιστος για να χρησιμοποιηθεί για τεχνικές κλωνοποίησης βάσει θέσης (positional cloning), αλλά όχι για να υποστηριχθεί το πρόγραμμα προσδιορισμού της αλληλουχίας όλου του ανθρώπινου γονιδιώματος.

- Έχει κατασκευαστεί ένας φυσικός χάρτης όλου του ανθρώπινου γονιδιώματος, με αλληλοεπικαλυπτόμενους κλώνους YAC σε συνδυασμό με χρωμοσωμική χαρτογράφηση μιας ομάδας ακτινοβολημένων υβριδίων σωματικών κυττάρων (Hudson *et al*, 1995). Η χαρτογράφηση των παραπάνω κλώνων, έγινε χρησιμοποιώντας 15086 STS (sequence tag sites) πολυμορφικά (microsatellite markers) και μη, με μέση απόσταση μεταξύ τους 199 Kb και 3235 ESTs (expressed sequence tags). Ο χάρτης αυτός αποτελεί αδρό σκελετό για το πρόγραμμα προσδιορισμού της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος σε ευρεία κλίμακα.
- Έχει κατασκευαστεί μία σειρά 168 ακτινοβολημένων σωματικών υβριδίων κυττάρων ανθρώπου - χάμστερ, που χρησιμοποιήθηκε για τη χαρτογράφηση 404 πολυμορφικών δεικτών και 374 ESTs, κατά μήκος όλου του ανθρώπινου γονιδιώματος (Gyapay *et al*, 1996). Αυτός, αλλά και άλλοι χάρτες μικρότερης έκτασης και μεγαλύτερης διακριτικής ικανότητας, αποτελούν σημαντικά εργαλεία χαρτογράφησης. Γεφυρώνοντας το γενετικό με το φυσικό χάρτη, παρέχουν τη δυνατότητα τοποθέτησης οποιασδήποτε αλληλουχίας STS ή EST, πάνω σ' αυτούς και αποτελούν πηγή υλικού για κλωνοποίηση γονιδίων από συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος.

Επιπλέον, έχουν κατασκευαστεί επιπρόσθετοι φυσικοί χάρτες ειδικοί για κάποιο χρωμόσωμα. Για το χρωμόσωμα 10, κατασκευάστηκε ένας χάρτης σωματικών υβριδίων ανθρώπου - χάμστερ (Κοκκινάκη Μ. 1996 και Marzella *et al*, 1997), που χαρτογραφεί 21 υβρίδια, ακτινοβολημένα και μη, πάνω στο χρωμόσωμα, βάσει του περιεχομένου τους σε γενετικούς δείκτες, με PCR (Εικ.1).

Η μέθοδος αυτή είναι πιο ευαίσθητη, από την εναλλακτική χαρτογράφηση υβριδίων με *in situ* υβριδοποίηση φθορισμού (FISH) των υβριδίων, μιας και μπορεί να ανιχνεύσει και να ορίσει με γενετική και μοριακή προσέγγιση, την ύπαρξη μικρών ελλειμμάτων.



Εικ. 1: Μοριακός χαρακτηρισμός και ανάλυση FISH, με 57 μικροδορυφορικούς δείκτες, 21 σωματικών κυτταρικών υβριδίων που φέρουν τμήματα του

ανθρώπινου χρωμοσώματος 10. Τα μπλε τετράγωνα δείχνουν διατήρηση του αντίστοιχου δείκτη και ανίχνευση των χρωμοσωμικών τμημάτων με FISH. Επίσης, φαίνονται οι διαφορές μεταξύ μοριακού χαρακτηρισμού και ανάλυσης FISH: Τα τμήματα του χρωμοσώματος 10 που αναγνωρίζονται μόνο από τους δείκτες, φαίνονται με αστερίσκο (*), ένα τμήμα που ανιχνεύθηκε μόνο με FISH σημειώνεται με ένα μικρό μπλε τετράγωνο, ενώ τα μοριακά χαρακτηρισμένα ελλείμματα που δεν δίνουν σήμα στην ανάλυση FISH, σημειώνονται με τελεία. (a): Ακτινοβολημένα κυτταρικά υβρίδια. (b): Σωματικά κυτταρικά υβρίδια με αυθόρμητες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που περιέχουν επιπλέον ανθρώπινο κυτταρογενετικό υλικό. Αριστερά, υπάρχει ένα ιδεόγραμμα του χρωμοσώματος 10, στο οποίο φαίνεται, ενδεικτικά, η κυτταρογενετική τοποθέτηση 25 εκ των δεικτών (ανατύπωση από τη διατριβή για μεταπτυχιακό τίτλο ειδίκευσης της Μ. Κοκκινάκη, 1996).

Μέθοδοι ταυτοποίησης γονιδίων

Μετά τη μεγάλη διακριτικής ικανότητας χαρτογράφηση μιας περιοχής, το σχηματισμό contigs και την ελαχιστοποίηση της κρίσιμης περιοχής για κάποια ασθένεια, ακολουθεί η εφαρμογή διαφόρων μεθόδων που αποσκοπούν στην ταυτοποίηση γονιδίων από μία συγκεκριμένη περιοχή. Η ταυτοποίηση γονιδίων μπορεί να γίνει με διάφορες προσεγγίσεις.

Κλωνοποίηση βάσει χρωμοσωμικής θέσης

Σε αντίθεση με την κλωνοποίηση βάσει λειτουργίας, η οποία στηρίζεται σε προϋπάρχουσα γνώση της βασικής βιοχημικής λειτουργίας του προϊόντος ενός γονιδίου, η προσέγγιση αυτή στηρίζεται στη χαρτογράφηση του υπεύθυνου γονιδίου στην φυσική του θέση σε κάποιο χρωμόσωμα. Εφαρμόζεται όταν δεν υπάρχει βιολογική πληροφορία για τις κύριες βιοχημικές δυσλειτουργίες αλλά μόνο η φαινοτυπική εικόνα και πώς αυτή κληρονομείται. Η μέθοδος της κλωνοποίησης βάσει θέσης έχει οδηγήσει στην ταυτοποίηση περισσότερων από 70 ανθρώπινα γονίδια που σχετίζονται με ασθένειες. Τέτοια γονίδια, δυσλειτουργίες των οποίων οδηγούν στην εμφάνιση κληρονομήσιμων νόσων είναι, για παράδειγμα, αυτά για την κυστική ίνωση (Rommens J.M *et al*, 1989, Riordan J.R *et al*, 1989), το ρετινοβλάστωμα (Lyonnet *et al*, 1995), τη μυική δυστροφία Duchenne (Kunkel *et al*, 1985), το σύνδρομο Werner's (Yu C.E *et al*, 1996), Hermansky-Pudlak (Oh J *et al*, 1996), κ.τ.λ.

Μέθοδος υποψηφίου γονιδίου

Η ταυτοποίηση κάποιου γονιδίου μπορεί να προκύψει με συνδυασμό των τεχνικών κλωνοποίησης βάσει λειτουργίας και θέσης, με μία διαδικασία που ονομάζεται προσέγγιση του «υποψηφίου γονιδίου» (candidate approach). Κατ'αυτήν, γονίδια ή μετάγραφα (ολόκληρα ή επιμέρους ESTs), που είναι ήδη γνωστά και που χαρτογραφούνται σε μία χρωμοσωμική περιοχή που έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση κάποιας νόσου, εξετάζονται για το αν η λειτουργία τους (απώλεια ή υπερλειτουργία), θα μπορούσε να ευθύνεται για την υπό εξέταση νόσο. Έτσι, αποφεύγεται η εξαντλητική κλωνοποίηση γονιδίων της κρίσιμης περιοχής. Η μέθοδος αυτή θα χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο λόγω της σταθερής αύξησης των χαρτογραφημένων γονιδίων υπό μορφή ESTs (βλ. παρακάτω) για όλα τα ανθρώπινα χρωμοσώματα και πιστεύεται ότι θα είναι η κύρια μέθοδος κλωνοποίησης, όταν ολοκληρωθεί το πρόγραμμα χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Μεταγραφική χαρτογράφηση

Από όλη τη νουκλεοτιδική αλληλουχία που θα προσδιοριστεί με το πρόγραμμα ανάλυσης του ανθρώπινου γονιδιώματος, μόνο το 3% αυτής υπολογίζεται ότι θα περιέχει γονίδια, (βάσει του ότι υπάρχουν 80-100 χιλιάδες γονίδια). Γι αυτόν το λόγο, ένα σημαντικό μέρος της βασικής και εφαρμοσμένης γενετικής αποτελεί η ταυτοποίηση και η χαρτογράφηση αυτών των γονιδίων, με μία διαδικασία που ονομάζεται μεταγραφική χαρτογράφηση (transcriptional mapping). Ένα μικρό μόνο μέρος της αλληλουχίας, καθενός μορίου cDNA, αρκεί για την παραγωγή μοναδιαίων γονιδιακών δεικτών. Τέτοιοι δείκτες είναι γνωστοί ως ESTs (expressed sequenced tags) και μπορούν να εντοπιστούν εύκολα πάνω στα χρωμοσώματα, με τη διαδικασία της PCR (Hayes PD *et al*, 1996). Με τη συνεργασία ομάδων από τις ΗΠΑ, την Ευρώπη και την Ιαπωνία οικοδομήθηκε ένας μεταγραφικός χάρτης που περιέχει πληθώρα ESTs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SCIENCE96/>, Schuler GD *et al*, 1996). Η φυσική τους τοποθέτηση στα χρωμοσώματα επιτεύχθηκε βάσει της παρουσίας ή απουσίας τους σε δύο σειρές (panels) ακτινοβολημένων υβριδίων σωματικών κυττάρων ή σε μία βιβλιοθήκη κλώνων YAC. Όλη αυτή η πληροφορία ενσωματώθηκε στο γενετικό χάρτη του ανθρώπου. Αξιόλογο ποσοστό γονιδίων που κλωνοποιήθηκαν με την τεχνική βάσει θέσης, υπήρχαν ήδη σαν αλληλουχίες ESTs, κατατεθειμένες σε βάση δεδομένων (π.χ. GDB, Genbank, κ.τ.λ.). Η τρέχουσα

εκτίμηση είναι ότι τουλάχιστον το 60% των υπαρχόντων γονιδίων έχουν ήδη απομονωθεί ως ESTs και καταγράφονται στην αντίστοιχη βάση δεδομένων dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>).

Οργανισμοί - πειραματικά μοντέλα

Οι οργανισμοί - μοντέλα (animal models) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία, για την κλωνοποίηση ανθρώπινων γονιδίων που συνδέονται με ασθένειες (Mushagian AR *et al* 1997, 1998). Σ' αυτούς τους οργανισμούς η λειτουργική μελέτη γονιδίων, επειδή είναι προφανώς απλούστεροι απ' ό,τι ο άνθρωπος, έχει προοδεύσει, συγκριτικά, πολύ περισσότερο. Σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ανθρώπινων γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με ασθένειες, με τις γενωμικές αλληλουχίες της *Drosophila melanogaster*, της ζύμης (*S. cerevisiae*), του νηματώδη σκόληκα (*C. elegans*) και διαφόρων βακτηρίων, οδήγησε στον εντοπισμό σημαντικών λειτουργικά περιοχών αλλά και στον προσδιορισμό του ρόλου γονιδίων. Σαν παράδειγμα, αναφέρουμε το ρόλο του γονιδίου *Pax 6* στο σχηματισμό του οφθαλμού, μέσω της μοριακής και γενετικής ανάλυσης του γονιδίου *eyeless* στη δροσόφιλα (Gehring WJ *et al*, 1996) και του *Small eye* στο ποντίκι (Hill RE *et al*, 1992)

Κατανομή γονιδίων στα χρωμοσώματα

Τα γονίδια δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα στα 46 χρωμοσώματα του ανθρώπου αλλά ούτε και κατά μήκος των χρωμοσωμάτων (Antonarakis SE, 1994). Έτσι, συγκεκριμένες χρωμοσωμικές περιοχές είναι δυνατόν να συγκεντρώνουν πλήθος γονιδίων, ενώ σε άλλες, η πυκνότητά τους να είναι μικρή. Περιοχές πλούσιες σε γονίδια, έχουν και μεγάλη περιεκτικότητα στις βάσεις G και C (Graig JM *et al*, 1994). Ο εντοπισμός αυτών των περιοχών, όπως και χρωμοσωμικών περιοχών που σχετίζονται με ασθένειες, κατευθύνει προτεραιότητες και προσεγγίσεις χαρτογράφησης γονιδίων. Εξάλλου, συγκριτικοί χρωμοσωμικοί χάρτες, π.χ.

ανθρώπου / ποντικού και ο προσδιορισμός συνταϊνικών περιοχών ανάμεσα στα δύο είδη, έχουν βοηθήσει στην ταυτοποίηση ορθόλογων γονιδίων και των αντίστοιχων πιθανών λειτουργιών με βάση τη μεγάλη συλλογή μεταλλαγμένων στελεχών ποντικού.

Το χρωμόσωμα 10 του ανθρώπου

Η εργασία που παρουσιάζεται εδώ ενσωματώνεται στην προσπάθεια του εργαστηρίου μας για τη χαρτογράφηση του χρωμοσώματος 10 του ανθρώπου. Το χρωμόσωμα 10 είναι ένα μεσαίου μεγέθους, υπομετακεντρικό χρωμόσωμα, που αντιστοιχεί στο 4,5% περίπου, του συνολικού μήκους των αυτοσωμάτων. Μέχρι σήμερα, περισσότερες από 40 γενετικές ασθένειες έχουν συσχετισθεί με το χρωμόσωμα αυτό, ενώ έχουν χαρτογραφηθεί περισσότερα από 170 γονίδια και περισσότερα από 1500 cDNA (μερικού ή πλήρους μήκους).

Ακολούθως παρουσιάζουμε αναλυτικότερα την τρέχουσα πληροφορία σχετικά με τη γονιδιωματική ανάλυση αυτού του χρωμοσώματος.

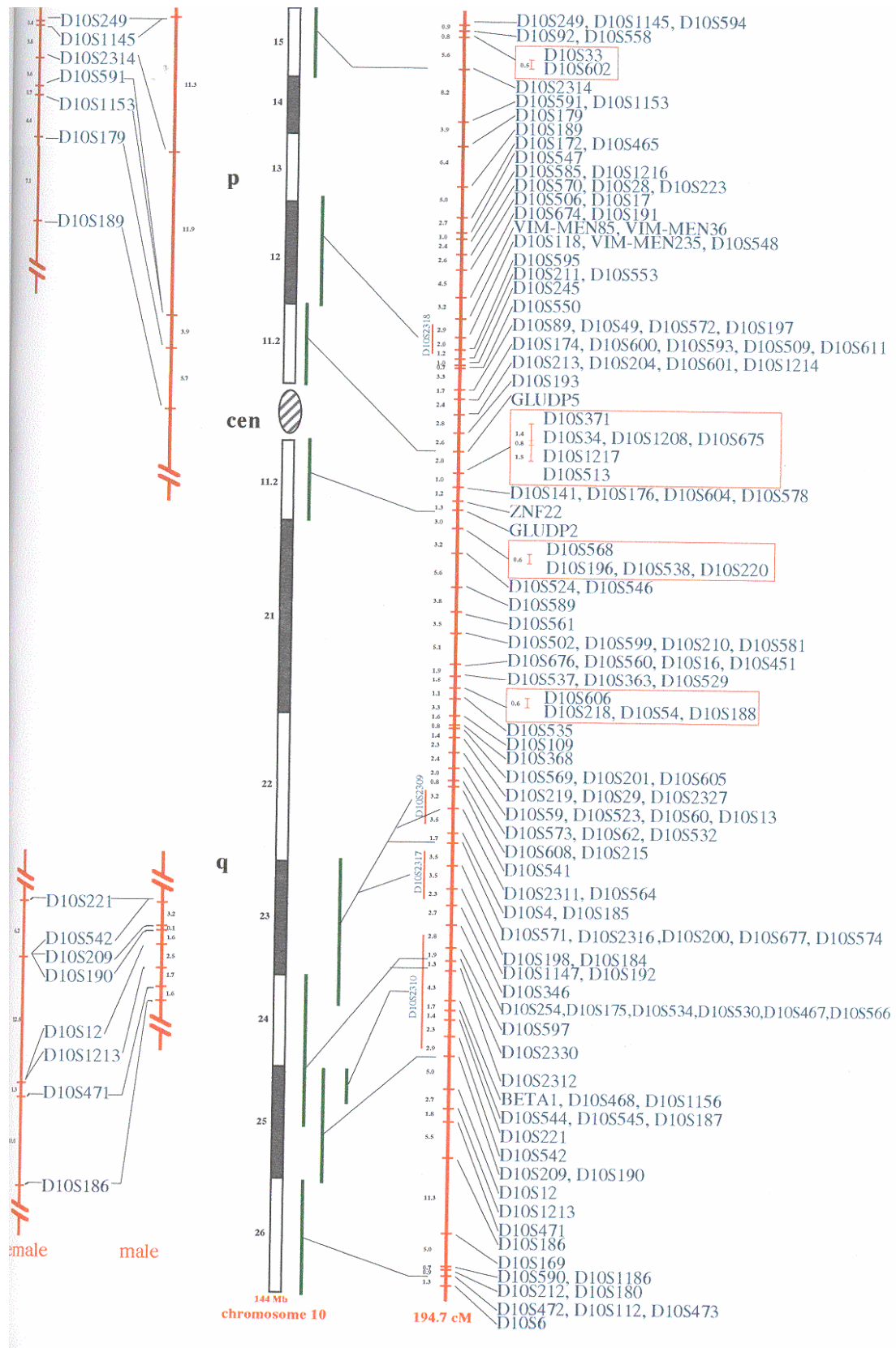
Γενετική χαρτογράφηση του χρωμοσώματος 10

Η γενετική χαρτογράφηση του χρωμοσώματος αυτού έχει ολοκληρωθεί και έχει οδηγήσει σε μεγάλης διακριτικής ικανότητας χάρτες. Οι πιο πρόσφατοι γενετικοί χάρτες του ανθρώπου για το χρωμόσωμα 10, με πολύ καλή τιμή μέσης γενετικής απόστασης μεταξύ των δεικτών, είναι:

- Ο χάρτης του IMBB με μέση γενετική απόσταση 2,8 cM (Εικ. 2). Χρησιμοποιεί γονοτυπικά δεδομένα από 153 πολυμορφικούς δείκτες (μικροδορυφορικούς και RFLPs), που έχουν μέση τιμή ετεροζυγωτίας 0,7. Για 36 από αυτούς τους δείκτες, η γονοτυπική ανάλυση έγινε στο εργαστήριό μας, χρησιμοποιώντας δείγματα 40 οικογενειών CEPH. Για τους υπόλοιπους, τα δεδομένα πάρθηκαν από τις βάσεις

δεδομένων CEPH και CHLC. Το συνολικό μήκος του χάρτη είναι για αρσενικό άτομο, 148,2 cM και για θηλυκό, 243,3 cM . Ο μέσος όρος και για τα δύο φύλα, είναι 194,7 cM. (Marzella *et al*, 1997). Η χρησιμότητα αυτού του χάρτη σε σχέση με το χάρτη CEPH (βλ. παρακάτω) έγκειται στο ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί από ευρύτερο αριθμό εργαστηρίων επειδή οι δείκτες που εμπεριέχει έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν (π.χ. RFLPs). Ας σημειωθεί ότι όλοι οι δείκτες έχουν τοποθετηθεί στο χάρτη με lod score > 3, ενώ στηρίζεται σε 40 οικογένειες CEPH, έναντι των 8 του χάρτη Genethon (βλ. παρακάτω).

- Ο χάρτης CEPH - Genethon, με μέση γενετική απόσταση 1,8 cM. Στηρίζεται σε γονοτυπική ανάλυση 281 μικροδορυφορικών δεικτών, με μέση τιμή ετεροζυγωτίας 0,7, σε δείγματα από 8 οικογένειες CEPH. Το συνολικό μήκος του χάρτη είναι 209,7 cM για τα θηλυκά και 146,1 cM για τα αρσενικά άτομα (μέσος όρος 181,7 cM) (Dib *et al*, 1996). Το μειονέκτημα του χάρτη αυτού είναι ο περιορισμός των γενετικών δεικτών μόνο σε μικροδορυφόρους και η χρήση αρκετών νέων δεικτών οι οποίοι δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν από την ευρύτερη επιστημονική κοινότητα.



Εικ. 2: Γενετικός χάρτης σύνδεσης του χρωμοσώματος 10.

Εκτός του γενετικού χάρτη που κατασκευάστηκε από το μέσο όρο των αντιστοίχων χαρτών των δύο φύλων, φαίνονται οι τελομερικές περιοχές των χαρτών για αρσενικά και θηλυκά άτομα, που εμφανίζουν, σ' αυτό το τμήμα, μεγάλη απόκλιση ως προς τα

ποσοστά ανασυνδυασμού. Οι αποστάσεις μεταξύ των γενετικών δεικτών είναι σχεδιασμένες σε κλίμακα. Για τέσσερις γενετικούς δείκτες, για τους οποίους δεν ήταν δυνατή η ακριβής τοποθέτησή τους στο χάρτη με lod score > 3, φαίνονται, με κάθετες γραμμές, τα διαστήματα στα οποία χαρτογραφούνται. Δείκτες που εμφανίζουν μηδενικό ποσοστό ανασυνδυασμού μεταξύ τους, ανήκουν στο ίδιο απλοτυπικό σύστημα και είναι γραμμένοι σε μία οριζόντια γραμμή. Αριστερά, στο ιδεόγραμμα του χρωμοσώματος 10, είναι τοποθετημένοι 13 από τους γενετικούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν, βάσει του προσδιορισμού της κυτταρογενετικής θέσης τους. Οι γενετικοί χάρτες για αρσενικά και θηλυκά άτομα είναι διαθέσιμοι στις παρακάτω ηλεκτρονικές διευθύνσεις:

<http://www.imbb.forth.gr/papers/malemap.jpg>,

<http://www.imbb.forth.gr/papers/femalemap.jpg>,

αντίστοιχα (ανατύπωση από τους Marzella et al, 1997).

Χρωμοσωμική περιοχή 10q23 - q25 και ασθένειες που συνδέονται με αυτήν

Μέχρι σήμερα, περισσότερες από 40 γενετικές ασθένειες σχετίζονται με γενετικούς τόπους του χρωμοσώματος 10. Μεγάλο ποσοστό αυτών, συνδέονται με την περιοχή 10q23 - q25. Αυτή η χρωμοσωμική περιοχή φαίνεται πως είναι μία περιοχή πλούσια σε γονίδια. Περιέχει βιολογικά σημαντικά γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των αναπτυξιακών γονιδίων *Pax 2* (Sanyanusin, 1995, 1996), *Hox 11* (Kennedy MA et al, 1991), *Wnt8B* (Lako, 1996), τέσσερα κυτοχρωμικά γονίδια που ενέχονται στο μεταβολισμό των στεροϊδών ορμονών και διάφορων περιβαλλοντικών μέσων (Spurr et al, 1987, Riddell DC et al, 1987), τα γονίδια *Fgf 8* (Yoshiura K, 1997, Gemel J, 1996), *Dmbt 1* (*Deleted in Malignant Brain Tumors*, Mollenhauer et al, 1997), *Mxi 1* (Zervos SJ et al, 1993), *Pten* (Li J et al, 1997, Steck P.A. et al, 1997), κ.τ.λ. Εξάλλου, η υψηλή συχνότητα γονιδίων αντανακλάται και από τον πολύ αυξημένο αριθμό ESTs που έχουν χαρτογραφηθεί εκεί. Αρκετά από τα γονίδια της περιοχής 10q23-25 σχετίζονται με κληρονομικές, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, αναπτυξιακές ανωμαλίες, καρκινογένεση κ.λ.π. Για ορισμένες από αυτές, το υπεύθυνο γονίδιο έχει ταυτοποιηθεί, για άλλες όμως όχι. Παρατείθονται, ενδεικτικά, ασθένειες, που σχετίζονται με γονιδιακούς τόπους της περιοχής αυτής και που δεν έχει οριστικοποιηθεί η συσχέτισή τους με συγκεκριμένο γονίδιο. Στην Εικ. 3 φαίνονται τα όρια των χρωμοσωμικών περιοχών που ενοχοποιούνται για τις ασθένειες που αναφέρονται κατωτέρω, που χαρτογραφούνται στο γενετικό χάρτη της Εικ. 2.

- Η **εκτροδακτυλία τύπου 3** (split hand / foot malformation, SHFM 3) είναι μία αναπτυξιακή ανωμαλία της μορφογένεσης των άκρων. Πιθανή χρωμοσωμική περιοχή που περιέχει γονίδιο/α που εμπλέκονται στη μορφογένεση των ανθρώπινων άκρων, θεωρείται η 10q24-q25. Εστιάζοντας σ' αυτήν τη χρωμοσωμική περιοχή και εφαρμόζοντας γενετική ανάλυση σύνδεσης σε μία οικογένεια, η κρίσιμη περιοχή του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 10, περιορίστηκε σε μήκος 9cM. Συγκεκριμένα, μεταξύ των γενετικών δεικτών D10S541 και D10S574, ενώ μέγιστο lod score προέκυψε με το δείκτη D10S583 (Nunes *et al*, 1995). Μία άλλη ερευνητική ομάδα καθόρισε το μήκος της κρίσιμης περιοχής σε 19cM, στο 10q24 - q25, με μέγιστες τιμές lod score, να προκύπτουν με το γενετικό τόπο του *Pax 2* και το δείκτη D10S1239 (Gurrieri *et al*, 1996).
- Το **πολύμορφο γλοιωβλάστωμα** είναι ο πιο κακοήθης καρκίνος των κυττάρων της γλοίας του εγκεφάλου στον άνθρωπο. Κυτταρογενετική και μοριακή ανάλυση πρωτογενών τέτοιων όγκων, έδειξαν ότι, πολύ συχνά, αυτή η μορφή καρκίνου συνοδεύεται από ελλείμματα μέρους ή ολόκληρου του χρωμοσώματος 10. Επιπλέον, μετά από εισαγωγή του ανθρώπινου χρωμοσώματος 10 σε κύτταρα γλοιώματος παρατηρήθηκε αναστροφή του κακοήθους φαινοτύπου *in vitro* και *in vivo*. Αυτό δείχνει την ύπαρξη ενός ή περισσότερων ογκοκατασταλτικών γονιδίων στο χρωμόσωμα 10 (10q ή / και 10p), που είναι σημαντικά για την ογκογένεση και την ανάπτυξη των γλοιωμάτων (Perhouse *et al*, 1993). Μελέτες απώλειας ετεροζυγωτίας περιόρισαν την κρίσιμη περιοχή κατά μήκος, σε 17cM, μεταξύ των πολυμορφικών δεικτών D10S221 και D10S214 (Albarosa *et al*, 1996), ενώ ως ελάχιστη κοινή περιοχή ελλειμμάτων σε δείγματα ασθενών, προσδιορίστηκε μία περιοχή μήκους 5cM, μεταξύ των πολυμορφικών δεικτών D10S587 και D10S216 (Rasheed *et al*, 1995). Το γονίδιο *Dmbt 1* (Mollenhauer *et al*, 1997), ένα μέλος της υπεροικογένειας των υποδοχέων scavenger (Resnick *et al*, 1994), που χαρτογραφείται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q25.3 - q26.1, θεωρείται πιθανό υποψήφιο γονίδιο για το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, καθώς και για το μυελοβλάστωμα (νευροσπογγιοβλάστωμα), μία επίσης συχνή, ταχύτατης εξέλιξης κακοήθη μορφή καρκίνου του εγκεφάλου. Ομόζυγες ελλείψεις του

παραπάνω γονιδίου ανιχνεύθηκαν σε ποσοστά, 10% για το μυελοβλάστωμα και 25% για το γλοιοβλάστωμα.

- **Καρκίνος του προστάτη:** Εκτιμάται ότι ο καρκίνος του προστάτη είναι ο πιο συχνός στον αντρικό πληθυσμό. Υπολογίζεται ότι, κατά τη διάρκεια της ζωής του, ένας στους δέκα άντρες εμφανίζει αυτή τη μορφή όγκου. Με μελέτες απώλειας ετεροζυγωτίας και με κυτταρογενετικές μελέτες που εφαρμόστηκαν σε καρκινικά κύτταρα προστάτη, φαίνεται ότι η εμφάνιση της νόσου συνοδεύεται από έλλειμα της χρωμοσωμικής περιοχής 10q23-q25. Περίπου 40% των δειγμάτων δείχνει αυτό το έλλειμα. Έχει υποτεθεί ότι η περιοχή αυτή περιέχει ένα, ή περισσότερα, ογκοκατασταλτικά γονίδια. Πιθανό υποψήφιο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που ρυθμίζει αρνητικά τη δράση του *Myc* και χαρτογραφείται στην περιοχή 10q25, θεωρήθηκε το *Mxi1*. Το προϊόν αυτού του γονιδίου ανήκει στην οικογένεια που τα μέλη της φέρουν το μοτίβο έλικα – στροφή – έλικα (Zervos SJ *et al*, 1993). Όμως μόνο ένας πολύ μικρός αριθμός δειγμάτων καρκίνων του προστάτη παρουσίασε μεταλλάξεις στο *Mxi1*, μόνο σε σωματικά κύτταρα (Gray IC *et al*, 1995, Kuczyk MA, 1998). Ένα τέτοιο μικρό ποσοστό μεταλλαγών στο συγκεκριμένο γονίδιο, πιθανώς, εξηγείται ως αποτέλεσμα των πολλαπλών διαιρέσεων που υφίστανται τα κύτταρα του όγκου και όχι σαν πρωταρχική αιτία της πορείας εξέλιξης αυτής της μορφής καρκινογένεσης. Άλλο πιθανό ογκοκατασταλτικό γονίδιο κλωνοποιημένο πρόσφατα, ταυτόχρονα από δύο ομάδες, είναι το *Pten / Mmac1*. Σε κυτταρικές σειρές προερχόμενες από όγκο προστάτη και οι οποίες εμφάνιζαν απώλεια του ενός αλληλομόρφου στην κρίσιμη περιοχή, ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις του δεύτερου εναπομήναντος αλληλομόρφου (Li J *et al*, 1997, Steck *et al*, 1997). Το γονίδιο χαρτογραφείται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23.3 και το προβλεπόμενο προϊόν του έχει ενεργότητα ενζύμου φωσφατάσης τυροσίνης και μεγάλη ομολογία με την τενσίνη, μία πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τα ινίδια της ακτίνης. Η πιθανότητα της ογκοκατασταλτικής δράσης του βασίζεται στις δύο παραπάνω δομικές ομοιότητες που εμφανίζει η νουκλεοτιδική του αλληλουχία.

Επιπλέον, μεταλλάξεις του *Pten / Mmac1*, ανιχνεύθηκαν στη γαμετική κυτταρική σειρά ατόμων και οικογενειών με σύνδρομο Cowden, ένα αυτοσωμικό επικρατές κληρονομήσιμο σύνδρομο, που χαρακτηρίζεται από ανάπτυξη

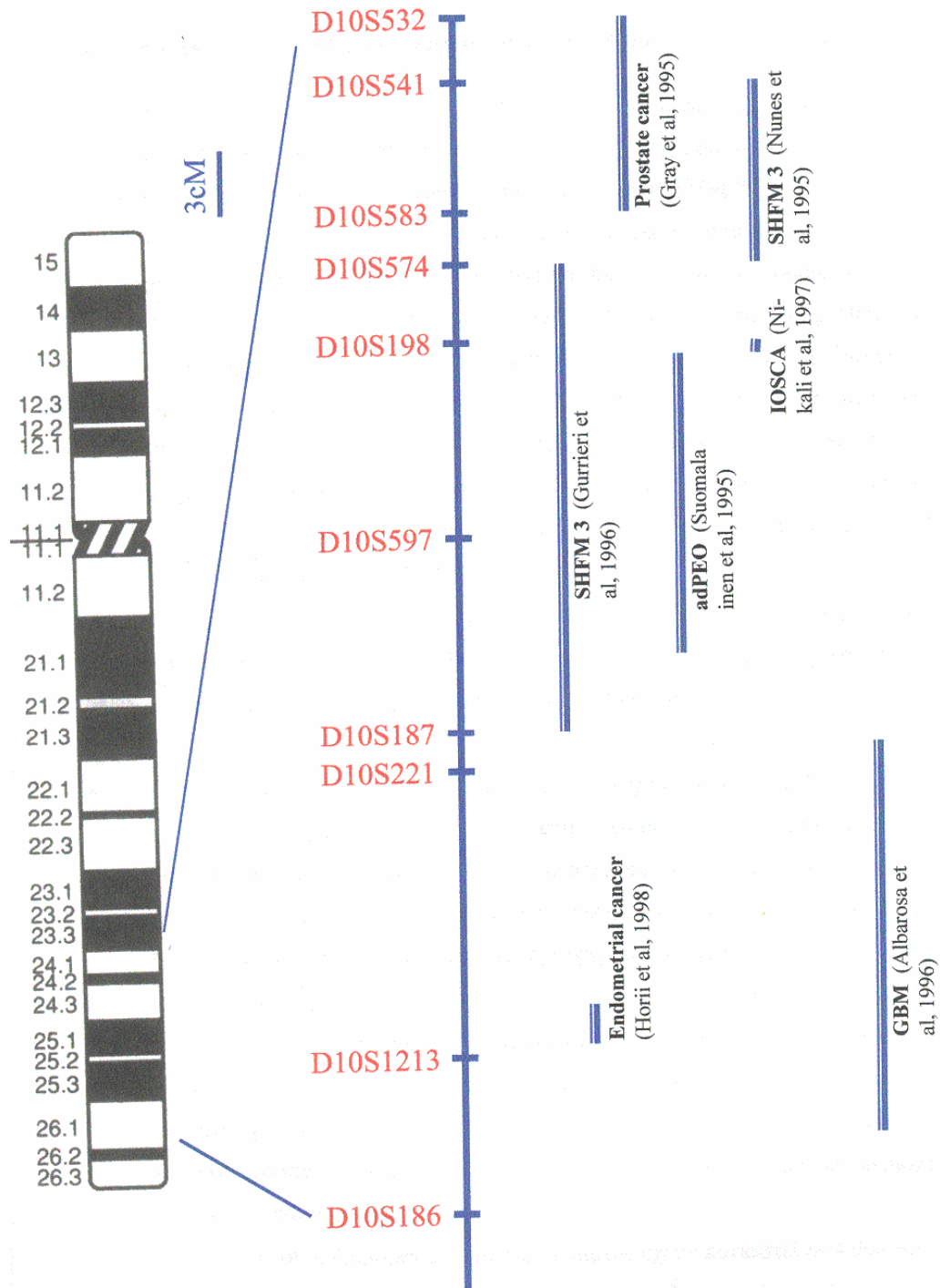
αμαρτωμάτων (συγγενείς δυσπλασίες) σε διάφορους ιστούς και προδιάθεση για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, του θυρεοειδή και άλλων οργάνων (Nelen M.R *et al* 1997, Liaw D *et al*, 1997). Επιπλέον, μεταλλάξεις του *Pten / Mmac1* ανιχνεύθηκαν στη γαμετική κυτταρική σειρά ατόμων με τη νόσο Lhermitte-Duclos και το σύνδρομο Bannayan-Zonana (Eng C *et al*, 1994, Bannayan GA *et al*, 1971, Zonana J *et al*, 1976). Σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου έχουν περιγραφεί, εκτός του καρκίνου του προστάτη (Li J *et al*, 1997), σε σποραδικές μορφές καρκίνου του θυρεοειδή (Dahia PL *et al*, 1997), του ενδομητρίου (Risinger J.I *et al*, 1997) και στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (Bostrom J *et al*, 1998, Wang SI *et al*, 1997). Γενικά φαίνεται ότι ο ρόλος του *Pten / Mmac1* στην ανάπτυξη διαφόρων μορφών κακοήθειας στον άνθρωπο, είναι ευρύτερος. Τελευταία, έγινε knockout του γονιδίου αυτού σε ποντίκι, που είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση θνησιμότητας στα εμβρυονικά στάδια ανάπτυξης (7,5 d.) στα ομόζυγα άτομα, στα δε ετερόζυγα, εμφάνιση συμπτωμάτων που χαρακτηρίζουν τις νόσους Lhermitte-Duclos, Bannayan-Zonana και Cowden (Cristofano A *et al*, 1998).

- Ο **καρκίνος του ενδομητρίου** είναι μία ασθένεια της οποίας οι μοριακοί μηχανισμοί δεν είναι σαφείς. Συχνά, σε δείγματα ασθενών, υπάρχει αλληλική έλλειψη (allele deletion) και γενωμική αστάθεια του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 10 και συγκεκριμένα της περιοχής 10q23-q26 (Safara *et al*, 1997). Με μελέτες απώλειας ετεροζυγωτίας (LOH), η κρίσιμη περιοχή μειώθηκε σε μέγεθος 1cM, συγκεκριμένα μεταξύ των γενετικών δεικτών D10S587 και D10S1723 και αργότερα, με περαιτέρω μελέτες αλληλικής έλλειψης με FISH, η κρίσιμη περιοχή έφθασε τα 120kb, στην οποία τελικά προσδιορίστηκαν τρεις αλληλοεπικαλυπτόμενοι κοσμιδιακοί κλώνοι (Hogii *et al*, 1998). Σημειώνεται, πάντως, ότι το γονίδιο *Pten*, που χαρτογραφείται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23.3, εμφανίζει σε πολύ υψηλή συχνότητα σωματικές μεταλλάξεις σε καρκίνους του ενδομητρίου (Risinger J.I *et al*, 1997).
- Η **νωτιαιοπαρεγκεφαλική αταξία με νηπιακή εμφάνιση** (infatle onset spinocerebellar ataxia, IOSCA), είναι ένα αυτοσωμικό υποτελές νευροεκφυλιστικό σύνδρομο με μεγάλη συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό της Φιλανδίας. Η κρίσιμη περιοχή έχει περιορισθεί πλέον σε μήκος 270 Kb στη

χρωμοσωμική περιοχή 10q24 και έχει προσδιοριστεί από μία σειρά αλληλοεπικαλυπτόμενων κλώνων YAC και PAC (Nikali *et al*, 1997).

- Η **προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία** (progressive external ophthalmoplegia, adPEO) είναι μία αυτοσωμική επικρατής ασθένεια, που χαρακτηρίζεται από μυική αδυναμία, κυρίως των οφθαλμικών μυών. Η αιτία των συμπτωμάτων είναι η συσσώρευση πολλαπλών μεγάλων ελλειμμάτων στο μιτοχονδριακό DNA των ιστών του ασθενή. Λόγω γενετικής ετερογένειας, με ανάλυση γενετικής σύνδεσης, γενετικοί τόποι για την adPEO έχουν χαρτογραφηθεί στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 10, αλλά και στη χρωμοσωμική περιοχή 3p14.1-p21.2 (Suomalainen *et al*, 1995). Ο τρόπος κληρονόμησης της ασθένειας, δηλαδή η απουσία μητρικής μιτοχονδριακής κληρονομικότητας, δείχνει ότι υπάρχει ένα αρχικό ελάττωμα σε κάποια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το DNA του πυρήνα και ότι οι ελλείψεις που παρατηρούνται στο μιτοχονδριακό DNA, είναι ένα δευτερογενές αποτέλεσμα. Βάσει των παραπάνω, υποψήφια πυρηνικά γονίδια είναι αυτά που συμμετέχουν στην αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA και αυτά που σχετίζονται με τον οξειδωτικό μεταβολισμό. Η κρίσιμη περιοχή εντοπίζεται, σε μήκος 20cM, συγκεκριμένα μεταξύ των γενετικών δεικτών D10S198 και D10S562. Η μεγαλύτερη τιμή lod score προέκυψε με το δείκτη D10S597, που εμφανίζει μηδενικό ποσοστό ανασυνδυασμού. Επειδή η κρίσιμη περιοχή είναι αρκετά μεγάλη για εφαρμογή των κλασικών τεχνικών κλωνοποίησης βάσει θέσης, εναλλακτικά γίνεται προσπάθεια εντοπισμού ανθρώπινων μεταγράφων που εμφανίζουν υψηλή ομολογία με μιτοχονδριακές πρωτεΐνες του σακχαρομύκητα και που χαρτογραφούνται στις κρίσιμες περιοχές. Ο σακχαρομύκητας χρησιμοποιείται ως οργανισμός - μοντέλο γιατί σ' αυτόν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως πυρηνικά γονίδια που ενέχονται στη βιογένεση των μιτοχονδρίων και τα οποία, μάλιστα, είναι συντηρημένα μεταξύ των ειδών.
- Το σύνδρομο **Ochoa** είναι μία σπάνια συγγενής αυτοσωμική υποτελής ασθένεια, που χαρακτηρίζεται από αποφρακτική ουροπάθεια και μη φυσιολογική έκφραση στο πρόσωπο. Με μελέτες ομοζυγωτίας κατά μήκος του γονιδιώματος και

ανισορροπίας σύνδεσης (linkage disequilibrium), χαρτογραφήθηκε το υπεύθυνο γονίδιο εντός μιας περιοχής 1cM, στο 10q23 - q24 (Wang *et al*, 1997).



Εικ. 3: Αναφορά σε γενετικές ασθένειες που χαρτογραφούνται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23- q25. Στο κέντρο, τμήμα του γενετικού χάρτη IMBB (εικ. 2), της περιοχής 10q23-q25, στον οποίο έχει τοποθετηθεί υποσύνολο των γενετικών δεικτών που τον συγκροτούν. Οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το εύρος των χρωμοσωμικών περιοχών στις οποίες χαρτογραφούνται γονίδια που σχετίζονται με εμφάνιση νόσων. Αριστερά, στο ιδεόγραμμα του χρωμοσώματος 10, φαίνεται ο διαχωρισμός του σε χρωμοσωμικές ζώνες.

Φυσική χαρτογράφηση της χρωμοσωμικής περιοχής 10q23 - q25

Για την ταυτοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με ασθένειες, όπως αυτές που προαναφέρθηκαν, απαραίτητη είναι η φυσική χαρτογράφηση της αντίστοιχης χρωμοσωμικής περιοχής. Για τη χρωμοσωμική περιοχή 10q23-q25, έχουν αναφερθεί κυτταρογενετικοί και φυσικοί χάρτες (χωρίς, με μικρά ή μεγαλύτερα κενά στην αλληλοεπικάλυψη των κλώνων) που καλύπτουν περιοχές του χρωμοσώματος που έχουν ενοχοποιηθεί για κάποια ασθένεια ή άλλες ενδιαφέρουσες περιοχές. Όλα αυτά τα contigs, έχουν φυσικό μήκος τουλάχιστον 1Mb και μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα από τους φυσικούς χάρτες που έχουν κατασκευαστεί και καλύπτουν όλο το ανθρώπινο γονιδίωμα. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί η κατασκευή των παρακάτω:

- Στην περιοχή απώλειας ετεροζυγωτίας για τον καρκίνο του προστάτη 10q23.3 - q24, έχει κατασκευαστεί ένα προκαταρκτικό contig κλώνων YAC και PAC, συνολικού μήκους περίπου 800Kb (Kokkinaki M *et al*, 1997).
- Για τις περιοχές 10p15, 10p11, 10q24 - q25 έχει δημιουργηθεί ένας φυσικός χάρτης μεγάλου μήκους (20-25Mb), μικρής όμως σχετικά διακριτικής ικανότητας, που περιλαμβάνει μία σειρά κλώνων μεγα - YAC, PAC, BAC και κοσμιδίων (Call K M *et al*, 1997).
- Για τις χρωμοσωμικές περιοχές 10p15, 10p11 και 10q24-q25 έχουν κατασκευαστεί μεγάλης διακριτικής ικανότητας φυσικοί χάρτες, από τους Little *et al* (1997). Από την ίδια ομάδα, όσον αφορά τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, εστίαση γίνεται στους αλληλοεπικαλυπτόμενους κλώνους, συνολικού μήκους περίπου 7,5Mb, της περιοχής 10q24 - q25 (βλ.: <http://www.cric.com>).
- Στην κρίσιμη περιοχή για την εκτροδακτυλία τύπου 3, έχει αναφερθεί η κατασκευή ενός contig με κλώνους YAC μήκους περίπου 7,5Mb (Nobile *et al*, 1997), ενώ η περιοχή για την νοτιαιοπαραγκεφαλιδική αταξία, έχει καλυφθεί από ένα άλλο contig (Nikali *et al*, 1997). Και οι δύο παραπάνω περιοχές χαρτογραφούνται στο 10q24.
- Στην περιοχή του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος έχουν εστιαστεί οι Albarosa *et al* (1997), ενώ στο 10q25, έχει αναφερθεί, επίσης, η δημιουργία contig από τους Hewett *et al*, 1997.

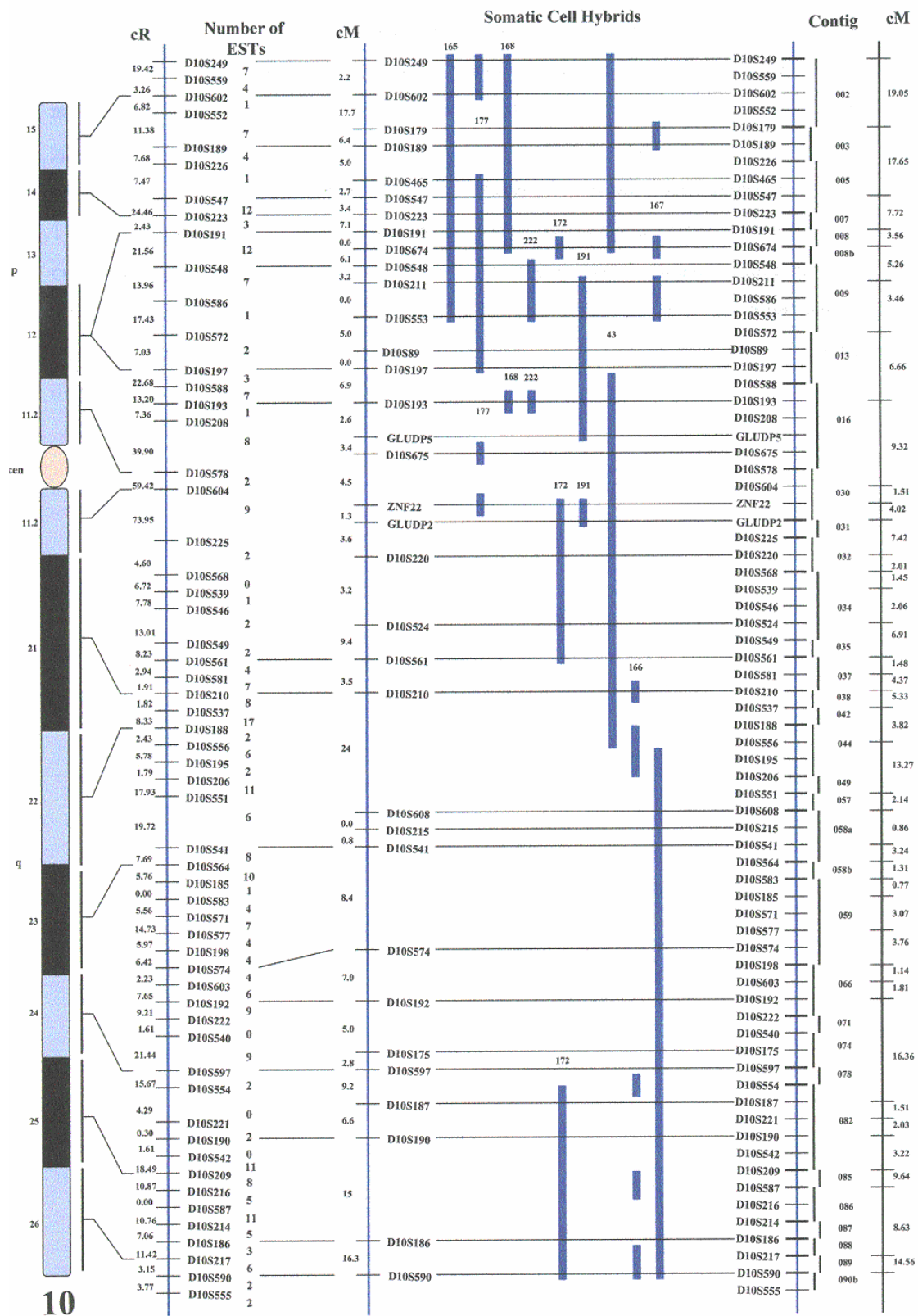
Σκοπός της εργασίας

Ένα σημαντικό μέρος της τρέχουσας δραστηριότητας του εργαστηρίου μας εστιάζεται στην κατασκευή ενός ολοκληρωμένου γονιδιωματικού χάρτη στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23 - q25. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η συμβολή στην κατασκευή ενός φυσικού χάρτη στη χρωμοσωμική περιοχή 10q24 / q25.1, η προσπάθεια προσδιορισμού και απομόνωσης κωδικών αλληλουχιών σ' αυτήν την περιοχή καθώς και η συσχέτιση όσο το δυνατόν περισσότερων προϋπαρχόντων ESTs σε γενωμικούς κλώνους αυτής ή της ευρύτερης χρωμοσωμικής περιοχής.

Η εργασία αυτή στηρίχθηκε στον προκαταρκτικό συνδυαστικό χάρτη του χρωμοσώματος 10, όπου ενσωματώνονται τρέχοντα δεδομένα γονιδιωματικής χαρτογράφησης. Αυτός ο χάρτης (Εικ. 4) σχεδιάστηκε πρόσφατα, συνδυάζοντας τα δεδομένα ενός φυσικού (Call *et al*, 1997), ενός μεταγραφικού (Deloukas *et al*, 1997), ενός γενετικού (IMBB) και ενός χάρτη σωματικών υβριδίων (βλ. Meitenger *et al*, 1997 και Marzella *et al*, 1997). Η πιστότητά του προκύπτει από το γεγονός ότι, αν και οι επιμέρους χάρτες κατασκευάστηκαν με διαφορετικές προσεγγίσεις, η διάταξη των δεικτών τους συμπίπτει καθ' όλο το μήκος του χρωμοσώματος. Στο συνδυαστικό χάρτη έχουν τοποθετηθεί χρωμοσωμοειδικά κυτταρικά υβρίδια, ESTs που έχουν χαρακτηριστεί με γενετικούς δείκτες καθώς και contigs κλώνων YAC, PAC, BAC και κοσμιδίων. Ο χάρτης αυτός γεφυρώνει όλες τις παρούσες πληροφορίες χαρτογράφησης και καλύπτει ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών επιπέδων διακριτικής ικανότητας (κυτταρογενετικό, γενετικό και φυσικό επίπεδο).

Για την πραγματοποίηση του σκοπού της εργασίας αυτής, χαρακτηρίστηκαν κλώνοι YAC της χρωμοσωμικής περιοχής 10q24/q25.1, οι οποίοι είχαν προηγουμένως απομονωθεί με διερεύνηση βιβλιοθήκης YAC βάσει των γενετικών δεικτών που περιείχαν, και κλώνοι PAC, της ίδιας περιοχής, οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε επιμέρους contigs βάσει των αλληλοεπικαλύψεων που εμφανίζουν τα προϊόντα τεμαχισμού τους (fingerprinting contigs). Ακολούθησε προσπάθεια ανίχνευσης γονιδίων, με διάφορες μεθόδους, αλλά έμφαση δόθηκε, κυρίως, στη λεπτομερή

φυσική χαρτογράφηση της ευρύτερης χρωμοσωμικής περιοχής 10q24-q25, όπου φαίνεται πως εντοπίζονται περισσότερα του ενός ογκοκατασταλτικά γονίδια, γονίδια που σχετίζονται με νευροεκφυλιστικά σύνδρομα, αναπτυξιακές ανωμαλίες, κ.λπ. Γι' αυτόν το λόγο, απομονώθηκε μεγάλος αριθμός γενωμικών κλώνων BAC, βάσει του περιεχομένου τους σε ESTs που χαρτογραφούνται ομοιόμορφα κατά μήκος της χρωμοσωμικής περιοχής 10q24 - 25.1. Η συλλογή των κλώνων BAC που απομονώθηκε υπολογίζεται πως καλύπτει πολλαπλά την εν λόγω περιοχή, μήκους 11cM. Στόχος είναι ο εμπλουτισμός της συλλογής των κλώνων από την ίδια και την ευρύτερη χρωμοσωμική περιοχή και η κατασκευή ενός ενιαίου contig που θα καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της ζώνης 10q23 - 25.1 και που θα συνεισφέρει, αφενός στον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της, αφετέρου στην ανάλυση των γονιδίων που περιέχει.



Sanger Center

IMBB

GTC

Εικ. 4: Ένας ολοκληρωμένος χάρτης του χρωμοσώματος 10. Οι αποστάσεις σε cM ή σε cR

δεν είναι σε κλίμακα. Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν τους γενετικούς δείκτες που είναι

κοινοί στους τρεις χάρτες. Οι κάθετες μπλε γραμμές δείχνουν σωματικά κυτταρικά υβρίδια, που περιέχουν τμήματα του χρωμοσώματος 10. Αριστερά, φαίνεται το ιδεόγραμμα του χρωμοσώματος 10 και, ενδεικτικά, η κυτταρογενετική θέση κάποιων δεικτών (ανατύπωση από την αναφορά του 2ου διεθνούς συνεδρίου για τη χαρτογράφηση του χρωμοσώματος 10 του ανθρώπου, 1997).

Υλικά και Μέθοδοι

1) Παρασκευή DNA από κύτταρα σακχαρομύκητα μετασχηματισμένα με YACs και εγκλεισμός σε αγαρόζη (Agarose blocks)

Πρόκειται για μια μέθοδο παρασκευής, σε ήπιες συνθήκες, γενωμικού DNA σακχαρομύκητα, ώστε τα χρωμοσώματά του καθώς και το τεχνητό χρωμόσωμα YAC, που περιέχει, να διατηρηθούν σχεδόν ακέραια ως προς το μήκος τους (Chu *et al*, 1986). Στηρίζεται στη δράση του ενζύμου λυτικάση που λύει τα κυτταρικά τοιχώματα

του σακχαρομύκητα και στην παγίδευση των σφαιροπλαστών σε πήκτωμα αγαρόζης, όπου και δρα στη συνέχεια, η πρωτεΐνωση K. Η τελευταία, διασπά τα κυτταρικά υπολείμματα, αφήνοντας έτσι το γενωμικό DNA παγιδευμένο στην αγαρόζη. Το ποσοστό του ανθρώπινου γενωμικού ενθέματος (YAC), στο συνολικό DNA, είναι της τάξεως του 1%. Η απομόνωση του DNA από τα τεμάχια αγαρόζης γίνεται, στη συνέχεια, με την επίδραση αγκαράσης.

α) Παρασκευή τεμαχίων αγαρόζης με έγκλειστο το DNA του

σακχαρομύκητα

Διαδικασία

- Γραμμωτή επίστρωση κυτταρικού επιχρήσματος του ανασυνδυασμένου στελέχους σακχαρομύκητα σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό YPD⁻ και 1,5% άγαρ. (Τα στελέχη αυτά διατηρούνται σε θερμοκρασία -80°C παρουσία 20% γλυκερόλης).
- Επώαση των κυττάρων σε θερμοκρασία 30°C, για 48h περίπου, ώστε να σχηματιστούν ορατές αποικίες.
- Εμβολιασμός 40ml υγρού θρεπτικού υλικού YPD⁻ με μία μεμονωμένη αποικία σακχαρομύκητα.
- Επώαση της καλλιέργειας σε θερμοκρασία 30°C με ανάδευση στις 200 rpm, για 20h περίπου, ώσπου η οπτική πυκνότητα (O.D.) της καλλιέργειας σε μήκος κύματος 600nm, να φθάσει την τιμή 0,75.
- Αραίωση της καλλιέργειας με ίσο όγκο υγρού θρεπτικού υλικού YPD⁻ και επώασή της στις ίδιες συνθήκες, για λίγες ώρες επιπλέον, ώσπου η O.D. να ξαναφθάσει στην ίδια τιμή. Τιμή O.D. 0,3 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση $3,3 \times 10^6$ κύτταρα / ml καλλιέργειας.
- Φυγοκέντρωση της καλλιέργειας σε 4000 rpm, σε θερμοκρασία 4°C για 10min. Ο όγκος του ιζήματος είναι 100μl περίπου.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 900 μl Διαλύματος I.
- Προσθήκη 4 μl λυτικάσης (25mg/ml) και επώαση των κυττάρων με το ένζυμο, για 1 ώρα, στους 37°C.
- Προσθήκη στο διάλυμα των κυττάρων, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 40°C, ίσου όγκου διαλύματος αγαρόζης, χαμηλού σημείου τήξεως (2%). Το μίγμα αυτό

μοιράζεται σε ειδικά καλούπια με διαστάσεις 20 x 9 x 1.2 mm. Σε αυτή τη μορφή, αφήνεται να πήξει στους 4°C, για 15min. Το σχήμα αυτών των καλουπιών, διευκολύνει την μετέπειτα χρήση των τεμαχίων αγαρόζης, σε ηλεκτροφόρηση. Πολύ προσεγγιστικά, βάσει της οπτικής πυκνότητας και του μεγέθους του γενώματος του σακχαρομύκητα, κάθε σχηματιζόμενο τεμάχιο αγαρόζης περιέχει, περίπου, 2μg DNA.

- Επώαση των σχηματιζόμενων τεμαχίων αγαρόζης, για 16h σε Διάλυμα II.
- Επώαση για 48h σε διάλυμα λύσης, που περιέχει 2mg / ml πρωτεΐνάση K, το οποίο ανανεώνεται στις 24 ώρες, στους 50°C. Απομάκρυνση του διαλύματος λύσης.
- Ξέπλυμα και διατήρηση των τεμαχίων αγαρόζης, με το περιεχόμενο σ' αυτά DNA, σε διάλυμα T.E., στους 4 °C.

Υλικά

- Θρεπτικό YPD⁻ (7 g yeast nitrogen base w/o amino acids, 14 g casaminoacids, 20g glucose, 0.055g tyrosine, 0.055g adenine hemisulfate ανά λίτρο). Για στερεό θρεπτικό υλικό, προστίθενται επιπλέον των παραπάνω, 15g άγαρ/λίτρο.
- Διάλυμα I (1M sorbitol, 20 mM EDTA pH 8, 14 mM β-μερκαπτοαιθανόλη).
- Λυτικάση (25 mg/ml) (Biorad).
- Διάλυμα αγαρόζης: 0.2g αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (FMC, Nu Sieve) σε 10 ml Διαλύματος I χωρίς μερκαπτοαιθανόλη, βράσιμο του μίγματος, διατήρησή του στους 40°C και προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης, σε τελική συγκέντρωση 14 mM.
- Διάλυμα II (1 M σορβιτόλη, 20 mM EDTA pH 8, 10 mM Tris.Cl pH 7.5, 70 mM β-μερκαπτοαιθανόλη).
- Πρωτεΐνάση K (25 mg/ml) (Biorad).
- Διάλυμα λύσης: 1% sodium lauryl sarcosine, 0.5 M EDTA pH 8.
- Διάλυμα T.E.: 10 mM Tris.Cl pH 8, 1 mM EDTA pH 8.

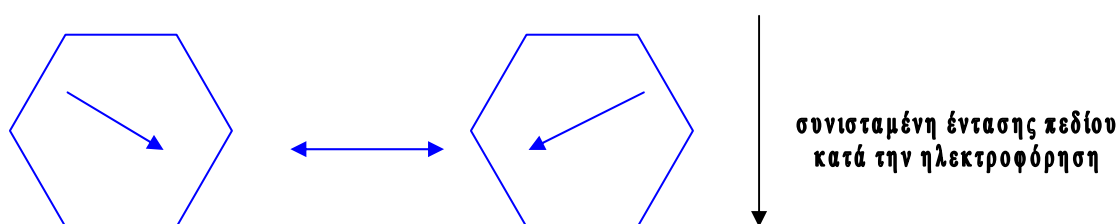
* Όλα τα παραπάνω διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν φρέσκα και αποστειρωμένα.

β) Επίδραση αγαράσης στα τεμάχια αγαρόζης για απομόνωση του έγκλειστου DNA

Εφαρμόζεται για την απομόνωση DNA σε υδατική μορφή. Η αγαράση διασπά την αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως, με την οποία έχουν παρασκευαστεί τα τεμάχια και την μετατρέπει σε ολιγοσακχαρίτες. Σκοπός της μεθόδου είναι η διευκόλυνση του χειρισμού του DNA στα μετέπειτα της παρασκευής του στάδια. Χρησιμοποιείται 1 unit αγαράσης (Boehringer Mannheim) ανά 100mg αγαρόζης (που έχει προηγουμένως διαλυτοποιηθεί με θέρμανση στους 65°C). Η αντίδραση επώάζεται για 2h στους 45°C, παρουσία κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος.

2) Ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (PFGE)

Η διακριτική ικανότητα των συμβατικών μεθόδων ηλεκτροφόρησης περιορίζεται σε μόρια DNA, μεγέθους έως 50 Kb. Για διαχωρισμό μεγαλύτερων μορίων, μέχρι και ολόκληρων χρωμοσωμάτων, χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (PFGE) (Schwartz DC *et al*, 1984). Η αρχή αυτής της μεθόδου είναι η επίτευξη ενός ομοιόμορφου ηλεκτρικού πεδίου, σε κάθε σημείο του πηκτώματος και καθ' όλη τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, καθώς και εναλασσόμενων ηλεκτρικών παλμών που σχηματίζουν μεταξύ τους βέλτιστη γωνία 120°. Το ηλεκτρικό πεδίο δημιουργείται από 24 ηλεκτρόδια σε διάταξη εξαγώνου, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να παράγεται, ανά μονάδα χρόνου, άνυσμα έντασης, της παρακάτω μορφής. Η συχνότητα εναλλαγής της διεύθυνσης του πεδίου μπορεί να ρυθμιστεί.



Η παραπάνω διάταξη είναι συνδεδεμένη σε σειρά με τροφοδοτική συσκευή και με σύστημα αντλίας, η οποία ανακυκλώνει το διάλυμα ηλεκτροφόρησης με ρυθμό 1 λίτρο / min.

Διαδικασία

- Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης PFGE (Biorad) τοποθετήθηκαν 2 λίτρα διαλύματος ηλεκτροφόρησης (0.5 x TBE). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση, απουσία του πηκτώματος, για 30 min ώστε να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία του συστήματος στους 12°C περίπου. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται στο δωμάτιο 4°C.
- Παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης, όγκου 100ml και συγκέντρωσης 1% σε αγαρόζη.
- Τα δείγματα μπορούν να είναι σε στερεά (τεμάχια αγαρόζης) ή υγρή μορφή. Στην πρώτη περίπτωση, τα τεμάχια αγαρόζης, με τους κλώνους που φέρουν, κόπηκαν ώστε να χωρούν στα πηγάδια του πηκτώματος και τοποθετήθηκαν εκεί, έτσι ώστε να περισεύει τουλάχιστον το 10% του ύψους της κάθε θέσης. Ο υπερκείμενος των δειγμάτων ελεύθερος χώρος σε κάθε θέση, συμπληρώθηκε με τηγμένη αγαρόζη, χαμηλού σημείου τήξεως, συγκέντρωσης 1%, επίσης. Αυτή αφέθηκε για 30min περίπου, σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να στερεοποιηθεί. (Στην περίπτωση δειγμάτων σε υγρή μορφή-διάλυμα ακολουθείται η συμβατική διαδικασία, με την αντλία ανακύκλωσης κλειστή κατά την διάρκεια της πρώτης ώρας της ηλεκτροφόρησης).
- Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων, ήταν: τάση πεδίου 180V, στους 12°C και με ρυθμιζόμενους χρόνους εναλλαγής ηλεκτρικού πεδίου, δηλαδή χρόνου που διαρκεί η φορά του ανύσματος του πεδίου. Αυτή η κατευθυνόμενη μεταβολή της διεύθυνσης του ανύσματος του ηλεκτρικού πεδίου, προκαλεί την αλλαγή της κατεύθυνσης των μορίων. Επειδή ο χρόνος που χρειάζεται κάθε μόριο για να αλλάξει το σχήμα του και να μετακινηθεί προς μία νέα κατεύθυνση, εξαρτάται από το μήκος του, είναι τελικά εφικτός ο άριστος διαχωρισμός μεταξύ διαφορετικού μεγέθους μορίων.
- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί χρώση του πηκτώματος σε υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου, συγκέντρωσης 0.5μg /ml, για χρόνο 30min και φωτογράφησή του κάτω από υπεριώδες φως.

Υλικά

- Σύστημα ηλεκτροφόρησης παλλόμενου πεδίου, Biorad Laboratories.
- Αγαρόζη FMC (SeaKem).
- Αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως FMC (Nu Sieve).
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 10mg/ml.
- Διάλυμα TBE 0.5% (45mM Tris base, 45mM boric acid, 20mM EDTA, pH 7.5).

3) Ανάλυση κατά Southern

α) Μεταφορά DNA σε νάιλον μεμβράνη

Η μεταφορά DNA από πήκτωμα αγαρόζης σε νάιλον μεμβράνη περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Southern και στηρίζεται σε τριχοειδή φαινόμενα (Southern M, 1975). Η χρήση νάιλον μεμβράνης Hybond N (Amersham), αντί νιτροκυτταρίνης, προτιμήθηκε εξαιτίας της ανθεκτικότητάς της και της ικανότητας να σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς με το DNA.

β) Υβριδοποίηση μεμβρανών με ραδιοσημασμένο DNA

Προϋβριδοποίηση

Η προϋβριδοποίηση των μεμβρανών, γίνεται για την αποφυγή της μη ειδικής σύνδεσης του ανιχνευτή, τόσο στα ίδια τα φίλτρα, όσο και σε μόρια που αυτά περιέχουν. Στην περίπτωση χρήσης μεμβρανών γενωμικών βιβλιοθηκών, η ανάγκη παρατεταμένης προϋβριδοποίησης είναι επιτακτικότερη, εξαιτίας της ύπαρξης μεγάλου αριθμού επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Αυτό επιτυγχάνεται αφενός με τα συστατικά του διαλύματος προϋβριδοποίησης, αφ' ετέρου με την επώαση των μεμβρανών με carrier DNA από ανθρώπινο πλακούντα, σπέρμα ρέγγας και E.coli, επεξεργασμένα με υπερήχους, ώστε να έχουν μέσο μήκος 1kb περίπου. Το DNA αυτό χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 100μg ανά ml

διαλύματος προϋβριδοποίησης, το καθένα. Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, εναλλακτικά, είναι:

Διάλυμα Α: 50% φορμαμίδιο, 0.1% Denhardt (0.1g BSA, 0.1g Polyvinyl pyrrolidone/ PVP 40, 0.1g Ficoll ανά 100ml H₂O), 6x SSC (0,9M NaCl, 0,09M κιτρικό νάτριο), 0.5% SDS, 5% dextran sulfate, για υβριδοποίηση σε θερμοκρασία 42°C.

Διάλυμα Β: 7% SDS, 100mM NaH₂PO₄, 50mM Na₄P₂O₇, 10mM EDTA, 1% BSA, για υβριδοποίηση σε θερμοκρασία 65 - 67 °C (Church and Gilbert, 1984).

Οι ποσότητες των αντίστοιχων carrier-DNAs προστίθενται στο διάλυμα προϋβριδοποίησης, το οποίο έχει προθερμανθεί στην αντίστοιχη θερμοκρασία, αποδιατεταγμένοι. Η διάρκεια της προϋβριδοποίησης είναι 6 - 16h στους 42°C και 3h στους 65 - 67 °C και πραγματοποιείται σε γυάλινους κυλίνδρους.

Παρασκευή DNA – φορέα από κύτταρα ανθρώπινου πλακούντα

Ο ιστός, αμέσως μετά την απομόνωσή του, πλένεται με φυσιολογικό ορό και διατηρείται σε τεμάχια όγκου 25cm³ περίπου (-80°C). Για την παρασκευή φορέα – DNA, χρησιμοποιούνται συνήθως δύο τέτοια τεμάχια. Η απομόνωση γενωμικού DNA από τον ιστό και ο τεμαχισμός του, γίνονται με τον ακόλουθο τρόπο:

- Κονιορτοποίηση του ιστού με ομογενοποιητή διατηρώντας τον συνεχώς παγωμένο με προσθήκη υγρού N₂.
- Προσθήκη διαλυμάτων TSE (150mM NaCl, 100mM EDTA pH 8, 20mM Tris.Cl pH 8) και SDS (20%) σε τελική συγκέντρωση 1% το τελευταίο. Διαλυτοποίηση του κονιορτοποιημένου ιστού, με θέρμανση ανά τακτά χρονικά διαστήματα στους 65°C. Απαιτούνται 100 ml περίπου διαλύματος TSE ανά τεμάχιο ιστού.
- Επώαση με πρωτεΐνωση K (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 100μg / ml, σε θερμοκρασία 65°C για 20h περίπου.
- Εκχύλισεις με ίσους όγκους ουδέτερης κορεσμένης με T.E. φαινόλης, μέχρι το σχηματισμό καθαρής μεσόφασης. Εκχύλιση με μίγμα ουδέτερης φαινόλης/ χλωροφορμίου και χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (αναλογία όγκων: 24/1)
- Κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη διαλύματος CH₃COONa (3M, pH 5,2) σε

τελική συγκέντρωση 10% κατ' όγκο και απόλυτης αιθανόλης σε τελική συγκέντρωση 70%. Η συλλογή του DNA, στη μορφή ινιδίων, γίνεται με βοήθεια πιπέττας Pasteur.

- Εξάτμιση της υγρής φάσης και επαναδιάλυση του DNA σε 20 ml περίπου διαλύματος T.E. (10mM Tris.Cl pH 7,5, 1mM EDTA pH 8). Η επαναδιάλυση γίνεται με ήπια συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C και μπορεί να διαρκέσει μέχρι και δύο ημέρες, εξαιτίας της ύπαρξης μεγαλομοριακών μορίων DNA. Η πλήρης επαναδιάλυση είναι απαραίτητη για το επόμενο στάδιο της κατεργασίας με υπέρηχους, έτσι ώστε η θραύση των μορίων να είναι ομοιόμορφη.
- Επεξεργασία με υπέρηχους. Εμπειρικά, ο ιδανικός χρόνος για την παραγωγή τεμαχίων DNA μεγέθους 200 – 1500bp, υπολογίζεται σε τρεις επαναλήψεις των 10sec η καθεμία (40% cycle actif, 5 microtip limit), με ανάμιξη του διαλύματος πριν από κάθε επανάληψη.
- Έλεγχος των μεγεθών των τεμαχίων που προκύπτουν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, συγκέντρωσης 1%. Υπολογισμό της συγκέντρωσης με ηλεκτροφόρηση (εμπειρικά) σε σύγκριση με δείγμα DNA γνωστής συγκέντρωσης και με φωτομέτρηση.
- Τρίωρη επώαση με RNAση στους 37°C, σε τελική συγκέντρωση 50μg / ml.
- Διαδοχική εκχύλιση με ουδέτερη φαινόλη, μίγμα φαινόλης / χλωροφορμίου και χλωροφορμίου / ισοαμυλικής αλκοόλης. Κατακρήμνιση και επαναδιάλυση, με τον τρόπο που αναφέρθηκε ανωτέρω, σε τελική συγκέντρωση 10mg/ml. Η επεξεργασία δύο τεμαχίων ιστού καταλήγει στην παρασκευή 10-20 ml διαλύματος της παραπάνω συγκέντρωσης.

Υβριδοποίηση

Κατά την υβριδοποίηση, η συγκέντρωση του ανιχνευτή στο διάλυμα υβριδοποίησης, είναι της τάξεως των 10⁶cpm / ml. Όταν πρόκειται για υβριδοποίηση ανθρώπινων γενωμικών βιβλιοθηκών, όπου η πολυπλοκότητα είναι μεγαλύτερη, η παραπάνω τιμή της συγκέντρωσης του ανιχνευτή, διπλασιάζεται. Επιπλέον, για τον ίδιο λόγο που γίνεται και η παρατεταμένη προϋβριδοποίηση, ο ανιχνευτής, στην τελευταία περίπτωση, υφίσταται τρίωρη προαναδιάταξη, παρουσία ανθρώπινου DNA - φορέα. Το διάλυμα υβριδοποίησης είναι ίδιο μ' αυτό της προϋβριδοποίησης, με την

επιπλέον προσθήκη του ανιχνευτή. Η διάρκεια της υβριδοποίησης είναι περίπου 18 ώρες.

Πλύσιμο φίλτρου

Το πλύσιμο των μεμβρανών γίνεται στις παρακάτω συνθήκες χρόνου και συγκέντρωσης αλάτων:

Για το διάλυμα υβριδοποίησης A: 2x SSC (2 x 10min), 2x SSC, 0.5% SDS (2 x 15min), 0.5% SSC, 0.5% SDS (2 x 30min), 0.1% SSC, 0.5% SDS (2 x 30min). Τα τελευταία πλυσίματα δεν είναι απαραίτητα εφόσον οι κρούσεις που ανιχνεύονται με μετρητή ραδιενέργειας Geiger στην επιφάνεια των φίλτρων είναι εντοπισμένες και χαμηλής έντασης

Για το διάλυμα υβριδοποίησης B: 5% SDS, 0.3M NaCl, 20mM NaH₂PO₄, 10mM Na₄P₂O₇, 2mM EDTA, αλλαγή του διαλύματος ανά 20min και παρακολούθηση των κρούσεων του ανιχνευτή στην επιφάνεια των μεμβρανών.

Τα πλυσίματα γίνονται σε θερμοκρασία δωματίου, με διαλύματα που έχουν προθερμανθεί στους 65 °C.

Έκθεση

Η έκθεση των φίλτρων μπορεί να διαρκέσει από 1 ώρα έως και 3-4 ημέρες, ανάλογα με την αναμενόμενη ένταση του σήματος. Γίνεται παρουσία ειδικής οθόνης ενίσχυσης σήματος σε θερμοκρασία -80 °C. Ακολουθεί αυτοραδιογραφία.

Έκπλυση φίλτρου

Γίνεται για την απομάκρυνση των μορίων του ανιχνευτή, που σχημάτισαν υβρίδια, από την επιφάνεια των μεμβρανών, με τα εξής διαλύματα: 0.4N NaOH για 20min, 5x SSC για 10min. Οι μεμβράνες διατηρούνται, στη συνέχεια, στους 4 °C, παρουσία ελάχιστης υγρασίας.

4) Ραδιοσήμανση νουκλεϊκών οξέων με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινήτων (*random priming*)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη ραδιοσήμανση γραμμικού DNA (αποδιαταγμένου ή μονόκλωνου). Το ένζυμο της DNA πολυμεράσης I της *E. coli* και συγκεκριμένα το κλάσμα Klenow, αντιγράφει τη μονόκλωνη αλυσίδα, παρουσία ραδιοσημασμένων νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται στη θυγατρική αλυσίδα. Η ραδιενεργά σημασμένη παραγόμενη αλυσίδα, σχηματίζεται αποκλειστικά και μόνο με επέκταση εκκινήτων, γιατί η 5'-3' εξωνουκλεοτιδική δράση του ενζύμου είναι ελάχιστη. Η δράση αυτή ελαχιστοποιείται περισσότερο σε τιμή pH 5.5. Οι εκκινήτες που χρησιμοποιούνται είναι ετερογενείς ως προς την αλληλουχία τους και γι'αυτό σχηματίζουν σε διάφορες τυχαίες θέσεις υβρίδια με το υπόστρωμα.

Διαδικασία

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι σύμφωνα με τους Goulian M *et al*, 1969 και Maniatis T *et al*, 1989.

- Ποσότητα υποστρώματος 100ng ρυθμίζεται στον όγκο των 7,5μl.
- Το DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 100°C για 2min και τοποθετείται στον πάγο για 1min, για να μην επαναδιαταχθεί.
- Στιγμιαία φυγοκέντρηση του DNA για την κατακρήμνιση των υδρατμών.
- Στα 7,5μl DNA προστίθενται: 11,5μl 2 x LS, 1 μl BSA, 1 μl Klenow, 2 μl [α -³²P] dATP, 2μl [α -³²P] dCTP (800Ci/mmol, 10μCi/μl, Amersham).
- Επώαση στους 37 °C για 3-4 h ή σε θερμοκρασία δωματίου για 12-16 h.
- Απομάκρυνση των ελεύθερων ραδιοσημασμένων μονονουκλεοτιδίων από το ραδιοσημασμένο υπόστρωμα με χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη Sephadex G-50 superfine (Pharmacia).
- Μέτρηση ειδικής ενεργότητας μετά από κατακρήμνιση με τριχλωροξικό οξύ (TCA). Η ειδική ενεργότητα του ανιχνευτή πρέπει να είναι της τάξεως του 10⁸ cpm/μg ενώ η συγκέντρωσή του στο διάλυμα υβριδοποίησης κυμαίνεται από 10⁶

έως 2×10^6 cpm ανά ml. Ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής αποδιατάσσεται με βρασμό για 5min πριν προστεθεί στο διάλυμα υβριδοποίησης.

Εκτίμηση της ειδικής ενεργότητας με τη μέθοδο της κατακρήμνισης με TCA

Μετά την απομάκρυνση των μη ενσωματωμένων στο DNA, ραδιοσημασμένων πρόδρομων νουκλεοτιδίων, με χρωματογραφία μοριακής διήθησης, 1μl δείγματος, τοποθετείται σε φίλτρο Whatman μαζί με 10μg DNA - φορέα. Έτσι, μόρια DNA, μεγαλύτερα των 50 νουκλεοτιδίων, κατακρημνίζονται στην επιφάνεια του φίλτρου. Το φίλτρο ξεπλένεται με 10% TCA για 10 min. Μ'αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται τα ελεύθερα ραδιενεργά νουκλεοτίδια. Στη συνέχεια, το φίλτρο ξεπλένεται με παγωμένη ακετόνη για 10 min και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να εξατμιστεί η υγρή φάση.

Ως ειδική ενεργότητα ορίζεται το ποσό της ραδιενέργειας σε cpm (κρούσεις ανά λεπτό), που ενσωματώνεται σε 1μg μορίου- ανιχνευτή. Η μέτρηση των κρούσεων γίνεται με σπινθηρομετρητή. Για τη μέτρηση των συνολικών κρούσεων του δείγματος χρησιμοποιείται ένα φίλτρο Whatman με 1μl ραδιοσημασμένου μορίου, που δεν έχει υποστεί κατακρήμνιση TCA. Η ένδειξη του μετρητή πολλαπλασιάζεται με 2,5, συντελεστής που χρησιμοποιείται επειδή η μέτρηση γίνεται απουσία υγρού σπινθηρομέτρησης (τολουένιο).

Οι συνολικές κρούσεις του δείγματος είναι:

Συνολικές κρούσεις = cpm για 1μl δείγματος x όγκος δείγματος σε μl x 2.5

Η ειδική ενεργότητα, εμπειρικά, μετριέται ως εξής:

Ειδική ενεργότητα = cpm ενσωματωμένα σε 100ng ανιχνευτικού μορίου x 10.

Υλικά

- Υπόστρωμα DNA: Για κάθε αντίδραση όγκου 25μl, 100 ng DNA.

- Διάλυμα O.L: 1 mM Tris.Cl pH 7.5, 1mM EDTA, 90 O.D units εξαμερή ολιγονουκλεοτίδια, που χρησιμεύουν ως εκκινητές για την πολυμεράση.
- Διάλυμα DTM: 100 μ M dGTP, 100 μ M dTTP, σε TM (250mM Tris.Cl pH 8.0, 25mMgCl₂, 50mM β -μερκαπτοαιθανόλη). Περιέχει τα μη σημασμένα νουκλεοτίδια dGTP και dTTP.
- [α -³²P] dATP και [α -³²P] dCTP (800Ci / mmol, 10 μ Ci / μ l) ραδιενεργά ισότοπα.
- Διάλυμα 2 x LS: 1M HEPES pH 6.6: DTM: OL σε αναλογία 25:25:7.
- BSA (Bovine Serum Albumin) 10mg/ml.
- Klenow fragment (5units/ μ l).

5) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Με την αντίδραση PCR επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός μιας μικρής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, περισσότερο από 10⁶ φορές, με τη χρήση μιας πολυμεράσης του DNA, η οποία είναι σταθερή στις υψηλές θερμοκρασίες στις οποίες πραγματοποιείται η αντίδραση (Taq πολυμεράση) και κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών, εκατέρωθεν της αλληλουχίας - στόχου.

Υλικά

Υπόστρωμα DNA: Χρησιμοποιούνται 60ng ανθρώπινου γενωμικού DNA ή γενωμικού DNA σακχαρομύκητα που περιέχει ένα YAC, ή 20 ng DNA κλώνων PAC.

Εκκινητές: Χρησιμοποιούνται από λυοφιλοποιημένα στοκ, σε αρχική συγκέντρωση 100-200 ng. Μετά την επαναδιάλυσή τους σε αποστειρωμένο, απιονισμένο H₂O και την απομάκρυνση των διαφόρων αλάτων μέσω χρωματογραφικής στήλης μοριακής διήθησης, Sephadex G-25 super fine (Pharmacia), ποσοτικοποιούνται, με φωτομέτρηση στα 260nm. Η καθαρότητά τους ελέγχεται με φωτομέτρηση στα 280nm, όπου απορροφούν οι πρωτεΐνες και με

υπολογισμό του λόγου $O.D._{260} / O.D._{280}$, ο οποίος πρέπει να έχει τιμή μεταξύ 1.6 - 2.0. Τελικά, οι εκκινητές αραιώνονται συνήθως σε συγκέντρωση 100ng / μ l και σε κάθε αντίδραση PCR, χρησιμοποιούνται 100 ng από τον καθένα. Τα μονονουκλεοτίδια dATP, dCTP, dGTP, dTTP χρησιμοποιούνται στην αντίδραση σε τελική συγκέντρωση 0,25mM το καθένα.

Η ονομασία και η αλληλουχία των εκκινητών καθώς και οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR, που πραγματοποιήθηκαν, φαίνονται στον Πίνακα 1. Στον 1α περιλαμβάνονται οι εκκινητές Alu και στον 1β οι εκκινητές που αναγνωρίζουν μικροδορυφορικούς γενετικούς δείκτες.

Αλβουμίνη (BSA): Βοηθάει στη σταθεροποίηση και στη δράση της πολυμεράσης και χρησιμοποιείται στην αντίδραση σε συγκέντρωση 100 μ g/ml.

Ρυθμιστικό διάλυμα (10 x Taq buffer): Περιέχει 1M Tris.Cl pH 8.3, 15mM MgCl₂, 1M KCl. Κατά την αντίδραση, αραιώνεται 10 φορές. Το Tris.Cl, ρυθμίζει το pH της αντίδρασης, το KCl ευνοεί την υβριδοποίηση εκκινητή - αλληλουχίας στόχου, ενώ τα ιόντα Mg⁺⁺, που μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε τελική συγκέντρωση μέχρι και 2,5 mM, είναι απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης.

Taq πολυμεράση (Minotech, USB ή Cetus): Προστίθεται 1 μονάδα ενζύμου σε κάθε αντίδραση πολυμερισμού

Διαδικασία

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η συμβατική (Saiki *et al*, 1988), σε τελικό όγκο αντίδρασης 10 - 25 μ l, σε θερμοανακυκλωτή Biometra ή Perkin-Elmer.

6) Απομόνωση DNA από κλώνους PAC

Η απομόνωση DNA από τους κλώνους PAC έγινε με μία παραλλαγή της κλασικής αλκαλικής λύσης (Birnboim HC *et al*, 1979). Η διαδικασία που περιγράφεται αναφέρεται σε μικρής κλίμακας παρασκευή DNA (όγκος βακτηριακής

καλλιέργειας 30ml) αλλά μπορεί να προσαρμοστεί κατάλληλα για μεγαλύτερους ή μικρότερους όγκους καλλιέργειας.

- Γραμμωτή επίστρωση κυτταρικού επιχρήσματος του ανασυνδυασμένου κλώνου PAC σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό LB που περιέχει ως μάρτυρα επιλογής καναμυκίνη σε συγκέντρωση 25μg/ml. Επώαση των κυττάρων στους 37°C για 16h, ώστε να σχηματιστούν ορατές αποικίες.
- Εμβολιασμός 30ml υγρού θρεπτικού υλικού LB (με 25μg/ml καναμυκίνη) με μία μεμονωμένη αποικία και επώαση της καλλιέργειας στους 37°C με ανάδευση στις 225rpm για 16h.
- Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε δοκιμαστικό σωλήνα Corex (30ml) στις 12000rpm για 1min και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 5ml διαλύματος P1 (15mM Tris.Cl pH 8, 10mM EDTA).
- Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος P2 (0,2N NaOH, 1% SDS), ήπια ανάμιξη και επώαση σε πάγο για 15min.
- Προσθήκη 5ml διαλύματος P3 (50ml διαλύματος περιέχουν: 30ml 5M CH₃COOK, 5,75 ml CH₃COOH, 15,25 ml H₂O), ήπια ανάμιξη και επώαση σε πάγο για 15min.
- Φυγοκέντρηση στις 12000rpm, στους 4°C για 15min και επανάληψη της φυγοκέντρωσης στο απομονωμένο υπερκείμενο διάλυμα.
- Κατακρήμιση του DNA με προσθήκη ισοπροπανόλης (όγκου ίσου με το 80% του όγκου του διαλύματος) και επώαση σε θερμοκρασία -80°C για 30min ή στους -20°C για χρόνο > 16h. Φυγοκέντρηση στις 12000rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 20min.
- Πλύσιμο του ιζήματος DNA με 1ml αιθανόλης 70% και επαναδιάλυση σε 100μl T.E. Η επαναδιάλυση διαρκεί τουλάχιστον 2h στους 4°C, εξαιτίας της ύπαρξης μεγαλομοριακών μορίων DNA.
- Επίδραση RNAσης σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml για 30min στους 37°C και απομάκρυνσή της με εκχύλιση με ίσους όγκους ουδέτερης φαινόλης, φαινόλης/χλωροφορμίου, χλωροφορμίου διαδοχικά. Τελική κατακρήμιση του DNA με προσθήκη 1/10 του όγκου διαλύματος CH₃COONa συγκέντρωσης 3M και pH 5,2 και 2,5 όγκους απόλυτης αιθανόλης. Επώαση, φυγοκέντρηση και επαναδιάλυση όπως αναφέρθηκε ανωτέρω.

Πιν. 1: Ονομασία, αλληλουχίες εκκινητών και συνθήκες αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκαν.

Πιν. 1α: Εκκινητές Alu

ΟΝΟΜΑ ΠΟΛ/ΝΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΥΒΡΙΔΟΠ. (°C)
Alu S	5'-GAG GTT GCA GTG AGC CGA GAT-3'	58
Alu J	5'-GAG GCT GCA GTG AGC CGT GAT-3'	58
Alu 4723	5'-GAG GGT TTC ACG ACC CTA ATG TCC-3'	58
Alu end	5'-ACA GAG CGA GAC TCC GTC TC-3'	58
CL-1	5'-AGG GTT TCA CGA CCC TAA TGT CC-3'	37
CL-2	5'-ACT GCA CTC CAG CCT GGG-3'	37
Alu 450	5'-AAA GTG CTG GGA TTA CAG G-3'	55
Alu 451	5'-GTG AGC CGA GAT GGC GCC ACT GCA CT-3'	55
Alu 3'	5'-GAT CGC GCC ACT GCA CTC C-3'	55
Alu 5'	5'-GGA TTA CAG GCG TGA GCC AC-3'	55
CL-3	5'-GTT GGC CAG GCT GGT CT-3'	55
t-54	5'-TGC ACT CCA GCC TGG GCA ACA-3'	55
Alu 153	5'-GGG ATT ACA GGC GTG AGC CAC-3'	55

Πιν. 1β: Εκκινητές πολυμορφικών γενετικών δεικτών

D10S597	F: GAA TGA AGA CAT CCA GAG G-3' R: GCA AGT ATC AGA AAC CCA A-3'	60
D10S2312	F: TTA GCC AGG TTT GGT GAC TC-3' R: TGC TGG CAA TTC GGA CAT AG-3'	60
D10S2330	F: AGA GTT GGC AGC TCC CAT TC-3' R: AGT TCC CAC CAT CAC AGG AC-3'	62
D10S2310	F: TGC TAG ATG ACG AGT TAG TG-3' R: CTT GAC CTT CTC TCT TTA ACC-3'	58
D10S187	F: CCC TGA TAG GCA CTC ATG TG-3' R: TTC CTC ATA ACC TCC GCT TC-3'	57
D10S 1156	F: ATA GGC TCA GAG GTA AGA ATG-3'	57

7) Παγίδευση εξονίων (*exon trapping*)

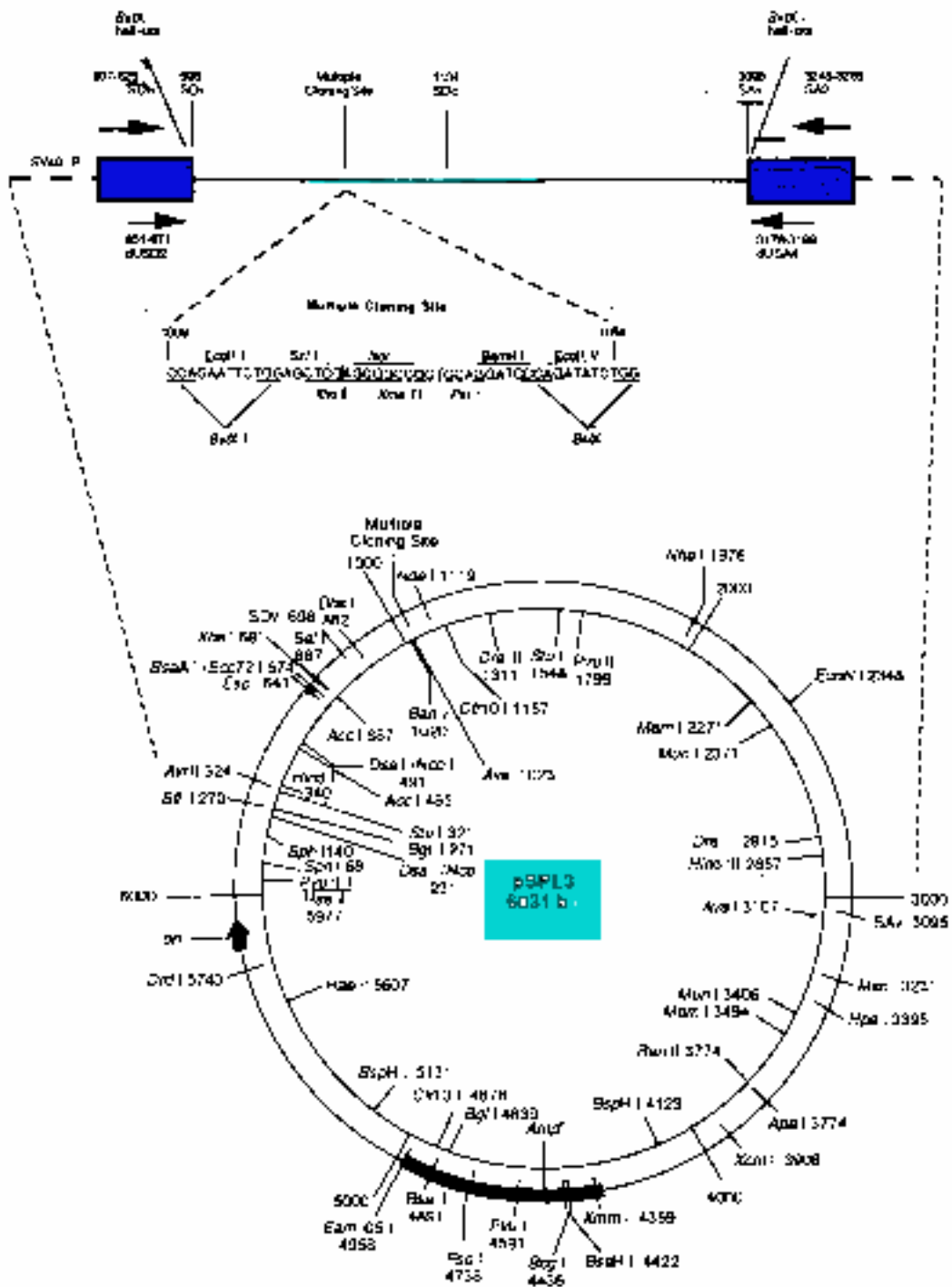
Στους ευκαριωτικούς οργανισμούς οι περισσότερες κωδικές αλληλουχίες διαχωρίζονται με ιντρόνια. Τα γονίδια μεταγράφονται στον πυρήνα σαν πρώιμα mRNA και τα ιντρόνια απομακρύνονται με τη διαδικασία της συναρμογής (splicing). Στη συνέχεια, το προκύπτον mRNA, που αποτελείται από συνεχόμενα εξόνια, μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα. Η συναρμογή πραγματοποιείται με το spliceosome, έτσι ώστε να συνδέονται ομοιοπολικά η 5' με την 3' θέση συναρμογής. Οι θέσεις αυτές βρίσκονται σε συντηρημένες περιοχές ολιγονουκλεοτιδίων. Η συντηρημένη (consensus) αλληλουχία 5' δότης - θέση συναρμογής είναι AG/GTRAGT ενώ η 3' θέση - δέκτης, είναι NCAG/G.

Η μέθοδος της παγίδευσης εξονίων είναι μία τεχνική για την απομόνωση μεταγραφόμενων αλληλουχιών από γενωμικό DNA που στηρίζεται στην παραπάνω περιγραφείσα διαδικασία συναρμογής (Church DM *et al*, 1994). Μ'αυτήν έχει απομονωθεί ποικιλία σημαντικών γονιδίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, το γονίδιο για την ασθένεια Huntington (Mac Donald M *et al*, 1993). Η μέθοδος αναπτύχθηκε από τους Buckler *et al*, το 1991 και αργότερα βελτιώθηκε. Κατ' αυτήν απομονώνονται από κλωνοποιημένα γενωμικά τμήματα, εξονιακές αλληλουχίες μέσω επιλογής των 5' και 3' θέσεων συρραφής, οι οποίες είναι λειτουργικές στα κύτταρα COS-7, τα οποία και χρησιμοποιούνται κατ'αυτήν. Αναλυτικότερα, η διαδικασία πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Επιλογή επτά κλώνων PAC της χρωμοσωμικής περιοχής 10q24 /q25.1. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν οι κλώνοι: # 30-C6, # 171-E5, # 119-I13, # 320-F13, # 74-O11, # 241-L17, # 317-D16.
- Απομόνωση DNA από τους παραπάνω κλώνους PAC, από 200ml βακτηριακής καλλιέργειας για τον κάθε κλώνο με την μέθοδο που περιγράφεται στην παρ. 6.
- Ηλεκτροφόρηση του DNA που απομονώθηκε ώστε να διαχωριστεί το πλασμιδιακό από το γενωμικό DNA, σε πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως και συγκέντρωσης 1%, χρησιμοποιώντας ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE (Tris- Borate -EDTA). Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης ήταν 20h με τάση

πεδίου 45V. Απομόνωση τεμαχίων αγαρόζης που περιέχουν το DNA των παραπάνω κλώνων και επίδραση αγαράσης ώστε να απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA σε υδατική μορφή.

- Τεμαχισμός των κλώνων με το περιοριστικό ένζυμο *Bst*YI. Η θερμοκρασία που πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ήταν 60°C, η διάρκειά της 20h, ενώ χρησιμοποιήθηκαν 20 units ενζύμου, για τον τεμαχισμό 2 – 6μg υποστρώματος. Η επιλογή του ενζύμου έγινε για τους εξής λόγους: 1) η θέση αναγνώρισής του (εξανουκλεοτίδιο), απαντάται με μέτρια συχνότητα στο ανθρώπινο γονιδίωμα, 2) τα προεξέχοντα άκρα που δημιουργεί το ένζυμο στα μόρια του DNA, είναι συμβατά με αυτά που δημιουργεί το περιοριστικό ένζυμο *Bam*HI, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για τον τεμαχισμό του φορέα pSPL3, ώστε να είναι δυνατή η μετέπειτα κλωνοποίηση.
- Έλεγχος των προϊόντων τεμαχισμού με ηλεκτροφόρηση δειγμάτων τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Υποκλωνοποίηση των προϊόντων τεμαχισμού των PACs στο φορέα pSPL3 (Εικ. 5), έτσι ώστε, εκατέρωθεν κάθε προϊόντος, να υπάρχουν οι δύο θέσεις συρραφής του φορέα. Η υποκλωνοποίηση των προϊόντων έγινε με αντίδραση λιγάσης, διαδοχικά για κάθε PAC. Στην αντίδραση προστέθηκαν τα εξής: 35ng DNA του φορέα pSPL3, 150 ng περίπου των προϊόντων τεμαχισμού, rATP σε συγκέντρωση 1,25mM, BSA σε συγκέντρωση 500μg / ml, ρυθμιστικό διάλυμα (N.E.Biolabs) και T4 DNA λιγάση (50units / αντίδραση, N.E.Biolabs).
- Μετασηματισμός των κατασκευών που προκύπτουν σε κύτταρα *E.coli* (DH10B), ικανά για διαμόλυνση (competent). Δειγματοληπτικός έλεγχος μερικών αποικιών που προκύπτουν από το μετασηματισμό των βακτηριακών κυττάρων, με αντίδραση PCR και με τους εκκινητές SD6 και SA2. Οι εκκινητές αυτοί υβριδοποιούνται με το φορέα pSPL3 (βλ. Εικ. 5) και παράγουν ως προϊόν PCR, το ένθεμα. Εμβολιασμός υγρού θρεπτικού LB (250ml) που περιέχει ως αντιβιοτικό επιλογής αμικικιλίνη σε συγκέντρωση 100μg/ml με όλες τις αποικίες που προκύπτουν από το μετασηματισμό των βακτηριακών κυττάρων. Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με κολώνες Qiagen.



Εικ. 5: Χάρτης του φορέα κλωνοποίησης pSPL3 που χρησιμοποιήθηκε στην μέθοδο της παγίδευσης εξονίων. Στο πάνω τμήμα της εικόνας, φαίνονται οι αλληλουχίες του γονιδίου tat του ιού HIV-1 που φέρει ο pSPL3 (τα εξόνια δηλώνονται με κουτιά, το ιντρόνιο με οριζόντια γραμμή, P: υποκινητής SV 40, SDv: θέση συναρμογής-δότης, SDc: κρυφή θέση συναρμογής, SAν: θέση συναρμογής-δέκτης). Με βέλη φαίνονται οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών. Αντί των dUSA4 και dUSD2 χρησιμοποιήθηκαν οι παραλλαγμένοι εκκινητές MDUSA4 και MDUSD2 που φέρουν στο 5' τους τις περιοριστικές θέσεις Xba I και EcoRI αντίστοιχα. Επίσης, φαίνεται η αλληλουχία DNA στις δυνατές θέσεις κλωνοποίησης (polylinker).

- Ποσοτικοποίηση και έλεγχος της ποιότητας του DNA που απομονώθηκε από κάθε κολώνα Qiagen με: 1) ηλεκτροφόρηση δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης και 2) με
- φωτομέτρηση σε μήκη κύματος 260nm και 280nm και υπολογισμό του λόγου των τιμών.
- Διαμόλυνση κυττάρων COS-7 (βλ. παρακάτω) με το DNA που απομονώθηκε και που ουσιαστικά είναι ένα μίγμα ανθρώπινων γενωμικών τμημάτων, κλωνοποιημένων στον pSPL3. Θεωρητικά, εφόσον το κλωνοποιημένο DNA περιέχει ένα ολόκληρο εξόνιο, σε σωστό προσανατολισμό, μπορεί να λάβει χώρα η διαδικασία της συρραφής μέσα στα κύτταρα COS-7 (βλ. Εικ. 5), ανάμεσα σε μία θέση συρραφής του φορέα και μία του ενθέματος.
- Καλλιέργεια των κυττάρων COS-7, απομόνωση ολικού RNA από αυτά με τη μέθοδο της ζέουσας όξινης φαινόλης (βλ. παρακάτω) και χρησιμοποίησή του ως μήτρα για τη σύνθεση συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA) με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση και με τον εκκινητή SA2, ειδικό για το φορέα. Ουσιαστικά, κατά την αντίστροφη μεταγραφή, επιλέγονται και συντίθενται ως cDNA μόνο τα ανθρώπινα μόρια DNA. Το ένα από τα 4 νουκλεοτίδια που προστίθενται στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, είναι σημασμένο με α - ^{32}P . Σε κάθε αντίδραση συμμετέχουν 3μg περίπου ολικού RNA και 100ng εκκινητή SA2. Ο όγκος ρυθμίζεται στα 11μl με H₂O επεξεργασμένο με DEPC (αναστολέας RNAσών). Ακολούθησε θέρμανση στους 70°C για 5min, τοποθέτηση σε πάγο για 1min, στιγμιαία φυγοκέντρηση και προσθήκη: 4μl ρυθμιστικού διαλύματος (1st strand buffer X5: 250mM Tris.Cl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 2μl DTT 0,1 M, 1μl dNTPs 10mM και 1μl α - ^{32}P dCTP. Η αντίδραση επωάζεται στους 42°C για 90min μετά την προσθήκη 200 units ενζύμου (reverse transcriptase, Gibco BRL). Τέλος, έγινε επώαση με 2 units ενζύμου RNase H (Gibco BRL) στους 55°C για 10min.
- Μέτρηση του ποσοστού ενσωμάτωσης του [α - ^{32}P] dCTP στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα cDNA και υπολογισμός της απόδοσης της αντίδρασης.

- Αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα, ποσοστό του cDNA που συντέθηκε από την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής και τους εκκινητές SA2 και SD6.
- Τεμαχισμός των προϊόντων PCR με το περιοριστικό ένζυμο *BstXI*, που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των προϊόντων που προκύπτουν από μόρια του φορέα και από κρυφές θέσεις συρραφής. Η αντίδραση έγινε με περίσσεια ενζύμου, ενώ η διάρκειά της (κατά την οποία ξαναπροστίθεται ένζυμο) ήταν 20h, στους 55°C.
- Επαναληπτική αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα τα προϊόντα του προηγούμενου PCR, μετά τον τεμαχισμό τους με *BstXI*, και τους εκκινητές MDUSA4 και MDUSD2 (παραλλαγή των εκκινητών dUSA4 και dUSD2 της Εικ. 5, που περιέχουν στο 5' της αλληλουχίας τους, τις θέσεις αναγνώρισης για τα περιοριστικά ένζυμα *Xba I* και *EcoRI*, αντίστοιχα).
- Τεμαχισμός των προϊόντων PCR με τα περιοριστικά ένζυμα *Xba I* και *EcoRI* και αντίδραση λιγάσης των προϊόντων με το φορέα pBluescript KS+ (Εικ.6), ο οποίος έχει τεμαχιστεί προηγουμένως με τα ίδια ένζυμα. Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli*, στελέχους DH5, με τα προϊόντα της αντίδρασης λιγάσης. Παρασκευή DNA, σε μικρή κλίμακα, από καλλιέργειες των βακτηριακών αποικιών που προκύπτουν μετά τον μετασχηματισμό, με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης.
- Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) των ενθεμάτων των κλώνων, με αντίδραση PCR (βλ. παρακάτω), χρησιμοποιώντας ως μήτρα 1,5μg DNA, περίπου, από κάθε κλώνο και τους εκκινητές T7 ή T3, που υβριδοποιούνται με το φορέα pBluescript KS+.

Διαμόλυνση κυττάρων COS – 7

Ο τρόπος διαμόλυνσης των κυττάρων COS – 7 που χρησιμοποιήθηκε, στηρίζεται στη διαδικασία της φαγοκύττωσης. Τα κύτταρα, κατά τη διάρκεια της επώασής τους, με το DNA και τα κατάλληλα συστατικά, φαγοκυττώνουν τους κρυστάλλους που σχηματίζονται από το φωσφορικό ασβέστιο και το DNA (Wingler *et al*, 1977).

Η διαμόλυνση των κυττάρων γίνεται με υπερελικωμένο DNA πολύ καλής ποιότητας, το οποίο έχει ελεγχθεί τόσο με ηλεκτροφόρηση, όσο και με φωτομέτρηση. Κατά τη διαμόλυνση, χρησιμοποιούνται 25μg DNA, περίπου, το οποίο έχει παρασκευαστεί σε συγκέντρωση 500ng / μl περίπου. Ο όγκος ρυθμίζεται στα 600μl με αποστειρωμένο H₂O και ακολουθεί πολύ καλή ανάμιξη. Στο διάλυμα του DNA προστίθενται 50μl διαλύματος CaCl₂, συγκέντρωσης 2,5 M, το οποίο διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα, σε θερμοκρασία -80°C εξαιτίας της μεγάλης υγροσκοπικότητάς του. Ακολουθεί σταδιακή, αργή προσθήκη 500μl διαλύματος HEBS (HEBS X 2: 280mM NaCl, 50mM HEPES, 1,5mM Na₂HPO₄, pH 7,12) και ελαφρά ανάμιξη. Μετά την επώαση των συστατικών για 15min, είναι εμφανής η μείωση της διαφάνειας του διαλύματος. Το διάλυμα προστίθεται ομοιόμορφα, στο τρυβλίο στο οποίο είναι προσκολλημένα τα κύτταρα και το οποίο περιέχει 9ml θρεπτικού υλικού DMEM (Gibco BRL). Η παρατήρηση με μικροσκόπιο, λίγα λεπτά μετά την διαμόλυνση, πρέπει να δείχνει μία ομοιόμορφη κατανομή των σχηματισμένων κρυστάλλων γύρω από τα κύτταρα και όχι σχηματισμό συσσωματωμάτων. Η επώαση διήρκησε 11h, στο πέρας της οποίας τα κύτταρα πλύθηκαν δύο φορές με διάλυμα Hanks (Gibco BRL), μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος επώασης. Ακολούθησε προσθήκη 15ml διαλύματος DMEM και περαιτέρω επώαση των κυττάρων για χρονικό διάστημα 48h.

Απομόνωση ολικού RNA από κυτταροκαλλιέργεια με τη μέθοδο της ζέουσας όξινης φαινόλης

- Ανάμειξη ίσου όγκου όξινης φαινόλης (pH 5) και διαλύματος CH₃COONa, συγκέντρωσης 50mM και pH 4. Ανάμειξη με vortex και επανασηματισμός δύο φάσεων. Η φαινόλη αποκτά τιμή pH 4,5.
- Ανάμειξη διαλύματος NETS X 2 (200mM NaCl, 20mM Tris-Cl pH 7,5, 1mM EDTA pH 8), φαινόλης pH 4,5 και SDS 20% σε αναλογία όγκων 23,75: 25: 1,25 αντίστοιχα. Θέρμανση του μίγματος στους 100°C, μέχρι να σχηματιστεί μία φάση.

- Σε δοκιμαστικό σωλήνα Falcon (15ml), όπου υπάρχει το ίζημα των κυττάρων, προστίθεται μέρος του ομογενούς μίγματος φαινόλης / NETS / SDS. Η ποσότητα που προστίθεται, εξαρτάται από τον όγκο του κυτταρικού ιζήματος. Γενικά, για ίζημα όγκου 200μl, χρησιμοποιήθηκε 1,5 ml περίπου του παραπάνω μίγματος. Ακολουθεί πολύ καλή ανάμειξη με vortex, για 5min, ώστε να σπάσουν τα κύτταρα.
- Φυγοκέντρηση για 15 min, στις 3000rpm (ή για 5 min, στις 12000rpm) σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφορά της υπερκείμενης φάσης.
- Επανεκχύλιση της μεσόφασης με 0,5ml διαλύματος 1 X NETS / 1% SDS. Φυγοκέντρηση για 15 min, στις 3000rpm (ή για 5 min, στις 12000rpm) σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφορά της υπερκείμενης φάσης.
- Ανάμειξη των δύο υπερκείμενων φάσεων από τα προηγούμενα βήματα και εκχύλιση με ίσο όγκο φαινόλης pH 4,5. Φυγοκέντρηση στις προηγούμενες συνθήκες.
- Εκχυλίσεις με: α) ίσο όγκο ουδέτερης φαινόλης, 2) ίσο όγκο μίγματος ουδέτερης φαινόλης / χλωροφορμίου, 3) ίσο όγκο χλωροφορμίου. Κατακρήμιση του RNA, που βρίσκεται στην υπερκείμενη φάση, με προσθήκη 1/10 του όγκου διαλύματος CH₃COONa συγκέντρωσης 3M και pH 5,2 και 2,5 όγκους απόλυτης αιθανόλης. Διατήρηση σε θερμοκρασία -20°C.
- Φυγοκέντρηση στις 12000rpm, για 15min στους 4°C. Πλύσιμο του ιζήματος με αιθανόλη συγκέντρωσης 70%. Στέγνωμα του ιζήματος και επαναδιάλυσή του σε αποστειρωμένο H₂O (Brown NH *et al*, 1988).

* Όλα τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν φρέσκα και αποστειρωμένα, ενώ στα διάφορα γυαλικά είχε γίνει προηγουμένως επίδραση με DEPC, που είναι αναστολέας των RNAσών, και στη συνέχεια αποστειρώθηκαν δις.

Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με αντίδραση PCR με άμεση ενσωμάτωση α-³²P dATP

Η μέθοδος αυτή ενδείκνυεται για ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πλασμιδιακού DNA (Promega Corporation, 1995) και περιλαμβάνει τα εξής συστατικά ανά αντίδραση:

- Υπόστρωμα DNA, ποσότητας 250ng, περίπου, ρυθμισμένο σε όγκο 2μl.
- Εκκινητή (6 ng για ολιγονουκλεοτίδιο, μήκους 24 βάσεων), ρυθμισμένο σε όγκο 0,25μl.
- 0,25 – 0,5 μl α-³²P dATP με ειδική ενεργότητα 800Ci / mmol και συγκέντρωση 10μCi / μl.
- Ρυθμιστικό διάλυμα (sequencing buffer 5 X): 250mM Tris. Cl pH 9, 10mM MgCl₂. Προστίθενται 1,25μl ανά αντίδραση.
- Μίγμα νουκλεοτιδίων dNTPs και ddNTPs. Σε κάθε αντίδραση προστίθενται και 2μl του αντίστοιχου πυκνού μίγματος. Οι συγκεντρώσεις των πυκνών μιγμάτων είναι: για τα dNTPs 20μM ενώ για τα ddNTPs έχουν ως εξής: 30 μM για το ddGTP, 350 μM για το ddATP, 600 μM για το ddTTP και 200 μM για το ddCTP.
- 1,25 units ενζύμου ανά αντίδραση (sequencing grade *Taq* DNA polymerase, Promega).
- Οι συνθήκες της αντίδρασης για τους εκκινητές T7 και T3 (μέγεθος μικρότερο των 24 νουκλεοτιδίων και περιεχόμενο σε βάσεις GC μικρότερο του 50%), έχουν ως εξής: 95°C – 2min / 95°C – 30sec, 42°C –30sec, 70°C –1min (επανάληψη 30 κύκλων)

8) Διερεύνηση cDNA βιβλιοθήκης φάγων

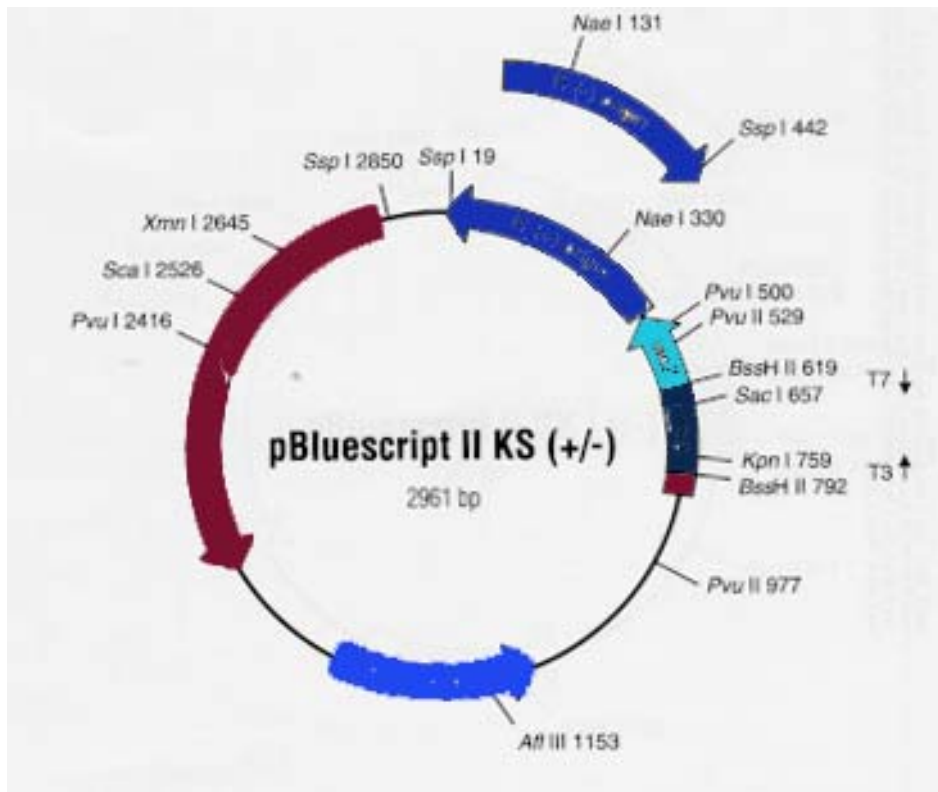
Η cDNA βιβλιοθήκη που διερευνήθηκε προερχόταν από αντίστροφη μεταγραφή με μήτρα RNA ανθρώπινου πλακούντα και με εκκινητές ολιγονουκλεοτίδια oligo dT (Clontech). Ο φορέας κλωνοποίησης είναι ο φάγος λgt11 (Εικ. 7) και το μέσο μέγεθος των ενθεμάτων υπολογίζεται σε 1,5 kb.

Πριν την ανάπτυξη της εν λόγω βιβλιοθήκης, ελέγχθηκε ο τίτλος της και, βάσει αυτού, απλώθηκαν τέσσερις δίσκοι (23 X 23 cm) με 200.000 p.f.u / δίσκο, περίπου. Για κάθε δίσκο μολύνθηκαν 1,2 ml βακτηριακών κυττάρων, στελέχους y1090 και χρησιμοποιήθηκαν 50 ml θρεπτικού υλικού NCZYM επιφάνειας (15g αγαρόζης, 10g Nzamine, 5g NaCl, 5g bacto – yeast extract, 1g casamino acids, 2g MgSO₄ ανά λίτρο) και 250ml θρεπτικού υλικού βάσης (ίδια σύσταση με NCZYM επιφάνειας, με άγαρ αντί αγαρόζη). Η χρόνος μόλυνσης των βακτηριακών κυττάρων από τους φάγους είναι 20min και πραγματοποιείται στους 37°C (Maniatis T, 1989), ενώ ο χρόνος επώασης για την ανάπτυξη της βιβλιοθήκης είναι 18 – 24h, στην ίδια θερμοκρασία.

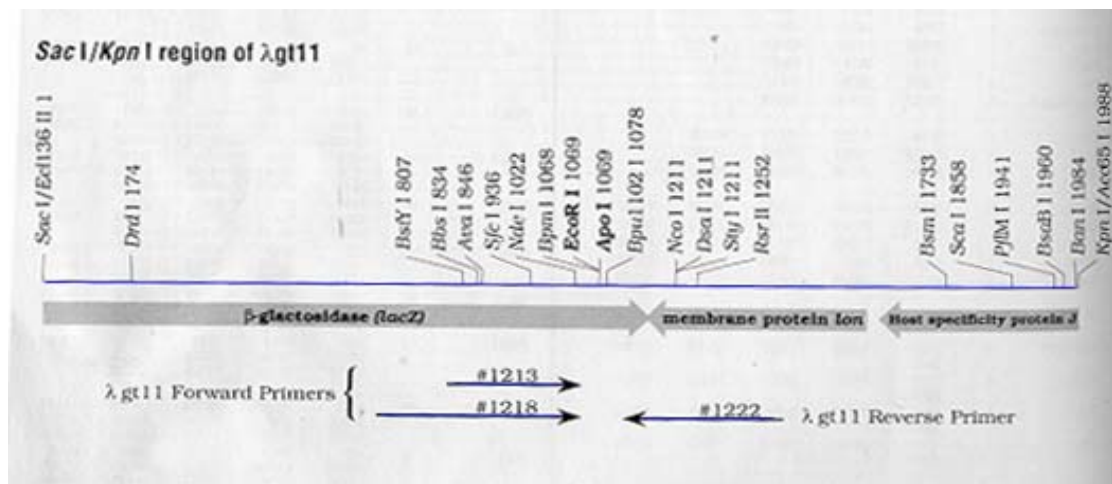
Ακολούθησε μεταφορά των πλακών σε νάιλον μεμβράνες και μονιμοποίηση του DNA των φάγων σ' αυτές, με επίδραση υπεριώδους φωτός για 20sec από απόσταση 15cm και ακόλουθη θέρμανση στους 80°C για 2h.

Ακολούθησε υβριδοποίηση των μεμβρανών σύμφωνα με τις συνθήκες που περιγράφονται στην παρ. 3, με χρήση του διαλύματος B και θερμοκρασία υβριδοποίησης 65 °C. Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε το ένθεμα του κλώνου EST W68650 (βλ. Πιν. 7), το οποίο ραδιοσημάνθηκε με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών. Χρησιμοποιήθηκαν 1,5 X 10⁶ cpm ανιχνευτή / ml διαλύματος υβριδοποίησης (ειδική ενεργότητα ανιχνευτή: 2 X 10⁸ cpm / μg). Η διάρκεια της έκθεσης των μεμβρανών ήταν 72 h σε θερμοκρασία

-80°C. Το αποτέλεσμα ήταν η επιλογή 12 διαφορετικών περιοχών που περιέχουν πολλαπλές πλάκες η καθεμία. Αυτοί τοποθετήθηκαν σε 500ml διαλύματος SM (5,8g NaCl, 2g MgSO₄.7 H₂O, 50ml 1M Tris.Cl pH 7,5 ανά 1 lt) που περιέχει και 100μl χλωροφορμίου. Από τους φάγους που εκλούνται στο παραπάνω διάλυμα, μολύνθηκαν, με τον τρόπο που ήδη περιγράφηκε, βακτηριακά κύτταρα. Ακολούθησε η ανάπτυξη των πολλαπλών κλώνων που επιλέχθηκαν κατά τον πρώτο έλεγχο. Σ' αυτήν τη φάση, η ανάπτυξη των κλώνων που εμφανίζονται θετικοί για το συγκεκριμένο EST, έγινε σε τρυβλία διαμέτρου 9cm. Ακολούθησε ανάλυση κατά Southern, με τη χρήση του ίδιου ανιχνευτή και με αύξηση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης στους 67 °C για μεγαλύτερη εξειδίκευση. Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε, έτσι ώστε να είναι δυνατή η επιλογή μεμονωμένων πλακών.



Εικ. 6: Ο φορέας κλωνοποίησης pBluescript KS+ που χρησιμοποιήθηκε στην μέθοδο της παγίδευσης εξονίων. Μεταξύ των άλλων φαίνονται οι δυνατές θέσεις κλωνοποίησης (polylinker) και οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών T3 και T7.



Εικ. 7: Η θέση κλωνοποίησης EcoRI του φορέα λgt11. Φαίνονται οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών #1213, #1218, #1222.

9) Μεταγραφική χαρτογράφηση

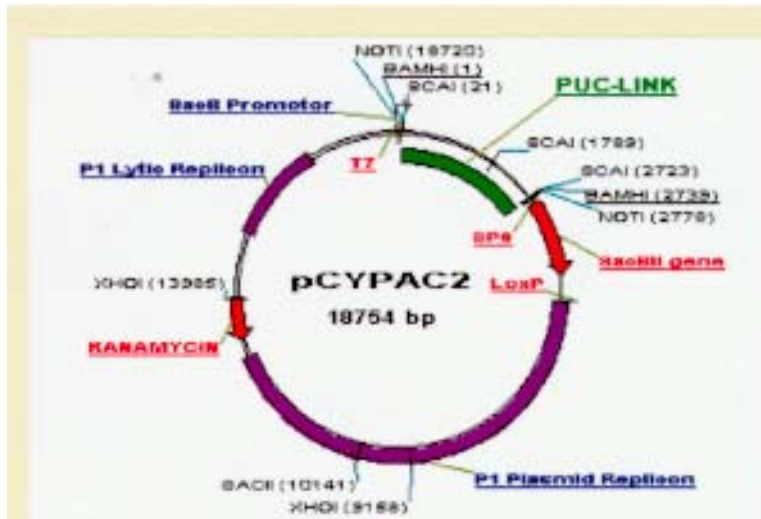
α) Γενωμικές βιβλιοθήκες PAC και BAC

Και οι δύο αυτές γενωμικές βιβλιοθήκες κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο του Pieter deJong. Η ανθρώπινη βιβλιοθήκη PAC (Ioannou PA *et al*, 1994) κατασκευάστηκε από DNA από κυτταρική σειρά ινοβλαστών αρσενικού ατόμου και είναι διαθέσιμη στη διευθετημένη της μορφή (gridded) σε επτά νάιλον φίλτρα (22 X 22 cm). Αυτά περιέχουν 120000 κλώνους, περίπου, ενώ κάθε κλώνος έχει τοποθετηθεί στα φίλτρα δύο φορές. Το μέσο μέγεθος ενθέματος των κλώνων είναι 130 –150 kb ενώ το ποσοστό των μη ανασυνδυασμένων κλώνων υπολογίζεται σε 3%. Επομένως, το ανθρώπινο γονιδίωμα αντιπροσωπεύεται 2,5 φορές περίπου. Ο φορέας κλωνοποίησης είναι ο PCYPAC2, που είναι μία εξελιγμένη μορφή του PCYPAC – 1, με μέγεθος 18754 bp (Εικ. 8). Αναπτύσσεται σε βακτηριακά κύτταρα με 1–2 αντίγραφα ανά κύτταρο. Τα φίλτρα της βιβλιοθήκης μας διατέθηκαν από το UK HGMP Resource Center.

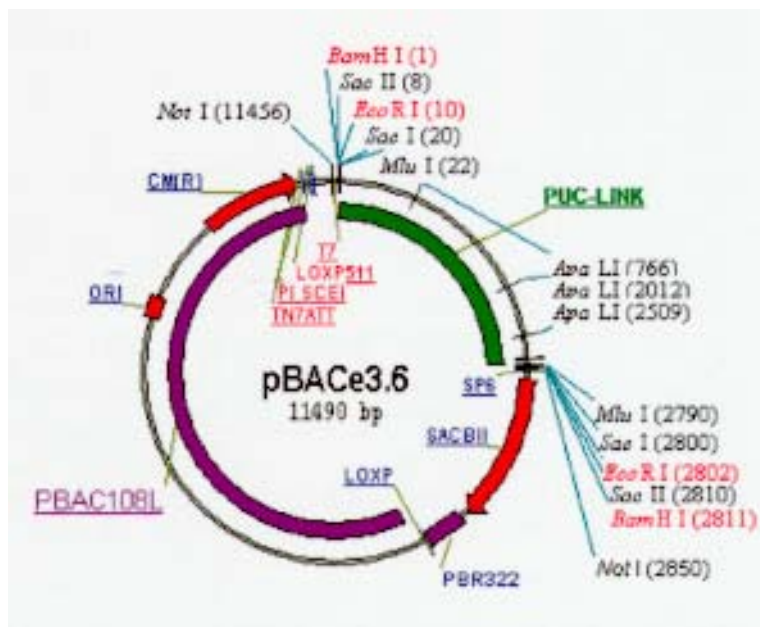
Η βιβλιοθήκη BAC κατασκευάστηκε από DNA λεμφοκυττάρων και είναι διαθέσιμη στη διευθετημένη της μορφή (gridded), όπως και η βιβλιοθήκη PAC, σε τριανταέξι νάιλον φίλτρα (7,5 X 11,5 cm) που περιέχουν 220,000 κλώνους περίπου. Ο φορέας κλωνοποίησης είναι ο pBACe 3.6 (Εικ. 9) με μέγεθος 11490bp. Το μέσο μέγεθος ενθέματος των κλώνων υπολογίζεται σε 174kb, το ποσοστό των μη ανασυνδυασμένων κλώνων σε 1% και η αντιπροσώπευση του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι περίπου δέκα φορές. Τα φίλτρα της βιβλιοθήκης αυτής μας παραχωρήθηκαν από το συνεργαζόμενο Sanger Center. Η βιβλιοθήκη αυτή είναι εκείνη που χρησιμοποιείται πλέον από όλα τα διεθνή κέντρα που μετέχουν στον προσδιορισμό της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Περισσότερες πληροφορίες για τις δύο παραπάνω γενωμικές βιβλιοθήκες είναι διαθέσιμες στη διεύθυνση: <http://bacpac.med.buffalo.edu/> (Roswell Park Cancer Institute).

β) Παρασκευή ανιχνευτών για τη διερεύνηση της γενωμικής βιβλιοθήκης PAC



Εικ. 8: Ο φορέας κλωνοποίησης pCYPAC2 που έχει χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή της ανθρώπινης γενωμικής βιβλιοθήκης PAC. Ο φορέας αυτός είναι κατάλληλος για κλωνοποίηση ενθεμάτων μεγάλου μεγέθους. Στην εικόνα φαίνεται το πλασμίδιο PUC που περιέχει, το οποίο όμως απομακρύνεται κατά τη διαδικασία κλωνοποίησης ενθεμάτων, συγκεκριμένα το τμήμα ανάμεσα στις δύο περιοριστικές θέσεις Not I, μεγέθους 2812bp. Επίσης, φέρει το γονίδιο SacB II, που προέρχεται από το φορέα P1 και χρησιμεύει στη θετική επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων. Τέλος, φαίνεται το γονίδιο επιλογής, που παρέχει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη.



Εικ. 9: Ο φορέας κλωνοποίησης pBACe 3.6 που έχει χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή της ανθρώπινης γενωμικής βιβλιοθήκης BAC. Όπως και ο φορέας pCYPAC2, έχει την ικανότητα ένθεσης τεμαχίων μεγάλου μεγέθους, φέρει τον ίδιο μάρτυρα επιλογής SacB II και ανθεκτικότητα χλωραμφενικόλης. Επίσης, φέρει το πλασμίδιο PUC που απομακρύνεται κατά την ένθεση τεμαχίων σ' αυτόν. Για την κατασκευή της γενωμικής βιβλιοθήκης BAC, οι θέσεις κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι δύο EcoRI.

Αυτοί προέκυψαν μετά από τεμαχισμό πλασμιδίων που φέρουν κλωνοποιημένες αλληλουχίες ESTs και ραδιοσήμανση του ενθέματος EST. Στον Πιν. 2β, φαίνονται οι περιοριστικές θέσεις στις οποίες έχουν κλωνοποιηθεί τα αντίστοιχα ESTs και βάσει των οποίων πραγματοποιήθηκαν και οι τεμαχισμοί. Ως υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκαν περίπου 5μg από κάθε πλασμίδιο, το οποίο είχε παρασκευαστεί με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης και είχε ποσοτικοποιηθεί με ηλεκτροφόρηση. Οι περιοριστικοί τεμαχισμοί έγιναν ταυτόχρονα και με τα δύο ένζυμα (15units από το καθένα, ανά αντίδραση) με χρήση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων (N.E.Biolabs). Οι αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 50μl και η διάρκειά τους ήταν 5 περίπου ώρες. Μετά τον τεμαχισμό, η απομόνωση του ενθέματος από το φορέα έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων, για τουλάχιστον 20 ώρες, σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1,5% περίπου, χρησιμοποιώντας ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE (Tris Acetate – EDTA), με τάση πεδίου 30V, έτσι ώστε να επιτευχθεί ο βέλτιστος διαχωρισμός. Αυτός είναι απαραίτητος γιατί οι φορείς στους οποίους είναι κλωνοποιημένα τα ESTs, είναι βακτηριακοί και έτσι εμφανίζουν, σε κάποιες περιοχές τους, πολύ υψηλά ποσοστά ομολογίας με τον φορέα PAC της αντίστοιχης βιβλιοθήκης, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται φαινόμενα μερικώς μη ειδικής υβριδοποίησης (cross – hybridisation).

Μετά την απομόνωση των ενθεμάτων και την ποσοτικοποίησή τους με ηλεκτροφόρηση, 100ng DNA ραδιοσημάνθηκαν με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών. Αυτή η μέθοδος επιλέχθηκε γιατί έχει καλά αποτελέσματα ραδιοσήμανσης σε μόρια μεγάλου μεγέθους, όπως τα συγκεκριμένα (βλ. Πιν. 2β). Η ειδική ενεργότητα των ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της βιβλιοθήκης PAC, ήταν της τάξεως των 10^8 cpm/μg.

γ) Παρασκευή ανιχνευτών για τη διερεύνηση της γενωμικής βιβλιοθήκης BAC

Ως ανιχνευτές για τη διερεύνηση της βιβλιοθήκης BAC, χρησιμοποιήθηκαν ραδιοσημασμένα προϊόντα PCR, που προέκυψαν ως εξής:

- Αντίδραση PCR με μήτρα ολικό γενωμικό DNA ή DNA κυττάρων σωματικών υβριδίων ανθρώπου – κρικητού (hamster), που περιείχε μόνο το μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 10 (υβρίδιο #175, βλ. Marzella *et al*, 1997) και όλο το γονιδίωμα του

τροκτικού. Η τελευταία επιλογή έγινε στις περιπτώσεις που εμφανιζόταν στα προϊόντα PCR πολυπλοκότητα μεγαλύτερη της αναμενόμενης (ποσότητα DNA - μήτρας: 50ng και στις δύο περιπτώσεις). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση φαίνονται στον Πιν. 2α. (Για τα υπόλοιπα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις, βλ. Υλικά και Μέθοδοι, παρ. 5). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10μl. Οι συνθήκες των αντιδράσεων έχουν ως εξής: 94°C - 4min / 94°C - 45sec, 55°C - 45sec, 72°C - 30sec επανάληψη 35 κύκλων / 72°C - 7min.

- Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης, απομόνωση τεμαχίου του πηκτώματος που περιέχει το αναμενόμενο προϊόν και τοποθέτησή του σε 150μl H₂O, στους 4°C, για χρόνο μεγαλύτερο της μίας ημέρας. Έτσι, εκλύεται ποσοστό του προϊόντος στην υδατική φάση, μέρος της οποίας χρησιμοποιείται για την επαναληπτική αντίδραση PCR.

- Επαναληπτική αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα 3 μl από την υδατική φάση στην οποία εκλούστηκε το DNA - προϊόν της πρώτης αντίδρασης. Έλεγχος του παραγόμενου προϊόντος με ηλεκτροφόρηση, ώστε το προϊόν να προκύπτει ως μία μόνο ζώνη του αναμενόμενου μεγέθους (όπου αυτό είναι γνωστό). Ο τελικός όγκος για την αντίδραση PCR είναι 10 μl, επίσης. Οι συνθήκες των αντιδράσεων έχουν ως ανωτέρω, με αύξηση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης στους 60°C για μεγαλύτερη εξειδίκευση.

- Επαναληπτική αντίδραση PCR, ραδιοσήμανσης, χρησιμοποιώντας ραδιενεργά σημασμένο CTP ([α-³²P] dCTP), ειδικής ενεργότητας 3000Ci/mmol (Amersham) και συγκέντρωση 10mCi/ml. Τα τρία υπόλοιπα νουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση μη σημασμένα, σε τελική συγκέντρωση 0,125mM, το καθένα. Όταν το [α-³²P] dCTP χρησιμοποιείται τις αμέσως επόμενες μέρες από την ημερομηνία παρασκευής του, προστίθεται στην αντίδραση 0,5μl (ήτοι 5μCi/ PCR), ενώ αργότερα, προστίθενται ποσότητες, ανάλογα με τον χρόνο ημιζωής του α-³²P. Ο τελικός όγκος και οι συνθήκες των αντιδράσεων είναι ίδιες με αυτές της επαναληπτικής αντίδρασης PCR απουσία [α-³²P] dCTP. Για μερικά από τα ραδιοσημασμένα προϊόντα ελέγχθηκε, επιβεβαιωτικά, το μέγεθός τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, ενώ για αρκετά υπολογίστηκε η ειδική ενεργότητά τους βάσει: 1) της ποσότητας του [α-³²P] dCTP που προστίθεται σε μία αντίδραση PCR (περίπου 0,55ng), 2) του ποσοστού ενσωμάτωσής του (περίπου 80% όπως προκύπτει μετά από μοριακή διήθηση σε

στήλη Sephadex G-50 superfine) και 3) των cpm, που μετρούνται μετά από κατακρήμνιση με τριχλωροοξικό οξύ (TCA) σε δείγμα 1% του ραδιοσημασμένου προϊόντος (70-80 X 10³ cpm). Κατά μέσο όρο, η ειδική ενεργότητα κάθε ραδιοσημασμένου προϊόντος PCR, υπολογίστηκε σε **3,5 X 10⁹ cpm / μg**, μία ιδιαίτερα υψηλή ενεργότητα.

δ) Υβριδοποίηση γενωμικών βιβλιοθηκών PAC και BAC

Η υβριδοποίηση έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3β του κεφαλαίου “Υλικά και Μέθοδοι”, με τη χρήση του διαλύματος υβριδοποίησης B.

Για τη βιβλιοθήκη PAC, η διερεύνησή της έγινε διαδοχικά για κάθε EST (Πιν.2β), χρησιμοποιώντας περίπου 10⁶cpm ανιχνευτή ανά ml διαλύματος υβριδοποίησης. Αντιθέτως, για τη διερεύνηση της βιβλιοθήκης BAC, έγινε ομαδοποίηση των 40ESTs, με 6 –9 ESTs ανά ομάδα. Κατά την υβριδοποίηση

χρησιμοποιήθηκαν περίπου 3 X 10⁵ cpm, από τον κάθε ανιχνευτή ανά ml διαλύματος υβριδοποίησης. Συνολικό ποσό ραδιενεργού ανιχνευτού: ~3 X 10⁶ cpm / ml διαλύματος υβριδοποίησης.

ESTs	Θέσεις κλωνοποίησης	Ένθεμα (bp)
W68650	Not I / EcoRI	1372
H20436	Not I / EcoRI	1469
T70543	Pac I / EcoRI	
Z38874	Hind III / Not I	1667
R53660	Not I / Hind III	1379

Πιν 2β: ESTs που χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της βιβλιοθήκης PAC.

Στην πρώτη στήλη, η ονομασία των ESTs, στη δεύτερη οι θέσεις κλωνοποίησής τους σε βακτηριακούς φορείς και στην τελευταία το μέγεθος των ενθεμάτων, όπου αυτό είναι γνωστό. Όλα χαρτογραφούνται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q24/q25.1, ενώ η σειρά τους στον πίνακα συμφωνεί με τη χαρτογράφησή τους, από το κεντρομερές προς το τελομερές, στο μεταγραφικό χάρτη των Schuler *et al* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SCIENCE96/>).

ESTs	Αλληλουχία εκκινητών
G25364	TTT ATC ATT AAG CAC ACT GAA GGA TAC CTA CGC CAC CAC AAT CA
T40917	AAG TAG AAC ACA ATA GAA TGG CTC A TGT GAA TGT GGG TGT CGG
R43697	TTT TTT TTT GCT GAA GAC CAG TGG ATG ATT TCT ACG TGG ATG
stSG1671	GTG GCA ATG CGT TGT TTA TG TGT GTC CCA GAT GCT GTC AT
T86168	CAT GAA TGA GGA AGT CTG ATG C TTA TTC AAC AGA TCT CAG CTT AGG A
stSG27214	
T61818	CAT TAT TTT CTG AAA ATG CTG AAA CCT GGT TTT GCT GAT CCA AT
stSG3691	TTC TCT GAA ACC CTT GGG TGC TGC TTG ATG ATG AGA GG
H87438	GGA GAA CTA AAG AAC ACA AAA TTC A CCC CTG GGC CTT ATC CTA TA
R00261	TCA CTG CAT CAA AGA CAG TGC GAA TGA TTC TCT TCC AGC GC
M14564	AGC TAT TTG CCC TTC GGA G CAG CCT TTA GGT GCT ACC C
stSG9207	
T96610	GCA GTC AGT ACT TAA GAG TCT AG TAA CAG CTT TCT CAA AGC
G20861	GTT GAA GTG GTC TAC TAC AA ATC TTT GAA ACC AGA GAA G
H41409	TTG AAC ATT TAA TAA TGT GCT GAG C GGA CCA TGG ACA GTG CTC TT
S38742	AGG TCA GGG GTG ACA CAG AC TGT TGT AGC TGT TGG CTG TTG
Z38716	GGT GAG ATT CGT GTG ACT TTT AA AGT TGC CCC GTC TCT GTT C
R51639	ATC TGT ATT TAC TTC CTA AGA GC TAC TCA TGA ACA GTG TCG
R01689	CAG TCA TCT CAC TAG CAG CTC ACC CCA GCA CCT GTA AAG
G20290	AAT CTT ACA GTC TAG AAG CA CTA GCA TTT TTA ATA GTG GA
R73647	CGT CTG CTT ATT AGA AGT TAA CC TAT TTT AGT CTT GTT GGG TTA GC
G26427	ACA GAC GTC TAA ATT ATA CAT TG CCA GTT CTT ACT TCC TTT TAT T
H80132	CAA TGC TTT TTA TTA CAC ACC CA TTT CCT GGG CTC CAT CAA T
H19386	CAA CTC TAG GAT GTC TAT ACA GA CAG CAC AGC TAA TTT TTC
U36223	TCA CGG AGA TTG TGC TG AAG TGG ACC TCA CGC TG
stSG2653	
Z38948	GAT CCT TCA CAT CCA GCT TTT TTT TCA CTG CAG GAA TAA AGA GG
R60767	TTT AGA GGC CGT GTG GGG CTC CGT CCA CCC TTC TAG TG
W86982	AAA CGA CAT CTA AGT GAG TCA CCC TCT GGT CTT CCC TTT CTG GC

ESTs	Αλληλουχία εκκινητών
D60282	ACC TTT ACT GTG CCC ATG GA AGA TCC CAG AGG GAT GCA G
T57197	CAT GTG TCA ATC CCA TGA TTG GTG CTC CTT CTC TGG TTT GC
T34337	TGT ATT CAC ACA GAT ATA AAG TG TAA AAC CTG AGA TGA GGA
R85766	ATT CTG TGT GGA ACT GGT TGG CCC TAT GAT TAT ACC AGA AAA CAT G
G25854	CAC ATC TTA AAA ATA GCT CCA GAT G ACA CAG TGA TCA GGG AAG GG
R43868	TCA AGT TTT ATT TTG CCT CTT GC TCA TCA CTC TAG GAT CAT GAA GTG
G27616	GAA TCT GCC TAA ATT TCT CCC A TTT GAA TGT GTG ACT TAG AAA AGA A
Z38397	GTG GGG AAA AAG GGT GTT TA TTT TGT AGC TGA GAA CGT GGA
T19389	ACT AGT GAT GTT CCA GTC TTC ATC T CCA ACC TGG ACA TCA GGT TC
H59776	TCA ACT AAA ACT GTT CCT AAT TCC C TCT GAT TTT GTC TAA AGA AAG GGG
M85683	CTA AGC CTG TGT GTC CTC AG GGG AGA TTA CCA AAC AAA AT
F10278	TGG AAA AGG CTC TAT AAA ATG TCC GGT TGC TTG GTC ATA GAG CC
R56222	TCT TGA TAA TAT CAT ACC ACA TGG C TTT CGT AGT TAT CTA AGG GGT TGG
H05479	CTA TGC TGT GGT CTT CAA AAT CC ACT CCA AAA TCC TGA AAA GGC
Z38786	AGA AGT TCC AAA CAG CAA C TAA GTC GGC AAA TGA GAG
W32419	CAC CTG GAA CAT GAC CAT C GCC AAG AAT AAA ATT GCT GC

Αποτελέσματα

1) Φυσική χαρτογράφηση κλώνων YAC και PAC του χρωμοσώματος 10 με έμφαση στην περιοχή 10q24 / q25.1

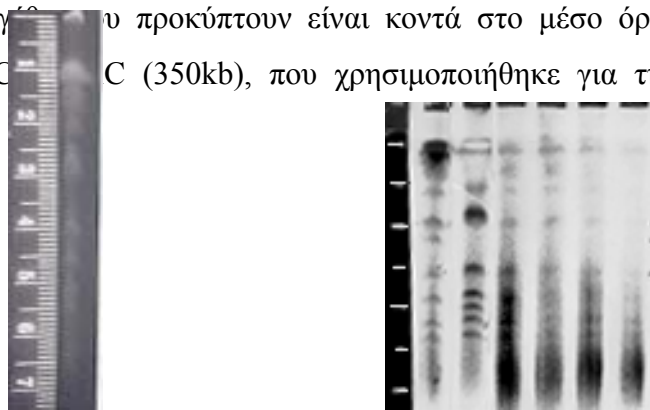
Η δημιουργία ενός φυσικού χάρτη για μία συγκεκριμένη χρωμοσωμική περιοχή, περιλαμβάνει τα εξής βήματα: 1) απομόνωση γενωμικών κλώνων με διερεύνηση βιβλιοθήκης χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές γενετικούς δείκτες της περιοχής, 2) δομική ανάλυση αυτών των κλώνων και 3) καθορισμό της αλληλοεπικάλυψής τους. Χάρη στην ικανότητα των φορέων YAC να δέχονται ένθεμα μεγάλου μεγέθους, συνηθίζεται η χρήση των YACs, στο πρώτο στάδιο φυσικής χαρτογράφησης.

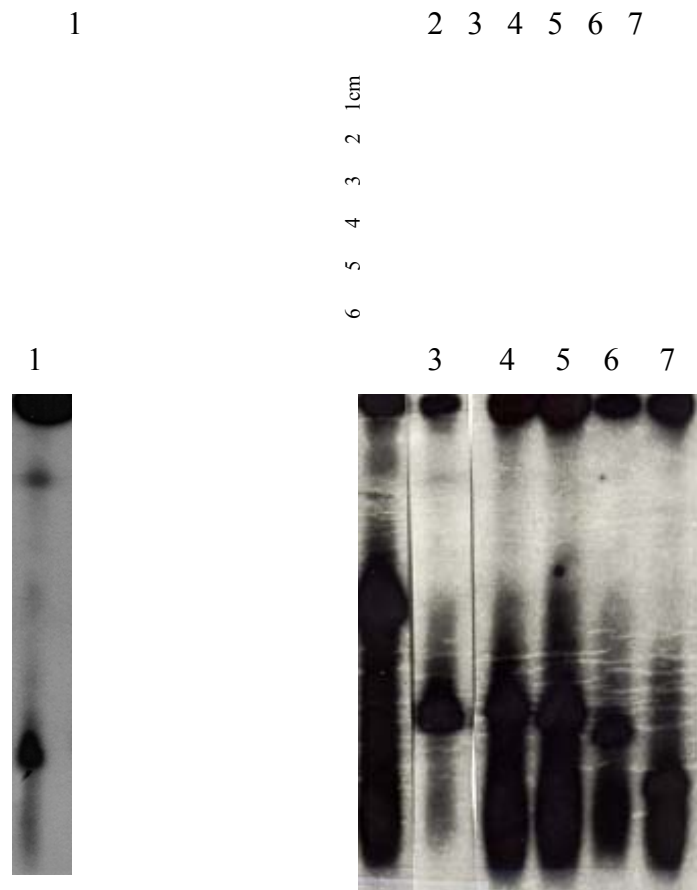
Ο σκοπός του πειράματος ήταν ο προσδιορισμός των μεγεθών μιας σειράς κλώνων YAC του χρωμοσώματος 10, που είχαν ήδη απομονωθεί και χαρτογραφηθεί γενετικά και κυτταρογενετικά με FISH, στο εργαστήριό μας (Marzella *et al*, 1997). Στη συνέχεια, η προσπάθειά μας εστιάστηκε σε κλώνους που χαρτογραφούνται στην περιοχή 10q24 / 25.1. Ακολούθησε η διαδικασία φυσικής χαρτογράφησης με στόχο τη δημιουργία ενός contig.

α) Προσδιορισμός μεγέθους κλώνων YAC

Επειδή η γνώση του μεγέθους του ενθέματος των γενωμικών κλώνων για την κατασκευή ενός contig, είναι απαραίτητο αρχικό βήμα, προχωρήσαμε στον προσδιορισμό των μεγεθών μιας σειράς κλώνων YAC. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους τους ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα: Παρασκευή DNA σε τεμάχια αγαρόζης, ηλεκτροφόρηση PFGE, ανάλυση κατά Southern χρησιμοποιώντας ραδιοσημασμένο ολικό ανθρώπινο γενωμικό DNA ως ανιχνευτή. Η επιλογή του ανιχνευτή έγινε έτσι ώστε να εντοπιστεί το ανθρώπινο ένθεμα μέσα στο γενωμικό DNA του σακχαρομύκητα και να προσδιοριστεί το μέγεθός του μετά από σύγκριση με τα γνωστού μεγέθους χρωμοσώματα του σακχαρομύκητα (Εικ. 10 και 11).

Με αυτή τη διαδικασία προσδιορίστηκε το μέγεθος 7 κλώνων YAC. Τα μεγέθη των κλώνων αυτών, η κυτταρογενετική τους χαρτογράφηση με FISH καθώς και οι γενετικοί δείκτες βάσει των οποίων έγινε η απομόνωσή τους φαίνονται στον Πίν. 3. Τα μεγέθη που προκύπτουν είναι κοντά στο μέσο όρο των μεγεθών της βιβλιοθήκης IC₁ YAC (350kb), που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των YACs.





Εικ. 11: Ανάλυση κατά Southern και προσδιορισμός μεγεθών κλώνων YAC της Εικ. 10: Παρουσιάζεται το αυτοραδιογράφημα της Εικ. 10. 1: YAC # 22DC2, 2: YAC # 27DD2, 3: YAC # 12HA1, 4: YAC #33GB2, 5: YAC # 36HC3, 6: YAC #10GA2, 7: YAC # 11DG4. Συνθήκες πειράματος: προϋβριδοποίηση για 16h σε διάλυμα υβριδοποίησης A, σε θερμοκρασία: 42°C. Διάρκεια υβριδοποίησης: 18 ώρες. Ανιχνευτής: ολικό

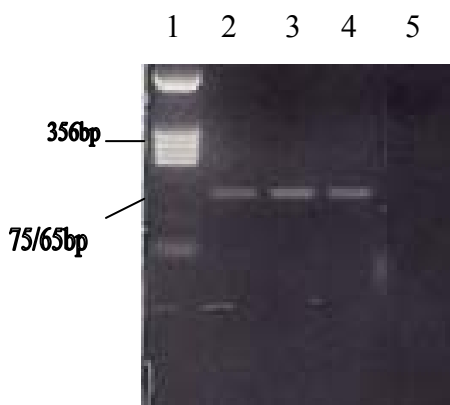
Πίνακας. 3: Προσδιορισμός μεγεθών κλώνων YAC

YAC	ΓΕΝ. ΔΕΙΚΤΗΣ/ ΚΥΤ.ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ	ΜΕΓΕΘΟΣ (Kb)
27DD2	D10S2312/10q24/25.1	510
22DC2	D10S2310/10q25.1	290
12HA1	D10S2309/10q23	330
33GB2	D10S2318/10p12	320
36HC3		310
10GA2	D10S2314/10pter	290
11DG4	D10S2316/10q23	200

Σημ.: Οι αριθμοί D10S, υποδηλώνουν τους μικροδορυφορικούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των YACs. Επίσης, σημειώνεται η κυτταρογενετική τους θέση όπως προσδιορίστηκε με πειράματα FISH (βλ. Martzella *et al*, 1997).

β) Ταυτοποίηση επιπλέον γενετικών δεικτών στους κλώνους YAC της χρωμοσωμικής περιοχής 10q24 / q25.1

Από τους επτά κλώνους, για τους οποίους προσδιορίστηκε το μέγεθός τους, εστιαστήκαμε σε δύο, που χαρτογραφούνται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q24 / 25.1. Στην περιοχή αυτή, χαρτογραφούνται επιπλέον 5 κλώνοι YAC, για τους οποίους ήταν γνωστό το μέγεθος και το περιεχόμενό τους σε γενετικούς δείκτες (Martzella *et al*, 1997). Συγκεκριμένα, ασχοληθήκαμε περαιτέρω με τους κλώνους: # 27BC9 (360kb), # 35GE1 (285-365kb) που φέρουν τον μικροδορυφορικό δείκτη D10S2330, τους # 27DD2 (510kb), # 14CB8 (225-285kb), # 19FC12 (285kb), # 24AC1 (225-285kb) που περιέχουν τον D10S2312 και τον 22DC2 (290kb) που φέρει το δείκτη D10S2310. Με στόχο τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των κλώνων, επιδιώξαμε να ταυτοποιήσουμε επιπλέον γενετικούς δείκτες στους κλώνους αυτούς. Αυτό έγινε με PCR, χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA από τους παραπάνω κλώνους και εκκινητές που ορίζουν τους γενετικούς δείκτες D10S597, D10S2330, D10S2312, D10S2310, D10S1156, D10S187. Οι δείκτες αυτοί επελέγησαν λόγω της θέσης τους στην περιοχή 10q24/25.1 (βλ. Εικ. 2 της Εισαγωγής). Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος φαίνονται στον Πιν. 4. Ενδεικτικά, στην Εικόνα 12, παρουσιάζουμε τα προϊόντα της αντίδρασης με τους εκκινητές του δείκτη D10S597.



Εικ. 12: Ταυτοποίηση του δείκτη D10S597 σε κλώνους YAC. 1: Δείκτης μεγεθών τεμαχίων DNA, pBluescript / Hinf I. Στις διαδρομές 2 έως 4 χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα DNA (60ng), τα εξής: (2): ολικό DNA ανθρώπου, (3): YAC # 27BC9, (4): YAC # 35GE1. 5: Αντίδραση χωρίς DNA (αρνητικός έλεγχος).

Πιν. 4: Ταυτοποίηση γενετικών δεικτών της περιοχής 10q24/25.1 στους κλώνους YAC.

Μικροδορυφορικοί δείκτες

YAC	D10S597	D10S2330	D10S2312	D10S2310	D10S1156	D10S187
27BC9	+	+	-	-	-	-
35GE1	+	+	-	-	-	-
27DD2		-	+	-	-	-
14CB8		-	+	-	-	-
19FC12		-	+	-	-	-
24AC1		-	+	-	-	-
22DC2			-	+	-	-

Σημ.: Η διάταξη των μικροδορυφορικών δεικτών του πίνακα, είναι ίδια με τη διάταξή τους στο γενετικό χάρτη, με κατεύθυνση από το κεντρομερές προς το τελομερές του βραχίονα q.

γ) Διερεύνηση της ανθρώπινης γενωμικής βιβλιοθήκης PAC

Οι κλώνοι YAC αποτελούν αναμφισβήτητα, χρήσιμα εργαλεία φυσικής χαρτογράφησης. Όμως έχουν το μειονέκτημα της δυσκολίας χειρισμού τους, της αυξημένης αστάθειας του ενθέματός τους και του υψηλού ποσοστού χμαιορισμού τους. Γι αυτούς τους λόγους και με αφετηρία τα διαθέσιμα YACs, οδηγηθήκαμε στη διερεύνηση της γενωμικής βιβλιοθήκης PAC (Ioannou *et al*, 1994). Επιπλέον, με τη χρήση τέτοιων κλώνων, είναι δυνατή η φυσική χαρτογράφηση της περιοχής που μας ενδιαφέρει, με υψηλότερη διακριτική ικανότητα από αυτήν που προσφέρουν οι κλώνοι YAC. Ο χειρισμός των κλώνων PAC, είναι πολύ ευκολότερος, εφόσον

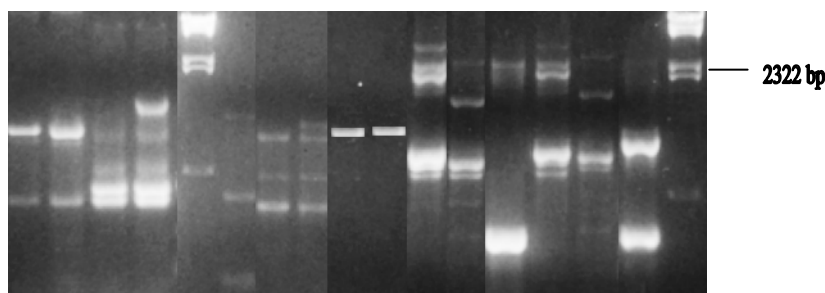
αναπαράγονται σχετικά εύκολα σε βακτηριακά κύτταρα. Ξεκινήσαμε με την παρασκευή μορίων ανιχνευτών με PCR, με μήτρα τους κλώνους YAC, χρησιμοποιώντας εκκινητές *Alu*, που υβριδοποιούνται ειδικά με το ανθρώπινο ένθεμα, ενώ δεν αναγνωρίζουν το γενωμικό DNA του σακχαρομύκητα. Οι εκκινητές *Alu* επιλέχθηκαν γιατί οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν, έχουν μεγάλη επαναληψιμότητα στο ανθρώπινο γονιδίωμα (κατά μέσο όρο απαντάται μία αλληλουχία *Alu* ανά 3 kb. Συνεχίσαμε με την επιλογή μιας σειράς τέτοιων προϊόντων PCR, με κύριο κριτήριο το σχετικά ικανοποιητικό τους μέγεθος (>500bp) και τη σχετική μη επαναληψιμότητα του προτύπου από διαφορετικά YACs. Ακολούθησε η ραδιοσήμανση των επιλεγμένων προϊόντων με τυχαίους εκκινητές και η διερεύνηση της βιβλιοθήκης PAC.

γ1.) Παρασκευή ανιχνευτών με αντίδραση PCR

Η παρασκευή ανιχνευτών ειδικών για τους κλώνους YAC, έγινε μέσω PCR. Ως μήτρα, χρησιμοποιήθηκε ολικό γενωμικό DNA σακχαρομύκητα ενώ επιλέχθηκαν διάφοροι συνδυασμοί εκκινητών *Alu*. Στον Πίν. 1α (Υλικά -Μέθοδοι), αναφέρονται οι ονομασίες και οι αλληλουχίες των εκκινητών *Alu* καθώς και η θερμοκρασία υβριδοποίησης του καθενός στην αντίδραση. Στις περιπτώσεις χρησιμοποίησης δύο εκκινητών που επαναδιατάσσονται σε διαφορετική θερμοκρασία, επιλέξαμε ως θερμοκρασία επαναδιάταξης τη χαμηλότερη τιμή. Πάντως, με το σκεπτικό ότι η χρήση στην αντίδραση, ενός μόνο αντί δύο εκκινητών, θα μας έδινε μεγαλύτερου μεγέθους προϊόντα, χρησιμοποιήσαμε ως επί το πλείστον έναν εκκινητή. Για παράδειγμα, βλ. Εικ. 13, διαδρομές 6 και 11, όπου στο YAC # 35GE1 έχουν χρησιμοποιηθεί αντίστοιχα οι εκκινητές CL-1 / CL-2 και CL-2. Η διαφορά μεγεθών των προϊόντων είναι εμφανής.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων, φαίνονται στις εικόνες 13, 14 και 15.

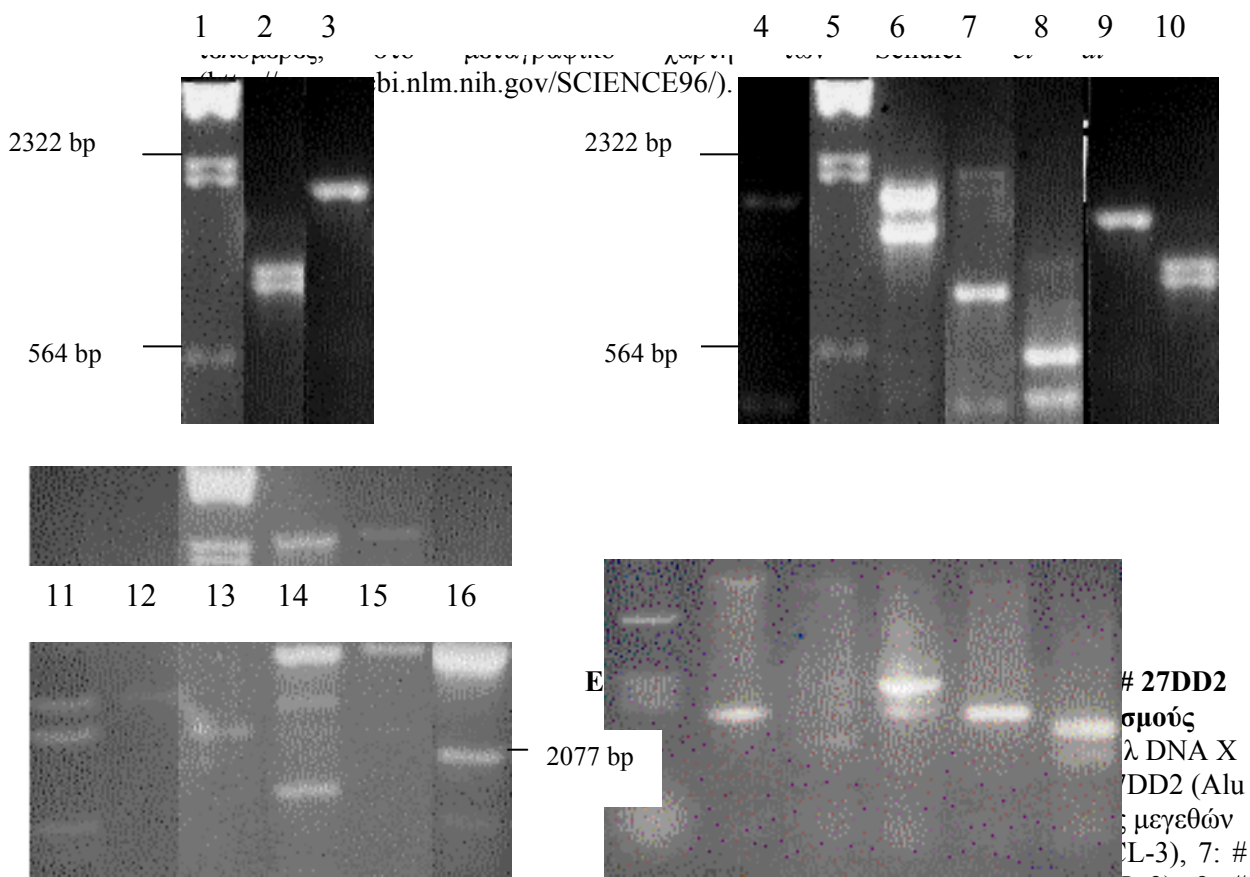
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17





Πιν 2β: ESTs που χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της βιβλιοθήκης PAC.

Στην πρώτη στήλη, η ονομασία των ESTs, στη δεύτερη οι θέσεις κλωνοποίησής τους σε βακτηριακούς φορείς και στην τελευταία το μέγεθος των ενθεμάτων, όπου αυτό είναι γνωστό. Όλα χαρτογραφούνται στη



γ2.) Υβριδοποίηση της γενωμικής βιβλιοθήκης PAC

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

- Επιλογή των προϊόντων PCR με βασικό κριτήριο το μέγεθος (> 500bp) και την αποφυγή χρήσης του ίδιου προϊόντος PCR από διαφορετικούς κλώνους.
- Εκτίμηση της ποσότητας των προϊόντων PCR των YACs (Εικ. 13, 14 και 15), έτσι ώστε να χρησιμοποιούνται μόνο 100ng από το καθένα (αν κατά την υβριδοποίηση χρησιμοποιείται μόνο ένας ανιχνευτής) ή ισομοριακές ποσότητες από το κάθε προϊόν PCR ώστε το άθροισμα των ποσοτήτων τους να είναι 100 ng (στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται, ταυτόχρονα, περισσότεροι του ενός ανιχνευτές).
- Καθαρισμός των προϊόντων PCR (απομάκρυνση αλάτων, νουκλεοτιδίων, ενζύμου) με τη χρήση στηλών Qiagen.
- Ραδιοσήμανση των προϊόντων με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινήτων και καθαρισμός των προϊόντων ραδιοσήμανσης μέσω χρωματογραφικής στήλης Sephadex G-50 superfine. Προσδιορισμός ειδικής ενεργότητας των ανιχνευτών.
- Διερεύνηση της γενωμικής βιβλιοθήκης PAC, η οποία είναι σε διευθετημένη μορφή σε νάιλον φίλτρα.
- Εντοπισμός των κλώνων PAC που ανιχνεύονται βάσει του κωδικού συστήματος που παρέχεται από το U.K. HGM Resource Center.

γ3.) Απομόνωση κλώνων PAC και προσδιορισμός μεγεθών

Η υβριδοποίηση της γενωμικής βιβλιοθήκης PAC είχε ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση 29 διαφορετικών κλώνων. Στην Εικ. 16 φαίνεται, ενδεικτικά, τμήμα μιας από τις μεμβράνες της βιβλιοθήκης με τους κλώνους PAC που ανιχνεύονται σ' αυτήν. Στον Πιν. 5 φαίνονται οι κλώνοι PAC που προέκυψαν από την υβριδοποίηση της βιβλιοθήκης, καθώς και οι κλώνοι YAC στους οποίους αντιστοιχούν, με βάση τους χρησιμοποιηθέντες εκκινητές (προϊόντα *Alu* – PCR).

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τους κλώνους PAC, δεν έχει μεγάλη απόδοση, εξαιτίας του ενός μόνο αντιγράφου τους που υπάρχει σε κάθε κύτταρο *E. coli*. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν 50ml βακτηριακής καλλιέργειας για κάθε ένα κλώνο για την τελική παρασκευή 20μg DNA περίπου (για τη διαδικασία παρασκευής, βλ. Υλικά και Μέθοδοι, παρ. 6). Για τον προσεγγιστικό προσδιορισμό των μεγεθών των κλώνων, ακολούθησε τεμαχισμός του DNA τους με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *BamHI*. Η διάρκεια της αντίδρασης ήταν 16h στους 37°C και η ποσότητα του υποστρώματος περίπου 3μg ανά αντίδραση.

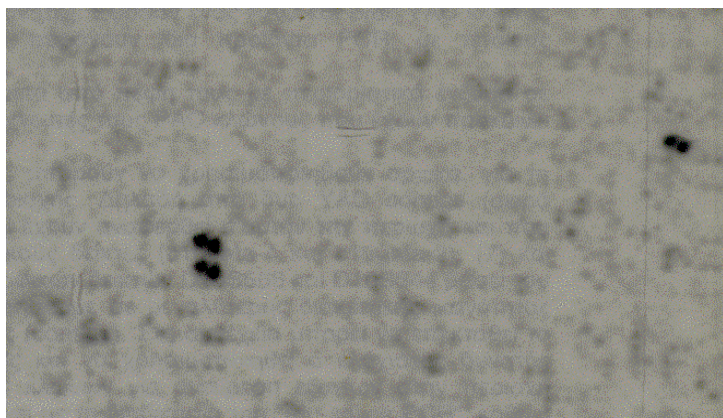
Η ηλεκτροφόρηση για τα προϊόντα τεμαχισμού με *EcoRI* έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης, 1% TAE. Τα προϊόντα τεμαχισμού με *BamHI*, αναλύθηκαν σε PFGE, λόγω ύπαρξης μεγαλύτερων τεμαχίων DNA.

Ενδεικτικά, παρατείθεται η εικόνα του προτύπου τεμαχισμού με *BamHI*, σε DNA κλώνων PAC μετά την ηλεκτροφόρησή τους σε PFGE και τη χρώση του πηκτώματος με διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Εικ. 17). Από το άθροισμα των μεγεθών των προϊόντων τεμαχισμού, προσδιορίστηκαν τα συνολικά μεγέθη των ενθεμάτων (βλ. Πιν. 6).

Πιν. 5: Κλώνοι PAC και οι αντίστοιχοι κλώνοι YAC

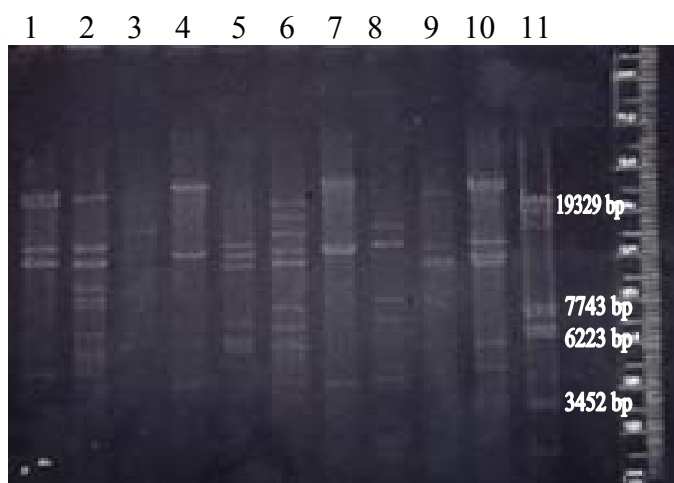
YAC	PAC
27BC9	30-C6, 75-B20, 119-I13, 118-L1, 118-M1, 171-A21, 270-G13
35GE1	171-E5, 171-F5, 310-D2, 317-G21, 183-B12, 205-D17
27DD2	32-B12 , 59-L4, 74-O11, 84-E23 , 88-M12 , 117-I21 , 312-E19 , 320-F13
24AC1	32-B12 , 84-E23 , 88-M12 , 117-I21 , 320-F13 , 312-E19 241-L17, 217-L10
22DC2	316-D1, 317-D16, 133-H24, 196-E11, 247-D20, 76-F8

Σημ: Με έντονα γράμματα παριστάνονται οι κοινοί κλώνοι PAC, που προέκυψαν από διαφορετικά YACs.



Εικ. 16: Αυτοραδιογραφία μεμβράνης της βιβλιοθήκης PAC με ανιχνευτές προϊόντα *Alu* – PCR των YACs.

Συνθήκες: Χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα υβριδοποίησης A (βλ. Υλικά και Μέθοδοι), με συγκέντρωση ανιχνευτή: 2×10^6 cpm/ml (ειδική ενεργότητα: 3×10^8 cpm / μ g), σε θερμοκρασία: 42°C . Διάρκεια έκθεσης: 18h.



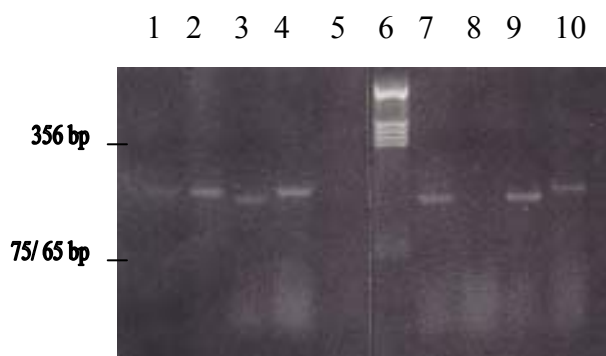
Εικ. 17: Ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (PFGE) προϊόντων τεμαχισμού κλώνων PAC με *Bam*HI. 1: # 317-G21, 2: # 119-I13, 3: # 59-L4, 4: # 32-B12, 5: # 320-F13, 6: # 171-E5, 7: # 217-L10, 8: # 118-L1, 9: # 75-B20, 10: # 171-F5, 11: Δείκτης μεγεθών *λ*Sty I. Συνθήκες ηλεκτροφόρησης: 200V, 12h, 12°C , εναλλαγή πεδίου: 0,3-1,3 sec.

γ4.) Ταυτοποίηση γενετικών δεικτών στους κλώνους PAC

Για τον περαιτέρω μοριακό χαρακτηρισμό των κλώνων PAC (Πιν. 5), αλλά και με στόχο την επιπλέον συλλογή πληροφοριών για την δημιουργία του contig, ακολούθησε η διερεύνηση της ύπαρξης γνωστών γενετικών δεικτών σ' αυτούς. Η παρουσία κάποιου γενετικού δείκτη σ' ένα γενωμικό κλώνο, αποτελεί σημείο αναφοράς κατά το σχηματισμό ενός contig και διευκολύνει τη συσχέτιση του PAC με το μητρικό YAC. Η διαδικασία έγινε με PCR ώστε να διαπιστωθεί η παρουσία ή η απουσία των μικροδορυφορικών δεικτών: D10S597, D10S2330, D10S2312, D10S2310, D10S1156 και D10S187. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η θερμοκρασία επαναδιάταξης με το υπόστρωμα, φαίνονται στον Πιν. 1β (βλ. Μέθοδοι - Υλικά). Στην Εικ. 18 παρουσιάζονται, ενδεικτικά, τα προϊόντα PCR μιας σειράς κλώνων PAC και ενός κλώνου YAC με εκκινητές, που αντιστοιχούν στο δείκτη D10S2330.

Τα αποτελέσματα της διερεύνησης παρουσιάζονται στον Πιν. 6. Το σύμβολο (+) δηλώνει την παρουσία του γενετικού δείκτη, το (-) την απουσία του, ενώ τα κενά τετράγωνα δηλώνουν ότι, εφόσον καθορίστηκαν τα φυσικά όρια κάθε κλώνου, η αντίστοιχη αντίδραση δεν έγινε. Ως θετικοί θεωρήθηκαν οι κλώνοι που εμφάνισαν έντονη ζώνη κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR.

Στην εικ. 18, η παρουσία του αναμενόμενου προϊόντος PCR στους κλώνους PAC # 75-B20, # 171-F5, # 171-A21, # 317-G21, # 119-I13, δηλώνει ότι οι κλώνοι αυτοί είναι θετικοί γι' αυτόν το δείκτη. Η εμφάνιση προϊόντων δύο διαφορετικών μεγεθών στους κλώνους PAC, εξηγείται, πιθανώς, με την ύπαρξη δύο διαφορετικών αλληλομόρφων στο γενωμικό DNA του ατόμου από το οποίο κατασκευάστηκε η βιβλιοθήκη PAC.



Εικ.
18.

γ5.) Φυσική χαρτογράφηση κλώνων με χρήση περιοριστικών ενζύμων

Ο τεμαχισμός των κλώνων PAC με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και EcoRI (παρ. γ3), εκτός από τον προσδιορισμό των μεγεθών των ενθεμάτων, μας έδωσε και μία αδρή εικόνα όσον αφορά τις αλληλοεπικαλύψεις μεταξύ τους (ως παράδειγμα, βλ. Εικ. 17, διαδρομές 1 και 2. Η ομοιότητα των προτύπων των προϊόντων τεμαχισμού των κλώνων # 317-G21 και # 119-I13 είναι εμφανής). Η λεπτομερέστερη ανάλυση των αλληλοεπικαλύψεων των κλώνων πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια του Sanger Center, στα πλαίσια της συνεργασίας με το εργαστήριό μας. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των fingerprinting contigs των κλώνων PAC ονομάζεται FPC (Soderlund C *et al*, 1997) και ανιχνεύει τις κοινές ζώνες που παρουσιάζουν τα προϊόντα τεμαχισμού των κλώνων. Τα contigs που σχηματίστηκαν προσδίδουν μεγάλη διακριτική ικανότητα στον φυσικό χάρτη με όριο ανάλυσης 3kb.

Από τους 29 κλώνους PAC που απομονώθηκαν (Πιν. 6) και αναλύθηκαν με το πρόγραμμα FPC, οι 22 εμφανίζουν αλληλοεπικαλύψεις, ανά ομάδες και σχηματίζουν 6 επιμέρους contigs, ενώ τα fingerprints των υπόλοιπων επτά κλώνων δεν εντάσσονται σε ένα από τα contigs (Εικ. 19). Επιπλέον, με διερεύνηση της βιβλιοθήκης PAC, απομονώθηκαν 9 PACs που αντιστοιχούν σε πέντε από τα ESTs της ίδιας περιοχής (Εικ. 20). Αντίστοιχη λεπτομερής ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα σε πέντε από αυτά, οδήγησε στον σχηματισμό δύο ακόμη contigs (Εικ. 19).

Πιν. 6: Ταυτοποίηση γενετικών δεικτών της περιοχής 10q24/25.1 στους κλώνους PAC

PAC	ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ						ΜΕΓΕΘΟΣ (Kb)
	D10S597	D10S2330	D10S2312	D10S2310	D10S1156	D10S187	
30-C6	+	+	-				74
75-B20	-	+	-				122
119-I13	+	+	-				136
118-L1		-	-				80
118-M1	-	-	-				23
171-A21		+	-				91
270-G13		-	-				80
171-E5	+	-	-				147
171-F5	-	+	-				70
310-D2		-	-				84
317-G21	-	+	-				88

183-B12		-	-				
205-D17	-	-	-				84
32-B12		-	-	-			85
59-L4		-	-	-			50
74-O11		-	-	-			130
84-E23		-	-	-			80
88-M12		-	-	-			74
117-I21		-	-	-			94
312-E19		-	-	-			115
320-F13		-	-	-			71
241-L17		-	+	-			60
217-L10		-	-	-			83
316-D1		-	-	-	-	-	39
317-D16		-	-	-	-	-	45
133-H24		-	-	-	-	-	123
196-E11		-	-	-	-	-	51
247-D20		-	-	-	-	-	91
76-F8		-	-	-	-	-	90

Σημ.: Η διάταξη των μικροδορυφορικών δεικτών του πίνακα (αριστερά προς δεξιά) είναι η ίδια με τη διάταξή τους στο γενετικό χάρτη, με κατεύθυνση από το κεντρομερές προς το τελομερές Του βραχίονα q.

Στον Πιν. 7 παρουσιάζονται οι πληροφορίες για τα contigs που σχηματίστηκαν: το μέγεθός τους, ο αριθμός των κλώνων PAC που απαρτίζουν κάθε contig και ο κλώνος YAC ή το EST από τα οποία προέρχονται. Τα μεγέθη των ενθεμάτων των κλώνων PAC που είχαν προσδιοριστεί (βλ. Πιν. 6), ταυτοποιήθηκαν για τους κλώνους που συμμετέχουν στα contigs και διορθώθηκαν τυχόν αποκλίσεις.

Το συνολικό μήκος του χρωμοσωμικού DNA που καλύπτουν τα ανωτέρω επιμέρους contigs είναι μεγαλύτερο από 950kb και καλύπτει το όριο μεταξύ των χρωμοσωμικών ζωνών 10q24 / q25.1. Τα επτά PACs που δεν εντάχθηκαν σε contigs είναι δυνατόν να αποτελούν μεμονωμένες χρωμοσωμικές περιοχές του 10q24 / q25.1 που δεν επικαλύπτονται ή να προέρχονται από τελείως διαφορετικά χρωμοσώματα, ως προϊόντα μη ειδικής υβριδοποίησης.

Στο contig # 7, ενδιαφέρον είναι το γεγονός της ύπαρξης αλληλοεπικάλυψης ανάμεσα στα PACs # 299-O1, # 51-I2 και # 202-L8. Ο πρώτος κλώνος ταυτοποιήθηκε με το EST H20436, ενώ οι υπόλοιποι με το R53660, που ανήκει σε διαφορετική ομάδα στη βάση δεδομένων Unigene (Unigene group). Αυτό, ενδεχομένως, υποδηλώνει είτε ότι τα δύο ESTs προέρχονται από διαφορετικές μη

YAC # 24A
D10S2312

2

επικαλυπτόμενες περιοχές του ίδιου γονιδίου είτε ότι πρόκειται για δύο ανεξάρτητα γονίδια, που όμως χαρτογραφούνται σε πολύ κοντινή απόσταση μεταξύ τους.

Πιν. 7. Το μέγεθος, η προέλευση, ο αριθμός των PACs και οι δείκτες κάθε contig.

Contig	Αριθμός PACs	Δείκτες	Μέγεθος (kb)	Προέλευση
1	2	dJ150E17	207	YAC # 27BC9
		dJ200I1		YAC # 35GE1
		dJ239O1		S2330
2	2	dJ239O1	120	YAC # 24AC1
3	3	dJ51I2	147	YAC # 24AC1
		dJ202L8		YAC # 27DD2
4	2	dJ202L8	96	YAC # 24AC1
				YAC # 27DD2
5	2	dJ817D16*	12	YAC # 22DC2
6	2	dJ816D1	4	YAC # 22DC2
7	3	stSG4025	14	ST H20436
		stSG2378		ST R53660
8	2	stSG2367	8	... 68650

1

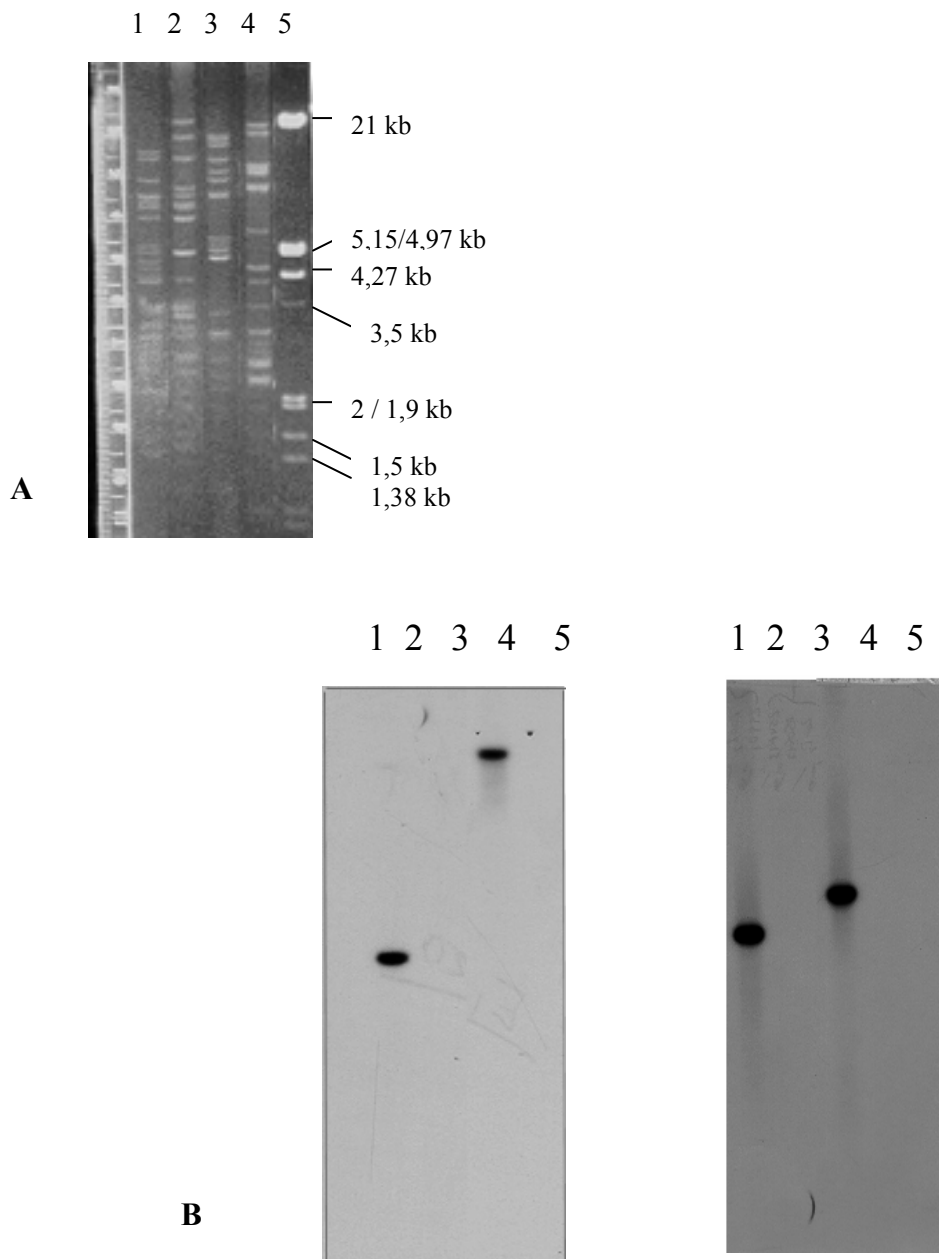
dJ117I21
dJ241L17

dJ217L10
dJ32B12
dJ312E19
dJ84E23

dJ118M1
dJ30C6
dJ171F5
dJ317G21
dJ205D17
dJ171A21~
dJ119I13
dJ310D2
dJ75B20*
dJ171E5

dJ196E11
dJ247D20
dJ133H24

dJ88M12
dJ320F13



Εικ. 20: Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα κλώνων PAC και ταυτοποίηση των αντίστοιχων ESTs. Α) Το ηλεκτροφορητικό πρότυπο προϊόντων τεμαχισμού κλώνων PAC. 1: # 299-O1/ *Hind III*, 2: # 150-E17 / *Hind III*, 3: # 299-O1 / *EcoRI*, 4: # 150-E17 / *EcoRI*, 5: Δείκτης μεγεθών λ/ *Hind III*, *EcoRI*. **Β)** Η ανάλυση κατά Southern για τα ESTs # H20436 (δεξιά) και # W68650 (αριστερά), χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές τα ενθέματα των αντιστοίχων κλώνων. Προσεγγιστικά, τα μεγέθη των ζωνών που ανιχνεύονται μετά την

ανάλυση κατά Southern, στις διαδρομές 1, 2, 3 και 4 είναι: 4 kb, 3 kb, 5kb και 20kb αντίστοιχα.

2) Προσπάθειες ανίχνευσης γονιδίων από τη χρωμοσωμική περιοχή 10q24/25.1

Οι προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση γονιδίων από τη χρωμοσωμική περιοχή 10q24/q25.1, ήταν: 1) η παγίδευση εξονίων (exon trapping) και 2) η διερεύνηση φαγικής cDNA βιβλιοθήκης.

α) Παγίδευση εξονίων

Αυτή η τεχνική εφαρμόστηκε σε επτά κλώνους PAC (# 30-C6, # 171-E5, # 119-I13, # 320-F13, # 74-O11, # 241-L17 και # 317-D16) που χαρτογραφούνται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q24/q25.1. Έξι από τους κλώνους αυτούς συμμετέχουν στα contigs που σχηματίστηκαν (Εικ. 19). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην παρ.7 (Υλικά και Μέθοδοι). Το αποτέλεσμα ήταν η απομόνωση 15 κλώνων, που θεωρήθηκαν υποψήφιοι ότι περιέχουν εξονιακές αλληλουχίες. Η διερεύνηση γι' αυτούς έφτασε μέχρι την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους χρησιμοποιώντας τους εκκινητές T3 και T7 που υβριδοποιούνται στο φορέα pBluescript (Εικ. 6). Οι αλληλουχίες που προέκυψαν, έδειξαν ότι οι κλώνοι αυτοί προέρχονταν είτε από προϊόντα συναρμογής του ίδιου του φορέα pSPL3 (2 κλώνοι), είτε από συναρμογή κρυφών θέσεων του φορέα (13 κλώνοι).

β) Διερεύνηση φαγικής cDNA βιβλιοθήκης

Η ιστολογική προέλευση της βιβλιοθήκης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανθρώπινος πλακούντας, ενώ η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην παρ. 8 (Υλικά και Μέθοδοι). Ως ανιχνευτής για τη διερεύνηση της βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκε το EST W68650 (μέγεθος ενθέματος: 1,4 kb) το οποίο χαρτογραφείται στους κλώνους PAC 150-E17 και 200-I1 (Εικ. 19) και μετάγραφα του οποίου ανιχνεύονται στον συγκεκριμένο ιστό, σύμφωνα με πληροφορίες από τη βάση δεδομένων Unigene. Η διερεύνηση της βιβλιοθήκης κατέληξε στην απομόνωση δώδεκα κλώνων cDNA. Τα ενθέματα των κλώνων αυτών απομονώθηκαν με PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδοποιούνται στο φορέα lgt11 (Εικ. 7). Η ανάλυση κατά Southern που ακολούθησε, έδειξε σαφή υψηλή ομολογία για πέντε από τους κλώνους (μεγέθη ενθεμάτων: 0,8-4 kb). Εντούτοις, τα προϊόντα τεμαχισμού τους

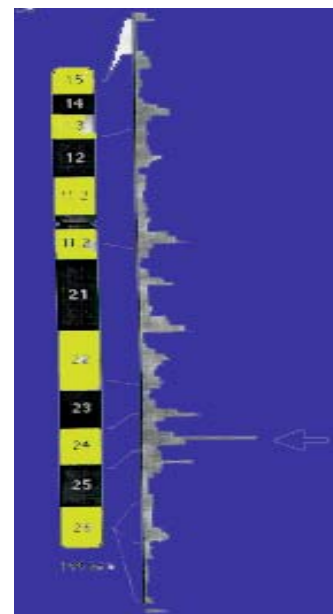
με ποικιλία περιοριστικών ενζύμων, δεν παρουσίαζαν σαφή αλληλοεπικάλυψη με τα προϊόντα τεμαχισμού του εξεταζόμενου EST.

3) Φυσική χαρτογράφηση κλώνων BAC στην ευρύτερη χρωμοσωμική περιοχή 10q24 – q25.1

Με σκοπό την κατασκευή ενός συνδυαστικού χάρτη (φυσικού και μεταγραφικού) της χρωμοσωμικής περιοχής 10q24 - q25.1 και την επέκταση και τον εμπλουτισμό των contigs που παρουσιάστηκαν, χαρτογραφήθηκε μία σειρά ESTs σε ανθρώπινους γενωμικούς κλώνους BAC. Η επιλογή της χρωμοσωμικής περιοχής έγινε βάσει της αυξημένης πληθώρας ESTs που παρατηρείται στην παραπάνω περιοχή και βάσει του περιεχομένου της σε γονιδιακούς τόπους που σχετίζονται με ασθένειες (βλ. Εικ. 3, Εισαγωγή). Η Εικ. 21, που προέρχεται από το μεταγραφικό χάρτη για το χρωμόσωμα 10 των Schuler *et al* (1996), δείχνει αυτήν την αυξημένη συγκέντρωση ESTs στο 10q24 με μία χαρακτηριστική κορυφή στο ιστόγραμμα. Η χαρτογράφηση των ESTs σε γενωμικούς κλώνους έγινε με διερεύνηση της αντίστοιχης βιβλιοθήκης BAC. Τα ESTs που επιλέχθηκαν, χαρτογραφούνται μεταξύ των γενετικών δεικτών D10S198 και D10S597, μία απόσταση 11,3 cM (βλ. γενετικό χάρτη IMBB, Εικ. 1).

Τα ονόματα των ESTs που χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της βιβλιοθήκης με την διαδικασία της υβριδοποίησης φίλτρων διευθετημένων κλώνων BAC, καταγράφονται στον Πιν. 8. Συγκεκριμένα φαίνονται τα ESTs, ανά ομάδες, όπως χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της βιβλιοθήκης BAC, οι γενετικοί δείκτες ανάμεσα στους οποίους χαρτογραφούνται, η ιστολογική προέλευσή των αντίστοιχων γονιδίων, τυχόν ομολογίες που εμφανίζουν με γνωστά γονίδια και οι κλώνοι BAC που ταυτοποιήθηκαν από κάθε ομάδα EST.

Εικ. 21: Κατανομή ESTs κατά μήκος του χρωμοσώματος 10 του ανθρώπου. Στο ιστόγραμμα φαίνεται, με μία χαρακτηριστική κορυφή, η αυξημένη συγκέντρωση ESTs στη χρωμοσωμική περιοχή 10q24. Η εικόνα είναι ανατύπωση από το μεταγραφικό χάρτη των Schuler GD *et al* (1996), που είναι διαθέσιμος στο δίκτυο στη διεύθυνση: <http://www.nlm.nih.gov/SCIENCE96>



Πιν. 8: Κλώνοι BAC που ανιχνεύθηκαν μετά την διερεύνηση της βιβλιοθήκης με κάθε ομάδα ESTs.
 Με έντονα γράμματα παριστάνονται οι κλώνοι που δίνουν ισχυρότερα σήματα κατά την υβριδοποίηση και με κόκκινο, οι κοινοί κλώνοι που ανιχνεύθηκαν από διαφορετική ομάδα ESTs. Με μπλε, παριστάνεται ένα EST που συμμετείχε ως ανιχνευτής, σε δύο διαφορετικές ομάδες.

Δείκτες	ESTs	Όρια γεν. δεικτών	Ιστός προέλευσης	Ομοιότητα με γνωστό γονίδιο	Κλώνοι BAC
	stSG9207	D10S192-D10S222			2F13, 16H23, 31L23, 26I17, 31C2, 37L21, 34D21, 38F19, 47K14, 47A8, 55P24, 55H24, 63G20, 73I21,
WI - 9147	S38742	D10S192-D10S222		HOX 11 (ομοιωτική πρωτεΐνη)	68M5, 85J3, 87A18, 92K19, 91E4, 91A6, 105N15, 124A14, 121B1, 124G18, 121A1, 121B2, 114F1,
WI - 6750	Z38716	D10S192-D10S222	εγκέφαλος νηπίου	neurofilament-66	135I2, 131P16, 131N13, 135G2, 135G3, 147B13, 148E14, 155M3, 161J3, 166D12, 177N16, 190J1,
A005K38	G20290	D10S222-D10S540		mouse melatonin receptor type 1A, Pvalue: 2.28e-03	208K8, 205K9, 217B13, 215H21, 216K21, 239A7, 225G22, 229H16, 225H22, 277F21, 294B4, 320K6,
WI - 16946	H80132	D10S222-D10S540	εμβρυικό ήπαρ/σπλήνα		308M12, 310C11, 326I7, 326J7, 325G20, 345B6, 344B9, 338F22, 364M5, 381E23, 372K16, 372L16, 381N11, 377N7, 388D6, 390A9, 390A22, 400D18, 399L6, 399P6, 397F19, 403K22, 416N2, 427G23,
SGC31986	T57197	D10S222-D10S540	σπλήνα εμβρύου		426P21, 418G13, 418E13, 440H6, 462G17, 450K22, 449L8, 474E14, 465A7, 491G16, 493O5
SHGC30899	R85766	D10S540-D10S1741			499D21, 517G4, 514D16, 513A17, 524G11, 522K10, 539A22, 529I10, 544J23, 537L19, 530L13,
SGC32623	G27616	D10S540-D10S1741			560B7, 550H22, 561B19
	W86982	D10S222-D10S540	εμβρυικό ήπαρ/σπλήνα		
WI - 6372	Z38397	D10S540-D10S1741			18I14, 31L23, 18O12, 41D21, 35P4, 38P1, 37L21, 51A7, 49I2, 75D10, 68I11, 84A2, 92K19, 110K7,
SGC32923	T19389	D10S540-D10S1741			108L7, 110P1, 110M24, 135I2, 135G2, 135G3, 133L23, 138J24, 138J21, 155M3, 154K6, 154E18,
SGC31936	G25854	D10S540-D10S1741		μικρή ομολογία με βαριά αλυσίδα μωσίνης (λείοι μύες)	170J3, 173J5, 172G11, 166D12, 167C14, 203B23, 214C13, 223B13, 213C11, 230H19, 229N4, 228C22,
WI - 16761	H59776	D10S540-D10S1741	εμβρυικό ήπαρ/σπλήνα		256H10, 252J11, 256P15, 243L20, 263M9, 268F5, 271I13, 260L13, 277F21, 285D15, 273N6, 303C5,
	M85683	D10S540-D10S1741			299I5, 301L10, 298P19, 302K17, 301F16, 301H14, 299C16, 317J21, 346A7, 345B6, 353B24, 353I17,
SGC32265	F10278	D10S540-D10S1741	εγκέφαλος νηπίου	μικρή ομολογία με ATP/GTP binding site motif A (C. eleg.)	363D8, 360E9, 367M7, 382M19, 381N11, 393G6, 303K22, 412G16, 416K23, 426A8, 422K11, 418P17,
WI - 14778	H05479	D10S540-D10S1741	εγκέφαλος νηπίου		446H13, 442J21, 446K23, 446K18, 451M19, 474A18, 472D22, 468M23, 471P23, 496G1, 482E11, 489E24,
Cda0pc11	Z38786	D10S1741-D10S597	εγκέφαλος νηπίου		503I5, 509I15, 497N19, 511O21, 520F2, 523M11, 524L15, 523F17, 513A17, 541N10, 555A18,
	W32419	D10S1741-D10S597	όγκος παραθυρεοειδή	αμινοπεπτιδάση P-like	550H22, 548N18, 549M18, 556D1, 555K2, 559P8, 571M9

SGC32598	H87438	D10S603 D10S192	πλακούντας (8-9 εβδομάδων)		2M13, 20D13, 20D7, 24H9, 29K18, 34D15, 43F15, 43G4, 46B21, 54N3, 77B12, 80H11, 85A1, 100J20, 113J14, 115G22, 116D23, 116E5, 117P24, 121I4, 121J23, 133I19, 142H5, 157O7, 159K16, 160I11, 165O6, 175B20, 188N23, 190O12, 190O13, 190N2, 227A18, 260L2, 274I6, 283C24, 285F16, 287B3, 296C3, 316M21, 325E17, 328F4, 330J1, 338O11, 344E13, 345F3, 352M13, 361J5, 363N16, 383K22, 395E12, 399H7, 407A10, 411B6, 417D19, 417F17, 420P24, 428K4, 433A14, 436A6, 436E6, 436A7, 438A21, 443A5, 455H10, 460C19, 469H13, 470C8, 478N5, 483F11, 483B11, 490D4, 494O2, 504A6, 509A14, 520E2, 539M3, 553H1, 565E10, 565H24, 572B16
SGC33917	R00261		εμβρυικό ήπαρ/σπλήνα		
SGC34176	G25364	D10S198 D10S603	πλακούντας		
WI - 8039	T40917	D10S198 D10S603	ήπαρ	GOT-1 (ασπαρτική αμινοτρανσφεράση 1)	
WI-8488	T61818	D10S198 D10S603	ήπαρ	multidrug resistance-asso ciated protein 1, canalicular	
WI - 13735	R43697	D10S198 D10S603	εγκέφαλος νηπιού		
WI-16766	T86168	D10S198 D10S603	εμβρυικό ήπαρ/σπλήνα		
RH11163	stSG1671	D10S198		CYB561 (κυτόχρωμα 561)	
RH44156		D10S603			
RH15687	stSG3691				

A004M06	R51639	D10S192 D10S222			18I14, 18O12, 29L1, 75D10, 124G18, 119L24, 170J3, 200K5, 215H21, 216K21, 229N4, 243G8, 301F16, 301L10, 369M5, 377N7, 393A6, 393G6, 416K23, 427G23, 426A8, 419K13, 436B8, 452K1, 453H6, 461F9, 465H10, 471P23, 496G1, 489E24, 501J12, 508J18, 550G18, 573E23
	stSG27214	D10S198 D10S603			
	stSG2653	D10S222 D10S540			
A002G45	G26427	D10S222 D10S540		homo sapiens, κλώνος 23608- αλληλουχία mRNA	
A006S48	H19386	D10S222 D10S540			
WI - 15962	R60767	D10S222 D10S540			
SGC33233	D60282	D10S222 D10S540	εγκέφαλος εμβρύου		

WI - 6938	Z38948	D10S222 D10S540			6I23, 6I24, 15I4 , 29L1 , 37K12 , 73I21 , 68M5 , 91A6, 87A18, 91E4, 95J12, 85J7, 81F18,
WI - 14063	R43868	D10S540- D10S1741	εγκέφαλος νηπίου		82F10, 105N15, 131P16 , 148E14 , 177N16 , 190J1, 239A7, 270D20, 279B8, 300I11,
A004B36	T96610	D10S192- D10S222	εμβρυικό ήπαρ/σπλήνα		293M13 , 312F17 , 325G20 , 349G14 , 356H19 , 369M5 , 394B24 , 390C1 , 401G3 , 413E5 ,
WI - 16299	H41409	D10S192- D10S222	εγκέφαλος ενήλικα		413I9 , 430D8 , 438O13 , 443N17 , 438K21 , 460P6 , 503H15, 503B2, 502B6, 509B9, 529I10 ,
WI - 14107	R56222	D10S540- D10S1741	εγκέφαλος νηπίου		530L13, 544J23, 537L19, 539A22
RH18043	U36223	D10S222 D10S540		FGF8 (αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών)	

A004R30	T34337	D10S222 D10S540	νεφρά		37L21 , 37D18, 34A22, 62C24 , 52H22, 88C2, 85A6, 91K19 , 107L7, 155M3 , 155N10 , 155M10 ,
RH17772	R01689	D10S192- D10S222	εμβρυικό ήπαρ/ σπλήνα		286K1 , 277F21 , 286O21 , 299C16 , 293M13, 242B12 , 249E8, 243G8, 321C9, 345B6 ,
A006J02	G20861	D10S192- D10S222			360E9 , 360M7 , 370K10, 381N11 , 393A6 , 396N9 , 416K23 , 436B8, 437A23 , 461F9,
A008M23	R73647	D10S222 D10S540	πλακούντας		453H6, 452K1, 465H10 , 471P23 , 501J12 , 513A17 , 550H22 , 203B23, 419K13
SGC31936	G25854	D10S540- D10S1741		μικρή ομολογία με βαριά αλυ- σίδα μυσίνης (λείοι μύες)	
RH17665	M14564				

Συζήτηση

Γενικά

Η εργασία που παρουσιάζεται, εντάσσεται στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος του εργαστηρίου μας για τη γονιδιωματική χαρτογράφηση του χρωμοσώματος 10. Η αρχή έγινε με τη γενετική χαρτογράφηση και την κατασκευή ενός πρώτου γενετικού χάρτη το 1994 (Kapsadaki *et al*, 1994). Ακολούθησε η απομόνωση 9 νέων γενετικών μικροδορυφορικών δεικτών, του τύπου (GATA)_n, (AAAT)_n και (GT)_n, ο προσδιορισμός της κυτταρογενετικής θέσης τους, η γενοτυπική ανάλυση αυτών καθώς και άλλων 27 γενετικών δεικτών σε δείγματα 40 οικογενειών CEPH και ο συνδυασμός αυτών των δεδομένων με άλλα, ώστε τελικά να προκύψει ένας βελτιωμένος γενετικός χάρτης, μεγάλης διακριτικής ικανότητας, με 149 δείκτες (Iodscore > 3 για όλους) και με μέση γενετική απόσταση ανάμεσα σε διαδοχικούς δείκτες 2,8cM.

Για τη γεφύρωση του γενετικού χάρτη με κυτταρογενετικά δεδομένα ακολούθησε λεπτομερής κυτταρογενετικός και μοριακός χαρακτηρισμός 21 σωματικών κυτταρικών υβριδίων, ακτινοβολημένων και μη, ειδικών για το χρωμόσωμα 10. Ο χαρακτηρισμός των υβριδίων έγινε με FISH και με PCR για 57 αντιπροσωπευτικούς μικροδορυφορικούς δείκτες, ομοιόμορφα κατανεμημένους κατά μήκος του χρωμοσώματος 10. Το αποτέλεσμα είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στη σύγχρονη διαγνωστική κυτταρογενετική αλλά και στη μελέτη της εξέλιξης των χρωμοσωμάτων των θηλαστικών (Marzella *et al*, 1997).

Η κατασκευή φυσικών χαρτών μεγάλης διακριτικής ικανότητας που είναι φερέγγυοι ώστε να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές τεχνικών κλωνοποίησης γονιδίων και στον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε μεγάλη κλίμακα, στηρίζονται σε συνδυαστικούς χάρτες, που περιέχουν δεδομένα γενετικής, κυτταρογενετικής και λεπτομερούς φυσικής χαρτογράφησης, όπως αυτά που προαναφέρθηκαν.

Η παρούσα εργασία εντάσσεται στην προσπάθεια λεπτομερούς φυσικής και μεταγραφικής χαρτογράφησης της χρωμοσωμικής περιοχής 10q24–q25. Η περιοχή αυτή έχει μεγάλο ενδιαφέρον, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς της σε γονίδια και του συσχετισμού της με την εμφάνιση αρκετών ασθενειών συμπεριλαμβανομένων διαφόρων μορφών καρκίνου, νευροεκφυλιστικών συνδρόμων, κ.λπ.

Χαρακτηρισμός κλώνων YAC

Η εργασία ξεκίνησε με την επιλογή και το χαρακτηρισμό επτά κλώνων YAC από τη χρωμοσωμική περιοχή 10q24 / q25.1. Το μέσο μέγεθος των ενθεμάτων των κλώνων της βιβλιοθήκης είναι 350kb (Anand R *et al*, 1990), μία τιμή όχι ιδιαίτερα μεγάλη συγκρινόμενη με τα μέγα –YACs, αλλά που προσφέρει μεγαλύτερη ασφάλεια όσον αφορά το χιμαιρισμό και την αστάθεια που συχνά παρουσιάζουν αυτοί οι κλώνοι. Οι κλώνοι χαρακτηρίστηκαν ως προς το περιεχόμενό τους σε γενετικούς δείκτες (D10S597, D10S2330, D10S2312, D10S2310, D10S1156 και D10S187) και για δύο από αυτούς προσδιορίστηκε το μέγεθος του ενθέματός τους: για το # 27DD2 (που φέρει το γενετικό δείκτη D10S2312) σε 510kb και για το 22DC2 (που περιέχει το δείκτη D10S2310) σε 290kb. Με τη διαδικασία αυτή επιβεβαιώθηκε η παρουσία των γενετικών δεικτών βάσει των οποίων είχαν απομονωθεί οι κλώνοι YAC ενώ, επιπρόσθετα, στους κλώνους #27BC9 και #35GE1, εκτός του D10S2330, εντοπίστηκε ο γενετικός δείκτης D10S597. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με το γενετικό χάρτη, όπου η γενετική απόσταση μεταξύ των δύο παραπάνω δεικτών είναι 1,9cM. Η διαφορά αυτή, μεταξύ γενετικού και φυσικού χάρτη, ίσως οφείλεται στα αυξημένα ποσοστά ανασυνδυασμού που παρατηρούνται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23-q25 και από άλλους ερευνητές. Το ίδιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και σε άλλα χρωμοσώματα, σε συγκεκριμένες περιοχές, ωστόσο δεν είναι σαφής η βιολογική αιτιολογία του.

Με βάση το περιεχόμενο των κλώνων σε γενετικούς δείκτες καθορίσαμε το ανώτερο και το κατώτερο όριο της φυσικής έκτασης κάθε κλώνου YAC καθώς και του συνολικού contig και εντάξαμε το contig στο γενετικό χάρτη.

Επιπλέον, βάσει της σύγκρισης των προτύπων προϊόντων PCR, με μήτρα τους παραπάνω κλώνους YAC έγινε αντιληπτή η μεγάλη ομοιότητα (και συνεπώς επικάλυψη) μεταξύ των κλώνων #27BC9 και #35GE1 και των #14CB9 και #19FC12.

Η χρήση και η αξιοποίηση των κλώνων PAC και BAC

Αύξηση της διακριτικής ικανότητας της φυσικής χαρτογράφησης, επιτυγχάνεται με τη χρήση γενωμικών κλώνων PAC και BAC. Ο χειρισμός τέτοιων

κλώνων είναι πολύ ευκολότερος και η παρασκευή του DNA γίνεται με μία απλή παραλλαγή της κλασικής τεχνικής της αλκαλικής λύσης. Επιπλέον, έχουν μεγάλη σταθερότητα, πολύ χαμηλά ποσοστά χιμαιρισμού, ενώ οι γενωμικές βιβλιοθήκες PAC και BAC και κυρίως η δεύτερη, καλύπτουν το ανθρώπινο γονιδίωμα πολλές φορές. Χάρη σ' αυτά τα πλεονεκτήματα, προτιμήθηκαν στα επόμενα βήματα.

Αρχικά, απομονώθηκαν κλώνοι PAC από το όριο 10q24/q25.1 και σχηματίστηκαν μικρά επιμέρους contigs. Η απομόνωση των κλώνων έγινε με διερεύνηση της βιβλιοθήκης PAC, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές είτε προϊόντα PCR με εκκινητές *Alu* των προαναφερθέντων κλώνων YAC είτε ESTs. Η διερεύνηση της βιβλιοθήκης οδήγησε στην απομόνωση 38 κλώνων. Αυτοί απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος του ενθέματός τους (23–147kb), την περιεκτικότητά τους σε γενετικούς δείκτες της περιοχής και τη σχετική αλληλοεπικάλυψή τους.

Ο μικροδορυφορικός δείκτης D10S597 ταυτοποιήθηκε σε τρεις κλώνους PAC, που επιπλέον περιέχουν και τον D10S2330, μειώνοντας έτσι, ακόμη περισσότερο, την γενετική απόσταση ανάμεσα στους παραπάνω δείκτες, σε λιγότερο από 75kb όπως ορίζεται από το μέγεθος του μικρότερου εκ των τριών κλώνων. Η αλληλοεπικάλυψη των κλώνων, καθορίστηκε μετά από σύγκριση των προτύπων τεμαχισμού του DNA τους και την ανάλυση των fingerprints με την χρήση του προγράμματος FPC. Το αποτέλεσμα ήταν ο σχηματισμός 8 επιμέρους contigs, στα οποία συμμετέχουν 27 από τους 34 κλώνους που αναλύθηκαν. Τα μεγέθη των σχηματιζόμενων contigs είναι από 45kb έως 207kb, ενώ η διακριτική ικανότητά τους είναι πολύ μεγάλη, της τάξεως των 3kb. Το συνολικό μήκος του χρωμοσωμικού DNA που καλύπτουν τα επιμέρους contigs είναι μεγαλύτερο από 950kb και καλύπτει το όριο μεταξύ των χρωμοσωμικών ζωνών 10q24/q25.1. Επιλεγμένοι κλώνοι από αυτά τα contigs, αποτελούν υλικό για προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequence ready tilling path), π.χ. οι κλώνοι # 171-E5 και # 119-I13, οι # 241-L17 και # 117-I21, οι # 84-E23 και # 312-E19, οι # 320-F13 και # 88-M12, οι # 133-H24 και # 196-E11, οι # 200-I1 και # 150-E17 και οι # 202-L8 και # 299-O1 (Εικ 19).

Προσπάθεια ανίχνευσης γονιδίων στη χρωμοσωμική περιοχή 10q24/ q25.1

Οι μέθοδοι που αρχικά χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση γονιδίων, ήταν η τεχνική της παγίδευσης εξονίων (exon trapping) και η διερεύνηση cDNA βιβλιοθήκης φάγων. Η τεχνική της παγίδευσης εξονίων εφαρμόστηκε σε επτά κλώνους PAC, έξι από τους οποίους συμμετέχουν στα contigs που προαναφέρθηκαν. Παρά τη μεγάλη και χρονοβόρα προσπάθεια, τα αποτελέσματα της εφαρμογής της μεθόδου δεν ήταν ενθαρρυντικά. Και οι 15 υποψήφιοι κλώνοι για τους οποίους η διερεύνηση έφτασε μέχρι την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ενθέματος, προέρχονταν είτε από προϊόντα συναρμογής του ίδιου του φορέα κλωνοποίησης είτε από συρραφή κρυφών θέσεων του φορέα. Η εμπειρία μας από αυτήν την προσέγγιση ήταν αρνητική λόγω του υψηλού επιπέδου “θορύβου” που παρουσίασε.

Τα αποτελέσματα της διερεύνησης της cDNA βιβλιοθήκης φάγων, δεν ήταν ικανοποιητικά, επίσης. Η ιστολογική προέλευση της βιβλιοθήκης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανθρώπινος πλακούντας. Ως ανιχνευτής για τη διερεύνησή της, χρησιμοποιήθηκε ένα EST για το οποίο υπήρχε, κατατεθειμένη σε βάση δεδομένων, η πληροφορία της έκφρασής του στον παραπάνω ιστό. Για το συγκεκριμένο EST (W68650), είχαμε, επίσης, απομονώσει τον αντίστοιχο κλώνο PAC. Τα ενθέματα πέντε διαφορετικών κλώνων cDNA που απομονώθηκαν (μεγέθους έως 4kb), εμφάνιζαν, με ανάλυση κατά Southern, υψηλή ομολογία με τον ανιχνευτή. Εντούτοις, τα προϊόντα τεμαχισμού τους με διάφορα περιοριστικά ένζυμα δεν παρουσίαζαν σαφή αλληλοεπικάλυψη με τα προϊόντα τεμαχισμού του εξεταζόμενου κλώνου EST (μέγεθος ενθέματος: 1,4kb περίπου). Επιπλέον, η ανάλυση κατά Southern των απομονωμένων κλώνων, παρουσία του EST στη μεμβράνη, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μίας μόνο έντονης ζώνης, αυτής που αντιστοιχούσε στο προϊόν PCR του ίδιου του EST. Τα αποτελέσματα αυτά χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης. Διάφορες εξηγήσεις θα ερμήνευαν τα παραπάνω αποτελέσματα. Μία εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι οι cDNA κλώνοι που απομονώθηκαν αντιστοιχούν σε μία υπεροικογένεια γονιδίων με κοινά χαρακτηριστικό την περιοχή που αντιστοιχεί στο EST. Επίσης, η ύπαρξη αλληλουχιών που επαναλαμβάνονται σε διάφορα γονίδια (π.χ. επαναλαμβανόμενες τριπλέτες νουκλεοτιδίων) θα μπορούσε να

εξηγήσει τη συλλογή ετερόκλητων κλώνων. Τέλος, η ενδεχόμενη κακή ποιότητα [έντονος χμαιορισμός λόγω πολλαπλών συνενώσεων (co-ligations)] της βιβλιοθήκης cDNA, θα ήταν μία ακραία τρίτη εξήγηση.

Φυσική χαρτογράφηση στην περιοχή 10q24 - q25 με βάση τον μεταγραφικό χάρτη

Τα μη ενθαρρυντικά αποτελέσματα από τις προσπάθειες ανίχνευσης νέων γονιδίων από τη χρωμοσωμική περιοχή 10q24 / q25.1, σε συνδυασμό με τη συνεχώς αυξανόμενη πληροφορία για τη μεταγραφική χαρτογράφηση και για νέα ESTs που δημιουργούνται καθημερινά (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap>), μας οδήγησε να δώσουμε έμφαση στην προσπάθεια κατασκευής ενός συνδυαστικού, φυσικού και μεταγραφικού χάρτη για την ευρύτερη χρωμοσωμική περιοχή 10q24 - q25 που θα στηρίξει στη συνέχεια τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και την μελέτη των περιεχόμενων γονιδίων σ' αυτήν.

Μέχρι σήμερα, υπάρχουν κατατεθειμένα στις διάφορες προσβάσιμες βάσεις δεδομένων, περίπου 800.000 ESTs. Αυτά υπολογίζεται ότι αντιπροσωπεύουν το 50% περίπου των γονιδίων του ανθρώπου (Adams MD, 1995). Ένα ποσοστό αυτών των ESTs, έχουν χαρτογραφηθεί στα ανθρώπινα χρωμοσώματα κυρίως με την τεχνική των κυτταρικών σωματικών υβριδίων. Ο μεταγραφικός χάρτης (transcript ή expression map) του γονιδιώματος αποτελεί χρήσιμη βάση για τα προγράμματα προσδιορισμού νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (επιλέγοντας καταρχήν περιοχές πλούσιες σε γονίδια), καθώς και για την κλωνοποίηση γονιδίων υπεύθυνων για ασθένειες. Υπάρχει ελεύθερη πρόσβαση στις διάφορες βάσεις δεδομένων και διαθεσιμότητα κλώνων ESTs καθώς και εκκινητών που αναγνωρίζουν STSs των ESTs και πολλές ερευνητικές ομάδες ασχολούνται με την χαρτογράφηση ESTs, συνήθως για ένα χρωμόσωμα. Τα ESTs που έχουν καταγραφεί και χρησιμοποιούνται για χαρτογράφηση προέρχονται, ως επί το πλείστον, από τις 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές (3'UTR) μορίων mRNAs που απομονώνονται τυχαία από cDNA βιβλιοθήκες, συνήθως κανονικοποιημένες. Έτσι, έχουν τα πλεονεκτήματα: 1) της απουσίας ιντρονίων, οπότε το προϊόν της PCR, είναι το ίδιο είτε το υπόστρωμα είναι γενωμικό DNA είτε cDNA, 2) οι αλληλουχίες 3'UTR, δεν είναι τόσο καλά συντηρημένες όπως οι κωδικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να είναι ευκολότερη η

διάκριση μεταξύ διαφορετικών γονιδίων, αλλά και ανάμεσα σε μέλη οικογενειών παράλογων γονιδίων και 3) η χρήση κανονικοποιημένων βιβλιοθηκών μειώνει την πιθανότητα της απομόνωσης αλληλουχιών ESTs που προέρχονται από γονίδια που μεταγράφονται με μεγαλύτερη συχνότητα στους διάφορους ιστούς.

Παρά τη χρήση κανονικοποιημένων βιβλιοθηκών cDNA, κατά τη μεταγραφική χαρτογράφηση υπάρχει σημαντικός βαθμός επανάληψης και αλληλοεπικάλυψη αρκετών ESTs με γνωστά χαρακτηρισμένα γονίδια και cDNAs. Έτσι, για να ξεχωρίσουν τα νέα, μη επαναλήψιμα ESTs, διερευνήθηκε η αλληλουχία τους, σε σχέση με υπάρχοντα ανθρώπινα γονίδια και cDNAs, που είναι κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων Genbank. Το αποτέλεσμα αυτού ήταν μία επιπλέον βάση δεδομένων, η Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Unigene/Hs.Home.html>). Αυτή περιέχει ESTs ομαδοποιημένα, με κριτήριο την πιθανότητα να ανήκουν στο ίδιο γονίδιο, βάσει αλληλοεπικαλύψεων στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες τους. Εκτός από τα υποψήφια νέα γονίδια που περιέχει αυτή η βάση δεδομένων, χρησιμεύει, επίσης, για συγκρίσεις με νέα ESTs που συνεχώς κατατίθενται στις βάσεις δεδομένων. Μεγάλο ποσοστό των ESTs που περιέχονται στην Unigene, έχει χαρτογραφηθεί στα ανθρώπινα χρωμοσώματα, κυρίως με την τεχνική των ακτινοβολημένων κυτταρικών υβριδίων. Σ' αυτόν τον τομέα, επομένως, στόχος της επιστημονικής κοινότητας είναι η φυσική χαρτογράφηση των ESTs, η γεφύρωση δηλαδή του φυσικού με το μεταγραφικό χάρτη.

Όσον αφορά το χρωμόσωμα 10, υπάρχουν οι εξής διαθέσιμοι μεταγραφικοί χάρτες:

-Των Hudson J et al, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/SCIENCE96/chr?10>.

-Του Sanger Center στη διεύθυνση: <http://www.Sanger.ac.uk/cgi-bin/rhtop?chr=10>, καθώς και ένας επιπλέον μεταγραφικός χάρτης του ίδιου ερευνητικού κέντρου, μεγαλύτερης διακριτικής ικανότητας, μη διαθέσιμος ακόμη στο δίκτυο, αλλά στον οποίο, λόγω της συνεργασίας μας, έχουμε πρόσβαση.

Αρχικό βήμα για την κατασκευή του συνδυαστικού χάρτη της χρωμοσωμικής περιοχής 10q24–q25, είναι η χαρτογράφηση των ESTs σε ανθρώπινους γενωμικούς κλώνους BAC και η απομόνωση των κλώνων αυτών. Η πολύ πρόσφατη μεταστροφή των μεγάλων ερευνητικών ομάδων που ασχολούνται με την ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος σε κλώνους BAC αντί για PAC, εκτός ορισμένων τεχνικών πλεονεκτημάτων, οφείλεται στην ευαισθησία σχετικά με την ανωνυμία που οφείλει η

επιστημονική κοινότητα να τηρεί όσον αφορά την προέλευση του βιολογικού υλικού από το οποίο κατασκευάζονται οι γενωμικές βιβλιοθήκες (Rowen L *et al*, 1997). Μεσοπρόθεσμος στόχος μας είναι η κατασκευή ενός λεπτομερούς συνδυαστικού χάρτη που θα αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό τμήμα του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 10. Η κατασκευή αυτού του χάρτη σχεδιάζεται σε συνεργασία με το Sanger Center και στοχεύει στην απομόνωση μιας συλλογής γενωμικών κλώνων BAC, που θα χρησιμοποιηθούν στον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της χρωμοσωμικής περιοχής και θα συνεισφέρουν στην μελέτη της χρωμοσωμικής οργάνωσης, της δομής και του ρόλου των γονιδίων που περιέχονται σ' αυτήν.

Η χαρτογράφηση των ESTs σε γενωμικούς κλώνους έγινε με διερεύνηση αντίστοιχης βιβλιοθήκης BAC. Τα ESTs που επιλέχθηκαν, χαρτογραφούνται, σχετικά ομοιόμορφα, μεταξύ των γενετικών δεικτών D10S198 και D10S597 καλύπτοντας μία απόσταση 11,3 cM (βλ. γενετικό χάρτη IMBB, Εικ. 1).

Απομονώσαμε 450 περίπου κλώνους PAC και BAC που αντιστοιχούν σε 50 περίπου ESTs χαρτογραφημένα σε κυτταρικά υβρίδια που περιέχουν συγκεκριμένους γενετικούς δείκτες. Θεωρώντας ότι η επιλεγμένη χρωμοσωμική περιοχή (γενετική απόσταση: 11cM) αντιστοιχεί σε φυσική απόσταση περίπου 11Mb και ότι το μέσο μήκος των ενθεμάτων των παραπάνω γενωμικών κλώνων είναι της τάξεως των 170kb, προκύπτει ότι έχουμε υπερκάλυψη με κλώνους BAC του συγκεκριμένου χρωμοσωμικού τμήματος, κατά 6 φορές περίπου. Αν και όλα τα ESTs που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από ανεξάρτητα αθροίσματα, με βάση τα δεδομένα της Unigene, ενενήντα περίπου BACs έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από μία φορές, γεγονός που υποδηλώνει ότι, ορισμένες τουλάχιστον, νουκλεοτιδικές καταχωρίσεις της Unigene επικαλύπτονται στο χρωμοσωμικό DNA και τα επιμέρους cDNA contigs αποτελούν μέρος του ίδιου γονιδίου. Με μετριοπαθείς υπολογισμούς, υπολογίζουμε ότι ο αριθμός των ESTs τα οποία χαρτογραφήθηκαν σε γενωμικούς κλώνους BAC και αντιπροσωπεύουν διαφορετικά γονίδια, τα οποία δεν εμφανίζουν σημαντική ομολογία με ήδη γνωστά χαρακτηρισμένα γονίδια, είναι περίπου τριάντα.

Σχέδια για το άμεσο μέλλον - προοπτικές

Ως συνέχεια της εργασίας αυτής προγραμματίζεται η απομόνωση επιπλέον κλώνων χρησιμοποιώντας 30 ανιχνευτές – ESTs που χαρτογραφούνται μεταξύ των

γενετικών δεικτών D10S198 – D10S597. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την βελτίωση της διακριτικής ικανότητας του ενιαίου contig που θα σχηματιστεί. Επίσης, καθ' οδόν είναι η απομόνωση γενωμικών κλώνων BAC χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές 35 περίπου ESTs που χαρτογραφούνται μεταξύ των γενετικών δεικτών D10S564 - D10S583 (~3,5 cM) στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23.3. Επόμενο βήμα θα είναι η απομόνωση κλώνων BAC προερχόμενα από το χρωμοσωμικό διάστημα D10S586 - D10S198 (απόσταση μικρότερη των 8 cM), το οποίο έχει προκαταρκτικά καλυφθεί από ένα contig από μέγα –YACs που στηρίζεται όμως σε λίγους κλώνους ταυτοποιημένους βάσει ενός μικρού αριθμού ESTs (Nobile *et al*, 1997). Όλοι αυτοί οι κλώνοι BAC σκοπεύεται να ενσωματωθούν σε ένα ενιαίο contig με διακριτική ικανότητα επιπέδου 3kb. Υπολογίζεται ότι αυτό το contig θα υπερκαλύπτει την χρωμοσωμική περιοχή 10q23–q25 κατά 6-9 φορές. Μία συνολική απεικόνιση της περιοχής φαίνεται στην Εικ. 22.

Το δυσκολότερο βήμα κατά το σχηματισμό μεγάλων contigs, είναι τα κενά που προκύπτουν στις αλληλοεπικαλύψεις των κλώνων εξαιτίας της έλλειψης απόλυτης αντιπροσωπευτικότητας των διαφόρων χρωμοσωμικών περιοχών στους κλώνους των βιβλιοθηκών που χρησιμοποιούνται και στην ύπαρξη περιοχών, στους γενετικούς χάρτες των χρωμοσωμάτων, που εμφανίζουν ανομοιομορφία στην κατανομή των δεικτών – STSs και στους πολυμορφικούς δείκτες. Τα κενά αυτά είναι δυνατόν να καλυφθούν με επιπλέον κλώνους που προκύπτουν από επαναληπτική διερεύνηση της βιβλιοθήκης, χρησιμοποιώντας νέους ανιχνευτές που δημιουργούνται από τα άκρα των υπαρχόντων contigs. Τέτοιες αλληλουχίες, προερχόμενες από τα άκρα των κλώνων, ονομάζονται STCs (sequence – tagged connectors) και για την βιβλιοθήκη BAC, με την πολλαπλή αντιπροσώπευση του ανθρώπινου γονιδιώματος που την χαρακτηρίζει, υπολογίζεται ότι μπορούν να δημιουργηθούν σε αυξημένη πυκνότητα, ένα STC ανά 5kb (Rowen L *et al*, 1997).

Από το contig που θα σχηματιστεί, θα γίνει επιλογή καλά χαρακτηρισμένων κλώνων, ελάχιστων σε αριθμό (sequence - ready tilling path), οι οποίοι θα καλύπτουν περίπου 25cM, χρωμοσωμική περιοχή που αντιπροσωπεύει ποσοστό της τάξεως του 20% του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 10. Το contig αυτό θα χρησιμεύσει στον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας αυτής της περιοχής. Με τη σημερινή διαθέσιμη τεχνολογία, ένας τέτοιος στόχος είναι εύκολα πραγματοποιήσιμος από τα μεγάλα ερευνητικά κέντρα, που πραγματοποιούν

προσδιορισμό νουκλεοτικών αλληλουχιών σε μεγάλη κλίμακα, με ρυθμό τουλάχιστον 20 – 30Mb ανά έτος. Να αναφερθεί ότι, μέχρι τώρα, το μεγαλύτερο ενιαίο τμήμα του ανθρώπινου γονιδιώματος για το οποίο έχει προσδιοριστεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία του, είναι 1,5 Mb περίπου (Olson lab, Univ. of Washington, χρωμόσωμα 7), ενώ στο χρωμόσωμα 10, έχει προσδιοριστεί νουκλεοτιδική αλληλουχία συνολικού μήκους 1,2 Mb, στην κρίσιμη περιοχή για το σύνδρομο DiGeorge (Pennisi E, 1998).

Όταν υπάρχει διαθέσιμη μία νουκλεοτιδική αλληλουχία, είναι δυνατή η πρόβλεψη των κωδικών αλληλουχιών, των ρυθμιστικών στοιχείων και των σημείων συναρμογής εξονίων – ιντρονίων που περιέχει, με την εφαρμογή κατάλληλων διαθέσιμων ηλεκτρονικών προγραμμάτων. Πληροφορίες από τέτοιες προβλέψεις, σε συνδυασμό με δεδομένα της βάσης δεδομένων Unigene που συνεχώς εμπλουτίζονται και που ομαδοποιούν αλληλουχίες ESTs με κριτήριο τον εντοπισμό τους στο ίδιο γονίδιο, μπορούν να οδηγήσουν στην κατασκευή της γονιδιωματικής οργάνωσης μιας χρωμοσωμικής περιοχής. Η ολοκλήρωση της δομικής γονιδιωματικής ανάλυσης (structural genomics) αποτελεί μία πολύ χρήσιμη βάση για τη μελέτη της λειτουργικής γονιδιωματικής ανάλυσης (functional genomics) (Hieter P, 1997). Γνωρίζοντας τα όρια των κρίσιμων περιοχών που σχετίζονται με εμφάνιση νόσων από τη μια και έχοντας προσδιορίσει τα αντίστοιχα γονίδια, θα είναι δυνατή η εφαρμογή της μεθόδου του υποψήφιου γονιδίου που θα στηρίζεται:

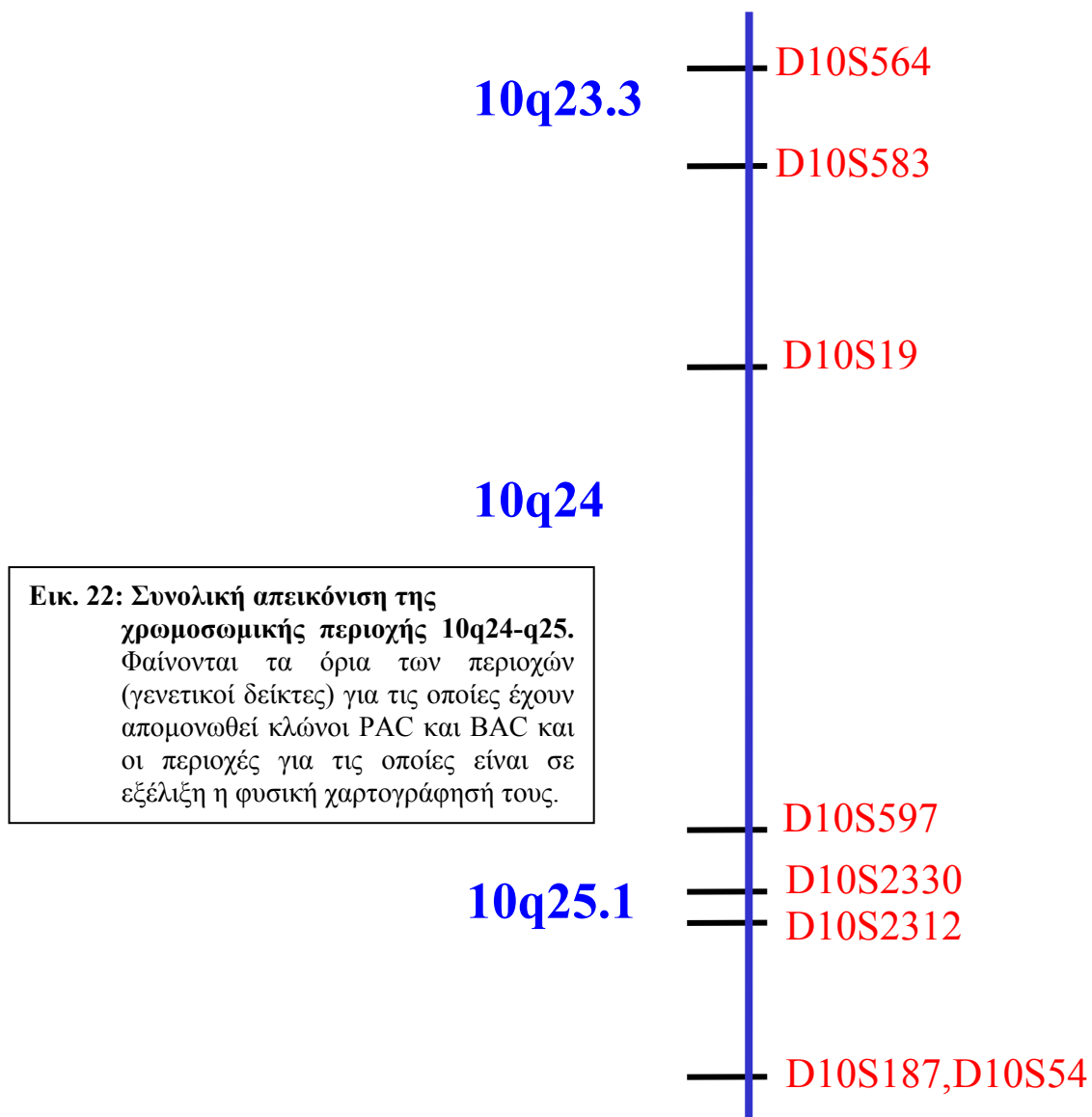
α) Σε πρότυπα έκφρασης: Είναι σε εξέλιξη η ανάπτυξη τεχνολογιών που μελετάνε, ταυτόχρονα, την έκφραση χιλιάδων γονιδίων, με χρήση μικροτσιπ. Για παράδειγμα, είναι δυνατή η μονιμοποίηση σε φίλτρο ή γυαλί, μεγέθους 2 X 2cm, 10.000 διαφορετικών μορίων cDNAs ή ολιγονουκλεοτιδίων. Έτσι, με ένα μόνο πείραμα, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή π.χ. RNA ή cDNA από ένα καρκινικό κύτταρο, ανιχνεύονται τα γονίδια που εκφράζονται ή καταστέλλονται (Ermolaeva O *et al*, 1998).

β) Σε ομολογίες με γνωστά γονίδια που έχουν ταυτοποιηθεί σε οργανισμούς-μοντέλα. Ήδη έχει ολοκληρωθεί ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του σακχαρομύκητα (Goffeau A *et al*, 1996), του E. coli (Burland V *et al*, 1998) και δεκαέξι τουλάχιστον άλλων μικροβίων ενώ είναι σε εξέλιξη το πρόγραμμα για την δροσόφιλα (<http://fruitfly.berkeley.edu/>) και το ποντίκι. Επιπλέον, είναι σε εξέλιξη πρόγραμμα κατασκευής διαφορετικών στελεχών σακχαρομύκητα, που στο καθένα θα υφίσταται έλλειψη ενός από τα 6000 περίπου γονίδια (Oliver S, 1996), καθώς και η

εφαρμογή του συστήματος των δύο-υβριδίων για όλους τους δυνατούς συνδυασμούς γονιδίων (περίπου 12 εκατομμύρια ζεύγη) (Fields S, Song O, 1989).

γ) Σε διερεύνηση μεταλλαγών στις κωδικές περιοχές γονιδίων που θεωρούνται ότι ενέχονται στην εμφάνιση νόσων, σε δείγματα DNA υγείων και ασθενών ατόμων ή σε DNA από διαφορετικούς ιστούς ασθενών (σωματικές μεταλλαγές). Παρότι δεν πρέπει να θεωρούνται ως μεταλλαγές οι διάφοροι πολυμορφισμοί (αλληλόμορφα) που παρατηρούνται στις κωδικές περιοχές γονιδίων, εντούτοις σε μερικές περιπτώσεις, έχει διαπιστωθεί η αυξημένη προδιάθεση για κάποια ασθένεια, σε άτομα που φέρουν κάποιο συγκεκριμένο αλληλόμορφο, όπως π.χ. η συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένου αλληλομόρφου του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης E και η προδιάθεση για τη νόσο Alzheimer's και για καρδιαγγειακές παθήσεις (Lander E, 1996).

Συμπερασματικά, με την ολοκλήρωση των αποτελεσμάτων της δομικής γονιδιωματικής ανάλυσης, υπάρχει η διαθέσιμη τεχνολογία για τη μελέτη, σε μεγάλη κλίμακα, της λειτουργίας των γονιδίων που θα προκύψουν.



Βιβλιογραφία

1. Adams MD, et al (1995). Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* 377 (6547 Suppl):3-174.
2. Albarosa R et al (1996). Deletion mapping of gliomas suggests the presence of two small regions for candidate tumor-suppressor genes in a 17-cM interval on chromosome 10q. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 1260-1267.
3. Albarosa R et al (1997). Physical maps of two putative tumor suppressor regions in glioblastoma on chromosome 10q. Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 10 Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 78: 183-196.
4. Anand R et al (1990). A 3.5 genome equivalent multi access YAC library: construction, characterisation, screening and storage. *Nucleic Acids Res.* 18(8):1951-6.
5. Antonarakis SE (1994). Genomic linkage scanning: systematic or intelligent? *Nat Genet* 8: 211-212.
6. Bannayan GA (1971). Lipomatosis, angiomatosis and macrencephalia. A previously undescribed congenital syndrome. *Arch Pathol* 92: 1-5.
7. Birnboim HC, et al (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* Nov 24:7(6):1513-23.
8. Bostrom J et al (1998). Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res.* 58(1): 29-33.
9. Brown NH, et al (1988). Functional cDNA libraries from *Drosophila* embryos. *J Mol Biol.* 203(2): 425-37.
10. Burland V, et al (1998). The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157: H7. *Nucleic Acids Res* 26(18): 4196-204.
11. Call KM (1997). Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 10 Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 78: 183-196.
12. Call KM et al (1997). Mapping and sequencing of human chromosome 10. Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 10 Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 78: 183-196.

13. Chu G et al (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234(4783): 1582-5.
14. Chumakov I.M et al. (1995). A YAC contig map of the human genome. *Nature* 377 (supl.): 175-183.
15. Church DM, et al (1994). Isolation of genes from complex sources of mammalian genomic DNA using exon amplification. *Nat Genet.* Jan: 6(1):98-105.
16. Church JM and Gilbert W (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81(7): 1991-5.
17. Craig JM and Bickmore WA (1994). The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes. *Nat Genet* 7: 376-382.
18. Cristofano A et al (1998). Pten is essential for embryonic development and tumor suppression. *Nat Genet* 19: 348-355.
19. Dahia PL et al (1997). Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors. *Cancer Res.* 57(21): 4710-3.
20. Deloukas P (1997). Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 10 Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 78: 183-196.
21. Dib C et al (1996). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380: 152-154.
22. Eng C et al (1994). Cowden syndrome and Lhermitte-Duclos disease in a family: a single genetic syndrome with pleiotropy? *J Med Genet* 31: 458-461.
23. Ermolaeva O et al (1998). Data management and analysis for gene expression arrays. *Nat Genet* 20 (1): 19-23.
24. Fields S, et al (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230): 245-6.
25. Gehring WJ et al (1996). The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Genes Cells* 1 (1): 11-15.
26. Gemel J et al (1996). Structure and sequence of human FGF8. *Genomics* 35: 253-257.
27. Goffeau A, et al (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274(5287):546, 563-7.
28. Goulian M et al (1968). Incorporation of oligodeoxynucleotides into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 61(1):284-91.
29. Gray IC et al (1995). Loss of chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer Res* 55: 4800-4803.

30. Gurrieri F et al (1996). A split hand-foot (SHFM 3) gene is located at 10q24-q25. *Am. J. Med. Genet.* 62: 427-436.
31. Gyapay G et al (1996). A radiation hybrid map of the human genome. *Hum. Mol. Genet.* 5: 339-346.
32. Hayes PD et al (1996). Regional assignment of human ESTs by whole-genome radiation hybrid mapping. *Mamm Genome* 7 (6): 446-450.
33. Hewett DR et al (1997). Construction of a genetic and physical map spanning the bromodeoxyuridine-inducible fragile site on human chromosome 10q25.2. Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 10 Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 78: 183-196.
34. Hieter P and Mark Boguski (1997). Functional Genomics: It's all How You Read It. *Science* 278: 601-602.
35. Hill RE et al (1992). Mouse Small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 355 (6362): 750.
36. Horii A et al (1998). Identification of a 120-kb region of common allelic loss in chromosome band 10q25-q26 in human endometrial cancer. *Human Genome Meeting '98, Turin, Italy.*
37. Hudson T.J et al (1995). An STS-based map of the human genome. *Science* 270: 1945-1954.
38. Ioannou PA et al (1994). A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet*, 6: 84-89.
39. Kapsetaki M, et al (1994). The EUROGEN map of human chromosome 10. *Eur J Hum Genet* 2(3):222-3.
40. Kennedy MA et al (1991). HOX 11, a homeobox-containing T-cell oncogene on human chromosome 10q24. *Proc Natl Acad Sci* 88: 8900-8904.
41. Kokkinaki M et al (1997). Map integration at 10q23-q25 chromosomal region. . Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 10 Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 78: 183-196.
42. Κοκκινάκη Μ. (1996). Διατριβή μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης στη Μοριακή Βιολογία και Γενετική. Συμβολή στη βελτίωση του γενετικού, φυσικού και κυτταρογενετικού χάρτη του χρωμοσώματος 10 του ανθρώπου.
43. Kuczyk MA et al (1998). The MXI1 tumor suppressor gene is not mutated in primary prostate cancer. *Oncol Rep.* 5 (1): 312-216.

44. Kunkel LM et al (1985). Construction of a human X-chromosome-enriched phage library which facilitates analysis of specific loci. *Gene* 33 (3): 251-258.
45. Lako M et al (1996). Isolation and characterization of WNT8B, a novel human Wnt gene that maps to 10q24. *Genomics* 35 (2): 386-388.
46. Lander E (1996). The new genomics: Global Views of Biology. *Science* (274): 536-539.
47. Li J et al (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275: 1943-1947.
48. Liaw D et al (1997). Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 16: 64-67.
49. Little RD et al (1997). Assembly of high-resolution sequence ready physical maps for human chromosome 10. Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 10 Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 78: 183-196.
50. Lyonnet S et al (1995). A gene for Hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10. *Nat Genet* 4: 346-350.
51. Mac Donald M and Ambrose CM et al (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosome. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72 (6): 971-983.
52. Marzella R. et al. (1997). Map integration at human chromosome 10: Molecular and cytogenetic analysis of a chromosome-specific somatic cell hybrid panel and genomic clones based on a well-supported genetic map. *Cytogenet. Cell Genet.* 79: 257-265.
53. Meitinger T (1997). Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 10 Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 78: 183-196.
54. Mollenhauer J et al (1997). DMBT 1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumors. *Nat. Genet.* 17: 32-39.
55. Mushegian AR et al (1997). Positionally cloned human disease genes: patterns of evolutionary conservation and functional motifs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 (11): 5831-5836.

56. Mushegian AR et al (1998). Large-scale taxonomic profiling of eukariotic model organisms: A comparison of orthologous proteins encoded by the human, fly, nematode and yeast genomes. *Genome Res* 8 (6): 590-598.
57. Nelen MR et al (1997). Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum Mol Genet* 6: 1383-1387.
58. Nelson DL et al (1989). Alu polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 6686-6690.
59. Nikali K et al (1997). Towards cloning of a novel ataxia gene: refined assignement and physical map of the IOSCA locus (SCA 8) on 10q24. *Genomics* 39: 185-191.
60. Nobile C et al (1997). A refined physical and EST map spanning 7.4 Mb of chromosome band 10q24. *Human Genome Meeting '98*, Turin, Italy.
61. Nobile et al (1997). Mapping of transcribed sequences along a detailed YAC map at 10q24. *Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 10 Mapping*. *Cytogenet Cell Genet* 78: 183-196.
62. Nunes M. E et al (1995). A second autosomal split hand/foot locus maps to chromosome 10q24-q25. *Hum. Molec. Genet.* 4: 2165-2170.
63. Oh J et al (1996). Positional cloning of a gene for Hermansky-Pudlak syndrome, a disorder of cytoplasmic organelles. *Nat Genet* 14 (3): 300-306.
64. Oliver S (1996). A network approach to the systematic analysis of yeast gene function. *Trends Genet* 12(7): 241-2.
65. Pennisi E (1998). DNA Sequencers' Trial by Fire. *Science* 280: 814-817.
66. Perhouse M.A et al (1993). Analysis of the functional role of chromosome 10 loss in human glioblastomas. *Cancer Research* 53: 5043-5050.
67. Rasheed B.K et al (1995). Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 10: 2243-2243.
68. Resnick D et al (1994). The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 19: 5-8.
69. Riddell DC et al (1987). Regional assignment for the genes encoding human P450III A3 (CYP 3) and P450II C9 (CYP 2C). *Cytogenet Cell Genet* 46:682.

70. Riordan J.R et al (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary cDNA. *Science*, 245 (4922): 1066-1073.
71. Risinger JI et al (1997). PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Res* 57 (21): 4736-4738.
72. Rommens J.M et al (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 245 (4922): 1059-1065.
73. Rowen L et al (1997). Sequencing the Human Genome. *Science* 278: 605-607.
74. Safara A. et al (1997). Allelic loss and genomic instability in the region q23-q26 of the chromosome 10 in endometrial cancer. Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 10 Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 78: 183-196.
75. Saiki R.K et al (1988). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350.
76. Sanyanusin P et al (1995). Mutation of the PAX 2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal abnormalities and vesicoureteral reflux. *Nat Genet* 9 (4): 358-364.
77. Sanyanusin P et al (1996). Genomic structure of the human PAX 2 gene. *Genomics* 35 (1): 258-261.
78. Schlessinger D (1990). Yeast artificial chromosomes: tools for mapping and analysis complex genomes. *TIG*, 6 (8) :248-258.
79. Schuler GD et al (1996). Genome maps 7. The human transcript map. *Science* 274 (5287): 547-562
80. Schwartz D.C et al (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37(1):67-75.
81. Shizuya H et al (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8794-8797 .
82. Soderlund C, et al (1997). FPC: a system for building contigs from restriction fingerprinted clones. *Comput Appl Biosci.* 13(5):523-35.
83. Southern E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503.
84. Spurr NK et al (1987). Isolation of human cytochrome P450 cDNA for the study of linkage in human disease. *Cytogenet Cell Genet* 46: 698.

85. Steck P.A et al (1997). Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature Genet.* 15: 356-362.
86. Suomalainen A et al (1995). An autosomal locus predisposing to deletions of mitochondrial DNA. *Nature Genetics* 9: 146-151.
87. Wang C.Y et al (1997). Homozygosity and linkage-disequilibrium mapping of the urofacial (Ocha) syndrome gene to a 1cM interval on chromosome 10q23-q24. *Am J Hum Genet* 60 (6): 1461-1467.
88. Wang SI et al (1997). Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiform. *Cancer Res* 57 (19): 4183-4186.
89. Yoshiura K et al (1997). Genomic structure, sequence and mapping of human FGF8 with no evidence for its role in craniosynostosis/limb defect syndromes. *Am J Med Genet* 72: 354-362.
90. Yu C.E et al (1996). Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272 (5259): 258-262.
91. Zervos SJ et al (1993). Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind to Myc-Max recognition sites. *Cell* 72: 223-232.
92. Zonana J et al (1976). Macrocephaly with multiple lipomas and menengiomas. *J Paediatr* 89: 600-603.
93. Maniatis, Sambrook, Fritch, (1989). *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* Second edition.

