

Shauni Loopmans
3^{de} Bachelor Bio-ingenieurswetenschappen
Afstudeerrichting Cel- en genbiotechnologie

ADNP-GEN MUISMODELLEN
GEÏNTEGREERD PRACTICUM CEL- EN GENBIOTECHNOLOGIE
EXAMENOPDRACHT

Universiteit Antwerpen
Academiejaar 2013-2014

ADNP-gen muismodellen

Activity-Dependent Neuroprotective Protein of ADNP is een transcriptiefactor bestaande uit 1102 aminozuren die bindt op het BAF of SWI/SNF remodeling complex, een complex dat instaat voor de maturatie van neurale progenitor cellen tot neuronen. Deze maturatie kan plaatsvinden doordat het proteïne zijn C-terminale einde gebruikt om te interageren met het complex.

Het ADNP gen bestaat uit vijf exonen, waarvan slechts de laatste drie getransleerd worden tot het functionele ADNP proteïne. Een recente studie heeft aangetoond dat de novo mutaties in dit ADNP gen verantwoordelijk kunnen zijn voor SWI/SNF gerelateerd autisme. Frameshift of nonsense mutaties in de regio aan het 3' einde van het laatste exon van dit gen vormen de oorzaak voor het ontstaan van een prematuur stopcodon. Deze mutaties zorgen er dus voor dat minstens 166 aminozuren aan het C-terminale einde van het ADNP proteïne verdwijnen. Aangezien ADNP met het BAF-complex interageert via zijn C-terminale einde, zal gemuteerd ADNP geen optimale interactie met het complex kunnen ondergaan. Het BAF-complex zal hierdoor dus niet meer optimaal kunnen werken en dit resulteert in de deregulatie van verschillende cellulaire processen. Volgens de studie zouden deze mutaties dus aan de basis kunnen liggen van 0,17% van het autisme, wat het vandaag de dag de meest frequent bekende genetische oorzaak maakt.

Werkwijze

Om het SWI/SNF gerelateerd autisme verder te onderzoeken, kunnen we gebruik maken van muismodellen. Muizen delen ongeveer 90% van hun genoom met de mens en zijn hierdoor extreem bruikbaar om experimenten op uit te voeren.

Een mogelijk muismodel dat gebruikt kan worden om de invloed van ADNP-mutaties te onderzoeken, is een ADNP knock-out muis. Het principe van een knock-out muis is dat een bepaald gen geïnactiveerd wordt door het te vervangen of verstoren met een artificieel stuk DNA nl. een targetting vector. Dit zijn plasmide vectoren die gespecialiseerd zijn in homologe recombinatie. Homologe recombinatie is de uitwisseling van DNA tussen twee DNA moleculen door de recombinatie via hun homologe regio's.

De eerste stap in het produceren van een ADNP knock-out muis, is het isoleren van de inner cell mass uit de blastocyst van een bepaald type muis van soort 1. De inner cell mass, die embryonale stamcellen bevat, kan nu in cultuur gebracht worden.

Vervolgens wordt de targetting vector aangemaakt. Hiervoor gebruiken we een BAC muis DNAbank om via Southern Blot hybridisatie het ADNP-gen te verkrijgen. Op deze manier kunnen we een BAC clone selecteren die het ADNP gen bevat. Het gen wordt uit de BAC clone gehaald en in de targetting vector geplaatst. Momenteel hebben we dus een vector met het ADNP gen, maar aangezien we het gen willen uitschakelen, moeten we het functionele deel van het gen verwijderen.

Vermits enkel de laatste drie exonen translatie ondergaan en het ADNP eiwit vormen, is het voldoende om deze uit te schakelen door deze te vervangen door een neo marker die zal dienen als positieve selectie voor de recombinante stamcellen.

De flankerende regio's van de exonen worden behouden, zodat homologe recombinatie kan plaatsvinden in de stamcellen.

Na de 3' flankerende regio wordt ook een thymidine kinase marker ingebouwd die zal dienen als negatieve selectie voor de targetting vector.

In een volgende stap worden de geïsoleerde stamcellen geïnfecteerd met de targetting vector. Homologe recombinatie zal plaatsvinden, waardoor het ADNP gen uitgeschakeld wordt.

Niet alle vectoren zullen echter gebruikt worden en niet alle stamcellen worden geïnfecteerd.

Om de recombinante stamcellen te selecteren, voegen we G148 en gancyclovir toe.

G148 is een antibioticum en enkel cellen die de neo marker bevatten en dus resistent zijn aan G148 zullen overleven. Dit zijn de stamcellen waarbij de homologe recombinatie met de targettingvector succesvol heeft plaatsgevonden.

Gancyclovir wordt gebruikt om de overblijvende vectoren af te breken, die herkend worden door de thymine kinase marker.

Southern Blot hybridisatie kan nogmaals gebruikt worden om na te gaan of er wel degelijk recombinatie heeft plaatsgevonden.

Tenslotte worden deze stamcellen geïnjecteerd in de blastocyst van een muis van een andere soort, soort 2. De nakomelingen van deze muis zullen dus recombinanten zijn.

De recombinanten kunnen dan gekruisd worden met een wildtype muis van soort 3, zodat heterozygote recombinanten worden verkregen. Onderlinge kruisingen tussen de heterozygoten kunnen er nu voor zorgen dat er heterozygote ADNP +/- muizen, wild type ADNP ++ muizen en homozygoten ADNP -/- muizen worden verkregen. De homozygote ADNP -/- muizen zijn echter niet levensvatbaar doordat de neurale buis niet gesloten wordt. De genotypering van de muizen kan opnieuw plaatsvinden via Southern Blot hybridisatie.

Onderzoek ADNP +/- mutanten

Er zijn verschillende technieken die gebruikt kunnen worden om vanuit deze muismodellen de gevolgen van ADNP mutaties verder te onderzoeken.

Ten eerst kan het niveau van ADNP expressie bepaald worden. Hiervoor moet eerst een eiwitextractie plaatsvinden. De cel wordt opengebroken via sonicatie en de hieropvolgende centrifugatie zal ervoor zorgen dat de eiwitten neerslaan.

Vervolgens wordt een verticale gelelektroforese uitgevoerd met behulp van een SDS-PAGE gel om de verschillende proteïnen van elkaar te scheiden.

Het uitvoeren van een Western blot kan uiteindelijk het ADNP detecteren door gebruik te maken van ADNP specifieke antilichamen. Met behulp van de eigenschappen van de gebonden antilichamen bv. fluorescentie kan het geëxprimeerd ADNP gevisualiseerd worden.

Vermits ADNP +/- muizen minder functioneel ADNP aanmaken, verwachten we dus een lagere concentratie aan ADNP dan bij de ADNP ++ muizen.

Vervolgens kan ook de neurodegeneratie gekwantificeerd worden. Om dit te verwezenlijken wordt hersenweefsel van de muizen behandeld met Fluoro-Jade B staining. Fluor-Jade B labelt degenererende neuronen. Het weefsel kan vervolgens onder een microscoop bekeken worden en de gedegenererde neuronen worden geteld. We verwachten dan dat ADNP +/- muizen een hoger aantal gedegenererde neuronen zullen vertonen dan ADNP ++ muizen.

Tenslotte kunnen ook experimenten opgesteld worden in verband met het sociaal gedrag en het geheugen van de muizen. Een voorbeeld van een experiment om het geheugen van de muizen te testen is door ze meerdere malen eenzelfde doolhofparcours te laten afleggen en vervolgens de tijd waarin dit gebeurt te vergelijken tussen de verschillende pogingen. Bij ADNP ++ muizen verwachten we een beter geheugen en dus een korter tijd na verscheidene pogingen, terwijl muizen die ADNP +/- zijn er langer over zullen doen zelfs na het parcours meerdere malen af te leggen.