

**Hönnun plasmíða með SLC13A5
stökkbrigðum og bæling Indy í *Drosophila
melanogaster***

Aðalbjörg Egilsdóttir



**Líf og umhverfisvísindadeild
Háskóli Íslands
2018**

Hönnun plasmíða með SLC13A5 stökkbrigðum og bæling Indy
í *Drosophila melanogaster*

Aðalbjörg Egilsdóttir

15 ECTS rannsóknarverkefni í líffræði
2019

Leiðbeinendur
Sigríður Rut Franzdóttir
Kristín Elísabet Allison

Líf og umhverfisvísindadeild
Verkfræði- og náttúruvísindasvið
Háskóli Íslands

Hönnun plasmíða með SLC13A5 stökkbreytingum og bæling Indy í *Drosophila melanogaster*

Hönnun pcDNA3.1(+) SLC13A5 og framköllun floga í flugum

Líf og umhverfisvísindadeild

Verkfræði- og náttúruvísindasvið

Háskóli Íslands

Skráningarupplýsingar:

Aðalbjörg Egilsdóttir, 2019, *Hönnun plasmíða með SLC13A5 stökkbrigðum og bæling Indy í Drosophila melanogaster*, 15 ECTS rannsóknarverkefni í líffræði,

Líf og umhverfisvísindadeild, Háskóli Íslands, 27 bls.

Reykjavík, maí 2019

Útdráttur

Síðustu 20 ár hefur sítratflutningspróteinið Indy í *Drosophila melanogaster* fengið mikla athygli vegna möguleika á að nota það sem lyfjamark í meðferðum við lífsstílstengdum sjúkdómum. Ástæðan er sú að flugur með stökkbreytingar, sem valda bælingu próteinsins, lifa lengur og svipgerð þeirra er eins og hjá flugum sem borða minna. Samsvarandi prótein hefur fundist í spendýrum, SLC13A5, sem stökkbreytingar í valda svipuðum áhrifum og á flugur. Nýlega uppgötvuðust stökkbreytingar hjá mönnum, í þessu sama geni, sem valda alvarlegri flogaveiki vegna heilakvilla, CTD. Ekki eru til lyf gegn sjúkdómnum sem tveir sjúklingar hafa greinst með hér á landi. Þekkt stökkbreyting í SLC13A5, G219R, er um 20 sinnum algengari í Íslendingum en í öðrum Evrópubúum.

Í þessu verkefni var plasmíð hannað með SLC13A5 innskoti til tjáningar í mannafrumum. Fjórar þekktar íslenskar stökkbreytingar voru innleiddar á geninu og plasmíðin voru raðgreind til staðfestingar. Hönnun plasmíða með óstökkbreyttu SLC13A5 og þremur stökkbreytinganna tókust.

Ekki hefur tekist að sýna fram á að bæling Indy í *D. melanogaster* valdi flogaveiki en próteinið er tjáð í ýmsum frumum sem koma nálægt taugakerfinu. Gerð voru flogapróf á flugum með bælda tjáningu á Indy í glialfrumum. Ekki tókst að safna nógu mörgum flugum af F1 kynslóð til að niðurstöður væru marktækar en áhugavert væri að endurtaka prófin síðar auk fleiri prófa til að kanna hlutverk próteinsins í taugakerfi fluga.

CTD er alvarlegur sjúkdómur sem getur umturnað lífi heilu fjölskyldnanna. Mikilvægt er að lækning finnist sem fyrst og getur þetta verkefni vonandi nýst á þeirri vegferð.

Efnisyfirlit

Myndir	xii
Töflur	xiii
1 Inngangur	1
1.1 Hlutverk SLC13A5	1
1.2 Indy/SLC13A5 skortur í ýmsum lífverum	2
1.3 SLC13A5 skortur í mönnum	3
1.3.1 Stökkbreytingar sem finnast á Íslandi	5
1.4 Markmið verkefnis	6
2 Aðferðir	7
2.1 Undirbúningur plasmíðs með SLC13A5 innskoti	7
2.1.1 Mögnun SLC13A5 úr pcDNA GFP-lic SLC13A5	7
2.1.2 Gibson klónun	8
2.1.3 Ummyndun <i>Escherichia coli</i>	9
2.1.4 Einangrun erfðæfnis og skerðigreining	10
2.1.5 Innleiðing stökkbreytinga í SLC13A5	10
2.1.6 Raðgreining	12
2.2 Indy og <i>Drosophila melanogaster</i>	13
2.2.1 Flogapróf	13
3 Niðurstöður	15
3.1 Plasmíð með SLC13A5 innskoti	15
3.1.1 Hönnun plasmíðs	15
3.1.2 Raðgreining	17
3.2 Áhrif þöggunar INDY á <i>Drosophila melanogaster</i>	18
3.2.1 Gal4 kerfið	18
3.2.2 Framköllun floga	20
4 Umræður	21
Viðauki	23
Heimildir	26

Myndir

Mynd 1. Ýmis hlutverk sítrats í lifrarfrumum. Frá Willmes o.fl., 2018.....	2
Mynd 2. Leiðin frá sítrati að GABA. Ensím sem hvarfa hvörfin eru í þessari röð: Acotinase, isocitrate dehydrogenase, transaminase, glutamate (Bhutia o.fl., 2017).....	4
Mynd 3. Staðsetning og nafn þeirra stökkbreytinga í SLC13A5 sem Selch o.fl. skoðuðu í rannsókn sinni.	5
Mynd 4. Staðsetning stökkbreytinga á SLC13A5 sem þekktar eru í Íslendingum (Kristín E. Allison, 2017).	6
Mynd 5. Saga SLC13A5 frá pcDNA GFP-lic í pcDNA3.1(+).	15
Mynd 6. Niðurstöður skerðigreiningar á pcDNA3.1(+) með SLC13A5 innskoti. Sýni 1 klipptist rétt og voru tómt pcDNA3.1(+) og pcDNA GFP-lic með SLC13A5 innskoti notuð sem viðmið.	16
Mynd 7. Niðurstöður skerðigreiningar á stökkbreytingunni G219R. A stendur fyrir G219R A stökkbreytinguna en B fyrir G219R B stökkbreytinguna. Sýni A2, A4 og B4 klipptust rétt.....	17
Mynd 8. Niðurstöður skerðigreiningar á stökkbreytingum í SLC13A5. C = A119T, D = Q185R og F = V429I. Sýni C1, C2, C3, D5, F2 og F3 klipptust rétt.....	17
Mynd 9. Afleiðingar þess að einn basi datt út í Thr223. Basann vantar þar sem bláa strikið er.	18
Mynd 10. Gal4 kerfið í ávaxtaflugu (Kelly, Elchert og Kahl, 2017).	19
Mynd 11. Mögulegar arfgerðir afkvæma úr æxlun.	19
Mynd 12. pcDNA3.1(+) með SLC13A5 innskoti.	23

Töflur

Tafla 1. Vísar notaðir í að magna upp SLC13A5 úr pcDNA GFP-lic með SLC13A5 innskoti. Stopptákninn sem var búinn til er undirstrikaður. Lágstafir tákna skörun við pcDNA3.1(+) í kringum skerðiset EcoRI og hástafir skörun við SLC13A5.	7
Tafla 2. Uppskrift PCR, mögnun SLC13A5 upp úr pcDNA GFP-lic með SLC13A5 innskoti.	7
Tafla 3. Hitastig og tími í PCR hvarfi (sjá uppskrift í töflu 2).	8
Tafla 4. Klipping pcDNA3.1(+) með EcoRI.	9
Tafla 5. Uppskrift af Gibson hvarfi.	9
Tafla 6. Stökkbreytingar sem voru skoðaðar auk vísa sem notaðir voru til að innleiða þær og skerðiseta sem var bætt við. Stökkbreyting er undirstrikuð og skerðiset feitlettrað.	11
Tafla 7. Uppskrift af Q5 Site Directed Mutagenesis.	11
Tafla 8. Hitastig og tími í Q5 Site Directed Mutagenesis.	12
Tafla 9. Vísar sem notaðir voru til raðgreiningar.	12
Tafla 10. Stökkbreytingar sem innleiddar voru auk skerðiensíma sem notuð voru til skerðigreiningar og stærðar búta.	16
Tafla 11. Plasmíð sem hönnuð voru í verkefninu.	18
Tafla 12. Fjöldi flugna sem skriðu upp 4 sentímetra á 5 sekúndum. Átta flugum var gefið tækifæri í hvert skipti.	20
Tafla 13. Niðurstöður raðgreiningar á stökkbrigðum SLC13A5. Sýndur er sá partur sem nær yfir vísana sem notaðir voru til stökkbreytinga á geninu. Þeir basar sem misfórust í raðgreiningunni eru feitlettraðir.	23

Þakkarorð

Þetta verkefni er stærsta verkefni sem ég hef unnið að og hef ég því mörgum að þakka fyrir hjálp og stuðning. Fyrst vil ég þakka Sigríði Rut og Kristínu Elísabetu fyrir að leyfa mér að vinna að verkefninu og alla þá hjálp og leiðbeinslu sem þær hafa veitt mér. Að auki vil ég þakka Zophaníasi Oddi fyrir hjálpina þegar Sigríður var í burtu og öllum á rannsóknarstofu 387 í Öskju sem hjálpuðu mér að fóta mig þar inni. Fyrir andlegan stuðning bæði í skóla og heima fyrir vil ég þakka kærastanum mínum, Aroni Alexanderi. Að auki vil ég þakka foreldrum mínum, systkinum og ömmu og afa fyrir að vera til staðar fyrir hvað sem er, hvenær sem er. Að lokum vil ég þakka bekknum mínum fyrir að gera námið enn skemmtilegra og fyrir að vera alltaf til í grín og glens.

1 Inngangur

Árið 2000 komust vísindamenn að því að stofnar *Drosophila melanogaster* með ákveðna stökkbreytingu lifðu óvenju lengi (sjá Bhutia, Kopel, Lawrence, Neugebauer og Ganapathy, 2017). Stökkbreytingin var kölluð Indy eða I'm not dead yet, sem hægt er að þýða sem „Ég er ekki ennþá dauð“. Síðar kom í ljós að stökkbreytingin var í frumuhimnupróteini sem sér um sítratflutning og fannst samsvarandi prótein í spendýrum, SLC13A5. Próteinið hefur svipaða virkni í spendýrum og flugum og virðast stökkbreytingar í því einnig hafa svipuð áhrif á þær módelífverur sem hafa verið skoðaðar. Því miður virðist það sama ekki gilda um okkur mennina, en stökkbreytingar í SLC13A5 hjá mönnum geta haft hræðilegar afleiðingar.

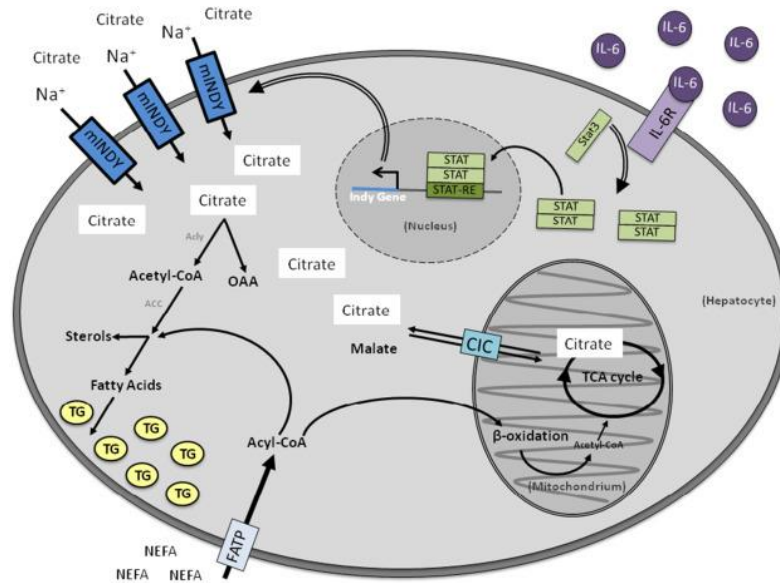
1.1 Hlutverk SLC13A5

SLC13A5 er Na⁺-hátt sítratflutningsprótein og staðsett í frumuhimnu ákveðinna frumugerða sem finnast í lifur, eistum og heila (sjá Bhutia o.fl., 2017). Próteinið er úr 14 α -helixum sem spanna frumuhimnuna. Það hefur litla sækni í sítrat en mjög mikla flutningsgetu, hærrí í mönnum en til dæmis rottum, eða um $604 \pm 73 \mu\text{M}$, sem er töluvert meira en styrkur sítrats er í utanfrumuvökva ($135 \mu\text{M}$) svo próteinið er sjaldan mettað við náttúrulegar aðstæður (sjá Willmes o.fl., 2018).

Sítrat hefur hlutverk í sítrónusýruhringnum og er því mikilvægt myndefni, meðal annars fyrir fitusýrur og kólesteról (sjá Willmes o.fl., 2018). Sítrat hindrar fosfófrúktókínasa (PFK) sem minnkar flæði glúkósa. Einnig hefur sítrat hlutverk við að örva nýmyndun glúkósa með því að virkja frúktósa 1,6 bisfosfatasa (F1,6Bpase), áhrif á β -oxun og virkjar fitusýrumyndun.

Sítrat er framleitt í hvatberum frumna en finnst einnig í um $160 \mu\text{M}$ styrk í blóðvökva, sem er hæsti styrkur myndefnis í sítrónusýruhringnum í utanfrumuvökva (sjá Bhutia o.fl., 2017) en utanfrumusítrat er helsta kolefnisuppsprettan fyrir myndun fitusýra, tríasýlglyseróla (TAG), kólesteróls og LDL (sjá Willmes o.fl., 2018). Nýmyndun lípíða í

lifur er beintengd styrk sítrats innan frumu, sem er að hluta til háð flutningi sítrats yfir frumuhimnu með SLC13A5.



Mynd 1. Ýmis hlutverk sítrats í lifrarfrumum. Frá Willmes o.fl., 2018.

1.2 Indy/SLC13A5 skortur í ýmsum lífverum

Stökkbreytingin Indy fær nafn sitt af því að *D. Melanogaster* með bælingu Indy lifðu lengur en aðrar sem ekki höfðu bælingu. Áhrif stökkbreytinganna höfðu svipuð áhrif á flugurnar og takmörkun hitaæininga (e. caloric restriction) (Rogina, Reenan, Nilsen og Helfand, 2000). Indy fékk athygli vísindasamfélagsins þar sem stökkbreytingar í því tengjast minni líkamsfitu og minna magn insúlínlíkra próteina og hvarfgjarns súrefnis (e. reactive oxygen species, ROS) (sjá Willmes o.fl., 2018).

Í ávaxtaflugum flytur Indy bæði sítrat og succínat og er ekki háð Na^+ líkt og í spendýrum (sjá Willmes o.fl., 2018). Það er lítið tjáð í taugafrumum, meira í vefjum sem taka þátt í samvægi orku og er tjáning minni hjá einstaklingum sem hafa takmarkaðan aðgang að fæðu. Þrátt fyrir að flugur með stökkbreytt Indy hafi svipaða svipgerð og takmörkun hitaæininga veldur, átu þær jafnmikið og aðrar flugur. Sýnt hefur verið að Indy er tjáð í yfirborðsglialfrumum í blóðheilapröskuldi (e. blood brain barrier) hjá flugum (DeSalvo o.fl., 2014). Sú staðsetning gefur til kynna að próteinið gæti haft hlutverk við að stjórna eða skynja oxunarstress (e. oxidative stress) í blóðheilapröskuldinum. Einnig hefur sést að próteinið er mikið tjáð í stjarnfrumum (e. astrocyte), choroid plexus (frumur sem mynda mænuvökva) og miðkerfisholsfrumum (Kristín E. Allison, 2019).

Einstaklingar með stökkbreytingar í samsvarandi próteini Indy í *Caenorhabditis elegans* hafa einnig hærri lífslíkur (sjá Willmes o.fl., 2018). Próteinið er aðallega tjáð í vefjum sem hafa hlutverk í fitugeymslu en einstaklingar með minni tjáningu gensins framleiða minna magn fitusýra.

Mýs með stökkbreytt SLC13A5 hafa svipaða svipgerð og einstaklingar með takmarkaðan aðgang að fæðu (sjá Willmes o.fl., 2018). Þær eru ólíklegri til að fá sykursýki eða lifrabilun vegna of feits mataræðis og verða ónæmar fyrir insúlíni auk þess sem þær lifa lengur (Birkenfeld o.fl., 2011). Einnig er orkunotkun músa með stökkbreytt Indy meiri en villigerðar og safnast minni fita fyrir á líffærum og beinagrindarvöðvum.

Vegna þessara upplýsinga hafa margir verið spenntir fyrir því að nota Indy sem lyfjamark í meðferðum gegn offitu og lífstílstengdum sjúkdómum (sjá Willmes o.fl., 2018). Málið virðist hins vegar ekki vera það einfalt því stökkbreytingar í manna SLC13A5, hafa önnur og alvarlegri áhrif.

1.3 SLC13A5 skortur í mönnum

Árið 2014 var í fyrsta sinn lýst sjúkdómi hjá mönnum sem orsakast af víkjandi stökkbreytingum í SLC13A5, citrate transporter disorder (CTD) (Thevenon o.fl., 2014). Um er að ræða flogaveiki vegna heilakvilla (e. epileptic encephalopathy) og fá sjúklingar fyrsta flog innan við viku eftir fæðingu, flestir á fyrsta sólarhring lífs síns og erfitt eða ómögulegt er að minnka flogin með lyfjum. Sjúkdómurinn er arfgengur víkjandi og einu útlitseinkenni hans er mikið vanþroski tanna og er langt á milli þeirra (e. hypodontia). Aðrir fylgikvillar CTD eru meðal annars greindarskerðing, skerðing á hreyfigetu og tali (Marini o.fl., 2015; Thevenon o.fl., 2014). Fylgikvillar sjúkdómsins eru þeir sömu og almennt fylgja flogaveiki vegna heilakvilla, flogaveikin sjálf leiðir til skerðingar á greind eða öðru (Berg o.fl., 2010).

Stökkbreytingar í SLC13A5 geta valdið öðrum sjúkdómi, Kohlschütter Tönz (KTSZ) (Schossig o.fl., 2017). Áður hafði fundist annað gen, ROGD1, sem við stökkbreytingar getur einnig valdið sjúkdómseinkennum. Mikil líkindi eru með KTSZ og CTD. Einkenni beggja er flogaveiki vegna heilakvilla, báðir eru arfgengir víkjandi, valda greindarskerðingu og einu sjáanlegu útlitseinkennin er mikið bil á milli gulleitra tanna. Fyrstu flog koma þó almennt síðar hjá þeim sem eru með KTSZ en CTD, oftast á fyrsta árinu en einhverjir sjúklingar hafa ekki fengið flog fyrr en við þriggja ára aldur. Einnig hafa heilar einhverra sjúklinga með

KTZS veslast upp og minnkað, sem ekki hefur komið fram hjá einstaklingum með CTD. Fyrstu einstaklingar með KTZS voru greindir árið 1973 og er alls vitað um sjúkdóminn hjá 23 fjölskyldum. Ástæðan fyrir því að Schossig og félagar leituðu að fleiri genum að baki KTZS en ROGD1, sem þegar hafði verið staðfest sem valdur að sjúkdómnum, var sú að ekki allar fjölskyldurnar höfðu stökkbreytingar í ROGD1. Áframhaldandi rannsóknir sýndu að SLC13A5 var genið sem leitað var að.

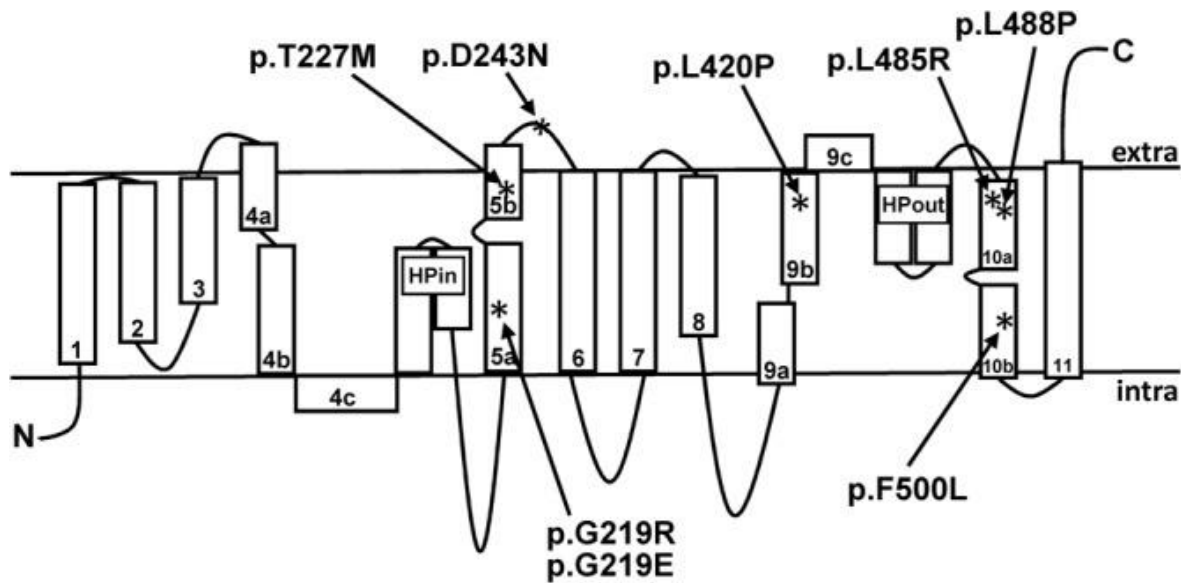
Bainbridge ásamt öðrum aðilum (2017) fann út að aukinn styrkur sítrats og annarra myndefna er í utanfrumuvökva sjúklinga sem eru með CTD, meðal annars í blóði þeirra og mænuvökva, sem gefur til kynna að sítrónusýruhringurinn getur verið í ójafnvægi. Það getur haft þau áhrif að heilinn fái ekki næga orku, en sítrat er einn af orkugjöfum hans (sjá Bhutia o.fl., 2017). Margir telja þetta ólíklegt þar sem einkenni sjúklinganna minnka ekki þó þeir prófi ketó mataræði, þar sem framboð svipaðra orkugjafa og sítrats er aukið.

Einu lyfin sem vitað er að minnka einkenni CTD að einhverju marki eru lyf sem hafa áhrif á GABA taugaboðleiðir (sjá Bhutia o.fl., 2017). Sítrat er notað til að mynda GABA (mynd 2) og veldur minna sítrat í umfrymi minna GABA, en lítið magn GABA í taugafrumum er þekktur orsakavaldur flogaveiki hjá músum.

Citrate → Isocitrate → α – Ketoglutarate → Glutamate → GABA

Mynd 2. Leiðin frá sítrati að GABA. Ensím sem hvarfa hvörfin eru í þessari röð: Acotinase, isocitrate dehydrogenase, transaminase, glutamate (Bhutia o.fl., 2017)

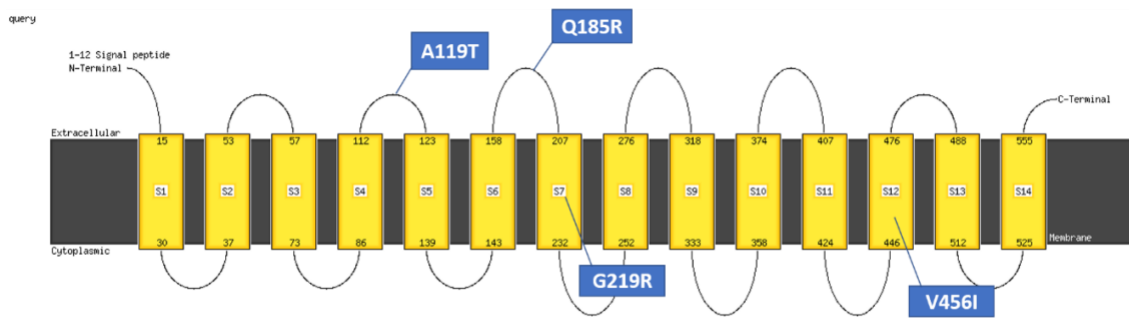
Tólf sjúkdómsvaldandi stökkbreytingar í SLC13A5 hafa fundist (Hardies o.fl., 2015; Klotz, Porter, Colas, Schlessinger og Pajor, 2016; Schossig o.fl., 2017; Selch o.fl., 2018; Thevenon o.fl., 2014). Nokkrar þeirra hafa verið skoðaðar í frumuræktum og ástæður fyrir minni virkni próteinsins ákvarðaðar. Selch og félagar (2018) skoðuðu átta ólíkar stökkbreytingar, þar á meðal eina sem eykur virkni SLC13A5. Í fjórum þeirra var próteinið staðsett á sambærilegum stað við villigerðarprótein en í hinum fjórum var próteinið staðsett innan í frumunni. Allar stökkbreytingarnar nema tvær, sú sem jók virkni SLC13A5 og ein önnur, minnkuðu sítratflutning yfir frumuhimnuna umtalsvert. Þegar staðsetning stökkbreytinganna í byggingu próteinsins var skoðuð sást að flestar þeirra eru staðsettar innan flutningsganga próteinsins (mynd 3). Stökkbreytingarnar sem voru skoðaðar voru flestar þekktar áður en aðrar voru skoðaðar vegna þess að þær voru taldar líklegar til að vera skaðlegar.



Mynd 3. Staðsetning og nafn þeirra stökkbreytinga í SLC13A5 sem Selch o.fl. skoðuðu í rannsókn sinni.

1.3.1 Stökkbreytingar sem finnast á Íslandi

Tvö tilvik af CTD hafa verið greind á Íslandi. Í nýsköpunarsjóðsverkefni Kristínar E. Allison (2017) kemur fram að fundist hafi nokkrir erfðabreytileikar í SLC13A5 geninu í hærri tíðni en 1:10000 í gagnagrunni Íslenskrar erfðagreiningar (ÍE), þar af fjórar mislestursstökkbreytingar í SLC13A5 auk tveggja stökkbreytinga í innröðum. Eina breytingin sem þekktist áður var G219R (Glýsín nr. 219 í Argínín) en hún er um 20 sinnum algengari í Íslendingum en Evrópubúum (Exac og Gnomac gagnagrunnar og gagnagrunnur ÍE). Aðrar stökkbreytingar eru A119T (Alanín nr. 119 í Threónín), Q185R (Glútamín nr. 185 í Argínín) og V456I (Valín nr. 456 í Ísóleúsín) og eru þær ýmist staðsettar í α -helixum sem spanna frumuhimnuna eða utan frumuhimnunnar (mynd 4). Þegar staðsetning stökkbreytinga sem þekktar eru í Íslendingum eru bornar saman við þær stökkbreytingar sem Selch og félagar skoðuðu, sem voru annaðhvort þekktar stökkbreytingar eða breytingar sem taldar voru skaðlegar, sést að aðeins ein stökkbreyting af átta er í utanhimnuhluta próteinsins í rannsókn þeirra en tvær af fjórum stökkbreytingum sem eru þekktar í Íslendingum eru í utanhimnuhluta próteinsins.



Mynd 4. Staðsetning stökkbreytinga á SLC13A5 sem þekktar eru í Íslendingum (Kristín E. Allison, 2017).

Tvær af þekktu stökkbreytingunum í Íslendingum, Q185R og G219R, hafa verið klónaðar inn í tjáningarferju með GFP merkingu, pcDNA GFP-lic (Kristín E. Allison, 2017). Þau plasmíð voru genaleidd í frumur en hvorki viðmið né stökkbrigði leituðu í frumuhimnuna. Þar sem SLC13A5 viðmiðið leitaði ekki í frumuhimnuna, líkt og búist var við, var talið mögulegt að GFP viðbótin hefði áhrif á byggingu próteinsins.

1.4 Markmið verkefnis

Markmið verkefnisins voru tvö. Hið fyrra að búa til plasmíð með innleiddum þekktum stökkbreytingum í Íslendingum, án þess að hafa GFP á N-enda próteinsins. Í kjölfarið átti að genleiða plasmíðin í frumurættir til að sjá hvort prótein myndaðist og þá hvert mismunandi stökkbreytt prótein leituðu.

Síðara markmið verkefnisins var að rækta *D. melanogaster* með Indy bælingu í glialfrumum og gera flogapróf á þeim. Ekki hefur áður tekist að sýna fram á að bæling á Indy valdi flogum í ávaxtaflugum en þar sem tjáning er á Indy í stjarnfrumum, blóðheilapröskuldi og fleiri heila- og taugatengdum frumum, til að mynda þeim glialfrumum sem mynda blóðheilapröskuldinn, er ástæða til að skoða áhrif bælingar í glialfrumum.

Vonandi verður hægt að nota niðurstöðurnar til frekari greiningar á þeim efnaferlum sem eru í ójafnvægi í sjúklingum með CTD, en ekki er vitað nákvæmlega hvað liggur að baki alvarleika sjúkdómsins (sjá Bhutia o.fl., 2017).

2 Aðferðir

2.1 Undirbúningur plasmíðs með SLC13A5 innskoti

2.1.1 Mögnun SLC13A5 úr pcDNA GFP-lic SLC13A5

Ég notaði pcDNA GFP-lic með SLC13A5 innskoti (sjá 1.3.1 Stökkbreytingar sem finnast á Íslandi) til þess að magna upp SLC13A5 cDNA röðina með PCR. cDNAið inniheldur ekki stopptákna en hannaðir voru vísar með nýjum stopptáknum með hjálp NebBuilder (tafla 1).

Tafla 1. Vísar notaðir í að magna upp SLC13A5 úr pcDNA GFP-lic með SLC13A5 innskoti. Stopptákninn sem var búinn til er undirstrikaður. Lágstafir tákna skörun við pcDNA3.1(+) í kringum skerðiset EcoRI og hástafir skörun við SLC13A5.

Vísir	Basaröð
SLC13A5_fwd	5'-ccactagtccagtgtggtggATGGCCTCGGCGCTGAGC -3'
SLC13A5_rev	5'- actgtgctggatatctgcag <u>CTA</u> AGTCTCAATATGTGTCACATTAGCCCAGTCAG - 3'

Í PCR hvarfinu notaðist ég við Q5 High Fidelity DNA pólýmerasa frá New England Biolabs (tafla 2). Um var að ræða tveggja skrefa hvarf, eðlissvipting fór fram við 98°C og þáttapörun og lenging við 72°C (tafla 3).

Tafla 2. Uppskrift PCR, mögnun SLC13A5 upp úr pcDNA GFP-lic með SLC13A5 innskoti.

Hráefni	Hvarflausn	Viðmiðslausn
Q5 High Fidelity Master Mix	5 µL	5 µL
10 µM SLC13A5_fwd	0,5 µL	0,5 µL
10 µM SLC13A5_rev	0,5 µL	0,5 µL
pcDNA GFP-lic SLC13A5	0,518 µL	0 µL
mqH ₂ O	3,482 µL	4 µL

Tafla 3. Hitastig og tími í PCR hvarfi (sjá uppskrift í töflu 2).

Skref	Hitastig (°C)	Tími (sek)
1	98	30
2	98	10
	72	60
3	72	120

} 22x

Eftir að SLC13A5 hafði verið magnað upp hreinsaði ég afurðina til þess að hægt væri að nota hana áfram. Það var gert með þessum hætti:

- PCR afurð, 9 μ L, blandað saman við 1 μ L dH₂O og sett á súlu.
- 100 μ L af buffer NT1 blandað saman við PCR afurð og spunnið í 30 sekúndur.
- 700 μ L af buffer NT3 bætt á og spunnið tvisvar í 30 sekúndur.
- Spunnið í 1 mínútu til að þurrka silica himnu.
- 15 μ L af buffer NE bætt út á, leyft að bíða í 1 mínútu í 65°C vatnsbaði og svo spunnið ofan í Eppendorf glas í 1 mínútu.

2.1.2 Gibson klónun

Eftir að SLC13A5 hafði verið magnað upp og einangrað klónaði ég það inn í pcDNA3.1(+) með Gibson Assembly klónun (sjá viðauka). Plasmíðið leyfir tjáningu í mannafrumum og er ónæmt fyrir sýklalyfinu Ampicillin (AmpR) (Addgene). Plasmíðið var opnað með skerðiensíminu EcoRI og EcoRI buffer frá New England Biolabs áður en hvarfið var sett af stað (tafla 4). Vísarnir sem notaðir voru til þess að magna SLC13A5 upp úr pcDNA lic-GFP SLC13A5 voru hannaðir þannig að þeir sköruðust á við pcDNA3.1(+) í kringum skerðiset EcoRI (tafla 1).

Tafla 4. Klipping pcDNA3.1(+) með EcoRI.

Hráefni	Magn
pcDNA3.1(+)	2,9 µL (1 ng)
EcoRI buffer	1 µL
EcoRI	1 µL
mqH ₂ O	5,1 µL

Með Gibson klónun er hægt að bæta einum eða fleiri dsDNA bót inn í plasmíð með einföldu jafnhitahvarfi sem fer fram í einu glasi (Gibson o.fl., 2009). Ég notaði Master Mix úr Gibson Assembly[®] setti í hvarfið og blandaði því saman við bæði pcDNA3.1(+) og SLC13A5 (tafla 5). Master Mix inniheldur 5' exónúkleasa, DNA pólýmerasa og lígasa. Hvarfið byrjar á því að exónúkleasinn klippir nokkra basa af öllum þeim 5' DNA endum sem hann sér, þannig að hluti af dsDNA verður ssDNA. Glasið er svo sett í 50°C vatnsbað, sem óvirkjar kjarnsýrukljúfínn, og þá límir lígasinn DNA bótana saman og pólýmerasinn fyllir inn í. Afurðin verður hringlanga tvöfaldur DNA helix, plasmíð með innskoti.

Tafla 5. Uppskrift af Gibson hvarfi.

Hráefni	Magn
pcDNA3.1(+)	1,0 µL (100 ng)
SLC13A5	3,62 µL (200 ng)
Gibson Assembly Master Mix	5 µL
mqH ₂ O	0,38 µL

E. coli voru ummyndaðar með pcDNA3.1(+) SLC13A5, erfðaeefnið einangrað og plasmíðin skerðigreind (sjá kafla 2.1.3 Ummyndun *Escherichia coli* og 2.1.4 Einangrun erfðaefnis og skerðigreining). Einnig var plasmíðið sent til Microsynth þar sem innskotið var raðgreint.

2.1.3 Ummyndun *Escherichia coli*

Ég notaði *Escherichia coli* frumur af stofni DH5α til ummyndunar. Plasmíði var bætt út í glas með móttækilegum (e. competent) *E. coli* frumum og sett á ís í 30 mínútur. Í kjölfarið voru frumurnar settar í hitalost við 42°C í hitablokk í 45 sekúndur. Að því loknu var þeim leyft að jafna sig á ís í 2 mínútur áður en 850 µL af SOC æti var bætt út á. Frumurnar voru

síðan hristar við 37°C í eina klukkustund. Að lokum var frumunum dreift á Luria broth (LB) og 1% Amp agarskálar og settar í 37°C hitaskáp yfir nótt. Stakar kólóníur voru pikkaðar að því loknu og settar í 6 - 10 mL LB - 1% Amp vökvaeti sem var hrist við 37°C yfir nótt. Að því loknu var plasmíðið einangrað og skerðigreining framkvæmd til að skera úr hvort um rétt plasmíð væri að ræða.

2.1.4 Einangrun erfðaefnis og skerðigreining

Við einangrun erfðaefnis notaði ég ýmist buffera úr Nucleospin® Plasmid (A1, A2, A3, A4, AE) setti frá Macherey-Nagel eða buffera sem voru blandaðir á rannsóknarstofunni (P1, P2, N3, PE, AE). Einangrunin fór fram á eftirfarandi hátt:

- a. 1,5 mL af vökvarækt sett í Eppendorf glas og spunnið niður. Flot tekið af. Endurtekið ef þörf krefur.
- b. 250 µL af buffer A1 (P1) bætt út á og blandað vel saman.
- c. 250 µL af buffer A2 (P2) bætt út á og blandað varlega. Leyft að standa í 3-5 mínútur.
- d. 300 µL af buffer A3 (N3) bætt út á og blandað varlega. Spunnið í 5 mínútur.
- e. Flot sett á súlu og spunnið í 1 mínútu.
- f. 600 µL af buffer A4 (PE) bætt út á og spunnið í 1 mínútu.
- g. Spunnið í 2 mínútur til að þurrka silica himnu.
- h. Súlur settar á Eppendorf glös. 50 µL af buffer AE bætt út á og sett í 65°C hitaskáp í 1 mínútu. Spunnið í 1 mínútu.

Að einangrun lokinni mældi ég styrk plasmíðanna með Nanopore til þess að hægt væri að skerðigreina þau. Í hverja klippingu voru notuð 300 ng af plasmíði auk 0,5 µL af viðeigandi skerðiensími og 1 µL af buffer. Klippingin fór fram í 37°C vatnsbaði í eina klukkustund og voru viðmið notuð þegar við átti, auk stiga til stærðarviðmiðunar. Að henni lokinni voru DNA bútarnir rafdrengir á 0,8% EtBr-agarósageli við 80 V í 20-30 mínútur. Mynd var tekin af gelinu á útfjólubláu ljósaborði.

2.1.5 Innleiðing stökkbreytinga í SLC13A5

Fjórar þekktar stökkbreytingar á SLC13A5 voru kallaðar fram, þar af ein tvisvar. Alls var geninu því stökkbreytt fimm sinnum. Notast var við vísa sem innihéldu bæði stökkbreytinguna sem átti að skoða og þögla stökkbreytingu sem bjó til nýtt skerðiset (tafla

6). Viðeigandi vísur og plasmíði var blandað saman við Q5 Hot Start HF Master Mix og gert Q5 PCR hvarf eða Q5 Site Directed Mutagenesis (tafla 7). Eðlissvipting fór fram við 98°C, þáttapörun við 65°C og lenging við 72°C (tafla 8).

Tafla 6. Stökkbreytingar sem voru skoðaðar auk vísu sem notaðir voru til að innleiða þær og skerðiseta sem var bætt við. Stökkbreyting er undirstrikuð og skerðiset feitletrað.

Stökkbreyting	Vísar	Skerðiset
G219R 1	F: GGCTAGCATC <u>A</u> GGGGCACC GC	G/CTAGC
	R: GCGTAGC AGATGCACAGGGTC	
G219R 2	F: ATC <u>A</u> GGGGCACC GCCACCCTGA	G/CTAGC
	R: GCTAGCC CGCTAGCAGATGCACAG	
Q185R	F: AATATTT GAAAGCCCCACTCTG	AAT/ATT
	R: ACT <u>C</u> GA CTCCCTGGCAGCTCCT	
V429I	F: GCTC <u>A</u> TTGCCGTGTTCACTGAGT	A/AGCTT
	R: AAGCTT AAGATCAAGGTGATGGCTG	
A119T	F: GGCGCG CCTGATGCTGGGCTTCATGGG	GG/CGCGCC
	R: GGCTTGGT <u>C</u> CCCCACCCAGAGGAGCGT	

Tafla 7. Uppskrift af Q5 Site Directed Mutagenesis.

Hráefni	Magn
Q5 Hot Start HF 2x Master Mix	7,5 µL
10 µM F vísir	0,75 µL
10 µM R vísir	0,75 µL
Template DNA (1-25 ng/µL)	1 µL
mqH ₂ O	5 µL

Tafla 8. Hitastig og tími í Q5 Site Directed Mutagenesis.

Skref	Hitastig (°C)	Tími (sek)
1	98	30
2	98	10
	65	30
	72	210
3	72	120

} 25x

Að hvörfunum loknum hlóð ég hluta úr hverju hvarfi á 0,8% agarósagel til þess að skera úr um hvort að afurð væri til staðar.

Því næst var KLD hvarf gert, sem er í þremur skrefum. Fyrst bætti ég 0,5 µL af skerðiensíminu DpnI við í hvert glas og það haft við 37°C í 15 mínútur, en DpnI þekkir metýlhópa sem aðeins eru á foreldraafurðinni og klippir hana því niður. Út á 1 µL af DpnI klippti afurð setti ég 0,5 µL PNK út í, sem setur fosfat á lausa 5' enda, ásamt 1 µL T4 ligase buffer og 3 µL mqH₂O. Þessu var leyft að vera við 37°C í 15 mínútur. Loks bætti ég 0,5 µL T4 lígasa út á, sem límur saman lausa enda, og bætti við 0,5 µL af T4 Ligase buffer og 4 µL mqH₂O. Lígasanum var leyft að vinna í eina klukkustund.

E. coli voru ummyndaðar með plasmíðum með hverri stökkbreytingu, plasmíðin einangruð og skerðigreind (sjá kafla 2.1.3 Ummyndun *Escherichia coli* og kafla 2.1.4 Einangrun erfðaefnis og skerðigreining). Einnig var viðkomandi SLC13A5 cDNA innskotið raðgreint hjá Microsynth.

2.1.6 Raðgreining

Bæði plasmíð með óstökkbreyttu SLC13A5 innskoti og stökkbreyttu plasmíðin voru send til Microsynth í raðgreiningu. Tveir sérhannaðir vísar voru notaðir, auk „universal“ T7 vísis úr safni Microsynth (tafla 9). T7 vísirinn virkar á þessa tilteknu röð í öllum plasmíðum, er ekki sértækur á ákveðna gerð plasmíðs.

Tafla 9. Vísar sem notaðir voru til raðgreiningar.

Nafn vísis	Basaröð	Notað til raðgreiningar á
seqSLC2	AGGAAGACCAAGAGCGGAAG	SLC13A5, G219R 1, G219R 2
seqSLC3	GGGTGGAGGGTGAGACAAAGTATG	SLC13A5, V429I
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	SLC13A5, Q185R, A119T

2.2 Indy og *Drosophila melanogaster*

Ég safnaði hreinum meyjum með arfgerðina w^- ; $\frac{repoGal4,UAS-mCD8::GFP}{TM3}$ og karlkyns flugum með arfgerðina $Indy - 2^{dsDNA}; Indy^{dsRNA}$. Sem viðmið safnaði ég karlflugum með villigerð, *CantonS* #64349. Ég setti upp tvær æxlanir, sem báðar höfðu tíu hreinar meyjur og fimm karlflugur, í annarri karlflugur sem voru $Indy - 2^{dsDNA}; Indy^{dsRNA}$ og í hinni karlflugur sem voru *CantonS* #64349. Æxlunarglösin setti ég í hitaskáp við 25°C. Ég endurtók báðar æxlanirnar með flugum með sömu arfgerðir. Afkvæmum var safnað og próf gerð á þeim við fjögurra daga aldur. Til að tryggja að aðeins F1 afkvæmum væri safnað var foreldraflugum komið fyrir í nýjum glösum á vikufresti.

2.2.1 Flogapróf

Ég safnaði saman átta F1 flugum í glös, þrjú glös af hvorri arfgerð (bæling Indy í glialfrumum og viðmið) úr fyrri æxlun og þrjú glös af hvorri arfgerð úr síðari æxluninni. Í hverju glasi voru flugur af báðum kynjum og voru hlutföll kynjanna jöfn.

Tvö ólík flogapróf voru framkvæmd á flugunum (sbr. Lin, Giachello og Baines, 2017; Kristín E. Allison, 2017). Annað þeirra fólst í því að sjá hversu fljótar flugurnar voru að ná sér eftir að hafa verið bankað niður í botn glassins sem þær voru í og hitt hversu fljótar þær voru að ná sér eftir að hafa verið hristar mjög hratt í vortex.

- Ég bankaði glösum með flugum í niður þrisvar sinnum og taldi hversu margar flugur komust yfir línu í fjögurra sentímetra hæð á fimm sekúndum.
- Ég tók hvert glas og hristi það mjög hratt í 10 sekúndur. Að því loknu tók ég tímunn á því hversu lengi flugurnar voru að standa á fætur.

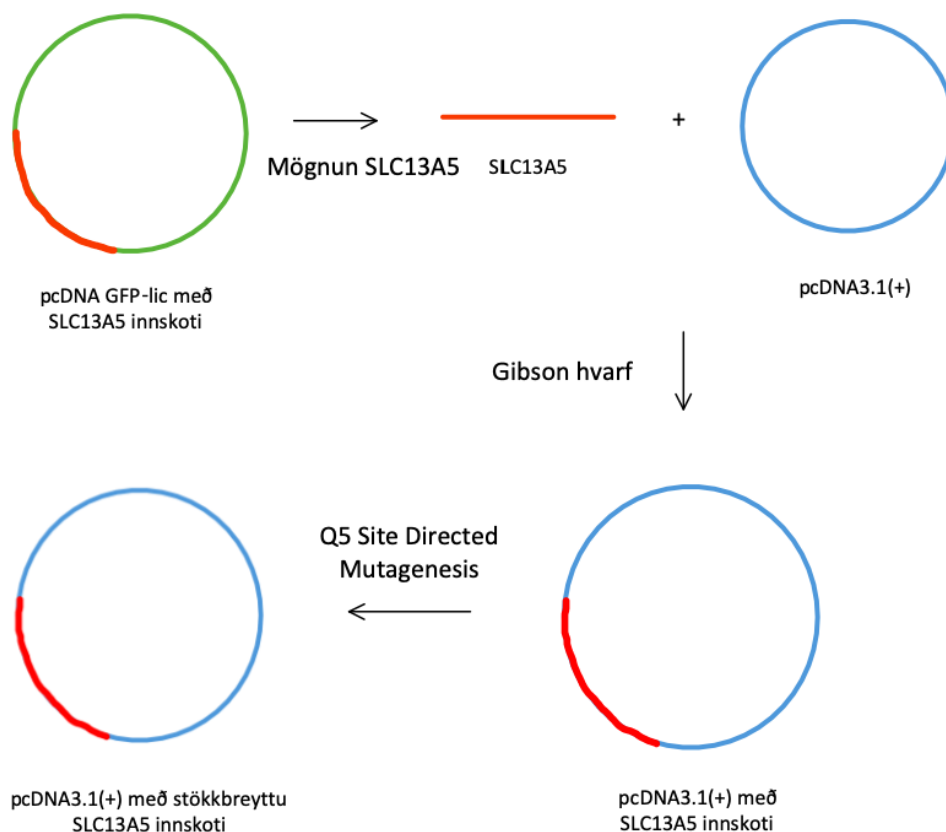
Bæði prófin hafa getu til að sýna fram á hvort flugur séu flogaveikar eða ekki (Lin o.fl., 2017; Kristín E. Allison, 2017).

3 Niðurstöður

3.1 Plasmíð með SLC13A5 innskoti

3.1.1 Hönnun plasmíðs

Fyrst var SLC13A5 magnað upp úr pcDNA GFP-lic plasmíði með SLC13A5 innskoti. Þetta var gert með PCR og voru notaðir vísar sem innleiddu stopptákna í lok gensins. Því næst var Gibson klónun notuð til að setja SLC13A5 inn í pcDNA3.1(+), sem klippt hafði verið með EcoRI til þess að hægt væri að framkalla klónunina. Loks var SLC13A5 (í pcDNA3.1(+)) stökkbreytt með Q5 Site Directed Mutagenesis. Það var gert með vísnum sem innleiddu stökkbreytingar sem eru þekktar í Íslendingum (mynd 5).

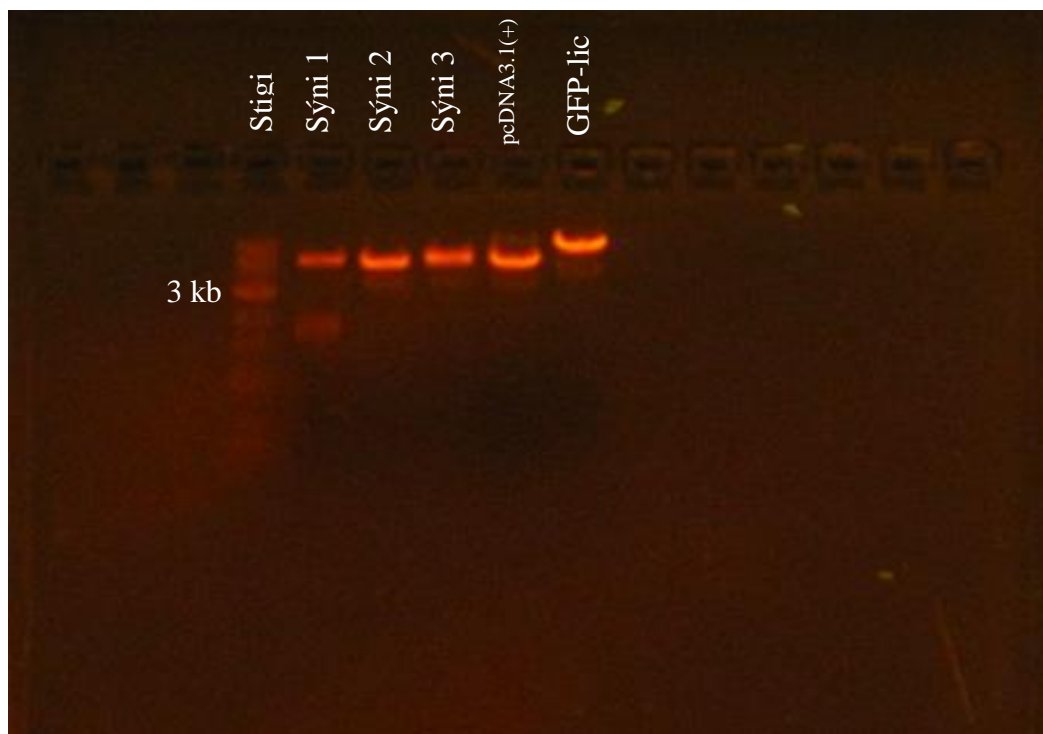


Mynd 5. Saga SLC13A5 frá pcDNA GFP-lic í pcDNA3.1(+).

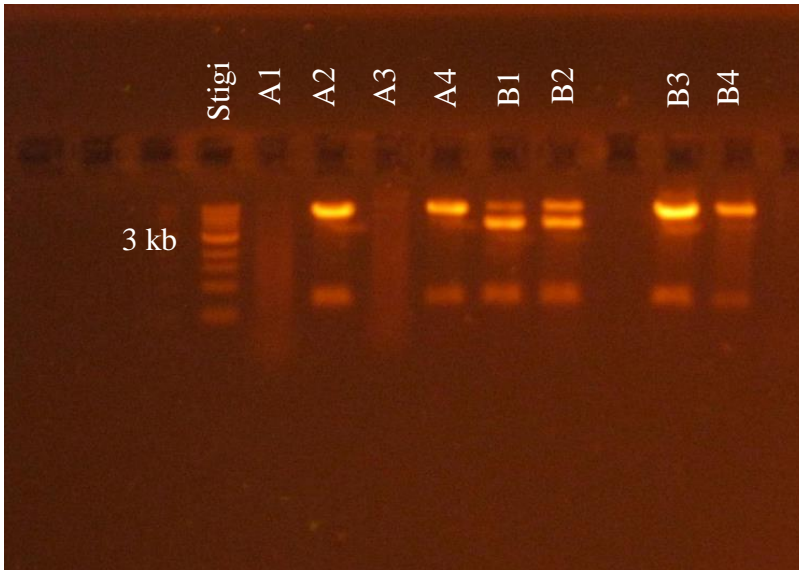
Skerðigreining sýndi að það tókst að klóna SLC13A5 inn í pcDNA3.1(+) og að stökkbreyta SLC13A5, þ.e. skerðiensímum klipptu á réttum stöðum. Í tilviki óstökkbreytts SLC13A5 var ekkert EcoRV skerðiset lengur á plasmíðinu, en það hafði verið áður en genið var klónað inn í plasmíðið, og HindIII átti að klippa einu sinni í genið sjálf og einu sinni í plasmíðið. Þar sem geninu hafði verið stökkbreytt var í öllum tilvikum búið að bæta við skerðiseti sem hafði ekki verið í geninu áður og klipptist plasmíðið því í fleiri búta en ef stökkbreytingarnar hefðu ekki tekist (tafla 10 og myndir 6-8).

Tafla 10. Stökkbreytingar sem innleiddar voru auk skerðiensíma sem notuð voru til skerðigreiningar og stærðar búta.

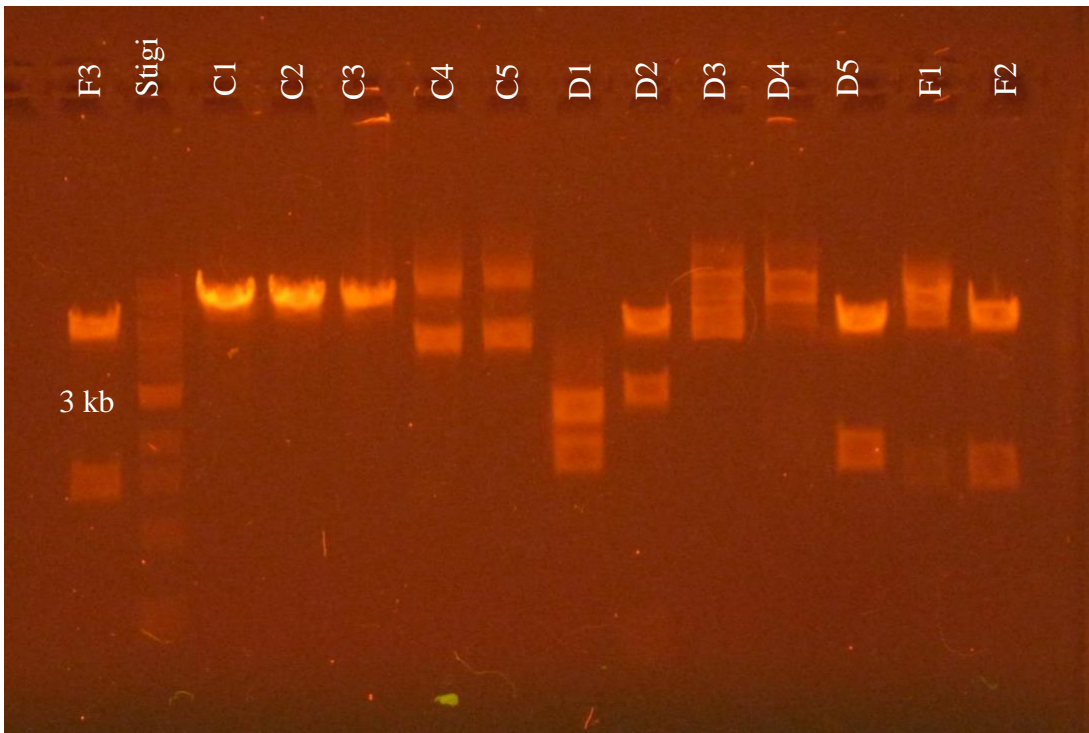
Stökkbreyting	Skerðiensím	Stærð búts/búta	
Engin	EcoRV HF og HindIII	1,7 kb	5,3 kb
G219R A	NheI	0,7 kb	6,4 kb
G219R B	NheI	0,7 kb	6,4 kb
A119T	AscI	7,1 kb	
Q185R	SspI	1,6 kb	5,5 kb
V429I	HindIII	1,3 kb	5,8 kb



Mynd 6. Niðurstöður skerðigreiningar á pcDNA3.1(+) með SLC13A5 innskoti. Sýni 1 klipptist rétt og voru tómt pcDNA3.1(+) og pcDNA GFP-lic með SLC13A5 innskoti notuð sem viðmið.



Mynd 7. Niðurstöður skerðigreiningar á stökkbreytingunni G219R. A stendur fyrir G219R A stökkbreytinguna en B fyrir G219R B stökkbreytinguna. Sýni A2, A4 og B4 klipptust rétt.



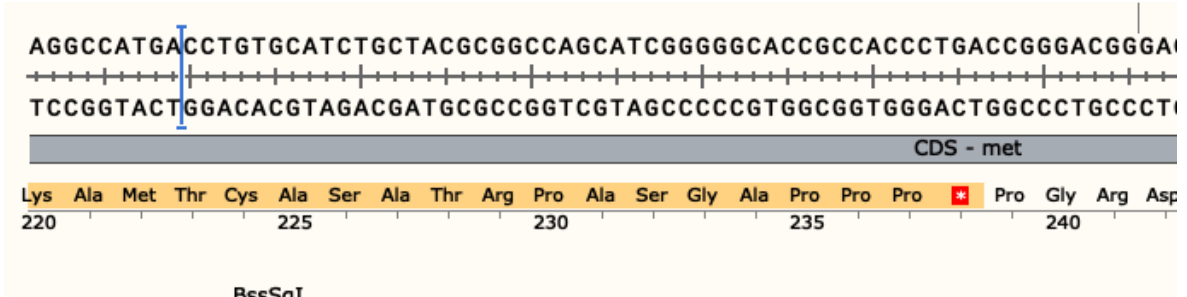
Mynd 8. Niðurstöður skerðigreiningar á stökkbreytingum í SLC13A5. C = A119T, D = Q185R og F = V429I. Sýni C1, C2, C3, D5, F2 og F3 klipptust rétt.

Eins og sjá má tókst að innleiða allar stökkbreytingarnar hjá að minnsta kosti einni kólóníu.

3.1.2 Raðgreining

Í flestum tilvikum voru niðurstöður raðgreiningarinnar í samræmi við vænta basaröð fyrir utan tvær undantekningar. Sú fyrri var í G219R A, þar sem einn basa vantaði, og veldur það

tilfærslu á lesramma í Thr223 því að allar amínósýrur þar fyrir aftan breytast og stopptákni myndast eftir 237 amínósýrur (mynd 6) (e. nonsense mutation). Sú seinni var í A119T þar sem G>C, þ.e. G125A. Niðurstöður raðgreiningarinnar má sjá í viðauka.



Mynd 9. Afleiðingar þess að einn basi datt út í Thr223. Basann vantar þar sem bláa strikið er.

Ekki gafst tími til að prófa tjáningu plasmíðanna í frumurækt áður en verkefninu lauk. Það var hins vegar ætlunin og er nú hægt þar sem flest plasmíðin eru tilbúin til notkunar (tafla 11).

Tafla 11. Plasmíð sem hönnuð voru í verkefninu.

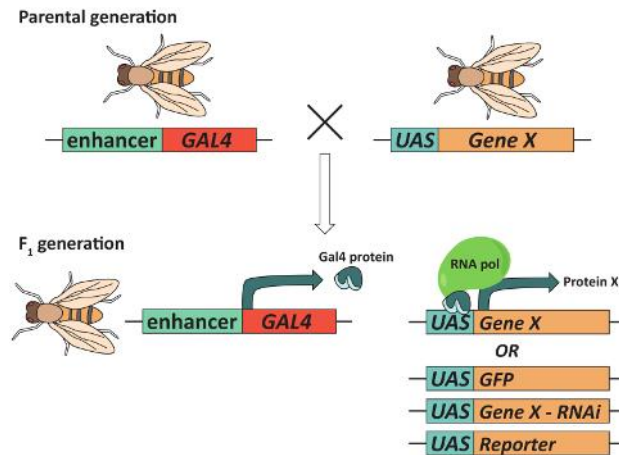
Plasmíð	Tilbúið?
pcDNA3.1(+) SLC13A5 G219R A	Ekki víst, möguleg hliðrun
pcDNA3.1(+) SLC13A5 G219R B	Já
pcDNA3.1(+) SLC13A5 A119T	Nei, mislestursbreyting
pcDNA3.1(+) SLC13A5 Q185R	Já
pcDNA3.1(+) SLC13A5 V429I	Já

3.2 Áhrif þöggunar INDY á *Drosophila melanogaster*

3.2.1 Gal4 kerfið

Til þess að þagga Indy í glialfrumum var Gal4 kerfið notað. Það felst í því að gen sem tjáir umritunarþáttinn Gal4 úr sveppum er sett inn í erfðamengi *D. melanogaster* (Brand og

Perrimon, 1993). Í kjölfarið er geni, sem hefur UAS bindiset fyrir Gal4, komið fyrir og er það þá tjáð ríkjandi í þeim frumum sem Gal4 er tjáð (mynd 10).



Mynd 10. Gal4 kerfið í ávaxtafluggu (Kelly, Elchert og Kahl, 2017).

Í þessu tilviki voru kvenkynsflugurnar sem notaðar voru til æxlunar arfblandnar um Gal4 sem tjáð var í taugatróðsfrumum undir stjórn stýrisvæðis *repo* gensins. Karlkynsflugurnar voru af villigerð (viðmiðunaræxlun) eða arfhreinar um *Indy^{dsRNA}* með Gal4 bindiseti svo að í þeim afkvæmum sem voru með arfgerðina $\frac{repoGal4,UAS-mCD8::GFP}{Indy^{dsRNA}}$ var tvíþátta DNA sameind tjáð, sem leiddi til þöggunar gensins. Þegar afkvæmi voru valin til prófunar var valið gegn TM3, og þannig hægt að tryggja að þau tjáðu Gal4 og tvíþátta RNAið í glialfrumum. Allar mögulegar arfgerðir afkvæma má sjá á mynd 11.

$$w^{-}; \frac{repoGal4,UAS \cdot mCD8 :: GFP}{TM3} \times Indy - 2^{dsDNA}; Indy^{dsRNA}$$

$$\downarrow$$

$$w^{-}; \frac{Indy-2^{dsDNA}}{wt}; \frac{repoGal4,UAS \cdot mCD8 :: GFP}{Indy^{dsRNA}} \text{ eða } w^{-}; \frac{Indy-2^{dsDNA}}{wt}; \frac{TM3}{Indy^{dsRNA}}$$

Mynd 11. Mögulegar arfgerðir afkvæma úr æxlun.

3.2.2 Framköllun floga

Aðeins tókst að safna nógu mörgum flugum til að prófa bælingu Indy fimm sinnum og viðmið einu sinni vegna þess að ekki nógu margar flugur klöktust. Ætlunin var að prófa hvoru tveggja sex sinnum.

Ekki tókst að framkalla flog með því að hrista flugurnar mjög hratt í vortex. Þær náðu sér svo fljótt að ekki gafst tími til að taka tímann á því hversu fljótt þær náðu sér. Í öllum tilvikum, bæði Indy og control, höfðu allar flugurnar náð sér og voru byrjaðar að skriða upp veggj eða fljúga um glasið 2-3 sekúndum eftir að hristingnum var hætt.

Ekki er marktækur munur á fjölda flugna sem skriðu upp veggj glasanna á tilsettum tíma (tafla 12).

Tafla 12. Fjöldi flugna sem skriðu upp 4 sentímetra á 5 sekúndum. Átta flugum var gefið tækifæri í hvert skipti.

Fjöldi flugna	Indy bæling	Control	Indy bæling	Control	Indy bæling	Control
Æxlun 1	6	7	6	x	8	x
Æxlun 2	6	x	6	x	x	x

4 Umræður

Í þessu verkefni sýna niðurstöður raðgreiningar að klónun SLC13A5 inn í pcDNA3.1(+) tókst og einnig að búa til plasmíð með flestum stökkbreytingum sem eru þekktar í geninu á Íslandi. Það býður upp á rannsóknir á tjáningu stökkbreytts gens í frumulínum eða í iPS frumum sem getur gefið sýn á hvernig virkni próteinsins breytist, vegna lögunar eða staðsetningar, og þá hverjar ástæður sjúkdómsins CTD eru.

Það getur verið að raðgreiningin á G219R A stökkbreytingunni hafi misfarist þar eð röngu basarnir voru á enda bútsins sem raðgreindur var. Til þess að ganga úr skugga um hvort að plasmíðið sjálft eða raðgreiningin hafi mislukkast þyrfti að raðgreina bútinna aftur með öðrum vísi sem nær betur yfir svæðið. Þar sem mislestrarbreyting varð í A119T þarf að undirbúa nýtt plasmíð áður en hægt er að nota það til að rannsaka áhrif þeirrar stökkbreytingar á frumuræktir. Áhugavert gæti verið að prófa nýju mislestrarbreytinguna og bera niðurstöðurnar saman.

Hægt er að ráðast í viðtækari rannsóknir á því hvaða áhrif hver og ein stökkbreyting hefur á starfsemi frumna og vefja því að nú eru til plasmíð með flestum stökkbreytingum í SLC13A5 sem þekkjast á Íslandi, án GFP viðbótar. Ætlunin var að skoða staðsetningu próteina með stökkbreytingarnar í HEK293 en því miður gafst ekki tími til þess í þessu verkefni þar sem lengri tíma tók en áætlað var að innleiða stökkbreytingarnar. Ef plasmíðin verða genaleidd í frumur væri áhugavert að bera það saman við þegar GFP merktu stökkbrigðin eru genaleidd í frumur.

Ein rannsókn hefur verið gerð þar sem stökkbrigði af SLC13A5 voru genaleidd í frumur og var ein af stökkbreytingunum sem notuð var hér tekin fyrir, G219R (Selch o.fl., 2018). Þær niðurstöður sýndu að stökkbreytingin veldur því að próteinið er staðsett innan frumunnar og að flutningur sítrats inn í frumuna minnkar töluvert og þar af leiðandi er styrkur sítrats innan frumu minni. Sumar af hinum stökkbreytingunum sem skoðaðar voru gáfu sömu niðurstöður en aðrar sýndu að próteinið var staðsett í frumuhimninni líkt og villigerðarpróteinið. Þegar plasmíðin sem hönnuð voru í verkefninu verða genaleidd í frumur verður áhugavert að sjá hver staðsetning próteinanna verður og hvort að styrkur sítrats innan frumu breytist.

Þar sem samsvarandi prótein SLC13A5 fannst fyrst í *D. melanogaster*, Indy, var vel við hæfi að skoða flugurnar líka. Ekki hefur verið sýnt fram á að bæling Indy valdi flogaveiki í flugum en það hefur samt ekki verið skoðað áður í glialfrumum, líkt og nú. Niðurstöður

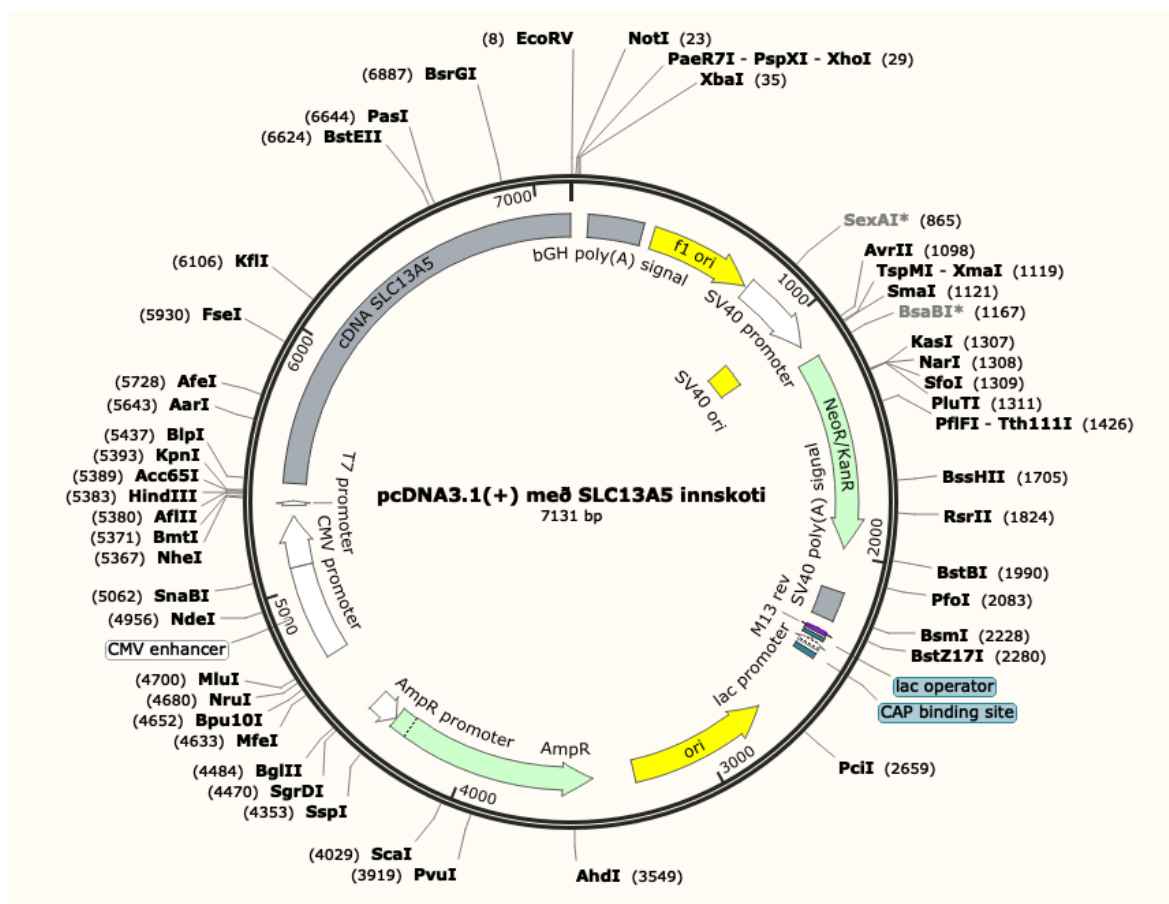
voru þó af skornum skammti þar sem erfiðleikar komu upp en vonandi verður tilraunin endurtekin síðar.

Það var erfitt að safna flugum úr viðmiðunaræxlunum því þær virtust ekki klekjust jafnhratt og þær sem höfðu bælt Indy í glialfrumum. Í einhverjum tilfellum var það vegna þess að svo óheppilega vildi til að maturinn var mjög blautur í sumum glösunum og foreldraflugurnar drukknuðu. Fjöldi púpa virtist almennt vera minni hjá viðmiðunarhópnum, sem er skrítið því ekki hefur verið sýnt fram á að bæling Indy hafi áhrif á frjósemi (Willmes o.fl. 2018).

Áhugavert var að flugurnar virtust ekkert truflast við það að vera hristar í vortex í 10 sekúndur. Í öðrum tilraunum hefur það tekið flugur nokkrar sekúndur að jafna sig meira að segja þegar þær voru villigerð, þar sem villigerð var í um 5 sekúndur að jafna sig en flogaveikar flugur í yfir 100 sekúndur (Lin o.fl., 2017). Eins og niðurstöðurnar gefa til kynna náðu flugurnar sér strax, á innan við 5 sekúndum, sama hvort um bælingu Indy eða villigerð var að ræða. Það að ekki var munur á því hversu hratt þær jöfnuðu sig gefur til kynna að bæling Indy í glialfrumum valdi ekki flogum hjá *D. melanogaster*. Ef til vill var vortexinn ekki nógu kraftmikill eða að flugurnar hefðu átt að vera í minni glösum þegar þær voru hristar. Þær hristust samt greinilega mikið þrátt fyrir að það hafi ekki haft nein langvarandi áhrif. Það sama má segja um hitt flogaprófið, þar sem glösum var bankað í borð, þar var ekki marktækur munur. Reyndar tókst aðeins að prófa viðmið einu sinni svo gögnin eru ekki tölfræðilega marktæk.

Þrátt fyrir að engar niðurstöður í verkefninu hafi bent til þess að bæling Indy í glialfrumum valdi flogaveiki eða einkennum í *D. melanogaster* þyrfti að endurtaka prófin til þess að skera úr um það. Einnig væri gott að framkvæma virknipróf sem ekki gafst tími til í þessu verkefni. Ef flugur með Indy bælingu væru með minni eða aukna virkni en viðmiðunarflugur gæfi það til kynna að eitthvað í heila- og taugastarfsemi þeirra væri öðruvísi. Að sama skapi gæti verið áhugavert að bæla Indy í stjarnfrumum eða jafnvel aðeins í glialfrumum í blóðheilapröskuldi til samanburðar og sjá hvort þær bælingar gætu valdið flogaveiki. Flestar rannsóknir sem gerðar hafa verið hingað til hafa einblínt á taugafrumurnar sjálfar en síðustu ár hafa ýmsar rannsóknir gefið til kynna að hjálparfrumur taugakerfisins, glialfrumur, stjarnfrumur og fleiri, hafi stærra og mikilvægara hlutverk en áður var talið.

Viðauki



Mynd 12. pcDNA3.1(+) með SLC13A5 innskoti.

Tafla 13. Niðurstöður raðgreiningar á stökkbrigðum SLC13A5. Sýndur er sá partur sem nær yfir vísana sem notaðir voru til stökkbreytinga á geninu. Þeir basar sem misfórust í raðgreiningunni eru feitletraðir.

Bútur	Vísir	Basaröð
G219R A	seqSLC2	NNNACCTGTGCATCTGCTACGCGGCT AGCATCAGGGGCACCGC
G219R B	seqSLC2	CTGTGCATCTGCTACGCGGCTAGCAT CAGGGGCACCGCCACCCTGA
Q185R	T7	AGGAGCTGCCAGGGAGTCGAGTAATA TTTGAAGCCCCACTCTG
V429I	seqSLC3	CAGCCATCACCTTGATCTTAAGCTTGC TCATTGCCGTGTTCACTGAGT
A119T	T7	ACGCTCCTCTGGGTGGGGACCAAGGC GCGCCTGATGCTGGGCTTCATGGG

Raðgreining á SLC13A5. Notaðir voru þrjár vísar til þess að spanna allt genið og sköruðust niðurstöður raðgreiningar því eitthvað á. Vísarnir spönnuðu genið í eftirfarandi röð:

Vísir: T7

Basaröð:

AAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGATGGCCTCGGC
GCTGAGCTATGTCTCCAAGTTCAAGTCCTTCGTGATCTTGTTTCGTCACCCCGCT
CCTGCTGCTGCCACTCGTCATTCTGATGCCCCGCAAGTTTGTTCAGGTGTGCCTA
CGTCATCATCCTCATGGCCATTTACTGGTGCACAGAAGTCATCCCTCTGGCTGT
CACCTCTCTCATGCCTGTCTTGCTTTTCCCCTCTTCCAGATTCTGGACTCCAGG
CAGGTGTGTGTCCAGTACATGAAGGACACCAACATGCTGTTCTGGGGCGGCCT
CATCGTGGCCGTGGCTGTGGAGCGCTGGAACCTGCACAAGAGGATCGCCCTGC
GCACGCTCCTCTGGGTGGGGGCCAAGCCTGCACGGCTGATGCTGGGCTTCATG
GGCGTCACAGCCCTCCTGTCCATGTGGATCAGTAACACGGCAACCACGGCCAT
GATGGTGCCCATCGTGGAGGCCATATTGCAGCAGATGGAAGCCACAAGCGCA
GCCACCGAGGCCGGCCTGGAGCTGGTGGACAAGGGCAAGGCCAAGGAGCTGC
CAGGGAGTCAAGTGATTTTTGAAGGCCCTCTGGGGCAGCAGGAAGACCAA
GAGCGGAAGAGGTTGTGTAAGGCCATGACCCTGTGCATCTGCTACGCGGCCAG
CATCGGGGGCACCGCCACCCTGACCGGGACGGGACCCAACGTGGTGTCTCCTGG
GCCAGATGAACGAGTTGTTTCCTGACAGCAAGGACCTCGTGAACCTTTGCTTCCT
GGTTTGCATTTGCCTTTCCCAACATGCTGGTGTGCTGCTGTTTCGCCTGGCTGT
GGCTCCAGTTTGTTTACATGAGATTCAATTTTAAAAAGTCCTGGGGCTGCGGGC
TAGAGAGCAAGAAAAACGAGAAGGCTGCCCTCAAGGTGCTGCAGGAGGAGTA
CCGGAAGCTGGGGCCCTTGTCTTCGCGGAGATCAACGTGCTGATCTGCTTCTT
CCTGCTGGTCATCCTGTGGTTCTCCCGAGACCCCGGCTTCATGCCCGGCTGGCT
GACTGTTGCCTGGGTGGAGGGTGAGACAAAGTATGTCTCCGATGCCACTGTGG
CCATCTTTGTGGCCACCCTGCTATTCAATTGTGCCTTC

Vísir: seqSLC2

Basaröð:

CGGGGGCACCGCCACCCTGACCGGGACGGGACCCNACGTGGTGTCTCCTGGGCC
AGATGAACGAGTTGTTTCCTGACAGCNAGGACCTCNTGAACTTTGCTTCTGGT
TTGCATTTGCCTTTCCCAACATGCTGGTGTGCTGCTGTTTCGCCTGGCTGTGGC
TCCAGTTTGTTTACATGAGATTCAATTTTAAAAAGTCCTGGGGCTGCGGGCTAG

AGAGCAAGAAAAACGAGAAGGCTGCCCTCAAGGTGCTGCAGGAGGAGTACCG
GAAGCTGGGGCCCTTGTCTTCGCGGAGATCAACGTGCTGATCTGCTTCTTCCT
GCTGGTCATCCTGTGGTTCTCCCGAGACCCCGGCTTCATGCCCGGCTGGCTGAC
TGTTGCCTGGGTGGAGGGTGARACAAAGTATGTCTCCGATGCCACTGTGGCCA
TCTTTGTGGCCACCCTGCTATTCATTGTGCCTTCACAGAAGCCCAAGTTTAACT
TCCGCAGCCAGACTGAGGAAGAAAGGAAAACCTCCATTTTATCCCCCTCCCCTG
CTGGATTGGAAGGTAACCCAGGAGAAAGTGCCCTGGGGCATCGTGCTGCTACT
AGGGGGCGGATTTGCTCTGGCTAAAGGATCCGAGGCCTCGGGGCTGTCCGTGT
GGATGGGGAAGCAGATGGAGCCCTTGCACGCAGTGCCCCCGGCAGCCATCAC
CTTGATCTTGTCTTGTCTCGTTGCCGTGTTCACTGAGTGCACAAGCAACGTGGC
CACCACCACCTTGTTCCCTGCCATCTTTGCCTCCATGTCTCGCTCCATCGGC

Vísir: seqSLC3

Basaröð:

NCCANACTGAGGAANAAAGGAAAACCTCCNTTTTATCCCCCTCCCCTGCTGGAT
TGGAAGGTAACCCAGGAGAAAGTGCCCTGGGGCATCGTGCTGCTACTAGGGG
GCGGATTTGCTCTGGCTAAAGGATCCGAGGCCTCGGGGCTGTCCGTGTGGATG
GGGAAGCANATGGAGCCCTTGCACGCAGTGCCCCCGGCAGCCATCACCTTGAT
CTTGTCTTGTCTCGTTGCCGTGTTCACTGAGTGCACAAGCAACGTGGCCACCAC
CACCTTGTTCCCTGCCATCTTTGCCTCCATGTCTCGCTCCATCGGCCTCAATCCG
CTGTACATCATGCTGCCCTGTACCCTGAGTGCCTCCTTTGCCTTCATGTTGCCTG
NGGCCACCCCTCCAAATGCCATCGTGTTACCTATGGGCACCTCAAGGTTGCT
GACATGGTGAAAACAGGAGTCATAATGAACATAATTGGAGTCTTCTGTGTGTT
TTTGGCTGTCAACACCTGGGGACGGGCCATATTTGACTTGGATCATTTCCTGA
CTGGGCTAATGTGACACATATTGAGACTTAGCTGCANATATCCAGCACAGTGG
CGGCCGCTCGAGTCTAGANGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCANCTCGACTGT
GCCTTCTAGTTGNCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCGNGCCTTCCTTGAC
CCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCCTAATAAAATGAGGAAANTGCAT
CNCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCA

Heimildir

- Bainbridge, M. N., Cooney, E., Miller, M., Kennedy, A. D., Wulff, J. E., Donti, T., Jhangiani, S. N., Gibbs, R. A., Elsea, S. H., Porter, B. E. og Graham, B. H. (2017). Analyses of SLC13A5-epilepsy patients reveal perturbations of TCA cycle. *Molecular Genetics and Metabolism*, 121(4), 314-319. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.06.009>
- Berg, A. T., Berkovic, S. F., Brodie, M. J., Buchhalter, J., Cross, J. H., Van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T. A., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D., Plouin, P. og Scheffer, I. E. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*, 51(4), 676-685. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x
- Bhutia, Y. D., Kopel, J. J., Lawrence, J. J., Neugebauer, V. og Ganapathy, V. (2017). Plasma Membrane Na⁺-Coupled Citrate Transporter (SLC13A5) and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(3), 378. doi:10.3390/molecules22030378
- Birkenfeld, A. L., Lee, H.-Y., Guebre-Egziabher, F., Alves, T. C., Jurczak, M. J., Jornayvaz, ..., Shulman, G. I. (2011). Deletion of the mammalian INDY homolog mimics aspects of dietary restriction and protects against adiposity and insulin resistance in mice. *Cell metabolism*, 14(2), 184-195. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.009
- Brand, A. H. og Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401.
- DeSalvo, M. K., Hindle, S. J., Rusan, Z. M., Orng, S., Eddison, M., Halliwill, K. og Bainton, R. J. (2014). The Drosophila surface glia transcriptome: evolutionary conserved blood-brain barrier processes. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 346.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R., Venter, J. C., Hutchison, C. A. og Smith, H. O. . (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 3. doi:<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Hardies, K., de Kovel, C. G. F., Weckhuysen, S., Asselbergh, B., Geuens, T., Deconinck, T., ..., Zara, F. (2015). Recessive mutations in SLC13A5 result in a loss of citrate transport and cause neonatal epilepsy, developmental delay and teeth hypoplasia. *Brain*, 138(11), 3238-3250. doi:10.1093/brain/awv263
- Klotz, J., Porter, B. E., Colas, C., Schlessinger, A. og Pajor, A. M. (2016). Mutations in the Na(+)/citrate cotransporter NaCT (SLC13A5) in pediatric patients with epilepsy and developmental delay. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 22, 310-321. doi:10.2119/molmed.2016.00077
- Lin, W.-H., Giachello, C. N. G. og Baines, R. A. (2017). Seizure control through genetic and pharmacological manipulation of Pumilio in Drosophila: a key component of neuronal homeostasis. *Disease Models & Mechanisms*, 10(2), 141. doi:10.1242/dmm.027045
- Kelly, S. M., Elchert, A. og Kahl, M. (2017). *Dissection and Immunofluorescent Staining of Mushroom Body and Photoreceptor Neurons in Adult Drosophila melanogaster Brains* (Vol. 2017).
- Kristín E. Allison (2017, óbirt). *Frequency of SLC13A5 variability in the Icelandic population, identification of novel alleles and effect of mutations on protein location and function* (Nýsköpunarsjóðsverkefni). Háskóli Íslands, Reykjavík.
- Kristín E. Allison (2019, óbirt). Doktorsverkefni í vinnslu. Háskóli Íslands, Reykjavík

- Marini, C., Leguern, E., Zara, F., Rosenow, F., Caglayan, H., Hjalgrim, H., ..., May, P. (2015). Recessive mutations in SLC13A5 result in a loss of citrate transport and cause neonatal epilepsy, developmental delay and teeth hypoplasia. *Brain*, 138(11), 3238-3250. doi:10.1093/brain/awv263
- Plasmid: pcDNA3.1(+). *Addgene*. Sótt 26. maí af <https://www.addgene.org/vector-database/2093/>
- Rogina, B., Reenan, R. A., Nilsen, S. P. og Helfand, S. L. (2000). Extended Life-Span Conferred by Cotransporter Gene Mutations in *Drosophila*. *Science*, 290(5499), 2137. doi:10.1126/science.290.5499.2137
- Schossig, A., Bloch-Zupan, A., Lussi, A., Wolf, N. I., Raskin, S., Cohen, M., Giuliano, F., Jurgens, J., Krabichler, B., Koolen, D. A., de Macena Sobreira, N. L., Maurer, E., Muller-Bolla, M., Penzien, J., Zschocke, J. og Kapferer-Seebacher, I. (2017). SLC13A5 is the second gene associated with Kohlschütter–Tönz syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 54(1), 54. doi:10.1136/jmedgenet-2016-103988
- Selch, S., Chafai, A., Sticht, H., Birkenfeld, A. L., Fromm, M. F. og König, J. (2018). Analysis of naturally occurring mutations in the human uptake transporter NaCT important for bone and brain development and energy metabolism. *Scientific reports*, 8(1), 11330-11330. doi:10.1038/s41598-018-29547-8
- Thevenon, J., Milh, M., Feillet, F., St-Onge, J., Duffourd, Y., Jugé, C., ..., Rivière, J.-B. (2014). Mutations in SLC13A5 Cause Autosomal-Recessive Epileptic Encephalopathy with Seizure Onset in the First Days of Life. *The American Journal of Human Genetics*, 95(1), 113-120. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.06.006>
- Willmes, D. M., Kurzbach, A., Henke, C., Schumann, T., Zahn, G., Heifetz, A., Jordan, J., Helfand, S. L. og Birkenfeld, A. L. (2018). The longevity gene INDY (I'm Not Dead Yet) in metabolic control: Potential as pharmacological target. *Pharmacology & Therapeutics*, 185, 1-11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.003>