



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

*ΜΕΛΕΤΗ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΚΝΟΚΚΟΥΤ ΓΙΑ
ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ FRA10AC1*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
της Γκοτζαρίδου Ευαγγελίας

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Σαραφίδου Θεολογία

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:
Λιαδάκη Κ., Μαμούρης Ζ., Σαραφίδου Θ.

ΛΑΡΙΣΑ, 2017

«ΜΕΛΕΤΗ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ KNOCKOUT ΓΙΑ
ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *FRA10AC1*»

«STUDY OF HETEROZYGOUS KNOCKOUT MICE FOR
THE *FRA10AC1* GENE»

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Σαραφίδου Θεολογία: Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών
Οργανισμών

Λιαδάκη Καλλιόπη: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας

Μαμούρης Ζήσης: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Κας Θεολογίας Σαραφίδου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω την κα Σαραφίδου τόσο για την άριστη συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων όσο και για τις πολύτιμες συμβουλές και το χρόνο που μου παρείχε. Ακόμη, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την υπομονή, το ενδιαφέρον και την υποστήριξη που έδειξε για την πραγματοποίηση της πτυχιακής εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών και την κα. Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Διδάκτορα κ. Κώστα Σταμάτη για την πολύτιμη βοήθειά του μέσα στο εργαστήριο καθώς επίσης και τους υποψήφιους Διδάκτορες Γαλλιοπούλου Ελένη, Γιαννούλη Θεμιστοκλή, Μαρκαντώνη Μαρία και Τσιπουρλιάνο Ανδρέα τόσο για την βοήθειά τους και την άριστη συνεργασία κατά την εκτέλεση των πειραμάτων όσο και για τις χρήσιμες συμβουλές τους, οι οποίες ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Χαρτογράφηση του γονιδίου <i>FRA10AC1</i> στην εύθραυστη χρωμοσωμική θέση <i>FRA10A</i> του ανθρώπου	9
1.1.1 Εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις.....	11
1.1.3 Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου <i>FRA10AC1</i>	13
1.1.2 Πρωτεΐνη <i>FRA10AC1</i>	14
1.2 Ανάγκη δημιουργίας ποντικών knockout.....	18
1.2.1 Δημιουργία ποντικών knockout	19
1.2.2 Γονιδιακή κατασκευή για τη δημιουργία ποντικών knockout για το γονίδιο <i>FRA10AC1</i>	22
1.3 ΣΚΟΠΟΣ.....	25
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1 Απομόνωση ολικού DNA από ιστό.....	28
2.1.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA :	29
2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός DNA	29
2.2.1 Κατασκευή πηκτώματος αγαρόζης.....	30
2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (polymerase chain reaction- PCR)	31
2.4 Σύγκριση αλληλουχιών <i>in silico</i> με εφαρμογή του αλγορίθμου BLAST.....	34
2.4.1. BLAST για τη σύγκριση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου και του knockout αλληλομόρφου.....	34
2.4.2 BLAST για τη σύγκριση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου με τις αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR.....	35
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
3.1 Δείγματα ποντικών	38
3.2 Απομόνωση DNA από ιστό ποντικού	38
3.3 Γονοτύπηση δειγμάτων	40
3.3.1 Αποτελέσματα από την PCR του πρώτου συνόλου δειγμάτων	40
3.3.2 Αποτελέσματα από την PCR του δεύτερου συνόλου δειγμάτων	42
3.3.3 Αποτελέσματα από την PCR του τρίτου συνόλου δειγμάτων	44

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	46
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γονίδιο *FRA10AC1* εντοπίζεται στην εύθραυστη χρωμοσωμική θέση, *FRA10A* του ανθρώπου. Η *FRA10A* είναι μία σπάνια αυτοσωμική εύθραυστη χρωμοσωμική θέση, ευαίσθητη στο φυλλικό οξύ. Χαρτογραφείται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23.3 και είναι η πιο συχνή εύθραυστη χρωμοσωμική θέση στο ανθρώπινο γονιδίωμα με συχνότητα 1/500 στα έμβρυα. Η έκφραση της *FRA10A* προκαλείται από την επέκταση μιας φυσιολογικά πολυμορφικής επανάληψης (CGG)₈₋₁₄. Αυτή η επανάληψη CGG είναι τμήμα μιας νησίδας CpG στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *FRA10AC1*. Στους φορείς της *FRA10A* η πολυμορφική επανάληψη επεκτείνεται κατά τουλάχιστον 200 αντίγραφα και σ' αυτό το μέγεθος υφίσταται υπερμεθυλίωση που έχει ως αποτέλεσμα τη σίγηση του αντίστοιχου αλληλομόρφου του γονιδίου *FRA10AC1* μέσω της καταστολής της μεταγραφής του. Το κύριο μετάγραφο του γονιδίου *FRA10AC1* έχει μέγεθος 1450 bp και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη, *FRA10AC1*. Η *FRA10AC1* είναι μια πυρηνική, υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη στους πολυκύτταρους ευκαρυώτες, η οποία αποτελείται από 315 αμινοξέα. Πλέον υπάρχουν ενδείξεις, ότι η *FRA10AC1* ίσως να συμμετέχει στη συναρμογή του πρόδρομου mRNA ή σε κάποια άλλη στενά σχετιζόμενη λειτουργία με τη διαδικασία μεταβολισμού του mRNA.

Με σκοπό τη συσχέτιση γονοτύπου- φαινοτύπου δημιουργήθηκε ένα ζωικό μοντέλο ενός ποντικού knockout με απαλοιφή του ορθόλογου γονιδίου *FRA10Ac1*. Στην παρούσα εργασία έγινε γονοτύπηση ποντικών που είχαν προέλθει από διασταυρώσεις ετερόζυγων και αγρίου τύπου ποντικών. Το πρώτο ποντίκι knockout για το γονίδιο *FRA10AC1* δημιουργήθηκε στο πλαίσιο της υποδομής Infrafrontier GR στο Ίδρυμα Βιοϊατρικών Επιστημονικών Ερευνών Αλέξανδρος Φλέμινγκ. Στη συνέχεια, οι επόμενες διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, τόσο για να μελετηθούν και οι ετερόζυγοι ποντικοί- φορείς όσο και γιατί είναι απαραίτητο να μεγαλώσουν οι αποικίες ώστε να μπορούν να διενεργηθούν οι απαραίτητες δοκιμασίες συμπεριφοράς. Όλα τα τροποποιημένα γενετικά ποντίκια γεννιούνταν και εκτρέφονταν σε ζωοτροφείο του Ιδρύματος Φλέμινγκ. Τα δείγματα που στάλθηκαν ήταν επεξεργασμένα από το εργαστήριο του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών όπου και πραγματοποιούνται όλες οι διασταυρώσεις των ζώων. Ειδικότερα, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από ιστούς ποντικών και διεξήχθησαν PCRs με σκοπό τη γονοτύπηση των δειγμάτων.

ABSTRACT

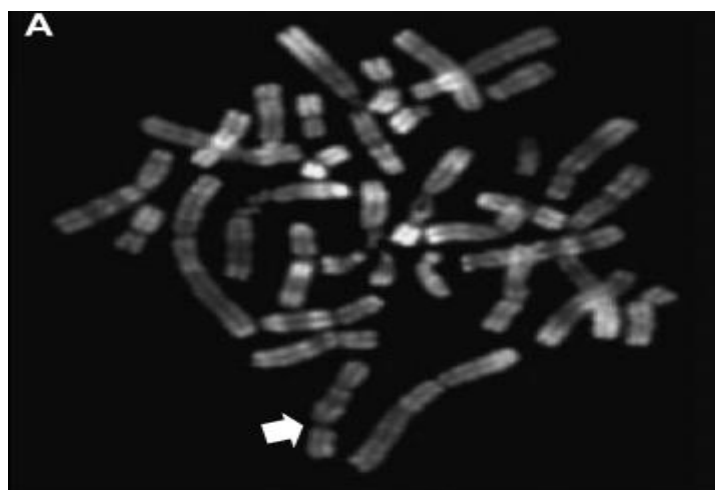
The *FRA10AC1* gene is located in the *FRA10A* fragile human chromosomal site. *FRA10A* is a rare autosomal fragile chromosomal site, sensitive to folic acid. It is mapped to the chromosomal region 10q23.3 and is the most common fragile chromosomal site in the human genome at a frequency of 1/500 embryos. Expression of *FRA10A* is mediated by the extension of a normal polymorphic repeat (CGG)₈₋₁₄. This CGG repeat is part of a CpG island in the 5' untranslated region of the *FRA10AC1* gene. In *FRA10A* carriers, the polymorphic repeat is expanded by at least 200 copies, and at this size there is hypermethylation resulting in the silence of the corresponding allele of the *FRA10AC1* gene by suppressing its transcription. The main transcript of the *FRA10AC1* gene is 1450 bp in size and encodes the protein, *FRA10AC1*. *FRA10AC1* is a nuclear, highly conserved protein in multicellular eukaryotes, which is consisted of 315 amino acids. There are now indications that *FRA10AC1* may be involved in the assembly of the mRNA precursor or some other closely related function with the mRNA metabolism process.

In order to correlate the genotype with the phenotype, an animal model of a knockout mouse was created by silencing the *FRA10Ac1* orthogene. In this study, genotyping of mice derived from crossings of heterozygous and wild-type mice was performed. The first knockout mouse for the *FRA10AC1* gene was created within the Infrafrontier GR infrastructure at the Alexander Fleming Foundation of Biomedical Research. Subsequently, the following crossings were carried out at the Institute of Biomedical Research of the Academy of Athens, both to study the heterozygous mice-carriers and because it is necessary to grow up the colonies so that the necessary behavioral tests can be carried out. All modified genetic mice were born and bred in a Fleming Foundation's animal feed. The samples sent were processed by the laboratory of the Institute of Biomedical Research of the Academy of Athens where all animal crossings are carried out. In particular, DNA isolation from mouse tissues was performed in the context of this study and PCRs were performed in order to genotype the samples.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Χαρτογράφηση του γονιδίου *FRA10AC1* στην εύθραυστη χρωμοσωμική θέση *FRA10A* του ανθρώπου

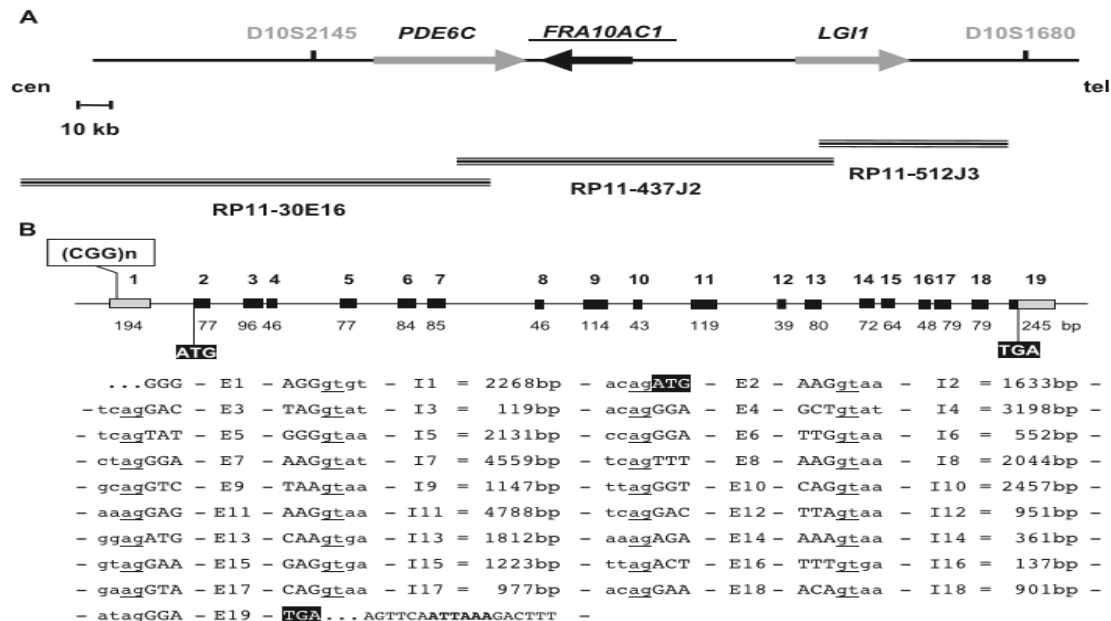
Η *FRA10A* είναι μία σπάνια αυτοσωμική εύθραυστη χρωμοσωμική θέση, ευαίσθητη στο φυλλικό οξύ. Χαρτογραφείται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23.3 (Εικόνα 1.1) και είναι η πιο συχνή εύθραυστη χρωμοσωμική θέση στο ανθρώπινο γονιδίωμα με συχνότητα 1/500 στα έμβρυα (Sutherland GR, 1982).



Εικόνα 1.1: Κυτταρογενετική χαρτογράφηση της εύθραυστης χρωμοσωμικής θέσης *FRA10A* (R. Siebert, et al., 1998, C. Nobile, et al., 1998).

Κλινικά συμπτώματα για τα άτομα που είναι φορείς για αυτήν την εύθραυστη χρωμοσωμική θέση αποτελούν η μέτρια νοητική υστέρηση και η αναπτυξιακή ανωμαλία (Mavrou et al., 1991, Sutherland GR, 1985, Petit P. et al., 1986, Kähkönen M. et al., 1989). Κατά τη διάρκεια, όμως, της μελέτης των φορέων για την *FRA10A* εντοπίστηκαν και φορείς, δηλαδή άτομα ετερόζυγα ως προς την *FRA10A*, τα οποία δεν εμφάνιζαν κανένα από τα κλινικά συμπτώματα και ήταν υγιή. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο παθολογικός φαινότυπος που σχετίζεται με τη *FRA10A* παρουσιάζει πιθανώς μειωμένη διεισδυτικότητα. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως άτομα-φορείς που έχουν τον ίδιο γονότυπο και θα έπρεπε να εμφανίζουν τον παθολογικό φαινότυπο, δεν πάσχουν. Εναλλακτικά, υπάρχει περίπτωση η *FRA10A* να μην σχετίζεται με παθολογικό φαινότυπο. Από μελέτες δείχθηκε ότι στην εύθραυστη θέση *FRA10A* χαρτογραφείται το γονίδιο *FRA10AC1*. Ειδικότερα, με ανάλυση FISH (*fluorescence in situ hybridization*) σε άτομα φορείς της *FRA10A* χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή τον γενωμικό κλώνο BAC RP11-437J2 που περιέχει το γονίδιο *FRA10AC1* και με σύγκριση της πλήρους αλληλουχίας του cDNA του γονιδίου *FRA10AC1* με τη γενωμική αλληλουχία του κλώνου BAC RP11-437J2 προσδιορίστηκε η γενωμική οργάνωση του γονιδίου. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να βρεθεί ότι το γονίδιο *FRA10AC1* καταλαμβάνει μια περιοχή 33 kb και μεταγράφεται με κατεύθυνση από το τελομερές προς το κεντρομερές (Εικόνα 1.2) . Επίσης, το

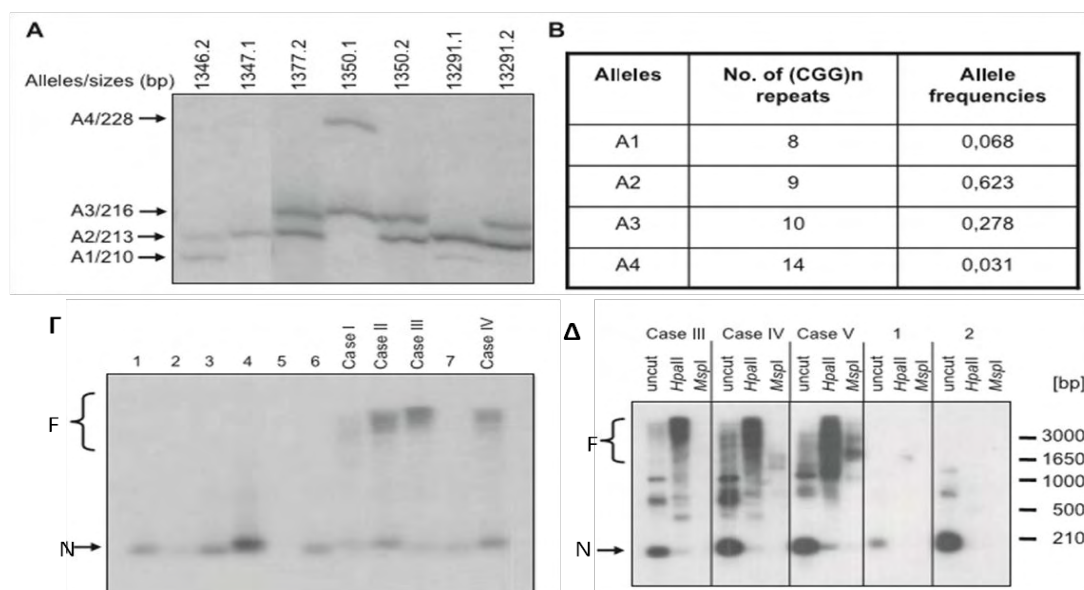
γονίδιο περιέχει μία επανάληψη (CGG)₈ στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του, η οποία αποτελεί μέρος μίας νησίδας CpG, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.2 (T. Sarafidou et al., 2004)



Εικόνα 1.2: Χαρτογράφηση και γενωμική οργάνωση του γονιδίου *FRA10AC1* (T. Sarafidou et al., 2004).

Η ανάλυση του πολυμορφισμού της επανάληψης CGG σε άτομα από το γενικό πληθυσμό έγινε με PCR κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που υβριδοποιούσαν τις αλληλουχίες που βρίσκονταν εκατέρωθεν της επανάληψης. Έτσι, δείχθηκε ότι η επανάληψη είναι πολυμορφική, δηλαδή εμφανίζει τέσσερα διαφορετικά αλληλόμορφα (Εικόνα 1.3). Στην Εικόνα 1.3 παρουσιάζονται τα τέσσερα αλληλόμορφα (A1-A4) της επανάληψης που ανιχνεύθηκαν και επτά αντιπροσωπευτικοί γενότυποι μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (Εικόνα 1.3A). Η ανάλυση των τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων (CGG)_n στα άτομα-ελέγχου (δείγματα 1-7) και στα άτομα που εκφράζουν τη θέση *FRA10A* (δείγματα I, II, III, IV, V), έδειξε ότι, εκτός από το φυσιολογικό αλληλόμορφο (το οποίο σημειώνεται με «N») τα άτομα που κυτταρογενετικά εκφράζουν την εύθραυστη θέση εμφανίζουν και ζώνες μεγαλύτερου μεγέθους (οι οποίες σημειώνονται με «F»), γεγονός που υποδεικνύει την επέκταση της επανάληψης (Εικόνα 1.3C). Τέλος, για να εξεταστεί εάν οι επαναλήψεις CGG υπόκεινται σε μεθυλίωση, έγινε πέψη με περιοριστικά ένζυμα σε γονιδιωματικό DNA από άτομα που είναι ετερόζυγα για την *FRA10A* (δείγματα III, IV, V) και άτομα ελέγχου (1 και 2). Τα περιοριστικά ένζυμα, ήταν ευαίσθητα (HpaII) ή όχι (MspI) στη μεθυλίωση. Στη συνέχεια, η επανάληψη (CGG)_n ενισχύθηκε με PCR η οποία δεν ήταν προφανώς εφικτή στην περίπτωση που

το DNA είχε τεμαχιστεί. Έτσι, επιβεβαιώθηκε η υπερμεθυλίωση αυτής της περιοχής. (Εικόνα 1.3D) (T. Sarafidou et al., 2004)



Εικόνα 1.3: Η επανάληψη CGG είναι πολυμορφική και υφίσταται επέκταση και υπερμεθυλίωση στους φορείς της FRA10A. Α) Αποτελέσματα PCR σε πήκτωμα ακρυλαμίδης όπου φαίνονται τα τέσσερα διαφορετικά αλληλόμορφα για την επανάληψη CGG Β) Ο αριθμός και η συχνότητα των επαναλήψεων στα αλληλόμορφα της επανάληψης CGG του γονιδίου FRA10AC1 Γ) Αποτελέσματα PCR σε πήκτωμα αγαρόζης όπου φαίνεται η επέκταση της επαναληψης CGG στα άτομα φορείς της FRA10A Δ) Πέψη γονιδιωματικού DNA σε άτομα φορείς της FRA10A και σε άτομα ελέγχου με ένζυμα περιορισμού ευαίσθητα ή μη στη μεθυλίωση και ενίσχυση των επαναλήψεων CGG με PCR (T. Sarafidou et al., 2004).

1.1.1 Εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις

Οι εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις είναι γονιδιωματικές περιοχές που εκδηλώνουν χρωμοσωμικά χάσματα ή θραύσεις κατά τη μετάφαση της μίτωσης των κυττάρων, τα οποία μπορούν να παρατηρηθούν στο οπτικό μικροσκόπιο και παράγονται κάτω από συνθήκες καλλιέργειας ευαίσθητες στην αναστολή της αντιγραφής του DNA. Οι εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις είναι πλούσιες σε περιοχές DNA που είναι συντηρημένες κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των χρωμοσωμάτων των θηλαστικών και γονίδια microRNAs (Rossi S. et al., 2008, Reshmi G. et al., 2011) που είναι ασταθή (Ragland RL et al., 2008, Ruiz-Herrera A. et al., 2007). Οι εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας που τις επάγουν σε: 1) αυτές που απαιτούν δισταμική A 2) βρωμο-δεοξυ-ουριδίνη (BrdU) και 3) σε αυτές που είναι ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, οι οποίες αποτελούν και την πλειοψηφία των σπάνιων εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων (B. Bardoni et al., 2000).

Επιπλέον, γίνεται διάκριση των εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων και ταξινόμησή τους σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τη συχνότητά τους στον πληθυσμό. Έτσι, προκύπτουν οι συχνές και οι σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις (G.R.

Sutherland et al., 1985, Y. Pekarsky et al., 2002, M.F. Arlt et al., 2003). Οι συχνές εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις υπάρχουν στο γενικό πληθυσμό και δεν προκαλούν παθολογικούς φαινοτύπους, καθώς επίσης δεν εμφανίζουν και κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο στην αλληλουχία τους. Από την άλλη, οι σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις παρουσιάζονται σε ποσοστό λιγότερο από το 5% του γενικού πληθυσμού. Ειδικότερα, οι συχνές εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις είναι περιοχές στις οποίες παρατηρείται αρκετά μεγάλη γενωμική αστάθεια, όπως παραδείγματος χάρη διαγραφές και αναδιατάξεις DNA, οι οποίες συχνά είναι η αιτία για σωματικές χρωμοσωμικές αλλαγές κατά την εμφάνιση καρκίνου (Debatisse M. Et al., 2012). Χαρακτηρίζονται από πλούσιες AT- περιοχές (S. Yu, et al., 1997, D.R. Hewett, et al., 1998), υψηλό ποσοστό στοιχείων LINES (Long interspersed nuclear elements) και μέτρια επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Lukusa T, Fryns JP, 2008), που φιλοξενούν γονίδια άνω των 650 kb (Thomas W. Glover1–3, et al., 2017, Durkin et al., 2007, Gao et al., 2014).

Αντίθετα, οι σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις (G.R. Sutherland et al., 2003) είναι στην πλειονότητά τους ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, οι οποίες παρουσιάζουν ένα συγκεκριμένο πρότυπο αλληλουχίας που αφορά στην επέκταση CCG/CGG- τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων (J.K. Nancarrow, 1994). Το πρότυπο αυτό συσχετίζεται πιθανώς με παθολογικούς φαινοτύπους. Πιο συγκεκριμένα, αυτές που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι οι: FRAXA, FRAXE, FRAXF, FRA16A, FRA11B, FRA10A, FRA11A, FRA12A (Lukusa T, Fryns JP, 2008). Υπάρχουν, όμως, και σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις από αυτές που έχουν μελετηθεί εκτενώς οι οποίες είναι ευαίσθητες σε άλλα χημικά που τις επάγουν. Παρακάτω φαίνεται η διάκριση των σπάνιων εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων ανάλογα με το χημικό που προκαλεί την επαγωγή τους:

Πίνακας 1: Διάκριση των μελετημένων σπάνιων εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων ανάλογα με το χημικό που επάγει την έκφρασή τους

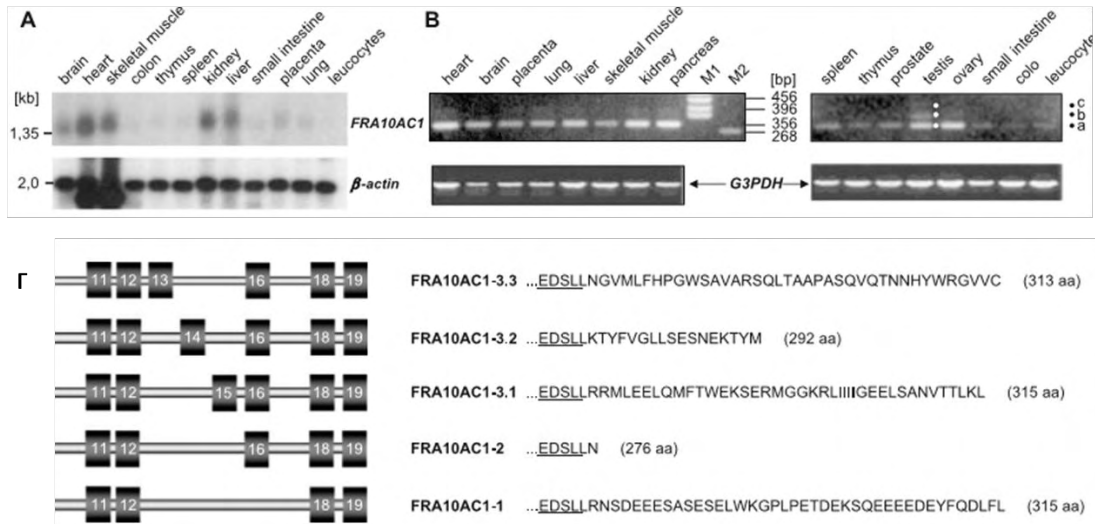
Χημικό που επάγει τις σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις	Εύθραυστη Χρωμοσωμική Θέση
Φυλλικό οξύ	FRAXA (Kremeret al. 1991, Verkerk et al. 1991)
	FRAXF (Parrish et al. 1994, Shaw et al., 2002)
	FRAXE (Knight et al. 1993, Gécz et al., 1997)
	FRA16A (Nancarrow et al. 1994)
	FRA10A (Sarafidou et al. 2004)
	FRA11B (Jones et al. 1994, Jones et al., 1995)
	FRA11A (Jones et al. 1994, Jones et al., 1995)
	FRA2A (Metsu et al., 2014)
	FRA12A (Winnepenninckx et al., 2007)
δισταμυκίνη ή/και βρωμο-δεοξυ-ουριδίνη (BrdU)	FRA10B (Hewett et al. 1998)
	FRA16B (Yu et al. 1997)

Όλες οι εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις αυτού του τύπου χαρακτηρίζονται από εκτεταμένες τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις (CGG)_n (Wang YH, 2006). Η δημιουργία εύθραυστης θέσης οφείλεται στην επέκταση της επανάληψης του αλληλομόρφου που έχει υποστεί μετάλλαξη και οδηγεί άμεσα σε υπερμεθυλίωση των γειτονικών περιοχών που είναι πλούσιες σε GC-, in cis. Αυτή η επέκταση των επαναλήψεων CGG και η υπερμεθυλίωσή τους σε ορισμένες περιπτώσεις έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την σίγηση του αντίστοιχου αλληλομόρφου. Η μελέτη της μοριακής βάσης αυτών των εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων δείχνει ότι αυτή βασίζεται στην αναστολή του σχηματισμού των νουκλεοσωμάτων από την (CGG)_n, δηλαδή στην ικανότητα του DNA να αναστέλλει το σχηματισμό των νουκλεοσωμάτων ανάλογα με το μέγεθος της εκάστοτε επανάληψης. Η αναστολή σχηματισμού των νουκλεοσωμάτων ενισχύεται ακόμη περισσότερο στην περίπτωση που προκαλείται μεθυλίωση από την τρινουκλεοτιδική επανάληψη (Wang YH, 2006). Όσον αφορά την κλινική τους σημασία, η πιο εκτενώς μελετημένη σπάνια εύθραυστη χρωμοσωμική θέση, είναι η *FRAXA* που συνδέεται με το σύνδρομο του εύθραυστου X και χαρτογραφείται στη χρωμοσωμική θέση Xq27.3 (B. Bardoni et al., 2000), ενώ η *FRAXE* οδηγεί σε μία ήπια ως μέτρια μη- συνδρομική νοητική υστέρηση (J. Ge'cz, 2000). Τέλος, δεν έχουν σημειωθεί ομοζυγώτες για τις αυτοσωμικές εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις που είναι ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ομοζυγωτία για τουλάχιστον κάποιες απ' αυτές τις εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις ίσως είναι ασύμβατη με τη ζωή (Sutherland GR, Baker E., 2000).

1.1.3 Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1*

Το γονίδιο *FRA10AC1* εντοπίζεται στην εύθραυστη χρωμοσωμική θέση, *FRA10A*. Μεταγράφεται από το τελομερές προς το κεντρομερές (κεντρομερική κατεύθυνση). Μετά από συναρμογή προκύπτουν εναλλακτικά μετάγραφα με διαφορετικά 3' άκρα και συνεπώς και πρωτεΐνες με εναλλακτικά καρβοξυ-τελικά άκρα. Το κύριο μετάγραφο των ~ 1450 bp εκφράζεται παντού και κωδικοποιεί για μια υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη, την *FRA10AC1*, 315 αμινοξέων. Η ανάλυση της έκφρασης του *FRA10AC1* σε διάφορους ανθρώπινους ιστούς πραγματοποιήθηκε με ανάλυση Northern. Έγινε υβριδοποίηση χρησιμοποιώντας δύο ανιχνευτές, απ' τους οποίους ο πρώτος υβριδοποιούσε το αρχικό τμήμα της 5' αμετάφραστης περιοχής του *FRA10AC1* ενώ ο δεύτερος κάλυπτε ένα τμήμα του εξωνίου 19. Ένα μετάγραφο 1450 bp το οποίο ανταποκρινόταν στο μέγεθος του cDNA του γονιδίου ανιχνεύθηκε σε όλους τους ιστούς που αναλύθηκαν, γεγονός που υποδεικνύει ότι το γονίδιο *FRA10AC1* εκφράζεται παντού στον άνθρωπο (όπως φαίνεται στην *Εικόνα 1.4*). Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν RT-PCRs με cDNA από άνθρωπο, όπως παρουσιάζεται παρακάτω προκειμένου να ερευνηθεί περαιτέρω το πρότυπο έκφρασης του

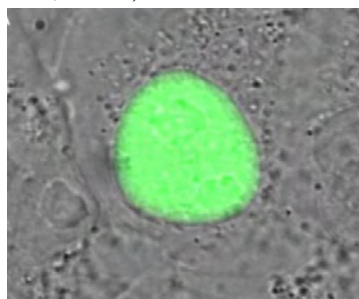
FRA10AC1 (Εικόνα 1.4). Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που υβριδοποιούνταν με τα εξώνια 11 έως 19. Η ανάλυση από όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν έδειξε ότι προκύπτουν πέντε διαφορετικά μετάγραφα. Τέλος, σύγκριση των ακολουθιών των αμινοξέων αυτών των πέντε διαφορετικών εναλλακτικών μεταγράφων που προκύπτουν από το συναρμογή του γονιδίου *FRA10AC1* έδειξε ότι οι καρβοξυτελικές περιοχές είναι αυτές που διαφέρουν (Εικόνα 1.4) (T. Sarafidou et al., 2004).



Εικόνα 1.4: Μοτίβο έκφρασης του *FRA10AC1* σε διάφορους ιστούς του ανθρώπου και αναγνώριση των εναλλακτικών παραγώγων ματίσματος. (Τα εξώνια σημειώνονται με σκούρα γκρι κουτιά και είναι αριθμημένα. Τα ιντρόνια απεικονίζονται ως πυκνές γκρι γραμμές. Τα αμινοξέα που κωδικοποιούνται από το εξώνιο 12, που είναι κοινά σε όλα τα μετάγραφα του *FRA10AC1*, υπογραμμίζονται) (T. Sarafidou et al., 2004).

1.1.2 Πρωτεΐνη *FRA10AC1*

Η πρωτεΐνη *FRA10AC1* είναι μια πυρηνική (Εικόνα 1.5), υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη στους πολυκύτταρους ευκαρυώτες, η οποία αποτελείται από 315 αμινοξέα (Sarafidou T. et al., 2004).



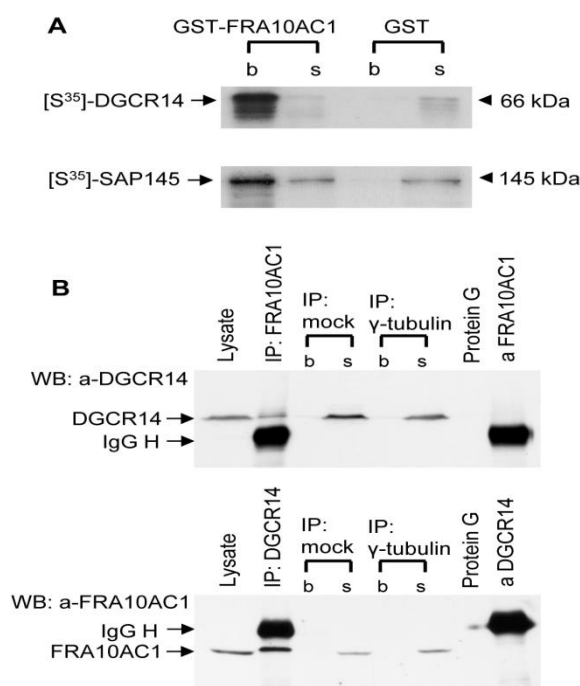
Εικόνα 1.5: Υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης *FRA10AC1* που έχει επισημανθεί με EGFP (Sarafidou T. et al., 2004).

Μετά από απομόνωση παρασκευασμάτων του σωματίου συναρμογής βρέθηκε με ανάλυση φασματομετρίας μάζας ότι η *FRA10AC1* εντοπίζεται σε καταλυτικά ενεργά συμπλέγματα συναρμογής, όπως το ενεργοποιημένο B-, το C- και

στο μετα- καταλυτικό σύμπλεγμα P (Bessonov S., 2010). Το σωματίο συναρμογής, είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών και πέντε μικρών πυρηνικών μορίων RNA (snRNA), των U1, U2, U4, U5 και U6, το οποίο καταλύει το συναρμογή του mRNA. Αυτά τα μόρια RNA συνδέονται με ειδικές πρωτεΐνες σχηματίζοντας σύμπλοκα που ονομάζονται μικρά πυρηνικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια (snRNP). Τα σωματίδια ματίσματος είναι μεγάλα (60S) δυναμικά συμπλέγματα αποτελούμενα από μόρια snRNP, άλλες πρωτεΐνες που ονομάζονται παράγοντες ματίσματος και το πρόδρομο μόριο mRNA που υφίσταται την επεξεργασία. Μερικές από τις πρωτεΐνες των snRNP μπορεί να εμπλέκονται άμεσα στη συναρμογή, ενώ άλλες μπορεί να έχουν δομικό ρόλο ή να συμμετέχουν στη συγκρότηση του σωματίου ή στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα σύμπλοκα snRNP (L. Benjamin, *Genes VIII*, 2004). Τα snRNPs συντονίζουν τη δυναμική ζεύξη βάσεων μεταξύ των διαφορετικών snRNAs και μεταξύ των snRNAs και του πρόδρομου mRNA για να ληφθούν δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές RNA που ορίζουν το καταλυτικό κέντρο των σωματιών συναρμογής. Επιπλέον, υπάρχουν και άλλες μη-snRNP πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη συναρμολόγηση και λειτουργία του σωματίου συναρμογής (Will, C. L. et al., 2011). Αν και η κατάλυση του ματίσματος δεν απαιτεί ATP, οι βασικές ATPάσεις υποβοηθούν τις μεταβολές της διαμόρφωσης κατά τη διάρκεια της συναρμολόγησης, καθιερώνοντας και αναδιατάσσοντας τις αλληλεπιδράσεις RNA-RNA, RNA-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Cvitkovic, I. et al., 2013). Όταν συντίθεται το mRNA κατά τη διάρκεια της μεταγραφής υφίσταται ταυτόχρονα το μεγαλύτερο μέρος της διαδικασίας ματίσματος. Η πρόσφατη παρατήρηση ότι η συναρμογή συχνά ολοκληρώνεται τη στιγμή που το ιντρόνιο αναδύεται από την RNA πολυμεράση II οδήγησε στην αναζήτηση μηχανισμών οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα του συν- μεταγραφικού ματίσματος (Lydia Herzel et al., 2017). Έχει προταθεί ότι ο περίπλοκος συντονισμός μεταξύ του DNA, της αλληλουχίας και της δομής του RNA, και των μηχανισμών μεταγραφής και επεξεργασίας εξασφαλίζει μία πολύ αποτελεσματική και ρυθμισμένη συν-μεταγραφικά επεξεργασία του mRNA και ότι αυτός ο συντονισμός μπορεί να επιτευχθεί εν μέρει συγκεντρώνοντας όλα τα εμπλεκόμενα στοιχεία σε υποπυρηνικά διαμερίσματα. Υπάρχουν, λοιπόν, ενδείξεις, ότι η FRA10AC1 ίσως να συμμετέχει στη συναρμογή του πρόδρομου mRNA ή σε κάποια άλλη στενά σχετιζόμενη λειτουργία με τη διαδικασία μεταβολισμού του mRNA.

Η FRA10AC1 βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με συστατικά του σωματίου συναρμογής. Ειδικότερα, παρατηρείται αλληλεπίδραση της FRA10AC1 με δύο παράγοντες ματίσματος τον SF3B2 και τον DGCR14 (Bessonov S., 2010, Lardelli RM et al., 2010). Ο SF3B2 είναι το πιο καλά μελετημένο συστατικό του παράγοντα ματίσματος SF3b ο οποίος συνδέεται με το πρόδρομο mRNA και δεσμεύει το U2 snRNP στο σημείο διακλάδωσης (Lardelli RM et al.:2010, Golas MM. Et al.:2003). Επιπλέον, σ' αυτήν την κατηγορία ανήκει ακόμα ένας καλά μελετημένος παράγοντας, ο DGCR14 ο οποίος εξασφαλίζει την ακριβή συναρμογή του mRNA όταν η θέση ματίσματος δεν είναι η σωστή λόγω κάποιας μετάλλαξης (Noma et al., 2014). Η άμεση αλληλεπίδραση της FRA10AC1 με τους παράγοντες SF3B2 ή DGCR14

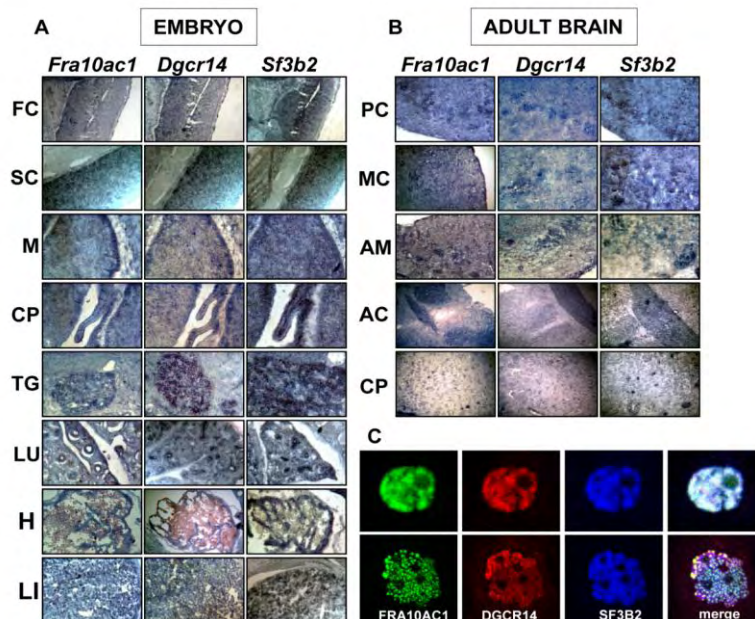
επιβεβαιώθηκε με GST “pull downs”. Η FRA10AC1 συγχωνευμένη με την GST παράχθηκε σε βακτήρια και χρησιμοποιήθηκε για να κατακρημνίσει μαζί της το πρωτεϊνικό προϊόν της DGCR14 ή της SF3B2, οι οποίες μεταφράστηκαν *in vitro* και ήταν επισημασμένες με μεθειονίνη (Εικόνα 1.6A). Επιπλέον, η ενδογενής FRA10AC1 συν- κατακρημνίζεται με την DGCR14 σε κύτταρα θηλαστικών (Εικόνα 1.6B). Αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουν αναμφισβήτητα μία άμεση φυσική επαφή μεταξύ της FRA10AC1 και της DGCR14, *in vivo*. Η αντίστοιχη δοκιμή για το πρωτεϊνικό ζεύγος της ενδογενούς FRA10AC1 με την SF3B2, απέτυχε να εντοπίσει κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει είτε ότι η σύνδεση της FRA10AC1 με την SF3B2 είναι αδύναμη ή παροδική ή δεν ευνοείται από τις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 1.6: Αποτελέσματα από αναλύσεις GST “pull down” για τη διαπίστωση των αλληλεπιδράσεων της FRA10AC1 με τις SF3B2 και DGCR14. A) Εμφάνιση των αποτελεσμάτων του GST “pull down” με SDS- PAGE και αυτοραδιογραφία B) Ανάλυση western απέδειξε την αλληλεπίδραση της FRA10AC1 με την DGCR14 ύστερα από ανοσοκατακρήμνιση (Sarafidou T. et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

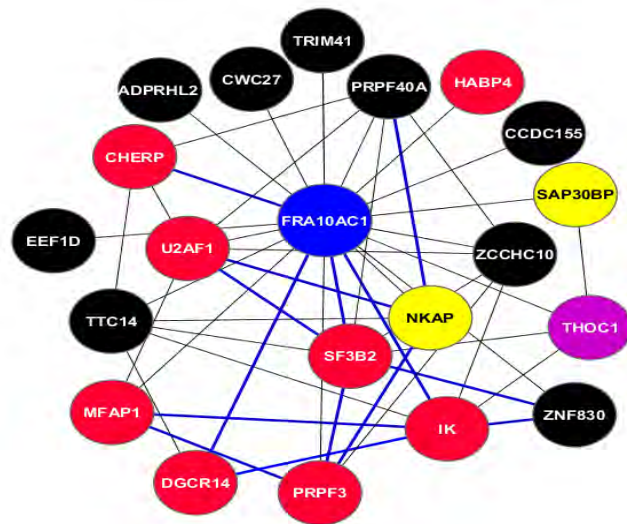
Οι τρεις πρωτεΐνες συνεντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου γεγονός που επιβεβαιώθηκε με παροδική έκφραση της GFP-FRA10AC1 και της Xpress-DGCR14 σε κύτταρα HeLa, στα οποία ανιχνεύεται και η SF3B2. Παρατηρήθηκε ότι οι πρωτεΐνες FRA10AC1, DGCR14 και SF3B2 συν- εντοπίζονται στο πυρηνόπλασμα των κυττάρων HeLa, όπως φαίνεται και στην παρακάτω Εικόνα (Εικόνα 1.7). Ακόμη, οι τρεις πρωτεΐνες FRA10AC1, DGCR14 και SF3B2 φαίνεται πως παρουσιάζουν εκτεταμένο χωρικό μοτίβο συν- έκφρασης κατά τη διάρκεια ανάπτυξης εμβρύων ποντικών. Για τη συγκριτική ανάλυση της έκφρασής τους πραγματοποιήθηκε *in situ*

υβριδοποίηση με αντι-νοηματικό RNA σε τμήματα από έμβρυα ποντικών (πίνακας A, Εικόνα 1.7) και τμήματα του εγκεφάλου ενήλικων ποντικών (πίνακας B, Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7: Οι *FRA10AC1*, *DGCR14* και *SF3B2* εμφανίζουν χωρική συν-έκφραση και αλληλεπικαλυπτόμενη υποκυτταρική τοπολογία (Sarafidou T. et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Επίσης, από άλλες μελέτες έχει δειχθεί ότι η *FRA10AC1* αλληλεπιδρά με άλλες 25 πρωτεΐνες που βρίσκονται αποκλειστικά ή μερικώς στον πυρήνα του κυττάρου σύμφωνα με την οντολογία των αντίστοιχων πρωτεϊνών (Εικόνα 1.8) (Montes M. et al., 2012, Imig J. et al., 2012, Castello A. et al., 2012). Δεκαεπτά από αυτά έχουν αναγνωριστεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής, ενώ τα υπόλοιπα δέκα εμπλέκονται λειτουργικά στη διαδικασία επεξεργασίας του mRNA και μπορούν να ταξινομηθούν στις παρακάτω κατηγορίες: α) παράγοντες ματίσματος, όπως π.χ. ο *SF3b* και ο *DGCR14*. Ακόμη, σ' αυτήν την κατηγορία ανήκουν ο *U2AF1* (Wu S. et al., 1999), ο *PRPF3* (Maita H. et al., 2005), ο *MFAP1* (Andersen DS et al., 2008) και οι *IK*, *CHERP* και *HABP4* (Spartz AK et al., 2004, Bressan GC et al., 2009, Sasaki et al., 2013) β) πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη ρύθμιση της μεταγραφής, όπως π.χ. η *NKAP* (Chen D et al., 2003) και η *SAP30BP* (Chen J et al., 2010) και γ) παράγοντες που εμπλέκονται στην έξοδο του mRNA, όπως π.χ. ο *THOC1* (Cheng H et al., 2006). Παρόλο που αυτές οι αλληλεπιδράσεις προέρχονται από πειράματα μεγάλης κλίμακας (π.χ. σύστημα δύο υβριδίων), τα οποία έχουν μικρότερη αξιοπιστία από στοχευμένα πειράματα, ενισχύουν την υπόθεση της συμμετοχής της *FRA10AC1* στη διαδικασία επεξεργασίας του mRNA (Hegele A. et al., 2012, Tilgner H. et al., 2012).



Εικόνα 1.8: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών της *FRA10AC1*. Οι έντονες γραμμές υποδηλώνουν αξιόπιστες αλληλεπιδράσεις που ταυτοποιήθηκαν με περισσότερες από μία πειραματικές μεθόδους. Ο κωδικός χρώματος του κόμβου ανταποκρίνεται σε ομάδες πρωτεϊνών συγκεκριμένης λειτουργίας, όπως π.χ. κόκκινο: παράγοντες ματίσματος, κίτρινο: μεταγραφικοί παράγοντες, μωβ: πρωτεΐνες εξαγωγής mRNA, μαύρο: άγνωστη λειτουργία ή μη σχετική με την επεξεργασία του mRNA (Sarafidou T. et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα)

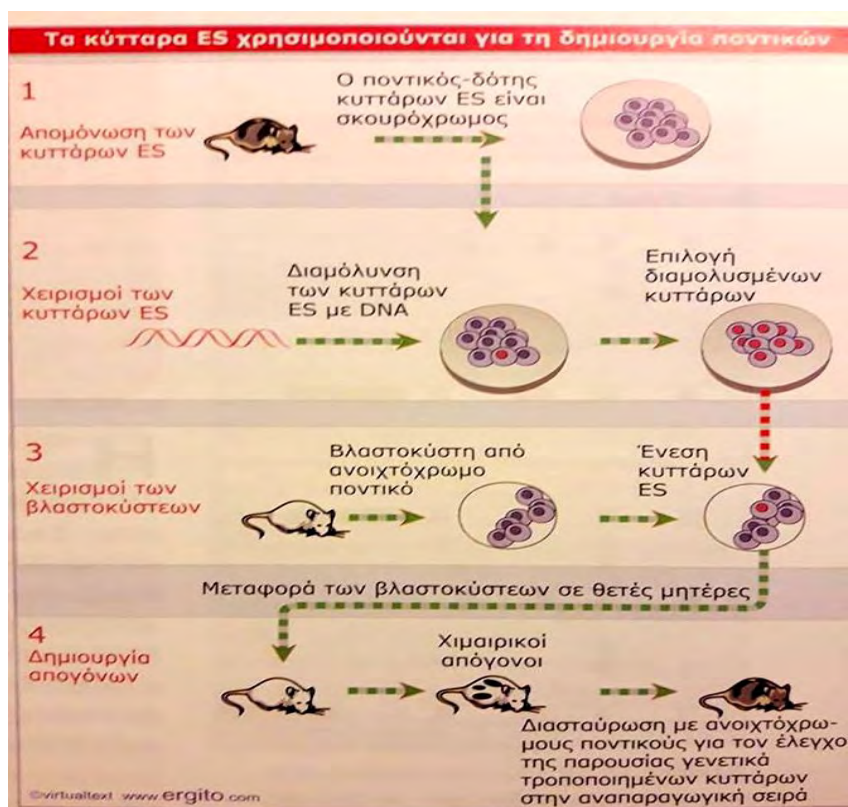
1.2 Ανάγκη δημιουργίας ποντικών knockout

Η διαδικασία στόχευσης γονιδίων παρέχει ένα μέσο τροποποίησης ενός συγκεκριμένου γονιδίου για να διευκρινιστεί καλύτερα ο βιολογικός του ρόλος (Bradford Hall et al., 2010). Ενώ, λοιπόν, η στόχευση γονιδίων είναι ένας άμεσος τρόπος να διαταραχθεί το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ενός γονιδίου και να εμποδιστεί η έκφρασή του σε έναν ποντικό, η απενεργοποίηση γονιδίων είναι ο καλύτερος τρόπος για να οριοθετηθεί ο βιολογικός ρόλος μιας πρωτεΐνης (Iredale, 1999). Ο ποντικός knockout υπήρξε ένα πολύτιμο εργαλείο έτσι ώστε οι γενετιστές να διακρίνουν το ρόλο ενός γονιδίου στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και στη φυσιολογική ομοίωση (Vogel G., 2007). Τα ποντικά δρουν ως καλό ανάλογο για τις περισσότερες ανθρώπινες βιολογικές διαδικασίες, καθώς και τα δύο είδη μοιράζονται περίπου το 99% των γονιδίων (Caracchi, 1994). Επιπλέον, τα ποντικά είναι χρήσιμα πειραματόζωα επειδή είναι μικρά, έχουν σχετικά σύντομη διάρκεια ζωής και είναι παραγωγικά. Έτσι, για τους γενετιστές, η στοχευμένη αφαίρεση ενός γονιδίου σε ένα ποντίκι παρέχει ένα σημαντικό μέσο για τον προσδιορισμό του βιολογικού ρόλου ενός γενετικού αλληλομόρφου. Ενώ είναι χρήσιμο να μελετηθεί η *in vivo* γονιδιακή λειτουργία, μερικοί ποντικοί knockout έχουν επιπλέον χρησιμεύσει ως πολύτιμα ζωικά μοντέλα για ανθρώπινες γενετικές ασθένειες. Όταν μία ανθρώπινη μετάλλαξη καθιστά ανίκανη τη λειτουργικότητα μιας πρωτεΐνης, ο αντίστοιχος ποντικός

knockout μπορεί να είναι ένα σημαντικό εργαλείο για να μελετηθεί η υποκείμενη παθοφυσιολογία και να αναπτυχθούν θεραπείες για μια γενετική νόσο (Majzoub & Muglia, 1996). Επιπλέον, οι φαρμακευτικές εταιρείες λαμβάνουν ενδείξεις σχετικά με την αναστολή της λειτουργίας μιας πρωτεΐνης εξετάζοντας πρώτα τον φαινότυπο ενός ποντικού knockout (Zambrowicz & Sands, 2003). Έτσι, οι ποντικοί knockout μπορούν να δώσουν μια εικόνα για τον φυσιολογικό ρόλο ενός γονιδίου στους ανθρώπους.

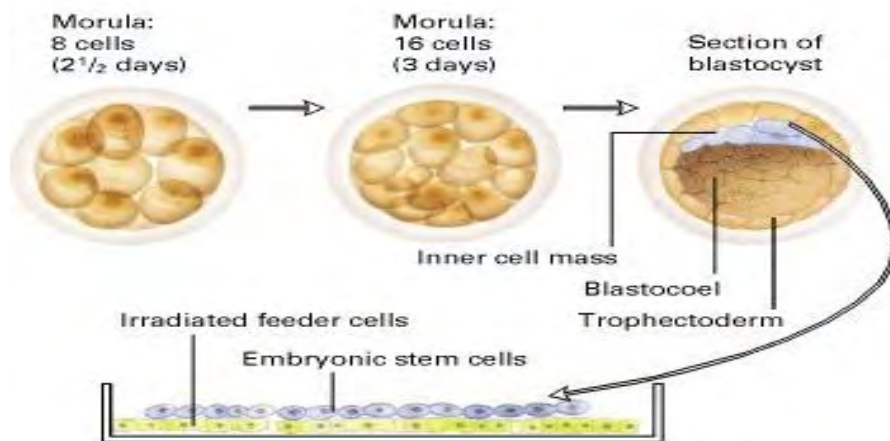
1.2.1 Δημιουργία ποντικών knockout

Η κατευθυνόμενη γονιδιακή στόχευση έχει εφαρμοστεί με μεγάλη επιτυχία τις τελευταίες δύο δεκαετίες στον ποντικό και προκαλεί την αντικατάσταση ενός ενδογενούς γονιδίου από ένα εξωγενές που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη (Caracchi MR, 2005). Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνεται με ομόλογο ανασυνδυασμό σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ES) (Torres R.M., et al., 1997), τα οποία προέρχονται από τη βλαστοκύστη του ποντικού (Ε. Ντούνη, *Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας*, 2009) (ένα πρώιμο στάδιο ανάπτυξης που προηγείται της εμφύτευσης του εμβρύου στη μήτρα) και όχι τυχαία ενσωμάτωση. Στην Εικόνα 1.9 παρουσιάζονται συνοπτικά τα στάδια που ακολουθούνται για τη δημιουργία ενός ποντικού knockout.



Εικόνα 1.9: Η διαδικασία δημιουργίας ποντικών knockout (Benjamin L., *Genes VIII*, 2004)

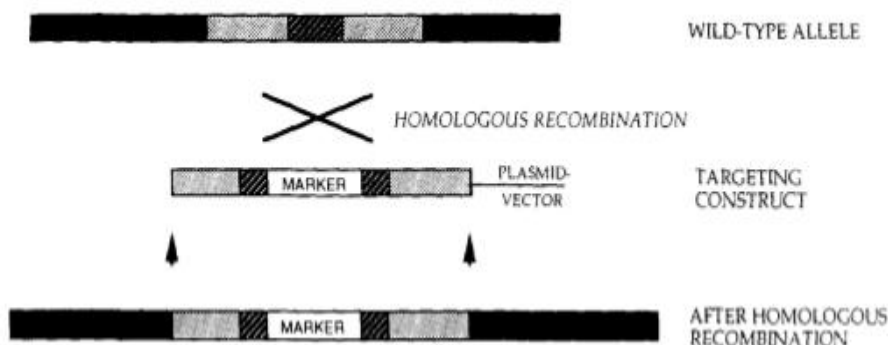
1. Αρχικά, απομονώνονται κύτταρα ES από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης του ποντικού, δηλαδή του εμβρύου 3,5 ημερών. Η βλαστοκύστη μπορεί να διακριθεί σε δύο ξεχωριστά μέρη: την εξωτερική επιφάνεια (τροφοεξώδερμα) απ' όπου προέρχονται οι μεμβράνες που περιβάλλουν το έμβρυο και την εσωτερική κυτταρική μάζα από την οποία προέρχονται τα κύτταρα που συνιστούν το έμβρυο. Τα βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από το έμβρυο μπορούν να καλλιεργηθούν και υπό ειδικές συνθήκες να παραμείνουν αδιαφοροποίητα και διπλοειδή. Έτσι, εάν εισαχθούν σε άλλες βλαστοκύστες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων, ακόμα και κυττάρων της γαμετικής σειράς. Αυτό γίνεται γιατί στην περίπτωση του ποντικού (Suckow MA et al., 2001) δεν είναι επιθυμητό απλά ένα μεταλλαγμένο κύτταρο, αλλά ένας ολόκληρος μεταλλαγμένος οργανισμός, εφόσον η πλήρης εκτίμηση των επιπτώσεων που μπορεί να έχει στο φαινότυπο η αδρανοποίηση γονιδίων είναι εφικτή μόνο με ολόκληρο τον ποντικό (Ε. Ντούνη, *Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας*, 2009).



Εικόνα 1.10: Στο στάδιο των 4 1/2 ημερών φαίνεται πως αρχίζει ο σχηματισμός της βλαστοκύστης που περιβάλλει μία εσωτερική κοιλότητα τη βλαστοκοιλία, απ' την οποία θα προέλθουν τα κύτταρα ES. Επίσης, στην εικόνα φαίνεται και το τροφοεξώδερμα (Harvey Lodish et al., *Molecular Cell Biology*, 2000)

2. Το κύριο εργαλείο για την τεχνική αδρανοποίησης γονιδίων ποντικών μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού που χρησιμοποιείται στη συνέχεια είναι μία γονιδιακή κατασκευή η οποία ονομάζεται «κασέτα διαγραφής» και περιλαμβάνει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Αυτό το γονίδιο δεν είναι κανονικό συστατικό του γονιδιώματος του ποντικού, αλλά θα λειτουργήσει αν μεταφερθεί σ' ένα χρωμόσωμά του, αποδίδοντας ένα μετασχηματισμένο κύτταρο ποντικού, ανθεκτικό στο παραπάνω αντιβιοτικό, π.χ. στη νεομυκίνη. Προτού χρησιμοποιηθεί η κασέτα διαγραφής, σε κάθε άκρο της προσκολλώνται νέα τμήματα DNA. Αυτά τα τμήματα έχουν αλληλουχίες ταυτόσημες με περιοχές του γονιδίου που πρόκειται να αδρανοποιηθεί. Όταν η τροποποιημένη κασέτα εισαχθεί σ' ένα κύτταρο ποντικού, θα πραγματοποιηθεί ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ των

βραχιόνων DNA και του χρωμοσωμικού αντιγράφου του γονιδίου του ποντικού (Pasparakis M., et al., 1996), οδηγώντας σε αντικατάσταση του τελευταίου από το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό (Collins FS et al., 2007). Συνεπώς, τα κύτταρα που έχουν υποστεί την αντικατάσταση επιλέγονται μέσα σε μέσο το οποίο περιέχει νεομυκίνη. Οι αποικίες που προκύπτουν δε διαθέτουν το γονίδιο στόχο και από την εξέταση των φαινοτύπων τους μπορεί να προκύψουν ενδείξεις για τη λειτουργία του γονιδίου (Ε. Ντούνη, *Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας*, 2009).



Εικόνα 1.11: Χρήση του ομόλογου ανασυνδυασμού για την ένθεση της «κασέτας διαγραφής» που περιλαμβάνει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην νεομυκίνη (L.A. Galli-Taliadoros a. et al., 1995).

3. Στη συνέχεια, εφόσον υπάρχουν τόσο τα κύτταρα ES όσο και την απαραίτητη γονιδιακή κατασκευή, η δεύτερη θα εισαχθεί σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα με την τεχνική του ηλεκτροπαλμού προκειμένου η στόχευση του γονιδίου να επιτευχθεί σε όλα τα κύτταρα του ποντικού (Bradley A. et al., 2012). Έτσι, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η γονιδιακή κατασκευή θα είναι ικανή να αντικαταστήσει το ενδογενές γονίδιο μέσω του φαινομένου του ομόλογου ανασυνδυασμού (Ε. Ντούνη, *Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας*, 2009).
4. Έπειτα, παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών (neo) τα περισσότερα κύτταρα πεθαίνουν λόγω της μη πρόσληψης ξένου DNA. Από κάθε κύτταρο που επιβιώνει δημιουργείται μια αποικία που απομονώνεται και καλλιεργείται έτσι ώστε να παραχθούν αρκετά κύτταρα της ίδιας γενετικής σύστασης προκειμένου να ελεγχθεί ο ανασυνδυασμός. Ένας εναλλακτικός τρόπος για να διαπιστωθεί η επιτυχής ενσωμάτωση του εξωγενούς DNA στα διαμολυσμένα κύτταρα ES είναι να χρησιμοποιηθεί η τεχνολογία PCR ή ανάλυση κατά Southern (Benjamin L., *Genes VIII*, 2004). Μ' αυτόν τον τρόπο δημιουργείται τελικά ένας πληθυσμός κυττάρων ES τα οποία, σε ένα μεγάλο ποσοστό, φέρουν την αλληλουχία του εξωγενούς DNA (Ε. Ντούνη, *Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας*, 2009).
5. Αυτά τα κύτταρα ES ενίονται σε βλαστοκύστες- δέκτες.
6. Η μεταφορά των βλαστοκύστεων αυτών σε θετές μητέρες καθιστά δυνατή τη δημιουργία χμαιρικών απογόνων, που θα φέρουν δηλαδή κύτταρα τόσο από τη

βλαστοκύστη όσο και από τα τροποποιημένα κύτταρα ES (Ε. Ντούνη, *Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας*, 2009).

7. Ορισμένοι απ' τους ιστούς του χμιαρικού ποντικού προέρχονται από τα κύτταρα της βλαστοκύστης-δέκτη, ενώ οι υπόλοιποι ιστοί προέρχονται από τα κύτταρα ES που ενέθηκαν σ' αυτήν (Cotton LM et al., 2015). Στον ενήλικο ποντικό, η αναλογία των ιστών που προέρχονται από τα κύτταρα της βλαστοκύστης-δέκτη σε σχέση με αυτούς που προέρχονται από τα χορηγηθέντα κύτταρα ES ποικίλλει μεταξύ των απογόνων. Εάν τα κύτταρα ES που χρησιμοποιούνται φέρουν κάποιον ορατό δείκτη, τότε μπορούν εύκολα να διακριθούν οι περιοχές που έχουν προέλθει από καθέναν από τους δύο τύπους κυττάρων ES (Ε. Ντούνη, *Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας*, 2009).

8. Για να διαπιστωθεί, λοιπόν, η συνεισφορά των κυττάρων ES στη γαμετική σειρά, κάθε χμιαρικός ποντικός διασταυρώνεται με έναν ποντικό αγρίου τύπου (James L. J. Coleman et al., 2015). Εάν τα κύτταρα ES που φέρουν το εξωγενές DNA έχουν συνεισφέρει και στη γαμετική σειρά, τότε από τη διασταύρωση αυτή μερικοί απόγονοι θα είναι ετερόζυγοι για το αλληλόμορφο knockout (*Εικόνα 1.12*) (Rodriguez CI et al., 2000). Αυτοί οι ποντικοί ονομάζονται «floxed» ή «tm1c». Ιδανικά, ο φορέας μεταφοράς του εξωγενούς DNA μπορεί να απομακρυνθεί με διασταύρωση των «tm1a» με διαγονιδιακά ποντίκια C57BL/6J που εκφράζουν τη ρεκομπινάση FLPJ (Rodriguez CI et al., 2000). Οι ποντικοί tm1c είναι ουσιαστικά αγρίου τύπου καθώς η μόνη διαφορά του αλληλομόρφου τους με το αλληλόμορφο αγρίου τύπου είναι οι περιοχές loxP που πλαισιώνουν το εξόνιο 5 (Brennan K., 2011).



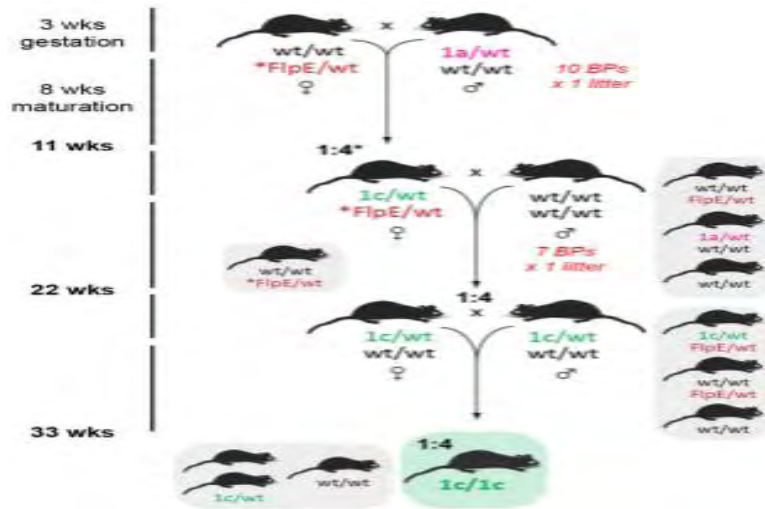
Εικόνα 1.12: *Επέκταση της αρχικής αποικίας των ποντικών ιδρυτών (James L. J. Coleman et al., 2015)*

9. Από τη διασταύρωση αυτών των ετερόζυγων ποντικών μεταξύ τους θα προκύψουν με αναλογία 25% ποντικοί ομόζυγοι για το αλληλόμορφο knockout, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 1.13* (James L. J. Coleman et al., 2015), που θα έχουν επομένως προέλθει από τα διαμολυσμένα κύτταρα ES.

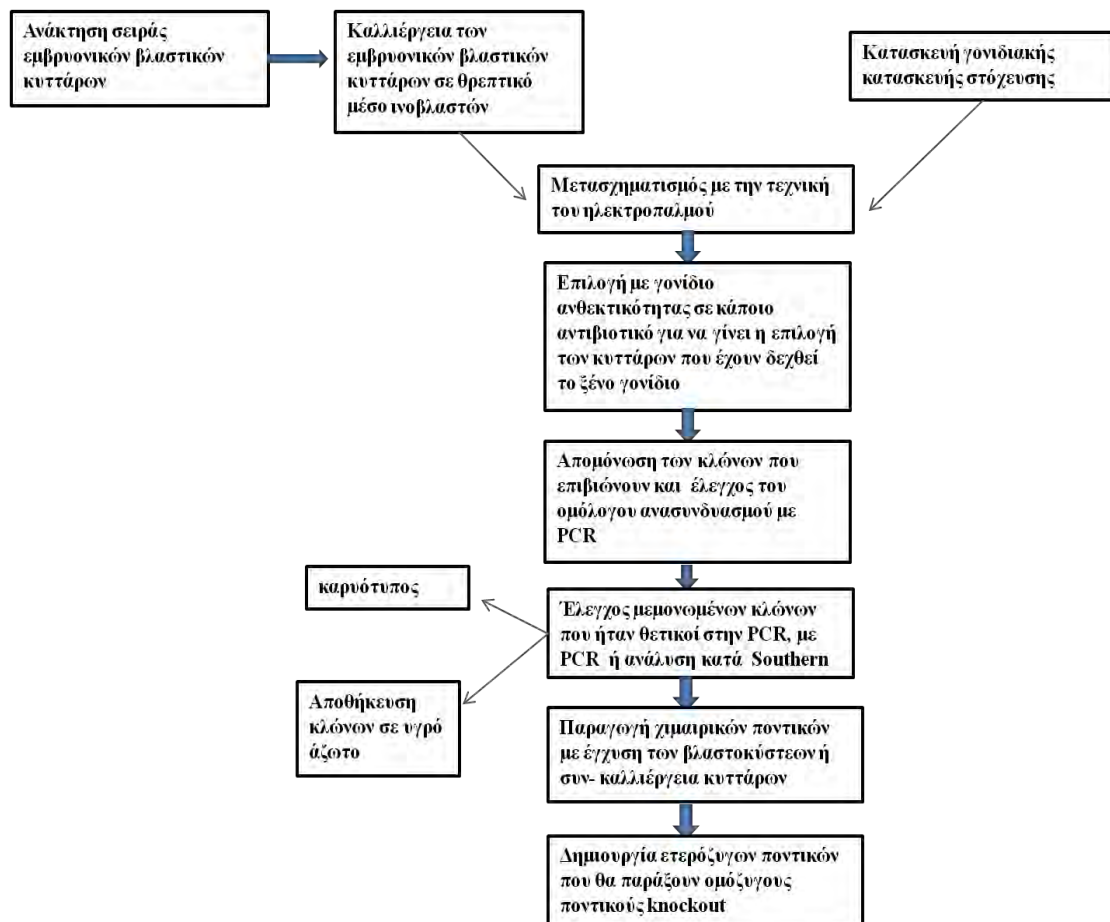
1.2.2 Γονιδιακή κατασκευή για τη δημιουργία ποντικών knockout για το γονίδιο *FRA10AC1*

Με σκοπό τη συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου δημιουργήθηκε ένα ζωικό μοντέλο ενός ποντικού knockout με απαλοιφή του γονιδίου *Fra10ac1*. Στην *Εικόνα*

1.16 φαίνεται η γονιδιακή κασέτα που χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να δημιουργηθούν τα knockout ποντίκια για το γονίδιο *Fra10a1* (Εικόνα 1.16)

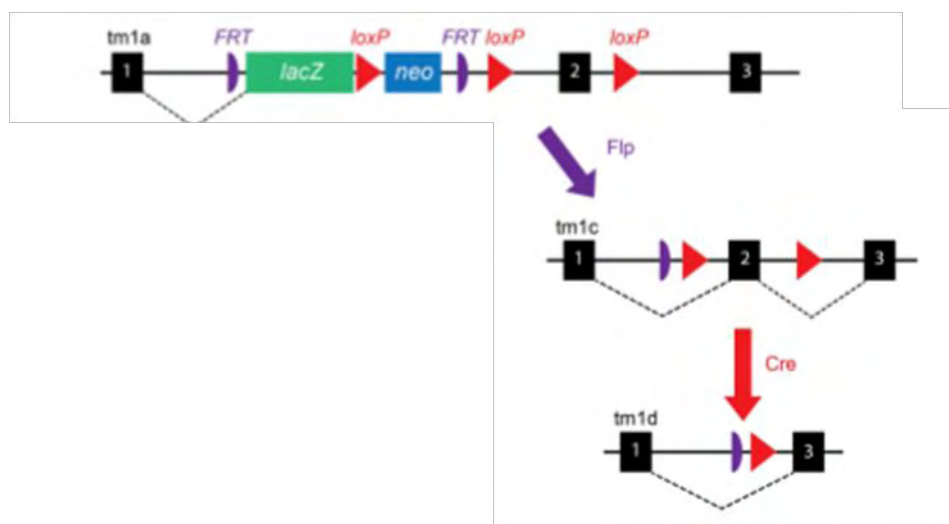


Εικόνα 1.13: Παραγωγή της γενιάς των ποντικών knockout (James L. J. Coleman et al., 2015).



Εικόνα 1.14: Σχηματική απεικόνιση των διαδικασιών που επιτελούνται για την παραγωγή μεταλλαγμένων ποντικών που έχουν υποστεί στοχευμένη αφαίρεση γονιδίου. (L.A. Galli-Taliadoros *a. et al.*, 1995)

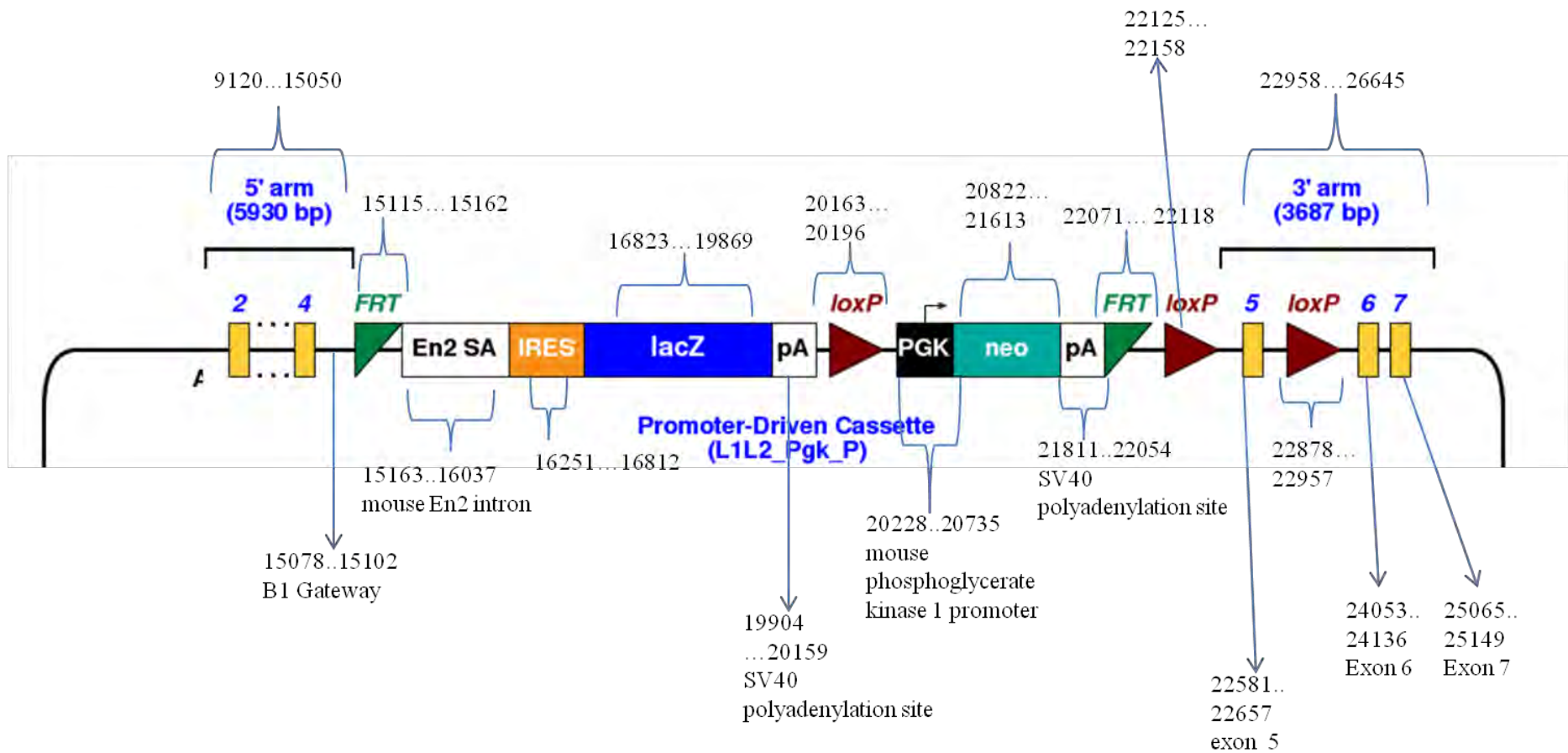
(<https://www.mousephenotype.org/data/search/allele2?kw=%22FRA10Ac1%22#order2>). Οι **βραχίονες 5'** και **3'** είναι ομόλογες περιοχές η οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τον ομόλογο ανασυνδυασμό και την ένθεση του εξωγενούς γονιδίου στη θέση του ενδογενούς. Υπάρχουν δύο **περιοχές FRT** στην γονιδιωματική κατασκευή οι οποίες αναγνωρίζονται από μια τοποειδική ρεκομπινάση, την FLP κι έτσι καταλύεται ο ανασυνδυασμός ανάμεσα σε αυτές τις ειδικές θέσεις. Η περιοχή **IRES** είναι ένα ρυθμιστικό στοιχείο έκφρασης και βρίσκεται πριν το **γονίδιο lacZ**. Επιπρόσθετα, οι **περιοχές loxP** είναι αλληλουχίες DNA ανάμεσα στις οποίες το ένζυμο ρεκομπινάση Cre (Nagy *et al.*, 2000) έχει την ικανότητα να καταλύει ανασυνδυασμό, αφαιρώντας το τμήμα του DNA που εμπεριέχεται σε αυτές. Υπάρχουν τρεις τέτοιες αλληλουχίες στη συγκεκριμένη κατασκευή, μία πριν την κασέτα ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη και δύο που πλαισιώνουν το εξόνιο 5. Τέλος, η **neomycin-resistance selection cassette** είναι μία κασέτα που περιλαμβάνει ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη και διευκολύνει την *in vitro* επιλογή των ανασυνδυασμένων κυττάρων ES. Το στέλεχος του ποντικού που δημιουργήθηκε με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία ονομάζεται *tm1a* (targeted mutation 1a) (James L. J. Coleman *et al.*, 2015) και περιλαμβάνει τόσο την κασέτα ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη όσο και το γονίδιο *lacZ* (Εικόνα 1.15).



Εικόνα 1.15: Ποντίκια *knockout tm1a* και *tm1c* (James L. J. Coleman *et al.*, 2015).

1.3 ΣΚΟΠΟΣ

Η εργασία ανήκει στη γενικότερη προσπάθεια κατανόησης της λειτουργίας του γονιδίου *FRA10AC1* του ανθρώπου και της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Το *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην εύθραυστη χρωμοσωμική θέση *FRA10A* στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23.3, η οποία ίσως συσχετίζεται με φαινότυπο ήπιας νοητικής υστέρησης για τα άτομα φορείς, που είναι δηλαδή ετερόζυγα για αυτήν. Με σκοπό τη συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου δημιουργήθηκε ένα ζωικό μοντέλο ενός ποντικού knockout με απαλοιφή του ορθόλογου γονιδίου *Fra10ac1*. Το ποντίκι knockout έπρεπε, στη συνέχεια, να διασταυρωθεί με ποντίκια αγρίου τύπου, τόσο για να μελετηθούν και οι ετερόζυγοι ποντικοί-φορείς όσο και γιατί ήταν απαραίτητη η δημιουργία αρκετών ποντικών knockout ώστε να μεγαλώσουν οι αποικίες και να μπορούν να διενεργηθούν οι απαραίτητες δοκιμασίες συμπεριφοράς. Στην παρούσα εργασία έγινε γονοτύπηση δειγμάτων που προέρχονται από διασταυρώσεις ετερόζυγων ποντικών για το αλληλόμορφο knockout με ποντικούς αγρίου τύπου. Οι ετερόζυγοι ποντικοί είναι σημαντικό να μελετηθούν διότι προσομοιάζουν την αντίστοιχη κατάσταση που επικρατεί στον άνθρωπο. Ως άμεση συνέπεια αυτού του γεγονότος, σκοπό αποτελεί η γονοτύπηση, δηλαδή ο έλεγχος του DNA των ποντικών προκειμένου να διαπιστωθεί εάν πρόκειται για ποντίκια ετερόζυγα ή αγρίου τύπου. Το γεγονός αυτό μπορεί να ελεγχθεί μέσω διεξαγωγής μιας σειράς PCR και οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων τους με ηλεκτροφορήσεις σε πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 1.16: Η δομή της γονιδιακής κασέτας που εισάγεται στα κύτταρα του ποντικού προκειμένου να πραγματοποιηθεί η γονιδιακή σίγηση (<https://www.mousephenotype.org/data/search/allele2?kw=%22FRA10Ac1%22#order2>)

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απομόνωση ολικού DNA από ιστό

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι απομόνωσης DNA. Η πιο κλασική από αυτές βασίζεται στην εξής αρχή: Αρχικά, πραγματοποιείται ομογενοποίηση του ιστού, κατά την οποία σπάνε μηχανικά οι πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων και αρκετές από τις πυρηνικές. Στη συνέχεια, γίνεται επώαση με πρωτεΐνάση K σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει μεταξύ άλλων: α) Tris base, το οποίο ρυθμίζει το pH, β) SDS, ένα ανιονικό απορρυπαντικό που αφενός βοηθάει στη διάσπαση των μεμβρανών και αφετέρου αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες και γ) EDTA (αιθυλενο- διαμινο- τετραοξικό οξύ), μία χειλική ένωση που δεσμεύει δισθενή ιόντα που είναι απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών. Η επώαση με πρωτεΐνάση K γίνεται στους 55°C. Ακολουθούν διαδοχικές εκχυλίσεις με τους οργανικούς διαλύτες φαινόλη και χλωροφόρμιο για να απομακρυνθούν τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες από το ομογενοποίημα. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και το διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH>7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην υπερκείμενη φάση.

Το χλωροφόρμιο βοηθάει στον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων και συμβάλλει

στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδατική φάση. Οι εκχυλίσεις σταματάνε όταν η μεσόφαση είναι πλέον «καθαρή». Η υπερκείμενη φάση (πολική) περιέχει DNA και RNA. Το RNA μπορεί να απομακρυνθεί με επώαση με RNAase στους 37°C, η οποία μπορεί, στη συνέχεια, να απομακρυνθεί με τη σειρά της με εκχυλίσεις με φαινόλη και χλωροφόρμιο. Το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης ή με αιθανόλη (τελικής συγκέντρωσης 70%)- γιατί είναι αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες- η οποία παρουσία άλατος που υπήρχε στο αρχικό διάλυμα της πρωτεϊνάσης μειώνει τη διαλυτότητα του DNA και στη συνέχεια απομονώνεται με φυγοκέντρηση. Εναλλακτικά, μπορεί να προστεθεί οξικό νάτριο για τη ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης του κυττάρου και τη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών προκειμένου να γίνει κατακρήμιση του DNA. Για να καθαριστεί το DNA από υπόλοιπα αλάτων ξεπλένεται με 70% παγωμένη αιθανόλη. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται συνήθως σε διάλυμα Tris-EDTA pH 8,00 (10 mM Tris -1 mM EDTA) ή σε H₂O που χρησιμοποιείται για τη συντήρηση του DNA για μεγάλο χρονικό διάστημα (Budwole B. et al., 1990).

Στο συγκεκριμένο πείραμα απομονώθηκε ολικό DNA από ιστό ποντικών. Τα δείγματα ήταν ήδη ομογενοποιημένα και είχαν επωαστεί με πρωτεΐνάση, έτσι ώστε να γίνει απομάκρυνση των υπολειμμάτων του ιστού ουράς (πάχους περίπου 1 mm). Τα δείγματα στάλθηκαν από το εργαστήριο του Δρ. Απόστολου Κλινάκη στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών όπου πραγματοποιούνται και όλες οι διασταυρώσεις των ζώων.

2.1.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA :

1. Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 2-3 min.
2. Επειδή τα δείγματα ήταν πολύ ιξώδη λόγω αυξημένης συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε μέρος του δείγματος (50 από τα 150 μl), το οποίο ρυθμίστηκε στα 400 μl με H₂O.
3. Προσθήκη 200 μl φαινόλης και 200 μl χλωροφορμίου.
4. Ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 10 min.
5. Συλλογή υπερκειμένου και διαδοχικές εκχυλίσσεις με φαινόλη και χλωροφόρμιο με όγκο ίσο με αυτό του δείγματος. Η παραπάνω διαδικασία - βήματα 3,4 και 5- επαναλαμβάνεται όσες φορές χρειαστεί μέχρι να παρατηρηθεί «καθαρή» μεσόφαση, γεγονός το οποίο εξαρτάται από την ποιότητα των δειγμάτων.
6. Προσθήκη οξικού νατρίου (σε όγκο ίσο με το 1/10 του αρχικού όγκου του υπερκειμένου) για τη δημιουργία διακριτού ιζήματος.
7. Προσθήκη αιθανόλης σε όγκο 2,5 φορές του όγκου του δείγματος.
8. Ανάδευση και μεταφορά των δειγμάτων στους -80 °C για 15 min.
9. Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 20 min για κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων.
10. Αφαίρεση της αιθανόλης και ξέπλυμα των ιζημάτων με αιθανόλη 70% (200-500 μl).
11. Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 10 min.
12. Αφαίρεση της αιθανόλης και επώαση στους 55-60 °C μέχρις ότου εξατμιστούν όλα τα υπολείμματα αιθανόλης.
13. Επαναδιαλυτοποίηση σε 30-50 μl H₂O

2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός DNA

Η ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των δειγμάτων DNA έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (πολυσακχαρίτης που παράγεται από φύκη) είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού, χαρακτηρισμού και απομόνωσης τμημάτων DNA κι αυτό γιατί είναι απλή, γρήγορη στην εφαρμογή και αρκετά ευαίσθητη (Μαθιόπουλος Κ. et al., *Φυλλάδιο Εργαστηριακών Ασκήσεων Μοριακής Βιολογίας I*, 2014). Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε τόσο για τον έλεγχο της ποιότητας και ποσότητας του DNA των δειγμάτων μετά από την πραγματοποίηση απομόνωσης, όσο και για τον έλεγχο της PCR.

Πιο αναλυτικά, τα νουκλεϊκά οξέα κινούνται στο πήκτωμα αгарόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Συγκεκριμένα, τα νουκλεϊκά οξέα τα οποία είναι φορτισμένα αρνητικά σε ουδέτερο pH λόγω των φωσφορικών ομάδων, κινούνται προς την άνοδο (θετικός πόλος) με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθός τους (τα μόρια μικρότερου μεγέθους κινούνται ταχύτερα από τα μόρια μεγαλύτερου μεγέθους). Ο ρυθμός μετακίνησης

εξαρτάται και από διάφορους άλλους παράγοντες, όπως η διαμόρφωση του μορίου, η θερμοκρασία, το είδος του χρησιμοποιούμενου μέσου, η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος και το μέγεθος της εφαρμοζόμενης τάσης.

Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα διαφορετικά μόρια DNA καθώς μετακινούνται σχηματίζουν χαρακτηριστικές ζώνες σε διαφορετικές περιοχές του πηκτώματος, ανάλογα με την κινητικότητα τους. Δηλαδή, με την ηλεκτροφόρηση επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός ενός μίγματος γραμμικών μορίων DNA σε ζώνες. Οι ζώνες δεν είναι ορατές κατά την πορεία της ηλεκτροφόρησης, γίνονται όμως ορατές με προσθήκη στο πήκτωμα μιας χρωστικής που δεσμεύεται στο DNA και φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα προέρχεται από την εταιρεία: SERVA Electrophoresis GmbH.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται και για τον αδρό ποσοτικό προσδιορισμό δειγμάτων DNA σε σχέση με κάποιον ποσοτικοποιημένο μάρτυρα (Ladder), ο οποίος περιέχει τμήματα DNA γνωστού μεγέθους και συγκέντρωσης. Έτσι, μέσω της σύγκρισης του φθορισμού που εκπέμπεται από το άγνωστο δείγμα με το φθορισμό που εκπέμπει το δείγμα γνωστής συγκέντρωσης και μεγέθους (σύγκριση της έντασης της ζώνης του υπό εξέταση μορίου DNA σε σχέση με την ένταση των ζωνών του DNA αναφοράς), επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση του άγνωστου δείγματος.

2.2.1 Κατασκευή πηκτώματος αγαρόζης

1. Χρήση πηκτωμάτων αγαρόζης με συγκεντρώσεις από 1-2% ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που έπρεπε να διαχωριστούν, με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x, το οποίο συνίστατο από: Tris Base 2.42 gr, Ακετικό οξύ 0.57 ml, EDTA 0.5 M 1 ml και ddH₂O έως τα 10 ml.
2. Θέρμανση του διαλύματος της αγαρόζης και του TAE 1x σε φούρνο μικροκυμάτων σε μέτρια έως υψηλή ισχύ έως ότου η αγαρόζη διαλυθεί πλήρως.
3. Απόκτηση θερμοκρασίας δωματίου για την αγαρόζη και προσθήκη χρωστικής (1-2 μl) η οποία είναι της εταιρείας SERVA Electrophoresis GmbH. Ανάδευση του διαλύματος για πλήρη ανάμιξη με τη χρωστική.
4. Τοποθέτηση του διαλύματος της αγαρόζης στο κατάλληλα συναρμολογημένο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης (το οποίο περιέχει χτενάκι για τη δημιουργία πηγαδιών όπου θα τοποθετηθούν αρχικά τα δείγματα προκειμένου να ηλεκτροφορηθούν) και στερεοποίηση μετά από χρόνο αναμονής περίπου 20 min.
5. Προσεκτική αφαίρεση της χτένας για να παραμείνουν ανέπαφα τα πηγάδια και τοποθέτηση των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων.
6. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει διάλυμα TAE 1x και πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης περίπου στα 100 volts, ανάλογα με το μέγεθος της συσκευής που χρησιμοποιείται.
7. Στα δείγματα DNA που θα ηλεκτροφορηθούν προστίθεται κατάλληλος όγκος διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer), το οποίο έχει υποστεί αραιώση 6x. Το διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) έχει την εξής σύσταση: μπλε της

βρωμοφαινόλης 1ml 1% w/v, γλυκερόλη 5ml, TBE 20x 0,5ml και ddH₂O έως τα 10ml. Το κυανό της βρωμοφαινόλης καθιστά ορατά τα δείγματα τα οποία διαφορετικά θα ήταν διάφανα και συνεπώς μη ορατά. Επιπλέον, η γλυκερόλη βοηθά το δείγμα να «βυθίζεται» στον πυθμένα των πηγαδιών του πηκτώματος.

2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (polymerase chain reaction- PCR)

Η PCR είναι ίσως η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος της μοριακής βιολογίας, με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο. Ανακαλύφθηκε το 1983 από το βιοχημικό Karry Mullis (Mullis, K.B., 1990). Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων DNA *in vitro*. Η PCR βασίζεται στη χρήση της ικανότητας της DNA πολυμεράσης να συνθέτει ένα νέο κλώνο DNA συμπληρωματικό προς τον υπάρχοντα πρότυπο κλώνο. Επειδή η DNA πολυμεράση μπορεί να προσθέσει ένα νουκλεοτίδιο μόνο σε μια προϋπάρχουσα 3'-OH ομάδα, χρειάζεται ένας εκκινητής στον οποίο μπορεί να προστεθεί το πρώτο νουκλεοτίδιο. Έτσι, οριοθετείται μια συγκεκριμένη αλληλουχία την οποία ο ερευνητής θέλει να ενισχύσει. Στο τέλος της PCR, η συγκεκριμένη αλληλουχία θα συσσωρευτεί σε δισεκατομμύρια αντίγραφα, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς, όπως η ηλεκτροφόρηση, η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η αλληλούχηση κ.ά. Η PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά:

1. Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA αποδιάσσονται με θέρμανση σε θερμοκρασία 95° C για περίπου 15 sec έως 1 min. Προηγούμενως υπάρχει και ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης περίπου 5 min .
2. Υβριδοποίηση εκκινητών: Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 40 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.
3. Επιμήκυνση: Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται συνήθως 35 φορές.

Η PCR πραγματοποιείται στο θερμικό κυκλοποιητή, που είναι μία συσκευή, η οποία μπορεί να ρυθμίσει την επιθυμητή θερμοκρασία, τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους. Τα βασικά συστατικά για μία PCR, όπως παρουσιάζονται και στον Πίνακα 2 είναι: η DNA Taq πολυμεράση, εκκινητές, DNA /αλληλουχία-

στόχος, ρυθμιστικό διάλυμα, Mg^{+} (εάν δεν περιέχεται ήδη στο ρυθμιστικό διάλυμα) και τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs). Οι εκκινητές της αντίδρασης προσδιορίζουν το ακριβές προϊόν DNA που πρόκειται να ενισχυθεί και είναι ολιγονουκλεοτίδια DNA με αλληλουχία συμπληρωματική προς το DNA στόχο που πρόκειται να ενισχυθεί. Αυτά χρησιμεύουν ως σημείο επέκτασης για τον πολυμερισμό της DNA πολυμεράσης. Συνεπώς, η αποτελεσματικότητα της PCR εξαρτάται από τα παραπάνω συστατικά καθώς και από άλλους παράγοντες όπως: η θερμοκρασία και η διάρκεια των κύκλων.

Στην παρούσα εργασία, η PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση αλληλουχιών DNA, που απομονώθηκαν από ιστό ποντικού με σκοπό τη γονοτύπηση ποντικών knockout για το γονίδιο *Fra10ac1*. Πιο συγκεκριμένα, για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι ήταν ειδικά σχεδιασμένοι έτσι ώστε να αναγνωρίζουν συμπληρωματικά αλληλουχίες του γονιδίου *Fra10ac1* και να το ενισχύουν. Ειδικότερα, ο εμπρόσθιος εκκινητής F_1' έχει αλληλουχία 5'- GTG TTT TAT TTT TGA AAC CTT AAT GTT C -3' και υβριδοποιείται στα 28 νουκλεοτίδια 8142- 8169 της αλληλουχίας με κωδικό καταχώρησης XM_006527335.3 και ο ανάστροφος R_1' 5'- GTC ATC TGA ATC CTA TGT CAA GTG -3' στα 24 νουκλεοτίδια 9005- 9028 της ίδιας αλληλουχίας και πραγματοποιούν την ενίσχυση μίας αλληλουχίας μεγέθους 886bp στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου (w/t). Ενώ, για την ενίσχυση της αλληλουχίας των ετερόζυγων ποντικών χρησιμοποιείται πάλι ο εμπρόσθιος εκκινητής F_1' με την ίδια αλληλουχία όπως περιγράφηκε παραπάνω και υβριδοποιείται πάλι στα 28 νουκλεοτίδια 15021-15048, της αλληλουχίας με κωδικό καταχώρησης IN957884.1, αυτή τη φορά όμως, με τον ανάστροφο εκκινητή LAR3' με αλληλουχία 5'- CAC AAC GGG TTC TTC TGT TAG TCC -3' ο οποίος υβριδοποιείται στα 24 νουκλεοτίδια 15231- 15254 της ίδιας αλληλουχίας και πραγματοποιούν την ενίσχυση μιας αλληλουχίας μεγέθους 233bp που αφορά το αλληλόμορφο knockout. Όλοι οι εκκινητές συντέθηκαν από την εταιρεία Eurofins Genomics. Οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης των εκκινητών είναι $T_m=59^{\circ}C$ για το ζεύγος εκκινητών που αφορά το αλληλόμορφο αγρίου τύπου και $T_m=58^{\circ}C$ για το ζεύγος εκκινητών που αφορά το knockout αλληλόμορφο. Γενικά, όταν πρέπει να πραγματοποιηθούν πολλές αντιδράσεις ταυτόχρονα, κατασκευάζονται MIX, που περιλαμβάνουν όλα τα συστατικά της PCR εκτός από το DNA που προστίθεται σε κάθε δείγμα ξεχωριστά προκειμένου να απλοποιηθεί η διαδικασία. Συνεπώς, κατασκευάστηκαν δύο MIX. Το MIX A περιείχε τους εκκινητές που αναγνωρίζουν και υβριδοποιούν τα αλληλόμορφα αγρίου τύπου (δηλαδή τους F_1' και R_1'), ενώ το MIX B περιείχε τους εκκινητές που υβριδοποιούν το αλληλόμορφο knockout (δηλαδή τους F_1' και LAR3). Κατά την προετοιμασία μίας PCR χρησιμοποιούνται περίπου 50- 200 ng από κάθε δείγμα που αντιστοιχούν σε 1- 6 μl DNA (στις περιπτώσεις που το DNA ήταν αρκετά ιξώδες και χρειαζόταν προσθήκη μικρότερης ποσότητας από τα υπόλοιπα δείγματα τις αντίδρασης, πραγματοποιούνταν προσθήκη H_2O έτσι ώστε όλα τα δείγματα να είναι ισόποσα και να απαιτείται ισόποση προσθήκη από το MIX). Τέλος, ανάλογα με την ποσότητα DNA που υπήρχε στο δείγμα γινόταν τόση

προσθήκη από το MIX ώστε ο συνολικός όγκος κάθε δείγματος να είναι 25 µl όπως είχε καθοριστεί.

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ήταν οι εξής:

- Αρχική αποδιάταξη: 95° C για 4 min
- Αποδιάταξη: 95° C για 30 sec
- Υβριδοποίηση: 58 ή 59 ° C για 30 sec, ανάλογα με το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιείται
- Πολυμερισμός: 72 ° C για 45 sec

} x35
κύκλοι

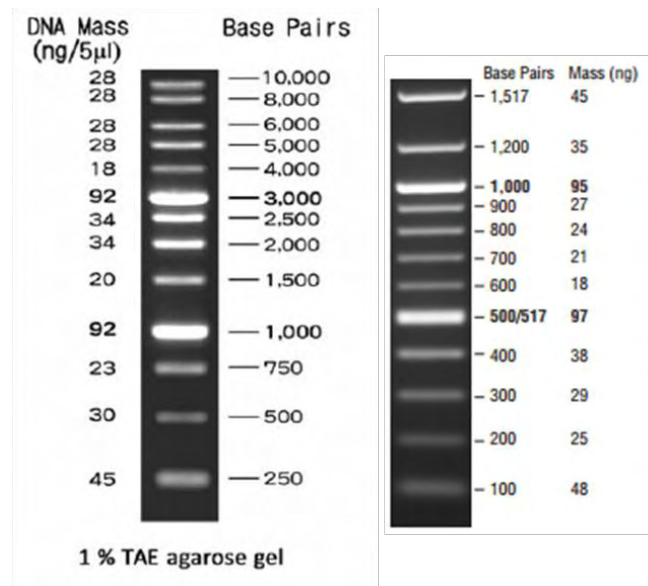
Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ποσότητες σε κάθε δείγμα:

Πίνακας 2: Τα συστατικά της PCR

ΥΛΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (µl)
DNA στόχος- μήτρα	Εξαρτάται από την ποιότητα των δειγμάτων (κυμαίνεται από 1-6 µl)
Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)	2,5 µl 10x
Εκκινητές (F ₁ ' & R ₁ ' ή F ₁ ' & LAR3')	1 µl & 1 µl
Taq DNA πολυμεράση	0,3 units/ µl
διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)	0,6 µl
ddH ₂ O	Εξαρτάται από την ποσότητα DNA
Συνολικός Όγκος	25 µl

Το ρυθμιστικό διάλυμα και η Taq πολυμεράση είναι από την εταιρεία KAPA BIOSYSTEMS. Το ρυθμιστικό διάλυμα έχει κωδική ονομασία 10x KAPA Taq B with Mg (Buffer B, KB1002). Το μαγνήσιο που περιέχεται στο ρυθμιστικό διάλυμα έχει συγκέντρωση 1.5 mM και αραίωση 1x. Επίσης, η κωδική ονομασία της Taq είναι KAPA Taq (KE1000) με συγκέντρωση 5 u/ µl (500 u). Για την κατασκευή του διαλύματος των δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) χρησιμοποιήθηκαν 10 mM από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dATP, dCTP, dGTP and dTTP). Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ένας αρνητικός μάρτυρας ο οποίος αντί του DNA περιείχε H₂O. Επίσης, συνήθως χρησιμοποιούνταν και κάποιο δείγμα που είχε ήδη υποστεί ανάλυση ως θετικός μάρτυρας.

Τα αποτελέσματα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ο Ladder με κωδικό MWD01 από την εταιρεία NIPPON Genetics 1kb για την αναγνώριση της ζώνης του αλληλόμορφου αγρίου τύπου και ο Ladder με κωδικό N3231S από την εταιρεία NEB (New England BioLabs) 100bp, για την αναγνώριση της ζώνης του αλληλομόρφου knockout (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1: Απεικόνιση των ladder που χρησιμοποιήθηκαν στις PCRs του πειράματος. Αριστερά απεικονίζεται ο Ladder με κωδικό MWD01 από την εταιρεία NIPPON Genetics 1kb και δεξιά ο Ladder με κωδικό N3231S από την εταιρεία NEB (New England BioLabs) 100bp.

2.4 Σύγκριση αλληλουχιών *in silico* με εφαρμογή του αλγορίθμου BLAST

2.4.1. BLAST για τη σύγκριση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου και του knockout αλληλομόρφου

Η γονιδιοματική αλληλουχία του γονιδίου *Fra10ac1* του ποντικού για τα αλληλόμορφα αγρίου τύπου με κωδικό καταχώρησης XM_006527335.3 προήλθε από τη βάση δεδομένων NCBI. Από τα δεδομένα που υπάρχουν διαθέσιμα στο NCBI μελετήθηκε η γενωμική οργάνωση των εξωνίων και ιντρονίων του αλληλομόρφου αγρίου τύπου, καθώς υπάρχουν διαθέσιμες οι αλληλουχίες των διάφορων μεταγράφων που προκύπτουν από εναλλακτική συναρμογή. Φαίνεται ότι υπάρχουν τρία mRNA του γονιδίου που προκύπτουν από εναλλακτική συναρμογή. Μελετήθηκε η αλληλουχία του κύριου μεταγράφου, στο οποίο αναγράφονται οι βάσεις που αντιστοιχούν στην αλληλουχία των εξωνίων του γονιδίου, αφού σκοπός ήταν η εύρεση των εξωνίων στην αλληλουχία του αλληλομόρφου knockout. Ταυτόχρονα βρέθηκε και η αλληλουχία του knockout αλληλόμορφου με κωδικό καταχώρησης 1N957884.1

(<https://www.mousephenotype.org/data/search/allele2?kw=%22FRA10Ac1%22#order>). Στη συνέχεια, με τον αλγόριθμο BLAST συγκρίθηκαν οι αλληλουχίες των εξωνίων. Το κύριο μετάγραφο περιλαμβάνει 14 εξώνια, δέκα απ' τα οποία υπάρχουν και στην αλληλουχία 1N957884.1. Το γεγονός ότι τα τελευταία τέσσερα εξώνια δεν ταυτοποιούνται στην τροποποιημένη αλληλουχία που προέρχεται από το EUCOMM

συμβαίνει επειδή το τελευταίο τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου από το NCBI έχει παραληφθεί από την αλληλουχία του EUCOMM.

Πίνακας 3: Σύγκριση των αλληλουχιών των εξονίων και εύρεση δέκα από αυτών στην αλληλουχία 1N957884.1 που προήλθε από τη σελίδα του EUCOMM.

Εξώνια	Αλληλουχία αλληλομόρφου αγρίου τύπου από NCBI απ' όπου προέρχεται το mRNA (ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗΣ: XM_006527335.3)	Αλληλουχία από EUCOMM (ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗΣ: 1N957884.1)
1	1-88	6880- 6967
2	2605-2681	9483- 9559
3	4791- 4886	11670- 11765
4	5015- 5060	11894- 11939
5	8611- 8687	22581- 22657
6	10061- 10144	24053- 24136
7	11073- 11157	25065- 25149
8	17210- 17255	31202- 31247
9	19709- 19822	33701- 33814
10	22929- 22971	36921- 36963
11	24840- 24958	-
12	28783- 28821	-
13	34611- 34689	-
14	35718- 36041	-

2.4.2 BLAST για τη σύγκριση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου με τις αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR

Η σύγκριση της αλληλουχίας του αλληλομόρφου αγρίου τύπου του NCBI, με κωδικό καταχώρησης XM_006527335.3 και της αλληλουχίας του αλληλομόρφου knockout του EUCOMM με κωδικό καταχώρησης 1N957884.1, με τις αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR αποσκοπούσε στην εύρεση τόσο των αλληλουχιών με τις οποίες υβριδοποιούνται οι εκκινητές όσο και του μεγέθους των προϊόντων που ενισχύονται από αυτούς. Από τη σύγκριση που έγινε με BLAST προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 4: Σύγκριση αλληλουχίας εκκινητών με τις αλληλουχίες XM_006527335.3 και 1N957884.1 έτσι ώστε να βρεθούν οι αλληλουχίες που υβριδοποιούνται οι εκκινητές.

Εκκινητής	Αλληλουχία που	Αλληλουχία που
-----------	----------------	----------------

	υβριδοποιείται ο εκκινητής στην αλληλουχία του NCBI	υβριδοποιείται ο εκκινητής στην αλληλουχία του EUCOMM
F1'	8142- 8169	15021- 15048
R1'	9005- 9028	-
LAR3	-	15231- 15254

Συνεπώς, από την παραπάνω σύγκριση μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι στην περίπτωση του ζεύγους εκκινητών F1'- R1' που ενισχύουν το αλληλόμορφο αγρίου τύπου, ενισχύεται μία αλληλουχία 886 bp. Απ' την άλλη, στην περίπτωση του ζεύγους F1'- LAR3 που ενισχύεται το αλληλόμορφο knockout, η αλληλουχία που ενισχύεται έχει μέγεθος 233 bp (*βλ. παράρτημα*).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Δείγματα ποντικών

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση δειγμάτων ποντικών. Τα δείγματα περιείχαν ιστό ποντικού. Σκοπός της γονοτύπησης ήταν να διαπιστωθεί εάν είναι αγρίου τύπου, δηλαδή ομόζυγοι για το φυσιολογικό αλληλόμορφο ή εάν είναι ετερόζυγοι, δηλαδή εάν περιλαμβάνουν ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο και ένα αλληλόμορφο knockout. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από το εργαστήριο του Δρ. Απόστολου Κλινάκη στο Ίδρυμα Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών όπου και πραγματοποιούνται όλες οι διασταυρώσεις των ζώων και ήταν τεμάχια ουράς (1mm). Οι κωδικοί των δειγμάτων συνοψίζονται στον Πίνακα 5. Σε κάθε σύνολο δειγμάτων ακολουθήθηκαν τα εξής στάδια επεξεργασίας:

1. Απομόνωση του DNA από τον εκάστοτε ιστό ποντικού
2. Ηλεκτροφόρηση για τον έλεγχο της ποιότητας και της ποσότητας του DNA
3. Πραγματοποίηση αντίδρασης PCR
4. Ηλεκτροφόρηση για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων της PCR

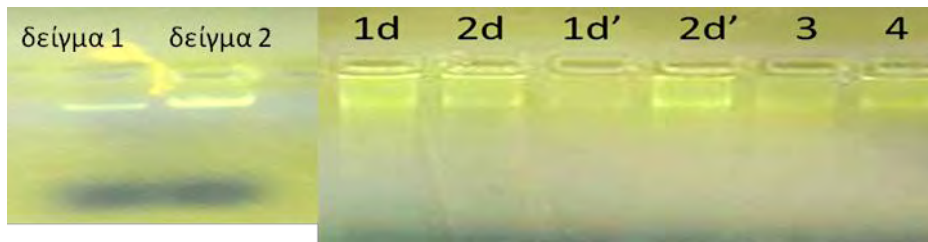
3.2 Απομόνωση DNA από ιστό ποντικού

Αρχικά, έγινε απομόνωση DNA από τα δείγματα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην ενότητα Υλικά-Μέθοδοι. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση προκειμένου να ελεγχθεί η ποιότητα και η ποσότητα του DNA που απομονώθηκε. Στην Εικόνα 3.1, φαίνεται ενδεικτικά το αποτέλεσμα ηλεκτροφορήσεων ολικού DNA που απομονώθηκε. Η συγκεκριμένη ηλεκτροφόρηση αφορά τα δείγματα 1 και 2 από το δεύτερο σύνολο δειγμάτων καθώς επίσης και τα έξι δείγματα του τρίτου συνόλου. Σύμφωνα λοιπόν με την Εικόνα 3.1, η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων 1 και 2 έδωσε ζώνες και για τα δύο δείγματα. Για το τρίτο σύνολο δειγμάτων φαίνεται τόσο έντονος φθορισμός γύρω από τη θέση ηλεκτροφορήσεως που σημαίνει ότι πρόκειται για γονιδιωματικό DNA, όσο και ζώνες για ορισμένα από τα δείγματα που δηλώνουν την ύπαρξη μιτοχονδριακού DNA. Κάποια από τα δείγματα -1d' και 3-, όμως, δεν παρουσιάζουν το ίδιο έντονη ζώνη, γεγονός που σημαίνει ότι περιέχουν μικρότερη ποσότητα DNA. Σε γενικές γραμμές τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι υπάρχει τόσο επαρκής ποσότητα όσο και καλή ποιότητα DNA στα δείγματα αυτά, εφόσον υπάρχουν ζώνες κι επιπλέον δεν υπάρχουν ενδείξεις αποικοδόμησης. Μία αδρή εκτίμηση για την ποσότητα του DNA των δειγμάτων είναι ότι είναι περισσότερη από 100 ng, εφόσον 30-50 ng είναι η ελάχιστη ποσότητα που μπορεί να υπάρχει έτσι ώστε να εμφανιστεί ζώνη. Από τα 30-50 μl που υπήρχαν διαθέσιμα από κάθε δείγμα μετά την απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν τα 5 μl για την ηλεκτροφόρηση της απομόνωσης. Συνεπώς,

έμειναν 25-45 μl δείγματος. Επομένως, αυτή η ποσότητα είναι αρκετή για την πραγματοποίηση πέντε έως εννέα PCR στο στάδιο που ακολουθεί, εφόσον χρησιμοποιούνται περίπου 100ng/ PCR (που αντιστοιχούν περίπου σε 5 μl).

Πίνακας 5: Κωδικοί των δειγμάτων στα οποία πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση.

Σύνολο δειγμάτων	Κωδικός δείγματος
Πρώτο σύνολο δειγμάτων (6.04.2017)	NM1 Θ1 (1.1)
	NM1 Θ2 (1.2)
	NM1 Θ3 (1.3)
	NM2 A1 (2.1)
	NM2 A2 (2.2)
	NM2 A3 (2.3)
	NM3 Θ1 (3.1)
	NM3 Θ2 (3.2)
	NM3 Θ3 (3.3)
	NM3 Θ4 (3.4)
	NM3 Θ5 (3.5)
	NM3 Θ6 (3.6)
	NM3 Θ7 (3.7)
	NM3 Θ8 (3.8)
	NM3 Θ9 (3.9)
	NM4 Θ1 (4.1)
	NM4 A2 (4.2)
	NM4 A3 (4.3)
	NM4 A4 (4.4)
	NM4 A5 (4.5)
	NM4 A6 (4.6)
	NM4 A7 (4.7)
	NM4 A8 (4.8)
	NM4 A9 (4.9)
Δεύτερο σύνολο δειγμάτων (05.05.2017)	1
	2
Τρίτο σύνολο δειγμάτων (21.06.2017)	1d
	1d'
	2d
	2d'
	3
	4



Εικόνα 3.1: Ενδεικτικά αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης μετά από απομόνωση DNA από το δεύτερο και τρίτο σύνολο δειγμάτων.

3.3 Γονοτύπηση δειγμάτων

Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του υπό εξέταση τμήματος DNA, τόσο στο αλληλομορφο αγρίου τύπου όσο και στο αλληλόμορφο knockout του γονιδίου *Fra10ac1*. Σε όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών: α) οι εκκινητές F1'-R1' οι οποίοι αναγνωρίζουν το αλληλόμορφο αγρίου τύπου του γονιδίου *Fra10ac1* και β) οι εκκινητές F1'-LAR3' οι οποίοι αναγνωρίζουν το αλληλόμορφο knockout. Επίσης, σε κάθε PCR χρησιμοποιούνταν δύο αρνητικοί μάρτυρες, ένας για κάθε ζεύγος εκκινητών. Όλα τα δείγματα είναι από διασταύρωση ποντικών αγρίου τύπου με ετερόζυγους, οπότε οφείλουν να δώσουν προϊόν και με τα δύο ζεύγη εκκινητών αν είναι ετερόζυγα ή μόνο με το ζεύγος F1'-R1' αν είναι αγρίου τύπου. Συνεπώς, όταν υπάρχει προϊόν για το αλληλόμορφο knockout δεν υπάρχει αμφιβολία ότι το δείγμα είναι ετερόζυγο. Αυτό συμβαίνει γιατί ακόμα δεν έχουν πραγματοποιηθεί διασταυρώσεις μεταξύ ετεροζυγών έτσι ώστε να υπάρχει το ενδεχόμενο να υπάρχουν και ομόζυγοι ποντικοί για το αλληλόμορφο knockout. Ο λόγος, λοιπόν, για τον οποίο πραγματοποιείται και η δεύτερη PCR με τους εκκινητές που αναγνωρίζουν το αλληλόμορφο αγρίου τύπου είναι για να ελεγχθεί ότι το συγκεκριμένο DNA που εξετάζεται, είναι ικανό να δώσει προϊόν. Μετά την πραγματοποίηση της PCR, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης, όπου φορτώνεται σχεδόν ολόκληρη η ποσότητα του εκάστοτε δείγματος (περίπου 18 μl). Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ο Ladder με κωδικό MWD01 από την εταιρεία NIPPON Genetics 1kb ως μάρτυρας για την αναγνώριση του μεγέθους της ζώνης του αλληλομόρφου αγρίου τύπου και ο ο Ladder με κωδικό N3231S από την εταιρεία NEB (New England BioLabs) 100bp για το αλληλόμορφο knockout.

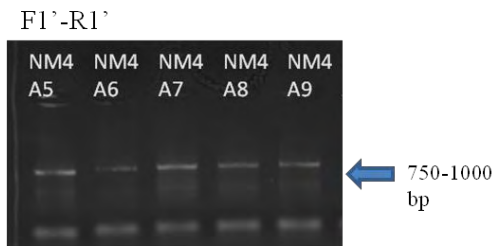
3.3.1 Αποτελέσματα από την PCR του πρώτου συνόλου δειγμάτων

Τα αποτελέσματα της πρώτης PCR παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.2:

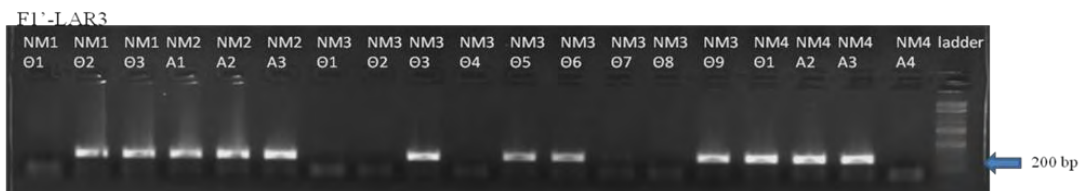
A)



B)



Γ)



Δ)



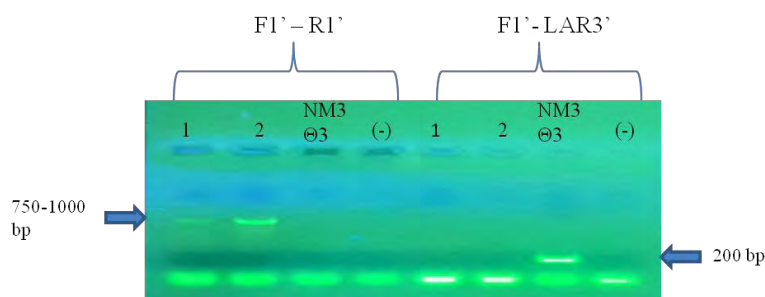
Εικόνα 3.2: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης για τον έλεγχο της PCR που πραγματοποιήθηκε στο πρώτο σύνολο δειγμάτων **A & B**) με τους εκκινητές *FI'-R1'* για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου και **Γ & Δ**) με το ζεύγος εκκινητών *FI'-LAR3* που αναγνωρίζει το αλληλόμορφο *knockout*.

Σύμφωνα με τις παραπάνω εικόνες μπορούν να διεξαχθούν τα εξής συμπεράσματα: Τα δείγματα 1.1, 3.1, 3.2, 3.4, 3.7, 3.8, 4.4, 4.5, 4.6 και 4.9 είναι αγρίου τύπου γιατί έχουν δώσει προϊόν στην PCR με τους εκκινητές *FI'-R1'*, ενώ δεν δίνουν προϊόν στην PCR με τους εκκινητές για το αλληλόμορφο *knockout*. Από την άλλη, τα δείγματα: 1.2, 1.3, 2.1, 2.2, 3.5, 3.6, 3.9, 4.1, 4.2, 4.3, 4.7 και 4.8 είναι σίγουρα ετερόζυγα, καθώς έχουν δώσει προϊόν τόσο στην PCR με τους εκκινητές *FI'-LAR3'* που αναγνωρίζουν το αλληλόμορφο *knockout* όσο και στην PCR με τους εκκινητές *FI'-R1'* που αναγνωρίζουν το αλληλόμορφο στα αγρίου

τύπου. Τέλος, τα δείγματα 2.3 και 3.3 έχουν εμφανίσει προϊόν στο αλληλόμορφο knockout, αλλά δεν έχουν δώσει το αναμενόμενο προϊόν στο αγρίου τύπου που δίνουν τα ετερόζυγα. Όμως, επειδή όλα τα δείγματα του πρώτου συνόλου προέρχονται από διασταύρωση ποντικών αγρίου τύπου με ετερόζυγα, δεν υπάρχει το ενδεχόμενο να βρεθούν ποντικοί ομόζυγοι για το αλληλόμορφο knockout. Επομένως, δε χρειάζεται να γίνει επανεξέταση των δειγμάτων των ποντικών 2.3 και 3.3, εφόσον η εμφάνιση προϊόντος στην PCR για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου δεν είναι απαραίτητη για να επιβεβαιωθεί το συμπέρασμα ότι και τα δύο αυτά δείγματα ανήκουν στους ετερόζυγους ποντικούς-φορείς.

3.3.2 Αποτελέσματα από την PCR του δεύτερου συνόλου δειγμάτων

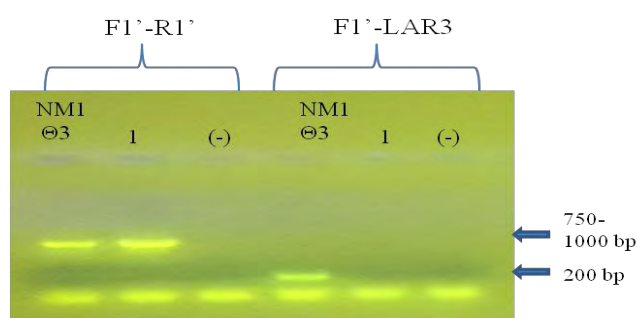
Η επόμενη PCR αφορούσε το δεύτερο σύνολο δειγμάτων που αποτελούνταν από δύο δείγματα. Χρησιμοποιήθηκαν τα δύο ζεύγη εκκινητών που προαναφέρθηκαν. Τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν το δείγμα 3.3 από το πρώτο σύνολο δειγμάτων (βλ. *Εικόνα 3.2*), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας για την PCR με τους εκκινητές F1'-LAR3' και τα δείγματα 1 και 2 από το δεύτερο σύνολο δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 4 μl DNA από το δείγμα 3.3 και από το δείγμα 1 και 1 μl από το δείγμα 2 γιατί πρόκειται για δείγμα με μεγαλύτερη συγκέντρωση DNA. Συνολικά, υπήρχαν οκτώ δείγματα καθώς χρησιμοποιήθηκαν και δύο αρνητικοί μάρτυρες, ένας για κάθε ζεύγος εκκινητών. Όλα τα υπόλοιπα πραγματοποιήθηκαν όπως ακριβώς περιγράφεται στο πρωτόκολλο της PCR στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την PCR παρουσιάζονται στην *Εικόνα 3.3* στην οποία φαίνεται η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% που ακολούθησε. Ο λόγος για τον οποίο δε χρησιμοποιείται κάποιος ladder ως μάρτυρας για το μέγεθος του προϊόντος είναι ότι πλέον χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας κάποιο απ' τα προηγούμενα δείγματα για το οποίο υπάρχουν επιβεβαιωμένα αποτελέσματα από προηγούμενη PCR στην οποία υπήρχε ο ladder.



Εικόνα 3.3: Ηλεκτροφόρηση μετά από PCR του δεύτερου συνόλου δειγμάτων

Στην ηλεκτροφόρηση το δείγμα 3.3 το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας εμφάνισε προϊόν ως προς το ζεύγος εκκινητών για το αλληλόμορφο

knockout όπως ήταν αναμενόμενο, γεγονός που σημαίνει ότι η PCR πραγματοποιήθηκε σωστά. Επίσης, τα θετικά αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από το γεγονός ότι οι αρνητικοί μάρτυρες δεν εμφάνισαν παραπροϊόντα. Το δείγμα 2 δεν εμφάνισε προϊόν για την PCR με τους εκκινητές F1'-LAR3' για το αλληλόμορφο knockout, που πραγματοποιήθηκε σίγουρα σωστά, ενώ εμφάνισε προϊόν στην PCR με τους εκκινητές F1'-R1', συνεπώς είναι σίγουρα αγρίου τύπου. Το ίδιο συμβαίνει και με το δείγμα 1. Το μόνο πρόβλημα μ' αυτήν την PCR είναι ότι το προϊόν του δείγματος 1 δεν εμφάνισε αρκετά έντονο προϊόν. Συνεπώς, πραγματοποιήθηκε επαναληπτική PCR στην οποία αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 1.3 ως θετικός μάρτυρας (βλ. *Εικόνα 3.2*), το οποίο όχι μόνο ήταν θετικό ως προς το ζεύγος εκκινητών για το αλληλόμορφο knockout, αλλά είχε εμφανίσει και την απαραίτητη ζώνη αγρίου τύπου σε προηγούμενη PCR (βλ. *Εικόνα 3.2*), επομένως μπορούσε να ελεγχθεί πιο αξιόπιστα και αυτή η αντίδραση. Αυτή η επαλήθευση ήταν απαραίτητη εξαιτίας τόσο του γεγονότος ότι το δείγμα 1 στην ηλεκτροφόρηση της προηγούμενης PCR έδωσε ένα προϊόν που δεν ήταν ικανοποιητικά έντονο όσο κι επειδή ο θετικός μάρτυρας 3.3 που χρησιμοποιήθηκε στην προηγούμενη PCR δεν εμφάνισε προϊόν ως αγρίου τύπου. Έτσι, λοιπόν, στη συγκεκριμένη PCR χρησιμοποιήθηκε η ίδια ποσότητα DNA (4 μl) τόσο για το δείγμα 1.3 όσο και για το δείγμα 1 με βάση προηγούμενες PCR που ήταν επιτυχείς. Συνολικά, υπήρχαν 6 δείγματα καθώς χρησιμοποιήθηκαν και δύο αρνητικοί μάρτυρες, ένας για κάθε ζεύγος εκκινητών. Έπειτα, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα (*Εικόνα 3.4*):



Εικόνα 3.4: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης μετά από την επαναληπτική PCR

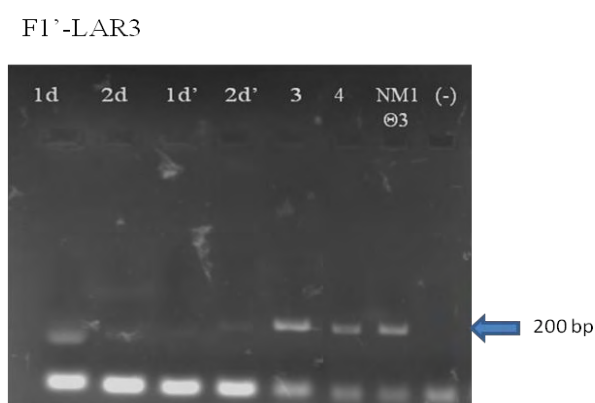
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης φαίνεται ότι το δείγμα 1.3, που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, έδωσε προϊόν τόσο στην PCR με τους εκκινητές που ανγνωρίζουν το αλληλόμορφο αγρίου τύπου, όσο και στην PCR για το αλληλόμορφο knockout, γεγονός που σημαίνει ότι και οι δύο PCR πραγματοποιήθηκαν σωστά. Το δείγμα 1 από την άλλη που ήταν και το ζητούμενο έδωσε αυτή τη φορά έντονο προϊόν για την PCR που αφορά το αλληλόμορφο αγρίου

τύπου, συνεπώς μπορεί να διεξαχθεί πλέον με βεβαιότητα το συμπέρασμα πως πρόκειται για δείγμα αγρίου τύπου.

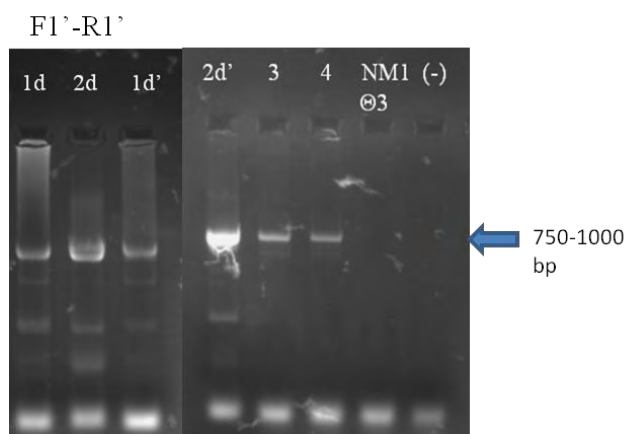
3.3.3 Αποτελέσματα από την PCR του τρίτου συνόλου δειγμάτων

Η επόμενη PCR αφορούσε το τρίτο και τελευταίο σύνολο δειγμάτων που αποτελούνταν από έξι δείγματα. Τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν το 1.3 από το πρώτο σύνολο δειγμάτων, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας και ως ladder και τα δείγματα 1d, 2d, 1d', 2d', 3 και 4 από το τρίτο σύνολο. Στη συνέχεια, έγινε αραιώση 1:10 των έξι αυτών δειγμάτων, επειδή η εικόνα (Εικόνα 3.1) από την ηλεκτροφόρηση απομόνωσης αυτών των δειγμάτων έδειξε ότι είναι αρκετά πυκνά. Από τα αραιωμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν 2 μl, ενώ από το θετικό μάρτυρα (1.3) 4 μl, όπως και πριν (βλ. Εικόνα 3.2). Συνολικά υπήρχαν 16 δείγματα καθώς χρησιμοποιήθηκαν και δύο αρνητικοί μάρτυρες, ένας για κάθε ζεύγος εκκινητών. Όλα τα υπόλοιπα πραγματοποιήθηκαν όπως ακριβώς περιγράφεται στο πρωτόκολλο της PCR στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την PCR παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.5 όπου φαίνεται η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% που ακολούθησε.

A)



B)



Εικόνα 3.5: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης μετά από PCR του τρίτου συνόλου δειγμάτων **A)** με το ζεύγος εκκινητών *F1'-LAR3* που αφορά το αλληλόμορφο *knockout* και **B)** με τους εκκινητές *F1'-R1'* για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου.

Στην ηλεκτροφόρηση το δείγμα 1.3 το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας εμφάνισε προϊόν ως προς το ζεύγος εκκινητών για το αλληλόμορφο *knockout* όπως ήταν αναμενόμενο, γεγονός που σημαίνει ότι η PCR πραγματοποιήθηκε σωστά. Επίσης, οι αρνητικοί μάρτυρες δεν εμφάνισαν προϊόντα. Τα δείγματα 3 και 4 εμφάνισαν προϊόν τόσο στην PCR με τους εκκινητές *F1'-LAR3* όσο και με τους *F1'-R1'* και συνεπώς διεξάγεται το συμπέρασμα ότι πρόκειται για ετερόζυγα δείγματα. Από την άλλη, τα υπόλοιπα δείγματα, δηλαδή τα 1d, 2d, 1d' και 2d' φαίνεται να δίνουν προϊόν μόνο για την PCR με τους εκκινητές *F1'-R1'* που αναγνωρίζουν το αλληλόμορφο αγρίου τύπου, άρα πρόκειται για δείγματα αγρίου τύπου. Πρέπει να σημειωθεί ότι μπορεί να φαίνεται οπτικά ότι τα δείγματα 1d και 2d δίνουν προϊόν και για την PCR με τους εκκινητές *F1'-LAR3*, αλλά αν παρατηρήσει κανείς πιο προσεκτικά θα διαπιστώσει πως αυτό το προϊόν είναι διαφορετικού μεγέθους από το αναμενόμενο και συνεπώς δεν αναιρεί το συμπέρασμα που έχει διεξαχθή προηγουμένως. Συμπερασματικά, από τα 32 δείγματα που εξετάστηκαν ταυτοποιήθηκαν 16 ετερόζυγα και 16 αγρίου τύπου.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στη γονοτύπηση ποντικών knockout με σκοπό τη μελέτη του ρόλου του γονιδίου *Fra10ac1* του ποντικού, μία έρευνα που εντάσσεται στο γενικότερο πλαίσιο αποσαφήνισης του ρόλου του γονιδίου *FRA10AC1* στον άνθρωπο καθώς επίσης και της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Το γονίδιο *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην εύθραυστη χρωμοσωμική θέση *FRA10A* στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23.3, η οποία ίσως συσχετίζεται με φαινότυπο ήπιας νοητικής υστέρησης. Κατά τη διάρκεια, όμως, της μελέτης των φορέων για την *FRA10A* εντοπίστηκαν και φορείς, δηλαδή άτομα ετερόζυγα ως προς την *FRA10A*, τα οποία δεν εμφάνιζαν κανένα από τα κλινικά συμπτώματα και ήταν υγιή. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο παθολογικός φαινότυπος που σχετίζεται με τη *FRA10A* ίσως παρουσιάζει μειωμένη διεισδυτικότητα. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως άτομα-φορείς που έχουν τον ίδιο γονότυπο και θα έπρεπε να εμφανίζουν τον παθολογικό φαινότυπο, δεν πάσχουν ή εναλλακτικά ότι δεν συσχετίζεται με νοητική υστέρηση. Με σκοπό τη συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου δημιουργήθηκε ένα ζωικό μοντέλο ενός ποντικού knockout με απαλοιφή του ορθόλογου γονιδίου *Fra10ac1*. Με σκοπό τη μελέτη του φαινοτυπικού αποτελέσματος πραγματοποιήθηκαν αρκετές διασταυρώσεις και ακόλουθη γονοτύπηση μέσω PCR και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.

Οι τροποποιημένοι γενετικά ποντικοί προήλθαν από διασταυρώσεις. Οι διασταυρώσεις είναι απαραίτητες προκειμένου να δημιουργηθεί επαρκής αριθμός ποντικών knockout, καθώς απαιτούνται τουλάχιστον 20 έως 30 ποντικοί έτσι ώστε να διενεργηθούν μελέτες συμπεριφοράς και άλλες δοκιμασίες. Όμως, όλες αυτές οι διασταυρώσεις δεν ήταν δυνατό να πραγματοποιηθούν στο χρονικό πλαίσιο της παρούσας εργασίας, εφόσον παρουσιάζουν ορισμένους χρονικούς περιορισμούς. Πιο συγκεκριμένα, η κύηση ενός ποντικού διαρκεί περίπου 20 μέρες, ενώ για να μπορεί να γίνει περαιτέρω χειρισμός των νεογνών θα πρέπει να περάσουν σίγουρα άλλες 20 μέρες, γεγονός που καθιστά τη διαδικασία αυτή χρονοβόρα. Επιπλέον, απαιτούνται τουλάχιστον δύο επιπλέον μήνες για να φτάσουν τα ποντίκια σε κατάλληλη ηλικία ώστε να κυοφορήσουν. Είναι σημαντικό να υπάρχει αρκετός αριθμός δειγμάτων έτσι ώστε να υπάρχει μέτρο σύγκρισης μεταξύ τους κι έτσι να είναι πιο αξιόπιστα τα αποτελέσματα των μελετών. Ο συγκεκριμένος ποντικός knockout για το γονίδιο *Fra10ac1* δημιουργήθηκε για πρώτη φορά στο πλαίσιο της υποδομής Infrafrontier GR στο Ίδρυμα Βιοϊατρικών Επιστημονικών Ερευνών Αλέξανδρος Φλέμινγκ (επικεφαλής-Δρ. Δ. Κοντογιάννης). Η γονοτύπηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δύο ζευγών εκκινητών κατά τη διάρκεια της PCR, ένα το οποίο αναγνώριζε το αλληλόμορφο αγρίου τύπου του γονιδίου *Fra10ac1* του ποντικού και ένα άλλο το οποίο αναγνώριζε το αλληλόμορφο knockout. Η εμφάνιση των αποτελεσμάτων της PCR με ηλεκτροφόρηση αποσκοπούσε στην αναγνώριση του γονοτύπου του εκάστοτε δείγματος, τα οποία ήταν είτε αγρίου τύπου ή ετερόζυγα. Απώτερος σκοπός

είναι να διενεργηθούν οι κατάλληλες δοκιμασίες συμπεριφοράς στους ποντικούς. Ο λόγος που υφίστανται αυτές οι δοκιμασίες είναι για να ελεγχθούν οι διαγονιδιακοί ποντικοί τόσο μεταξύ τους όσο και με ποντικούς αγρίου τύπου που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες για να διαπιστωθεί εάν οι ποντικοί με το αλληλόμορφο knockout μειονεκτούν ως προς τη μνήμη και τη μάθηση, καθώς επίσης κι αν έχουν πλέον μειωμένα αντανεκλαστικά ανάλογα με τον εάν αποκρίνονται στις συνθήκες της εκάστοτε δοκιμασίας. Με λίγα λόγια, χρησιμοποιούνται για να καθοριστούν οι επιπτώσεις του γονοτύπου στις αποκρίσεις συμπεριφοράς. Τόσο οι ενήλικοι ποντικοί όσο και οι ποντικοί ελέγχου (η ηλικία τους μπορεί να ποικίλει από 3-18 μηνών) χρησιμοποιούνται σε όλες τις δοκιμές συμπεριφοράς. Όλες οι δοκιμές συμπεριφοράς διεξάγονται σε ένα ειδικά σχεδιασμένο δωμάτιο, καλά ηχομονωμένο, το οποίο βρίσκεται στη μονάδα των ζώων, κοντά στις ζωικές αποικίες. Η αρένα για τις δοκιμές συμπεριφοράς προστατεύεται από μια μαύρη κουρτίνα, για να εξασφαλιστεί η εξάλειψη οποιονδήποτε πιθανών οπτικών ενδείξεων ή παρεμβολών (Y.-P. Tang et al., 2001).

Υπάρχουν διάφορες δοκιμασίες που μπορούν να εφαρμοστούν στους ποντικούς για να ελεγχθεί η συμπεριφορά τους, οι οποίες μπορούν να διακριθούν ανάλογα με τα επίπεδα στρες που προκαλούν. Από τη μία υπάρχουν οι δοκιμασίες που προκαλούν σχετικά χαμηλά επίπεδα άγχους όπως α) ο λαβύρινθος elevated- plus maze και β) η μεταβίβαση σε συνθήκες φωτός/ σκότους. Από την άλλη, υπάρχουν δοκιμασίες που επάγουν αυξημένα επίπεδα στρες στους ποντικούς και είναι οι ακόλουθες: α) forced to swim test (FTS), β) tail suspension και γ) learned helplessness. Συνήθως, η εφαρμογή των δοκιμασιών με μειωμένο στρες προηγείται αυτών που προκαλούν αυξημένα επίπεδα στρες στους ποντικούς (Bailey et al., 2007). Ακόμη, υπάρχουν και άλλες δοκιμασίες συμπεριφοράς που εφαρμόζονται ευρέως στους ποντικούς, όπως: α) η αναγνώριση ενός καινούργιου αντικειμένου (novel-object-recognition task), β) η επαγωγή του αισθήματος του φόβου (fear conditioning), γ) η δοκιμασία του Morris water maze και δ) του T- maze και τέλος ε) η δοκιμασία open field test. Οι διάφοροι μέθοδοι δοκιμασίας μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με το σκοπό διεξαγωγής τους. Ειδικότερα, για τη μέτρηση της μνήμης οπτικής αναγνώρισης χρησιμοποιούνται μέθοδοι όπως α) novel-object recognition task (Reed, J. M. Et al., 1997, Myhrer, T., 1988, Mumby, D. G. et al., 1996), για τη μέτρηση της μνήμης των συναισθημάτων των ποντικών εφαρμόζονται μέθοδοι όπως: α) fear conditioning, β) extinction trial, γ) tail suspension, δ) forced to swim test (FTS) και ε) learned helplessness. Ακόμη, υπάρχουν δοκιμασίες για τον έλεγχο της μάθησης του χώρου από του ποντικούς, που περιλαμβάνουν κυρίως δοκιμασίες με λαβύρινθους, όπως: α) ο λαβύρινθος elevated-plus maze, β) Morris water maze (Tsien, J. Z., et al., 1996, Morris, R. G. et al., 1992), γ) T- maze και δ) η δοκιμασία του open field test.

Αρχικά, όσον αφορά το novel-object recognition task (Tang et al., 1999; Rampon et al., 2000) πρόκειται για μία δοκιμασία όπου οι ποντικοί τοποθετούνται ο καθένας ξεχωριστά σε ένα ανοιχτό πλαίσιο, όπου υπάρχουν δύο νέα αντικείμενα. Ο δείκτης προτίμησης, η αναλογία του χρόνου που δαπανάται εξερευνώντας

οποιοδήποτε από τα δύο αντικείμενα κατά τη διάρκεια του συνολικού χρόνου που δαπανάται για την εξερεύνηση και των δύο αντικειμένων χρησιμοποιούνται ως δείκτες για τη μέτρηση της μνήμης αναγνώρισης.

Για τη διεξαγωγή του fear conditioning test (Tang et al., 1999; Tang et al., 2001) χρησιμοποιείται ένας θάλαμος σοκ και ανιχνευτές δραστηριότητας. Το ελεγχόμενο ερέθισμα (CS) που χρησιμοποιείται είναι συνήθως ένας ήχος 85dB στα 2.800 Hz και το μη ελεγχόμενο ερέθισμα (US) είναι ένας συνεχής ηλεκτροσόκ ποδιών στα 0,75 mA και οι αντιδράσεις ακινητοποίησης καταγράφονται. Επίσης, στην ίδια λογική κινείται και το παράδειγμα του φόβου-εξαφάνισης (fear extinction trial) (Falls, W. A. et al., 1992). Εάν τα ζώα εκτίθενται επανειλημμένα στο ελεγχόμενο ερέθισμα (τόνος) χωρίς το μη ελεγχόμενο ερέθισμα (σοκ), το ελεγχόμενο ερέθισμα θα χάσει την ικανότητά του να παράγει αποκρίσεις στο φόβο. Αυτή η μείωση του ελεγχόμενου φόβου είναι γνωστή ως εξαφάνιση του φόβου (fear extinction). Μία μέθοδος που ακολουθεί την ίδια λογική είναι αυτή της ανιχνευμένης αδυναμίας (learned helplessness) (Caldarone et al., 2003, Duman et al., 2007) κατά την οποία σε ειδικά κατασκευασμένα κουτιά διενεργούνται προπονήσεις ηλεκτροσόκ και καταγράφεται η τάση των ποντικών να διαφύγουν από το κουτί και ο αριθμός των αποτυχημένων προσπαθειών διαφυγής.

Όσον αφορά τη δοκιμασία του Morris water- maze (Morris et al. 1982; Steiner et al. 2001; Holmes et al., in press) περιλαμβάνει μια συσκευή λαβύρινθου που είναι μια κυκλική δεξαμενή που αποτελείται από νερό και ο χρόνος που δαπανάται σε κάθε τεταρτημόριο καταγράφεται, έτσι ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση του γονοτύπου στη χωρική προτίμηση.

Δύο άλλοι τύποι λαβύρινθου που, όμως, δεν περιέχουν το υγρό στοιχείο είναι ο T- maze και ο elevated plus maze. Η μέθοδος του elevated plus-maze (Lister, 1987) περιλαμβάνει την τοποθέτηση των ποντικών στο κέντρο του λαβύρινθου με προσανατολισμό να αντικρίζουν έναν ανοιχτό βραχίονα. Στη συνέχεια, αφήνονται να εξερευνήσουν το λαβύρινθο και βαθμολογούνται για τις επιδόσεις τους. Ο T- maze (Reisel et al., 2002) αποτελεί μία δοκιμασία χωρικής αναγνώρισης και μνήμης που είναι παρόμοια με την προηγούμενη δοκιμασία που περιγράφηκε. Αυτό που καταγράφεται είναι η ακρίβεια της απόκρισης των ποντικών. Κατά τη δοκιμή αναγκαστικής κολύμβησης (forced to swim- FTS) (Caldarone et al., 2003; Duman κ.ά., 2007) τα ποντίκια τοποθετούνται σε ένα γυάλινο κύλινδρο γεμάτο με νερό και αυτό που βαθμολογείται είναι ο χρόνος που το ποντίκι παραμένει ακίνητο. Από την άλλη, η διαδικασία αναστολής της ουράς (tail suspension) (Steru et al., 1985) περιλαμβάνει την αιώρηση των ποντικών με κολλητική ταινία που τοποθετείται στην άκρη της ουράς και ο χρόνος ακινησίας καταγράφεται.

Έπειτα, υπάρχει η δοκιμασία του ανοιχτού πεδίου (open field test) κατά την οποία τα ζώα τοποθετούνται στο κέντρο ενός κουτιού και καταγράφονται τόσο η απόσταση που διανύεται όσο και το ποσοστό του χρόνου που δαπανάται στις κεντρικές και στις περιφερειακές ζώνες του πεδίου. Τέλος, υπάρχει και η δοκιμή εξερεύνησης υπό συνθήκες φωτός/ σκότους (Crawley 1981, Mathis et al., 1995, Holmes & Rodgers 2001). Αυτό που καταγράφεται είναι ο αριθμός των μεταβάσεων

των ποντικών μεταξύ φωτός/ σκότους και ο συνολικός χρόνος που περνάει στο σκοτεινό διαμέρισμα κάθε ποντικός.

Η διεξαγωγή κάποιων από τις δοκιμασίες που περιγράφηκαν παραπάνω έχει ως στόχο τον έλεγχο της συμπεριφοράς των ποντικών knockout, είτε των ετερόζυγων είτε των ομόζυγων. Στον άνθρωπο υφίσταται μόνο η κατάσταση ετεροζυγωτίας, δηλαδή έχουν βρεθεί μόνο άτομα φορείς που προκύπτουν μετά από αποσιώπηση του ενός αλληλομόρφου του γονιδίου *FRA10A**C1*. Μέχρι στιγμής δεν έχουν αναφερθεί ομοζυγώτες για την *FRA10A*, στους οποίους και τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου να έχουν υποστεί σίγηση. Γι' αυτό το λόγο, ήταν απαραίτητη η δημιουργία διασταυρώσεων για την κατασκευή ετερόζυγων ποντικών knockout για το γονίδιο *Fra10ac1*, έτσι ώστε να δημιουργηθεί ακριβώς το αντίστοιχο μοντέλο που θα προσομοιάζει την κατάσταση που υφίσταται στον άνθρωπο. Όλες οι επιπλέον διασταυρώσεις μετά τη δημιουργία του αρχικού knockout, πραγματοποιήθηκαν από το εργαστήριο του Δρ. Απόστολου Κλινάκη στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, απ' όπου στέλνονταν απευθείας τα δείγματα που επρόκειτο να εξεταστούν. Όπως προαναφέρθηκε το γεγονός ότι δεν έχουν εντοπιστεί ομοζυγώτες που να φέρουν την αποσιώπηση καθιστά επιτακτική τη μελέτη της τουλάχιστον πειραματικά. Γι' αυτό το λόγο πρέπει να πραγματοποιηθούν οι διασταυρώσεις μεταξύ των ετερόζυγων ποντικών-φορέων, έτσι ώστε να δημιουργηθούν αρκετοί ποντικοί knockout, οι οποίοι θα αποτελέσουν το εργαλείο για να μελετηθεί το φαινοτυπικό αποτέλεσμα για τους ποντικούς που είναι ομόζυγοι για την αποσιώπηση του γονιδίου *Fra10ac1*, δηλαδή εάν αυτή η κατάσταση είναι ή όχι συμβατή με τη ζωή. Το αποτέλεσμα που θα προκύψει, στη συνέχεια, θα αντικατοπτρίζει και το φαινοτυπικό αποτέλεσμα που θα είχε αυτή η κατάσταση στον άνθρωπο. Ο έλεγχος της δημιουργίας των ποντικών knockout μπορεί να πραγματοποιηθεί, στη συνέχεια, με PCR ή με ανάλυση κατά Southern, για περισσότερη ακρίβεια.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

➤ ΒΙΒΛΙΑ

1. Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell.(2000), *Molecular Cell Biology*, 4th edition, Section 8.5, New York: W.H Freeman
2. Lewin Benjamin(2004), *Genes VIII*, Pearson Prentice Hall, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
3. Peter J. Russel, *iGenetics: A Mendelian Approach*, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις , 2009
- 4.Ελένη Ντούνη(2009-2010), *Σημειώσεις βιοτεχνολογίας ζώων*, Κεφάλαια 2 και 3, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
5. Ματθιόπουλος Κ., Κακάνη Ε., Αυγουστίνος Α., 2014, *Φυλλάδιο Εργαστηριακών Ασκήσεων Μοριακής Βιολογίας Ι, Τ.Β.Β Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

➤ ΑΡΘΡΑ

1. Andersen DS, Tapon N (2008) Drosophila MFAP1 is required for pre-mRNA processing and G2/M progression. *J Biol Chem* 283 (45): 31256-67.
2. Bailey, K.R., Pavlova, M.N., Rohde, A.D., Hohmann, J.G., Crawley, J.N., 2007. Galanin receptor subtype 2 (GalR2) null mutant mice display an anxiogenic-like phenotype specific to the elevated plusmaze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 8–20.
3. B. Bardoni, J.L. Mandel, G.S. Fisch, FMR1 gene and fragile X syndrome, *Am. J. Med. Genet.* 97 (2000) 153–163.
4. Bessonov S, Anokhina M, Krasauskas A, Golas MM, Sander B, et al. (2010) Characterization of purified human Bact spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis. *RNA* 16: 2384-2403
5. Bieberstein, N. I., Carrillo Oesterreich, F., Straube, K. & Neugebauer, K. M. First exon length controls active chromatin signatures and transcription. *Cell Rep.* 2, 62–68 (2012).
6. B.J. Mowry, et al., Second stage of a genome scan of schizophrenia: study of five positive regions in an expanded sample, *Am. J. Med. Genet.* 96 (2000) 864–869.
7. Bradford Hall,¹ Advait Limaye,¹ and Ashok B Kulkarni^{1,1}, Overview: Generation of Gene Knockout Mice, Author manuscript, 2010 Sep
8. Bradley A, Anastassiadis K, Ayadi A, Battey JF, Bell C, Birling MC, et al. The mammalian gene function resource: the international knockout mouse consortium. *Mamm Genome* (2012) 23(9–10):580–6. doi:10.1007/s00335-012-9422-2
9. Braunschweig, U., Gueroussov, S., Plocik, A. M., Graveley, B. R. & Blencowe, B. J. Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. *Cell* 152, 1252–1269 (2013).
10. Brennan K. Colony management. First ed. In: Pease S, Saunders TL, editors. *Advanced Protocols for Animal Transgenesis*. Berlin: Springer (2011). p. 535–76
11. Bressan GC, Quaresma AJ, Moraes EC, Manfiolli AO, Passos DO, et al. (2009) Functional association of human Ki-1/57 with pre-mRNA splicing events. *FEBS J* 276 (14): 3770-83.
12. Budwole B., Allen, RC., Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis of DNA fragments, *Molecular Biology in Medicine*(1990), Volume 7
13. Caldarone, B.J., George, T.P., Zachariou, V., Picciotto, M.R., 2000. Gender differences in learned helplessness behavior are influenced by genetic background. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66, 811–817.
14. Capecchi MR. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 1989;5:70–6.

15. Capecchi MR. Targeted Gene Replacement. *Sci. Am.* 1994;270:52–59.
16. Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genetics* (2005) **6**(6):507–12. doi:10.1038/nrg1619
17. Carrillo Oesterreich, F., Bieberstein, N. & Neugebauer, K. M. Pause locally, splice globally. *Trends Cell Biol.* **21**, 328–335 (2011).
18. Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, Horos R, Beckmann BM, et al. (2012) Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* **149** (6): 1393-406
19. Chen D, Li Z, Yang Q, Zhang J, Zhai Z, et al. (2003) Identification of a nuclear protein that promotes NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun* **310** (3): 720-4.
20. Chen J, Li YM, Li JF, Liu LD, Liao Y, et al. (2010) Transcriptional regulation by HSV-1 induced HTRP via acetylation system. *Virology* **25** (6): 417-24.
21. Cheng H, Dufu K, Lee CS, Hsu JL, Dias A, et al. (2006) Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* **127** (7): 1389-400.
22. C. Nobile, et al., A refined physical and EST map spanning 7.4 Mb of 10q24, a region involved in neurological disorders, *Mamm. Genome* **9** (1998) 835–837.
23. Cotton LM, Meilak ML, Templeton T, Gonzales JG, Nenci A, Cooney M, et al. Utilising the resources of the international knockout mouse consortium: the Australian experience. *Mamm0020Genome* (2015) **26**(3–4):142–53. doi:10.1007/ s00335-015-9555-1
24. Crawley, J.N. (1981) Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* **15**, 695±699.
25. Custódio, N. & Carmo-Fonseca, M. Co-transcriptional splicing and the CTD code. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **51**, 395–411 (2016).
26. Cvitkovic, I. & Jurica, M. S. Spliceosome database: a tool for tracking components of the spliceosome. *Nucleic Acids Res.* **41**, D132–D141 (2013).
27. Debatisse M, Le Tallec B, Letessier A, Dutrillaux B, Brison O (2012) Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. *Trends Genet* **28**: 22-32.
28. D.R. Hewett, et al., FRA10B structure reveals common elements in repeat expansion and chromosomal fragile site genesis, *Mol. Cell* **1** (1998) 773–781.
29. Duman, R.S., Monteggia, L.M., 2006. A neurotrophic model for σ tres-related mood disorders. *Biol. Psychiatry* **59** (12), 1116–1127.
19. Durkin, S. G. & Glover, T. W. Chromosome fragile sites. *Annu. Rev. Genet.* **41**, 169–192 (2007).
30. Falls, W.A., Kogan, J.H., Silva, A.J., Willott, J.F., Carlson, S. & Turner, J.G. (2000) Fear-potentiated startle, but not prepulse inhibition of startle, is impaired in CREB α phadelta-/- mutant mice. *Behav Neurosci* **114**, 998± 1004.
28. Gao, G. & Smith, D. I. Very large common fragile site genes and their potential role in cancer development. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 4601–4615 (2014).
31. Giot L, Bader JS, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, et al. (2003) A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**: 1727-1736.
32. Golas MM, Sander B, Will CL, Lührmann R, Stark H (2003) Molecular architecture of the multiprotein splicing factor SF3b. *Science* **300** (5621): 980-4.
33. G.R. Sutherland, F. Hecht, *Fragile Sites on Human Chromosomes*, Oxford Univ. Press, New York, 1985.
34. G.R. Sutherland, Rare fragile sites, *Cytogenet. Genome Res.* **100** (2003) 77– 84.
35. Hegele A, Kamburov A, Grossmann A, Sourlis C, Wowro S, et al. (2012) Dynamic protein-protein interaction wiring of the human spliceosome. *Mol Cell* **45** (4): 567-80.
36. Hewett DR, Handt O, Hobson L, Mangelsdorf M, Eyre HJ, Baker E, Sutherland GR, Schuffenhauer S, Mao JI, Richards RI. “FRA10B structure reveals common elements in repeat expansion and chromosomal fragile site genesis.” *Mol Cell.* 1998 May; **1**(6):773-81.
37. Holmes, A. & Rodgers, R.J. (2001) Prior test experience abolishes the anxiolytic

efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. *Behav Brain Res* **122**, 159±167.

38. Holmes* A., C. C. Wrenn, A. P. Harris, K. E. Thayer and J. N. Crawley, Behavioral problems of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice, 2002

39. Imig J, Alexander Kanitz, André P Gerber (2012) RNA regulons and the RNA-protein interaction network. *Biomol concepts* 3(4):403-414.

40. International Mouse Knockout Consortium, Collins FS, Rossant J, Wurst W. A mouse for all reasons. *Cell* (2007) **128**(1):9–13. doi:10.1016/j.cell.2006.12.018

41. Iredale JP. Gene knockouts. *Mol. Pathol.* 1999;52:111–116

42. James L. J. Coleman 1,2, Karen Brennan 3, Tony Ngo 1,2, Poornima Balaji 1,2, Robert M. Graham 1,2* and Nicola J. Smith 1,2*, Rapid knockout and reporter mouse line generation and breeding colony establishment using eUCoMM conditional-ready embryonic stem cells: a case study, *Frontiers in Endocrinology*, June 2015

43. J. Ge'cz, The FMR2 gene, FRAXE and non-specific X-linked mental retardation: clinical and molecular aspects, *Ann. Hum. Genet.* 64 (2000) 95–106.

44. J.K. Nancarrow, et al., Implications of FRA16A structure for the mechanism of chromosomal fragile site genesis, *Science* 264 (1994) 1938–1941.

45. Jones C1, Slijepcevic P, Marsh S, Baker E, Langdon WY, Richards RI, Tunnacliffe A., *Hum Mol Genet.* 1994 Dec;3(12):2123-30., Physical linkage of the fragile site FRA11B and a Jacobsen syndrome chromosome deletion breakpoint in 11q23.3.

46. Jones C1, Penny L, Mattina T, Yu S, Baker E, Voullaire L, Langdon WY, Sutherland GR, Richards RI, Tunnacliffe A., *Nature.* 1995 Jul 13;376(6536):145-9., Association of a chromosome deletion syndrome with a fragile site within the proto-oncogene CBL2.

47. Kähkönen M, Tengström C, Alitalo T, Matilainen R, Kaski M, et al. (1989) Population cytogenetics of folate-sensitive fragile sites. II. Autosomal rare fragile sites. *Hum Genet* 82 : 3-8.

48. Knight SJ, Flannery AV, Hirst MC, Campbell L, Christodoulou Z, Phelps SR, Pointon J, Middleton-Price HR, Barnicoat A, Pembrey ME, et al. “Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation.” *Cell.* 1993 Jul 16; 74(1):127-34.

49. Kremer EJ1, Yu S, Pritchard M, Nagaraja R, Heitz D, Lynch M, Baker E, Hyland VJ, Little RD, Wada M, et al., *Am J Hum Genet.* 1991 Sep;49(3):656-61., Isolation of a human DNA sequence which spans the fragile X.

50. L.A. Galli-Taliadoros a, J.D. Sedgwick a, S.A. Wood b, H. Kijrner a,* , Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice, *Journal of Immunological Methods* 181, 1995

51. Lardelli RM, Thompson JX, Yates JR 3rd, Stevens SW (2010) Release of SF3 from the intron branchpoint activates the first step of pre-mRNA splicing. *RNA* 16: 516-528.

52. Lister, R.G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl.)* 92 (2), 180–185.

53. L. Lacombe, et al., Microsatellite instability and deletion analysis of chromosome 10 in human prostate cancer, *Int. J. Cancer* 69 (1996) 110 – 113.

54. Lukusa T, Fryns JP (2008) Human chromosome fragility. *Biochim Biophys Acta* 1779: 3-16.

55. Lydia Herzel, Diana S. M. Ottoz, Tara Alpert and Karla M. Neugebauer, Splicing and transcription touch base: co-transcriptional spliceosome assembly and function, 2017

56. Maita H, Kitaura H, Ariga H, Iguchi-Arigo SM (2005) Association of PAP-1 and Prp3p, the products of causative genes of dominant retinitis pigmentosa, in the tri-snRNP complex. *Exp Cell Res* 302 (1): 61-8.

57. Majzoub JA, Muglia LJ. Knockout Mice. *N Engl J Med.* 1996;334:904–7.

58. Mathis, C., Paul, S.M. & Crawley, J.N. (1995) Characterization of benzodiazepine-sensitive behaviors in the A/J and C57BL/6J inbred strains of mice. *Behav Genet* **24**, 171±180.

59. Mavrou A, Syrrou M, Tsenghi C, Metaxotou C (1991) Autosomal folate sensitive fragile sites in normal and mentally retarded individuals in Greece. *Am J Med Genet* 38: 437-439.
60. Metsu S1, Rooms L1, Rainger J2, Taylor MS2, Bengani H2, Wilson DI3, Chilamakuri CS4, Morrison H2, Vandeweyer G1, Reyniers E1, Douglas E5, Thompson G6, Haan E7, Gez J8, Fitzpatrick DR2, Kooy RF1., *PLoS Genet.* 2014 Apr 24;10(4):e1004242. doi: 10.1371/journal.pgen.1004242. eCollection 2014., FRA2A is a CGG repeat expansion associated with silencing of AFF3.
61. Moehle, E. A., Braberg, H., Krogan, N. J. & Guthrie, C. Adventures in time and space: splicing efficiency and RNA polymerase II elongation rate. *RNA Biol.* **11**, 313–319 (2014).
62. Montes M, Becerra S, Sánchez-Álvarez M, Suñé C (2012) Functional coupling of transcription and splicing. *Gene* 501 (2): 104-17.
63. Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N. & O'Keefe, J. (1982) Place navigation is impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**, 681±683.
64. Mullis, The unusual origin of the polymerase chain reaction., K.B. 1990
65. Mumby, D. G. et al. Ischemia-induced object-recognition defects in rats are attenuated by hippocampal ablation before or soon after ischemia. *Behav. Neurosci.* 110, 266±281 (1996).
66. Myhrer, T. Exploratory behavior and reaction to novelty in rats with hippocampal perforant path systems disrupted. *Behav. Neurosci.* 102, 356±362 (1988).
67. Naftelberg, S., Schor, I. E., Ast, G. & Kornblihtt, A. R. Regulation of alternative splicing through coupling with transcription and chromatin structure. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 165–198 (2015).
68. Nagy, A. *Genesis*, (2000), vol. 26, p99-109.
69. Noma Miura T¹, Furukawa TA³, Mitsuyasu H⁴, Tanaka S⁵, Stockton S⁶, Salanti G⁷, Motomura K⁴, Shimano-Katsuki S⁴, Leucht S⁸, Cipriani A⁹, Geddes JR⁶, Kanba S⁴., Comparative efficacy and tolerability of pharmacological treatments in the maintenance treatment of bipolar disorder: a systematic review and network meta-analysis. ,2014
70. Pasparakis M., et al., *Journal of Experimental Medicine*, (1996), vol. 184, p1397- 1411.
71. Parrish JE, Oostra BA, Verkerk AJ, Richards CS, Reynolds J, Spikes AS, Shaffer LG, Nelson DL. "Isolation of a GCC repeat showing expansion in FRAXF, a fragile site distal to FRAXA and FRAXE." *Nat Genet.* 1994 Nov;8(3):229-35.
72. P. Petit, J.P. Fryns, H. van den Berghe, F. Hecht, Population cytogenetics of autosomal fragile sites, *Clin. Genet.* 29 (1986) 96– 100.
73. Ragland RL, Glynn MW, Arlt MF, Glover TW (2008) Stably transfected common fragile site sequences exhibit instability at ectopic sites. *Genes Chromosomes Canc* 47: 860-872.
74. Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Maureen, K. & Tsien, J.Z. (2000) Enrichment promotes structural changes and rescues nonspatial memory deficits in CA1-NMDAR1-knockout mice. *Nature Neurosci.*, 3, 238–244.
75. Reed, J. M. & Squire, L. R. Impaired recognition memory in patients with lesions limited to the hippocampal formation. *Behav. Neurosci.* 111, 667±675 (1997).
76. Reisel, D., Bannerman, D.M., Schmitt, W.B., Deacon, R.M., Flint, J., Borchardt, T., Seeburg, P.H. & Rawlins, J.N. (2002) Spatial memory dissociations in mice lacking GluR1. *Nature Neurosci.*, 5, 868–873.
77. Reshmi G, Chandra SS, Babu VJ, Babu PS, Santhi WS, et al. (2011) Identification and analysis of novel microRNAs from fragile sites of human cervical cancer: computational and experimental approach. *Genomics* 97: 333-340.
78. Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, et al. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* (2000) **25**(2):139–40. doi:10.1038/75973
79. Rossi S, Sevigani C, Nnadi SC, Siracusa LD, Calin GA (2008) Cancer-associated genomic regions (CAGRs) and noncoding RNAs: bioinformatics and therapeutic implications. *Mamm Genome* 19: 526-540.
80. R. Siebert, et al., Deletions in the long arm of chromosome 10 in lymphomas with t(14;18): a pathogenetic role of the tumor suppressor genes PTEN/MMAC1 and MXI1? *Blood* 92 (1998) 4487– 4489.

- 81.** Ruiz-Herrera A, Robinson TJ (2007) Chromosomal instability in Afrotheria: fragile sites, evolutionary breakpoints and phylogenetic inference from genome sequence assemblies. *BMC Evol Biol* 7: 199.
- 82.** Saldi, T., Cortazar, M. A., Sheridan, R. M. & Bentley, D. L. Coupling of RNA polymerase II transcription elongation with pre-mRNA splicing. *J. Mol. Biol.* **428**, 2623–2635 (2016).
- 83.** Sarafidou T, Kahl C, Martinez-Garay I, Mangelsdorf M, Gesk S et al. (2004) Folate-sensitive fragile site *FRA10A* is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, *FRA10AC1*, encoding a nuclear protein. *Genomics* 84: 69-81.
- 84.** Sarafidou et al., Reconstruction of the experimentally deduced *FRA10AC* protein-protein interaction network, 2017
- 85.** Sasaki et al.:2013
- 86.** Schwenk F, Baron U, Rajewsky K. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* (1995) **23**(24):5080–1. doi:10.1093/nar/23.24.5080
- 87.** Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, et al. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* (2011) **474**(7351):337–42. doi:10.1038/nature10163
- 88.** S.K. Kim, et al., Identification of two distinct tumor-suppressor loci on the long arm of chromosome 10 in small cell lung cancer, *Oncogene* 17 (1998) 1749– 1753.
- 89.** Smith, D. I., Zhu, Y., McAvoy, S. & Kuhn, R. Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer. *Cancer Lett.* **232**, 48–57 (2006).
- 90.** Spartz AK, Herman RK, Shaw JE (2004) SMU-2 and SMU-1, *Caenorhabditis elegans* homologs of mammalian spliceosome-associated proteins RED and fSAP57, work together to affect splice site choice. *Mol Cell Biol* 24 (15): 6811-23.
- 91.** Steiner, R.A., Hohmann, J.G., Holmes, A., Wrenn, C.C., Cadd, G., Jureus, A., Clifton, D.K., Luo, M., Gutshall, M., Ma, S.Y., Mufson, E.J. & Crawley, J.N. (2001) Galanin transgenic mice display cognitive and neurochemical deficits characteristic of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 4184±4189.
- 92.** Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 85 (3), 367–370.
- 93.** Suckow MA, Danneman P, Brayton C. First ed. In: Suckow MA, editor. *The Laboratory Mouse*. CRC Press (2001). p. 1–5.
- 94.** Sutherland GR (1982) Heritable fragile sites on human chromosomes. VIII. Preliminary population cytogenetic data on the folic-acid-sensitive fragile sites. *Am J Hum Genet* 34: 452-458
- 95.** Sutherland GR (1985) Heritable fragile sites on human chromosomes. XII. Population cytogenetics. *Ann Hum Genet* 49: 153-161.
- 96.** Sutherland GR, Baker E (2000) The clinical significance of fragile sites on human chromosomes. *Clin Genet* 58: 157-61.
- 97.** S. Yu, et al., Human chromosomal fragile site FRA16B is an amplified AT-rich minisatellite repeat, *Cell* 88 (1997) 367– 374.
- 98.** Tang, Y., Shimizu, E., Rampon, C., Zhuo, M., Liu, G. & Tsien, J.Z. (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 401, 63–69.
- 99.** Tang, Y., Wang, H., Feng, R., Kyin, M. & Tsien, J.Z. (2001) Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology*, 41, 779–790.
- 100.** Theologia Sarafidou,a,1 Christina Kahl,b,1 Isabel Martinez-Garay,c,1 Marie Mangelsdorf,d,1, Stefan Gesk,b Elizabeth Baker,d et al., Folate-sensitive fragile site *FRA10A* is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, *FRA10AC1*, encoding a nuclear protein, *Genomics* 84 (2004)
- 101.** Thomas W. Glover^{1–3}, Thomas E. Wilson^{1,2} and Martin F. Arlt¹, Fragile sites in cancer: more than meets the eye, *NATURE REVIEWS*, VOLUME 17, AUGUST 2017
- 102.** Tilgner H, Knowles DG, Johnson R, Davis CA, Chakraborty S, et al. (2012) Deep

sequencing of subcellular RNA fractions shows splicing to be predominantly co-transcriptional in the human genome but inefficient for lncRNAs. *Genome Res* 22 (9): 1616-25.

103. Torres, R.M., et al., In *Laboratory protocols for conditional gene targeting*. Oxford University Press, New York, (1997), p. 32-48.

104. Tsien, J.Z. (2000) Building a brainier mouse. *Scientific Am.*, 282, 62–68.

105. Vogel G. A knockout award in medicine. *Science*. 2007;318:178–179.

106. Wallace, E. & Beggs, J. Extremely fast and incredibly close: co-transcriptional splicing in budding yeast. *RNA* **23**, 601–610 (2017).

107. Wang YH (2006) Chromatin structure of human chromosomal fragile sites. *Cancer Lett* 232: 70-78.

108. Will, C. L. & Lührmann, R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a003707 (2011).

109. Winnepeninckx B1, Debacker K, Ramsay J, Smeets D, Smits A, FitzPatrick DR, Kooy RF, Am J Hum Genet. 2007 Feb;80(2):221-31. Epub 2006 Dec 12. , CGG-repeat expansion in the DIP2B gene is associated with the fragile site FRA12A on chromosome 12q13.1.

110. Wu S, Romfo CM, Nilsen TW, Green MR (1999) Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature* 402(6763): 832-5.

111. Y. Pekarsky, A. Palamarchuk, K. Huebner, C.M. Croce, FHIT as tumor suppressor: mechanisms and therapeutic opportunities, *Cancer Biol. Ther.* 1 (2002) 232– 236.

112. Zambrowicz BP, Sands AT. Knockouts model the 100 best-selling drugs — 9.will they model the next 100? *Nature Rev.* 2003;2:38–51

➤ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

1. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

2. <https://www.mousephenotype.org/data/search/allele2?kw=%22FRA10Ac1%22#order>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Η γονιδιωματική αλληλουχία του ποντικού που περιέχει το αλληλόμορφο αγρίου τύπου για το γονίδιο *FRA10Ac1* από το NCBI με κωδικό καταχώρησης XM_006527335.3 είναι η εξής:

```
1  gtgataaggc agatctgagg ctgagctgct ggctgggcca ggatgctcgg tggaggcgtt
61  actaaggtta ctagagagag gaccgcaggt gacaggcggg gtttttctct atagcaatat
121 acattttcca atgaaggacg tgggctgggc agtgccacat tgtactacat attggattcc
181 ctagagghaaa aaggagatgg cccaaaaggaa aaatgaggga ccaaagcagg gagcctctgc
241 ttcctcttcc gggccttttc ttccgccgtc tttgtttacc cccgagccat tctggctgca
301 gcacagagtc ggcgcgcccg agaacggtgt cttatcgatg tgacacgcct ctgagccggg
361 ccggaagcgg ttcccagccg gtaccgtag ggccaggcgt gcagcgtgcg gtgacagtgg
421 cgcgggcggc ggcgctgctg ggctctggag gaccggcggc gacctgcagc ggctcgtgca
481 ggcctgggct cgtcgtgca gctgtcagga ctcttggggg cgaacttgcc agacagagaa
541 gagcggaaag gaagggtgtg taaaggaggg ccgtgggctg gtttgatctc agagaggact
601 ttgaaactgg ttcttagtag ttgagctca tttttatctt gacagattcg ggaggcagca
661 gatgccctat tctcgagatt ttcttaattc cagtcagttg atagcatgat ttgagtgaga
721 gcttttttagt gaagctactg ggttaagata gctcaaggga tggatgaagc tgcccagat
781 aaaaagaat gtggcgtcgg agcagagaag aggtgtctgg aatgaggggt caagatgac
841 tactagtctc aggttctact agtttcaggt ctctctgtac taggtaccgt ccccaacta
901 tgtaagcttg aggtttggc ttctttacat aacctctatg ttaaccttta cataagtggg
961 gaagtggag acgctctgt gccagccaga ccttagattc tgcaactgct ccaggctcca
1021 cactgcggtt ttccaccatc aatatatgaa gcacgtgagg atggattaga gggtagtaga
1081 atttgaacag ccttgatgag atctgctaaa aggtgtgacg tctaggtgta taaggcaatg
1141 atagctgtcg gtcaggaaga actgtggctt gcaaaccat gtctccaaag cttggctgtt
1201 gccttctctt tagcatttgg tgggataagg aagagaggta tatactcaca cgcccaagt
1261 tgaatatgga gttgcagaga ctcacagaat ttaatgatt gacatagcta ccttatttaa
1321 cagaatgaca aacagaaggt agtcaagaac gcagacactg gctatcctag cgtacttgc
1381 caacacagat gctaaagtta atgtctctt acctggactg ggtcctttca gcaataaaga
1441 ttgcaacca cctttacccc tattaatgtg tgttacgaat tctgtacact tactgacaca
1501 aataccaaag ctgaaaaata ttatcacttg acctggactg gctcctttca gctgcaggag
1561 ttgactattg atgatataca gtatgaaat catctgtacc cttgctcatg tgtgtccaa
1621 actctgtgta atgctggagt cagatgcctt ttcaggcaca actgacagct gaagcttttc
1681 agcaattcca agactatcca ctggaaaata ataagactga ctaagcctag gggtaaggaa
1741 acttagctta aggagcctc agctaaact catgcttaa aattaaggaa aaaaaattta
1801 atcagttgat aatgtactgt ttacaaacac taattctggc aagttgtgcc taatattccc
1861 aagagattgt tgaactggg gccttaagaa tcaagtagat tagtttaact acattttcat
1921 tcctaaaatg caagtactta tttttaactt gaaaaatcat aagcttata aaagtgccta
1981 tcaactgtgc tatgacaaaag taataatata gtcaccaggt gcttaataag agagacactt
2041 aaatacattt ctgcagctcc ttcattgttc aaacagcaga gagtatgctt ctacaatggt
2101 acagccatca aacacctcta ctacagacag ccccaact agtatcttct tagactatga
2161 acgtatatag catgttgttg caattattac tgtagataag tgtaatggta tttgcacagt
2221 taggcatagc tacaatgtag aaggatagat tgaagtacta agcaataatt tgtattttcc
2281 tccagtggtc tgtctgtggc tgaacatct ctaggggtg tggggtgtgt ggcacaaata
2341 aaagtgatgc actgtgtcc cttgcatgga gtcgcttgc aatatccagg cttaggttcc
2401 actggaagc cagtgactaa tgtccttatt ctcttattt caaaggatt aaagtgttag
2461 gtggtcgtg agaccagaga ccatgactg cccagcatga cttgtaaagc ttgtgctgt
2521 ttaagatcac ttaacttca tcttgtgtt tccctgagat ttggcagctc ggtccgcac
2581 ggctgacctc gcactcctt gcagatgcat gggcatggag gctatgactc tgattttagt
2641 gacgatgagc aaggcggagg ctccagcaaa aagaggaaga agtaagtctg ttgatccata
2701 gttcacactg tttctagacg gacatgaagt ataactaaat cctggaagg gtttgattg
2761 actttgcata tggaaacaac tgctgtagca agtgagggtt tattcattgc actgtaataa
2821 atggatttca gtttgagggt agttgtgggg aaaatgaagt tttgtgtgta aggagtttat
2881 tgaagggat agaggaaaaa ggaagattt ctctattgca tgttttttt tttgttttg
2941 tttgttttt tgttgtttgc ttttctattt gtttaagactg tgtgtctgca aatgtcacag
3001 cttaaaggag gcttgggtgc tgtttgtctt cccagtggag tgctcgtgga ggatgaattg
3061 taattcagaa cagttgtaat gttgacttga atgagcaggt cagagttggc aagaccaaga
3121 tcctctagca tacaagcct gggctcaca aagaggacac attttgttg ttgtgtcat
3181 tttgtttcc tgagacagtt ttattattta gttcaggcta tcctggaatt ccctatatag
3241 ccaggctgt cctaagacac agtctcttgc gtttagctt gaaagtgcgt gggttccagg
3301 tatgaactgc atgtccagct ggaggctaca tcttcacaaa attgctgtgt taggcccag
3361 tgtccttagc tttcagtgtc ttgaaatgtc atggatgta gtaacaggag ggctgtatc
3421 gtagtagcag gacttagaga agttggttta ttatccata gtgagactga tgtgttatca
3481 ctaactagga atgaacattt tataaaatcg gcagcttcta tcaataacag aagaatagta
3541 ataattatag caatgtatgt tttttagatt tctttcttcc tttcttctt ttttcttcc
3601 ttccttctc ccttcttcc ttccttctc ccttcttcc tttcttctt ttaaaagatt
```

Exon 1

Exon 2

3661 tacttatggt gtttatatga gtacactgta actgtcttca gacacaccag aagagggcat
3721 tggatcctat tacagattgt tgtgagccac tatgtagttg ctggaaattg gactcagaac
3781 ctctggaaga gcaatcagtg cccttaacca ctgagccatc tctccagccc tgtgttgttt
3841 tttttttttt agattttcat taagaacat tgctttctgg tctggggggg ggggggtgaa
3901 ctaagttagt ggaatgcttg cctaggatat aggacgccc ggttcagtc cctagctgt
3961 gtaaaacaaa gaaaagtgc acatgcctt tagaggcaga ttaaggagca tcaggaattc
4021 aggtttatcc ttgcttgtgt agtgatttcc gggctatctt gggctagtga ggatcctccc
4081 tcaaaagaaa tgatttatga atagaatttg agcagattta gttgggtact gtggcttagg
4141 gttctatgta tccatatcag taaggctgtt tgtctgtggc cagtgtcctc tatagtcaaa
4201 ctttcttttc catatttttt acctgttaaa tcttcattat ctctccttta gaggtaaata
4261 actagggtg gtaaagtgc aagtccgaa ctgagctagg aacctgctgc taagaactag
4321 ccattttctc ttatcttttc cttttataa gtagtataa aatgaaaga gcaaaatggt
4381 tcattaaaga tcagagacc attttaagt taagtcctta tttcatgtta gttacttttc
4441 tagttgtgag cctgttacc gacaagaaga aactgaaaga tttgcttttg gtcaagattt
4501 aagaaggggt acagtgagaa ggggttctta tggaggcagg ggcagtaagt agctgtcac
4561 attgtgtcta cagtccagag gccgagagca gatataaagt gaggccgggt tataaaatgt
4621 caatccatct gcagtgatcc acttcttcca gcaaggctct gccttcttaa gacagctgag
4681 gcagaggtca ctggcagaat acctgcagag ctgtcacaaa catgggaaga gttagacagc
4741 atccttcaag aaaaattaac ttttaacact tttttttttt actacaccag gacagtccaa
4801 gatgagttgc tgcttcaaaa accgtttcaa aaagaaaggc atggaaaggc ggccataaaa
4861 caagtcgccc cagacttgct cgacagtgtg ggcgctttgg tgctatgacg gacagccttt
4921 gcgttaagct cttttataat ctcataacct gtgggtttca ttatgttaat aaaatatggg
4981 ctttgaatt tacctaaact tcttttttaa acagggaaaga agcaagaat agaaggtttc
5041 atctcctagc tatggatgct gtatcctttt tatagtccta ttttcataac taatagaata
5101 ttttgcttgt tatccatggt ttctgacttt taaaaatcaa aatcttgca agttaaagtag
5161 actagtttta tttttacagg ttagtagtta ttgatataga aatttacgat ttgaattttc
5221 aggtgtaatt ctcttttgct aatataatag aaaaactaga ggtaaaaata atgaaataaa
5281 tactagtgt ggtctatata tagactttaa agtccaggaa cttaaaaggg ttcccacctg
5341 ttcttgcag gcttgcacac ttccccttac tgttctcgtc ttcttgaata tcattttaat
5401 tcactcccct cctacctggc tcttgactac tttaaatfff ctgcaaaact tctgttttaa
5461 aattaagtgt gtctgagtgc ctctctatg tgtgctgttg ctctgttctc cgggtatgac
5521 tgaagacttg agctgtgagt tagactgtca tgcaccgcta ctcggtatgt tagagaacag
5581 gagaggccag gcaagacctg agtgttcact cccaggtcag gactgaagag aggaagcacc
5641 aactagagt catctgatgc atttcacct cattcctttc ctttaagtta ctgtgttcta
5701 gatttttttt ttttaaaaat ctctcttacc tcctaatacca ttggaaactt accttagctt
5761 aatggtctta tctcccataa acatctatac atatgttctc ccttctctga cactctcatt
5821 gaggggtgta gtgcacctag cgagaataaa aatatagggt atagttttct gtcattggtag
5881 agagatctca tggctgagat ggtagagaa cccagtatft ttgggaagta ggcatagtgt
5941 tagctatagg agtagtcacc atcttaaaag ttagtgattt tgctaggtgt ggtacacacc
6001 ttcaatcca gcattcagaa ggcagaggct ggcagatgtc tgaatttgag gccagcatgg
6061 tctacatagt gagctccaag ctagccaagg ctacatagtg tgacctgtc taaaaacaaa
6121 aaacaaccaa ccaaccaaac ccaaaaacca aaatgttagt ggctatctta gttaaggttt
6181 catagtgaag ggacaacatg accaaggcaa atcttataaa aggaaaacat ttaattgggg
6241 ttggcttaca gttctagagg ttcatcctat tatcatcttg gtaggaatca tggcagctc
6301 cagagatcca tggctgaga gtagctgaga gttctacatc tgtcgtctcc caccctccct
6361 caccctctc cccgccaaca aggtttctct gtgtagccct ggctgtcctg gaactcactc
6421 ttagaccat gctggccttg aactcagaaa tctgcctgcc tctgcctccc aacactggg
6481 attaaagcgc tgcgccacca ctgcccagct aacttctaca tcttgatcct tgggaagcag
6541 aaggggattg atctcccaca aacaaccagg aggagaatgt cttccagact gggccagct
6601 tgagcatagg agacctcaa gccacactac attgtgacac acctgttcca acaaggctac
6661 atctcctcca gcaaggcga cctcctaata gtgccactct ctatggtcaa gcattcaaac
6721 catgaatata tgggggccac ccctattcag tccaccacag tagtctttta gagttgtaat
6781 tgtttcagtc tgtgtctgat ggtgttttta agttgctagc ctcaccacaa tgtctgggg
6841 agaataggca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaaaggaaa ggaaaaggaa aagggaaaga
6901 aaaagaaaaa gaaaaaaaaa cccggggaat gaatgtagtt cagtacacgg gcagtcctg
6961 gtgtgccttt taaccaccga ctttcacagg cttgtatttg ttacatatga tgcccaaagt
7021 gggactcgtt agtttaaga gtaggagga ggaatagggt tttgtctact ccttctctg
7081 gaagccaaac tctcactgcc atctgtttt ttgctcaagg aaaagtgtg ttaaccacag
7141 ccctgcctgt tgcctatgac tgcctcatgt tacagtagca gagctgagca gtaacggcag
7201 aaaccactag gctgcgaagc ctgtaaaatt tgtcttctag ctcttacag aaaaaatta
7261 gcatttttaa cagcttgccc gtttagtggg agttggagag ttcaaaccca ggcctgagg
7321 tgtttgtcta cctcccact caatttcag ttcttataa taagtactct aattctaatt
7381 attataaatt agcatacact gtgattaggg gaattactat gcctataagg gtgtggctag
7441 ttaggttag acagttcacc ttgactgtgc ttgagtatgg agagtgtgc ctgtgttta
7501 aaagaaacac caggtgttca tatacttctg tattgtgat gaaaaatata catagtgtg
7561 tagattctct gaatattaaa aagaaaagaa aaatcttact gtggtttatt ttttctatt
7621 tcttttctat ttgagacact ctcttacct aaggcccagg ctggccagga aatctgtgtg
7681 ctctctctgc ctccacctct tgaatgctag tacgataagg gtgagccact acacctctc

Exon 3

Exon 4

7741	tctgacttct	tggcggtg	tggcggtcc	tctcctctt	cctccttctc	cttcttcttc	
7801	agatttattt	atcttcttca	tgtatatgag	tacacactat	aactgtacag	atatttgtaa	
7861	gccttcatct	ggttggtgag	aattgaattt	aggacctctg	ttcactccgg	tcaacctctg	
7921	tccctccggt	gggccccact	cactctggcc	caaacattta	tagactatgt	ttgaacactg	
7981	tgccagtcct	cagacaacc	agaagagga	gtcagatctc	attatagtg	ttgtgagcc	
8041	accatgtgat	tgctaggatt	tgaactcagg	acctttggaa	gagcagtcag	tgcttttacc	
8101	tgctgagcca	tctcaccagc	ctctctctgg	cttcttatgt	tggtttttat	ttttgaaacc	Primer F1'
8161	taaatgtda	tggcatttaa	ttttataaac	atctcctatt	tttatatact	ttattattaa	
8221	ttattacatt	gtataacagt	agaagataaa	ttttaatttt	ttatctttaa	tttagaagcc	
8281	gcagtttatt	tgtaatatta	ttattagact	gaataaaaaga	ataaagctgt	gtgcagtcta	
8341	gaagcagact	agaaagctcc	ctctttcccc	tggtggttat	atatttttat	cccaagaata	
8401	atgtattcat	gaaaaagatt	ccaaacattt	taggtaatac	atgcttgaaa	gattttcagc	
8461	agaaagtgaa	agtctgctgt	gtagtgtctg	tacatgattt	acacatttaa	aaatgataga	
8521	ctcataccat	gctttctttt	tatttaatat	tatgttacag	tggaacaact	tctgaacagt	
8581	tacagaagtc	cttaatgttt	tgcatctcag	tatcaaaggc	acaccaagtt	tgtaaacgac	Exon 5
8641	tatattttgt	actatggtgg	caaaagagag	gactttaagc	ggttggggt	agatttgtca	
8701	agttcacatg	gcacggttag	gcaagtacaa	atgattttct	aggccctggt	gtaactttct	
8761	tggcgacag	agcattctca	tgattgaacc	agggtgtgat	ctggtaagag	cagtacactt	
8821	ggccaatgct	ttgtgtcttg	ttgaatgaga	ccattgaaac	gacgacacac	ttagactata	
8881	gtgtccagga	ttgcttttgc	aaaattaaag	caatgtccaa	aagactcccc	aaatataggc	
8941	tattgcccgt	gccctggttg	ctccctaggc	attgaagata	agtcctactg	ctgaggacac	
9001	caga	cacttg	acataggatt	cagatgad	ct	gagatgtctg	Primer R1'
9061	agggctacct	ttcctggtac	aattgaaaa	gtagccagga	tgggctgggt	agatggctca	
9121	gtgggtaaga	gcaccgact	gctcttccga	aggctcagag	ttcaaatccc	agcaaccaca	
9181	tgggtgctta	caaccatccc	gtaacgatat	ctgatgcctc	cttctggagt	gtctgaatac	
9241	agctacagt	tacttacata	taataaataa	ataaatcttt	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	
9301	aaaaaaaaaa	agaaaaagta	gccaggaatt	tgagagcaat	ggagagggt	tctgagagg	
9361	gttggaggaa	gaaaagatag	gatagaagt	atgtaataac	atttataatc	taaaaaagta	
9421	aacatgttat	ttaaaaaaaaa	aagcaagcag	gaaacttcac	ataaaaaata	ttcctgtgtc	
9481	gaggetgttg	tcttgcatgg	attcttctct	gatttactat	ctgagttagt	agggccctaa	
9541	cgaatttaac	tattatttaa	tttaatagtt	aaattagcta	ccccatttct	atcttccctc	
9601	gtccactgag	cccatactgc	tcaaagtgtt	cttccacttc	ctagctgagc	atctttattt	
9661	tctcctgcc	tttattggtc	tttattagta	acatgatgta	aaatcgcata	ttactgagag	
9721	ctcgttactt	ggatctactc	tgaacttgt	tctcactcac	atcttctcac	tcagagtctg	
9781	gttgagcttc	tgtgtccttg	ttttgcaac	aaagcccat	ctgtataact	gacctactgt	
9841	agggttgagt	ggatctgctt	ctctatggaa	ctcactcctt	tcttgcaagt	ttttcttaag	
9901	taccttctga	aaatattgaa	tattttttat	ataaaaaatt	ccaaattgaa	gtatactttt	
9961	atthtatatt	ttattcaagt	tttttcaaaa	ctttcagcaa	tgtttgacct	aaatttgact	
10021	aatttttaatt	ttatattaaa	ttaaaatttt	tatattctag	ggagaatgat	aagacagatc	Exon 6
10081	tggatgttat	acgagaaaa	catagattcc	tttggaatga	ggaggatgaa	gcagatatga	
10141	cttgtaatt	ttacttgatt	atthatttgt	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	
10201	tgtggagggc	agaggacaac	ttgtaagagg	ggttctgttc	tttaccatg	agcttctcag	
10261	ggctgaaacg	caggtcatca	gaattggtgg	caggagcctt	tactaattag	agtgtcttgc	
10321	cagtcctgaga	cttggtgatt	ttagccaata	gcgtctaag	gaacaagtgt	tatagctctg	
10381	tcttttttat	tctatagtgt	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtaggaact	cttagagcc	
10441	agaggagggc	atcagattgt	ccagatctgt	aagtacagga	ggttgtgagc	cacctcagc	
10501	gggtgctcag	atctgaacta	aggctttttg	aaaaacaaca	catgctctta	acaacctgga	
10561	gccatctctc	cagctccaat	atgtattgtc	ttaatcatca	tttatacagg	tgttcagctc	
10621	tttcatagac	agtttctgaa	ggatagaaac	ctacatttat	gactcctgat	tctggtttgc	
10681	ttccttgggt	aatctttggt	aatttaatta	acttgaatt	gtttgaccca	gtcttcaaaa	
10741	ataaattatg	tactgtttgt	tgtcttataa	taagcaattg	tatgttctct	ataaaatggt	
10801	ttgaataaatt	tggaaaaaca	aaatacatga	aagtgtttt	caaagtcaga	catcactgag	
10861	ggtaataagt	gaagagtaat	tctccatctc	attctctgag	agccgccatt	aacaaacagg	
10921	tcatctctag	acagtcgtca	catctgtcta	tattaggcat	ctcttagcat	taatatttat	
10981	agcatatag	tatcacctat	ttgatatttc	ttccaagtaa	caaactgttg	ttggatttct	
11041	gaatataata	tacatacttt	ttatgaattt	agggagaaga	gacttgcaaa	gaaatactat	Exon 7
11101	gataaattat	tcaaggaata	ctgcatagct	gatctcagta	gatacaaaaga	aaataag	gta
11161	tgccctagga	atattttacag	tggcgctctc	tgttcaacta	cagcatcaat	ttttattaac	
11221	tacctgacc	cacattactc	tttctgtggc	ctgatttgaa	tctgttatct	tgcactttga	
11281	gtatcatttt	gaccacttac	cctctgtggt	catggggttt	aaagggtcta	taggatttat	
11341	gaaggacaag	tgctttgtgt	ttgtgagatc	atctataaaa	ggctaaaatt	acacagttgg	
11401	caactagatt	ccatccgggc	tgtcatcttg	agcctctagt	gattaaacac	tttagaatga	
11461	tgtctcattt	catagatcat	gctttaaatc	agcagttttt	tgattgattg	ccatttatgg	
11521	agtggcagat	acattttttt	tctacataaa	atatttctat	tttggtaaaa	ttaactttca	
11581	gtcaatgcta	attagtagtg	gcagattccc	atctccacat	tacatcttta	gttaatatta	
11641	aagcaatttt	tattccttagc	tcaactcca	ttggaactag	agaaggtaat	ccaagaatgg	
11701	atgatcttca	gttggaaatg	ttaaaaggac	tgagtggcta	tttgatttct	actaagaaaa	
11761	aaaatccatt	tataaacaac	tatctaaaag	aaattctaag	gatttctttt	tattttatta	

11821 ttttgatttc ttttagttgt gagttgtttt ctagtctgt acagacagta gcaataatta
11881 ccttgcatat tcctgatata aatctatgtg gttgggtag accaaagact tctcagtcc
11941 ttacaaacta gttgtgaatg ctattgcata gcacttgtct gtaccagcga attaccatag
12001 taactagtct ggagtcagca caaccacctg gatggagtgt cttgtaatta ctgacagta
12061 agccaagtct gaaatacctt tctagccctg tgtggcaag tagattgcca ccagtgatt
12121 tttttttttt ttaatgatac actccagtat ttatcgaaat tggactgcac cctctatggc
12181 tgcggctctg atgggtgtga tgggtgtatac ctgtggtctc atcaettgag gcagtagcag
12241 gattgtgaag tcatgactag ctgaggctgc agagcaagt ttgagggaga tactgtctca
12301 aaaaaaatgt agtctagcta aggagaacag ataattcaca agagtgttta aagtctccat
12361 tttaaaaata ctactagaat tagggagctg gaaagatggc tcagtggtta ggagtgtctg
12421 ctgaggagtc ataaggacct gaggacgaga gtttgattt cagcaccat gtaacaaggc
12481 aggcaaccac acatatgtaa atacacacac acacacctgta gtaacagcct
12541 ggatgtagtc agagatagga ggatctctag gacttgctag cctctatcct agctccact
12601 cccagcaaaa ttgcaagcct gagggtcagg gagagaactt acttcaaaga ataggtaaagg
12661 gtacgttaga cacctcagac actctctctg ctctctatg tgcactgact cgtgtgactg
12721 tctttttttt ttcttccact ttttaaaatc tatttagaat attaaactg atagaagtag
12781 aagaaaatct cttatgaagt tctctatgaa aggaaattgt gacaagtctc tggtagaca
12841 gaaactgttc catctgcaag ggagaatata cagcttaact gaatgaactt ggtagtgttc
12901 tctctgtttc tattttgtgg aatagtttga agagtattgg tattaggctc cctttgaagg
12961 tctgatagaa ttctgcgcta aactgtctgg tcttgggctt tttttggtta ggagactttt
13021 aaagactgct tctatattgt tacaggttat gggactgttt aggtggttta tctgatcctg
13081 atttaactct ggtacttggg atctgtctag aaagtgttcc atttcatcca gattttccag
13141 ttttattgag ttttaggtct tgtagtagga tctgatgatt ttttaaatat cctgggcttc
13201 tgatgttata tctccctttt catttctgat tttgttaatt tgaatactgt ctctgtgcc
13261 tctgttagt ctgactaagg gtcaatctat cttttgattt ttctcaaaga actagctccc
13321 agttttgttg atctttggat agttctgttt gtttccactt ggttgatttc agcctgagt
13381 ttgattattt cctgccatct actcctcttg ggtgaatttg cttctttctg ttctagagca
13441 ttcaggtgtg ctgttaagct tctagtgtat gctctctcca gtttctttt ggaggactc
13501 aagttatgag ttttccctt accagtcctt tcattgtgtc ccataagttt gagtattttg
13561 tgcctttatt ttcattaat tctaaagtct ttaatttctt tatttcttc ttgaccaagt
13621 gatcttagag cagtgcattg ttcagcttcc atgtatatgt gggcttctg ttgctttat
13681 tgctattgaa gaccagcctt agccttggtta tcttctgcac ctgagattct ctctctatc
13741 tcttgatttc tgttggtgat gcttgcatca atgtctctg atctcttcc taggttttct
13801 atctccaggg ttgtctccct ttgtgatttc tttattgttt ctatttccat ttttagatcc
13861 tggatgtttt tgttcaatc tttcacatgt ttggtgtgt tttttctaa ttctataagg
13921 gattttgtg ttacatctt aagggtctt acctgtttac cttgttctc ctgtatttct
13981 ttaagggagt tatttatatc ctacttaaag tctctatca tcatcatgag atgtgatttt
14041 aaatcagagt cttgctttc tttgtgttg ggtatccag ggtctctgt ggtggagaa
14101 ctggattctg aagggtccaa gttagccttg tttctgttg tctgttctt atgcttgct
14161 cttgccatct ggttatctct ggtgttagct ggtcttgctg tctgtgactg tggctgtcc
14221 ctccagcaag cctaggtgtc aatactctg ggagaccagt tcttctctg aggaatttag
14281 gtatggagag ctgtgttaca ggggtggctc tgggtacat tcagaaacca gaaggatcct
14341 gtcccggcta ctccatggg tctgattga tggctatggg tgggtctctc ttgggccaga
14401 aatttgaaca gaaatggtyg tcttacctg aatcataggt gtgtcggc acctgggaga
14461 ccagctctct cctggcagta tttggtagt gagcactgtg gcacagagtc agctcctggc
14521 acagacagaa actggaagga tctgtctct ggctgtctc cagtcttctg gtctgaggg
14581 ctccaggagg gtccctctga gcagaagtgg tgactatctt aagaagagta atttgatag
14641 atgttatgtt ttgttagaac atggtaactg catgtgaaaa gaagataggt gataataaga
14701 aacgaaacat gacttgggtt tgagtgtgga aatgagagaa caggaagttt ggaggggcta
14761 tgtttggaac atgtaatagc tctgttctt agcataccat gtttgacatg ttgaaaaag
14821 tttagcttac atcatgctt cagagttagg atgctgtttt ctcttagctt catttacaca
14881 gatagtactt tattcacttt aattaagcag gtcttaatta attagttaat cagtgcctac
14941 tgtacatagc agagccttaa ggcacgtcta gtgactctt ctttgcctg tgttctgtt
15001 ctttctttg aaaactttt atgtttgagg ctgtatttga gttctatga gccactagga
15061 aaggagaagt gggataagaa aaaagaaaa aactgtctt aaatgagcca aaagctattt
15121 ttcttttaca gaaagtccca gtatgctgt gttgcaggaa gcaggattca ggaccaagcc
15181 ctgagtaact gcagctgga tccatgaga agaactggg ttgggaaag atataaggag
15241 acagagttta caaagtggga cagtgtagtc tcttactccc cataagatta taacttctc
15301 cgtgatggat agtgcctgt aaagctttt ttattttgt tttatgtata tcaatgtttg
15361 cctgcacatg tatgtgtact gcatgggtgt attgtgctg tggggaccag aagaaggtgt
15421 cagatgccc cgtactggag gaatagatgg ttgtgatgca ctctatgcat attggagtc
15481 aaaccctgg cttctgcagc agcactaagc gctcttaaac agctgagcca tttctccagt
15541 cctgaaatac aagtccaata agtagttct taaatagatg aatgaatgaa agaaaaggct
15601 tggaaaaact ttgtagtaa tacagtgcac tttgtgctt agtagacat gcaagacaat
15661 tggggatggc atgtaatctc tagacacaga tataactaa agcataaaat gaaagggagt
15721 cactttaaaa tttttacttc ctttttttga tacttattta ttctactccc ccccatagac
15781 atggggaatt ttatttttat ttgcatttta actagaatgt tttgacattt tttgaaattt
15841 ttgtatgaat ttaagatata aatttgaaaa attaagaaat ggatgattta aaacttgaat

15901 attaataaga aattgaatgt tttatctgaa ttatttatat ttttcccctt taaaaaatgt
15961 gtatggctgt tttgcctgca tgtctatctg tgtaccacat gtgtgacgtg cctgtggagg
16021 aaggaagatg tcagctcctc tgagctagag ttgtaggtag ttgtgagcca ccacataggg
16081 gctgagactt aagcctgggc gctgagcagta gcagccagtg ctcttacata ccgagccatc
16141 tctccagcct tctgaattct ctctgtagtac actgagctc aggggtaaga tattgaagta
16201 atacccttgg ccataaccac agcccctgtt cttgttaata ctgtatacta cgcatagatg
16261 ttatatgcag atgttatcct gttcttggtt atctgtatac tacgcataga tgttatatgc
16321 agatgttatc ctgttcttgt taatctgtat actacgcata gatgttatat gcagatgtta
16381 tcctgttctt gtttaactctg tatactatgc atagatgtta tacgcagatg ttatcctggt
16441 cttgttaata ctgtatacta tgcataagatg ttatacgcag atgttatcct gttcttggtt
16501 ataactgata ctacgcatag atgttatatg cagatgttat cctgttcttg ttaactgtta
16561 tactacgcat agatgttata tacagatggt atcctgttct tgttaactct gtatactacg
16621 catagatggt atatgcagat gttatcctgt tcttggttaat actgtatact acgcatagat
16681 gttatatgca gatgttatcc tgttcttggt aatactgtat actacgcata gatgttatat
16741 gcagatgtta tcctgttctt gtttaactctg tatactacgc atagatgtta tatacagatg
16801 ttatcctggt cttgttaata ctgtatacaa cgcatagatg ttatatacag atgttatcct
16861 gttcttggtt aactgtgata ctacgcatag atgttatatg cagatgttat cctgttcttg
16921 ataactgtgt aactgtgca tagatgttat atgcagatgt tatcctgctt caactcctgt
16981 agattttagg ttttttaaaa gtcattttta acagaagttg gtaattgtca ggagatattc
17041 ttaagttctg taaaaagaga aaaagccatc aactgatag ttaagtttat ttttcaggct
17101 gaaaacgtca ccaacctgg ctttgtggtt agattgttac atatatattt taaaatttg
17161 aatttacatt ttttttatat aaatgtactt ttttttttt ttaaccagt ttggatttag
17221 gtggcgaata gaaaaagaag taatttcagg aaaa gtaaac tttttaaaa ttttacttt
17281 ctaattgatc acagtttact ttgttatata gaattgaaat caccaggtga gaatttttc
17341 ttataaaaat aaagtttggg aaaaatgtat ttctgatata tatgttggtta gcaaagatca
17401 gaatttaatg ctttcatgac ttctttagaa tttggctcct agaatatttg aggatattg
17461 gacaatgttt taagaattaa agatttagta acaaggaaca agtgcttgat tatcaattat
17521 aacaaaatat tgatagtact gcattccaac aaaaatcatt attttgaaga tgttaaatat
17581 cattcgtgaa cccaatagag ttgcaactcca gctccaggga tcgggagccc tcttctgacc
17641 gctcccggca ccgcgcctga cgtgcacgga tatgagtggc aggggtgttt tctgtgactg
17701 ataaaggctc tgtagagggg agggaaaggg gatgaattta aagcagctct ctttgggtc
17761 agtgaggcgg ttggtggcta aggcacagtg ccacaccagc ctagcaactt cattccaatc
17821 cctcaagcta gagttaaagg agagaacaca ctcaacagaa ttgtcctctg aactctacat
17881 gcatgcacgc gtgtgtgctc aagcacacac acacatgccg tgcacacaca atattaaata
17941 tactttttgg gttttgtttt tcaagacagg gtttttccgt gtacccctgg ctgtcctgga
18001 gcttgcctct tgaatgaggc tgggcaggaa cttgatcctc ctacctctgc ttcttgagt
18061 ttgagattaa aggtgggac cactgccacc accatcccc gctccctatc cccctactc
18121 cccaccacca gctaagtaaa ctttttaaaa aataaggcaa ttcaaaagt ttttaagg
18181 catgttttat tttgtatctt tacctaaaat tatgagatat ctgagatgtc actagtaaaa
18241 atatctgtat taattttgtc aagtgaatt tttaggagag tatataaaac tgcttttaa
18301 aaaatggcag gctgccggcc gtgggtggcc acgccttaa tcccaggag gcagaggcag
18361 gcggtttct gagttcagag ccagcctggt ctacagatg agttccaagga cagccagagc
18421 tataaagaga aacctgtct cgaaaaacca aaaaaaaaa aaaaaaaaa aatggcaggc
18481 attcttaag ttcttaaatg aatataggac tagtgggaa gcagagaaca agctgttgc
18541 ctgtttaaac agtgttggc ttctgtttta acagacatta ctaaacatgc taaacatgct
18601 taattaatta gcttttcatt tgggataact tgtacaataa ttctgtgact tccttacata
18661 cttcatggca tgacatgtat gtatacacac aatagataga tagatgcata catacataca
18721 tacatgcatg cagaaagtgt gttttaagtt caagtctcc tctgctacat gataagctg
18781 aggttagtct ggggcacata tgctagatcc tgggtgcagac gactgagtta caaatcagcc
18841 tttggatgct gatgttagag tttcattttg gcagctttt gcattttatg aaaaagaatt
18901 tatggttctc atttgttact cttggtcaa attattgtgg tggaaattgt tctttgtata
18961 aatcattttt attttctctt tctctttttc tgccaaaata gttttgagtt gtgcttatgt
19021 ccaaatcatt tttttgtcct tagaagttt tagatagaat tttatgtaa tgatataatt
19081 gaaaacatta atttaacatt tagctaaata ctgaaaggac tgacatctaa gagcatgtct
19141 tttgggaaat gatctctttc aggttttag ttagtacact tactatttca ctttctaaag
19201 tgtaagattc tctaatatgg actcactaaa atttacttta aataaacagt ttaccaacag
19261 gaattgtgtg ccagcttttg ttttaagagt tcagctcttt agcttggctc ggtggcacag
19321 tctcatggtc ccagctacc tgggtggtt tgcaattcag tgcactcctt tctgacctt tagaacaagt
19381 tctaggccag cttaggcaat gtggcaagca agcaagaaat aataatagt tttttgtttg
19441 tttgttttaa gacttaattg taaaacaac actttgcatg cagaggtcc tgggttcagt
19501 cccactgta gaaggaaaa agcatctctc tgatttcata tttcaatata tgcatgctat
19561 agttattgtg gtcattcatt ttcatgtcga ctttgtattg aatttattat atttatttta
19621 taatttttaa aggaaaatt tagagtaat agtttcttgt aggtgactcc tatcatgtac
19681 tttgggtgac agtccttttc ttttgcaggc cagttttttt gtggaaataa atgtttgta
19741 gaaaaagaag gctgaggag ctgggaagtc aacttcggtt aactgagca cgggaaag
19801 agaaacgcac ttgttaatt aagt aagacg tgttcagtgg atttcttcca attttacct
19861 gaatttagaa ctgaaaaaaa tgtatgtact atttatattt aaaagatttg gtatattttc
19921 ctgaaagtat actttttccc tgtagtttcc ccaaacctca aataaaattt gaactaaag

Exon 8

Exon 9

19981 tcttttagcat tatggaagcg ctttgataag acaattctaa tgtcagattt cagctggtaa
20041 cttgtagagt catctgttac aagcttgagg atggcactag attaggagtc taagtacagag
20101 tatcagaag gacagttaga cctcacatct gattgtgtag ccgtaattat cagcaataaa
20161 tacatthtct ttctgacagt gagtgaagat tttggaaaaa tatcctthta aaaaagthtt
20221 tacgtaacta acttaataatt aatthtactt aataatgagt ttcactatgt cactthctatg
20281 tatgtacaca cacacacaca cacacgtaca catatgctat ttactctctc ttgtcccctc
20341 atacactgat cccctthttc ttctcatta gtcctcatgt gtgtgtctgt gtgtgtctgt
20401 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgacc caataagtgt agttagggtt acttacgagg
20461 tgagggatta tttacaggac ccacttacca gttgctctac acctgaagaa atcttcagga
20521 gtacagagtc tcacgaatct cccccaactc cacaatgatg gactgttcat gcatttaata
20581 gtctgaaggt ttatacaag taatcacag tgctgagaat tcaaggctgt agtagttatg
20641 tcatgctcag aggacagagt tatgtgacgc actgtgctac ctctgggtct tctthttct
20701 thttthcttc tgctthctca ctgtagatgt tccctgagcc ttggaggctc taatataggt
20761 gccctagtaa gagctgagcc agttatthct agcacttga ctagtattga gtctctgcac
20821 taataactgc actcataatt gtctctcact gcaaaaaagt tgagcctagc accatthctgg
20881 gtaattagga gactatthga caaccacacc agactatthta ggaaagcagt agcaatagct
20941 tccatactag gaccagccac aagccctgta ccagatthgg agtaagatth ccagactthc
21001 atgtgactt cctcctgtag agtgagcctt aaataccatc cagagtatth ggttaccoca
21061 taacagtcac gccactatca caccagtggg caggcacatc ttgtctggga gatgggtgtg
21121 ctaacatgaa ggattctgtg ctgagcaaga ccattgatga caactctccc agaaccctc
21181 gcacagtacc thctggcact gtgaaagcta atctctagag aggaagcttc cagctccatt
21241 tcctthgtct ctcacacaag caaagcatat ggtatcttca attgctgtgt ctctctggc
21301 thctaathgg caactaatgg ccctagcacc agtcatgtgt gthtaaaagt atagagatga
21361 gctagtaca tggthcagtg ggtgaggtac ctgctacca gcttgacatc ttgaattht
21421 tccctggagc ccacaatgtg gaaggagaca acagaccatg taaactgtcc tcagacctc
21481 atacactcat cgcactcact gtgggtgatg cacatcccct cgccacaaag taataccat
21541 gtaattagga aacagtgtag agggactgga gagatggctt agaggtcagg agcattggct
21601 gctcttgcaa atgaccaggt thtgatthcc gtagccacat gatgatcac agccactgt
21661 aactccagtt ccaggggagc cagtaccctc ttggcctcca cagtgagctt gtatgcacat
21721 gtccaggcat gtgtgtagac aaaacactca tacatataac thtaaaaaa aagaaaaag
21781 attagagata aatgthactt tgagtthgtt tctctctgag thctcaaca ttgtctatth
21841 aagaccaggt ctctgtgta acctagagct caccagcaga cagcagttgc ctatagccat
21901 ggtthacagt gthaccctgc ththththta aatthgtthta catctthcag ttgtctgctt
21961 gctcccctcc tgcctcccct cctcgtctc tcccctccc gctcccctcc tcccctccc
22021 cctcccctcc thctcccctt cctcccctcc thctctcctt ccatttatga ccatcagctt
22081 thctggctct gtaataaatc thcagattht cagtctcctc ctgatagtac agatthgtht
22141 ctgtgagctc ctctgatag tacagattht thctgtgag ctctcttag aagcactgt
22201 ctggaaaaag cagccagtht ggaatgagc tagggaaaaa agthththt atgtgattct
22261 cthctgttht acttgaaagt ththaacact tcagaggaga tggctaaacc caaataata
22321 tcatcatcat cattatcatt attatataca tattattaca tcatgttata ttaagagaga
22381 tctthgatgt cagatactaa ththgtctat gaaacacaat ggataaaact ththctaacg
22441 tacctthaaa acaacattht catatgtaac agggctgaca catatataaa ctcacaaaga
22501 cagcatatat aagaccagca caagthcaaa ccagatagaa tcccagcacc tacatgggaa
22561 agtgggtaca ttaagcagga agaagthgt gattggtagc tgctgggaaa aggaaaaaa
22621 taagththct ttaatgagtg atactththt ththcaaaag agagagaaaa tatgaatgg
22681 ggtggatagg gaggggatc ttggaggaac tgagggaagg gagagagtat gatcaaatat
22741 atgtatgaa aaaaaatct caaacatgt aatataatth tagatatact gthtagatth
22801 thctthgta thattctctg tgtatagtaa gggatagaaa gaacatggga aattataat
22861 aaaatatata gagthgcaat ataattcac ggattcagaa gctcagthgt ataththt
22921 tctthtagga thatgccaag aatgthcctt thaaatthaa thctatcaca gthaattht
22981 thctththaa atatcathth taatgthtag taactthggc catactcatt thctacact
23041 gagtgtctaa atctcaatth ggaathgga thththtaga acatagagca ctattgtatg
23101 atccatggaa ttggagatth actctgccct catcaagcca agcaagthta tatgthaaagg
23161 tctgtgtggg gcgatagatg cctgtgtgta atthggagcc aacgactaga cactgthata
23221 gtcctagaaa tgatattata aagctggctg cataaactgg agcatgctg catgctgcc
23281 tgcgtgagtg tgtgcccacg cgtthcttag gcagctaaaag gaggacactg agtthgtg
23341 thctgtctt thccccgtt actcactthaa acaagthct ctgththaa ctgthctg
23401 ccatththga ctagtctgac tggtaagccc cagcaatgth ctgtctthg gtctccact
23461 thctgtccct aagcactgag atththggcg aacatgthca cagctgacat thatgtgtht
23521 ctgggattc agatthcaat cccctgtht gcattgcaga ctctcttacc caggcatctt
23581 taagtcactc ggagtgtgtc tgctatgtg aatthaggag gccactggtc tgcacatgc
23641 cthctatgtg agatcattgg thctgththt atthththt thgtctgtht ththththt
23701 ththththt cgatththtag gaagactgcc thcagthct aatgctctg aggtagctt
23761 cacatthgtg atthctctgt ctcagctctc tgagtgtgt ctgggtht atgccaacac
23821 ccgctthatt aagththtagg ataagcatgt ctacatgtg thctagctac tacaataaa
23881 cagtacatth tcaaaaccag caggattht thtgthacta gaatggccag ccaaacctt
23941 aatthcttht thctgttagt gatgctgaga gattgaaagt atththgtgac thctcttht
24001 gagtgacatt tcagaatgta aatgactthg ataaaaaac aatthaggat aatgactatg

Exon 10

24061 cccgcatgaa agcatctgca tgggtatctt aaccagaagt cagctgagca aatatttgag
 24121 agctgttttt ccaggtttct ttccttaagc aattaagatg aattgttttc acctgctgta
 24181 ctgaccagca gctgttggtc taaatctggc ctagaaaagg taaagccaga gcactaggaa
 24241 ggtaaactag gagctgtcta acgttgacat cggagttcag agtacgtact tttagctcca
 24301 tccctggata tgtttactat ggtctctggt ctgagaggag agcatcctct ctctctgtg
 24361 aattagatcc attatagccc ttgcttctcc agtgctcact ggatagagt tacgtgctag
 24421 gaaagggagt ggacataaaa agtgcactgt ttgtgtagag aatttacaaa atagctcttt
 24481 gtgtctgitt aggctttatc atcttacaga attatcttaa tttatatatc gacctaaaat
 24541 atttgcatac tctagcatgg cagtgtgggc acataccttt tctcccagca ctctggagac
 24601 agacacaggt ggatgaacct ctgtgagtc agcctggctc acagagttag tttcagtaca
 24661 actaagatta tatggggata ctgatactca aaaaaataag gaataaaaaa aaattacata
 24721 ctctttcaag gttccttatg atatacattc tatggacttt aactgttttc ttttaattcaa
 24781 acatttttat ggaatctggt gaaaaaatta acttcagtat tatgttgitt aacatgaagg
 24841 agaaaagaaa tcaagtcaac aaagaaaaag tctaaaacca cgcctgagtg tgacgagtca
 24901 cctcgtaaaga aatccagatc gccaccttca gaggaagctt ccaaggggaa ggatgaagg
 24961 aagagaggac taagagctgc tcatctcgag tgtgagatac agacggccac ggcactggtc
 25021 agaatccatc tggggatgtg cttagaggtc tcttttagag caactgaaag cgaagtggtc
 25081 aagaattcag atgtaaattt atagtcgctt atagtcgctt aagaacagaa ctggttttgg
 25141 ttccttttgg ggcataacct atagtattat ataacgctgc aagcagtgtt cggctctgg
 25201 ctgtatccaa gccatgttac ttggetaaga cacggactct cctgggctta ccttctccat
 25261 gtatgttggg gtatgtgtaa cacctgcctg catattcata acagtcagat gagaatttga
 25321 aggctttctc agactgtaaa gcagtttttc agtctgtcat tcaatctaaa atcttgatta
 25381 tagtagctgc cttataggat tatgagaaaa attgagatcg tttatttagc aatttgacta
 25441 atgcccgcg tgtaattcat tattaagaag gtttcttcta gttgcttttt cgcaccagga
 25501 ggtaatcaga tacaactttt actcaattta acccaatgct aatataagat ctggacagga
 25561 gagggccccc ttgctctaga taggaagata cttggctcag gtgcattctt ttgtgcattt
 25621 ttttttttcc ttcttgcata tcacaatggc catgcagttc aagtatatag tataaaatgt
 25681 cactgaattg gaatggctgg ttagtagacg tattattctg ttgtttattg agagctggca
 25741 tttgaagctg aaagcctttt tatgtctatc ttatttccta actccacaat aagtctcaat
 25801 aagttagtga atctcaattt aattctgagt tttaaattta aatctgagtt taaaattttg
 25861 tttttattct aatatgctgt aacagtaata aggcatttga aattttggtt atgtccatta
 25921 ttaaattaat aatattgtta tcttcttaac ggtaatcata ccatgtaatc atgcttatt
 25981 ataaattaag gaagagctca tctctaccta gaccttttta atttgaaata atctttaata
 26041 atgactaac atctagacag ttggcactcc tggttctatc cctagtcac ccttgccct
 26101 ttgtgtgaga ctgtgtatc tatagcttca tcgttaccoc atagaaagt ctaagtaagt
 26161 gaatggctgg gtggacagct gagtgccaca tggcagaatg agaaaactaa gacaagtcaa
 26221 tagctgtgtg ttgaagagtg gttttgcttt cgcaagaaag gaagaactaa atacttggac
 26281 aaaggtctc tatctcctc ccccatttcc ctcggagcag cctcacctc actttcact
 26341 tgagctcagt tggaaaggcc cttcttaaca acgtctgtct cacttctcca acccagctta
 26401 gatccctagg gtacatcctg agtaccctgt acttgtttag agatgcacag gaccctggaa
 26461 atcattcatt ttctgtgaga gaagggatta cgtagctgtt taactacccc ccaattccta
 26521 agaccatagg catttattta gtagatatta gtgagtgtaa tcagtgaatt cattcatttt
 26581 tctaatagtt gaagaaactc cagaaatcaa tcctaaacat aatcaaaaag atgttgtaga
 26641 attttgcttt tcaaactatg atgctctgtt gtaagcagct ctaaattggt ctgaagttac
 26701 tgtctgaagc ccctgtgatt tgtgggtcct cacacacaga caagtggtca agagctctg
 26761 ccctgtggcg tgtgggtggt ctgactgctt cagcatttcc gggagagga gccactcat
 26821 cccacagctg ccttcccgtc agatgggtgc agcaggtttc cctggacaaa ctacacctc
 26881 ccacttggg cctacttata tcaatgggtt tgcagagtaa acctaacctt tccacctact
 26941 ttttaaattt ttttttttta agatttattt attttattta tctgagtaca ctgatggttg
 27001 tgagccacca tgaagttgct gggaaattga ctcagaacct ctgaaagaa agtcagtgt
 27061 cttaacccgt gagccatctt tgcagctcc acccactttt taaaagcca ttgaacctc
 27121 gtacttcttg tatccccttt ggcctctaaa agactaaaac ttaggcttct ccagcctctc
 27181 atccagtttt gttgggtggc tttttgtca tctgtgcttt tactacccc cagaaatctc
 27241 tctcatgagg gctctgtaga gtgggtgtgt tgtatatata tatatatata cacacacaca
 27301 cacatacaca tatataatat ataattaata tataactata tattaatata tataataatt
 27361 aatataatat attaattaat aatataataa ttaatactca taatatata attaattaat
 27421 atattaatac atataatata taataaatac ataataatac atataataa gtgtatgtg
 27481 atatgtatgt gtatgtgtat gtgtatgtgt atatgtatat gtatgtatgt
 27541 atatgtatat agctgggtgg tagcagcaca agcctttaat cctagcacct gggaggtact
 27601 gaaaggcaga tctctctgag tttgaggcca gcctggttta cagagcaagt tccaggacag
 27661 ccagggtctac acaaagaac ccttctctca aaaaacatat atatatacac acacacacac
 27721 acatatatgt gtatatatat atatacacat acacacacac gtgtgtatat gtatatatat
 27781 atatatgtta tttacttata aaatataata cgtttaatta tataaatata atttaactaa
 27841 tataatataa ttaaatataa taaacattgt ttaagtatat caatatatgt aatataata
 27901 tcttaatata aatatgtata aaatataaaa tacactatat tattctataa tatataatcc
 27961 aatagatgtt ctgtactttt tgctttttgt ctccctcaat aactattgca gagatgaaat
 28021 ttttattttt ttgacaaaat aatgcctgtt gattgtggac aagggtggct gggatgtgg
 28081 ctgagtgga gagcacgtgt ttgcatgcta tatggaagga ggaagcccta actcctcgct

Exon 11

28141 acctccattt ctacttgtat atgaccttga aaaaagtctg gagaatagat ttctgtacac
 28201 tgtgcagtgg gagggctgag catctctgca aagtaaagga agtgtattag tgttgcgttt
 28261 gttactgtca tcattattht cagcctttga agagtgttt aagccatgta agactgttca
 28321 taagctttca gtttttaagt tctatgttag ctatcagctg tcccaggctc tatgaacaaa
 28381 taagatgatc actgtctaaa aggacctaat attttaattg aggaaataaa actaagagac
 28441 ctgaaagtag taaaaggctt ttcccccttt ttcttttttt ctttctttct ttctcccttc
 28501 ctccctccct ccctccctcc ctccctctct ttctttcttt ctttctttct ttctttcttt
 28561 ctttctttct ttctttcttt ctccctctct tccttccttc ctccctctct ttctttcttt
 28621 ctttctttct ctttccctct ttctttcttt cctttgtttt ttttttttgt ttgtttgttt
 28681 gttctgagag catacgaaaa tttgtgaaga atttatagct ttagctacaa ctgtcaatac
 28741 catccaaaaga tgatgcttgg taaaacagtg ttttcttttc **aggacattca tcctcaaaaga**
28801 agtcagaaga ttctagaaac agtaagtacc aagcatttat cattagaaat gatatagattc
 28861 aaagcacttg caatttgggt ttttttttat ttgtatcctg ctgtgatgtg aattatattt
 28921 attataccat gagaagaacc ataaaggaca aaaagtaaat atttattgac tttttacaat
 28981 tttattgtaa actatthtact tttttacaat taaaagtctt attttaatta tagaaagcat
 29041 cagaagtgat tttcagtaaa cttgctgagt gtgcatttca gtttcacact gtacggtgtg
 29101 caggaagaga agggggtaag gttggactgg ggaaggaag gcaggtagga cttaaagaaa
 29161 gctcagagt ctggctgctt gtgctgcctt ggacgggaca cacagtgcag tctctgtgtg
 29221 gttccctgct cagaagcctt tgctctgagt ggtgcgttca ccacttctc ccaaacactt
 29281 attttactgg aagattgcta caaagtctta tttcccatga aatgcttccc cgagtthtca
 29341 cagtactta caaaagtaca caggtgtttt taaaattagt gacataggaa tactgggaaa
 29401 caaggtggaa ttgcagtata aaggtagaag caagatgtat tcctttacca aagcatgtca
 29461 catgactgtc gctgttctcc ccacagcaa agcacaatga ctaatgctct tttgaaataa
 29521 taaagagact gtacgcctta tttaatgttt tctggcagct ttgagagaaa tctctgttag
 29581 gattagaaaa gggctctgct tttttttttt ttttctaata tctgtctgtg gtagaataa
 29641 actacttttg ggttttaaat tgtaaagggt tctttttact atttttaaat tatactgtg
 29701 agtatatcta ctctagtgca ggtgccattg aagtgcacac atgagccatg gctgccttgg
 29761 agcttgtctt agtcagggtt ttactgctgt gaacagacac catgaccaag gcaagtctta
 29821 taaaaaaaca acatttaatt ggggctggct tacaggttca gaggtcagt ccattatcat
 29881 caaggtggga acatggcagt atccaggcag gcatggtgca ggaggagctg agagtctat
 29941 gccttcctcc aaaggctgct agtggaaagc tgacttccag gcaactaggg tgaggaactt
 30001 ataccacac ccacagtgc accccttttc caaccaggtc acgcctattc caacaaggcc
 30061 acaccttcag atggtgccac tacctggtcc aaggacatac aaaccatcac attggatata
 30121 caaacatca cagagctgca gttgtagact ggcgagctgc tgcagtggc tgcaggaaac
 30181 cagcgtaggt tctctgaaag agcagtattc accccttacc actgagccat ctctccactg
 30241 ctatgcctcc ccctccgtht tgaaaagatt attttttttt aaattgtaat gtacatattt
 30301 atttttagac aagttcaagc tattcttgac tttgcaatcc gtgtgtctca ctgtccaaat
 30361 ttctagcatt acaggcaaat gccatcaggg ctattaagta gatgccctga gaaccagaga
 30421 gctcaaggaa attattcaag gctaaatagt taatgttaaa gataggctta gagacaagtt
 30481 tataatcccc aactcagtgc tgttttgctc ttactaccaa taactgttca ctattggtga
 30541 gtcaaatgaa agcctatagt caaattgttt atattgtaat gagatagata gatagataga
 30601 tagatagata gatagataga tagatagata gagagagaga gagagagaga gataggtaga
 30661 tagatagata gaaggaagga tagatggatc catcttaaat gattggtcca tgtcttgctt
 30721 ctttttaga aggggtataa acaggccagg ccagctttat tgaattattg tcaaaagaga
 30781 agatatatac aaaaagtctg tctcacacaa aggaagtctt tgataacctg tagctctggt
 30841 gcaatgccag caaaaagaaa aatgccagac attaaacagt ctgtatttgc tctctgaatt
 30901 gatcagatca aaagttaata cctgaccatt tattatggtt attagagaca ttccgcatc
 30961 ttcagttgaa tgagttttta gttatcatat aacatccaca aaatgtaagc atttgggaaa
 31021 acctgaagca ttaagcacca cacactaagg agagctttga aggctgaagc agatcagaca
 31081 ccgagcagcc ggtatggtac aagtactgaa gttgtgcat gggagaagat ttggcgaact
 31141 atcgatgtht agtttggaga aaggtggagg atacgaggag gcgagcgtga gggtaggac
 31201 ataaaacttg gaggtgtttg gaggtgttca ctcgatggga gaagtatctt tggtagattg
 31261 ttcattggagt ctgtagataa aaagaacctg aaaacacatt ttgtcctcga ttttaaggaa
 31321 actgtccctt ggaattctct gacaaatgga agtgaactgt ctcaggagac agattggtg
 31381 tggcttgtht tcacaagtac catggtgact gggttcatct gcaggcagag ctggtgagc
 31441 aggcccaaga gaccagtagc acagcaggcc ggggtcagc agatccaggc tgggtgctgc
 31501 aagctggaag acctgatttg acccttggga ctcacgtgct caatgctgca cctgcacaca
 31561 cgcattgtag catgthtgcata tttatcaca cacataaatg tgaagagaag aaaataacta
 31621 attcttgccc ataaccactg cagacttgac agtgaggctg taagagggcc gttgtgtata
 31681 gaccactcta cctgtctgtc attccgtagt gggactcttt caccctggc agatggttgt
 31741 agtggttaact gtttagtagt actccgtctc tcagggtatc aagaagtht actcatagag
 31801 tggaaagAAC tctacagatc atthttagtct ttcctataga tttgattctc tgaggtaatt
 31861 tgaccacttht tccaatggat actctgtcag agggatttat ttttaagatga ttttaacttht
 31921 taaaagtAAA atthtcttat cttgtatag aaaattgatg tgctgtggtg ctggggcaat
 31981 agtccatttg gtacagtgct tccgtgaaag caagagatc tgaattgagt tctcagagcc
 32041 cactthtAAA actgggacaa ggtcagctca gtgagtgaag gcgcttgcca ccaaacttga
 32101 cagcttaatc cctgaaccaca cgtgggagtg ggatagaact gatttccata gcttctgtc
 32161 tagcctccat actgtgtcct gcatgagcac ccctgcatga gcatgacat atataaaaat

Exon 12

32221 aagtgtatga taaatgtcca ggtatagttg cacacatfff caatccttagg gctgggaagg
32281 cagagacagg cagatctctg ggtttgtgtc aggcagctc acctgttag taagttcagg
32341 gccagtgaaa gacccttct gtggacagta cccaaggaac aacctagaaa gttgacctt
32401 gtccttcacg tatacacgca cacactatac ttatgcatac cacacacaga cagatagact
32461 catacaaaag aaatttagtg agaaaagctg acttgtggaa agtattctta agagggaaca
32521 gagtgaacac cagagctggt tgcagtgtaa gattttacaa tcaactgctt gtttttaaa
32581 gccatgtagg ttctgttctc tgacggctgg acagtaatgc catatagaga acttcattag
32641 gcataattgg gttttctggt ctttcttacc tcagcaagtg gaagatttta ttctttcttg
32701 tgttatcagt tcaagacact gggaaactgtg ttgatggctg tcacagagca ggaatcttcc
32761 tctaagactt tatagtttca tcatcatgtg tacatagctc attagacagc acctcccc
32821 tgctatttgt taaagttggt gccacaacag gttcagttag gatcaaagt caggcataca
32881 cattgattca aagatcagag tccagcaggt aaaaggctag aaccacgtg gcaaatcaat
32941 ggggctttat tttgtcctg tgctgaactg agggacgtt tgtactggca agccaaatcc
33001 gagttaagtc agaactctag ttgtaactct ccaaggcaat tagctcttat tacgtcattc
33061 ttgaagtgc atcttttctt ttaatctat ggacgtgtg taagttaagg tttgtaaga
33121 gcacactgtg ttaggatgag cacatcaaga tgttctctta catttgaag agtattgtc
33181 aaacattgg aaaaataatg cttattactt tagaaaaact tattctgaga agaggaggcc
33241 ttctcagaca ttgtttgaa gaatgaaac tctctaacct ttcttctgga ggaaaactc
33301 acctgtaac tgggttagag cacatgtggt ggccaatgat gctgctttg gaattgata
33361 ttttatttg aatagataag ctctcagat aaacatgggc agaaatgcac actgttcacc
33421 aagaaaaaca gcgtggtgga ctgtgtgcc gccactgtg gagctctgc tagcatgtt
33481 aagatcctgg gtttaatcac cagactgctc cccaccacc ctcaccccca ataaaaata
33541 aatgggaaa tacagcctaa atccccacca atcagaaat aacgattgt taatcaaat
33601 ccataataca gttttgttt tgtttgttt tgtttgttt gttgtttta ggttttaca
33661 gggctagata gatggctctg tggctaaag acatattggc acttggagag atccaagttc
33721 agttctagcg cttcattgg gagatctgac acctcagccc tctgcaaaa cctgtacata
33781 catatgcatc attcaaaa aagataaat ctagaaaga atctcattat aaaagctttg
33841 acatatttat acgtattgtc aaggagaact gtctctgcta tctcaaatcc tttatagtta
33901 cagttatgca cagtataatc ttaatttaa tatatatata tatatatgaa tgatacctt
33961 ttaaagacca accacacta aaaagtact gtattacctg tggcctggg taactttcc
34021 ttagacttt aacatttcc aaattgcttt tatttttagc agtggcagta tgtattacct
34081 ataaaatcag taaagataat atattcctat ttttaaaata taacaaaata gacctacat
34141 gaattatcta aactcaacta aaatttattc aatattggat aaagtagtat caggcagaca
34201 aactattcca tgatgtaatt acattagtaa gtggctcacc tccagtgaaa accttagcc
34261 tacaggaact aatcttgagt gtaggtccta atacatatat gttctttaca aaattcttca
34321 tttctgttg atggccaagg aaataattaa accagctgct attttagtgt aacatgggga
34381 agttgttcat tagatattac ttgcattcac tttttgatga ggctctggg tttttcatat
34441 ttttaattt tttaaaatt atggtatctt gaggaataag ttaaattttg tggaatcata
34501 gaagttgaag ctaaaatact gctaaattca tggtaattt aattgactg gtaaacgatt
34561 cagaatgctg tatgttaaaa caatgacgac atttccttgt caatgacgag gaaacgctga
34621 ggaggaagac agtgctcag actctgagct ctggaagggt ccgctgccag agacagatga
34681 gaagtccag taagtgtca ttcgcaagggt ctccatcctg gcctcagctt agcatctgtg
34741 ggtactgccg ttcttgatag cagttgatga aaatatttaa tgccatggat gttgatttag
34801 tgccaaagtc tccctatcct ggtaaggtgc aagtttatta ccagtcattg tttgggatg
34861 caagcagcca gtatgtgac cgtcagttca ctttaacagg cagccctctg ttctgtctg
34921 gattctttcc gagacggctg ctcagtcgca tcttgacag cctgtcccat ggtgttagga
34981 ttctcgtaac ccattccaag gagcccctg aagatttaca cagggtgtag gatgccttgc
35041 cagcagccat ctcagcctcc caccacagg tgaccagtg cacttgttct ctgccccct
35101 tgactccaga gcctgagctg ctggctactt gaggtggct gcaaacacta acgttattta
35161 gcactgggta cttctcaccg tttttcacag gtttactga atgtggcgtc tctcaaagc
35221 tctgcttag atgaaacctc tataaactat aaataggtag ccaactgtcc cagactaata
35281 aagcactgtg gcctgaacag atgtcctcac attcctggga gtaagacgtg gttgtttt
35341 tagacatagt ttctgtttca ggcatttctt aagcaggtt taatttgaag tagtgaacag
35401 agaaggtaca aagcaacca gaaaggcaa gagaagcaat ggtctttcac aaagtactc
35461 aaagaaaact gaggggttt aagagaggtg aagtattcca gttttaaata ttctgagcat
35521 agataggatt gtttagatac taagaattat ttgaattatg aaagccaact ggtataaaga
35581 gtgatagcta atatactaga cgaaaatatt ttaattagt tcatatatca cttattttt
35641 tactctattg atttttttaa ttaattttc attgagtact cttgattata atcaatattt
35701 gtacttttt ttaataggga agaagaatt gatgattatt ttcaggatt gtttctgtga
35761 actgggagag agaatttat tcttgggtga ggagatgtac agagacactc ggtgagtgtg
35821 tccatgctgt tgagtctgga cagccactgg gatagatcct tcagcagcac gggacatttc
35881 agacatttcc tctttactt tctgtgctgc tctgtgctt atctaaaacc tggtttggc
35941 tctagctota cagtttatgg tatacttgtt tcaaggtca tttgaacatg gattgattgt
36001 cattgagctg taaataaatt atttagtctc ttattctaaa a

Exon 13

Exon 14

Η αλληλουχία του ποντικού που περιέχει το knockout αλληλόμορφο για το γονίδιο *FRA10Ac1* από τη σελίδα EUCOMM με κωδικό καταχώρησης IN957884.1 είναι η εξής:

```
1 ttgtggtggt tagttatagt ttgttcaagg tggtttttat ctatctatct atctatctat
61 ctatctatct atctatctat ctatctatct atctaagtga tagtagtcta ctgtgactt
121 aaaccaaact ctccaagtac ttaacttgg attgcttcta gctttcttcc ttaggaatag
181 atttgctata aatattctag ttcaggctt tctgtgacta tgaacacttg ctgttaaaga
241 atcaaacaga tgagacattg atatgctgtg ttagcattag tctggtgttac tcagcgcct
301 tcccaagcct cagcaccagc gtgcacaagt taaggtcaga gcacatcttc accaccacgg
361 gatcagctgt cttctccttt atcccctccg gtgtgcaatc atgtgctctg tgttcacagc
421 ctgtgtttgt ccaataacag taaatgtagg tgccttgctg catctgcatt ggcttttggg
481 gtcttctgtg gatggatcct tcaaaccctt tgccattttt ttttttttcc taccgagagt
541 cgacttttag tgtaatacat tctttcaatg ctttcagatg ttaaaaattt ttatttgtac
601 agagtttttc ctgcatgcat gcatgctgt atatcacata tatgaagtgc ccacagaggg
661 aagagatggc actagatctc tgagactgtg agttacagac gtttgtgtac tgacatgtgg
721 gtgctgggaa tcaaaccctga attctgcata atcagcaagt gcttttagcc tctctggcat
781 ctttgtatbc cctagtataa tggattataa atatgttttt taatgtatta gctatgtata
841 cacactcata taaacgttgt gtgtgtatgc atgcatttat ttgaatatat acatctcttt
901 ttctccacc cgtacttaa cttttcattt tcttaataaa atcttctaaa tgaacagaa
961 gtcttttttt tttccatttt tattagtagt ttactcatt tacatttcca atgctatacc
1021 aaaagtaaac agaagtctta acttatttat gccttcttat gcatctatt tgagtcttc
1081 tggctctaag agaaaaatat ttaaaaatac catcaagatg ttttctgtt ttatttagaa
1141 ctgacttgtg tgtggtgtaa ggtagggatc aagccgact ttttaacca tatgttgtgc
1201 agcaatcact ctcaaacctga acaatttcta cttactttta aaggtttatt ttcttcttga
1261 ttatgtatat aattatgtac atgtgtagc aggtgtggga ggagaccaga ggggggact
1321 ggaacccttg gaactgtgtg taccggcaga ttactgtagc ctgatgtggg tgggtgggac
1381 tgaactcagg tctattgtaa gggcagtata tatgtattct taaccactga gccatctctc
1441 aaccccaatt tcctccaaat taaaatattg catcctggag aggaactccc aagtctctgt
1501 aagttccaaa gaaaggcttg ttaagattca ggcagtaaac aactcccaag tctcaagaag
1561 tcctgaaac ttaccaggct ctcaaggtct ctctctcctt aaggttgtta ctgctaagaa
1621 gagggaaact tcacctcctg agctgctgt aagttgtgca gagagcttca ggggtctgtg
1681 tttcatgagt tatcactcat actgggtaag cttttttaga tgcagtgcct gtggtgtgct
1741 tgtgctcctg taagtaacc tcgccatgct cctgtaagt actctgataa actctgttaa
1801 tagttctctg agttggactt tgatgttatt gttcctttgg tctgtcaattg atccctatc
1861 tggaatgaat agcagggatg agtatcatgt tttccagaa aacttctcac acaatattat
1921 tctattctgt tgactcggaa ctatttatta gccagaccat atttaatcct atgctgttaa
1981 ccacaggact atatgtgat tggctctggg atacttgaga agtagttaat agttgaactt
2041 attcctgttg tatttgattc tttttgcaag tagcatttat tatagtcact aagaataagt
2101 catcattgct caggaatcac ttcactttaa acttaatcag tcacagtaat atagatactt
2161 gtattatcct atttatagg taaggaataa atttgccag agttctctag cttgtgagtg
2221 gcaggaacat gacttcaggg aaattctagt tgactctgac gttggagaag cttttgatgg
2281 gggggggggg ggacagtgat gatattatgt tgttaggaga gagctagaaa gaagagctaa
2341 ttaaaaaaaaa aaagaaaaag aaaaagaaa aagacaagct gaagagtctg ctcagtggta
2401 aagagcatag agtgctctag ctgtgaatct gggtttgggt cccagactc acatggcaga
2461 tcccaactgt ctgtaactcc agtgccaaga gttctgccc cccctctggt cctccatggt
2521 cactgcatgc atttgatata catgcaggca aataaactca tgcactataa ataaaaatga
2581 atttaaaaat ctttaggaaa gaacaagag gttagagaatg tcttaactta agtatacaaa
2641 tattaaaggt ttttttttta cagaagaggt attttaact ttttgtgtga tttgctaaag
2701 tttcaaattc cctccaaagc aaacttatta cttctccaag aaagtgtttt gtttttgttt
2761 taagtaatcc tcttgccttc cacagggatg cttacaatcc ttcaatcttt ccagcttag
2821 aaacatcttt ctttttctc cattccctca tcctttatac ttaattagcc acaacttcta
2881 ccattgtatt cttcagctat taaaccattt ctctcatttc ccactgcctg ccactgttct
2941 tgaactcact cctactgtcc ctctgcctc cagccagtct attaaagga taataacta
3001 ccaaagcact gcgcacaatg tctccttttc aaagctgaac cctttaaattg caacatctga
3061 ggggattctc acactcttgt ccatccatat tgacacctct atttataaac tctcctttat
3121 cactaaccaa atgcaaaaat ttagtattca agaacttcc aaatcggcct caagtctctt
3181 ctgtggcctt accttacta ctctttaa ttctactctc agtgaagtca cccctcatg
3241 ttctctaaa caagtcatag ctatttctac ctcaagtctt ttctgaaag tacactgtct
3301 tgattattat ccccttccc acatccttta acatttaata tctacattta aattatagct
3361 caagtctgat tcttctaaa gccgttaca catttacta aactcttct caagtattt
3421 ggttactttt ctcttataa aaaatagctc ccaatttgc caaatacac aactgcctc
3481 ggcctattga aaggcagtag aaatattaaa cagaaaccct gaactcagag tcaaatgtat
3541 ttgggaccat ttacatgctc atgactttgg gaaagttaat ttctctaaat cttcttctt
3601 gtctgtaaaa tatgaatgat agtactttgt cttgttaaac aatatttaca tatgtgtact
3661 tttgtgggta tgaacctgtg ggcattgtcag catgtatgca gcagtccag gacacccag
3721 atgttggctc ttaggagcct tccacctta gtttgagaca gtgcaactct tggctcttac
3781 aggtagttag tctaattgct ccactaactc tcaggaatcc atatatatg ataggtatg
```

3841 gtatatgtat atgtatgtgt gtgtgtgtat atatatacac acatacacac acacacacac
3901 acacacacac acacacacac acacacacat atatagtctc tcaagagaac cctgactaat
3961 acagatgaaa acatgaggta ggtgggttat agccaagttg gggaatctgt tatagccctt
4021 agatgccatc tgataacatt tttcaccaag ggttgggaaa ggtagatctt tgtcctttcc
4081 aaaaggaact atctaactct tgcaagaatc ttgatcacac cacagtcggg taataaatgg
4141 ttatttaaaag ggttaaagat agcccaagat gtttgacatt ggatctgcaa cattttgact
4201 taccataaat tgaaattgta atcagtcaat tgacctgta gaatgattaa catgggcagt
4261 tgttttttgg ttttctggga tctcaattta cagcatagac caaaccacc caagagtttg
4321 ttgcttgaag cagcatttaa tttgcataaa tctgcagtgt gggtcggact cagtgaagat
4381 ggcttgggtc tgtctgtact actatttacc atcaagaaga cagaaaggt caggcagaag
4441 ctgcatcatc tgtcacatgc agcttcgaag cctctcagca ttatttctgt agagccttga
4501 cagctggggc agagatgcag atatcaggtt accatggaga aatattaatg ttgtacaac
4561 cttaatgaaa aatatattcat gtgatcattt tgggaaaata aagtgtgttc agacctaaag
4621 gataacagaa catgtattga aagcatggct tgatatttta tggccatcgc catccatctc
4681 tggcccttat ctaatgccac catagcattt tgttgctttg agcatcaata tattattgca
4741 tttttttgta attatcgata acatatctta aagcctggaa cccataggtt tccatatgcc
4801 atatacttat ggtatatgat agaatacat gattttacta ttttatatgc tctgtctttt
4861 aaactagatt gtctctgaga taaagaagtg atttttacat ttttgaatt ccaatgactg
4921 atccaccaa agcatgttct taatgggtgt ttgtgtcttt taatattgaa ttgtaatcgc
4981 ttacttgaga gtttttcatc aggttaagttt tctgtcctgt gttgattcaa attcagatta
5041 tgttatctat ctatagcata tactttgtat ttaatgtctc cagtagctgc tgacctaaa
5101 gcaaaaaatg gaaacctttg aatgaatgga aatagaaac acacatcaat gcagcagcta
5161 ctccccgtag aatcatgaac tgagaggtag gagctgaatt gtataaaagg aaagtgtctg
5221 cgagctcaa accctcatgg acctgtgggg tcaaggtctg tgcatactc tcttatgcgt
5281 aaagcaaac atgtgtgaa gagatgtgtg gttacgattc tattgtctg aggagacacc
5341 acgagcaaa caacttataa aagacaacat ttaattggag gcctgcttac agttttggag
5401 ggtgagttca tggccatcat ggttagcaag cttggtagca ggcaggcatg atgctggacc
5461 agtagctggg agcacacatc ctgatccaca agttatagga taggggtacg gatacatata
5521 tataactgga tacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacacg tcatatctat
5581 ctgtctgtct gtctgtctat ccatccatcc attcactggg cctctgggct ttgagtttca
5641 ataaatgagg agcaagcagt caagcatctg aatctatggg gccattctc ctcaaaccc
5701 ccatagctgg caaagctgtg gagaggcttg ctgctcttcc ccagggcag ggttcggctc
5761 ccagtaccca caccactctg tcacgcttgt tccagggctt accacaccgt cttctgtcct
5821 ccatgtgtaa tgtgacatgg agaagcaggc acacacatat gacacagaag caacatcttt
5881 aaaaaattta aatgcagggc ctacaacagc agcacagggg tgttgaaaa ctaaaaagaa
5941 gttaatagat aaaagatgtt ttttaaaaag gaacaaaaat gctaattgcat gtcaaatatt
6001 ggtatacaa agttttcatt aggctacagg agttcttatt agtgataaaa ggacaaagta
6061 tttgtttttt agatatctat aaaaattgac tgcttgacaa attaactcaa tacttaata
6121 atattaaatt atgaggtttc ctatttacct ttttaaagga aacattttta ttgtagtata
6181 attcaaatgc accttgaat gcataaattt ataattttgt aattaacaag attgcaatcg
6241 ctgctctatg taaatcaggg tgtatctatg atttgctgcc aggaataaaa aaagtcttga
6301 actgattgac agggatattg ttatctactg gttaggataa aagatttaaa atgaactgtg
6361 attagattc agagtcttc cttaacatgg acccgctgta aaagtgaga gcatgccagt
6421 tctgttcagc aaatgthttt gtagctcctg tgatttcaa ggcacagtgt tggctgcgga
6481 gtgcgagatg aataactgct ggtattgaa agaagcaaga tctgtacca gtggaagag
6541 gaatgggacg tcacggtgta gggcaaacac aatgcaggaa caaccagtg gagcttaaaa
6601 taatttaatt ctggctgcct gaggtgtttt tttttttttt ttttttctt aaattttata
6661 ttgatgccc tttctgcgtg tgctaggttg cttattggcg tagaatctgc gaccctgtga
6721 aatctttttc attccccatt tcttcttttc cttgccaaact cgatctcttc agccgccagc
6781 actgccttg gaacagatc tattgtgtg gtggcggaac gcggggaagc tatttctgtt
6841 ctaattatga gcactgtttt cgtagtgaa aaagaggggg tgataaggca gatctgaggc
6901 tgagctgctg gctgggcgag gatgctcggg ggaggcgta ctaaggttac tagagagagg
6961 accgcaagtg acaggcgggg tttttctcta tagcaatata cattttccaa tgaaggacgt
7021 gggctgggca gtgccacatt gtactacata ttggattccc tagaggaaaa aggagatggc
7081 ccaaaggaaa aatgagggac caaagcaggg agcctctgct tcctctccg gcccttttct
7141 tccgccgtct ttgtttacc cagagccatt ctggctgcag cacagagtcg gcgcccggga
7201 gaacggtgct ttatcgatg gacacgcctc tgagccgggc cggagcggg tcccagccgg
7261 taccctagg gccagcgctg cagcgtcgg tgacagtggc gcggcgcgcg gcgctgctg
7321 gctctggagg accggcgcgg acctgcagcg gctcgtgag gccgtggctc gtcgctgcag
7381 ctgtcaggac tcttgggggc gaacttgcca gacagagaag agcggaaagg aaggggtgtg
7441 taaggagggc cgtggcgctg tttgatctca gagaggactt tgaaactggg tcttagtagt
7501 tgagtctcat ttttattttg acagattcgg gaggcagcag atgccctatt ctcgagattt
7561 tcttaattcc agtcagttga tagcatgatt tgagtgaag ctttttagtg aagctactgg
7621 gttaaagatg ctcaagggat ggatgaagct gcccgagata aaaagaatg tggcctcggg
7681 gcagagaaga ggtgtctgga atgagggctc aagatgatct actagttcca ggttctacta
7741 gtttcaggtc ttctgtact aggtaccgtc cccaaactat gtaagcttga ggtttgggct
7801 tctttacata acctctatgt taacctttac ataagtggg aagtaggaga cgcgtctgtg
7861 ccagccagac cttagattct gcaactgctc caggctccac actgcggttt tccaccatca

Exon 1

7921 atatatgaag cacgtgagga tggattagag ggtagtagaa tttgaacagc cttgatgaga
7981 tctgctaaaa ggtgtgacgt ctagggtat aaggcaatga tagctgtcgg tcaggaagaa
8041 ctgtggcttg caaacctatg tctccaaagc ttggctgttg ccttctcttt agcatttggg
8101 gggagaagga agagaggtat atactcacac gcccaagttt gaaaatggag tcgacagagac
8161 tcacagaatt taatgatttg acatagctac cttatttaac agaatgacaa atcagaagta
8221 gtcaagaacg cagacactgg ctatcctagc tgtacttgcc aacacagatg ctaaagttaa
8281 tgtctcttta cctggactgg gtcctttcag caataaagat tgcaaccac ctttaccct
8341 attaatgtgt gttacgaatt ctgtacactt actgacacaa ataccaaacg tgaaaaatat
8401 tatcacttga cctggactgg ctcctttcag ctgcaggagt tgactattga tgatatacag
8461 tagtaaaatc atctgtaccc ttgctcatgt gtgttccaaa ctctgtgtaa tgctggagtc
8521 agatgccttt tcaggcaca ctgacagctg aagcctttca gcaattcca gactatccat
8581 cggaaaataa taagactgac taagcctagg ggtaaggaaa cttagcttaa ggagactca
8641 gctaaaactc atgcttaaaa attaaggaaa aaaaatttaa tcagttgata atgtactgtt
8701 tacaacact aattctggca agttgtgcct aatattcca agagattgtt gaaactgggg
8761 ccttaagaat caagtagatt agtttaacta cttttcatt cctaaaatgc aagtacttat
8821 ttttaacttg aaaaatcata agctttataa aagtgttat cactgtgtct atgacaaagt
8881 aataatatag tcaccagtg ctttaataaga gagacactta aatacatttc tgcagctcct
8941 acattgttca aacagcagag agtatgtctc tacaatggta cagccatcaa acactctac
9001 tacagacagc ccccaacta gtatctttct agactatgaa cgtatatagc atgttgttgc
9061 aattattact gtagataagt gtaatggat ttgcacagtt aggcatact acaatgtaga
9121 aggtatagtt gaagtactaa gcaataattt gtatcttct ctagtggct gtctgtggct
9181 gaaacatctc taggggtgtg ggggtgtgtg gcacaaataa aagtgtgca ctgtgtccc
9241 ttgcatggag tcgctttgca ataccagc ttaggtttca ctggaaggcc agtgactaat
9301 gtccttattc ttcttatttc aaaggatta aagtgttagg ttgctgcgta gaccagagac
9361 catgatctgc ccagcatgac ttgtaaagct tgtggctggt taagatcact taactctcag
9421 tcttgtgttt cctgagtatt tggcagctcg ggtccgacg gctgacctcg cactccttg
9481 cagatgcatg ggcattggag ctatgactct gattttagtg acgatgagca aggcggaggg
9541 tccagcaaaa agaggaagaa gtaagtctgt tgatccatag ttcacactgt ttctagacgg
9601 acatgaagta taactaaatc ctggaaaggg tttggattga ctttgcataat ggaacaact
9661 gctgtagcaa gtgaggggtt attcattgca ctgtaataaa tggatttcag tttggaggta
9721 gttgtgggga aaatgaagt ttgttgtgaa ggagtttatt gaaaggata gaggaaaaag
9781 gaaagatttc tctattgcat gtttttttt tttgtttgt tttgttttt gttgtttgct
9841 ttttcatttg ttaagactgt gtgtctgcaa atgtcacagc ttaaaggagg cttggttgc
9901 gtttgccttc ccagtgaggt gctcgtggag gatgaattgt aattcagaac agttgtaatg
9961 ttgacttgaa tgagcaggtc agagttggca agaccaagat cctctagcat acaaagcctg
10021 ggcttcacaa agaggacaca tttttgttgt tgttgcatt tttgtttct gagacagttt
10081 tattatttag ttcaggctat cctggaattc cctatatagc ccaggctgtc ctaagacaca
10141 gtcttcttgg tttagctttg aaagtctgg gtttccaagg atgaactgca tgtccagctg
10201 gaggctacat cttcacaaaa ttgctgtgtt tagggccatt gtccttagct ttcagtgcct
10261 tgaatgtca tggatgtag taacaggagg gcttgattcg tagtagcagg acttagagaa
10321 gttgtttat tatcccatag tgagactgat gtgttatcac taactaggaa tgaacatttt
10381 ataaaatcgg cagtctttat caataacaga agaatagtaa taattatagc aatgtatgtt
10441 ttttagattt ctttctttct ttctttcttt ttttcttct tccttctct cttcttctct
10501 tccttctct cttctttct ttctttcttt taaaagattt acttatgttg ttatatgag
10561 tacactgtaa ctgtcttcag acacaccaga agagggcatt agatcctatt atcatgtgtt
10621 gtgagccact atgtagtgc tggaaattgg actcagaacc tctggaagag caatcagtc
10681 ctttaaccac tgagccatct ctccagccct gtgttgtttt tttttttta gatttctatt
10741 aagaacatt gcttctggt ctgggggggg ggggtgtaac taagttagtg gaatgctgc
10801 ctaggatata ggacgccag gttcagtcct cagtgtctgt taaaacaaag aaaagtgaca
10861 catgcccttt agaggcagat taaggagcat caggaattca ggtttatcct tgcttgtgta
10921 gtgatttccg ggctatcttg gctagtggag gatcctcct caaaagaaat gatttatgaa
10981 tagaatttga gcagatttag ttgggtactg tgggtctaggg ttctatgtat ccatatcagt
11041 aaggctgttt gtctgtggtc agtgtcctct atagtcaaac tttcctttcc atatttttta
11101 cctgttaaat cttcattatc tctccttag aggtaataaa cttagggtgg taaatgatca
11161 agtcaggaac tgagctagga acctgctgct aagaactagc cttttctct tatcttttcc
11221 atttataaag tagtaataa aatgaagaag caaaatgttt cattaaagat cagagacca
11281 ttttaaagt aagtcctat ttcatgttag ttacttttct agttgtgagc ctgttaccg
11341 acaagaagaa actgaaagat ttgcttttgg tcaagattta agaagggta cagtgaag
11401 gggttcctat ggaggcagg gcatgaagta gctggtcaca ttgtgtctac agtcaggagg
11461 ccgagagcag atataaagt aggccgggtt ataaaatgtc aatccatctg cagtgatcca
11521 cttcttccag caaggctctg cttcctaaag acagctgag cagagtcac tggcagaata
11581 cctgtcagc tgtcacaaac atgggaagag ttagacagca tccttcaaga aaaattaact
11641 ttttaactt tttttttta ctacaccag acagtogaag atgagttgct gcttcaaaaa
11701 cgttttcaaa aagaaagca tggaaaggtg gcccataaac aagtcgccc agacttgctc
11761 gacaggtgtg cgccttggg gctatgacgg acagccttg cgtaaagctc ttttataatc
11821 tcataacctg tgggtttcat tatgttaata aatatgggc atttgaattt acctaaactt
11881 cttttttaa cagggaagaa gcaagaaata gaaggttca tctcatagct atggatgctg
11941 tatcctttt atagtcctat tttcataact aatagaatat tttgctgtt atccatgttt

Exon 2

Exon 3

Exon 4

12001 tctgactttt aaaaatcaaa atcttgtcaa gttaagtaga ctagttttat ttttacaggt
12061 tagtagttat tgatatagaa atttacgatt tgaattttca ggtgtaattc tcttttgcta
12121 atatatagga aaaactagag gtaaaaaataa tgaataaaat actagtgtg gtctattaat
12181 agactttaaa gtccaggaac ttaaaagggt tcccacctgt tcttgcagg ctgtctcact
12241 tccctttact gttctcgtct tcttgaatat cattttaatt catcccttc catccctgct
12301 cttgactact ttaaattttc tgcaaaactt ctgttttaaa attaagtgtg tctgagtgcc
12361 atctctatgt gtgctgttgc tctgttcctc gggatgact gaagacttga gctgtgagtt
12421 agactgtcat gcaccgctac tcgggatggt agagaacagg agaggccagg caagacctga
12481 gtgttcactc ccaggtcagg actgaagaga ggaagcacca cactagagtc atctgatgca
12541 tttttcacctc attcctttcc ttttaagttac tgtgttctag atttttttt tttaaaaatc
12601 tctcttacct cctaaccat tggaactta ccttagctta atggcttat tcccataaa
12661 catctataca tatgttctcc cttctctgac actctcattg aggggttag tgcacctagc
12721 gagaataaaa ataataggtga tatgtttctg tcatggtaga gagatctcat ggctgagatg
12781 gtagagaacc ccagtatttt tgggaagtag gcatatggtt agctatagga gtagtcacca
12841 tcttaaaagt tagtgatttt gctaggtgtg gtacacacct tcaatccag cattcagaag
12901 gcagaggctg gcagatgtct gaatttgagg ccagcatggt ctacatagtg agtccaagc
12961 tagccaaggc tacatagtgt gacctgtct aaaaaacaa aacaaccaac caaccaaac
13021 caaaaaccaa aatgttagtg gctatcttag ttaaggttc atagtgaag gacaacatga
13081 ccaaggcaaa tcttataaaa ggaaaacatt taattgggtt tggcttacag ttctagaggt
13141 tcagtccatt atcatcttgg taggaatcat ggcagcgtcc agagagccat ggtgctggag
13201 gagctgagag ttctacatct gtcgtctccc acccccctc acccccctc cgcacaaca
13261 ggtttctctg tgtagccctg gctgtcctgg aactcactct gtagaccatg ctggccttga
13321 actcagaaat ctgcctgcct ctgcctcca aacctggga ttaaaggcgt gcgccaccac
13381 tgcccagcta acttctacat cttgatcctt ggggaagcaga aggggattga tctcccaca
13441 acaaccagga ggagaatgtc ttccagactg ggtccagcct gagcatagga gacctcaaa
13501 cccacctaca ttgtgacaca ccttgtccaa caaggctaca tctcctccag caaggcgcac
13561 ctctaataag tgccactctc tatggccaag cattcaaacc atgaatata gggggccacc
13621 cctattcagt ccaccacagt agtcttttag agttgttaatt gtttcagtct gtgtctgatg
13681 gtgtttttaa gttgctagcc tcaccacaat gtctggggtg gaataggcaa aaaaaaaaa
13741 aaaaaaaaag aaaggaaaag gaaaaggaaa agggaaaaga aaagaaaaag aaaaaaaaa
13801 cgggggaatg aatgtagttc agtacacggg cagtccctgg tgtgcctttt aaccaccgac
13861 tttcacaggc ttgtatttgt tacatatgat gcccaaatg ggaactcgtta gtttaagag
13921 tagggaggag gaataggttt ttgtctactc cttctcctgg aagccaaact ctactgcca
13981 ttctgttttt tgctcaagga aaagtgtgt taaccacagc cctgcctggt gcctatgact
14041 gcctcatggt acagtagcag agctgagcag taacggcaga aaccactagg ctgcaagcc
14101 tgtaaaattt gtcttctagc tccttacaga aaaaaattag ctttttaac agcttgcctc
14161 ttttagtgga gttggagagt tcaaaccag gccttgaggt gtttgtctac ctcccactc
14221 aatttctatg tcttattaat aagtactcta attctaatta ttaataatta gatacactg
14281 tgattagggg aattactatg cctataaggg ttgtggtcagt gaggtgaga gatttacct
14341 tgcatgtgct tgagtatgga gagtgtgcc ttggttttaa aagaaacacc aggtgttcat
14401 atatcttgtt attgtgcatg aaaaatatac atagtgtgt agattctctg aatattaaaa
14461 agaaaagaaa aatcttactg tggtttattt atttcatttt ctttctatt tgagacactc
14521 tcttaccta aggcccaggc tggccaggaa atcttgttgc tcctcctgcc tccacctctt
14581 gaatgctagt acgatagtg tgagccacta cacctcctct ctgacttctt cggcgggtgt
14641 ggcggctcct cctcctctc cctcctctc ttctcttca gatttattta tctcttctat
14701 gtatatgagt acacactata actgtacaga tttttgtaag cttcatctg gttgtgaga
14761 attgaattta ggacctctgt tcaactcggg caaccctgct cctcctggtg ggcccactc
14821 actctggccc aacatttat agactatggt tgaactgtg ggcagtctc agacacacca
14881 gaagaggag tcagatctca ttataggtgt ttgtgagcca ccatgtgatt gctaggatt
14941 gaactcagga cctttggaag agcagtcagt gcttttacct gctgagccat ctaccagcc
15001 tctctctggc ttcttatggt **gtgttttatt tttgaaacct taatgtt**at aaggcgata
15061 acgataccac gatatacaaa agttttgaca aaaaagcagg ctggcggcgg aaccgaagt
15121 cctattccga agttcctatt ctctagaaag tataggaact tcgaaccctt tcccacacca
15181 ccctccacac ttgcccacaa cactgccaac tatgtaggag gaaggggtg **ggactaacag**
15241 aagaaccgt tgtggggaag ctgttgggag ggtcacttta tgttcttgcc caaggtcagt
15301 tgggtggcct gcttctgatg aggtgttccc aaggtctggg gtagaagggtg agaggacag
15361 gccaccaagg tcagcccccc cccctatcc cataggagcc aggtcctct cctgacagc
15421 aagactgaag gggagatgcc agagactcag tgaagcctgg ggtaccctat tggagtctt
15481 caaggaaaca aacttggcct caccaggcct cagccttggc tcctcctggg aactctactg
15541 cccttgggat cccctttag ttgtgggtta cataggaagg gggacgggat tccccttgac
15601 tggctagcct actctttct tcagtctct ccatctctc tcacctgtct ctgacctt
15661 tccctaggat agacttgaa aaagataagg ggagaaaaca aatgcaaac aggccagaaa
15721 gattttggct gggcattctc tccgtagct tttattggga tcccctagt tgtgataggc
15781 ctttttagcta catctgcaa tccatctcat tttcacacac acacacacca tttctctct
15841 ggtcagtggg cacatgtcca cccctcaagt tatatcacca ccccaatgc ccaacttgg
15901 tatggccttg ggcgggtcat ccccccccc acccccagta tctgcaacct caagctagct
15961 tgggtgcggt ggttgtggat aagtagctag actccagcaa ccagtaacct ctgcccttc
16021 tcctccatga caaccaggtc ccaggtcccg aaaaccaaac aagaagaacc ctaacaaaga

Primer F1'

Primer LAR3

16081 ggacaagcgg cctcgcacag ccttactcgc tgagcagctc cagaggtca aggctgagtt
16141 tcagaccaac aggtactcga cagagcagcg gcgccagagt ctggcacagg agctcgttac
16201 ccggaagatc tggactctag agaattccgc ccctctccct ccccccccc taactgtact
16261 ggccgaagcc gcttgaata aggcgggtgt gcgtttgtct atatgttatt ttccaccata
16321 ttgccgtcct ttggcaatgt gaggcccggtg aaacctggcc ctgtctctct gacgagcatt
16381 cctaggggtc tttcccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt cgtgaaggaa
16441 gcagttcctc tgggaagctt ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct ttgcaggcag
16501 cggaaacccc cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt ataagatata
16561 cctgcaaagg cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt ggaaagagtc
16621 aatggctct cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgccagaa ggtaccccat
16681 ctacagggat ctgatctggg gcctcgtgct acatgcttta catgtgttta gtcgaggtta
16741 aaaaaacgtc taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt tccttgaaa aacacgatga
16801 taagcttgcc acaacctagg aagatcccgt cgttttataa cgtcgtgact gggaaaacc
16861 tggcgttacc caacttaatc gccttgacgc acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag
16921 cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttcca acagttgctc agcctgaatg gcgaatggcg
16981 ctttgctctg tttccggcac cagaagcggg gccggaaagc tggctggagt gcgatctcc
17041 tgaggccgat actgtcgtcg tcccccaaa ctggcagatg cacggttacg atgcgccat
17101 ctacaccaac gtgacctatc ccattacgtt caatccgctg tttgttcca cggagaatcc
17161 gacgggtgt tactcgtca cattaatgt tgatgaaagc tggctacagg aaggcagac
17221 gcgaattatt tttgatggcg ttaactcggc gtttcatctg tggtgcaacg ggcgtgggt
17281 cggttacggc caggacagtc gtttgccgct tgaatttgac ctgagcgcac ttttacgcgc
17341 cggagaaaac cgcctcgcgg tgatggtgct gcgctggagt gacggcagtt atctggaaga
17401 tcaggatatg tggcggatga gggcatttt ccgtgacgtc tcggtgctgc ataaaccgac
17461 tacacaaatc agcgatttcc atgttgccac tcgctttaat gatgattca gccgcgtgt
17521 actggaggct gaagttcaga tgtgcgcgca gttgctgac tacctacggg taacagtttc
17581 tttatggcag ggtgaaacgc aggtcgcag cggcaccgct cctttcggcg gtgaaattat
17641 cgatgagcgt ggtggttatg ccgatcgcgt cacactacgt ctgaacgtcg aaaaccgaa
17701 actgtggagc gccgaaatcc cgaatctcta tcgtgcggtg gttgaaactg acaccgccga
17761 cggcacgctg attgaagcag aagcctgcga tgcggtttc cgcgaggtgc ggattgaaaa
17821 tggctgctg ctgctgaacg gcaagccgtt gctgattcga ggcgttaacc gtcacagaca
17881 tcatctctg catggtcagc tcatgtaga gcagacgatg ctgacagata tctctgtagt
17941 gaagcagaac aactttaacg ccgtgcgctg ttcgcatat cccaaccatc cgctgtggtta
18001 cacgctgtgc gaccgctacg gcctgtatgt ggtggatgaa gccaatattg aaaccacgg
18061 catggtgcca atgaatcgtc tgaccgatga tccgcgctgg ctaccggcga tgagcgaacg
18121 cgtaacgcga atggtgcagc gcgatcgtaa tcacccgagt gtgatcaatc ggtcgcgtggg
18181 gaatgaatca ggccacggcg ctaatcacga cgcgctgtat cgctggatca aatctgtcga
18241 tccttcccgc ccggtgcagt atgaagcggg cggagccgac accacggcca ccgataattat
18301 tttcccgatg tacgcgcgct tggatgaaag ccagcccttc ccgctgtgc cgaatggtc
18361 catcaaaaaa tggctttcgc tacctggaga gacgcgcccg ctgatccttt gcgaatacgc
18421 ccacgcgatg ggtaacagtc ttggcggttt cgctaaatac tggcaggcgt ttcgtcagta
18481 tccccgttta caggcggcct tcgtctggga ctgggtggat cagtcgctga ttaaatatga
18541 tgaaacggc aaccctggtt cggcttacgg cggtgatttt ggcgatcgc cgaacgatcg
18601 ccagttctgt atgaacggtc tggcttttgc cgaccgcacg ccgcatccag cgctgacgga
18661 agcaaaacac cagcagcagt tttccagtt ccgtttatcc gggcaaacca tccaagtgc
18721 cagcgaatac ctgttccgct atagcgtctc cgagctcctg cactgtagg tggcgtgga
18781 tggtaagccg ctggcaagcg gtgaagtgcc tctggatgct gctccacaag gtaaacagtt
18841 gattgaactg cctgaactac cgcagccgga gagcgcggg caactctggc tcacagtacg
18901 cgtagtcaa ccgaacgcga ccgatggtc agaagccggg cacatcagcg cctggagca
18961 gtggcgtctg gcgaaaaacc tcagtgtgac gctccccgcc gctccccag ccacccgca
19021 tctgaccacc agcgaatgg atttttgcat cgagctgggt aataagcgtt ggcaatttaa
19081 ccgcccagtc ggctttctt cacagatgtg gattggcgat aaaaaaac tgctgacgc
19141 gctgcgcgat cagttcaccg gtgcaccgct ggataacgac attggcgtaa gtgaagcgc
19201 ccgattgac cctaaccctt gggctgaacg ctggaaggcg gcgggccatt accagccga
19261 agcagcgttg ttgcagtgca cggcagatac acttgctgat gcggtgctga ttacgaccgc
19321 tcacgcgtgg cagcatcagg gaaaaacct atttatcagc cggaaaaact accgattga
19381 tggtagtggg caaatggcga ttaccgttga tgttgaagtg gcgagcgata caccgatcc
19441 ggcgcggtt ggcctgaact gccagctggc gcaggtagca gagcgggtaa actgctcgg
19501 attaggccg caagaaaact atccccagc ccttactgcc gcctgttttg accctggga
19561 tctgccattg tcagacatgt ataccctgta cgtcttcccg agcgaaacg gtctgcgctg
19621 cgggacgcgc gaattgaatt atggccaca ccagtggcg ggcgacttcc agttcaacat
19681 cagccgtac agtcaacagc aactgatgga aaccagccat cgccatctgc tgacgcgga
19741 agaaggcaca tggctgaata tcgacggtt ccataggggg attggtggcg acgactcctg
19801 gagccgtca gtatcggcgg aattccagct gagcgcgggt cgctaccatt accagtgtg
19861 ctggtgtcaa aaataataat aaccggcag ggggatcta agctctagat agtaatgat
19921 cataatcagc catatcacat ctgtagaggt tttactgtct ttaaaaaacc tcccacact
19981 cccctgaac ctgaaacata aatgaatgc aattgtgtt gtttaactgt ttattgcagc
20041 ttataatggt tacaataaa gcaatagcat cacaaattc acaataaag ctttttttc
20101 actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggatccg

20161 gaataacttc gtatagcata cattatacga agttatgttt cttagcttggc tgcaggtcgt
 20221 cgaattctta cgggtaggg gaggcgttt tcccaaggca gtctggagca tgcgcttag
 20281 cagccccgct gggcacttgg cgctacaca gtggcctctg gcctcgaca cattccacat
 20341 ccaccgtag ggcacaacc gctccgttct ttgggtggcc cttcgcgcca ccttctactc
 20401 ctccccagt caggaagttc cccccggccc cgcagctcgc gtcgtgacag aactgacaaa
 20461 tggaaagtag acgtctcact agtctcgtgc agatggacag caccgctgag caatggaagc
 20521 gggtaggcct ttggggcagc ggccaatagc agctttgctc cttcgtttc tgggctcaga
 20581 ggctgggaag gggtaggtcc gggggcggc tcagggcgcg gctcagggc ggggcggcg
 20641 cccgaaggtc ctccgaggc cggcattct gcacgctca aaagcgacg tctgcccgc
 20701 tgttctctc ttctcatct cgggcttct cgacctgag cctgttgaca attaatac
 20761 ggcatagtat atcgcatag tataatacga caagtgagg aactaaacca tgggctcgg
 20821 cattgaaaca gatggattgc acgcagttc tccggcgcct tgggtgaga ggctattcgg
 20881 ctatgactgg gcacaacaga caatcgctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc
 20941 gcagggcgcg cgggttcttt ttgtcaagc cgacctgtcc ggtgccctga atgaactga
 21001 ggacgaggca ggcggctat cgtggctggc cacgacggc gttccttgcg cagctgtgct
 21061 cgacttctc actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga
 21121 tctctgtca tctcacctg ctctgcccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg
 21181 gcgatagat acgcttgat cggctactg cccattcgac caccagcga aactcgcac
 21241 cgagcgagca cgtactcga tggaaagcgg tcttctgat caggatgatc tggacgaaga
 21301 gcatcagggg ctgcgcccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccagcg
 21361 cgaggatctc gtcgtgacc atggcgatgc ctgcttgcg aatatcatgg tggaaaatgg
 21421 ccgctttct ggattcatc actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat
 21481 agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttct
 21541 cgtgctttac ggtatcgcc ctccgattc gcagcgcac gccttctat gccttctga
 21601 cgagttcttc tgagcggac tctgggttcc gaaatgacc accaagcgc cccaacctg
 21661 ccatcacgag atttctgatt caccgcccgc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcgtt
 21721 ttccgggacg cgggttggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttccg
 21781 cccccccgg atctaagctc tagataagta atgatcataa tcagccatat cacatctgta
 21841 gaggttttac ttgctttaa aaacctcca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg
 21901 aatgcaattg ttggtttaa cttgtttat gcagcttata atggttaca ataaagcaat
 21961 agatcacaaa atttcacaaa taagcattt ttttactgc attctagtgt tggttgtcc
 22021 aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atccgggggt acccgcgcga gaagtctca
 22081 ttccgaagtt cctattctct agaaagtata ggaacttctg cgagataact tcgtatagca
 22141 tacattatac gaagttatgt cgagatatct agaccagct ttcttctaca aagtgttga
 22201 tatctctata gtcgcagtag gcggaatttt ttatctttaa tttagaagcc gcagttatt
 22261 tgtaataata ttattagact gaataaaaga ataaagctgt gtgcagtcta gaagcagact
 22321 agaaagctcc ctcttcccc ttggtggtat atattttat cccaagaata atgtattcat
 22381 gaaaaagatt ccaaacattt taggtaatac atgcttgaaa gattttcagc agaaatgaa
 22441 agtctgctgt gtagttgtcg tacatgattt acacatttaa aatgataga ctcataccat
 22501 gctttctttt tatttaatag tatgttacag tggaaacaact tctgaacagt tacagaagtc
 22561 cttaatgttt tgcatttcag tatcaaaagg acaccaagtt tgaaaacgac tataatttgt
 22621 actatggtgg caaaagagag gactttaagc ggttggggtgta agtattgtca agttcacatg
 22681 gcacggtagg gcaagtacaa atgattttct aggcctgtt gtaactttct tggcgacagg
 22741 agcatctca tgattgaacc aggtgtgatg ctggtaagag cagtacactt gagcaatgct
 22801 ttgtgtcttg ttgaatgaga ccattgaaac gacgacacac tttagactata gtgtccagga
 22861 ttgcttttgc aaaattagag atggcgcaac gcaattaatg ataacttctg atagcataca
 22921 ttatacgaag ttatggctg agctcgccat cagttcatag gcattgaaga taagctctac
 22981 tgctgaggac accagacact tgacatagga ttcagatgac ctgagatgct tgacctaaa
 23041 gcttctctcc taagggtac ctttcttggg acaattgaaa aagtagccag gatggctgg
 23101 tgagatggct cagtgggtaa gagcaccga ctgctcttcc gaaggtccag agttcaaact
 23161 ccagcaacca catggtggct tacaaccatc ccgtaacgat atctgatgcc ctcttctgga
 23221 gtgtctgaat acagctacag tgtacttaca tataataaat aaataaatct ttaaaaaaaa
 23281 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagaaaag tagccaggaa tttgagagca atggagaggg
 23341 tatctgagag gggttggagg aagaaaagat aggatagaag tgatgtaata acattataa
 23401 tctaaaaaag taaacatggt atttaaaaaa aaaagcaagc aggaaactt acataaaat
 23461 tattctctgt tgcaggctgt tgtcttgcac ggattcttct ctgatttact atctgagtag
 23521 gtaggccctt aacgaattta actattatt aatttaatag ttaaattagc tccccattt
 23581 ctatctccc ctgtccactg agccctact gctcaaatgt ttcttccact cttagctga
 23641 gcatctttat tttctctctg cctttattgg tctttattag taacatgatg taaaatcgca
 23701 tattactgag agctcgttac ttggatctac tctgaaactt gttctcactc acatttctc
 23761 actcagagtc tggttgagct tctgttctct tgttttggca acaaagcacc atctgtataa
 23821 ctgaccact gtagggtga gtggatctgc ttctctatgg aactcactcc tttcttgca
 23881 gtttttctta agtaccttct gaaaatattg aatattttt atataaaat ttccaattg
 23941 aagataactt ttatttatat ttttattcaa gtttttcaa aactttcagc aatgtttagc
 24001 ctaaatttga ctaattttaa ttttatatta aattaaaatt tttatattct agggagaatg
 24061 ataagacaga tctggatgtt atacgagaaa atcatagatt cctttggaat gaggagatg
 24121 aagcagatat gacttgta ttttacttga ttatttattt gttgtgtgtg tgtgtgtgtg
 24181 tgtgtgtgtg tgtgtggaag gcagaggaca acttgaaga ggggttctgt tctttacca

Exon 5

Exon 6

24241 tgagcttctc agggctgaaa cgcaggtcat cagaattggt ggcaggagcc ttactaatt
 24301 agagtgtctt gccagctctga gacttgggtga ttttagccaa tagcgtctaa tggaaacaagt
 24361 gttatagtct tgtctttttt attctatatg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtaggaa
 24421 ctcttagagg ccagaggagg gcatcagatg gtccagatct gtaagtacag gaggttgtga
 24481 gccaccagc atgggtgctc agatctgaac taaggctttt tgaaaaacaa cacatgctct
 24541 taaacaacct gagccatctc tccagctcca atatgtattg tcttaatcat catttatcaa
 24601 ggtgttcagc tctttcatag acagtttctg aaggatagaa acctacattt atgactcctg
 24661 attctggttt gcttccttgg gtaatctttg gtaatttaat taacttgtaa ttgtttgacc
 24721 cagtcttcaa aaataattat gctactgttt gttgtcttat aataagcaat tgtatgttcc
 24781 ttataaaatg ttttgaataa tttggaaaaa caaaatacat gaaagtgggt ttcaaagtca
 24841 gacatcactg agggtaataa gtgaagagta attctccatc tcattctctg agagccgcca
 24901 ttaacaaaaca ggtcatctct agacagtctg cacatctgtc tatattaggc atctcttagc
 24961 attaataatt atagcatata tgtatcacct atttgatatt tcttccaagt aacaaactgt
 25021 tgttgattt ctgaatata aatacatact ttttatgaat ttagggagaa gagacttga
 25081 aagaaatact atgataaatt attcaaggaa tactgcatag ctgatctcag tagatacaaa
 25141 gaaaataag tatgccctag gaatatttac agctggcgct cttgttcaac tacagcatca
 25201 atttttatta actaccatga cccacattac tctttcctgg cactgatttg aatctgttat
 25261 cttgcacttt gagtacatt ttgaccactt accctctgtg gtcatggggt ttaaagggtc
 25321 tataggattt atgaaggaca agtgctttgt gtttgtgaga tcatctataa aaggtaaaaa
 25381 ttacacagtt ggcaactaga ttccatccgg gctgtcatct tgagcctcta gtgattaaac
 25441 actttagaat gatgtctcat ttcatagatc atgctttaa tcagcagttt tttgatgat
 25501 tgccatttat ggagtggcag atacattttt ttttctacat aaatatttct attttggtaa
 25561 aattaacttt cagtcaatgc taattagtag tggcagattc ccatttccac attacatctt
 25621 tagttaatat taaagcaatt tttattccta gctcaacttc cattggaact agagaaggta
 25681 atccaagaat ggatgatctt cagttggaaa tgttaaaagg actgagtggc tatttgtatt
 25741 ctactaagaa aaaaaatcca tttataaaca actatctaaa agaaattcta aggatttctt
 25801 tttatttatt tttttgatt tctttagttt gtgagttggt ttctagttct gtacagacag
 25861 tagcaataat taccttgcat attcctgata caaatctatg tggttggggt agaccaaaga
 25921 cttctcagtt ccttacaac tagtttgtaa tgctattgca tagcacttgt ctgtaccagc
 25981 gaattaccat agtaactagt ctggagtcag cacaaccacc tggatggagt tgcttghtaa
 26041 tactagacag taagccaagt ctgaaatacc tttctaggcc catgtggcaa agtattatgc
 26101 cagccatgga tttttttttt ttttaatgat acactccagt atttatcgaa attggactgc
 26161 accctctatg gctgcggtct cgatgggtgt gatgggtgat acctgtggtc tcatcacttg
 26221 aggcagtagc aggattgtga agtcatgact agctgaggct gcagagcaag ttttgagga
 26281 gatactgtct caaaaaaat gtagtctagc taaggagaac agataattca caagagtgtt
 26341 taaagtctcc attttaaaaa tactactaga attagggagc tggaaagatg gctcagtggt
 26401 taggagtgtc tgcagaggag tcataaggac ctgaggacga gaggttggat ttcagaccac
 26461 atgtaacaag gcaggcaacc acacatatgt aaatacacac acacacacac acacaccctg
 26521 tagtaacagc ctggatgtag tcagagatag gaggatctct aggacttgtc agcctctatc
 26581 ctagctccca ctcccagcaa aattgcaagc ctgaggggtca gggagagAAC ttacttcaa
 26641 gaataggtaa gggtagctta gacacctcag acactctctc ggctctcta tgtgcatgca
 26701 ctctgtgac tgtctttttt ttttctcca ctttttaaaa tctatttaga atattaacaa
 26761 ttagtagaagt agaagaaaat ctcttatgaa gttctctatg aaaggaaat gtgacaagtt
 26821 tctgggttag cagaaactgt tccatctgca agggagaata cacagcttaa ctgaatgac
 26881 tgggtagtgt tccttctggt tctattttgt ggaatagttt gaagagtatt ggtattagggt
 26941 ctctttgaa ggtctgatag aattctgcgc taaactgtct ggtcctgggc ttttttgggt
 27001 taggagactt ttaaagactg cttctatttg tttacagggt atgggactgt ttaggtgggt
 27061 tatctgatcc tgatttaact ctggacttgc gtatctgtct agaaagtgt tcatctatc
 27121 cagattttcc agttttattg agtttaggct cttgtagtag gatctgatga ttttttaaat
 27181 atcctgggct tctgatgta tatctccctt ttcatttctg attttgttaa tttgaatact
 27241 gtctctgtgc cctctggtta gtctgactaa gggcfaatct atctttgat ttttctcaaa
 27301 gaactagctc ccagttttgt tgatctttgg atagtctgt tttttccac ttggttgatt
 27361 tcagccctga gtttgattat ttcttccat ctactcctct tgggtgaatt tgcttctttc
 27421 tgttctagag cattcagggtg tgctgttaag cttctagtgt atgctctctc cagtttcttt
 27481 ttggaggcac tcaagttatg agttttctc ttaccagtcc tttcattgtg tcccataagt
 27541 ttgagtattt tgtgccttta ttttcattaa attctaaagt ctttaatttc tttatttctt
 27601 ctttgaccac gtgatcattg agcagtgcac tgttcagctt ccattgatat gttggctttc
 27661 ttttctttt attgctattg aagaccagcc ttagccctgg ttagcctctg atctctgatt
 27721 ctctcttcta tctcttgtat tctgttgggt atgcttgcac caatgtctcc tgatctcttt
 27781 cctaggtttt ctatctccag ggttgcctcc ctttgtgatt tctttattgt ttctatttcc
 27841 attttttagat cctggatgtt tttgttcaat tctttcacat gtttgggtgt gttttttct
 27901 aattctataa gggatttttg ttttacatct ttaagggtct ctacctgttt acctttgttc
 27961 tctgtattt ctttaaggga gttatttata tctacttaa agtctctat catcatcatg
 28021 agatgtgatt ttaaatacaga gtcttgcctt tctgtgtgtg tggggtatcc agggctcgtc
 28081 gtgggtggag aactggattc tgaaggtgcc aagtagcctt ggtttctgtt gcttctgttc
 28141 ttatgcttgc ctcttgccat ctggttatct ctgggtgttag ctggcttgc tgtcgtgac
 28201 tgtggcttgt ccctccagca agcctagggt tcaatactcc tgggagacca gttcttctct
 28261 ggaggaattt aggtatggag agctgtggta cagggttggc tctggggtac attcagaaac

Exon 7

28321 cagaaggatc ctgtcccggc tactccatgg tgtcctgatt gatggctatg ggtgggtctc
28381 tcttgggcca gaaatttgaa cagaaatggg ggtcttacct gtaatcatag gtgtgctggc
28441 actcctggga gaccagctct ctcctggcag tatttgggta tggagcactg tggcacagga
28501 tcagctcctg gcacagacag aaactggaag gatcctgtcc ctggctgctc ctcagttctt
28561 tgttcctgag ggctccagga gggctcctct gagcagaagt ggtgactatc ttaagaagag
28621 taattttgat agatgttatg ttttgttaga acatggtaac tgcagtgtgaa aagaagatag
28681 gtgataataa gaaacgaaac atgacttggg tttgagtgtg gaaatgagag aacaggaagt
28741 ttggaggggc tatgtttgga acatgtaata gctctgtgtt ctagcatacc atgtttgaca
28801 tgttgaaaaa agtttagctt acatcatgct tccagagtta ggatgcgttt ttctcttagc
28861 ttcatttaca cagatagtac tttattcact ttaattaagc aggtcttaat taattagtta
28921 atcagtcctt actgtacata gcagagcctt aaggcacgtc tagtgactct tcctttgctc
28981 tgtgttcctg ttcctttctt tgaaaacttt tcatgtttga ggctgtattt gaggttctatt
29041 gagccactag gaaaggagaa gtgggataag aaaaaaggaa aaactgtct ttaaatgagc
29101 caaaagctat ttttctttaa cagaaagtcc cagtagatct gtgttgacag aagcaggatt
29161 caggaccaag ccctgagtaa ctgcagctg gatcccatga gaagaactgg ggttgggaaa
29221 ggatataagg agacagaggt taaaaagtgg gacagtgtag tctcttactc cccataagat
29281 tataactttc ctctgtgatg atagtgcctt gtaaagcttt atttattttt gttttatgta
29341 tatcaatggt tgcctgcaca tgtatgtgta ctgcatgggt gtattgtgcc tgtggggacc
29401 agaagaaggt gtcagatgcc cccgtactgg aggaatagat gtttgtgatg cactctatgc
29461 atattggcag tcaaaccctg gtcttctgca gcagcactaa gcgctcttta acagctgagc
29521 ctttctcca gtcctgaaat acaagtcaa taagtgttc cttaaataga tgaatgaatg
29581 aaagaaaagg cttggaaaac tcttgctagt aatacagttg actttgtgct tcagtagaca
29641 ctgcaagaca atgtgggatg gcatgtaatc tctagacaca gatatacact aaagcataaa
29701 atgaaagga gtcactttaa aatttttact tccttttttt gatacttatt tatttactc
29761 cccccatag acatgggaa ttttattttt atttgcattt taactagaat gttttgacat
29821 ttttttgaat ttttgtatga atttaagata taaatttgaa aaattaagaa atggatgatt
29881 taaaacttga atattaataa gaaattgaa gttttatctg aattatttat attttcccc
29941 tttaaaaaat gtgtatggct gttttgcctg catgtctatc tgtgtaccac atgtgtgcag
30001 tgcctgtgga ggaaggaaga tgtcagctcc tctgagctag agttgtagggt agttgtgagc
30061 caccacatag gggctgagac ttaagcctgg tctgtctgag tagcagccag tgcctttaca
30121 taccgagcca tctctccagc cttctgaatt ctctcgtagt acactgagtc tcagggttaa
30181 gatattgaaag taataccctt ggccataaac acagcccctg ttcttgttaa cactgtatac
30241 tacgcataga tgttatatgc agatgttatc ctgttcttgt taatctgtat actacgcata
30301 gatgttatat gcagatgta tcctgttctt gttaatctgt atactacgca tagatgttat
30361 atgcagatgt tatcctgttc ttgttaatac tgtatactat gcatagatgt tatacgaga
30421 tgttatcctg ttcttgttaa tactgtatac tatgcataga tgttatacgc agatgttatc
30481 ctgttcttgt taatactgta tactacgcat agatgttata tgcagatgtt atcctgttct
30541 tgttaactg tatactacgc atagatgta tatacagatg tttatcctgtt ttgttaata
30601 ctgtatacta cgcagatag tttatgcag atgttatcct gttcttgtta atactgtata
30661 ctacgcatag atgttatatg cagatgttat cctgttcttg ttaatactgt atactacgca
30721 tagatgttat atgcagatgt tatcctgttc ttgttaatac tgtatactac gcatagatgt
30781 tatatacaga tgttatcctg ttcttgttaa tactgtatac aacgcataga tgttatatac
30841 agatgttatc ctgttcttgt taatactgta tactacgcat agatgttata tgcagatgtt
30901 atcctgttct tgttaactg gtatactgtg catagatgtt atatgcagat gttatcctgc
30961 ctcaactcct gttagattta ggtattttaa aagtcatttt taacagaagt tggtaattgt
31021 caggagatat ccttaagttc tgtaaaaaga gaaaaagcca tcacactgat agttaagttt
31081 attttccagg ctgaaaacgt caccaacctt ggctttgtgt ttagatttgt acatatatta
31141 atttaaaatt tgaatttaca tttattttat ataaatgtac tttttttttt ttttaacca
31201 gtttggattt **aggtggcgaa tagaaaaaga agtaatttca ggaaaaag**gta actttttaa
31261 aatttttact ttctaattga tcacagttta ctttgttata tagaattgaa atcaccagggt
31321 gagaattttt tcttataaaa ataaagtttg ggaaaaatgt atttctgata tatatgttgt
31381 tagcaaagat cagaatttaa tgccttcatg acttcttttag aatttggctc ttagaatatt
31441 tgaggatatg tggacaatgt tttagaatt aaagatttag taacaaggaa caagtgcctg
31501 attatcaatt ataacaaaat attgatagta ctgcattcca acaaaaatca ttattttgaa
31561 gatgttaaat atcattcgtg aacccaatag agttgactc cagctccagg gatcgggagc
31621 cctcttctga ccgctcccgg caccgcgctt gacgtgcacg gatatgagtg gcaggggtgt
31681 tttctgtgac tgataaaggc tctgtagagg ggagggaaag gggatgaatt taagcagct
31741 ctctttggg tcagtgaagc gtttgggtgg taaggacagc tgccacacca gcctgcaac
31801 ttcatttcaa tccctcaagc tagagttaaa ggagagaaca cactcaacag aattgtcctc
31861 tgaactctac atgcatgcac gcgtgtgtgc tcaagcacac acacacatgc cgtgcacaca
31921 caatattaaa tatacttttt gggttttgtt tttcaagaca gggtttttcc gtgtagccct
31981 ggctgtcctg gagcttgctc tgtgaatgag gctgggcagg aacttgatcc tcctacctc
32041 gcttctctgag tgttgagatt aaaggtgggc accactgcca ccaccatccc cagctcccta
32101 tccccctact ctcccacccc cagctaagta aacattttaa aaaataaggc aattcaaaag
32161 ttttcttaag gtcatgtttt attttgtatc tttacctaaa attatgagat atctgagatg
32221 tcaactagtaa aaatatctgt attaattttg tcaagtgaaa tttttaggag agtatataaa
32281 actgctttta aaaaaatggc aggcgtccgg ccgtgggtgg gcacgccttt aatcccaggg
32341 aggcagaggc aggcgattt ctgagttcga ggccagcctg gtctacagag tgagttccag

Exon 8

32401 gacagccaga gctataaaga gaaacctgt ctcgaaaaac caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
32461 aaaatggcag gcattctcta agttcttaaa tgaatatagg actagtgagg aagcagagaa
32521 caagctgttg ctctgttaaa acagtggtgt gcttgctgtt taacagacat tactaaacat
32581 gctaacaatg cttaattaat tagcttttca tttgggataa cttgtacaat aattctgtga
32641 cttccttaca tacttcatgg catgacatgt atgtatacac acaatagata gatagatgca
32701 tacatacata catacatgca tgcagaaagt gtgttttaag ttcaagtcgt cctctgtcac
32761 atgataagct tgaggttagt ctggggcaca tatgctagat cctgggtgcag acgactgagt
32821 tacaatcag cctttggatg ctgatgttag agtttcattt tggcagctct ttgcatttta
32881 tgaaaaagaa tttatggttt ctatttgtaa ctcttggtgc aaattattgt ggtgaaatt
32941 gttctttgta taaatcattt ttattttctc tttctctttt tctgcaaaa tagttttgag
33001 ttgtgcttat gtccaaatca ttttttgc cttagaagtt tttagataga attttatgta
33061 aatgatataat ttgaaaacat taatttaaca tttagctaaa tactgaaagg actgacatct
33121 aagagcatgt cttttgggaa atgatctctt tcagggtttt agttagtaca cttactattt
33181 cactttctaa agtgtaagat tctctaatat ggactcacta aaattctact taaataaaca
33241 gtttaccac aggaattgtg tgccagcttt tgttttaaga gttcagctct tttagctggg
33301 ccggtggcac agtctcatgg tcccagctac cctggggatg tttgcaattc agtctgacc
33361 tttagaacaa gttctagggc agcttaggca atgtggcaag caagcaagaa ataataatg
33421 tgtttttggt tgtttgggtt agacttaat ggtaaaaaca acacttgc acactgaggt
33481 cctgggttca gtcccactg tagaaggaaa aaagcatctc tctgatttca ttttcaata
33541 catgcatgct atagttattg tggatcatcat tttcatgct gactttgtat tgaatttatt
33601 atatttattt tataattttt aaaggaaaat tttagaggtg ataggttctt gtagggtact
33661 cctatcatgt actgtgggtg acagctctt tcttttgcag gccagttttt ttgtgaaat
33721 aaatgttga atgaaaaaga aggectgagg agctgggagg tcaacttcgg ttacactgag
33781 cacggtgaaa agagaaacgc acttgtaaa ttaagtaaga cgtgttcagt ggattcttc
33841 caaatttacc ttgaatttag aactgaaaaa aatgtatgta ctatttaatt ttaaaagatt
33901 tggatattt tcctgaaagt atacttttct cctgtagttt ccccaaacct caaataaaat
33961 ttgaatctaa agtcttttagc attatggaag cgctttgata agacaattct aatgtcagat
34021 ttcagctggt aactgttaga gtcactgtgt acaagctga ggatggcact agattaggag
34081 tctaagtcag agtatcagaa aggcagtgtgac gacctcacat ctgattgtgt agccgtaatt
34141 atcagcaata aatacatttt cttctgaca gtgagtgaag attttggaaa aatatccttt
34201 taaaaaagt tttacgtaac taacttaata ttaattttac ttaataatga gtttactat
34261 tctatttca tgtatgtaca cacacacaca cacacacgta cacatatgct atttactctc
34321 tcttgtcccc tcatacactg atcccccttt tcttctcat tagtctcat gtgtgtgtct
34381 gtgtgtgtct gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtga cccaataagt gtagttaggg
34441 ttacttacga ggtgagggat ttttacagg acccacttac cagttgctct acacctgaag
34501 aaatcttcag gagtacagag tctcacgaat ctcccccaac tccacaatga tggactgttc
34561 atgcatttaa tagtctgaag gttttatata agtaatcaca gctgtgaga attcagggt
34621 gtagtgtta tgtcatgctc agaggacaga gttatgtgac gactgtgct accttgggt
34681 cttctttttt ctttttttct tctgcttct cactgtagat gttccctgag ccttggaggc
34741 tctaataatag gtgccctagt aagagctgag ccagttattc tcagcacttg gactagttat
34801 gagtctctgc actaataact gcactcataa ttgtctctca ctgcaaaaaa gttgagcta
34861 gcaccattct gggtaattag gagactattt gacaaccaca ccagactatt taggaaagca
34921 gtgcaatag cttccatact aggaccagcc acaagccgt gaccagattt ggagtaagat
34981 ttccagact tcatgtggac ttctctctgt agagtggacc ttaataacca tccagagttag
35041 ttggtaattc cataacagtc atgcccactat cacaccagtg ggcaggcaca tttgtctgg
35101 gagatgggtt gtctaacaatg aaggattcgt ggctgagcaa gaccattgat gacaactctc
35161 ccagaacccc ctgcacagta cttctggca ctgtgaaagc taatctctag agaggaagct
35221 tccagctcca tttccttgt ctctcaaca agcaaagcat atggtatctt caattgcgct
35281 gtctctctg gcttctaattg ggcaactaat ggccttagca ccagtcagt tttttaaaa
35341 gtatagatag gagctagtga catggttcag tgggtgagg acctgtacc aagctgaca
35401 tcttgaattt attccctgga gcccaaatg tggaaggaga caacagacca tgtaaactgt
35461 cctcagacct ccatacactc atcgactca ctgtggtgca tgcacatccc ctgccacaa
35521 agtaataacc atgtaattag gaaacagtgt agagggactg gagagatggc ttagaggtca
35581 ggagcattgg ctgctctgc aaatgacca ggtttgattt ccgtagccac atgatgattc
35641 acagccacct gtaactccag ttccagggga gccagtacc tcttggctc cacagtgagc
35701 ctgtatgcac atgtccaggc atgtgtgtag acaaaacact catacatata acttttaaaa
35761 ataaagaaa agattagaga taaatgtac tttgagtgtt gttctctctg agttctcaa
35821 cattgtcat ttaagaccag gtctctgtct gaacctagag ctcaccagca gcagcaggt
35881 gcctatagcc atggtttaca gtgttaccct gctctttttt aaaattagtt tacatcttc
35941 agttgcttgc ttgctccctc cctcgctccc tccctcgctc tctccctccc tgcctccc
36001 cctccctccc tccctccctt ccttctccc tccctccc ctttctcc tccatttat
36061 gaccatcagc ttttctggct ctgtaataaa tcttcagagt ttcagctcc tctgtatgt
36121 acagattggt ttctgtgagc tctctctgat agtacagatt ggtttctgtg agctctctt
36181 agaagcacct gtctgaaaa gtcagcagat ttggaatgag actagggaaa agaagttttt
36241 atagtggatt ctctttctgt ttacttgaaa gtttttaaca cttcagagga gatggctaaa
36301 cccaaataat aatcatcatc atcattatca ttattatata catattatta catcatgtta
36361 tattaagaga gatctttgat gtcagatact aattttgtct atgaaacaca atggataaaa
36421 ctttttctaa cgtaccttta aaacaacatt ttcatatgta acagggtcga cacatatata

Exon 9

36481 aactcacaaa gacagcatat ataagaccag cacaagttca aaccagatag aatcccagca
 36541 cctacatggg aaagtgggta cattaagcag gaagaagttt gtgattggta gctgctggga
 36601 aaaggaaaaa aataagtttt ctttaatgag tgatactttt tttttcaaa agagagagaa
 36661 aatatgaatt ggggtggata gggaggggga tcttggagga actgagggaa gggagagagt
 36721 atgatcaaat atattgtatg aaaaaaatt ctcaaacatt gtaataaat ttttagatata
 36781 ctgttagatt attttctttg tattatttcc tgtgtatagt aagggataga aagaacatgg
 36841 gaaattataa ttaaaatata tagagttgca atataattac acggattcag aagctcagtg
 36901 gtatatTTTT tctcttttag **gattatgcc** **agaatgttc** **tttaaat** **attttcatca**
36961 **cag**gtaattt ttttctttta aaatatcatt tttaatgttt agtaacttag gccatactca
 37021 ttttatcaca ctgagtgtct aaatctcaat ttggaaaatg gatttgttta gaacatagag
 37081 catcattgta tgatccatgg aattggagat tcaactctgcc ctcatcaagc caagcaagtt
 37141 tatatgtaaa ggtctgtgtg gggcगतaga tgcctgttgt taatttgag ccaacgacta
 37201 gacactgtaa tagtcctaga aatgatatta taaagctggc tgcataaact ggagcatgag
 37261 tgcagtctctg cctgcgtgag tgtgtgcca cgcgtttctt aggcagctaa aggaggacac
 37321 tgagtgtgtg gctctctgtc ttttccccg ttactcactt aaaacaaggc ctctggttaa
 37381 acctggagct tgccattttt gactagtctg actggtaagc cccagcaatg ttctgtctt
 37441 tggctctccac cttcctgtcc ctaagcactg agattattgg cgaacatggc cacagctgac
 37501 atttatgtgg ttcttgggat tcagattcaa ttccccgtgt ttgcattgca gactctctta
 37561 cccaggcatc ttttaagcat ctggagtgtg tctgctatgt tgaattagga gtgccactgg
 37621 tctgcaccat gcctttcatg tgagatcatt ggtcttggtt ttattttatt atttgcttgt
 37681 tttttgtttt gctattttgt ttcgattttt aggaagactg cttcagttc ataatgcctc
 37741 tgaggctagc ctcacatttg tgattctcct gtctcagcct cttgagtgtc ggctggggtt
 37801 ataggccaac acccggctta ttaagtttag gaataagcat gtctacattg tgttctagct
 37861 actacaaata aacagtacat tttcaaaacc agcaggattt tttatgttac tagaatggcc
 37921 agcccaaacc ttaatttctt ttttctgtta gtgatgctga gagattgaag gtattttgtg
 37981 actttccctt ttgagtgaca tttcaga

Exon 10

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Και στις δύο αλληλουχίες σημειώνονται οι αλληλουχίες τόσο των εξωνίων όσο και των εκκινήτων.