



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη ποντικού με απενεργοποιημένο το γονίδιο *Fra10ac1*

Μυρτώ Χατζηαγγέλου του Δημητρίου

Λάρισα, 2020

Thesis

Study of knockout mice for the *Fra10ac1* gene

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Σαραφίδου Θεολογία (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια): Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μαμούρης Ζήσης: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μούτου Α. Αικατερίνη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Members of examination committee

Sarafidou Theologia (Supervisor): Assistant Professor of Animal Molecular Genetics, Laboratory of Genetics, Comparative and Evolutionary Biology, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly.

Mamuris Zissis: Professor of Animal Population Genetics, Laboratory of Genetics, Comparative and Evolutionary Biology, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly.

Moutou A. Katerina: Associate Professor of Vertebrate Biology, Laboratory of Genetics, Comparative and Evolutionary Biology, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Σαραφίδου Θεολογία που μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ στο συγκεκριμένο αντικείμενο μελέτης και για την υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της ενασχόλησής μου με αυτό. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, που συνέβαλλαν παρέχοντας οποιαδήποτε βοήθεια χρειάστηκα, στην εκπλήρωση της πτυχιακής αυτής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	σελ. 1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	σελ. 3
1.1. Το γονίδιο <i>FRA10AC1</i>	σελ. 3
1.1.1 Το γονίδιο <i>FRA10AC1</i> αποτελεί μέρος της ευαίσθητης σε φυλλικό οξύ εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης <i>FRA10A</i>	σελ. 3
1.1.2. Εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις.....	σελ. 4
1.2. Μεταγραφή του γονιδίου <i>FRA10AC1</i>	σελ. 4
1.3. Η πρωτεΐνη <i>FRA10AC1</i>	σελ. 5
1.3.1. Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης <i>FRA10AC1</i>	σελ. 5
1.3.2. Σωματίο συναρμογής, διαδικασία συναρμογής και εναλλακτική συναρμογή.....	σελ. 6
1.3.3. Πιθανοί ρόλοι της πρωτεΐνης <i>FRA10AC1</i>	σελ. 9
1.4. Το γονίδιο <i>Fra10Ac1</i> στον ποντικό.....	σελ. 10
1.4.1. Πλεονεκτήματα της χρήσης του ποντικού ως οργανισμό-μοντέλο.....	σελ. 10
1.5. Δημιουργία ποντικών knockout.....	σελ. 11
1.5.1. Σχεδιασμός φορέων στόχευσης.....	σελ. 13
1.5.2. Μεταφορά του φορέα στόχευσης στα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα και δημιουργία γενετικά τροποποιημένων ποντικών.....	σελ. 14
1.5.3. Δημιουργία ποντικών knockout-first (<i>tm1a</i>).....	σελ. 14
1.5.4. Δημιουργία ποντικών reporter <i>lacZ</i> (<i>tm1b</i>).....	σελ. 15
1.5.5. Δημιουργία ποντικών floxed (<i>tm1c</i>).....	σελ. 15
1.5.6. Δημιουργία ποντικών knockout (<i>tm1d</i>).....	σελ. 16
1.5.7. Διασταυρώσεις ποντικών για την αφαίρεση των διαγονιδίων και της κασέτας επιλογής νεομυκίνης.....	σελ. 17
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	σελ. 18
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	σελ. 19
2.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ουρά ποντικού.....	σελ. 19
2.2. Ποσοτικοποίηση του απομονωμένου DNA.....	σελ. 20

2.3. Γονοτύπηση των δειγμάτων DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....σελ.	20
2.3.1. Τα στάδια της PCR.....σελ.	21
2.3.2. Σύσταση του διαλύματος αντίδρασης.....σελ.	22
2.3.3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την PCR.....σελ.	22
2.4. Ηλεκτροφόρηση του γονιδιωματικού DNA και των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.....σελ.	23
2.4.1. Σύσταση και παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης.....σελ.	24
2.4.2. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης.....σελ.	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....σελ.	27
3.1. Απομόνωση DNA από ουρά ποντικού.....σελ.	27
3.2. Ποσοτικοποίηση δειγμάτων απομονωμένου DNA.....σελ.	28
3.3. Γονοτύπηση των δειγμάτων DNA με τη μέθοδο PCR.....σελ.	28
3.3.1. Γονοτύπηση των δειγμάτων DNA ποντικού για την παρουσία του αλληλομόρφου <i>wt</i> , <i>tm1c</i> και <i>tm1d</i>σελ.	28
3.3.1.1. Ανίχνευση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου (wild-type) και <i>tm1c</i>σελ.	30
3.3.1.2. Ανίχνευση του αλληλομόρφου <i>tm1d</i>σελ.	31
3.3.2. Γονοτύπηση των δειγμάτων DNA ποντικού για την παρουσία του διαγονιδίου της ρεκομπινάσης <i>Cre</i>σελ.	32
3.3.3. Γονοτύπηση δειγμάτων DNA ποντικού για την παρουσία του διαγονιδίου της ρεκομπινάσης <i>FloPE</i>σελ.	34
3.3.3.1. Εύρεση θετικού μάρτυρα για την PCR.....σελ.	35
3.3.3.2. PCR κλίσης θερμοκρασίας (Gradient PCR).....σελ.	35
3.3.3.3. Επαλήθευση προϊόντων PCR με εκκινητές τους <i>Rosa1-3</i> και <i>Rosa1-2</i>σελ.	36
3.3.3.4. Ανίχνευση του διαγονιδίου <i>FLPE</i>σελ.	37
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....σελ.	38
4.1. Η γονοτύπηση των ποντικών με απενεργοποιημένο το γονίδιο <i>FRA10AC1</i> έδειξε ότι οι επτά ποντικοί είναι κατάλληλοι για τις επακόλουθες αναλύσεις.....σελ.	38

4.1.1. Πιθανοί ρόλοι της πρωτεΐνης FRA10AC1.....σελ.	38
4.1.2. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων διαφορετικών κυτταρικών τύπων έπειτα από απλοανεπάρκεια ή πλήρη απώλεια του γονιδίου <i>FRA10AC1</i>σελ.	40
4.1.3. Συμπεριφορικά πειράματα.....σελ.	41
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ.	42

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γονίδιο *FRA10AC1* εντοπίζεται στην σπάνια εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A* στην χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3 του ανθρώπου. Φορείς της εύθραυστης θέσης *FRA10A* εμφανίζουν συνήθως νοητική και αναπτυξιακή υστέρηση. Η θέση *FRA10A* εκφράζεται απουσία φυλλικού οξέος στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας όταν υπάρχει επέκταση κατά τουλάχιστον 200 φορές των τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων τύπου (CGG)_n στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *FRA10AC1*. Η επέκταση αυτή προκαλεί υπερμεθυλίωση και κατ' επέκταση μεταγραφική καταστολή του αντίστοιχου αλληλομόρφου του γονιδίου *FRA10AC1*. Η πρωτεΐνη *FRA10AC1* έχει χαρακτηριστεί ως συστατικό του μείζονος σωματίου συναρμογής και των υποσυμπλόκων του, χωρίς να είναι ξεκάθαρη η ακριβής λειτουργία του.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία περιλαμβάνει την διαδικασία γονοτύπησης ποντικών με απενεργοποιημένο το γονίδιο *Fra10ac1* (knockout), που έχουν προέλθει από επιλεκτικές διασταυρώσεις. Οι ποντικοί αυτοί (ομόζυγοι και ετερόζυγοι για το απενεργοποιημένο αλληλόμορφο του γονιδίου *Fra10ac1*) θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης τόσο του γονιδίου *Fra10ac1* όσο και των υπόλοιπων γονιδίων των οποίων η έκφραση ενδέχεται να επηρεαστεί. Επίσης θα χρησιμοποιηθούν και για ανάλυση προτύπου συναρμογής καθώς και για συμπεριφορικά πειράματα. Ειδικότερα επτά ποντικοί κρίθηκαν μετά τη γονοτύπηση κατάλληλοι για να υποβληθούν στα ακόλουθα πειράματα καθώς έφεραν το αλληλόμορφο knockout και όχι κάποιο από τα διαγονίδια των ρεκομπινασίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των ποντικών αυτών.

ABSTRACT

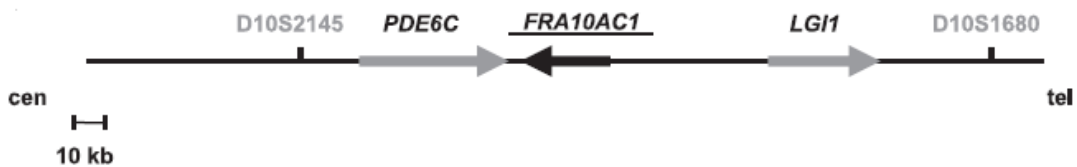
The *FRA10AC1* gene is mapped at the rare fragile chromosomal site *FRA10A* in the human chromosomal region 10q23.3. Carriers of the fragile *FRA10A* site usually exhibit mental and developmental retardation. This fragile site is expressed in the absence of folic acid in the culture medium and is caused by the 200-fold expansion of the trinucleotide repeat (CGG)_n located in the 5' untranslated region of the *FRA10AC1* gene. This expansion causes hypermethylation and consequently transcriptional repression of the corresponding allele of the *FRA10AC1* gene. The *FRA10AC1* protein has been identified as a component of the major spliceosome and its subcomplexes, but its function is unclear.

The present thesis includes the genotyping of knockout mice derived from selective crosses. These mice (homozygous and heterozygous for the inactivated allele of the *Fra10ac1* gene) will then be used for subsequent experiments, such as behavioral tests as well as gene expression splicing pattern analysis. In particular, seven mice were suitable for the following experiments after genotyping as they carried the knockout allele and not one of the recombinase transgenes used to create these mice.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το γονίδιο *FRA10AC1*

Το γονίδιο *FRA10AC1* [fragile site, folic acid type, rare, fra (10)(q23.3) candidate 1] χαρτογραφείται στον άνθρωπο στην χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3 ενδιάμεσα των γονιδίων *LGII* και *PDE6C* και αποτελείται από 19 εξόνια, 5 από τα οποία (εξόνια 13, 14, 15, 16 και 17) υφίστανται εναλλακτική συναρμογή (ή εναλλακτική συρραφή). Το γονίδιο *FRA10AC1* εκτείνεται σε περιοχή 33kb και μεταγράφεται από το τελομερές προς το κεντρομερές κωδικοποιώντας μια πρωτεΐνη μεγέθους 315 αμινοξέων (Εικόνα 1). Όλα τα όρια ιντρονίων ακολουθούν τον κανόνα AG/GT θέσης συναρμογής. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ATG εντοπίζεται στη θέση 195 (στο εξόνιο 2). Το κωδικόνιο τερματισμού μετάφρασης, TGA, βρίσκεται στο εξόνιο 19 (Sarafidou, T. et al., 2004).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της χρωμοσωματικής περιοχής στην οποία χαρτογραφείται το γονίδιο *FRA10AC1*. Στην περιοχή αυτή απεικονίζονται τα γειτονικά γονίδια *LGII* και *PDE6C* καθώς και δύο μικροδορυφόροι, οι *D10S2145* και *D10S1680*. Με το βέλος φαίνεται ο προσανατολισμός μεταγραφής του γονιδίου (Sarafidou, T. et al., 2004).

1.1.1. Το γονίδιο *FRA10AC1* αποτελεί μέρος της ευαίσθητης σε φυλλικό οξύ εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης *FRA10A*

Η χρωμοσωματική θέση *FRA10A* είναι μια σπάνια ευαίσθητη σε φυλλικό οξύ εύθραυστη θέση. Η έκφραση της εύθραυστης θέσης *FRA10A* έχει συσχετιστεί με νοητική υστέρηση, νευρολογικές διαταραχές και αναπτυξιακές ανωμαλίες (Sarafidou, T. et al., 2004). Όπως και σε άλλες γνωστές εύθραυστες θέσεις αυτής της κατηγορίας, ανιχνεύτηκε και στην περιοχή που εκτείνεται στη θέση *FRA10A*, μια επανάληψη CGG. Αυτή αποτελεί μέρος της νησίδας CpG στο εξόνιο 1, εντός του 5' UTR (5' untranslated region) του γονιδίου *FRA10AC1*. Παρόμοια με τα άλλες ευαίσθητες σε φυλλικό οξύ εύθραυστες θέσεις, η θέση *FRA10A* σχετίζεται με την έκφραση ενός γονιδίου. Ο αριθμός των επαναλήψεων CGG βρέθηκε ότι κυμαινόταν στον πληθυσμό από 8 έως 14 αποδεικνύοντας ότι η επανάληψη CGG στο 5' UTR του *FRA10AC1* είναι πολυμορφική. Αποδείχθηκε ότι οι επεκτάσεις που ξεπερνούσαν τις 200 (600-800bp) επαναλαμβανόμενες μονάδες ήταν μεθυλιωμένες σε όλους τους φορείς της εύθραυστης θέσης *FRA10A*. Έτσι αποδείχθηκε ότι τα αλληλόμορφα *FRA10AC1* με

αυξημένες επαναλήψεις σιγούνται μεταγραφικά ως άμεση συνέπεια της παρουσίας της εύθραυστης θέσης *FRA10A* σε αυτό το χρωμόσωμα (Sarafidou, T. et al., 2004).

1.1.2. Εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις

Χρωμοσωματικές εύθραυστες θέσεις είναι τόποι που παρουσιάζουν κενά ή θραύσεις σε μεταφάσεις κυττάρων που αναπτύσσονται υπό συγκεκριμένες συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας. Γενικά, διακρίνονται σε κοινές και σπάνιες εύθραυστες θέσεις. Σύμφωνα με τις συνθήκες καλλιέργειας κάτω από τις οποίες παρατηρούνται οι εύθραυστες θέσεις, οι σπάνιες εύθραυστες θέσεις ταξινομούνται σε ευαίσθητες σε φυλλικό οξύ και ευαίσθητες σε δισταμικίνη A ή βρωμοδεοξυ-ουριδίνη (BrdU). Στην συγκεκριμένη εργασία η χρωμοσωματική θέση που εξετάζεται είναι ευαίσθητη σε φυλλικό οξύ. Το στρες φυλλικού οξέος μειώνει τις διαθέσιμες δεξαμενές dCTP για σύνθεση DNA, έλλειψη φυλλικού οξέος μειώνει τα επίπεδα των προδρόμων για τη σύνθεση dCTP, ενώ πάρα πολύ φυλλικό οξύ αναστέλλει την αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων και την παραγωγή dCTP από το TTP. Άρα σε κάθε περίπτωση το στρες φυλλικού οξέος παρεμβαίνει στην αντιγραφή του DNA μειώνοντας τις δεξαμενές νουκλεοτιδίων (Wells, R. and Ashizawa, T., 2006). Η πλειονότητα των ευαίσθητων σε φυλλικό οξύ εύθραυστων θέσεων βρίσκεται στις ρυθμιστικές ή 5' μη μεταφραζόμενες περιοχές (UTRs) μεταγραφόμενων γονιδίων, όπου υπάρχουν επαναλήψεις χαρακτηριστικές για τις θέσεις αυτές που υφίστανται υπερμεθυλίωση. Όλες αυτές οι επαναλήψεις των εύθραυστων θέσεων ακολουθούν το παράδειγμα της επέκτασης και της υπερμεθυλίωσης με επακόλουθο αποτέλεσμα τη γονιδιακή σίγηση (Schwartz, M., Zlotorynski, E. and Kerem, B., 2006).

1.2. Μεταγραφή του γονιδίου *FRA10AC1*

Το γονίδιο *FRA10AC1* παράγει συνολικά 5 μετάγραφα διαφορετικού μήκους, έναν εκ των οποίων (το πιο άφθονο) φέρει την κύρια κωδική αλληλουχία. Το κύριο μετάγραφο περιλαμβάνει τα εξόνια 1-12 και 18-19, ενώ τα εναλλακτικά μετάγραφα περιλαμβάνουν συνδυασμούς των εξονίων 13-16 και η έκφρασή των τριών εναλλακτικών μεταγράφων φαίνεται να είναι ιστοειδική και συγκεκριμένα στις γονάδες. Κατά την ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1*, ανιχνεύθηκαν μετάγραφα σε όλους τους ιστούς ενηλίκων ατόμων που αναλύθηκαν, υποδεικνύοντας την καθολική έκφραση του *FRA10AC1*. Υψηλή ανάλυση έκφρασης του *FRA10AC1* βρέθηκε στον εγκέφαλο, την καρδιά, τους σκελετικούς μύες, τα νεφρά και το ήπαρ δηλαδή σε μεταβολικά ενεργούς ιστούς (Sarafidou, T. et al., 2004).

1.3. Η πρωτεΐνη FRA10AC1

Η πρωτεΐνη FRA10AC1 είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη 315 αμινοξέων (κύριο και πιο άφθονο μετάγραφο του γονιδίου *FRA10AC1*) που βρίσκεται αποκλειστικά στο πυρηνόπλασμα και φέρει σήμα πυρηνικού εντοπισμού NLS (Nuclear Localization Signal). Πρόκειται για μια πολύ συντηρημένη πρωτεΐνη καθώς εμφανίζει ορθόλογα μόρια μόνο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (μονοκύτταρους και πολυκύτταρους) γεγονός που υποδεικνύει ότι εξυπηρετεί μια σημαντική λειτουργία (Sarafidou, T. et al., 2004). Έπειτα από επανειλημμένες απομονώσεις, η πρωτεΐνη FRA10AC1 ταυτοποιήθηκε ως συστατικό των υποσυμπλόκων του μείζονος σωματίου συναρμογής στα καταλυτικά και τελικά στάδια του μηχανισμού συναρμογής (υποσύμπλοκα B, C και P), γεγονός που υποδεικνύει ότι σχετίζεται με το μηχανισμό επεξεργασίας και ωρίμανσης του πρόδρομου mRNA (pre-mRNA), (Bessonov, S. et al., 2010, Bessonov, S. et al., 2008, Ilagan, J. et al., 2013, Schmidt, C. et al., 2014). Ωστόσο χαρακτηρίστηκε ως πρωτεΐνη χαμηλής αφθονίας (non-core) σε σχέση με την αφθονία των υπόλοιπων συστατικών του σωματίου συναρμογής (Hegele, A. et al., 2012). Αυτό υποδεικνύει ότι έχει πιθανόν δευτερεύοντα ρόλο στη διαδικασία της συναρμογής ή συμμετέχει σε άλλες διαδικασίες που συνδέονται με τη συναρμογή όπως οι διαδικασίες της μεταγραφής, αυτές που έπονται της μεταγραφής δηλαδή η μεταφορά των ώριμων mRNAs έξω από τον πυρήνα, ή η αποικοδόμηση των μη νοηματικών mRNAs στο κυτταρόπλασμα.

1.3.1. Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης FRA10AC1

Σε αναλύσεις του δικτύου αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης FRA10AC1, το οποίο αποτελείται από 1500 αλληλεπιδράσεις της FRA10AC1 με μετάγραφα και 500 αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες, αποδείχθηκε ότι η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν άμεσα με την FRA10AC1 είτε συμμετέχουν στη συναρμογή είτε σε συναφείς με αυτή διαδικασίες. Το γεγονός αυτό ενισχύει τις παραπάνω υποθέσεις που αφορούν τη λειτουργία της πρωτεΐνης FRA10AC1. Για παράδειγμα σε αναλύσεις πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων προσδιορίστηκε η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης FRA10AC1 με τις πρωτεΐνες DGCR14 και SF3B2 οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής και έχουν επιβεβαιωμένο ρόλο στη διαδικασία της συναρμογής (Γαλλιοπούλου, E., 2018). Μάλιστα το γονίδιο DGCR14 έχει συσχετιστεί με αναπτυξιακή υστέρηση (Kobrynski, L. and Sullivan, K., 2007). Η πρωτεΐνη FRA10AC1 μπορεί να δρα ως ένας trans-acting παράγοντας συναρμογής και η απώλεια λειτουργίας της μπορεί να διαταράσσει μεγάλο μέρος των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του σωματίου συναρμογής και κατ' επέκταση τη συναρμογή πολλών μεταγράφων που μπορεί να αποτελούν τη μοριακή βάση πολλών ασθενειών. Η διερεύνηση της «γειτονιάς» των πρωτεϊνών του δικτύου του σωματίου συναρμογής που προκαλούν ή σχετίζονται με γενετικά νοσήματα μπορούν να προβλέψουν πιθανά

υποψήφια γονίδια για τα ίδια νοσήματα. Για παράδειγμα η «γειτονιά» της πρωτεΐνης FRA10AC1 τόσο εντός όσο και εκτός του σωματίου συναρμογής, το οποίο περιλαμβάνει 630 πρωτεΐνες και περίπου 1686 άμεσες αλληλεπιδράσεις, είναι εμπλουτισμένη σε πρωτεΐνες οι οποίες έχουν συσχετιστεί με νευροεκφυλιστικά νοσήματα (π.χ. Alzheimer, Parkinson), (Berman, D. et al., 2014, Schulte, E. et al., 2013). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το συσχέτισμό πολυμορφισμών του γονιδίου FRA10AC1 με τη νόσο Alzheimer (Li, Q. et al., 2015) υποδεικνύουν μια σημαντική συσχέτιση της FRA10AC1 με αυτού του είδους τα νοσήματα.

1.3.2. Σωματίο συναρμογής, διαδικασία συναρμογής και εναλλακτική συναρμογή

Η συναρμογή, είναι ένα στάδιο επεξεργασίας του RNA, πολύ ουσιαστικό για τον καθορισμό της γονιδιακής έκφρασης, κατά το οποίο απομακρύνονται οι μη κωδικοποιητικές αλληλουχίες (ιντρόνια) από το πρόδρομο RNA ώστε να προκύψει το τελικό ώριμο mRNA που φέρει μόνο κωδικοποιητικές αλληλουχίες (εξόνια), το οποίο και θα μεταφραστεί. Τα περισσότερα ευκαρυωτικά γονίδια εκφράζονται ως πρόδρομα mRNAs (pre-mRNAs) που μετατρέπονται σε ώριμα mRNAs μέσω της διαδικασίας της συναρμογής. Η συναρμογή είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που συμβαίνει σε μεγάλα σύμπλοκα τα οποία ονομάζονται σωματίο συναρμογής και αποτελούνται από πρωτεΐνες και RNAs. Η εναλλακτική συναρμογή είναι επίσης μια πολύ σημαντική διαδικασία των ευκαρυωτικών οργανισμών καθώς από ένα πρόδρομο mRNA μπορούν να προκύψουν πολλές εναλλακτικές μορφές ώριμου mRNA και κατ'επέκταση μεγαλύτερος αριθμός μοναδικών πρωτεϊνών (εναλλακτικές ισομορφές) που κωδικοποιούνται από ένα μόνο γονίδιο. Ως εκ τούτου η διαδικασία αυτή συμβάλλει στην πολυπλοκότητά της γενετικής πληροφορίας που χαρακτηρίζει τους οργανισμούς αυτούς. Για παράδειγμα περισσότερο από το 95% των γονιδίων του ανθρώπου που περιέχουν πολλαπλά εξόνια υφίσταται εναλλακτική συναρμογή (Pan, Q., et al., 2008).

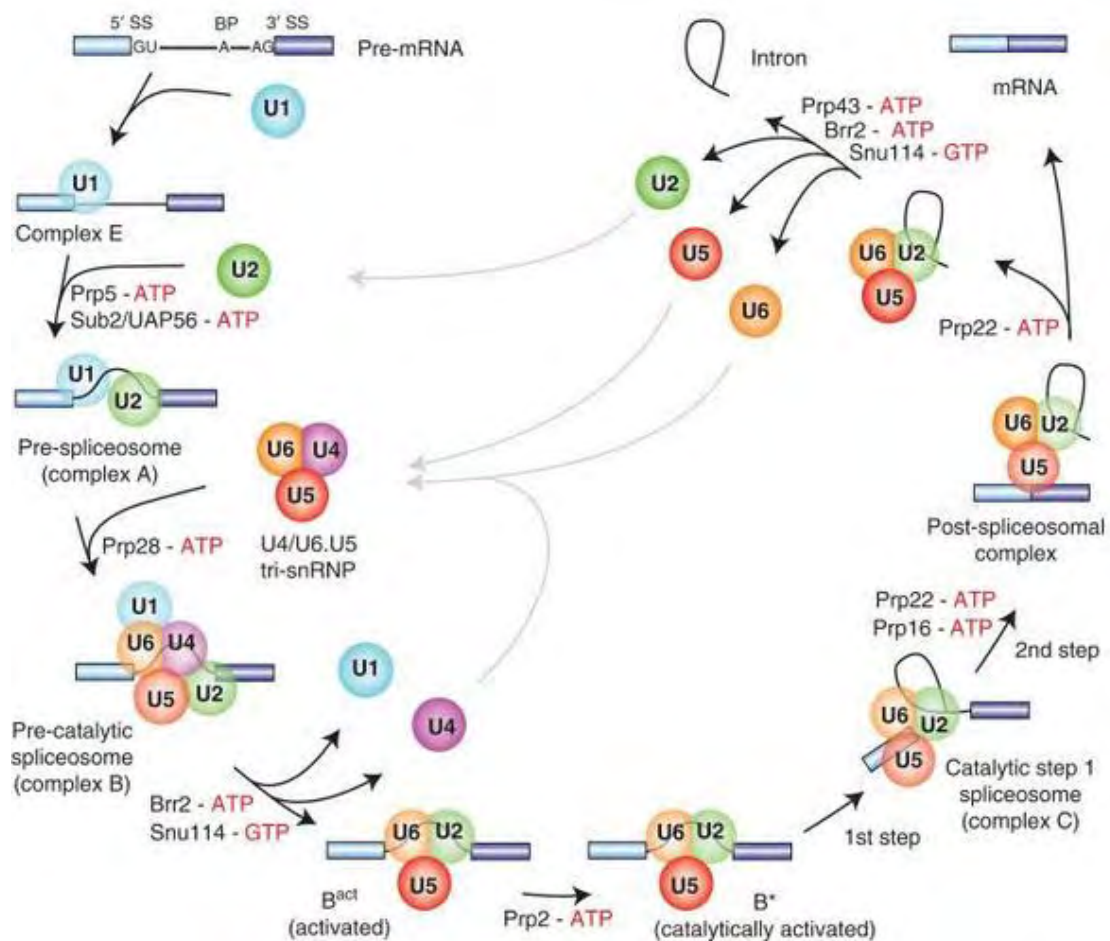
Υπάρχουν δύο τύποι συμπλόκων που επιτελούν τη συναρμογή, το μείζον και το ελάσσον σωματίο συναρμογής (spliceosome). Και τα δύο επιτελούν ισοδύναμες λειτουργίες. Το ελάσσον σωματίο συναρμογής είναι λιγότερο άφθονο και υπάρχει μόνο σε ένα υποσύνολο ευκαρυωτών και απομακρύνει τη σπάνια κατηγορία ιντρονίων τύπου U12. Το μείζον σωματίο συναρμογής απομακρύνει τα ιντρόνια τύπου U2 και περιέχει πέντε τύπους μορίων RNA τα οποία ονομάζονται μικρά πυρηνικά RNAs (snRNAs, small nuclear RNAs): τα U1, U2, U4, U5 και U6. Αυτά τα snRNAs, των οποίων το μέγεθος ποικίλλει μεταξύ περίπου 50 και 200 νουκλεοτιδίων, σχηματίζουν σύμπλοκα με έξι έως δέκα πρωτεϊνικά μόρια με αποτέλεσμα το σχηματισμό ριβονουκλεοπρωτεϊνικών σωματίων μικρών πυρηνικών RNA (snRNPs, small nuclear Ribonucleoprotein Particles), τα οποία έχουν κεντρικό ρόλο στη διαδικασία της συναρμογής. Κάθε snRNP αποτελείται από ένα snRNA (ή δύο στην περίπτωση των U4 / U6), ένα κοινό σύνολο επτά πρωτεϊνών Sm (B / B', D3, D2, D1, E, F και G) και έναν μεταβλητό αριθμό ειδικών για το κάθε σωματίο παραγόντων. Ενώ

τα U1, U2, και U5 βρίσκονται σε ξεχωριστά σωματίδια snRNP που το καθένα περιέχει ένα μόριο snRNA, τα U4 και U6 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε ένα κοινό snRNP. Το σωματίδιο συναρμογής δεν διαθέτει ενεργό κέντρο αλλά το καταλυτικό του κέντρο συναρμολογείται εκ νέου σε κάθε πρόδρομο μετάγραφο. Ένας μεγάλος αριθμός trans-acting παραγόντων αλληλεπιδρούν με το πρόδρομο mRNA για να σχηματίσουν το σωματίδιο συναρμογής (Will, C. and Luhrmann, R., 2010). Ο συνολικός αριθμός των πρωτεϊνών-παραγόντων που αποτελούν το σωματίδιο συναρμογής ανέρχεται στις 630 πρωτεΐνες (Akerman, M. et al., 2015). Η διαδικασία της συναρμογής είναι μία δυναμική διαδικασία καθώς κατά τη διάρκεια της συναρμολόγησης του σωματίου συναρμογής αλλάζει η σύσταση των διαφορετικών υποσυμπλόκων σε πρωτεΐνες, αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, μορίων RNA και μεταξύ πρωτεϊνών και μορίων RNA. Η συναρμολόγηση του σωματίου συναρμογής συμβαίνει μέσω καθορισμένης αλληλεπίδρασης των snRNPs με άλλους παράγοντες συναρμογής (Splicing Factors, SFs).

Το πρώτο βήμα στη συναρμολόγηση του σωματίου συναρμογής έγκειται στην πρόσδεση του U1 snRNP στην 5' θέση συναρμογής του pre-mRNA. Κατόπιν, προσδένεται στο σημείο διακλάδωσης το U2 snRNP. Στη συνέχεια, ένα προσχηματισμένο σύμπλοκο το οποίο αποτελείται από τα U4/U6 και U5 snRNP ενσωματώνεται στο σωματίδιο συναρμογής. Τα U1 και U4 αποσυνδέονται από το σύμπλοκο και το U6 αντικαθιστά το U1 στην 5' θέση συναρμογής. Ακολούθως το U6 σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το U2, με αποτέλεσμα να έρχονται κοντά το σημείο διακλάδωσης και η 5' θέση συναρμογής ώστε να πραγματοποιηθεί το πρώτο βήμα της διαδικασίας συναρμογής (δηλαδή ο σχηματισμός του ενδιάμεσου που έχει σχήμα βρόγχου). Τέλος, το U5 προσδένεται σε αλληλουχίες στην 3' θέση συναρμογής και τα δύο διαδοχικά εξόνια διευθετούνται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να είναι δυνατή η συνένωσή τους μετά την εκτομή του ιντρονίου (Εικόνα 2). Στο σχηματισμό του σωματίου συναρμογής και κυρίως στον ακριβή εντοπισμό των θέσεων συναρμογής στο mRNA παίζει σημαντικό ρόλο και μια σειρά πρωτεϊνικών παραγόντων που δεν αποτελούν συστατικά των snRNP. Διάφοροι πρωτεϊνικοί παράγοντες συναρμογής εντοπίζουν πάνω στο mRNA τις αυθεντικές θέσεις συναρμογής και προσδένονται σε αυτές. Στη συνέχεια, μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στρατολογούν τα U1 και U2 snRNP, κατευθύνοντας έτσι το σχηματισμό του σωματίου συναρμογής στις σωστές θέσεις. Επιπρόσθετα οι παράγοντες συναρμογής συνδέουν τη συναρμογή με τη μεταγραφή μέσω σύνδεσης του συμπλόκου συναρμογής και της RNA πολυμεράσης II. Αυτή η σύνδεση θεωρείται πολύ σημαντική διότι εξασφαλίζει τη σύνδεση των εξονίων με τον σωστό τρόπο ενώ βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη η σύνθεση του pre-mRNA. Ακόμα υπάρχει άμεση σύνδεση μεταξύ των διαδικασιών της συναρμογής και της εξαγωγής του mRNA από τον πυρήνα: Η εξαγωγή του ώριμου mRNA στο κυτταρόπλασμα είναι απαραίτητη για την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης, όμως η εξαγωγή μεταλλαγμένων μεταγράφων ή μεταγράφων που δεν τους έχουν αφαιρεθεί αποτελεσματικά τα ιντρόνια, είναι δυνατόν να μειώσει τις πιθανότητες της κυτταρικής επιβίωσης (Proudfoot, N. et al., 2002, Maniatis, T. and Reed, R., 2002). Γι' αυτό τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς διάκρισης των ώριμων

mRNAs που θα εξαχθούν στο κυτταρόπλασμα. Ένας από τους μηχανισμούς αυτούς βασίζεται στον συνδυασμό των διαδικασιών εξαγωγής από τον πυρήνα και συναρμογής (Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman, 2011, 2013). Άρα η διαδικασία της συναρμογής συνδέεται άμεσα με τη μεταγραφή και με την εξαγωγή του ώριμου mRNA από τον πυρήνα, γεγονός που υποδεικνύει μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, δικαιολογώντας τον αριθμό των 630 πρωτεϊνών που απαρτίζουν το σωματίο συναρμογής και συμμετέχουν στις διαδικασίες αυτές.

Η πρωτεΐνη FRA10AC1 βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τα συστατικά του μείζονος σωματίου συναρμογής όμως αποτελεί πρωτεΐνη χαμηλής αφθονίας (Hegele, A. et al., 2012). Πιθανόν λοιπόν να μην επιτελεί η ίδια τη συναρμογή αλλά να σχετίζεται με άλλες διαδικασίες επεξεργασίας του RNA (συναρμογή/εναλλακτική συναρμογή, μεταγραφή, οργάνωση και αναδιαμόρφωση χρωματίνης, έξοδος από τον πυρήνα και επακόλουθη αναγνώριση του ώριμου mRNA από τα ριβοσώματα). Έχουν συσχετιστεί διάφορα νοσήματα με μεταλλάξεις των γονιδίων των συστατικών του σωματίου συναρμογής. Πολυπαραγοντικά νοσήματα, καρκίνοι, μενδελικές διαταραχές όπως αναπτυξιακές ανωμαλίες, νευρολογικές διαταραχές και μυοπάθειες έχουν ως μοριακή βάση την εσφαλμένη συναρμογή πολλών γονιδίων (Γαλλιοπούλου, Ε., 2018).



Εικόνα 2: Στάδια συναρμολόγησης και αποσυναρμολόγησης του μείζονος σωματίου συναρμογής (Will, C. and Luhrmann, R., 2010).

1.3.3. Πιθανοί ρόλοι της πρωτεΐνης FRA10AC1

Σύμφωνα με αναλύσεις της πρωτεΐνης FRA10AC1 που αφορούν τον υποκυτταρικό εντοπισμό της και τις αλληλεπιδράσεις της με χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες του σωματίου συναρμογής, σε συνδυασμό με την αυξημένη συντήρησή της στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που υποδεικνύει ότι πιθανόν να συμμετέχει σε σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου, γίνονται υποθέσεις για τον πιθανό ή πιθανούς ρόλους της πρωτεΐνης FRA10AC1.

➤ Πιθανός ρόλος της FRA10AC1 στην εναλλακτική ή μη συναρμογή

Η συμμετοχή της FRA10AC1 στην εναλλακτική ή μη συναρμογή μπορεί να είναι άμεση εφόσον συνδέεται στο πρώιμο μετάγραφο ή έμμεση λειτουργώντας ως σημείο στρατολόγησης άλλων πρωτεϊνών (πρωτεΐνη-προσαρμογέας). Άμεση συμμετοχή στην εναλλακτική ή μη συναρμογή μπορεί να έχει καθώς δρα σε συνεργασία με την DGCR14 (μια επίσης συντηρημένη πρωτεΐνη) για την αναγνώριση των θέσεων συναρμογής (Lin et al., 2018). Επίσης αλληλεπιδρά με το U2AF1, συστατικό του σωματίου συναρμογής που συμμετέχει και αυτό στην αναγνώριση των θέσεων συναρμογής. Από την άλλη μπορεί να δρα έμμεσα ως συνδεδετικός κρίκος των παραγόντων συναρμογής που εμφανίζουν μάλιστα βασικό ρόλο στη συναρμογή ή να συνδέει πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε διαφορετικά στάδια της διαδικασίας. Άρα οι επιδράσεις λόγω καταστολής της έκφρασης της FRA10AC1 δε θα περιοριζόταν μόνο εντός των διαδικασιών επεξεργασίας του mRNA αλλά και σε πληθώρα βιολογικών διεργασιών καθώς δεν θα ήταν εφικτή η συναρμογή των γονιδίων που συμμετέχουν στις διεργασίες αυτές [για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι η απουσία της πρωτεΐνης επηρεάζει πολλά μεταβολικά μονοπάτια ίσως διαταράσσοντας τη συναρμογή των ενζύμων που συμμετέχουν στα μονοπάτια αυτά, (Γαλλιοπούλου, E., 2018)].

➤ Πιθανός ρόλος της FRA10AC1 στη ρύθμιση της μεταγραφής

Η FRA10AC1 μπορεί να ρυθμίζει την έναρξη ή την επιμήκυνση της μεταγραφής. Μπορεί για παράδειγμα να διαταράσσει ή να ευνοεί την αλληλεπίδραση ρυθμιστών της μεταγραφής με τροποποιημένες ιστόνες ή με πρωτεΐνες προσαρμογείς με αποτέλεσμα να καταστέλλεται ή να ενεργοποιείται η μεταγραφή γονιδίων. Μπορεί ακόμα να συμβάλει στην τροποποίηση της διαμόρφωσης της χρωματίνης ή και να δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ή συμπαράγοντας μεταγραφικών παραγόντων. Έτσι η καταστολή της FRA10AC1 θα μπορούσε να προκαλεί είτε αυξημένη είτε μειωμένη έκφραση των μεταγράφων των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

➤ Πιθανός ρόλος της FRA10AC1 ως πρωτεΐνη-προσαρμογέας μεταξύ της συναρμογής και των υπολοίπων μετα-μεταγραφικών διαδικασιών

Η πρωτεΐνη FRA10AC1 βοηθά ίσως άλλες πρωτεΐνες να αποκτήσουν την κατάλληλη διαμόρφωση ώστε να μπορέσουν αυτές με τη σειρά τους να αλληλεπιδράσουν. Μπορεί για παράδειγμα να δρα ως προσαρμογέας-μεσολαβητής μεταξύ της συναρμογής και της εξόδου του mRNA από τον πυρήνα. Ενδέχεται επίσης να λειτουργεί ως προσαρμογέας μεταξύ συναρμογής και αποικοδόμησης εναλλακτικών ή μη μεταγράφων στρατολογώντας παράγοντες αποικοδόμησης σε μετάγραφα στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί σωστά η συναρμογή. Αυτό επηρεάζει την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων σε απώλεια της FRA10AC1 καθώς η απουσία της μπορεί να προκαλούσε αστάθεια των παραγόντων αποικοδόμησης.

1.4. Το γονίδιο *Fra10Ac1* στον ποντικό

Στον συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό χρησιμοποιήθηκε ο ποντικός ως οργανισμός μοντέλο για τη μελέτη του γονιδίου *Fra10Ac1*. Το *Fra10Ac1* εντοπίζεται στη χρωμοσωματική περιοχή του ποντικού 19C2 – C3, μεταξύ των γονιδίων *Pde6c* και *Lgi1*, σε μια περιοχή που είναι συνταϊνική με την περιοχή 10q23 – q24 του ανθρώπου. Το γονίδιο *Fra10ac1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ίδιου μεγέθους (315 αμινοξέων) σε σύγκριση με τον άνθρωπο. Οι δύο πρωτεΐνες εμφανίζουν ομοιότητα αμινοξικής αλληλουχίας 92% και ομοιότητα νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 86% (Sarafidou, T. et al., 2004).

1.4.1. Πλεονεκτήματα της χρήσης του ποντικού ως οργανισμό-μοντέλο

Μία προσέγγιση για τον προσδιορισμό της λειτουργίας ενός γονιδίου είναι η μετάλλαξη αυτού του γονιδίου σε οργανισμούς μοντέλα. Ένας οργανισμός-μοντέλο είναι ένα είδος που έχει μελετηθεί ευρέως, συνήθως επειδή είναι εύκολο να διατηρηθεί και να αναπαραχθεί σε εργαστηριακό περιβάλλον και έχει ιδιαίτερα πειραματικά πλεονεκτήματα. Οι ποντικοί (*M. musculus*) θεωρούνται εδώ και πολύ καιρό ιδανικοί για αυτό το σκοπό. Η ομοιότητα των περισσότερων πτυχών της ανάπτυξης των θηλαστικών και στη συγκεκριμένη περίπτωση μεταξύ ανθρώπων και ποντικών, καθώς και της ανατομίας, του μεταβολισμού και της φυσιολογίας τους οφείλεται στις ισχυρές ορθολογικές σχέσεις (σχέσεις ομολογίας λόγω κοινού προγόνου) μεταξύ των γονιδίων των δύο ειδών. Οι ποντικοί και οι άνθρωποι έχουν παρόμοιο αριθμό γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και κατά μέσο όρο οι κωδικοποιητικές περιοχές του γονιδιώματος τους είναι 85% ταυτόσημες. Από τον Ιανουάριο του 2019, οι προβλέψεις είναι 23.000 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σε ποντικούς σε σύγκριση με 20.000 σε ανθρώπους, με 16.430 από αυτά τα γονίδια να είναι ορθόλογα (Canales, C. et al., 2019). Αυτό υποστηρίζεται έντονα από παρόμοιες φαινοτυπικές συνέπειες μεταλλάξεων πλήρους ή μερικής απώλειας λειτουργίας στα ορθόλογα γονίδια και στα δύο είδη αλλά και με τη δυνατότητα

αντικατάστασης των γονιδίων ποντικού από τα ανθρώπινα ορθόλογά τους (Bradley, A. et al., 2012). Επιπλέον, οι ποντικοί είναι πολύ παρόμοιοι με τον άνθρωπο και στη μη κωδικοποιητική αλληλουχία τους, καθιστώντας τους ένα εξαιρετικό μοντέλο για τη μελέτη αλλαγών όχι μόνο στην κωδικοποιητική αλληλουχία αλλά και σε μη κωδικοποιητικές περιοχές (Canales, C. et al., 2019).

Η τροποποίηση του γονιδιώματος του ποντικού είναι σχετικά εύκολη. Η προσθήκη ή η αφαίρεση ενός γονιδίου συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση του ρόλου του στον οργανισμό. Αυτό παρέχει ένα ισχυρό εργαλείο για τη μοντελοποίηση συγκεκριμένων ασθενειών όταν ένα μεταλλαγμένο γονίδιο είναι γνωστό ότι έχει κάποιο ρόλο σε μια ασθένεια. Έτσι η έρευνα σε ποντικούς παρέχει πληροφορίες για τους γενετικούς παράγοντες κινδύνου για αυτές τις ασθένειες στον ανθρώπινο πληθυσμό (Vandamme, T., 2014).

Επιπλέον οφέλη χρήσης του ποντικού ως μοντέλο βιοϊατρικής έρευνας είναι το σχετικά χαμηλό κόστος συντήρησης του ζώου (σε σχέση με τα υπόλοιπα θηλαστικά), το μικρό μέγεθός του και η ικανότητά του να πολλαπλασιάζεται γρήγορα, αφού μπορεί να αναπαράγεται κάθε τρεις εβδομάδες (ζευγαρώνουν την ημέρα που γεννούν). Έτσι οι επιστήμονες έχουν πολλούς ποντικούς για να εργαστούν. Επίσης ο χρόνος μεταξύ της γέννησης ενός ποντικού και του τοκετού (χρόνος γενεάς) είναι μικρός (σε σχέση με τα υπόλοιπα θηλαστικά), συνήθως περίπου 10 εβδομάδες. Αυτό σημαίνει ότι πολλές γενιές μπορούν να παρατηρηθούν ταυτόχρονα. Τέλος οι εργαστηριακοί ποντικοί έχουν μικρή διάρκεια ζωής περίπου δύο χρόνων γεγονός που επιτρέπει στους επιστήμονες να μπορούν να μετρήσουν και τις επιπτώσεις της γήρανσης (Vandamme, T., 2014).

Τα μοντέλα ποντικών που διατίθενται επί του παρόντος για γενετική έρευνα περιλαμβάνουν χιλιάδες αμιγή στελέχη (έπειτα από καθοδηγούμενες διασταυρώσεις με σκοπό την απόκτηση απογόνων με ορισμένα επιθυμητά χαρακτηριστικά) και γενετικά τροποποιημένα μεταλλάγματα (Simmons, D., 2008).

1.5. Δημιουργία ποντικών knockout

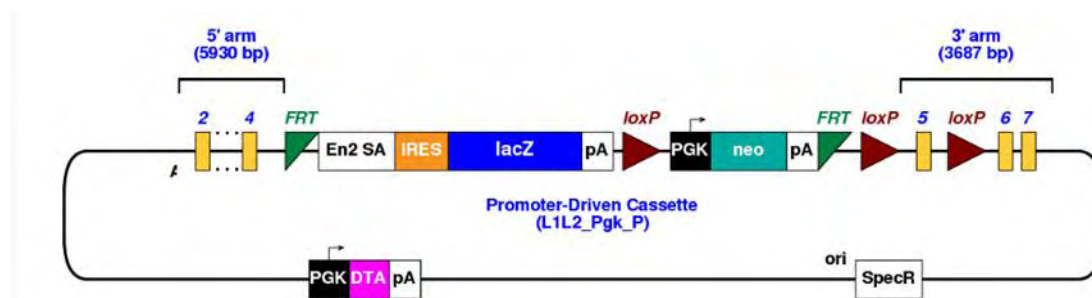
Τις τελευταίες δεκαετίες, οι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει μια σειρά καινοτόμων γενετικών τεχνολογιών για την παραγωγή ποντικών-μοντέλων για ένα ευρύ φάσμα συγκεκριμένων ασθενειών, καθώς και για τη μελέτη της λειτουργίας στοχευμένων γονιδίων. Μία από τις σημαντικότερες προόδους ήταν η ικανότητα δημιουργίας διαγονιδιακών ποντικών, όπου ένα νέο γονίδιο εισάγεται στη γαμετική σειρά του ζώου. Ακόμη πιο αποτελεσματικές προσεγγίσεις, που εξαρτώνται από τον ομόλογο ανασυνδυασμό, επέτρεψαν την ανάπτυξη εργαλείων για knockout γονιδίων, το οποίο περιλαμβάνει την αντικατάσταση υπαρχόντων γονιδίων με τροποποιημένες εκδόσεις τους. Με την ανάπτυξη τεχνολογιών στόχευσης γονιδίων (gene targeting) δηλαδή τη

δημιουργία αδρανών/μη λειτουργικών γονιδίων με χρήση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού ES (τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα ES είναι ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από την εσωτερική μάζα κυττάρων της βλαστοκύστης, ενός προεμφυτευτικού εμβρύου, πρώιμου σταδίου), οι ερευνητές απέκτησαν την ικανότητα να μεταλλάξουν επιλεκτικά το γονιδίωμα του ποντικού σε τόπους της επιλογής τους. Η στόχευση γονιδίων είναι μια τεχνική που βασίζεται στα γεγονότα ομόλογου ανασυνδυασμού που συμβαίνουν μεταξύ μιας κατασκευής εξωγενούς DNA που εισάγεται μέσα στα κύτταρα και του ομόλογου προς αυτή γενετικού τόπου, με σκοπό να δημιουργηθεί μια ακριβής τροποποίηση στο γονιδίωμα. Η επιτυχία αυτής της τεχνολογίας απαιτεί βέβαια υψηλό επίπεδο εμπειρίας 1) για το σχεδιασμό του φορέα στόχευσης, 2) για απομόνωση των κυττάρων ES, 3) για την καλλιέργεια των κυττάρων ES και 4) για τη χειρουργική εμφύτευση του εμβρύου. Επειδή όμως αυτή η διαδικασία είναι χρονοβόρος και δαπανηρή, οι ερευνητές που προτίθενται να ξεκινήσουν μελέτες σε ζώα, επωφελούνται από μια βιβλιοθήκη προμεταλλαγμένων κυττάρων ποντικού ES η οποία δημιουργήθηκε έπειτα από την ίδρυση του International Knockout Mouse Consortium (IKMC) (Coleman, J. et al., 2015). Το IKMC ιδρύθηκε το 2007 με σκοπό τη μετάλλαξη όλων των κωδικοποιητικών περιοχών του γονιδιώματος ποντικού χρησιμοποιώντας γονιδιακή στόχευση και παγίδευση γονιδίων (gene targeting and gene trapping) σε κύτταρα ES ποντικού C57BL/6 σε μια συντονισμένη παγκόσμια δράση. Το ίδιο το IKMC είναι μια κοινοπραξία προγραμμάτων συνεργατών: Knockout Mouse Project (KOMMP) (USA), European Conditional Mouse Mutagenesis Programme (EUCOMM) (Europe), EUCOMM: Tools for Functional Annotation of the Mouse Genome (EUCOMMTOOLS) (Europe), North American Conditional Mouse Mutagenesis Project (NorCOMM) (Canada) και Texas A&M Institute for Genomic Medicine (TIGM) (ΗΠΑ). Η κοινοπραξία IKMC δημιούργησε κυρίως μεταλλάξεις κατά συνθήκη (conditional) αλλά και συστατικές (constitutive), με την πρώτη τάξη μεταλλάξεων να επιτρέπει την ιστοειδική αξιολόγηση της γονιδιακής λειτουργίας σε συγκεκριμένες συνθήκες, όπως για παράδειγμα συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια (Bradley, A. et al., 2012), (Coleman, L. J. et al., 2015). Το IKMC έτσι κατάφερε να δημιουργήσει μια πηγή ανοιχτής πρόσβασης και όσο το δυνατόν χαμηλού κόστους εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (ES). Οι ποντικοί knockout δημιουργήθηκαν μέσω διαδοχικής διασταύρωσης των γενετικά τροποποιημένων ποντικών πρώτα με διαγονιδιακούς ποντικούς που έφεραν τη ρεκομπινάση *FloE* και στη συνέχεια με διαγονιδιακούς ποντικούς που έφεραν τη ρεκομπινάση *Cre*. Αυτό οδήγησε είτε σε ολική διαγραφή στη γαμετική σειρά, είτε σε κατά συνθήκη διαγραφή σχεδόν κάθε γονιδίου στο γονιδίωμα του ποντικού. Από το 2012, περισσότερες από 17.400 κυτταρικές σειρές ES είχαν δημιουργηθεί από το IKMC για στοχευμένη διαγραφή γονιδίων. Η κοινοπραξία IKMC διευκολύνει και τη δημιουργία ομόζυγων μεταλλαγμένων κυττάρων ES μέσω δημιουργίας δύο αλληλομόρφων knockout για το ίδιο γονίδιο *in vitro* (Coleman, L. J. et al., 2015). Στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία το γονίδιο που μελετάται ήταν διαθέσιμο μέσω της

EUCOMM, επομένως παρακάτω θα αναλυθεί η προσέγγιση στόχευσης γονιδίων ειδικά για τα κύτταρα ES από τη EUCOMM.

1.5.1. Σχεδιασμός φορέων στόχευσης

Ένα βασικό χαρακτηριστικό του συστήματος του EUCOMM είναι ότι ο σχεδιασμός του φορέα είναι ευέλικτος και στοχεύει στην αποδοτικότερη αξιοποίηση του ομόλογου ανασυνδυασμού. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο σχεδιασμού φορέα της EUCOMM, το 5' πιο «κρίσιμο» εξόνιο αναγνωρίζεται και στοχεύεται για διαγραφή. Ένα κρίσιμο εξόνιο είναι αυτό που θα οδηγήσει σε αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης εάν διαγραφεί, είναι κοινό σε όλα τα εναλλακτικά μεταγράφα και θα διαταράξει >50% της πρωτεΐνης. Ακολουθώς, τοποθετούνται θέσεις *loxP* σε ιντρονικές περιοχές γύρω από το κρίσιμο εξόνιο όπου είναι απίθανο να διαταράξουν τη μεταγραφή (Coleman, J. et al., 2015), (Skarnes, W. et al., 2011). Στη συγκεκριμένη πειραματική συνθήκη το κρίσιμο εξόνιο είναι το πέμπτο και μόλις αφαιρεθεί, το εξόνιο 4 έως 6 καθίσταται εκτός πλαισίου ανάγνωσης.



Εικόνα 3: Φορέας στόχευσης BAC (Bacterial Artificial Chromosome) που περιέχει την αλληλουχία στόχευσης: Knockout First, Reporter-tagged insertion with conditional potential (<https://www.eummcr.org>).

Ο φορέας στόχευσης για τα γονίδια *Fra10ac1* αποτελείται από:

- Κρίσιμο εξόνιο: 5ο
- Κασέτα επιλογής ανθεκτικότητας σε νεομυκίνη, πλαισιωμένη με θέσεις *loxP*, η οποία βρίσκεται ανοδικά από το εξόνιο 5. Η κασέτα ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη διευκολύνει την *in vitro* επιλογή στοχευμένων κυττάρων ES.
- Κασέτα *lacZ*. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη δημιουργία ποντικών που εκφράζουν το *lacZ* στους ιστούς που εκφράζεται φυσιολογικά το γονίδιο.
- Μια τρίτη θέση *loxP* βρίσκεται αμέσως μετά το εξόνιο 5 για να συμβάλλει στην αφαίρεσή του και συνεπώς να είναι δυνατή η δημιουργία των ποντικών knockout.

- Δύο θέσεις *FRT* (στόχος αναγνώρισης της ρεκομπινάσης *FIpE*), μία ανοδικά της κασέτας *lacZ* και μία μεταξύ της κασέτας ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη και της θέσης *loxP*, αμέσως πριν από το εξόνιο 5. Αυτές οι θέσεις εισάγονται στο αλληλόμορφο με σκοπό να επιτρέπεται η ταυτόχρονη αφαίρεση τόσο των κασετών *lacZ* όσο και ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη.

1.5.2. Μεταφορά του φορέα στόχευσης στα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα και δημιουργία γενετικά τροποποιημένων ποντικών

Τα κύτταρα ES συλλέγονται από τη βλαστοκύστη και καλλιεργούνται ώστε να δημιουργηθεί η πηγή γενετικά τροποποιημένων βλαστοκυττάρων. Εισάγεται ο φορέας στόχευσης του γονιδίου με μικροένεση και γίνεται επιλογή *in vitro* των γενετικά τροποποιημένων εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων στα οποία έχει γίνει αποτελεσματικά ο ανασυνδυασμός. Τα κύτταρα που επιλέγονται είναι ανθεκτικά στη νεομυκίνη καθώς φέρουν την κασέτα ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη. Τα γενετικά τροποποιημένα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα τοποθετούνται πάλι σε βλαστοκύστη (συνήθως τοποθετούνται σε βλαστοκύστη άλλου στελέχους ποντικού που έχει διαφορά στο χρώμα ώστε να επιλεγούν στη συνέχεια οι απόγονοι ανάλογα με το χρώμα) η οποία εμφυτεύεται στη μήτρα ή στους ωαγωγούς ψευδο-εγκυμονούντων παρένθετων μητέρων-ποντικών. Οι ποντικοί που γεννιούνται είναι χιμαιρικοί. Πραγματοποιείται στη συνέχεια γονοτύπηση με σκοπό την ανίχνευση ποντικών knockout των οποίων πιθανόν η γαμετική σειρά να έχει προκύψει από τα γενετικά τροποποιημένα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα. Στη συνέχεια διασταυρώνονται οι χιμαιρικοί ποντικοί με αγρίου τύπου ώστε να προκύψουν ετερόζυγοι γενετικά τροποποιημένοι απόγονοι που φέρουν σε όλους τους ιστούς στο γονιδίωμά τους το τροποποιημένο αλληλόμορφο *tm1a* (targeted mutation 1a), (Coleman, L. J. et al., 2015).

1.5.3. Δημιουργία ποντικών knockout-first (*tm1a*)

Το αλληλόμορφο που προκύπτει έπειτα από τον ομόλογο ανασυνδυασμό του φορέα στόχευσης με τον αντίστοιχο γονιδιακό τύπο αγρίου τύπου (wild type, *wt*) αναφέρεται ως στοχευμένη μετάλλαξη 1a (targeted mutation 1a ή *tm1a*) και ονομάζεται knockout-first, επειδή η εισαγωγή του αλληλόμορφου παγίδευσης (trapping allele) *lacZ* αναμένεται από μόνη της να διαταράξει τη συναρμογή του γονιδίου. Προκειμένου όμως να αξιολογηθεί ο φαινότυπος της καταστροφής του γονιδίου, πρέπει να αφαιρεθούν οι κασέτες ανθεκτικότητας της νεομυκίνης και το *lacZ*. Αν και οι ποντικοί που φέρουν το αλληλόμορφο *tm1a* θα έχουν ουσιαστικά ανενεργό το γονίδιο *Fra10ac1* (αν και σε κάποιες περιπτώσεις έχει φανεί ότι ένα ποσοστό των μεταγράφων παράγεται κανονικά), απαιτούνται πρόσθετα βήματα διασταύρωσης για τη δημιουργία κατάλληλων πειραματόζων αναφοράς reporter

lacZ (tm1b) ή knockout (*tm1d*). Είναι σημαντικό για την εγκυρότητα των πειραμάτων να μην υπάρχουν παρεμβολές από εξωγενείς αλληλουχίες καθώς αυτές (π.χ. κασέτα ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη) έχουν συσχετιστεί με φαινοτυπικά αποτελέσματα ανεξάρτητα από την απενεργοποίηση του προς μελέτη γονιδίου (Coleman, L. J. et al., 2015).

1.5.4. Δημιουργία ποντικών reporter *lacZ (tm1b)*

Εκτός από τη στοχευμένη σίγηση γονιδίων, ο σχεδιασμός αλληλόμορφων EUCOMM διαθέτει τη δυνατότητα αντικατάστασης της μετάφρασης του γονιδίου με την έκφραση ενός ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης (από την κασέτα *lacZ*), παρέχοντας ένα μέσο για την αναζήτηση της φυσιολογικής χωρικής έκφρασης του γονιδίου. Η έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης μπορεί να εκτιμηθεί κατά την ανάλυση των ιστών και των κυτταρικών τύπων, χρησιμοποιώντας είτε ιστοχημική χρώση είτε ανοσοϊστοχημεία. Διασταυρώνοντας ετερόζυγους ποντικούς *tm1a* με διαγονιδιακούς ομόζυγους ποντικούς *Cre deleter*, που εκφράζουν δηλαδή τη ρεκομπινάση *Cre* καθολικά υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή ανθρωπίνου κυτταρομεγαλοϊού (CMV), οι θέσεις *loxP* κόβονται και ανασυνδυάζονται, αφαιρώντας την κασέτα επιλογής/ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη και το εξόνιο 5 του γονιδίου, διατηρώντας παράλληλα την κασέτα *lacZ* (Εικόνα 4). Έτσι δημιουργούνται οι ποντικοί *tm1b*, δηλαδή οι ποντικοί αναφοράς *lacZ* που εκφράζουν τη β-γαλακτοσιδάση σε κύτταρα όπου συνήθως θα εκφράζονταν το γονίδιο. Αρχικά δημιουργούνται χιμαιρικοί ποντικοί και στη συνέχεια με περαιτέρω διασταυρώσεις προκύπτουν ποντικοί που φέρουν το αλληλόμορφο *tm1b* καθολικά (Coleman, L. J. et al., 2015).

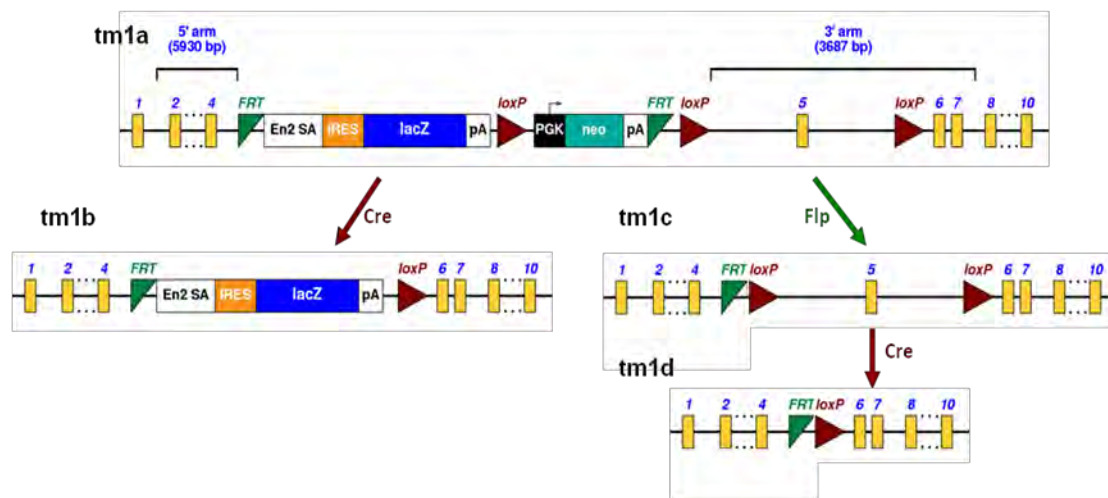
1.5.5. Δημιουργία ποντικών floxed (*tm1c*)

Ως ενδιάμεσο βήμα προς τη δημιουργία της τελικής σειράς knockout, ετερόζυγοι ποντικοί *tm1a* διασταυρώνονται με ομόζυγους διαγονιδιακούς ποντικούς C57BL/6J που εκφράζουν μια βελτιωμένη παραλλαγή της ρεκομπινάσης *Flp1 (FlpE)* του *Saccharomyces cerevisiae* σε όλους τους ιστούς, υπό τον υποκινητή της ανθρωπίνης β-ακτίνης. Στους απόγονους που κληρονομούν τόσο το αλληλόμορφο *tm1a* όσο και το αλληλόμορφο *FLPE*, η περιοχή μεταξύ των θέσεων *FRT* του *tm1a* αποκόπτεται και ανασυνδυάζεται, αφαιρώντας τις κασέτες *lacZ* και ανθεκτικότητας νεομυκίνης αποκαθιστώντας έτσι την έκφραση του γονιδίου (Εικόνα 4). Αυτοί οι ποντικοί αναφέρονται ως ποντικοί *tm1c* ή floxed και χρησιμεύουν τόσο ως ιδρυτική σειρά (founder line) για τη δημιουργία ποντικών knockout *tm1d* (βλ. παρακάτω) όσο και ως η σειρά ελέγχου (control line) για πειράματα. Οι ποντικοί *tm1c* είναι ουσιαστικά άγριου τύπου, καθώς η μόνη διαφορά μεταξύ του αλληλόμορφου τους και εκείνου

των ποντικών άγριου τύπου C57BL/6 είναι η εισαγωγή μιας θέσης *FRT* και δύο θέσεων *loxP* εκατέρωθεν του εξονίου 5 που δεν διαταράσσουν κάποια ρυθμιστική αλληλουχία ή πρότυπο συναρμογής. Όπως και παραπάνω, αρχικά προκύπτουν χμαιρικοί ποντικοί και έπειτα, με τις επακόλουθες διασταυρώσεις, οι ποντικοί *tm1c* (Coleman, L. J. et al., 2015).

1.5.6. Δημιουργία ποντικών knockout (*tm1d*)

Τέλος, η διασταύρωση ετερόζυγων ποντικών *tm1c* με τον ποντικό *Cre* deleter όπως για το *tm1b*, οδηγεί στη δημιουργία ποντικών *tm1d*, δηλαδή ζώνων στα οποία το εξόνιο 5 του γονιδίου έχει διαγραφεί και το μετάγραφο του εναπομείναντος γονιδίου πιθανώς αποικοδομείται καθώς πρόκειται για μη νοηματικό μετάγραφο (το εξόνιο 4 έως 6 είναι εκτός πλαισίου ανάγνωσης). Στη διασταύρωση ποντικών *tm1c* με διαγονιδιακούς ποντικούς *CRE* προκύπτουν χμαιρικοί ποντικοί *tm1c/tm1d* διότι η ρεκομπινάση *Cre* δεν δρα συνήθως στο ζυγωτό. Για τα πειράματα απαιτούνται καθαροί ποντικοί *tm1d* και όχι χμαιρικοί που κληρονόμησαν το αλληλόμορφο *tm1c* και ακολούθησε η δράση της ρεκομπινάσης *Cre*. Για αυτό το λόγο πραγματοποιείται γονοτύπηση (σε επόμενη γενεά) για το γονίδιο της ρεκομπινάσης *Cre* σε ποντικούς *tm1d* ώστε να αποκλειστούν από τα πειράματα οι χμαιρικοί ποντικοί (Coleman, L. J. et al., 2015).



Εικόνα 4: Διαδικασία δημιουργίας ποντικών knockout (*tm1d*) για το γονίδιο *Fra10ac1*, από ποντικούς knockout-first (*tm1a*) μέσω διαδοχικών διασταυρώσεων με διαγονιδιακούς ποντικούς που έφεραν τη ρεκομπινάση *Cre* και *FlpE* (τροποποιημένη από: <https://www.eummc.org>).

1.5.7. Διασταυρώσεις ποντικών για την αφαίρεση των διαγονιδίων και της κασέτας επιλογής νεομυκίνης

Πριν από τη φαινοτύπηση (phenotyping) των ποντικών knockout είναι απαραίτητο να αφαιρεθεί τόσο η κασέτα νεομυκίνης (διασταυρώνοντας με ποντικούς *FLPE* για τη δημιουργία *tm1c*) όσο και τυχόν εναπομείναντα γονίδια ρεκομπινασών (είτε *FloE* είτε *Cre*), καθώς και τα δύο έχουν συνδεθεί με φαινοτυπικά αποτελέσματα ανεξάρτητα από αυτά που οφείλονται στην απενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων (Thyagarajan et al., 2000; Huh et al., 2010; Jeannotte et al., 2011; Bersell et al., 2013; Lexow et al., 2013). Για παράδειγμα, η ρεκομπινάση *Cre* μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις στο DNA, δηλαδή να αφαιρέσει τμήμα DNA μέσω «κρυμμένων» θέσεων *loxP* (cryptic *loxP* sites) στο γονιδίωμα των θηλαστικών, με παθογόνες συνέπειες. Παρομοίως, η διατήρηση κασετών επιλογής αντιβιοτικών, όπως αυτές που χρησιμοποιούνται στο σύστημα EUCOMM, μπορεί να προκαλέσει άμεση διακοπή ρυθμιστικών στοιχείων γονιδίων πολύ μακριά από την αρχική μετάλλαξη (Coleman, L. J. et al., 2015).

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το γονίδιο *FRA10AC1* του ανθρώπου βρίσκεται στην σπάνια εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A* η οποία εκφράζεται απουσία φυλλικού οξέος στο μέσο καλλιέργειας και έχει συσχετιστεί με νοητική και αναπτυξιακή υστέρηση. Στο πλαίσιο διερεύνησης της συσχέτισης γονοτύπου-φαινοτύπου αλλά και των μοριακών και φαινοτυπικών συνεπειών των μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *FRA10AC1* τόσο σε ομόζυγη όσο και σε ετερόζυγη κατάσταση, προσομοιάζεται η απώλεια λειτουργίας του γονιδίου *FRA10AC1* στον ποντικό μέσω δημιουργίας knockout.

Οι πειραματικές διαδικασίες που περιλαμβάνει η παρούσα πτυχιακή εργασία, η οποία εντάσσεται στο παραπάνω ερευνητικό πρόγραμμα, αφορούν τη γονοτύπηση ποντικών οι οποίοι έχουν προέλθει από επιλεκτικές διασταυρώσεις και φέρουν αλληλόμορφο knockout του γονιδίου *Fra10ac1*. Πιο συγκεκριμένα ελέγχθηκε η παρουσία του αλληλόμορφου *tm1d* (που αποτελεί το «αληθινό» knockout) στους απογόνους των επιλεκτικών διασταυρώσεων καθώς και η παρουσία των διαγονιδίων των ρεκομπινασών *Cre* και *FipE* που συμμετείχαν στην διαδικασία δημιουργίας των ποντικών knockout. Έτσι, στο τέλος της γονοτύπησης, επιλέχθηκαν για τις περαιτέρω αναλύσεις οι ομόζυγοι και οι ετερόζυγοι ποντικοί που φέρουν το αλληλόμορφο *tm1d* χωρίς όμως να φέρουν κάποιο από τα διαγονίδια των ρεκομπινασών *Cre* και *FipE*.

Ακολούθως, θα πραγματοποιηθούν συμπεριφορικά πειράματα και θα γίνει ανάλυση της επίδρασης της μείωσης και της απώλειας της έκφρασης του προς μελέτη γονιδίου, στην έκφραση και το πρότυπο συναρμογής όλων των υπόλοιπων γονιδίων με βάση την πιθανή λειτουργία της πρωτεΐνης στο μηχανισμό συναρμογής του πρόδρομου mRNA ή σε κάποια συναφή λειτουργία.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα δείγματα προήλθαν από ποντικούς που εκτρέφονται στο ζωοτροφείο του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) υπό την επίβλεψη του Δρ. Α. Κλινάκη.

2.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ουρά ποντικού

Η απομόνωση του DNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας Invitrogen προσαρμοσμένο στην ποσότητα του δείγματος με βάση τις οδηγίες για απομόνωση DNA από ουρά ποντικού 1 mm. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση DNA με εμπορικό διαθέσιμο σύστημα αντιδραστηρίων το Invitrogen Purelink® Genomic DNA Mini Kit K1820-02 είναι (Hearn, R. and Arblaster, K., 2010):

1. Λύση των κυττάρων του δείγματος παρουσία ενός διαλύματος χαοτροπικών αλάτων και πρωτεΐνάσης K (το δείγμα της ουράς βρισκόταν ήδη σε eppendorf tube με πρωτεΐνάση K σε συγκέντρωση 100mg/ml σε 150μl κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 min στις 12.000 rpm ώστε να κατακαθίσει ο ιστός στον πάτο του eppendorf και να αντληθεί το υπερκείμενο εκχύλισμα κυττάρων από το οποίο πραγματοποιείται η απομόνωση DNA. Έτσι 60μl από το κάθε δείγμα ουράς, μεταφέρονται σε 1,5ml eppendorf tube και ο όγκος ρυθμίζεται στα 200μl με την προσθήκη 140μl PureLink® Genomic Digestion buffer.
2. Στη συνέχεια προστίθενται 20μl της RNAσης A και πραγματοποιείται σύντομη ανάδευση στο vortex και επώαση για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστίθενται 200μl Genomic Lysis/Binding Buffer και 200μl 100% καθαρής αιθανόλης για διαμόρφωση κατάλληλων συνθηκών για την πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη.
3. Τα δείγματα φορτώνονται στη στήλη φυγοκέντρωσης και κατά τη φυγοκέντρηση τα μόρια DNA προσροφώνονται στη μεμβράνη, ενώ οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες, τα πολυσακχαρίδια και τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά τη διαπερνούν και συλλέγονται σε κατάλληλο σωληνάριο.
4. Το DNA παραμένει προσδεμένο στη μεμβράνη, ενώ γίνεται περαιτέρω απομάκρυνση αλάτων και τμημάτων πρωτεϊνών με δύο διαδοχικές πλύσεις με κατάλληλα διαλύματα με αιθανόλη.
5. Η μεμβράνη στεγνώνεται με φυγοκέντρηση.
6. Το καθαρό DNA εκλύεται από τη μεμβράνη με ελαφρά αλκαλικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας. Η έκλυση του DNA ολοκληρώθηκε με 50μl PureLink® Genomic Elution Buffer. Η συγκέντρωση του DNA στον τελικό όγκο ήταν 50-100 ng/μl. Η συγκέντρωση αυτή είναι επιθυμητή καθώς εμπειρικά διαπιστώθηκε ότι η ποσότητα DNA που περιέχεται στο 1 μl είναι αρκετή για την εκτέλεση μιας PCR.

Να σημειωθεί ότι μετά την προσθήκη της RNAσης και της αιθανόλης (στάδιο 2), ακολουθήθηκε η διαδικασία του Binding DNA, Washing DNA και Eluting DNA όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο της εταιρίας.

2.2. Ποσοτικοποίηση του απομονωμένου DNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου DNA πραγματοποιήθηκε με ποσοτικοποίηση μέσω φωτομέτρησης χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο της εταιρίας Quawell. Το φασματοφωτόμετρο της Quawell είναι μια συσκευή που μετράει με μεγάλη ακρίβεια τις συγκεντρώσεις μακρομορίων σε ένα διάλυμα όπως το DNA. Μέσα στα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνολογίας περιλαμβάνονται: η γρήγορη και ακριβής απεικόνιση των αποτελεσμάτων, η εύκολη εισαγωγή του δείγματος και καθαρισμός, η μέτρηση μεγάλου εύρους συγκεντρώσεων και η απαίτηση μικρής ποσότητας δείγματος για τη μέτρηση, μόλις 2μl (quawell micro volume spectrophotometer. 2020, <http://www.quawell.com/#!/products/vstc1=q3000>). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA είναι η εξής:

1. Εισαγωγή 2μl ποσότητας διαλύματος στο οποίο είναι διαλυμένο το απομονωμένο DNA ως μάρτυρας (blank) για μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο μηδενισμός έγινε με PureLink® Genomic Elution Buffer με το οποίο είχε προηγηθεί η έκλυση του DNA.
2. Μέτρηση κάθε φορά 2 μl από το κάθε ένα δείγμα (η μέτρηση του blank έχει αποθηκευτεί και δεν είναι απαραίτητος ο μηδενισμός του φωτομέτρου πριν τη μέτρηση κάθε δείγματος).
3. Ο υπολογισμός της μέτρησης γίνεται αυτόματα και υπολογίζεται την ίδια στιγμή και η καθαρότητα του δείγματος μέσω του λόγου 260/280.

Πριν από κάθε μέτρηση γίνεται πλύση των επιφανειών του φασματοφωτομέτρου με απιονισμένο νερό τουλάχιστον δύο φορές. Το νερό αφαιρείται με διηθητικό χαρτί.

2.3. Γονοτύπηση των δειγμάτων DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων DNA με χρήση δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών εκατέρωθεν της υπό εξέταση αλληλουχίας *in vitro*. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής PCR το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς, όπως η ηλεκτροφόρηση, η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η αλληλούχηση κ.ά. Η αποτελεσματικότητα της PCR καθορίζεται από την εξειδίκευση, την απόδοση και την ακρίβεια με την οποία πραγματοποιείται η

ενίσχυση του DNA. Μια PCR υψηλής εξειδίκευσης ενισχύει μόνο ένα προϊόν, το επιθυμητό. Οι παράμετροι που καθορίζουν την εξειδίκευση είναι η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών, η συγκέντρωση ιόντων Mg^{+2} , το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου, η διάρκεια των κύκλων και η πολυμεράση (Garibyan L et al., 2013).

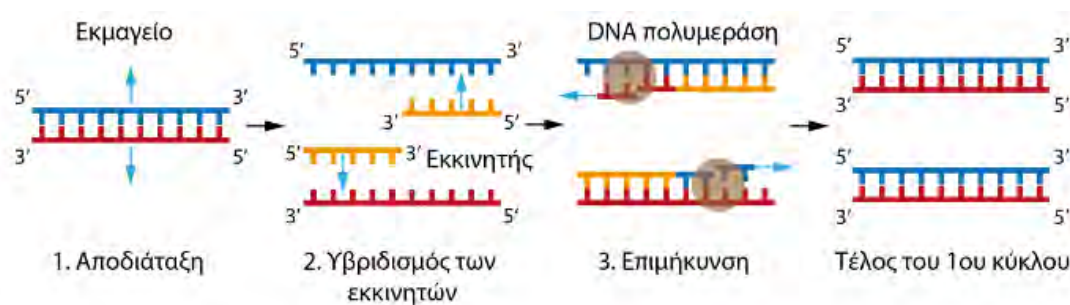
2.3.1. Τα στάδια της PCR

Η PCR περιλαμβάνει ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης 5 min και τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά (Εικόνα 5), (Πίνακας 1):

1.Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.

2.Υβριδισμός εκκινητών: Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.

3.Επιμήκυνση: Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72° C, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000bp ανά min.



Εικόνα 5: Τα στάδια της PCR.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 40 φορές. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, η οποία ρυθμίζεται στην επιθυμητή θερμοκρασία και στη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και στη διαδοχή τους (Garibyan L et al., 2013).

Πίνακας 1: Στάδια PCR με τις αντίστοιχες θερμοκρασίες και χρονική διάρκεια στο κάθε στάδιο.

Στάδια της PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
1. Αρχική αποδιάταξη	95	5 min
2. Αποδιάταξη	95	45 sec
3. Υβριδισμός εκκινητών	58-62	45 sec
4. Επιμήκυνση (1kb/min)	72	45 sec
Επανάληψη σταδίων 2-4 για 35 φορές		
5. Τελική επιμήκυνση	72	10 min

2.3.2. Σύσταση του διαλύματος αντίδρασης

Πίνακας 2: Τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις τους στον τελικό όγκο των 25 μl.

Αντιδραστήρια	Εταιρία/Κωδικός	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
Primer F (50pmol/μl)	Eurofins Genomics	0,5	1pmol/μl
Primer R (50pmol/μl)	Eurofins Genomics	0,5	1pmol/μl
Taq Buffer (10x)	KBIOSYSTEMS/KB 1003	2,5	1x
dNTPs (50x)		0,5	1x
Taq (5u/μl)	KBIOSYSTEMS/KE 1000	0.3	1,5 u/25μl
DNA (50-100 ng/μl)		1	50-100 ng/25μl
H ₂ O		19,7	
Τελικός όγκος		25	

Οι εκκινητές παραλαμβάνονται σε λυοφιλοποιημένη μορφή και διαλύονται σε διπλάσιο όγκο νερού από τον προτεινόμενο ώστε η τελική τους συγκέντρωση να είναι 50pmol/μl αντί για 100pmol/μl. Αυτό συμβάλει στο να χρησιμοποιούνται όγκοι των εκκινητών της τάξεως των 0,5 και 1μl στην PCR και όχι μικρότεροι.

2.3.3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την PCR

Πίνακας 3: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη γονοτύπηση των ποντικών *wt*, *tm1c* και *tm1d*.

Ζεύγη εκκινητών	Θέσεις υβριδ.	Θερμοκ. υβριδ.(°C)	Προϊόν ενίσχυσης
F1': GTG TTT TAT TTT TGA AAC CTT AAT GTT C R5new: TGT AAA TCA TGT ACG ACA ACT ACA C	intron4 intron4	58-59	wt:361bp tm1c:495bp
F1': GTG TTT TAT TTT TGA AAC CTT AAT GTT C R_intron5_3: AGG TAG CCC TTA GGA AGG AA	intron4 intron5	59	wt:928bp tm1c:1086bp tm1d: περίπου 350 bp

Πίνακας 4: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη γονοτύπηση των ποντικών που έφεραν το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *Cre* και *FlpE*.

Ζεύγη εκκινητών	Θέσεις υβριδ.	Θερμοκ. υβριδ.(°C)	Προϊόν ενίσχυσης
CreF2: AAAATTTGCCTGCATTACCG CreR2: ATGTTTAGCTGGCCCAAATG	Γονίδιο <i>CRE</i>	60	265bp
Rosa1 (F): AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT Rosa2 (R): GCGAAGAGTTTGTCTCAACC Rosa3 (R): GGAGCGGGAGAAATGGATATG	Γονίδιο <i>FLPE</i>	62	wt: περίπου 600bp (Rosa1-3) transgenic: περίπου 350bp (Rosa1-2)

2.4. Ηλεκτροφόρηση του γονιδιωματικού DNA και των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για τον διαχωρισμό και την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και πρωτεϊνών. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Ο διαχωρισμός των μορίων γίνεται κατά κύριο λόγο ανάλογα με το μέγεθός τους. Η πιο συχνή μορφή ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Η μέθοδος είναι απλή και αποτελεσματική και επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA μεγέθους από 100bp έως 25kb. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη (red algae). Η κινητικότητα των μορίων εξαρτάται, πέραν της συγκέντρωσης της αγαρόζης, από το μέγεθός τους, τη διαμόρφωσή τους και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου. Μικρού μοριακού βάρους μόρια κινούνται γρηγορότερα ανάμεσα στους πόρους του πηκτώματος ενώ μεγαλύτερου μοριακού βάρους μόρια καθυστερούν. Η

στερεοδιαμόρφωση των μορίων DNA (υπερελικωμένα, ανοιχτά κυκλικά ή ευθύγραμμα) καθορίζει και την αντίσταση που δέχονται τα μόρια DNA καθώς κινούνται ανάμεσα στους πόρους του πηκτώματος αγαρόζης. Τα υπερελικωμένα μόρια κινούνται ταχύτερα και ακολουθούν τα ανοιχτά κυκλικά και τα ευθύγραμμα μόρια DNA. Ένα γραμμικό μόριο DNA κινείται με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογάριθμου του μοριακού του βάρους. Όσον αφορά το ηλεκτρικό πεδίο, σε χαμηλή τάση ευνοείται ο διαχωρισμός των μεγάλων μορίων, ενώ σε υψηλότερη τάση διαχωρίζονται μόνο τα μικρά μόρια DNA. Τέλος το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης έχει επίδραση στην κινητικότητα των μορίων καθώς διατηρεί σταθερό το pH και περιέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας.

Τα πηκτώματα αγαρόζης παρασκευάζονται σε συγκεντρώσεις 0,7-2,5 % ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που θα διαχωριστούν. Χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης ευνοούν το διαχωρισμό μορίων μεγαλύτερου μοριακού βάρους (καθώς είναι μεγαλύτεροι οι πόροι που δημιουργούνται κατά τον πολυμερισμό του πηκτώματος) και υψηλότερες συγκεντρώσεις το διαχωρισμό μορίων μικρότερου μοριακού βάρους (καθώς δημιουργούνται μικρότεροι πόροι κατά τον πολυμερισμό του πηκτώματος). Για παράδειγμα το πήκτωμα αγαρόζης 2% θεωρείται πήκτωμα υψηλής συγκέντρωσης και χρησιμοποιείται για μικρά τμήματα DNA της τάξεως 50bp έως 1kb. Τα προϊόντα PCR των δειγμάτων του τρέχοντος πειράματος είχαν μέγεθος της τάξεως των 200 έως 1000bp. Από την άλλη το πήκτωμα αγαρόζης 1% θεωρείται πήκτωμα χαμηλής συγκέντρωσης και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μεγαλύτερων τμημάτων DNA της τάξεως των 0,5 έως 10kb. Αυτή η συγκέντρωση αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή πηκτώματος στο οποίο ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα απομόνωσης DNA, για να ελεγχθεί αν πραγματοποιήθηκε σωστά η απομόνωση (D. Voytas et al., 2001).

2.4.1. Σύσταση και παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Η σύσταση του πηκτώματος είναι η εξής: 50ml TAE , 1gr αγαρόζη για 2% και 0,5gr αγαρόζης για 1%, 4μl χρωστική Xpert Green DNA Stain (20.000X) Ref: QS01 0001 της εταιρίας Grisp.

Διάλυμα TAE: Ένα διάλυμα πυκνό 50× παρασκευάζεται διαλύοντας 242 g βάσης Tris σε νερό, προσθέτοντας 57,1 ml οξικού οξέος και 100 ml διαλύματος 500 mM EDTA (pH 8.0), και ρυθμίζοντας τον τελικό όγκο σε 1 λίτρο. Το διάλυμα TAE 1× περιέχει 40 mM Tris, 20 mM οξικό οξύ και 1 mM EDTA. Το Tris είναι μια ισχυρή βάση. Το συζυγές οξύ του Tris έχει pKa 8,07 στους 25 °C, που σημαίνει ότι το ρυθμιστικό διάλυμα έχει αποτελεσματικό εύρος pH μεταξύ 7,1 και 9,1 (pKa ± 1) σε θερμοκρασία δωματίου. Αντίθετα, το οξικό είναι ένα οξύ, και ο συνδυασμός αποτελεί ένα ρυθμιστικό διάλυμα με ελαφρώς αλκαλικό εύρος (pH 8-8,5). Υπό αυτές τις ελαφρώς αλκαλικές συνθήκες,

το DNA προστατεύεται καλύτερα από την υδρόλυση. Το EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) είναι ένας χηλικός παράγοντας που διαχωρίζει τα δισθενή ιόντα, ιδίως τα ιόντα μαγνησίου. Αυτό είναι απαραίτητο επειδή το ένζυμο DNase απαιτεί ιόντα μαγνησίου για να δράσει. Έτσι χρησιμοποιείται για να διατηρηθεί το DNA ασφαλές ενώ ηλεκτροφορείται σε ένα πήκτωμα (Genetic Education. 2020: <https://geneticeducation.co.in/agarose-gel-electrophoresis-buffer/>).

Χρωστική Xpert Green: Η Xpert Green DNA Stain είναι μια νέα και ασφαλής εναλλακτική λύση του βρωμιούχου αιθιδίου για την οπτικοποίηση του DNA (δίκλωνου και μονόκλωνου DNA) και RNA σε πηκτώματα αγαρόζης και πολυακρυλαμίδης. Είναι μη μεταλλαξιγόνος όπως έχει προσδιοριστεί από το τεστ Ames. Η Xpert Green DNA Stain έχει μήκος κύματος διέγερσης φθορισμού στην περιοχή UV από 270nm έως 290nm. Το όριο ανίχνευσης της κυμαίνεται από 0,5-5 ng / ζώνη (ανάλογα με το τύπο και το ποσοστό της αγαρόζης, το πάχος του πηκτώματος και το ρυθμιστικό ηλεκτροφόρησης) (Khimexpert.com: <https://khimexpert.com/wp-content/uploads/2018/12/GS01-Xpert-Green-DNA-Stain-20.000X.pdf>).

Για την παρασκευή του πηκτώματος αναμειγνύεται η αγαρόζη με το ρυθμιστικό διάλυμα 50 ml 1x TAE (40 mM Tris, 20 mM οξικό οξύ και 1 mM EDTA), και το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει διαυγές. Αφού μειωθεί η θερμοκρασία (περίπου στους 55 °C) στο μίγμα προστίθεται 4ml χρωστικής Xpert Green η οποία προσδένεται στο DNA και το καθιστά ορατό στο υπεριώδες φως (UV). Το μίγμα τέλος τοποθετείται σε εκμαγείο-καλούπι χωρητικότητας 50ml για να πήξει (10-15 min) και με ειδικά «χτένια» θα δημιουργηθούν στο τελικό πήκτωμα οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων (πηγαδάκια).

2.4.2. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης

Το πήκτωμα εμβαπτίστηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με διάλυμα TAE σε ποσότητα ώστε να υπερκαλύψει το πήκτωμα κατά περίπου 1 cm, και με τροφοδοτικό εφαρμόστηκε ηλεκτρική τάση. Το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται οδηγεί τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA προς την κάθοδο. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης πηκτωμάτων αγαρόζης είναι μια συσκευή οριζόντιας διάταξης που φέρει στα άκρα της δύο ηλεκτρόδια από πλατίνα στα οποία εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση (D. Voytas et al., 2001). Η τάση που εφαρμόστηκε σε κάθε περίπτωση ήταν 150mV για 20-30 min.

Στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκαν 10 μl (από τα 25μl) του προϊόντος PCR και 4 μl διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) κυανού του ξυλενίου [6x, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% ξυλένιο, 60% γλυκερόλη, 60 mM EDTA]. Η ποσότητα του κυανού του ξυλενίου που χρησιμοποιήθηκε ήταν διπλάσια από τη συνιστώμενη ποσότητα

διότι αυτό συνέβαλε στην καλύτερη τοποθέτηση («φόρτωση») του DNA στο πήκτωμα. Τα διαλύματα φόρτωσης περιέχουν μία ουσία υψηλής πυκνότητας (συνήθως γλυκερόλη) και μία ή δύο χρωστικές που μετακινούνται στο πήκτωμα (D. Voytas et al., 2001). Επίσης σε μερικές από τις ηλεκτροφορήσεις, όταν αυτό ήταν απαραίτητο, προστέθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100bp PLUS BLUE DNA ladder – purple coding Cat. –No: 304-105, 50μg / 500μl της εταιρίας GeneON που αποτελείται από 11 ζώνες κατάλληλες για χρήση ως πρότυπα μοριακού βάρους για ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα θραύσματα DNA κυμαίνονται από 100 – 1500bp.

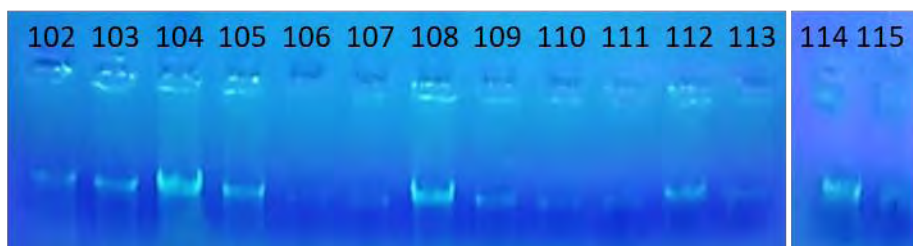
Για να απεικονιστούν οι ζώνες των μορίων DNA στο πήκτωμα αγαρόζης είναι απαραίτητη μια ουσία που να καθιστά ορατά τα μόρια του DNA. Η χρωστική Xpert Green έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα γι' αυτόν τον σκοπό διότι έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η χρωστική προστίθεται στο πήκτωμα κατά την παρασκευή του. Για την παρατήρηση των ζωνών, το πήκτωμα τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας που βρίσκεται σε σκοτεινό θάλαμο. Με την έκθεσή τους σε υπεριώδη ακτινοβολία τα μόρια του DNA φθορίζουν και γίνονται ορατά.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η διαδικασία δημιουργίας των ποντικών knockout (*tm1d*) για το γονίδιο *Fra10ac1* περιλάμβανε συνοπτικά τα εξής βήματα (Εικόνα 4): α) δημιουργία ποντικών *tm1c* μέσω διασταύρωσης των ετερόζυγων *tm1a* με διαγονιδιακούς ομόζυγους ποντικούς για την ρεκομπινάση *FlpE*. β) διασταύρωση των ετερόζυγων ποντικών *tm1c* με διαγονιδιακούς ποντικούς για την ρεκομπινάση *Cre*. Όταν γίνει η διασταύρωση ενός ετερόζυγου ποντικού *tm1c* με έναν ομόζυγο διαγονιδιακό ποντικό για την ρεκομπινάση *Cre*, προκύπτουν χιμαιρικοί ποντικοί που φέρουν τόσο το αλληλόμορφο *tm1c* όσο και το *tm1d*. Αυτό συμβαίνει διότι λίγο μετά τη γονιμοποίηση των ποντικών *tm1c/wt* με διαγονιδιακούς ποντικούς *Cre* προκύπτουν μεταξύ των άλλων και έμβρυα (*tm1c/wt, cre/wt*) στα οποία θα αρχίσει να εκφράζεται η ρεκομπινάση *Cre*. Όταν εκφραστεί θα εισαχθεί στον πυρήνα των κυττάρων του εμβρύου και θα μετατρέψει το *tm1c* αλληλόμορφο σε *tm1d*. Από τα κύτταρα στα οποία έδρασε η ρεκομπινάση *Cre* θα προκύψουν κυτταρικές σειρές *tm1d*, ενώ από αυτές που δεν έδρασε θα προκύψουν κυτταρικές σειρές *tm1c* στο ίδιο έμβρυο. Στη συνέχεια, από αυτούς τους χιμαιρικούς ποντικούς θα προκύψουν απόγονοι *tm1d* μόνο αν τα κύτταρα της γαμετικής σειράς φέρουν το αλληλόμορφο *tm1d* (Ενότητα 1.5.6.). Υπάρχει όμως και το ενδεχόμενο να κληρονομήσει ένας ποντικός ταυτόχρονα και το αλληλόμορφο *tm1c* και το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *Cre* με αποτέλεσμα να γίνει μετατροπή του *tm1c* σε *tm1d* σε μεγάλο ποσοστό κυττάρων και στην PCR κατά τη γονοτύπηση να αξιολογείται σαν *tm1d*. Για το λόγο αυτό πρέπει να ελεγχθεί αν οι ποντικοί *tm1d* φέρουν το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *Cre* για να αποκλειστούν αυτοί που πιθανόν να είναι χιμαιρικοί. Η ρεκομπινάση *Cre* εκφράζεται και δρα στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου και όσο πιο νωρίς δράσει τόσο μεγαλύτερο το ποσοστό κυττάρων *tm1d* στο αναπτυσσόμενο έμβρυο.

3.1. Απομόνωση DNA από ουρά ποντικού

Για τη γονοτύπηση των ποντικών πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από ουρά ποντικού στα δείγματα 102-115 (Εικόνα 6). Η απομόνωση DNA από το συγκεκριμένο τεμάχιο ουράς (>1μg) δίνει αρκετή ποσότητα απομονωμένου DNA (βλ. παρακάτω) για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).



Εικόνα 6: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων απομονωμένου DNA.

3.2. Ποσοτικοποίηση δειγμάτων απομονωμένου DNA

Πίνακας 5: Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης δειγμάτων απομονωμένου DNA με φωτομέτρηση.

Κωδικός	Λόγος Καθαρότητας 260/280	Συγκέντρωση σε ng/μl
Δ102	1,67	50,8
Δ103	1,58	61,5
Δ104	1,7	89,8
Δ105	1,45	83,2
Δ106	1,13	68

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5, ελέγχθηκαν ενδεικτικά 5 από τα δείγματα απομονωμένου DNA για να βρεθεί η συγκέντρωσή του. Οι συγκεντρώσεις του απομονωμένου DNA ήταν μεταξύ 50 - 100 ng/μl. Συνεπώς, καθώς τα δείγματα επαναδιαλύονταν τελικά σε 50μl H₂O προκύπτει ότι συνολικά από κάθε δείγμα απομονώθηκαν περίπου 2,5-5μg DNA. Επίσης, βάσει της συγκέντρωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε 1μl σε κάθε PCR.

3.3. Γονοτύπηση των δειγμάτων DNA με τη μέθοδο PCR

3.3.1. Γονοτύπηση των δειγμάτων DNA ποντικού για την παρουσία του αλληλομόρφου *wt*, *tm1c* και *tm1d*

Πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση των δειγμάτων απομονωμένου DNA 111-115 που προέκυψαν από τη διασταύρωση: Δ33 ♀ (*tm1d/wt*) ή Δ69 ♀ (*tm1d/wt*) x Δ36 ♂ (*tm1d/wt*) με σκοπό τον εντοπισμό των ποντικών που έφεραν το αλληλόμορφο *tm1d* (Πίνακας 6). Οι πιθανοί γονότυποι που θα μπορούσαν να έχουν οι απόγονοι θα ήταν οι εξής: *wt/wt*, *tm1d/wt* και *tm1d/tm1d*. Αν οι γονείς ήταν χιμαιρικοί, θα μπορούσαν να προκύψουν οι εξής γονότυποι: *wt/wt*, *tm1c/wt* και *tm1c/tm1c* ή αν ένας από τους δύο γονείς ήταν χιμαιρικός να προκύψουν οι εξής γονότυποι: *wt/wt*, *tm1c/wt*, *tm1d/wt* και *tm1c/tm1d*. Για το λόγο αυτό πρέπει να ελεγχθούν όλα τα πιθανά αλληλόμορφα που μπορεί να φέρουν οι απόγονοι ώστε να διατηρηθούν μόνο αυτοί που φέρουν το αλληλόμορφο *tm1d* (η γονοτύπηση των υπόλοιπων δειγμάτων για *tm1d* είχε προηγηθεί και τα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για τα επόμενα στάδια γονοτύπησης).

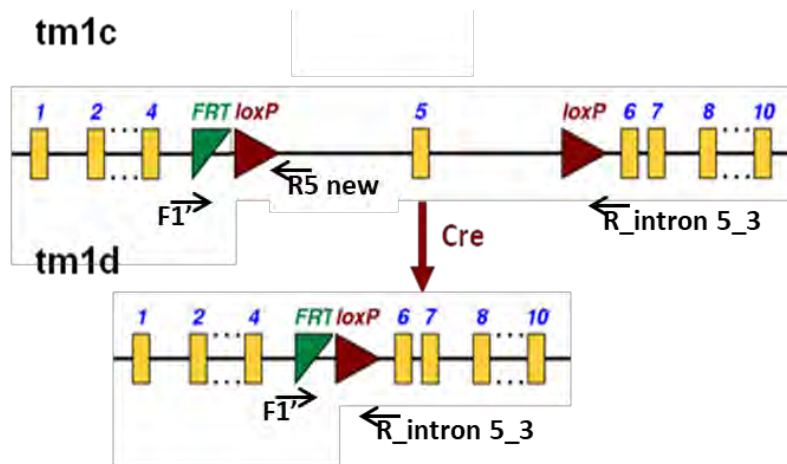
Πίνακας 6: Διασταυρώσεις από τις οποίες προέκυψαν οι ποντικοί προς μελέτη. Οι ποντικοί με κωδικό Δ6, Δ7 και Δ9 ήταν χιμαιρικοί.

Κωδικός	Φύλο	Ημερομ. Γεν.	Διασταύρωση γονέων	
Δ33	θηλυκό	02/2019	Δ6 ♀ (<i>tm1d/wt</i>) x Δ7 ♂ (<i>tm1d/wt</i>) ή Δ9 ♂ (<i>tm1d/wt</i>)	
Δ36	αρσενικό			
Δ39	αρσενικό			
Δ53	αρσενικό	04/2019		
Δ54	αρσενικό			
Δ68	θηλυκό	05/2019		
Δ69	θηλυκό			
Δ72	αρσενικό			
Δ79	θηλυκό	05/2019		Δ33 ♀ (<i>tm1d/wt</i>) x Δ36 ♂ (<i>tm1d/wt</i>) ή Δ39 ♂ (<i>tm1d/wt</i>)
Δ80	θηλυκό			
Δ81	θηλυκό			
Δ82	θηλυκό			
Δ83	θηλυκό			
Δ84	αρσενικό			
Δ85	αρσενικό			
Δ86	αρσενικό	08/2019	Δ68 ♀ (<i>tm1d/tm1d</i>) x Δ84 ♂ (<i>tm1d/wt</i>)	
Δ87	θηλυκό			
Δ88	θηλυκό			
Δ89	θηλυκό			
Δ90	θηλυκό	08/2019	Δ6 ♀ (<i>tm1d/wt</i>) x Δ7 ♂ (<i>tm1d/wt</i>)	
Δ95	αρσενικό			
Δ96	αρσενικό			
Δ102*	αρσενικό	10/2019	Δ68 ♀ (<i>tm1d/tm1d</i>) x Δ86 ♂ (<i>tm1d/tm1d</i>)	
Δ103*	θηλυκό			
Δ104*	θηλυκό			
Δ105*	θηλυκό			
Δ106*	θηλυκό			
Δ107*	θηλυκό			
Δ108*	θηλυκό			
Δ109*	θηλυκό			
Δ110*	θηλυκό			
Δ111*	θηλυκό	11/2019	Δ33 ♀ (<i>tm1d/wt</i>) ή Δ69 ♀ (<i>tm1d/wt</i>) x Δ36 ♂ (<i>tm1d/wt</i>)	
Δ112*				
Δ113*	αρσενικό			
Δ114*	αρσενικό			
Δ115*				

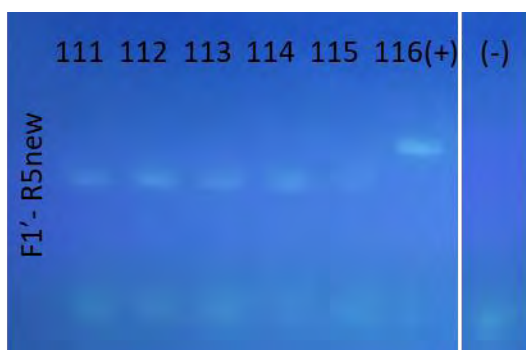
*Με αστερίσκο σημαίνονται τα δείγματα στα οποία έγινε απομόνωση DNA στο πλαίσιο αυτής της πτυχιακής εργασίας. Στα υπόλοιπα είχε προηγηθεί.

3.3.1.1. Ανίχνευση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου (wild-type) και *tm1c*

Αρχικά έγινε ανίχνευση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου (*wt*) με τη χρήση των εκκινητών *F1'*– *R5new* που υβριδίζονται στο ιντρόνιο 4 του αλληλομόρφου *wt* και δίνουν προϊόν PCR μεγέθους 361bp. Επίσης παράγουν προϊόν PCR και στο αλληλόμορφο *tm1c* μεγέθους 495bp το οποίο περιέχει επιπλέον μια αλληλουχία *FRT* και μία θέση *loxP* σε σχέση με το αγρίου τύπου (ο υβριδισμός των εκκινητών γίνεται εκατέρωθεν αυτών των δύο αλληλουχιών), (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Θέσεις υβριδισμού των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη γονοτύπηση ποντικών για τα αλληλόμορφα *tm1c* και *tm1d*.

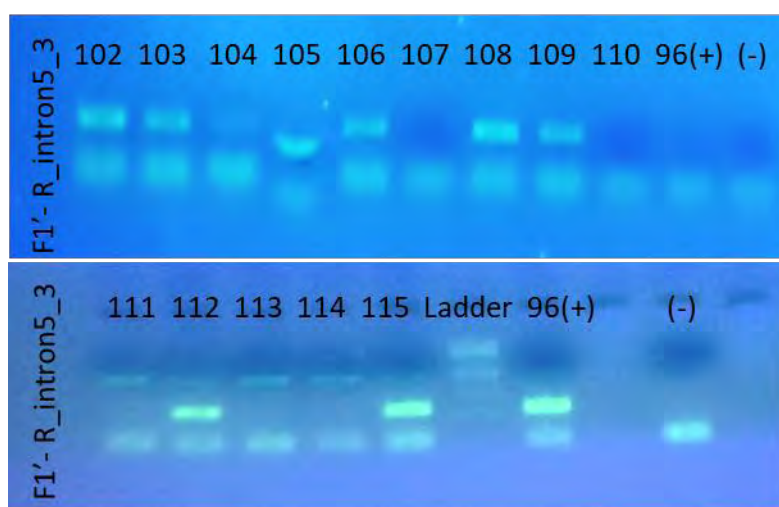


Εικόνα 8: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR των δειγμάτων 111-115 με εκκινητές τους *F1'*- *R5new* που ενισχύουν τα αλληλόμορφα *wt* και *tm1c*. Το δείγμα 116 χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για *tm1c* καθώς είναι ομόζυγο *tm1c/tm1c*.

Όπως φαίνεται από την Εικόνα 8 όλα τα δείγματα 111 έως 115 φέρουν το αλληλόμορφο αγρίου τύπου (*wt*) και κανένα το *tm1c*.

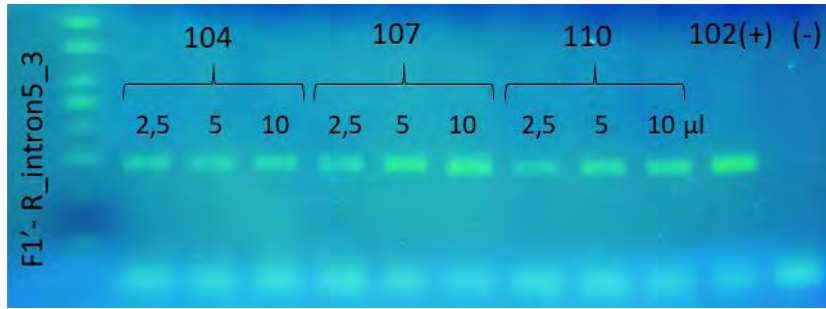
3.3.1.2. Ανίχνευση του αλληλομόρφου *tm1d*

Στη συνέχεια ακολούθησε η ανίχνευση του αλληλομόρφου *tm1d* στα δείγματα 102-115 με τη χρήση των εκκινητών F1' – R_intron5_3 (Εικόνα 9) που υβριδίζονται στο ιντρόνιο 4 (F1') και στο ιντρόνιο 5 (R_intron5_3) στο αλληλόμορφο *tm1d* και δίνουν προϊόν PCR μεγέθους περίπου 350bp. Επίσης παράγουν προϊόν PCR και στο αλληλόμορφο *wt* μεγέθους 928bp και στο αλληλόμορφο *tm1c* μεγέθους 1086bp. Να σημειωθεί ότι τα δείγματα 102-110 αναμένεται να δώσουν προϊόν PCR με τους συγκεκριμένους εκκινητές που να αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο *tm1d*, γιατί προέκυψαν από διασταύρωση ομόζυγων ποντικών *tm1d* (Πίνακας 6).



Εικόνα 9: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR των δειγμάτων 102-115 με εκκινητές τους F1' - R_intron5_3. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 96 που ήταν γνωστό ότι έφερε το αλληλόμορφο *tm1d*.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα τα δείγματα 102, 103, 105, 106, 108, 109, 112 και 115 φέρουν το αλληλόμορφο *tm1d*. Επειδή όμως τα δείγματα 104, 107 και 110 δεν εμφάνισαν διακριτή ζώνη για το αλληλόμορφο *tm1d* στην προηγούμενη PCR, έγινε επανάληψη της ίδιας PCR αλλά με διαφορετικές ποσότητες αρχικού DNA των δειγμάτων αυτών. Πιο αναλυτικά πραγματοποιήθηκε αραιώση 1 προς 5 στα τρία αυτά δείγματα και στη συνέχεια από το αραιωμένο διάλυμα DNA προστέθηκαν στην PCR 2,5μl, δηλαδή μισή ποσότητα DNA απ' ότι είχε προστεθεί αρχικά, 5μl, δηλαδή όση ακριβώς ποσότητα DNA είχε προστεθεί αρχικά και 10μl δηλαδή διπλάσια ποσότητα DNA απ' όση προστέθηκε αρχικά. Η διαδικασία αυτή ήταν απαραίτητη καθώς τα παραπάνω δείγματα είχαν αναμενόμενο φαινότυπο *tm1d/tm1d* αφού έχουν προέλθει από διασταύρωση ομόζυγων ποντικών *tm1d*.



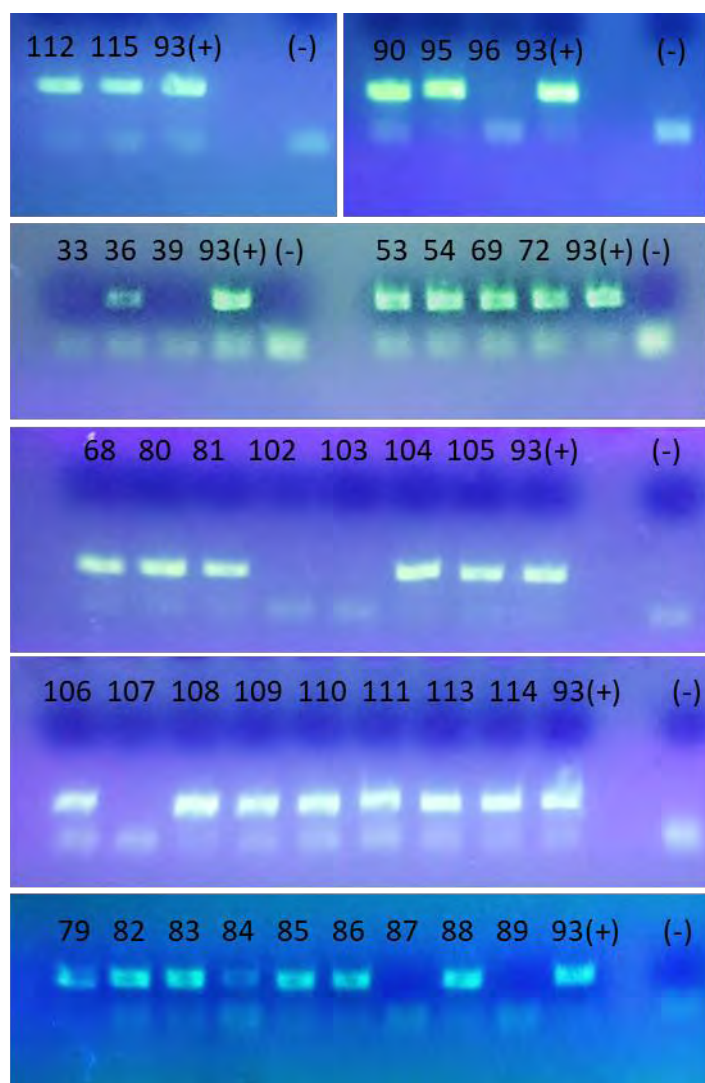
Εικόνα 10: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR των δειγμάτων 104, 107, 110 με εκκινητές τους F1' - R_intron5_3 με διαφορετικές ποσότητες αρχικού DNA. Όλα τα δείγματα σε όλες τις αρχικές ποσότητες DNA έδωσαν προϊόν PCR.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (Εικόνα 9 και Εικόνα 10) προκύπτει ότι τα δείγματα 102-110 έχουν γονότυπο *tm1d/tm1d* όπως ήταν αναμενόμενο. Επίσης τα δείγματα 112 και 115 φέρουν το αλληλόμορφο *tm1d* και άρα έχουν γονότυπο *tm1d/wt* αφού όπως βρέθηκε προηγουμένως έφεραν και το αλληλόμορφο αγρίου τύπου (*wt*). Φυσικά πρέπει να ελεγχθεί αν όντως οι ποντικοί φέρουν το αλληλόμορφο *tm1d* και δεν πρόκειται για αλληλόμορφα *tm1c* στα οποία έχει δράσει η ρεκομπινάση *Cre* (βλ. παρακάτω).

3.3.2. Γονοτύπηση των δειγμάτων DNA ποντικού για την παρουσία του διαγονιδίου της ρεκομπινάσης *Cre*

Μετά τη γονοτύπηση για το αλληλόμορφο *tm1d*, είναι σημαντικό να ελεγχθεί και η ύπαρξη του διαγονιδίου της ρεκομπινάσης *Cre* καθώς υπάρχει η περίπτωση συνκληρονόμησης των αλληλομόρφων *tm1c* και *CRE*. Σε αυτή την περίπτωση μπορούν να προκύψουν χιμαιρικοί ποντικοί που να φέρουν και το αλληλόμορφο *tm1c* και το *tm1d* (Ενότητα 1.5.6.). Αυτοί όμως θα πρέπει να αποκλειστούν από τα μετέπειτα πειράματα. Έτσι έπρεπε να διασφαλιστεί ότι τα δείγματα που φέρουν το αλληλόμορφο *tm1d*, προέρχονται πράγματι από ποντικούς *tm1d* και όχι από χιμαιρικούς. Για να διαπιστωθεί αυτό λοιπόν έγινε γονοτύπηση όλων των δειγμάτων που έφεραν το αλληλόμορφο *tm1d*, για την ύπαρξη του διαγονιδίου της ρεκομπινάσης *Cre*. Οι ποντικοί που δεν έφεραν το διαγονίδιο, σίγουρα δεν ήταν χιμαιρικοί και διατηρήθηκαν για τα επακόλουθα πειράματα. Εκτός των άλλων, το επιπλέον γενετικό φορτίο ενός διαγονιδίου μπορεί να προκαλέσει κάποιον φαινότυπο στο ζώο και να επηρεάσει την ορθότητα του πειράματος και γι' αυτό είναι ανεπιθύμητο (Ενότητα 1.5.7.). Πραγματοποιήθηκε έτσι γονοτύπηση των δειγμάτων που φέρουν το αλληλόμορφο *tm1d* (Πίνακας 6) με σκοπό τον εντοπισμό των ποντικών που δεν φέρουν το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *Cre* (Εικόνα 11). Οι ειδικοί εκκινητές για το γονίδιο της ρεκομπινάσης *Cre* που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι CreF2–CreR2 οι οποίοι υβριδίζονται μέσα στο διαγονίδιο. Στον Πίνακα 6 φαίνονται αναλυτικά όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία. Δίνονται

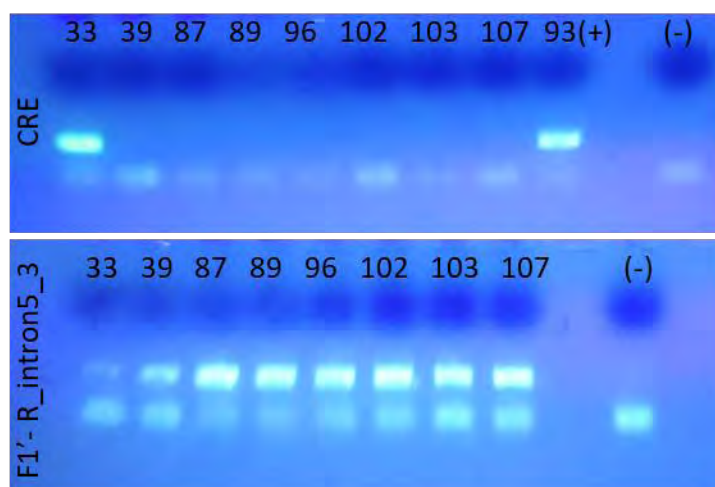
πληροφορίες για το φύλο των ζώων, την ημερομηνία γέννησής τους, το γονότυπο, καθώς και για τις διασταυρώσεις από τις οποίες προήλθαν.



Εικόνα 11: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR των δειγμάτων 33, 36, 39, 53, 54, 68, 69, 72, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 95, 96, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 με εκκινητές τους CreF2 – CreR2. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 93 που ήταν γνωστό ότι περιείχε το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *Cre*.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, τα δείγματα τα οποία δεν φέρουν το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *Cre* είναι τα εξής: 33, 39, 87, 89, 96, 102, 103, 107. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί πως όλα τα δείγματα που δεν έδωσαν προϊόν PCR με τους ειδικούς εκκινητές για το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *Cre*, δεν φέρουν πράγματι το διαγονίδιο και δεν πρόκειται για κάποιο ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα, πραγματοποιήθηκε ξανά η PCR με την ίδια ποσότητα DNA, με δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Το ένα ζεύγος είναι οι εκκινητές CreF2 – CreR2 που χρησιμοποιήθηκαν

προηγουμένως, και το άλλο ζεύγος οι εκκινητές F1'– R_intron5_3 (Εικ. 12) με τους οποίους ταυτοποιήθηκαν τα δείγματα που έφεραν το αλληλόμορφο *tm1d*.



Εικόνα 12: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR των δειγμάτων 33, 39, 87, 89, 96, 102, 103, 107 με εκκινητές τους CreF2 – CreR2 (πάνω εικόνα) και τους F1' – R_intron5_3 (κάτω εικόνα). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 93 που ήταν γνωστό ότι έφερε το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *Cre*.

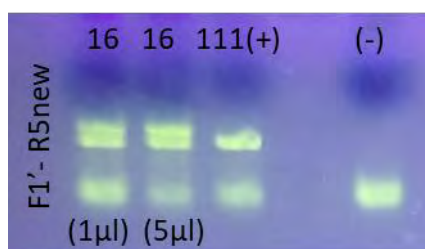
Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, τα δείγματα τα οποία δεν φέρουν το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *Cre* είναι τα εξής: 39, 87, 89, 96, 102, 103, 107. Όπως φαίνεται το δείγμα 33 είχε δώσει αρχικά ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα διότι πιθανόν δεν πραγματοποιήθηκε σωστά η PCR. Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων για το διαγονίδιο *CRE* έγινε δύο φορές. (Δεν φαίνονται όλα τα αποτελέσματα παραπάνω).

3.3.3. Γονοτύπηση δειγμάτων DNA ποντικού για την παρουσία του διαγονιδίου της ρεκομπινάσης *FlpE*

Πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση των δειγμάτων τα οποία δεν έφεραν το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *Cre* με σκοπό τον εντοπισμό των ποντικών που δεν φέρουν ούτε το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *FlpE*. Τα επιπλέον γονίδια που αποτελούν ένα περιττό γενετικό φορτίο μπορεί να επηρεάσουν την ορθότητα του πειράματος και γι' αυτό είναι ανεπιθύμητα. Έτσι τόσο το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *Cre* όσο και το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *FlpE* πρέπει μέσω επιλεγόμενων διασταυρώσεων να αφαιρεθούν (Ενότητα 1.5.7.). Οι ειδικόι εκκινητές *Rosa1*, *Rosa2* και *Rosa3* που χρησιμοποιήθηκαν, υβριδίζονται τόσο στο διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *FlpE* (*Rosa1-2*) δίνοντας προϊόν PCR περίπου 350bp, όσο και στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου (*wt*) δίνοντας προϊόν PCR περίπου 600bp (ο *Rosa1* εκκινητής υβριδίζεται εκτός διαγονιδίου).

3.3.3.1. Εύρεση θετικού μάρτυρα για την PCR

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ένας θετικός μάρτυρας (positive control) ώστε να χρησιμοποιηθεί σε επόμενες PCR για την ανίχνευση της ύπαρξης ή όχι των *FLPE* διαγονιδίων στα δείγματα DNA ποντικού, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στο δείγμα 16 που ήταν γνωστό ότι είχε γονότυπο *tm1a/tm1c/wt*, *flp/wt*. Άρα καθορίστηκε η ποσότητα του DNA του δείγματος 16 ώστε να προκύψει προϊόν PCR (Εικόνα 13) και δοκιμάστηκαν ανά ζεύγη οι εκκινητές *Rosa1-2* και *Rosa1-3* ώστε να επαληθευτεί το αναμενόμενο προϊόν.

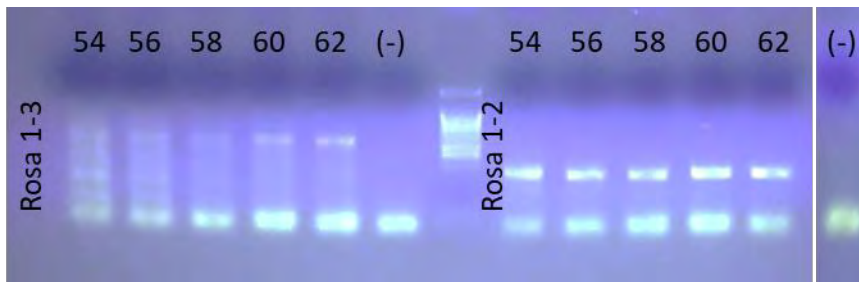


Εικόνα 13: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR του δείγματος 16 με εκκινητές τους F1'- R5new με διαφορετικές ποσότητες αρχικού DNA. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 111 (*wt/wt*) που ήταν γνωστό ότι δίνει προϊόν PCR με τους εκκινητές F1'- R5new με 1μl αρχικής ποσότητας DNA.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, βρέθηκε η ποσότητα DNA για τον θετικό μάρτυρα δηλαδή το δείγμα 16. Έτσι αφού το δείγμα 16 δίνει προϊόν PCR με 1μl απομονωμένου DNA, χρησιμοποιήθηκε αυτή η ποσότητα για να δοκιμαστούν οι εκκινητές *Rosa*.

3.3.3.2. PCR κλίσης θερμοκρασίας (Gradient PCR)

Επειδή τα προϊόντα των εκκινητών *Rosa* που δοκιμάστηκαν ανά ζεύγη στους 56 °C (*Rosa1-3*, *Rosa1-2*) δεν έδωσαν ευδιάκριτο προϊόν στην PCR, έπρεπε να πραγματοποιηθεί η PCR κλίσης θερμοκρασίας, δηλαδή η εκτέλεση της ίδιας PCR σε διαφορετικές θερμοκρασίες με σκοπό τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδισμού (Εικόνα 14). Οι μεγαλύτερες θερμοκρασίες στο στάδιο της υβριδοποίησης οδηγούν σε μεγαλύτερη εξειδίκευση των προϊόντων της PCR διότι ευνοούνται μόνο οι ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εκκινητών και του DNA-εκμαγείου.

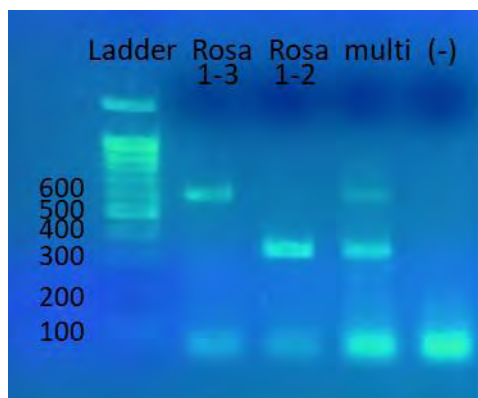


Εικόνα 14: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων της Gradient PCR του δείγματος 16 με εκκινητές τους Rosa1,2,3 ανά ζεύγη (Rosa1-3, Rosa1-2) σε θερμοκρασίες υβριδισμού 54, 56, 58, 60, 62 °C.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται πως διακριτό προϊόν δίνουν τα ζεύγη των εκκινητών Rosa1-2 και Rosa1-3 στους 62°C (ο αρνητικός μάρτυρας τοποθετήθηκε στη χαμηλότερη θερμοκρασία υβριδισμού δηλαδή στους 54°C). Άρα ο υβριδισμός των εκκινητών αποφασίστηκε να γίνεται στους 62°C.

3.3.3.3. Επαλήθευση προϊόντων PCR με τους εκκινητές Rosa1-3 και Rosa1-2

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR με τα ζεύγη εκκινητών Rosa1-3 και Rosa1-2 προκειμένου να επιβεβαιωθεί το μέγεθος των προϊόντων PCR που προκύπτουν, και μια πολλαπλή PCR και με τους τρεις εκκινητές Rosa1, Rosa2, Rosa3. Σε αυτήν την αντίδραση η θερμοκρασία υβριδισμού ήταν οι 62°C όπως βρέθηκε παραπάνω (Εικ. 15).



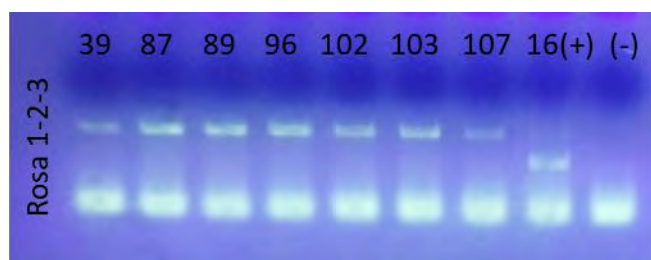
Εικόνα 15: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR του δείγματος 16 με εκκινητές τους Rosa1-3 και Rosa1-2 καθώς και των προϊόντων PCR και των τριών εκκινητών Rosa1, 2, 3 (πολλαπλή PCR). Οι αντιδράσεις έγιναν με θερμοκρασία υβριδισμού τους 62 °C.

Αφού επιβεβαιώθηκαν τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων PCR με τους εκκινητές Rosa1-3 (περίπου 600bp) για το αλληλόμορφο αγρίου τύπου και Rosa1-2 (περίπου 350bp) για το γονίδιο της ρεκομπινάσης *F1pE* σε μία πολλαπλή PCR, πλέον

ήταν γνωστές οι ζώνες που θα προκύψουν για ένα δείγμα ποντικού που φέρει το γονίδιο της ρεκομπινάσης *FlpE*. Έτσι στο δείγμα 16 που έχει γονότυπο *flp/wt*, προκύπτουν δύο ζώνες. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 15, όταν προκύπτουν και τα δύο παραπάνω προϊόντα PCR, σε περίπτωση που το δείγμα είναι ετερόζυγο, τότε η ζώνη του προϊόντος του διαγονιδίου είναι πιο έντονη από το αλληλόμορφο αγρίου τύπου. Αυτό συμβαίνει διότι το μέγεθος του προϊόντος PCR της πρώτης είναι σχεδόν υποδιπλάσιο από αυτό της δεύτερης και έτσι ενισχύεται πιο πολλές φορές κατά την PCR.

3.3.3.4. Ανίχνευση του διαγονιδίου *FLPE*

Τέλος, καθώς προσδιορίστηκε ο θετικός μάρτυρας με τους εκκινητές Rosa1, 2, 3, πραγματοποιήθηκε η PCR για τα δείγματα που είχε διαπιστωθεί προηγουμένως ότι δεν έφεραν το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *Cre*. Με αυτόν τον τρόπο ελέγχθηκε αν τα δείγματα αυτά έφεραν το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *FlpE* (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR των δειγμάτων 39, 87, 89, 96, 102, 103, 107 με εκκινητές τους Rosa1, Rosa2 και Rosa3. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 16 που ελέγχθηκε προηγουμένως. Οι αντιδράσεις έγιναν σε θερμοκρασία υβριδισμού τους 62 °C.

Τα παραπάνω αποτελέσματα της PCR δείχνουν πως όλα τα δείγματα που είχαν ελεγχθεί προηγουμένως για την παρουσία του διαγονιδίου της ρεκομπινάσης *Cre* και δεν το έφεραν, δεν φέρουν ούτε το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *FlpE*. Αυτό είναι εμφανές από το γεγονός ότι σε όλα τα δείγματα προκύπτει η ζώνη που αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου (*wt*) και όχι αυτή που είναι μικρότερου μοριακού βάρους και αντιστοιχεί στο διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *FlpE*.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Η γονοτύπηση των ποντικών με απενεργοποιημένο το γονίδιο *Fra10ac1* έδειξε ότι οι επτά ποντικοί είναι κατάλληλοι για τις επακόλουθες αναλύσεις

Από τα αποτελέσματα της γονοτύπησης βρέθηκε πως οι ποντικοί με κωδικό 39, 87, 89, 96, 102, 103, 107 (Πίνακας 7) είναι κατάλληλοι για περαιτέρω μελέτες καθώς περιέχουν το αλληλόμορφο *tm1d* σε ομόζυγη ή σε ετερόζυγη κατάσταση και όχι το *tm1c* που συνυπήρχε με το διαγονίδιο της ρεκομπινάσης *Cre*, ώστε να προκύψουν χιμαιρικοί ποντικοί που να φέρουν και τα δύο αλληλόμορφα σε διαφορετικούς ιστούς (Ενότητα 1.5.6.). Ακόμα οι ποντικοί αυτοί δεν φέρουν τα διαγονίδια της ρεκομπινάσης *Cre* και *FipE*. Έτσι τα αποτελέσματα των επακόλουθων αναλύσεων δεν θα επηρεαστούν από την παρουσία κάποιου από των δύο διαγονιδίων (Ενότητα 1.5.7.). Οι περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες αφορούν, μεταξύ άλλων, ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου *Fra10ac1* (επιβεβαίωση καταστολής) αλλά και άλλων γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων ενδέχεται να επηρεάζονται και να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη *Fra10ac1*. Έτσι θα ξεκαθαριστούν οι μοριακοί μηχανισμοί στους οποίους συμμετέχει η πρωτεΐνη *Fra10ac1*. Επίσης θα είναι δυνατή η διεξαγωγή συμπεριφορικών πειραμάτων τόσο σε ποντικούς με απλοανεπάρκεια της πρωτεΐνης *Fra10ac1* όσο και με πλήρη απώλειά της ώστε να γίνει συσχέτιση με το φαινότυπο.

Πίνακας 7: Ποντικοί που κρίθηκαν κατάλληλοι για τα επακόλουθα πειράματα με βάση τα αποτελέσματα της γονοτύπησης.

Κωδικός	Φύλο	Ημερομ. Γεν.	Γονότυπος
Δ39	αρσενικό	02/19	<i>tm1d/wt</i>
Δ87	θηλυκό	08/19	<i>tm1d/tm1d</i>
Δ89	θηλυκό		<i>tm1d/wt</i>
Δ102	αρσενικό	10/19	<i>tm1d/tm1d</i>
Δ103	θηλυκό		
Δ107	θηλυκό		

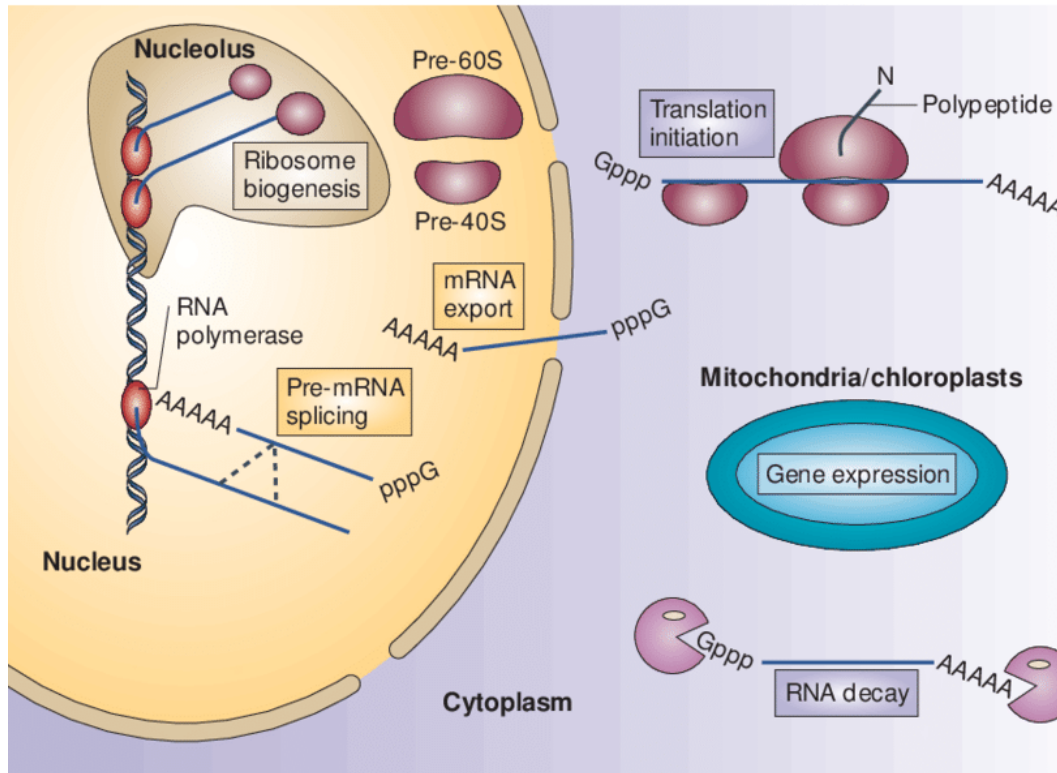
4.1.1. Πιθανοί ρόλοι της πρωτεΐνης FRA10AC1

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *FRA10AC1* είναι πολύ συντηρημένη μόνο σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς υποδεικνύοντας ότι επιτελεί μια σημαντική λειτουργία. Αυτό συνάδει και με το γεγονός ότι η *FRA10AC1* αποτελεί συστατικό των υποσυμπλόκων του μείζονος σωματίου συναρμογής και συμμετέχει είτε στις διαδικασίες της συναρμογής είτε σε διαδικασίες που συνδέονται με τη συναρμογή

(Ενότητα 1.3.). Η διαδικασία της συναρμογής και της εναλλακτικής συναρμογής συμβαίνει μόνο σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς και μάλιστα στην πλειοψηφία των γονιδίων τους, συμβάλλοντας έτσι στην πολυπλοκότητα που τους χαρακτηρίζει (Pan, Q., et al., 2008).

Έπειτα από αναλύσεις των άμεσων αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης FRA10AC1 με κυτταρικές πρωτεΐνες, επιβεβαιώθηκε η συμβολή της FRA10AC1 στο δίκτυο πρωτεϊνών του σωματίου συναρμογής. Επιπλέον, αποτελέσματα από ομικές αναλύσεις (μεταβολομικής, μεταγραφομικής, πρωτεομικής) κυτταρικών μοντέλων *HeLa* με καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1* έδειξαν πως αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση προέκυψαν σε τουλάχιστον 1500 μετάγραφα και 500 πρωτεΐνες αποδεικνύοντας ότι η FRA10AC1 ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδιακών προϊόντων. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι επιτελεί βασική κυτταρική λειτουργία η οποία αφορά περίπου το 2,5% του συνολικού αριθμού των πρωτεϊνών του ανθρώπου. Η έλλειψη του γονιδίου επηρεάζει μόρια που ανήκουν στις ίδιες λειτουργικές ομάδες (π.χ. μεταβολισμός, επεξεργασία mRNA). Συμμετέχει δηλαδή στη ρύθμιση των mRNAs που κωδικοποιούν λειτουργικά συσχετιζόμενες πρωτεΐνες σε διαφορετικά επίπεδα όπως στην εναλλακτική ή μη συναρμογή, στη σταθερότητα, στον καθορισμό τοπολογίας και στη μετάφραση των μεταγράφων (Γαλλιοπούλου, Ε., 2018).

Οι αλλαγές στην αφθονία των πρωτεϊνών ή των μεταγράφων που παράγονται από τα αντίστοιχα γονίδια, έπειτα από την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1*, θα μπορούσαν να εξηγηθούν από την πιθανή συμμετοχή της FRA10AC1 σε διάφορους ρυθμιστικούς μηχανισμούς με τους οποίους καθορίζεται η γονιδιακή έκφραση. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν τη συναρμογή και την εναλλακτική συναρμογή, τη ρύθμιση της διαδικασίας της μεταγραφής, την έξοδο των μεταγράφων από τον πυρήνα για να οδηγηθούν στο ριβόσωμα ή την αποικοδόμηση των μεταγράφων στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί σωστά η συναρμογή (Εικόνα 17). Φυσικά μπορεί να συμμετέχει και σε παραπάνω από μία από αυτές τις κυτταρικές διεργασίες ή να αποτελεί πρωτεΐνη προσαρμογέα που στρατολογεί ένα δίκτυο πρωτεϊνών που θα πραγματοποιεί κάποια από τις παραπάνω διαδικασίες. Ακόμα, μπορεί να συνδέει δύο διαφορετικές διαδικασίες που πραγματοποιούνται διαδοχικά. Έτσι οι αλλαγές στην έκφραση πρωτεϊνών έπειτα από καταστολή του *FRA10AC1* μπορεί να αφορούν τη μη σωστή διεξαγωγή της μεταγραφής (π.χ. λόγω μη σωστής αναγνώρισης της τροποποιημένης χρωματίνης), της ωρίμανσης των πρώιμων μεταγράφων (π.χ. λόγω μη σωστής διεξαγωγής της αποκοπής των ιντρονίων), της εξαγωγής από τον πυρήνα ή της αποικοδόμησης των ατελώς τροποποιημένων μεταγράφων (Γαλλιοπούλου, Ε., 2018).



Εικόνα 17: Κυτταρικές διεργασίες επεξεργασίας του RNA (Rocak, S. and Linder, P., 2004).

4.1.2. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων διαφορετικών κυτταρικών τύπων έπειτα από απλοανεπάρκεια ή πλήρη απώλεια του γονιδίου *FRA10AC1*

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί η βιολογική λειτουργία του προϊόντος του γονιδίου *FRA10AC1* πρέπει να πραγματοποιηθεί έλεγχος των μοριακών μονοπατιών που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ανεπάρκειας του *Fra10ac1* σε επίπεδο οργανισμού. Ήδη μετά την παραγωγή των ετερόζυγων ποντικών *tm1d* φάνηκε ότι η απουσία του ενός αλληλομόρφου *Fra10ac1* δεν επηρεάζει λόγω απλοανεπάρκειας τη βιωσιμότητα των ποντικών καθώς γεννιούνται και είναι γόνιμοι αλλά ενδέχεται να επηρεάζεται η επιβίωσή τους στο μέλλον. Για να βρεθούν όμως οι μοριακοί μηχανισμοί στους οποίους συμμετέχει η πρωτεΐνη *Fra10ac1*, θα πρέπει να ελεγχθεί η επίδραση της απλοανεπάρκειας και της πλήρους απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *Fra10ac1* σε κυτταρικό επίπεδο. Αρχικά πρέπει να διαπιστωθεί αν σε απλοανεπάρκεια του γονιδίου *Fra10ac1* η γονιδιακή έκφραση εξισορροπείται μέσω αύξησης της ρύθμισης της έκφρασης (up-regulation) του γονιδιακού προϊόντος του φυσιολογικού αλληλομόρφου. Αυτό πρέπει να πραγματοποιηθεί τόσο σε επίπεδο οργανισμού αλλά και σε συγκεκριμένους ιστούς με προτεραιότητα τον εγκέφαλο, αλλά και σε ιστούς στους οποίους παρατηρείται υψηλή έκφραση του γονιδίου. Ο έλεγχος αυτός θα πραγματοποιηθεί με real-time PCR για να βρεθεί ο βαθμός της μεταγραφής του γονιδίου καθώς και με ανάλυση Western ώστε να συγκριθεί η παραγωγή του γονιδιακού προϊόντος όταν είναι και τα δύο αλληλόμορφα ενεργά σε σύγκριση με απλοανεπάρκεια του γονιδίου. Φυσικά πρέπει να γίνει και έλεγχος της

έκφρασης του προαναφερθέντος γονιδίου όταν έχει απενεργοποιηθεί πλήρως σε ποντικούς knockout (να ελεγχθεί δηλαδή η επιτυχία του knockout).

Αφού βρεθούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Fra10ac1* σε κάθε μια από τις παραπάνω περιπτώσεις ακολουθεί η εύρεση του πως επηρεάζεται η έκφραση όλων των κυτταρικών μεταγράφων στις διαφορετικές καταστάσεις έκφρασης του *Fra10ac1*. Αφού είναι γνωστό πια πως το προϊόν του γονιδίου *Fra10ac1* είναι συστατικό του μείζονος σωματίου συναρμογής, αναμένεται η απενεργοποίηση του να επηρεάσει μεγάλο ποσοστό των μεταγράφων και κατ' επέκταση των πρωτεϊνών του κυττάρου. Η εύρεση αυτών των μεταγράφων και πρωτεϊνών που θα μεταβληθεί η έκφρασή τους, το ποσοστό μεταβολής της έκφρασής τους και το πρότυπο της συναρμογής τους (μέσω της χρήσης του RNA sequencing και της ανάλυσης Western) μπορεί να δώσει απαντήσεις για τους μοριακούς μηχανισμούς που ευθύνονται για την εκδήλωση συμπτωμάτων γνωστών συνδρόμων που εμφανίζουν οι φορείς της εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης *FRA10A*. Η ταυτοποίηση των επιδράσεων αυτών μπορεί να γίνει μέσω ομικών τεχνολογιών (μεταγραφομική, πρωτεομική, μεταβολομική κ.α.).

4.1.3. Συμπεριφορικά πειράματα

Αφού δημιουργηθούν οι ποντικοί knockout, πρέπει να ελεγχθεί με συμπεριφορικά πειράματα ο αντίκτυπος που φέρει η μετάλλαξη knockout (απλοανεπάρκεια και πλήρης απώλεια λειτουργίας) στο φαινότυπο. Έτσι οι φαινοτυπικές εκδηλώσεις της απενεργοποίησης του γονιδίου μπορούν να συγκριθούν και να συσχετισθούν με κλινικές εκδηλώσεις/συμπτώματα που εμφανίζουν οι φορείς της εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης *FRA10A*. Με αυτόν τον τρόπο θα είναι δυνατή η διεξοδικότερη ανάλυση της απενεργοποίησης του γονιδίου ώστε να αποκαλυφθούν οι διαταράξεις όλων των μοριακών αλληλεπιδράσεων που αυτή προκαλεί, και πως αυτές μεταφράζονται στο φαινότυπο. Τα συμπεριφορικά πειράματα θα περιλαμβάνουν λοιπόν τεστ νοητικών λειτουργιών (κυρίως μνήμης και μάθησης) διότι η απώλεια της έκφρασης του γονιδίου *Fra10ac1* καθώς και άλλων γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων αποτελούν συστατικά του σωματίου συναρμογής, έχουν συσχετιστεί σε προγενέστερες μελέτες με νοητική υστέρηση (Ενότητα 1.3.1.).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Γαλλιοπούλου, Ε. Α., (2018): *Λειτουργική ανάλυση του γονιδίου FRA10AC1 του ανθρώπου στο πλαίσιο του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του σωματίου συναρμογής*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Geoffrey, M. Cooper, Robert, E. Hausman (2011, 2013), *Το Κύτταρο Μια Μοριακή Προσέγγιση*, Αλεξανδρούπολη: Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε..

Akerman, M., Fregoso, O., Das, S., Ruse, C., Jensen, M., Pappin, D., Zhang, M. and Krainer, A., 2015. Differential connectivity of splicing activators and repressors to the human spliceosome. *Genome Biology*, 16(1).

Berman, D., Ringe, D., Petsko, G. and Small, S., 2014. The Use of Pharmacological Retromer Chaperones in Alzheimer's Disease and other Endosomal-related Disorders. *Neurotherapeutics*, 12(1), pp.12-18.

Bersell, K., Choudhury, S., Mollova, M. et al., Moderate and high amounts of tamoxifen in α MHC-MerCreMer mice induce a DNA damage response, leading to heart failure and death. *Dis Model Mech*. 2013;6(6):1459-1469. doi:10.1242/dmm.010447

Bessonov, S., Anokhina, M., Krasauskas, A., Golas, M., Sander, B., Will, C., Urlaub, H., Stark, H. and Luhrmann, R., 2010. Characterization of purified human Bact spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis. *RNA*, 16(12), pp.2384-2403.

Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C., Urlaub, H. and Lührmann, R., 2008. Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature*, 452(7189), pp.846-850.

Bradley, A., Anastassiadis, K., Ayadi, A., Battey, J., Bell, C., Birling, M., et al., (2012). The mammalian gene function resource: the international knockout mouse consortium. *Mammalian Genome*, 23(9-10), pp.580-586.

Canales, C. and Walz, K., (2019). The Mouse, a Model Organism for Biomedical Research. *Cellular and Animal Models in Human Genomics Research*, pp.119-140.

Coleman, J., Brennan, K., Ngo, T., Balaji, P., Graham, R. and Smith, N., (2015). Rapid Knockout and Reporter Mouse Line Generation and Breeding Colony Establishment Using EUCOMM Conditional-Ready Embryonic Stem Cells: A Case Study. *Frontiers in Endocrinology*, 6.

Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*. 2013;133(3):1-4. doi:10.1038/jid.2013.1

Genetic Education. 2020. *Agarose Gel Electrophoresis Buffer*. [online] Available at: <<https://geneticeducation.co.in/agarose-gel-electrophoresis-buffer/>> [Accessed 14 June 2020].

Hegele, A., Kamburov, A., Grossmann, A., Sourlis, C., Wowro, S., Weimann, M., Will, C., Pena, V., Lührmann, R. and Stelzl, U., 2012. Dynamic Protein-Protein Interaction Wiring of the Human Spliceosome. *Molecular Cell*, 45(4), pp.567-580.

Huh WJ, Mysorekar IU, Mills JC., 2010. Inducible activation of *Cre* recombinase in adult mice causes gastric epithelial atrophy, metaplasia, and regenerative changes in the absence of “floxed” alleles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* ;299:G368–G380.

Ilagan, J., Chalkley, R., Burlingame, A. and Jurica, M., 2013. Rearrangements within human spliceosomes captured after exon ligation. *RNA*, 19(3), pp.400-412.

Jeannotte L, Aubin J, Bourque S, Lemieux M, Montaron S, Provencher St-Pierre A., 2011. Unsuspected effects of a lung-specific *Cre* deleter mouse line. *Genesis.* ;49(3):152-159. doi:10.1002/dvg.20720.

Khimexpert.com. 2020. [online] Available at: <<https://khimexpert.com/wp-content/uploads/2018/12/GS01-Xpert-Green-DNA-Stain-20.000X.pdf>> [Accessed 14 June 2020].

Kobrynski, L. and Sullivan, K., 2007. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *The Lancet*, 370(9596), pp.1443-1452.

Lexow J, Poggioli T, Sarathchandra P, Santini MP, Rosenthal N. Cardiac fibrosis in mice expressing an inducible myocardial-specific *Cre* driver. *Dis Model Mech.* 2013;6(6):1470-1476. doi:10.1242/dmm.010470

Li, Q., Parrado, A., Samtani, M. and Narayan, V., 2015. Variations in the *FRA10AC1* Fragile Site and 15q21 Are Associated with Cerebrospinal Fluid A β 1-42 Level. *PLOS ONE*, 10(8), p.e0134000.

Lin, H., Zhang, Z., Iomini, C. and Dutcher, S., 2018. Identifying RNA splicing factors using IFT genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Open Biology*, 8(3), p.170211.

Maniatis, T. and Reed, R., 2002. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature*, 416(6880), pp.499-506.

Pan, Q., Shai, O., Lee, L., Frey, B. and Blencowe, B., 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Genetics*, 40(12), pp.1413-1415.

Proudfoot, N., Furger, A. and Dye, M., 2002. Integrating mRNA Processing with Transcription. *Cell*, 108(4), pp.501-512.

Quawell micro volume spectrophotometer. 2020. Quawell Micro Volume Spectrophotometer. [online] Available at: <<http://www.quawell.com/#!products/vstc1=q3000>> [Accessed 13 June 2020].

Hearn, R. and Arblaster, K., 2010. DNA extraction techniques for use in education. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 38(3), pp.161-166.

Rocak, S. and Linder, P., 2004. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(3), pp.232-241.

Sarafidou, T., Kahl, C., Martinez-Garay, I., Mangelsdorf, M., Gesk, S., Baker, E. 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(1), pp.69-81.

Schmidt, C., Gronborg, M., Deckert, J., Bessonov, S., Conrad, T., Luhrmann, R. and Urlaub, H., 2014. Mass spectrometry-based relative quantification of proteins in precatalytic and catalytically active spliceosomes by metabolic labeling (SILAC), chemical labeling (iTRAQ), and label-free spectral count. *RNA*, 20(3), pp.406-420.

Schulte, E., Ellwanger, D., Dihanich, S., Manzoni, C., Stangl, K., Schormair, B., Graf, E., Eck, S., Mollenhauer, B., Haubenberger, D., Pirker, W., Zimprich, A., Brücke, T., Lichtner, P., Peters, A., Gieger, C., Trenkwalder, C., Mewes, H., Meitinger, T., Lewis, P., Klünemann, H. and Winkelmann, J., 2013. Rare variants in *LRRK1* and Parkinson's disease. *neurogenetics*, 15(1), pp.49-57.

Schwartz, M., Zlotorynski, E. and Kerem, B., 2006. The molecular basis of common and rare fragile sites. *Cancer Letters*, 232(1), pp.13-26.

Simmons, D. (2008). The use of animal models in studying genetic disease: transgenesis and induced mutation. *Nature Education* 1(1):70

Sjöblom, T., Jones, S., Wood LD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2006; 314(5797):268-274. doi:10.1126/science.1133427

Skarnes, W., Rosen, B., West, A., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., et al., (2011). A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*, 474(7351), pp.337-342.

Thyagarajan B, Guimarães MJ, Groth AC, Calos MP (2000). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* 244(1–2):47–54

Vandamme, T., 2014. Use of rodents as models of human diseases. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 6(1), p.2.

Voytas D., "Agarose gel electrophoresis," in Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., 2001. doi: 10.1002/0471142727.mb0205as51.

Wells, R. and Ashizawa, T., 2006. *Genetic Instabilities And Neurological Diseases*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp.617-635.

Will, C. and Luhrmann, R., 2010. Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), pp.a003707-a003707.

Yates, A., Achuthan, P., Akanni, W., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M., Armean, I., Azov, A., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., Marugán, J., Cummins, C., Davidson, C., Dodiya, K., Fatima, R., Gall, A., Giron, C., Gil, L., Grego, T., Haggerty, L., Haskell, E., Hourlier, T., Izuogu, O., Janacek, S., Juettemann, T., Kay, M., Lavidas, I., Le, T., Lemos, D., Martinez, J., Maurel, T., McDowall, M., McMahan, A., Mohanan, S., Moore, B., Nuhn, M., Oeh, D., Parker, A., Parton, A., Patricio, M., Sakthivel, M., Abdul Salam, A., Schmitt, B., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sycheva, M., Szuba, M., Taylor, K., Thormann, A., Threadgold, G., Vullo, A., Walts, B., Winterbottom, A., Zadissa, A., Chakiachvili, M., Flint, B., Frankish, A., Hunt, S., Ilesley, G., Kostadima, M., Langridge, N., Loveland, J., Martin, F., Morales, J., Mudge, J., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Trevanion, S., Cunningham, F., Howe, K., Zerbino, D. and Flicek, P., 2019. Ensembl 2020. *Nucleic Acids Research*,