



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

Ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΕΝΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΓΙΑ
ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ 1 ΤΟΥ ΛΥΣΟΦΩΣΦΑΤΙΔΙΚΟΥ
ΟΞΕΟΣ (Lpar1)

ΧΑΤΖΗΔΑΚΗ ΙΣΜΗΝΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΜΑΡΤΙΟΣ 2017

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΕΝΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΓΙΑ
ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ 1 ΤΟΥ ΛΥΣΟΦΩΣΦΑΤΙΔΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ
(Lpar1)**

ΧΑΤΖΗΔΑΚΗ ΙΣΜΗΝΗ

A.M.:71403

Επιβλέπουσα: Εύη Λιανίδου, Ph.D, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας-Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ).

Τριμελής επιτροπή εξέτασης:

Εύη Λιανίδου, Ph.D, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας-Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ).

Βασίλης Αϊδίνης, Ερευνητής Α, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών (ΕΚΕΒΕ) <<Alexander Fleming>>.

Μιχάλης Κουππάρης, Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το **λυσοφωσφατιδικό οξύ (Lysophosphatidic acid, LPA)** παράγει μια ποικιλία κυτταρικών αποκρίσεων μέσω μιας οικογένειας ειδικών υποδοχέων (**Lysophosphatidic Acid Receptors, LPARs**). Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον LPA_1 ήταν το πρώτο που ταυτοποιήθηκε [19] και εκφράζεται ευρέως σε ενήλικους ποντικούς, ενώ κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη η έκφραση του είναι εμπλουτισμένη στον εγκέφαλο [7]. Η ενεργοποίηση του LPA_1 επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, την μετανάστευση, και κυτταροσκελετικές αλλαγές. Οι ποντικοί με ανεπάρκεια στον LPA_1 παρουσιάζουν πάνω από 50% περιγεννητική θνησιμότητα σε καθαρό (C57BL/6J) γενετικό υπόβαθρο. Οι επιζώντες είναι 10-15% μικρότεροι σε μέγεθος από ό,τι τα φυσιολογικά ποντίκια, έχουν αμβλύ ρύγχος και πιο φαρδιά μάτια.

Η έκφραση των LPARs είναι υψηλή σε ορισμένες καρκινικές οντότητες και η υπερέκφραση τους θεωρείται ότι έχει άμεσες επιδράσεις στην έναρξη του καρκίνου. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι ο LPA_1 συμβάλλει στην **ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF)** [42]. Τα ποντίκια με ανεπάρκεια στον LPA_1 προστατεύονται δραματικά από την ίνωση και την θνησιμότητα που επάγονται από την μπλεομυκίνη [44].

Με βάση αυτά τα δεδομένα, δημιουργήσαμε έναν **υπό όρους “knockout” (conditional “knockout”, cKO)** $Lpar1$ ποντικό, επιλέγοντας την προσέγγιση, της υπό όρους γονιδιακής στόχευσης του **Ευρωπαϊκού Προγράμματος της Υπό Όρους Μεταλλαξιγένεσης Ποντικού (European Conditional Mouse Mutagenesis Programme, EUCOMM)**, που βασίζεται σε μια κασέτα στόχευσης και έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός πρώτου ΚΟ αλληλόμορφου σε **εμβρυϊκά βλαστικά (Embryonic Stem, ES) κύτταρα (Cells, ESCs)**. Για τον χαρακτηρισμό του διαγονιδιακού ζώου, μελετήθηκε ποιοτικά και ποσοτικά η ιστολογική έκφραση του γονιδίου σε $Lpar1^{+/+}$, $Lpar1^{+/-}$, $Lpar1^{-/-}$ ποντικών. Επίσης μελετήσαμε $Lpar1^{-/-}$ έμβρυα, σε διάφορες ημέρες κύησης, για να επιβεβαιώσουμε την περιγεννητική θνησιμότητα.

Συμπεραίνουμε ότι η έκφραση του γονιδίου μειώνεται κατά 50% στους $Lpar1^{+/-}$ ποντικούς σε σχέση με την έκφραση στους φυσιολογικούς ποντικούς, και μηδενίζεται

στους $Lpar1^{-/-}$ ποντικούς. Παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση του γονιδίου στους όρχεις, στην ουροδόχο κύστη, στην μήτρα και στο παχύ έντερο. Τέλος αν και οι $Lpar1^{-/-}$ ποντικοί δεν γεννιούνται στις αναμενόμενες κατά Mendel αναλογίες, δεν βρέθηκε η εμβρυϊκή ημέρα στην οποία πεθαίνουν.

Λέξεις κλειδιά: Υποδοχέας 1 του λυσοφωσφατιδικού οξέος, υπό όρους “knockout”, εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα.

ABSTRACT

Lysophosphatidic acid (LPA) produces a variety of cellular responses through a family of specific G protein-coupled receptors. The LPAR1 gene was the first to be cloned and identified. Wide expression of *Lpar1* is observed in adult mice. During embryonic development is enriched in the brain. LPA1 activation induces: cell proliferation and survival, cell migration, and cytoskeletal changes. *Lpar1*^{-/-} mice show up to 50% perinatal lethality in pure (C57Bl/6J) genetic backgrounds.

LPARs' expression is high in some cancer entities and their overexpression is thought to have direct effects on cancer initiation. There is also increasing evidence that LPAR1 contributes to idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Mice deficient in LPA₁ are dramatically protected from fibrosis and mortality induced by bleomycin challenge.

According to these data, we generated *Lpar1* cKO mice. Considering EUCOMM's conditional gene targeting strategy, we selected the approach that is based on a promoter-driven targeting cassette and results in the generation of a 'Knockout-first allele' in ES cells. For the characterization of the transgenic animal, we studied qualitative and quantitative the histological expression of the gene in, *Lpar1*^{+/+}, *Lpar1*^{+/-}, *Lpar1*^{-/-} mice. We, also, studied *Lpar1*^{-/-} embryos at various days of pregnancy, to confirm the perinatal mortality.

We conclude that the expression of the gene is reduced by 50% at *Lpar1*^{+/-} mice compared to expression in normal mice, and zeroed at *Lpar1*^{-/-} mice. There was high expression of the gene in testis, bladder, uterus and colon. Finally although *Lpar1*^{-/-} mice were not born at the expected Mendel proportions, we did not find in which embryonic day dying.

Keywords: Lysophosphatidic acid receptor 1, conditional "knockout", embryonic stem cells.

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9 -
ABSTRACT	5 -
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10 -
1.1 Λυσοφωσφατιδικό οξύ (Lysophosphatidic acid, LPA) και οι υποδοχείς του (Lysophosphatidic Acid Receptors, LPARs).....	10 -
1.1.1 Φωσφολιπίδια (Phospholipids, PLs)	10 -
1.1.2 Λυσοφωσφολιπίδια (Lysophospholipids, LPLs)	11 -
1.1.3 LPA.....	13 -
1.1.4 Υποδοχείς του λυσοφωσφατιδικού οξέος (Lysophosphatidic Acid Receptors, LPARs): υπότυποι	16 -
1.1.4.1 Ο υποδοχέας LPA ₁	17 -
1.1.4.2 Ο υποδοχέας LPA ₂	24 -
1.1.4.3 Ο υποδοχέας LPA ₃	25 -
1.1.4.4 Ο υποδοχέας LPA ₄	26 -
1.1.4.5 Ο υποδοχέας LPA ₅	27 -
1.1.5 Έκφραση των LPARs σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις	28 -
1.2 Γενετικές τροποποιήσεις	32 -
1.2.1 Το ποντίκι ως μοντέλο των θηλαστικών στην γενετική έρευνα.....	32 -
1.2.2 Διαγονιδιακές διαδικασίες	37 -
1.2.3 Γονιδιακή παγίδευση.....	39 -
1.2.4 Διαδικασίες γονιδιακής στόχευσης	40 -
1.2.6 Μεταλλαξιγένεση τρανσποζονίου.....	51 -
1.2.7 Μεταλλαξιγένεση ENU	51 -
1.3 Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα Υπό Όρους Μεταλλαξιγένεσης Ποντικού (European Conditional Mouse Mutagenesis Program, EUCOMM)	52 -
1.3.1 Στρατηγική του “πρώτου knock out” αλληλόμορφου	54 -
1.3.2 Παραγωγή ποντικών που φέρουν το γονίδιο αναφοράς lacZ (tm1b)	56 -
1.3.3 Παραγωγή “floxed” ποντικών (tm1c).....	58 -

1.3.4 Παραγωγή ΚΟ ποντικών(tm1d)	- 60 -
ΣΚΟΠΟΣ	- 64 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	- 65 -
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	- 65 -
2.1 Εξοπλισμός- Όργανα	- 65 -
2.2 Υλικά	- 66 -
2.3 Δείγματα.....	- 68 -
Ζώα.....	- 68 -
Συλλογή αίματος (πλάσματος).....	- 69 -
Συλλογή ιστού.....	- 69 -
Συλλογή εμβρύων.....	- 73 -
2.4 Μέθοδοι.....	- 74 -
2.4.1 Απομόνωση DNA.....	- 74 -
2.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	- 76 -
2.4.3 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πραγματικού χρόνου (Real Time qPCR)....	- 84 -
2.4.4 PCR μεγάλης εμβέλειας (Long-range PCR, LR-PCR).....	- 87 -
2.4.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης 2% σε TBE.	- 91 -
2.4.6 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης 0.7% σε TAE.	- 95 -
2.4.8 Κατεργασία καθαρισμού του απομονωμένου ολικού RNA.....	- 97 -
2.4.9 Μετατροπή του RNA σε cDNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση- 99 -	
2.4.11 LacZ staining (X gal staining)	- 102 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	- 108 -
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	- 108 -
Δημιουργία ενός cKO LPAR1 ποντικού	- 108 -
3.1 Παραγωγή ποντικών που φέρουν το πρώτο ΚΟ αλληλόμορφο (tm1a).....	- 109 -
3.2 Παραγωγή ποντικών που εκφράζουν το γονίδιο LacZ (tm1b).....	- 118 -

3.2.1 Μελέτη της ιστολογικής έκφρασης του Lpar1, μέσω της έκφρασης του γονιδίου LacZ.....	- 122 -
3.3 Παραγωγή “Floxed” ποντικών (tm1c).....	- 125 -
3.4 Παραγωγή ΚΟ ποντικών(tm1d)	- 129 -
3.4.1 Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου Lpar1 σε ΚΟ ποντικούς	- 133 -
3.4.2 Ιστολογική μελέτη ΚΟ ποντικών.....	- 135 -
3.4.3 Έλεγχος της βιωσιμότητας των tm1d ^{-/-} ποντικών	- 135 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	- 141 -
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	- 141 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α’	- 145 -
ΣΥΝΤΜΙΣΕΙΣ	- 145 -
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	- 149 -

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Ερευνών (ΕΚΕΒΕ) «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» στα πλαίσια του προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Διπλώματος Ειδίκευσης του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά τα έτη 2014-2017, υπό την επίβλεψη του Δρ. Βασίλη Αϊδίνη, Ερευνητή Α' στο Κέντρο Βιοϊατρικών Ερευνών «ΕΚΕΒΕ» Αλέξανδρος Φλέμινγκ και της Ευρύκλειας Λιανίδου, Καθηγήτριας Αναλυτικής και Κλινικής Χημείας, του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Βασίλη Αϊδίνη, ερευνητή Α' του ΕΚΕΒΕ Φλέμινγκ, ο οποίος μου εμπιστεύτηκε το θέμα και με δέχθηκε σαν μέλος του εργαστηρίου του προκειμένου να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία και με την πολύπλευρη επιστημονική του συνεισφορά, συνέβαλε τα μέγιστα στην απόκτηση από πλευράς μου πλούσιας εργαστηριακής εμπειρίας και κατάρτισης. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την επιστημονική του καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Αναλυτικής και Κλινικής Χημείας, του Πανεπιστημίου Αθηνών, Ευρύκλεια Λιανίδου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας, στο συγκεκριμένο Ερευνητικό κέντρο, για την ουσιαστική επίβλεψη της πτυχιακής εργασίας με χρήσιμες συμβουλές και παρεμβάσεις που συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωσή της.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου με τα οποία συνεργάστηκα και απευθύνθηκα σε αυτά για όποιο πρόβλημα προέκυπτε. Συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδακτορικό φοιτητή Ευάγγελο Διολέτη, ο οποίος με εκπαίδευσε και με καθοδήγησε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων αλλά και τις υποψήφιες διδάκτορες κα Ιωάννα Νίνου και κα Αγγελική Κατσιφα, για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Κλείνοντας, θα ήθελα να πω το μεγαλύτερο «ευχαριστώ» στην οικογένειά μου, την μητέρα μου και τον αδελφό μου που πάντα στήριζε τις επιλογές μου και χωρίς την αμέριστη ηθική και οικονομική στήριξη της, δε θα μπορούσα να φέρω εις πέρας τη διατριβή αυτή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

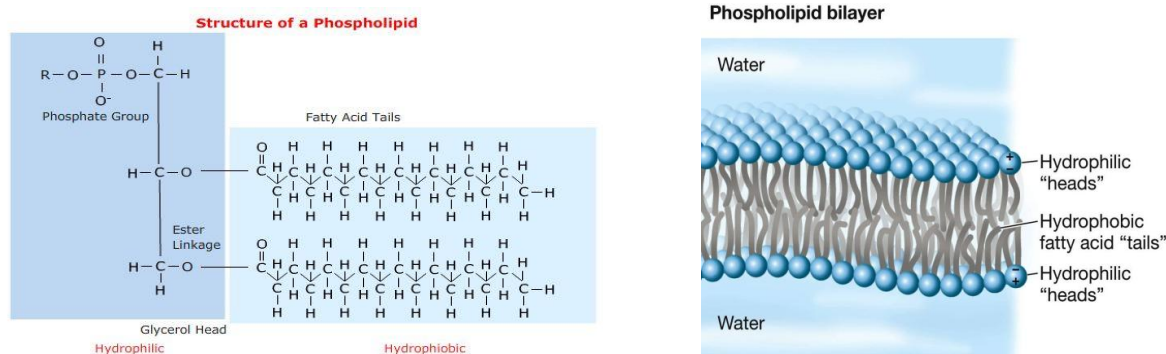
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Λυσοφωσφατιδικό οξύ (Lysophosphatidic acid, LPA) και οι υποδοχείς του (Lysophosphatidic Acid Receptors, LPARs)

1.1.1 Φωσφολιπίδια (Phospholipids, PLs)

Τα PLs είναι κρίσιμα συστατικά των περισσότερων βιολογικών μεμβρανών. Έχουν αμφιπαθή φύση και οι ιδιότητες ομαδοποίησής τους είναι το επίκεντρο έντονης μελέτης [1]. Τα PLs χαρακτηρίζονται από μια ραχοκοκαλιά γλυκερίνης στην οποία μια πολική ομάδα φωσφοδιεστέρα συνδέεται στον sn-3 άνθρακα, ενώ η πολική κεφαλή ορίζει την κατηγορία τους. Στους sn-1 και sn-2 άνθρακες είναι συνδεδεμένα δύο ακυλικά κατάλοιπα που προέρχονται από λιπαρό οξύ. Η δομική ποικιλομορφία των PLs μπορεί να αποδοθεί στην διαφορετική ομάδα πολικής κεφαλής, στους υποκαταστάτες λιπαρών οξέων και στην περιφερειοσομερεία τους. Μπορούν να θεωρηθούν ότι έχουν τρεις διακριτές δομικές περιοχές:

- (α) μια πολική υδρόφιλη ομάδα κεφαλής η οποία βρίσκεται στη διαχωριστική επιφάνεια λιπιδίου-νερού, όταν συναρμολογούνται σε οργανωμένες δομές
- (β) μια μεσεπιφανειακή περιοχή που είναι ενδιάμεσης πολικότητας και
- (γ) μια υδρόφοβη ουρά [2].



Σχήμα 1.1: (α) Δομή των φωσφολιπιδίων και (β) διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων

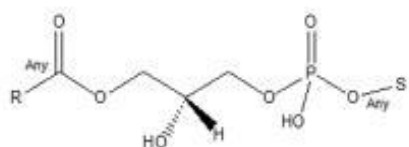
[Figures taken from (α) <http://alevelnotes.com/Lipids/58> , (β) *FILIFE:THE SCIENCE OF BIOLOGY*, Eighth Edition c 2007 Sinauer Associates, Inc. and W. H. Freeman & Co.]

Τα PLs είναι βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, έχουν διερευνηθεί διεξοδικά και είναι το θέμα πολλών περιοχών της βιοϊατρικής έρευνας. Η κατασκευή μεμβρανών τεχνητού κυττάρου με συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες απαιτούν ειδικά σχεδιασμένα λιπίδια που προέρχονται από γλυκερίνη. Επιπρόσθετα με τον φυσικό βιολογικό τους ρόλο, τα PLs χρησιμοποιούνται για διάφορες πρακτικές εφαρμογές, όπως η γαλακτωματοποίηση φαρμακευτικών προϊόντων και τροφίμων, η παρασκευή λιποσωμάτων για καλλυντικά και η χορήγηση φαρμάκου.[2]

1.1.2 Λυσοφωσfolιπίδια (Lysophospholipids, LPLs)

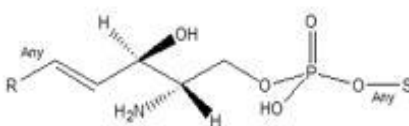
Τα LPLs είναι βιοδραστικά μόρια σηματοδότησης. Παράγονται από ενζυματικές και χημικές διαδικασίες των τοποειδικών φωσfolιπιδίων σε υποστρώματα όπως τα PLs της μεμβράνης και τα **σφιγγολιπίδια (sphingolipids, SLs)**. Κατά συνέπεια, τα LPLs χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα γλυκερυλο-LPLs και σφιγγόσυλο-LPLs, τα οποία έχουν έναν σκελετό γλυκερόλης και έναν σκελετό σφιγγοσίνης, αντίστοιχα [3]. Ωστόσο, όλα χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μιας ενιαίας ανθρακικής αλυσίδας (κατάλοιπο λιπαρού οξέος) και μίας πολικής κεφαλής. Όλα αυτά τα δομικά χαρακτηριστικά τα καθιστούν πιο υδρόφιλα και ευέλικτα από τους προδρόμους τους. Η υδρόφοβη ουρά (ανθρακική αλυσίδα) και η υδρόφιλη κεφαλή προσδιορίζουν τις ειδικές χημικές δομές των LPLs και συνεπώς επηρεάζουν τις μοναδικές βιολογικές τους δραστηριότητες [3].

Glycerol-LPLs (glycerol-based lysophospholipids)



R= fatty acid
S= specific group
for different LPLs

Sphingosyl-LPLs (sphingosyl-based lysophospholipids)



Σχήμα 1.2: (α) Γλυκερυλο- LPLs και (β) σφιγγόσυλο- LPLs [3]

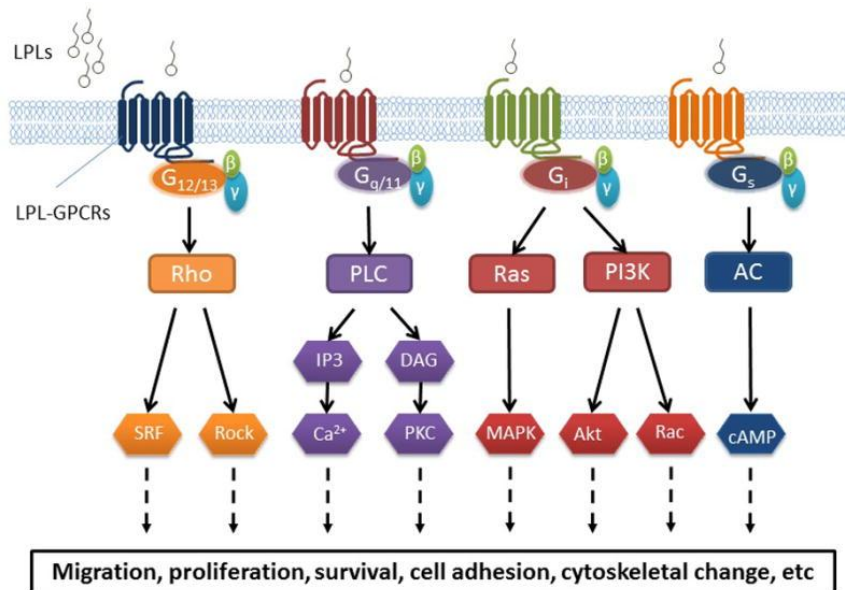
Σε αντίθεση με τα PLs, βρίσκονται μόνο σε μικρές ποσότητες στις βιολογικές κυτταρικές μεμβράνες [4]. Αρχικά, θεωρήθηκαν ως μεταβολικά ενδιάμεσα στην βιοσύνθεση των διαφόρων PLs της βιολογικής μεμβράνης. Ωστόσο, μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι τα LPLs παρουσιάζουν ευρείες βιολογικές ιδιότητες [3]. Στην πραγματικότητα τα LPLs και οι υποδοχείς τους έχουν βρεθεί σε ένα ευρύ φάσμα ιστών και κυτταρικών τύπων, που δείχνει τη σημασία τους σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένης της

αναπαραγωγής, της αγγειακής ανάπτυξης και της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος [3,5]. Περιλαμβάνουν LPA και την **1-φωσφορική σφιγγοσίνη (sphingosine-1-phosphate, S1P)**, τα οποία είναι καλά χαρακτηρισμένα και παίζουν σημαντικό ρόλο όχι μόνο στις φυσιολογικές αλλά και στις παθοφυσιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων της σύσπασης των λείων μυών, του πολλαπλασιασμού, του νευροπαθητικού πόνου, της φλεγμονής, της αθηροσκλήρωσης, της μυοκαρδιακής βλάβης, της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων, της εισβολής, κλπ [3].



Σχήμα 1.3: (α) Λυσοφωσφατιδικό οξύ και (β) 1-φωσφορική σφιγγοσίνη [2]

Παίζουν σημαντικό ρόλο ως σηματοδοτικοί μεσολαβητές, μέσω της σύνδεσής τους με **υποδοχείς που συζευγνύονται με πρωτείνες οι οποίες είναι συνδεδεμένες με τριφωσφορική γουανοσίνη (Guanine nucleotide-binding proteins, G-protein coupled receptors, GPCRs)**. Μέσω των μονοπατιών σηματοδότησής τους, διεγείρουν ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική μετανάστευση, η κυτταρική επιβίωση, οι κυτταροσκελετικές αλλαγές και η κυτταρική προσκόλληση, είτε ενεργοποιώντας είτε αναστέλλοντας κατάντη δευτερογενείς αγγελιοφόρους όπως την **κινάση που σχετίζεται με Rho (Rho-associated protein kinase, ROCK)**, την **διακυλογλυκερόλη (Diacylglycerol, DAG)**, την **1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (Inositol Triphosphate, IP3)**, την **πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνο (Mitogen-activated protein kinase, MAPK)**, το Ca^{2+} , την **αδενυλική κυκλάση (Adenylyl Cyclase, AC)**, την **κινάση της φωσφατιδυλinoσιτόλης-3 (Phosphatidylinositol 3-Kinase, PI3K)**, κλπ [3,6].



Σχήμα 1.4: Σηματοδότηση Υποδοχέα Λυσοφωσφολιπίδιου. Οι σημαντικότερες δράσεις των LPLs διαμεσολαβούνται από GPCRs της επιφάνειας των κυττάρων. Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες G πρωτεϊνών – G_s , $G_{q/11}$, G_i και $G_{12/13}$ - που οδηγούν σε ενεργοποίηση πολλαπλών καθοδικών μονοπατιών, τα οποία οδηγούν σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές λειτουργίες όπως η μετανάστευση/ο πολλαπλασιασμός/η επιβίωση του κυττάρου, η αντίδραση κυττάρου-κυττάρου, η κυτταροσκελετική αναδιαμόρφωση, κλπ [3]

1.1.3 LPA

Το LPA (Σχήμα 1.3α) είναι ένα μικρό γλυκεροφωσφολιπίδιο (μοριακό βάρος: 430-480 Da), σημαντικό μέλος της οικογένειας των λιπιδικών μορίων σηματοδότησης, LPLs [7]. Είναι ένας μεταβολίτης στην βιοσύνθεση των PLs της μεμβράνης. Ο γενικός όρος LPA (μονο-ακυλο-sn-γλυκερόλ-3-φωσφορικό άλας) αναφέρεται συχνά στο 18:1 ολεοϋλ-LPA (1-ακυλο-2-υδροξυ-sn-γλυκερο-3-φωσφορικό άλας), αντανakλώντας την ευρεία εργαστηριακή χρήση του. Ωστόσο, υπάρχουν και πολλές άλλες χημικές μορφές του LPA με διαφορετικά μήκη αλυσίδας ακυλίου και διαφορετικό βαθμό κορεσμού, που εξαρτώνται από το πρόδρομο PL [8]. Για παράδειγμα, η 1-παλμιτοϋλ-φωσφατιδυλοχολίνη μεταβολίζεται στο 1-παλμιτοϋλ-LPA (16:0-LPA), και η 18:1 λυσοφωσφατιδυλοχολίνη παράγει το 18:1-LPA, τα οποία, ποσοτικά, είναι και οι πιο άφθονες μορφές LPA στο ανθρώπινο πλάσμα [7].

Κατανομή του LPA

Το LPA είναι ένα φυσιολογικό συστατικό του αίματος και των παραγώγων του αίματος, όπως το πλάσμα και ο ορός, και κυμαίνεται από 0,1 mM στο πλάσμα έως περισσότερο από 10 mM στον ορό. Αυτές οι συγκεντρώσεις είναι σημαντικά υψηλότερες από τις εκτιμώμενες τιμές (nanomolar K_d) των LPA1-6. [9-10] Είναι παρόν σε όλους τους ευκαρυωτικούς ιστούς, σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με μείζονα είδη φωσφολιπιδίων [7], συμπεριλαμβανομένων και του αναπτυσσόμενου και ενήλικου νευρικού συστήματος [8]. Εντός του **κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ)**, το LPA βρίσκεται στον εμβρυϊκό εγκέφαλο, τον νευρικό σωλήνα, το χοριοειδές πλέγμα, τις μήνιγγες, στα αιμοφόρα αγγεία, στον νωτιαίο μυελό, και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) σε χαμηλές νανομοριακές να μικρομοριακές συγκεντρώσεις [11].

Μεταβολισμός του LPA

Το LPA παράγεται από τα PLs της μεμβράνης μέσω δύο μεγάλων οδών:

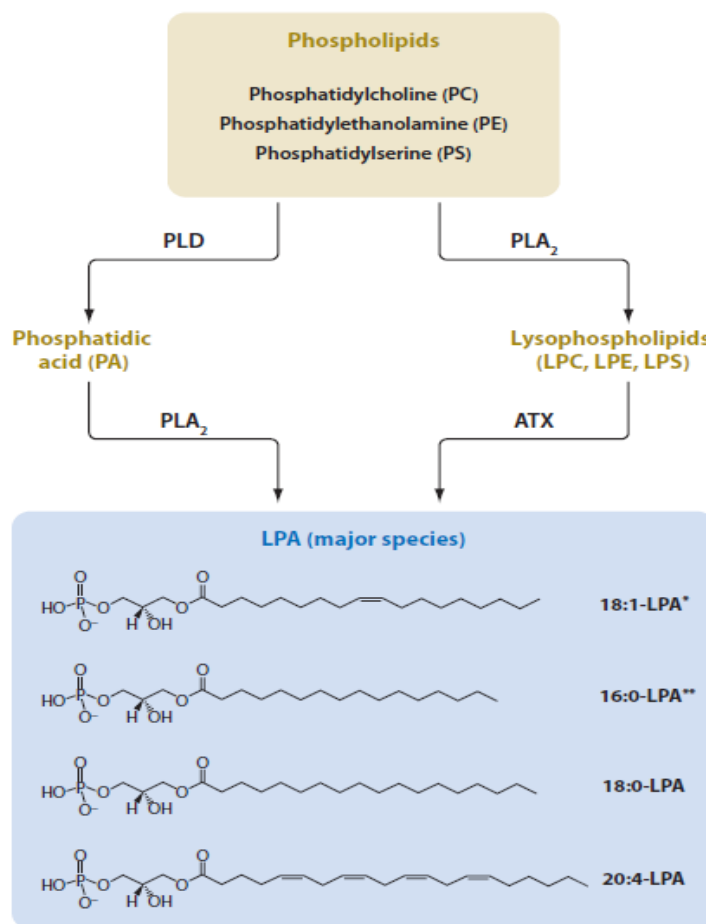
(α) διαδοχική δραστηριότητα της **φωσφολιπάσης D (Phospholipase D, PLD)** και της **φωσφολιπάσης A2 (Phospholipase A2, PLA2)** και (β) διαδοχική δράση της PLA2 και της **λυσοφωσφολιπάσης D (lysoPLD)** (Σχήμα 1.5) [7].

Το κύριο μονοπάτι παραγωγής του LPA είναι μέσω της ενζυμικής δράσης της **αυτοταξίνης (autotoxin, ATX)** [12,13], η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *Enpp2* και βρέθηκε να έχει δραστηριότητα lysoPLD [7]. Η σημασία της ATX στο μεταβολισμό του LPA δεν είχε εκτιμηθεί πλήρως, μέχρι που αναφέρθηκαν οι φαινοτύποι των ATX **“knock out” (KO)** ποντικών. Η ολική αφαίρεση της ATX (*Enpp2^{-/-}*) οδηγεί σε νευρικές και αγγειακές ανωμαλίες, με θάνατο από την εμβρυϊκή ημέρα (E) 9.5 [12,13]. Είναι σημαντικό ότι οι ετεροζυγώτες (*Enpp2^{+/-}*) επιβιώνουν μέχρι την ενηλικίωσή τους, αλλά τα επίπεδα του LPA στο πλάσμα τους είναι μειωμένα κατά περίπου 50%, σε σχέση με αυτά των φυσιολογικών (**αγρίου τύπου, Wild Type, WT**) ποντικών [13,14]. Αυτό επιβεβαιώνει ότι η δραστηριότητα της ATX είναι η κύρια πηγή παραγωγής του LPA στο πλάσμα και ότι η σηματοδότηση του LPA είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη.

Υπάρχουν συμπληρωματικά μονοπάτια για την παραγωγή LPA που περιέχουν ακυλοτρανσφεράσες [15].

Τα προαναφερθέντα μονοπάτια παράγουν τόσο ενδοκυτταρικό όσο και εξωκυτταρικό LPA [15]. Το εξωκυτταρικό LPA παράγει σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων του [7,11] ενώ το ενδοκυτταρικό LPA χρησιμεύει ως ενδιάμεσο για την de novo βιοσύνθεση του συμπλόκου γλυκερολιπιδίων.[15]

Η πηγή του ιστικού LPA, που συμβάλλει στις σηματοδοτικές δεξαμενές, πιθανόν περιλαμβάνει και άλλα ένζυμα εκτός από την ATX [7].



Σχήμα 1.5: Μεταβολισμός του LPA. Δείχνεται η παραγωγή του LPA από τα PLs της μεμβράνης μέσω δύο κύριων μεταβολικών οδών. Υπάρχουν και άλλοι οδοί για την παραγωγή και την αποικοδόμηση του LPA. *Το 18:1-LPA είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο εργαστηριακό αντιδραστήριο για ενεργοποίηση των LPA υποδοχέων. ** Το 16: 0-LPA φέρεται να είναι το πιο άφθονο είδος στο ανθρώπινο πλάσμα [7].

Το LPA μπορεί να αποδομηθεί με την απελευθέρωση της φωσφορικής ομάδας, για την παραγωγή **μονοακυλογλυκερόλης (Monoacylglycerol, MAG)**, με την μεσολάβηση διαφόρων κατηγοριών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των **λιπιδικών φωσφορικών φωσφατασών (Lipid Phosphate Phosphatases, LPPs)** (που ονομάζονται επίσης φωσφουδρολάσες), της **ακυλοτρανσφεράσης LPA (LPA Acyltransferase, LPAAT)**, της **ακυλοτρανσφεράσης λεκιθίνης-χοληστερόλης (Lecithin-Cholesterol Acyltransferase, LCAT)**, και άλλων λιπιδικών ενζύμων [9,15,16]. Αναστολή της αποικοδόμησης στην οποία μεσολαβούν οι LPP(1-3) μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα LPA στον ιστό του εγκεφαλικού φλοιού [8].

Βιολογική δράση του LPA

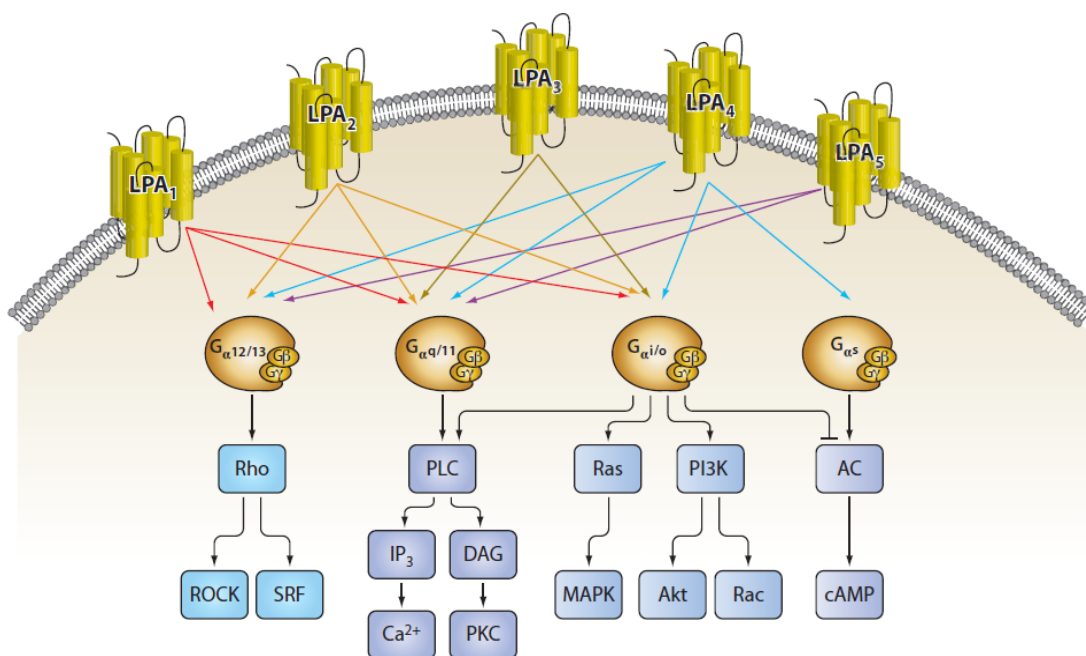
Η πρώτη γνωστή in vivo βιολογική λειτουργία, που αποδόθηκε στο LPA, ήταν η ρύθμιση της πίεσης του αίματος. Ενώ αυτό πιστευόταν ότι οφείλεται στο ρόλο του ως μεταβολικό ενδιάμεσο, έκτοτε ανακαλύφθηκε ότι οι περισσότερες βιολογικές λειτουργίες του LPA επιτυγχάνονται από την ειδική αλληλεπίδραση του με τους πέντε συγγενείς υποδοχείς του (LPA₁₋₅) [7]. Οι επιδράσεις του LPA στα κύτταρα εξαρτώνται από το ότι αυτά εκφράζουν στην επιφάνεια τους ειδικούς, για το LPA, GPCRs [11]. Επιπλέον, διαφορετικά κατάντη μονοπάτια σηματοδότησης συνδέονται σε κάθε υποδοχέα LPA, επιτρέποντας στον ίδιο υποδοχέα να μεσολαβήσει σε αντίθετες επιδράσεις σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων [17]. Το LPA είναι ένας βιοενεργός λιπιδικός μεσολαβητής που κατευθύνει πολλαπλές θεμελιώδεις βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που ρυθμίζουν την κυτταρική πορεία, όπως η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση, και εκείνων που ρυθμίζουν την κυτταρική κινητικότητα, όπως η επέκταση και η συστολή του κυτταροσκελετού ακτίνης [8,11,18].

1.1.4 Υποδοχείς του λυσοφωσφατιδικού οξέος (Lysophosphatidic Acid Receptors, LPARs): υπότυποι

Το 1996 ταυτοποιήθηκε ο πρώτος υψηλής συγγένειας, υποδοχέας κυτταρικής επιφάνειας για το LPA (LPA₁) [19]. Αυτό οδήγησε γρήγορα στον εντοπισμό δύο επιπλέον, στενά συσχετιζόμενων υποδοχέων (LPA₂ και LPA₃) και την μετέπειτα

ταυτοποίηση δύο, κάπως αποκλινόντων υποδοχέων (LPA₄ και LPA₅). Όλοι αυτοί οι πέντε υποδοχείς είναι τύπου I, παρόμοιοι με ροδοψίνη, συζευγμένοι με G πρωτεΐνη, που διαφέρουν ως προς την κατανομή τους στους ιστούς και τα μονοπάτια σηματοδότησης (Σχήμα 1.8) [7].

Λόγω αυτής της ετερογένειας των υποτύπων του υποδοχέα, των προτύπων έκφρασης, και των μονοπατιών τελεστή, οι επιδράσεις του LPA είναι ποικίλες και εκτεταμένες, ρυθμίζοντας πολλές βιολογικές διεργασίες. Πολύ πληροφορία σχετικά με αυτούς τους βιολογικούς ρόλους προήλθε από μελέτες γενετικής διαγραφής. Μέχρι σήμερα, ΚΟ ποντικοί έχουν αναφερθεί για τέσσερις από τους πέντε γνωστούς υποδοχείς (LPA₁₋₄), καθώς και για το βασικό ένζυμο παραγωγής του LPA, την ATX [20].



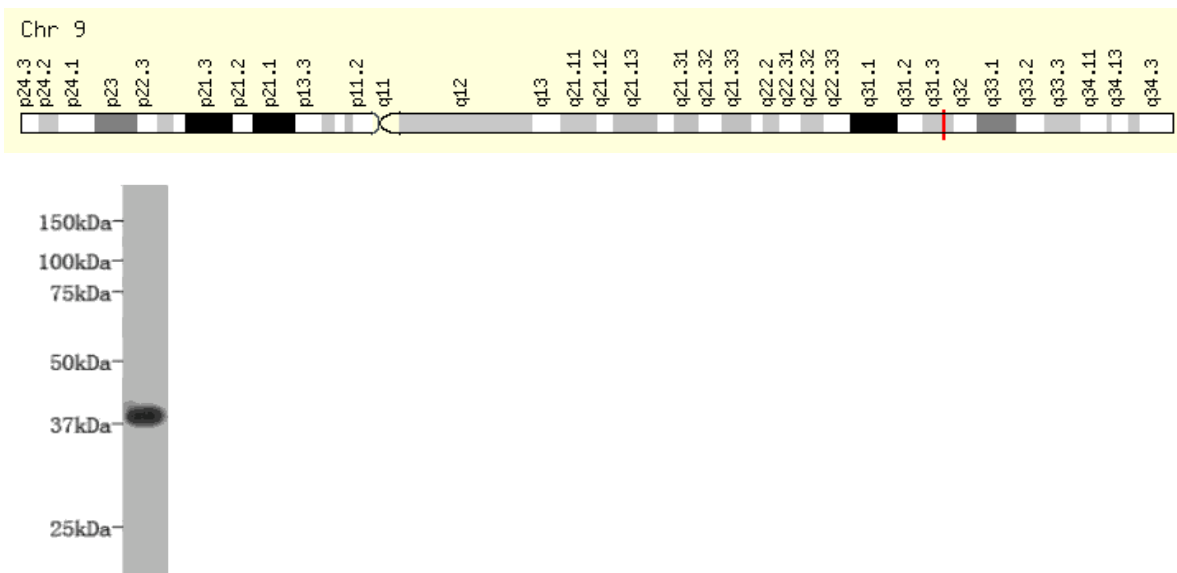
Σχήμα 1.6: Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τους πέντε επιβεβαιωμένους υποδοχείς του LPA. [7]

1.1.4.1 Ο υποδοχέας LPA₁

Το γονίδιο του υποδοχέα 1 του λυσοφωσφατικού οξέος (**Lysophosphatidic Acid Receptor 1, LPAR1**) ήταν το πρώτο που κλωνοποιήθηκε και ταυτοποιήθηκε [19] από έναν αυξανόμενο αριθμό γονιδίων, που κωδικοποιούν για LPA υποδοχείς, που περιλαμβάνει την οικογένεια γονιδίου ενδοθηλιακής διαφοροποίησης (**Endothelial**

differentiation gene, Edg) και τους πουρινεργικούς υποδοχείς [21]. Το αρχικό όνομα του LPAR1, ήταν **γονίδιο κοιλιακής ζώνης-1(Ventricular zone gene, Vzq-1)**, λόγω της εμπλουτισμένης έκφρασης του στο εμβρυϊκό νευροπολλαπλασιαστικό στρώμα του εγκεφαλικού φλοιού [19]. Επιπρόσθετα, οι πρώτοι υποδοχείς για το LPA αρχικά περιγράφηκαν ως Edgs, με το LPAR1 ως ένα από τα γονίδια άμεσης πρώιμης απόκρισης, που κλωνοποιήθηκε από τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας (HUVEC), και κωδικοποιεί έναν GPCR της οικογένειας ροδοψίνης [21].

Το γονίδιο LPAR1 των θηλαστικών (ανθρώπινη χρωμοσωμική θέση 9q31.3) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη περίπου 41-kDa, που αποτελείται από 364 αμινοξέα με 7 διαμεμβρανικές περιοχές. Στα ποντίκια (*Lpar1*), το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης κωδικοποιείται σε δύο από τα πέντε εξόνια, με ένα διατηρημένο ιντρόνιο (κοινό και στο *Lpar2* και στο *Lpar3*) που διακόπτει την διαμεμβρανική περιοχή 6 [7]. Μία παραλλαγή του *Lpar1* (*mrec1.3*) που έχει αναφερθεί, η οποία μπορεί να παράγεται με την εναλλακτική χρήση εξονίου ή ματίσματος, οδηγεί σε μια διαγραφή 18 αμινοξέων του N-τελικού άκρου [22]. Η βιολογική σημασία αυτής της παραλλαγής δεν έχει τεκμηριωθεί.



Σχήμα 1.7:(πάνω) θέση του γονιδίου LPAR1 στο ανθρώπινο χρωμόσωμα, (κάτω) ανάλυση Western blot σε ήπαρ ποντικού, με την χρήση anti-Lpar1 αντισώματος.

Figures taken from: (πάνω) <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LPAR1>, (κάτω) https://www.mylabsource.com/prods/Antibody/Polyclonal/LPA-receptor-1/Lpar1/datasheet.php?products_id=857126

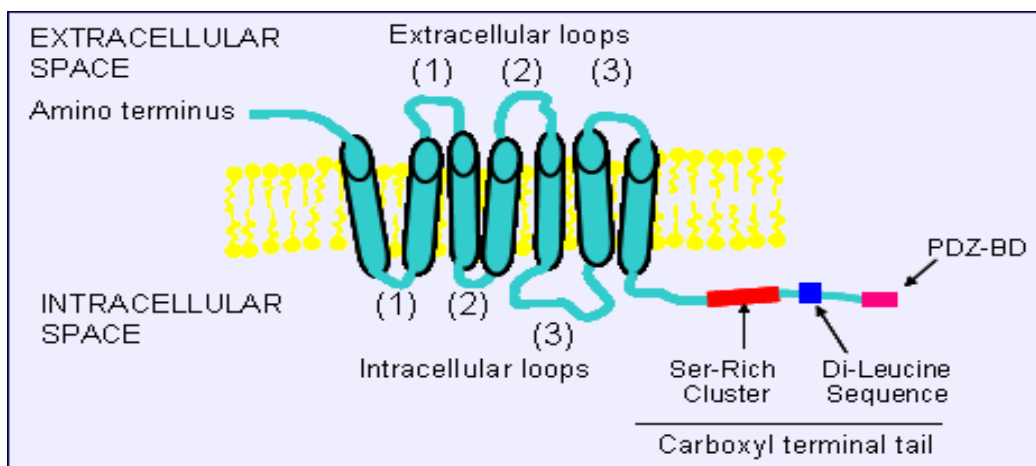
Περιγραφή του LPA₁

Ο LPA₁ είναι ένας GPCR, και όπως απαιτεί η λειτουργία των συζευγμένων με πρωτεΐνη, υποδοχέων να ενσωματώνονται στις μεμβράνες ώστε η δομή τους να είναι σωστή, έτσι και ο LPA₁ διασχίζει την πλασματική μεμβράνη επτά φορές. Έχει τρεις αριθμημένους εξωκυτταρικούς και ενδοκυτταρικούς βρόγχους που εμπλέκονται στην μεταγωγή σήματος. Τρεις περιοχές της καρβοξυτελικής ουράς έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντικές για την σηματοδότηση και την ρύθμιση του υποδοχέα. Ο LPA₁ περιέχει μια κανονική Τύπου 1 PDZ περιοχή πρόσδεσης (α.α. 362-364) στο καρβοξυτελικό άκρο. Αυτή η περιοχή έχει δείχθει ότι απαιτείται για τις, επαγόμενες από το LPA, διαδικασίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής ενεργοποίησης των GTP-ασων της οικογένειας Rho, μέσω PDZ-Rho παραγόντων ανταλλαγής νουκλεοτιδίου γουανίνης. Ανάντη της Τύπου 1 PDZ περιοχή πρόσδεσης, ο LPA₁ περιέχει μια αλληλουχία δι-λευκίνης (α.α. 351 και 352), η οποία απαιτείται για την, διεγερόμενη από εστέρα, εσωτερίκευση φορβόλης. Ακόμη πιο ανοδικά βρίσκεται ένα πλούσιο σε σερίνη σύμπλεγμα (α.α. 341-347) που απαιτείται για την ένωση βήτα-αρρεστίνης, η οποία είναι κρίσιμη για την εξασθένηση του σήματος και την ενδοκυττάρωση υποδοχέα (Σχήμα 1.8) [21].

Εντοπισμός του υποδοχέα LPA₁

Στη σταθερή κατάσταση ο LPA₁ βρίσκεται πάνω στη πλασματική μεμβράνη στην κυτταρική επιφάνεια, μέχρι να δεσμεύσει το LPA, το οποίο πυροδοτεί την εξαρτώμενη από δυναμίνη 2 και μεσολαβούμενη από κλαθρίνη, ενδοκύτωση μέσα στο κύτταρο. Ο LPA₁ απαιτεί μεμβρανική χοληστερίνη για σύνδεση με βήτα-αρρεστίνη, η οποία στοχεύει τον υποδοχέα στα επικαλυμμένα με κλαθρίνη κοιλώματα, για ενδοκύτωση. Επίσης, εκτός από το LPA, η ενδοκύτωση του LPA₁ επάγεται και από την διέγερση της πρωτεϊνικής κινάσης C από τον εστέρα φορβόλης, αλλά αυτή απαιτεί αντάπτορες AP-2 κλαθρίνης και όχι βήτα-αρρεστίνη. Ο LPA₁ εν συνεχεία ανακυκλώνει τα ενδοσώματα πριν ανακυκλωθεί πίσω στην επιφάνεια του κυττάρου ή αποδομηθεί στα λυσοσώματα [21].

Ο υποδοχέας μπορεί επίσης να εντοπίζεται στην πυρηνική μεμβράνη στο κύτταρο. Ορισμένα στοιχεία δείχνουν ότι ένα μέρος του συνολικού κυτταρικού LPA₁ εντοπίζεται στην πυρηνική μεμβράνη των PC12 κυττάρων, των ενδοθηλιακών μικρο-αγγειακών κυττάρων και των ανθρώπινων βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων. Η ακριβής λειτουργία αυτής της πυρηνικής δεξαμενής του LPA₁ δεν είναι γνωστή [21].



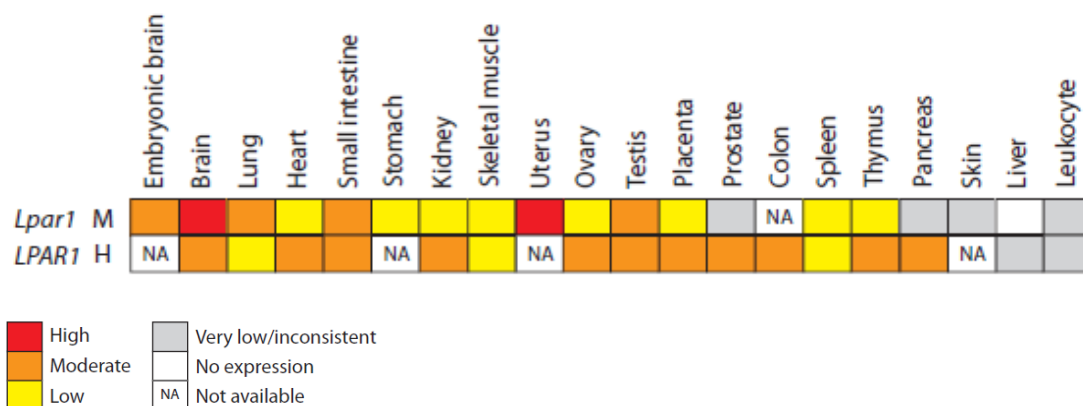
Σχήμα 1.8: Εικόνα του LPA₁, ενός υποδοχέα συζευγμένου με G πρωτεΐνη, που διαπερνά την πλασματική μεμβράνη επτά φορές. Ο υποδοχέας έχει τρεις αριθμημένους εξωκυτταρικούς και ενδοκυτταρικούς βρόγχους που εμπλέκονται στην μεταγωγή σήματος. Επίσης παρουσιάζονται το αμινοτελικό άκρο και η καρβοξυτελική ουρά. Τρεις περιοχές της καρβοξυτελικής ουράς έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντικές για την σηματοδότηση και την ρύθμιση του υποδοχέα LPA₁: (α) η PDZ περιοχή πρόσδεσης, (β) μια αλληλουχία δι-λευκίνης, (γ) ένα σύμπλεγμα πλουσιο σε σερίνες.

Figure taken from: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/LPAR1ID40405ch9q31.html>

Έκφραση του γονιδίου Lpar1/LPAR1

Ευρεία έκφραση του Lpar1 παρατηρείται σε ενήλικα ποντίκια, με σαφή παρουσία στον εγκέφαλο, στην μήτρα, στους όρχεις, στον πνεύμονα, στο λεπτό έντερο, στην καρδιά, στο στομάχι, στα νεφρά, στον σπλήνα, στον θύμο, στον πλακούντα, και στους σκελετικούς μύες [23]. Ο LPAR1 εκφράζεται, επίσης, ευρέως στους ανθρώπους [24]. Η έκφραση του Lpar1 είναι πιο χωρικά περιορισμένη κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, αλλά είναι εμπλουτισμένη στον εγκέφαλο [7].

Ειδικότερα, το αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα είναι ένας κύριος τόπος για την έκφραση του *Lpar1*, όπου ρυθμίζεται χωρικά και χρονικά [23,25]. Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, η έκφραση του ΚΝΣ περιορίζεται στην νεοφλοιική νευρογενή περιοχή, που ονομάζεται **κοιλιακή ζώνη (Ventricular Zone, VZ)** και επιφανειακά σε ένα στρώμα που περιλαμβάνει τις μήνιγγες [19]. Η VZ εξαφανίζεται στο τέλος της φλοιώδους νευρογένεσης, ακριβώς πριν από τη γέννηση, αλλά η έκφραση του *Lpar1* συνεχίζεται στον εγκέφαλο και μετά τη γέννηση, και είναι εμφανής σε κύτταρα που υπάρχουν στο εσωτερικό των αναπτυσσόμενων εκτάσεων λευκής ουσίας και συμπίπτει με την μυελίνωση. Ο *in situ* υβριδισμός αποκαλύπτει την έκφραση του *Lpar1* στα ολιγοδενδροκύτταρα και στα κύτταρα Schwann, στα μυελινωτικά κύτταρα του ΚΝΣ και του περιφερικού νευρικού συστήματος, αντίστοιχα [7].



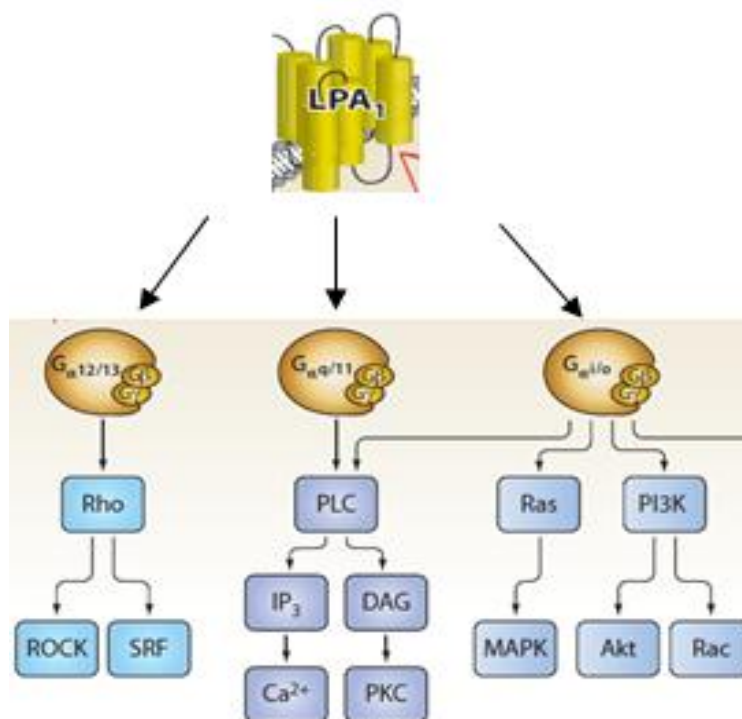
Σχήμα 1.9: έκφραση του γονιδίου του LPAR1. Αναφέρθηκαν πρότυπα έκφρασης του υποδοχέα σε διάφορους ιστούς σε ποντίκια (M) και σε ανθρώπους (H) με βάση συγκεντρωτικά στοιχεία από πολλαπλές δημοσιευμένες εργασίες συμπεριλαμβανομένων των αναλύσεων Northern, των real-time PCR, και των δεδομένων των μικροσυστοιχιών. [7]

Λειτουργία του LPA₁

Ο LPA₁ δεσμεύει το LPA και εκκινεί, εξαρτώμενους από G πρωτεΐνη, καταρράκτες μεταγωγής σήματος σε όλο το κύτταρο, που οδηγούν σε ένα αριθμό λειτουργικών αποτελεσμάτων, ανάλογα με τον συγκεκριμένο τύπο κυττάρου ή ιστού. Οι G πρωτεΐνες που εμπλέκονται είναι οι G_{ai/o}, G_{α11/q}, και G_{α12/13} [26].

Η ενεργοποίηση του LPA₁ επάγει μία σειρά κυτταρικών αποκρίσεων: τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, την κυτταρική μετανάστευση, κυτταροσκελετικές

αλλαγές -αλλαγή στην επαφή κυττάρου-κυττάρου μέσω της ενεργοποίησης του στοιχείου απόκρισης ορού, κινητοποίηση του Ca^{2+} , αναστολή της AC- και ενεργοποίηση της MAPK, της **φωσφολιπάσης C (Phospholipase C, PLC)**, και των μονοπατιών Akt, και Rho [23,25].



Σχήμα 1.10: Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από LPA1. [7]

Ένας ρόλος για τον LPA₁ στην νευρογένεση του εγκεφαλικού φλοιού προτάθηκε από το συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης του στην εμβρυϊκή κοιλιακή ζώνη, μια θέση όπου λαμβάνει χώρα ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η νευρογένεση [19]. Οι κυτταρικές σειρές που προέρχονται από την περιοχή αυτή ανταποκρίνονται στο LPA με μορφολογικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένων της συστολής νευρίτη/της στρογγυλοποίησης κυττάρου [19]. Επιπλέον, πρωτογενείς καλλιεργημένοι εμβρυϊκοί φλοιώδης νευροβλάστες ανταποκρίνονται στο LPA με ιοντική αγωγιμότητα και μορφολογικές αλλαγές. Αυτά τα αποτελέσματα εμπλέκουν την σηματοδότηση LPA, μέσω του LPA₁, στην κανονική βιολογία των φλοιώδων νευροβλαστών [28,62]. Μια δεύτερη λειτουργία για τον LPA₁ προτάθηκε από την έκφρασή του σε ολιγοδενδροκύτταρα του εγκεφάλου μετά την γέννηση και σε κύτταρα Schwann που

βρίσκονται σε περιφερικά νεύρα, όπως το ισχιακό νεύρο. Αυτά τα νευρογλοία είναι τα μυελινωτικά κύτταρα του νευρικού συστήματος. Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι το LPA ενήργησε ως παράγοντας επιβίωσης για καλλιιεργημένα κύτταρα Schwann, πιθανώς μέσω του υποδοχέα LPA₁ [63]. Μέσω του LPA που παράγεται από την ATX, ο LPAR1 μεσολαβεί στον νευροπαθητικό πόνο που προκαλείται από τραυματισμό νεύρου. Η ενεργοποίηση των λειτουργιών του LPAR1 στη φλεγμονώδη απόκριση, διεγείρει την πρόσληψη των μακροφάγων. Ο LPAR1 ρυθμίζει θετικά την κινητικότητα σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων, ασκώντας ένα κυρίαρχο σήμα απουσία του LPAR4 [21].

Για να εξεταστούν οι πραγματικές βιολογικές λειτουργίες της LPA₁/LPA σηματοδότησης σε υγιή ζώα, έχουν δημιουργηθεί ποντίκια με μια ομόζυγη ανενεργή μετάλλαξη του *Lpar1* και αναλύονται για ελαττώματα στην σηματοδότηση LPA και για αναπτυξιακές ανωμαλίες [62].

Η στοχευμένη διακοπή της έκφρασης του *Lpar1* σε ποντικούς αποκάλυψε μη αναμενόμενες *in vivo* λειτουργίες αυτού του υποδοχέα. Τα *Lpar1*^{-/-} ποντίκια παρουσιάζουν 50% περιγεννητικής θνησιμότητα σε ένα μικτό (C57BL/6Jx129) γενετικό υπόβαθρο και την περαιτέρω μείωση της επιβίωσης σε καθαρό (C57BL/6J ή Balb / cByJ) γενετικό υπόβαθρο (J. Chun, αδημοσίευτες παρατηρήσεις). Τα *Lpar1*^{-/-} ποντίκια έχουν ελλείψεις στην οσφρητική εξέλιξη, πράγμα που μειώνει την ικανότητά τους να εντοπίσουν τις θηλές της μητέρας και την κίνηση του θηλασμού, που απαιτούνται για την επιβίωση, και ίσως σε αυτό να οφείλεται η περιγεννητική θνησιμότητα. Οι επιζώντες είναι 10-15% μικρότεροι σε μέγεθος από ό, τι τα φυσιολογικά ποντίκια, έχουν μεικτές ανατομικές ανωμαλίες, που οφείλονται στην ανάπτυξη των οστών, συμπεριλαμβανομένων των κρανιοπροσωπικών δυσμορφισμών με υπερανάπτυξη των κοπτήρων -αμβλύ ρύγχος-, πράγμα που επηρεάζει την ικανότητα τους να τραφούν, πιο φαρδιά μάτια και αυξημένη απόπτωση στα ισχιακά νευρικά κύτταρα Schwann [27]. Μικρά κλάσματα *Lpar1*^{-/-} εμβρύων έχουν ανεγκεφαλία (~ 5%) ή μετωπική κεφαλική αιμορραγία (-2,5%).

Επιπλέον, κατά την επέκταση των αποικιών της αρχικής γραμμής [28], ένα υποστέλεχος *Lpar1*^{-/-} προέκυψε αυθόρμητα, το οποίο ονομάζεται παραλλαγή "Malaga" και παρουσιάζει πιο σοβαρές αναπτυξιακές ανωμαλίες του εγκεφάλου.

1.1.4.2 Ο υποδοχέας LPA₂

Το γονίδιο του **υποδοχέα 2 του LPA (LPA receptor 2, Lpar2)** εντοπίστηκε από αναζητήσεις γονιδίων GPCR στην GenBank, λόγω της κατά περίπου 60% αμινοξικής ομοιότητας του με το Lpar1. Στους ανθρώπους, το LPAR2 (χρωμοσωμικός τόπος 19p12) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που έχει μια προβλεπόμενη αλληλουχία 348 αμινοξικών καταλοίπων, αποδίδοντας μια υπολογισμένη μοριακή μάζα των ~39 kDa.

Το πρότυπο έκφρασης του Lpar2 είναι σχετικά περιορισμένο χωροχρονικά σε σύγκριση με εκείνο του Lpar1. Στον ποντικό, το Lpar2 έχει υψηλή έκφραση στους νεφρούς, στην μήτρα, και στους όρχεις, μέτρια έκφραση στον πνεύμονα και χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στο στομάχι, στην σπλήνα, στον θύμο, στον εγκέφαλο, και την καρδιά (Σχήμα 1.11). Το Lpar2 εκφράζεται επίσης στον εμβρυϊκό εγκέφαλο, αλλά μειώνεται μέσα σε μια εβδομάδα μετά από τη γέννηση. Στους ανθρώπινους ιστούς, υψηλή έκφραση του LPAR2 ανιχνεύεται στους όρχεις και στα λευκοκύτταρα, και μέτρια έκφραση στον προστάτη, στον σπλήνα, στον θύμο, και στο πάγκρεας (Σχήμα 1.11) . Στα καρκινικά κύτταρα, έχει αναφερθεί σε αρκετές περιπτώσεις η ανώμαλη έκφραση του LPAR2, προτείνοντας ένα ογκογενή ρόλο για τον LPA₂.

Ο LPA₂ ζευγαρώνει με τις G_{ai/o}, G_{α11/q}, και G_{α12/13}, της οικογένειας ετεροτριμερών G πρωτεϊνών (Σχήμα 1.6). Αυτές οι G πρωτεΐνες μεταφέρουν σήματα μέσω καθοδικών μορίων που περιλαμβάνουν την Ras, την MAPK, την PI3K, την Rac, την PLC, την DAG, και την Rho,. Ο LPA₂ είναι ένας καλόπιστος, υψηλής συγγένειας υποδοχέας για το LPA. Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης του LPA₂ γενικά συνδέεται με διεργασίες όπως η κυτταρική επιβίωση και η μετανάστευση κυττάρων. Κατά συνέπεια, η σηματοδότηση του LPA₂ έχει αναδειχθεί ως ένας πιθανός παράγοντας για μετάσταση καρκίνου.

Είναι ενδιαφέρον, ότι αρκετές αναφορές παρείχαν αποδείξεις για την αλληλεπίδραση της σηματοδότησης του LPA₂ με άλλες οδούς. Για παράδειγμα, ο LPA₂ προάγει την κυτταρική μετανάστευση μέσω αλληλεπιδράσεων με το εστιακό μόριο προσκόλλησης TRIP6 και με αρκετές πρωτεΐνες PDZ, και έχει επίσης αναφερθεί ότι πρωτεΐνες δακτύλου ψευδαργύρου αλληλεπιδρούν άμεσα με την καρβοξυτελική ουρά του LPA₂ . Επιπλέον, η μεσολαβούμενη από LPA₂ σηματοδότηση μπορεί να παρέχει ανασταλτικές

επιδράσεις στην επαγόμενη από επιδερμικό αυξητικό παράγοντα, μετανάστευση και εισβολή των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων μέσω του μονοπατιού $G_{\alpha 12/13}$ / Rho . Αυτές οι μελέτες παρέχουν ενδείξεις ότι η σηματοδότηση LPA_2 έχει διασταυρούμενη ρύθμιση μεταξύ των κλασικών καταρρακτών σηματοδότησης πρωτεΐνης G και άλλων μονοπατιών σηματοδότησης, για να ρυθμίσει την αποτελεσματικότητα και τη ειδικότητα της μεταγωγής σήματος.

Μελέτες ΚΟ ποντικού αποδεικνύουν ότι τα $Lpar2^{-/-}$ μεταλλαγμένα ζώα είναι βιώσιμα, χονδρικά φυσιολογικά, και γεννιούνται σε κανονικές, κατά Μέντελ, αναλογίες. Τα $Lpar1^{-/-}$ / $Lpar2^{-/-}$ μεταλλαγμένα ζώα, όμως, έχουν μια έξαρση των μετωπιαίων αιματωμάτων που υπάρχουν στα $Lpar1^{-/-}$ μεταλλαγμένα ζώα. Επιπλέον, πρωτογενείς ινοβλάστες και εμβρυϊκά φλοιώδη κύτταρα από τα ζώα που φέρουν την διπλή μετάλλαξη δείχνουν πολύ μειωμένες αποκρίσεις σε εξωγενές LPA.

1.1.4.3 Ο υποδοχέας LPA_3

Το γονίδιο του **υποδοχέα 3 του LPA (LPA receptor 3, $Lpar3$)** ανακαλύφθηκε ως γονίδιο GPCR χρησιμοποιώντας έρευνες ομολογίας. Το $LPAR3$ (ανθρώπινος χρωμοσωμικός τόπος 1p22.3-p31.1) κωδικοποιεί έναν ~ 40 kDa- GPCR που είναι κατά περίπου 50% ταυτόσημος με τους LPA_1 και LPA_2 του ποντικού, στην αλληλουχία των αμινοξέων [7].

Έκφραση του $LPAR3$ έχει παρατηρηθεί στην ανθρώπινη καρδιά, στους όρχεις, στον προστάτη, στο πάγκρεας, στους πνεύμονες, στις ωοθήκες, και στον εγκέφαλο, και στο ποντίκι ($Lpar1$) είναι πιο άφθονη στους όρχεις, στο νεφρό, στον πνεύμονα, στο λεπτό έντερο, στην καρδιά, στο στομάχι, στον σπλήνα, στον εγκέφαλο και στον θύμο (Σχήμα 1.11) [23]. Είναι ενδιαφέρον ότι στη μήτρα του ποντικού το mRNA του $Lpar3$ εκφράζεται αποκλειστικά στο επιθήλιο του αυλού του ενδομητρίου, στο παράθυρο της εμφύτευσης, και ότι η έκφραση του ρυθμίζεται από προγεστερόνη και οιστρογόνα [31].

Όπως ο LPA_1 και ο LPA_2 , έτσι και ο LPA_3 συζευγνύεται με τις $G_{ai/o}$ και G_{aq} , για να μεσολαβήσει στην ενεργοποίηση της, επαγόμενης από LPA, PLC, στην κινητοποίηση του Ca^{2+} , στην αναστολή και στην ενεργοποίηση της AC, και στην ενεργοποίηση της MAPK (Σχήμα 1.6) [30]. Ο LPA_3 δεν ανταποκρίνεται τόσο, όσο οι LPA_1 και LPA_2 , σε είδη

LPA με κορεσμένες ακυλικές αλυσίδες, αλλά έχει σχετικά υψηλή συγγένεια για το 2-ακυλο-LPA που περιέχει ακόρεστα λιπαρά οξέα [7].

Τα $Lpar3^{-/-}$ ποντίκια είναι βιώσιμα και χονδροειδώς φυσιολογικά, αλλά τα θηλυκά μεταλλαγμένα, δείχνουν έναν εντυπωσιακό φαινότυπο στο αναπαραγωγικό σύστημα. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι ο LPA_3 εκφράζεται στον μετωπιαίο φλοιό, τον ιππόκαμπο και την αμυγδαλή, δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα φαινότυποι που να σχετίζονται με την απώλεια του LPA_3 στο νευρικό σύστημα [7].

1.1.4.4 Ο υποδοχέας LPA_4

Ο LPA_4 βρέθηκε να είναι ένας ειδικός υποδοχέας για το LPA μέσω ελέγχου προσδέματος. Ο LPA_4 είναι δομικά διαφορετικός από τους κλασικούς LPA και S1P υποδοχείς, οι οποίοι μοιράζονται σημαντική ομολογία, και είναι πιο στενά συνδεδεμένος με τους P2Y πουρινεργικούς υποδοχείς. Ωστόσο δεν ανταποκρίνεται σε οποιαδήποτε νουκλεοτίδια ή νουκλεοσίδια. Στους ανθρώπους, το γονίδιο $LPAR4$ βρίσκεται στο χρωμόσωμα X (περιοχή q13-q21.1) και περιέχει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης 1113bp, άνευ ιντρονίων, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 370 αμινοξέων, με ένα υπολογισμένο μοριακό βάρος ~42 kDa. Ο LPA_4 έχει μια ειδική συγγένεια σύνδεσης με το 18: 1-LPA με μια τιμή K_d των 44,8 nM, αλλά όχι με άλλα PLs και συναφή λιπίδια όπως τα S1P και SPC. Ο LPA_4 προτιμά δομικά ανάλογα του LPA με σειρά κατάταξης: 18: 1-> 18: 0-> 16: 0-> 14: 0-> 1-αλκυλ-> 1-αλκενυλ-LPA [7].

Το γονίδιο του **υποδοχέα 4 του LPA (LPA Receptor 4, $LPAR4$)** εκφράζεται παντού και ειδικά άφθονα στην ωοθήκη. Στον ποντικό ο $Lpar4$ εκφράζεται στην καρδιά, στο δέρμα, στον θύμο, στην ωοθήκη, στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, και στους εμβρυϊκούς ινοβλάστες (Σχήμα 1.11) [7].

Στα κύτταρα που υπερεκφράζουν LPA_4 , το LPA προκαλεί μορφολογικές αλλαγές, όπως η κυτταρική στρογγυλοποίηση και ο σχηματισμός ινών στρες μέσω των $G_{\alpha_{12/13}}$ και Rho/Rho-κινάση μονοπατιών, όπως παρατηρείται και σε κύτταρα που εκφράζουν LPA_1 , LPA_2 , και LPA_5 . Το LPA επάγει την ενδοκυτταρική συσσώρευση **κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (Cyclic adenosine monophosphate, cAMP)** μέσω της G_{α_s} , και την κινητοποίηση Ca^{2+} μέσω των $G_{\alpha_q/11}$ και G_{α_i} . Αξίζει να σημειωθεί ότι, η

σύζευξη με την G_{as} δεν αναφέρεται για κλασικούς LPA υποδοχείς (Σχήμα 1.6). Πρόσφατα, έχουν αναφερθεί $LPA_4^{-/-}$ ποντίκια, αν και δεν παρουσιάζουν εμφανείς ανωμαλίες. Ωστόσο, ο LPA_4 έχει μια κατασταλτική επίδραση στην κυτταρική κινητικότητα. Με αυτό, πρώτον η έλλειψη του LPA_4 ενισχύει την μεταναστευτική απόκριση στο LPA στους ινοβλάστες και δεύτερον, η ετερόλογη έκφραση του LPA_4 καταστέλλει την, εξαρτώμενη από LPA_1 , μετανάστευση των B103 κυττάρων και την, επαγόμενη από το LPA, μετανάστευση και εισβολή των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου [7].

1.1.4.5 Ο υποδοχέας LPA_5

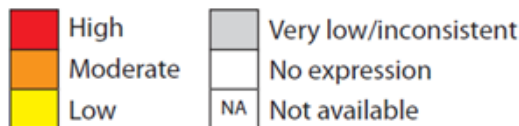
Ο LPA_5 ανήκει και αυτός στους GPCRs της οικογένειας ροδοψίνης και αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως υποδοχέας του LPA. Είναι διαφορετικός, δομικά, από τους LPA_1-3 και μοιράζεται 35% ομολογία με τον LPA_4 [7]. Το ανθρώπινο γονίδιο $Lpar5$ βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12p13.31 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ~41 kDa που αποτελείται από 372 αμινοξέα.

Το γονίδιο του **υποδοχέα 5 του LPA (LPA receptor 5, $Lpar5$)** εκφράζεται ευρέως σε ιστούς ποντικού όπως ο εμβρυονικός εγκέφαλος, το λεπτό έντερο, το δέρμα, ο σπλήνας, το στομάχι, ο θύμος, ο πνεύμονας, η καρδιά, το συκώτι, και τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Σχήμα 1.11) [7].

Το LPA προκαλεί νευρική συστολή και τον σχηματισμό ινών στρες στα κύτταρα που εκφράζουν LPA_5 , μέσω σύζευξης με την $G_{\alpha_{12/13}}$ και αυξάνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου με ενεργοποίηση της G_{α_q} . Επιπλέον, αυξάνει τα επίπεδα cAMP και την παραγωγή φωσφορικής ινοσιτόλης. Πρόσφατα, δύο άλλα μόρια που προέρχονται από λιπίδια, το πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο και η N-αραχιδογλυκίνη, χαρακτηρίστηκαν ως προσδέματα του LPA_5 . Το πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο ενεργοποιεί την μεσολαβούμενη από την $G_{\alpha_{q/11}}$ και G_{as} σηματοδότηση, ενώ η N-αραχιδογλυκίνη ενεργοποιεί μόνο την μεσολαβούμενη από $G_{\alpha_{q/11}}$ σηματοδότηση. Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες επιβεβαιώνουν ότι ο LPA_5 είναι ένας καλόπιστος υποδοχέας για το LPA, που μπορεί να ενεργοποιηθεί και με πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο, αλλά σε

πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το 18:1-LPA, αφήνοντας ανοικτό το ζήτημα της βιολογικής σημασίας αυτών των εναλλακτικών προσδεμάτων [7].

		Embryonic brain	Brain	Lung	Heart	Small intestine	Stomach	Kidney	Skeletal muscle	Uterus	Ovary	Testis	Placenta	Prostate	Colon	Spleen	Thymus	Pancreas	Skin	Liver	Leukocyte
<i>Lpar2</i>	M	High	Very low/inconsistent	Moderate	Very low/inconsistent	No expression	Low	High	No expression	High	NA	High	NA	NA	NA	Low	Low	NA	NA	No expression	NA
<i>LPAR2</i>	H	NA	No expression	No expression	No expression	No expression	NA	No expression	No expression	NA	No expression	High	No expression	Moderate	No expression	Moderate	Moderate	Moderate	NA	No expression	High
<i>Lpar3</i>	M	Very low/inconsistent	Low	High	Low	Moderate	Low	High	No expression	High	Very low/inconsistent	High	Low	NA	NA	Low	Low	NA	NA	No expression	NA
<i>LPAR3</i>	H	NA	Low	Moderate	High	No expression	No expression	No expression	No expression	NA	Moderate	High	Very low/inconsistent	High	Very low/inconsistent	No expression	No expression	High	NA	No expression	No expression
<i>Lpar4</i>	M	Low	No expression	No expression	Moderate	No expression	No expression	No expression	NA	Low	Moderate	No expression	NA	NA	NA	No expression	Very low/inconsistent	NA	Low	No expression	NA
<i>LPAR4</i>	H	NA	Low	No expression	Low	Low	NA	No expression	No expression	NA	High	Low	No expression	Low	Low	Low	Moderate	Moderate	NA	No expression	No expression
<i>Lpar5</i>	M	Very low/inconsistent	NA	Moderate	Moderate	High	Moderate	Low	No expression	Very low/inconsistent	NA	Low	NA	NA	Moderate	Moderate	Moderate	NA	Moderate	Moderate	NA
<i>LPAR5</i>	H	NA	NA	No expression	Moderate	Moderate	NA	No expression	No expression	NA	NA	NA	Moderate	No expression	Low	High	No expression	NA	NA	Low	No expression



Σχήμα 1.11: έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα του LPA. Πρότυπα έκφρασης των *Lpar2-5* σε διάφορους ιστούς σε ποντίκια (M) και ανθρώπους (H). [7]

1.1.5 Έκφραση των LPARs σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις

Αν και οι περισσότεροι LPARs εκφράζονται μόνο σε χαμηλά επίπεδα σε φυσιολογικούς ιστούς, η έκφραση τους είναι υψηλή σε ορισμένες καρκινικές οντότητες και η υπερέκφραση τους θεωρείται ότι έχει άμεσες επιδράσεις στην έναρξη του καρκίνου. Για παράδειγμα, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των LPARs (LPAR1-3) σε επιθηλιακά κύτταρα του μαστού, έχει βρεθεί ότι είναι επαρκή για να προκαλέσουν καρκίνο του μαστού σε ποντίκια, πράγμα το οποίο τονίζει το ογκογόνο δυναμικό τους όταν εκφράζονται με ασυντόνιστο τρόπο [32]. Ο μεσολαβούμενος από το LPA επιθετικός φαινότυπος των καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών, μπορεί να εξηγείται εν μέρει από την υψηλή έκφραση του LPAR1 και την επαγόμενη, από το LPA, έκφραση της περιουστίνης (γνωστός ειδικός παράγοντας οστεοβλαστών-2), ένα εκκριμένο μόριο

προσκόλλησης που μπορεί να προωθήσει τη μετανάστευση και την εισβολή του καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών, καθώς και την νεο-αγγειογένεση [34]. Αξίζει να σημειωθεί ότι το LPA μπορεί να παραχθεί όχι μόνο από τα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών, αλλά και από καλοήγη περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα, προωθώντας έτσι την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών, η οποία μπορεί να επηρεαστεί από την απελευθέρωση μιας **όξινης εκκρινόμενης και πλούσιας σε κυστεΐνη πρωτεΐνης (Secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC)** [35]. Η SPARC ρυθμίζει τις φιλο-επιθετικές επιδράσεις του LPA μέσω δύο μηχανισμών: πρώτον, με την αλλαγή των διαφορετικών οδών που περιλαμβάνουν σηματοδότηση ERK1 / 2 και IL-6, και δεύτερον, με μειορύθμιση του LPAR2 και αυξητική ρύθμιση του LPAR1 [35]. Στον καρκίνο του προστάτη και του θυρεοειδούς, το CD97 ετεροδιμερίζεται με διάφορους LPARs (LPAR1, -2 και -3), ενισχύοντας έτσι την επαγόμενη από LPA σηματοδότηση RHOA και την επακόλουθη εισβολή καρκινικών κυττάρων [36]. Σε αντίθεση με τα καρκινικά κύτταρα του μαστού, τα φυσιολογικά μαστικά επιθηλιακά κύτταρα δεν εμφανίζουν αυξημένη εισβολή κατά την κατεργασία με LPA.[37]Ωστόσο, έκτοπη έκφραση του LPAR1 σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές μαστικού ιστού, οδηγεί στην απόκτηση επεμβατικών δυνατοτήτων σε απόκριση με το LPA, η οποία μπορεί να αντιστραφεί με κατακύρωση της βήτα-αρρεστίνης [37]. Ωστόσο, αποδείχθηκε πρόσφατα ένας καταρράκτης σηματοδότησης ο οποίος διεγείρει την εισβολή και αρχίζει με την παραγωγή LPA από ATX, επακόλουθη ενεργοποίηση του LPAR1 και επαγωγή της **μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 (Metalloproteinase-9, MMP9)** μέσω της ενεργοποίησης των MAPK, p38 και PI3K [38]. Μεταξύ των παιδιατρικών κακοηθειών, ιδίως τα **νευροβλαστώματα (Neuroblastoma, NB)** εκφράζουν υψηλά επίπεδα LPAR1, ενώ τα σαρκώματα του Ewing εμφανίζουν υψηλή έκφραση LPAR4 (και σε μικρότερο βαθμό LPAR1), η οποία θα μπορούσε να συμβάλει στον επεμβατικό φαινότυπο.

Επιπλέον, έχει αναφερθεί ανώμαλη έκφραση και σηματοδότηση των LPARs, σε **γλοιοβλαστώματα (Glioblastoma, GBM)** και NB του ΚΝΣ [39,40]. Τα γονίδια LPAR1 και ENPP2 υπερεκφράζονται σε εξαιρετικά κακοήθες πολύμορφο GBM [41].

Υπάρχουν επίσης αυξανόμενες ενδείξεις ότι ο LPA_1 συμβάλλει στις φλεγμονώδεις ή καθοδηγούμενες από φλεγμονή ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων της αρθρίτιδας και

της **ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF)** [42]. Ο επαναλαμβανόμενος τραυματισμός του πνεύμονα και οι ανώμαλες αποκρίσεις για την επούλωση της πληγής, πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην παθογένεια της IPF [43]. Οι μεσολαβητές που κατευθύνουν αυτές τις παθολογικές αποκρίσεις δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί πλήρως. Έχει δειχθεί ότι το βιοδραστικό λιπίδιο LPA συμβάλλει στην ανάπτυξη της πνευμονικής ίνωσης, μετά από τραυματισμό του πνεύμονα, με την πρόσληψη ινοβλαστών και την αγγειακή διαρροή. Τα ποντίκια με ανεπάρκεια στον LPA₁ προστατεύονται δραματικά από την ίνωση και την θνησιμότητα που επάγονται από την μπλεομυκίνη [44]. Η απουσία του LPA₁ (Lpar1^{-/-}) οδήγησε σε μείωση της πρόσληψης ινοβλαστών και της αγγειακής διαρροής, δύο αποκρίσεις που μπορεί να είναι υπερβολικές όταν ο τραυματισμός οδηγεί σε ίνωση και όχι σε επισκευή, ενώ η στρατολόγηση λευκοκυττάρων διατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας μετά τον τραυματισμό [44]. Επίσης σε άτομα με IPF, τα επίπεδα LPA είναι αυξημένα στα δείγματα βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης και οι ινοβλάστες που ανακτώνται από αυτά τα δείγματα έχουν υψηλή έκφραση LPA₁. Η αναστολή του LPA₁ μειώνει σημαντικά τις αποκρίσεις των ινοβλαστών στην χημειοτακτική δραστηριότητα αυτών των δειγμάτων, υποδηλώνοντας ότι η σηματοδότηση του LPA μέσω του LPA₁ συμβάλλει στην υπερβολική συσσώρευση των ινοβλαστών που εμφανίζεται στους πνεύμονες των ασθενών με IPF [45].

Εκτός από την μεσολάβηση στην πρόσληψη ινοβλαστών και στην αγγειακή διαρροή, το LPA, όσον αφορά την επιβίωση των κυττάρων, έχει διάχυτες αλλά ποικίλες επιδράσεις, προωθώντας την επιβίωση ή απόπτωση πολλών διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Η υπερβολική απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα φαίνεται να παίζει κεντρικό ρόλο στην πνευμονική ινωδογένεση. Αυξημένοι αριθμοί αποπτωτικών κυττάρων παρατηρήθηκαν στο κυψελιδικό και βρογχικό επιθήλιο ασθενών με IPF [46]. Η επαγωγή της πνευμονικής επιθηλιακής κυτταρικής απόπτωσης σε ποντικούς με πνευμονική χορήγηση αντισώματος αντι-Fas ή διαγονιδιακή υπερέκφραση του **αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού βήτα (Transforming Growth Factor beta, TGF-β)**, έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη της ίνωσης, όπως και ο στοχεύμενος τραυματισμός των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων. Η επιθηλιακή κυτταρική απόπτωση είναι επίσης εξέχουσα στο μοντέλο της μπλεομυκίνης της πνευμονικής

ίνωσης, στο οποίο η ενδοτραχειακή πρόκληση οδηγεί στην ταχεία εμφάνιση της απόπτωσης βρογχικών και κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων. Αυτή η πρώιμη φάση της απόπτωσης υποχωρεί αλλά ακολουθείται από ένα δεύτερο κύμα απόπτωσης κατά τη δεύτερη εβδομάδα μετά την πρόκληση. Η πρώιμη φάση της απόπτωσης είναι σημαντικά εξασθενημένη κατά την απουσία έκφρασης του LPA₁, γεγονός που υποδηλώνει ότι η LPA σηματοδότηση μέσω του LPA₁ προάγει την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων [45].

Σε αντίθεση, η LPA σηματοδότηση μέσω του LPA₁, προωθεί την αντίσταση των **πρωτογενών ινοβλαστών του πνεύμονα (Primary Lung Fibroblasts, PMLFs)** ποντικού στην απόπτωση. Οι ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες φαίνονται να είναι ασυνήθιστα ανθεκτικοί στην απόπτωση στην IPF [47]. Εκτός από τις ικανότητες του LPA και του LPA₁ να προωθούν την πρόσληψη των ινοβλαστών και την αγγειακή διαρροή, η LPA-LPA₁ σηματοδότηση μπορεί επίσης να συμβάλει στην ανάπτυξη της πνευμονικής ίνωσης μετά από τραυματισμό των πνευμόνων, με την προώθηση της απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων αλλά την αντίσταση των ινοβλαστών στην απόπτωση [45].

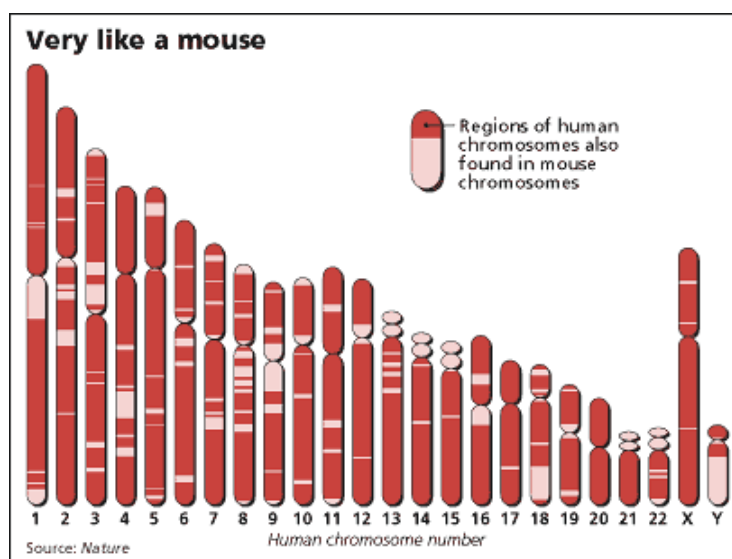
Η απώλεια αυτών των επιδράσεων της σηματοδότησης LPA-LPA₁ επί των επιθηλιακών κυττάρων καθώς και της απόπτωσης των ινοβλαστών, μπορεί επομένως να αντιπροσωπεύουν δύο πρόσθετους μηχανισμούς μέσω των οποίων οι Lpar1 KO ποντικοί προστατεύονται από την, επαγόμενη από μπλεομυκίνη, ίνωση [44].

Ως εκ τούτου, ο LPA₁ αντιπροσωπεύει ένα νέο θεραπευτικό στόχο για ασθένειες στις οποίες οι ανώμαλες αποκρίσεις στον τραυματισμό συμβάλουν στην ίνωση, όπως η IPF.

1.2 Γενετικές τροποποιήσεις

1.2.1 Το ποντίκι ως μοντέλο των θηλαστικών στην γενετική έρευνα

Κατά τη διάρκεια του περασμένου αιώνα, ο ποντικός έχει εξελιχθεί σε κορυφαίο πρότυπο σύστημα των θηλαστικών για την γενετική έρευνα [48]. Ο ποντικός έχει πολλές ομοιότητες με τον άνθρωπο από την άποψη της ανατομίας, της φυσιολογίας και της γενετικής [49]. Το γονιδίωμα του ποντικού είναι πολύ παρόμοιο με του ανθρώπου, καθιστώντας την γενετική έρευνα του ποντικού ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μελέτη των ανθρώπινων ασθενειών [49].



Εικόνα 1.12: Το γονιδίωμα του ποντικού και του ανθρώπου είναι πολύ παρόμοια. Το DNA τους είναι κατά 97.5% όμοια.

Figure taken from: <http://ephshonorsbioblogfoley.blogspot.gr/2014/12/mice-and-human-genome.html>

Οι ποντικοί που έχουν υποβληθεί σε γονιδιωματικούς χειρισμούς, μπορούν στη συνέχεια να υποβληθούν σε βιοϊατρικούς πειραματισμούς, οι οποίοι δεν είναι δυνατόν να εφαρμοστούν σε ανθρώπους ασθενείς [48]. Οι ποντικοί είναι μικροί σε μέγεθος και είναι οικονομικά αποτελεσματικοί, επειδή είναι φτηνοί και εύκολο να προσεχθούν. Οι ενήλικοι ποντικοί πολλαπλασιάζονται γρήγορα. Μπορούν να αναπαραχθούν κάθε τρεις εβδομάδες (ζευγαρώνουν την ημέρα που γεννούν), με αποτέλεσμα οι επιστήμονες να έχουν πολλά ποντίκια για να εργαστούν. Ο χρόνος μεταξύ της γέννησης ενός ποντικού και του να γεννήσει (χρόνος γενεάς) είναι μικρός, συνήθως γύρω στις 10 εβδομάδες.

Αυτό σημαίνει ότι πολλές γενιές μπορεί να παρατηρηθούν με τη μία. Ο ποντικός έχει μικρή διάρκεια ζωής (ένα έτος ποντικού ισούται με περίπου 30 ανθρώπινα χρόνια), το οποίο σημαίνει ότι οι επιστήμονες μπορούν να μελετήσουν εύκολα τις επιπτώσεις της γήρανσης. Είναι σχετικά εύκολο να χειριστεί το γονιδίωμα του ποντικού, για παράδειγμα προσθέτοντας ή αφαιρώντας ένα γονίδιο για την καλύτερη κατανόηση του ρόλου του στον οργανισμό. Αυτό παρέχει ένα ισχυρό εργαλείο για τη μοντελοποίηση συγκεκριμένων ασθενειών, όταν ένα μεταλλαγμένο γονίδιο είναι γνωστό ότι παίζει έναν ρόλο στην ασθένεια [49]. Παρά το γεγονός ότι οι ζυμομύκητες, τα σκουλήκια και οι μύγες είναι άριστα μοντέλα για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου και πολλών αναπτυξιακών διαδικασιών, οι ποντικοί είναι πολύ καλύτερα εργαλεία για την διερεύνηση του ανοσοποιητικού, του ενδοκρινικού, του νευρικού, του καρδιαγγειακού, του σκελετικού και άλλων πολύπλοκων φυσιολογικών συστημάτων που μοιράζονται τα θηλαστικά.[48] Όπως και οι άνθρωποι, οι ποντικοί αναπτύσσουν φυσικά τις ασθένειες που επηρεάζουν αυτά τα συστήματα, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, της αρτηριοσκλήρωσης, της υπέρτασης, του διαβήτη, της οστεοπόρωσης και του γλαυκώματος. Επιπλέον, ορισμένες ασθένειες που πλήττουν τον άνθρωπο, αλλά κανονικά δεν εμφανίζονται στα ποντίκια, όπως η κυστική ίνωση και η νόσος Alzheimer, μπορούν να προκληθούν με τον χειρισμό του γονιδιώματος του ποντικού [48]. Οι γενετικά τροποποιημένοι ποντικοί είναι επιρρεπείς σε διάφορους καρκίνους, σε καρδιακές παθήσεις, στην υπέρταση, στον διαβήτη, στην παχυσαρκία, την οστεοπόρωση, στο γλαύκωμα, στην τύφλωση και στην κώφωση, σε νευροπαθολογίες όπως Huntington ή νόσος του Lou Gehrig, και σε συμπεριφορικές διαταραχές συμπεριλαμβανομένου του άγχους και της κατάθλιψης [48]. Ποντικοί με διάφορες ανοσοανεπάρκειες (ποντικοί χωρίς ένα πλήρως λειτουργικό ανοσοποιητικό σύστημα) είναι ιδιαίτερα πολύτιμα για τη μελέτη της ανάπτυξης όγκου και μολυσματικών ασθενειών (πχ AIDS), και μπορούν να δράσουν ως ξενιστές για ανθρώπινους ιστούς και κύτταρα [50].

Ως επιστημονικό εργαλείο, οι ποντικοί έχουν βοηθήσει στο να επιταχυνθεί η πρόοδος της έρευνας και έχουν επιτρέψει την ανάπτυξη σημαντικών νέων φαρμάκων. Η γονιδιωματική αλληλουχία του ποντικού δημοσιεύθηκε τον Δεκέμβριο του 2002. Το γονιδίωμα του έχει μήκος περίπου 3.500 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων και περιέχει πάνω από 23.000 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες [49].

Κατά τη διάρκεια του περασμένου αιώνα, ο ποντικός *Mus musculus* έχει γίνει το προτιμώμενο μοντέλο θηλαστικών για την γενετική έρευνα [49]. Η τρέχουσα έφεση του ποντικιού ως μοντέλο για τις ανθρώπινες ασθένειες έχει τις ρίζες της στις ιστορικές επιλογές και τις πρωτοβουλίες αναπαραγωγής που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή απογόνων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Πολυάριθμες μεταλλάξεις δημιουργήθηκαν με έκθεση των ποντικών σε ακτινοβολία ή σε χημικές ουσίες που προκαλούν βλάβη στο DNA. Παρά το γεγονός ότι αυτές οι πρώιμες προσεγγίσεις είναι ταχείες και σχετικά ανέξοδες, εισήγαγαν πολλαπλές άγνωστες γονιδιωματικές αλλαγές που απαιτούν εκτεταμένες εργασίες παρακολούθησης για τον εντοπισμό και τον χαρακτηρισμό τους. Πιο πρόσφατα, οι ερευνητές έχουν δημιουργήσει ενιαίες στοχευμένες μεταλλάξεις, χρησιμοποιώντας μια σειρά καινοτόμων γενετικών τεχνολογιών, που παράγουν συγκεκριμένες γενετικές αλλαγές στα ποντίκια, ώστε να μιμηθούν τις ανθρώπινες γενετικές διαταραχές, προκειμένου να μελετηθεί η ανάπτυξή τους και να δοκιμαστούν νέες θεραπείες. Για παράδειγμα, διαγονιδιακοί ποντικοί, στους οποίους το γονίδιο που μας ενδιαφέρει εγχέεται με ένεση σε γονιμοποιημένο ωάριο ποντικού, παράγουν απογόνους με επιπλέον αντίγραφα του διαγονιδίου. Αυτό το διαγονίδιο είναι συχνά κατασκευασμένο να έχει ιστοειδική έκφραση ή η έκφραση του να επάγεται από ορισμένα φάρμακα. Εναλλακτικές μέθοδοι για μεταλλαξιγένεση στηρίζονται στον χειρισμό ESCs ποντικού. Προς το παρόν, χρησιμοποιείται ένας αριθμός στρατηγικών μεταλλαξιγένεσης που βασίζονται σε ES κύτταρα, οι οποίες χρησιμοποιούν ομόλογο ανασυνδυασμό για να μεταβάλλουν τα γονίδια στην αρχική τους θέση, παράγοντας είτε “knock out”, για να καταστείλουν τη λειτουργία του γονιδίου, είτε “knock in”, για να εισαγάγουν μια αλλαγμένη έκδοχή του γονιδίου. Η τεχνολογία “knock out” είναι εξαιρετικά ισχυρή και γενικά παράγει μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας, οι οποίες διαταράσσουν το νωρίτερο ρόλο ενός γονιδίου κατά την εμβρυογένεση, πράγμα το οποίο συχνά συγχέει την ανάλυση της δυσλειτουργίας του γονιδίου σε μεταγενέστερα στάδια της ανάπτυξης ή κατά την ενηλικίωση. Περαιτέρω βελτιώσεις σε αυτούς τους χειρισμούς περιλαμβάνουν την υπό όρους επαγωγή γονιδιωματικών αλλαγών. Με τη διασταύρωση ενός ποντικού που φέρει ένα γονίδιο ρεκομπινάσης με έναν ποντικό που φέρει το γονίδιο-στόχο, μια μετάλλαξη προκαλείται μέσω ανασυνδυασμού, με ένα χωρικά και χρονικά ελεγχόμενο τρόπο. Επειδή οι

περισσότερες κοινές ανθρώπινες ασθένειες αποκτήθηκαν αργότερα στη ζωή, η παραγωγή των νέων μοντέλων ποντικού για τις ανθρώπινες ασθένειες σήμερα, βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην τεχνολογία της υπό όρους μεταλλαξιγένεσης, η οποία οριοθετεί -μέσω ανασυνδυασμού με την δράση της ρεκομπινάσης- την μετάλλαξη γονιδίων σε συγκεκριμένους ιστούς ή σε ένα συγκεκριμένο στάδιο της ζωής [50].

Για την ανταπόκριση στην αυξανόμενη ζήτηση για τα υπό όρους μεταλλαγμένα μοντέλα, έχουν θεσπιστεί διεθνώς συντονισμένες πρωτοβουλίες για τη συστηματική δημιουργία μεταλλαγμένων ποντικών σε μία μεγάλη κλίμακα, χρησιμοποιώντας διάφορες στρατηγικές (Πίνακας 1.1).

Η πλειοψηφία αυτών των πρωτοβουλιών έχει δεσμευτεί να παράγει σειρές μεταλλαγμένων ES κυττάρων ποντικού, κάθε μια από τις οποίες φέρει ένα αλλαγμένο – ή “floxed”- αλληλόμορφο ενός συγκεκριμένου γονιδίου που φιλοξενεί θέσεις δράσης της ρεκομπινάσης Cre. Αυτά τα μεταλλαγμένα ES κύτταρα εισάγονται με τη χρήση ένεσης σε βλαστοκύστη, και παράγονται ποντικοί που φέρουν την μετάλλαξη, η οποία ενεργοποιείται με διασταύρωση με το επιθυμητό στέλεχος που εκφράζει ρεκομπινάση Cre [50].

Ως συμπληρωματική στρατηγική, η πρόοδος της γενετικής - όπου η παρατήρηση ενός φαινοτύπου ακολουθείται από την ταυτοποίηση του υπεύθυνου γενετικού τόπου - υπήρξε πολύτιμη για την ανακάλυψη νέων και απροσδόκητων σχέσεων γονιδιακής λειτουργίας. Όπως και στις πρώιμες στρατηγικές τυχαίας μεταλλαξιγένεσης, οι πιο πρόσφατες μέθοδοι για την ουδέτερη, τυχαία μετάλλαξη στον ποντικό βασίζονται στην ανίχνευση της αλλαγής της αλληλουχίας μετά την μετάλλαξη, η οποία έχει τώρα απλοποιηθεί, με την έλευση της κλωνοποίησης θέσης, τους **πολυμορφισμούς ενός μόνο νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)** και της υψηλής απόδοσης αλληλούχησης γονιδιώματος [50].

Πίνακας 1.1: Διεθνής γενετικές και γονιδιωματικές πρωτοβουλίες ποντικού [50].

	Consortium	Mission and aims	URL
EUCOMM	European Conditional Mouse Mutagenesis Programme	Genome-wide mouse mutagenesis	www.eucomm.org
KOMP	Knock-out Mouse Project	Genome-wide mouse mutagenesis	www.nih.gov/science/models/mouse/knock-out/
NorCOMM	North American Conditional Mouse Mutagenesis Programme	Genome-wide mouse mutagenesis	www.norcomm.org
IMMC	International Mouse Mutagenesis Consortium	Coordinating the worldwide efforts of mouse mutagenesis consortia (above)	http://www.informatics.jax.org/mgihome/other/phenoallele_commun_resource.shtml#pointer1
FIMRe	Federation of International Mouse Resources	Coordinating activities and setting standards for repositories worldwide	www.fimre.org
IMSR	International Mouse Strain Resource	One-stop shop for searching archives across the globe for mutants of interest	www.informatics.jax.org
EMMA	European Mouse Mutant Archive	European network of repositories, archiving and distributing mutants to genetic community	www.emmanet.org
EUMODIC	European Mouse Disease Clinic	Pilot network for large-scale systematic phenotyping of mouse mutants	www.eumodic.org
Collaborative Cross	Complex Trait Consortium	A large panel of recombinant inbred strains derived from a genetically diverse set of founder strains, designed specifically for complex trait analysis	http://www.complextait.org/

1.2.2 Διαγονιδιακές διαδικασίες

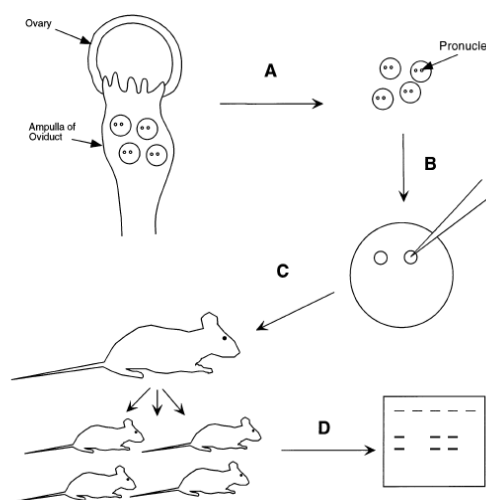
Οι ραγδαίες εξελίξεις και η αναβάθμιση των μελετών στην αλληλούχηση του DNA, κατά τη διάρκεια των τελευταίων 15 χρόνων, έχουν οδηγήσει στην πλήρη αλληλούχηση του γονιδιώματος δεκάδων ειδών. Η μεγάλη πρόκληση που αντιμετωπίζουν οι βιολόγοι σήμερα είναι η απόδοση τη λειτουργίας των χιλιάδων γονιδίων που ανακαλύφθηκαν μέσω αυτών των προσπαθειών. Η απάντηση σε αυτή την πρόκληση απαιτεί την περιγραφή των λειτουργιών του κάθε γονιδίου σε κανονική φυσιολογία και ανάπτυξη, καθώς επίσης και τη συμβολή των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων σε κληρονομικές ασθένειες. Μία ισχυρή προσέγγιση για να βοηθήσει στην αποκρυπτογράφηση των λειτουργιών των γονιδίων είναι η χειραγώγηση των γονιδίων σε άθικτα ζώα [52]. Αρκετές στρατηγικές μεταλλαξιγένεσης ευρείου γονιδιώματος έχουν εφαρμοστεί στον ποντικό, συμπεριλαμβανομένων της μεταλλαξιγένεσης **αιθυλ-νιτροζουρίας (N- Ethyl-N-Nitrosoyrea, ENU)**, της μεταλλαξιγένεσης τρανσποζονίου, της παγίδευσης γονιδίου και της στόχευσης γονιδίου [53].

Η δυνατότητα να εισάγεται ένα εξωγενές (ή ξένο) γονίδιο στο γονιδίωμα ποντικού με άμεση ένεση στον προπυρήνα του ζυγωτού επιτεύχθηκε μόλις πριν από δύο δεκαετίες. Ο όρος *διαγονιδιακό* αναφέρεται στους ποντικούς που έχουν παραχθεί χρησιμοποιώντας αυτήν την τεχνική και εκφράζουν εξωγενές DNA. Με αυτή την μέθοδο, το γονίδιο ενδιαφέροντος εισάγεται μέσα σε ένα τυχαίο τόπο στο γονιδίωμα του ποντικού, και εκφράζεται "σε trans", δηλαδή όχι στον συνήθη γενετικό του τόπο. Οι μέθοδοι που απαιτούνται για την εισαγωγή διαγονιδίων στο γονιδίωμα ποντικού έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα εκλεπτυσμένες, πράγμα που επιτρέπει την ευρεία χρήση τους. Από την ανάπτυξη αυτής της τεχνικής, πολλές χιλιάδες σειρές διαγονιδιακών ποντικών έχουν δημιουργηθεί, και αυτή ήταν η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική γενετικού χειρισμού σε ποντικούς [51].

Μέθοδοι παραγωγής διαγονιδιακών ποντικών

Οι τεχνικές για την παραγωγή διαγονιδιακών ποντικών περιλαμβάνουν την μικροέγχυση των DNA κατασκευασμάτων σε γονιμοποιημένα ωάρια ποντικού. Τα κατασκευάσματα DNA που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του διαγονιδιακών ποντικών, τυπικά

αποτελούνται από ένα γονίδιο ενδιαφέροντος, που βρίσκεται σε προσανατολισμό 3' ως προς τις αλληλουχίες υποκινητή, επιλεγμένο για να παράγει μια επιθυμητή διακοπή της γονιδιακής έκφρασης. Θραύσματα DNA, μέχρι 70 kb, έχουν επιτυχώς ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ποντικού, αν και το μέγιστο μήκος της αλληλουχίας DNA που μπορεί να ενσωματωθεί επιτυχώς δεν είναι γνωστό. Το διαγονίδιο είναι γραμμικοποιημένο και καθαρισμένο από αλληλουχίες προκαρυωτικού φορέα. Για την βέλτιστη απόδοση ενσωμάτωσης, περίπου 1-2 πικόλιτρα (pL) DNA, συγκέντρωσης 1-2 ng/μL (που αντιστοιχεί σε μερικές εκατοντάδες μόρια ενός θραύσματος DNA 5 kb) χορηγούνται με μικροένεση στον αρσενικό προπυρήνα ενός γονιμοποιημένου ωαρίου του ποντικού. Ο άμεσος ψεκασμός του DNA στον προπυρήνα, έχει ως αποτέλεσμα πολύ υψηλότερα ποσοστά ενσωμάτωσης των διαγονιδίων από άλλες γνωστές μεθόδους μετασχηματισμού. Μετά την μικροέγχυση, τα έμβρυα μεταφέρονται χειρουργικά στην σάλπιγγα ψευδοκυφορούντος ποντικού [51].



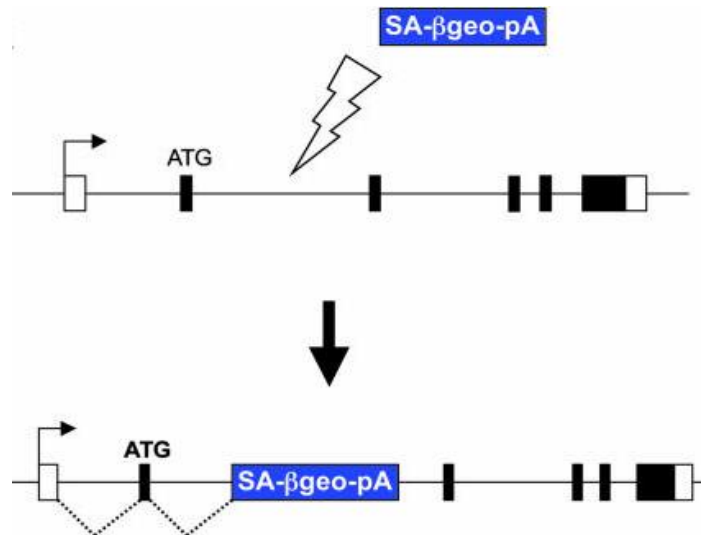
Σχήμα 1.13: Διαδικασία για την παραγωγή διαγονιδιακών ποντικών. A: Μονοκύτταρα γονιμοποιημένα ζυγωτά που βρίσκονται στην σάλπιγγα του έγκυος ποντικού-δότη, συλλέγονται χειρουργικά. B: Το DNA που κωδικοποιεί το γονίδιο ενδιαφέροντος μικροεγχέεται κατευθείαν στον προπυρήνα των ζυγών. C: Τα ζυγωτά μεταφέρονται χειρουργικά σε σάλπιγγες ψευδοκυφορούντων θηλυκών ποντικών. D: Το DNA από τους απογόνους μπορεί να αναλυθεί με Southern blot ή PCR για την παρουσία του διαγονιδίου [51].

Τα ψευδοκυφορούντα θηλυκά παράγονται από αναπαραγωγή με αρσενικά στα οποία έχει γίνει εκτομή του σπερματικού πόρου. Η πράξη της συνουσίας κινεί τις ενδοκρινείς

αλλαγές της εγκυμοσύνης, παρέχοντας ένα κατάλληλο περιβάλλον στην μήτρα, για την επιβίωση και την εμφύτευση των μεταφερόμενων εμβρύων. Οι ανάδοχες μητέρες γεννούν 19-21 ημέρες μετά τη μεταφορά στην σάλπιγγα. Για προσδιορισμό του γονότυπου, το DNA συνήθως απομονώνεται από βιοψίες ουράς ποντικού και ελέγχεται για την παρουσία του διαγονιδίου με Southern blot ή με **αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)**. Τυπικά, περίπου το 20%-40% των ποντικών που αναπτύσσονται διαθέτουν το διαγονίδιο. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η ενσωμάτωση του διαγονιδίου συμβαίνει κατά το στάδιο του ενός κυττάρου, έτσι ώστε το διαγονίδιο να είναι παρόν σε κάθε κύτταρο του διαγονιδιακού ποντικού. Η ενσωμάτωση συνήθως συμβαίνει σε μια τυχαία χρωμοσωμική θέση, και, για λόγους που δεν είναι πλήρως κατανοητοί, συνήθως πολλαπλά αντίγραφα του διαγονιδίου έχουν εισαχθεί ως αλυσομερή από το κεφάλι έως την ουρά. Τα ποντίκια που εντοπίζονται να κατέχουν το ενσωματωμένο διαγονίδιο αναφέρονται ως *ιδρυτές*. Οι ιδρυτές χρησιμοποιούνται συνήθως σε μια στρατηγική αναπαραγωγής για να παράγουν ζώα που είναι ομόζυγα για την εισαγωγή του διαγονιδίου [51].

1.2.3 Γονιδιακή παγίδευση

Η παγίδευση γονιδίου, βασίζεται στην διακοπή ενός γονιδιωματικού τόπου από την τυχαία ενσωμάτωση ενός γονιδίου αναφοράς που δεν έχει υποκινητή [54], όπως το γονίδιο βgeo. Το βgeo είναι ένα γονίδιο που αποτελείται από το γονίδιο LacZ της E.coli, στο αμινοτελικό άκρο και από το γονίδιο της φωσφοτρανσφεράσης νεομυκίνης (Neo) στο καρβοξυ-τελικό άκρο. Το βgeo κωδικοποιεί μία συντηγμένη πρωτεΐνη με τις δραστηριότητες και της βακτηριακής β-γαλακτοσιδάσης και της φωσφοτρανσφεράσης νεομυκίνης. Κύτταρα με μεταλλάξεις γονιδίου-παγίδα είναι ανθεκτικά στο φάρμακο G418, λόγω της έκφρασης της νεομυκίνης, ενώ το γονίδιο LacZ παρέχει, μια ένδειξη του προτύπου έκφρασης του διακοπτόμενου γονιδίου. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι φορείς περιέχουν ένα **δέκτη ματίσματος (Acceptor splicing site, SA)** από την αλληλουχία engrailed, ακολουθούμενη από μια **εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου (Internal Ribosome Entry Site, IRES)** του ιού της εγκεφαλομυοκαρδίτιδας, ανάντη του β-geo και ένα **σήμα πολυαδενυλίωσης του ιού του πιθήκου (Simian virus 40 PolyA, SV40 PA)** κατάντη του γονιδίου αναφοράς [54,67].



Σχήμα 1.14: Η γονιδιακή παγίδευση εξαρτάται από τυχαίες ενθέσεις ενός γονιδίου αναφοράς που δεν έχει υποκινητή, όπως το βgeo, και είναι εξοπλισμένο με SA και pA. Το γονίδιο αναφοράς ενεργοποιείται μετά από ενθέσεις σε εσώνια εκφρασμένων γονιδίων για την παραγωγή ενός mRNA σύντηξης που μπορεί να χαρακτηριστεί από 5 'RACE.[55]

Το γονίδιο αναφοράς ενεργοποιείται κατά την εισαγωγή στα ιντρόνια των εκφραζόμενων γονιδίων για να παράγει ένα mRNA σύντηξης, που μπορεί να χαρακτηριστεί με στρατηγικές που βασίζονται σε PCR, όπως η 5'RACE (5' end Rapid amplification of cDNA ends-PCR) [55]. Η παγίδευση γονιδίου έχει αποκτήσει εξέχουσα θέση κατά τα τελευταία χρόνια ως μια μέθοδος υψηλής απόδοσης για την απομόνωση των τυχαίων μεταλλάξεων παρεμβολής σε ES κύτταρα. Αυτές οι πηγές ES κυττάρων μπορούν να αρχειοθετηθούν επ 'αόριστον και να διανέμονται εύκολα στην επιστημονική κοινότητα για το σκοπό της δημιουργίας "knockout" ποντικών. Ωστόσο, αλληλόμορφα του γονιδίου-παγίδα δεν μπορούν να κατασκευαστούν με ακρίβεια οπότε η στρατηγική αυτή ευνοεί τα γονίδια που εκφράζονται στα ES κύτταρα του ποντικού [53].

1.2.4 Διαδικασίες γονιδιακής στόχευσης

Δεδομένων των περιορισμών της παγίδευσης γονιδίου, η εφαρμογή της γονιδιακής στόχευσης ως προσέγγιση δημιουργίας μεταλλάξεων έχει αποδειχθεί ανεκτίμητη για τους ερευνητές, εξετάζοντας τους ρόλους των γονιδιακών προϊόντων σε πολύπλοκες βιολογικές διεργασίες εντός καλλιεργημένων προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών

κυττάρων. Πρόσφατα έχει γίνει δυνατή η εφαρμογή αυτής της προσέγγισης σε ένα θηλαστικό σύστημα. Οι διαδικασίες στόχευσης γονιδίων επιτρέπουν, την ακριβή (τοπο-ειδική) εισαγωγή μεταλλάξης σε ένα από τα περίπου 100.000 γονίδια του ποντικού. Τυπικά, οι μεταλλάξεις έχουν σχεδιαστεί για την εξάλειψη της γονιδιακής λειτουργίας, με αποτέλεσμα την παραγωγή των ΚΟ ή "ανενεργών μεταλλαγμένων" ποντικών. Έχει επίσης επιτευχθεί η εισαγωγή μεταλλάξεων που παράγουν περισσότερο ανεπαίσθητες μεταβολές στη λειτουργία του γονιδίου [51].

Η τεχνολογία έλλειψης γονιδίου (gene-knockout) ή στόχευσης γονιδίου (gene-targeting) προέκυψε από τον διορατικό συνδυασμό δύο ανεξάρτητα προερχόμενων τεχνικών: την καλλιέργεια πολυδύναμων ES κυττάρων από έμβρυα ποντικού, και την εισαγωγή μεταλλάξεων, από σημειακές μεταλλάξεις μέχρι μεγάλες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις [53], σε κύτταρα θηλαστικών με ομόλογο ανασυνδυασμό [56].

Η συνειδητοποίηση ότι τα γονίδια ενδιαφέροντος μπορούν να τροποποιηθούν ειδικά σε ένα ολόκληρο ποντίκι, αναπτύχθηκε από εκτεταμένες εργασίες για να προσδιοριστεί αν σε καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών μπορεί να μεσολαβήσει ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ του ενδογενούς DNA τους και των εξωγενώς προστεθέντων μορίων DNA. Ταυτόχρονα, τα ES κύτταρα ποντικού καλλιεργήθηκαν με επιτυχία in vitro, χωρίς να χάσουν το πολυδύναμο δυναμικό τους. Έτσι, όταν εισάγονται σε ένα προεμφυτευτικό έμβρυο θα μπορούσαν να συμβάλουν στην βλαστική σειρά. Τα ES κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως οχήματα για τη μεταφορά τοποειδικών γενετικών τροποποιήσεων ενδιαφέροντος στην βλαστική σειρά ποντικού [57].

Εμβρυϊκά βλαστικά (ES) κύτταρα για γενετικούς πόρους ποντικού.

Τα ES κύτταρα προέρχονται από την πολυδύναμη **εσωτερική κυτταρική μάζα (Inner Cell Mass, ICM)** της βλαστοκύστης, μια δομή που σχηματίζεται στο αρχικό στάδιο της εμβρυογένεσης (3.5 ημέρες πριν από την εμφύτευση του εμβρύου ποντικού), και έτσι μπορούν να συμβάλουν σε όλους τους εμβρυϊκούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων και των γεννητικών κυττάρων, κατά την ανάπτυξη των ποντικών. Τα απομονωμένα ES κύτταρα πρέπει να καλλιεργούνται σε ειδικές συνθήκες καλλιέργειας για να διατηρείται η

πολλαπλασιαστική τους ικανότητα (αυτο-ανανέωση), χωρίς απώλεια της πολυδυναμίας τους [57].

Αρκετές υπάρχοντες ES κυτταρικές σειρές είναι σε κοινή χρήση. Αρχικά, τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα ES κύτταρα προήλθαν από το στέλεχος 129 ποντικού [57]. Οι ES κυτταρικές σειρές 129 χρησιμοποιούνται συχνά λόγω της πιο ισχυρής απόδοση τους σε κυτταρική καλλιέργεια και τα υψηλότερα ποσοστά μετάδοσης βλαστικής σειράς σε σύγκριση με ES κυτταρικές σειρές από τα στελέχη C57BL/6J και C57BL/6N [57]. Το C57BL/6 στέλεχος ποντικού, όμως, είναι ένα από τα καλύτερα χαρακτηρισμένα αμιγή στελέχη, που είναι ευρέως αποδεκτό ως το στέλεχος αναφοράς για ανοσολογικές, νευροβιολογικές, συμπεριφορικές και φυσιολογικές μελέτες σε ποντίκια, και είναι η πρότυπη βιβλιοθήκη αναφοράς για το πρόγραμμα αλληλούχισης-γονιδιώματος του ποντικού [57,58]. Ως εκ τούτου, οι ποντικοί που προέρχονται από τις 129 ES κυτταρικές σειρές πρέπει να αναδιασταυρωθούν για 10 ή περισσότερες γενεές σε C57BL/6 υπόβαθρο, το οποίο είναι μια χρονοβόρα διαδικασία, λαμβάνοντας δύο ή περισσότερα έτη [57]. Οι C57BL/6 ES κυτταρικές σειρές έχουν δημιουργηθεί με αποδοτικό αποικισμό βλαστικής σειράς και διευκολύνουν την άμεση παραγωγή γενετικά τροποποιημένων C57BL/6 ποντικών [57,58]. Η απαίτηση για διασταύρωση ποντικών που προέρχονται από C57BL/6-παραγόμενα ES κύτταρα είναι σημαντικά μικρότερη, αν και όχι εντελώς εξαλειμμένη καθώς τα ES κύτταρα ενδέχεται να φέρουν μεταλλάξεις που αποκτήθηκαν *in vitro*.

Οι ES κυτταρικές σειρές που προέρχονται από C57BL/6 ποντίκια περιλαμβάνουν τις: Bruce4, BL / 6-III, LK1 και JM8 [58]. Οι κυτταρικές σειρές JM8 έχουν χρησιμοποιηθεί για ευρείας κλίμακας προγράμματα ΚΟ ποντικού, για τη δημιουργία ποντικών με στοχευμένες μεταλλάξεις στο C57BL/6 γενετικό υπόβαθρο [58]. Τα JM8 κύτταρα μπορούν εύκολα να πολλαπλασιάζονται, χρησιμοποιώντας πρότυπες συνθήκες καλλιέργειας ES, παρουσία και απουσία τροφοδοτικών κυττάρων. Επιπλέον, για την απλοποίηση των συστημάτων αναπαραγωγής, το κυρίαρχο γονίδιο για το καφέ (*agouti*) χρώμα του τριχώματος αποκαταστάθηκε στα κύτταρα JM8 με στοχευμένη επισκευή της C57BL/6 *non-agouti* μετάλλαξης που επιτρέπει την οπτική εκτίμηση της συνεισφοράς του χρώματος του τριχώματος και της μεταβίβασης της βλαστικής γραμμής [58].

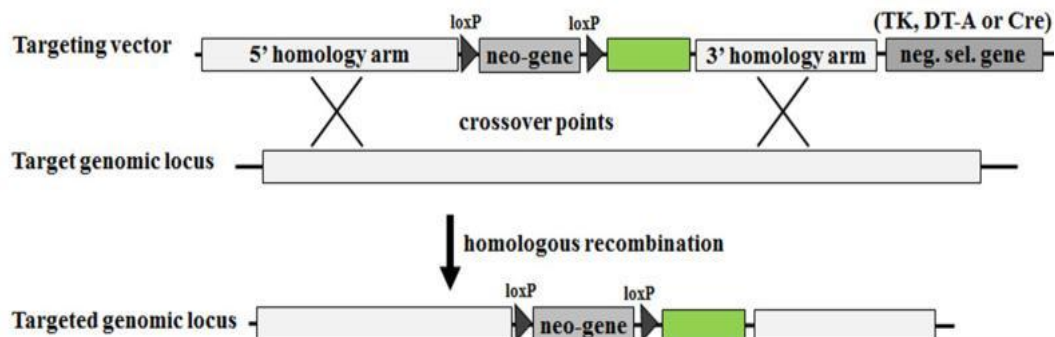
Εισαγωγή μεταλλάξεων στο γονίδιο ενδιαφέροντος

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι ο ανασυνδυασμός μιας κατασκευασμένης εκδοχής ενός γονιδίου στον φυσιολογικό της τόπο σε ένα γονιδίωμα, σε αντίθεση με την τυχαία ενσωμάτωση. Η χρήση των «βραχιόνων» του DNA που είναι ομόλογοι με τις περιοχές που περιβάλλουν το γονίδιο ενδιαφέροντος, διευκολύνει την προτιμητέα εισαγωγή των γενετικώς τροποποιημένων φορέων στόχευσης μέσα στο επιθυμητό τόπο [56].

Η γονιδιακή στόχευση επιτυγχάνεται μέσω της εισαγωγής ενός φορέα στόχευσης στα ES κύτταρα με ηλεκτροδιάτρηση [51].

Ένας φορέας στόχευσης (μόρφωμα DNA) τυπικά αποτελείται από μία γονιδιακή αλληλουχία στόχο, μέσα στην οποία έχει κατασκευαστεί μια μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας [51]. Οι τρεις βασικές μονάδες του είναι: (i) ένας 5' ομόλογος βραχίονας, (ii) ένας 3' ομόλογος βραχίονας (iii) μια ακολουθία, η οποία αντικαθιστά ένα τμήμα του εξωνίου που κωδικοποιεί πρωτεΐνη και προσδίδει αντίσταση στο φάρμακο G418 [51,57]. Αυτή η μετάλλαξη εξυπηρετεί δύο σκοπούς: (α) την απενεργοποίηση του γονιδιακού προϊόντος, και (β) παρέχει ένα θετικό δείκτη που επιτρέπει την επιλογή των κυττάρων που έχουν ενσωματώσει το κατασκεύασμα [51]. Αυτό το εξωγενές θραύσμα DNA πλαισιώνεται από τις περιοχές DNA που είναι ομόλογες προς το φυσικό γονίδιο [51]. Γειτονικό σε μία από αυτές τις ομόλογες περιοχές είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την κινάση της θυμιδίνης. Κατά τη διάρκεια του ομόλογου ανασυνδυασμού περιοχές του κατασκευάσματος που δεν πλαισιώνονται από ομόλογες, προς το φυσικό γονίδιο, αλληλουχίες, αποκλείονται από το γεγονός ενσωμάτωσης. Ως εκ τούτου, οι ομόλογοι ανασυνδυασμένοι κλώνοι δεν θα περιέχουν το γονίδιο της κινάσης της θυμιδίνης (Σχήμα 1.15) [51].

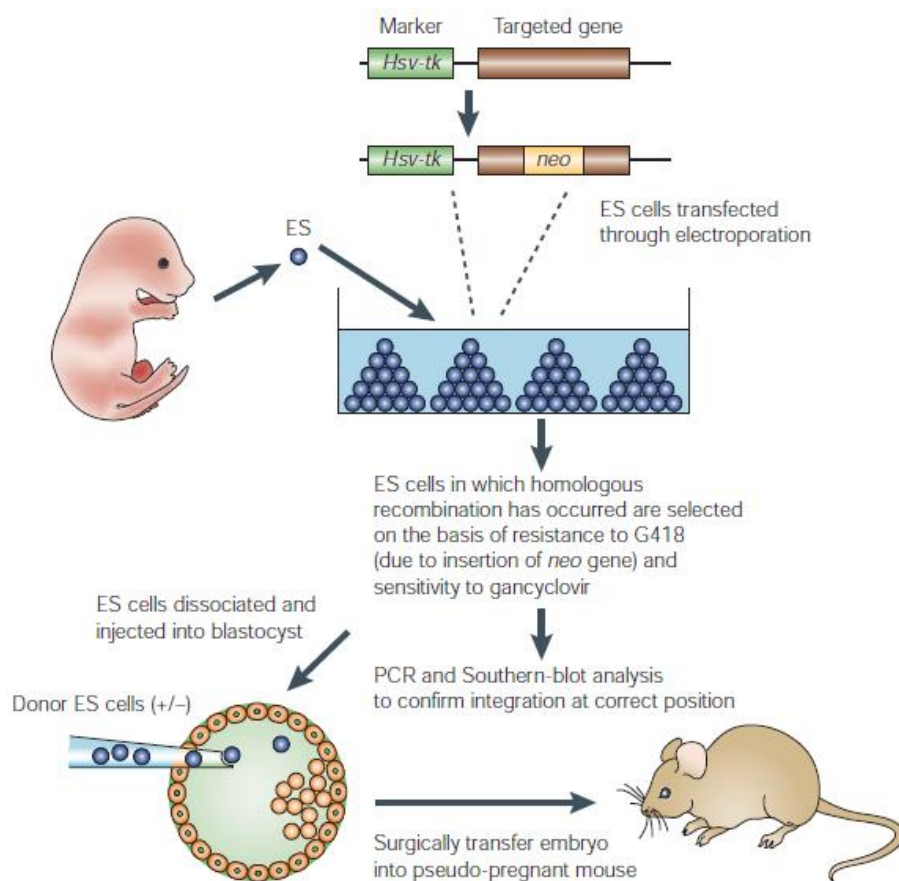
Ο επιμολυσμένος φορέας στόχευσης μπορεί είτε να εισαχθεί ο ίδιος τυχαίως στο γονιδίωμα ή να ενσωματωθεί με ομόλογο ανασυνδυασμό, όπως καθορίζεται από την ομολογία των 5' και 3' βραχιόνων του [57].



Σχήμα 1.15: Φορέας στόχευσης. Ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ του φορέα και της συγγενούς χρωμοσωμικής περιοχής-στόχου [51].

Όσον αφορά την κλασική προσέγγιση της γονιδιακής στόχευσης σε ES κύτταρα, η οποία απεικονίζεται και παρακάτω (Σχήμα 1.16), το γενετικό κατασκευάσμα εισαγωγής που περιέχει το γονίδιο στόχο διακόπτεται με το γονίδιο neo. Το γονίδιο HSV-tk κινάσης θυμιδίνης βρίσκεται έξω από το γονίδιο στόχο. Καλλιεργημένα ES κύτταρα διαμολύνονται μέσω ηλεκτροπόρωσης με το κατασκευάσμα. Σε αυτό το στάδιο, τα κύτταρα υποβάλλονται σε ένα ηλεκτρικό ρεύμα που διευκολύνει την εσωτερικοποίηση του κατασκευάσματος DNA. Αυτά τα κύτταρα που δεν ενσωμάτωσαν το στοχευμένο κατασκευάσμα θανατώνονται με την προσθήκη G418 στο μέσο καλλιέργειας – διότι δεν περιέχουν την κασέτα neo, η οποία προσδίδει ανθεκτικότητα στο φάρμακο (θετική επιλογή). Η πλειοψηφία των υπόλοιπων κυττάρων έχει ενσωματώσει όλο το DNA κατασκευάσμα, συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου της κινάσης της θυμιδίνης του ιού του απλού έρπητα, σε τυχαίες θέσεις σε όλο το γονιδίωμα. Το ιϊκό γονίδιο φωσφορυλιώνει το νουκλεοτιδικό ανάλογο ganciclovir στη μονοφωσφορική του μορφή, και κυτταρικές κινάσες καταλύουν την μετατροπή του στην τριφωσφορική, η οποία αναστέλλει τον κυτταρικό διπλασιασμό του DNA στα ES κύτταρα. Έτσι, η κατεργασία με γανκυκλοβίρη είναι κυτταροτοξική και σκοτώνει τα προϊόντα μη-ομόλογου ανασυνδυασμού που φέρουν το γονίδιο HSV-tk (αρνητική επιλογή). Με PCR και ανάλυση Southern-Blot επιβεβαιώνεται η ενσωμάτωση στην σωστή θέση. Οι ομόλογα ανασυνδυασμένοι κλώνοι, οι οποίοι είναι ετερόζυγοι για την εισαχθείσα μετάλλαξη, στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία χιμαιρικών ποντικών [51,56]. Μετά την απομόνωση των ομόλογα ανασυνδυασμένων ES κυτταρικών κλώνων, αυτά τα κύτταρα

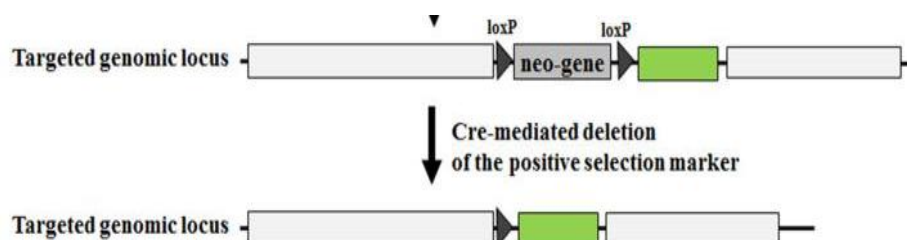
εισάγονται με μικροένεση μέσα στην γεμάτη υγρό βλαστική κοιλότητα των 3,5-ημερών εμβρύων, που βρίσκονται στο στάδιο της βλαστοκύστης. Τα έμβρυα αυτά στη συνέχεια μεταφέρονται χειρουργικά στη μήτρα ψευδοκυοφορούντων θηλυκών. Αυτά τα ζώα τότε θα γεννήσουν χιμαιρικά ποντίκια, τα οποία φέρουν γενετικό υλικό και από τα ενέσιμα ES κύτταρα και από το έμβρυο υποδοχής [51].



Σχήμα 1.16: Κλασική προσέγγιση της γονιδιακής στόχευσης σε ES κύτταρα [56].

Εάν το γονίδιο δείκτης θετικής επιλογής περιστοιχίζεται από αλληλουχίες οι οποίες αποτελούν τον τόπο όπου λαμβάνει μέρος το χιάσμα στον βακτηριοφάγο P1 (locus of X-over P1 Bacteriophage, *loxP*) ή από αλληλουχίες που αποτελούν στόχο αναγνώρισης της φλιπάσης (Flippase Recognition Target, FRT), τότε μπορεί να αφαιρεθεί από στοχευμένη θέση στα ES κύτταρα ή στα διαγονιδιακά ποντίκια υπό την έκφραση ενζύμου που προκαλεί ανασυνδυασμό (Causes recombination, Cre) ή φλιπάσης (Flippase, FLP) στα ανασυνδυασμένα ES κύτταρα (μέσω

επιμόλυνσης με φορέα που εκφράζει Cre- ή FLP) ή μέσω διασταύρωσης των χιμαιρικών ποντικών με διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν Cre- ή FLP [57].



Σχήμα 1.17: Το, πλαισιωμένο από θέσεις loxP, γονίδιο- δείκτης θετικής επιλογής, μπορεί να αφαιρεθεί με την έκφραση Cre ρεκομπινάσης στα ανασυνδυασμένα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα ή με την διασταύρωση των χιμαιρικών ποντικών με διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν Cre [51].

Προβληματισμοί στην ερμηνεία των φαινοτύπων των στοχευμένων μεταλλάξεων

Η γονιδιακή στόχευση είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την in vivo μελέτη της λειτουργίας των γονιδίων των θηλαστικών. Επιτρέπει στους ερευνητές να παράγουν μια ποικιλία μεταλλάξεων σε συγκεκριμένους τόπους του γονιδιώματος του ποντικού και να διερευνήσουν τη λειτουργία του γονιδίου σε ένα φυσιολογικό πλαίσιο κατά την ανάπτυξη και τα ενήλικα στάδια. Ωστόσο η εφαρμογή της τεχνολογίας στόχευσης γονιδίων έχει διάφορους εγγενείς περιορισμούς. Πολλά γονίδια έχουν ρόλους σε πολλαπλούς ιστούς ή όργανα και απαιτούνται για την κανονική εμβρυογένεση και την επιβίωση. Η διακοπή τους στην βλαστική σειρά συχνά προκαλεί πρόωμη εμβρυϊκή θνησιμότητα, εμποδίζοντας την ανάλυση σε μεταγενέστερα στάδια [59].

Οι ανενεργές μεταλλάξεις που κατασκευάζονται στα ΚΟ ποντίκια είναι συνήθως ιδιοσυστατικές, δηλαδή, είναι παρούσες σε όλη την εμβρυϊκή και μεταγεννητική ανάπτυξη. Ως εκ τούτου, το δυναμικό για αναπτυξιακές διαταραχές είναι ένας σημαντικός περιοριστικός παράγοντας προς την ερμηνεία των μεταλλαγμένων φαινοτύπων στα ενήλικα ζώα. Μπορεί να είναι δύσκολο να προσδιοριστεί εάν ένας μεταλλαγμένος φαινότυπος αντανάκλα έναν φυσιολογικό ενήλικο ρόλο για το στοχευμένο γονίδιο ή μια έμμεση επίδραση της μετάλλαξης που αναλογεί σε διατάραξη της ανάπτυξης. Ένα τέτοιο αποτέλεσμα μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της λειτουργικής σημασίας του γονιδιακού προϊόντος στο ενήλικο ζώο. Αντίθετα, αν συμβεί

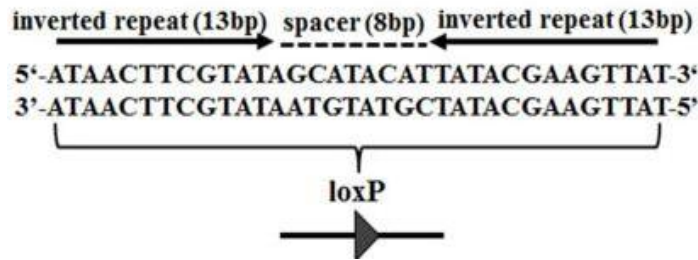
σημαντική αντιστάθμιση για την απώλεια ενός γονιδιακού προϊόντος κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, τότε η σοβαρότητα του μεταλλαγμένου φαινοτύπου μπορεί να υποτιμά την λειτουργική σημασία του γονιδιακού προϊόντος. Η φύση αυτών των αντισταθμιστικών μηχανισμών και η έκταση στην οποία υπάρχουν μπορεί να είναι δύσκολο να καθοριστούν. Οι παραπάνω προβληματισμοί αφορούν επίσης την ανάλυση του διαγονιδιακών ποντικών που φέρουν συστατικές μεταλλάξεις [51].

Ένας άλλος περιορισμός, της πρότυπης τεχνολογίας γονιδιακής στόχευσης, είναι ότι οι μεταλλάξεις είναι παρούσες σε όλα τα κύτταρα του ζώου [51]. Η διαγραφή του γονιδίου σε πολλαπλά κύτταρα και ιστούς, όπου η λειτουργία του απαιτείται, δημιουργεί προβλήματα στην ερμηνεία της λειτουργίας του γονιδίου σε ένα συγκεκριμένο σύστημα ή κυτταρικό τύπο [59]. Έτσι, εάν για παράδειγμα ένα νευρικό γονίδιο ενδιαφέροντος εκφράζεται και στους περιφερικούς ιστούς, τότε η έλλειψη του γονιδιακού προϊόντος περιφερικά θα μπορούσε να οδηγήσει σε έναν θανατηφόρο ή αλλοιωμένο φαινότυπο, ανεξάρτητα του νευρικού της ρόλου. Επιπλέον, για γονίδια που εκφράζονται ευρέως στο ΚΝΣ, μπορεί επίσης να είναι δύσκολο να εντοπιστούν ανατομικά η/οι περιοχή(-ές) στον εγκέφαλο που αποτελούν τη βάση των μεταλλαγμένων φαινοτύπων [51].

Για να παρακαμφθούν αυτοί οι περιορισμοί, το ειδικής θέσης σύστημα ανασυνδυασμού, χρησιμοποιείται για να οριοθετήσει τη διαγραφή του γονιδίου σε ειδικά στάδια, καθώς και σε ειδικό κυτταρικό τύπο ή τύπο ιστού. Ο Cre/loxP ανασυνδυασμός, είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα και καλύτερα συστήματα για την παραγωγή **υπό όρους KO (conditional knockout-cKO)** ποντικών μέχρι σήμερα [59].

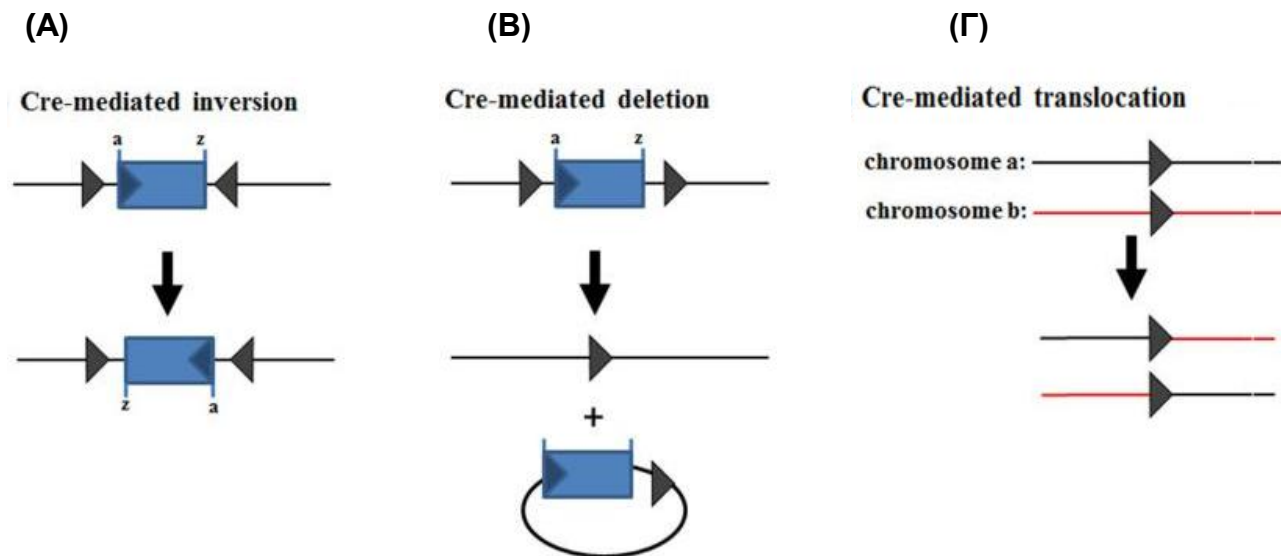
Η χρήση του συστήματος ανασυνδυασμού Cre/loxP στη στόχευση γονιδίων

Η Cre ρεκομπινάση είναι μια πρωτεΐνη 38-kDa από τον βακτηριοφάγο P1, που αναγνωρίζει και καταλύει τον ομόλογο ανασυνδυασμό ανάμεσα σε δύο θέσεις loxP, με αποτέλεσμα την εκτομή ενός θραύσματος DNA, το οποίο περιστοιχίζεται από θέσεις loxP [59]. Η αλληλουχία loxP έχει μήκος 34 bp και αποτελείται από δύο ανεστραμμένες επαναλήψεις, 13 bp, που διαχωρίζονται από μια μη παλινδρομική (ασύμμετρη) αλληλουχία, 8bp, η οποία υπαγορεύει τον προσανατολισμό της συνολικής θέσης loxP [57].



Σχήμα 1.18: Ενιαία θέση loxP που περιέχει δύο ανεστραμμένες επαναλήψεις 13 bp, που χωρίζονται από μια ασύμμετρη 8 bp μακρά ακολουθία. Ο τύπος του ανασυνδυασμού μέσω Cre, εξαρτάται από τον προσανατολισμό και τη θέση των θέσεων loxP [59].

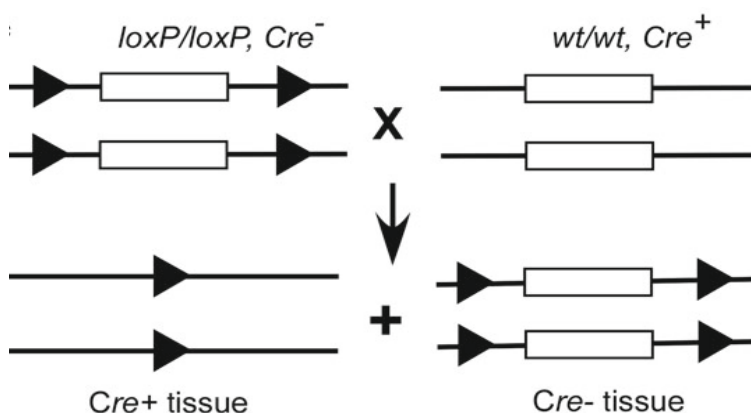
Δύο αλληλουχίες loxP σε αντίθετο προσανατολισμό μεσολαβούν στην αναστροφή του ενδιάμεσου DNA με Cre ρεκομπινάση ενώ δύο θέσεις loxP με τον ίδιο προσανατολισμό διαμεσολαβούν στην εκτομή του ενδιάμεσου DNA. Μετά την εκτομή μόνο μία θέση loxP παραμένει. Εάν οι θέσεις loxP βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, η Cre ρεκομπινάση μπορεί να μεσολαβήσει σε μια χρωμοσωμική μετάθεση [57].



Σχήμα 1.19: (Α) Η Cre αναστρέφει την αλληλουχία DNA μεταξύ δύο θέσεων loxP, τοποθετημένων σε αντίθετη κατεύθυνση. (Β) Η Cre αποκόπτει ένα κυκλικό μόριο μεταξύ δύο θέσεων loxP, οι οποίες έχουν τον ίδιο προσανατολισμό. (Γ) Ο μεσολαβούμενος από Cre ανασυνδυασμός μεταξύ δύο διαφορετικών μορίων γραμμικού DNA (π.χ. χρωμοσώματα), που το καθένα περιέχει μία θέση loxP, έχει ως αποτέλεσμα την ανταλλαγή περιοχών DNA στις θέσεις loxP [57].

Οι cKO ποντικοί δημιουργούνται με την τοποθέτηση loxP ή FRT θέσεων στα 2 άκρα επιλεγμένων εξωνίων.

Η Cre ρεκομπινάση μπορεί να εκφραστεί κάτω από τον έλεγχο κυτταρό- ή ιστο- ειδικών εκκινητών. Οι ποντικοί Cre παράγονται με διαγονιδιακές διαδικασίες ή με διαδικασίες γονιδιακής στόχευσης. Οι αλληλουχίες loxP εισάγονται στις επιθυμητές θέσεις του γονιδιώματος, με φορέα στόχευσης που εισάγεται μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού σε ES κύτταρα. Στη συνέχεια, οι ποντικοί που έχουν loxP θέσεις, διασταυρώνονται με Cre ποντικούς. Οι απόγονοι που φέρουν και τα loxP και τα Cre αλληλόμορφα θα υποστούν την εκτομή του θραύσματος DNA από το γονιδίωμα τους, στα ειδικά κύτταρα ή ιστούς, όπου εκφράζεται η Cre [59].

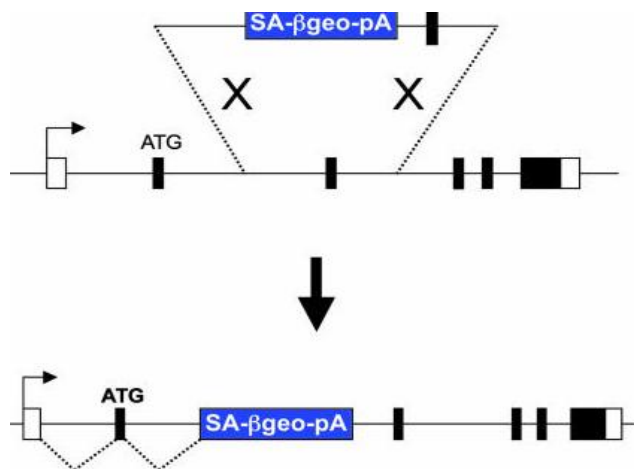


Σχήμα 1.20: Δημιουργία ενός cKO ποντικού, με την αναπαραγωγή ενός ομόζυγου floxed ποντικού, που φέρει ένα γονίδιο πλαισιωμένο από θέσεις loxP (αριστερά) με ένα ποντίκι που έχει ιστό-ειδική έκφραση Cre ρεκομπινάσης (δεξιά). Μετά από δύο γενιές, οι απόγονοι φέρουν και το ομόλογο floxed γονίδιο και την Cre, και έχουν διακοπή του στοχευόμενου γονιδίου στους ιστούς που εκφράζουν Cre [59].

Ένα άλλο χρήσιμο σύστημα ανασυνδυασμού είναι η FLP, που προέρχεται από τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* και οι αλληλουχίες FRT, που είναι ο στόχος αναγνώρισης της Flp. Αυτό το σύστημα είναι μηχανιστικά ταυτόσημο με εκείνο του συστήματος ανασυνδυασμού Cre/loxP, και αντιπροσωπεύει ένα εναλλακτικό εργαλείο για Cre/loxP. Επιπλέον, ο συνδυασμός των δύο συστημάτων ανασυνδυασμού μπορεί να αυξήσει σημαντικά τις δυνατότητες της υπό όρους χειραγώγησης γονιδίων σε ποντίκια [57].

1.2.5 Διαδικασία στοχευμένης παγίδευσης

Η προσέγγιση στοχευμένης παγίδευσης αντιπροσωπεύει μια ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδο για την αδρανοποίηση γονιδίων που εκφράζονται σε ES κύτταρα [60]. Με την πλαισίωση μιας κασέτας γονιδίου-παγίδα, με γονιδιωματικές αλληλουχίες, οι ενθέσεις του γονιδίου-παγίδα μπορούν να κατευθύνονται με ακρίβεια σε ιντρόνια των γονιδίων με ομόλογο ανασυνδυασμό [55].



Σχήμα 1.21: Η στοχευμένη παγίδευση στηρίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό, για την εισαγωγή μιας κασέτας γονιδίου-παγίδα, χωρίς υποκινητή, σε προκαθορισμένες θέσεις. Η κασέτα παγίδευσης πλαισιώνεται από γονιδιωματικές αλληλουχίες του στοχευόμενου τόπου που δεν περιέχουν τον υποκινητή του γονιδίου στόχου [55].

Η μόνη απαίτηση για την κατασκευή των φορέων στοχευμένης παγίδευσης, είναι να αποφευχθεί ο υποκινητής του γονιδίου στόχου να συμπεριλαμβάνεται στους βραχίονες ομολογίας. Όπως και στην τυχαία παγίδευση γονιδίων, η ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς βgeo απαιτεί μάτισμα των εξονίων των γονιδίων που εκφράζονται σε ES κύτταρα. Έτσι, τα ES κύτταρα που φέρουν τις ενσωματώσεις στην περιοχή στόχο είναι σε μεγάλο βαθμό εμπλουτισμένα μεταξύ των αποικιών που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα φάρμακα, ενώ αυτά όπου ο φορέας στόχευσης ενσωματώνεται τυχαία ,οπουδήποτε αλλού στο γονιδίωμα, καταστέλλονται. Ένας επιπλέον βαθμός εμπλουτισμού κερδίζεται από τη χρήση των κασετών γονιδίου-παγίδα, οι οποίες στερούνται ένα σήμα έναρξης της μετάφρασης και επομένως απαιτούν την παραγωγή μιας εντός πλαισίου πρωτεΐνης σύντηξης. Η χρήση δεικτών επιλογής φαρμάκου που δεν

έχουν υποκινητή, για γονιδιακή στόχευση δεν είναι καινούργια, αλλά έχει χρησιμοποιηθεί για την στόχευση μόνο λίγων γονιδίων [55].

1.2.6 Μεταλλαξιγένεση τρανσποζονίου

Με βάση την αρχή της γονιδιακής παγίδευσης, τα τρανσποζόνια – μεταθετά στοιχεία DNA- εισάγονται τυχαία εντός του γονιδιώματος και διατηρούν την ικανότητα να μεταφέρονται και να ενσωματώνονται σε διαφορετικές γονιδιωματικές θέσεις, δημιουργώντας επισημασμένες μεταλλάξεις σε μια μεγάλη κλίμακα. Σε μια πρόσφατη καινοτομία, η στρατηγική μεταλλαξογένεσης η οποία βασίζεται στο PB-τρανσποζόνιο συνδυάστηκε με Cre-loxP ανασυνδυασμό ώστε να μεσολαβήσει αποτελεσματικός ανασυνδυασμός trans-αλληλομόρφων *in vivo*. Αυτό διευκολύνει την παραγωγή των μεγάλων βλαστικών παραλείψεων, διπλασιασμών ή μεταθέσεων μεταξύ μη ομόλογων χρωμοσωμάτων. Κατ' αρχήν, αυτό το σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεγάλης κλίμακας λειτουργικής γονιδιωματικής ανάλυσης, μεταλλάσσοντας συστηματικά εκτεταμένες περιοχές του γονιδιώματος του ποντικού απλά μέσω της αναπαραγωγής [50].

1.2.7 Μεταλλαξιγένεση ENU

Η χρήση της χημικής μεταλλαξιογόνου ENU έχει συμβάλει, κατά την τελευταία δεκαετία, στην αναγνώριση μιας πληθώρας μοντέλων ασθενειών και στον εντοπισμό νέων γονιδίων και μονοπατιών. Η ENU εισάγει σημειακές μεταλλάξεις και μπορεί συνεπώς να δημιουργεί αλληλόμορφα με μια σειρά από συνέπειες, συμπεριλαμβανομένων της απώλειας λειτουργίας, της απόκτησης λειτουργίας και των κυρίαρχων-αρνητικών μεταλλάξεων. Μερικά από τα αλληλόμορφα που δημιουργούνται θα έχουν μέτριες επιπτώσεις και θα είναι πιο παρόμοια με τη γενετική ποικιλία που διέπει την πολύπλοκη ασθένεια στον ανθρώπινο πληθυσμό. Μεγάλα παράλληλα αρχεία DNA και σπέρματος από τους ποντικούς με μεταλλάξεις που προκαλούνται από την ENU, έχουν δημιουργηθεί σε διάφορα ερευνητικά κέντρα. Καθώς το κόστος του εκ νέου προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδιώματος πέφτει κατακόρυφα, θα γίνει εφικτό να δημιουργηθούν ολοκληρωμένες σειρές δεδομένων των μεταλλάξεων από την ENU, για κάθε γονίδιο, σε κάθε ποντίκι από το αρχείο. Οι σημειακές μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε γονίδιο ενδιαφέροντος μπορούν εύκολα να ανακτηθούν από το

παράλληλο αρχείο σπέρματος, παρέχοντας μια εξαιρετική νέα πηγή για μελέτες γονιδιακής λειτουργίας [50].

1.3 Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα Υπό Όρους Μεταλλαξιγένεσης Ποντικού (European Conditional Mouse Mutagenesis Program, EUCOMM)

Με την ανάπτυξη των τεχνολογιών της "στόχευσης γονιδίου", στα τέλη του 20ου αιώνα, οι οποίες χρησιμοποιούν ES κύτταρα ποντικού, οι ερευνητές απέκτησαν την ικανότητα να μεταλλάσουν επιλεκτικά το γονιδίωμα του ποντικού σε τόπους της επιλογής τους. Ωστόσο, οι υποσχέσεις αυτής της τεχνολογίας εξαρτώνται από ένα υψηλό επίπεδο τεχνογνωσίας για τον σχεδιασμό του φορέα στόχευσης, την απομόνωση των ES κυττάρων, και την χειρουργική εμφύτευση του εμβρύου. Επιπλέον, αυτή η διαδικασία είναι χρονοβόρα και δαπανηρή. Σαφώς, οι ερευνητές οι οποίοι είναι πρόθυμοι να αρχίσουν μελέτες σε ζώα θα επωφεληθούν από μια βιβλιοθήκη ES κυττάρων χωρίς μεταλλάξεις. Αυτή η ανάγκη αντιμετωπίστηκε την τελευταία δεκαετία με την ίδρυση της **Διεθνούς Κοινοπραξίας Knockout Ποντικού (International Knockout Mouse Consortium, IKMC)** [66].

Η IKMC ιδρύθηκε το 2007 με στόχο την δημιουργία μεταλλάξεων σε όλες τις περιοχές του γονιδιώματος του ποντικού που κωδικοποιούν πρωτεΐνη, με τη χρήση της γονιδιακής στόχευσης και της γονιδιακής παγίδευσης σε ES κύτταρα C57BL/6 ποντικών. Η IKMC είναι η ίδια μια κοινοπραξία συνεργατικών προγραμμάτων: του **Προγράμματος Knockout Ποντικού (Knockout Mouse Project, KOMP)**(ΗΠΑ), του EUCOMM (Ευρώπη), του **Προγράμματος της Υπό Όρους Μεταλλαξιγένεσης Ποντικού της Βόρεια Αμερικής (North American Conditional Mouse Mutagenesis Programme, NorCOMM)** (Καναδάς), και του Ινστιτούτου Texas A&M για Γενωμική Ιατρική (TIGM) (ΗΠΑ). [66]

Η υπό όρους μεταλλαξιγένεση στην Ευρώπη είναι ισχυρή και σε μεγάλο μέρος οφείλεται στην τοπική ανάπτυξη των βασικών τεχνολογιών, συμπεριλαμβανομένων των εφαρμογών του ανασυνδυασμού ειδικής θέσεως και των επαγόμενων από πρόσδεμα αλλαγών. Επειδή η υπό όρους μεταλλαξιγένεση απαιτείται για την ακριβή ανάλυση της λειτουργίας των περισσότερων γονιδίων *in vivo*, είναι λογικό το να έχει οικοδομηθεί η

ευρωπαϊκή συμβολή στις διεθνείς προσπάθειες, με βάση τα υφιστάμενα πλεονεκτήματα της Ευρώπης [61].

Οι στόχοι του EUCOMM έχουν ως εξής:

- (i) να αναπτύξει γενικές υπό όρους στρατηγικές, χρησιμοποιώντας γονιδιακές παγίδες και πολλαπλών χρήσεων κασέτες στόχους, για την ταχεία δημιουργία υπό όρους αλληλομόρφων στα ES κύτταρα
- (ii) να δημιουργηθούν αποκλειστικές μονάδες γονιδιακής στόχευσης και υπό όρους γονιδιακής παγίδευσης
- (iii) να χρησιμοποιηθεί η γονιδιακή στόχευση, με πολλαπλής χρήσης υπό όρους αλληλόμορφα, ώστε να βοηθήσει στην ολοκλήρωση της συλλογής των ανενεργών αλληλόμορφων αναφοράς
- (iv) να επεκτείνει, να αρχειοθετήσει και να διανείμει αναλυτικά την συλλογή των σειρών των διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν Cre ρεκομπινάση.
- (v) να εστιάσει τις συντονισμένες προσπάθειες της υπό όρους μεταλλαξιγένεσης και της φαινοτυπικής ανάλυσης σε συγκεκριμένα υποσύνολα γονιδίων (συμπεριλαμβανομένων, για παράδειγμα, γονιδίων που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται σε ανθρώπινη ασθένεια ή νέες μεταγραφόμενες αλληλουχίες θηλαστικών)
- (vi) να συνεχίσει την διερεύνηση και την ενσωμάτωση των τεχνολογικών εξελίξεων στην λειτουργική γονιδιωματική (π.χ., χρήση του σημείου μεταλλαξιγένεσης, παρεμβολή RNA και άλλες αναδυόμενες τεχνολογίες οι οποίες λειτουργούν σε επίπεδο RNA) για τη συμπλήρωση της ανενεργής και υπό όρους μεταλλαξιγένεσης και για εμπλουτισμό του βάθους των μεταλλαγμένων πηγών [61].

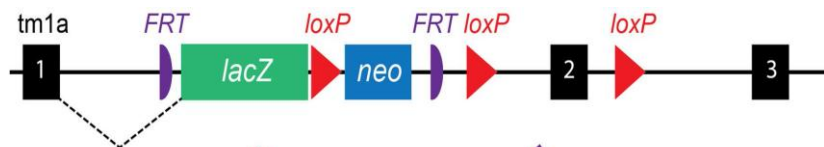
Οι υπό όρους αναλύσεις απαιτούν μεγαλύτερη επένδυση από ό, τι η δημιουργία ανενεργών μεταλλάξεων στην βλαστική γραμμή. Ως εκ τούτου, είναι λογικό σε αυτό το στάδιο να δοθεί προτεραιότητα για την υπό όρους μεταλλαξιγένεση στα γονίδια και την φαινοτυπική ανάλυση. Για παράδειγμα, ένα πιθανό επίκεντρο της EUCOMM μπορεί να είναι τα γονίδια της **βάσης δεδομένων της Μεντελιανής Κληρονομικότητας στον Άνθρωπο (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM)**, τα οποία είναι γνωστό ότι

σχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες, επειδή είναι καλά προσαρμοσμένα στην ανάλυση χρησιμοποιώντας τη δύναμη της υπό όρους μεταλλαξιγένεσης και της ιατρικής συνάφειας. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας ανασυνδυασμού και η διαθεσιμότητα των βιοπληροφορικών πηγών, ως αποτέλεσμα του προγράμματος της αλληλούχισης του γονιδιώματος, έχουν σε μεγάλο βαθμό μειώσει τον χρόνο και το κόστος που εμπλέκεται στην καθιέρωση των στοχευμένων υπό όρους αλληλομόρφων. Παρ' όλα αυτά, για να δημιουργηθεί αποτελεσματικά ένας μεγάλος αριθμός υπό όρους αλληλόμορφων, πρέπει να καθιερωθούν μονάδες στόχευσης γονιδίου. Οι μονάδες αυτές θα συμπληρώνουν τα υφιστάμενα ευρωπαϊκά πλεονεκτήματα στις γονιδιακές παγίδες, στην ανάλυση έκφρασης, στην ENU μεταλλαξιγένεση και την φαινοτυπική ανάλυση και θα προσθέτουν την ικανότητα για την οικονομική παραγωγή ακριβών μεταλλάξεων, όπως σημειακές μεταλλάξεις ή ειδικής ισομορφής knockouts. Θα διευκολύνουν επίσης την καθιέρωση του πλήρους πακέτου ανενεργών αλληλομόρφων με στόχευση εκείνων των γονιδίων που αποδεικνύουν αναθεκτικότητα στην μεταλλαξιγένεση με παγίδευση γονιδίου. Η συλλογή διαγονιδιακών σειρών ποντικού που εκφράζουν Cre ρεκομπινάση πρέπει να επεκταθεί περισσότερο αποτελεσματικά, με την εκμετάλλευση χαρακτηριζόμενων προτύπων έκφρασης καθώς και της τεχνολογίας ανταλλαγής κασέτας, και στεγάζεται σε κεντρικής διανομής κέντρα, όπως το **Ευρωπαϊκό Αρχείο Μετάλλαξης Ποντικών (European Mouse Mutant Archive, EMMA)**. Επιπλέον, η EUCOMM στοχεύει στη διατήρηση μιας ιδιαίτερης έμφασης στην περαιτέρω τεχνολογική ανάπτυξη, έτσι ώστε το πρόγραμμα να μπορεί να ενσωματώσει γρήγορα τις βελτιώσεις που διευκολύνουν την επίτευξη των συνολικών στόχων. Τέτοιες τεχνολογικές εξελίξεις περιλαμβάνουν εναλλακτικές προσεγγίσεις για μεταλλαξιγένεση, όπως ENU οθόνες γονίδιο καθοδηγείται ή υπό όρους στρατηγικές knock-down RNA [61].

1.3.1 Στρατηγική του “πρώτου knockout” αλληλόμορφου

Η κύρια στρατηγική του EUCOMM ήταν να αναπτύξει την στόχευση του “πρώτου ΚΟ” υπό όρους αλληλόμορφου, μια ισχυρή προσέγγιση που επιτρέπει και την επισήμανση με γονίδιο αναφοράς και την υπό όρους μετάλλαξη ενός συγκεκριμένου γονιδίου ενδιαφέροντος. Παρακάτω παρέχεται μία περιγραφή του πώς αυτή η προσέγγιση θα

μπορούσε να εφαρμοστεί σε ένα πρωτότυπο γονίδιο ενδιαφέροντος που περιέχει τρία εξώνια, με το εξώνιο 2 να έχει ταυτοποιηθεί ως "κρίσιμο" για τη λειτουργία του γονιδίου [66].

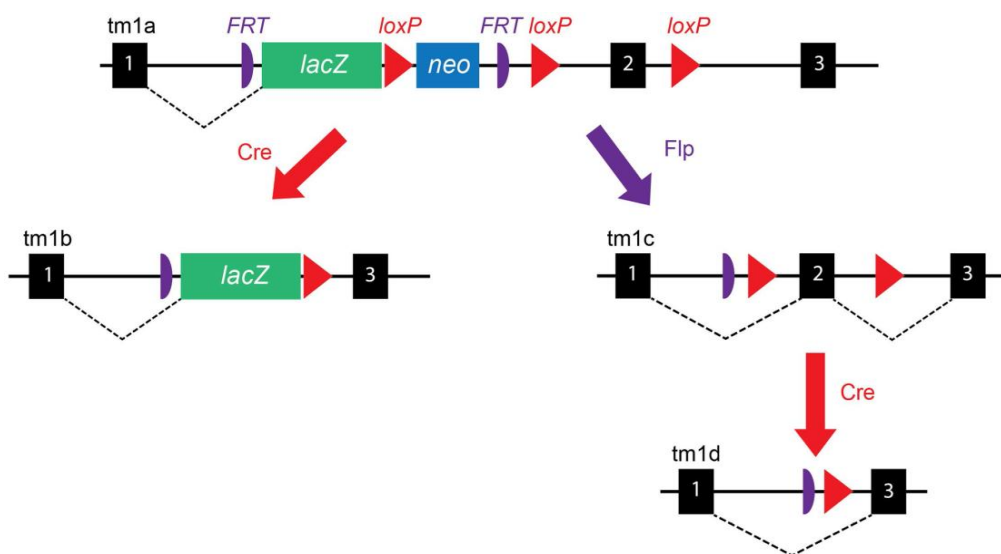


Σχήμα 1.22: Σχηματική αναπαράσταση του “πρώτου ΚΟ” υπό όρους αλληλόμορφου.[66]

Η κασέτα παγίδευσης LacZ τοποθετείται στο 5' άκρο μιας κασέτας επιλογής (κασέτα neo), που προσδίδει ανθεκτικότητα στην νεομυκίνη, βρίσκεται αμέσως ανοδικά του εξωνίου 2, πλαισιώνεται από loxP θέσεις και είναι κατευθυνόμενη από υποκινητή. Η εισαγωγή των δύο κασετών στο ιντρόνιο ενός γονιδίου, διαταράσσουν την λειτουργία του γονιδίου. Η κασέτα neo διευκολύνει την in vitro επιλογή των στοχευόμενων ES κυττάρων, ενώ η κασέτα lacZ μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή ζώων επισημασμένων με το γονίδιο αναφοράς, δηλαδή, ζώα που εκφράζουν lacZ στους ιστούς όπου κανονικά εκφράζεται το γονίδιο ενδιαφέροντος. Μια τρίτη θέση loxP εισάγεται αμέσως μετά το εξώνιο 2, για να διευκολυνθεί η αφαίρεση του και έτσι να παραχθούν πειραματικά ΚΟ ζώα, στα οποία και τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου ενδιαφέροντος έχουν αδρανοποιηθεί. Ως εκ τούτου, είναι ομόζυγα ανενεργά για το γονίδιο ενδιαφέροντος. Για να επιτραπεί η ταυτόχρονη αφαίρεση τόσο της lacZ και όσο και της neo κασέτας, δύο FRT θέσεις έχουν εισαχθεί στο αλληλόμορφο: ένα ανάντη της κασέτας lacZ και μία μεταξύ της neo κασέτας και της loxP θέσης αμέσως πριν το εξώνιο 2 [53,66].

Αυτό το αλληλόμορφο αναφέρεται ως **“στοχευμένη μετάλλαξη 1α” (targeted mutation 1a, tm1a)**, και ορίζεται ως “πρώτο ΚΟ,” επειδή η ίδια η εισαγωγή της κασέτας παγίδευσης αναμένεται να διαταράξει το μάτισμα του γονιδίου ενδιαφέροντος. Το γονίδιο lacZ και η κασέτα neo πρέπει να αφαιρούνται πριν την αξιολόγηση του ΚΟ φαινοτύπου.

Ο συνδυασμός των σημείων FRT και loxP επιτρέπει περαιτέρω χειρισμούς για το πρώτο-KO αλληλόμορφο (tm1a). Μπορεί να αφαιρεθεί η κασέτα αναφοράς –με την δράση της Flp ρεκομπινάσης-για την παραγωγή cKO αλληλομόρφων και αποκατάσταση της φυσιολογικής έκφρασης του γονιδίου (tm1c), μπορεί να διαγραφεί το κρίσιμο εξώνιο- με την δράση της Cre ρεκομπινάσης- και να παραχθούν KO αλληλόμορφα που φέρουν το γονίδιο αναφοράς (tm1b), και τέλος μπορούν να παραχθούν ανενεργά αλληλόμορφα (tm1d)-μετά την έκθεση σε Cre ρεκομπινάση [52].



Σχήμα 1.23: Σχηματική αναπαράσταση του σχεδιασμού φορέα στόχευσης, από το EUCOMM, που απεικονίζει τη διαδικασία στόχευσης και ανασυνδυασμού για ένα πρωτότυπο γονίδιο με τρία εξόνια [66]. Σχήμα προσαρμοσμένο από Skarnes et al. [53].

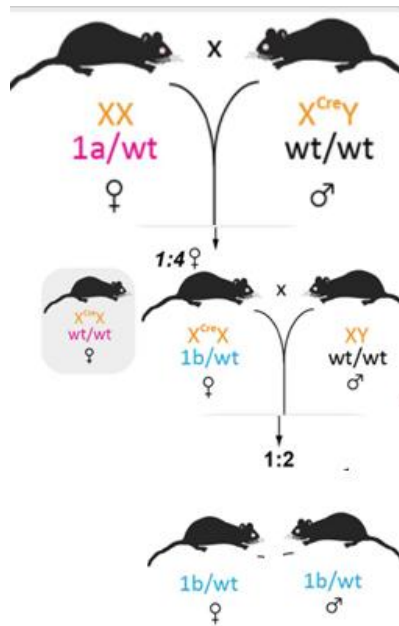
1.3.2 Παραγωγή ποντικών που φέρουν το γονίδιο αναφοράς lacZ (tm1b)

Εκτός από τη στοχευμένη γονιδιακή αποσιώπηση, ο σχεδιασμός αλληλόμορφου του EUCOMM δίνει την δυνατότητα να αντικατασταθεί η έκφραση του γονιδίου ενδιαφέροντος με την έκφραση του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση (από την κασέτα lacZ), παρέχοντας έτσι ένα μέσο για να αναζητηθεί που εκφράζεται κανονικά το γονίδιο ενδιαφέροντος. Η έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης μπορεί να αξιολογηθεί με την ανάλυση των ιστών και των κυτταρικών τύπων, χρησιμοποιώντας είτε ιστοχημική χρώση είτε ανοσοϊστοχημεία. Ένα μόνο αντίγραφο του διαγονιδίου lacZ είναι επαρκές για χρώση β-γαλακτοσιδάσης ή ανοσοϊστοχημεία. Το πλεονέκτημα της εκτέλεσης ανοσοϊστοχημείας για την ανίχνευση της πρωτεΐνης β-γαλακτοσιδάσης, αντί του

μητρικού προϊόντος του γονιδίου ενδιαφέροντος, είναι ότι οι ερευνητές μπορούν να χρησιμοποιήσουν καθιερωμένα και ευαίσθητα για την β-γαλακτοσιδάση ανοσοϊστοχημικά πρωτόκολλα, αντί να πρέπει να σχεδιαστεί ένα πρωτόκολλο για το δικό τους γονίδιο ενδιαφέροντος, το οποίο σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να μην έχει υποβληθεί σε λεπτομερή αξιολόγηση και μπορεί να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα υψηλής ποιότητας αντισωμάτων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τους GPCRs, για παράδειγμα, που τα «ειδικά» αντισώματα δεν έχουν υψηλή εξειδίκευση [66].

Με την διασταύρωση ποντικών που φέρουν το αλληλόμορφο *tm1a* με ποντικούς που εκφράζουν Cre ρεκομπινάση παντού, κάτω από τον έλεγχο ενός ανθρώπινου **κυτταρομεγαλοϊού (Cytomegalovirus, CMV)**, ο ανασυνδυασμός στις θέσεις *loxP*, έχει ως αποτέλεσμα τη διαγραφή τόσο της κασέτας neo όσο και του εξονίου 2, οδηγώντας στην παραγωγή των *tm1b* ποντικών, που φέρουν γονίδιο αναφοράς *lacZ* ("lacZ reporter") και εκφράζουν β-γαλακτοσιδάση σε κύτταρα όπου κανονικά θα εκφραζόταν το γονίδιο ενδιαφέροντος. Το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης είναι φυλοσύνδετο σε αυτή τη σειρά ποντικού εξαιτίας της τυχαίας ενσωμάτωσης του διαγονιδίου στο χρωμόσωμα X, αλλά η έκφραση της Cre ρεκομπινάσης προηγείται της X-αδρανοποίησης, οπότε η εκτομή του γονιδίου θα προχωρήσει αποτελεσματικά τόσο σε αρσενικούς όσο και θηλυκούς ποντικούς. Όπου οι απόγονοι κληρονομούν και το *tm1a* αλληλόμορφο και ένα αλληλόμορφο Cre, ο ανασυνδυασμός στις θέσεις *loxP* έχει ως αποτέλεσμα τη διαγραφή τόσο της κασέτας νεομυκίνης όσο και του κρίσιμου εξονίου, ενώ παράλληλα η κασέτα *lacZ* παραμένει. Οι *tm1b^{+/-}Cre^{+/-}* ποντικοί διασταυρώνονται περαιτέρω με C57BL6 ποντικούς, ώστε να παραχθούν απόγονοι χωρίς Cre ρεκομπινάση στο γενετικό τους υπόβαθρο. Αυτοί οι απόγονοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για χαρακτηρισμό της έκφρασης του γονιδίου ενδιαφέροντος [66].

Οι ποντικοί που φέρουν το *tm1b^{+/-}* είναι αποτελεσματικοί ετερόζυγοι ΚΟ και θα πρέπει να παρακολουθούνται αναλόγως.

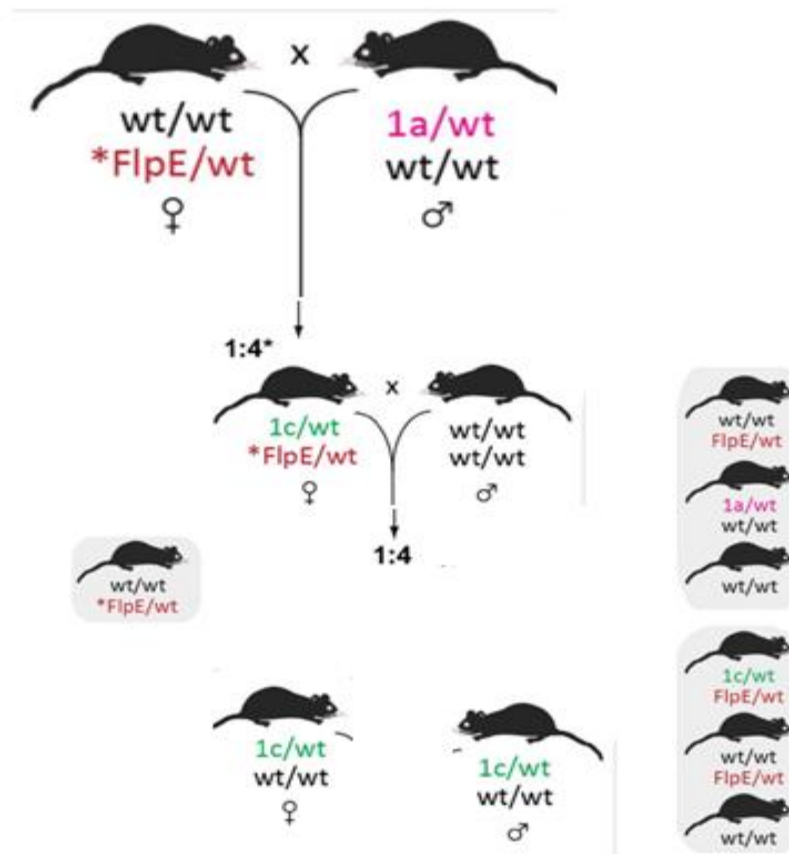


Σχήμα 1.24: αρσενικοί CMV-Cre ποντικοί διασταυρώθηκαν με θηλυκούς $tm1a$ ετεροζυγώτες, για την παραγωγή $tm1b$ ετεροζυγωτών. Όλοι οι $tm1b^{+/-}$ απόγονοι είναι θηλυκοί και ετερόζυγοι για το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης. Η ρεκομπινάση απομακρύνεται από το γενετικό υπόβαθρο των απογόνων μέσω διασταύρωσης με C57BL6 ποντικούς [66].

1.3.3 Παραγωγή “floxed” ποντικών ($tm1c$)

Για τη δημιουργία της σειράς KO και για την αποκατάσταση της έκφρασης του γονιδίου ενδιαφέροντος σε εκείνη ενός ψευδό-άγριου τύπου ζώου, οι ετερόζυγοι ποντικοί $tm1a$ διασταυρώνονται με διαγονιδιακούς C57BL/6J ποντικούς που εκφράζουν την ρεκομπινάση FLP σε όλους τους ιστούς, υπό τον εκκινητή της ανθρώπινης β-ακτίνης. Όπου οι απόγονοι κληρονομούν τόσο το αλληλόμορφο $tm1a$ όσο και το αλληλόμορφο FlpE, η περιοχή του $tm1a$ που πλαισιώνεται από FRT θέσεις αποκόπτεται και ανασυνδυάζεται, με αποτέλεσμα την αφαίρεση της κασέτας $lacZ$ και της κασέτας neo, καθώς και την αποκατάσταση της έκφρασης του γονιδίου ενδιαφέροντος. Αυτοί οι ποντικοί αναφέρονται ως $tm1c$ ή “floxed” ποντικοί και χρησιμεύουν τόσο ως η σειρά ιδρυτή για τη δημιουργία KO ποντικών, όσο και ως η σειρά ελέγχου για πειράματα. Οι $tm1c$ ποντικοί είναι ουσιαστικά WT, με μόνη διαφορά μεταξύ του αλληλόμορφου τους και εκείνου των WT, C57BL/6 ποντικών, να είναι η εισαγωγή των δύο loxP θέσεων που πλαισιώνουν το κρίσιμο εξώνιο. Ωστόσο, αυτό θα πρέπει να επιβεβαιωθεί πειραματικά

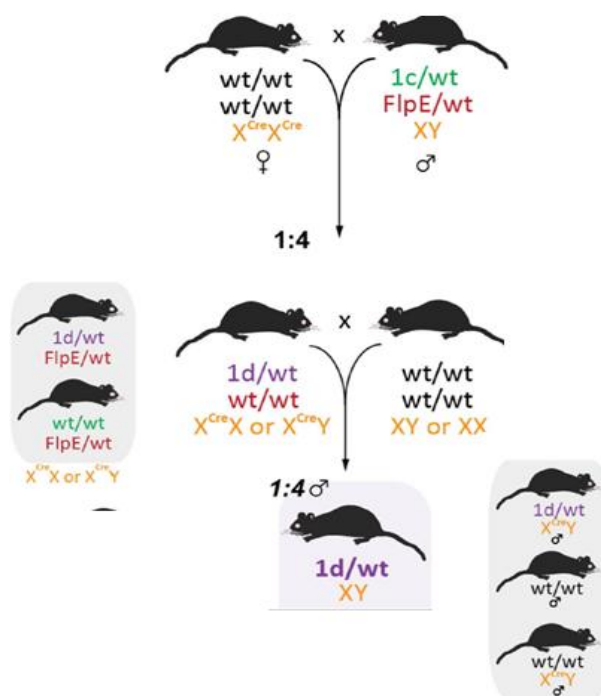
στην απίθανη περίπτωση που οι θέσεις loxP έχουν διαταράξει το μάτισμα του γονίδιου ή ένα σημαντικό ρυθμιστικό ή ενισχυτικό στοιχείο μέσα στα εσώνια. Οι $tm1c^{+/-}$ απόγονοι διασταυρώνονται περαιτέρω με WT, C57BL6 ποντικούς, ώστε να παραχθούν “floxed” ετεροζυγώτες χωρίς Flp ρεκομπινάση στο γενετικό τους υπόβαθρο.[66]



Σχήμα 1.25: διασταύρωση ετερόζυγων $tm1a$ ποντικών με διαγονιδιακούς C57BL/6J ποντικούς, που εκφράζουν την ρεκομπινάση FLP παντού, και περαιτέρω διασταύρωση των $tm1c^{+/-}$ απογόνων με C57BL/6J ποντικούς, για την παραγωγή “floxed” ετεροζυγώτες αρνητικών για την FLP ρεκομπινάση [66].

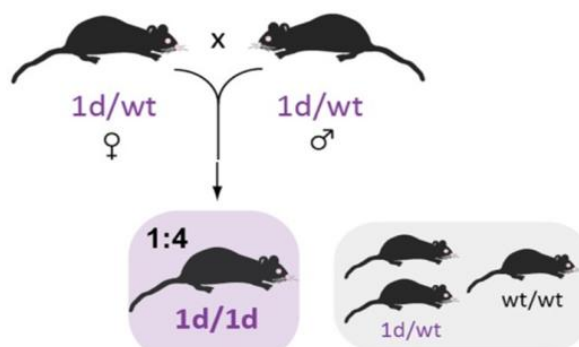
1.3.4 Παραγωγή ΚΟ ποντικών(tm1d)

Η διασταύρωση των tm1c ποντικών είτε με ποντικούς που εκφράζουν Cre ρεκομπινάση παντού- οι οποίοι χρησιμοποιούνται και για την παραγωγή tm1b ποντικών- ή εναλλακτικά με ποντικούς που εκφράζουν Cre στο επιθυμητό όργανο ή κυτταρικό τύπο, οδηγεί στην δημιουργία των "tm1d" ποντικών, δηλαδή, τα ζώα στα οποία το κρίσιμο εξώνιο του γονιδίου ενδιαφέροντος έχει διαγραφεί. Για τα περισσότερα αλληλόμορφα του EUCOMM το κρίσιμο εξώνιο είναι ασύμμετρο και η διαγραφή ασύμμετρων εξωνίων προκαλεί μια μετατόπιση πλαισίου και ως εκ τούτου μη νοηματικές μεταλλάξεις. Το εναπομείναν γονιδιακό μετάγραφο είναι πιθανό να αποδομηθεί, ως αποτέλεσμα αποσύνθεσης που μεσολαβείται από μη νοηματική μετάλλαξη. Οι tm1d^{+/-} ποντικοί διασταυρώνονται με C57BL/6 ποντικούς, ώστε να προκύψουν απόγονοι χωρίς Cre και Flp ρεκομπινάση στο γενετικό τους υπόβαθρο [66].



Σχήμα 1.26: διασταύρωση tm1c^{+/-}Flp^{+/-} ποντικών με διαγονιδιακούς C57BL/6J ποντικούς που εκφράζουν την ρεκομπινάση Cre παντού ή σε συγκεκριμένους ιστούς για την παραγωγή ΚΟ ποντικών. Η Cre και η Flp ρεκομπινάση απομακρύνονται από το γενετικό υπόβαθρο των απογόνων μέσω διασταύρωσης με C57BL/6 ποντικούς.[66]

Για την παραγωγή και τον έλεγχο των ομόζυγων ΚΟ ποντικών, διασταυρώνονται ετερόζυγοι *tm1d* ποντικοί μεταξύ τους.



Σχήμα 1.27: διασταύρωση μεταξύ ετερόζυγων *tm1d* ποντικών [66].

Κρυοσυντήρηση των “νέων ποντικών” που παράγονται από το EUCOMM

Η παραγωγή γενετικά τροποποιημένων σειρών ποντικού είναι μια σημαντική και δαπανηρή επιχείρηση, οπότε η συντήρηση και η διαφύλαξη της σειράς είναι απαραίτητη. Η κρυοσυντήρηση είτε εμβρύων είτε σπέρματος έχει μια σειρά από πλεονεκτήματα σε σχέση με τη συνεχή συντήρηση των ζευγών αναπαραγωγής στις ερευνητικές εγκαταστάσεις. Εκτός από το ότι επιτρέπει τη διατήρηση αχρησιμοποίητων σειρών χωρίς περαιτέρω αναπαραγωγή, γεγονός που εξοικονομεί χώρο και έξοδα που σχετίζονται με τη στέγαση και την γονοτύπηση, η κρυοσυντήρηση παρέχει ασφάλιση έναντι ενός αριθμού διαφορετικών σεναρίων. Η απώλεια μιας σειράς ποντικού μπορεί να προκύψει μέσα από μια μόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να εξαλειφθεί μόνο με τη σφαγή ολόκληρου του αποθέματος των προσβεβλημένων ζώων και την ανασύσταση του πληθυσμού από την προ-μολυσμένες πηγές. Επίσης με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται γενετική διαφοροποίηση μέσα από μεταλλάξεις που προκύπτουν αυθόρμητα, οι οποίες μπορεί να γίνουν σταθερά στην αποικία, ή επίσης μπορεί να προκύψει κακή διαχείριση της αναπαραγωγής, οδηγώντας σε γενετική μόλυνση.

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του συστήματος EUCOMM

- **Οι ποντικοί του EUCOMM δεν απαιτούν αναδιασταύρωση (backcrossing) επειδή χρησιμοποιούνται C57BL/6 ES κύτταρα.** Οι C57BL/6 ποντικοί είναι καλύτεροι αναπαραγωγείς σε σχέση με διάφορα 129 υποστέλεχη, αποτελούν το στέλεχος αναφοράς και το υπόβαθρο για πολλούς τροποποιημένους, με την δράση της Cre, διαγονιδιακούς ποντικούς και χρησιμοποιούνται ευρέως σε όλη την ερευνητική κοινότητα, λόγω των καλά χαρακτηρισμένων αποκρίσεων τους σε πολλά μοντέλα νόσων. Με τη χρήση αυτών των κυττάρων για να παράγουν χίμαιρες, οι ερευνητές μπορούν να αποφύγουν την ανάγκη της χρονοβόρας αναδιασταυρώσεως (10 γενεές αναδιασταύρωσης για επίτευξη γενετικής ομοιογένειας) και να είναι σίγουροι ότι οι ποντικοί τους έχουν ένα καθαρό γενετικό υπόβαθρο.
- **Η επιλογή ποντικών που εκφράζουν Cre ρεκομπινάση, δίνει χρονική και χωρική ευελιξία.** Μια από τις πιο ισχυρές πτυχές του συστήματος EUCOMM είναι η ικανότητα διαγραφής του γονιδίου με ιστό- ή χρόνο-ειδικό τρόπο, με την διασταύρωση tm1c ποντικών με εξειδικευμένες σειρές ανασυνδυάσης Cre. Ενώ ένας tm1d ποντικός μπορεί να παραχθεί με διασταύρωση tm1c ποντικού με ποντικούς που εκφράζουν Cre ρεκομπινάση, κάτω από τον έλεγχο του CMV και το γονίδιο να διαγραφεί παντού, υπάρχουν πολλές περιπτώσεις στις οποίες η ολική διαγραφή δεν είναι ιδανική. Έχει βρεθεί ότι το 42% των γονιδίων είναι απαραίτητα για τη βιωσιμότητα ή μια αναπτυξιακή ανωμαλία συγχέει την διερεύνηση μιας κατάστασης σε ενήλικους ποντικούς. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το EUCOMM έχει δώσει την δυνατότητα, η επαγωγίμη Cre ανασυνδυάση να επιτρέψει τη διαγραφή του γονιδίου ενδιαφέροντος ,αφού το ποντίκι έχει φτάσει στην ενηλικίωση.
Ένα άλλο ισχυρό παράδειγμα της χρησιμότητας της προσέγγισης EUCOMM είναι η ικανότητα να αποκρυπτογραφήσει την ιστοειδική φυσιολογία που στηρίζει έναν φαινότυπο, ο οποίος παρατηρείται σε μία ολική διαγραφή γονιδίου, είτε με έναν επαγωγίμο είτε με ιδιοσυστατικό τρόπο, με τη χρήση υποκινητών ειδικών για έναν κυτταρικό τύπο ή ιστό, για να οδηγήσουν την έκφραση της Cre.

- **Οι ποντικοί του EUCOMM απαιτούν πολλαπλές γενιές αναπαραγωγής για την απομάκρυνση των “μολυσματικών” διαγονιδίων και της κασέτας νεομυκίνης.** Το γεγονός ότι οι ποντικοί tm1a θεωρούνται “πρώτοι ΚΟ” σημαίνει ότι η αρχική φαινοτύπηση μπορεί να πραγματοποιηθεί άμεσα και χωρίς περαιτέρω βήματα αναπαραγωγής. Διασταυρώσεις ετεροζυγωτών tm1a χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή ποντικών που φέρουν το “ανενεργό” αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία, για φαινοτυπικό έλεγχο. Σε γενικές γραμμές, πάντως, είναι επιθυμητή η απομάκρυνση τόσο της κασέτας νεομυκίνης (με διασταύρωση με ποντίκια που εκφράζουν FlpE για παραγωγή tm1c ποντικών) όσο και τυχόν εναπομεινάντων ρεκομπινασών (FlpE ή Cre), πριν από τη φαινοτυπική ανάλυση των ΚΟ ποντικών, αφού και τα δύο έχουν συνδεθεί με φαινοτυπικά αποτελέσματα ανεξάρτητα από εκείνα που οφείλονται στην απενεργοποίηση του γονιδίου ενδιαφέροντος. Για παράδειγμα, η Cre ρεκομπινάση μπορεί να εισαγάγει μεταβολές DNA μέσω κρυπτικών θέσεων loxP στο γονιδίωμα των θηλαστικών, με παθογόνες συνέπειες στο γαστρεντερικό, στο αναπνευστικό, στο καρδιαγγειακό και σε άλλα συστήματα. Παρομοίως, η διατήρηση της κασέτας νεομυκίνης, μπορεί να προκαλέσει άμεση διακοπή γονιδιακών ρυθμιστικών στοιχείων και μη αναμενόμενη διακοπή γονιδίων, που βρίσκονται μακριά από την αρχική μετάλλαξη. Έτσι, παρά του ότι οι ποντικοί του EUCOMM είναι οι “πρώτοι ΚΟ” θεωρείται απαραίτητο να αναπαράγονται οι ποντικοί για πολλές γενιές για να παραχθούν ΚΟ και floxed ποντικοί που θα είναι απαλλαγμένοι από παρεμβολές από εξωγενείς ακολουθίες.

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία αφορά την δημιουργία και τον χαρακτηρισμό ενός cKO *Lpar1* ποντικού. Είναι γνωστό ότι το *Lpar1* εκφράζεται ευρέως σε ενήλικους ποντικούς ενώ κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη η έκφραση του είναι εμπλουτισμένη στον εγκέφαλο. Ευρεία έκφραση του LPAR1 παρατηρείται και στους ανθρώπους. Ο LPA₁ δεσμεύει το LPA και εκκινεί καταρράκτες μεταγωγής σήματος, εξαρτώμενους από G πρωτεΐνη, επάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, την κυτταρική μετανάστευση, και κυτταροσκελετικές αλλαγές. Οι *Lpar1*^{-/-} ποντικοί παρουσιάζουν μεγαλύτερη από 50% περιγεννητικής θνησιμότητα σε καθαρό (C57Bl / 6J ή Balb / cByJ) γενετικό υπόβαθρο.

Τα υψηλά επίπεδα *Lpar1* έχουν συνδεθεί με τον καρκίνο του μαστού, τον καρκίνο των ωοθηκών, με NB και με κακοήθες πολύμορφο GBM. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο LPA₁ συμβάλλει στην IPF. Σε άτομα με IPF ο LPA₁ εκφράζεται ιδιαίτερα από ινοβλάστες που ανακτώνται από δείγματα βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης. Οι ποντικοί με ανεπάρκεια στον LPA₁ προστατεύονται δραματικά από την επαγόμενη από μπλεομυκίνη ίνωση, λόγω της μειωμένης πρόσληψης ινοβλαστών και αγγειακής διαρροή, δύο αποκρίσεις που μπορεί να είναι υπερβολικές όταν ο τραυματισμός οδηγεί σε ίνωση και όχι σε επισκευή.

Σκοπός της παρούσας εργασίας, αρχικά, είναι η παραγωγή ποντικών που φέρουν το “πρώτο ΚΟ αλληλόμορφο” (*tm1a*), και η επιβεβαίωση της επιτυχίας της στόχευσης. Οι πρώτοι ΚΟ ποντικοί διασταυρώνονται περαιτέρω με ποντικούς που εκφράζουν Cre ή Flp ρεκομπινάση για την παραγωγή, ΚΟ ποντικών που εκφράζουν το γονίδιο αναφοράς *lacZ*, “floxed” ποντικών και ΚΟ ποντικών, ώστε να μελετηθεί ποιοτικά και ποσοτικά η ιστολογική έκφραση του γονιδίου. Επίσης με αφορμή την αναφορά ότι οι *Lpar1*^{-/-} ποντικοί παρουσιάζουν περιγεννητική θνησιμότητα (J.Chun, αδημοσίευτες παρατηρήσεις), μελετήθηκαν οι επιπτώσεις της απώλειας της έκφρασης του *Lpar1* στην βιωσιμότητα των *Lpar1*^{-/-} ποντικών κατά την εμβρυϊκή ηλικία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εξοπλισμός- Όργανα

- Ανακινούμενοι επωαστήρες
- Αναλυτικός ζυγός
- Επωαστήρας
- Θερμικοί κυκλοποιητές-Thermal cyclers, (Peqlab peQSTAR 2x και Biorad #582BR016459)
- Συσκευή Real-time PCR (Biorad CFX96 Optics Module)
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Μετασχηματιστής- Τροφοδοτικό Power supply , (Biorad # 164-5050)
- Πιπέτες
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad #283BR15412)
- Συσκευή απιονισμού ύδατος
- Σωληνάρια (2- 1.5- 0,5) ml eppendorfs (Greiner bio-one # 616201)
- Σωληνάρια 0.2 ml eppendorfs PCR tubes thick wall (Sarstedt #72.699)
- Φωτόμετρα
- Ψηφιακή Φωτογραφική μηχανή
- pHμετρο
- Πλαστικά ακρορύχια (tips) της εταιρείας Costar.
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15ml και 50ml της εταιρείας Falcon.
- Συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος
- Συσκευή με λάμπα UV
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Εκμαγείο συσκευής ηλεκτροφόρησης
- Ομογενοποιητής ULTRA TURRAX T25 basic (IKA-Werke)
- Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος Heraeus Fresco 17 (Thermo scientific)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος (Thermo scientific # 41775276)
- Συσκευή Vortex

- Σωληνάρια BIORUX
- Συσκευή Υδατόλουτρου Memert TYP:WB 10
- Φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- PCR Plates, 96-well, thin-wall (Biorad # 6474523)
- Petri dishes
- Αντικειμενοφόρες πλάκες (VWR # 09184)
- Καλυπτρίδες (Knittel Glass # KN00010029628)
- Parafilm
- Κασέτες σκίνωσης
- Ενδροτραχειακοί καθετήρες
- Ράμματα
- Σύριγγες του 1ml και των 10 ml
- Βάζο χρώσης
- Γυάλινη ράβδος

Όλα τα υαλικά και πλαστικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα.

2.2 Υλικά

- Ξηρός πάγος
- Υγρό άζωτο
- Αγαρόζη, Agarose (Invitrogen # 16500500)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x TBE
- Tris-(hydroxymethyl)-methylamine, Tris base (Fisher Scientific #142829)
- Βορικό οξύ, Boric acid (Fisher Scientific #BP168-1)
- EDTA αιθύλενο διαμινω τετρα οξικό οξύ (Applichm #A2937 1000)
- EtBr Βρωμιούχο αιθίδιο ethidium bromide (Sigma, #E1510)
- Χρωστική Orange G (DNA loading buffer)
- Διάλυμα λύσης (Tail Buffer) 1L
- Πρωτεϊνάση K, Proteinase K (10 mg/ml) (Roche #3115879)
- Φαινόλη (VWR chemicals #20599.297)
- H₂O PCR, Gibco distilled water DNase/RNase Free (Invitrogen #05686)

- Διάλυμα 10x PCR (500 mM χλωριούχο κάλιο, 100mM Tris-υδροχλωρίου με pH 9,0 στους 25 °C, 1% Triton X-100)
- Χλωριούχο μαγνήσιο (Panreac, CR 161696)
- dNTPs δεόξυριβονουκλεοτίδια (Invitrogen#18427-088 και Fermentas#R0181)
- Εκκινητές με συγκέντρωση 5 pmol/μL, Macrogen
- Taq πολυμεράση
- Μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης -TRIzol Reagent Invitrogen (TR118)
- DEPC-H₂O (RNase free)
- Χλωροφόρμιο (Fisher scientific #1173671)
- Ισοπροπανόλη (AppliChem #DS-22,0005)
- Διάλυμα αλάτων (0.8M C₆H₅Na₃O₇·2H₂O και 1,2M NaCl)
- Αιθανόλη 75%
- Ένζυμο: RQ1 & RNase-free DNase (Promega), (M6101)
- RQ1 DNase 10x Reaction Buffer (Promega #0006112322)
- Μίγμα φαινόλης | χλωροφορμίου (1:1) (vol/vol)
- Διάλυμα γλυκογόνου 10 μg/μL (Roche)
- Διάλυμα οξικού νατρίου 3M
- Αιθανόλη 100%
- Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης, M-MLV RT (Promega #0000172807)
- M-MLV RT 5x buffer (Promega #0000201700)
- Oligo d(T)₁₈ , m RNA Primer # S1316S (Biolabs #0091408)
- Ξυλένιο
- Αιθανόλη 96%
- Αιθανόλη 50%
- Αιματοξυλίνη
- Υδροχλωρικό οξύ
- Διάλυμα Scott's
- Διάλυμα Εωσίνης
- DPX (Dibutyl phthalate), (Sigma, #80100)

- OCT (VWR chemicals #03806271)
- Διβασικό φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) (Fisher Bioreagents #149441)
- Δισόξινο Φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4)
- X gal powder (Applichem #SF01556)
- Milli Q
- PBS pH7.4
- Διμεθυλοσουλφοξειδίο (Dimethyl sulfoxide DMSO)
- Na deoxycolate, Δεοξυχολικό νάτριο ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{Na}$) (Fluka Biochemica #30970)
- Nonylphenylpolyethylene glycol NP-40 (Applichem #0J005002)
- Διάλυμα Γλουταραλδεΐδης (25%) (Sigma #G6257)
- Φορμαλδεΐδη (37-40%) (Lab scan #A48C11X)
- - Potassium ferricyanide $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Sigma #20709DB)
- Σιδηροκυανιούχο κάλιο- Potassium ferrocyanide $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Sigma #455989)
- QIAGEN® LongRange PCR Kit (#151044625)
- DMEM-KO (KnockOut™ •DMEM)(Thermo Fisher Scientific# 10829018)
- Gibco™ Trypsin (2.5%), No Phenol Red (Gibco #15090046)
- L5158 SIGMA
- Leukemia Inhibitory Factor from mouse(L5158 SIGMA# MFCD00283681)

2.3 Δείγματα

Ζώα

Όλα οι ποντικοί ανατράφηκαν στις εγκαταστάσεις ζώων στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών “Αλέξανδρος Φλέμινγκ”, υπό συγκεκριμένες μη παθογόνες συνθήκες. Η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 20-22°C, η υγρασία στο 55±5% και ο κύκλος μέρας-νύχτας ήταν 12 ώρες. Οι ποντικοί διατηρήθηκαν στα αντίστοιχα γενετικά τους υπόβαθρα για περισσότερο από δέκα γενιές. Όλα τα πειράματα είχαν την έγκριση τόσο της Επιτροπής Βιοηθικής του Ε.Κ.Ε.Β.Ε, όσο και της Διεύθυνσης Κτηνιατρικής Υπηρεσίας της Περιφέρειας Αττικής. Όλες οι ενέργειες και οι επεμβάσεις στα ζώα πραγματοποιήθηκαν με τον λιγότερο επώδυνο τρόπο, ενώ η ευθανασία των ζώων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα διεθνή πρωτόκολλα.

Συλλογή αίματος (πλάσματος)

Η συλλογή αίματος από τους ποντικούς πραγματοποιήθηκε μετά την ευθανασία του ζώου, με την χρήση ξηρού πάγου. Το αίμα λαμβάνεται από την κοιλιακή αορτή, και προστίθεται 10% του όγκου 5mM EDTA ως αντιπηκτικό και μετά από φυγοκέντρηση στα 2000 g για 20 min λαμβάνεται το υπερκείμενο (πλάσμα). Το πλάσμα αποθηκεύεται σε ειδικά σωληνάκια στους -20°C για περαιτέρω μελέτη.

Συλλογή ιστού

Οι διάφοροι ιστοί απομονώθηκαν με την ίδια σειρά απ' όλους τους ποντικούς, η οποία ήταν η εξής: πρώτα απομονώθηκε ο λευκός λιπώδης ιστός, μετά η καρδιά, ο πνεύμονας, το στομάχι, ο ειλεός του λεπτού εντέρου, το παχύ έντερο, το ήπαρ, οι νεφροί, η ουροδόχος κύστη, οι όρχεις ή μήτρα αναλόγως με το φύλο του ζώου, ο εγκέφαλος και τέλος ο μυελός των οστών.

Μετά την ευθανασία του ζώου, με χρήση ξηρού πάγου, γίνεται έγχυση 5-10 ml PBS στην δεξιά πλευρά της καρδιάς για τον καθαρισμό των οργάνων από το αίμα.

Κάθε φορά που απομονώνεται ένα όργανο, ένα τμήμα του μεταφέρεται σε σωληνάριο και φυλάσσεται σε υγρό άζωτο. Τα δείγματα μεταφέρονται στους -80°C για την περαιτέρω επεξεργασία του ιστού, για την απομόνωση RNA.

Για την ιστολογική μελέτη, ο υπόλοιπος ιστός μεταφέρεται σε σωληνάριο (5ml) με φορμαλίνη (4%) για 24 ώρες. Μετά αντικαθίσταται η φορμαλίνη με PBS και αποθηκεύονται στους 4°C. Ο ιστός τοποθετείται σε κασέτα. παραφινοποιείται σε ένα ειδικό μηχάνημα και στην συνέχεια ακολουθεί σκίνωση με υγρή παραφίνη, η οποία στερεοποιείται κάτω από τους 62°C. Έτσι έχουμε τους παραφινοποιημένους ιστούς σε κασέτες

Για την μελέτη έκφρασης του LacZ, οι ιστοί μόλις απομονωθούν –με εξαίρεση τον πνεύμονα, που λόγω της εύθραυστης δομής του ακολουθείται άλλη διαδικασία η οποία περιγράφεται παρακάτω- ενσωματώνονται στην ένωση **OCT (Optimal cutting temperature compound)**, και αφήνονται να παγώσουν αργά σε ατμούς υγρού αζώτου. Η ένωση OCT είναι ένα μέσο σαν γέλη, σε θερμοκρασία δωματίου, και όταν

καταψύχεται έχει την ίδια πυκνότητα με τον κατεψυγμένο ιστό. Τα δείγματα στην συνέχεια φυλάσσονται στους -80°C .

Για κάθε όργανο ακολουθήθηκε διαφορετική διαδικασία απομόνωσης.

Λευκός Λιπώδης Ιστός

Ο λευκός λιπώδης ιστός είναι η λιπώδης μάζα που συσσωρεύεται στην κοιλία του ποντικού και από κάτω βρίσκονται τα όργανα. Κόβεται ένα κομμάτι του και φυλάσσεται για την απομόνωση RNA.

Καρδιά

Διαχωρίζεται ο ιστός από τους πνεύμονες και τον θύμο αδένα. Το μισό τμήμα του φυλάσσεται, για την απομόνωση RNA. Ο υπόλοιπος μισός φυλάσσεται ανάλογα με την μετέπειτα χρήση του, είτε για ιστολογική μελέτη, είτε για την μελέτη έκφρασης του LacZ.

Πνεύμονας

Απομονώνεται ο αριστερός λοβός με ράμματα, και φυλάσσεται για την απομόνωση RNA. Ακολουθεί η διασωλήνωση της τραχείας με καθετήρα και η εγχύση 1 ml φορμαλίνης. Απομακρύνεται ο καθετήρας, κόβεται η τραχεία με ράμματα και μεταφέρονται μαζί με τον υπόλοιπο πνεύμονα σε σωληνάριο (5ml) με φορμαλίνη (4%) για 24 ώρες. Μετά αντικαθίσταται η φορμαλίνη με PBS και αποθηκεύονται στους 4°C . Αφαιρείται η τραχεία, κόβεται ο πνεύμονας σε 4 λοβούς και τοποθετούνται σε κασέτα. Ακολουθεί ιστολογική μελέτη. Για την μελέτη έκφρασης του LacZ, αντί για φορμαλίνη γίνεται έγχυση 1 ml διαλύματος PBS/OCT 1:1. Ο ιστός τοποθετείται σε tube (5ml) με σουκρόζη για 24 ώρες, και την επόμενη μέρα ενσωματώνεται σε OCT και φυλάσσεται στους -80°C .

Στομάχι

Απομονώνεται το στομάχι από το οισοφαγικό στόμιο(κεντρικό στόμιο, πάνω και αριστερά) μέχρι το πυλωρικό στόμιο(περιφερικό στόμιο, κάτω και δεξιά). Με σύριγγα με ειδικό λείο στόμιο, ώστε να μην τραυματίζει τον ιστό, εγχέεται στον πυλωρό, επαρκής ποσότητα διαλύματος PBS ώστε να απομακρυνθεί το περιεχόμενο του στομάχου. Ένα

τμήμα από τον πυλωρικό στόμαχο φυλάσσεται για την απομόνωση RNA. Ο υπόλοιπος ιστός φυλάσσεται ανάλογα με την μετέπειτα χρήση του, είτε για ιστολογική μελέτη, είτε για την μελέτη έκφρασης του LacZ.

Λεπτό έντερο

Κόβεται ένα κομμάτι (4-5cm) από τον ειλεό του λεπτού εντέρου. Με σύριγγα με ειδικό λείο στόμιο, ώστε να μην τραυματίζει τον ιστό, εγχέεται στο ένα άκρο επαρκής ποσότητα διαλύματος PBS ώστε να απομακρυνθεί το περιεχόμενο του. Ένα μικρό τμήμα του ιστού (1-2 cm) φυλάσσεται για την απομόνωση RNA. Εάν προορίζεται για ιστολογική μελέτη, το υπόλοιπο τμήμα του ειλεού τοποθετείται πάνω σε φελλό παραλληλόγραμμου σχήματος και το ένα του άκρο κλείνεται με καρφίτσα. Από το άλλο άκρο γίνεται έγχυση διαλύματος PBS μέχρι ο ιστός να φουσκώσει και να αποκτήσει σωληνοειδές σχήμα. Κλείνεται και το άλλο άκρο με καρφίτσα και μεταφέρεται ο ιστός, μαζί με τον φελλό, σε σωληνάριο με φορμαλίνη. Για μελέτη έκφρασης LacZ ο ιστός φουσκώνεται με διάλυμα PBS/OCT 1:1, χωρίς να κλείσουν τα άκρα, λόγω του ότι το διάλυμα επειδή περιέχει OCT είναι πιο πυκνό και δεν διαφεύγει εύκολα, και ενσωματώνεται σε OCT.

Παχύ έντερο

Απομονώνεται το παχύ έντερο από το τυφλό μέχρι το ορθό. Με σύριγγα με ειδικό λείο στόμιο, ώστε να μην τραυματίζει τον ιστό, εγχέεται στο ένα άκρο επαρκής ποσότητα διαλύματος PBS ώστε να απομακρυνθεί το περιεχόμενο του. Ένα μικρό τμήμα του ιστού (1-2 cm) φυλάσσεται για την απομόνωση RNA. Το υπόλοιπο τμήμα του εντέρου τοποθετείται πάνω σε φελλό παραλληλόγραμμου σχήματος, και με την χρήση πολύ λεπτού ψαλιδιού κόβεται από το ένα άκρο έως το άλλο, με πολύ προσοχή για να μην καταστραφούν οι λάχνες (εσωτερικό του ιστού), μέχρι να ανοίξει. Καρφιτσώνεται πάνω στον φελλό και μεταφέρεται σε σωληνάριο με φορμαλίνη, για μετέπειτα ιστολογική μελέτη, ή ενσωματώνεται σε OCT για την μελέτη έκφρασης του LacZ.

Ήπαρ

Κόβεται ένα μικρό κομμάτι από τον κερκοφόρο λοβό του ήπατος μεταφέρεται σε tube και φυλάσσεται σε υγρό άζωτο. Μεταφέρονται τα δείγματα στους -80°C για την

επεξεργασία του ιστού για την απομόνωση RNA. Ο αριστερός πλευρικός λοβός του ήπατος φυλάσσεται ανάλογα με την μετέπειτα χρήση του , είτε για ιστολογική μελέτη, είτε για την μελέτη έκφρασης του LacZ.

Νεφροί

Απομονώνονται και οι δυο νεφροί. Ο ένας κόβεται στην μέση και ο μισός ιστός φυλάσσεται για την απομόνωση RNA. Ο υπόλοιπος μισός ιστός και ο άλλος νεφρός φυλάσσονται ανάλογα με την μετέπειτα χρήση του είτε για ιστολογική μελέτη, είτε για την μελέτη έκφρασης του LacZ.

Ουροδόχος κύστη

Απομονώνεται η ουροδόχος κύστη. Σε περίπτωση που έχει περιεχόμενο την σκίζουμε προσεχτικά σε ένα σημείο και την ακουμπάμε σε ένα χαρτί μέχρι να αδειάσει. Επειδή ο ιστός είναι πολύ μικρός, χρησιμοποιείται ολόκληρος είτε για ιστολογική μελέτη, είτε για την μελέτη έκφρασης του LacZ.

Όρχεις

Απομονώνονται και οι δυο όρχεις. Ο ένας μεταφέρεται φυλάσσεται για την απομόνωση RNA. Ο άλλος όρχεις φυλάσσεται ανάλογα με την μετέπειτα χρήση του, είτε για ιστολογική μελέτη, είτε για την μελέτη έκφρασης του LacZ.

Μήτρα

Απομονώνεται η μήτρα, από την μία ωοθήκη έως την άλλη. Ένα μικρό κομμάτι του ιστού φυλάσσεται για την απομόνωση RNA. Εάν προορίζεται για ιστολογική μελέτη, το υπόλοιπο τμήμα του ιστού τοποθετείται πάνω σε φελλό παραλληλόγραμμου σχήματος και το ένα του άκρο κλείνεται με καρφίτσα. Από το άλλο άκρο γίνεται έγχυση διαλύματος PBS μέχρι ο ιστός να φουσκώσει και να αποκτήσει σωληνοειδές σχήμα. Κλείνεται και το άλλο άκρο με καρφίτσα και μεταφέρεται ο ιστός, μαζί με τον φελλό, σε σωληνάριο με φορμαλίνη. Για μελέτη έκφρασης LacZ ο ιστός φουσκώνεται με διάλυμα PBS/OCT 1:1, χωρίς να κλείσουν τα άκρα, λόγω του ότι το διάλυμα επειδή περιέχει OCT είναι πιο πυκνό και δεν διαφεύγει εύκολα, και ενσωματώνεται σε OCT.

Εγκέφαλος

Αφαιρούμε το τρίχωμα, το δέρμα και τα αυτιά από το κεφάλι του ζώου. Κόβουμε το κεφάλι ακριβώς στο σημείο που ενώνεται με την σπονδυλική στήλη. Με πολύ λεπτό ψαλίδι κόβουμε το περίβλημα του εγκεφάλου στην μέση, με πολύ προσοχή να μην τραυματίσουμε τον ιστό που βρίσκεται από κάτω. Απομονώνουμε τον εγκέφαλο. Η παρεγκεφαλίδα φυλάσσεται για την απομόνωση RNA. Ο υπόλοιπος ιστός φυλάσσεται ανάλογα με την μετέπειτα χρήση του, είτε για ιστολογική μελέτη, είτε για την μελέτη έκφρασης του LacZ.

Μυελός των οστών

Έχοντας αφαιρεθεί το κεφάλι, κόβουμε το ποντίκι και πάνω από τα πίσω πόδια. Με σύριγγα που έχει ειδικό στόμιο βρίσκουμε, από την κάτω πλευρά, το άκρο της σπονδυλικής στήλης. Εγχέεται PBS με πίεση, έως ότου βγει από το άλλο άκρο ο μυελός των οστών. Ένα μικρό τμήμα του ιστού φυλάσσεται για την απομόνωση RNA. Ο υπόλοιπος ιστός φυλάσσεται ανάλογα με την μετέπειτα χρήση του, είτε για ιστολογική μελέτη, είτε για την μελέτη έκφρασης του LacZ.

Συλλογή εμβρύων

Σκοτώνεται με ευθανασία, με χρήση ξηρού πάγου, το έγκυος ποντίκι. Απομονώνεται όλη η μήτρα, μέσα στην οποία αναπτύσσονται τα έμβρυα, και τοποθετείται σε πιάτο καλλιέργειας, στο οποίο υπάρχει μικρή ποσότητα PBS. Η μήτρα με τα έμβρυα έχει την μορφή κομπολογιού, με κάθε έμβρυο να αντιστοιχεί σε μία χάντρα. Διαχωρίζονται τα έμβρυα με νυστέρι, και με την βοήθεια στερεοσκοπίου αφαιρούνται, προσεκτικά για να μην τραυματιστεί το έμβρυο, οι δύο μεμβράνες που το περιβάλλουν. Η εσωτερική μεμβράνη, η οποία δεν περιέχει γενετικό υλικό της μητέρας, μεταφέρεται σε σωληνάριο (500μl) που περιέχει tail buffer και πρωτεϊνάση K, ώστε να ακολουθήσει η απομόνωση DNA από τον ιστό και γονοτύπηση του εμβρύου. Εναλλακτικά, εάν το έμβρυο είναι σχετικά μεγάλο (πχ εμβρυική μέρα 17,5) κόβεται λίγη ουρά για απομόνωση DNA. Φωτογραφίζεται το έμβρυο και έπειτα μεταφέρεται σε σωληνάριο (500μl) με φορμαλίνη (4%) για 24 ώρες. Μετά αντικαθίσταται η φορμαλίνη με PBS και αποθηκεύεται στους 4 °C. Τα έμβρυα τοποθετούνται σε κασέτες, έπειτα παραφινοποιούνται σε ένα ειδικό

μηχάνημα και στην συνέχεια ακολουθεί σκίνωση με υγρή παραφίνη, και χρησιμοποιούνται για την ιστολογική μελέτη.

2.4 Μέθοδοι

2.4.1 Απομόνωση DNA

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της φαινόλης βασίζεται στην ισχυρή πρωτεολυτική δράση της πρωτεάσης K συνδυασμένης με την ικανότητα αποδιάταξης του ιονικού αντιδραστηρίου SDS (δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου). Σύμφωνα με το βασικό πρωτόκολλο, στο τμήμα του ιστού προστίθεται διάλυμα πρωτεάσης K και SDS κι αφήνεται προς επώαση έως ότου το μεγαλύτερο ποσοστό της κυτταρικής πρωτεΐνης αποσυντεθεί. Κατόπιν το δείγμα υφίσταται αποπρωτεΐνωση με την προσθήκη φαινόλης και εν συνεχεία προστίθεται ισοπροπανόλη για την εξαγωγή και καταβύθιση του DNA.

Μέθοδος

- Ονοματίζεται ο ποντικός
- Κόβεται 0,5- 1 cm ουράς και τοποθετείται σε σωληνάρια (eppendorf) του 1,5ml
- Προστίθενται 400 μl διάλυμα λύσης , με 4 μl πρωτεΐνάση (proteinase) K σε κάθε σωληνάριο
- Επωάζεται όλη την νύχτα στους 55°C σε υδατόλουτρο, έως ότου είναι ορατό μόνο το τρίχωμα της ουράς. Αν το δείγμα αποθηκευτεί σε αυτό το στάδιο προστίθεται διάλυμα λύσης χωρίς πρωτεΐνάση K και καταψύχεται στους -20°C
- Προστίθενται 400 μl φαινόλη σε κάθε σωληνάριο
- Αναδεύεται πολύ ισχυρά για 5 min
- Φυγοκεντρείται για 10 min στις 13.000 rpm
- Με ιδιαίτερη προσοχή μεταφέρονται 300 μl από την πάνω φάση σε καθαρά σωληνάρια του 1,5ml
- Προστίθενται 300 μl (0.9 του όγκου που πήραμε) ισοπροπανόλη σε κάθε σωληνάριο και ανακινούνται προσεκτικά.

- Εάν δεν είναι σίγουρο ότι περιέχεται καθαρό DNA ή εάν το άσπρο ίζημα δεν είναι ορατό μετά την προσθήκη της ισοπροπανόλης, τα σωληνάρια τοποθετούνται στους -20°C για 15 min.
- Φυγοκεντρούνται τα σωληνάρια στα 16.200 g στους 4°C για 15 min.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο, πλένεται το ίζημα με 500 µl 70% αιθανόλη.
- Φυγοκεντρούνται τα σωληνάρια στα 16.200 g στους 4°C για 5-10 min.
- Αναρροφάται το υπερκείμενο (με προσοχή, να μην αναρροφηθεί το ίζημα)
- Αφήνεται σε ξηρό αέρα
- Τέλος προστίθεται ddH₂O (Gibco) νερό στο ίζημα (ο προστιθέμενος όγκος εξαρτάται από την μάζα του DNA, δηλαδή το μέγεθος του ιζήματος. Συνήθως είναι 50 µl)
- Αποθηκεύονται στους 4°C αν πρόκειται να επεξεργαστούν σύντομα ειδάλλως για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα στους -20°C.

Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου.

❖ Διάλυμα λύσης (Tail Buffer) 1L

Tris pH 8,0 1M 50 ml (50 mM τελική συγκέντρωση)

EDTA 0,5 M 200 ml (100 mM τελική συγκέντρωση)

NaCl 5 M 20 ml (100 mM τελική συγκέντρωση)

ddH₂O 630 ml

Φίλτρο 0,22µm, αποστείρωση

SDS 10% 100 ml (1% τελική συγκέντρωση)

Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

❖ Πρωτεϊνάση K, Proteinase K (10 mg/ml)

100 mg Proteinase K

10 ml 50mM Tris pH 8.0

Καλή ανάδευση, διαιρείται σε κλάσματα των 500 μL

Φυλάσσεται στους -20°C .

2.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μέθοδος για την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Μέσω της PCR καθίσταται δυνατή η παραγωγή τεράστιου αριθμού πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με σχετικά απλό τρόπο. Η αντίδραση PCR σχεδιάστηκε και παρουσιάστηκε από τον Dr K. Mullis το 1983. Το 1989 το περιοδικό Science επέλεξε την PCR σαν το "μέγιστο επιστημονικό επίτευγμα" και την Taq DNA πολυμεράση σαν το "μόριο της χρονιάς". Το 1993 ο K.Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας. Η αντίδραση PCR εκμεταλλεύεται ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του DNA με σκοπό την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για την σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλωνα μόρια μπορούν να παραχθούν με απλό τρόπο από δίκλωνα μόρια DNA, όταν αυτά θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες, οπότε αποχωρίζονται. Η DNA πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Επομένως το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA μπορεί να καθοριστεί με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδικού εναρκτήριου μορίου (εκκινητή, primer) που συνδέεται με τη μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Σημαντικό χαρακτηριστικό της αντίδρασης PCR είναι ότι μπορούμε μέσω των κατάλληλων εκκινητών να κατευθύνουμε την DNA πολυμεράση να συνθέσει συγκεκριμένη περιοχή του DNA. Και οι δύο κλώνοι του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία για την σύνθεση DNA, εφόσον υπάρχει ένας εκκινητής για κάθε μία αντίδραση. Ακόμη ένα χαρακτηριστικό της αντίδρασης PCR είναι η εκθετική "ενίσχυση" της συγκεκριμένης περιοχής του DNA-στόχου. Το τελικό αποτέλεσμα μιας αντίδρασης PCR μετά από n κύκλους είναι η παραγωγή, θεωρητικά, 2^n δίκλωνων μορίων DNA, που είναι πιστά αντίγραφα της αλληλουχίας του DNA που περικλείεται μεταξύ των εκκινητών. Ένα τυπικό πρωτόκολλο

PCR περιλαμβάνει πολλούς κύκλους (συνήθως 25-35), ο καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες με βάση τα ακόλουθα βήματα:

- Αποδιάταξη (denaturation) Το μίγμα θερμαίνεται αρχικά στους 95°C για περίπου 5 min. Σε αυτή τη θερμοκρασία τα δίκλωνα μόρια DNA αποχωρίζονται τελείως και έτσι παράγονται οι μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμεύσουν ως εκμαγεία για τους εκκινητές και τη DNA πολυμεράση.

- Υβριδισμό (annealing). Στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώνεται ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μόρια του μονόκλωνου DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εξειδίκευση της αντίδρασης PCR. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι που χρησιμοποιούνται ποικίλουν ανάλογα με τις αλληλουχίες που ενισχύονται.

- Επέκταση (extension) Στο επόμενο βήμα η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, περιοχή βέλτιστης θερμοκρασίας για την θερμοσταθερή Taq DNA πολυμεράση, ώστε να εκτελέσει τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσού DNA. Ο χρόνος επώασης στους 72°C ποικίλει ανάλογα με το μήκος του τμήματος στόχου που θέλουμε να ενισχύσουμε.

- Τέλος, η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι στους 95°C, μόνο για λίγα δευτερόλεπτα, έτσι ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA (που αποτελούνται από την αρχική και τη νεοσυντιθέμενη συμπληρωματική αλυσίδα) να αποχωριστούν και πάλι. Αυτές οι μονόκλωνες αλυσίδες αποτελούν τα εκμαγεία για τον επόμενο γύρο σύνθεσης DNA και επαναλαμβάνονται συνήθως 25-35 κύκλοι αποχωρισμού των αλυσίδων, υβριδισμού των εκκινητών και σύνθεσης DNA. Ο χρόνος προέκτασης του τελικού κύκλου είναι συνήθως μεγαλύτερος (~5min) έτσι ώστε να δοθεί χρόνος στην πολυμεράση για την ολοκλήρωση της προέκτασης όλων των προϊόντων

Μέθοδος

1.Το αρχικό υλικό για μία αντίδραση PCR είναι δείγμα DNA το οποίο περιέχει την αλληλουχία-στόχο. Δεν είναι απαραίτητο να έχει απομονωθεί μόνο η αλληλουχία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί διότι αυτή μπορεί να καθορισθεί από τους εκκινητές που

χρησιμοποιούνται στην αντίδραση. Έτσι πρώτα, προστίθεται 1μl (80ng) του προτύπου DNA στο κατάλληλο σωλήνα.

2.Οι εκκινητές ήταν αποθηκευμένοι στους -20°C σε συγκέντρωση 100 pmol/μL. Από αυτούς ένα μέρος αραιώθηκε σε τελική συγκέντρωση 5 pmol/μL για χρήση στα πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Συγκεκριμένα σε σωληνάρια τύπου errendorf 1.5 mL, προστέθηκαν 5 μL του αντίστοιχου εκκινητή και 95 μL H₂O.

3.Στη συνέχεια προστίθενται τα συστατικά με την ακόλουθη σειρά: αποστειρωμένο mH₂O, 10x Buffer PCR, MgCl₂, dNTPs, εκκινητές και στη συνέχεια προστίθεται η Taq πολυμεράση. Ανακίνηση του διαλύματος και διανομή 19 μl σε κάθε σωλήνα. Ένα γενικό πρωτόκολλο εργασίας περιγράφεται στον πίνακα 2.1

Πίνακας 2.1 Ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
Εκμαγείο DNA	1
Taq πολυμεράση	0.4
10x buffer	2
dNTPs	2
MgCl ₂	1.2
Εκκινητής 1	1
Εκκινητής 2	1
dsH ₂ O	11.4
Συνολικός όγκος	20

4.Τέλος εκτελείται το κατάλληλο πρόγραμμα. Η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing temperature), εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις GC. Όταν το μήκος των εκκινητών δεν είναι μεγαλύτερο των 20 βάσεων, η θερμοκρασία τήξης μπορεί να προσεγγισθεί από τον τύπο: $T_m = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C}$. Η γνώση της T_m βοηθά κυρίως για τον καθορισμό του πειραματικού σημείου έναρξης της βελτιστοποίησης. Θερμοκρασία 55°C είναι καλή για αρχή, όσον αφορά ένα τυπικό ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή 20 βάσεων με περίπου 50% σύσταση σε GC. Μεγαλύτερες θερμοκρασίες μπορεί να είναι απαραίτητες προς αύξηση της ειδικότητας του εκκινητή.

Ως καλύτερη θερμοκρασία υβριδοποίησης επιλέγεται συνήθως η υψηλότερη θερμοκρασία που δίνει τα καλύτερα προϊόντα. Η πολύ μεγάλη μοριακή περίσσεια των εκκινητών στο μίγμα της αντίδρασης καθιστά δυνατή την υβριδοποίηση σχεδόν στιγμιαία και δεν απαιτείται περαιτέρω επώαση στη θερμοκρασία υβριδισμού.

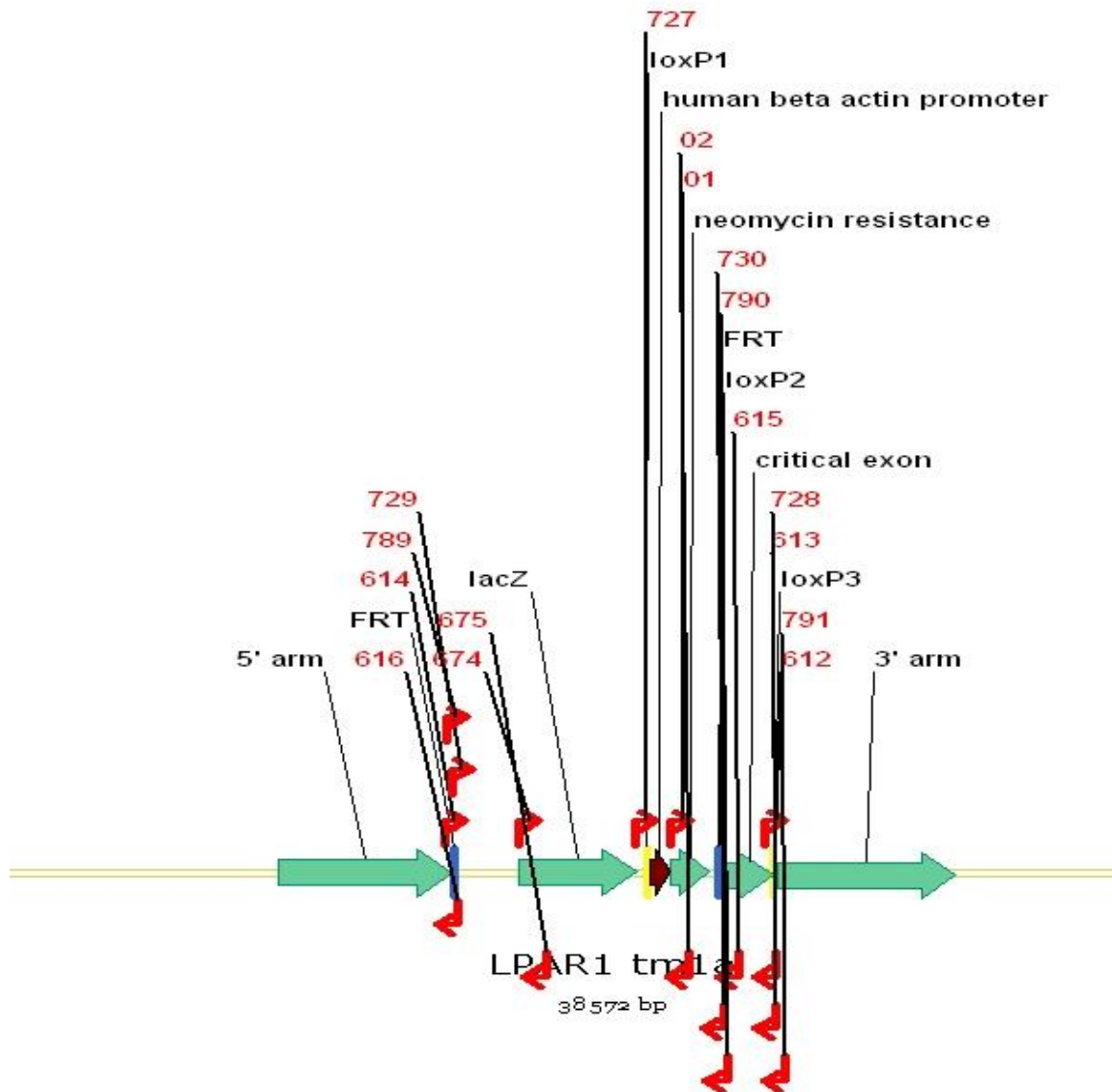
Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου.

- ❖ **Taq πολυμεράση:** Το *Thermus aquaticus*, ένα θερμόφιλο βακτήριο, απομονώθηκε στο Yellowstone National Park και περιγράφηκε 20 χρόνια πριν την ανακάλυψη της Taq πολυμεράσης. Η Taq πολυμεράση είναι το πιο δημοφιλές ένζυμο για χρήση στην PCR. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ενζυμική δράση της Taq πολυμεράσης είναι οι 72°C, αλλά είναι αρκετά σταθερή ακόμα και στους 94°C. Προστίθεται μόνο μία φορά στην αρχή της αντίδρασης και παραμένει ενεργός σε όλη την διάρκεια των κύκλων, καθιστώντας δυνατή την αυτοματοποίηση της PCR με την χρήση ειδικών οργάνων, των θερμικών κυκλοποιητών (thermal cyclers).
- ❖ **Εκκινητές, primers:** Ο σχεδιασμός και η επιλογή ενός ικανού και ειδικού εκκινητή αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της αντίδρασης PCR. Αν και δεν υπάρχουν συγκεκριμένοι κανόνες οι οποίοι να βοηθούν στην επιλογή ενός αποτελεσματικού ζεύγους εκκινητών, υπάρχουν ειδικά λογισμικά προγράμματα (Primer Blast) που βοηθούν αρκετά στην επιλογή. Είναι φανερό ότι οι εκκινητές είναι αυτοί που θα οδηγήσουν στην επιτυχία ή αποτυχία της αντίδρασης, περισσότερο από κάθε άλλον παράγοντα. Η μοριακή αναλογία των εκκινητών ως προς το DNA στόχο πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη. Οι εκκινητές διατηρούνται σε απόθεμα 100pmol/μl. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται είναι 5pmol/μl. Στον πίνακα 2.2 παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 2.2: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

	Number	Primer length/ Melting temperature	Sequence (5'→3')	Product length	Gene	Thermocycler conditions
Forward Primer (Lpar1- fwd)	612	24 bp T _m =64.4°C	5'GAGG ATGTCT CGGCAT AGTTCT GG 3'	318bp	Lpar1 tm1a allele (1 st genotyping option)	95°C for 3 min 95°C for 30 s 62°C for 30 s } x30 72°C for 1 min 72°C for 3 min
Reverse primer (loxP- rev)	613	23 bp T _m =64.2°C	5'TGAA CTGATG GCGAG CTCAGA CC 3'			
Forward Primer (Lpar1- 5'arm)	614	24 bp T _m =64.4°C	5'CGTTC TCAAGA GTCTCA CGTTGG G 3'	688bp(Lpar1-5'arm/Lpar1- 3'arm) 380bp(Lpar1-5'arm/LAR3)	Lpar1 tm1a allele (2 nd genotyping option)	
Reverse primer (Lpar1- 3'arm)	615	24 bp T _m =62.7°C	5'GAAG CACTGT TGTTCT TTCATG GC 3'			
Reverse Primer (LAR3)	616	22 bp T _m =60.3°C	5'CAAC GGGTTC TTCTGT TAGTCC 3'			
Forward Primer (Tm1b_p rom_F)	727	20 bp T _m =60.5°C	5'CGGT CGCTAC CATTAC CAGT 3'	380 bp	Lpar1 tm1b allele	94°C for 5 min 94°C for 30 s 58°C for 30 s } x30 72°C for 45 s 72°C for 5 min
Reverse Primer (Floxed LR)	728	20 bp T _m =62.5°C	5'ACTG ATGGCG AGCTCA GACC 3'			
Forward Primer	789	20 bp T _m =58.4°C	5'GGA TGC TAT TCT GGG GATGA'	325 bp και 434 bp(789,790) 1,961bp (789-791) 564bp(789-791)	Lpar1 tm1c allele Lpar1 tm1d allele	95°C for 5 min 95°C for 30 s 60.7°C for 30 s } x30 72°C for 45 s 72°C for 5 min
Reverse Primer	790	20 bp T _m =54.3°C	5'ATA CCC AATGCA GCCAAA AA 3'			
Reverse Primer	791	23 bp T _m =59.3°C	5'TCATG GACACT TGGACT AATGAA 3'			

Forward Primer	710	20bp	5'GAGA AGAAC GGCATA GTGCG 3'	600bp	Flpe	94°C for 5 min 94°C for 30 s 58°C for 30 s } x30 45°C for 45 s 72°C for 5 min
Reverse Primer	711	21bp	5'GACA AGCGTT AGTAG GCACAT 3'			
Forward Primer	725	20bp	5'CATT GGGCC AGCTAA ACAT 3'	233bp	Cre	94°C for 5 min 94°C for 30 s 58°C for 30 s } x30 45°C for 45 s 72°C for 5 min
Reverse Primer	726	20bp	5'TAAG CAATCC CCAGAA ATGC3'			
Forward Primer	674	24bp	5'GATC CCGTCC TTTTAC AACGTC GT3'	715bp	LacZ	95°C for 5 min 95°C for 30s 59°C for 40s } x30 72°C for 1 min 72°C for 5 min
Reverse Primer	675	24bp	5'GAAC TTCAGC CTCCAG TACAGC GC3'			
Forward Primer	1	21bp	5'ATTG AACAA GATGG ATTGCA C3'	400bp	Neomycin	94°C for 5 min 94°C for 30s 55°C for 40s } x30 72°C for 1 min 72°C for 5 min
Reverse Primer	2	19bp	5'CGT CCA GAT CAT CCT GAT C 3'			



Σχήμα 2.1: παριστάνονται οι θέσεις σύνδεσης των εκκινήτων, που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του γονότυπου.

- ❖ **Συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} σε μορφή $MgCl_2$:** Η τελική συγκέντρωση που χρησιμοποιείται είναι 25mM. Η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} έχει μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα και στη ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR. Σε κάθε πρωτόκολλο πρέπει να γίνεται βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης ιόντων Mg^{2+} . Συγκεντρώσεις περίπου 1,5mM είναι συνήθως βέλτιστες, αλλά σε μερικές περιπτώσεις διαφορετικές συγκεντρώσεις Mg^{2+} μπορεί να αποδειχθούν απαραίτητες. Γενικά, περίσσεια Mg^{2+} θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση μη ειδικού προϊόντος, ενώ έλλειψη Mg^{2+} θα μειώσει την ποσότητα του προϊόντος.

Για 5ml: $MgCl_2$ 0.5M: 0.25ml

Gibco H_2O : 4.75ml

- ❖ **Συγκέντρωση τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοζιτών (dNTPs), 100mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP.** Τα dNTPs (δηλ. dATP, dCTP, dGTP και dTTP) αποτελούν τα απαραίτητα συστατικά για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA στην αντίδραση PCR. Στην αντίδραση PCR οι συγκεντρώσεις των dNTPs κυμαίνονται μεταξύ 50-200μM. Υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή παραπροϊόντων από την πολυμεράση και πρέπει ν' αποφευχθούν. Η τελική συγκέντρωση που χρησιμοποιείται είναι 2.5mM.

Για 500μl: Gibco H_2O : 450 μl

dATP: 12.5 μl

dCTP: 12.5 μl

dGTP: 12.5 μl

dTTP: 12.5 μl

❖ **10x PCR Buffer** : Για 5ml : KCl 1M: 2.5ml

Tris HCl pH 9.0 1M: 0.5ml

Gibco H₂O: 1.95ml

Filter 0.2μm or autoclave

1% Triton X-100: 5

2.4.3 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πραγματικού χρόνου (Real Time qPCR)

Αρχή της Μεθόδου

Η μέτρηση του επιπέδου έκφρασης ενός συγκεκριμένου μεταγράφου και η σχετική αλλαγή στην έκφραση του μετά από φαρμακολογική ή γονοτυπική διαχείριση, πραγματοποιείται με την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πραγματικού χρόνου υψηλής απόδοσης (qPCR). Η μέθοδος παρακολούθησης φθορισμού είναι η SYBR® Green η οποία αποτελεί το φθοροφόρο αναφοράς. Λειτουργεί σαν το βρωμιούχο αιθίδιο με τη σύνδεση της με τη διπλή έλικα DNA, η οποία είναι το προϊόν της PCR. Καθώς ο κύκλος της αντίδρασης προχωρά, καταγράφεται η αύξηση του φθορισμού έναντι του χρόνου. Η SYBR® Green απαιτεί ένα συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών εκτός από τα επιπρόσθετα συστατικά της PCR.

Υπάρχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα σε κάθε μία από τις χρωστικές που χρησιμοποιούνται για qPCR. Ένα βασικό πλεονέκτημα της SYBR® Green είναι ότι η αρχική προετοιμασία απαιτεί μόνο λίγες ημέρες για το σχεδιασμό των εκκινητών. Επίσης, η SYBR® Green είναι σημαντική ως προς ευαισθησία σε >10 αντίγραφα, επειδή η χρωστική αναφοράς προσδένεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA που υπάρχει στην αντίδραση, με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται το προϊόν PCR σε προηγούμενους κύκλους και αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση των μεταγράφων χαμηλής αφθονίας (> 10 αντίγραφα). Ένα μειονέκτημα της χρωστικής αυτής είναι τα μη-ειδικά προϊόντα και mRNAs με υψηλή ταυτότητα αλληλουχίας που μπορεί να ανιχνεύονται λόγω της ιδιότητας δέσμευσης στο δίκλωνο DNA.

Ένας από τους πειραματικούς ελέγχους που περιλαμβάνει η δοκιμασία έκφρασης των γονιδίων είναι ο εσωτερικός έλεγχος. Χρησιμοποιείται για την εξομάλυνση της τιμής σήματος του κάθε δείγματος, έτσι ώστε οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων να είναι το αποτέλεσμα μιας πραγματικής βιολογικής διαφοράς και όχι λόγω της ασυνεπούς φόρτωσης. Τα γονίδια αναφοράς, τα οποία αναφέρονται ως housekeeping γονίδια, επιλέγονται για τον εσωτερικό έλεγχο εξαιτίας κυρίως της σταθερότητας στα επίπεδα έκφρασης σε όλους τους τύπους κυττάρων. Ωστόσο, εξαιτίας της πολύ υψηλής έκφρασης τους, η συγκέντρωση του προτύπου εκκίνησης σε μία qPCR πρέπει να είναι χαμηλή, και η ανίχνευση του γονιδίου ενδιαφέροντος μπορεί να χαθεί στη χαμηλότερη ποσότητα του προτύπου. Η επιλογή της ενδογενούς αναφοράς, ως εκ τούτου, θα πρέπει να είναι καθοριστεί εμπειρικά και με βάση το σύστημα που βρίσκεται υπό μελέτη.

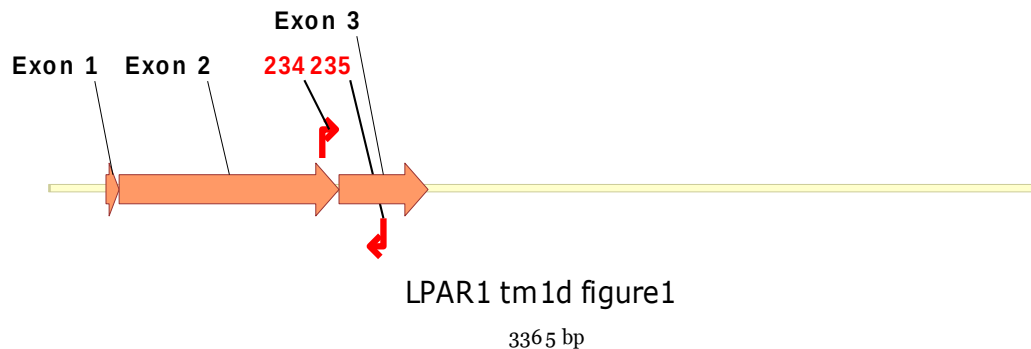
Ίσως ο πιο σημαντικός παράγοντας της ανάλυσης qPCR είναι η επιλογή και η επικύρωση των ακολουθιών ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών. Θα πρέπει να είναι πολύ ειδική, η οποία μπορεί να είναι δύσκολη όταν πρόκειται για ισομορφές ή παραλλαγές ματίσματος. Ένα ζεύγος εκκινητών που έχει χρησιμοποιηθεί σε συμβατική, ανάλυση τελικού σημείου PCR μπορεί να μην επαρκεί για ποσοτικές μετρήσεις. Το ζεύγος των εκκινητών θα πρέπει να περάσει μια σειρά παραμέτρων επικύρωσης. Ένα μειονέκτημα της qPCR πάνω στην ανάλυση είναι ότι δεν μπορεί να ανιχνεύσει την ποιότητα (δηλαδή, το μέγεθος) ενός μηνύματος RNA, τον αριθμό των διαφορετικού μεγέθους μηνυμάτων (π.χ. ματίσματος-παραλλαγές), ή τα επίπεδα έκφρασης του σε σχέση με το άλλο. Ένα γενικό πρωτόκολλο εργασίας περιγράφεται στον πίνακα 2.3

Πίνακας 2.3: Ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης QPCR

Αντιδραστήριο	Όγκος(μl)
Εκμαγείο cDNA	1
Εκκινητής 1	1
Εκκινητής 2	1
dsH ₂ O	2
Eva Green	10
Συνολικός όγκος	20

Πίνακας 2.4: Αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν

	Number	Primer length	Sequence (5'→3')	Product length	Target sequence	
Forward Primer (LPA1 mus S)	234	21bp	5' GAGGAAT CGGGACACCATGAT 3'	227bp	Exon2	Lpar1 tm1d allele
Reverse Primer (LPA1 mus AS)	235	18bp	5' TGAAGG TGGCGCTCATCT 3'		Exon3	
Forward Primer	111	21bp	5'TTCTGGTGC TTGTCTCACTGA3'	104bp		B2M
Reverse Primer	112	22bp	5'CAGTATGTT CGGCTTCCCATTTC3'			



Σχήμα 2.2: Η περιοχή στόχευσης του ζεύγους εκκινήτων 234/235, στο αλληλόμορφο tm1d του γονιδίου Lpar1.

Ποσοτικοί Τύποι Ανάλυσης

Υπάρχουν τρεις ποσοτικές μέθοδοι: η απόλυτη πρότυπη καμπύλη, η σχετική τυπική καμπύλη, και οι συγκριτικοί μέθοδοι χρόνου κύκλου (Ct) [Applied Biosystems, 2003]. Στο παρόν, περιγράφουμε μεθόδους για τη σχετική πρότυπη καμπύλη και τη συγκριτική Ct (ονομάζεται επίσης ΔCt).

Η σχετική τυπική μέθοδος καμπύλης χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ποσότητας ενός συγκεκριμένου μετάγραφου σε μια ομάδα δειγμάτων. Απαιτεί ότι μια σειρά αραίωσης ενός προτύπου cDNA περιλαμβάνονται για κάθε γονίδιο σε κάθε πιάτο. Για τη σχετική ποσοτικοποίηση, οι τιμές συγκέντρωσης του προτύπου είναι αυθαίρετες. Οι ποσότητες παρεμβολής από την προκύπτουσα πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των σχετικών επιπέδων mRNA σε κάθε άγνωστο δείγμα.

Η συγκριτική μέθοδος Ct (ή ΔCt) χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση σχετικών μεταβολών στα επίπεδα mRNA μεταξύ δύο δειγμάτων, και δεν απαιτείται η χρήση σειρών αραίωσης προτύπου. Αυτό απαιτεί την ενίσχυση των αποδόσεων των γονιδίων που συγκρίνονται να είναι ίδια. Προκειμένου να παρεμβάλλονται πρότυπες ποσότητες, χρησιμοποιούνται για τους υπολογισμούς οι χρόνοι του κάθε κύκλου.

2.4.4 PCR μεγάλης εμβέλειας (Long-range PCR, LR-PCR)

Αρχή της μεθόδου

Από την έναρξή της, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) έχει γίνει ένα από τα πιο απαραίτητα εργαλεία στη μοριακή βιολογία, για την ενίσχυση θραυσμάτων DNA. Ωστόσο οι παραδοσιακές αντιδράσεις PCR περιορίζονται από το μέγεθος των ενισχυμένων προϊόντων (λιγότερο από 1000 bp). Μεγαλύτερα προϊόντα μπορούν να συντεθούν σε χαμηλά ή αναποτελεσματικά επίπεδα και στη συνέχεια κανονικά, μετά από σημαντική και χρονοβόρα προσπάθεια βελτιστοποίησης της αντίδρασης. Το 1992, ο Barnes [63], ανέπτυξε νέες συνθήκες PCR, για να καταστεί δυνατή η ενίσχυση θραυσμάτων μέχρι 5 kb. Η LR-PCR αύξησε το μέγεθος των αμπλικονίων από 3-5 kb σε πάνω από 30 kb με τροποποίηση των πολυμερασών.

Ενώ η Taq DNA πολυμεράση έχει παραμείνει η θερμοσταθερή πολυμεράση επιλογής για τις περισσότερες PCR, αυτό το ένζυμο δεν είναι αποτελεσματικό στην ενίσχυση μεγάλων τμημάτων DNA. Ο περιορισμός αυτός, πιστεύεται, ότι οφείλεται στην επιρρεπή σε λάθη φύση της Taq πολυμεράσης, οπότε οι εν λόγω μεταγραφές που καταλήγουν σε ένα λάθος (μια κακώς ενσωματωμένη βάση) δεν ξαναρχίζουν, ούτε επεκτείνονται, αποτελεσματικά. Ο συνδυασμός δύο θερμοσταθερών DNA πολυμερασών, όπως η Taq και ένα άλλο ένζυμο με ανώτερη ικανότητα επεξεργασίας (διορθωτικό), ελαχιστοποιεί την λανθασμένη ενσωμάτωση και διευκολύνει την ενίσχυση των μακρών (φέρεται πάνω από 40 kb) PCR προϊόντων.[62]

Πολλαπλές DNA πολυμεράσες μεγάλης εμβέλειας είναι εμπορικά διαθέσιμες, για την ενίσχυση μεγάλων γονιδιακών θραυσμάτων. Μερικές από αυτές διαφημίζονται να είναι σε θέση να ενισχύσουν μέχρι και 15 kb ή και μεγαλύτερο γονιδιωματικό DNA και μπορούν να λειτουργήσουν καλά για συγκεκριμένες γονιδιωματικές περιοχές, κάτω από εξαιρετικά βελτιστοποιημένες συνθήκες. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά στη βιβλιογραφία (εκτός από το φυλλάδιο του κατασκευαστή), σχετικά με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα του κάθε ενζύμου, και δεν είναι δεδομένη η πραγματική επίδοση τους στα τυχαία επιλεγμένα αμπλικόνια.

Φυσικά αυτές οι τεχνικές πρόοδοι, έχουν φέρει την ταχύτητα και την απλότητα της PCR για γενωμική χαρτογράφηση και αλληλούχιση, και έχουν διευκολύνει τις μελέτες στη μοριακή γενετική. Όταν συνδυάζεται με αλληλούχιση, η PCR μεγάλης εμβέλειας μπορεί να επιτύχει υψηλότερη ευαισθησία και να προσφέρει ένα ταχύτερο και πιο αποδοτικό οικονομικά εργαλείο για την ανίχνευση γενετικών παραλλαγών.[64]

Μέθοδος

- Ξεπαγώνουμε τα συστατικά :10x LongRange PCR Buffer, μείγμα των dNTPs, εκκινητές, μίγμα ενζύμων, RNase-free νερό.
- Ετοιμάζουμε το μίγμα της αντίδρασης

Πίνακας 2.5: Ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης LR-PCR.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
Εκμαγείο DNA	Variable (50-500ng)
Longrange PCR Enzyme Mix	0.4
Longrange PCR Buffer 10x	5
dNTP mix	2.5
Εκκινητής 1 (10pmol/μl)	2
Εκκινητής 2(10pmol/μl)	2
RNase-free water	Variable
Συνολικός όγκος	50

- Ανακατεύουμε το μείγμα της αντίδρασης πολύ καλά με πιπτετάρισμα πάνω και κάτω. Μοιράζουμε τους κατάλληλους όγκους σε σωληνάρια PCR.
- Προσθέτουμε εκμαγείο DNA σε κάθε σωληνάριο που περιέχει μείγμα αντίδρασης. Ο τελικός όγκος σε κάθε σωληνάριο είναι 50μl.
- Τέλος εκτελείται το κατάλληλο πρόγραμμα στον θερμοκυκλοποιητή. Τα σωληνάρια τοποθετούνται αμέσως σε έναν θερμοκυκλοποιητή, ο οποίος είναι προθερμασμένος στους 93⁰C και αρχίζει το πρόγραμμα. Αυτή η απλοποιημένη θερμή εκκίνηση (hot start) βεβαιώνει την ειδικότητα της PCR.

Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου

❖ LongRange PCR Enzyme Mix (Qiagen LongRange PCR Kit)

Είναι ένα μίγμα ανασυνδυασμένων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών υψηλής καθαρότητας και παραγόντων ενίσχυσης της επεξεργασιμότητας, κλωνοποιημένο σε E.coli.

Συγκέντρωση: 5 units/μl. Αναφέρεται στο ποσό της Taq DNA πολυμεράσης ανά μικρόλιτρο του LongRange Enzyme Mix, παρόλο που η ειδική δράση (ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου) της Taq DNA πολυμεράσης σε συνδυασμό με τα άλλα ένζυμα, είναι υψηλότερη από την ειδική δράση της καθαρής Taq DNA πολυμεράσης στην ίδια συγκέντρωση.

❖ **LongRange PCR Buffer, 10x (Qiagen LongRange PCR Kit)**

Συμπυκνωμένο 10x, περιέχει 25 mM Mg²⁺

❖ **dNTP mix (Qiagen LongRange PCR Kit)**

10 mM από κάθε ένα: dATP, dCTP, dGTP, dTTP

❖ **RNase-free water: (Qiagen LongRange PCR Kit)**

Ultrapure quality, PCR-grade

❖ **LongRange Enzyme Mix (Qiagen LongRange PCR Kit)**

Tris·HCl pH 8.0 (στους 25°C), KCl, EDTA, DTT, 50% γλυκερόλη, Tween® 20, Igepal® CA-630

❖ **Εκκινητές, primers:**

Οι εκκινητές διατηρούνται σε απόθεμα 100 pmol/μl. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται είναι 5 pmol/μl. Στον πίνακα 2.6 παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 2.6: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

	Number	Primer length	Sequence (5'→3')	Product length	Gene	Thermocycler conditions
Forward Primer	617	24bp	5'TCATTCTC CTCTTAGGC TCAACC3'	7,509bp	5'arm Lpar1	93 °C for 3min 92 °C for 15s 65 °C for 30s (-1 °C/cycle) } 8 cycles 68 °C for 10min +20 sec
Reverse primer	618	24bp	5'TGGGATA GGTCACGT TGGTGTAGA3'			
Forward Primer	628	30bp	5'CCCATGGAT AGCC TATCCAC TCCCTCATGC3'	8,405bp	3'arm Lpar1	92 °C for 15s } 30 cycles 55 °C for 30s 68 °C for 10min (+20sec/cycle)
Reverse primer	630	24bp				
						68 °C for 9min Store at 4 °C

2.4.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης 2% σε TBE.

Αρχή της μεθόδου

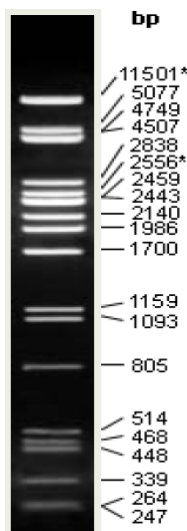
Η κυριότερη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (agarose gel electrophoresis). Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίσει μίγμα τμημάτων DNA, που δεν μπορούν να διαχωριστούν επαρκώς με άλλες μεθόδους. Στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA, σε ουδέτερο pH, είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων του. Έτσι, τα διάφορα μόρια DNA μετακινούνται, κατά την ηλεκτροφόρηση προς το θετικό ηλεκτρόδιο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους. Τα μικρότερα μόρια DNA, λοιπόν, μετακινούνται μέσα στην πηκτή πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα κι έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μήκους. Επειδή η πηκτή εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μήκους διαχωρίζονται σε "ζώνες". Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές κατόπιν σύνδεσης του DNA με ειδικά μόρια, τα οποία είναι κυρίως χημικές ουσίες όπως το βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide), SYBR green, SYBR gold, και που έχουν την ικανότητα να παρεμβάλλονται στην διπλή έλικα και να σχηματίζουν φθορίζοντα σύμπλοκα με το DNA. Έτσι, μπορεί να ανιχνευθεί ακόμα και ποσότητα 1 ng DNA με άμεση εξέταση του πηκτώματος κατόπιν διέγερσης με ακτινοβολία UV. Αν είναι απαραίτητο, οι ζώνες του DNA μπορούν να ανακτηθούν από το πηκτώμα και να χρησιμοποιηθούν για διάφορους σκοπούς.

Μέθοδος

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 2%

- Ζυγίζονται 5g αγαρόζης τοποθετούνται σε κωνική φιάλη των 500 mL και προστίθενται 250ml 1x TBE.
- Η φιάλη, το στόμιο της οποίας καλύπτεται με μεμβράνη στην οποία δημιουργούνται μικρές τρύπες, τοποθετείται σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα ή σε μικροκύματα και την αφήνουμε μέχρι να λιώσει η αγαρόζη και να δημιουργηθεί ένα διαφανές διάλυμα.

- Αφήνεται το διάλυμα να κρυώσει μέχρι τους 60°C και προσθέτουμε 8μL βρωμιούχο αιθίδιο.
- Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρό μεταλλαξογόνο και μέτρια τοξικό. Απαραίτητη η χρήση γαντιών όταν χρησιμοποιούνται διαλύματα που περιέχουν αυτή την χρωστική. Το βρωμιούχο αιθίδιο πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου μακριά από το φως.
- Τοποθετούμε την πλαστική χτένα 0.5-1.0mm πάνω από τον πλαστικό δίσκο, ώστε όταν προστεθεί το διάλυμα της αгарόζης να σχηματιστούν πηγαδάκια.
- Το διάλυμα της αгарόζης τοποθετείται προσεκτικά μέσα στο δίσκο ώστε να μην δημιουργούνται φουσαλίδες.
- Όταν η πηκτή είναι έτοιμη (χρειάζεται 55-60 min σε θερμοκρασία δωματίου) αφαιρούμε την χτένα και τοποθετούμε τον δίσκο μέσα στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης.
- Προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα TBE ώστε να βυθιστεί το πήκτωμα κατά 1 mm περίπου.
- Αναμιγνύουμε τα δείγματα του DNA με το gel-loading buffer, 20μl DNA με 4μl χρωστικής. Η αναλογία είναι 1:5 (Orange G: DNA). Με τη βοήθεια πιπέτας φορτώνουμε σε κάθε εγκοπή της πηκτής αгарόζης 10 μL κατά σειρά από τα δείγματα. Στο πρώτο πηγαδάκι φορτώνουμε μίγμα της χρωστικής με το DNA του θετικού μαρτύρα. Στο τελευταίο πηγαδάκι φορτώνουμε μίγμα χρωστικής με το τυφλό δείγμα (έχει H₂O αντι για DNA ως εκμαγείο), για να βεβαιωθούμε ότι δεν υπάρχει μόλυνση. Για να επιβεβαιώσουμε το μέγεθος των προϊόντων, χρησιμοποιείται δείκτης (Marker, *Pst*I-cut lambda DNA), τον οποίο φορτώνουμε μαζί με τα δείγματα.



Σχήμα 2.3: το γράφημα δείχνει το ποσοστό των ζωνών ανά ζώνη σε ng, που σχετίζεται με 0,5 μg φορτωμένου δείκτη. Χρησιμοποιείται ο ίδιος όγκος DNA και δείκτη. Επιπλέον, η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης στα δείγματα και στον δείκτη θα πρέπει να είναι ίδια.

Figure taken from: http://www.taq-dna.com/phage-lambda-dna-psti-digest-ready-to-use-_144.html

- Κλείνουμε τη συσκευή και επιλέγουμε τη φορά του πεδίου έτσι ώστε το DNA να μετακινείται προς την άνοδο (+). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 120 V για 40 min.
- Κλείνουμε το ρεύμα, βγάζουμε την πηκτή και την
- εξετάζουμε κάτω από UV. φως στα 312 nm.
- Βγάζουμε φωτογραφίες. Η φωτογράφιση των προϊόντων της ηλεκτροφόρησης γίνεται με χρήση ψηφιακής κάμερας, η οποία είναι συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή, οπότε είναι δυνατή η επεξεργασία της με χρήση ειδικού λογισμικού προγράμματος.

Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου.

❖ **Δείγματα DNA. (προϊόντα PCR)**

❖ **Ρυθμιστικό διάλυμα 10x TBE**

Tris base 108 gr (0.891M τελική συγκέντρωση)

Boric acid 55 gr (0,889M τελική συγκέντρωση)

EDTA 9.3 gr /0.5 M EDTA (pH 8.0) 40 ml (31,8mM τελική συγκέντρωση)

H₂O έως το 1 lt

TBE 10X διατηρείται σε RT.

❖ **Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml)**

❖ **Χρωστική Orange G (DNA loading buffer)**

15% ficoll, 0.25% orange

Ficoll 400 15gr (in a 500ml flask)

ddH₂O 30ml

θέρμανση στους 55°C για 15-20 λεπτά (αναμιγνύουμε κάθε 5 λεπτά έως ότου διαλυθεί)

ddH₂O έως τα 100 ml

Προσθέτουμε 0.25gr Orange G και αναμιγνύουμε καλά

Μοιράζονται σε erpendorfs και διατηρούνται στους -20°C.

❖ **Καθαρή αγαρόζη**

5g αγαρόζης

2.4.6 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης 0.7% σε TAE.

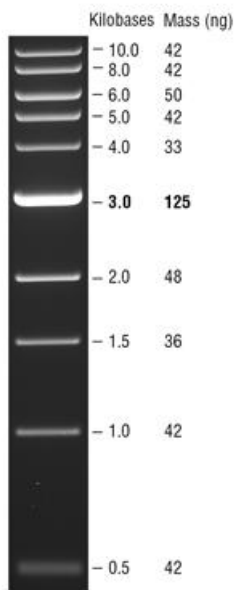
Μέθοδος

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 0,7%

- Ζυγίζονται 0,7g αγαρόζης τοποθετούνται σε κωνική φιάλη των 500 mL και προστίθενται 100ml 1x TAE.

Η υπόλοιπη διαδικασία είναι ίδια με την ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης 2% σε TBE, με διαφορά ότι χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα TAE αντί για το TBE.

- Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται υπό σταθερή τάση 41V, για 300 λεπτά.
- Για να επιβεβαιώσουμε το μέγεθος των προϊόντων, χρησιμοποιείται δείκτης (1kd DNA ladder), τον οποίο φορτώνουμε μαζί με τα δείγματα.



Σχήμα 2.4: 1 kb DNA Ladder, ορατός με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο σε μια πηκτή αγαρόζης 0,8% με ρυθμιστικό διάλυμα TAE. Οι τιμές μάζας είναι για 0,5 μg/λωρίδα πηκτής.

Figure taken from: <https://www.neb.com/products/n3232-1-kb-dna-ladder>

Η πηκτή εξετάζεται στο UV φως και φωτογραφίζεται όπως έχει περιγραφεί και στην μέθοδο της ηλεκτροφόρησης DNA σε πηκτή αγαρόζης 2%.

Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου.

❖ Δείγματα DNA. (προϊόντα LR-PCR)

❖ Ρυθμιστικό διάλυμα 50x TAE

Trizma base 242 gr

EDTA 18.6gr Ethylenediaminetetra-acetic acid

Προστίθενται περίπου 800 ml αποσταγμένου νερού. Ανακατεύουμε για να διαλυθεί. Ρυθμίζεται το pH να είναι 8,0, με κρυσταλλικό οξικό οξύ (~ 57 ml / l). Συμπληρώνουμε με νερό μέχρι τελικό όγκο 1000 ml.

TAE 50X: διατηρείται σε RT για έως και 3 μήνες.

❖ Καθαρή αгарόζη

0,7g αгарόζης

Τα υπόλοιπα διαλύματα είναι ίδια με της μεθόδου της ηλεκτροφόρησης σε 2% πηκτή αгарόζης.

2.4.7 Απομόνωση RNA από ιστούς ποντικού

Μέθοδος

- Τα δείγματα των ιστών μεταφέρθηκαν από δοχείο υγρού αζώτου όπου βρίσκονταν σε σωληνάρια “BIJOUX”, κατάλληλα για χρήση με τον ομογενοποιητή.
- Μετά την μεταφορά ομογενοποιήθηκαν με χρήση της συσκευής ομογενοποίησης σε 1 mL αντιδραστήριο TRIzol Reagent και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Εν συνεχεία τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε αριθμημένα σωληνάρια 1.5 mL Eppendorf και φυγοκεντρήθηκαν σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στα 12.000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Το μίγμα διαχωρίστηκε σε τρεις φάσεις: μια χαμηλότερη, φαινόλο-χλωροφρμική οργανική φάση η οποία περιείχε το μόρια DNA, μια

μεσόφαση η οποία περιείχε τις πρωτεΐνες, και μια άχρωμη ανώτερη υδατική φάση, η οποία περιείχε τα μόρια RNA.

- Επειδή ιδιαίτερα τα δείγματα του εγκεφάλου ενδέχεται να περιέχουν κομμάτια μεμβρανών, πολυσακχαριτών και μορίων DNA μεγάλου μοριακού βάρους, τα οποία μετά τη φυγοκέντρηση κατακάθονται σαν ίζημα, το υπερκείμενο το οποίο περιέχει το RNA λήφθηκε με αυτόματη πιπέτα σε νέα αριθμημένα σωληνάρια errendorf ενώ το ίζημα απορρίφθηκε.
- Προστέθηκαν σε κάθε σωληνάριο 200 μ L χλωροφόρμιο στον απαγωγό. Τα σωληνάρια με τα δείγματα πωματίστηκαν και ακολούθησε βίαιη ανάδευση με συσκευή Vortex για 15 δευτερόλεπτα.
- Ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 15 λεπτά στους 4°C και μετά λήφθηκαν 500 μ L της υδατικής φάσης κάθε δείγματος, τα οποία μεταφέρθηκαν σε νέα σωληνάρια errendorf.
- Προστέθηκαν 0.25 mL ισοπροπανόλης και 0.25 mL διαλύματος αλάτων (κιτρικό νάτριο 0.8M και χλωριούχο νάτριο 1.2M) και μετά τα δείγματα αφέθηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000 g για 8 λεπτά στους 4°C με αποτέλεσμα το RNA να κατακάσει ως λευκό/ημιδιαφανές ίζημα ενώ το υπερκείμενο απορρίφθηκε προσεκτικά με χρήση πλαστικού ακρορυγχίου, προσαρμοσμένου σε σωλήνα κενού αέρος.
- Για πλύση του ιζήματος σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1 mL αιθανόλη 75% και ακολούθησε βίαιη ανάδευση με Vortex.
- Τα παραπάνω στάδια φυγοκέντρησης και πλύσης επαναλήφθηκαν άλλη μια φορά.
- Τα δείγματα RNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

2.4.8 Κατεργασία καθαρισμού του απομονωμένου ολικού RNA

Μέθοδος

Σκοπός ήταν ο καθαρισμός του RNA από επιμολύνσεις DNA ώστε εν συνεχεία να απομονωθεί με υψηλή καθαρότητα.

- Τα δείγματα απομονωμένου RNA φυγοκεντρήθηκαν στα 6.000 g για 5 λεπτά στους 4°C για καταβύθιση του RNA ενώ η αιθανόλη 75% που αποτελούσε το διαλύτη, απορρίφθηκε προσεκτικά με χρήση πλαστικού ακρορυγχίου, προσαρμοσμένου σε σωλήνα κενού αέρος.
- Εν συνεχεία στα δείγματα όπου το ίζημα ήταν μη ορατό (αραιό) προστέθηκαν 20 μL DEPC- H_2O ενώ στα υπόλοιπα 100 μL DEPC- H_2O και επωάστηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60°C για 10 λεπτά. Όπου το ίζημα δεν είχε διαλυτοποιηθεί έγινε χρήση πλαστικού ακρορυγχίου με ρυθμιζόμενη παλίνδρομη εισροή/εκροή μέσω της πιπέτας έως ότου να διαλυτοποιηθούν τα ιζήματα σε όλα τα δείγματα.
- Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση και μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 πριν προχωρήσουμε παραπέρα, στην ενζυμική κατεργασία με την RQ1 & RNase free DNase 1, ώστε να αποκτηθεί μια πρώτη εικόνα σχετικά με το πόση συγκέντρωση RNA έχει εκχυλίσει από τους ιστούς και ποια είναι η υφιστάμενη μόλυνση των δειγμάτων από DNA.
- Μετά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του φασματοφωτομέτρου, κατασκευάστηκε πίνακας ποσοτήτων για τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που θα προστίθεντο στη συνέχεια. Οι υπολογισμοί βασίστηκαν σε δύο προϋποθέσεις. Η πρώτη ήταν ο τελικός όγκος των δειγμάτων να μην ξεπερνά τα 20 μL , ενώ παράλληλα οι ποσότητες του ενζύμου και του RQ1 DNase 10X Reaction Buffer ήταν σταθερές στα 2 μL . Η δεύτερη ήταν η ύπαρξη 10 μg RNA στα δείγματα. Επομένως στους υπολογισμούς αυξομειώθηκαν οι ποσότητες του RNA και του DEPC- H_2O . Τα περισσότερα δείγματα ικανοποιούσαν και τις δύο συνθήκες, ενώ σε κάποιες μεμονωμένες εξαιρέσεις χρησιμοποιήθηκε αναγκαστικά λιγότερη αρχική ποσότητα RNA.
- Ακολούθησε η προσθήκη των υπολογισμένων όγκων DEPC- H_2O , RNA σε νέα αντιστοίχως αριθμημένα σωληνάρια τύπου erpendorf του 1.5 mL και μετά η προσθήκη 2 μL RQ1 DNase 10X Reaction Buffer και 2 μL του ενζύμου. Τα παλιά σωληνάρια με το ακαθάριστο απομονωμένο RNA φυλάχθηκαν για μελλοντική χρήση στους -20°C.

- Τα δείγματα επωάστηκαν στους 37°C για 1-1,5 ώρα στο υδατόλουτρο. Με το πέρας του χρόνου ακολούθησε προσθήκη DEPC-H₂O μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 200 μ L και 200 μ L μίγματος αποτελούμενο από φαινόλη και χλωροφόρμιο σε αναλογία όγκων 1:1, ακολουθούμενη από στιγμιαία έντονη ανάδευση σε συσκευή Vortex για 30 δευτερόλεπτα.
- Μετά τοποθετήθηκαν σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι οργανικές κάτω φάσεις απορρίφθηκαν ενώ οι υδατικές άνω φάσεις των δειγμάτων που περιείχαν το RNA συλλέχθηκαν σε νέα σωληνάρια τύπου errendorf του 0.5 mL
- Προστέθηκαν 200 μ L χλωροφόρμιο στο καθένα. Εν συνεχεία ακολούθησε έντονη ανάδευση με συσκευή Vortex για δέκα δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στα 12.000 g για δέκα λεπτά στους 4°C.
- Συλλέχθηκαν οι υδατικές φάσεις (V') έως ορίου V'max=180 μ L σε νέα σωληνάρια τύπου errendorf του 0.5 mL και προστέθηκε στο καθένα από αυτά 1 μ L γλυκογόνο ως συμπαραγοντας κατακρήμνισης (10 μ g/ μ L). Αν V' ο αντίστοιχος ληφθείς όγκος RNA, προστέθηκαν στο δείγμα αντίστοιχα 1/10xV' διάλυμα οξικό νάτριο συγκέντρωσης 3M και 2.5xV' παγωμένη αιθανόλη 100%, συνοδευόμενα από καλή ανάμειξη των δειγμάτων με χρήση της συσκευής Vortex κάθε φορά.
- Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C όλο το βράδυ. Εναλλακτικώς θα μπορούσαν να αποθηκευτούν στους -80°C για είκοσι λεπτά, για άμεση χρήση στην επόμενη μία ώρα.

2.4.9 Μετατροπή του RNA σε cDNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση

Μέθοδος

- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000 g για 10 λεπτά στους 4°C ώστε το RNA να κατακρίμνησθεί σαν ίζημα και να απομακρυνθεί εν συνεχεία μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο με χρήση πλαστικού ακρορυγχίου, προσαρμοσμένου σε σωλήνα κενού αέρος.

- Σε κάθε δείγμα έγινε προσθήκη 500 μL αιθανόλης 75% (RNase free) για πλύση του ιζήματος
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν προσεκτικά σε επιτραπέζια συσκευή φυγοκέντρωσης, ώστε να φυγοκεντρηθούν ξανά στα 12.000 g για 10 λεπτά στους 4° C. Ακολούθησε εκ νέου απομάκρυνση της υπερκείμενης οργανικής φάσης και τα δείγματα ξηράθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έγινε αναδιάλυση των ιζημάτων σε 20 μL DEPC- H_2O και ακολούθησε μέτρηση απορρόφησης των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 ώστε να προσδιοριστεί η τελική συγκέντρωση ολικού RNA σε αυτά.
- Δημιουργήθηκαν δείγματα RNA συγκέντρωσης 2000 ng/ μL RNA σε νέα αριθμημένα σωληνάρια τύπου erpendorf στον πάγο.
- Προστέθηκε 1 μL oligo(dT) (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) προς υβριδοποίηση όλων των μεταγραφημάτων με poly-A ουρά και οι όγκοι συμπληρώθηκαν με DEPC- H_2O , έως τελικού όγκου 12 μL .
- Τα δείγματα θερμάνθηκαν για πέντε λεπτά στους 70°C, ώστε να διασπαστούν τυχόν σχηματισμένες δευτεροταγείς δομές και τοποθετήθηκαν στο πάγο για άμεση ψύξη ώστε να αποφευχθεί ο τυχόν αυθόρμητος ανασχηματισμός τους.
- Ακολούθησε ένα στιγμιαίο spin σε επιτραπέζια φυγόκεντρο ώστε να συλλεχθεί ο όγκος κάθε δείγματος στο κάτω μέρος των σωληνάρων.
- Προστέθηκαν κατά σειρά 4 μL M-MLV 5x buffer, 2 μL δεοξυνουκλεοτίδια (10mM) και τέλος 2 μL του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV RT του ρετροϊού *Moloney Leukemia Virus*. Ο συνολικός όγκος όλων των δειγμάτων με βάση και τις οδηγίες του πρωτοκόλλου αντίστροφης μεταγραφής της Promega ήταν 20 μL .
- Τα δείγματα επώαστηκαν για μία ώρα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42°C.
- Η αντίδραση τερματίζεται με επώαση των δειγμάτων στους 70 °C για δέκα λεπτά.
- Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο για δέκα λεπτά και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Η κατεργασία της αντιστροφής μεταγραφής σε συνδυασμό με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελούν την πιο ευαίσθητη και αξιοποιήσιμη τεχνική ώστε να ανιχνευτεί το mRNA ενός γονιδίου. Το απομονωμένο και καθαρισμένο ολικό RNA χρησιμοποιείται

ως εκμαγείο για να συντεθεί το συμπληρωματικό DNA (cDNA) με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση

2.4.10 Χρώση Αιματοξυλίνης-Εωσίνης

Αρχή της Μεθόδου

Στην μέθοδο αυτή (HE stain) οι πυρήνες των κυττάρων βάφονται από την αιματοξυλίνη, ενώ το κυτταρόπλασμα χρωματίζεται από την εωσίνη. Η αιματοξυλίνη αποτελεί το άχρωμο υπόστρωμα που οξειδώνεται και δίνει την ένωση hematein, που είναι ο χρωμοφόρος παράγοντας. Το hemalum, το οποίο είναι ένα σύμπλοκο που σχηματίζεται από τα ιόντα αργιλίου και hematein, βάφει τις δομές που περιέχουν νουκλεϊκά οξέα (κυρίως οι πυρήνες αλλά και τα ριβοσώματα) μπλε. Η πυρηνική χρώση ακολουθείται από αντίθετη χρώση με διάλυμα ηωσίνης, η οποία αποτελεί μια όξινη χρωστική, το οποίο βάφει τις υπόλοιπες δομές του κυτταροπλάσματος κόκκινες.

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται σε αυτή την μέθοδο είναι τομές παραφινोποιημένων ιστών, στο μικροτόμο. Οι κασέτες με τους παραφινοποιημένους ιστούς τοποθετούνται στην ειδική κεφαλή του μικροτόμου. Πρώτα κόβονται τομές στα 10μm, ώστε να απομακρυνθούν οι πρώτες στρώσεις παραφίνης, μέχρι να εμφανιστεί ο ιστός και στην συνέχεια τοποθετούνται για λίγο σε ψυχρό μέρος (-13 °C), ώστε να σκληρύνει η παραφίνη και να είναι εφικτό να κοπούν λεπτές τομές. Ακολουθεί το κόψιμο των τομών στα 5μm και αφού εκπτυχθούν σε υδατόλουτρο, επικολλώνται σε γυάλινες πλάκες μικροσκοπίου, οι οποίες αφήνονται να στεγνώσουν, στους 42°C, για αρκετές ώρες (καλύτερα όλο το βράδυ), έτσι ώστε να είναι βέβαιο ότι δεν υπάρχει νερό ή αέρας και η τομή έχει κολλήσει σωστά.

Μέθοδος

Η διαδικασία της χρώσης που ακολουθείται είναι η εξής:

Τα πλακάκια με τις τομές των 5μm από μονιμοποιημένους ιστούς εμβαπτίζονται:

- Σε τρία διαδοχικά διαλύματα ξυλενίου για 5 λεπτά στο κάθε ένα, για αποπαραφινοποίηση των τομών.

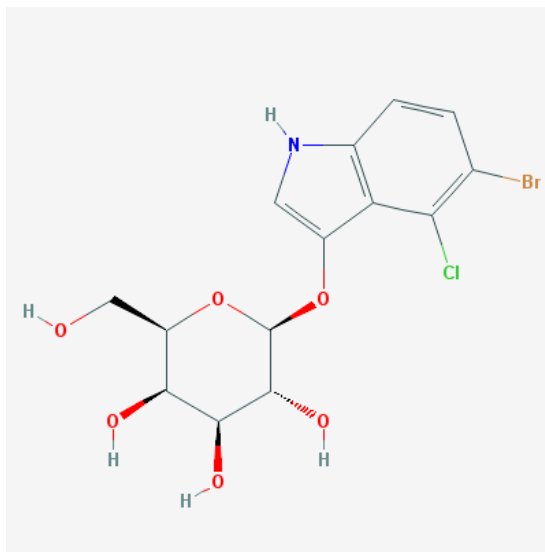
- Εν συνεχεία σε διαδοχικά διαλύματα 100% αιθανόλης, 96% αιθανόλης (δισ), 75% αιθανόλης και 50% αιθανόλης σε καθένα από τα οποία παραμένει για 2-3 λεπτά.
- Έπειτα σε απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
- Στη συνέχεια παραμένουν σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 2 λεπτά και ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό μέχρι την απομάκρυνση της χρωστικής.
- Ακολουθεί εμβάπτιση σε οξύ αλκοόλ (acid alcohol), διάλυμα 70% αιθανόλης με 37% HCl, για 1 λεπτό και 2-3 βυθίσεις σε απεσταγμένο νερό.
- Έπειτα παραμένουν σε διάλυμα Scott's για 3-5 λεπτά και μετά βυθίζονται 4-5 φορές σε απεσταγμένο νερό.
- Μετά υφίστανται τη χρώση με εωσίνη για 30sec-2min, ανάλογα με την παλαιότητα της χρωστικής. Ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό.
- Στην συνέχεια έχουμε αφυδάτωση του ιστού όπου οι τομές εμβαπτίζονται για 8-10 φορές στα διαλύματα των αλκοολών με αντίστροφη σειρά 50% αιθανόλη, 70% αιθανόλη, 96% αιθανόλη και 100% αιθανόλη και τέλος ξυλενίου.
- Τέλος ακολουθεί η κάλυψη των τομών με διάλυμα DPX (Dibutyl phthalate, BDH) που περιέχει ξυλένιο, η προσθήκη καλυπτρίδας και η παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο.

2.4.11 LacZ staining (X gal staining)

Αρχή της μεθόδου

Η χρώση X-gal είναι μια ταχεία και βολική ιστοχημική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η δημιουργία ή απόκτηση διαγονιδιακών σειρών ποντικού που φέρει το γονίδιο αναφοράς (reporter mouse), στο οποίο το βακτηριακό γονίδιο LacZ έχει εισαχθεί μέσα στο γονίδιο του ενδιαφέροντος ή έχει τεθεί υπό τον έλεγχο των ρυθμιστικών στοιχείων που αντιστοιχούν στο γονίδιο που μας ενδιαφέρει. Η έκφραση σηματοδοτείται από μία σκούρα μπλε κηλίδα και μπορεί να ανιχνευθεί στο επίπεδο του ενός κυττάρου, παρέχοντας μια ισχυρή οπτική ένδειξη της γονιδιακής έκφρασης.

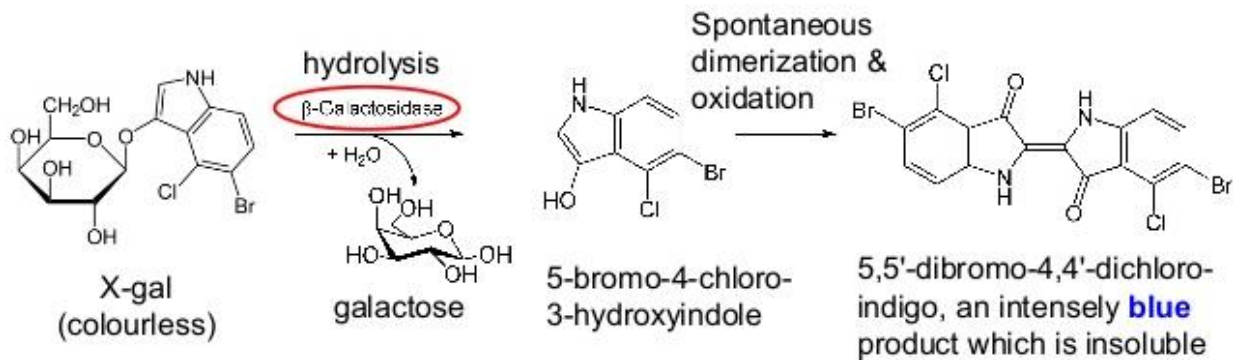
Το X-gal (επίσης συντετμημένο BCIG, 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη) είναι μια οργανική ένωση που αποτελείται από γαλακτόζη, συνδεδεμένη με ένα υποκατεστημένο ινδόλιο.



Σχήμα 2.4: Xgal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

Figure taken from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/X-Gal#section=2D-Structure>

Το X-gal είναι ένα ανάλογο της λακτόζης, και ως εκ τούτου μπορεί να υδρολυθεί από το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση, το οποίο διασπά το β-γλυκοσιδικό δεσμό στην D-λακτόζη. Το X-gal, όταν διασπάται από την β-γαλακτοσιδάση, αποδίδει γαλακτόζη και 5-βρωμο-4-χλωρο-3-υδροξυινδόλη. Το τελευταίο, στη συνέχεια, διμερίζεται αυθόρμητα και οξειδώνεται σε 5,5'-διβρωμο-4,4'-διχλωρο-ινδικοκαρμίνιο, ένα έντονα μπλε προϊόν το οποίο είναι αδιάλυτο. Το ίδιο το X-gal είναι άχρωμο, και έτσι η παρουσία του μπλε χρώματος προϊόντος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια δοκιμή για την παρουσία της δραστηκής β-γαλακτοσιδάσης. Αυτή η εύκολη αναγνώριση ενός δραστικού ενζύμου επιτρέπει στο γονίδιο για την β-γαλακτοσιδάση (το γονίδιο lacZ) να χρησιμοποιηθεί ως ένα γονίδιο αναφοράς σε διάφορες εφαρμογές.



Σχήμα 2.5: Αντίδραση της β -γαλακτοσιδάσης

Figure taken from: <http://www.slideshare.net/thelawofscience/biotechnology-gene-cloning>

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται σε αυτή την μέθοδο είναι τομές από ιστούς, οι οποίοι αμέσως μετά την απομόνωση έχουν ενσωματωθεί σε μέσο OCT. Οι τομές κόβονται στον κρυοτόμο, ο οποίος είναι ουσιαστικά ένα μικροτόμος μέσα σε ένα καταψύκτη. Το δείγμα τοποθετείται σε ένα μεταλλικό δίσκο, τον οποίο έχουμε επαλείψει με OCT, και αφήνεται μέσα στον κρυοτόμο για αρκετά λεπτά, ώστε η ενδιάμεση στρώση OCT να παγώσει και έτσι το δείγμα να κολλήσει καλά στην μεταλλική βάση. Στην συνέχεια η βάση ασφαρίζεται σε σφιγκτήρα, τα δείγματα τριμάρονται για να απομακρυνθούν οι πρώτες στρώσεις OCT και εν συνεχεία κόβονται οι τομές (6-10 μm πάχος), οι οποίες τοποθετούνται σε πλακίδια καλυμμένα με ζελατίνη και φυλάσσονται στους -80°C μέχρι την χρώση τους.

Στην θερμοκρασία που υπάρχει στον κρυοτόμο (-20°C έως και -30°C), οι περισσότεροι ιστοί γίνονται σκληροί σαν πέτρες. Συνήθως για το λίπος ή ιστούς πλούσιους σε λιπίδια απαιτούνται χαμηλότερες θερμοκρασίες (-30°C). Κάθε ιστός έχει μία προτιμώμενη θερμοκρασία για την επεξεργασία.

Οι ιστοί οι οποίοι μετά την συλλογή τους φυλάσσονται στους -80°C , μέχρι να μεταφερθούν στον κρυοτόμο βρίσκονται σε ξηρό πάγο, έτσι ώστε να διατηρούνται οι χαμηλές θερμοκρασίες για να μην λιώσει το OCT και καταστραφούν

Μέθοδος

- Αφήνονται να στεγνώσουν οι τομές , στον αέρα, για 30 λεπτά
- Τοποθετούνται οι αντικειμενοφόρες πλάκες σε βάζο χρώσης, το οποίο γεμίζουμε με κρύο σταθεροποιητικό διάλυμα, για 1-1,5h στους 4 ° C.
- Τοποθετείται στους 37 ° C ο επιθυμητός όγκος του διαλύματος χρώσης X-gal. Χρησιμοποιούνται περίπου 100 μ l / slide.
- Ξεπλένονται τα πλακίδια σε κρύο 1XPBS / 2mM MgCl₂, δύο φορές για 10 λεπτά.
- Προετοιμάζεται η χρώση LacZ. Προστίθεται ο επιθυμητός όγκος του stock διαλύματος X-gal στο διάλυμα χρώσης X-gal, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 2 mg / ml.
- Τοποθετούνται οι αντικειμενοφόρες πλάκες σε ένα κουτί και χρωματίζονται σε επωαστήρα στους 37°C στο σκοτάδι O / N (το χρώμα θα γίνει εμφανές σε 2 έως 24 ώρες). Προστίθεται παραφίλμ πάνω στις διαφάνειες έτσι ώστε κανένα LacZ να μην πέσει από τις διαφάνειες.
- Την επόμενη μέρα αφαιρείται προσεκτικά το παραφίλμ από τις πλάκες.
- Πλένονται δύο φορές σε PBS / 2 mM MgCl₂ σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Ξεπλένονται σε dH₂O.
- Βυθίσεις σε ηωσίνη για 15-30sec
- Πλένονται σε dH₂O.
- Στερεώνονται καλυπτρίδες με DPX

Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου

❖ OCT

Αποτελείται από:

- polyvinyl alcohol
- polyethylene glycol
- non-reactive ingredients

❖ **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 1M pH 7.3**

Διαλύονται 103.6g Na₂HPO₄ και 37.25g NaH₂PO₄ σε 800ml milli-Q. Συμπληρώνεται με milli-Q μέχρι το 1L. Αποστείρωση.

❖ **1X PBS / 2 mM MgCl₂**

Συνδυάζονται 100 ml 10XPBS και 1 ml 2M MgCl₂. Συμπληρώνεται με milli-Q μέχρι το 1L. Αποθηκεύεται στους 4 ° C για 6 μήνες.

❖ **Σταθεροποιητικό ρυθμιστικό διάλυμα**

Διαλύονται 50 mg Na deoxycolate σε 50 ml 10XPBS. Προστίθενται 100 μl NP40 και συμπληρώνεται με milli-Q μέχρι το 1L. Αποθηκεύεται για 6 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου.

❖ **Σταθεροποιητικό διάλυμα**

Συνδυάζονται 5.25 ml φορμαλδεΰδης 38% με 0,8 ml γλουταραλδεΰδης 25%. Συμπληρώνεται με στερεωτικό ρυθμιστικό μέχρι τα 100ml . Αποθηκεύεται στους 4 ° C για 1 ημέρα.

❖ **Διάλυμα χρώσης X-gal**

Συνδυάζονται τα ακόλουθα για ένα διάλυμα τελικού όγκου 100ml:

φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 1M pH 7.3 :10 ml

Na deoxycolate :10 mg

K₃Fe(CN)₆ :164 mg

K₄Fe(CN)₆ :210 mg

MgCl₂ 2M:100μl

NP40 :20 μl

Milli-Q :90 ml

Αποθηκεύεται στους 4 ° C, προστατευμένο από το φως, για τουλάχιστον 12 μήνες.

❖ **50mg / mL stock διάλυμα X-gal**

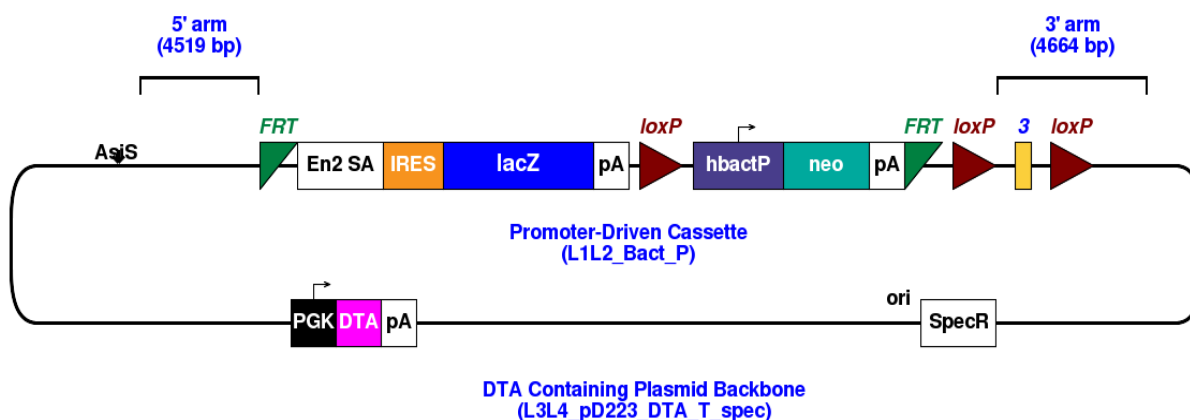
Διαλύονται 250mg σκόνης X-gal σε 5ml DMSO. Αποθηκεύεται στους -20 ° C, προστατευμένο από το φως.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δημιουργία ενός cKO LPAR1 ποντικού

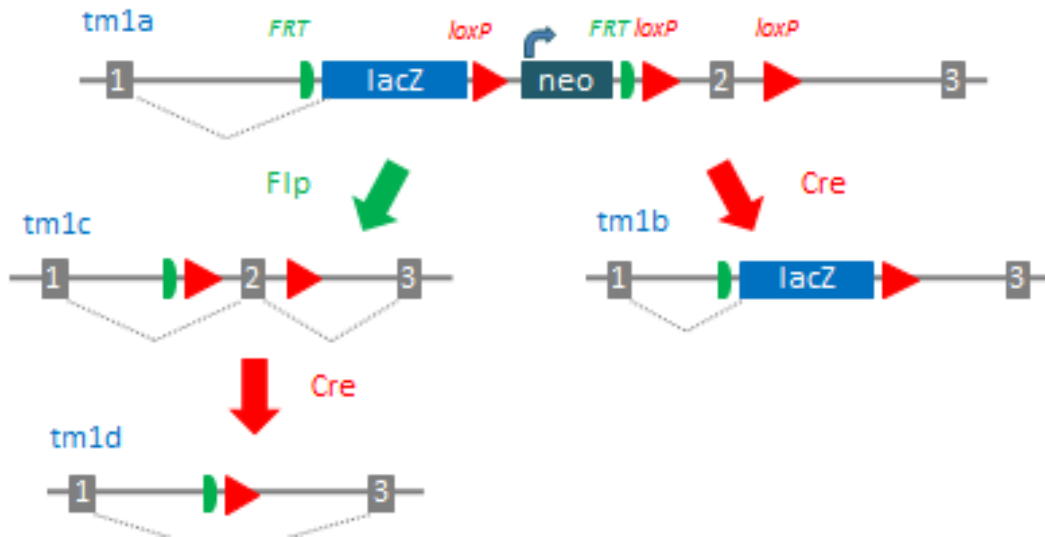
Στοχευμένα cKO Lpar1 ES κύτταρα ποντικού ελήφθησαν από το EUCOMM. Η γονιδιακή στόχευση επιτυγχάνεται με την εισαγωγή του φορέα στόχευσης (σχ. 3.1) στα ES κύτταρα.



Σχήμα 3.1: ο φορέας στόχευσης του Lpar1 που εισάχθηκε στα ES κύτταρα

Figure taken from: https://www.i-dcc.org/imits/targ_rep/alleles/1736/vector-image

Λαμβάνοντας υπόψη την στρατηγική του EUCOMM για την υπο όρους στόχευση του γονιδίου, επιλέξαμε την προσέγγιση που βασίζεται σε μια, κατευθυνόμενη από υποκινητή, κασέτα στόχευσης και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός «πρώτου ΚΟ αλληλόμορφου» [53] σε C57BL/6N ES κύτταρα [65]. Το πρώτο-ΚΟ αλληλόμορφο (tm1a) είναι ευέλικτο και μπορεί να παράγει, μετά από έκθεση στις ρεκομπινάσες Cre και Flp που έχουν δράση ειδικής θέσης, ΚΟ αλληλόμορφα με γονίδιο αναφοράς (tm1b), cKO αλληλόμορφα (tm1c), και ανενεργά αλληλόμορφα (tm1d).



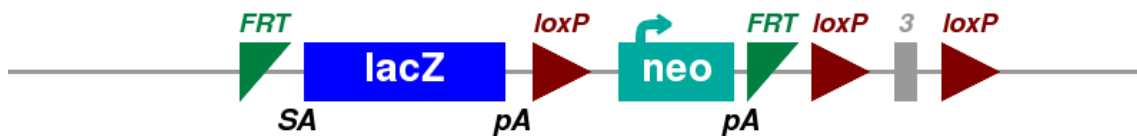
Σχήμα: 3.2 Σχηματική αναπαράσταση του σχεδιασμού φορέα στόχευσης, από το EUCOMM, που απεικονίζει τη διαδικασία στόχευσης και ανασυνδυασμού για ένα πρωτότυπο γονίδιου με τρία εξώνια.

Figure taken from: <http://www.mousephenotype.org/about-ikmc/targeting-strategies>

3.1 Παραγωγή ποντικών που φέρουν το πρώτο ΚΟ αλληλόμορφο (tm1a)

Το tm1a είναι το στοχευμένο αλληλόμορφο στα ES κύτταρα του EUCOMM. Είναι ένα λεγόμενο αλληλόμορφο στοχευμένης παγίδας, δηλαδή έχει δημιουργηθεί με τη στόχευση, όμως λειτουργεί ως μια νοκ-άουτ παγίδα.

Στο γονίδιο ενδιαφέροντος μας (Lpar1), το πρώτο ΚΟ αλληλόμορφο φαίνεται παρακάτω, με κρίσιμο εξώνιο το 3.



Σχήμα 3.3: το πρώτο ΚΟ αλληλόμορφο του γονιδίου Lpar1

Figure taken from: https://www.i-dcc.org/imits/targ_rep/alleles/1736/allele-image?simple=true.jpg

Δύο διαφορετικοί Lpar1 cKO ES κλώνοι, οι EPD0496_2_C05 και EPD0496_2_D05, ελήφθησαν από το EUCOMM, στην προσπάθεια να αυξηθούν οι πιθανότητες της

απόκτησης σωστά στοχευόμενου κλώνου. Τα κύτταρα ήταν p5, αρσενικά και ετερόζυγα για τη στοχευμένη μετάλλαξη. Ο τύπος κυττάρων ήταν JM8A3.N1 και το χρώμα του τριχώματος ήταν agouti / καφέ. Τα ES κύτταρα, κατά την άφιξη τους, αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι επεξεργασία.

Αρχικά, οι ES κλώνοι αποψύχθηκαν και επεκτάθηκαν ώστε να εξαχθεί το απαιτούμενο, για την εξακρίβωση, γονιδιωματικό DNA. Ακολουθήθηκε ένα τροφοδοτικό πρωτόκολλο με βάση τα κύτταρα.

Ένα απόθεμα τροφοδοτικών κυττάρων (ινοβλάστες), που περιείχε 1×10^6 κύτταρα, ξεπάγωσε σε υδατόλουτρο, στους 37°C . Τα κύτταρα στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε 15 σωληνάρια Falcon, αραιώθηκαν 10 φορές και φυγοκεντρήθηκαν στα 800 xg για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και ο πυθμένας του σωλήνα falcon χτυπήθηκε για να σπάσει το κυτταρικό σφαιρίδιο και να ληφθούν μεμονωμένα κύτταρα. Στη συνέχεια, 8 ml DMEM-KO προστέθηκαν στο σωληνάριο Falcon και πιπεταρίστηκαν πάνω-κάτω, ώστε να επαναιωρηθούν τα κύτταρα.

Ταυτόχρονα, πιάτα καλλιέργειας 6 cm καλύφθηκαν με 1 ml ζελατίνης χοίρου 0.1% και επωάστηκαν στους 37°C για 5-10 λεπτά. Οποιαδήποτε περίσσεια ζελατίνης αναρροφήθηκε στο τέλος της επώασης. Τα 4 ml τροφοδοτικών κυττάρων σε DMEM-KO μεταφέρθηκαν πάνω σε κάθε τρυβλίο καλλιέργειας και τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα (37°C , 5% CO_2 , υγροποιημένο).

Την επόμενη ημέρα, τα τροφοδοτικά κύτταρα ελέγχθηκαν για πολλαπλασιασμό και συμβολή και τα αφήσαμε για άλλο ένα 24ώρο στον επωαστήρα.

Την επόμενη ημέρα, οι κλώνοι ES κυττάρων απομακρύνθηκαν από τους -80°C και μεταφέρθηκαν σε ξηρό πάγο. Τα κύτταρα αποψύχθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C και μεταφέρθηκαν σε ένα σωλήνα Falcon των 15 ml που περιείχε 5 ml DMEM-KO, συμπληρωμένο με παράγοντα αναστολής της λευχαιμίας (Leukemia Inhibitory Factor-LIF) και προ-θερμασμένο στους 37°C . Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 800xg για 5 λεπτά, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και ο σωλήνας χτυπήθηκε ώστε να διαχωριστούν τα συσσωματώματα κυττάρων. 5 ml φρέσκου DMEM-KO (συν LIF) προστέθηκαν στα ES κύτταρα και επαναιωρήθηκαν με πιπέτα πάνω και κάτω. Εν τω

μεταξύ, το παλιό μέσο αναρροφήθηκε από τα πιάτα που στέγαζαν τα τροφοδοτικά κύτταρα και πλύθηκαν μία φορά με φρέσκο μέσο. Τα ES κύτταρα στη συνέχεια μεταφέρθηκαν επί των τροφοδοτικών κυττάρων (5 ml ανά πιάτο) και επωάστηκαν περαιτέρω.

Όταν τα ES κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν, συλλέχθηκαν με επεξεργασία με θρυψίνη. 1 ml ρυθμιστικού λύσης συν πρωτεΐνάση K χρησιμοποιήθηκε ανά τρυβλίο (6cm) καλλιέργειας ES κυττάρων και επωάστηκαν όλη τη νύκτα στους 56°C. Την επόμενη ημέρα, προστέθηκαν δύο όγκοι φαινόλης στα λυμένα κύτταρα και αναμίχθηκαν έντονα, αλλά απαλά με το χέρι για 5 λεπτά. Τα κυτταρολύματα κατόπιν φυγοκεντρήθηκαν, σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο, σε μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό. Το υπερκείμενο στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε ένα νέο σωλήνα που περιείχε δύο όγκους χλωροφορμίου, αναμίχθηκαν με το χέρι και φυγοκεντρήθηκαν σε μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό, όπως και προηγουμένως. Η υδατική φάση στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε ένα σωλήνα Falcon των 15 ml που περιείχε 3-5 όγκους 100% αιθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά την ανάμιξη και την εμφάνιση του DNA με μορφή νήματος, το DNA περιελίσσεται με τη χρήση μια γυάλινης ράβδου που έχει μία άκρη σε σχήμα σφαίρας. Το συλλεγόμενο DNA στη συνέχεια βυθίστηκε σε 70% αιθανόλη για 1-2 λεπτά και αφήσαμε την γυάλινη ράβδο στον πάγκο για να στεγνώσει. Η γυάλινη άκρη που είχε συνδεδεμένο το DNA ήταν προσεκτικά κομμένη και βυθισμένη σε ένα σωληνάριο Eppendorf που περιείχει 200 µl ρυθμιστικού διαλύματος TE και αφέθηκε όλη τη νύκτα στους 4 ° C. Την επόμενη μέρα ο σωλήνας Eppendorf που περιείχει το DNA θερμάνθηκε στους 65°C για 10-15 λεπτά για να μετουσιωθούν τυχόν DNAσες που μπορεί να ήταν παρούσες. Στη συνέχεια μοιράστηκε σε ίσες ποσότητες και φυλάχθηκε στους -20 ° C.

Επιβεβαίωση σωστής στόχευσης με LP-PCR

Το πρώτο στάδιο της διαδικασίας παραγωγής του νέου cKO Lpar1 ποντικού ήταν να επιβεβαιωθεί το γεγονός του σωστού ομόλογου ανασυνδυασμού, δηλαδή να επικυρωθεί ότι το γονίδιο Lpar1 έχει στοχευτεί σωστά και ότι η στόχευση έχει συμβεί στην προκαθορισμένη θέση στο αντίστοιχο χρωμόσωμα στα ES κύτταρα ποντικών που λάβαμε από EUCOMM . Επιλέχθηκε η στρατηγική της μεγάλης εμβέλειας PCR (Long Range PCR, LR-PCR) και στους δύο βραχίονες (5' και 3'). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν να

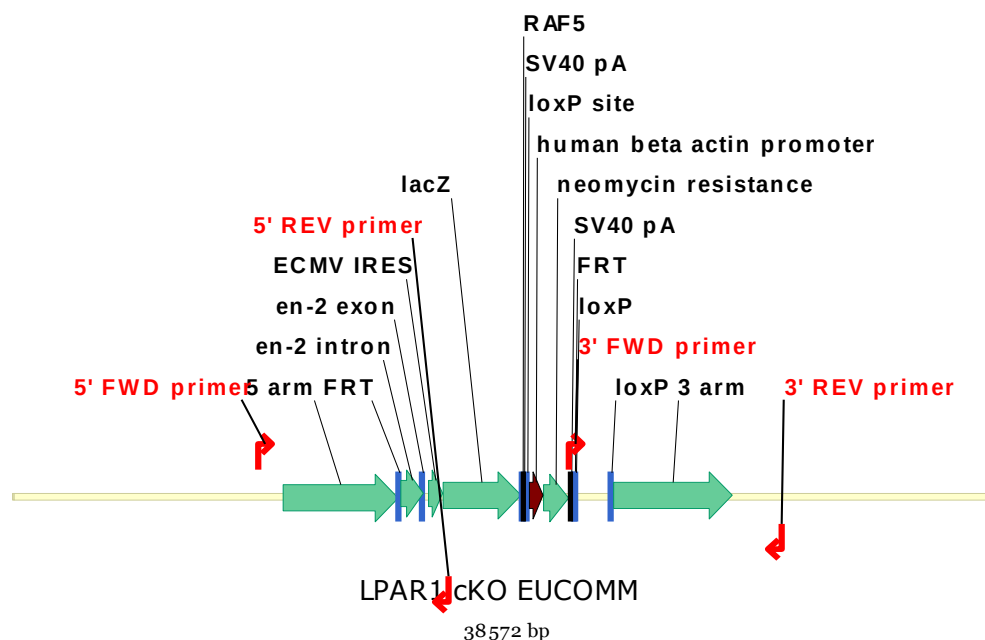
προσδένονται σε γονιδιωματικές περιοχές του Lpar1, ανάντη και κατάντη των 5' και 3' βραχιόνων του φορέα στόχευσης, αντίστοιχα. Η LR-PCR επιβεβαίωσε τη σωστή στόχευση του γονιδιακού τόπου Lpar1.

Για τον 5' βραχίονα χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινήτων 617/618:

Ο εκκινήτης 617 (5' FWD primer) προσδένεται στον 5' βραχίονα του τελικού φορέα στόχευσης Lpar1, οπότε προσδένεται και σε WT και σε μεταλλαγμένο gDNA. Ο εκκινήτης 618 (5' REV primer) προσδένεται στο γονίδιο LacZ, οπότε δεσμεύει μόνο μεταλλαγμένο gDNA. (Σχήμα 3.4) Το ζεύγος 617/618 λειτουργεί μόνο με μεταλλαγμένο gDNA και το αναμενόμενο μήκος του προϊόντος ήταν 7,509 bp.

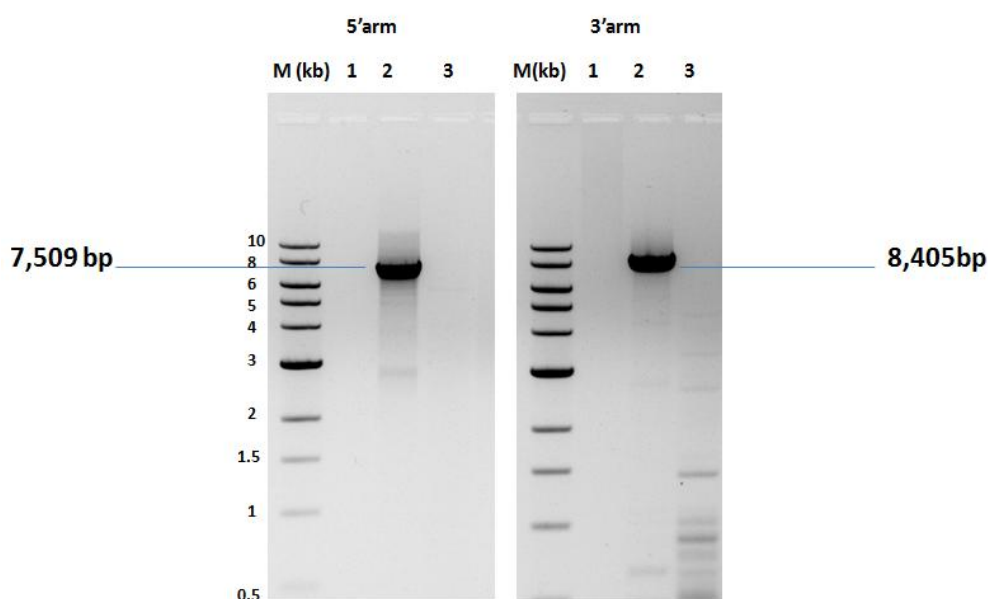
Για τον 3' βραχίονα χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινήτων 628/630:

Ο εκκινήτης 628 (3' FWD primer) προσδένεται σε μια loxP αλληλουχία της κασέτας στόχευσης, οπότε δεσμεύει μόνο μεταλλαγμένο gDNA. Ο εκκινήτης 630 (3' REV primer) προσδένεται στον 3' βραχίονα του τελικού φορέα στόχευσης Lpar1, οπότε προσδένεται και σε WT και σε μεταλλαγμένο gDNA. Το ζεύγος 628/630 λειτουργεί μόνο με μεταλλαγμένο gDNA και το αναμενόμενο μήκος του προϊόντος ήταν 8,405 bp.



Σχήμα 3.4: παριστάνονται οι θέσεις σύνδεσης των εκκινήτων, που χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση σωστής στόχευσης με την τεχνική της LR-PCR.

Παρουσιάζονται οι ζώνες που ελήφθησαν από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της LR-PCR για τον 5' βραχίονα και για τον 3' βραχίονα αντίστοιχα. Ο αριθμός (1) αντιστοιχεί στα δείγματα που έχουν νερό, αντί για gDNA, ως εκμαγείο, ο αριθμός (2) αντιστοιχεί στα δείγματα που έχουν gDNA από τον ES κυτταρικό κλώνο EPD0496_2_C05 και ο αριθμός (3) αντιστοιχεί σε δείγμα που έχει gDNA από WT ποντίκι, σαν αρνητικό μάρτυρα, διότι δεν δίνει ζώνη αφού δεν έχει λάβει μέρος ο ανασυνδυασμός. Το σύμβολο (M) αντιστοιχεί στο δείκτη (PCR Ladder marker) που χρησιμοποιείται, για τον ακριβή προσδιορισμό του μεγέθους του προϊόντος.



Σχήμα 3.5: Αναμενόμενες ζώνες των προϊόντων της LR-PCR στον 3' και τον 5' βραχίονα, στα 8,405bp και 7,509bp αντίστοιχα, που επιβεβαιώνουν την σωστή στόχευση. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 0.7% 1x TAE gel, στα 41V, για 300min.

Οι cKO *Lpar1* κλώνοι επεκτάθηκαν από την Διαγονιδιακή εγκατάσταση του Alexander Fleming και έγινε καρυοτυπική ανάλυση για να επαληθευτεί η γενετική ακεραιότητα των κλώνων. Τα ES κύτταρα στη συνέχεια εγχύθηκαν με μικροένεση σε C57BL/6 αλμπίνο βλαστοκύστες. Αυτές οι βλαστοκύστες ελήφθησαν είτε από έμβρυα που συλλέχτηκαν πρόσφατα είτε από κατεψυγμένα αποθέματα.

Μετά την έγχυση των ES κυττάρων, μεταφέρθηκαν σε ψευδοκυφορούντα θηλυκά και τα νεογνά γεννήθηκαν. Αν και οι δύο κλώνοι χρησιμοποιήθηκαν για μικροενέσεις, μόνο ο κλώνος C05 απέδωσε χιμαιρικούς ποντικούς, ποντικούς δηλαδή που θα φέρουν

κύτταρα τόσο από τη βλαστοκύστη (λευκές περιοχές) όσο και από τα τροποποιημένα ES κύτταρα(αγουτι-καφέ περιοχές). Δύο χιμαιρικοί αρσενικοί ποντικοί ελήφθησαν.

Οι 2 χίμαιρες γοντυπήθηκαν ως προς το γονίδιο lacZ και την κασέτα νεομυκίνης, για την περαιτέρω επιβεβαίωση της σωστής στόχευσης του γονιδιακού τόπου Lpar1.

Γονοτύπηση για το γονίδιο lacZ

Και οι δυο εκκινητές (674,675) προσδένονται στο γονίδιο lacZ.(Σχήμα 2.1)

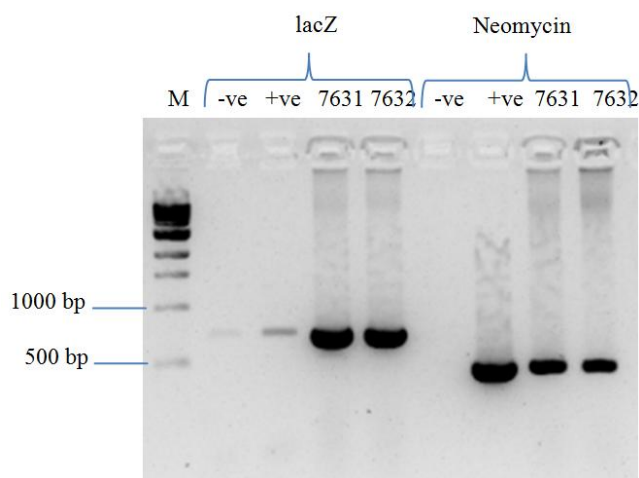
Το ζεύγος των εκκινητών λειτουργεί μόνο με μεταλλαγμένο gDNA και το αναμενόμενο μήκος προϊόντος είναι 715bp.

Γονοτύπηση για την κασέτα neo

Και οι δυο εκκινητές (01,02) προσδένονται στην κασέτα neo.(Σχήμα 2.1)

Το ζεύγος των εκκινητών λειτουργεί μόνο με μεταλλαγμένο gDNA και το αναμενόμενο μήκος προϊόντος είναι 475bp.

Παρουσιάζονται οι ζώνες που ελήφθησαν για τους 2 χιμαιρικούς ποντικούς (7631,7632). Ο συμβολισμός (-ve) αντιστοιχεί στα δείγματα που έχουν νερό, αντί για gDNA, ως εκμαγείο, ο συμβολισμός (+ve) αντιστοιχεί στα δείγματα που έχουν gDNA από τον ES κυτταρικό κλώνο EPD0496_2_C05. M: δείκτης



Σχήμα 3.6: Αναμενόμενες ζώνες για lacZ και κασέτα neo, στα 715bp και 475bp αντίστοιχα, που επιβεβαιώνουν την σωστή στόχευση. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel 1.5% αгарόζης σε 1x TBE, για 40min στα 100V.

Οι δύο χιμαιρικοί αρσενικοί ποντικοί διασταυρώθηκαν με C57BL/6 θηλυκούς ποντικούς. Οι απόγονοι γονοτυπήθηκαν και συνολικά 11 cKO Lpar1 (tm1a) γεννήθηκαν.

Πρωτόκολλο γονοτύπησης για Lpar1 tm1a αλληλόμορφα

Το πρωτόκολλο έχει κατατεθεί στην EMMA.

1^η επιλογή για τον προσδιορισμό του γονότυπου:

Ο 612 (Lpar1-for) εκκινητής προσδένεται στον 3' βραχίονα, άρα και σε WT και σε μεταλλαγμένο gDNA. Ο εκκινητής 613 (loxP-rev), προσδένεται στην αλληλουχία loxP₃, άρα αποκλειστικά σε μεταλλαγμένο gDNA. (Σχήμα 2.1).

Το ζεύγος των εκκινητών λειτουργεί μόνο με μεταλλαγμένο gDNA και το αναμενόμενο μήκος του προϊόντος είναι 318 bp.

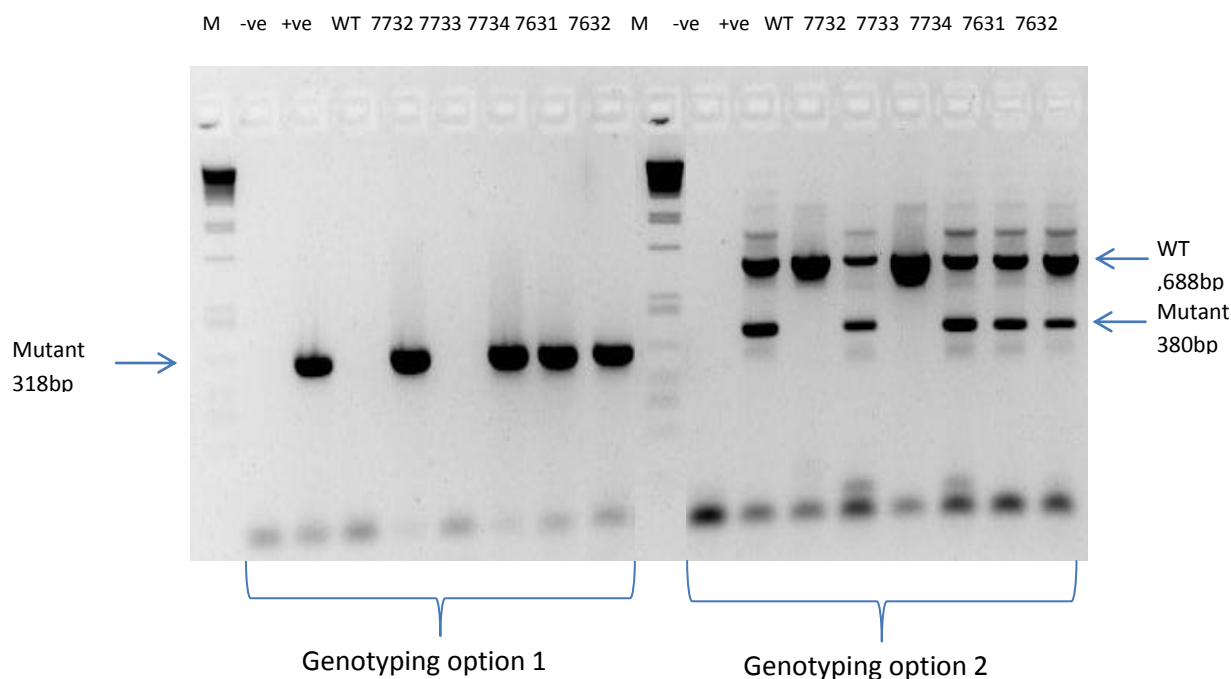
2^η επιλογή για τον προσδιορισμό του γονότυπου:

Οι εκκινητές 614 (Lpar1-5'arm) και 615 (Lpar1-3'arm), προσδένονται στον 5' βραχίονα και στον κρίσιμο εξώνιο, αντίστοιχα, άρα και σε WT και σε μεταλλαγμένο gDNA. Ο εκκινητής 616 (LAR3) προσδένεται σε μια αλληλουχία 2 ιντρονίων της κασέτας στόχευσης (engrailed-2 intron), άρα αποκλειστικά σε μεταλλαγμένο gDNA. (Σχήμα 2.1) Το ζεύγος των εκκινητών 614/615 λειτουργεί με WT και με μεταλλαγμένο gDNA, και το αναμενόμενο μήκος προϊόντος είναι 688 bp με wt gDNA, ενώ με μεταλλαγμένο gDNA είναι 7701bp και δεν ανιχνεύεται.

Το ζεύγος των εκκινητών 614/616 λειτουργεί μόνο με μεταλλαγμένο gDNA και το αναμενόμενο μήκος του προϊόντος είναι 380 bp.

Παρουσιάζεται ένα παράδειγμα με τις αναμενόμενες μπάντες για τα tm1a^{+/+} και tm1a^{+/-} ποντίκια. Οι αριθμοί που φαίνονται στην κορυφή της φωτογραφίας αναφέρονται ενδεικτικά σε κάποιους από τους απόγονους των χιμαιρικών ποντικών. Ο συμβολισμός (-ve) αντιστοιχεί στα δείγματα που έχουν νερό, αντί για gDNA, ως εκμαγείο, ο συμβολισμός (+ve) αντιστοιχεί στα δείγματα που έχουν gDNA από τον ES κυτταρικό κλώνο EPD0496_2_C05, και ο συμβολισμός WT αντιστοιχεί στα δείγματα που έχουν ως εκμαγείο gDNA C57BL/6 ποντικών. Οι αριθμοί 7732, 7733, 7734, 7631, 7632

αντιστοιχούν σε δείγματα ποντικών των οποίων ελέγχεται ο γονότυπος. M: δείκτης (*Pst*I-cut lambda DNA)



Σχήμα 3.7: Παράδειγμα γονοτύπησης cKO *Lpar1* (*Lpar1*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}) ποντικού. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε gel 2% αγαρόζης σε 1x TBE, για 40min στα 120V.

Ενδεικτικά, για έναν από τους πρώτους απογόνους των χιμαιρικών ποντικών (δηλαδή έναν από τους πρώτους tm1a), πάρθηκε τμήμα της ουράς του, έγινε απομόνωση DNA και επιβεβαιώθηκε ο 5' ή ο 3' βραχίονας με LR-PCR ξανά (δεν δείχνονται τα δεδομένα).

Επέκταση της σειράς των tm1a^{+/-} ποντικών

Για να ελέγξουμε εάν το πρώτο KO αλληλόμορφο επηρεάζει την βιωσιμότητα των ετερόζυγων ζώων καθώς και για αυξήσουμε τον πληθυσμό των ποντικών που φέρουν το πρώτο knockout αλληλόμορφο σε ετεροζυγωτία, οι tm1a^{+/-} ποντικοί διασταυρώθηκαν με C57BL/6J ποντικούς.

Οι απόγονοι είναι σεξουαλικά ώριμοι σε ηλικία 7-8 εβδομάδων.

Πίνακας 3.1: Συνολικές διασταυρώσεις $tm1a^{+/-}$ ποντικών με C57BL/6J ποντικούς

Total matings	Total progeny			
5	48 (100%)			
	$tm1a^{+/+}$		$tm1a^{+/-}$	
	Born	Expected	Born	Expected
	24	24	24	24
	50%	50%	50%	50%
1♂C57BL/6J x 1♀$tm1a^{+/-}$	6			
	4	3	2	3
	66,7%	50%	33,3%	50%
1♂$tm1a^{+/-}$ x 1♀C57BL/6J	14			
	6	7	8	7
	42.8%	50%	57.1	50%
1♂$tm1a^{+/-}$ x 2♀C57BL/6J	10			
	4	5	6	5
	40%	50%	60%	50%
1♂$tm1a^{+/-}$ x 2♀C57BL/6J	5			
	3	2-3	2	2-3
	60%	50%	40%	50%
1♂$tm1a^{+/-}$ x 2♀C57BL/6J	13			
	7	6-7	6	6-7
	53.8%	50%	46.2%	50%

Οι γονότυποι των απογόνων, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1, αντιστοιχούν στις αναμενόμενες αναλογίες κληρονομικότητας του Μέντελ, υποδεικνύοντας ότι δεν επηρεάζεται η βιωσιμότητα των ετερόζυγων ζώων που φέρουν το αλληλόμορφο $tm1a$. Η προσεκτική παρακολούθηση όλων των γεννών που παράγονται είναι κρίσιμη δεδομένου ότι οι ποντικοί $tm1a$ είναι πρώτοι ΚΟ ποντικοί και μπορεί να έχουν απροσδόκητους φαινότυπους που επηρεάζουν αρνητικά την καλή διαβίωση τους.

Έχει κατατεθεί στην EMMA σπέρμα, από $tm1a^{+/-}$ αρσενικούς ποντικούς, για πάγωμα(sperm freezing).

Για να ελεγχθεί η βιωσιμότητα των ποντικών που φέρουν το πρώτο-ΚΟ αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία, διασταυρώθηκαν $Lpar1\ tm1a^{+/-}$ ποντικοί μεταξύ τους.

Πίνακας 3.2 : Συνολικές διασταυρώσεις μεταξύ $tm1a^{+/-}$ ποντικών.

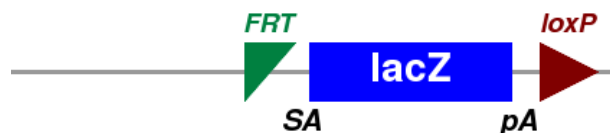
Total matings	Total progeny					
3	12 (100%)					
	$tm1a^{+/+}$		$tm1a^{+/-}$		$tm1a^{-/-}$	
	Born	Expected	Born	Expected	Born	Expected
	4	2-3	7	5-6	1	2-3
	33.3%	25%	58.3%	50%	8.3%	25%
$1\sigma^{tm1a^{+/-}} \times 2\phi^{tm1a^{+/-}}$	7					
	1	1-2	5	3-4	1	1-2
	14.3%	25%	71.4%	50%	14.3%	25%
$1\sigma^{tm1a^{+/-}} \times 2\phi^{tm1a^{+/-}}$	3					
	3	1	0	1-2	0	1
	100%	25%	0%	50%	0%	25%
$1\sigma^{tm1a^{+/-}} \times 2\phi^{tm1a^{+/-}}$	2					
	0	0-1	2	1	0	0-1
	0%	25%	100%	50%	0%	25%

Οι αναλογίες των γονοτύπων των απογόνων, δεν ήταν οι αναμενόμενες κατά Mendel, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2. Άρα είναι πιθανό το πρώτο ΚΟ αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία, να επηρεάζει την βιωσιμότητα των $tm1a^{-/-}$ ποντικών.

Παρ' όλα αυτά θα πρέπει να αυξηθεί ο αριθμός των διασταυρώσεων μεταξύ των $tm1a^{+/-}$ ποντικών, ώστε να επιβεβαιωθεί αυτό το συμπέρασμα.

3.2 Παραγωγή ποντικών που εκφράζουν το γονίδιο LacZ ($tm1b$)

Το $Lpar1^{tm1b(EUCOMM)Wtsi}$ είναι ένα ανενεργό αλληλόμορφο που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη του γονιδίου αναφοράς lacZ. Προέρχεται από το $Lpar1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$ αλληλόμορφο, μέσω ανασυνδυασμού με μεσολάβηση της Cre.



Σχήμα 3.8: το αλληλόμορφο $tm1b$. Ο ανασυνδυασμός στις θέσεις loxP με την μεσολάβηση της Cre, έχει ως αποτέλεσμα την εκτομή του κρίσιμου εξονίου (3). Το γονίδιο αναφοράς LacZ εκφράζεται αντί για το γονίδιο ενδιαφέροντος.

Figure taken from: [http://www.mousephenotype.org/data/alleles/MGI:108429/tm1b\(EUCOMM\)Wtsi](http://www.mousephenotype.org/data/alleles/MGI:108429/tm1b(EUCOMM)Wtsi)

Για την παραγωγή ποντικών που φέρουν αυτό το αλληλόμορφο, διασταυρώθηκαν αρσενικοί ποντικοί που εκφράζουν Cre ρεκομπινάση ($X^{Cre}Y$) με $tm1a^{+/-}$ θηλυκούς ποντικούς. Μόνο οι θηλυκοί απόγονοι (25%) μπορούν να έχουν κληρονομήσει το αλληλόμορφο $tm1a$ και το αλληλόμορφο Cre, ώστε να επέλθει ανασυνδυασμός και παραγωγή ποντικών που φέρουν το $tm1b$ αλληλόμορφο. Το υπόλοιπο 75% των απογόνων θα έχουν γονότυπο $tm1a^{+/-}$ ή $tm1a^{+/+}$ $Cre^{+/-}$ ή WT.

Πίνακας 3.3: Συνολικές διασταυρώσεις $tm1a^{+/-}$ ποντικών με ποντικούς που εκφράζουν Cre ρεκομπινάση για την παραγωγή $tm1b$ ποντικών

Total matings	Total progeny			
4	35 (100%)			
	$tm1a^{+/-}/tm1a^{+/+}$ $Cre^{+/-}/WT$		$tm1b^{+/-}$ $Cre^{+/-}$	
	Born	Expected	Born	Expected
	26	26	9	8-9
	75%	75%	25%	25%
1♂ CMV-Cre x 2♀ $tm1a^{+/-}$	9			
	6	6-7	2	2-3
	66,7%	75%	33,3%	25%
1♂ CMV-Cre x 2♀ $tm1a^{+/-}$	11			
	8	8-7	3	2-3
	72.7%	75%	27.3%	25%
1♂ CMV-Cre x 2♀ $tm1a^{+/-}$	8			
	5	6	3	2
	62.5%	75%	37.5%	25%
1♂ CMV-Cre x 2♀ $tm1a^{+/-}$	7			
	6	5-6	1	1-2
	85.7%	75%	14.3%	25%

Στον πίνακα 3.3 φαίνεται ότι, το 25% των απογόνων, όπως επιβεβαιώθηκε μετά από γονοτύπηση, έφερε το αλληλόμορφο $tm1b$ σε ετεροζυγωτία.

Πρωτόκολλο γονοτύπησης για $Lpar1$ $tm1b$ αλληλόμορφα

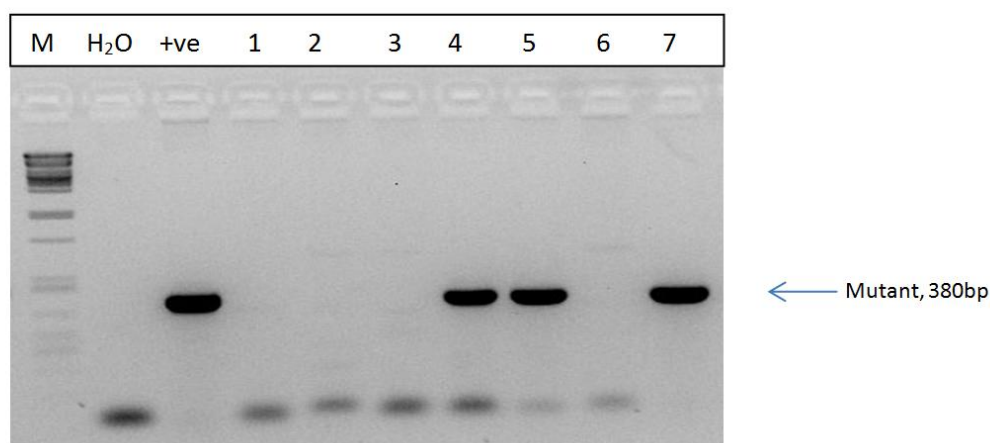
Το πρωτόκολλο έχει κατατεθεί στην EMMA.

Ο εκκινητής 727($Tm1b_prom_F$) προσδένεται στην θέση $loxP_1$, άρα μόνο σε μεταλλαγμένο gDNA. Ο εκκινητής 728 (Floxed LR) προσδένεται στην θέση $loxP_3$, άρα επίσης μόνο σε μεταλλαγμένο gDNA. (Σχήμα 2.1)

Το ζεύγος των εκκινητών λειτουργεί μόνο με μεταλλαγμένο gDNA και το αναμενόμενο μήκος του προϊόντος είναι 380 bp.

Το ισχύον πρωτόκολλο δεν κάνει διακρίσεις μεταξύ των ομο- και ετερόζυγων ποντικών.

Παρουσιάζεται ένα παράδειγμα γονοτύπησης όπου φαίνεται η αναμενόμενη ζώνη για τους $tm1b^{+/-}$ ποντικούς. Το δείγμα που έχει νερό, αντί για gDNA, ως εκμαγείο, αναφέρεται ως H₂O και ο συμβολισμός (+ve) αντιστοιχεί στο δείγμα που έχει gDNA από Lpar1 $tm1b$ ποντικό. Οι αριθμοί 1-7 αντιστοιχούν στα δείγματα ποντικών, των οποίων ελέγχονται οι γονότυποι. M: δείκτης (*Pst*I-cut lambda DNA)



Σχήμα 3.9: Παράδειγμα γονοτύπησης $Lpar1^{tm1b(EUCOMM)Wtsi}$ ποντικού. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε gel 2% αγαρόζης σε 1x TBE, για 40min στα 120V.

Επέκταση της σειράς των $tm1b$ ποντικών

Για να αυξηθεί ο αριθμός των ποντικών που φέρουν το αλληλόμορφο $tm1b$, καθώς και για την παραγωγή $tm1b^{+/-}$ ποντικών που έχει απομακρυνθεί η Cre ρεκομπινάση από το γενετικό τους υπόβαθρο, οι $Lpar1\ tm1b^{+/-}$ θηλυκοί ποντικοί, διασταυρώθηκαν με C57BL/6 αρσενικούς ποντικούς.

Πίνακας 3.4: Συνολικές διασταυρώσεις $tm1b^{+/-}$ ποντικών με C57BL/6J ποντικούς

Total matings	Total progeny			
9	53 (100%)			
	$tm1b^{+/+}$		$tm1b^{+/-}$	
	Born	Expected	Born	Expected
	39	26-27	14	26-27
	73.6%	50%	26.4%	50%
1♂ C57BL/6J x 1♀ $tm1b^{+/-}$	5			
	5	2-3	0	2-3
	100%	50%	0%	50%
1♂ C57BL/6J x 2♀ $tm1b^{+/-}$	8			
	7	4	1	4
	87.5%	50%	12.5%	50%
1♂ C57BL/6J x 2♀ $tm1b^{+/-}$	7			
	5	3-4	2	3-4
	71.4%	50%	28.6%	50%
1♂ C57BL/6J x 2♀ $tm1b^{+/-}$	6			
	5	3	1	3
	83.3%	50%	16.7%	50%
1♂ C57BL/6J x 2♀ $tm1b^{+/-}$	9			
	6	4-5	3	4-5
	66.7%	50%	33.3%	50%
1♂ C57BL/6J x 1♀ $tm1b^{+/-} Cre^{-/-}$	2			
	2	1	0	1
	100%	50%	0%	50%
1♂ C57BL/6J x 1♀ $tm1b^{+/-} Cre^{-/-}$	8			
	4	4	4	4
	50%	50%	50%	50%
1♂ C57BL/6J x 2♀ $tm1b^{+/-}$	6			
	3	3	3	3
	50%	50%	50%	50%
1♂ C57BL/6J x 2♀ $tm1b^{+/-}$	2			
	2	1	0	1
	100%	50%	0%	50%

Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.4, το ποσοστό των ετερόζυγων απογόνων δεν είναι το αναμενόμενο με βάση την αρχή κληρονομικότητας του Mendel. Είναι πιθανό λοιπόν το αλληλόμορφο $tm1b$, σε ετεροζυγωτία, να επηρεάζει την βιωσιμότητα των απογόνων.

Οι απόγονοι γονοτυπήθηκαν για το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης (χρησιμοποιούμενο ζεύγος εκκινητών 725/726). Το αναμενόμενο μήκος του προϊόντος για τους ποντικούς

που φέρουν το γονίδιο της ρεκομπινάσης είναι 233bp. Η γονοτύπηση των ποντικών με καθαρό γενετικό υπόβαθρο, δεν δίνει προϊόν.

Από τις παραπάνω διασταυρώσεις – εκτός από τις 2 διασταυρώσεις που οι $tm1b^{+/-}$ ποντικοί είναι $Cre^{-/-}$, περιμένουμε το 50% των $tm1b^{+/+}$ απογόνων και το 50% των $tm1b^{-/+}$ απογόνων, να μην έχουν Cre ρεκομπινάση στο γενετικό τους υπόβαθρο.

Πίνακας 3.5: Συνολικός αριθμός $tm1b^{+/-}$ και $tm1b^{+/+}$ ποντικών χωρίς Cre στο γενετικό τους υπόβαθρο

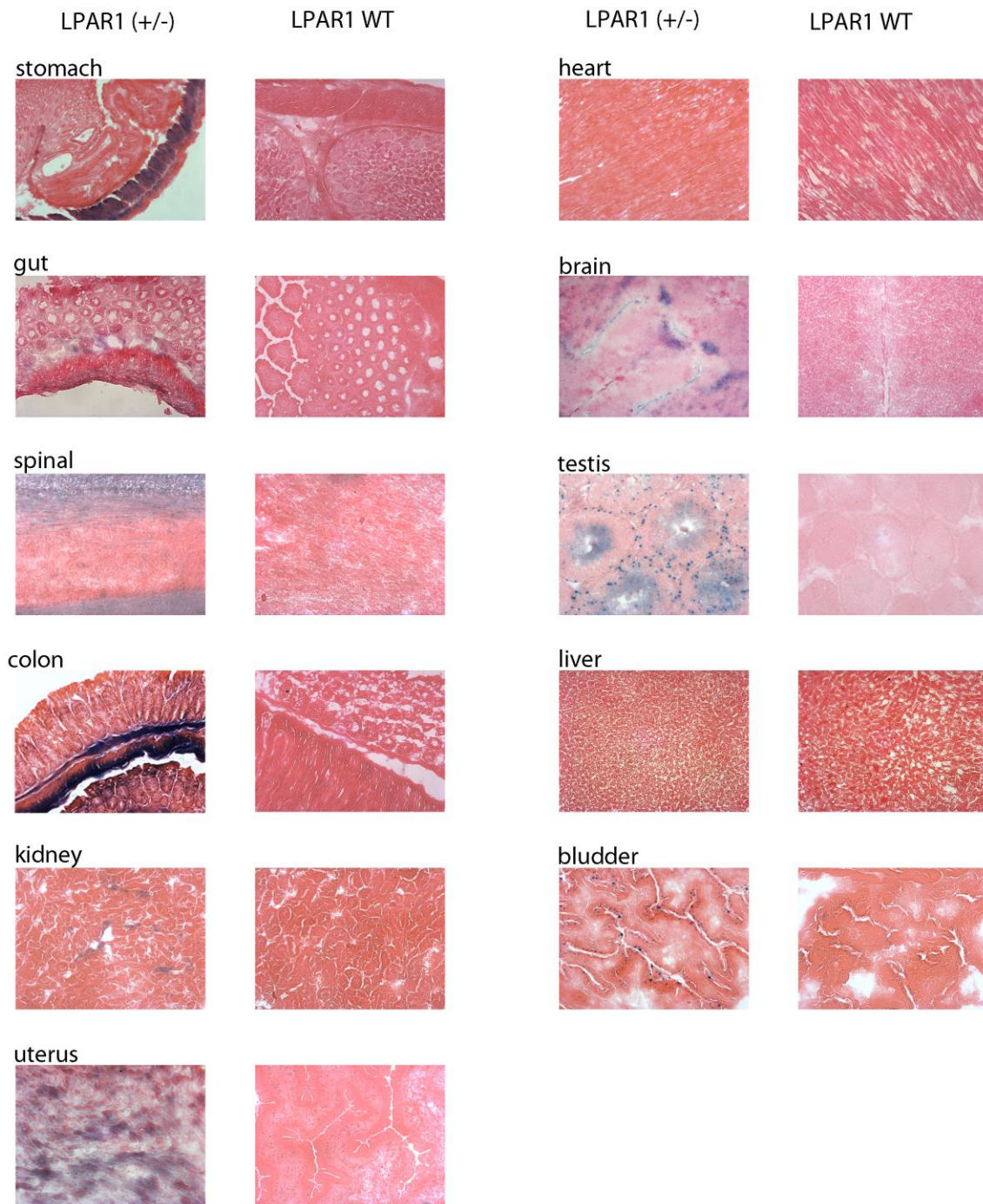
Total matings	Total progeny			
7	43			
	$tm1b^{+/+}$: 33		$tm1b^{+/-}$: 10	
	$Cre^{-/-}$		$Cre^{-/-}$	
	Born	Expected	born	expected
	12	16-17	5	5
	36.4%	50%	50%	50%

Όπως προέκυψε από την γονοτύπηση για την Cre και φαίνεται στον πίνακα 3.5, το 39.5% των συνολικών απογόνων δεν έχουν Cre στο γενετικό τους υπόβαθρο.

Έχει κατατεθεί στην EMMA σπέρμα, από $tm1b^{+/-}$ $Cre^{-/-}$ αρσενικούς ποντικούς, για πάγωμα (sperm freezing).

3.2.1 Μελέτη της ιστολογικής έκφρασης του *Lpar1*, μέσω της έκφρασης του γονιδίου *LacZ*

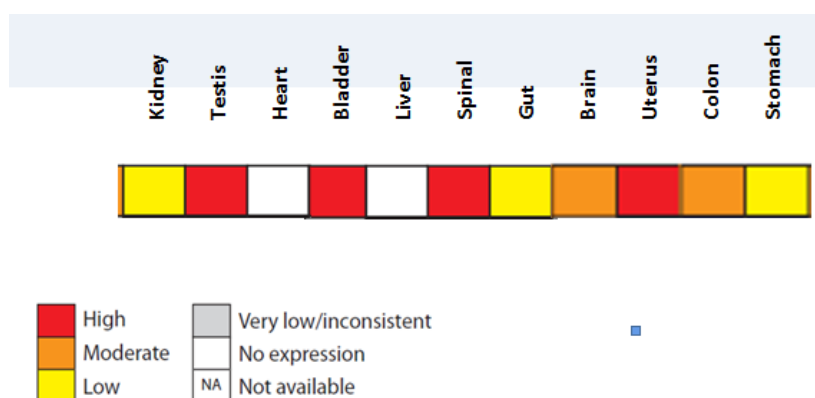
Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε συνολικά 5 ποντικούς φυσικού τύπου (C57BL/6) και 7 *Lpar1* $tm1b^{+/-}$ ποντικούς. Απομονώθηκαν τα εξής όργανα: στομάχι, λεπτό έντερο, νωτιαίος μυελός, νεφρός, μήτρα, ουροδόχος κύστη, καρδιά, εγκέφαλος, όρχεις, συκώτι και παχύ έντερο. Πραγματοποιήθηκε ιστολογική παρατήρηση των διαφόρων ιστών μετά από ειδική χρώση , όπως παρουσιάζεται παρακάτω.



Σχήμα 3.10: Φωτογραφίες από κρυτομές οργάνων μετά από χρώση X gal(x10 και x20).

Στο σχήμα 3.10 φαίνονται κρυοτομές ιστών σε OCT, μετά από χρώση με X gal. Η έκφραση του LacZ ελέγχεται από την εμφάνιση μπλε στιγμάτων στον ιστό. Με την χρώση με X gal είναι εφικτός ο διαχωρισμός των φυσιολογικών ποντικών (δεξιά στήλη σχήματος) από τους ετερόζυγους ποντικούς, όπου έχει λάβει μέρος ο ανασυνδυασμός.(αριστερή στήλη σχήματος).

Μία ποιοτική αναπαράσταση της έκφρασης του *Lpar1*, ανάλογα με την ποσότητα και την ένταση των μπλε στιγμάτων που παρατηρήθηκαν σε κάθε έναν από τους ιστούς που μελετήθηκαν καθώς και με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα (<http://biogps.org/#goto=genereport&id=14745>) , συνοψίζεται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα 3.11: σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του *Lpar1* στους διάφορους ιστούς ποντικού, με βάση τα αποτελέσματα και βιβλιογραφικά δεδομένα.

3.3 Παραγωγή “Floxed” ποντικών (tm1c)

Το tm1c είναι το υπό όρους αλληλόμορφο . Το Lpar1 cKO ποντίκι προήλθε από την διασταύρωση ποντικών που φέρουν το πρώτου νοκ-άουτ αλληλόμορφο με ποντικούς που εκφράζουν την ρεκομπινάση FLP .



Σχήμα 3.12: το αλληλόμορφο tm1c. Ο ανασυνδυασμός στις θέσεις FRT, με την δράση της Flp ρεκομπινάσης, έχει ως αποτέλεσμα την αφαίρεση της κασέτας νεομυκίνης και του γονιδίου αναφοράς και τη αποκατάσταση της έκφρασης του γονιδίου.

Για την παραγωγή ποντικών που φέρουν αυτό το αλληλόμορφο, διασταυρώθηκαν ποντικοί που εκφράζουν Flp ρεκομπινάση με tm1a^{+/-} ποντικούς. Ένας στους τέσσερις απογόνους (25%) κατά Mendel, κληρονομεί το αλληλόμορφο tm1a και το αλληλόμορφο Flp ώστε να επέλθει ανασυνδυασμός και παραγωγή ποντικών που φέρουν το tm1c αλληλόμορφο. Το υπόλοιπο 75% των απογόνων θα έχει γονότυπο tm1a^{+/-} ή tm1a^{+/+}Flp^{+/-} ή WT. Όλοι όμως οι ποντικοί θα έχουν το γονίδιο τα ρεκομπινάσης στο γενετικό τους υπόβαθρο.

Πίνακας 3.6: Συνολικές διασταυρώσεις $tm1a^{+/-}$ ποντικών με ποντικούς που εκφράζουν Flp ρεκομπινάση, για την παραγωγή $tm1c$ ποντικών

Total matings	Total progeny			
9	84 (100%)			
	$tm1a^{+/-}/tm1a^{+/+}Flp^{+/-}/WT$		$tm1c^{+/-}Flp^{+/-}$	
	Born	Expected	Born	Expected
	63	63	21	21
	75%	75%	25%	25%
1♂ Flper x 2♀ $tm1a^{+/-}$	6			
	4	4-5	2	1-2
	66.7%	75%	33.3%	25%
1♂ Flper x 2♀ $tm1a^{+/-}$	5			
	5	3-4	0	1-2
	100%	75%	0%	25%
1♂ $tm1a^{+/-}$ x 2♀ Flper	8			
	7	6	1	2
	87.5%	75%	12.5%	25%
1♂ Flper x 1♀ $tm1a^{+/-}$	13			
	9	9-10	4	3-4
	69.3%	75%	30.7%	25%
1♂ Flper x 1♀ $tm1a^{+/-}$	3			
	3	2	0	1
	100%	75%	0%	25%
1♂ $tm1a^{+/-}$ x 2♀ Flper	5			
	5	3-4	0	1-2
	100%	75%	0%	25%
1♂ Flper x 3♀ $tm1a^{+/-}$	14			
	9	10-11	5	3-4
	64.3%	75%	35.7%	25%
1♂ $tm1a^{+/-}$ x 2♀ Flper	11			
	8	8-9	3	2-3
	72.7%	75%	27.3%	25%
1♂ Flper x 3♀ $tm1a^{+/-}$	19			
	13	14-15	6	4-5
	68.4%	75%	31.6%	25%

Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.6, το 25% των συνολικών απογόνων φέρουν το αλληλόμορφο $tm1c$ σε ετεροζυγωτία.

Πρωτόκολλο γονοτύπησης για $Lpar1$ $tm1c$ αλληλόμορφα

Το πρωτόκολλο έχει κατατεθεί στην EMMA.

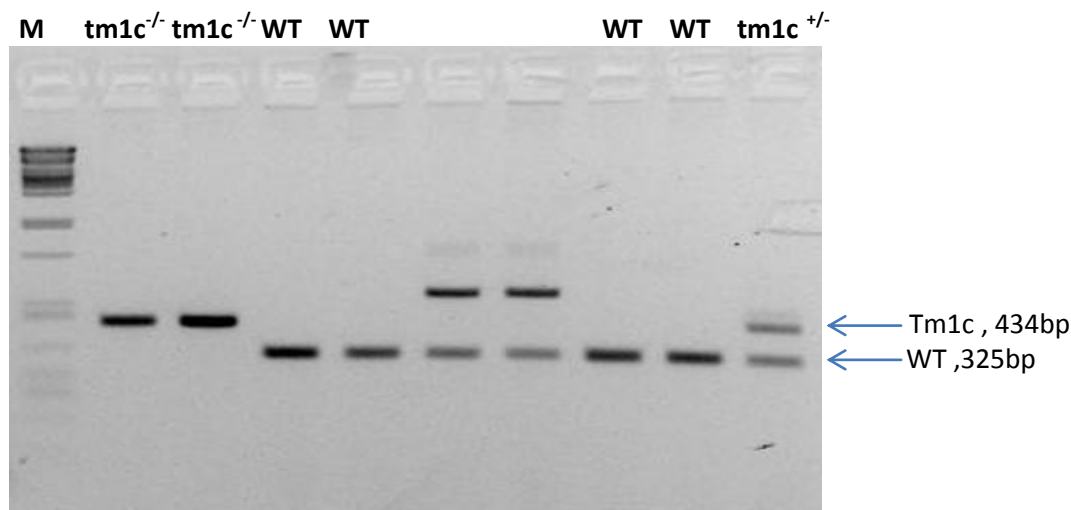
Οι εκκινητές 789,791 προσδένονται στον 5' βραχίονα και στον 3' βραχίονα, αντίστοιχα, του γονιδίου άρα και σε WT και σε μεταλλαγμένο gDNA.Ο εκκινητής 790 προσδένεται στο κρίσιμο εξώνιο, οπότε και σε WT και σε μεταλλαγμένο gDNA.(Σχήμα 2.1)

Το ζεύγος των εκκινητών 789/791 λειτουργεί και με WT και με μεταλλαγμένο gDNA,αλλά το αναμενόμενο μήκος των προϊόντων είναι πολύ μεγάλο και δεν ανιχνεύεται.

Το ζεύγος των εκκινητών 789/790 λειτουργεί και με WT και με μεταλλαγμένο gDNA, και το αναμενόμενο μήκος των προϊόντων είναι 325 bp και 434bp, αντίστοιχα.

Το ισχύον πρωτόκολλο PCR μπορεί να διακρίνει μεταξύ ομόζυγων και ετερόζυγων floxed ποντικών.

Παρουσιάζεται ένα παράδειγμα γονοτύπησης όπου φαίνονται οι αναμενόμενες ζώνες για τους WT και τους $tm1c^{+/-}$ ποντικούς. M: δείκτης (*Pst*I-cut lambda DNA)



Σχήμα 3.13: Παράδειγμα γονοτύπησης για *Lpar1* floxed ποντικούς. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε gel 2% αγαρόζης σε 1x TBE, για 40 min στα 120V

Επέκταση της σειράς των $tm1c$ ποντικών

Για αύξηση και διατήρηση της σειράς των ποντικών που φέρουν το αλληλόμορφο $tm1c^{+/-}$, καθώς και για να απομακρυνθεί η FLP ρεκομπινάση από το γενετικό τους υπόβαθρο, οι *Lpar1* $tm1c^{+/-}$ απόγονοι διασταυρώθηκαν με C57BL/6J ποντικούς,

Πίνακας 3.7: Συνολικές διασταυρώσεις tm1c ποντικών με C57BL/6J ποντικούς.

Total matings	Total progeny			
10	102(100%)			
	tm1c ^{+/+}		tm1c ^{+/-}	
	Born	Expected	Born	Expected
	56	51	46	51
	54.9%	50%	45.1%	50%
1♂ C57BL/6J x 1♀ tm1c ^{+/-}	3			
	3	1-2	0	1-2
	100%	50%	0%	50%
1♂ C57BL/6J x 1♀ tm1c ^{+/-}	6			
	2	3	4	3
	33.3%	50%	66.7%	50%
1♂ tm1c ^{+/-} x 3♀ C57BL/6J	7			
	5	3-4	2	3-4
	71.4%	50%	28.6%	50%
1♂ tm1c ^{+/-} x 2♀ C57BL/6J	12			
	7	6	5	6
	58.3%	50%	41.6%	50%
1♂ C57BL/6J x 1♀ tm1c ^{+/-}	9			
	4	4-5	5	4-5
	44.4%	50%	55.6%	50%
1♂ C57BL/6J x 2♀ tm1c ^{+/-}	13			
	7	6-7	6	6-7
	53.8%	50%	46.2%	50%
1♂ C57BL/6J x 1♀ tm1c ^{+/-}	7			
	3	3-4	4	3-4
	42.9%	50%	57.1%	50%
1♂ C57BL/6J x 2♀ tm1c ^{+/-} Flp ^{-/-}	17			
	10	8-9	7	8-9
	58.8%	50%	41.2%	50%
1♂ C57BL/6J x 2♀ tm1c ^{+/-} Flp ^{-/-}	16			
	8	8	8	0
	50%	50%	50%	50%
1♂ tm1c ^{+/-} Flp ^{-/-} x 2♀ C57BL/6J	12			
	7	6	5	6
	58.3%	50%	41.6%	50%

Οι απόγονοι γεννιούνται στις αναμενόμενες, κατά Mendel, γονοτυπικές αναλογίες, οπότε το αλληλόμορφο tm1c σε ετεροζυγωτία δεν φαίνεται να επηρεάζει την βιωσιμότητα των ζώων.

Οι απόγονοι γονοτυπήθηκαν για το γονίδιο της FLP ρεκομπινάσης (χρησιμοποιούμενο ζεύγος εκκινητών 710/711). Το αναμενόμενο μήκος του προϊόντος για τους ποντικούς που φέρουν το γονίδιο της ρεκομπινάσης είναι 600bp. Η γονοτύπηση των ποντικών με καθαρό γενετικό υπόβαθρο, δεν δίνει προϊόν.

Από τις παραπάνω διασταυρώσεις –εκτός από τις 3 διασταυρώσεις που οι $tm1c^{+/-}$ ποντικοί είναι $Flp^{-/-}$, περιμένουμε το 50% των $tm1c^{+/-}$ απογόνων και το 50% των $tm1c^{-/+}$ απογόνων, να μην έχουν FLP ρεκομπινάση στο γενετικό τους υπόβαθρο.

Πίνακας 3.8: Συνολικός αριθμός $tm1c^{+/-}$ και $tm1c^{-/+}$ ποντικών χωρίς FLP στο γενετικό τους υπόβαθρο.

Total matings	Total progeny			
7	57			
	$tm1c^{+/-}$: 31		$tm1c^{-/+}$: 26	
	$Flp^{-/-}$		$Flp^{-/-}$	
	Born	Expected	Born	Expected
	17	15-16	10	13
	54.5%	50%	38.5%	50%

Όπως προέκυψε από την γονοτύπηση για FLP και φαίνεται στον πίνακα 3.8, το 47.4% των συνολικών απογόνων δεν έχουν FLP στο γενετικό τους υπόβαθρο.

Έχει κατατεθεί στην EMMA σπέρμα, από $tm1c^{+/-}$ $Flp^{-/-}$ αρσενικούς ποντικούς, για πάγωμα (sperm freezing).

3.4 Παραγωγή ΚΟ ποντικών($tm1d$)

Το $tm1d$ είναι το ανενεργό αλληλόμορφο συγκεκριμένου οργάνου ή κυτταρικού τύπου. Οι ΚΟ $Lpar1$ ποντικοί ή αλλιώς “defloxed” ποντικοί, προκύπτουν από το ζευγάρι cKO $Lpar1$ ποντικών με ποντικούς που εκφράζουν Cre παντού ή σε συγκεκριμένο όργανο ή κυτταρικό τύπο.



Σχήμα 3.14: το αλληλόμορφο *tm1d*. Ο ανασυνδυασμός στις θέσεις *loxP* με την μεσολάβηση της *Cre*, έχει ως αποτέλεσμα την εκτομή του κρίσιμου εξονίου (3). Διαγραφή του ασύμμετρου κρίσιμου εξωνίου θα προκαλέσει μια μετατόπιση πλαισίου και ως εκ τούτου μη νοηματικές μεταλλάξεις.

Για την παραγωγή ποντικών που φέρουν αυτό το αλληλόμορφο, διασταυρώθηκαν αρσενικοί ποντικοί που εκφράζουν *Cre* ρεκομπινάση ($X^{Cre}Y$) με *tm1c*^{+/-} θηλυκούς ποντικούς. Μόνο οι θηλυκοί απόγονοι (25%) μπορούν να έχουν κληρονομήσει το αλληλόμορφο *tm1a* και το αλληλόμορφο *Cre*, ώστε να επέλθει ανασυνδυασμός και παραγωγή ποντικών που φέρουν το *tm1b* αλληλόμορφο. Το υπόλοιπο 75% των απογόνων θα έχουν γονότυπο *tm1c*^{+/-} *Flp*^{+/-} ή *tm1c*^{+/+} *Cre*^{+/+} ή WT.

Πίνακας 3.9: Συνολικές διασταυρώσεις *tm1c*^{+/-} ποντικών με ποντικούς που εκφράζουν *Cre* ρεκομπινάση, για την παραγωγή *tm1d* ποντικών

Total matings	Total progeny			
1♂ CMV-Cre x 2♀ <i>tm1c</i> ^{+/-} <i>Flp</i> ^{+/-}	8(100%)			
	<i>tm1c</i> ^{+/-} <i>Flp</i> ^{+/-} / <i>tm1c</i> ^{+/+} <i>Cre</i> ^{+/-} /WT	<i>tm1d</i> ^{+/-} <i>Flp</i> ^{+/-}		
	Born	Expected	Born	Expected
	5	6	3	2
	62.5	75%	37.5%	25%

Στον πίνακα 3.9 φαίνεται ότι, το 37.5% των απογόνων, όπως επιβεβαιώθηκε μετά από γονοτύπηση, έφερε το αλληλόμορφο *tm1d* σε ετεροζυγωτία.

Πρωτόκολλο γονοτύπησης για *Lpar1 tm1d* αλληλόμορφα

Το πρωτόκολλο έχει κατατεθεί στην EMMA.

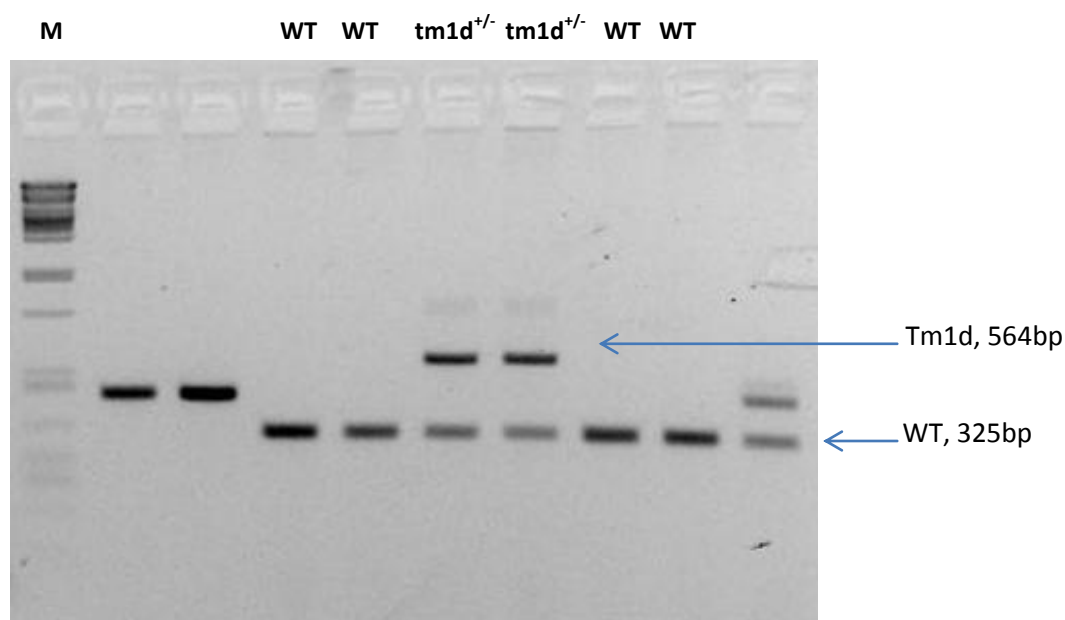
Οι εκκινητές 789, 791 δεσμεύουν τον 5' βραχίονα και τον 3' βραχίονα, αντίστοιχα, οπότε δεσμεύουν και wt και μεταλλαγμένο gDNA. Ο εκκινητής 790 δεσμεύει το κρίσιμο εξώνιο, οπότε δεσμεύει μόνο wt gDNA.(Σχήμα 2.1)

Το ζεύγος των εκκινητών 789/791 λειτουργεί και με wt και με μεταλλαγμένο gDNA, και το αναμενόμενο μήκος προϊόντος είναι 564bp για τα "defloxed" αλληλόμορφα.

Το ζεύγος των εκκινήτων 789/790 λειτουργεί μόνο με wt gDNA και το αναμενόμενο μήκος προϊόντος είναι 325 bp.

Το ισχύον πρωτόκολλο PCR μπορεί να διακρίνει μεταξύ ομόζυγων και ετερόζυγων "floxed" ποντικών.

Παρουσιάζεται ένα παράδειγμα γονοτύπησης όπου φαίνεται η αναμενόμενη ζώνη για τους $tm1d^{+/-}$ ποντικούς. M: δείκτης (*Pst*I-cut lambda DNA)



Σχήμα 3.15: Παράδειγμα γονοτύπησης για *Lpar1* defloxed ποντικούς. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε gel 2% αγαρόζης σε 1x TBE, για 40min στα 120V.

Επέκταση της σειράς των $tm1d$ ποντικών

Για να αυξηθεί ο αριθμός των ποντικών που φέρουν το αλληλόμορφο $tm1d$, καθώς και για την παραγωγή $tm1d^{+/-}$ ποντικών που έχει απομακρυνθεί η Cre και η Flp ρεκομπινάση από το γενετικό τους υπόβαθρο, οι *Lpar1* $tm1d^{+/-}$ θηλυκοί ποντικοί, διασταυρώθηκαν με C57BL/6J αρσενικούς ποντικούς.

Πίνακας 3.10: Συνολικές διασταυρώσεις $tm1d^{+/-}$ ποντικών με C57BL/6J ποντικούς

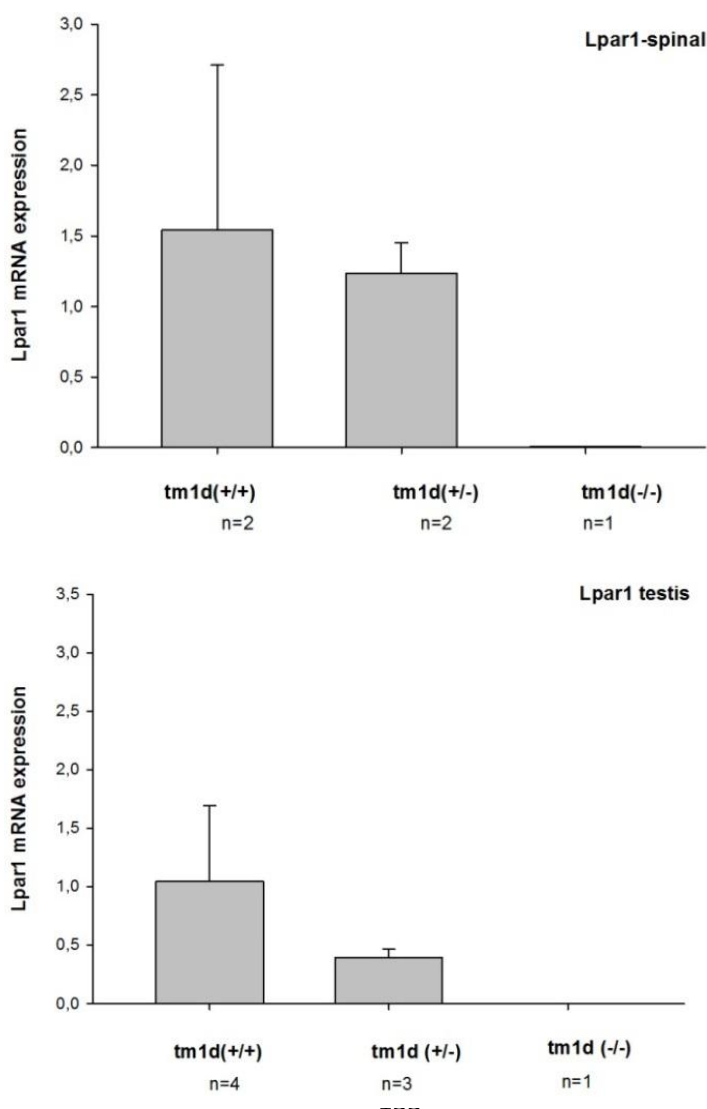
Total matings	Total progeny			
8	55 (100%)			
	$tm1d^{+/+}$		$tm1d^{+/-}$	
	Born	Expected	Born	Expected
	32	27-28	23	27-28
	58.2%	50%	41.8%	50%
1♂ C57BL/6J x 1♀ $tm1d^{+/-}$	4			
	2	2	2	2
	50%	50%	50%	50%
1♂ C57BL/6J x 2♀ $tm1d^{+/-}$	6			
	4	3	2	3
	66.7%	50%	33.3%	50%
1♂ C57BL/6J x 1♀ $tm1d^{+/-}$	5			
	4	2-3	1	2-3
	80%	50%	20%	50%
1♂C57BL/6J x 2♀ $tm1d^{+/-}$ Cre^{-/-} Flp^{-/-}	8			
	4	4	4	4
	50%	50%	50%	50%
1♂ $tm1d^{+/-}$ Cre^{-/-} Flp^{-/-} x 2♀ C57BL/6J	8			
	2	4	6	4
	25%	50%	75%	50%
1♂$tm1d^{+/-}$ Cre^{-/-} Flp^{-/-} x 2♀ C57BL/6J	6			
	3	3	3	3
	50%	50%	50%	50%
1♂$tm1d^{+/-}$ Cre^{-/-} Flp^{-/-} x 2♀ C57BL/6J	7			
	7	3-4	0	3-4
	100%	50%	0%	50%
1♂$tm1d^{+/-}$ Cre^{-/-} Flp^{-/-} x 2♀ C57BL/6J	11			
	6	5-6	5	5-6
	54.5%	50%	45.5%	50%

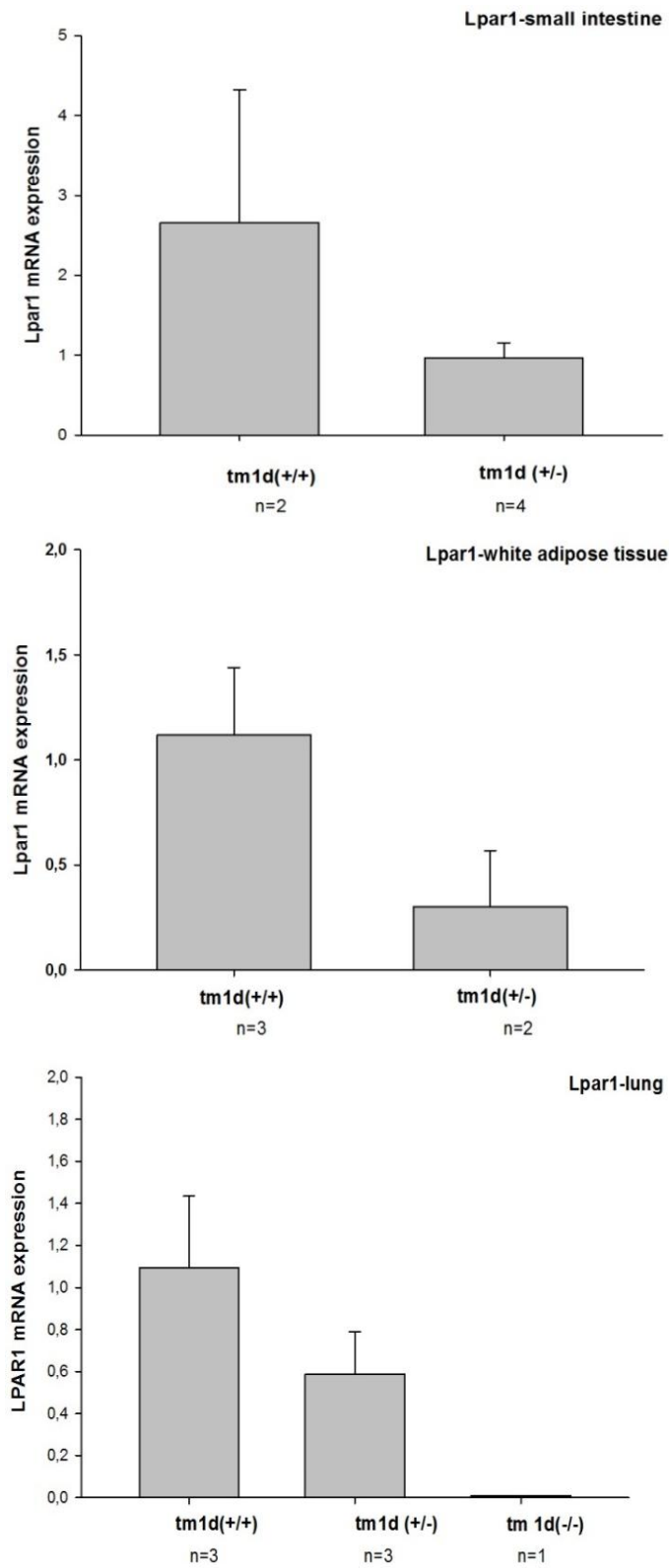
Γονοτυπήθηκαν ως προς Cre ή/και Flp ρεκομπινάση, μόνο οι $tm1d^{+/-}$ απόγονοι που προέκυψαν από τις τρεις πρώτες διασταυρώσεις και αυτοί που είχαν καθαρό γενετικό υπόβαθρο (Cre^{-/-} Flp^{-/-}), χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω διασταυρώσεις με C57BL/6J ποντικούς. Έτσι όλες οι επόμενες γενιές $tm1d^{+/-}$ ποντικών δεν έφεραν τα γονίδια για τις ρεκομπινάσεις.

3.4.1 Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου *Lpar1* σε ΚΟ ποντικούς

Η έκφραση του *Lpar1* είναι αναμενόμενο να είναι μειωμένη κατά 50% στους *tm1d*^{+/-} ποντικούς, σε σχέση με την φυσιολογική έκφραση στους *tm1d*^{+/+}, δεδομένου ότι το γονίδιο εκφράζεται μόνο από το ένα χρωμόσωμα και μηδενική στους ομόζυγους ποντικούς, λόγω του ότι το γονίδιο ενδιαφέροντος έχει διαγραφεί και από τα 2 χρωμοσώματα.

Για να διαπιστώσουμε ότι αυτά τα δεδομένα ισχύουν, έγινε ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου *Lpar1* στα δείγματα cDNA από διάφορους ιστούς, με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο και η ανάλυση των αποτελεσμάτων με βάση την συγκριτική μέθοδο ct ή (Δ ct). Η κανονικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου έγινε με το γονίδιο αναφοράς *B2M* (βήτα-2-μικροσφαιρίνη).

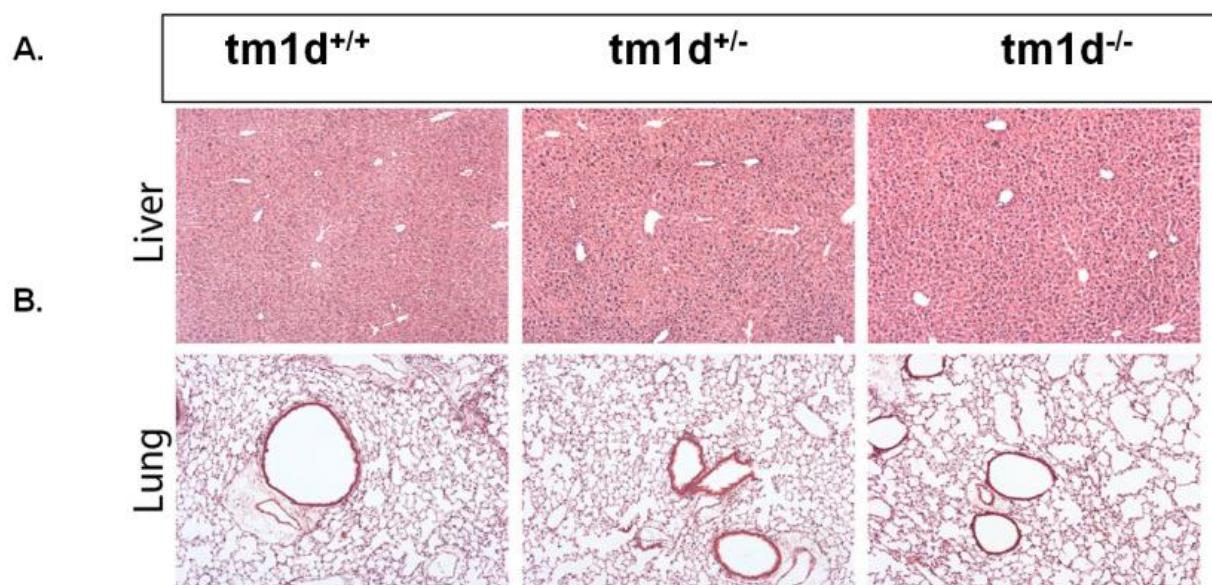




Σχήμα 3.16: Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίου *Lpar1* σε διάφορους ιστούς *tm1d*^{+/+}, *tm1d*^{+/-}, *tm1d*^{-/-} ποντικών.

3.4.2 Ιστολογική μελέτη ΚΟ ποντικών

Δεδομένου ότι η έκφραση του γονιδίου *Lpar1* μειώνεται στους ετερόζυγους και απουσιάζει στους ομόζυγους *tm1d* ποντικούς, μελετήθηκαν οι ιστοί πνεύμονα και ήπατος ΚΟ ποντικών σε σχέση με αυτούς φυσιολογικών ποντικών, για τυχόν ιστολογικές επιδράσεις της διαγραφής του γονιδίου.



Σχήμα 3.17: Φωτογραφίες από τομές ήπατος (Α) και από τομές πνεύμονα (Β) μετά από χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης

Στο σχήμα φαίνονται τομές παραφिनτοποιημένων ιστών ήπατος και πνεύμονα μετά από χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Οι πυρήνες και τα ριβοσώματα βάφονται από την αιματοξυλίνη με σκούρο μωβ χρώμα, ενώ οι υπόλοιπες δομές του κυτταροπλάσματος βάφονται από την ηωσίνη κόκκινες. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στους ιστούς των φυσιολογικών, των ετερόζυγων και του ομόζυγου ποντικού.

3.4.3 Έλεγχος της βιωσιμότητας των *tm1d*^{-/-} ποντικών

Για να ελεγχθεί η βιωσιμότητα των ποντικών που φέρουν το ΚΟ αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία, διασταυρώθηκαν *Lpar1 tm1d*^{+/+} ποντικοί μεταξύ τους.

Πίνακας 3.11: Συνολικές διασταυρώσεις μεταξύ $tm1d^{+/-}$ ποντικών

Total matings	Total progeny					
8	71 (100%)					
	$tm1d^{+/+}$		$tm1d^{+/-}$		$tm1d^{-/-}$	
	Born	Expected	Born	Expected	Born	Expected
	20	17-18	44	35-36	6	17-18
	28.1%	25%	61.9%	50%	8.5%	25%
$1\text{♂ } tm1d^{+/-} \times 2\text{♀ } tm1d^{+/-}$	15					
	7	3-4	7	7-8	1	3-4
	46.7%	25%	46.7%	50%	6.7%	25%
$1\text{♂ } tm1d^{+/-} \times 2\text{♀ } tm1d^{+/-}$	8					
	1	2	6	4	1	2
	12.5%	25%	75%	50%	12.5%	25%
$1\text{♂ } tm1d^{+/-} \times 2\text{♀ } tm1d^{+/-}$	6					
	0	1-2	6	3	0	1-2
	0%	25%	100%	50%	0%	25%
$1\text{♂ } tm1d^{+/-} \times 2\text{♀ } tm1d^{+/-}$	6					
	4	1-2	2	3	0	1-2
	66.7%	25%	33.3%	50%	0%	25%
$1\text{♂ } tm1d^{+/-} \times 2\text{♀ } tm1d^{+/-}$	4					
	2	1	2	2	0	1
	50%	25%	50%	50%	0%	25%
$1\text{♂ } tm1d^{+/-} \times 2\text{♀ } tm1d^{+/-}$	6					
	1	1-2	4	3	1	1-2
	16.7%	25%	66.7%	50%	16.7%	25%
$1\text{♂ } tm1d^{+/-} \times 2\text{♀ } tm1d^{+/-}$	14					
	3	3-4	8	7	2	3-4
	21.4%	25%	57.1%	50%	14.3%	25%
$1\text{♂ } tm1d^{+/-} \times 2\text{♀ } tm1d^{+/-}$	10					
	2	2-3	7	5	1	2-3
	20%	25%	70%	50%	10%	25%

Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.11, διαπιστώθηκε ότι οι $tm1d^{-/-}$ απόγονοι δεν αποτελούσαν το 25% του συνολικού αριθμού των απογόνων. Άρα το $tm1d$ αλληλόμορφο δημιουργεί προβλήματα στην βιωσιμότητα των ποντικών που το φέρουν σε ομοζυγία.

Με βάση την παρατήρηση ότι οι $tm1d^{-/-}$ ποντικοί δεν γεννιούνται στις αναμενόμενες κατά Mendel αναλογίες, καθώς και με βιβλιογραφικά δεδομένα, που αναφέρουν ότι οι $Lpar1^{-/-}$ ποντικοί παρουσιάζουν περιγεννητική θνησιμότητα [7], για να διαπιστώσουμε σε ποια μέρα της κύησης πεθαίνουν οι ομόζυγοι ποντικοί, συλλέχθηκαν, γονοτυπήθηκαν και μελετήθηκαν έμβρυα, που προέρχονται από διασταυρώσεις $tm1d^{+/-}$ θηλυκών με $tm1d^{+/-}$ αρσενικούς ποντικούς.

Κάποιοι $Lpar1\ tm1d^{-/-}$ απόγονοι, βέβαια, επιβιώνουν όπως επιβεβαιώνεται από προσδιορισμό του γονότυπου και παρουσιάζεται στον πίνακα 3.11, και όπως έχει αναφερθεί και σε άλλη μελέτη.[25] Επίσης αυτά τα ποντίκια μπορούν και να αναπαραχθούν.

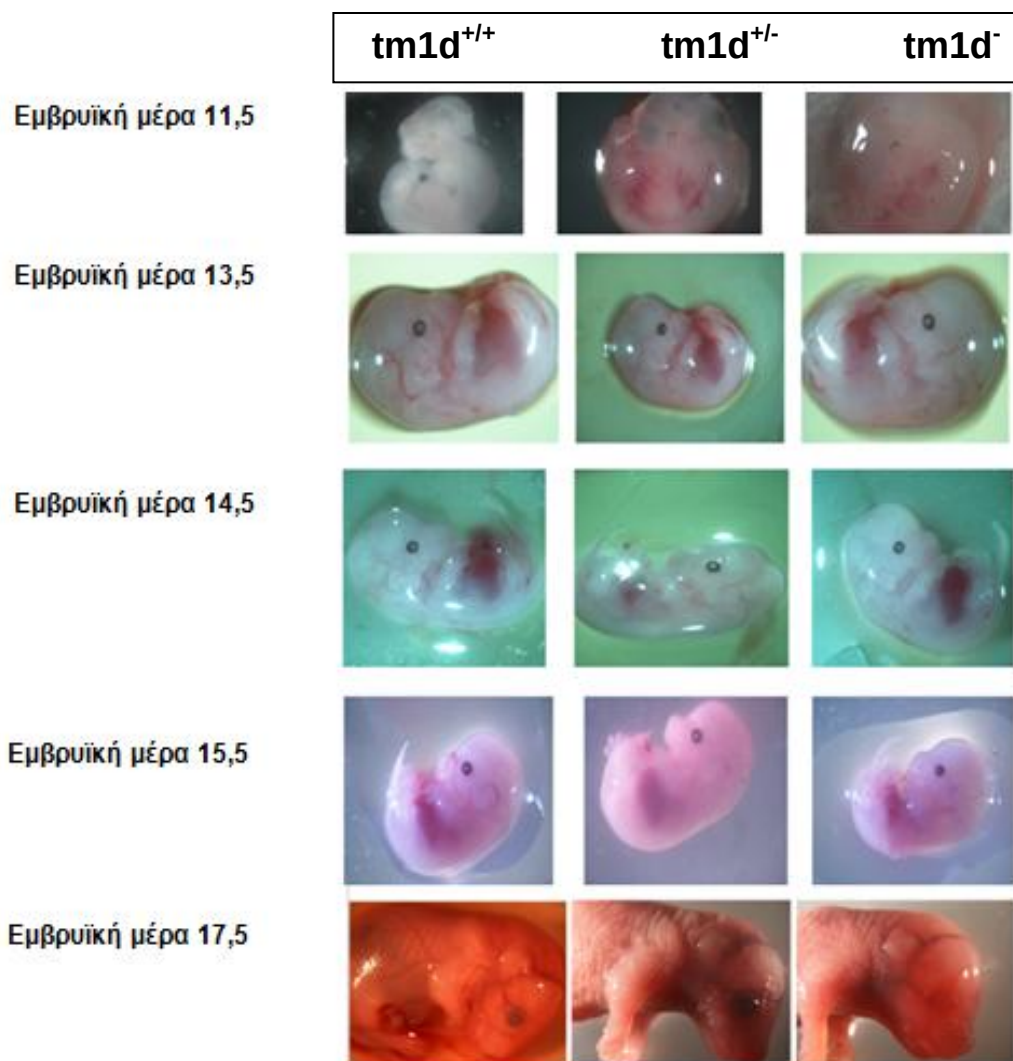
Κάθε φορά 1-2 $tm1d^{+/-}$ θηλυκοί ποντικοί διασταυρώνονται με έναν $tm1d^{+/-}$ αρσενικό. Τα ζώα αφήνονται σε "mating" για ένα βράδυ. Επειδή οι αρσενικοί ποντικοί έχουν μια περιορισμένη ημερήσια ικανότητα να παράγουν σπέρμα, δεν αντιστοιχούν περισσότεροι από 2 θηλυκούς ανά αρσενικό. Εάν έχει λάβει μέρος αναπαραγωγή, οι θηλυκοί ποντικοί θα φέρουν μία υπόλευκη παχύρρευστη κολπική μάζα (plug) το επόμενο πρωί. Η μάζα αυτή αποτελείται από συστατικά της αρσενικής εκσπερμάτωσης που προέρχεται από τους πηκτικούς και τους φουσαλιδώδεις αδένες του αρσενικού. Οι μάζες καλύπτουν τον κόλπο του θηλυκού και γενικά παραμένουν για 8-24 ώρες μετά την αναπαραγωγή. Επειδή το κάλυμμα μπορεί να είναι λεπτό και να διαλύεται γρήγορα, ή αν παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, μπορεί να πέσει έξω πριν από την διάλυση, είναι καλύτερο να γίνει ο έλεγχος για την ύπαρξη του (plug check), όσο το δυνατόν νωρίτερα το πρωί. Το πρωί που διαπιστώνεται η ύπαρξη κολπικού καλύμματος στο θηλυκό ποντικό, αναφέρεται ως ημέρα κύησης 0.5 ή ημέρα μετά την συνουσία (day after coitum- dpc) 0.5. Η ύπαρξη καλύμματος είναι ενδεικτική της διαδικασίας της αναπαραγωγής και όχι της γονιμοποίησης.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 6 θηλυκά $tm1d^{+/-}$ ποντίκια που ήταν έγκυος. Υποβλήθηκαν σε ευθανασία σε διάφορες ημέρες κύησης (11.5, 13.5, 14.5, 15.5, 17.5), απομονώθηκαν τα έμβρυα, φωτογραφήθηκαν, γονοτυπήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε παραφίνη για περαιτέρω ιστολογική μελέτη, με σκοπό να βρεθεί η εμβρυϊκή μέρα στην οποία πεθαίνουν οι $Lpar1^{-/-}$ απόγονοι.

Πίνακας 3.12: Γονότυποι εμβρύων από τις διασταυρώσεις μεταξύ $tm1d^{+/-}$ ΠΟΝΤΙΚΩΝ.

Total matings: 6 Embryonic Day	Total progeny					
	49 (100%)					
	$tm1d^{+/+}$		$tm1d^{+/-}$		$tm1d^{-/-}$	
	Embryos	Expected	Embryos	Expected	Embryos	Expected
	15	12-13	24	24-25	10	12-13
	30.6%	25%	48.9%	50%	20.4%	25%
E.D 11.5	8					
	3	2	3	4	2	2
	37.5%	25%	37.5%	50%	25%	25%
E.D 13.5	8					
	1	2	6	4	1	2
	12.5%	25%	75%	50%	12.5%	25%
E.D 14.5	11					
	6	2-3	4	5-6	1	2-3
	54.5%	25%	36.4%	50%	9.1%	25%
E.D 15.5	12					
	4	3	4	6	4	3
	33.3%	25%	33.3%	50%	33.3%	25%
E.D 17.5	4					
	0	1	2	2	2	1
	0%	25%	50%	50%	50%	25%
E.D 17.5	6					
	1	1-2	5	3	0	1-2
	16.7%	25%	83.3%	50%	0%	25%

Τα έμβρυα αμέσως αφού απομονώθηκαν, φωτογραφήθηκαν, ώστε μετά την γονοτύπηση τους να παρατηρηθούν, για να διαπιστωθούν διαφορές μεταξύ των φυσιολογικών, των ετερόζυγων και των ομόζυγων.



Σχήμα 3.18: Φωτογραφίες $tm1d^{+/+}$, $tm1d^{+/-}$, $tm1d^{-/-}$ εμβρύων, που απομονώθηκαν σε διαφορετική ημέρα κύησης.

Στο σχήμα 3.18, παρουσιάζονται φωτογραφίες από έμβρυα που απομονώθηκαν κατά τις εμβρυϊκές μέρες 11.5, 13.5, 14.5, 15.5 και 17.5. Για κάθε ημέρα κύησης, που έλαβε μέρος το πείραμα, φαίνεται ενδεικτικά ένα φυσιολογικό, ένα $tm1d^{+/-}$ και ένα $tm1d^{-/-}$ έμβρυο, με βάση τα αποτελέσματα γονοτύπησης από την PCR.

Σε καμία από τις παραπάνω ημέρες κύησης δεν βρέθηκε κάποιο νεκρό έμβρυο.

Στην εμβρυϊκή μέρα 15.5, το έμβρυο με γονότυπο $Lpar1\ tm1d^{-/-}$, που φαίνεται και στην αντίστοιχη φωτογραφία του σχήματος 3.18, ήταν μικρότερο από τα υπόλοιπα. Είναι γνωστό ότι τα ποντίκια που επιβιώνουν έχουν μικρότερο μέγεθος από τα φυσιολογικά και τα ετερόζυγα αδέρφια τους [7,25], αλλά δεν είναι γνωστό αν γεννιούνται μικρότερα ή

εάν δεν αναπτύσσονται, λόγω οσφρητικών προβλημάτων και κρανιοπροσωπικών δυσμορφισμών , που δεν τους επιτρέπουν να τραφούν σωστά.

Στην εμβρυϊκή ημέρα 17.5, το *Lpar1* *tm1d^{-/-}* ποντίκι δεν είχε μάτι, κάτι το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε C57BL/6 ποντικούς, οπότε δεν συνδέθηκε με την έλλειψη του γονιδίου *Lpar1*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το LPA είναι ένα μικρό γλυκεροφωσφολιπίδιο, που ανήκει στην οικογένεια των, λιπιδικών μορίων σηματοδότησης, LPLs. Το κύριο μονοπάτι παραγωγής του LPA είναι μέσω της ενζυμικής δράσης της ATX [12,13], η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *Enpp2* και βρέθηκε να έχει δραστικότητα PLD [7]. Οι *Enpp2*^{-/-} ποντικοί πεθαίνουν από την εμβρυϊκή ημέρα 9.5, ενώ οι ετεροζυγώτες (*Enpp2*^{+/-}) επιβιώνουν μέχρι την ενηλικίωσή τους, αλλά τα επίπεδα του LPA στο πλάσμα τους είναι μειωμένα κατά περίπου 50%, σε σχέση με αυτά των WT ποντικών [13,14]. Αυτό επιβεβαιώνει ότι η δραστηριότητα της ATX είναι η κύρια πηγή παραγωγής του LPA στο πλάσμα και ότι η σηματοδότηση του LPA είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη.

Οι επιδράσεις του LPA στα κύτταρα εξαρτώνται από το ότι αυτά εκφράζουν στην επιφάνεια τους ειδικούς, για το LPA, GPCRs [11]. Μέσω της ειδικής αλληλεπίδρασης του με τους πέντε συγγενείς υποδοχείς του (LPA₁₋₅) [7], το LPA κατευθύνει πολλαπλές θεμελιώδεις βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που ρυθμίζουν την κυτταρική πορεία, όπως η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση, και εκείνων που ρυθμίζουν την κυτταρική κινητικότητα, όπως η επέκταση και η συστολή του κυτταροσκελετού ακτίνης.[8,11,18]. Και οι πέντε υποδοχείς του LPA είναι τύπου I, παρόμοιοι με ροδοψίνη, συζευγμένοι με G πρωτεΐνη, και διαφέρουν ως προς την κατανομή τους στους ιστούς και τα μονοπάτια σηματοδότησης[7].

Το γονίδιο LPAR1 ήταν το πρώτο που κλωνοποιήθηκε και ταυτοποιήθηκε [19]. Το αρχικό του όνομα ήταν *vzg-1*, λόγω της εμπλουτισμένης έκφρασης του στο εμβρυϊκό νευροπολλαπλασιαστικό στρώμα του εγκεφαλικού φλοιού [19]. Ευρεία έκφραση του *Lpar1* παρατηρείται σε ενήλικα ποντίκια, με σαφή παρουσία στον εγκέφαλο, στην μήτρα, στους όρχεις, στον πνεύμονα, στο λεπτό έντερο, στην καρδιά, στο στομάχι, στα νεφρά, στον σπλήνα, στον θύμο, στον πλακούντα, και στους σκελετικούς μύες [23]. Ο LPAR1 εκφράζεται ευρέως και στους ανθρώπους [24]. Η έκφραση του *Lpar1* είναι πιο χωρικά περιορισμένη κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, αλλά είναι εμπλουτισμένη στον εγκέφαλο [7]. Ο LPA₁ δεσμεύει το LPA και εκκινεί, εξαρτώμενους από G πρωτεΐνη,

καταρράκτες μεταγωγής σήματος σε όλο το κύτταρο, επάγοντας μία σειρά κυτταρικών αποκρίσεων, όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, την κυτταρική μετανάστευση, κυτταροσκελετικές αλλαγές και ενεργοποίηση της MAPK, της PLC, και των μονοπατιών Akt, και Rho [23,25]. Οι G πρωτεΐνες που εμπλέκονται είναι οι $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha 11/q}$, και $G_{\alpha 12/13}$ [26].

Για να εξεταστούν οι πραγματικές βιολογικές λειτουργίες της LPA_1/LPA σηματοδότησης σε υγιή ζώα, έχουν δημιουργηθεί ποντικοί με μια ομόζυγη ανενεργή μετάλλαξη του *Lpar1* και αναλύονται για ελαττώματα στην σηματοδότηση LPA και για αναπτυξιακές ανωμαλίες [62]. Οι *Lpar1*^{-/-} ποντικοί παρουσιάζουν 50% περιγεννητικής θνησιμότητα σε ένα μικτό (C57BL/6Jx129) γενετικό υπόβαθρο και την περαιτέρω μείωση της επιβίωσης σε καθαρό (C57BL/6J ή Balb/cByJ) γενετικό υπόβαθρο (J. Chun, αδημοσίευτες παρατηρήσεις). Οι *Lpar1*^{-/-} ποντικοί έχουν ελλείψεις στην οσφρητική εξέλιξη, πράγμα που μειώνει την ικανότητά τους να εντοπίσουν τις θηλές της μητέρας και την κίνηση του θηλασμού, που απαιτούνται για την επιβίωση, και ίσως σε αυτό να οφείλεται η περιγεννητική θνησιμότητα. Οι επιζώντες είναι 10-15% μικρότεροι σε μέγεθος από ό, τι οι φυσιολογικοί ποντικοί, έχουν αμβλύ ρύγχος, που επηρεάζει την ικανότητα τους να τραφούν, πιο φαρδιά μάτια και αυξημένη απόπτωση στα ισχιακά νευρικά κύτταρα Schwann [27]. Μικρά κλάσματα *Lpar1*^{-/-} εμβρύων έχουν ανεγκεφαλία (~ 5%) ή μετωπική κεφαλική αιμορραγία (-2,5%).

Αν και οι περισσότεροι υποδοχείς του LPA εκφράζονται μόνο σε χαμηλά επίπεδα σε φυσιολογικούς ιστούς, η έκφραση τους είναι υψηλή σε ορισμένες καρκινικές οντότητες και η υπερέκφραση τους θεωρείται ότι έχει άμεσες επιδράσεις στην έναρξη του καρκίνου. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των LPA_1-3 σε επιθηλιακά κύτταρα του μαστού, έχουν βρεθεί να είναι επαρκή για να προκαλέσουν καρκίνο του μαστού σε ποντίκια[32]. Ο μεσολαβούμενος από το LPA επιθετικός φαινότυπος των καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών, μπορεί να εξηγείται εν μέρει από την υψηλή έκφραση του LPA_1 και την επαγόμενη από το LPA έκφραση της περιουστίνης[34]. Στον καρκίνο του προστάτη και του θυρεοειδούς, το CD97 ετεροδιμερίζεται με διάφορους υποδοχείς LPA ($LPA_{1/2/3}$), ενισχύοντας έτσι την εισβολή καρκινικών κυττάρων. [36] Μεταξύ των παιδιατρικών κακοηθειών, ιδίως τα NB εκφράζουν υψηλά επίπεδα LPA_1 . Τα γονίδια

LPAR1 και ENPP2 υπερεκφράζονται σε εξαιρετικά κακοήγη πολύμορφο GBM [41]. Υπάρχουν, επίσης, αυξανόμενες ενδείξεις ότι ο LPA₁ συμβάλλει στις φλεγμονώδεις ή καθοδηγούμενες από φλεγμονή ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων της αρθρίτιδας και της IPF [42]. Η LPA/LPA₁ σηματοδότηση συμβάλλει στην ανάπτυξη της πνευμονικής ίνωσης μετά από τραυματισμό των πνευμόνων προωθώντας την πρόσληψη των ινοβλαστών και την αγγειακή διαρροή, την απόπτωση του επιθηλιακού κυττάρου και την αντίσταση των ινοβλαστών στην απόπτωση. Οι ποντικοί με ανεπάρκεια στον LPA₁ προστατεύονται δραματικά από την ίνωση και την θνησιμότητα που επάγονται από την μπλεομυκίνη [44]. Η απουσία του LPA₁ (knockout Lpar1) οδήγησε σε μείωση της πρόσληψης ινοβλαστών και της αγγειακής διαρροής. Στο ζωικό μοντέλο της μπλεομυκίνης, για την ανάλυση των χαρακτηριστικών της πνευμονικής ίνωσης, η πρώιμη φάση της ταχείας απόπτωσης των βρογχικών και κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων, είναι σημαντικά εξασθενημένη κατά την απουσία έκφρασης του LPA₁ [45].

Για να διερευνηθεί ο ρόλος του γονιδίου Lpar1, δημιουργήσαμε έναν cKO Lpar1 ποντικό. Στοχευμένα cKO Lpar1 ES κύτταρα ποντικού ελήφθησαν από το EUCOMM. Λαμβάνοντας υπόψη την στρατηγική του EUCOMM για την υπο όρους στόχευση του γονιδίου, επιλέξαμε την προσέγγιση που βασίζεται σε μια, κατευθυνόμενη από υποκινητή, κασέτα στόχευσης και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός «πρώτου KO αλληλόμορφου» [53] σε C57BL/6N ES κύτταρα [65]. Το πρώτο-KO αλληλόμορφο (tm1a) είναι ευέλικτο και μπορεί να παράγει, μετά από έκθεση στις ρεκομπινάσες Cre και Flp που έχουν δράση ειδικής θέσης, KO αλληλόμορφα με γονίδιο αναφοράς (tm1b), cKO αλληλόμορφα (tm1c), και ανενεργά αλληλόμορφα (tm1d).

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, το “πρώτο knockout” αλληλόμορφο δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα των ετερόζυγων ζώων, δεδομένου ότι αυτά γεννιούνται στις αναμενόμενες κατά Mendel γονοτυπικές αναλογίες. Αντίθετα αν και τα tm1a^{-/-} ποντίκια, δεν γεννιούνται στις αναμενόμενες αναλογίες, θα πρέπει να αυξηθεί ο αριθμός των διασταυρώσεων μεταξύ των tm1a^{+/-} ποντικών, για να επιβεβαιωθεί ότι το αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία επηρεάζει την βιωσιμότητα.

Το tm1b αλληλόμορφο φαίνεται να επηρεάζει την βιωσιμότητα των ποντικών που το φέρουν σε ετεροζυγωτία. Έκφραση του γονιδίου αναφοράς LacZ, το οποίο εκφράζεται

αντί του *Lpar1*, παρατηρήθηκε στους όρχεις, στην ουροδόχο κύστη, στον μυελό των οστών, στον εγκέφαλο, στην μήτρα, στο λεπτό και στο παχύ έντερο, στο στομάχι και στους νεφρούς, ενώ το γονίδιο δεν εκφράζεται στην καρδιά και στο ήπαρ.

Από τις διασταυρώσεις των *tm1a* ποντικών με ποντικούς που εκφράζουν *Flp* ρεκομπινάση, παράχθηκαν *tm1c* ποντικοί στην αναμενόμενη αναλογία. Το *tm1c* αλληλόμορφο σε ετεροζυγωτία δεν φαίνεται να επηρεάζει τη βιωσιμότητα των ποντικών.

Το *tm1d* αλληλόμορφο σε ετεροζυγωτία, επίσης δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα των ζώων. Από την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του *Lpar1* σε όργανα *tm1d^{+/+}*, *tm1d^{+/-}*, *tm1d^{-/-}* ποντικών, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου είναι μειωμένη κατά 50% περίπου, στους ιστούς των ετερόζυγων ποντικών, σε σχέση με την έκφραση του σε φυσιολογικούς ιστούς. Στο ομόζυγο ζώο η έκφραση του γονιδίου φαίνεται να είναι μηδενική. Δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικές διαφορές στους πνεύμονες και στα ήπατα φυσιολογικών, ετερόζυγων και ομόζυγων *tm1d* ποντικών. Επειδή από τις διασταυρώσεις μεταξύ ετερόζυγων ΚΟ ποντικών δεν γεννιούνται, όσον αφορά τον γονότυπο, οι αναμενόμενοι απόγονοι, υποτέθηκε ότι το *tm1d* αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία επηρεάζει την βιωσιμότητα των ποντικών. Κατά την μελέτη όμως εμβρύων, που προκύπτουν από τις διασταυρώσεις *tm1d^{+/+}* θηλυκών με *tm1d^{+/+}* αρσενικούς, δεν βρέθηκε η εμβρυϊκή μέρα που ίσως πεθαίνουν οι ομόζυγοι απόγονοι.

Μελλοντικός στόχος του εργαστηρίου είναι να επιβεβαιωθεί η περιγεννητική θνησιμότητα των ομόζυγων ΚΟ *Lpar1* ποντικών, καθώς και να χρησιμοποιηθεί ο cKO *Lpar1* ποντικός ως μοντέλο για την επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση και να μελετηθούν οι επιπτώσεις της ιστοειδικής διαγραφής του γονιδίου στην εξέλιξη της νόσου.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄

ΣΥΝΤΜΙΣΕΙΣ

AC	Adenylyl Cyclase	Αδενυλική κυκλάση
AIDS	Acquired Immune Deficiency syndrome	Σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας
Akt	Akt/protein kinase B	Akt/πρωτεϊνική κινάση B
ATX	Autotaxin	Αυτοταξίνη
BCIG	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside	βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη
BPs	Breeding Pairs	Ζεύγη αναπαραγωγής
bp	Base pair	Ζεύγος βάσεων
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CD97	Cluster of Differentiation 97	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 97
cKO	Conditional Knock out	Υπό όρους Knock out
CMV	Cytomegalovirus	Κυτταρομεγαλοϊός
Cre	Causes recombination	Προκαλεί ανασυνδυασμό
CSF	Cerebrospinal fluid	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
DAG	Diacylglycerol	Διακυλογλυκερόλη
ECM	Extracellular Matrix	Εξωκυτάρια μήτρα
Edg	Endothelial differentiation gene	Γονίδιο ενδοθηλιακής διαφοροποίησης
ERK1 / 2	Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2	Κινάσες ρυθμιζόμενες από εξωκυτταρικά σήματα
Enpp2	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2	Εξωνουκλεοτιδική πυροφωσφατάση/φωσφοδιεστεραση 2
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea	Αιθυλ-νιτροζουρία
ESC	Embryonic stem cell	Εμβρυϊκό βλαστικό κύτταρο
EUCOMM	European Conditional Mouse Mutagenesis Program	Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα υπό όρους Μεταλλαξιγένεσης Ποντικού

FLP	flippase	Φλιπάση
FRT	FLP recognition target	Στόχος αναγνώρισης της FLP
GBM	Glioblastoma	Γλοιοβλάστωμα
gDNA	genomic DNA	Γενωμικό DNA
G Protein	Guanine-nucleotide-binding protein	Γουανοσινικές τριφωσφορικές δεσμευτικές πρωτείνες
GPCRs	G-protein coupled receptors	Υποδοχείς που συζευγνυνται με G-πρωτείνη
HSV-kt	Herpes Simplex Virus thymidine kinase	Κινάση θυμιδίνης του ιού του απλού έρπητα
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells	Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας
ICM	Inner Cell Mass	Εσωτερική Κυτταρική μάζα
IL-6	Interleukin 6	Ιντερλευκίνη 6
IP3	Inositol trisphosphate	Τριφωσφορική ινοσιτόλη
IPF	Idiopathic Pulmonary Fibrosis	Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση
IRES	Internal Ribosome Entry Site	Εσωτερική θέση εισόδου ριβοσώματος
ΚΝΣ	Central nervous system	Κεντρικό νευρικό σύστημα
KO	Knock out	
LCAT	Lecithin–cholesterol acyltransferase	Ακυλοτρανσφεράση λεκιθίνης-χοληστερόλης
LIF	Leukemia inhibitory factor	Παράγοντας αναστολής λευχαιμίας
loxP	locus of X-over P1 Bacteriophage	Τόπος του χιάσματος στον βακτηριοφάγο P1
LPA	Lysophosphatidic acid	Λυσοφωσφατιδικό οξύ
LPAAT	Lysophosphatidic acid acyltransferase	Ακυλοτρανσφεράση LPA
LPARs	Lysophosphatidic acid Receptors	Υποδοχείς του λυσοφωσφατιδικού οξέος
LPLs	Lysophospholipids	Λυσοφωσφολιπίδια
LPP	Lipid Phosphate Phosphatase	Λιπιδική φωσφορική φωσφατάση

lysoPLD	Lysophospholipase D	Λυσοφωσφολιπάσης D
MAG	Monoacylglycerol	Μονοακυλογλυκερόλη
MAPK κινασών	Mitogen-activated protein kinase	Μιτογόνο ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση
MMP-9	Metalloproteinase-9	Μεταλλοπρωτεϊνάση-9
NB	Neuroblastoma	Νευροβλάστωμα
neo	neomycin	Νεομυκίνη
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man	Βάση Δεδομένων Μεντελιανής Κληρονομικότητας στον Άνθρωπο
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase	Κινάση Φωσφατιδυλινοσιτόλης-3
PLA2	Phospholipase A2	Φωσφολιπάσης A2
PLC	Phospholipase C	Φωσφολιπάσης C
PLD	Phospholipase D	Φωσφολιπάσης D
PLs	Phospholipids	Φωσφολιπίδια
PMLFs	Πρωτογενείς ινοβλάστες του πνεύμονα	Primary Lung Fibroblasts
ROCK	πρωτεΐνη κινάση σχετιζόμενη με Rho	Rho-associated protein kinase
RHOA	Ras homolog family member A	Μέλος A της οικογένειας ομολόγων της Ras
SA	Acceptor splicing site	Δέκτης ματίσματος
SLs	Sphingolipid	Σφιγγολιπίδια
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	Πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine	Όξινη εκκρινόμενη πρωτεΐνη και πλούσια σε κυστεΐνη
S1P	Spingosine-1-phosphate	1-φωσφορική σφιγγοσίνη
SV 40 PolyA	Simian virus 40 PolyA	Σήμα πολυαδενυλίωσης του ιού του πιθήκου
SPC	Spingosylphosphorylcholine	Σφιγγοσυλοφωσφόρυλοχολίνη
tm1a	targeted mutation 1a	Στοχευμένη μετάλλαξη 1 a
tm1b	targeted mutation 1b	Στοχευμένη μετάλλαξη 1 b

tm1c	targeted mutation 1c	Στοχευμένη μετάλλαξη 1 c
tm1d	targeted mutation 1d	Στοχευμένη μετάλλαξη 1 d
TGF-β	Transforming growth factor beta	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού βήτα
VZ	Ventricular Zone	Κοιλιακή ζώνη
Vzg-1	Ventricular zone gene-1	Γονίδιο κοιλιακής ζώνης

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vance, D.E.; Vance, J.E. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and membranes, 4th ed.; Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, 2002; pp. 315–340.
2. D'Arrigo, Paola and Stefano Servi. "Synthesis Of Lysophospholipids". *Molecules* 15.3 (2010): 1354-1377.
3. Li, Rong-Shan et al. "Lysophospholipids And Their G Protein-Coupled Receptors In Atherosclerosis". *Frontiers in Bioscience* 21.1 (2016): 70-88.
4. Birgbauer, E.; Chun, J.N. New developments in the biological functions of lysophospholipids. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006, 63, 2695–2701.
5. Chun, J. Lysophospholipids in the nervous system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2005, 77, 46–51.
6. Anliker B, Chun J. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* 2004;279(20):20555–8. doi: 10.1074/jbc.R400013200.
7. Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, Lin ME, Teo ST, Park KE, Mosley AN, Chun J. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*2010;50:157–186.
8. Yung, Yun C. et al. "Lysophosphatidic Acid Signaling In The Nervous System". *Neuron* 85.4 (2015): 669-682.
9. Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, Kishi Y, Hama K, Kishimoto T, Mizuno K, Saku K, Taguchi R, Arai H. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277:48737–48744.
10. Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, Tajima Y, Taguchi R, Shimizu T, Ishii S. Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *J Biol Chem.*2009;284:17731–17741.
11. Yung YC, Stoddard NC, Chun J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Journal of lipid research.* 2014;55:1192–1214.
12. Tanaka M, Okudaira S, Kishi Y, Ohkawa R, Iseki S, Ota M, Noji S, Yatomi Y, Aoki J, Arai H. Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry.* 2006;281:25822–25830.

13. van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP, Pettit TR, Wakelam MJ, Saulnier-Blache JS, Mummery CL, et al. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol*. 2006;26:5015–5022.
14. Fotopoulou S, Oikonomou N, Grigorieva E, Nikitopoulou I, Paparountas T, Thanassopoulou A, Zhao Z, Xu Y, Kontoyiannis DL, Remboutsika E, Aidinis V. ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Developmental biology*. 2010;339:451–464.
15. Pages C, Simon MF, Valet P, Saulnier-Blache JS. Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 2001;64:1–10
16. Aoki J. Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2004;15:477–489.
17. Funke M, Zhao Z, Xu Y, Chun J, Tager AM. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 promotes epithelial cell apoptosis after lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;46(3):355-64.
18. Sheng X, Yung YC, Chen A, Chun J. Lysophosphatidic acid signaling in development *Development* 2015 142:1390-1395.
19. Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J. 1996. Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J. Cell. Biol.* 135:1071–83
20. Choi JW, Lee CW, Chun J. 2008. Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: an update. *Biochim. Biophys. Acta* 1781:531–39
21. Atlas Of Genetics And Cytogenetics In Oncology And Haematology. 1st ed. Poitiers, France: J.L. Huret, 1997. Print.
22. Contos JJ, Chun J. 1998. Complete cDNA sequence, genomic structure, and chromosomal localization of the LPA receptor gene, lpA1/vzg-1/Gpcr26. *Genomics* 51:364–78
23. Contos JJ, Ishii I, Chun J. 2000. Lysophosphatidic acid receptors. *Mol. Pharmacol.* 58:1188–96

24. An S, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ. 1998. Characterization of a novel subtype of human G protein coupled receptor for lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 273:7906–10
25. Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. 2004. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu. Rev. Biochem.* 73:321–54
26. Fukushima N, Kimura Y, Chun J. 1998. A single receptor encoded by vzg-1/lpA1/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6151–56
27. Contos, J. J. A. et al. "Requirement For The Lpa1 Lysophosphatidic Acid Receptor Gene In Normal Suckling Behavior". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.24 (2000): 13384-13389.
28. Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J. 2000. Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13384–89
29. Contos JJ, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye X, et al. 2002. Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa(2). *Mol. Cell. Biol.* 22:6921–29
30. Ishii I, Contos JJ, Fukushima N, Chun J. 2000. Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LP(A1)/VZG-1/EDG-2, LP(A2)/EDG-4, and LP(A3)/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system. *Mol. Pharmacol.* 58:895–902
31. Hama K, Aoki J, Bandoh K, Inoue A, Endo T, et al. 2006. Lysophosphatidic receptor, LPA3, is positively and negatively regulated by progesterone and estrogen in the mouse uterus. *Life Sci.* 79:1736–40
32. Liu S, Umezū-Goto M, Murph M, Lu Y, Liu W, Zhang W, Yu S, Stephens C, Cui X, Murrow G, Coombes K, Muller W, Hung MC, Perou CM, Lee A, Fang X, Mills GB. Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion and metastases. *Cancer Cell.* 2009;15:539–550.).

33. Zhu M, Fejzo MS, Anderson L, Dering J, Ginther C, Ramos L, Gasson JC, Karlan BY, Slamon DJ. Periostin promotes ovarian cancer angiogenesis and metastasis. *Gynecol Oncol.* 2010;119:337–344
34. Choi, J. H., Lee, K. T., & Leung, P. C. (2011). Estrogen receptor alpha pathway is involved in leptin-induced ovarian cancer cell growth. *Carcinogenesis*, 32, 589–596).
35. Said N, Socha MJ, Olearczyk JJ, Elmarakby AA, Imig JD, Motamed K (2007) Normalization of the ovarian cancer microenvironment by SPARC. *Mol Cancer Res* 5:1015–1030
36. Ward Y, Lake R, Yin JJ, et al. LPA receptor heterodimerizes with CD97 to amplify LPA-initiated RHO-dependent signaling and invasion in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2011;71:7301-11.
37. Li TT, Alemayehu M, Aziziyeh AI, Pape C, Pampillo M, et al. (2009) Beta-arrestin/Ral signaling regulates lysophosphatidic acid-mediated migration and invasion of human breast tumor cells. *Mol Cancer Res* 7: 1064–1077
38. Park, S Y et al. "Lysophosphatidic Acid Augments Human Hepatocellular Carcinoma Cell Invasion Through LPA1 Receptor And MMP-9 Expression". *Oncogene* 30.11 (2010): 1351-1359.
39. Hoelzinger DB, Nakada M, Demuth T, Rosensteel T, Reavie LB, Berens ME. Autotaxin: a secreted autocrine/paracrine factor that promotes glioma invasion. *Journal of neuro-oncology.* 2008;86:297–309.
40. Willier S, Butt E, Grunewald TG. Lysophosphatidic acid (LPA) signalling in cell migration and cancer invasion: a focussed review and analysis of LPA receptor gene expression on the basis of more than 1700 cancer microarrays. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization.* 2013;105:317–333.
41. Kishi Y, Okudaira S, Tanaka M, Hama K, Shida D, Kitayama J, Yamori T, Aoki J, Fujimaki T, Arai H. Autotaxin Is Overexpressed in Glioblastoma Multiforme and Contributes to Cell Motility of Glioblastoma by Converting Lysophosphatidylcholine to Lysophosphatidic Acid. *Journal of Biological Chemistry.* 2006;281:17492–17500.

42. Funke, Manuela et al. "The Lysophosphatidic Acid Receptor LPA 1 Promotes Epithelial Cell Apoptosis After Lung Injury". *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 46.3 (2012): 355-364.
43. Selman, Moisés. "Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing And Evolving Hypotheses About Its Pathogenesis And Implications For Therapy". *Annals of Internal Medicine* 134.2 (2001): 136.
44. Tager, Andrew M et al. "The Lysophosphatidic Acid Receptor LPA1 Links Pulmonary Fibrosis To Lung Injury By Mediating Fibroblast Recruitment And Vascular Leak". *Nature Medicine* 14.1 (2007): 45-54.
45. Funke, Manuela et al. "The Lysophosphatidic Acid Receptor LPA 1 Promotes Epithelial Cell Apoptosis After Lung Injury". *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 46.3 (2012): 355-364.
46. Plataki, Maria et al. "Expression Of Apoptotic And Antiapoptotic Markers In Epithelial Cells In Idiopathic Pulmonary Fibrosis". *Chest* 127.1 (2005): 266-274.
47. Chang, W. et al. "SPARC Suppresses Apoptosis Of Idiopathic Pulmonary Fibrosis Fibroblasts Through Constitutive Activation Of β -Catenin". *Journal of Biological Chemistry* 285.11 (2010): 8196-8206.
48. "Background On Mouse As A Model Organism". *National Human Genome Research Institute (NHGRI)*. N.p., 2016. Web. 9 Dec. 2016.
49. "Why Use The Mouse In Research?". *Yourgenome.org*. N.p., 2016. Web. 9 Dec. 2016.
50. Rosenthal, Nadia and Steve Brown. "The Mouse Ascending: Perspectives For Human-Disease Models". *Nature Cell Biology* 9.9 (2007): 993-999.
51. Snyder, Solomon H. "Book Review Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation Of Progress Fifth Edition. Edited By Kenneth L. Davis, Dennis Charney, Joseph T. Coyle, And Charles Nemeroff. 2010 Pp., Illustrated. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2002. \$189. 0-7817-2837-1". *New England Journal of Medicine* 347.16 (2002): 1289-1289.
52. "A Mouse For All Reasons". *Cell* 128.1 (2007): 9-13.

53. Skarnes, William C. et al. "A Conditional Knockout Resource For The Genome-Wide Study Of Mouse Gene Function". *Nature* 474.7351 (2011): 337-342. Web.
54. Friedrich, G. & Soriano, P. (1991) *Genes Dev.* **5** , 1513–1523.
55. Skarnes, W. C. "Two Ways To Trap A Gene In Mice". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.37 (2005): 13001-13002.
56. Mak, Tak W., Josef M. Penninger, and Pamela S. Ohashi. "KNOCKOUT MICE: A PARADIGM SHIFT IN MODERN IMMUNOLOGY". *Nature Reviews Immunology* 1.1 (2001): 11-19.
57. Bailer, Susanne M and Diana Lieber. *Virus-Host Interactions*. 1st ed. Print.
58. Pettitt SJ, Liang Q, Rairdan XY, Moran JL, Prosser HM, Beier DR, Lloyd KC, Bradley A, Skarnes WC. Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nature methods*. 2009;6:493–495.
59. Wang, Shu-Zhen. *Retinal Development*. 1st ed. New York: Humana Press, 2012. Print.
60. Friedel, R. H., Plump, A., Lu, X., Spilker, K., Jolicoeur, C., Wong, K., Venkatesh, T. R., Yaron, A., Hynes, M., Chen, B., et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13188–13193.
61. "Corrigendum: The European Dimension For The Mouse Genome Mutagenesis Program". *Nature Genetics* 36.11 (2004): 1238-1238.
62. Wilton, Steve and Lynnette Lim. "Long-Range PCR: Synthesis Of Products Independent Of Size". *Trends in Genetics* 12.11 (1996): 458.
63. Barnes, W. The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene* **112**, 29–35 (1992).
64. Jia, Haiying et al. "Long-Range PCR In Next-Generation Sequencing: Comparison Of Six Enzymes And Evaluation On The Miseq Sequencer". *Scientific Reports* 4 (2014): n. pag.
65. Pettitt, Stephen J et al. "Agouti C57BL/6N Embryonic Stem Cells For Mouse Genetic Resources". *Nature Methods* 6.7 (2009): 493-495.
66. Coleman, James L. J. et al. "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 (2015): n. pag.

67. Testa, Giuseppe et al. "A Reliable LacZ Expression Reporter Cassette For Multipurpose, Knockout-First Alleles". *genesis* 38.3 (2004): 151-158