

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΛΛΕΙΨΗ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ  
Fras1 ΣΤΟΝ ΠΟΝΤΙΚΟ : ΤΟ ΖΩΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ  
ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ FRASER  
ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ //

ΣΟΦΙΑ ΒΡΟΝΤΟΥ //



ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2003



<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ</b>	<b>1</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
I. Γενικά	<b>6</b>
I.I. Μελέτη του γονιδίου <i>Fras1</i>	<b>7</b>
I.II Επιθήλια	<b>9</b>
I.II.1 Εσωτερικά επιθηλιακά όργανα	
I.II.2 Δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και εξωκυττάριας ουσίας	
I.II.3 Εξωτερικά επιθηλιακά όργανα-Δέρμα	
I.III Βασικό έλασμα	<b>18</b>
I.III.1 Το βασικό έλασμα της επιδερμίδας και των υπόλοιπων στρωματοποιημένων επιθηλίων	
I.III.2 Τα βασικά ελάσματα του νευρομυϊκού συστήματος στα θηλαστικά	
I.IV Δερματικές ασθένειες του ανθρώπου	<b>27</b>
I.IV.1 Απενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν για συστατικά του βασικού ελάσματος	
I.IV.1.α κολλαγόνα	
I.IV.1.α.1 Κολλαγόνο VII	
I.IV.1.α.2 Κολλαγόνο VI	
I.IV.1.α.3 Κολλαγόνο IV	
I.IV.1.β Ιντεγκρίνες	
I.IV.1.β.1 α3 αλυσίδα ιντεγκρίνης	
I.IV.1.β.2 β1 αλυσίδα ιντεγκρίνης	
I.IV.1.β.3 α6 ή β4 αλυσίδα ιντεγκρίνης	
I.IV.1.β.4 α5β1 ιντεγκρίνη	
I.IV.1.β.5 α4 αλυσίδα ιντεγκρίνης	
I.IV.1.β.6 α1 αλυσίδα ιντεγκρίνης	
I.IV.1.β.7 α8β1 ιντεγκρίνη	
I.IV.1.β.8 αν ιντεγκρίνες	
I.IV.1.γ Κερατίνες	
I.IV.1.γ.1 Κερατίνη 10 και κερατίνη 14	
I.IV.1.δ Πλεκτίνη (plectin)	
I.IV.1.ε BP-230 ή BPAG1	
I.IV.1.ζ Περλεκάνη	
I.IV.1.η Δυστρογλυκάνη	
I.IV.1.θ Λαμινίνες	
I.IV.1.θ.1 Δομικά δεδομένα λαμινινών	
I.IV.1.θ.2 Λαμινίνη 5	
I.IV.1.θ.3 Λαμινίνη γ1	
I.IV.1.θ.4 Λαμινίνη α2	
I.IV.1.θ.5 Λαμινίνη β2	
I.IV.1.ι Νιδογόνο	
I.V Σύνοψη αποτελεσμάτων και γενικά συμπεράσματα	<b>46</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
I. Μέθοδοι ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων	<b>47</b>
I.I Τεχνικές ανασυνδυασμού του DNA	
I.I.1 Τυποποιημένες διαδικασίες χειρισμού του DNA	

I.1.2 Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA	
I.1.3 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων	
I.1.4 Παρασκευή ηλεκτροδεκτικών κυττάρων	
I.1.5 Μετασχηματισμός ηλεκτροδεκτικών κυττάρων με τη μέθοδο της παροχής ηλεκτρικού πεδίου (electroporation)	
I.1.6 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης	
I.II Τεχνικές ανάλυσης RNA	
I.II.1 Απομόνωση RNA από ιστούς ή έμβρυα ποντικού	
I.II.2 Παρασκευή cDNA με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης και RT-PCR	
I.II.3 Εύρεση των μεταγράφων του γονιδίου <i>Fras1</i> με τη μέθοδο του Northern Blot	
II. Διερεύνηση φαγικών βιβλιοθηκών	<b>50</b>
II.I Ετοιμασία τρυβλίων για άπλωμα βιβλιοθήκης	
II.II Άπλωμα φαγικής βιβλιοθήκης	
II.III Μεταφορά των φαγικών πλακών σε μεμβράνες	
II.IV Προυβριδοποίηση/Υβριδοποίηση και πλουσίματα των μεμβρανών	
II.V Συλλογή των κατάλληλων πλακών	
II.VI Απομόνωση φαγικού γενωμικού από υγρή καλλιέργεια	
III. Φυσική χαρτογράφηση του γονιδίου <i>Fras1</i> και <i>FRAS1</i> με τη χρησιμοποίηση υβριδίων σωματικών κυττάρων	<b>54</b>
III.I Χαρτογράφηση του <i>Fras1</i> στο γονιδίωμα του ποντικού	
III.II Χαρτογράφηση του <i>FRAS1</i> στο γονιδίωμα του ανθρώπου	
IV. Ταυτοποίηση του ομόλογου ανασυνδυασμού στα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα	<b>55</b>
IV.I Απομόνωση γενωμικού DNA από τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα	
IV.II Ταυτοποίηση του ομόλογου ανασυνδυασμού με τη μέθοδο του Southern Blot	
IV.III Ταυτοποίηση του ομόλογου ανασυνδυασμού με τη μέθοδο PCR	
V. Γονοτυπική ταυτοποίηση των ποντικών	<b>56</b>
V.I Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών	
V.II Ταυτοποίηση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου του <i>Fras1</i>	
V.III Ταυτοποίηση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου του <i>Fras1</i>	
VI. Αντισώματα	<b>57</b>
VI.I Διαδικασία καθαρισμού των πολυκλωνικών αντισωμάτων	
VII. Ιστολογική ανάλυση δειγμάτων	<b>58</b>
VII.I Μονιμοποίηση δειγμάτων	
VII.II Διαδικασία έγκλισης δειγμάτων σε παραφίνη	
VII.III Διαδικασία έγκλισης δειγμάτων για επεξεργασία τους σε κρουτόμο	
VII.IV Παραγωγή τομών σε μικροτόμο ή κρουτόμο	
VII.V Επεξεργασία των αντικειμενοφόρων	
VII.V.1 Προετοιμασία αντικειμενοφόρων για ιστολογικές χρώσεις και για αντιδράσεις ανοσοεντοπισμού	
VII.V.2 Προετοιμασία αντικειμενοφόρων για <i>in situ</i> υβριδοποίηση	
VII.VI <i>In situ</i> υβριδοποίηση	
VII.VI.1 Παρασκευή ανιχνευτή RNA με αντίδραση μεταγραφής <i>in vitro</i>	
VII.VI.2 Αλκαλική λύση ανιχνευτή RNA	
VII.VI.3 <i>In situ</i> υβριδοποίηση RNA	
VII.VII Ανοσοεντοπισμός	
VII.VII.1 Ανοσοεντοπισμός με χρώση υπεροξειδάσης	

VII.VII.2	Ανοσοφθορισμός	
VII.VIII	Ιστολογικές χρώσεις	
VII.VIII.1	Χρώση με Αιματοξυλίνη-Ηωσίνη	
VII.VIII.2	Χρώση με Methylene- Blue	
VII.VIII.3	Χρώση Cresyl violet	
VIII.	Παρασκευή σκελετού	66
IX.	Ολιγονουκλεοτίδια	67
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>		
I.	Ταυτοποίηση του cDNA του <i>Fras1</i>	69
I.I	Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του cDNA του <i>Fras1</i>	
I.II	Ανίχνευση των μεταγράφων mRNA του γονιδίου <i>Fras1</i>	
I.III	Πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης <i>Fras1</i>	
II.	Στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου <i>Fras1</i>	77
II.I	Ανίχνευση γενωμικής βιβλιοθήκης	
II.II	Δημιουργία της κατασκευής στόχου	
II.III	Παραγωγή χιμαιρικών ζώων	
II.IV	Έλεγχος της αρτιότητας του 5' και 3' άκρου της στοχευμένης γενωμικής περιοχής του <i>Fras1</i>	
III.	Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου <i>Fras1</i>	89
IV.	Ανάλυση του φαινοτύπου ποντικών <i>Fras1</i> <sup>-/-</sup>	92
IV.I	Εμφάνιση αιμορραγικών φουσκάλων στα <i>Fras1</i> <sup>-/-</sup> έμβρυα	
IV.II	Εμφάνιση κρυπτοφθαλμίας και συνδακτυλίας σε ενήλικα <i>Fras1</i> <sup>-/-</sup> ποντίκια	
IV.III	Νεφρικές ανωμαλίες στα <i>Fras1</i> <sup>-/-</sup> ποντίκια	
IV.IV	Σκελετικά προβλήματα <i>Fras1</i> <sup>-/-</sup> ενηλίκων ποντικών	
IV.V	Μοριακός χαρακτηρισμός της μεταλλαγής <i>Fras1</i>	
V.	Ταυτοποίηση των χρωμοσωμικών θέσεων των γονιδίων <i>Fras1</i> και <i>FRAS1</i>	100
VI.	Κλωνοποίηση του μεταφραζόμενου cDNA του γονιδίου <i>Fras1</i> στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript	102
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>		
I.	Γενικά	106
I.I	Ανάλυση του φαινοτύπου των <i>Fras1</i> <sup>-/-</sup> ποντικών	
I.I.1	Υποεπιδερμικές φουσκάλες	
I.I.2	Συμμετοχή του <i>Fras1</i> στη διαδικασία της οργανογένεσης και σε παθογενετικές διαδικασίες	
I.I.2.α	Διαμόρφωση και αναδιαμόρφωση του βασικού ελάσματος	
I.I.2.β	Οργανογένεση και επιθήλιο-μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις	
I.I.2.γ	Ανάπτυξη των νεφρών	
I.I.3	Νεφρικές ανωμαλίες των <i>Fras1</i> <sup>-/-</sup> ποντικών	
I.I.4	Συγχωνεύσεις βλεφάρων και άκρων στα <i>Fras1</i> <sup>-/-</sup> ποντίκια	
I.I.5	Θνησιμότητα των <i>Fras1</i> <sup>-/-</sup> ποντικών	
I.I.6	Συσχετισμός της απενεργοποίησης του <i>Fras1</i> με το μετάλλαγμα “Blebbed” στον ποντικό και με το σύνδρομο Fraser στον άνθρωπο	
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>		
		129

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το βασικό έλασμα (βασική μεμβράνη) αποτελεί μια ειδική κατηγορία εξωκυττάριας ουσίας, η οποία διακρίνεται με ηλεκτρονική μικροσκοπία σε τρεις ζώνες, τη Lamina lucida (φωτεινός υμένας), τη Lamina densa (σκοτεινός υμένας) και τη Sub Lamina densa (ζώνη κάτω από τον σκοτεινό υμένα). Η ξεχωριστή αυτή εξωκυττάρια ουσία υπόκειται όλων των εσωτερικών ή εξωτερικών επιθηλιακών στρωμάτων, καλύπτει όλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα προς το μέρος του συνδετικού ιστού, ενώ περιβάλλει τα κύτταρα Schwann, τους μύες και τα λιπώδη κύτταρα. Γενικότερα τα βασικά ελάσματα, εκτός από το να στηρίζουν τους ιστούς και να τους συνδέουν με το υποκείμενο ή περιβάλλον μεσέγγυμα, εμποδίζουν την παθητική διέλευση μακρομορίων, κυττάρων ή νευρικών απολήξεων, δεσμεύουν και αποθηκεύουν αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες και συμβάλλουν στην κυτταρική μετακίνηση και γενικότερα στον μεταβολισμό και στην ανάπτυξη των κυττάρων. Όσον αφορά το βασικό έλασμα της επιδερμίδας αυτό συνδέει και ταυτόχρονα διαχωρίζει τη δερμίδα από την επιδερμίδα και είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του δέρματος. Τα κύρια συστατικά του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, που είναι οι λαμίνες 5, 6, 10 και 1, το νιδογόνο, η περλεκάνη και τα κολλαγόνα IV και VII, σχηματίζουν ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδρώντων μακρομορίων που συνδέεται ταυτόχρονα με τα κερατινοκύτταρα και τη δερμίδα. Μεταλλαγές σε αρκετά από τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα παραπάνω συστατικά, προκαλούν μια σειρά δερματικών ασθενειών στον άνθρωπο, που χαρακτηρίζονται από αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα και από τη δημιουργία υποεπιδερμικών φουσκαλών μετά τη γέννηση. Ανάλογα συμπτώματα παρατηρούνται και στην περίπτωση της απενεργοποίησης ορισμένων από τα παραπάνω γονίδια στον ποντικό.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια ανίχνευσης της λειτουργίας ενός καινούργιου γονιδίου στον ποντικό, του *Fras1*. Το γονίδιο *Fras1* βρέθηκε ότι κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη μεγέθους 4010 αμινοξέων, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία διαφορετικών πρωτεϊνικών περιοχών. Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης το *Fras1* εκφράζεται από τα περισσότερα επιθηλιακά κύτταρα, ενώ η πρωτεΐνη του παρουσιάζει ένα γραμμικό πρότυπο ανίχνευσης στον εξωκυττάριο χώρο που υπόκειται τόσο της επιδερμίδας, όσο και της βασικής πλευράς των περισσότερων επιθηλίων. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *Fras1* οδήγησε στη δημιουργία υποεπιδερμικών αιμορραγικών φουσκαλών καθώς και στην μονόπλευρη ή αμφίπλευρη νεφρική αγενεσία στην περίοδο της εμβρυογένεσης. Μετά τη γέννηση τα *Fras1*<sup>-/-</sup> μεταλλάγματα παρουσιάζουν συγχωνεύσεις στα άκρα και στα βλέφαρα, σκελετικές ανωμαλίες και μονόπλευρη νεφρική αγενεσία ή δυσπλασία.

Από τα πειράματα που έγιναν προέκυψε ότι το *Fras1* συνεισφέρει στο να δημιουργηθεί το απαραίτητο δομικό κρίωμα για την συνάθροιση, ορισμένων τουλάχιστον, συστατικών του κατώτερου στρώματος του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, επηρεάζοντας καθοριστικά την σύνδεση της επιδερμίδας με τη δερμίδα μετά το στρώμα της Lamina Densa. Κατά συνέπεια η απουσία του μπορεί να προκαλέσει σε ορισμένες περιπτώσεις τη δημιουργία υποεπιδερμικών φουσκαλών και την αποκόλληση του δέρματος μετά το επίπεδο της Lamina densa. Επιπρόσθετα στα πλαίσια της παρούσας διατριβής έγινε συσχετισμός της απενεργοποίησης του *Fras1* με το μετάλλαγμα "Blebbid" στον ποντικό, το οποίο έχει προταθεί ότι αποτελεί μοντέλο εργασίας για το σύνδρομο Fraser στον άνθρωπο και διαπιστώθηκε ότι πιθανότατα οι αιτίες και των δύο παραπάνω ανωμαλιών οφείλονται σε διαταραχές του εξωκυττάριας χώρου που υπόκειται των επιθηλίων.

## ABSTRACT

Basal lamina (Basement membrane) is a special category of extracellular matrix, discerned by electron microscopy into three zones, Lamina lucida, Lamina densa and Sub Lamina densa. This **distinguishable** extracellular matrix underlies all external and internal epithelia, covers endothelia towards the connective tissue and surrounds nerves, muscles and fat cells. Besides the connection with the underlying mesenchyme and the structural support that provides to different tissues, many various functions have been assigned to the basement membranes. These include a physical barrier for passage of macromolecules, cells or nervoprocesses, binding and deposition of growth factors and hormones and specification of cell migration, proliferation and metabolism. Skin-basement membrane (Dermal Epidermal Junction, DEJ) separates dermis from epidermis but in the same time contributes to their adherent connection, resulting in the structural integrity of the skin. Skin-basal lamina is composed mainly of laminins 5, 6, 10, 1, collagen IV and VII, nidogen and perlecan, that are arranged in an ordered fashion building a highly specialized ultrastructure (which is connected with dermis and basal keratinocytes). Different skin disorders in human have been associated with defects in the genes encoding some components of the basement membrane. These defects usually lead postnatally, to the loss of adherence of epidermis to dermis and subsequently to the formation of subepidermal blisters. Inactivation of the same genes in mice results in parallel symptoms.

The present study is an investigation of the function of a new gene in mouse, called *Fras1*. The *Fras1* gene encodes for a protein of 4010 amino acids, which can be subdivided in several distinct domains. During embryonic development *Fras1* expression is confined to different epithelial cell layers, while *Fras1* is detected extracellularly producing a linear staining pattern underlying epidermis as well as the basal surface of several epithelia. Loss of *Fras1* function results in the formation of subepidermal hemorrhagic blisters as well as in unilateral or bilateral renal agenesis during mouse embryogenesis. Postnatally, homozygous *Fras1* mutants exhibit fusion of the eyelids and digits, skeletal abnormalities, as well as unilateral renal agenesis or dysplasia.

On the basis of the observed investigations, it is deciphered that *Fras1* is involved in a structural scaffold that arranges the assembly of at least some of the macromolecules of the dermal side of skin basement membrane, affecting the dermal epidermal connection underneath the lamina densa. Therefore its absence causes, under certain circumstances, subepidermal blister formation and skin detachment underneath Lamina densa. Additionally, our data demonstrate that inactivation of *Fras1* is correlated with the existing "Blebbid" mouse mutant, which have been suggested to provide a model for the human genetic disorder Fraser syndrome and that perturbations in the composition of the extracellular space underlying epithelia could account for the onset of both of the above anomalies.

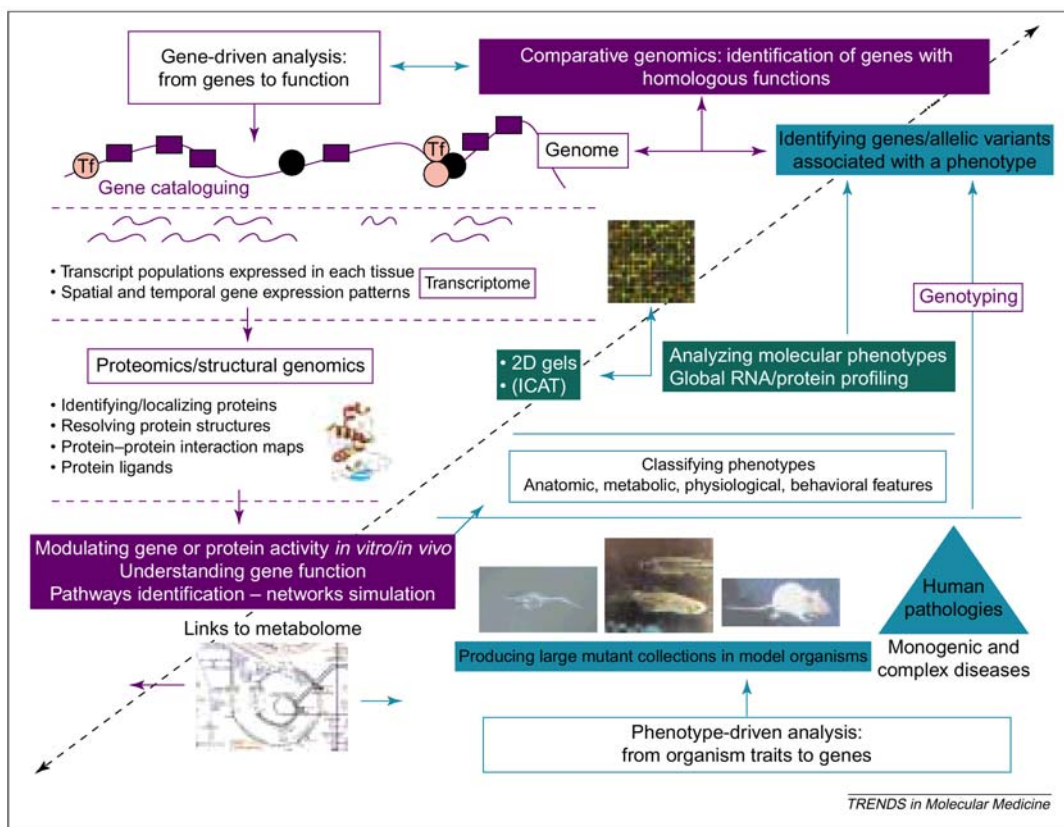
## I. Γενικά

Η εύρεση της λειτουργίας των γονιδίων του ανθρώπου και ιδιαίτερα η ανίχνευση γονιδίων που σχετίζονται με ασθένειες αποτελεί ένα καινούργιο στοίχημα για την επιστημονική κοινότητα. Η δημιουργία ζωικών μοντέλων που παρουσιάζουν συμπτώματα ανθρώπινων ασθενειών θα βοηθήσει αποφασιστικά στην εύρεση της λειτουργίας αυτών των γονιδίων και θα διευκολύνει την ανάπτυξη της γονιδιακής θεραπείας καθώς και τον έλεγχο των πιθανών ευρεθέντων τρόπων αντιμετώπισης.

Το ποντίκι αποτελεί ιδανικό μοντέλο οργανισμού γι' αυτές τις μελέτες, αφού τα γονιδιώματα ανθρώπου και ποντικού είναι παρόμοια. [Ουσιαστικά άνθρωποι και ποντίκια διαφέρουν στις μη κωδικές αλληλουχίες του DNA (junk), οι οποίες δεν κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Π.χ μία από τις κυριότερες διαφορές τους εντοπίζεται στην ενεργότητα ορισμένων περιοχών αυτών των αλληλουχιών, όπως τα ρετροτρανσποζόνια-retrotransposons (Dennis *et al.*, 2002).] Από την άλλη μεριά, οι διαγονιδιακές μέθοδοι και η τεχνολογία απενεργοποίησης των γονιδίων μέσω της μεθόδου του ομόλογου ανασυνδυασμού έχουν αναπτυχθεί στο ποντίκι σε μεγάλο βαθμό. Συγκεκριμένα είναι δυνατό να πραγματοποιηθούν στο γονιδίωμα του ποντικού, ελλείψεις τμημάτων γονιδίων, πρόκληση πρόωρου τερματισμού των γονιδιακών προϊόντων και εισαγωγή σημειακών μεταλλαγών σε οποιοδήποτε γονίδιο. Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας της γονιδιακής στόχευσης είναι δυνατή επίσης η επιλεκτική απενεργοποίηση γονιδίων είτε σε μία ομάδα κυττάρων, είτε σε καθορισμένα αναπτυξιακά ή ενήλικα στάδια.

Το τεράστιο εύρος γενωμικής πληροφορίας που έχει προκύψει ύστερα από την ολοκλήρωση του προγράμματος του ανθρώπινου γονιδιώματος, το οποίο ξεκίνησε στα τέλη της δεκαετίας του 80 και επιτέλεσε πρόσφατα τον πρωταρχικό του στόχο με την αλληλούχηση του 90% του ανθρώπινου γονιδιώματος, είναι ελπιδοφόρο για την ανάπτυξη του πεδίου της μοριακής ιατρικής και της κατανόησης της παθογένεσης ανθρώπινων ασθενειών και επομένως για τη γονιδιακή θεραπεία. Η επόμενη πρόκληση αφορά την εύρεση όλων των ανθρώπινων γονιδίων, τον εντοπισμό των κωδικών τους περιοχών και τον καθορισμό του λειτουργικού τους ρόλου. Η λειτουργία ενός γονιδίου εξαρτάται από το μοριακό περιεχόμενο του κυττάρου που το εκφράζει, αλλά και από το κυτταρικό μικροπεριβάλλον, γι' αυτό και απαιτείται η χρήση πειραματικών μεθόδων που θα ελέγξουν τη γονιδιακή λειτουργία στο επίπεδο του οργανισμού. Το ανθρώπινο γονιδίωμα υπολογίζεται ότι περιέχει 35.000 γονίδια που κωδικοποιούν για περίπου 1.000.000 πρωτεΐνες, εκ των οποίων το 60% είναι άγνωστης ιδιότητας. Η επιστημονική κοινότητα επομένως απαιτείται πλέον να προσαρμοστεί στα νέα δεδομένα και να ερευνήσει το ρόλο των γονιδίων ενός οργανισμού παράλληλα και όχι ανεξάρτητα και μεμονωμένα, έτσι ώστε να κατανοηθεί ταχύτερα και καλύτερα η λειτουργία τους. Η συστηματική προσπάθεια κατανόησης της λειτουργίας των γονιδίων χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα του προγράμματος του ανθρώπινου γονιδιώματος, αναφέρεται σαν λειτουργική ανάλυση γονιδιωμάτων (Functional Genomics). Η μελέτη αυτή περιλαμβάνει την πραγματοποίηση συνολικών αναλύσεων (high-throughput analysis) των γονιδιακών προϊόντων (μετάγραφα, πρωτεΐνες) και των βιολογικών συστημάτων (κυττάρων, ιστών, οργανισμών), μέσω αυτοματοποιημένων μεθόδων, που εφαρμόζουν σε μεγάλη κλίμακα πειράματα που συνήθως πραγματοποιούνται για ένα γονίδιο (π.χ παραγωγή μεταλλαγμάτων-gene trap (παγίδευση γονιδίων)-enhancer trap (παγίδευση ενισχυτών), ανάλυση μεταγράφων και πρωτεϊνικής έκφρασης σε επίπεδο γονιδιώματος, ανάλυση πρωτεϊνικών δομών και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων-two hybrid (διύβριδικό σύστημα) κ.τ.λ). Η λειτουργική ανάλυση γονιδιωμάτων περιλαμβάνει φαινοτυπικές και γονιδιακές προσεγγίσεις. Οι φαινοτυπικές προσεγγίσεις αναλύουν φαινοτύπους που προκύπτουν είτε από τυχαία μεταλλαξογένεση, είτε από φυσικές παραλλαγές (φυσικά μεταλλάγματα ποντικών, ανθρώπινες ασθένειες) και καταλήγουν στην κλωνοποίηση των σχετικών γονιδίων, χωρίς προηγούμενη πληροφόρηση για τους υπεύθυνους μοριακούς μηχανισμούς. Οι γονιδιακές προσεγγίσεις χρησιμοποιούν τη γονιδιακή πληροφορία για την ανίχνευση, κλωνοποίηση, έκφραση και χαρακτηρισμό των γονιδίων στο μοριακό επίπεδο. Σ' αυτές τις προσεγγίσεις ανήκει και η πρωτεϊνική ανάλυση γονιδιωμάτων (Proteomics), η οποία περιλαμβάνει οποιαδήποτε διαδικασία μπορεί να χαρακτηρίσει μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, συνεισφέροντας στην ανίχνευση, στην ποσοτικοποίηση και στον εντοπισμό τους, αλλά και στην εύρεση των αλληλεπιδράσεων και τροποποιήσεων τους και τελικά στην κατανόηση της λειτουργίας τους. Και οι δύο στρατηγικές της λειτουργικής ανάλυσης γονιδιωμάτων είναι συμπληρωματικές σε όλα τα επίπεδα μελέτης και οδηγούν συγκεντρωτικά στη συσχέτιση φαινοτύπων και γονοτύπων (εικ. 1). Η λειτουργική ανάλυση γονιδιωμάτων περιλαμβάνει εκτός των άλλων και τον έλεγχο της έκφρασης πολλών γονιδίων ταυτόχρονα,

χρησιμοποιώντας μεθόδους όπως η τεχνολογία των DNA chips, οι οποίες συμβάλλουν στην συγκριτική μελέτη της έκφρασης των γονιδίων και στον εντοπισμό των διαφορών τους. Οι μελέτες αυτές προωθούν τη διερεύνηση γενετικών μονοπατιών για φυσιολογικές διαδικασίες ανάπτυξης ή για διάφορες παθολογικές καταστάσεις. (Yaspo Marie-Laure, 2001; Ko MS, 2001; Copeland *et al.*, 2001; Haberkorn *et al.*, 2002).



**Εικ. 1:** Γενική επισκόπηση των δύο συμπληρωματικών στρατηγικών της λειτουργικής ανάλυσης γονιδιωμάτων

Η φαινοτυπική και η γονιδιακή προσέγγιση διαχωρίζονται τεχνητά κατά μήκος ενός διαγώνιου άξονα. Αναφέρονται τα κυριότερα εργαλεία ανάλυσης και οι σημαντικότερες ερευνητικές μέθοδοι, όπως και οι συνδετικοί κρίκοι μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων πληροφόρησης.

## 1.1 Μελέτη του γονιδίου *Fras1*

Στο γενικότερο πλαίσιο της λειτουργικής ανάλυσης γονιδίων, αποφασίστηκε η ανίχνευση της λειτουργίας και ο μοριακός χαρακτηρισμός ενός καινούργιου γονιδίου στον ποντικό, του γονιδίου *Fras1*, που κλωνοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Καθ. Γ. Χαλεπάκη. Πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του mRNA του σε ιστολογικές τομές εμβρύων ποντικού και εγκεφάλων ενηλίκων από τον Γ. Χαλεπάκη, έδειξαν ότι την ημέρα 12.5 (E12.5) της εμβρυογένεσης το γονίδιο παρατηρείται στα επιθήλια των πνευμόνων, των νεφρών και της επιδερμίδας. Το *Fras1* ανιχνεύθηκε επίσης και στον εγκέφαλο, τόσο σε έμβρυα, όσο και σε νεογνήτα και σε ενήλικα ποντίκια. Συγκεκριμένα στο πρώτο μήνα ζωής των ποντικών η έκφραση του *Fras1* στον εγκέφαλο εντοπίστηκε στον ιππόκαμπο, στο νεοφλοιό, στο βασικό αμυγδαλοειδή πυρήνα, καθώς και στην παρεγκεφαλίδα. Έκφραση του *Fras1* παρατηρήθηκε και στο χοριοειδές πλέγμα, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και στους ενήλικες.

Κατά συνέπεια το ιδιαίτερα ενδιαφέρον πρότυπο έκφρασης του *Fras1*, το οποίο εντοπίζεται σε ιστούς όπως τα επιθήλια, αλλά και στην περιοχή του εγκεφάλου, σε συνδυασμό με το



γεγονός ότι αποτελεί ένα καινούργιο γονίδιο, προκάλεσε το ενδιαφέρον του εργαστηρίου να ασχοληθεί με τη διερεύνηση της λειτουργίας του.

Τα μοριακά εργαλεία τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη διαλεύκανση της λειτουργίας του καινούργιου αυτού γονιδίου, περιλαμβάνουν την εύρεση του cDNA του γονιδίου *Fras1*, τη χαρτογράφηση του στον ποντικό και στον άνθρωπο, την κλωνοποίηση του σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς, τη δημιουργία πολυκλωνικών αντισωμάτων για τη *Fras1* και την στοχευόμενη απενεργοποίηση του γονιδίου αυτού στον ποντικό.

Οι περισσότερες πειραματικές διαδικασίες στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν σε επιθήλια όπως το δέρμα, γι' αυτό και στα επόμενα εισαγωγικά κεφάλαια θα αναφερθούν πληροφορίες για τους επιθηλιακούς ιστούς και για το βασικό τους έλασμα, θα σχολιαστούν τα συστατικά του βασικού ελάσματος, καθώς και η σύνδεση ορισμένων από αυτά με δερματικές ασθένειες.

## I.II Επιθήλια

Τα επιθήλια είναι μία ξεχωριστή κατηγορία ιστών που αποτελούνται από συνεκτικά συνδεδεμένες δεσμίδες κυττάρων, οι οποίες περιλαμβάνουν είτε ένα στρώμα κυττάρων (μονόστοιβα επιθήλια), είτε περισσότερα από ένα στρώματα (πολύστοιβα στρωματοποιημένα επιθήλια), όπως η επιδερμίδα. Οι επιθηλιακές ζώνες περιβάλλουν όλες τις εξωτερικές και εσωτερικές επιφάνειες ενός οργανισμού, καλύπτοντας όλες τις κοιλότητες και τους σωλήνες του. Μ' αυτόν τον τρόπο λειτουργούν σαν ζώνες μεσόφασης τόσο μεταξύ του εσωτερικού ενός οργανισμού και του εξωτερικού περιβάλλοντος, όσο και μεταξύ των διαφορετικών εσωτερικών βιολογικών διαμερισμάτων, προσδίδοντας στα όργανα που περιβάλλουν εκτός από περιεχόμενο και φυσική προστασία και ειδικές μεταφορικές ιδιότητες (Bissel Mina J. and Radisky Derek, 2001; NR cancer Thiery Jean Paul, 2002).

Με βάση την κυρίαρχη λειτουργία τους τα επιθήλια διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες:

**A)** Τα εκκριτικά επιθήλια. Πολλές φορές τα επιθήλια αυτά οργανώνονται σε αδένες που είτε εκκρίνουν ορμόνες στο αίμα (ενδοκρινείς αδένες), είτε εκκρίνουν άλλες ουσίες, όπως δάκρυα και βλέννα σε σωλήνες (εξωκρινείς αδένες).

**B)** Τα βλεφαριδωτά επιθήλια, τα οποία έχουν βλεφαρίδες που κινούν συγχρονισμένα στην ελεύθερη επιφάνεια τους προκειμένου να μετακινήσουν ουσίες πάνω από το επιθηλιακό στρώμα.

**Γ)** Τα προσροφητικά επιθήλια, με πολυάριθμες μικρολάχνες που αυξάνουν την επιφάνεια προσρόφησης ουσιών.

**Δ)** Τα περιοριστικά επιθήλια, τα οποία εμποδίζουν την είσοδο μικροοργανισμών. Τονίζεται ότι τα επιθήλια δεν αποτελούν μόνο φυσικά εμπόδια για την είσοδο μικροβίων, αλλά συμμετέχουν και δυναμικά στην αντιμετώπιση της εισβολής τους μέσω αισθητήρων, δικτύων σηματοδότησης και μορίων τελεστών.

Τα περισσότερα επιθήλια συνδυάζουν όλες τις παραπάνω ιδιότητες (Ganz T, 2002).

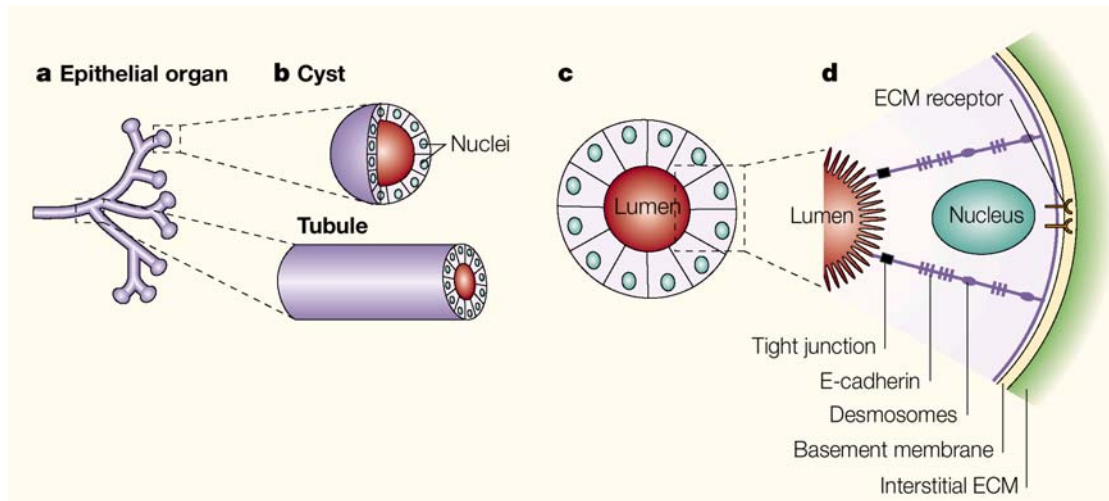
### I.II.1 Εσωτερικά επιθηλιακά όργανα

Οι δομικές μονάδες των εσωτερικών επιθηλιακών οργάνων διακρίνονται σε δύο κατηγορίες μονόστοιβων ζωνών που περικλείουν μια κοιλότητα, στις κύστες που είναι σφαιρικές και στους σωλήνες που είναι κυλινδρικοί. Ο συνδυασμός κύστεων και κυλίνδρων μπορεί να δημιουργήσει πολύπλοκες επιθηλιακές δομές όπως οι πνεύμονες των σπονδυλωτών, οι οποίοι αποτελούνται από ένα δίκτυο διακλαδιζόμενων κυλινδρικών βρογχιολίων που καταλήγουν σε κυστικές κυψελίδες. Κάθε κύτταρο στα μονόστοιβα επιθήλια είναι πολωμένο και περιλαμβάνει τρεις διακριτές επιφάνειες: μία κορυφαία μεμβρανική περιοχή πλούσια σε μικρολάχνες που βλέπει στην κοιλότητα του οργάνου, μία πλευρική μεμβρανική περιοχή που έρχεται σε επαφή με τα γειτονικά κύτταρα, καθώς και μία βασική μεμβρανική περιοχή η οποία εφάπτεται του βασικού ελάσματος (μία χαρακτηριστική περιοχή εξωκυττάριας ουσίας που ονομάζεται και βασική μεμβράνη) και επικοινωνεί με τον υποκείμενο συνδετικό ιστό. Το βασικό έλασμα που εντοπίζεται μεταξύ των επιθηλίων και της διάμεσης εξωκυττάριας ουσίας (interstitial extracellular matrix-ECM) που εκκρίνεται από το μεσέγγυμα, πιστεύεται ότι συμβάλλει στη διατήρηση της πολικότητας τόσο των επιθηλιακών κυττάρων όσο και των επιθηλιακών ιστών (εικ. 1).

Το προτεινόμενο μοντέλο για την επιθηλιακή μορφογένεση, το οποίο οδηγεί στη δημιουργία των εσωτερικών επιθηλιακών οργάνων, στηρίζεται στις παρακάτω δύο αρχές (εικ. 2):

**α)** Στην επιδίωξη της απόκτησης των τριών διακριτών μεμβρανικών επιφανειών των επιθηλιακών κυττάρων, μέσω της οποίας προωθείται η δημιουργία μιας αυτό-εσώκλειστης (self-enclosed) μονόστοιβης επιθηλιακής ζώνης που περιβάλλει μία κοιλότητα. Η μονόστοιβη επιθηλιακή ζώνη έχει μορφή σφαίρας ή σωλήνα ανάλογα με την γεωμετρία των κυττάρων στην αρχή της διαδικασίας αναζήτησης των τριών επιφανειών. Συγκεκριμένα τα μοναδιαία κύτταρα δίνουν σφαιρικές κύστες, ενώ οι επιμήκεις αλυσίδες κυττάρων κυλινδρικούς σωλήνες, ενώ η τάση αναζήτησης των τριών επιφανειών υφίσταται συνεχώς, τόσο κατά την διαδικασία της κυστοποίησης (cystogenesis), όσο και στα τελικά στάδια της σωληνοποίησης (tubulogenesis) των επιθηλίων.

Τονίζεται ότι, προκειμένου κάθε επιθηλιακό κύτταρο να εξασφαλίσει την απόκτηση των τριών χαρακτηριστικών μεμβρανικών επιφανειών θα πρέπει να διαθέτει μηχανισμούς με τους οποίους:



**Εικ. 1: Οι δομικές μονάδες των επιθηλιακών οργάνων**

Τα εσωτερικά επιθηλιακά όργανα **(α)** αποτελούνται από δύο βασικές δομικές μονάδες: τις κύστες και τους σωλήνες **(β)**. **γ**, Εγκάρσια τομή των δομικών μονάδων. **δ**, Κάθε κύτταρο στην επιθηλιακή ζώνη κάθε δομικής μονάδας, περιέχει τρεις διακριτές επιφάνειες. Τα γειτονικά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με διάφορες κατηγορίες δεσμών.

**1)** Ανιχνεύει το εξωκυττάριο περιβάλλον, τα γειτονικά κύτταρα ή το υγρό μιας κοιλότητας (π.χ η ανίχνευση της εξωκυττάριας ουσίας γίνεται μέσω υποδοχέων των επιθηλιακών κυττάρων που αναγνωρίζουν συστατικά της) και

**2)** Δημιουργεί τις ανάλογες επιφάνειες.

Γενικότερα πιστεύεται ότι τα επιθήλια διαθέτουν ένα πολύπλοκο μηχανισμό, τόσο ανίχνευσης του περιβάλλοντος πλησίον κάθε επιθηλιακής μεμβρανικής επιφάνειας, όσο και δημιουργίας της συγκεκριμένης επιφάνειας.

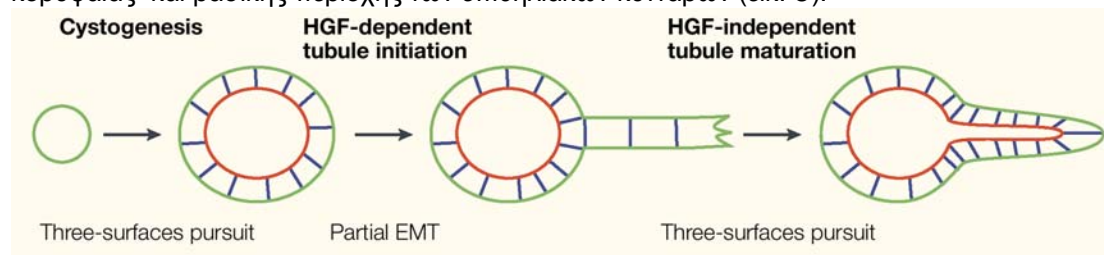
**β)** Στην παρουσία μορφογόνων όπως ο παράγοντας HGF (Hepatocyte Growth Factor-Αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων), που επάγουν την σωληνοποίηση των επιθηλίων. Η δράση των μορφογόνων προωθεί τα κύτταρα στα μονόστοιβα επιθήλια σε παροδική αποδιαφοροποίηση, μέσω ενεργοποίησης της διαδικασίας της επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT), με επακόλουθο τη δημιουργία επιμήκους κυτταρικής αλυσίδας. Κατά τη μετάβαση αυτή τα επιθηλιακά κύτταρα μεταμορφώνονται σε άπολα και αποκτούν ιδιότητες μετακίνησης, διαπερνώντας την ζώνη της βασικής τους μεμβράνης και διασχίζοντας την παρεμβαλλόμενη εξωκυττάρια ουσία, παραμένοντας όμως μερικώς συνδεδεμένα (O'Brien Lucy Erin *et al.*, 2002; Nelson WJ, 2001). Πολλές φορές τα επιθηλιακά κύτταρα στα αναπτυσσόμενα όργανα δεν παρουσιάζουν κάποια από τις χαρακτηριστικές παραπάνω επιφάνειες, είτε γιατί είναι πολύστοιβα, είτε γιατί δεν περιβάλλουν μία κοιλότητα. Τα κύτταρα αυτά μετακινούνται, πολλαπλασιάζονται, ή σχηματίζουν κοιλότητες προκειμένου να αποκτήσουν τις τρεις διακριτές επιφάνειες και κατά συνέπεια την κατάλληλη επιθηλιακή διαφοροποίηση. Επομένως η επιθηλιακή αρχιτεκτονική των διαφόρων οργάνων θεμελιώνεται μέσω της διαδικασίας αναζήτησης των επιθηλιακών κυττάρων για τρεις χαρακτηριστικές μεμβρανικές επιφάνειες και μέσω της διαδικασίας της επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης (O'Brien Lucy Erin *et al.*, 2002).

### **Ι.Π.2 Δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και εξωκυττάριας ουσίας**

Τα επιθηλιακά κύτταρα διατηρούν τη συνεκτικότητα τους μέσω διαφόρων συνδέσμων, όπως:

**α)** Οι στενοσύνδεσμοι (tight junctions), οι οποίοι υπάρχουν και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι σύνδεσμοι αυτοί εμποδίζουν την παθητική διέλευση υδατοδιαλυτών μορίων μεταξύ των κυτταροπλασμάτων γειτονικών κυττάρων και συμβάλλουν στην ελεγχόμενη διάχυση ουσιών. Πιστεύεται ότι σχηματίζονται από αλυσίδες άγνωστων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών γειτονικών κυττάρων, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους στον διακυτταρικό χώρο και φέρνοντας σε

επαφή τις πλασματικές μεμβράνες των γειτονικών αυτών κυττάρων δημιουργούν τους συγκεκριμένους δεσμούς. Μ' αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται και η επικοινωνία μεταξύ κορυφαίας και βασικής περιοχής των επιθηλιακών κυττάρων (εικ. 3).



**Εικ. 2: Μοντέλο επιθηλιακής μορφογένεσης**

Η κινητήριος δύναμη των επιθηλιακών κυττάρων για τη δημιουργία τριών μεμβρανικών επιφανειών και η διαδικασία της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης καθορίζουν την επιθηλιακή αρχιτεκτονική των διαφόρων οργάνων.

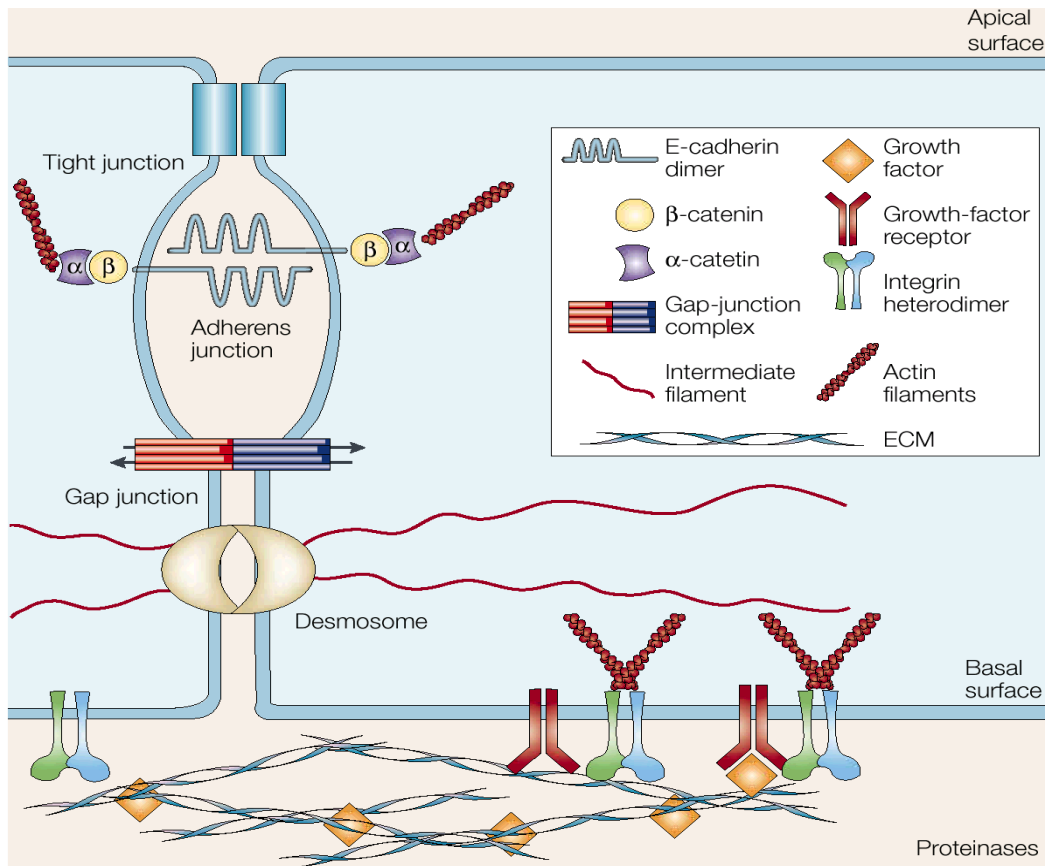
**β)** Οι χασμοσύνδεσμοι (Gap junctions) δημιουργούνται από την συνένωση κατάλληλων δομών γειτονικών κυττάρων, οι οποίες σχηματίζουν ένα σύστημα διαύλων πρωτεϊνικής φύσης (connexons). Οι δομές αυτές, οι οποίες προεξέχουν από την κάθε κυτταρική επιφάνεια κρατώντας σε απόσταση τις πλασματικές μεμβράνες των γειτονικών κυττάρων, δημιουργούνται (η κάθε μια), από την σύνδεση 6 διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που είναι γνωστές σαν connexins (Κονεξίνες). Τα υδατικά κανάλια που προκύπτουν συνδέουν τα κυτταροπλάσματα γειτονικών κυττάρων, επιτρέποντας τη παθητική διέλευση μικρών μορίων σηματοδότησης (χημικών ή ηλεκτρικών), το μέγεθος των οποίων καθορίζεται από το είδος των connexins (εικ. 3).

**γ)** Οι σύνδεσμοι πρόσδεσης (adherens junctions), οι οποίοι ενώνουν γειτονικά κύτταρα μέσω σύνδεσης των κορυφοπλευρικά εντοπισμένων ζωνών ακτίνης του κυτταροσκελετού τους. Οι δεσμοί αυτοί προκύπτουν από τη συνένωση, παρουσία ασβεστίου, δύο γειτονικών διαμεμβρανικών μορίων E-cadherin (E-καδερίνης). Κάθε μόριο E-cadherin συνδέεται κυτταροπλασματικά με την πρωτεΐνη β-κατενίνη, η οποία ενώνεται με την α-κατενίνη και αυτή με τα ινίδια ακτίνης (εικ. 3, 4).

δ) Τα δεσμοσώματα, τα οποία χαρακτηρίζουν ιστούς σπονδυλωτών που υφίστανται ισχυρές πιέσεις, συμβάλλουν στην αγκυροβόληση των ενδιάμεσων ινιδίων κερατίνης δύο γειτονικών κυττάρων σε συγκεκριμένες θέσεις και μ' αυτόν τον τρόπο στην σύνδεση των κυττάρων αυτών. Αποτελούνται, όπως και οι δεσμοί πρόσδεσης, από γειτονικά διαμεμβρανικά διμερή της οικογένειας των cadherin, τα οποία με τη σειρά τους συνδέονται με άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και μέσω αυτών με τα ινίδια κερατίνης του κυτταροσκελετού των κυττάρων (Bissel Mina J. and Radisky Derek, 2001).

Τόσο τα δεσμοσώματα, όσο και οι δεσμοί πρόσδεσης, πραγματοποιούν διακυτταρικές συνδέσεις στο επιδερμικό επιθήλιο και εντοπίζονται σε όλα τα μεταβολικά ενεργά κυτταρικά στρώματα της επιδερμίδας (εικ. 3, 4).

Όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και εξωκυττάριας ουσίας, αυτές πραγματοποιούνται μέσω της δράσης ειδικών κυτταρικών υποδοχέων, όπως οι ιντεγκρίνες. Οι υποδοχείς αυτοί σχηματίζουν δεσμεύσεις με τα ινίδια ακτίνης του κυτταροσκελετού των κυττάρων και ενεργοποιούνται από συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας (π.χ αυξητικοί παράγοντες) (εικ. 3). Τονίζεται ότι στο επιδερμικό επιθήλιο και στα πολύστοιβα επιθήλια γενικότερα εντοπίζεται και η δομή των ημιδεσμοσωμάτων. Τα ημιδεσμοσώματα εκτείνονται από το κυτταροπλασματικό περιβάλλον στον εξωκυττάριο χώρο, συνδέοντας τον κυτταροσκελετό των ενδιάμεσων ινιδίων των κερατινοκυττάρων με άλλα συστατικά του βασικού ελάσματος. Τα ημιδεσμοσώματα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, παρουσιάζονται υπό τη μορφή ηλεκτρονιακά πυκνών συναθροίσεων (electron dense omplexes) και αποτελούνται (εικ. 5):



**Εικ. 3: Μηχανισμοί διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων και αλληλεπιδράσεων των κυττάρων με την εξωκυττάρια ουσία**

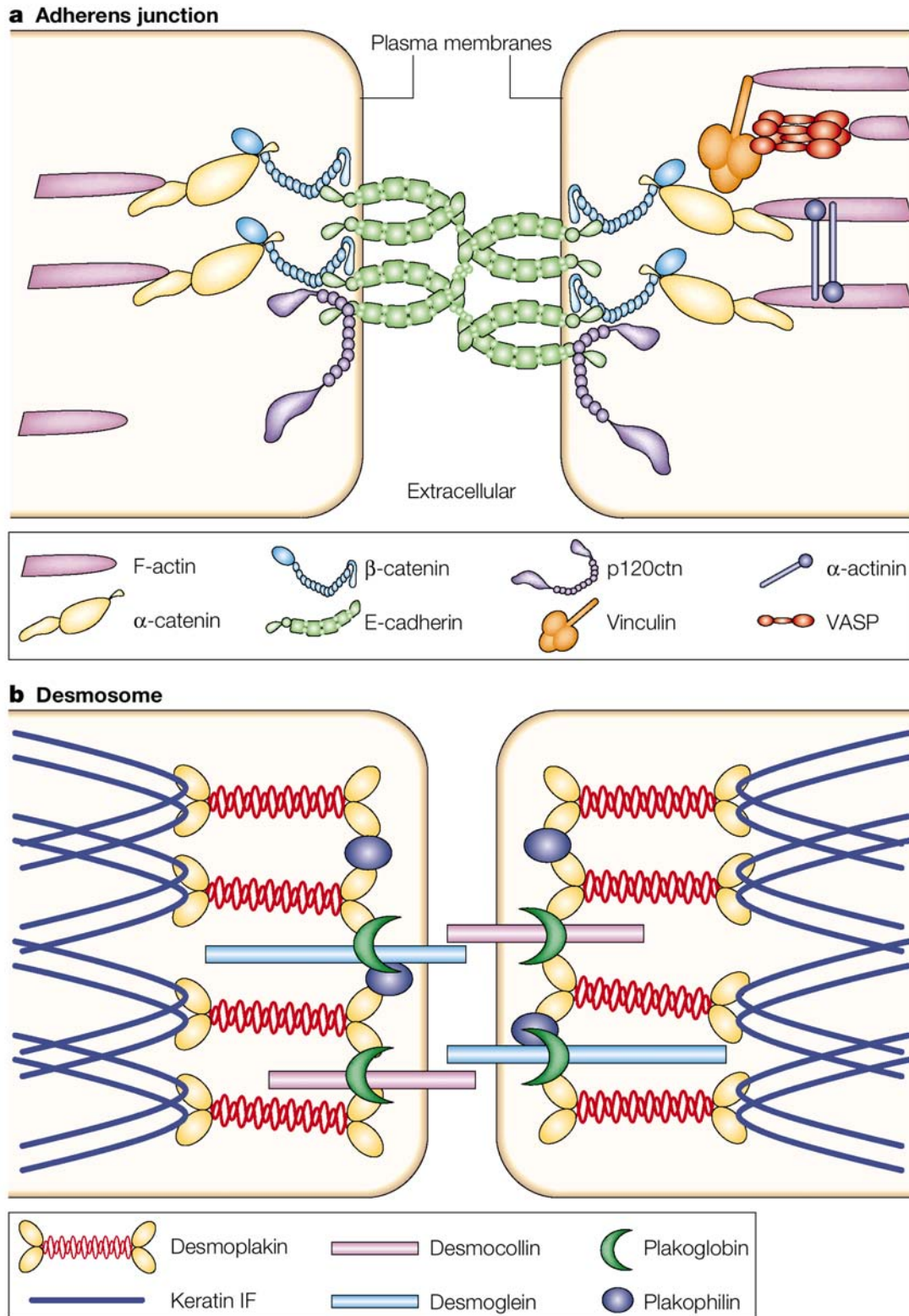
Οι κατηγορίες συνδέσμων μεταξύ γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων περιλαμβάνουν, τους χασμοσυνδέσμους, τα δεσμοσώματα, τους δεσμούς πρόσδεσης και τους στενοσύνδεσμους.

Η αλληλεπίδραση της εξωκυττάριας ουσίας με τα επιθηλιακά κύτταρα επιτυγχάνεται μέσω ειδικών κυτταρικών υποδοχέων, όπως οι ιντεγκρίνες.

1) Από τις ιντεγκρίνες αββ4 και το κολλαγόνο XVII (BPAG2 ή BP180-bullous pemphigoid antigen-πομοφολυγώδες αντιγόνο), τα οποία είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που με τις εξωκυττάριας περιοχές τους σχηματίζουν την εξωτερική πλάκα των ημιδεσμοσωμάτων (outer plaque). Οι υποδοχείς αυτοί αλληλεπιδρούν εξωκυτταρικά με διάφορα συστατικά του βασικού ελάσματος, δημιουργώντας το υποκοιλιακό πυκνό στρώμα των ημιδεσμοσωμάτων (sub-basal dense plate).

2) Από τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες πλεκτίνη και BPAG1 ή BP230-bullous pemphigoid antigen 1 (πομοφολυγώδες αντιγόνο 1), με τις οποίες αλληλεπιδρούν ενδοκυτταρικά η ιντεγκρίνη αββ4 και το κολλαγόνο XVII αντίστοιχα. Οι κυτταροπλασματικές αυτές πρωτεΐνες αποτελούν δύο ημιδεσμοσωμικές πρωτεΐνες, που ανήκουν στην οικογένεια των πλακινών (πρωτεΐνες με μορφή περιελιγμένου σπειράματος-coiled-coil proteins). Οι πρωτεΐνες αυτές διαθέτουν στην μη ελικοειδή καρβοξυτελική τους περιοχή θέσεις σύνδεσης για τα ενδιάμεσα ινίδια κερατίνης. Μ' αυτόν τον τρόπο σχηματίζουν την εσωτερική πλάκα των ημιδεσμοσωμάτων (cytoplasmic inner plaque), λειτουργώντας σαν γέφυρες μεταξύ των ινιδίων κερατίνης του κυτταροσκελετού και των διαμεμβρανικών υποδοχέων των ημιδεσμοσωμάτων.

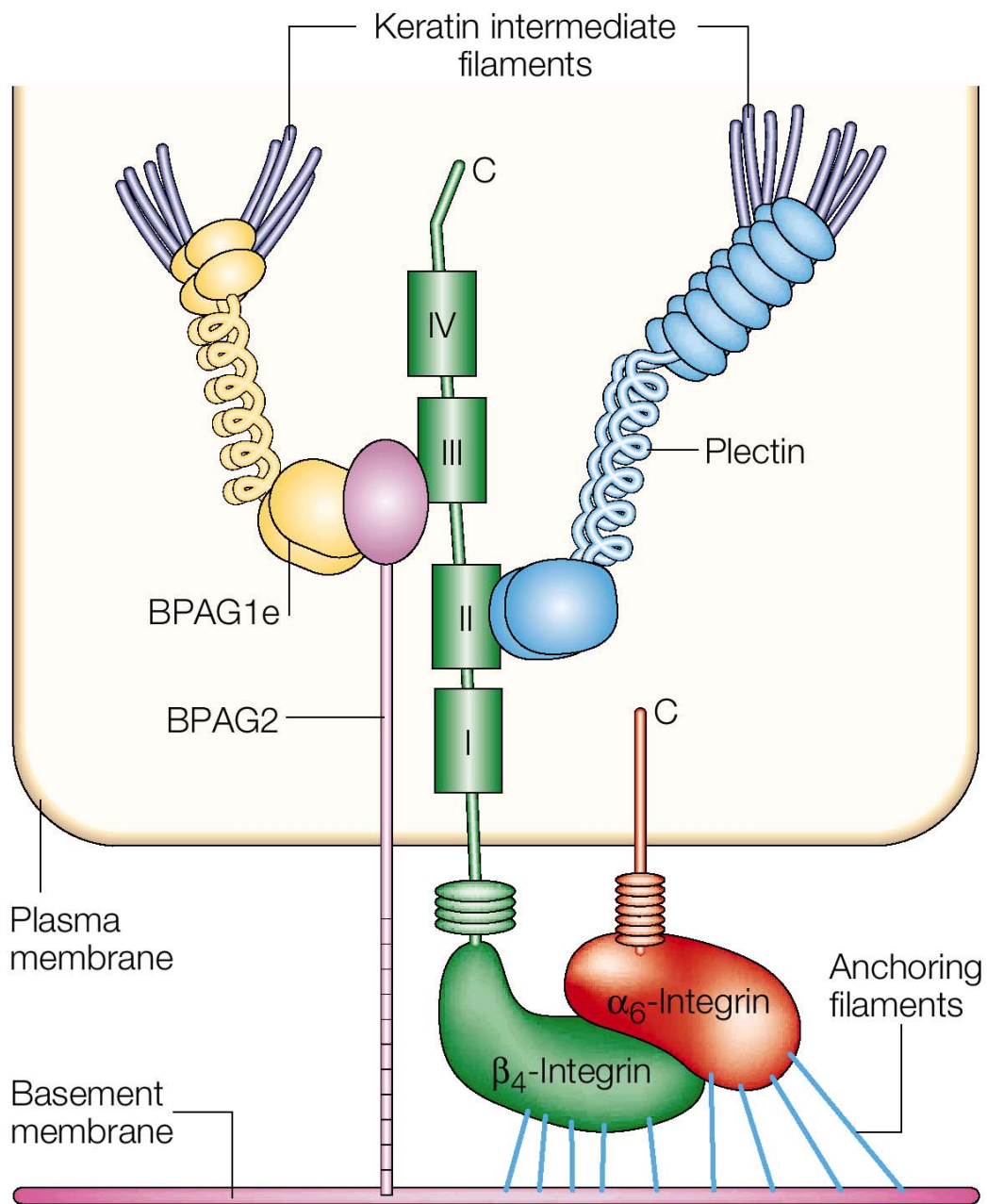
3) Από τα ενδιάμεσα ινίδια κερατίνης του κυτταροσκελετού, τα οποία συνδέονται με τις προαναφερθείσες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και τα οποία προσφέρουν μηχανική σταθερότητα στα κερατινοκύτταρα (Borradori L, Sonnenberg A, 1996; Raghavan S *et al.*, 2000).



**Εικ. 4: Δεσμοσώματα και δεσμοί προσκόλλησης**

**a**, Σύνδεσμος πρόσδεσης και δεσμοσώμα (**b**) και οι κυριότερες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που εντοπίζονται σ' αυτές τις δομές.

Keratin IF, keratin intermediate filaments (ενδιάμεσα νημάτια κερατίνης); p120ctn, adherens junction protein p120 (πρωτεΐνη των συνδέσμων πρόσδεσης); VASP, vasodilator-stimulated phosphoprotein (φωσφοπρωτεΐνη που ενεργοποιείται από αγγειοδιαστολή).



### Εικ. 5: Ημιδεσμοσώματα

Σχηματική αναπαράσταση του ημιδεσμοσώματος.

BPAG1e, bullous pemphigoid antigen 1 (πομφολυγώδες αντιγόνο 1), epidermal isoform (επιδερμική ισομορφή).

### I.II.3 Εξωτερικά επιθηλιακά όργανα-Δέρμα

Το όργανο το οποίο χρησιμοποιήθηκε εκτενέστερα στις πειραματικές διαδικασίες που αναφέρονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων είναι το δέρμα. Το δέρμα αποτελείται από δύο κατηγορίες ιστών που συνδέονται ανατομικά και αλληλεπιδρούν λειτουργικά. Το επιφανειακότερο τμήμα του δέρματος περιλαμβάνει την εξωτερικής προέλευσης επιδερμίδα,

ενώ πιο εσωτερικά εντοπίζονται διαδοχικά η δερμίδα και η υποδερμίδα. Τόσο η δερμίδα όσο και η υποδερμίδα προέρχονται από το μεσέγγυμα και αποτελούνται από συνδετικό ιστό.

Ο συνδετικός ιστός περιέχει αραιά τοποθετημένα κύτταρα σε ένα πλούσιο στρώμα εξωκυττάριας ουσίας. Σε αντίθεση με τα επιθήλια, ο στηρικτικός του ρόλος αποδίδεται στην εξωκυττάρια ουσία, η οποία περιέχει πρωτεϊνικές ίνες βυθισμένες σε ένα πήκτωμα από πολυσακχαρίτες. Η εξωκυττάρια ουσία εκκρίνεται κυρίως από τους ινοβλάστες του συνδετικού ιστού. Κατηγορίες συνδετικού ιστού αποτελούν ενδεικτικά τα οστά, οι χόνδροι καθώς και ο χαλαρός συνδετικός ιστός.

Όσον αφορά τη δερμίδα αυτή αποτελείται από δύο στρώματα συνδετικού ιστού, ένα πιο χαλαρό εξωτερικά και ένα πυκνότερο εσωτερικά, ενώ η υποδερμίδα περιέχει λιπώδη συνδετικό ιστό. Στη δερμίδα εντοπίζονται πρωτεογλυκάνες που έλκουν και συγκρατούν το νερό και διαφόρων ειδών πρωτεϊνικές ίνες, όπως διάμεσες ίνες κολλαγόνου και ελαστικές ίνες (οι ελαστικές ίνες συντίθενται από ελαστίνη και μικροϊνίδια). Η δερμίδα διακρίνεται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τη διάμετρο των ινών κολλαγόνου που περιέχει, την θηλώδη δερμίδα (papillary dermis), η οποία υπόκειται της επιδερμίδας και ακολουθως τη δικτυωτή δερμίδα (reticular dermis), που περιέχει ίνες κολλαγόνου αυξημένης διαμέτρου. Η δερμίδα και η υποδερμίδα εκτός από τους ινοβλάστες (που εκκρίνουν τις πρωτεϊνικές ίνες της εξωκυττάριας ουσίας), περιέχουν αιμοφόρα αγγεία, οι απολήξεις των οποίων σταματούν στη βάση της επιδερμίδας χωρίς να εισέρχονται στο εσωτερικό της, καθώς και επιδερμικές αποφύσεις, νευρικά κύτταρα, αδένες, μελανοκύτταρα, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα.

Η επιδερμίδα και οι αποφύσεις της, συμπεριλαμβανομένων των θυλάκων των τριχών και των ιδρωτοποιών αδένων (που αποτελούνται όλα από επιθηλιακά κύτταρα), διαχωρίζονται από την υποκείμενη δερμίδα μ' ένα στρώμα εξωκυττάριας ουσίας, το βασικό έλασμα, για το οποίο θα μιλήσουμε αναλυτικότερα στη συνέχεια (εικ. 6) (Arin Meral J. and Roop Dennis, 2001). Στους ενήλικες οργανισμούς η επιδερμίδα αποτελείται από πολλά στρώματα επιθηλιακών κυττάρων (στα αρχικά εμβρυϊκά στάδια απαντώνται λιγοστά επιδερμικά στρώματα), από απολήξεις νευρικών ινών, μελανοκύτταρα, κύτταρα Langerhans, κύτταρα Merkel, αλλά δεν περιέχει ενδοθηλιακά κύτταρα. (Άλλοι ιστοί με εσωτερικά στρωματοποιημένα επιθήλια είναι η γλώσσα, ο οισοφάγος, ο πρωκτός, ο πυθμένας της στομαχικής περιοχής).

Τονίζεται ότι τουλάχιστον στα ποντίκια, η επιδερμίδα παρουσιάζει σταδιακή στρωματοποίηση κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης. Την ημέρα 11.5 της εμβρυογένεσης αποτελείται από ένα στρώμα βασικών κερατινοκυττάρων και ένα εξωτερικό στρώμα την περιδερμίδα και σταδιακά αναπτύσσει αυξανόμενους βαθμούς στρωματοποίησης για να φθάσει στην ολοκλήρωση της την εμβρυϊκή ημέρα 17.5 (Kreidberg JA, 1996).

Η επιδερμίδα του ενήλικου ανθρώπου διακρίνεται σε τέσσερα, μορφολογικώς διαφορετικά στρώματα διαφοροποίησης, τα οποία από το εσωτερικό της επιδερμίδας προς το εξωτερικό περιβάλλον είναι (εικ. 6):

**A)** Το βασικό στρώμα (**BL**). Αυτό αποτελείται από μία στοιβάδα από κιονοειδή πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, η οποία έρχεται σε επαφή με το βασικό έλασμα. Στο βασικό στρώμα εντοπίζονται και τα πρόδρομα επιδερμικά κύτταρα, ένα μέρος των οποίων εισέρχεται στη διαδικασία της διαφοροποίησης και παράγει τα υπόλοιπα στρώματα της επιδερμίδας.

**B)** Το μωσαϊκό στρώμα, το οποίο ονομάζεται και ακανθώδες (prickle ή spinous layer-**SL**) και περιλαμβάνει πέντε με δέκα σειρές μερικώς διαφοροποιημένων και περισσότερο πεπλατυσμένων πολυγωνικών κυττάρων. Το όνομα του στρώματος αυτού οφείλεται στην εμφάνιση των κυττάρων που περιέχει, τα οποία παρουσιάζουν πολλά δεσμοσώματα (που αποτελούν θέσεις αγκυροβόλησης νηματίων κερατίνης), τα οποία αναγνωρίζονται σαν αγκάθια στο οπτικό μικροσκόπιο.

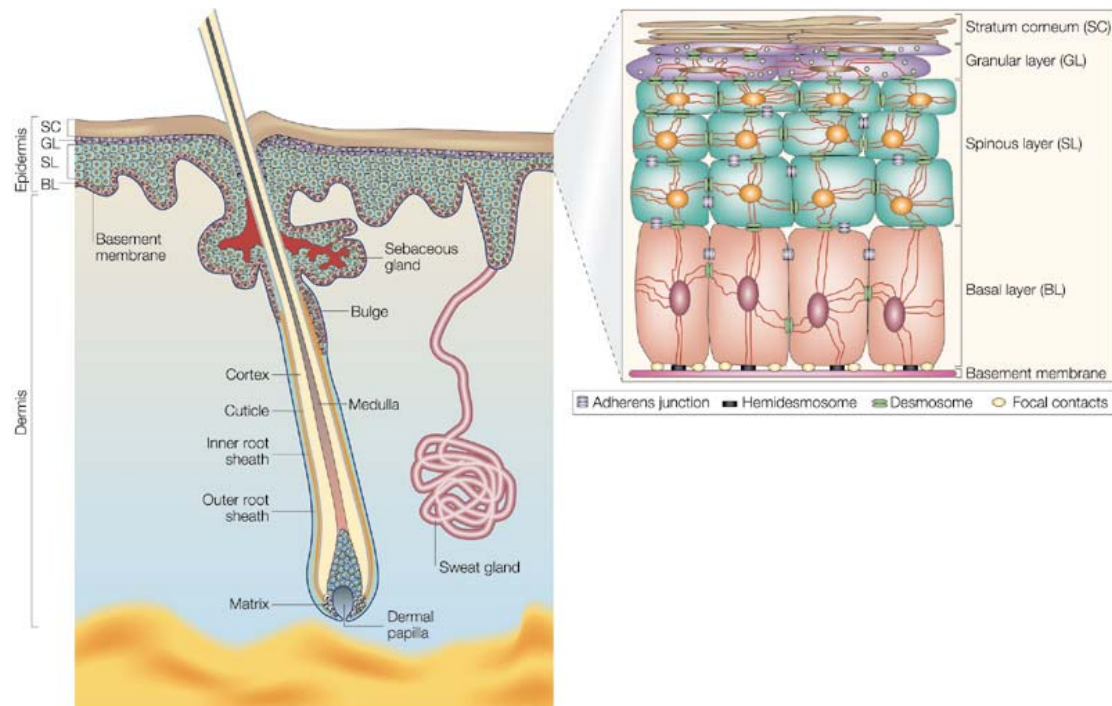
**Γ)** Το λεπτό κοκκώδες στρώμα (granular cell layer-**GL**), που αποτελείται από μία έως τρεις στοιβες κυττάρων, σε περιοχές όπου το υπερκείμενο στρώμα είναι λεπτό και από μέχρι δέκα στοιβες όταν είναι παχύ. Τα κύτταρα του στρώματος αυτού είναι μεταγραφικά ενεργά αλλά τελικώς διαφοροποιημένα, το κυτταρόπλασμα τους είναι γεμάτο από κοκκία κερατουαλίνης (keratohyaline) και το σχήμα τους θυμίζει διαμάντι.

**Δ)** Το τελευταίο επιθηλιακό στρώμα ονομάζεται στρώμα κερατίνης στοιβάδας (stratum corneum-**SC**) και αποτελεί το πολύ λεπτό στρώμα των νεκρών, απύρηνων και χωρίς ενδοκυτταρικά συστατικά κυττάρων, τα οποία σχηματίζουν κάθετες στοιβες. Τα κύτταρα του στρώματος αυτού είναι εντελώς πεπλατυσμένα και γεμάτα πυκνή πακεταρισμένη κερατίνη και η αποφολίδωση τους ξεκινάει από τις υψηλότερες στοιβάδες. Τα κύτταρα αυτά μαζί με τα κύτταρα του κοκκιώδους στρώματος παρουσιάζουν στην κυτταροπλασματική πλευρά της πλασματικής τους μεμβράνης ένα ισχυρό στρώμα



της πρωτεΐνης ινβολουκρίνης (involucrin), το οποίο και τους προσφέρει μεγάλη ανθεκτικότητα (Raghavan S *et al.*, 2000).

Ο κύριος τύπος επιθηλιακών κυττάρων της επιδερμίδας είναι τα κερατινοκύτταρα, που συνθέτουν τα ενδιάμεσα ινίδια τύπου κερατίνης. Τα ινίδια αυτά σχηματίζοντας ετεροδιμερή δημιουργούν ένα δίκτυο κερατίνης, που σε συνεργασία με τα πολλά στρώματα κυττάρων, προσφέρει ανθεκτικότητα στην επιδερμίδα, ώστε να αντέχει πληθώρα φυσικών και χημικών



Nature Reviews | Genetics

### Εικ. 6: Το δέρμα και οι αποφύσεις του

Απεικονίζεται το στρωματοποιημένο μηκώδες επιθήλιο της επιδερμίδας, το οποίο αποτελείται από πολλές κυτταρικές στοιβάδες και μία εγκάρσια τομή ενός τριχοφόρου θυλακίου. Η τομή αυτή περιέχει ένα εξωτερικό ριζικό περίβλημα (outer root sheath), το οποίο συνορεύει με το βασικό επιδερμικό στρώμα. Στη βάση του θυλακίου εντοπίζεται ο τριχοφόρος βολβός (hair bulb), ο οποίος περιέχει τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα της μήτρας (proliferating matrix cells). Τα παροδικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα της μήτρας κατά την τελική τους διαφοροποίηση παράγουν τους διάφορους κυτταρικούς τύπους των τριχοφόρων θυλακίων. Τέλος σημειώνεται το εξόγκωμα (bulge), ως τμήμα του εξωτερικού ριζικού περιβλήματος, στο οποίο εντοπίζονται τα πρόδρομα επιδερμικά κύτταρα. Το δερματικό συστατικό των τριχοφόρων θυλακίων είναι η θηλώδης δερμίδα (dermal papilla), η οποία αποτελείται από ειδικά μεσεγχυματικά κύτταρα τα οποία περιστοιχίζονται από τριχοφόρα κύτταρα της μήτρας.

ερεθισμάτων και να εμποδίζει την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών. Η επιδερμίδα συμβάλλει και στην κατακράτηση των σωματικών υγρών για να αποφευχθεί η αφυδάτωση, αποτελώντας ουσιαστικά την πανοπλία κάθε οργανισμού. Οι παραπάνω ιδιότητες της επιδερμίδας βασίζονται στην ικανότητα που έχει να ανανεώνεται και να επιδιορθώνεται. Συγκεκριμένα τόσο η επιδερμίδα όσο και το εντερικό επιθήλιο και οι αιμοποιητικοί ιστοί, που αποτελούν τους τρεις ιστούς που υποφέρουν περισσότερο από τις αλληλεπιδράσεις τους με το εξωτερικό περιβάλλον, είναι ιδιαίτερα δυναμικοί και αυτοανανεώσιμοι. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η γρήγορη αντικατάσταση των ώριμων διαφοροποιημένων κυττάρων τους από τα πιο εκτεθειμένα μέρη, με κύτταρα λιγότερο διαφοροποιημένα, τα οποία βρίσκονται σε πιο απάγκιους θώκους και διαρκώς πολλαπλασιάζονται. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται πρόδρομα, πολλαπλασιάζονται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού και ένα μέρος των απογόνων τους κάποια στιγμή διαφοροποιείται (Fuchs Elaine and Raghavan Srikala, 2002).

Στην περίπτωση του εντερικού επιθηλίου, τα πρόδρομα και ελαφρώς διαφοροποιημένα κύτταρα εντοπίζονται στην κρύπτη του κρυπτολαχνώδους άξονα, που αποτελεί και την βασική λειτουργική του μονάδα, ενώ τα ώριμα εντεροκύτταρα εντοπίζονται στις λάχνες του (Lussier C *et al.*, 2000).

Τα πρόδρομα επιδερμικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να δημιουργήσουν εκ νέου ολόκληρη την επιδερμίδα και προέρχονται στην περίπτωση των τριχοφόρων ζώων από ένα εξόγκωμα (bulge) που βρίσκεται σ' ένα τμήμα των τριχοφόρων θυλακίων, ενώ στην περίπτωση της ανθρώπινης επιδερμίδας αποτελούν ένα μέρος του βασικού στρώματος της (basal layer). Στην περίπτωση των τριχοφόρων ζώων τα πρόδρομα κύτταρα μετατοπίζονται άνωθεν, προς το εσωτερικό βασικό στρώμα της επιδερμίδας και είναι πολυδύναμα, δηλαδή μπορούν να συμβάλλουν στην ανανέωση τόσο της επιδερμίδας όσο και των τριχοφόρων θυλακίων και των σημηματογόνων αδένων. Αυτή η πολυδραστικότητα (multipotency) δεν έχει ακόμα αποδειχθεί για τα ανθρώπινα πρόδρομα επιδερμικά κύτταρα (Fuchs Elaine and Raghavan Srikala, 2002).

Συγκεκριμένα ένα μέρος των πρόδρομων κυττάρων του βασικού στρώματος της επιδερμίδας, που αναφέρονται σαν παροδικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (transit amplifying cells), ύστερα από ένα περιορισμένο αριθμό διαιρέσεων αποσύρεται από τον κυτταρικό κύκλο και δεσμεύεται στο πρόγραμμα τελικής διαφοροποίησης τους. Δηλαδή αποχωρίζεται από το βασικό έλασμα (η αλληλεπίδραση με το οποίο του προσδίδει ξεχωριστές ιδιότητες) και μετατοπίζεται στα ανώτερα στρώματα της επιδερμίδας μέχρι να φτάσει στην επιφάνεια του δέρματος τελικώς διαφοροποιημένο. Κατά τη μετακίνηση τους τα κύτταρα αυτά πλαταίνουν σταδιακά και διαφοροποιούνται βαθμιαία. Όσον αφορά τα κερατινοκύτταρα, αυτά παρουσιάζουν ποικιλία στην έκφραση τους στα διαφορετικά στρώματα της επιδερμίδας (για παράδειγμα τα κερατινοκύτταρα του βασικού στρώματος εκφράζουν την κερατίνη 5 και 14, ενώ τα τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα την κερατίνη 1 και 10). Εκτός από τις αλλαγές στην έκφραση των μορίων κερατίνης κατά τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, παρατηρούνται και μετατροπές στις κυτταρικές και κύτταρο-εξωκυτταρικές αλληλεπιδράσεις τους (παρατηρείται για παράδειγμα μείωση της έκφρασης των κατάλληλων ιντεγκρινών (integrins)), ώστε να αποχωρίζονται εύκολα από το βασικό έλασμα και να μεταναστεύουν (Brakebusch C *et al.*, 2000). Τα νεκρά, απύρνηνα και πεπλατυσμένα κύτταρα που φτάνουν τελικά στην επιφάνεια, απομακρύνονται από το δέρμα για να αντικατασταθούν από άλλα πιο εσωτερικά κύτταρα, τα οποία μετακινούνται με τη σειρά τους προς τα πάνω. Η πορεία αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την διαρκή ανανέωση της επιδερμίδας.

Σημειώνεται ότι σε περίπτωση τραυματισμού της επιδερμίδας παρατηρείται μείωση της συνεκτικότητας των κυττάρων, αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού τους και γρηγορότερη άνωθεν μετακίνηση τους, προκειμένου να επουλωθούν γρηγορότερα οι προβληματικές περιοχές.

Γενικότερα το διαμέρισμα της επιδερμίδας που πολλαπλασιάζεται περιλαμβάνει το βασικό της στρώμα και τα 2/3 των κυττάρων του υπερκείμενου στρώματος. Από την άλλη μεριά το διαμέρισμα της επιδερμίδας που είναι διαφοροποιημένο αποτελείται από το υπόλοιπο 1/3 των κυττάρων του προηγούμενου στρώματος, μαζί με όλα τα υπερκείμενα βιώσιμα κύτταρα.

Όσον αφορά τους παράγοντες που καθορίζουν τις ισορροπίες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των επιδερμικών κυττάρων, ενώ δεν έχουν ακόμα διαλευκανθεί, πιστεύεται ότι περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων και υποδοχείς κινασών τυροσίνης (Fuchs Elaine and Raghavan Srikala, 2002).

## I.III Βασικό έλασμα

Τα επιθηλιακά κύτταρα συνδέονται και αλληλεπιδρούν όχι μόνο μεταξύ τους αλλά και με την εξωκυττάρια ουσία. Η εξωκυττάρια ουσία αποτελείται κυρίως από τέσσερα συστατικά: κολλαγόνα, πρωτεογλυκάνες, μη κολλαγονώδεις γλυκοπρωτεΐνες και σε μερικούς ιστούς όπως το δέρμα και η αορτή, από ίνες ελαστικής. Τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας δημιουργούν ένα τρισδιάστατο δίκτυο μεγάλων μακρομορίων, το οποίο γεμίζει το χώρο ανάμεσα στα κύτταρα, προσφέροντας το απαραίτητο ικρίωμα για την προσκόλληση και για την μετακίνηση των κυττάρων. Γενικότερα το εξωκυττάριο περιβάλλον είναι υπεύθυνο για την ακεραιότητα και την συμπεριφορά των κυττάρων που περιβάλλει, προσδίδοντας τους την κατάλληλη πληροφορία για διάφορες σημαντικές λειτουργίες, όπως για τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη διαφοροποίηση και την αλλαγή του κυτταρικού τους σχήματος. Η σύσταση της εξωκυττάριας ουσίας διαφοροποιείται από ιστό σε ιστό έτσι ώστε να εξασφαλίζει τις δομικές και λειτουργικές του ιδιότητες, τη μορφογένεση και την ομοίωση του. Μια ειδική κατηγορία της εξωκυττάριας ουσίας αποτελεί και το βασικό έλασμα (Aszodi A *et al.*, 1998; Vu TH, 2001).

Το βασικό έλασμα (ή βασικός υμένας, ή βασική μεμβράνη, ή βασική λαμίνη-Basement membrane ή Basal Lamina) είναι ένας ευέλικτος λεπτός σχηματισμός εξωκυττάριας ουσίας, που εντοπίζεται σε όλους σχεδόν τους πολυκύτταρους οργανισμούς και αποτελεί την πρώτη εξωκυττάρια ουσία που παράγεται κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Το λεπτό αυτό στρώμα (20-200 nm, στο ποντίκι) στηρίζει όλα τα επιθηλιακά (πάχους περίπου 50μm) και ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και αρκετά μεσεγγυματικά. Συγκεκριμένα εντοπίζεται κάτω από τη βασική πλευρά κάθε επιθηλιακής στοιβάδας, καλύπτει το ενδοθηλιακό στρώμα προς το μέρος του συνδετικού ιστού, ή περιβάλλει συγκεκριμένες κατηγορίες κυττάρων όπως τα μυϊκά κύτταρα, τα λιπώδη κύτταρα και τα κύτταρα Schwann (όπου τυλίγεται γύρω από τους άξονες περιφερικών νεύρων σχηματίζοντας τη μυελίνη).

Το βασικό έλασμα (όπως και η εξωκυττάρια ουσία) εκτός από τη δομική του λειτουργία, μέσω της οποίας στηρίζει και διαμερισματοποιεί τους ιστούς, εμποδίζει και την ανεξέλεγκτη διέλευση μακρομορίων, κυττάρων ή νευρικών απολήξεων. Μ' άλλα λόγια όχι μόνο διαχωρίζει τα κύτταρα που περιβάλλει από τον υποκείμενο ή περιβάλλοντα συνδετικό ιστό, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στις κυψελίδες των πνευμόνων ή των αγγειωδών σπειραμάτων των νεφρών, τοποθετείται μεταξύ δύο κυτταρικών στρωμάτων και δρα σαν ειδικό φίλτρο για τη διέλευση ουσιών με βάση το μέγεθος τους (Timpl R, 1996; Liddington Robert C, 2001; Miosge N, 2001. Ταυτόχρονα εντός του πολύπλοκου μακρομοριακού του δικτύου, το βασικό έλασμα παγιδεύει μία πληθώρα αυξητικών παραγόντων, μορφογενετικών μορίων, ορμονών και γενικότερα σηματοδοτικών συστατικών, προσδιορίζοντας το εξωκυτταρικό μικροπεριβάλλον. Αυτό, ανάλογα με τη σύσταση του, ενεργοποιεί υποδοχείς στα κύτταρα με τα οποία έρχεται σε επαφή και κινητοποιεί κατάλληλους σηματοδοτικούς μηχανισμούς που επηρεάζουν την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την κυτταρική διαφοροποίηση, τον κυτταρικό μεταβολισμό, τον κυτταρικό θάνατο ή πολλαπλασιασμό (για παράδειγμα τα επιθηλιακά κύτταρα προκειμένου να επιβιώσουν πρέπει να στηρίζονται στο βασικό έλασμα, αλλιώς υφίστανται απόπτωση). Το βασικό έλασμα συμβάλλει επίσης στον καθορισμό της πολικότητας των κυττάρων, στην οργάνωση των πρωτεϊνών μεταξύ γειτονικών πλασματικών μεμβρανών, στην αναδιάρθρωση των ιστών, στην κυτταρική μετακίνηση και στην επούλωση πληγών, και επηρεάζει και την καρκινική μετάσταση (Bruckner-Tuderman L and Bruckner P, 1998; Hood John D. and Cheresch David A, 2002; Fuchs Elaine and Raghavan Srikala, 2002).

Παρά την ομοιογενή εμφάνιση που παρουσιάζουν τα βασικά ελάσματα από διάφορα είδη κυττάρων στη δομική τους οργάνωση, η σύσταση τους πρέπει να είναι περισσότερο πολύπλοκη, όπως υποδηλώνεται από τη μεγάλη βιολογική τους σημασία και την ποικιλία των ρόλων τους. Πράγματι η μοριακή σύνθεση του βασικού ελάσματος ποικίλλει από ιστό σε ιστό και πολλές φορές από περιοχή σε περιοχή μέσα στον ίδιο ιστό, ενώ ενδέχεται βασικά ελάσματα με τα ίδια πρωτεϊνικά συστατικά να διαφοροποιούνται λόγω μεταβολών στις ισομορφές των εμπλεκόμενων πρωτεϊνικών μορίων, ή στη μοριακή τους οργάνωση.

Το τυπικό βασικό έλασμα διακρίνεται με ηλεκτρονική μικροσκοπία σε τρεις ζώνες. Την Lamina lucida (φωτεινός υμένας), που αντιπροσωπεύει μια διαυγής περιοχή, την Lamina densa (σκοτεινός υμένας), η οποία αποτελεί μία σκοτεινή ζώνη που υπόκειται της Lamina lucida και ακολούθως την Sub lamina densa ή Lamina fibroreticularis (δικτυωτό πέταλο), η οποία περιλαμβάνει ινώδεις δομές και συνδέει την Lamina densa με την ανώτερη δερμική περιοχή. Υπάρχουν επίσης βασικά ελάσματα με πολλαπλές στρώσεις των παραπάνω ζωνών, όπως η μεμβράνη Reichert's, η οποία αποτελείται από πολλαπλές στοιβάδες Lamina densa (Miosge N, 2001).

Τυπικά συστατικά όλων των βασικών ελασμάτων αποτελούν τα κολλαγόνα, οι λαμίνες, οι πρωτεογλυκάνες, πρωτεΐνες που προσδέουν ασβέστιο καθώς και αρκετές δομικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες προσκολλησεως (Miosge N, 2001). Αναλυτικότερα η λαμίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη, η

οποία παρατηρείται σε όλα τα βασικά ελάσματα και απαιτείται για την συνάθροιση αρκετών άλλων συστατικών τους. Τα περισσότερα ώριμα βασικά ελάσματα αποτελούνται επίσης από κολλαγόνο τύπου IV, νιδογόνο (entactin) και την πρωτεογλυκάνη περιλεκάνη. Τόσο το κολλαγόνο τύπου IV, όσο και η λαμινίνη πολυμερίζονται και δημιουργούν δύο ανεξάρτητα πρωτεϊνικά δίκτυα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους μέσω των πιο ευέλικτων μορίων νιδογόνου, ενώ η περιλεκάνη αλληλεπιδρά τόσο με τα δίκτυα της λαμινίνης και του κολλαγόνου, όσο και με το νιδογόνο. Το δίκτυο του κολλαγόνου χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό ομοιοπολικών διασυνδέσεων (cross-links) μεταξύ των μορίων του, που προσδίδουν στο βασικό έλασμα υψηλή μηχανική σταθερότητα. Από την άλλη μεριά το δίκτυο της λαμινίνης, που είναι μη ομοιοπολικής φύσης, επιφέρει μία δυναμικότητα και ελαστικότητα στο βασικό έλασμα. Εκτός από αυτές τις 4 πρωτεΐνες, των οποίων οι αλληλεπιδράσεις δημιουργούν το λεπτό επίστρωμα του βασικού ελάσματος, παρατηρείται και μία πλειάδα άλλων μορίων, όπως η Agrin (Αγκρίνη), οι Fibulins 1 και 2 (Φιμπουλίνες 1 και 2) αλλά και η πρωτεΐνη BP-40/SPARC/Osteonectin (Οστεονεκτίνη). Τα ποικίλα πρόσθετα συστατικά των βασικών ελασμάτων σταθεροποιούν, μέσω των αλληλεπιδράσεων τους, τα παραπάνω προτεινόμενα δίκτυα και ποικίλουν από ιστό σε ιστό, ανάλογα με τις λειτουργίες και τις ιδιαιτερότητες που του εξασφαλίζουν.

Τονίζεται ότι μόνο υπερδομικές μέθοδοι (ultrastructural methods), όπως η ανοσοχρίζουσα ιστοχημεία (immunogold histochemistry) μπορούν να καθορίσουν αν ένα εξωκυτταρικό συστατικό είναι συστατικό του βασικού ελάσματος. Η χρήση οπτικού μικροσκοπίου δεν επαρκεί, δεδομένου ότι οποιοδήποτε εξωκυττάριο συστατικό (είτε αποτελεί, είτε δεν αποτελεί συστατικό του βασικού ελάσματος) εμφανίζει το ίδιο γραμμικό πρότυπο χρώσης κάτω από το επιθήλιο. Από την άλλη μεριά ένα μόριο μπορεί να αποτελεί συστατικό του βασικού ελάσματος σε ένα ή περισσότερα όργανα και απλό εξωκυττάριο συστατικό σε κάποια άλλα. Οι λαμινίνες, το κολλαγόνο τύπου IV, το νιδογόνο και η περιλεκάνη έχουν επιβεβαιωθεί με υπερδομικές μεθόδους για τη συμμετοχή τους στα βασικά ελάσματα (Miosge N, 2001).

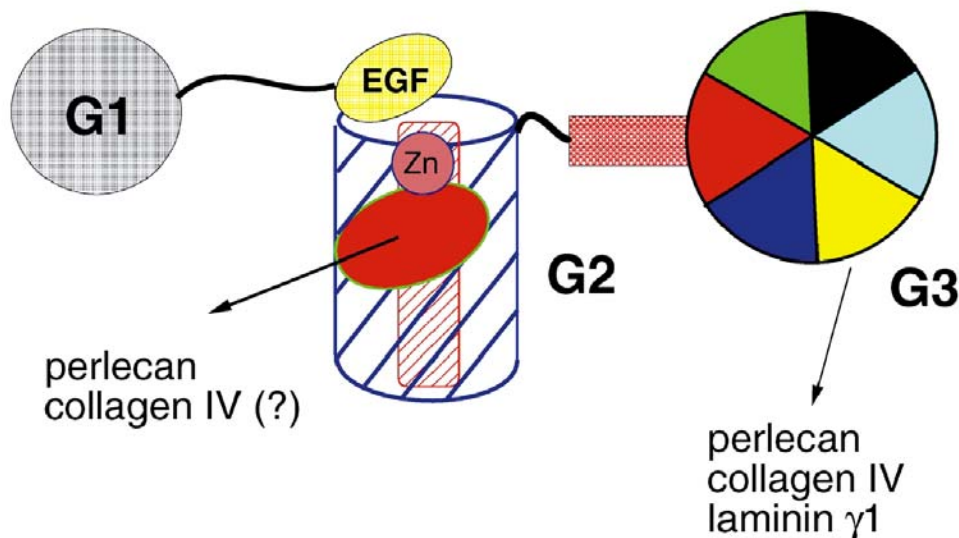
Η πλήρης μοριακή σύσταση των ποικίλων βασικών ελασμάτων, ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η συγκρότηση των συστατικών τους, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο τα συστατικά αυτά επιτελούν τις λειτουργίες τους, δεν είναι ακόμα γνωστά. Αυτό που πιστεύεται για το μηχανισμό συγκρότησης του βασικού ελάσματος είναι ότι γίνεται αυθόρμητα και ότι απαιτεί την παρουσία κυττάρων. Συγκεκριμένα τα κύτταρα που περιβάλλονται από βασικά ελάσματα, μέσω της δράσης των διαμεμβρανικών υποδοχέων τους, όπως οι ιντεγκρίνες και το σύμπλοκο δυστρογλυκάνης-δυστροφίνης, συντελούν στη συνάθροιση των συστατικών του βασικού ελάσματος στην κατάλληλη περιοχή. Από τη στιγμή που συγκεντρωθούν τα απαραίτητα συστατικά του βασικού ελάσματος, πραγματοποιείται αυθόρμητος πολυμερισμός των μορίων κολλαγόνου IV (πιθανότατα παρουσία ιόντων ασβεστίου) και αυθόρμητος σχηματισμός ενός δικτύου μορίων λαμινίνης. Ταυτόχρονα τόσο το νιδογόνο όσο και η περιλεκάνη συνδέονται αυθόρμητα και με τα δύο δίκτυα, γεφυρώνοντας τα. Επομένως τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα υποδοχέων της ιντεγκρίνης και της δυστρογλυκάνης συνδέουν το ενδοκυτταρικό και το εξωκυτταρικό περιβάλλον, μεταφέροντας σιγάλα από και προς τον κυτταροσκελετό. Ο τρόπος με τον οποίο ρυθμίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του βασικού ελάσματος δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί, αλλά υπάρχουν ενδείξεις, από την ανάλυση της δομής συγκεκριμένων περιοχών ορισμένων συστατικών του βασικού ελάσματος, για την εμπλοκή ιόντων μετάλλων π.χ  $Ca^{2+}$   $Mg^{2+}$  (Liddington Robert C, 2001).

Όσον αφορά την προέλευση των συστατικών του βασικού ελάσματος είναι σημαντικό να τονιστεί ότι προέρχονται κυρίως από τα κύτταρα τα οποία επικάθονται σ' αυτό, αλλά και από το υποκείμενο μεσέγχυμα και συγκεκριμένα από τους ινοβλάστες του συνδετικού ιστού. Δηλαδή υπάρχουν συστατικά του βασικού ελάσματος που είναι αποκλειστικά προϊόντα του συνδετικού ιστού, συστατικά που προέρχονται από τα επιθηλιακά, ενδοθηλιακά, μυϊκά ή νευρικά κύτταρα, αλλά και συστατικά του βασικού ελάσματος που έχουν κοινή προέλευση.

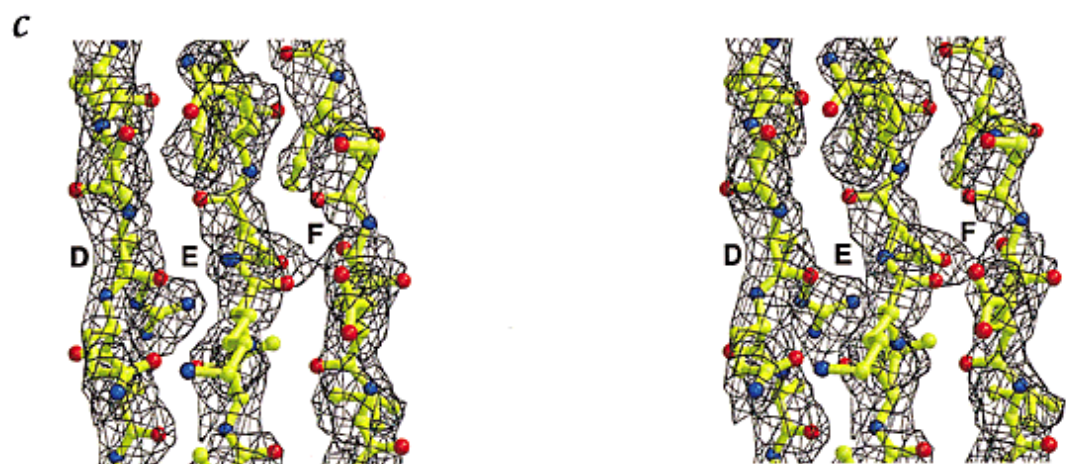
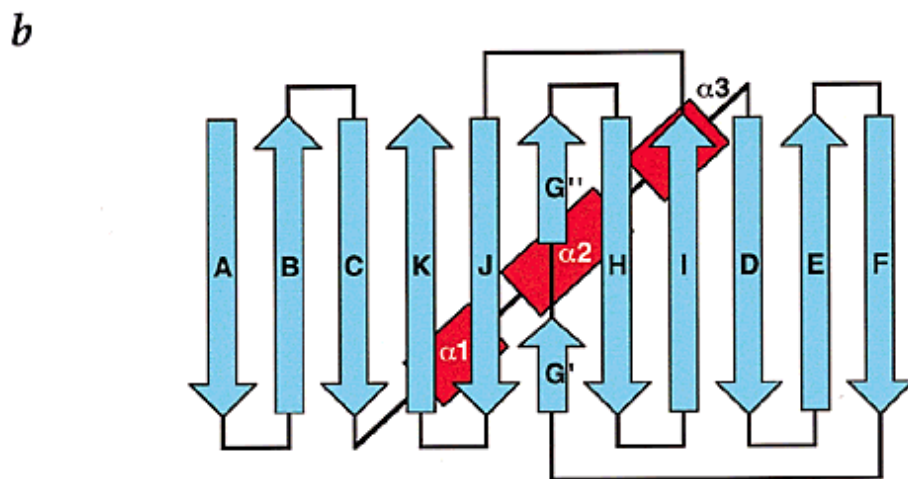
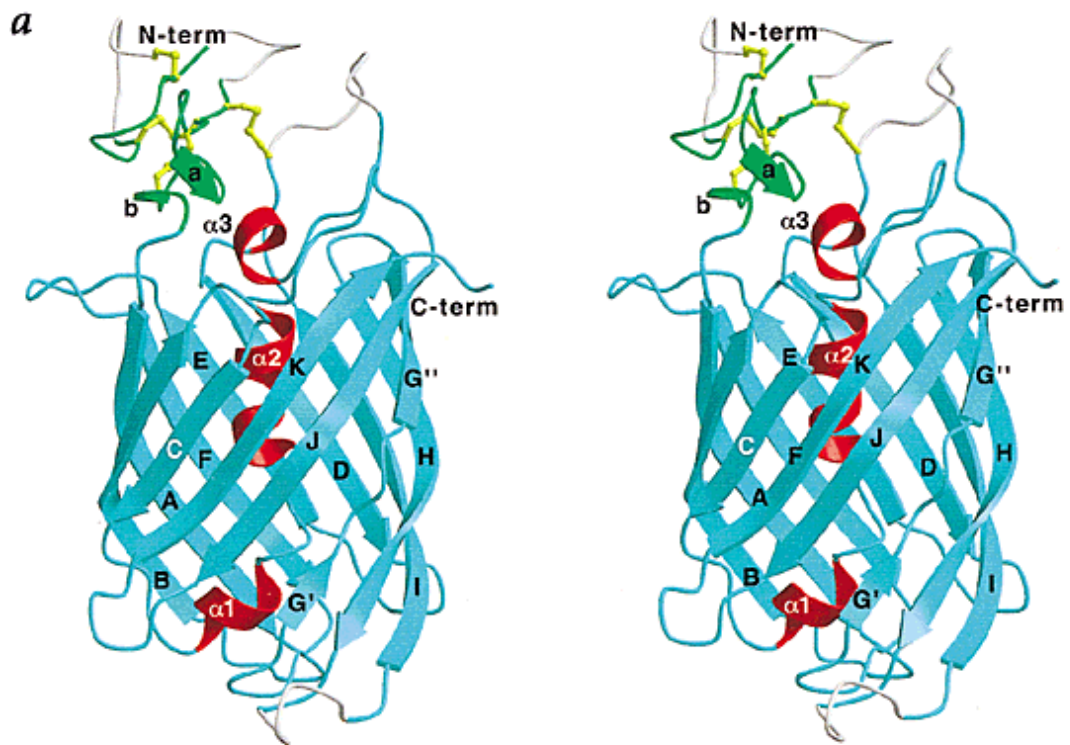
Αξίζει να σημειωθεί ότι τα συστατικά του βασικού ελάσματος είναι τα αρχαιότερα και τα περισσότερο συντηρημένα συστατικά εξωκυττάριας ουσίας. Στα πιο απλά μετάζωα όπως η ύδρα, το βασικό έλασμα διαχωρίζει το ενδόδερμα από το εξώδερμα. Σε πιο πολύπλοκους οργανισμούς, το βασικό έλασμα προσφέρει περισσότερο πολύπλοκες λειτουργίες. Η αλληλουχία του γονιδιώματος του Κενοραβδίτη (*C.Elegans*) συνέβαλλε στην ανίχνευση σ' αυτόν τον οργανισμό πολλών γνωστών συστατικών του βασικού ελάσματος, όπως λαμινίνες, κολλαγόνα IV, φιμπουλίνες, νιδογόνο, περιλεκάνη, ιντεγκρίνες, πρωτεΐνες του συμπλόκου δυστρογλυκάνη-δυστροφίνη, αγκρίνη, οστεονεκτίνη, κάποιες κατηγορίες μεταλλοπρωτεασών, αλλά και καινούργιων μορίων, όπως η ημισεντίνη (hemicentin). Από την άλλη μεριά ορισμένες γνωστές εξωκυττάριας πρωτεΐνες, όπως η φιμπρονεκτίνη (fibronectin), η ελαστίνη (elastin) και το ινώδες κολλαγόνο απουσιάζουν από τον Κενοραβδίτη, ενώ εντοπίζονται σε άλλα ασπόνδυλα. Σημειώνεται ότι κάποια συστατικά του βασικού ελάσματος στον Κενοραβδίτη, όπως το κολλαγόνο IV, συντίθενται αρκετά μακριά από τις περιοχές εντοπισμού του (Graham Patricia L *et al.*, 1997; Hutter H *et al.*, 2000).

Γενικότερα πιστεύεται ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες του βασικού ελάσματος στα μετάρζωα δεν έχουν μόνο συντηρημένη νουκλεοτιδική αλληλουχία, αλλά παρουσιάζουν συντήρηση και στη λειτουργία τους. Δομικές μελέτες υποστηρίζουν ότι τόσο η φύση, όσο και ο εντοπισμός των επιφανειών των μορίων του βασικού ελάσματος που πραγματοποιούν τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, είναι συντηρημένες στα μετάρζωα και η ακριβής δομή τους είναι απaráλλακτη. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε η δομή της περιοχής G2 του νιδογόνου που δεσμεύει την περλεκάνη και πιθανότατα και το κολλαγόνο IV και διαπιστώθηκε ότι αυτή η περιοχή είναι συντηρημένη ακόμα και στα αρχικά μετάρζωα (Hopf Michael *et al.*, 2001)

Συγκεκριμένα το μόριο του νιδογόνου περιέχει τρεις σφαιρικές περιοχές: την G1, την G2 και την G3. Η G1 είναι άγνωστης δομής και λειτουργίας, ενώ η G3 σχηματίζει ένα προωστήρα έξι πτερυγίων β-πτυχωτής επιφάνειας (six-bladed β-propeller). Τα G1 και G2 ενώνονται μέσω ενός εύκαμπτου συνδέσμου, ενώ τα G2 και G3 συνδέονται με τη μεσολάβηση μιας άκαμπτης ράβδου, η οποία περιλαμβάνει μοτίβα που προσομοιάζουν με τα μοτίβα που εντοπίζονται στον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (Epidermal Growth Factor (EGF)-like motifs) (εικ. 1). Οι συγκεκριμένοι ερευνητές ανέλυσαν τη δομή της G2 περιοχής του νιδογόνου, η οποία περιλαμβάνει ένα ασυνήθιστο β-βαρέλι 11 πτυχωτών δομών με μία κεντρική α-έλικα, πάνω στο οποίο επικάθεται μια περιοχή ανάλογη του EGF. Μία μεγάλη επιφάνεια στο β-βαρέλι παρουσιάζει εκπληκτική συντήρηση σ' όλα τα μεταζωικά νιδογόνα. Με πειράματα ειδικής μεταλλαξογένεσης αποδείχθηκε ότι τα συντηρημένα αμινοξέα σ' αυτήν την επιφάνεια είναι απαραίτητα για τη σύνδεση με την περλεκάνη και ίσως με το κολλαγόνο IV, γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία αυτών των αλληλεπιδράσεων στη συγκρότηση του βασικού ελάσματος (εικ. 2).



Εικ. 1: Σχηματικό διάγραμμα του μορίου νιδογόνου



## Εικ. 2: Η δομή G2 του νιδογόνου

**a**, Στερεοδομή της G2, όπου με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η περιοχή που προσομοιάζει στον EGF και με μπλε η περιοχή του β-βαρελίου. Οι β-πτυχωτές δομές συμβολίζονται με a-b, στην περιοχή που περιέχει τα μοτίβα που προσομοιάζουν στα μοτίβα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και A-K στο β-βαρέλι. Οι α-έλικες 1-3 σημειώνονται με κόκκινο χρώμα και οι δισουλφιδικοί δεσμοί με κίτρινο. **b**, Τοπολογικό διάγραμμα του β-βαρελίου, το οποίο κυκλοποιείται με την παράλληλη αλληλεπίδραση των δομών A και F. **c**, Ηλεκτρονιακός χάρτης πυκνότητας στα 2.8 Å των D, E και F β-πτυχωτών δομών.

## I.III.1 Το βασικό έλασμα της επιδερμίδας και των υπόλοιπων στρωματοποιημένων επιθηλίων

Το βασικό έλασμα της ανθρώπινης επιδερμίδας ενήλικου (human cutaneous basement membrane ή dermal epidermal junction-DEJ), η οποία τοποθετείται ανάμεσα στο επιδερμικό επιθηλιακό στρώμα και την δερμίδα του δέρματος, αντιστοιχεί ιστολογικά σε μία ζώνη μεγέθους 0.5-1μm (στο ενήλικο ποντίκι έχει πάχος 200 nm). Η ζώνη αυτή είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του δέρματος, δεδομένου ότι διαχωρίζει τα δύο διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα της δερμίδας και της επιδερμίδας, αλλά ταυτόχρονα διατηρεί τη σύνδεση και την αλληλεπίδραση τους. Αυτή η ικανότητα του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας οφείλεται από τη μια μεριά, στην επιβολή περιορισμών στη μεταβίβαση μορίων μεταξύ δερμίδας και επιδερμίδας ανάλογα με το μέγεθος και το φορτίο τους και από την άλλη στην παθητική διέλευση κυττάρων, π.χ μελανοκυττάρων ή κυττάρων Langerhans κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ή λεμφοκυττάρων και καρκινικών κυττάρων στην περίπτωση παθολογικών καταστάσεων. Ταυτόχρονα το βασικό έλασμα της επιδερμίδας στηρίζει την επιδερμίδα και επηρεάζει τη συμπεριφορά των κερατινοκυττάρων, ρυθμίζοντας την πολικότητα τους, τον πολλαπλασιασμό, την μετακίνηση και την διαφοροποίηση τους. Εξαιρετικής σημασίας είναι επίσης η συμβολή του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας στην μορφογένεση, στην ανάπτυξη και αναδιάρθρωση του δέρματος, αλλά και στην επούλωση των πληγών της επιδερμίδας.

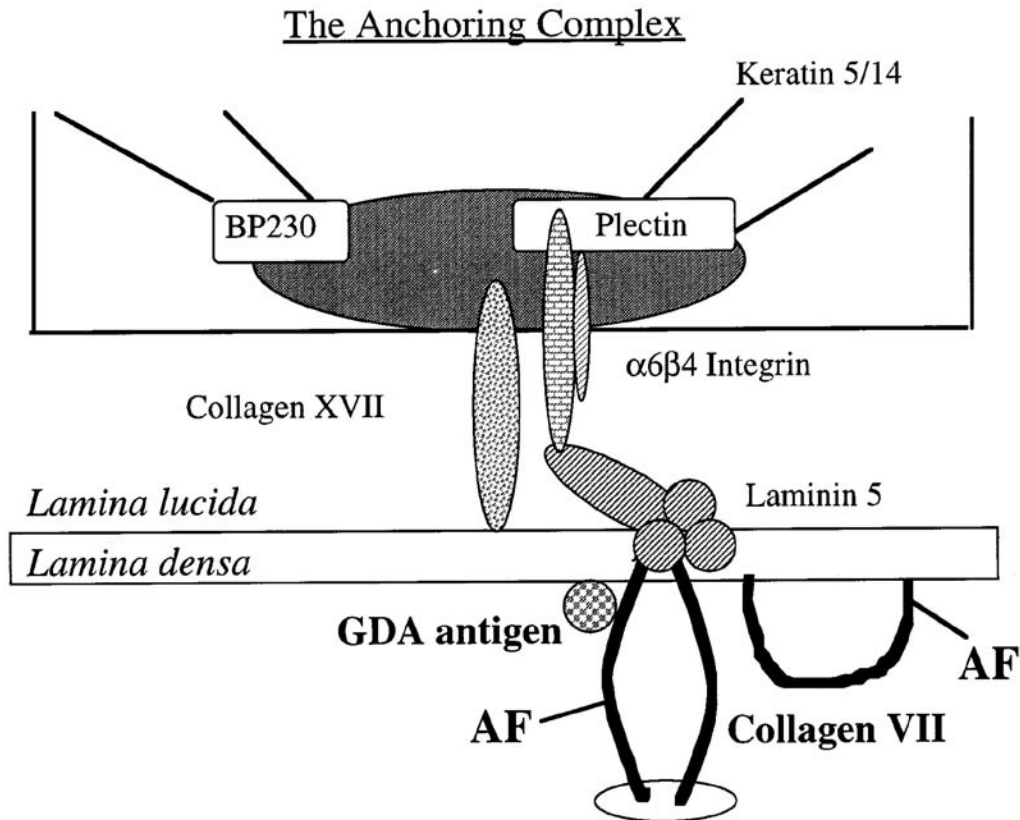
Υπερδομικές μελέτες (ultrastructural studies) αποκάλυψαν στο βασικό έλασμα της επιδερμίδας και στα στρωματοποιημένα επιθήλια γενικότερα, εκτός από τα κοινά συστατικά που συναντώνται σε όλα τα βασικά ελάσματα, την παρουσία πολλαπλών ξεχωριστών δομών. Τα καινούργια αυτά δομικά συστατικά συμβάλλουν στη δημιουργία ενός εξαιρετικά πολύπλοκου δικτύου από αλληλοσυνδεδεμένες πρωτεΐνες, το οποίο προσφέρει ανθεκτικότητα στα ποικίλα ερεθίσματα που δέχονται τα στρωματοποιημένα επιθήλια. Ειδικότερα η ισχυρή ζώνη του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας συντελεί στη διατήρηση της σύνδεσης μεταξύ δερμίδας και επιδερμίδας, κάτω από την επίδραση των μεγάλων μηχανικών πιέσεων στις οποίες υπόκειται το δέρμα από το εξωτερικό περιβάλλον. Η δημιουργία αυτών των πρόσθετων χαρακτηριστικών δομών είναι αποτέλεσμα: **α**) ειδικής συνάθροισης μακρομορίων στους κατάλληλους υποδοχείς, **β**) δημιουργίας ολιγομερών, **γ**) πολυμερισμού των ολιγομερών αυτών σε διάφορα επίπεδα (π.χ ινίδια, ίνες) και **δ**) συνάθροισης των πολυμερών αυτών σε υπερδομές (π.χ σύμπλοκο αγκυροβόλησης, anchoring complex) (εικ. 3). Κατά συνέπεια η σύνδεση των κερατινοκυττάρων αλλά και γενικότερα των πολύστοιβων επιθηλίων με το βασικό έλασμα, εκτός από τον κλασικό τρόπο μέσω των ιντεγκρινών α3β1 (που ισχύει στα περισσότερα επιθήλια), ισχυροποιείται και από την παρουσία συμπληρωματικών δομών, όπως το σύμπλοκο αγκυροβόλησης.

Υπερδομικά το σύμπλοκο αγκυροβόλησης αποτελείται από τους σχηματισμούς των ημιδεσμοσωμάτων, των νηματίων αγκυροβόλησης (anchoring filaments) και των ινών αγκυροβόλησης (anchoring fibrils). Τα συστατικά που συνθέτουν τους σχηματισμούς αυτούς αναφέρονται παρακάτω με αφορμή την ανάλυση του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, το οποίο διακρίνεται (με ηλεκτρονική μικροσκοπία) σε τέσσερα διαφορετικά διαμερίσματα (Burgeson RE and Christiano AM, 1997) (εικ. 3):

**A)** Το πρώτο διαμέρισμα περιλαμβάνει τις κοιλιακές πλασματικές μεμβράνες των βασικών κερατινοκυττάρων, στις οποίες εντοπίζονται τα ημιδεσμοσώματα.

**B)** Το δεύτερο τμήμα αντιπροσωπεύεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαν ηλεκτρονιακά διαυγής περιοχή, γνωστή ως Lamina Lucida (φωτεινός υμένας), η οποία περιλαμβάνει τις λεπτές δέσμες των νηματίων αγκυροβόλησης (anchoring filaments) που αποτελούνται κυρίως από λαμινίνη-5.

Γ) Ακολουθεί το τρίτο διαμέρισμα, η Lamina densa (σκοτεινός υμένος), που εντοπίζεται σαν ηλεκτρονιακά πυκνή περιοχή και την οποία διαπερνούν τόσο τα παραπάνω νημάτια αγκυροβόλησης, όσο και διάφορα άλλα συστατικά, όπως το κολλαγόνο IV, το νιδογόνο και η περλεκάνη. Από τη Lamina densa ξεκινούν και μερικές φορές και καταλήγουν και τα ινίδια αγκυροβόλησης.



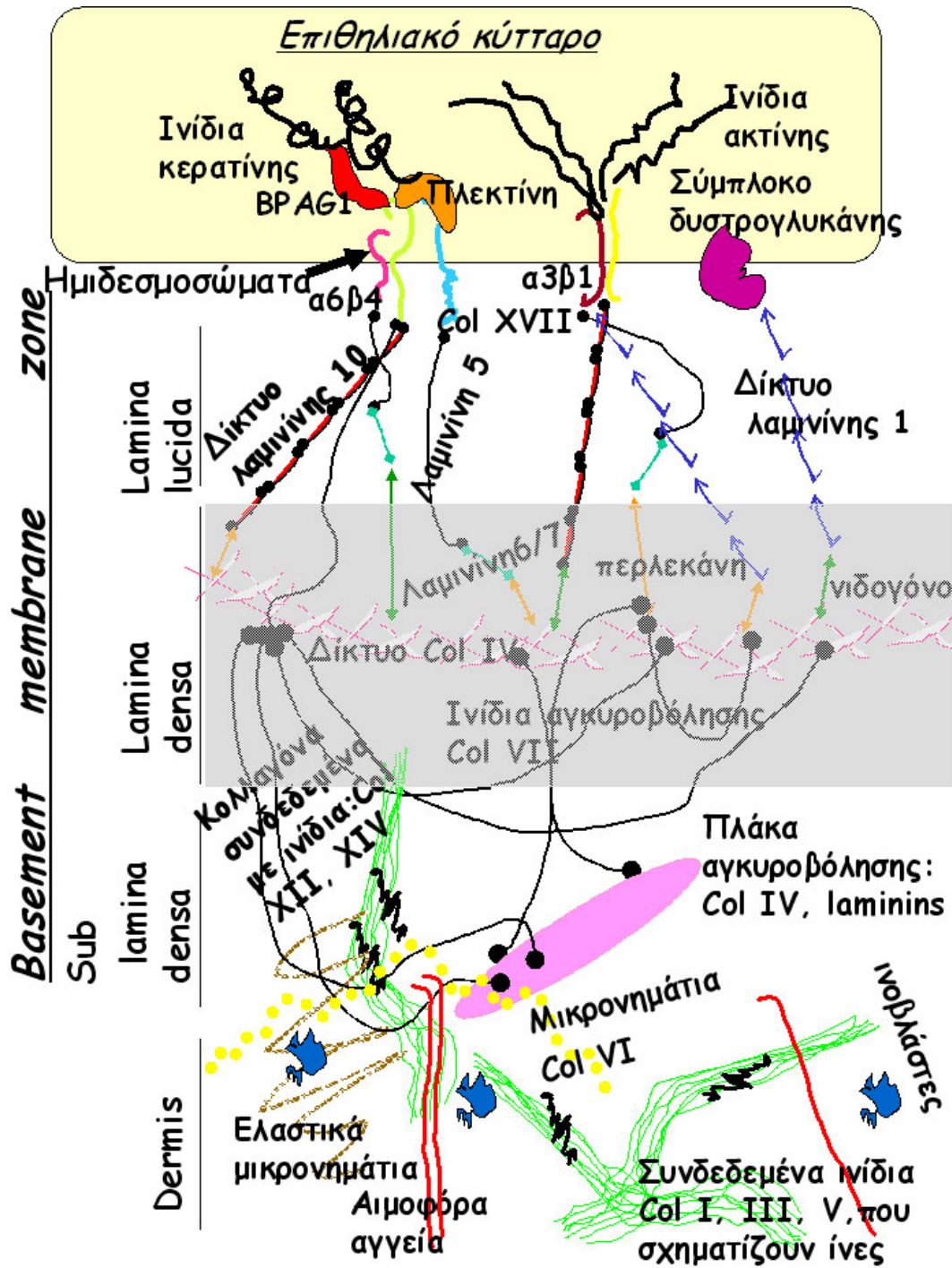
**Εικ. 3:** Σχηματική αναπαράσταση του συμπλόκου αγκυροβόλησης

Τα ημιδεσμοσώματα στην κοιλιακή πλευρά των βασικών κερατινοκυττάρων, συνδέονται με τα νημάτια αγκυροβόλησης (anchoring filaments), τα οποία διατρέχουν τη Lamina lucida. Τα νημάτια αγκυροβόλησης ενώνονται με τα ινίδια αγκυροβόλησης (anchoring fibrils, AF), που ξεκινούν στην Lamina densa και είτε καταλήγουν στις πλάκες αγκυροβόλησης (anchoring plaques), είτε ξανααγορίζουν στην Lamina densa.

Δ) Κάτω από την Lamina densa εντοπίζεται η Sub Lamina densa, η οποία αποτελείται από τις ινώδεις δομές αγκυροβόλησης (anchoring fibrils), που αποτελούνται κυρίως από κολλαγόνο VII. Οι δομές αυτές συνδέουν την Lamina densa με σχηματισμούς της δερμίδας που λειτουργούν σαν σταθμοί αγκυροβόλησης (plaque-like structures).

Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί γύρω στα 20 βιοχημικά συστατικά στο βασικό έλασμα της επιδερμίδας, συμπεριλαμβανομένων των κοινών συστατικών που χαρακτηρίζουν γενικά όλα τα βασικά ελάσματα. Αναλυτικότερα ορισμένα από τα συστατικά του βασικού ελάσματος της ανθρώπινης επιδερμίδας, αναπαρίστανται στην εικ. 4.





Εικ. 4: Το βασικό έλασμα της επιδερμίδας

Σημειώνονται οι τέσσερις ζώνες του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας: τα ημιδεσμοσώματα, η Lamina Lucida, η Lamina densa και η Sub Lamina densa, καθώς και αρκετά από τα επιμέρους συστατικά τους. Επίσης απεικονίζονται οι υποδοχείς των βασικών κερατινοκυττάρων καθώς και τα ινίδια ακτίνης και κερατίνης του κυτταροσκελετού τους.

Όπως φαίνεται στην εικ. 4, στη Lamina Lucida εντοπίζονται οι λαμινίνες 5, 6, 10 και 1. Η λαμινίνη 5 προσδένεται στις ιντεγκρίνες αβ4 (οι οποίες αποτελούν και τον πρωταρχικό τους δεσμευτή), στο

κολλαγόνο XVII, καθώς και στην ιντεγκρίνη  $\alpha\beta 1$  και εκτείνεται από την βασική πλασματική μεμβράνη των κερατινοκυττάρων μέχρι και την Lamina densa. Εντός της Lamina Lucida και της Lamina densa η λαμινίνη 5 σχηματίζει διμερή με την λαμινίνη 6. Τα δύο αυτά στρώματα του βασικού ελάσματος της ανθρώπινης επιδερμίδας διασχίζουν και οι λαμινίνες 1 και 10, οι οποίες πολυμερίζονται δημιουργώντας ανεξάρτητα δίκτυα, που δεσμεύονται από τις ιντεγκρίνες  $\alpha\beta 4$  και  $\alpha\beta 1$ , η λαμινίνη 10 και από την δυστρογλυκάνη και ιντεγκρίνη  $\alpha\beta 1$ , η λαμινίνη 1. Εντός της Lamina densa εντοπίζεται και το δίκτυο του κολλαγόνου IV καθώς και τα μόρια του νιδογόνου και της περλεκάνης τα οποία συνδέουν τα δίκτυα της λαμινίνης 1 και 10 αλλά και τα διμερή λαμινίνης 5-6 με το δίκτυο του κολλαγόνου IV. Τα μόρια νιδογόνου συνδέονται και με τον υποδοχέα  $\alpha\beta 1$  των κερατινοκυττάρων. Τόσο το δίκτυο του κολλαγόνου IV, όσο και η λαμινίνη 5, αλλά και το διμερές λαμινίνης 5-6 (λιγότερο ισχυρά) συνδέονται και με τα ινίδια αγκυροβόλησης, των οποίων το κυριότερο συστατικό είναι το κολλαγόνο VII. Τα ινίδια αυτά (μήκους 800nm) ξεκινάνε από την Lamina densa και τερματίζουν είτε στην δερμίδα, στις υποθετικές πλάκες αγκυροβόλησης (anchoring plaques), είτε ξανααγρυρίζουν στην Lamina densa, έχοντας διασχίσει μέρος της Sub Lamina densa. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι πλάκες αγκυροβόλησης είναι θεωρητικές και δεν έχει αποδειχθεί η ύπαρξη τους, αλλά ενδέχεται να περιέχουν λαμινίνες και κολλαγόνο IV (Bruckner-Tuderman Leena, 1999; Bruckner-Tuderman Leena *et al.*, 1999; Pulkkinen Leena and Uitto Jou 1999; Keene DR *et al.*, 1997). Εκτός από το κολλαγόνο VII που είναι το σημαντικότερο συστατικό της Sub Lamina densa, στη ζώνη αυτή εντοπίζονται και άλλα ινώδη συστατικά που χαρακτηρίζουν την εξωκυττάρια ουσία του συνδετικού ιστού, όπως ελαστικά μικρονημάτια (Φιμπριλλίνες-fibrillins), μικρονημάτια κολλαγόνου VI (συνδεδεμένα σαν χάντρες κομπολογιού), ίνες κολλαγόνου I, III, V (οι οποίες σχηματίζονται από τη σύνδεση των αντίστοιχων ινιδίων), καθώς και κολλαγόνα που συνδέονται με αυτά τα ινίδια, όπως το κολλαγόνο XII και XIV. Επειδή τα περισσότερα από τα παραπάνω συστατικά και ιδιαίτερα τα κολλαγόνα I, III, V, που διαπλέκονται μεταξύ των ινιδίων του κολλαγόνου VII, είναι συστατικά της υποκείμενης δερμίδας, η παρουσία τους συμβάλλει στη σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο χαμηλότερο στρώμα του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας και στην δερμίδα.

Το βασικό έλασμα της επιδερμίδας διατρέχεται και από το μόριο της Φιμπρονεκτίνης (Fibronectin). Η γλυκοπρωτεΐνη αυτή χαρακτηρίζεται από την παρουσία χαρακτηριστικών μοτίβων (μοτίβα τύπου III Φιμπρονεκτίνης) και εντοπίζεται σαν διμερές που σχηματίζεται μέσω δισουλφιδικών δεσμών. Το μόριο αυτό περιέχει θέσεις σύνδεσης τόσο για υποδοχείς στην επιφάνεια του βασικού στρώματος των κερατινοκυττάρων, όπως η ιντεγκρίνη  $\alpha 5\beta 1$ , αλλά και για διάφορα άλλα συστατικά του βασικού ελάσματος, όπως για κολλαγόνα και πρωτεογλυκάνες. Τα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας εκφράζουν επίσης και την ιντεγκρίνη  $\alpha 2\beta 1$  που προσδένει κολλαγόνα, την ιντεγκρίνη  $\alpha \nu\beta 5$  που προσδένει τη Βιμπρονεκτίνη (Vibronectin), και την ιντεγκρίνη  $\alpha 9\beta 1$  που δεσμεύει την τεναςίνη-C (εξαμερής γλυκοπρωτεΐνη μεγάλου μεγέθους), συμβάλλοντας στη σταθεροποίηση του δικτύου του βασικού ελάσματος (Burgeson RE and Christiano AM, 1997; Chan LS, 1997).

Τα συστατικά που αναφέρθηκαν, με τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, την πρόσδεση ορισμένων σε υποδοχείς των κερατινοκυττάρων και την σύνδεση κάποιων άλλων με μόρια της δερμίδας, συμβάλλουν στην οργάνωση και τη σταθεροποίηση του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας και επομένως στην διατήρηση της συνοχής του δέρματος.

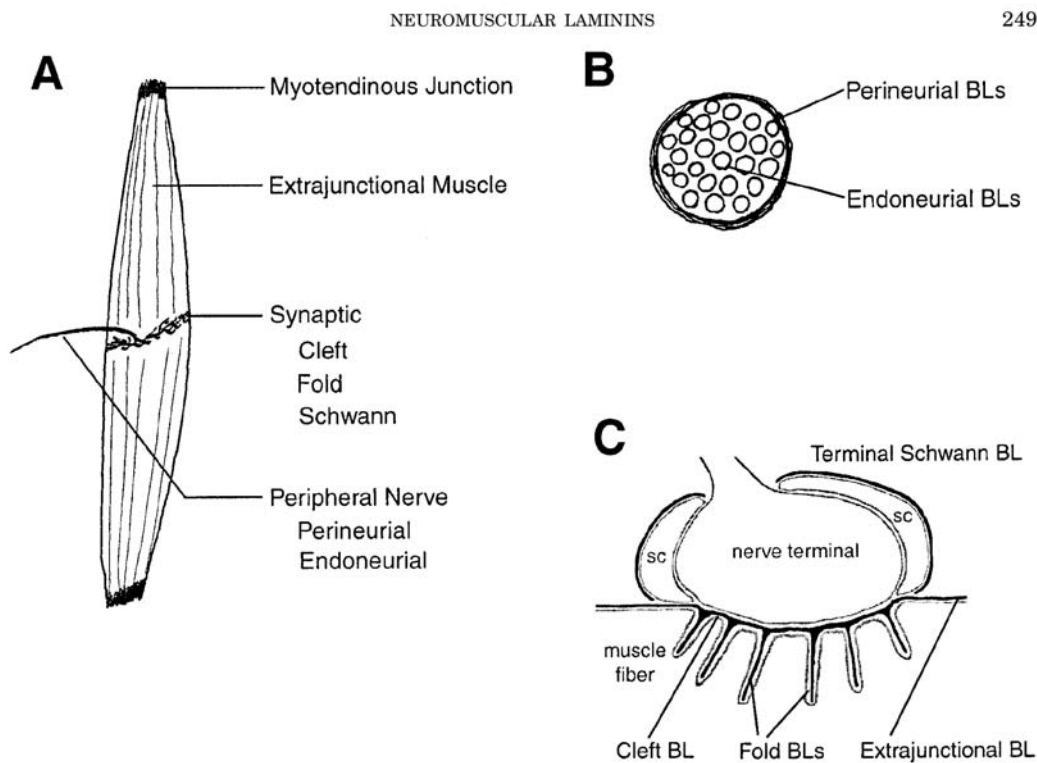
Σημειώνεται ότι τόσο τα εκτοδερμικής προέλευσης κερατινοκύτταρα, όσο και οι μεσοδερμικά προερχόμενοι ινοβλάστες, συνεισφέρουν στην παραγωγή των συστατικών του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας. Συγκεκριμένα τα κολλαγόνα τύπου IV, V και VII, οι λαμινίνες 5 και 6, οι πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης όπως η περλεκάνη, καθώς και οι πρωτεΐνες που σχηματίζουν τα ημιδεσμοσώματα, αποτελούν προϊόντα παραγωγής των βασικών κερατινοκυττάρων. Από την άλλη μεριά οι ινοβλάστες της θηλώδους δερμίδας συνεισφέρουν στην παραγωγή των κολλαγόνων I, III, IV, VI, VIII, νιδογόνου, φιμπρονεκτίνης και διαφόρων κατηγοριών λαμινίνης. Τονίζεται ότι πολλά από τα παραπάνω μόρια εκτός από δομικά συστατικά του βασικού ελάσματος, λειτουργούν και σαν σηματοδοτικά σιγνάλα.

## **I.III.2 Τα βασικά ελάσματα του νευρομυϊκού συστήματος στα θηλαστικά**

Στην περίπτωση του νευρομυϊκού συστήματος των θηλαστικών, εντοπίζονται τουλάχιστον επτά διαφορετικά βασικά ελάσματα. Κάθε μία από τις εκατοντάδες-χιλιάδες μυϊκές ίνες που αποτελούν τους μυς περιβάλλεται από βασικό έλασμα. Η μυϊκή ίνα εκτείνεται σε όλο το μήκος του μυός και συνδέεται στα άκρα της με συνδετικό ιστό σχηματίζοντας τη μυοτενοντώδη σύνδεση (myotendinous junction,

MTJ). Επίσης νευρώνεται από ένα μοναδικό κινητικό νεύρο σε ένα μικρό σημείο στο μέσο της, δημιουργώντας τη νευρομυϊκή σύναψη (neuromuscular junction, NMJ). Η υπόλοιπη περιοχή της μυϊκής ίνας ονομάζεται εξωσυναπτική (extrajunctional). Και οι τρεις παραπάνω περιοχές της μυϊκής ίνας (MTJ, NMJ και extrajunctional) περιβάλλονται από βασικό έλασμα. Όσον αφορά τα περιφερικά νεύρα, οι άξονες τους περιβάλλονται από κύτταρα Schwann και όλα μαζί από το περινεύριο (perineurium) (το περινεύριο παρουσιάζει πολλαπλές στρώσεις). Κάθε μονάδα άξονα/κυττάρου Schwann περιβάλλεται από το ενδονευρικό βασικό έλασμα (endoneurial BL), ενώ το περινεύριο καλύπτεται, από την αρχή μέχρι το τέλος του, από το περινευρικό βασικό έλασμα (perineurium BL).

Κατά συνέπεια στο νευρομυϊκό σύστημα απαντώνται, στη περιοχή του μυός, τα βασικά ελάσματα της μυοτενοντώδους σύνδεσης (myotendinous junction), του συναπτικού χάσματος (synaptic cleft), της συναπτικής πτύχωσης (synaptic fold) και του εξωσυναπτικού μυός (extrajunctional muscle) και στο νεύρο τα τρία βασικά ελάσματα των τελικών κυττάρων Schwann, το ενδονευρικό και το περινευρικό (Patton Bruce L, 2000) (εικ. 5).

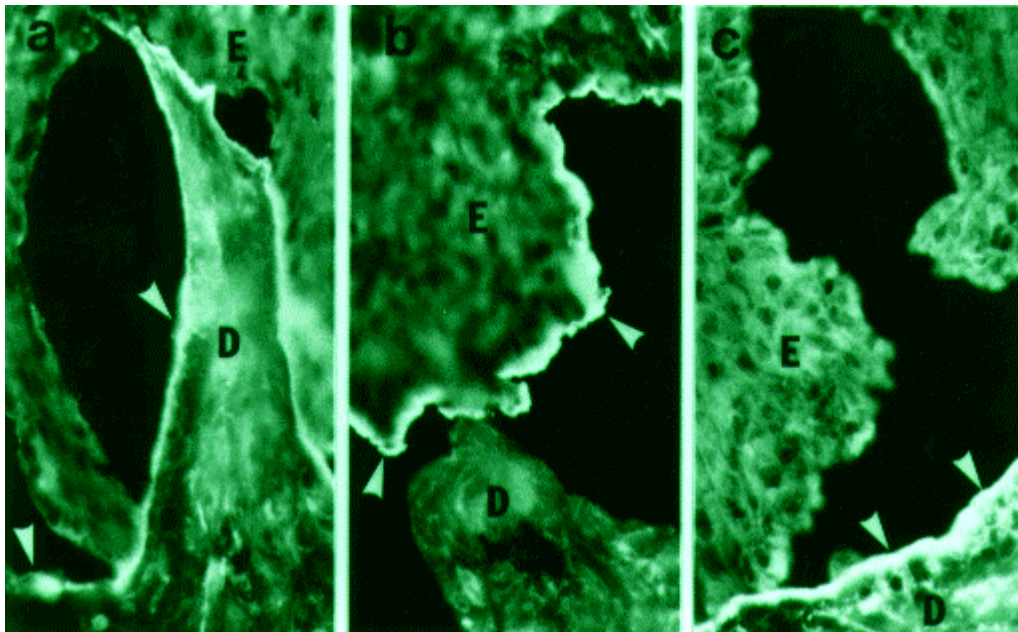


**Εικ. 5:** Βασικά ελάσματα του νευρομυϊκού συστήματος

**A**, Το νευρομυϊκό σύστημα περιέχει τουλάχιστον επτά βασικά ελάσματα, συμπεριλαμβανομένων της μυοτενοντώδους σύνδεσης, του συναπτικού χάσματος, της συναπτικής πτύχωσης, και του εξωσυναπτικού μυός, στη περιοχή του μυός και των τελικών κυττάρων Schwann, τα ενδονευρικά και τα περινευρικά, στο νεύρο. **B**, Ενδονευρικά βασικά ελάσματα και περινευρικά βασικά ελάσματα. **C**, Τέσσερα βασικά ελάσματα τοποθετούνται γειτονικά στη νευρομυϊκή σύναψη.

## I.IV Δερματικές ασθένειες του ανθρώπου

Διαταραχές σε συστατικά των βασικών ελασμάτων της επιδερμίδας, που οφείλονται είτε σε μεταλλαγές των γονιδίων που τα κωδικοποιούν, είτε στην δημιουργία αυτοαντισωμάτων, οδηγούν σε μια σειρά δερματικών ασθενειών στον άνθρωπο, όπως το σύνδρομο Alport και η Πομφολυγώδης Επιδερμόλυση (Epidermolysis Bullosa-**EB**). Παραδείγματα συστατικών του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας που προσβάλλονται από αυτοαντισώματα αποτελούν το κολλαγόνο VII (προκαλώντας την επίκτητη Πομφολυγώδη Επιδερμόλυση-Epidermolysis bullosa acquisita), το κολλαγόνο XVII, το BPAG1 (αυτοαντισώματα για το κολλαγόνο XVII και για το BPAG1 είναι υπεύθυνα για την ασθένεια του πομφόλυγα-Bullous pemphigoid), η λαμινίνη 5 και 6 (αυτοαντισώματα των οποίων οδηγούν στην ασθένεια του ουλώδους πομφόλυγα-anti-laminin cicatricial pemphigoid) (Chan LS,1997) (εικ. 1).



**Εικ. 1:** Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού σε χημικά διαχωρισμένες τομές δέρματος από ασθενείς με anti-laminin cicatricial pemphigoid (αριστερά), με Bullous pemphigoid (μέσο) και με Epidermolysis bullosa acquisita (δεξιά), στις οποίες σημαίνονται οι αντιγονικές θέσεις (βέλη) στη δερμίδα, στην επιδερμική οροφή και στη δερμίδα αντίστοιχα.  
E;επιδερμίδα, D; Δερμίδα

Από την άλλη μεριά σε ποικίλες κληρονομήσιμες ασθένειες του δέρματος έχουν ανιχνευθεί τροποποιήσεις, τουλάχιστον στα 5 χαρακτηριστικά δομικά συστατικά των βασικών ελασμάτων της επιδερμίδας, δηλαδή στα κολλαγόνα IV, VII, XVII, στην λαμινίνη-5 και στις ιντεγκρίνες αββ4. Τα περισσότερα από τα μόρια αυτά απαντούν ως διμερή ή τριμερή, ενώ περίπου 13 γονίδια κωδικοποιούν για τις πολυπεπτιδικές τους αλυσίδες. Μέχρι σήμερα μεταλλαγές σε 11 από τα παραπάνω γονίδια έχουν συσχετιστεί με ασθένειες που χαρακτηρίζονται από διαταραχές του βασικού ελάσματος. Στις ασθένειες αυτές πραγματοποιείται, μετά τη γέννηση, δημιουργία υποεπιδερμικών φουσκαλών και αποκόλληση της επιδερμίδας από την δερμίδα (subepidermal blisters) (Bruckner-Tuderman L and Bruckner P., 1998; Arin Meral J. and Roop Dennis R, 2001).

Το πρωτότυπο των δερματικών ασθενειών, που οφείλονται σε διαταραχές συστατικών του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας αποτελεί η **EB**. Με τον όρο αυτό περιγράφεται μία ετερογενής κατηγορία κληρονομήσιμων ασθενειών (αυτοσωμικές υπολειπόμενες ή επικρατείς), οι οποίες χαρακτηρίζονται από αφύσικη ευθραυστότητα του δέρματος των ασθενών. Σ' αυτές τις ασθένειες η αυξημένη ευπάθεια των επιδερμικών επιθηλίων σε μηχανικούς τραυματισμούς ή τριβές, οδηγεί στη δημιουργία φουσκαλών (blisters or bullae), κυστών και γενικά στην αποσάθρωση του δέρματος. Ανωμαλίες μπορεί να παρατηρηθούν επίσης σε φολιδωτά και παροδικά επιθήλια, ενώ είναι δυνατόν να προκύψουν και διάφορα

άλλα εξωδερματικά συμπτώματα, όπως αλωπεκία, δυστροφία των ονύχων και ανωμαλίες στο σμάλτο των δοντιών (pitted enamel). Φουσκάλες εμφανίζονται συχνά και σε βλεννώδεις επιθηλιακές μεμβράνες, δημιουργώντας προβλήματα σε εσωτερικά όργανα. Τονίζεται ότι η κλινική εκδήλωση της ασθένειας κυμαίνεται από ένα απλό επιδερμικό φαινόμενο, μέχρι την εκτεταμένη παρουσία φουσκαλών και την παρουσία σπλαγχνικών προβλημάτων που οδηγούν σε θάνατο. Αυτή η κλινική ποικιλομορφία της ασθένειας πιστεύεται ότι οφείλεται σε γενετική ετερογένεια.

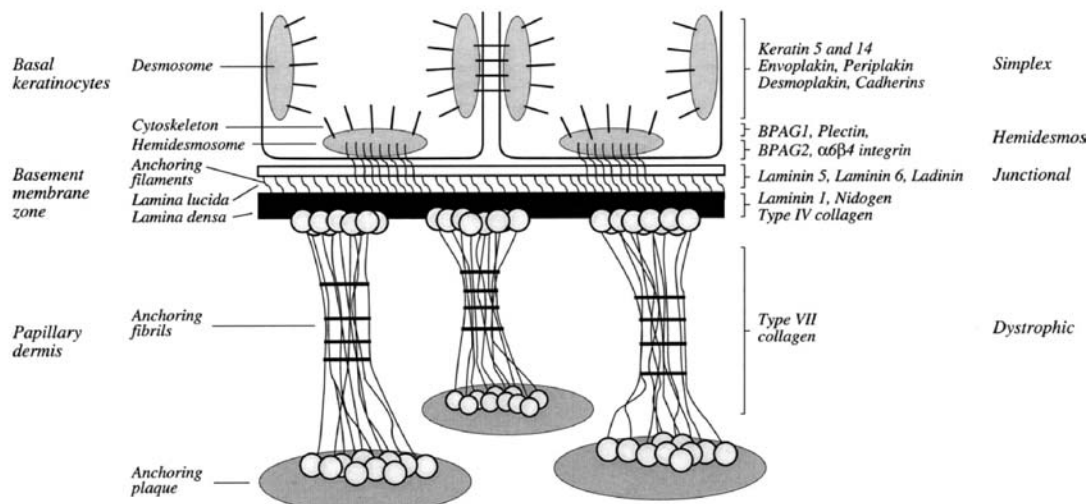
Αρχικά η **EB** κατηγοριοποιήθηκε, χρησιμοποιώντας κλινικά κριτήρια, στην επιδερμολυτική (Simplex-epidermolytic), στην δυστροφική (dystrophic-dermolytic/scarring) και στη συνδετική (Junctional). Στη συνέχεια η παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, οδήγησε στη διάκριση της **EB** σε τέσσερις κατηγορίες, με βάση το επίπεδο σχηματισμού της φουσκάλας στην περιοχή του δέρματος, δηλαδή σύμφωνα με το στρώμα στο οποίο πραγματοποιείται η αποκόλληση μεταξύ δερμίδας και επιδερμίδας (εικ. 2).

Όταν ο διαχωρισμός επιδερμίδας δερμίδας συμβαίνει ενδοεπιδερμικά (intraepidermal blistering), δηλαδή εντός των βασικών κερατινοκυττάρων, με αποτέλεσμα το βασικό έλασμα της επιδερμίδας να παραμένει ανεπηρέαστο, η **EB** ονομάζεται Simplex (EBS). Αυτή η κατηγορία χαρακτηρίζεται μεταξύ άλλων και από μεταλλαγές στα γονίδια της κερατίνης 5 και 14, οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα την συρρίκνωση των νηματίων κερατίνης (filament clumping), την κυτταρική ευθραυστότητα και τη διάρρηξη των βασικών κερατινοκυττάρων. Στη δεύτερη κατηγορία **EB** το επίπεδο της αποκόλλησης του δερματικού ιστού παρατηρείται στη βασική πλευρά των επιδερμικών κερατινοκυττάρων, εντός της ημιδεσμοσωμικής πλάκας, δηλαδή οι φουσκάλες εντοπίζονται στη μεσόφαση μεταξύ των βασικών κερατινοκυττάρων και της Lamina Lucida. Η περίπτωση αυτή είναι γνωστή ως ημιδεσμοσωμική (Hemidesmosomal) και διακρίνεται, στην καλοήθης ατροφική συνδετική πομφολυγώδη επιδερμόλυση (atrophic benign junctional epidermolysis bullosa-GABEB), όταν εμφανίζονται μεταλλαγές στο κολλαγόνο XVII, στην πομφολυγώδη επιδερμόλυση με πυλωρική ατρησία (Epidermolysis Bullosa with pyloric atresia-EB-PA), σε περίπτωση μεταλλαγών στα γονίδια που κωδικοποιούν τις ιντεγκρίνες α6 ή β4, και στην πομφολυγώδη επιδερμόλυση με ταυτόχρονη παρουσία μυϊκής δυστροφίας (Epidermolysis Bullosa with muscular dystrophy-EB-MD), αν οι μεταλλαγές παρατηρούνται στο γονίδιο της πλεκτίνης. Η τρίτη κατηγορία πομφολυγώδους επιδερμόλυσης ονομάζεται συνδετική (Junctional) και το επίπεδο σχηματισμού της φουσκάλας εντοπίζεται εντός της Lamina Lucida, ενώ έχουν παρατηρηθεί μεταλλαγές στα γονίδια της λαμινίνης α3, β3, γ2. Τέλος η τέταρτη κατηγορία της ασθένειας αυτής είναι η δυστροφική πομφολυγώδη επιδερμόλυση (Dystrophic Epidermolysis Bullosa-DEB), στην οποία παρατηρούνται διαταραχές στα ινίδια αγκυροβόλησης που συνδέουν το βασικό έλασμα με την υποκείμενη δερμίδα. Στην περίπτωση αυτή το επίπεδο διαχωρισμού της επιδερμίδας από τη δερμίδα παρατηρείται εντός της Sub-lamina densa, στην δερμική πλευρά του βασικού ελάσματος και ανιχνεύονται μεταλλαγές στο γονίδιο του κολλαγόνου VII (Pulkkinen Leena and Uitto Jouni, 1998) (εικ. 2 και Πίνακας 1).

#### **I.IV.1 Απενεργοποίηση γονιδίων στον ποντικό που κωδικοποιούν για συστατικά του βασικού ελάσματος**

Σε αρκετά από τα γονίδια που κωδικοποιούν για συστατικά των βασικών ελασμάτων στον ποντικό έχει πραγματοποιηθεί στοχευόμενη απενεργοποίηση με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2) αναφέρονται ενδεικτικά ορισμένα μοντέλα ποντικών για κληρονομήσιμες δερματικές ασθένειες του ανθρώπου που χαρακτηρίζονται από τη δημιουργία φουσκαλών.

Στη συνέχεια θα αναφερθούν αναλυτικά τα αποτελέσματα της απενεργοποίησης ορισμένων γονιδίων που κωδικοποιούν για συστατικά του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας:



## Εικ. 2: Απεικόνιση του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας

Σημειώνεται το βασικό έλασμα της επιδερμίδας, το οποίο διαχωρίζει τα βασικά κερατινοκύτταρα από την υποκείμενη θηλώδη δερμίδα (papillary dermis). Στα αριστερά του σχήματος αναγράφονται οι δομές προσκόλλησης εντός του βασικού ελάσματος (οι οποίες αναγνωρίζονται με ηλεκτρονική μικροσκοπία) και δεξιά τα πρωτεϊνικά συστατικά που συνιστούν αυτές τις δομές. Επίσης σημειώνεται το επίπεδο διαχωρισμού του δέρματος στις τέσσερις κατηγορίες **EB**, την Simplex, την Hemidesmosomal, την Junctional και την Dystrophic.

Table 1

Clinical variants of epidermolysis bullosa, level of tissue separation within the cutaneous basement membrane zone, and the genes, harboring mutations

EB variant	Level of tissue separation	Mutated gene	Chromosomal l
Simplex	Intraepidermal	KRT5 KRT14	17q11-13 12q12-21
Hemidesmosomal <sup>a</sup>	Basal keratinocyte/ lamina lucida interface	COL17A1	10q24.3
GABEB		ITGA6	2q24-31
EB-PA		ITGB4	17q25
EB-MD		PLEC1	8q24
Junctional	Lamina lucida	LAMA3 LAMB3 LAMC2	18q11.2 1q32 1q25-31
Dystrophic	Sub-lamina densa	COL7A1	3p21.1

<sup>a</sup>GABEB, generalized atrophic benign EB; EB-PA, EB with pyloric atresia; EB-MD, EB with late-onset muscular dystrophy.

## Πίνακας 1: Κλινικές παραλλαγές της Ε.Β, επίπεδο διαχωρισμού του δερματικού ιστού, υπεύθυνα γονίδια και μεταλλαγές τους

### I.IV.1.α κολλαγόνα

#### I.IV.1.α.1 Κολλαγόνο VII

Το Κολλαγόνο VII όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί το βασικό συστατικό των ινιδίων αγκυροβόλησης που εντοπίζονται στην Sub-Lamina Densa και όπως όλα τα μόρια κολλαγόνου αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες [proa1(VII)]<sub>3</sub>. Κάθε μονομερές

του κολλαγόνου VII αποτελείται από δύο κολλαγονώδεις περιοχές, οι οποίες διακόπτονται από μία μη κολλαγονώδη περιοχή 39 αμινοξέων. Τα κολλαγονώδη τμήματα που περιλαμβάνουν επαναλήψεις Gly-Xaa-Yaa και σχηματίζουν μια τριπλοελικοειδή περιοχή, περικλείονται από ένα μεγάλο και ένα μικρό μη-κολλαγονώδες τμήμα, το NC1 (non-collagenous 1) και το NC2 (non-collagenous 2) αντίστοιχα. Όσον αφορά τον τρόπο συνάθροισης των ινιδίων του κολλαγόνου VII, αυτός περιλαμβάνει αρχικά τον σχηματισμό αντιπαράλληλων διμερών που ενώνονται ομοιοπολικά με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η αλληλοεπικάλυψη των ινιδίων του κολλαγόνου λαμβάνει χώρα εντός της κολλαγονώδους ελικοειδής τους περιοχής, στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Στη συνέχεια τα προκύπτοντα διμερή αφού πρωτεολυθούν κατάλληλα (διάσπαση της περιοχής NC2), συναθροίζονται πλευρικός κατά ομάδες (μη ελαστική πλευρική συνάθροιση των διμερών σε ινίδια αγκυροβόλησης) (εικ. 3) (Bruckner-Tuderman Leena, 1999; Bruckner-Tuderman Leena *et al.*, 1999; Keene DR *et al.*, 1997).

**Table 1. Mouse models for inherited skin blistering diseases**

Disease	Model	Genetics	Similarities to human disease	Differences from human disease	Refs
EHK (AD)	<i>K10/K14</i> transgenic	Truncated human K10/14 fusion protein	Severe blistering, keratin aggregates	Phenotype dependent on transgene copy number	4
	<i>K1</i> transgenic	Truncated human K1	Fragile epidermis with erosions and blisters, hyperkeratoses later	Phenotype in homozygotes with high copy number	5
	<i>K10</i> knockout	Truncated mouse K10	Generalized blistering, hyperkeratoses	Phenotype more severe, neonatal lethality	6
	K10 R156C	Most common point mutation in humans	First model that mimics the human disease at the genetic and phenotypic level		15
EBS (AD)	<i>K14</i> transgenic	Truncated human K14	Generalized blistering	Perinatal lethality in high expressors	3
	<i>K14</i> knockout	Generation of null allele	Generalized blistering at birth, improves with age	Phenotype more severe than human 'knockout'	7
	K14 R125C	Most common point mutation in humans	First model that mimics the human disease at the genetic and phenotypic level		16
EBS-MD (AR)	Plectin knockout	Generation of null allele	Skin blistering and muscular dystrophy	Cardiac muscle aberration not reported in humans	8
JEB Herlitz (AR)	<i>LAMA3</i> knockout	Generation of null allele	Skin blistering and dental abnormalities, perinatal lethality	Blistering restricted to forepaws, limbs, oral mucosa	9
JEB Herlitz (AR)	<i>LAMB3</i> knockout	Spontaneous mouse mutant, null allele	Generalized blisters, lethal after birth	No blister formation in respiratory, urinary and GI tract	10
JEB-PA (AR)	Integrin $\alpha 6$ and $\beta 4$ knockout	Generation of null allele	Generalized blistering of skin and internal epithelia, high rate of mortality	Phenotype more severe, basal and spinous cells are also affected	11-13
RDEB (AR)	<i>Col7a1</i> knockout	Generation of null allele	Extensive blistering of skin and internal epithelia, early lethality		14

Abbreviations: AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; EBS, epidermolysis bullosa simplex; EBS-MD, EBS with associated muscular dystrophy; EHK, epidermolytic hyperkeratosis; JEB, junctional form of epidermolysis bullosa (EB); JEB-PA, JEB with pyloric atresia; RDEB, recessive dystrophic EB.

**Πίνακας 2: Μοντέλα στον ποντικό για κληρονομήσιμες δερματικές ασθένειες που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη φουσκαλών ή κυστών**

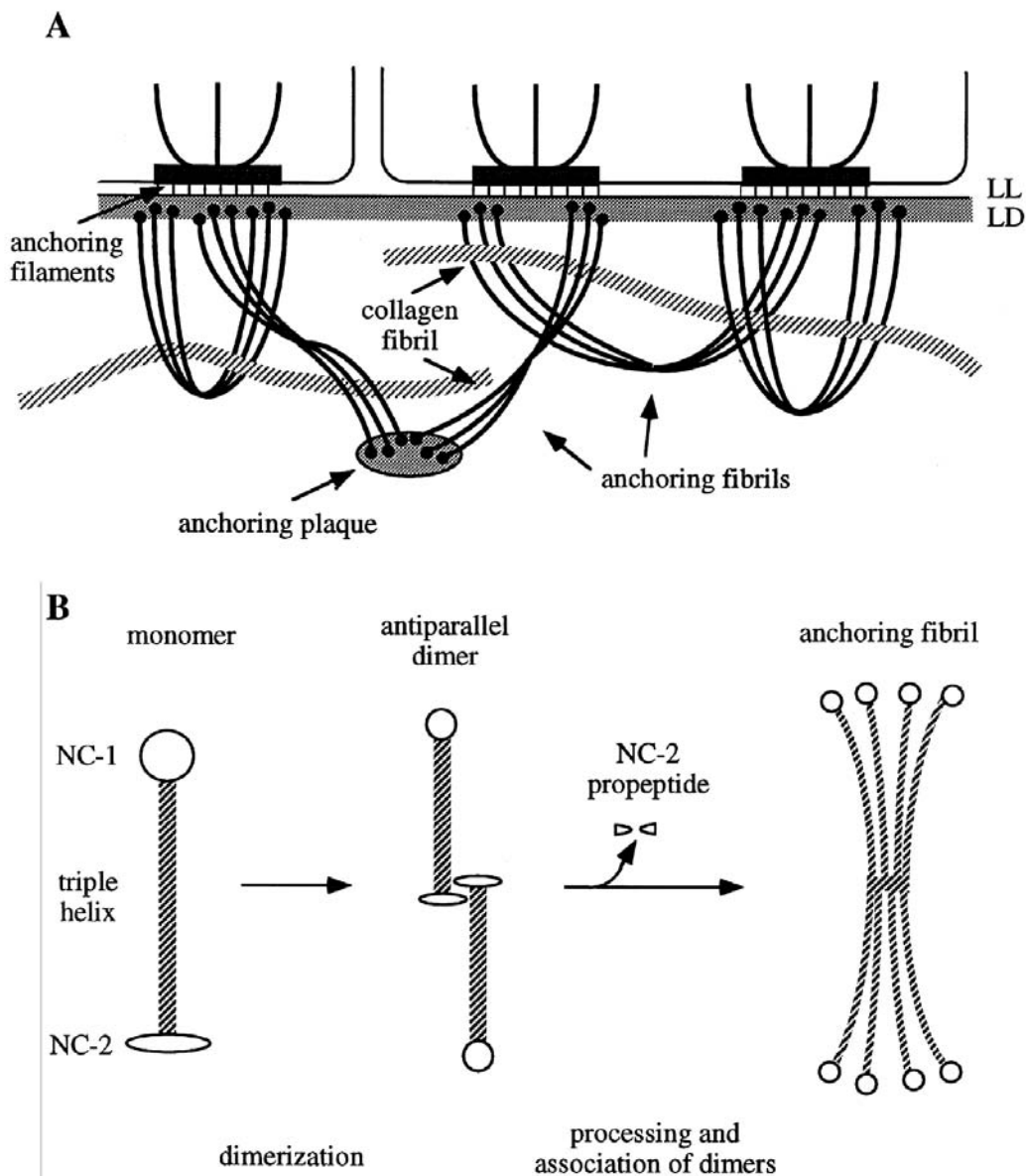
Τονίζεται ότι το κολλαγόνο VII το οποίο παράγεται κυρίως από τα επιθηλιακά κύτταρα αλλά και από τα κύτταρα της δερμίδας, εντοπίζεται από την ημέρα 11.5 και μέχρι τη γέννηση συνεχώς στη δερμίδα, ενώ η παρουσία του στην περιοχή του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας αυξάνει προοδευτικά κατά την ανάπτυξη (εικ. 4) (Heinonen Serrro *et al.*, 1999; DiPersio CM *et al.*, 1997).

Απενεργοποίηση του κολλαγόνου VII στο ποντίκι προκαλεί την εκτεταμένη παρουσία φουσκαλών σε νεογέννητα ποντίκια, ιδιαίτερα στην κοιλιακή τους περιοχή. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο η θέση δημιουργίας των φουσκαλών εντοπίζεται κάτω από την Lamina densa (η Lamina densa παραμένει ακέραια), ενώ παρατηρείται απουσία των ινιδίων αγκυροβόλησης ακόμα και στις περιοχές που δεν εντοπίζονται φουσκάλες, καθώς και ευθραυστότητα του δέρματος. Οι φουσκάλες συχνά περιέχουν μικρές ποσότητες αίματος, λόγω του εντοπισμού τους κοντά στην δερμίδα που περιέχει αγγεία. Η επιβίωση των ομόζυγων μεταλλαγμένων ζώων διαρκεί το πολύ δύο εβδομάδες μετά την γέννηση, ενώ αρκετά συχνά εντοπίζονται περιπτώσεις συνδακτυλίας. Σαν αιτίες θανάτου των ζώων αυτών μπορούν να θεωρηθούν:

**α)** Η εκτεταμένη ανισορροπία υγρού στα ποντίκια εξαιτίας των φουσκαλών, οι οποίες μπορεί να περιέχουν υγρό που να αντιστοιχεί στο 20% του συνολικού βάρους του σώματος τους.

**β)** Η μειωμένη ικανότητα των μεταλλαγμένων ποντικών να πέμψουν το φαγητό τους, λόγω πιθανής ύπαρξης φουσκαλών και γενικότερης φθοράς του γαστροεντερικού τους σωλήνα.

Τα συγκεκριμένα ποντίκια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν μοντέλα για την ασθένεια DEB. Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευθεί σε οικογένειες με DEB, γύρω στις 200 μεταλλάξεις στο γονίδιο του κολλαγόνου VII και έχουν παρατηρηθεί τόσο ήπιες όσο και βαριές μορφές ασθένειες, οι οποίες κληρονομούνται με επικρατή ή υπολειπόμενο τρόπο. Οι μεταλλάξεις αυτές, όπως συμβαίνει γενικότερα με τις μεταλλάξεις που παρουσιάζουν τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα περισσότερα κολλαγόνα σε πολλές κληρονομήσιμες ασθένειες, είτε οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό του γονιδιακού προϊόντος, είτε το μεταλλαγμένο προϊόν επιδρά αρνητικά στη φυσιολογική πρωτεΐνη (dominant negative effects). Πρέπει να σημειωθεί ότι παρατηρούνται και μεταλλάξεις του κολλαγόνου VII που οδηγούν σε αντικατάσταση ή έλλειψη κάποιου αμινοξέος, οι οποίες είναι ασυμπτωματικές. Το γεγονός αυτό ξεχωρίζει το κολλαγόνο VII από τα ινώδη κολλαγόνα και υποδηλώνει ότι τα ινίδια αγκυροβόλησης μπορούν να υποστούν ορισμένες δομικές αλλαγές στα συστατικά τους χωρίς να παρουσιάσουν πρόβλημα (Heinonen Seppo *et al.*, 1999).

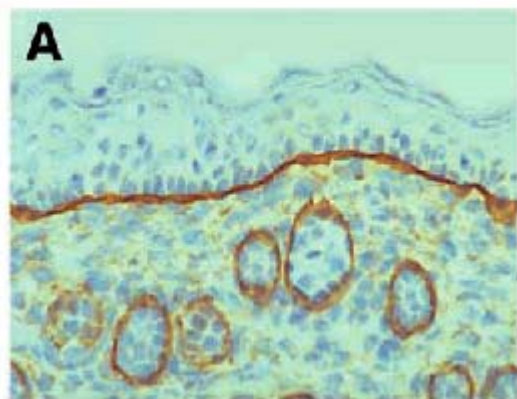




### Εικ. 3: Ινίδια αγκυροβόλησης

A. Σχηματική αναπαράσταση των ινιδίων αγκυροβόλησης (anchoring fibrils), σαν μέρος του συμπλόκου αγκυροβόλησης του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας. Τα ινίδια αγκυροβόλησης που ξεκινούν στην Lamina densa, είτε καταλήγουν στις πλάκες αγκυροβόλησης (anchoring plaques), είτε ξαναγυρίζουν στην Lamina densa. Αρκετά συχνά μεταξύ των ινιδίων αγκυροβόλησης παγιδεύονται δερματικές ίνες κολλαγόνου, έτσι ώστε να διασφαλίζεται η σύνδεση του συμπλόκου αγκυροβόλησης με την εξωκυτταρική ουσία της δερμίδας.

B. Σχηματική αναπαράσταση του πολυμερισμού των ινιδίων αγκυροβόλησης.



### Εικ. 4: Ανοσοεντοπισμός του κολλαγόνου VII

Το κολλαγόνου VII ανιχνεύεται στη περιοχή του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας καθώς και γύρω από τα τριχοειδή θυλάκια, σε νεογέννητο ποντίκι.

### I.IV.1.α.2 Κολλαγόνο VI

Το κολλαγόνο VI αποτελείται από τρεις διαφορετικές α αλυσίδες, που σχηματίζουν ένα τριμερές με μία μικρή κολλαγονώδη περιοχή, η οποία περιβάλλεται αμινοτελικά και καρβοξυτελικά από αρκετά μοτίβα τύπου A του παράγοντα Von Willebrand. Και οι δύο παραπάνω περιοχές του κολλαγόνου VI συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση του με διάφορα μόρια. Για παράδειγμα, η κολλαγονώδης περιοχή προσδένει κύτταρα, πρωτεογλυκάνες και το κολλαγόνο II. Η περιοχή των μοτίβων Von Willebrand αλληλεπιδρά με κολλαγόνα τύπου I, IV, VI, καθώς και με την φιμπρονεκτίνη, την ηπαρίνη (heparin) και το υαλουρονικό οξύ. Το κολλαγόνο VI αποτελεί βασικό συστατικό της διάμεσης ουσίας (interstitial matrix) και σχηματίζει ένα εκτεταμένο μικροϊνιδιακό δίκτυο (ιδιαίτερα άφθονο κοντά σε κύτταρα), το οποίο πιστεύεται ότι συνδέει το βασικό έλασμα, κυρίως μη επιθηλιακών κυττάρων, με τον υποκείμενο συνδετικό ιστό. Ανάλογο ρόλο έχει το κολλαγόνο VI και στο βασικό έλασμα της επιδερμίδας, με τη συμμετοχή όμως και άλλων μορίων.

Η απενεργοποίηση του γονιδίου του κολλαγόνου VI αποτελεί μοντέλο για το ανθρώπινο σύνδρομο Bethlem και προκαλεί συμπτώματα μυοπάθειας στους σκελετικούς μύες σε ενήλικα ποντίκια (νέκρωση ινών, φαγοκύτωση και μία έκδηλη ποικιλομορφία στη διάμετρο των ινών). Η μυοπάθεια πιστεύεται ότι οφείλεται στην αποτυχία του κολλαγόνου VI να συνδέσει το δίκτυο του κολλαγόνου IV του βασικού ελάσματος με ίνες κολλαγόνου, φιμπρονεκτίνη και πρωτεογλυκάνες που απαντώνται στη διάμεση ουσία. Ανάλογα προβλήματα παρουσιάζουν και τα ετερόζυγα ποντίκια αλλά σε μικρότερο βαθμό. Οι διαφορές στα συμπτώματα μεταξύ ανθρώπων και ποντικών (π.χ η απουσία κινητικών προβλημάτων στα ποντίκια) πιθανότατα οφείλονται στο διαφορετικό υποχρεωτικό αναπνευστικό ρυθμό έργου ανά μονάδα μάζας στους δύο οργανισμούς (Bonaldo P *et al.*, 1998).

### I.IV.1.α.3 Κολλαγόνο IV

Το κολλαγόνο IV είναι ένα πολύ σημαντικό συστατικό των βασικών ελασμάτων στα σπονδυλωτά και στα ασπόνδυλα. Σχηματίζει, όπως τα κολλαγόνα που αναφέρθηκαν

παραπάνω, ένα τριμερές από πολυπεπτιδικές αλυσίδες  $\alpha$  (μήκους 2000  $\text{\AA}$ ), οι οποίες σχηματίζουν με τις κολλαγόνωδεις περιοχές τους (που περιέχουν επαναλήψεις Gly-X-Y) τριπλοέλικες. Το τριμερές του κολλαγόνου IV περιλαμβάνει επίσης δύο μη κολλαγόνωδεις σφαιρικές περιοχές στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό του άκρο. Τα προκύπτοντα τριμερή συνδέονται ομοιοπολικά στις μη κολλαγόνωδεις περιοχές τους και σχηματίζουν δίκτυα. Στα θηλαστικά εντοπίζονται έξι αλυσίδες  $\alpha$  εκ των οποίων οι  $\alpha 1$  και  $\alpha 2$  εκφράζονται σε έμβρυα και ενήλικα άτομα, ενώ οι  $\alpha 3$ - $\alpha 6$  εκφράζονται σε συγκεκριμένα βασικά ελάσματα. Ειδικότερα στα βασικά ελάσματα των σπειραμάτων των νεφρών πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, αντικατάσταση των αλυσίδων  $\alpha 1$  και  $\alpha 2$ , με τις  $\alpha 3$  και  $\alpha 5$ .

Στην περίπτωση απενεργοποίησης της αλυσίδας  $\alpha 3$  του κολλαγόνου IV στον ποντικό, παρατηρείται νεφρικός φαινότυπος παρόμοιος με αυτόν του συνδρόμου Alport στον άνθρωπο, που έχει συσχετιστεί με μεταλλαγές στις αλυσίδες  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  και  $\alpha 5$  του κολλαγόνου IV. Τονίζεται ότι η αλυσίδα  $\alpha 3$  του κολλαγόνου IV στον ποντικό, εντοπίζεται αμέσως μετά τη γέννηση στα βασικά ελάσματα των νεφρών, με αποτέλεσμα η έλλειψη της να προκαλεί διαφοροποιήσεις σε κάποια συστατικά της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (glomerular Basal membrane-GBM) των νεογέννητων ποντικών. Συγκεκριμένα στα ομόζυγα μεταλλαγμένα ποντίκια παρατηρείται έλλειψη των αλυσίδων  $\alpha 4$  και  $\alpha 5$  του κολλαγόνου IV με τις οποίες αλληλεπιδρά η  $\alpha 3$ , διατήρηση της έκφρασης των αλυσίδων  $\alpha 1$  και  $\alpha 2$  του κολλαγόνου IV, εμφάνιση της φμπρονεκτίνης και του κολλαγόνου VI, καθώς και αύξηση των επιπέδων της περλεκάνης. Τα υπόλοιπα συστατικά του σπειραματικού βασικού ελάσματος παραμένουν ανεπηρέαστα. Η αλλαγή στη μοριακή σύσταση αυτού του βασικού ελάσματος προκαλεί νεφρικές ανωμαλίες, όπως τη διάρρηξη του σπειραματικού φίλτρου.

Παρά το γεγονός ότι η αλυσίδα  $\alpha 3$  του κολλαγόνου IV απαντάται και σε μη νεφρικά βασικά ελάσματα, όπως στη σκελετονευρομυϊκή σύναψη, δεν παρατηρείται στην περιοχή αυτή ανάλογη έλλειψη της αλυσίδα  $\alpha 5$  του κολλαγόνου IV, πιθανότατα γιατί οι αλυσίδες  $\alpha 3$  και  $\alpha 5$  συμμετέχουν σε διαφορετικά δίκτυα κολλαγόνου IV σε κάποιους ιστούς (Miner JH and Sanes JR. 1996; Cosgrove D *et al.*, 1996).

#### I.IV.1.β Ιντεγκρίνες

Οι ιντεγκρίνες συνιστούν μία πολυποίκιλη οικογένεια διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνικών ετεροδιμερών, αλυσίδων  $\alpha$  και  $\beta$ , που αποτελούν υποδοχείς για μια πληθώρα συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Εκφράζονται από πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους, τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και κατά την ενηλικίωση και χαρακτηρίζονται από μεταβλητά πρότυπα έκφρασης (Bader BL *et al.*, 1998). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 25 διαφορετικά, μη ομοιοπολικά συνδεδεμένα ετεροδιμερή, που προέρχονται από το συνδυασμό 18 αλυσίδων  $\alpha$  και 8 αλυσίδων  $\beta$ , καθένα από τα οποία αλληλεπιδρά με μία κατηγορία δεσμευτών. Για παράδειγμα, η ιντεγκρίνη ανβ3 προσδένει μία πληθώρα εξωκυττάρια συστατικών, όπως η φμπρονεκτίνη, το φμπρινογόνο (Fibrinogen), ο παράγοντας Von Willebrand, η βιμπρονεκτίνη (Vibronectin), πρωτεολυμμένες μορφές κολλαγόνου καθώς και λαμινίνη, ενώ η ιντεγκρίνη  $\alpha 5 \beta 1$  προσδένει αποκλειστικά και μόνο φμπρονεκτίνη.

Ο κυριότερος ρόλος των ιντεγκρινών είναι η συγκρότηση και η διατήρηση του βασικού ελάσματος, μέσω οργάνωσης των επιμέρους συστατικών τους τα οποία λειτουργούν σαν δεσμευτές των ιντεγκρινών. Εκτός από τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με την εξωκυττάρια ουσία, μέσω των ιντεγκρινών επιτυγχάνονται και διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις που συμβάλλουν στη διατήρηση της συνεκτικότητας των κυττάρων και οι οποίες πραγματοποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων των ιντεγκρινών με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως οι καδερίνες (Cadherins).

Κάθε υπομονάδα της ιντεγκρίνης περιλαμβάνει μία μεγάλη εξωκυτταρική περιοχή, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία μικρή μη καταλυτική περιοχή. Εκτός από την κυτταρική προσκόλληση και την προσκόλληση με την εξωκυττάρια ουσία οι ιντεγκρίνες πραγματοποιούν, μέσω της κυτταροπλασματικής τους περιοχής, την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μηχανισμών που επηρεάζουν τις ιδιότητες και τις λειτουργίες των κυττάρων, αλλά και την ικανότητα της προσκόλλησης τους. Επιπρόσθετα οι ιντεγκρίνες, αφού προσδέσουν τον κατάλληλο δεσμευτή, σχηματίζουν μέσω της κυτταροπλασματικής τους περιοχής συναθροίσεις με άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρώντας με συστατικά του κυτταροσκελετού επηρεάζουν τόσο το σχήμα του κυττάρου όσο και την μετακίνησή του. Τονίζεται ότι η υπομονάδα  $\alpha$  της ιντεγκρίνης καθορίζει την ειδικότητα της για

τον κατάλληλο δεσμευτή, ενώ η β επηρεάζει τον κυτταροπλασματικό της ρόλο (Hood John D. and Cheresh David A., 2002).

Στην περίπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των σπονδυλωτών απαντάται πληθώρα ιντεγκρινών, οι οποίες αλληλεπιδρούν με ποικίλες ιστοειδικές λαμινίνες, αλλά και με άλλα συστατικά του βασικού ελάσματος. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές, όπως αναφέρθηκε, προκαλούν αλλαγές στη μορφολογία των επιθηλιακών κυττάρων, καθώς και στον τρόπο προσκόλλησης τους με την εξωκυττάρια ουσία ή με άλλα κύτταρα, έτσι ώστε να εξασφαλίζονται οι λειτουργίες τους. Οι ιντεγκρίνες που συναντώνται συχνότερα στα επιθήλια είναι οι α3β1, ενώ στα επιθήλια εκτοδερμικής προέλευσης, όπως του δέρματος και του εντέρου, εντοπίζονται πολύ συχνά και οι ιντεγκρίνες α6β4. Όσον αφορά την ανθρώπινη επιδερμίδα, εκτός από τα παραπάνω μόρια ιντεγκρινών, εκφράζονται και οι ιντεγκρίνες α2β1 (υποδοχέας και οργανωτής κολλαγόνου/λαμινινών) και α5β1 (υποδοχέας και οργανωτής της φιμπρονεκτίνης) και ανβ5 (Brakebusch C *et al.*, 2000). Οι ιντεγκρίνες α3β1 προσδένουν μεταξύ άλλων και τη λαμινίνη 5, ενώ ενδοκυτταρικά αλληλεπιδρούν μέσω άλλων πρωτεϊνών με ινίδια ακτίνης. Έχει διαπιστωθεί ότι οι ιντεγκρίνες αυτές είναι απαραίτητες για την οργάνωση και την ακεραιότητα του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, ενώ οι ιντεγκρίνες α6β4 είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό των ημιδεσμοσωμάτων και την επακόλουθη αύξηση της αντοχής στα επιθήλια (Raghavan S *et al.*, 2000; Hodivala-Dilke KM *et al.*, 1998; Brakebusch C *et al.*, 2000; Belkin AM and Stepp MA, 2000).

Τονίζεται ότι στον ενήλικα άνθρωπο οι δύο κυριότερες θέσεις έκφρασης των ιντεγκρινών είναι τα επιθήλια και οι λείοι μύες. Στα επιθήλια εντοπίζονται οι ιντεγκρίνες α2β1, α3β1, α7β1, α6β4, που δεσμεύουν κολλαγόνα ή λαμινίνες, ενώ στους λείους μύες εμφανίζονται οι α5β1, α8β1, α9β1 και ανβ. Όλες οι παραπάνω ιντεγκρίνες εντοπίζονται τόσο κατά την ανάπτυξη του εντέρου, όσο και στο ενήλικο έντερο, σε χαμηλότερο όμως ποσοστό (Lussier C *et al.*, 2000).

#### **I.IV.1.β.1 α3 αλυσίδα ιντεγκρίνης**

Το γονίδιο της αλυσίδας α3 της ιντεγκρίνης εκφράζεται κατά την ανάπτυξη πολλών επιθηλιακών οργάνων, όπως τα νεφρά, οι πνεύμονες και το δέρμα. Έχουν ανιχνευθεί διάφοροι δεσμευτές της ιντεγκρίνης α3β1, συμπεριλαμβανομένων της λαμινίνης 1 και 5, του νιδογόνου, της φιμπρονεκτίνης και κάποιων τύπων κολλαγόνου, καθώς και άλλα μόρια ιντεγκρινών. Τα συμπτώματα που προκαλεί η απενεργοποίηση του γονιδίου της αλυσίδας α3 περιλαμβάνουν, τη διαταραχή της οργάνωσης του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, των σπειραμάτων των νεφρών και των πνευμόνων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Η παραμόρφωση του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας εκδηλώνεται υπό τη μορφή ήπιου δερματικού φαινοτύπου χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα στην επιδερμίδα ή στα τριχοειδή θυλάκια, εκτός από την εμφάνιση μικροφουσκάλων στα κάτω άκρα νεογέννητων ποντικών (που οφείλονται στη τοπική διάρρηξη του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας στις περιοχές αυτές). Σε μερικές περιπτώσεις οι μικροφουσκάλες των νεογέννητων ποντικών περιέχουν αίμα. Τελικά τα ποντίκια α3<sup>-/-</sup> πεθαίνουν σύντομα μετά τη γέννηση, πιθανότατα λόγω των νεφρικών και πνευμονικών προβλημάτων που παρατηρούνται και τα οποία οφείλονται στην έλλειψη του υποδοχέα α3β1 από τα βασικά τους ελάσματα, με επακόλουθες διαταραχές στις καθοριστικές για την ανάπτυξη τους επιθηλιομεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις (Kreidberg JA *et al.*, 1996). Οι ανωμαλίες που παρατηρούνται στα παραπάνω βασικά ελάσματα πιστεύεται ότι οφείλονται σε προβλήματα στην οργάνωση των συστατικών τους. Στην παραπάνω υπόθεση συνιστά και η παρατήρηση συστατικών, όλων των ζωνών του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, τόσο στην οροφή όσο και στο δάπεδο κάθε μικροφουσκάλας. Κατά συνέπεια πιθανότατα λαμβάνει χώρα ακανόνιστη διάρρηξη, του ιδιαίτερα επιρρεπούς σε εξωτερικές πιέσεις βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, παρά αποκόλληση του από τη δερμίδα. Επομένως η αλυσίδα α3 της ιντεγκρίνης, μέσω του διμερούς α3β1, μπορεί να συμβάλλει σαν δευτερογενής υποδοχέας στην συγκρότηση του βασικού ελάσματος ή/και στην διατήρηση της ακεραιότητας του (DiPersio CM *et al.*, 1997). Επίσης διαπιστώνεται η σημασία της ιντεγκρίνης α3β1 ως καθοριστή των κυτταροσκελετικών συναθροίσεων των κυττάρων και ως αναστολέα (trans-dominant) της δράσης άλλων ιντεγκρινών (Hodivala-Dilke KM *et al.*, 1998).

### I.IV.1.β.2 β1 αλυσίδα ιντεγκρίνης

Η αλυσίδα β1 των ιντεγκρινών παρουσιάζει καθολική έκφραση και συμμετέχει σε διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις αλλά και σε αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με την εξωκυττάρια ουσία. Εκτός από την αλυσίδα α3 αλληλεπιδρά και με τις αλυσίδες α2 και α5, αποτελώντας τον υποδοχέα για την λαμινίνη-5, το κολλαγόνο IV και την φιμπρονεκτίνη αντίστοιχα. Η απενεργοποίηση της αλυσίδας β1 προκαλεί πρόωρο εμβρυϊκό θάνατο, γι' αυτό προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της στο δέρμα προκλήθηκε ελεγχόμενη απενεργοποίηση του γονιδίου που την κωδικοποιεί σ' αυτόν τον ιστό. Τα επακόλουθα της απενεργοποίησης αυτής περιλαμβάνουν, σε αντίθεση με την έλλειψη της αλυσίδας α3, πολύ σοβαρό δερματικό φαινότυπο σε νεογέννητα ποντίκια, που χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα ευπαθές δέρμα με αποκόλληση της επιδερμίδας από την δερμίδα και πολλές φουσκάλες (εντός του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας) ύστερα από μικροτραυματισμούς. Επίσης παρατηρείται διαταραχή στην ικανότητα πολλαπλασιασμού της επιδερμίδας και κάποιων εσωτερικών στρωματοποιημένων επιθηλίων, καθώς και διαταραχές στη μορφογέννηση των τριχοφόρων θυλακίων. Σε αντίθεση με την απενεργοποίηση των αλυσίδων β4 ή α6, όπου παρατηρείται εκτεταμένη έλλειψη τριχών στα ποντίκια, στην περίπτωση των α3<sup>-/-</sup> ποντικών διαπιστώνεται ισχνή και προσδευτική απογύμνωση. Τέλος προκαλείται φλεγμονή και δερματική ίνωση.

Ουσιαστικά η δομή του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας εξαφανίζεται και παρατηρείται απώλεια των ημιδεσμοσωμάτων και των χαρακτηριστικών ζωνών του βασικού ελάσματος, αλλά και έλλειψη των βασικών συστατικών του, καθώς και ανωμαλίες στην επεξεργασία τους. Δηλαδή η αλυσίδα β1 (η μοναδική αλυσίδα ιντεγκρίνης που η απενεργοποίηση της προκαλεί τόσο σοβαρό πρόβλημα στην ακεραιότητα της ζώνης του επιδερμικού βασικού ελάσματος), μέσω των αλληλεπιδράσεων της με τις αλυσίδες α3, α2 και α5, είναι απαραίτητη (και όχι απλά βοηθητική όπως η α3) για την συγκρότηση και τη διατήρηση της οργάνωσης του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας (όχι όμως και του βασικού ελάσματος των τριχοφόρων θυλακίων).

Τελικά τα ομόζυγα μεταλλαγμένα ποντίκια πεθαίνουν, είτε από υποθερμία και αυξημένη κατανάλωση ενέργειας (λόγω έλλειψης τριχών και λίπους), είτε λόγω διαταραχών στην πρόσληψη και πέψη της τροφής (εξαιτίας της πιθανής παρουσίας φουσκάλων σε γλώσσα, οισοφάγο και έντερο, είτε λόγω μειωμένης κινητικότητας των ζώων (προκαλείται δυσκαμψία του δέρματος με την αυξημένη εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας) (Brakebusch C *et al.*, 2000; Raghavan S *et al.*, 2000; Fassler R *et al.*, 1996).

### I.IV.1.β.3 α6 ή β4 αλυσίδα ιντεγκρίνης

Η έκφραση της ιντεγκρίνης α6β4 εντοπίζεται στα στρωματοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα των ενδιάμεσων αιμοφόρων αγγείων, στα ανώριμα θυμοκύτταρα, στα κύτταρα Schwann, καθώς και στους ινοβλάστες του περιφερικού νευρικού συστήματος. Η ιντεγκρίνη αυτή λειτουργεί ως υποδοχέας των λαμινινών 1, 2, 4, 5 και πιθανότατα και της λαμινίνης 10 (που αποτελούν συστατικά του βασικού ελάσματος) και πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση, σε διαδικασίες όπως η μετακίνηση του ενδοδέρματος και ο σχηματισμός των σωληναρίων των νεφρών. Το αποτέλεσμα της απενεργοποίησης της αλυσίδας α6 (στην περίπτωση αυτή απουσιάζει τόσο η ιντεγκρίνη α6β4 όσο και η ιντεγκρίνη α6β1, που προσδένουν και οι δύο μόνο λαμινίνες) ή της β4, παραδόξως επιτρέπει τη γέννηση των ποντικών και την επιβίωση τους για σύντομο χρονικό διάστημα. Τα νεογέννητα ποντίκια παρουσιάζουν εκτεταμένη αποκόλληση της επιδερμίδας και άλλων φοιλιδωτών (squamous) επιθηλίων (όπως της γλώσσας και της στοματικής και οσφρητικής κοιλότητας) από τον υποκείμενο συνδετικό ιστό και ύστερα από μικροτραυματισμούς τη δημιουργία φουσκάλων. Οι διαταραχές που παρουσιάζει το βασικό έλασμα της επιδερμίδας περιλαμβάνουν την απουσία των δομών των ημιδεσμοσωμάτων, ενώ στις περιοχές που δεν εντοπίζονται φουσκάλες παρατηρείται ένα τυπικό βασικό έλασμα με συνεχή Lamina lucida και Lamina densa (σε αντίθεση με την απενεργοποίηση της α3 ή της β1). Οι παρατηρούμενες φουσκάλες εντοπίζονται είτε εντός της Lamina lucida (με αποτέλεσμα τόσο η Lamini-5, όσο και το κολλαγόνο VII να εντοπίζονται κάτω από τη φουσκάλα στον υποκείμενο συνδετικό ιστό), είτε εντός των βασικών κερατινοκυττάρων (στην περίπτωση αυτή το βασικό έλασμα παραμένει ανεπηρέαστο περιέχοντας πολλές φορές υπολείμματα βασικών κερατινοκυττάρων). Η δημιουργία ενδοεπιδερμικών φουσκάλων εντοπίζεται σε περιοχές όπου, εξαιτίας της έλλειψης σύνδεσης της βασικής πλασματικής μεμβράνης των κερατινοκυττάρων με τα ινίδια κερατίνης

(λόγω απουσίας των ημιδεσμοσωμάτων), η προσκόλληση μεταξύ κυττάρου και εξωκυττάριας ουσίας τυγχάνει να είναι ισχυρότερη από την αντοχή του κυττάρου σε μηχανικές πιέσεις. Μεταλλαγές στο γονίδιο της β4 αλλά και της α6 εντοπίζονται σε ασθενείς με συνδυαστική πομφολυγώδη επιδερμόλυση με πυλωρική ατρησία (Junctional Epidermolysis Bullosa with pyloric atresia, PA-JEB) (Georges-Labouesse *et al.*, 1996; Van der Neut R *et al.*, 1996).

Τονίζεται ότι τα ποντίκια β4<sup>-/-</sup> στα οποία εκφράστηκε η αλυσίδα β4 (κάτω από την έκφραση του υποκινητή της κερατίνης-5) στα τριχωτά επιθήλια της επιδερμίδας, επιβιώνουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Τα ημιδεσμοσώματα των επιδερμικών επιθηλίων τους επανασχηματίζονται, ύστερα όμως από σύντομο χρονικό διάστημα παρατηρούνται φουσκάλες με αίμα στις περιοχές των παλαμών και των πελμάτων και θάνατος από κυάνωση. Ο συγκεκριμένος φαινότυπος δικαιολογείται από την απουσία έκφρασης της αλυσίδας β4 στα μη τριχωτά επιθήλια, την επακόλουθη απώλεια των ημιδεσμοσωμάτων και την αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα στις περιοχές αυτές. Η αποκόλληση του δέρματος παρατηρείται πρώτα στις περιοχές των άκρων, οι οποίες υφίστανται παρατεταμένες μηχανικές πιέσεις και αργότερα στο τριχωτό επιθήλιο της μύτης και του στόματος, γεγονός που επιφέρει την αναπνευστική απόφραξη και το θάνατο. Τονίζεται ότι το γέμισμα των φουσκάλων με αίμα στις παλάμες και στα πέλματα, μπορεί να εξηγηθεί από την αυξημένη πίεση που προκαλείται μεταξύ των περιοχών με υψηλή και χαμηλή έκφραση της αλυσίδας β4 (δηλαδή ανάμεσα στα τριχωτά και μη τριχωτά μέρη), η οποία οδηγεί σε διαταραχή του βασικού ελάσματος σε πιο βαθιά στρώματα, κοντά στη δερμίδα. Κατά συνέπεια προκαλείται διάρρηξη των λεπτών αιμοφόρων αγγείων που εντοπίζονται στα όρια επιδερμίδας δερμίδας (Van der Neut R *et al.*, 1999).

#### **I.IV.1.β.4 α5β1 ιντεγκρίνη**

Η ιντεγκρίνη α5β1, που αποτελεί υποδοχέα της φιμπρονεκτίνης, όταν απενεργοποιηθεί στα ποντίκια επιφέρει το θάνατο την ημέρα 10 της εμβρυογένεσης εξαιτίας ανωμαλιών στις μεσοδερμικές δομές (Kreidberg JA *et al.*, 1996).

#### **I.IV.1.β.5 α4 αλυσίδα ιντεγκρίνης**

Η απενεργοποίηση της ιντεγκρίνης α4β1, η οποία προσδένει τη φιμπρονεκτίνη και την πρωτεΐνη VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule-VCAM, μόριο αγγειακής προσκόλλησης), οδηγεί σε εμβρυϊκό θάνατο εξαιτίας δυσμορφιών στον πλακούντα και στην καρδιά (μάλλον λόγω δράσης VCAM) (Kreidberg JA *et al.*, 1996).

#### **I.IV.1.β.6 α1 αλυσίδα ιντεγκρίνης**

Η απενεργοποίηση της αλυσίδας α1 δεν προκαλεί θάνατο ή κάποιον ορατό φαινότυπο (Kreidberg JA *et al.*, 1996).

#### **I.IV.1.β.7 α8β1 ιντεγκρίνη**

Η ιντεγκρίνη α8β1 εκφράζεται σε πολλά αναπτυσσόμενα όργανα, όπως στα νεφρά, όπου εντοπίζεται στα μεσεγχυματικά κύτταρα πλησίον των επιθηλιακών στρωμάτων που υφίστανται διακλαδιζόμενη μορφογένεση. Η απενεργοποίηση της ιντεγκρίνης α8β1 προκαλεί ανωμαλίες στις επιθηλιο-μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις που απαιτούνται κατά την νεφρική ανάπτυξη, με αποτέλεσμα την αγενεσία ή τη δυσγενεσία των νεφρών. Τα α8β1<sup>-/-</sup> ποντίκια επιβιώνουν για μία με δύο μέρες μετά τη γέννηση τους και στη συνέχεια πεθαίνουν λόγω νεφρικής ανεπάρκειας. Τα ελάχιστα ομόζυγα μεταλλαγμένα ποντίκια που επιβιώνουν για μερικές εβδομάδες ή και μήνες, έχουν τουλάχιστον το ένα νεφρό τους λειτουργικό. Η ποικιλομορφία που παρουσιάζουν τα α8β1<sup>-/-</sup> ποντίκια στην ανάπτυξη των νεφρών πιστεύεται ότι οφείλεται σε στοχαστικούς παράγοντες, οι οποίοι είναι αποτέλεσμα διαφορών στο γενετικό υπόβαθρο των ποντικών (δηλαδή στην δράση διαφορετικών γενετικών τροποποιητών) (Muller U *et al.*, 1997).

### I.IV.1.β.8 αν ιντεγκρίνες

Οι αλυσίδες **αV** των ιντεγκρινών εκφράζονται σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους (νευρικά κύτταρα του φλοιού, νευρογλοιακά κύτταρα, μύες, επιθήλια, οστεοκλάστες και ενδοθήλια αιμοφόρων αγγείων) και έχουν εμπλακεί σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες. Η αλληλεπίδραση τους με διάφορες αλυσίδες τύπου β, οι οποίες παρουσιάζουν συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης, μαζί με την ποικιλία των δεσμευτών που αναγνωρίζουν τα σχηματιζόμενα διμερή, υποδηλώνει τη συμμετοχή τους σε πολλαπλές λειτουργίες. Παρόλα αυτά, η απενεργοποίηση των 5 διαφορετικών ιντεγκρινών στις οποίες συμμετέχει η υπομονάδα **αV**, δεν επιφέρει πολύ πρόωρο εμβρυϊκό θάνατο και τα ομόζυγα μεταλλαγμένα ζώα πεθαίνουν σε δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους. Το 80% των μεταλλαγμένων εμβρύων πεθαίνει από περικαρδικό οίδημα και καθυστέρηση στην αύξηση και στην ανάπτυξη τους, πιθανότατα λόγω προβλημάτων στον πλακούντα, το διάστημα μεταξύ 10.5 και 12.5 της εμβρυογένεσης. Το υπόλοιπο 20% των **αV<sup>-/-</sup>** πεθαίνει λίγο μετά τη γέννηση, από σοβαρότατη ενδοεγκεφαλική και εντερική αιμορραγία, η οποία ξεκινάει κατά την ανάπτυξη και σταδιακά χειροτερεύει.

Οι ιντεγκρίνες **αV**, αν και αποτελούν απαραίτητα συστατικά του βασικού ελάσματος των ενδοθηλίων, δεν επηρεάζουν την εκ νέου δημιουργία αγγείων (vascularization) και την αγγειογένεση (angiogenesis) των περισσότερων οργάνων. Αντίθετα η αγγειακή ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος καθώς και των όγκων βασίζεται στις ιντεγκρίνες **αV**.

Η απουσία των ιντεγκρινών **αV** επιφέρει πιθανότατα τη δημιουργία ελαττωματικού βασικού ελάσματος στα ενδοθήλια, με τελικό αποτέλεσμα τα παραπάνω αιμορραγικά προβλήματα. Η διαταραχή στο βασικό έλασμα των ενδοθηλίων προκαλεί, είτε την λανθασμένη τοποθέτηση/οργάνωση ορισμένων (άγνωστων μέχρι σήμερα) συστατικών του βασικού τους ελάσματος, είτε την αποτυχημένη αλληλεπίδραση των αγγείων του κεντρικού νευρικού συστήματος με κάποια βοηθητικά κύτταρα (Bader BL *et al.*, 1998).

### I.IV.1.γ Κερατίνες

#### I.IV.1.γ.1 Κερατίνη 10 και κερατίνη 14

Στην περίπτωση που με την τεχνολογία του ομόλογου ανασυνδυασμού εκφραστεί στα ποντίκια τμήμα της πρωτεΐνης K10, λειτουργώντας σαν αρνητική επικρατή μεταλλαγή (dominant negative), παρατηρείται γενικευμένη εμφάνιση φουσκάλων στην επιδερμίδα νεογέννητων ποντικών και υπερκεράτωση (δηλαδή αυξημένη συγκέντρωση ινιδίων κερατίνης). Τα ομόζυγα μεταλλαγμένα ζώα πεθαίνουν σύντομα μετά τη γέννηση και μπορούν να θεωρηθούν πρότυπα μοντέλα για την επιδερμολυτική υπερκεράτωση (Epidermolytic Hyperkeratosis-EHK), αν και στους ανθρώπους μεταλλαγές στο αντίστοιχο γονίδιο δεν προκαλούν τόσο σοβαρά συμπτώματα (πιθανότατα επειδή είναι ανενεργές) (Arin Meral J. and Roop Dennis R, 2001).

Ανάλογα, η απενεργοποίηση της κερατίνης 14 (K14) στα ποντίκια, προκαλεί γενικευμένη εμφάνιση φουσκάλων στην επιδερμίδα νεογέννητων ποντικών, με σταδιακή εξασθένηση του φαινομένου κατά την ενηλικίωση. Τα συμπτώματα που παρατηρούνται χαρακτηρίζουν την Simplex EBS αλλά είναι πολύ σοβαρότερης μορφής από ότι στον άνθρωπο (λόγω της ύπαρξης γενετικών τροποποιητών-genetic modifiers, ή διαφορών στις βιολογικές λειτουργίες ανθρώπων ποντικών) (Arin Meral J. and Roop Dennis R, 2001).

#### I.IV.1.δ Πλεκτίνη (plectin)

Επιδερμικές φουσκάλες (Skin blistering) και μυϊκή δυστροφία είναι συμπτώματα που χαρακτηρίζουν τόσο την ασθένεια EBS-MD στον άνθρωπο, αλλά και νεογέννητα ποντίκια στα οποία έχει πραγματοποιηθεί απενεργοποίηση του γονιδίου της πλεκτίνης. Τα ποντίκια αυτά πεθαίνουν μία με δύο μέρες μετά τη γέννηση τους. Σημειώνεται ότι στα ποντίκια αυτά παρατηρείται και διαταραχή του καρδιακού μυός, σύμπτωμα που δεν έχει αναφερθεί στους ασθενείς με EBS-MD (Arin Meral J. and Roop Dennis R, 2001; Andrä Kerstin *et al.*, 1997).

### I.IV.1.ε BP-230 ή BPAG1

Η απενεργοποίηση του BP-230 ή BPAG1 στον ποντικό, προκαλεί αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα στο επίπεδο των βασικών κερατινοκυττάρων. Τα ημιδεσμοσώματα εξακολουθούν να ανιχνεύονται, παρατηρείται όμως απουσία της εσωτερικής τους πλάκας και απώλεια σύνδεσης της βασικής πλασματικής μεμβράνης των κερατινοκυττάρων με τα ινίδια κερατίνης. Τα παραπάνω συμπτώματα προσομοιάζουν στην ασθένεια EBS (Georges-Labouesse E *et al.*, 1996; Van der Neut R *et al.*, 1996).

### I.IV.1.ζ Περλεκάνη

Η περλεκάνη είναι μία πενταμερής πρωτεΐνη (700 A<sup>0</sup>) που περιέχει τρεις μεγάλες αλυσίδες της γλυκάνης θειικής ηπαράνης στο αμινοτελικό της άκρο και η οποία εκφράζεται σε όλες τις βασικές μεμβράνες, στους χόνδρους και σε αρκετούς μεσεγχυματικούς ιστούς κατά την ανάπτυξη. Το μόριο αυτό προσδένει αυξητικούς παράγοντες και αλληλεπιδρά με πληθώρα εξωκυτταρικών και διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Τα ποντίκια στα οποία έχει πραγματοποιηθεί απενεργοποίηση του γονιδίου της περλεκάνης πεθαίνουν σε δυο διαφορετικά αναπτυξιακά κατώφλια. Συγκεκριμένα τα περισσότερα πεθαίνουν μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων 10.5 και 12.5 της εμβρυογένεσης, ενώ τα ελάχιστα ομόζυγα μεταλλαγμένα ποντίκια που ξεπερνούν αυτήν την πρώτη κρίση επιβιώνουν μέχρι και το στάδιο της γέννησης τους. Ο θάνατος στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια οφείλεται στον εκφυλισμό του βασικού ελάσματος του συστέλλοντος μυοκαρδίου, που έχει σαν αποτέλεσμα τη διαρροή αίματος στην περικαρδιακή κοιλότητα και στην παύση της καρδιακής λειτουργίας. Από την άλλη μεριά τα νεογέννητα ποντίκια παρουσιάζουν προβλήματα στο βασικό έλασμα των διαστελλομένων εγκεφαλικών κυστιδίων που διαχωρίζουν τον εγκέφαλο από το γειτονικό μεσέγχυμα, με αποτέλεσμα να παρατηρείται ανώμαλη νευροεπιθηλιακή επέκταση, νευρωνική παρεκτόπιση (neurogenic ectopia) και εξωεγκεφαλία.

Τονίζεται ότι αν και όλα τα συστατικά του βασικού ελάσματος που εξετάστηκαν, δεν παρουσίασαν διαταραχές στην έκφραση τους, παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στη δομή του βασικού ελάσματος σε περιοχές με αυξημένες πιέσεις (π.χ η περιοχή της Lamina densa απουσιάζει από κάποια βασικά ελάσματα), με αποτέλεσμα η περλεκάνη να θεωρείται ότι είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ακεραιότητας, αλλά όχι της συγκρότησης αυτών των βασικών ελασμάτων.

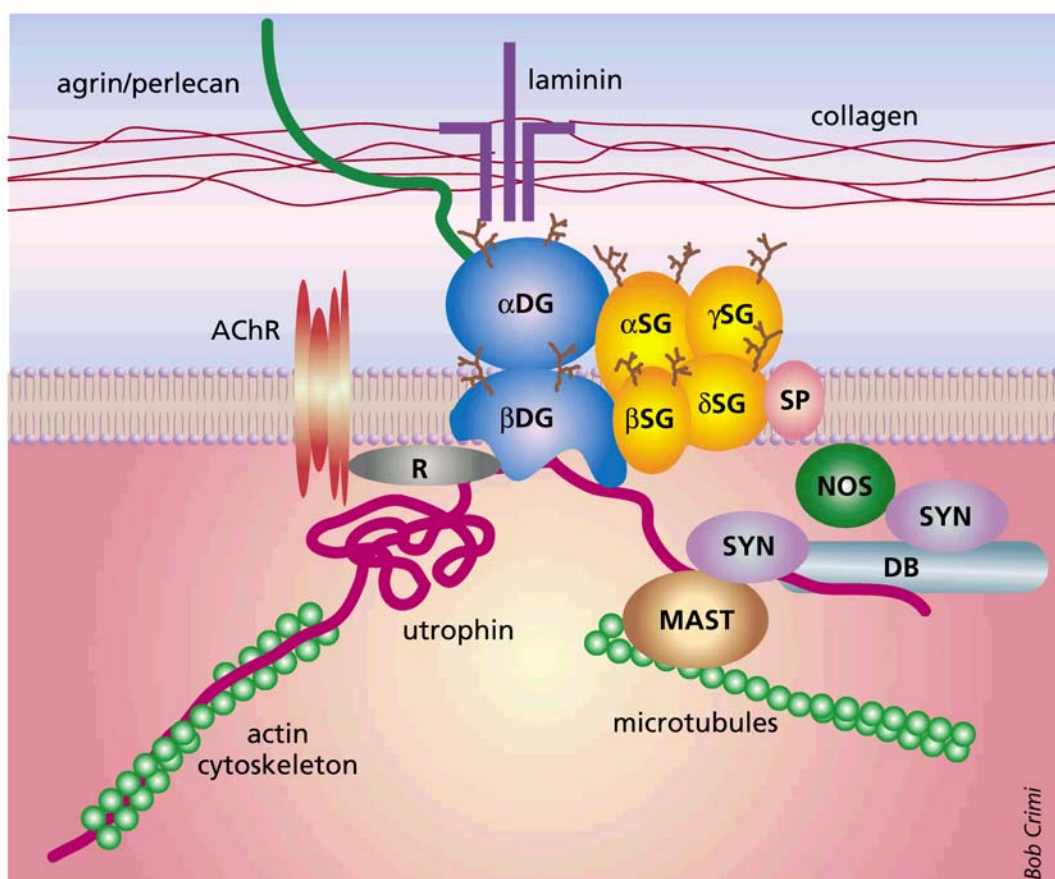
Εκτός από τις παραπάνω ανωμαλίες η απουσία της περλεκάνης προκαλεί προβλήματα στη διατήρηση του χόνδρινου ιστού, ο οποίος στερείται βασικού ελάσματος. Η περλεκάνη πιστεύεται ότι συμβάλλει στη διατήρηση της εξωκυττάριας ουσίας των χόνδρων, είτε αλληλεπιδρώντας με συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, προστατεύοντας τα από τη δράση πρωτεασών, είτε μέσω πρόσδεσης και απενεργοποίησης των πρωτεασών αυτών (Costell M *et al.*, 1999).

### I.IV.1.η Δυστρογλυκάνη

Η δυστρογλυκάνη είναι μία από τις πρωτεΐνες του πολυπεπτιδικού συμπλόκου δυστροφίνης-δυστρογλυκάνης (dystrophin-glycoprotein complex, DGC), το οποίο αποτελείται από περιφερειακές και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που συνδέουν τον κυτταροσκελετό με την εξωκυττάρια ουσία. Εκτός από τις δυστρογλυκάνες (DG) το παραπάνω σύμπλοκο περιλαμβάνει τις σαρκογλυκάνες (στην περίπτωση των μυών οι σαρκογλυκάνες παρουσιάζουν α, β, γ, δ υπομονάδες), τη σαρκοσπάνη και τις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες δυστροπίνες και συντροφίνες. (Οι δυστρογλυκάνες, οι σαρκογλυκάνες και η σαρκοσπάνη ονομάζονται και σαρκειλημματικές πρωτεΐνες, sarcolemmal proteins.) Μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν τις παραπάνω πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια της σύνδεσης κυτταροσκελετού και εξωκυττάριας ουσίας, οδηγούν σε μυϊκές δυστροφίες. Οι μυϊκές δυστροφίες αποτελούν μία ομάδα κληρονομήσιμων ασθενειών που χαρακτηρίζονται από προοδευτική μυϊκή απώλεια και εξασθένιση.

Όσον αφορά τη δυστρογλυκάνη, αυτή διασπάται πρωτεολυτικά σε δύο υπομονάδες την α και τη β. Η β υπομονάδα διαπερνάει την κυτταρική μεμβράνη και συνδέεται ενδοκυτταρικά με τα

καρβοξυτελικά άκρα των σηματοδοτικών μορίων της δυστροφίνης, ουτροφίνης, ή με κάποιες από τις ισομορφές τους. Η β-δυστρογλυκάνη συνδέεται και με την α-δυστρογλυκάνη, η οποία εντοπίζεται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και αλληλεπιδρά με τουλάχιστον τρεις εξωκυτταρικές πρωτεΐνες: την αλυσίδα α1 της λαμινίνης, την αγκρίνη και την περλεκάνη. Στην περίπτωση των μυών τόσο η α όσο και η β δυστρογλυκάνη αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο των σαρκογλυκανών, που αποτελείται από μεμβρανικές πρωτεΐνες (integral membrane proteins) και το οποίο σταθεροποιεί τη σύνδεση μεταξύ δυστρογλυκάνης και δυστροφίνης/ουτροφίνης (εικ. 5).



**Εικ. 5: Δομή του συμπλόκου DGC στη νευρομυϊκή σύναψη των θηλαστικών**

Το σύμπλοκο αυτό συνδέει την εξωκυττάρια ουσία με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης στους μύες. Rapsyn, (R) (ραψίνη); Syntrophin, SYN (συντροφίνη); dystrobrevin, DB (δυστρομπρεβίνη); neuronal nitric oxide synthase, NOS (νευρωνική συνθάση νιτρικού οξειδίου); sarcospan, SP (σαρκοσπάνη).

Οι δυστρογλυκάνες έχουν πολλαπλές λειτουργίες ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο στον οποίο εκφράζονται, όπως το σχηματισμό των βασικών ελασμάτων διαφόρων ιστών και την πρόσδεση κάποιων βακτηρίων ή ιών. (Η οργάνωση του συμπλόκου των δυστροφινών είναι παρόμοια σε όλους τους κυτταρικούς τύπους). Στην περίπτωση των μυών ο ρόλος τους διαφοροποιείται, καθώς συμβάλλει στην προστασία των μυϊκών ινών από μηχανικούς τραυματισμούς και στην συνάθροιση των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης (AChR) στην νευρομυϊκή σύναψη (NMJ) (το σύμπλοκο των δυστροφινών αλληλεπιδρά στην περίπτωση της NMJ με την αγκρίνη, τη ραψίνη (R) ή την πρωτεΐνη MAST).

Η απενεργοποίηση της δυστρογλυκάνης στα ποντίκια (*Dag1<sup>-/-</sup>*) προκαλεί εμβρυϊκό θάνατο, αφού χρειάζεται για το σχηματισμό της μεμβράνης Reichert's και για το σχηματισμό του υποενδοδερμικού βασικού ελάσματος στα εμβρυονικά σώματα.

Στη περίπτωση απενεργοποίησης της δυστρογλυκάνης στον εγκέφαλο, προκύπτουν ανωμαλίες στη νευρονική μετακίνηση που προσομοιάζουν των ανωμαλιών που παρατηρούνται στον εγκέφαλο στην συγγενή μυϊκή δυστροφία.



Όσον αφορά την απενεργοποίηση της δυστρογλυκάνης στους σκελετικούς μύες, παρατηρείται μυϊκή νέκρωση και μυϊκή δυστροφία ήπιας μορφής, χωρίς υπερτροφία και ιστική ίνωση, λόγω διατήρησης της ανανεωτικής ικανότητας των δορυφορικών κυττάρων να εκφράζουν τη δυστρογλυκάνη. Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι τα δορυφορικά κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της μυϊκής δυστροφίας. Στον άνθρωπο παρατηρούνται παρόμοια συμπτώματα κατά την διαταραχή της μεταμεταφραστικής επεξεργασίας της δυστρογλυκάνης (Cohn RD *et al.*, 2002; Chamberlain Jeffrey, 1999).

### **I.IV.1.θ Λαμινίνες**

Οι λαμινίνες είναι μεγάλες γλυκοπρωτεΐνες (500-900 kDa) που αποτελούνται από τρεις διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, την α, β και γ. Οι τρεις αυτές πολυπεπτιδικές αλυσίδες αλληλεπιδρούν, σχηματίζοντας μία τριπλή ελικοειδή περιέλιξη (triple-helical coiled-coil) και το παραγόμενο τριμερές έχει τη μορφή σταυρού (εικ. 6). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 5 διαφορετικές αλυσίδες α, 3 αλυσίδες β και 3 αλυσίδες γ και έχουν ανιχνευθεί 14 από τα 45 τριμερή που είναι πιθανό να σχηματίζουν. Όσον αφορά τις τρεις αλυσίδες γ, η γ1 εντοπίζεται σε όλες τις λαμινίνες, εκτός της λαμινίνης 5 και των λαμινινών 12 και 14 (που περιέχουν αντίστοιχα τις αλυσίδες γ2 και γ3) και περιέχει τη θέση αλληλεπίδρασης με το νιδογόνο (Willem M *et al.*, 2002).

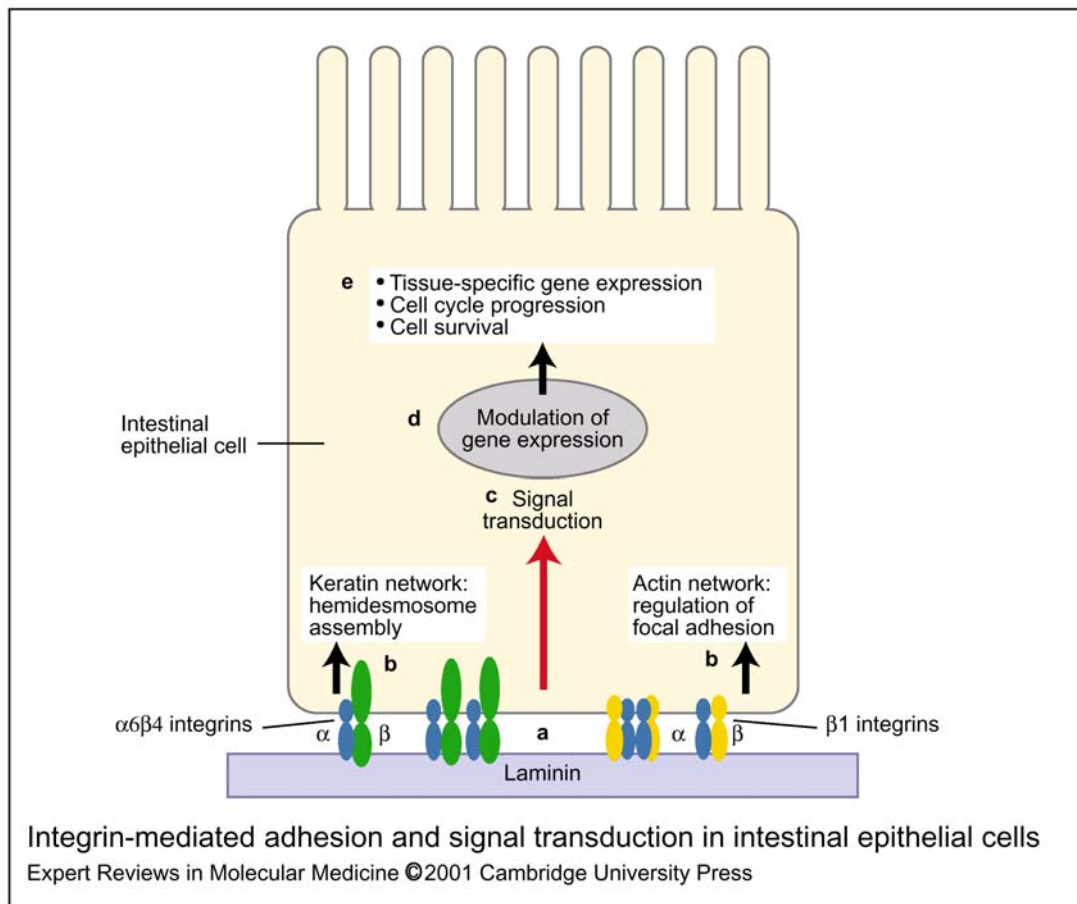
Όπως οι περισσότερες πρωτεΐνες εξωκυττάριας ουσίας, έτσι και οι λαμινίνες αποτελούνται από πολλές περιοχές, αυτόνομες δομικά και πολλές φορές και λειτουργικά. Οι περιοχές αυτές συναντώνται σε πολλές διαφορετικές και όχι απαραίτητα εξωκυττάριας πρωτεΐνες.

Οι λαμινίνες ανιχνεύονται, τόσο σε εμβρυϊκό όσο και σε ενήλικο στάδιο, στα βασικά ελάσματα ποικίλων κυτταρικών τύπων, όπως το δέρμα, οι μύες και τα νεύρα, εντοπίζονται όμως και εκτός βασικών ελασμάτων και χαρακτηρίζονται από δομικές και λειτουργικές ιδιότητες. Από τη μια μεριά οι λαμινίνες αποτελούν μη-κολλαγνώδη δομικά συστατικά των βασικών ελασμάτων, είτε λειτουργώντας σαν θέσεις πρόσδεσης για διαμεμβρανικούς υποδοχείς π.χ. ιντεγκρίνες ή δυστρογλυκάνη, είτε συμβάλλοντας στην πρόσδεση πολλών άλλων εξωκυττάριας συστατικών της. Ταυτόχρονα όμως, μέσω της σύνδεσης τους με τους μεμβρανικούς υποδοχείς, λειτουργούν και ως μόρια σηματοδότησης ρυθμίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την μετακίνηση, τη διαφοροποίηση, τη μορφολογία και την ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων (Ekblom P, 1996; Belkin AM and Stepp MA, 2000) (εικ. 6).

Όλες οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες των λαμινινών παρουσιάζουν γενικά μία δομική ομοιότητα, περιλαμβάνοντας σφαιρικές περιοχές (LG, LN, L4), επαναλήψεις που παρουσιάζουν ομολογία με τα μοτίβα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGF, LE (EGF-like laminin-repeats), καθώς και περιοχές που σχηματίζουν τις α-έλικες για την σπειροειδή περιέλιξη του τριμερούς της λαμινίνης (Patton Bruce L, 2000; Jones JC *et al.*, 2000; McGowan KA and Marinkovich MP, 2000; Aumailley Monique and Rousselle Patricia, 1999; Tunggal Patrick *et al.*, 2000) (εικ. 7).

#### **I.IV.1.θ.1 Δομικά δεδομένα που αφορούν τις λαμινίνες**

Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε η δομή της περιοχής LG των λαμινινών (Timpl Rupert *et al.*, 2000). Η περιοχή αυτή αποτελείται από 14 β-πτυχωτές δομές (A-N), οι οποίες διατάσσονται σε δύο στρώματα. Μ' αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται η δομή ενός "β-σάντουιτς", το οποίο μαζί με τις συμπεριλαμβανόμενες δομές λούπας, έχει σφαιρικό σχήμα διαμέτρου περίπου 3.5nm. Σε όλα σχεδόν τα μοτίβα LG το καρβοξυτελικό άκρο συνδέεται με την β-πτυχωτή δομή L μέσω μιας συντηρημένης δισουλφιδικής γέφυρας. Στο συγκεκριμένο μοτίβο α2LG5 που μελετήθηκε, βρέθηκε μία καινούργια θέση πρόσδεσης ασβεστίου και γύρω από αυτή θέσεις σύνδεσης και



### Εικ. 6: Προσκόλληση και μεταβίβαση σήματος μέσω ιντεγκρινών

Σαν αποτέλεσμα της πρόσδεσης λαμινινών, οι ιντεγκρίνες κινητοποιούν αλλαγές στον κυτταροσκελετό και ενεργοποιούν ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης, τα οποία οδηγούν τελικά σε τροποποιήσεις της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων, καθώς και σε ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού της διαφοροποίησης και της επιβίωσης.

άλλων δεσμευτών όπως της α-δυστρογλυκάνης, σουλφατιδίων και της ηπαρίνης. Οι θέσεις αυτές εντοπίζονται απέναντι από τα όρια των β-πτυχώσεων (εικ. 8).

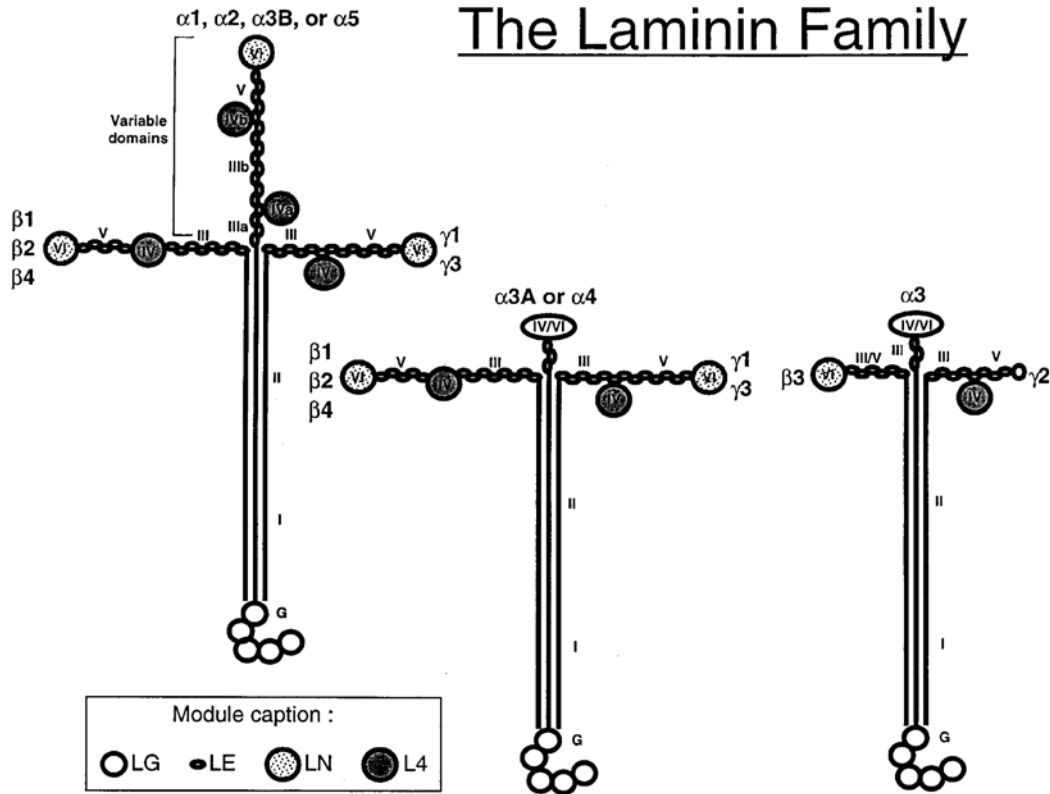
Όσον αφορά τη δομή της περιοχής G, διαπιστώθηκε ότι το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο κάθε μοτίβου LG είναι αρκετά κοντά και ότι στο μοτίβο α2LG4-LG5 ενσωματώνεται ένα τμήμα του συνδέτη LG3-LG4, σχηματίζοντας μία δισουλφιδική γέφυρα με το LG5 (εικ. 8).

Επίσης έχει προσδιοριστεί και η δομή του μοτίβου LE των λαμινινών (Timpl R, 1996; Tunggal Patrick *et al.*, 2000). Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι κάθε μοτίβο LE παρουσιάζει το ίδιο πρότυπο δισουλφιδικών δεσμών, μέσω των οποίων προκύπτουν τέσσερις χαρακτηριστικές λούπες η a, b, c, d. Τονίζεται ότι το μοτίβο LE4 της αλυσίδας γ1 των διάφορων μορίων λαμινίνης, περιέχει την χαρακτηριστική περιοχή σύνδεσης για το νιδογόνο, η οποία παρουσιάζεται σαν μια μικρή χαρακτηριστική θέση που περιλαμβάνει τα συντηρημένα αμινοξέα Asp-Pro-Asn-Ala-Val. Οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων αυτών βρίσκονται στην επιφάνεια του μορίου, στην ίδια ευθεία, ενώ περαιτέρω σταθεροποίηση αυτής της θέσης προέρχεται από δεσμούς υδρογόνου. Τα μοτίβα LE διαφέρουν γενικά στη δευτεροταγή τους δομή, στη διαμόρφωση κάθε λούπας και στην εσωτερική σταθεροποίηση τους λόγω δεσμών υδρογόνου και υδρόφοβων δεσμών (εικ. 9).

### I.IV.1.θ.2 Λαμινίνη 5

Η λαμινίνη 5 (α3β3γ2), εκτός από το ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη μορφογένεση, στην κυτταρική μετακίνηση και μετάσταση, αλλά και στην κυτταρική αύξηση, αποτελεί και τον

# The Laminin Family



**Εικ. 7:** Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών στις οποίες οργανώνονται οι αλυσίδες των λαμινινών

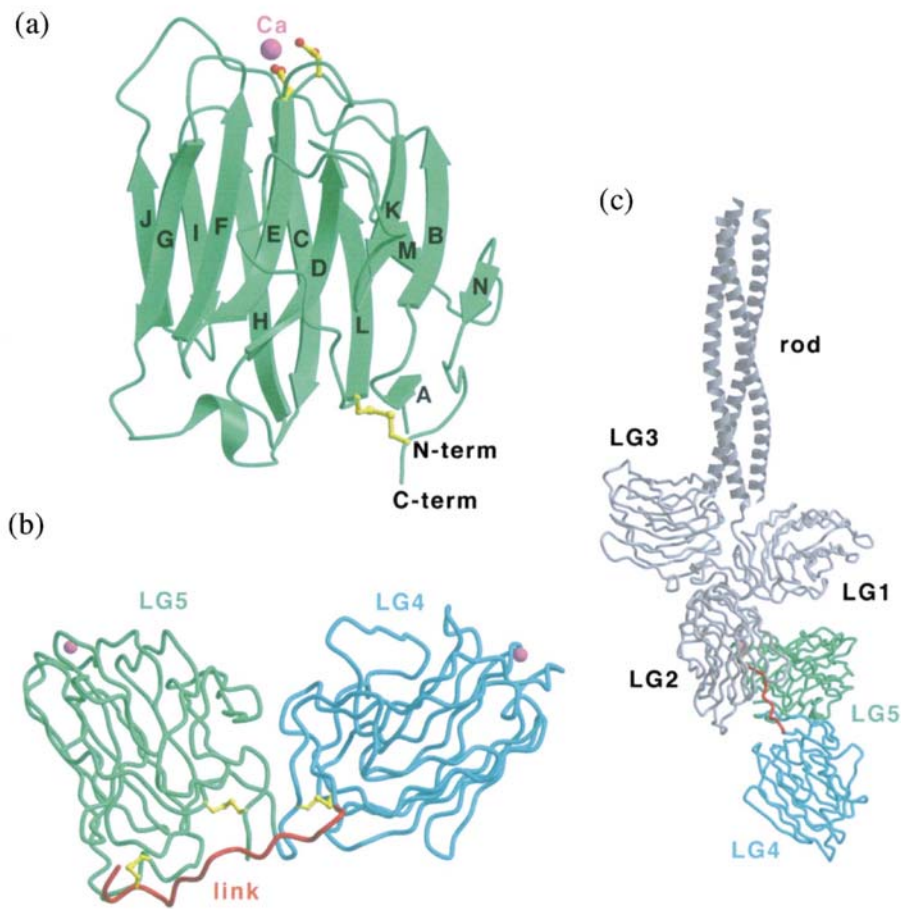
Τα μοτίβα L4 και LN είναι σφαιρικά και τοποθετούνται ανάμεσα ή εντός των μοτίβων LE και στο αμινοτελικό άκρο των αλυσίδων αντίστοιχα. Τα σφαιρικά μοτίβα LG εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο της αλυσίδας α. Οι ελικοειδείς περιοχές συμβολίζονται με γραμμές.

κυριότερο δεσμευτή σύνδεσης των επιδερμικών επιθηλίων (από τα οποία και παράγεται για να εκκριθεί στο βασικό έλασμα) με το βασικό έλασμα της επιδερμίδας.

Συγκεκριμένα μέσω της καρβοξυτελικής της περιοχής G, αλληλεπιδρά με τις ιντεγκρίνες α3β1 και α6β4 και συμβάλλει στην σταθεροποίηση του σχηματισμού των ημιδεσμοσωμάτων. Από την άλλη μεριά με την αμινοτελική της περιοχή αλληλεπιδρά με το κολλαγόνο VII και την λαμινίνη 6 (ή τη λαμινίνη 7 στο άμνιο). Το 90% της λαμινίνης 5 απαντάται στην Lamina Lucida και το υπόλοιπο 10% κατανέμεται κατά μήκος του βασικού ελάσματος στην Lamina Lucida και στην Lamina Densa, όπου συνεντοπίζεται με τα υπόλοιπα νημάτια αγκυροβόλησης.

Απενεργοποίηση στον ποντικό ενός από τα γονίδια που κωδικοποιούν για αλυσίδες της λαμινίνης 5 (LAMA3, LAMB3 LAMC2) προκαλεί στις μη τριχωτές περιοχές της επιδερμίδας, καθώς και στα βλενώδη βασικά ελάσματα νεογέννητων ποντικών, εκτεταμένη δημιουργία αιμορραγικών φουσκαλών που τελικά επιφέρουν το θάνατο. Οι αιμορραγίες στις περιοχές αυτές προηγούνται των φουσκαλών, υποδηλώνοντας ότι δεν οφείλονται σε αυτές. Το επίπεδο της αποκόλλησης των ιστών εντοπίζεται εντός της Lamina Lucida και οι ασθενείς με μεταλλαγές στα αντίστοιχα ανθρώπινα γονίδια (οι οποίες προκαλούν συνήθως πρόωρα σινιάλα τερματισμού) παρουσιάζουν την συνδετική ημιδεσμοσωμική πομφολυγώδη επιδερμόλυση (Hemidesmosomal junctional Epidermolysis Bullosa, H-JEB) (Bruckner-Tuderman L and Bruckner P., 1998; Van der Neut R *et al.*, 1999; Ryan Maureen C *et al.*, 1999).

Η λαμινίνη 5 πιστεύεται ότι εντοπίζεται και στις "πλάκες αγκυροβόλησης", συμβάλλοντας μ' αυτόν τον τρόπο στην σταθεροποίηση της σύνδεσης της επιδερμίδας με τη δερμίδα (Spirito F *et al.*, 2001). Συγκεκριμένα σε ασθενείς με μειωμένη έκφραση της λαμινίνης 5, παρατηρείται αποκόλληση του δέρματος, κυρίως κάτω από το επίπεδο της Sub Lamina Densa και λιγότερο



**Εικ. 8: Κρυσταλλική δομή του μοτίβου LG της λαμίνης**

**a** , Σχήμα της δομής  $\alpha 2\text{LG5}$ . Τα κατάλοιπα των ασπαρτικών αλληλεπιδρούν με το ασβέστιο και συμβολίζονται σαν ράβδοι και μπάλες αντίστοιχα. Η δισουλφιδική γέφυρα κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο σημειώνεται με κίτρινο χρώμα. Οι  $\beta$ -πτυχωτές δομές συμβολίζονται A-N. **b**, Ο κρίκος LG3-LG4 που συνδέεται με δισουλφιδικό δεσμό με το LG5, συμβολίζεται με κόκκινο χρώμα. **c**, Υποθετικό μοντέλο της περιοχής G της λαμίνης. Ο προσανατολισμός του συνδετικού κρίκου LG3-LG4, καθώς και των LG4-5 σε σχέση με τα LG1-3, είναι αυθαίρετος.

εντός της Lamina Lucida, δεδομένου ότι η λιγοστή ποσότητα της λαμίνης 5 συγκεντρώνεται κυρίως πάνω από τα ινίδια αγκυροβόλησης. Κατά συνέπεια στους ασθενείς αυτούς παρατηρείται πιο συχνά η συνδετική, μη ημιδεσμοσωμική, πομφολυγώδη επιδερμόλυση (non Hemidesmosomal junctional Epidermolysis Bullosa, nH-JEB), η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία ημιδεσμοσωμάτων και αποτελεί ηπιότερη μορφή της H-JEB.

**I.IV.1.θ.3 Λαμίνη γ1**

Η απενεργοποίηση της λαμίνης γ1 έχει σαν αποτέλεσμα την έλλειψη των 10 από τις 14 γνωστές μέχρι σήμερα λαμίνες, την έλλειψη όλων των βασικών ελασμάτων και τον θάνατο την ημέρα 5.5 της εμβρυογένεσης λόγω προβλημάτων στην εκτοδερμική και ενδοδερμική κυτταρική διαφοροποίηση (Aumailley Monique and Rousselle Patricia, 1999).

#### I.IV.1.θ.4 Λαμινίνη α2

Η απουσία της λαμινίνης α2 επιφέρει συμπτώματα μυϊκής δυστροφίας σοβαρής μορφής και θάνατο εντός πέντε εβδομάδων μετά τη γέννηση (McGowan KA and Marinkovich MP, 2000).

#### I.IV.1.θ.5 Λαμινίνη β2

Τα ομόζυγα μεταλλαγμένα ζώα β2<sup>-/-</sup> παρουσιάζουν πρωτεϊνουρία, λόγω αλλοίωσης της λειτουργίας του βασικού ελάσματος στο σπείραμα των νεφρών, αλλά και ανωμαλίες στη δομή των νευρομυϊκών συνάψεων (McGowan KA and Marinkovich MP, 2000).

#### I.IV.1.ι Νιδογόνο

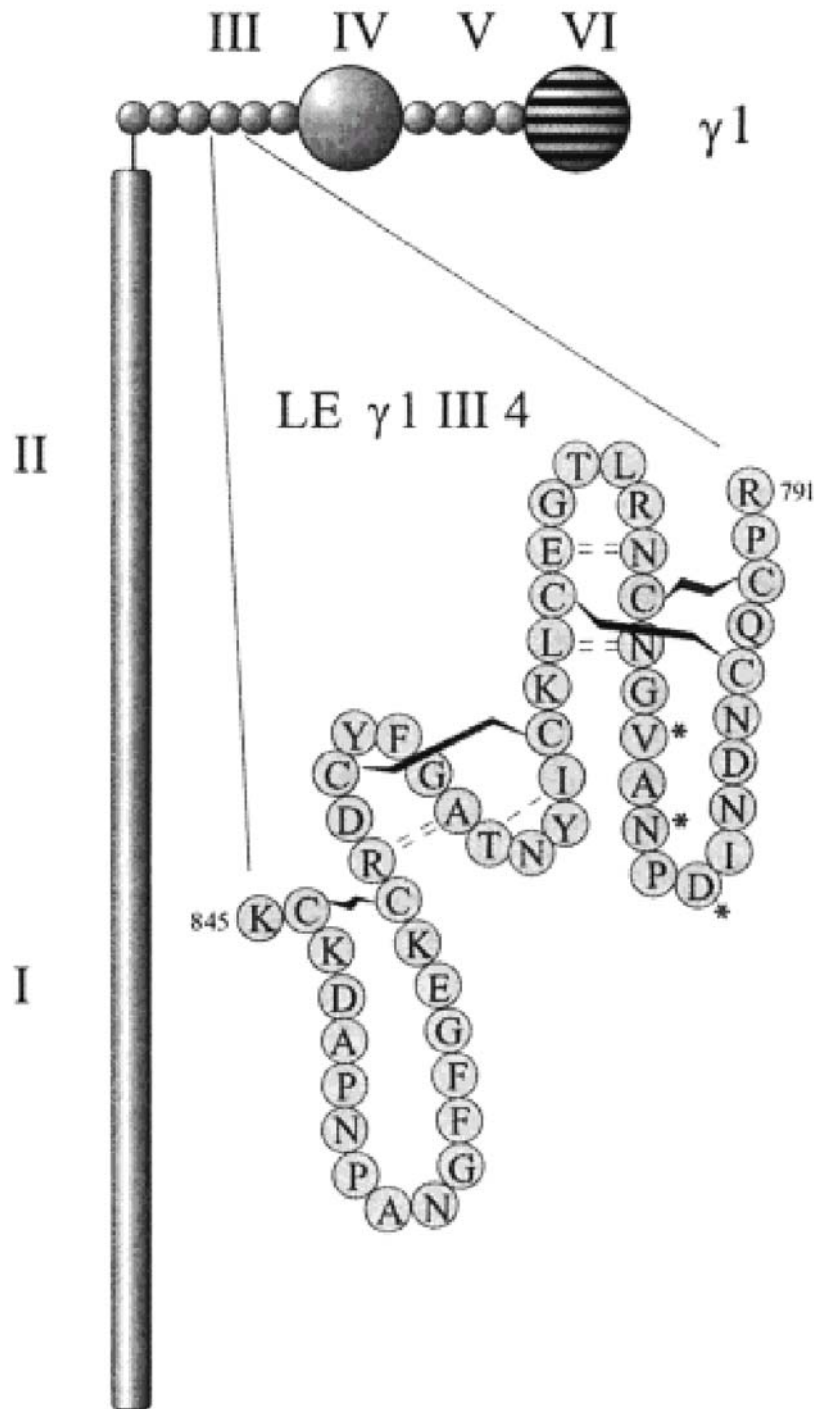
Το νιδογόνο είναι μία σχετικά μικρή πρωτεΐνη (150 kDa). Η απενεργοποίηση στον ποντικό των γονιδίων που κωδικοποιούν τόσο το νιδογόνο 1 όσο και το νιδογόνο 2 δεν προκαλεί κάποιο φανερό φαινοτυπικό αποτέλεσμα (πιθανότατα λόγω επικάλυψης του ρόλου της κάθε ισομορφής νιδογόνου από άλλες ισομορφές), ενώ η απενεργοποίηση και των δύο γονιδίων ταυτόχρονα δεν έχει ακόμα πραγματοποιηθεί. Ο ρόλος του νιδογόνου μελετήθηκε με την απενεργοποίηση της θέσης πρόσδεσης του στην αλυσίδα γ1 των λαμινινών. (Τόσο η αλυσίδα γ1 της λαμινίνης, όσο και το νιδογόνο 1 πρωτοεμφανίζονται στο στάδιο των 4 και 32 κυττάρων της εμβρυϊκής ανάπτυξης αντίστοιχα.)

Στην περίπτωση της απενεργοποίησης αυτής, παρατηρούνται νεφρικές και πνευμονικές ανωμαλίες, οι οποίες οφείλονται στην δημιουργία εντοπισμένων και περιορισμένων ρήξεων στο βασικό έλασμα του επιμήκη σωλήνα Wolfiann στα νεφρά και των κυψελιδικών κυστιδίων (alveolar sacculi) στους πνεύμονες. Παρόλο που η αλληλεπίδραση λαμινίνης-νιδογόνου δεν προαπαιτείται για το σχηματισμό των βασικών ελασμάτων, πιστεύεται ότι η απουσία της είναι υπεύθυνη είτε:

**α)** για αλλαγές στην δομή του βασικού ελάσματος, οι οποίες ενδέχεται να παρεμποδίζουν τη συνάθροιση μορφογενετικών και αυξητικών παραγόντων, απαραίτητων για ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια.

**β)** για την έλλειψη σταθερότητας του βασικού ελάσματος, που οδηγεί πιθανότατα στην διαταραχή του κατά ένα στοχαστικό τρόπο.

Τα παραπάνω ποντίκια πεθαίνουν αμέσως μετά τη γέννηση εξαιτίας προβλημάτων στο σχηματισμό της μεσόφασης (βασικό έλασμα) του αιματοαναπνευστικού φραγμού (Willem M *et al.*, 2002).



**Εικ. 9:** Σχηματική αναπαράσταση της αλυσίδας  $\gamma 1$  της λαμίνινης και απεικόνιση της θέσης πρόσδεσης του νιδογόνου-1, LE  $\gamma 1$ III4  
 Τα αμινοξέα που συμβολίζονται με αστερίσκο αλληλεπιδρούν άμεσα με το νιδογόνο-1. Οι μαύρες γραμμές, οι οποίες συνδέουν τις κυστεΐνες συμβολίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς και οι διακεκομμένες γραμμές τους δεσμούς υδρογόνου που σταθεροποιούν τη β-δομή.

## I.V Σύνοψη αποτελεσμάτων και γενικά συμπεράσματα

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αφορούν:

**A)** Την απομόνωση του cDNA, μεγέθους 15.685 bp, του γονιδίου *Fras1*, το οποίο κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη με 4010 αμινοξέα. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται από την παρουσία διαφορετικών πρωτεϊνικών περιοχών με ξεχωριστές λειτουργίες, οι οποίες εντοπίζονται σε διάφορες κατηγορίες πρωτεϊνών ποικίλων οργανισμών. Όσον αφορά τον κυτταρικό εντοπισμό της *Fras1* (η οποία διαπιστώθηκε ότι είναι επιθηλιακής προέλευσης), αυτή ανιχνεύθηκε στον εξωκυττάριο χώρο της βασικής πλευράς των περισσότερων επιθηλίων, προς το μέρος του βασικού τους ελάσματος, αλλά και στο εσωτερικό νευρικών και μυϊκών κυττάρων.

**B)** Την χαρτογράφηση του γονιδίου *Fras1* στο χρωμόσωμα 5 του ποντικού και στη συντενική περιοχή του χρωμοσώματος 4 στον άνθρωπο (4q13-q21).

**Γ)** Τη δημιουργία *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών. Τα ποντίκια αυτά εμφανίζουν χαρακτηριστικές υποεπιδερμικές φλύκταινες (φουσκάλες, Blisters), καθώς και μονόπλευρη ή αμφίπλευρη νεφρική αγενεσία κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Τα μεταλλαγμένα ποντίκια *Fras1*<sup>-/-</sup> που καταφέρνουν να επιβιώσουν, χαρακτηρίζονται από την συνένωση βλεφάρων στο ένα ή και στα δύο μάτια (κρυπτοφθαλμία), από ανωμαλίες στα άκρα που αρκετές φορές αφορούν συνδακτυλίες και από μονόπλευρη νεφρική αγενεσία ή μονόπλευρη/αμφίπλευρη νεφρική δυσπλασία. Παρουσιάζουν επίσης σκελετικά προβλήματα και δυσμορφίες στην περιοχή του εγκεφάλου, καθώς και προβλήματα σε διάφορα άλλα όργανα όπως στους πνεύμονες, στο ήπαρ και στο έντερο.

Τα κυριότερα συμπεράσματα τα οποία προέκυψαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας είναι τα παρακάτω:

- Η πρωτεΐνη *Fras1*, που αποτελεί ένα καινούργιο συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας των περισσότερων επιθηλιακών κυττάρων, πιθανότατα συμμετέχει στη σταθεροποίηση των βασικών τους ελασμάτων. Πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, η *Fras1* πιστεύεται ότι συμβάλλει στη συγκρότηση και στη συνάθροιση, ορισμένων τουλάχιστον, μακρομορίων της κατώτερης περιοχής του βασικού της ελάσματος (το οποίο έρχεται σε επαφή με τη δερμίδα), προσφέροντας το απαραίτητο δομικό ικρίωμα για την τοποθέτησή τους.

- Ο συσχετισμός των ποντικών *Fras1*<sup>-/-</sup> με τα ήδη υπάρχοντα μεταλλάγματα “blebbed” του ποντικού. Αυτός βασίστηκε **α)** στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της απενεργοποίησης του γονιδίου *Fras1*, που κυριολεκτικά αντιγράφουν το φαινότυπο που παρουσιάζουν τα μεταλλάγματα “blebbed” (Darling and Gossler, 1994; Green MC, 1989), **β)** στη χαρτογράφηση τόσο του *Fras1* όσο και της μεταλλαγής “blebbed” πλησίον του γενετικού τόπου *Fgf5* στο χρωμόσωμα 5 του ποντικού, **γ)** στην απώλεια έκφρασης της *Fras1* στα “blebbed” ποντίκια και **δ)** στην εύρεση μεταλλαγής στο *Fras1* στα ποντίκια “blebbed” (McGregor L, *et al.*, 2003).

- Η δημιουργία μοντέλου εργασίας στον ποντικό, με την απενεργοποίηση του γονιδίου *Fras1*, για το σύνδρομο Fraser. Το σύνδρομο αυτό αποτελεί μία σπάνια κληρονομήσιμη ανθρώπινη ασθένεια με κυρίαρχα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά την μερική ή ολική κρυπτοφθαλμία, την μερική συνδακτυλία και την μονόπλευρη ή αμφίπλευρη νεφρική αγενεσία ή δυσπλασία (Slavotinek and Tiffet, 2002). Στην διαπίστωση αυτή, που στηρίχτηκε στην υπόθεση ότι τα ποντίκια bleb σχετίζονται με το σύνδρομο Fraser (Winter RM, 1988; Winter, RM 1990), συνέβαλλαν τα παρόμοια χαρακτηριστικά των μεταλλαγμάτων *Fras1*<sup>-/-</sup> με αυτά των ασθενών με το σύνδρομο Fraser, καθώς και η εύρεση μεταλλαγών στο FRAS1 σε ασθενείς με αυτό το σύνδρομο (McGregor L, *et al.*, 2003).

- Η απαρχή της αποκάλυψη της μοριακής βάσης του φαινοτύπου “blebbed” στον ποντικό και του συνδρόμου Fraser στον άνθρωπο, η οποία όπως προκύπτει από την παρούσα μελέτη, οφείλεται πιθανότατα σε ανωμαλίες της εξωκυττάριας ουσίας που υπόκειται των επιθηλίων.

## I. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

### I.1 Τεχνικές ανασυνδυασμού του DNA

#### I.1.1 Τυποποιημένες διαδικασίες χειρισμού του DNA

Παρακάτω αναφέρονται οι διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του εργαστηριακού εγχειριδίου Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 2nd. Ed (Sambrook *et al.*, 1989):

- 1) Οι ενζυματικοί χειρισμοί του DNA που περιλαμβάνουν αντιδράσεις πέψης με ενδονουκλεάσες περιορισμού, υδρόλυσης των 5' ελεύθερων φωσφορικών ομάδων του με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (CIP), τροποποίησης των άκρων του με DNA πολυμεράση I (Klenow fragment) και σύνδεσης μορίων DNA με το ένζυμο T4 DNA λιγάση.
- 2) Η διαδικασία που ακολουθείται για τον μετασχηματισμό βακτηριακών στελεχών από πλασμιδικές κατασκευές.
- 3) Ο διαχωρισμός μορίων νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης και σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.
- 4) Η απομόνωση πλασμιδικού DNA σε μικρή κλίμακα.
- 5) Η απομόνωση πλασμιδικού DNA σε μεγάλη κλίμακα, μέσω της αλκαλικής λύσης σε συνδυασμό με κατακρήμνιση από πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG-8000).
- 6) Η ραδιοσήμανση μορίων DNA με  $\alpha[^{32}\text{P}]\text{-dATP}$  και  $\alpha[^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  για την απόκτηση ραδιενεργών ανιχνευτών, μέσω της μεθόδου των τυχαίων εκκινήτων (Random Priming).
- 7) Η ραδιοσήμανση μονόκλωνων συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων με  $\gamma[^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ , με τη χρήση πολυνουκλεοτιδικής κινάσης T4.
- 8) Η διαδικασία του Southern Blot.

#### I.1.2 Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA

Η εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας διαφόρων τμημάτων DNA έγινε:

- 1) Με τη μέθοδο Sanger (Sanger *et al.*, 1977), η οποία αφορά τον τερματισμό της αλυσίδας DNA μέσω της ενσωμάτωσης τριφωσφορικών δι-δεοξυνουκλεοτιδίων. Τα δείγματα DNA που αναλύονται έχουν προηγουμένως κατεργαστεί με Πρωτεϊνάση K για δύο ώρες στους 55°C. Η πρωτεϊνάση K δρα σε διάλυμα που περιέχει 0.02 % SDS, 100 mM NaCl, 50 mM Tris.HCl pH 7.5, 2 mM EDTA και χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 0.05 ng/μλ.
- 2) Με το μηχάνημα του αυτόματου Sequencer ABI399 Prism°, στο εργαστήριο του Καθ. Κ. Λούη.

#### I.1.3 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων

##### Υλικά

##### **LB:**

10 g tryptone peptone  
8 g NaCl  
5 g εκχύλισμα ζύμης  
7.5 ml 1N NaOH

##### **Διαδικασία**

100 ml θρεπτικού διαλύματος LB εμβολιάζεται με 1/100 ολονύκτιας καλλιέργειας κύτταρων μέχρι η O.D των κυττάρων στα 560 nm να φτάσει την τιμή 0.36-0.44. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2.500 στροφές, για 10 λεπτά, στους 4°C, επαναδιάλυση σε 10 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>, επώαση στον πάγο για 30 λεπτά και επαναφυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Τελικά τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10 ml διαλύματος που περιέχει 50 mM CaCl<sub>2</sub> και 10% γλυκερόλη και φυλάσσονται στους -80°C.

#### I.1.4 Παρασκευή ηλεκτροδεκτικών κυττάρων



## Υλικά

### **LB:**

10 g tryptone peptone  
2 g NaCl  
5 g εκχύλισμα ζύμης  
pH 7.0 NaOH

### **Διαδικασία**

Ακολουθείται ανάλογη πορεία με τη διαδικασία παρασκευής επιδεκτικών κυττάρων, μόνο που τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε παγωμένο H<sub>2</sub>O. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 4-5 φορές. Οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιούνται στις 4.000 στροφές, για 15 λεπτά, στους 4°C και τελικά τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε υδατικό διάλυμα 10 % γλυκερόλης.

## **I.I.5 Μετασχηματισμός ηλεκτροδεκτικών κυττάρων με τη μέθοδο της παροχής ηλεκτρικού πεδίου (electroporation)**

Η διαδικασία που ακολουθείται για τον μετασχηματισμό επιδεκτικών βακτηριακών στελεχών με τη μέθοδο της παροχής ηλεκτρικού πεδίου, περιγράφεται στο εγχειρίδιο του ειδικού μηχανήματος ECM399 (electroporator) της εταιρίας BTX και πραγματοποιείται στα 1600 Volts.

## **I.I.6 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης**

Η απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται με διαδοχική ψύξη με υγρό άζωτο και θέρμανση στους 70°C του τμήματος της αγαρόζης που περιέχει το ζητούμενο τμήμα του DNA (διαδικασία που επαναλαμβάνεται 3-4 φορές). Ακολουθεί προσθήκη φαινόλης, επώαση στους 70°C για 1-2 λεπτά και ισχυρή ανακίνηση. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 2-3 φορές, για να ακολουθήσει ψύξη με υγρό άζωτο και φυγοκέντρωση για 40 λεπτά, στους -4°C. Στην συνέχεια πραγματοποιούνται εκχυλίσεις με χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη και κατακρήμιση του DNA με αιθανόλη.

## **I.II Τεχνικές ανάλυσης RNA**

### **I.II.1 Απομόνωση RNA από ιστούς ή έμβρυα ποντικού**

## Υλικά

### **Διάλυμα D:**

4 M guanidium thiocyanate (θειοκυανική γουανιδίνη)  
25 mM κιτρικό νάτριο pH 7.0  
0.5 % Sarcosyl  
0.1 M μερκαπτοαιθανόλη 2 (η οποία προστίθεται πριν χρησιμοποιηθεί το διάλυμα D)  
**Όξινο νάτριο 2 M pH 4.0**  
**Όξινη φαινόλη**  
**1xPBS**  
**RNasin:40 U/λ (Promega)**  
(Όλα τα διαλύματα φυλάσσονται στους 4°C)

### **Διαδικασία**

Όλα τα παρακάτω βήματα πραγματοποιούνται στο πάγο, έτσι ώστε να μειωθεί η δράση των ριβονουκλεασών.

-Απομόνωση του εμβρύου ή του ιστού και ξέπλυμα πολλές φορές με 1xPBS.

-Στην περίπτωση εμβρύου ημέρας 15.5 (E15.5) ομογενοποιούμε το έμβρυο (με μηχανικό ομογενοποιητή) σε 5 ml διαλύματος D.

-Στην συνέχεια προστίθεται 0.5 ml οξικού οξέος, 5 ml όξινης φαινόλης και λίγο περισσότερο από 1 ml διαλύματος που περιέχει χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 24:1. Μετά από κάθε προσθήκη ακολουθεί ανακίνηση, που στο τελευταίο στάδιο διαρκεί τουλάχιστον 2 λεπτά.

-Το μείγμα αφήνεται στον πάγο για 15 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 3200 rpm, για 20 λεπτά.

-Ακολούθως προστίθεται μείγμα ουδέτερης φαινόλης:χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25:24:1, πραγματοποιείται ανακίνηση για 2 τουλάχιστον λεπτά και φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες με προηγούμενως.

-Το RNA κατακρημνίζεται με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης, επώαση στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για περισσότερο από μία ώρα και φυγοκέντρωση για 20-30 λεπτά, στους  $4^{\circ}\text{C}$ , στις 10.000 rpm.

-Το ίζημα ξεπλένεται με 75 % αιθανόλη και τελικά επαναδιαλύεται σε 30-200 μl διπλά κλιβανισμένου νερού. Στο διάλυμα προστίθεται και RNasin, σε ποσοστό 0.2 % και φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**(Reference: Chomozynski *et al.*, 1987)**

## **I.II.2 Παρασκευή cDNA με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης και RT-PCR**

### **Υλικά**

#### **5xRT-buffer:**

250 mM Tris pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT

#### **εκκινητές (100 ng/μl):**

τυχαία εξαμερή

#### **μείγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (20 mM):**

5 mM dCTP

5 mM dATP

5 mM dTTP

5 mM dGTP

#### **Αντίστροφη μεταγραφάση (M-MLV, Promega 200 U/μl)**

#### **Διαδικασία**

-Αναμιγνύονται:

1 μg RNA

10 μl 5xRT-buffer

3 μl εκκινητών

10 μl μείγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων

H<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 49 μl

-Το παραπάνω μείγμα επωάζεται στους  $65^{\circ}\text{C}$ , για 5 λεπτά και αφήνεται στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

-Στη συνέχεια προστίθεται 1 μl αντίστροφης μεταγραφάσης και το μείγμα επωάζεται στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 45 λεπτά.

#### **Ακολουθεί PCR:**

Οι ποσότητες και οι όγκοι που χρησιμοποιούνται είναι οι ίδιες με αυτές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου του γονιδίου *Fras1* (κύττα **V.II**), με τη διαφορά ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση η ποσότητα της μήτρας (template) που χρησιμοποιείται είναι 2 μl από το μείγμα της παραπάνω αντίδρασης. Παρομοίως οι συνθήκες για το PCR είναι ανάλογες μ' αυτές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου του γονιδίου *Fras1*, με εξαίρεση τη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών με τη μήτρα, που καθορίζεται από τη θερμοκρασία τήξης τους (melting temperature  $T_m$ ).

## **I.II.3 Εύρεση των μεταγράφων του γονιδίου *Fras1* με τη μέθοδο του Northern Blot**

Η μεμβράνη η οποία χρησιμοποιήθηκε είναι από την CLONTECH (Mouse Embryo Multiple Tissue Northern MTN™ Blot). Η μεμβράνη αυτή περιέχει poly A<sup>+</sup> RNA από έμβρυα 7, 11, 15 και 17

ημερών. Οι συνθήκες υβριδοποίησης έγιναν με βάση το πρωτόκολλο της CLONTECH (Hybridization of cDNA probes to MTN Blots).

Οι ανιχνευτές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν είναι:

A) Το κομμάτι του cDNA του *Fras1* μεγέθους 896 bp, από 1291-2187 bp.

B) Το κομμάτι του cDNA του *Fras1* μεγέθους 750 bp, από 3.533-4.290 bp.

Τα τμήματα αυτά του cDNA σημάνθηκαν ραδιενεργά με την μέθοδο των τυχαίων εκκινήτων (Random Priming).

## II. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΦΑΓΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ

Οι βιβλιοθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

**α)** Μια βιβλιοθήκη cDNA (**home made**) η οποία περιέχει ενθέματα cDNA μεγέθους 1-4 Kb κλωνοποιημένα σε φαγικούς φορείς. Συγκεκριμένα οι κλώνοι cDNA της βιβλιοθήκης αυτής προκύπτουν μέσω της δράσης του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης, η οποία χρησιμοποιεί σαν καλούπι RNA που έχει απομονωθεί από τον εγκέφαλο εμβρύου ποντικού ημέρας 14.5 και τόσο τυχαίους, όσο και oligodTTT εκκινήτες. Τα κομμάτια cDNA που προκύπτουν μ' αυτόν τον τρόπο υφίστανται κατεργασία με πολυμεράση Klenow, ώστε να παρουσιάζουν λεία άκρα και στη συνέχεια συνδέονται σε κάθε άκρο τους με τμήματα DNA που ονομάζονται αλληλουχίες σύνδεσης (linkers). Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι αλληλουχίες αυτές περιλαμβάνουν τις περιοριστικές θέσεις για τα ένζυμα EcoRI και NotI (η περιοριστική θέση NotI εντοπίζεται εξωτερικά της EcoRI). Οι κλώνοι cDNA στη βιβλιοθήκη αυτή (μεγέθους 1-4 Kb) είναι κλωνοποιημένοι στο φαγικό φορέα λExCell EcoRI/CIP στη θέση EcoRI. Ο φορέας αυτός έχει μέγεθος 45.5 Kb, προέρχεται από ένα φορέα λ charon, ο οποίος έχει τροποποιηθεί κατάλληλα έτσι ώστε να περιέχει ένα εσωτερικό γραμμοποιημένο φαγεμιδιακό φορέα και μπορεί να μολύνει κύτταρα *E.coli* της κατηγορίας NM522, NP66 ή LE392 (εικ.1).

Τονίζουμε ότι το στέλεχος NP66, περιέχοντας τις απαραίτητες βοηθητικές πρωτεΐνες, διευκολύνει την *in vivo* απελευθέρωση ενός κυκλικού αυτόνομα αντιγραφόμενου φαγεμιδίου, του pExCell. Η *in vivo* αποκοπή του φαγεμιδίου πραγματοποιείται μέσω τοποειδικού ανασυνδυασμού μεταξύ των θέσεων attL και attR, οι οποίες περιβάλλουν το φαγεμιδίο στον φαγικό φορέα. Οι βοηθητικές πρωτεΐνες του στελέχους NP66 βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο ενός θερμοεπαγόμενου υποκινητή, με αποτέλεσμα η αποκοπή να πραγματοποιείται μόνο όταν μετά την διαμόλυση των κυττάρων NP66 από τον φάγο λExCell αυτά μεγαλώνουν στους 39°C (Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 2nd. Ed.1989).

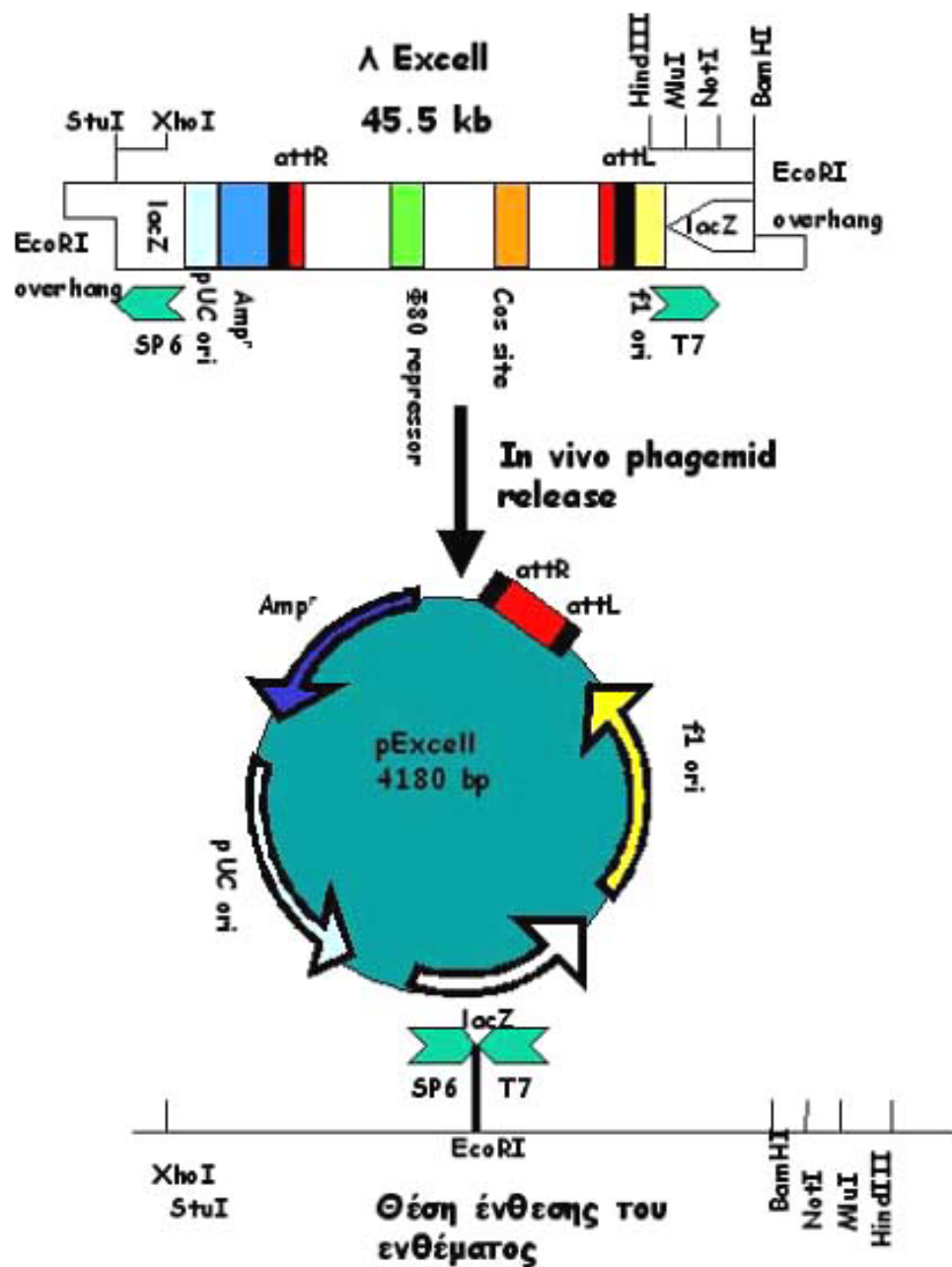
**β)** Μία γενωμική βιβλιοθήκη η οποία περιλαμβάνει ενθέματα γενωμικού DNA που έχει απομονωθεί από πολυδύναμα προγονικά κύτταρα ποντικού του στελέχους Sv129 (129/OLA genomic library). Τα τμήματα του γενωμικού DNA έχουν προκύψει από μερική πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Sau3A και έχουν κλωνοποιηθεί στον φαγικό φορέα λGEM<sub>TM</sub>-12vector (που προσφέρθηκε από τον **Anton Berns**), στην περιοριστική θέση NotI. Σε κάθε ένθεμα έχει προστεθεί εκατέρωθεν συνδέτης που αποτελείται από τα περιοριστικά ένζυμα XmaI, BamHI, SacII, EcoRI, NotI (με κατεύθυνση από το ένθεμα προς τον φορέα). Ο φορέας αυτός μολύνει μεταξύ άλλων και κύτταρα *E.coli* του τύπου LE392 και μπορεί να δεχτεί ενθέματα μεγέθους 9-23 Kb.

### II.1 Ετοιμασία τρυβλίων για άπλωμα βιβλιοθήκης

#### Υλικά

##### **1 lt NZY:**

5 g NaCl, 2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 g Yeast Extract, 10 g NZ Amine (casein hydrolysate), 4.5 ml 1N NaOH pH 7.5, 15 g agar ή 7 g αγαρόζη για Top agarose



**Εικ. 1:** Φαγικός φορέας λ Excell και *in vivo* αποκοπή του φαγεμιδίου

Στο σχήμα απεικονίζεται ο φαγικός φορέας λ Excell, με τις χαρακτηριστικές αμινοξικές περιοχές του και μερικές μοναδιαίες περιοριστικές θέσεις, το φαγεμίδιο που προκύπτει με αποκοπή ύστερα από ανασυνδυασμό μεταξύ των θέσεων attR και attL, καθώς και η θέση εισαγωγής των κλώνων cDNA.

### **Διαδικασία**

- Χρησιμοποιούνται τρυβλία διαστάσεων 24x24.
- Σε κάθε τρυβλίο προστίθενται 300 ml θρεπτικού μέσου NZY.
- Τα τρυβλία παραμένουν ολονυκτίως σε θερμοκρασία δωματίου.

## **II.II Απλωμα φαγικής βιβλιοθήκης**

### **Υλικά**

#### **1 lt LB:**

8 g NaCl, 10 g Bacto-Tryptone, 5 g Yeast Extract, 7.5 ml 1N NaOH

#### **1 lt NZY:**

5 g NaCl, 2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 g Yeast Extract, 10 g NZ Amine (casein hydrolysate), 4.5 ml 1N NaOH pH 7.5

#### **1 lt SM:**

5.8 g NaCl, 2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 50 ml 1 M Tris-HCl pH 7.5, 100 mg ζελατίνη ή 5 ml από διάλυμα 2 % ζελατίνης

#### **Top agarose:**

1 lt NZY, 7 g αγαρόζη, 20 % Μαλτόζη, 1 M MgSO<sub>4</sub>

### **Διαδικασία**

-Ολονύκτια επώαση κυττάρων NM522, σε θρεπτικό μέσο LB που περιέχει 0.2 % Μαλτόζη και 10 mM MgSO<sub>4</sub>, ή εναλλακτικά κυττάρων LE392, σε θρεπτικό μέσο NZY που περιέχει 0.2 % Μαλτόζη. Και στις δυο περιπτώσεις η επώαση πραγματοποιείται στους 37°C.

-Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 1000 στροφές, για 10 λεπτά, στους 4°C και το ίζημα των κυττάρων διαλυτοποιείται σε διάλυμα 10 mM MgSO<sub>4</sub>, όγκου ίσου με το μισό του όγκου της ολονυκτίας κυτταρικής καλλιέργειας.

-Στην περίπτωση της βιβλιοθήκης cDNA, ακολουθεί επώαση 3 ml κυττάρων NM522 με 13.3 μλ βιβλιοθήκης, αραιωμένης 1/100, στους 37°C, για 20 λεπτά. Σημειώνεται ότι έχει προηγηθεί τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης, η οποία έδειξε ότι 13.3 μλ, από 1/100 αραιώση, περιέχουν περίπου 200.000 φάγους.

Ανάλογα, στην περίπτωση της γενωμικής βιβλιοθήκης, που η τιτλοδότηση έδειξε ότι 1 μλ περιέχει περίπου 28.000 φάγους, επωάζονται 3 ml LE392 με 7 μλ γενωμικής βιβλιοθήκης, στους 37°C, για 20 λεπτά.

-Στη συνέχεια το παραπάνω μίγμα ανακατεύεται με 30 ml Top agarose και απλώνεται σε τρυβλίο 24x24. Και στις δύο περιπτώσεις βιβλιοθηκών χρησιμοποιούνται συνολικά 800.000 φάγοι, οι οποίοι μοιράζονται σε τέσσερα πιάτα.

-Ακολουθεί επώαση στους 37°C.

## **II.III Μεταφορά των φαγικών πλακών σε μεμβράνες**

### **Υλικά**

#### **Διάλυμα αποδιάταξης:**

0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl

#### **Διάλυμα ουδετεροποίησης:**

0.5 M Tris-Cl pH 7.4, 1.5 M NaCl

### **Διαδικασία**

-Οι μεμβράνες τοποθετούνται προσεκτικά στα τρυβλία.

-Αφήνονται για 2 λεπτά και μαρκάρονται με τη βοήθεια βελόνης.

-Στη συνέχεια υφίστανται κατάλληλη επεξεργασία που περιλαμβάνει:

- α) εμφύσηση σε διάλυμα αποδιάταξης για 2 λεπτά
- β) εμφύσηση σε διάλυμα ουδετεροποίησης για 5 λεπτά και
- γ) ξέπλυμα των μεμβρανών με 2xSSC

-Ακολουθεί μονιμοποίηση του DNA με υπεριώδη διασύνδεση (U.V-crosslinking)

## **II.IV Προβριδοποίηση/Υβριδοποίηση και πλουσίματα των μεμβρανών**

### Υλικά

#### **Διάλυμα Προυβριδοποίησης/Υβριδοποίησης:**

3xSSC, 0.1 % SDS, 10x Denhard's (100x:2 %BSA, 2 %Ficoll 400, 2 % polyvinyl pyrrolidone), 75 µg/ml salmon sperm DNA

Διαλύματα για τα πλυσίματα των μεμβρανών:

Διάλυμα I: 3xSSC, 0.1 %SDS

Διάλυμα II: 0.3xSSC, 0.1 %SDS

Διάλυμα III: 0.1xSSC, 0,1 %SDS

### **Διαδικασία**

-Οι μεμβράνες ξεπλένονται με διάλυμα που περιέχει 0.3xSSC και 0.1 %SDS.

-Ακολουθεί η διαδικασία της προϋβριδοποίησης. Οι μεμβράνες εμβαπτίζονται με το διάλυμα προϋβριδοποίησης, για 2 ώρες τουλάχιστον.

-Στη συνέχεια υβριδοποιούνται με το διάλυμα υβριδοποίησης, το οποίο είναι ίδιο με το διάλυμα προϋβριδοποίησης, με τη διαφορά ότι περιέχει και τον κατάλληλο ραδιενεργό ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής έχει προηγουμένως αποδιαταχθεί στους 100°C, για 5 λεπτά. Η διαδικασία της υβριδοποίησης διαρκεί όλη νύχτα.

-Τα πλυσίματα των μεμβρανών πραγματοποιούνται με τα διαλύματα I,II,III. Το ξέπλυμα με κάθε διάλυμα γίνεται τρεις φορές, για 10 λεπτά κάθε φορά.

-Τελικά οι μεμβράνες εκθέτονται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

## **II.V Συλλογή των κατάλληλων πλακών**

-Οριοθετούμε τα φιλμ πάνω στις μεμβράνες και στη συνέχεια πάνω στα πιάτα, έτσι ώστε να συλλεχθούν τα τμήματα των πιάτων που αντιστοιχούν στα σήματα των φιλμ.

-Το τμήμα του περιεχομένου του πιάτου που συλλέγεται, τοποθετείται σε διάλυμα SM που περιέχει 0.6 % CHCl<sub>3</sub>. Η εκχύλιση αυτή πραγματοποιείται συνήθως όλη νύχτα στους 4°C.

Η παραπάνω διαδικασία ανίχνευσης επαναλαμβάνεται άλλες τρεις ή τέσσερις φορές. Κάθε φορά πραγματοποιείται ανάμιξη συγκεκριμένου αριθμού φάγων με 350 µl βακτηρίων και επώαση σε μικρότερα τρυβλία μαζί με 3 ml Top agarose, μέχρι να είναι δυνατή η συλλογή μιας μοναδιαίας φαγικής πλάκας που θα περιέχει μόνο τον ζητούμενο κλώνο.

## **II.VI Απομόνωση φαγικού γενωμικού από υγρή καλλιέργεια**

### Υλικά

#### **Διάλυμα δράσης πρωτεΐνάσης K:**

100 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.5 %SDS, 200 mM NaCl, 400 ng/µl πρωτεΐνάση K

**50 mM CaCl<sub>2</sub>**

**1 M MgCl<sub>2</sub>**

**NZY**

**SM**

**CHCl<sub>3</sub>**

**RNase (10 µg/µl)**

**DNase (10 µg/µl)**

**40 % PEG 6000)**

**5 M NaCl**

**TE**

#### **Ισοπροπανόλη/οξικό αμμώνιο:**

(σε αναλογία, 416 ml ισοπροπανόλη/83 ml οξικό αμμώνιο, συγκέντρωσης 5 M)

### **Διαδικασία**

-Από τρυβλίο, το οποίο είναι γεμάτο με φαγικές πλάκες που περιέχουν τον ίδιο κλώνο, συλλέγουμε κατάλληλη περιοχή και την εμβαπτίζουμε σε 300 µl διαλύματος SM που περιέχει και 20 µl CHCl<sub>3</sub>.

-Οι φάγοι εκλούονται ολονυκτίως στους 4°C και ετοιμάζεται ολονύκτια καλλιέργεια των κατάλληλων βακτηριακών κυττάρων.

-Την επόμενη μέρα επωάζονται, 100 μλ της ολονύκτιας βακτηριακής καλλιέργειας με 100 μλ από το διάλυμα έκλουσης των φάγων και 100 μλ διαλύματος που περιέχει 5 mM CaCl<sub>2</sub> και 5 mM MgCl<sub>2</sub>, στους 37°C, για 15 λεπτά.

-Στη συνέχεια εμβολιάζονται 17 ml διαλύματος NZY με 100 μλ από το παραπάνω μίγμα και ακολουθεί επώαση στους 37°C, μέχρι να λάβει χώρα η λύση των βακτηριακών κυττάρων.

-Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 9000 στροφές, για 30 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν τα βακτηριακά κύτταρα. Στο υπερκείμενο διάλυμα προστίθενται NaCl (σε όγκο ίσο με το 1/4 του υπερκείμενου) και το μίγμα φυγοκεντρείται στις ίδιες στροφές.

-Έπειτα προστίθενται PEG, σε όγκο ίσο με το 1/3 του προηγούμενου διαλύματος και το μίγμα επωάζεται για μία με δυο ώρες στον πάγο.

-Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 9000 στροφές, για 30 λεπτά και το ίζημα που προκύπτει επαναδιαλύεται σε 700 μλ διαλύματος πρωτεΐνάσης K. Ακολουθεί επώαση στους 50°C για 45 λεπτά.

-Στη συνέχεια πραγματοποιούνται εκχυλίσεις με φαινόλη/CHCl<sub>3</sub>/ισοαμυλική αλκοόλη και κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη/οξικό αμμώνιο.

-Το ίζημα επαναδιαλύεται σε περίπου 500 μλ TE και επωάζεται για 30 λεπτά, στους 37°C με RNase συγκέντρωσης 100 μg/ml.

-το διάλυμα που προκύπτει εκχυλίζεται με φαινόλη/CHCl<sub>3</sub>/ισοαμυλική αλκοόλη, το DNA κατακρήμνίζεται με αιθανόλη και οξικό αμμώνιο και τελικά επαναδιαλύεται σε 50 μλ TE.

### **III. ΦΥΣΙΚΗ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *Fras1* ΚΑΙ *FRAS1* ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΥΒΡΙΔΙΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

#### **III.I Χαρτογράφηση του *Fras1* στο γονιδίωμα του ποντικού**

Τα ζευγάρια των εκκινητών που χρησιμοποιούνται είναι:

A) pr3, pr5

B) pr3, pr6

**Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιούνται:**

50 ng DNA

300 ng από κάθε εκκινητή.

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

250 μM dNTPs

**Οι συνθήκες αντίδρασης είναι:**

Αποδιάταξη στους 94°C για 5 λεπτά

35 κύκλοι με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει:

α)Υβριδοποίηση στους 60°C για 90 δευτερόλεπτα.

β)Επέκταση στους 72°C για 2 λεπτά.

γ)Αποδιάταξη στους 94°C για 1 λεπτό.

Επέκταση στους 72°C για 10 λεπτά.

#### **III.II Χαρτογράφηση του *FRAS1* στο γονιδίωμα του ανθρώπου**

Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι οι pr13, pr16.

**Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιούνται:**

50 ng DNA

300 ng από κάθε εκκινητή.

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

250 μM dNTPs

**Οι συνθήκες αντίδρασης είναι:**

Αποδιάταξη στους 94°C για 5 λεπτά

35 κύκλοι με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει:

α)Υβριδοποίηση στους 60°C για 90 δευτερόλεπτα.

β)Επέκταση στους 72°C για 2 λεπτά.

γ)Αποδιάταξη στους 94°C για 1 λεπτό.

Επέκταση στους 72°C για 10 λεπτά.

## IV. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΟΜΟΛΟΓΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΣΤΑ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

### IV.I Απομόνωση γενωμικού DNA από τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα

#### Υλικά

##### **Διάλυμα λύσης:**

100 mM Tris.HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2 % SDS, 200 mM NaCl, 100 µg/ml Πρωτεΐνάση K

##### **TE:**

10 mM Tris.HCl pH 8.0, 1 mM EDTA

#### **Διαδικασία**

-Όταν τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (ES) πυκνώσουν, αφαιρείται το θρεπτικό τους υλικό και προστίθενται 500 µl διαλύματος λύσης. Στη συνέχεια το μείγμα μεταφέρεται σε σωληνάρια τύπου errendorf.

-Ακολουθεί ολονύκτια ανακίνηση στους 37°C ή στους 55°C, για 2-3 ώρες.

-Τελικά το γενωμικό DNA των κυττάρων ES κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη και επαναδιαλύεται σε 50 µl TE.

### IV.II Ταυτοποίηση του ομόλογου ανασυνδυασμού με τη μέθοδο του Southern Blot

-Πραγματοποιείται πέψη του γενωμικού DNA κάθε κλώνου με τα περιοριστικά ένζυμα ApaI και ClaI αναμιγνύοντας:

7.5 µg γενωμικού DNA

5 µg BSA

2.5 µl ApaI (5 units/µl)

2.5 µl ClaI (5 units/µl)

-Οι πέψεις ηλεκτροφορούνται ολονυκτίως σε πήκτωμα αγαρόζης.

-Ακολουθεί η διαδικασία του Southern Blot και υβριδοποίηση.

### IV.III Ταυτοποίηση του ομόλογου ανασυνδυασμού με τη μέθοδο PCR

Οι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιούνται είναι ο pr1 και ο pr2.

#### **Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιούνται:**

-250 ng DNA από κάθε κλώνο κυττάρων ES

-300 ng από κάθε εκκινητή

-2 mM MgCl<sub>2</sub>

-350 µm dNTPs

-3 units ενζύμου Taq polymerase (Minotech)

#### **Οι συνθήκες αντίδρασης είναι:**

Αποδιάταξη στους 94°C για 5 λεπτά

30 κύκλοι με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει:

α) Υβριδοποίηση των εκκινητών στους 63°C για 90 δευτερόλεπτα.

β) Επέκταση στους 72°C για 4 λεπτά.

γ) Αποδιάταξη στους 94°C για 1 λεπτό.

Επέκταση στους 72°C για 10 λεπτά.

## V. ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ



## V.I Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών

### Υλικά

#### Διάλυμα λύσης:

100 mM Tris.HCl pH 7.5  
5 mM EDTA  
10 % SDS  
5 M NaCl  
200 µg/ml Πρωτεΐνάση K

### Διαδικασία

-Οι ουρές επωάζονται ολονυκτίως στους 55°C, σε 300 µl διαλύματος λύσης.  
-Ακολουθεί φυγοκέντρηση, αφαίρεση του υπερκείμενου και κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη.  
-Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 50-100 µl διαλύματος που περιέχει 10 mM Tris.HCl pH 8.0 και 0.1 mM EDTA.

## V.II Ταυτοποίηση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου του *Fras1*

Τα ζευγάρια των εκκινητών που χρησιμοποιούνται είναι:

- A) pr3, pr5
- B) pr3, pr6
- Γ) pr4, pr5
- Δ) pr4, pr6

#### Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιούνται:

50 ng DNA  
230 ng από κάθε εκκινητή.  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
250 µM dNTPs

#### Οι συνθήκες αντίδρασης είναι:

Αποδιάταξη στους 94°C για 5 λεπτά  
35 κύκλοι με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει:  
α)Υβριδοποίηση των εκκινητών στους 64°C για 90 δευτερόλεπτα.  
β)Επέκταση στους 72°C για 2 λεπτά.  
γ)Αποδιάταξη στους 94°C για 1 λεπτό.  
Επέκταση στους 72°C για 10 λεπτά.

## V.III Ταυτοποίηση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου του *Fras1*

Τα ζευγάρια των εκκινητών που χρησιμοποιούνται είναι:

- A) pr7, pr8
- B) pr9, pr10
- Γ) pr11, pr12

#### Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιούνται:

50 ng DNA  
300 ng από κάθε εκκινητή.  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
250 µM dNTPs

#### Οι συνθήκες αντίδρασης είναι:

Αποδιάταξη στους 94°C για 5 λεπτά.  
35 κύκλοι για το ζευγάρι εκκινητών Γ), 35 κύκλοι για το ζευγάρι εκκινητών Β) και 32 κύκλοι για το ζευγάρι εκκινητών Α), με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει:  
α)Υβριδοποίηση στους 60°C, για το ζευγάρι εκκινητών Γ) και στους 68°C, για το ζευγάρι εκκινητών Α) και Β), για 1 λεπτό.  
β)Επέκταση στους 72°C για 2 λεπτά.  
γ)Αποδιάταξη στους 94°C για 1 λεπτό  
Επέκταση στους 72°C για 10 λεπτά

## VI. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Η διαδικασία παρασκευής των πολυκλωνικών αντισωμάτων για το γονίδιο *Fras1* περιγράφεται αναλυτικά στην εργασία του μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης.

### VI.I Διαδικασία καθαρισμού των πολυκλωνικών αντισωμάτων

#### Υλικά

##### **Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) (10x, 1lt):**

30 g Tris  
144 g Γλυκίνη  
10 g SDS  
pH 8-8.3

##### **Διάλυμα Ponceau:**

20 ml Ponceau S concentrate Sigma P7767 σε 180 ml H<sub>2</sub>O ή 0.2 % Ponceau σε 3 % (w/v) TCA

##### **TBS buffer:**

20 mM Tris pH 7.5  
150 mM NaCl

##### **Blocking solution (Διάλυμα Παρεμπόδισης):**

1X TBS  
5 % ξηρή σκόνη γάλακτος ή 3 % BSA

##### **0.2 M Glycine-HCl pH 2.5**

##### **0.2 M Glycine-HCl pH 1.9**

##### **1 M Tris pH 8.0**

##### **Transfer buffer (Διάλυμα μεταφοράς) (4 lt):**

50 mM Tris  
380 mM Γλυκίνη  
0.1 % SDS  
20 % Μεθανόλη

##### **Sample buffer (Διάλυμα δείγματος) (5x, 100 ml):**

50 ml γλυκερόλη  
10 g SDS  
30 ml 1M Tris pH 6.8  
1 ml μερκαπτοαιθανόλη-β  
0.005 % μπλέ βρωμοφαινόλη

#### **Διαδικασία**

-Φυγοκέντρηση 10 ml κυτταρικής καλλιέργειας, στην οποία έχει εκφραστεί το πεπτιδίο το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των αντισωμάτων, ύστερα από επαγωγή με IPTG.

-Σε 12.5 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αναλύεται διαλυτοποιημένο σε 2.5x Sample buffer το ίζημα των παραπάνω κυττάρων. Μαζί με το δείγμα φορτώνεται και προχρωματισμένος πρωτεϊνικός δείκτης (pre-stain marker). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 200 Volts, για 40 περίπου λεπτά.

-Στη συνέχεια υφίσταται ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η διαδικασία αυτή γίνεται στα 300 mA, για μία ώρα και υπό ανάδευση.

-Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με Ponceau για 5-10 λεπτά και κόψιμο της ζώνης του υπερεκφραζόμενου πεπτιδίου.

-Η ζώνη της νιτροκυτταρίνης επωάζεται στο διάλυμα παρεμπόδισης για 30 λεπτά, με ήπια ανάδευση.

-Η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα TBS (3 φορές και για 10 λεπτά κάθε φορά) και επωάζεται με τον ορό που θέλουμε να καθαρίσουμε, για 90 λεπτά, με ήπια ανακίνηση.

-Ο ορός συλλέγεται ενώ η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα TBS (3 φορές και για 5 λεπτά κάθε φορά).

-Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα γλυκίνης 0.2 M pH 2.5 (ίσου όγκου με τον όγκο του ορού που χρησιμοποιήθηκε), για 5 λεπτά. Σ' αυτές τις όξινες συνθήκες ξεκολλάει το μεγαλύτερο μέρος του αντισώματος που προσδέθηκε στη μεμβράνη. Ο ορός που συλλέγεται ανακατεύεται με

ίσο όγκο κρύου διαλύματος 1M Tris pH 8-8.8 και το μίγμα φυλάσσεται αμέσως στους  $-20^{\circ}\text{C}$  με την προσθήκη BSA τελικής συγκέντρωσης 1 %.

-Η μεμβράνη ακολούθως επωάζεται κατά τον ίδιο τρόπο με διάλυμα γλυκίνης 0.2 M pH 1.9 και το διάλυμα που συλλέγεται αναμιγνύεται με το ίδιο διάλυμα Tris.

### References:

1) Roth, J., Lentze, M., J. and Berger, E., G., (1985), *J. Cell Biol.*, **100**, 118-125.

2) Burke, B. *et al.*, (1982), *EMBO J.*, **1**, 1621-1628.

3) Towbin *et al.*, *P.N.A.S.*, (1976), **76**, 4350

4) Bio-Rad Instruction manual, Mini trans-blot Electrophoretic transfer cell)

## VII. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

### VII.I Μονιμοποίηση δειγμάτων

#### Υλικά

**PBS (Phosphate-buffered saline-φωσφορικό άλας) (10x):**

1.5 M NaCl 0.4 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.4

**PFA (Paraformaldehyde-Παραφορμαλδεΰδη 4 %):**

40 gr PFA διαλύονται σε 1x PBS (προθερμασμένο στους  $60^{\circ}\text{C}$ ). Το μείγμα ανακατεύεται ήπια στους  $58-60^{\circ}\text{C}$ , μέχρι να διαλυθεί. Στην περίπτωση που το μείγμα δεν διαλύεται γρήγορα προστίθενται μερικές σταγόνες NaOH συγκέντρωσης 1 M μέχρι να γίνει διαυγές. Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι 7.4-7.6. Το διάλυμα φιλτράρεται και φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **Διαδικασία**

-Τα δείγματα μονιμοποιούνται σε 4 % PFA, στους  $4^{\circ}\text{C}$ , με ήπια ανακίνηση. Ο χρόνος μονιμοποίησης εξαρτάται από το μέγεθος των δειγμάτων. Όσο μεγαλώνει το μέγεθος των δειγμάτων μεγαλώνει και ο χρόνος παραμονής σε κάθε διάλυμα. (Π.χ για έμβρυα ημέρας 13.5-14.5 ο χρόνος ανακίνησης διαρκεί όλη νύχτα.)

-Ακολουθούν ξεπλύματα με ισοτονικό διάλυμα 1x PBS για 1-3 ώρες, ανάλογα με το μέγεθος των δειγμάτων.

### VII.II Διαδικασία έγκλισης δειγμάτων σε παραφίνη

#### Υλικά

**NaCl: 0.86 %**

**Ξυλένιο ή Neo-clear**

**Παραφίνη**

**Αιθανόλη**

#### **Διαδικασία**

Για έμβρυα ημέρας 13.5-14.5 ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

-Μετά την μονιμοποίηση τα δείγματα ξεπλένονται με διάλυμα NaCl για 1-3 ώρες.

-Στη συνέχεια πραγματοποιείται σταδιακή αφυδάτωση των δειγμάτων με ξεπλύματα σε:

**α)** 30 % αιθανόλη για 1-3 ώρες (δύο φορές)

**β)** 50 % αιθανόλη για 1-3 ώρες (δύο φορές)

**γ)** 70 % αιθανόλη για 2-6 ώρες (συνήθως το στάδιο αυτό πραγματοποιείται όλη νύχτα, με μία αλλαγή)

**δ)** 95 % αιθανόλη για 1-2 ώρες (δύο φορές)

**ε)** 100 % απόλυτη αιθανόλη για 2-3 ώρες (δύο φορές)

-Ακολουθεί η διαδικασία της διαύγασης, κατά την οποία τα δείγματα εμποτίζονται σε ξυλένιο για 2-3 ώρες (δύο φορές).

(Όλα τα παραπάνω βήματα πραγματοποιούνται με διαρκή ανακίνηση.)

-Έπειτα πραγματοποιείται η σκλήνωση των δειγμάτων, η οποία διαρκεί 24-48 ώρες και περιλαμβάνει τρεις αλλαγές παραφίνης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στους 65°C.  
-Μετά το στάδιο της σκλήνωσης, τα δείγματα τοποθετούνται μέσα σε ειδικά καλούπια και περιλούνται με λειωμένη παραφίνη. Τα δείγματα παγιδεύονται μέσα στην παραφίνη καθώς αυτή παγώνει και παίρνει το σχήμα του κύβου.

### **VII.III Διαδικασία έγκλισης δειγμάτων για επεξεργασία τους σε κρουτόμο**

#### **Υλικά**

**10 % σουκρόζη σε 1x PBS**

**30 % σουκρόζη σε 1x PBS**

#### **Διαδικασία**

-Μετά την μονιμοποίηση τα δείγματα ανακινώνται σε διάλυμα που περιέχει 10 % σουκρόζη (στους 4°C), μέχρι το δείγμα να απορροφήσει την σουκρόζη.  
-Ακολουθεί ανακίνηση σε 30 % σουκρόζη, όπως προηγουμένως.  
-Τελικά το δείγμα παγώνεται σε ισοπεντάνιο, αφού αφαιρεθεί η περίσσεια σουκρόζης. Στη συνέχεια τα δείγματα είναι έτοιμα να κοπούν στον κρουτόμο, αφού περιλουστούν με υγρό κρουοπροστασίας.

### **VII.IV Παραγωγή τομών σε μικροτόμο ή κρουτόμο**

Τα δείγματα που έχουν εγκλειστεί σε παραφίνη ή σε υγρό κρουοπροστασίας μπορούν να επεξεργαστούν αντίστοιχα είτε σε μικροτόμο (συνήθως το πάχος διατομής είναι 8-10 μm), είτε σε κρουτόμο (συνήθως το πάχος διατομής είναι 12 μm). Τελικά οι τομές συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους που έχουν υποστεί κατάλληλη επεξεργασία.

Στην περίπτωση των τομών παραφίνης οι τομές απλώνονται πρώτα σε υδατόλουτρο στους 42°C και στη συνέχεια συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους, οι οποίες αφήνονται να στεγνώσουν στους 37°C. Οι κρουτομές και οι τομές παραφίνης φυλάσσονται στους -80°C και 4°C αντίστοιχα.

### **VII.V Επεξεργασία των αντικειμενοφόρων**

#### **VII.V.1 Προετοιμασία αντικειμενοφόρων για ιστολογικές χρώσεις και για αντιδράσεις ανοσοεντοπισμού**

#### **Υλικά**

##### **Διάλυμα ζελατίνης:**

Η σύσταση του διαλύματος ζελατίνης είναι 0.6 % σε νερό. Το διάλυμα αφήνεται 30 λεπτά και στη συνέχεια αναδεύεται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως θερμαίνεται στους 65°C, για μία ώρα και έπειτα αναδεύεται για 2-3 ώρες στην ίδια θερμοκρασία. Τελικά μεταφέρεται σε θερμοκρασία δωματίου, όπου προστίθεται σταδιακά  $KCr(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$  σε ποσοστό 0.06 % και φιλτράρεται με διηθητικό χαρτί.

#### **Διαδικασία**

-Οι αντικειμενοφόροι αναδεύονται όλη νύχτα σε χρωμοθεικικό οξύ.  
-Στη συνέχεια ξεπλένονται πολύ καλά με νερό βρύσης και στη συνέχεια με αποιονισμένο νερό.  
-Αφού στεγνώσουν, εμβαπτίζονται σε διάλυμα ζελατίνης για 10 περίπου λεπτά.  
-Τελικά αφήνονται να στεγνώσουν είτε σε θερμοκρασία δωματίου, είτε στους 37°C (συνήθως όλη τη νύχτα).

#### **VII.V.2 Προετοιμασία αντικειμενοφόρων για *in situ* υβριδοποίηση**

-Οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίζονται σε διάλυμα 0.2 N NaOH και ανακινούνται για μισή ώρα.  
-Ακολουθεί ξέπλυμα με διπλά κλιβαντισμένο νερό (η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές και για 2 λεπτά κάθε φορά).

-Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται με αιθανόλη (η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές και για 2 λεπτά κάθε φορά) και αφήνονται να στεγνώσουν στους 42°C.

-Ακολουθώς εμβαπτίζονται σε διάλυμα πολυλυσίνης (poly-L-lysine MW 47,000) συγκέντρωσης 100 µg/ml, για 20 δευτερόλεπτα (προσοχή η πολυλυσίνη απλώνεται ομοιόμορφα πριν στεγνώσει) και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

-Τελικά ξαναεμβαπτίζονται στο διάλυμα της πολυλυσίνης, όπως προηγουμένως και αφήνονται όλη νύχτα στους 42°C.

## VII.VI *In situ* υβριδοποίηση

### VII.VI.1 Παρασκευή ανιχνευτή RNA με αντίδραση μεταγραφής *in vitro*

#### Υλικά

##### **1x ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής (Roche):**

10x: 400 mM Tris-HCl pH 8.0, 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 20 mM σπερμιδίνη

##### **1x DIG-RNA μίγμα σήμανσης (Roche):**

10x: 10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6.5 mM UTP, 3.5 mM DIG-11-UTP pH 7.5

##### **RNasin (40 U/µl)**

##### **T<sub>3</sub> ή T<sub>7</sub> πολυμεράση RNA (20 U/µl)**

##### **DNase I (15 U/µl)**

##### **DTT**

##### **4 M LiCl**

#### **Διαδικασία**

- Για τελικό όγκο 20 µl αναμειγνύονται τα παρακάτω συστατικά:

1 µg γραμμοποιημένου πλασμιδιακού DNA

H<sub>2</sub>O

1x ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής

1x DIG-RNA μίγμα σήμανσης

0.1M DTT (προαιρετικά)

-Το μείγμα επώαζεται στους 37°C, για 2-3 λεπτά και ακολουθώς προστίθεται 2-3 units RNasin και 40 units T<sub>3</sub> ή T<sub>7</sub> πολυμεράση RNA.

-Ακολουθεί επώαση για δύο ώρες, στους 37°C και στη συνέχεια προστίθεται 1 µl DNase I και το μείγμα επώαζεται στους 37°C για 15 λεπτά.

-Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 1 µl EDTA 0.5 M pH 8.0.

-Τελικά πραγματοποιείται διπλή κατακρήμνιση του RNA με 2.5 µl LiCl και 75 µl απόλυτη αιθανόλη, επώαση στους -80°C, φυγοκέντρηση και επαναδιάλυση.

### VII.VI.2 Αλκαλική λύση ανιχνευτή RNA

Η διαδικασία αλκαλικής λύσης του RNA συμβάλλει στη διάσπαση του σε δύο ίσα τμήματα και κατά συνέπεια στη μείωση του παραγόμενου θορύβου λόγω μη ειδικής πρόσδεσης.

#### Υλικά

Ανθρακικό διάλυμα (Carbonate buffer, 2x buffer):

**80 mM NaHCO<sub>3</sub> +120 mM NaCO<sub>3</sub> pH 10.2**

οξικό οξύ 10 %

οξικό νάτριο 3M pH 6

#### **Διαδικασία**

-Αναμιγνύεται ένα μέρος του διαλύματος του ανιχνευτή RNA με ίσο όγκο ανθρακικού διαλύματος.

-Το μείγμα επώαζεται στους 60°C, για το χρονικό διάστημα που καθορίζεται από τον τύπο:  $t=(L_0-L)/kL_0L$ , όπου  $k=0.11$ ,  $L_0$  είναι το αρχικό μέγεθος του ανιχνευτή RNA και  $L$  το μισό μέγεθος του ανιχνευτή RNA.

-Ακολουθεί κατακρήμνιση του RNA με την προσθήκη 10 μλ οξικού οξέος, 12 μλ οξικού νατρίου και 300 μλ παγωμένης αιθανόλης. Το μείγμα αφήνεται για 30 λεπτά στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 13.000 στροφές για 10 λεπτά  
-Το παραγόμενο ίζημα ξεπλένεται σε αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε 50 μλ TE

**(Reference: Kalantidis *et al.*, Arabidopsis, a practical approach, 1999)**

### VII.VI.3 *In situ* υβριδοποίηση RNA

#### **Υλικά**

##### **1 lt PBS 10x:**

1.5 M NaCl, 0.4 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.4

##### **PFA4 %**

##### **NTE:**

0.5 M NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA

##### **Μίγμα ακετυλίωσης:**

Σε 245.6 ml  $\text{H}_2\text{O}$  προστίθενται 3.33 ml τριεθανολαμίνης, 0.44 ml HCl (37 %) και 0.625 ml οξικού ανυδρίτη. (Το μείγμα αυτό χρησιμοποιείται πάντα φρέσκο)

**Τριεθανολαμίνη (Triethanolamine)** (MERCK)  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3$  M=149.19 g/mol

1lt=1.12 kg, 7.5 M (99 %)

**Οξικός ανυδρίτης (Acetic anhydride)** (MERCK)  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$  M=102.09 g/mol, 1lt = 1.08 kg (99 %)

##### **20xSSC:**

3 M NaCl, 0.3 M  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  pH 5.5

##### **Το διάλυμα υβριδοποίησης αποτελείται:**

-50 % Φορμαμίδιο

-2xSSPE (**20x SSPE:** 3.6 M NaCl, 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.02 M EDTA pH 7.7)

-5 %Denhardt's

-10 %Dextran Sulfate

-0.5 %SDS

-100 μg/ml tRNA

-Ανιχνευτή RNA συγκέντρωσης 0.5 μg/ml διαλύματος υβριδοποίησης, ο οποίος αποδιατάσσεται προηγουμένως στους  $80^{\circ}\text{C}$  για 5 λεπτά.

(Ο ανιχνευτής ελέγχεται για το ποσοστό ενσωμάτωσης Dig-11-UTP με σύγκριση με μάρτυρα RNA που έχει καλό ποσοστό ενσωμάτωσης Dig-11-UTP)

B<sub>1</sub>:

**100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.5**

B<sub>2</sub>:

**B1+0.5 % αντιδραστηρίου παρεμπόδισης (blocking reagent) της εταιρείας Boehringer Mannheim. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται κάθε φορά φρέσκο.**

B<sub>3</sub>:

**B1+1 % BSA, +0.3 % TritonX-100 + 1 % Tween-20**

B<sub>4</sub>:

**100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 9.5+50 mM  $\text{MgCl}_2$  +0.1 % Tween-20**

Nitroblue tetrazolium chloride, NBT:

**100 mg/ml (Boehringer Mannheim)**

**5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt ή X-phosphate, 4-toluidine salt, Bcip:**

50 mg/ml (Boehringer Mannheim)

##### **TE:**

10 mM Tris pH 8.0

1 mM EDTA

##### **RNaseA**

#### **Διαδικασία**

##### **Προυβριδοποίηση**

-Οι τομές εμβαπτίζονται σε διάλυμα 0.86 % NaCl, για 5 λεπτά.

-Στη συνέχεια ξεπλένονται σε 1x PBS, για 5 λεπτά.

- Ακολουθεί μεταμονιμοποίηση των τομών σε 4 % PFA, για 15 λεπτά.
- Στη συνέχεια οι τομές ξεπλένονται σε 1x PBS ( η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές, για 5 λεπτά κάθε φορά).
- Ακολουθεί επώαση των τομών για 10 λεπτά, στο μίγμα ακετυλίωσης.
- Οι τομές ξεπλένονται σε 1x PBS, για 5 λεπτά και σε διάλυμα 0.86 % NaCl, για 5 λεπτά.
- Στη συνέχεια ο ιστός αφυδατώνεται με σταδιακά πλυσίματα σε διαλύματα αιθανόλης 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 95 %, 100 % (η διαδικασία διαρκεί 2 λεπτά για κάθε στάδιο).
- Ακολουθεί απολίπωση των τομών με εμβάπτισμα τους σε χλωροφόρμιο, για 5 λεπτά.
- Οι τομές ξεπλένονται σε 100 % αιθανόλη, για 2 λεπτά και σε 95 % αιθανόλη, για 2 λεπτά και αφήνονται να στεγνώσουν.

### **Υβριδοποίηση**

- Στις τομές κάθε αντικειμενοφόρου προστίθεται 100 μλ διαλύματος υβριδοποίησης (το οποίο καλύπτεται με parafilm).
- Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται σε δοχείο, το οποίο είναι κορεσμένο σε διάλυμα που περιέχει 50 % formamide και 2x SSC και το οποίο έχει προθερμανθεί στους 50°C. Η υβριδοποίηση διαρκεί περίπου 16 ώρες στους 50°C.

### **Πλυσίματα μετά την υβριδοποίηση**

- Οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται σε 2x SSC, στους 50°C, υπό διαρκή ανακίνηση (για να απομακρυνθούν τα parafilms).
- Ακολουθεί ξέπλυμα σε διάλυμα που περιέχει 2x SSC και 50 % Formamide (η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές και για μία ώρα κάθε φορά), στους 50°C και υπό διαρκή ανακίνηση.
- Οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται σε διάλυμα NTE, για 15 λεπτά, στους 37°C.
- Στη συνέχεια οι τομές επώάζονται με 20 μg/ml RNaseA, σε NTE, για 15 λεπτά, στους 37°C.
- Ακολουθεί ξέπλυμα σε διάλυμα NTE, για 15 λεπτά, στους 37°C.
- Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται σε διάλυμα που περιέχει 2x SSC και 50 % Formamide, για 30 λεπτά, στους 50°C.
- Ακολουθώς εμβαπτίζονται σε διάλυμα 2x SSC, για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τελικά ξεπλένονται σε διάλυμα 1x PBS (η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές και για 5 λεπτά κάθε φορά).

### **Ανίχνευση και Χρώση**

- Οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται σε διάλυμα B<sub>1</sub>, για 5 λεπτά.
- Στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε διάλυμα B<sub>2</sub>, για μία ώρα, υπό διαρκή ανακίνηση.
- Ακολουθεί ξέπλυμα σε διάλυμα B<sub>3</sub>, όπως προηγουμένως.
- Οι τομές επώάζονται με αντίσωμα για την digoxigenin, το οποίο περιέχει προσδεμένο το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης (anti-digoxigenin-alkaline phosphatase, Boehringer Mannheim). Η αραιώση του αντισώματος η οποία χρησιμοποιείται είναι 1/3000 και η επώαση διαρκεί είτε 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου, είτε όλη νύχτα, στους 4°C.
- Ακολουθεί ξέπλυμα με διάλυμα B<sub>3</sub> (η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές και για 20 λεπτά κάθε φορά).
- Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι διαβρέχονται με διάλυμα B<sub>1</sub>.
- Οι αντικειμενοφόροι εξισορροπούνται σε διάλυμα B<sub>4</sub>, για 5 λεπτά.
- Ακολουθώς οι τομές στις αντικειμενοφόρους επώάζονται σε διάλυμα B<sub>4</sub>, που περιέχει 4.5 μl/ml NBT και 3.5 μl/ml BciP, στο σκοτάδι, για κατάλληλο χρονικό διάστημα. Τόσο το NBT όσο και το BciP είναι υποστρώματα του ενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης.
- Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη TE, για 15 λεπτά.
- Ακολουθεί ξέπλυμα με νερό, για 15 λεπτά.
- Τέλος οι τομές αφυδατώνονται με διαδοχικά πλυσίματα σε 50 %, 70 %, 95 % και 100 % αιθανόλη (για 2 λεπτά, σε κάθε στάδιο) και καλύπτονται με καλυπτρίδα με τη μεσολάβηση συνθετικής ακρυλακρλικής ρητίνης-διάλυμα (entellan).

## **VII.VII Ανοσοεντοπισμός**

### **Υλικά**

#### **PBT:**

1x PBS και 0.1 % Triton

#### **VECTASTAIN ELITE ABC KIT**

**Διάλυμα απενεργοποίησης της ενδογενούς υπεροξειδάσης:**

0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

50 % Μεθανόλη

50 % 1XPBS

**Διάλυμα μεταμονιμοποίησης:**

Ακετόνη

**Blocking solution (Διάλυμα Παρεμπόδισης):**

1x PBS

1 % BSA

0.1 % Triton

**Διάλυμα αραίωσης του πρωτογενούς αντισώματος:**

1x PBS

0.1 % BSA

0.1 % Triton

**Διάλυμα αραίωσης του δευτερογενούς αντισώματος, το οποίο είναι βιοτινιλιωμένο:**

1x PBS και φυσιολογικός ορός παρεμπόδισης (normal blocking serum) (σύμφωνα με το VECTASTAIN ELITE ABC KIT)

**Διάλυμα αραίωσης του δευτερογενούς αντισώματος, το οποίο είναι συνδεδεμένο με μόριο που φθορίζει:**

1x PBS που περιέχει 0.1% BSA

**Διάλυμα δημιουργίας του μακρομοριακού συμπλόκου Αβιδίνης-βιοτινιλιωμένης υπεροξειδάσης:**

(σύμφωνα με τις οδηγίες του VECTASTAIN ELITE ABC KIT)

**Χρωμογόνο υπόστρωμα DAB**

**Διάλυμα δημιουργίας του χρωμογόνου υποστρώματος της υπεροξειδάσης:**

Σε 10 ml H<sub>2</sub>O προστίθενται μία ταμπλέτα DAB και μία ταμπλέτα Urea Hydrogen Peroxide (Sigma). Το μίγμα ανακατεύεται μέχρι να διαλυθεί και στη συνέχεια φιλτράρεται. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται στο σκοτάδι. ΠΡΟΣΟΧΗ το DAB είναι πιθανό καρκινογόνο και απενεργοποιείται στη χλωρίνη

**Διάλυμα διαύγασης:**

Ξυλένιο

**Διάλυματα κάλυψης των τομών:**

Entellan

η-propyl-gallate glycerol

**Διαδικασία**

-Κάθε αντικειμενοφόρος με τομές περικλείεται με το ειδικό πινέλο (pap pen) και αφήνεται 30 λεπτά να στεγνώσει.

-Σε ορισμένες περιπτώσεις ακολουθεί μεταμονιμοποίηση των τομών κάθε αντικειμενοφόρου, με εμβάπτισμα των αντικειμενοφόρων σε ακετόνη, για 5 λεπτά.

-Ακολουθεί ξέπλυμα με 1x PBT (η διαδικασία διαρκεί 3 φορές και για 10 λεπτά κάθε φορά).

-Ενίοτε πραγματοποιείται απενεργοποίηση της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης.

Συγκεκριμένα, αν δεν έχει προηγηθεί μεταμονιμοποίηση των τομών, πραγματοποιείται αρχικά

ξέπλυμα με 1x PBT. Ακολουθεί επώαση στο διάλυμα απενεργοποίησης της ενδογενούς

υπεροξειδάσης, για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. (Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στο

σκοτάδι λόγω της φωτοευαισθησίας του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Στη συνέχεια οι τομές ξεπλένονται με 1x PBT (η

διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές και για 10 λεπτά κάθε φορά).

-Ακολουθεί επώαση των τομών στο διάλυμα παρεμπόδισης, τουλάχιστον για μία ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου.

-Στη συνέχεια οι τομές επωάζονται με το πρωτογενές αντίσωμα, όλη νύχτα, στους 4°C.

## VII.VII.1 Ανοσοεντοπισμός με χρώση υπεροξειδάσης

**-Στην περίπτωση που το δευτεροταγές αντίσωμα που χρησιμοποιούμε είναι βιοτινιλιωμένο, ακολουθεί ξέπλυμα με 1x PBT (η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές και για 10 λεπτά κάθε φορά).**

-Επώαση των τομών με το βιοτινιλιωμένο δεύτερο αντίσωμα, τουλάχιστον για δύο ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου.

-Ακολουθεί ξέπλυμα με 1x PBT (η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές και για 10 λεπτά κάθε φορά).



-Στο παραπάνω χρονικό διάστημα προετοιμάζεται το μακρομοριακό σύμπλοκο Αβιδίνης-Βιοτινιλωμένης υπεροξειδάσης. Ο χρόνος επώασης για τη δημιουργία του συμπλόκου είναι μισή ώρα και ο σχηματισμός του πραγματοποιείται στο σκοτάδι.

-Το διάλυμα με το σύμπλοκο Αβιδίνης/Βιοτίνης προστίθεται στις τομές, οι οποίες αφήνονται να επωαστούν για μισή ώρα τουλάχιστον, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι.

-Ακολουθεί ξέπλυμα με 1x PBT (η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές και για 10λεπτά κάθε φορά).

-Οι τομές επωάζονται με το χρωμογόνο υπόστρωμα DAB, στο σκοτάδι, για κατάλληλο χρονικό διάστημα (συνήθως 2-10 λεπτά).

-Η διαδικασία της χρώσης σταματάει με ξέπλυμα των τομών με 1x PBT.

-Ακολουθούν τρία δεκάλεπτα πλυσίματα με 1x PBT.

-Τέλος οι τομές αφυδατώνονται με τα διαλύματα 70, 95 και 100 % αιθανόλης (2 λεπτά παραμονή σε κάθε διάλυμα), εμβαπτίζονται σε ξυλένιο (τουλάχιστον μισή ώρα) και καλύπτονται με Entellan.

## VII.VII.2 Ανοσοφθορισμός

-Στην περίπτωση που το δευτεροταγές αντίσωμα που χρησιμοποιούμε είναι συνδεδεμένο με μόριο που φθορίζει, πραγματοποιείται ξέπλυμα του πρώτου αντισώματος με 1x PBS (η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές και για 5 λεπτά κάθε φορά).

-Ακολουθώντας οι τομές επωάζονται με το δεύτερο αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι, για μία ώρα.

-Ακολουθεί ξέπλυμα σε 1x PBS (η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές και για 10 λεπτά στο σκοτάδι).

-Τελικά οι τομές καλύπτονται με το ειδικό υγρό μονιμοποίησης η-propyl-gallate glycerol και σκεπάζονται με καλυπτρίδες.

## VII.VIII Ιστολογικές χρώσεις

Τα βασικά βήματα για χρώση τομών παραφίνης ή κρυστομών είναι τα εξής:

-Αποπαραφίνωση με ξυλόλη.

-Απομάκρυνση της ξυλόλης με απόλυτη αιθυλική αλκοόλη.

(Τα δύο παραπάνω στάδια πραγματοποιούνται μόνο σε τομές παραφίνης)

- Σταδιακή ενυδάτωση με σειρά διαλυμάτων, που χαρακτηρίζονται από σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης σε αλκοόλη.

-Χρώση.

- Σταδιακή αφυδάτωση με σειρά διαλυμάτων, που χαρακτηρίζονται από σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης σε αλκοόλη.

-Διάυγαση με ξυλόλη.

-Κάλυψη των τομών με Entellan και τοποθέτηση καλυπτρίδας.

### VII.VIII.1 Χρώση με Αιματοξυλίνη-Ηωσίνη

Η χρώση με αιματοξυλίνη βάφει το πυρηνικό DNA με σκούρο μπλε χρώμα, ενώ η ηωσίνη έχει την ιδιότητα να χρωματίζει το κυτταρόπλασμα και τα οργανίδια που περιέχονται σ' αυτό, με διαφορετικούς τόνους κόκκινου και ροζ.

#### Υλικά

##### **Διάλυμα Ηωσίνης:**

α) Διάλυμα αποθήκευσης:

1 g ηωσίνης

20 ml νερό

80 ml 95 % αιθανόλη

β) Διάλυμα χρώσης:

Ένα μέρος διάλυμα αποθήκευσης

Τρία μέρη αιθυλική αλκοόλη 80 %

### **Διάλυμα αιματοξυλίνης:**

Σε 700 ml νερό διαλύονται 5 g αιματοξυλίνης (η διαλυτοποίηση διαρκεί αρκετές ώρες).

Στη συνέχεια προστίθενται 50 g στυπτηρία αλουμινίου αμμωνίου [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>AL<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>].4H<sub>2</sub>O και 0.25 g NaIO<sub>3</sub>. Μετά την διάλυση όλων των συστατικών προστίθενται 300 ml γλυκερίνης και 20 ml οξικό οξύ.

Εναλλακτικά χρησιμοποιείται έτοιμο διάλυμα αιματοξυλίνης (Sigma)

### **Διαδικασία**

- Ξέπλυμα:
- με ξυλόλη για 5 λεπτά (δύο φορές)
- με 100 % αιθανόλη για 5 λεπτά (δύο φορές)
- με 95 % αιθανόλη για 2 λεπτά (δύο φορές)
- με 70 % αιθανόλη για 2 λεπτά
- με 50 % αιθανόλη για 2 λεπτά
- με 30 % αιθανόλη για 2 λεπτά
- με νερό για 2 λεπτά
- Χρώση με διάλυμα αιματοξυλίνης για 7 λεπτά
- Ξέπλυμα με νερό για 2-5 λεπτά
- Εμβάπτιση σε διάλυμα 1 % υδροχλωρικού οξέος (8 σταγόνες διαλύματος HCl συγκέντρωσης 1 M σε 100 ml διαλύματος αιθυλικής αλκόολης 70 %) για 10 δευτερόλεπτα
- Ξέπλυμα:
- σε νερό βρύσης για 10 λεπτά
- με 30 % αιθανόλη για 2 λεπτά
- με 50 % αιθανόλη για 2 λεπτά
- με 70 % αιθανόλη για 2 λεπτά
- με 95 % αιθανόλη για 5 δευτερόλεπτα
- Χρώση με ηωσίνη για 40 δευτερόλεπτα
- με 95 % αιθανόλη για 2-3 λεπτά
- με 100 % αιθανόλη για 2-3 λεπτά (δύο φορές)
- με ξυλόλη για 5 λεπτά (δύο φορές)
- Τέλος κάλυψη τομών με Entellan και τοποθέτηση καλυπτρίδας

## **VII.VIII.2 Χρώση με Methylene- Blue**

Η χρώση methylene blue μπορεί να βάψει το πυρήνα.

### **Διαδικασία**

- Ξέπλυμα:
- με ξυλόλη για 15 λεπτά
- με ξυλόλη για 2-5 λεπτά
- με 96 % αιθανόλη για 1-2 λεπτά
- με 70 % αιθανόλη 1-2 λεπτά
- με νερό για 2-5 λεπτά
- Χρώση με Methylene blue για 5 λεπτά
- με νερό για 10 λεπτά (δύο φορές)
- με 70 % αιθανόλη για 5-10 λεπτά συνολικά (δύο φορές)
- με 90 % αιθανόλη για 5 λεπτά συνολικά (δύο φορές)
- με 100 % αιθανόλη για 5 λεπτά συνολικά (δύο φορές)
- με ξυλόλη για 10 λεπτά έως μία ώρα συνολικά (δύο φορές)
- Επικάλυψη των τομών με Entellan και τοποθέτηση καλυπτρίδας.

## **VII.VIII.3 Χρώση Cresyl violet**

Η χρώση Cresyl violet μπορεί να βάψει τα νουκλεοσώματα, τα ριβοσώματα και τα σωμάτια Nissl στο νευρικό σύστημα.

### **Υλικά**

#### **Χρώση Cresyl violet:**

Η συγκέντρωση του διαλύματος είναι 0.1 %. Το διάλυμα αναδεύεται για 2-3 ώρες και στη συνέχεια φιλτράρεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

### **Διαδικασία**

- Ξέπλυμα:
- με ξυλόλη για 15 λεπτά
- με ξυλόλη για 2-5λεπτά
- με 100 % αιθανόλη για 2 λεπτά
- με 96 % αιθανόλη για 1-2 λεπτά
- με 70 % αιθανόλη για 1-2 λεπτά
- με νερό για 2-5 λεπτά
- Χρώση με Cresyl violet για 10 λεπτά
- Ξέπλυμα:
- με νερό για 10 λεπτά (δύο φορές)
- με 70 % αιθανόλη για 15 λεπτά συνολικά (δύο φορές)
- με 90 % αιθανόλη για 10 λεπτά συνολικά (δύο φορές)
- με 100 % αιθανόλη για 10 λεπτά συνολικά (δύο φορές)
- με ξυλόλη για 10 λεπτά εως μία ώρα συνολικά (δύο φορές)
- Επικάλυψη των τομών με Entellan και τοποθέτηση καλυπτρίδας

## **VIII. Παρασκευή σκελετού**

### **Υλικά**

#### **Διάλυμα χρώσης:**

- 1 όγκος 0.3 % Alcian blue 8GX (100 mg Alcian blue διαλύονται σε 100 ml 70 % αιθανόλη)
- 1 όγκος 0.1 % Alizarin red S (100 mg Alizarin red S διαλύονται σε 100 ml 95 % αιθανόλη. Σ' αυτή την περίπτωση διαλύεται πρώτα η σκόνη της Alizarin red S σε νερό και στη συνέχεια προστίθενται απόλυτη αιθανόλη)
- 1 όγκος 100 % οξικού οξέος
- 17 όγκοι απόλυτη αιθανόλη

### **Διαδικασία**

- (Οι χρόνοι που αναφέρονται στα παρακάτω δείγματα αντιστοιχούν για έμβρυα ημέρας 17.5-18.5)
- Εμβάπτιση των δειγμάτων σε διάλυμα 90 % αιθανόλης, για 24 ώρες.
- Αφαίρεση του δέρματος και των εσωτερικών τους οργάνων.
- Τα δείγματα αφήνονται στο διάλυμα της 90 % αιθανόλης, ακόμα για 1-3 μέρες.
- Ακολουθεί αφυδάτωση τους, σε 96 % διαλύματος αιθανόλης, για 24 ώρες.
- Στη συνέχεια πραγματοποιείται περαιτέρω μονιμοποίηση τους με ξέπλυμα σε διάλυμα ακετόνης, για μία μέρα.
- Πριν τη χρώση των δειγμάτων ακολουθεί ξέπλυμα με διάλυμα που περιέχει 19 όγκους αιθανόλη και 1 όγκο νερό και στη συνέχεια ξέπλυμα με διάλυμα που περιέχει 19 όγκους αιθανόλη και 1 όγκο 100 % οξικού οξέος.
- Ακολουθεί η χρώση των δειγμάτων με το διάλυμα χρώσης, για χρονικό διάστημα από 5-10 μέρες. (Προσοχή τα δείγματα πρέπει να είναι σε σκοτεινό μέρος και το διάλυμα χρώσης να αλλάζεται αρκετά συχνά)
- Έπειτα τα δείγματα ενυδατώνονται σταδιακά με διαδοχικά ξεπλύματα σε 90 %, 70 %, 40 % και 15 % διαλύματος αιθανόλης σε H<sub>2</sub>O (30 λεπτά περίπου το κάθε ξέπλυμα). Στο τέλος τα δείγματα ξεπλένονται με νερό μέχρι να βυθιστούν.
- Ακολουθεί η διαύγαση των δειγμάτων, η οποία γίνεται σε διάλυμα 1 % KOH, στο σκοτάδι και με ήπια ανακίνηση. Πραγματοποιούνται 3 αλλαγές του διαλύματος KOH και κάθε αλλαγή διαρκεί αρκετές ώρες (εναλλακτικά τα δείγματα αφήνονται όλη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου).
- Έπειτα τα δείγματα τοποθετούνται σε διάλυμα που περιέχει 20 % γλυκερόλη και 1 % KOH μέχρι να ολοκληρωθεί η διαύγαση. (Και αυτό το βήμα πραγματοποιείται στο σκοτάδι)
- Τέλος τα δείγματα μεταφέρονται σταδιακά σε διαλύματα που περιέχουν, 1 % KOH και 50 % ή 80 % γλυκερόλη και τελικά σε 100 % γλυκερόλη προκειμένου να διατηρηθούν.

## **IX. ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ**

Τα οιγονουκλεοτίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας του Ι.Τ.Ε και είναι:

**pr1**

5'-GAG AGC TAT TGG AAG GGA GAG AAT CTG G

**pr2**

5'-CCC CAT GCT GGG TAC ATG AAA ACC CGC

**pr3**

5'-TGG CAA AGT AAC ACT GCA GAG CAT G

**pr4**

5'-AAG GAC ATC TCC ATT CCC CAC CAC C

**pr5**

5'-CTA CTT TGA GGG TGC CTT CCT TAC C

**pr6**

5'-CTC CAC ATT CGT CAC CAG TCA GCT G

**pr7**

5'-TTC ACT GGC CGT CGT TTT ACA ACG TCG TGA

**pr8**

5'-ATG TGA GCG AGT AAC AAC CCG TCG GAT TCT

**pr9**

5'-AGG ATC TCC TGT CAT CTC ACC TTG CTC CTG

**pr10**

5'-AAG AAC TCG TCA AGA AGG CGA TAG AAG GCG

**pr11**

5'-TTGGCGTAAGTGAAGCGAC

**pr12**

5'-AGCGGCTGATGTTGAACTG

**pr13**

5'-CAC TGC CTT TGG GCT ACT CTC CAG C

**pr14**

5'-CTG CAG TGT TTG TAA TTG AAA TCT C

**pr15**

5'-AAC CTC AGG TGG CAG CTC CAG CTC C

**pr16**

5'-TCC TTC CCA GCT ACT GCC CCA AGA G



## I. Ταυτοποίηση του cDNA του *Fras1*

### I.I Εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του cDNA του *Fras1*

Η εύρεση της αλληλουχίας του cDNA του *Fras1*, έχει προκύψει από την ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μιας σειράς αλληλοεπικαλυπτόμενων κλώνων cDNA (contig) (εικ. 1).

Οι κλώνοι αυτοί έχουν απομονωθεί από μία βιβλιοθήκη cDNA, που έχει προκύψει από εγκέφαλο εμβρύου ποντικού ημέρας 14.5 (E14.5) (Oliver *et al.*, 1995). Η χρησιμοποίηση της συγκεκριμένης βιβλιοθήκης βασίστηκε στην πληροφορία που προέκυψε, από πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του mRNA του *Fras1*, σύμφωνα με την οποία το *Fras1* εκφράζεται στο εμβρυϊκό αυτό στάδιο στον εγκέφαλο. Οι κλώνοι που απομονώθηκαν, κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pBS KSII+ ή στον pExCell και στη συνέχεια ανιχνεύθηκε η νουκλεοτιδική τους αλληλουχία (τα cDNA στον pExCell έχουν απομονωθεί από τον Κ. Χαλεπάκη). Η επιλογή των κλώνων cDNA από την παραπάνω βιβλιοθήκη, έγινε με την χρησιμοποίηση κατάλληλων ανιχνευτών οι οποίοι κάθε φορά εντοπίζονται στο καινούργιο 3' άκρο της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που προστίθεται από την ανάγνωση των νεοαποκτηθέντων κλώνων.

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του cDNA του *Fras1* που ταυτοποιήθηκε, καταχωρήθηκε στην τράπεζα δεδομένων EMBL (Κωδικός πρόσβασης: accession number *Fras1* AJ489280 ) και έχει μέγεθος 15.865 bp. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης εντοπίζεται στα 859 bp, ενώ το κωδικόνιο λήξης στα 12.891 bp, με αποτέλεσμα η ευρεθείσα νουκλεοτιδική αλληλουχία από 859-12.891 bp να κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη μεγέθους 4010 αμινοξέων (εικ. 2 και εικ. 3a). Στα 15.825 bp της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που ταυτοποιήθηκε, εντοπίζεται το σινιάλο πολυαδενυλίωσης (AATAAT) και στα 15.865 bp η ουρά πολυαδενυλίωσης. Επομένως το κομμάτι της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του cDNA του *Fras1* από τα 12.891–15.865 bp αντιπροσωπεύει το 3' μη μεταφραζόμενο άκρο του *Fras1* (3'UTR). Από την άλλη μεριά η νουκλεοτιδική αλληλουχία από 1-857 bp περιλαμβάνει μέρος του 5' μη μεταφραζόμενο άκρου του *Fras1* (5'UTR), αφού περιέχει πολλαπλά κωδικόνια λήξης, στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, τα οποία προηγούνται μίας καλά καθορισμένης αλληλουχίας Kozak. Επιπρόσθετα ο εντοπισμός δύο διαφορετικών κλώνων cDNA του *Fras1*, του W87 και του W41, οι οποίοι έχουν κοινό 5' άκρο, καθώς και η εύρεση (με ανάλυση Northern) ενός μεταγράφου mRNA του *Fras1*, με μέγεθος που αντιστοιχεί περίπου στο μέγεθος του cDNA που έχει αλληλουχηθεί (εικ. 3b), υποδηλώνει ότι το cDNA του *Fras1* που απομονώθηκε περιλαμβάνει πιθανότατα ολόκληρο το 5' UTR.

### I.II Ανίχνευση των μεταγράφων mRNA του γονιδίου *Fras1*

Με ανάλυση κατά Northern, όπου χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη που περιέχει polyA+ RNA από διάφορα εμβρυϊκά στάδια του ποντικού και ανιχνευτές από δύο διαφορετικές περιοχές του cDNA του *Fras1*, διαπιστώθηκε ότι το *Fras1* ξεκινάει να μεταγράφεται αρκετά νωρίς κατά την εμβρυογένεση, τουλάχιστον από τη μέρα 7 (E7.5) και μετά, ενώ εντοπίζεται και τις τέσσερις εμβρυϊκές ημέρες που ελέγχθηκαν. Οι ανιχνευτές μεγέθους 900 και 750 bp που χρησιμοποιήθηκαν, περιλαμβάνουν τα τμήματα του cDNA του *Fras1* από 1291-2187 bp και από 3.533-4.290 bp αντίστοιχα, τα οποία κωδικοποιούν για περιοχές που εντοπίζονται μοτίβα τύπου von Willebrand και μοτίβα που συναντώνται σε πρωτεάσες της οικογένειας των φουρινών (εικ. 3a). Και με τους δύο ανιχνευτές προκύπτει ένα μετάγραφο μεγέθους 15-16.000 bp, επιβεβαιώνοντας ότι η αλληλουχία που έχει καταχωρηθεί στις βάσεις δεδομένων περιέχει σχεδόν ολόκληρο το cDNA του *Fras1*. Με τον πρώτο ανιχνευτή ανιχνεύεται και ένα άλλο μικρότερο μετάγραφο, μεγέθους 4.8 Kb, το οποίο αποτελεί είτε προϊόν εναλλακτικής συναρμολόγησης του *Fras1*, είτε μετάγραφο ομόλογου γονιδίου (εικ. 3b).

Επειδή το μεταφραζόμενο cDNA του *Fras1* είναι αρκετά μεγάλο και το μέγεθος των κλώνων cDNA της βιβλιοθήκης είναι μόνο 1-4 Kb, γίνεται κατανοητό ότι η διαδικασία κλωνοποίησης του cDNA του *Fras1* είναι μία πολύπλοκη και χρονοβόρα διαδικασία, που απαιτεί πολλές προσπάθειες ανίχνευσης της βιβλιοθήκης (screenings). Ταυτόχρονα σε κάθε διαδικασία ανίχνευσης συλλέγονται όσο το δυνατό περισσότεροι κλώνοι (ώστε να υπάρχουν και αρκετοί

Xho 0 W87 ExCell 2980 BamHI  
 Xho 0 W41 ExCell 4290 BamH  
 Xho 1503 W42 ExCell 4290 BamHI  
 BamHI 1785 W43 ExCell 5450 Xho  
 Xho 3483 W70 ExCell 5005 BamH  
 BamHI 3120 W105 BS-KS 4815 Kpn EcoRI insert  
 BamHI 5040 W104 BS- 6591 Kpn EcoRI insert  
 Xho 4550 W124 BS-KS 630 HindII XhoI/HindIII  
 Xho 6000 W123 BS- 7590 HindII XhoI/HindIII  
 T7 6070 W164 BS-KS 8950 T3 NotI insert  
 T7 650 W156 BS-KS 8950 T3 NotI insert  
 T 720 W157 BS-KS 10020 T3 NotI insert  
 T 722 W163 BS-KS 11050 T3 NotI insert  
 T 7620 W188 BS-KS 10470 T3 NotI insert  
 T3 8000 W185 BS-KS 10030 T7 NotI insert  
 T7 9050 W180 BS-KS 10970 T3 EcoRI insert  
 9830 W186/187BS-KS 12940  
 9610 W174/175BS-KS 13600

### Εικ. 1: Αλληλοεπικαλυπτόμενοι κλώνοι cDNA που συνθέτουν το cDNA του *Fras1*

Απεικονίζεται ένα μέρος των κλώνων cDNA που έχουν απομονωθεί, καθώς και η σχετική τους θέση. Πάνω από τη γραμμική παράσταση κάθε κλώνου αναγράφεται το όνομα του, το οποίο ακολουθείται από τον χρησιμοποιούμενο φορέα κλωνοποίησης, που είναι είτε ο pBS-KS+, είτε ο pExCell. Σημειώνονται επίσης το μέγεθος κάθε κλώνου, καθώς και ο τρόπος κλωνοποίησης του στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα, με βάση τις περιοριστικές θέσεις που αναγράφονται εκατέρωθεν του κλώνου. Στις γραμμικές παραστάσεις μερικών κλώνων υποδεικνύεται και ο προσανατολισμός των εκκινητών T3 και T7 των πλασμιδιακών φορέων pBS-KS<sup>+</sup>, που ταυτοποιεί την κατεύθυνση ένθεσης του κλώνου στον φορέα.

επικαλυπτόμενοι κλώνοι, οι οποίοι θα συμβάλλουν στην αποφυγή λαθών κατά την ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας), με αποτέλεσμα να ελλοχεύουν πιθανότητες ύπαρξης χιμαιρισμού στο cDNA που απομονώθηκε. Παρόλα αυτά η νουκλεοτιδική αλληλουχία του *Fras1* που ταυτοποιήθηκε, επιβεβαιώθηκε για την αρτιότητα της αλληλουχίας της με την εύρεση της στις διεθνείς βάσεις δεδομένων και ιδιαίτερα στη βάση δεδομένων Celera ([www.celera.com](http://www.celera.com), στην οποία είχαμε πρόσβαση μέσω των συνεργατών μας στη Γερμανία, στο εργαστήριο του Καθ. P.Gruss). Μέσω της Celera αποκαλύφθηκε ότι το *Fras1* εκτείνεται σε ένα γενετικό τόπο μεγέθους περίπου 500 Kb.

## I.III Πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης *Fras1*

Συγκρίνοντας την πρωτεϊνική αλληλουχία της *Fras1* με τις πρωτεϊνικές αλληλουχίες που υπάρχουν στις διεθνείς βάσεις δεδομένων, προκύπτει ότι η *Fras1* παρουσιάζει διάφορες χαρακτηριστικές περιοχές, που συναντώνται σε ποικίλες γνωστές πρωτεΐνες, με διαφορετικές λειτουργίες. Συγκεκριμένα, ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης εντοπίστηκαν οι παρακάτω αμινοξικές περιοχές:

**1.** Η περιοχή **27-417 aa**, η οποία είναι πλούσια σε κυστεΐνες και περιλαμβάνει 6 επαναλαμβανόμενες πεπτιδικές αλληλουχίες. Το μοτίβο των αλληλουχιών αυτών συναντάται σε διάφορες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, όπως η περιοχή C του παράγοντα von Willebrand (για το λόγο αυτό τα παραπάνω μοτίβα αναγνωρίζονται στις βάσεις δεδομένων ως VWC-motifs) (Sadler, J.E, 1998), η Χορδίνη (chordin), τα Ινώδη Προκολλαγόνα I, II, III, V (fibrillar procollagens I, II, III, V), σε πρωτεΐνες που προσομοιάζουν στα μέλη της οικογένειας Nel (Nel-like family), καθώς και στις πρωτεΐνες CRIM-1, Κιελίνη (Kielin), Amnionless, Νευραλίνη (Neuralin), Crossveinless2, (Θρομβοσπονδίνη 1) Thrombospondin1, (Θρομβοσπονδίνη 2) Thrombospondin2 κ.τ.λ (εικ. **2**, εικ. **3a** και εικ. **4**) (Larrain *et al.*, 2000; Larrain *et al.*, 2001).

**2.** Η αμινοξική περιοχή από **418-1095 aa**, που είναι και αυτή πλούσια σε κυστεΐνη και περιλαμβάνει 13 επαναλαμβανόμενα πρωτεϊνικά μοτίβα, τα οποία συναντώνται σε πρωτεάσες της οικογένειας των φουρινών (furin) (Roebroek *et al.*, 1992) (εικ. **2**, εικ. **3a** και εικ. **5**).

Και στις δύο παραπάνω περιοχές παρατηρείται ακριβής στοίχιση των καταλοίπων των κυστεϊνών ανάμεσα στη *Fras1* και στις άλλες πρωτεΐνες.

**3.** Η μεγάλη πρωτεϊνική περιοχή από **1104-2520 aa**, παρουσιάζει ομολογία με την πρωτεΐνη NG2 (η οποία είναι μία πρωτεογλυκάνη των θηλαστικών που προσδένει θειική χονδροϊτίνη). Το ποσοστό ταυτότητας με την NG2 είναι 22 % (Nishiyama *et al.*, 1991; Pluschke *et al.*, 1996) (εικ. **2** και εικ. **3a**).

**4.** Η περιοχή των 564 αμινοξέων από **2566-3130 aa**, που περιέχει 5 επαναλαμβανόμενες πεπτιδικές αλληλουχίες (Calx-beta motifs), οι οποίες συναντώνται σε ιοντοανταλλάκτες Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> (Na-Ca exchangers) της κατηγορίας των πρωτεϊνών NCX1, NCX3, στα θηλαστικά και στη δροσόφιλα και τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως θέσεις πρόσδεσης ασβεστίου (Schwarz E.M. and Benzer S., 1997; Guerini D, 1998) (εικ. **2**, εικ. **3a**, εικ. **6**).

Όπως προκύπτει από προγράμματα ανάλυσης πρωτεϊνικών δομών (π.χ το πρόγραμμα Smart: <http://smart.embl-heidelberg.de/>), η πρωτεΐνη *Fras1* περιέχει μια πιθανή αλληλουχία σιναλίου (SP:signal peptide) στα πρώτα 20 αμινοτελικά αμινοξέα, για εισαγωγή στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και ολοκλήρωση της σύνθεσης της (κατάλοιπα από 2-22) και μία πιθανή διαμεμβρανική περιοχή (TM:transmembrane protein) (κατάλοιπα από 3895-3924) στο καρβοξυτελικό της άκρο. Χρησιμοποιώντας διάφορα άλλα προγράμματα βρέθηκαν στην πρωτεΐνη και αρκετές πιθανές θέσεις N (Asn-X-Ser/Thr, NXS/T) και O-γλυκοζιλίωσης (Ser-Gly, SG), N-μυριστιλίωσης και φωσφοριλίωσης. Συγκεκριμένα στην περιοχή της *Fras1* που





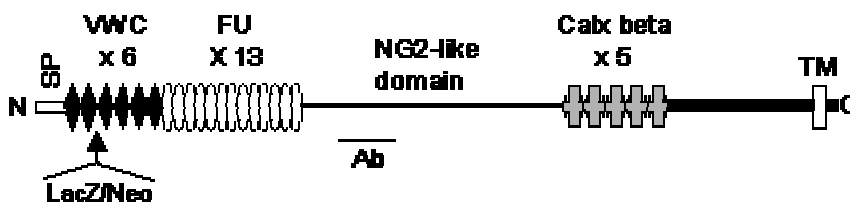
## Εικ. 2: Η πρωτεϊνική αλληλουχία του γονιδίου *Fras1*

Το μέγεθος της πρωτεΐνης *Fras1* είναι 4010 αμινοξέα. Στην αναγραφόμενη πρωτεϊνική αλληλουχία συμβολίζεται με μπλε κεφαλαίο γράμμα η Μεθειονίνη (M) στην αρχή της πρωτεΐνης, με μπλέ υπογραμμισμένα γράμματα το πιθανό πεπτιδίο σινιάλο (SP) στο αμινοτελικό άκρο, ενώ τα υπογραμμισμένα γράμματα με κόκκινο χρώμα συμβολίζουν την πιθανή διαμεμβρανική περιοχή (TM) στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Υπογραμμίζονται επίσης οι πιθανές θέσεις N- και O-γλυκοζιλίωσης. Με τα έντονα υπογραμμισμένα γράμματα αναπαρίστανται οι συντηρημένες κυστεΐνες στα 6 επαναλαμβανόμενα μοτίβα τύπου VWC και στα 13 μοτίβα τύπου φουρίνης, ενώ με έντονα γράμματα σημειώνονται τα συντηρημένα αμινοξέα στα 5 μοτίβα τύπου Calx-β. Οι παύλες ανάμεσα στα αμινοξέα συμβολίζουν κενά και απλώς χρησιμοποιήθηκαν για την απλούστερη στοίχιση των επαναλαμβανόμενων μοτίβων. Με βέλος υποδεικνύεται η θέση εισαγωγής της κασέτας με τη γαλακτοζιδάση και τη νεομυκίνη (LacZ/Neo), που χρησιμοποιήθηκε για την απενεργοποίηση του γονιδίου *Fras1*.

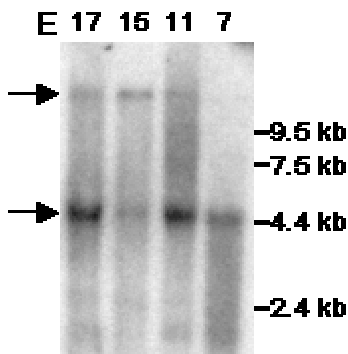
παρουσιάζει ομολογία με την πρωτεογλυκάνη, περιέχονται 6 ζευγάρια Ser-Gly, τα οποία χρησιμεύουν σαν πιθανές θέσεις πρόσδεσης γλυκοσαμινογλυκανών (O-γλυκοζιλίωση) (εικ. 2 και εικ. 3a).

Ερευνώντας τις διεθνείς βάσεις δεδομένων, το γονίδιο *Fras1* εντοπίστηκε επίσης στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα τμήματα του cDNA του *Fras1* ανιχνεύθηκαν στις βάσεις δεδομένων σαν ESTs, τόσο στον ποντικό (καλύπτοντας συνολικά περίπου το 20% της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του cDNA του *Fras1*), όσο και στον άνθρωπο. Από την άλλη μεριά εντοπίστηκαν περιοχές του γονιδίου *Fras1*, μετά τα μοτίβα των κυστεϊνών και σε δυο άλλους οργανισμούς, στο Zebrafish και στον αχινό. Το μεγαλύτερο εύρος ομολογίας με το *Fras1* εντοπίζεται στον αχινό, του οποίου η πρωτεΐνη ECM3 που στερείται των μοτίβων που περιέχουν κυστεΐνες, παρουσιάζει 32% ταυτότητα με την περιοχή της *Fras1* από το αμινοξύ 1102 μέχρι το αμινοξύ 3937 (Hodor *et al.*, 2000). Στο Zebrafish ανιχνεύεται ένα τμήμα που παρουσιάζει 79% βαθμό ταυτότητας με μία μικρότερη αλλά συνεχόμενη περιοχή της *Fras1*, από το αμινοξύ 3171 μέχρι το αμινοξύ 3297.

**a**



**b**



### Εικ. 3: Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης Fras1 και ανίχνευση των mRNA του Fras1

**a.** Οι διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης Fras1 συνάγονται με βάση την προκύπτουσα αμινοξική αλληλουχία. Ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (N) συναντάται πρώτα το πιθανό πεπτιδίο σινιάλο (SP), στη συνέχεια τα 6 επαναλαμβανόμενα και πλούσια σε κυστεΐνη μοτίβα της περιοχής C του παράγοντα Von Willebrand (VWC), τα οποία ακολουθούνται από 13 επαναλαμβανόμενα και πάλι πλούσια σε κυστεΐνη μοτίβα τύπου φουρίνης (FU), καθώς και από μια περιοχή που παρουσιάζει ομολογία με την NG2 (NG2 like domain). Στη συνέχεια εντοπίζονται τα 5 μοτίβα τύπου Calx-beta και προς το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης συναντάται μία πιθανή διαμεμβρανική περιοχή (TM). Υποδεικνύονται με βέλος η θέση εισαγωγής της κασέτας γαλακτοζιδάσης/νεομυκίνης (LacZ/Neo), μπροστά από το τρίτο μοτίβο τύπου VWC, και με οριζόντια μπάρα το πεπτιδίο στην περιοχή της πρωτεογλυκάνης, που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση και την παραγωγή του πολυκλωνικού αντισώματος. **b.** Ανάλυση κατά Northern των mRNAs του Fras1. Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε περιέχει poly A+ RNA από έμβρυα ποντικού των αναπτυξιακών σταδίων E7.0, E11.0, E15.0 και E17.0 και υβριδοποιήθηκε με ανιχνευτή μεγέθους 900 bp, ο οποίος εντοπίζεται στην περιοχή του cDNA του Fras1, που κωδικοποιεί για μοτίβα τύπου VWC. Διαπιστώνεται ότι το πλήρες μετάγραφο του γονιδίου Fras1 είναι 15-16 kb, ενώ παρατηρείται και ένα μικρότερο στα 4.8 kb, όπως υποδεικνύεται με τα δυο βέλη. Στη δεξιά πλευρά του στυπώματος σημειώνονται οι μάρτυρες μεγέθους RNA.

Fras1-1	27	CLYQGSFLADATIWKPDS-----CQNCRCHGDIVI	57
Fras1-2	94	CHHEGKIHEHGTEWASAP-----CTVCSCTHGEVR	124
Fras1-3	158	CSYDGHVFQDGEDWQLSR-----CAKCVCRNGLTQ	188
Fras1-4	220	CSTAGQVYEHGEQWKEDA-----CTL <sup>→</sup> CMCDQGOVR	250
Fras1-5	284	CSSGGVRLRYQDEM <sup>→</sup> WKGSA-----CEFCMCDQGOVT	314
Fras1-6	348	CIYEQKAETMSSSAREIKHVPDGEKWEEGPCKLCECREAQVT	390
Nel1-1	273	CQVSGLLYRDQDSWVDGDN-----CGNCTCKSGAVE	304
Chordin-1	693	CSFEGQLRAHGSRWAPDYDRK-----CSVCSQKRTVI	726
Col1-1	34	CLQNGQRYKDKDVWKPSS-----CRI <sup>→</sup> CVCDTGNVL	64
kielin-1	909	CVQDGV <sup>→</sup> EFLEGIEWELDGNP-----CSSCTCRNGDTV	941
kielin-1	1085	CNYAGKEYPNGADFP <sup>→</sup> HPTDK-----CRQCHCINGNVQ	1117
kielin-1	1617	CRYQ <sup>→</sup> GKEFSEGAHWV <sup>→</sup> PHTDP-----CLKCTCSNGHVD	1649
kielin-1	1676	CVYNGREYRDN <sup>→</sup> SNW <sup>→</sup> LSSSDH-----CMS <sup>→</sup> CMCVDGVT	1708
kielin-1	1930	CWYQ <sup>→</sup> GQRFLSNEHW <sup>→</sup> QVDE-----CTACTCVSGEVH	1960

Fras1-1	58	CKPVVCKNPRCAF <sup>→</sup> EKGEVLWIAPNQCCPQC	87
Fras1-2	124	CSHQQC <sup>→</sup> TPLSCGPQELEFLAEGR--CCPIC	152
Fras1-3	188	CFAAQ <sup>→</sup> CQPLFCNQDEIVVRVPGK--CCSQC	216
Fras1-4	250	CHKQVC <sup>→</sup> PPLRCAKGQGRARHHGQ--CCEEC	278
Fras1-5	314	CQTGEC <sup>→</sup> AKVACALGEELVHLEGK--CCPEC	342
Fras1-6	390	CYEPS <sup>→</sup> CPP--CPVATLALVVKGQ--CCPDC	416
Nel1-1	304	CRRMS <sup>→</sup> CPPLNCS <sup>→</sup> PDSL <sup>→</sup> VPVHISGQ--CCKVC	332
Chordin-1	726	CDPIV <sup>→</sup> CPPLNCS <sup>→</sup> QPVHLPDQ-----CCPVC	751
Col1-1	64	CDDII <sup>→</sup> CEDPDCLNPEIPF---GE--CCPIC	89
kielin-1	941	CGVSE <sup>→</sup> CPPVSC <sup>→</sup> LHPTRRE---GE--CCPVC	966
kielin-1	1117	CLAQR <sup>→</sup> CPPLLCAEFP <sup>→</sup> FVP---GE--CCPQC	1142
kielin-1	1649	CEPPQ <sup>→</sup> CPPLPCT <sup>→</sup> QQVTD <sup>→</sup> DP---GT--CCPRC	1674
kielin-1	1708	CSKLQ <sup>→</sup> CITS--CTN <sup>→</sup> QITIP---GE--CCPVC	1732
kielin-1	1960	CHSER <sup>→</sup> CPQVSC <sup>→</sup> TAEETPALIPGM--CCPHC	1988

### Εικ. 4: Μοτίβα τύπου VWC

Στοιχίσεις των 6 μοτίβων τύπου VWC της πρωτεΐνης Fras1, με 5 από τα 27 μοτίβα VWC της Κιελίνης (Kielin) (xeporus), με 1 από τα 4 μοτίβα της Nel1 (αρουραίος, rat), με 1 από τα 4 μοτίβα της Χορδίνης (chordin) (xenla) και με το ένα μοτίβο VWC του Κολλαγόνου I (Col1) (ποντίκι, mouse). Με έντονα γράμματα συμβολίζονται οι κυστεΐνες που είναι 100% συντηρημένες στα μοτίβα τύπου VWC, ενώ υπογραμμίζονται τα αμινοξέα των μοτίβων με μικρότερο ποσοστό συντήρησης.

Στη δεξιά και αριστερή πλευρά των μοτίβων υποδεικνύονται οι θέσεις των περιοχών στοίχισης σε κάθε πρωτεΐνη.

Fras1-1 418 VHCHPDCLT--CSHSPDH----CDLCQDPTKLLQNGR--CVHS-CGLGFYQAGSL----C  
Fras1-2 465 LACQPQCST--CTN-GLE----CSSCLPPLLMQQGQ---CVST-CGDGFYQDHHS----C  
Fras1-3 510 AVCHESCAG--CW--GPTEKH-CMACRDPLOVLRDSS--CENT-CGNGFYNRQGT----C  
Fras1-4 558 VACDQSCKS--C---GPSSPR-CLSCAEKTI LHDGK---CISE-CPHGGYADSTGS---C  
Fras1-5 605 KVCHSSCAS--CS--GPTAAH-CIACIHPQTLRQGH---CLPS-CGEGFYDPHGI----C  
Fras1-6 711 EVCHPSCLT--CE--GKSPHN-CTGCESTHALLAGC---CVSQ-CPETHFNLEGT----C  
Fras1-7 758 TECHPSCRQ--CH--GPLESD-CVSCHPHLTLTSGH---CKTS-CKEEQFLNLVGY---C  
Fras1-8 806 ADCHPLCQH--CVANLQDTGSI CLKQ HARHLLLDGDH--CVPE-CPPGHYKERGT----C  
Fras1-9 857 KTCHSSCRS- CQNGGPFSS---CSSCDTGLVLTHIGT--CSTA-CFPGHYLDDNQV---C  
Fras1-10 906 QPCNRHCRS--CDSQGS-----CTSCRDP SKVLLFGE--CQYESCTPQYYLDIATKT--C  
Fras1-11 955 KECDWSCNA--CT--GPLRTD-CLQCMDGYVLQDGV---CVEQ-CSPQHYRDSGS----C  
Fras1-12 1002 KRCDSHCV E--CQ--GPHE---CTRCEEPFLFFQAQ---CVQE-CGKGYFADHAKHR--C  
Fras1-13 1049 IACPQGC LR--CSHKDQ-----CHLCDHSFFLKSGL---CMPT-CVPGFSGHSSNEN--C  
PCK5B-1 678 RHCHDSCAT--CH--GRHSGQ-CLSCHEGNYFVEDEGT-CSEE-CGQGYKDEEERK--C  
PCK5B-2 1235 RPOCHQSKT--CS--GPSDTD-CDSCKGDDTILDRGE--CITS-CGPGYMDRREK---C  
FUR2-1 1014 WPCHDTCET--CA--GAGPDS-CLTCAPAHLHVIDLAV-CLQF-CPDGYFENS RNRT--C  
FUR2-2 1112 AFCHSTCAT--CN--GPTDQD-CITCRSSRYAWQNK---CLIS-CPDGFYADKKRLE--C  
PAC4-1 693 SVCHPECGDKGCD--GPNADQ-CLNCVHFSLGSVKT SRKCVSV-CPLGYFGDTAARR--C  
PAC4-2 747 RRCHKGCET--CSSRAATQ---CLSCRRGFYHHQEMNT-CVTL-CPAGFYADES QKN--C  
PCK5M-1 1395 VPCHKNCLE--CN--GPKEDD-CKVCADTSKALHNGL--CLDE-CPEGTYKEEENDE--C  
PCK5M-2 1494 QPCHKKCSR--CS--GPSEDQ-CYTCPRETFLNNTT---CVKE-CPEGYHTDKDSQQ--C  
PCK5M-3 1543 VLCHSSCRT--CE--GPHSMQ-CLSCRPGWFQLGKE---CLLQ-CRDGYYGESTSGR--C  
PCK5M-4 1643 ERCHPTCDK--CS--GKEAWS-CLSCVWSYHLLKGI---CIPE-CIVGEYREGKGENFNC

**Εικ. 5: Μοτίβα τύπου φουρίνης**

Στοιχίσεις των 13 μοτίβων τύπου φουρίνης της πρωτεΐνης Fras1, με 2 από τα 18 μοτίβα τύπου φουρίνης της PCK5-BRACL, με 2 από τα 10 μοτίβα της FUR2-DR, με 4 από τα 22 μοτίβα της PCK5-MOUSE και με 2 από τα 5 μοτίβα της PAC4-HUMAN. Με έντονα γράμματα συμβολίζονται τα αμινοξέα των κυστεινών που είναι 100% συντηρημένα στα μοτίβα τύπου φουρίνης, ενώ υπογραμμίζονται τα αμινοξέα των μοτίβων που παρουσιάζουν μικρότερη συντήρηση. Στην αριστερή πλευρά των μοτίβων υποδεικνύονται οι θέσεις των περιοχών στοίχισης σε κάθε πρωτεΐνη.

CMRP-1 2566 **VSEKAGS**-----**VS**VTV**QRTG**-NLNQYAI**VLCRTEQGT**ASSSSHPGQQ--- 2607  
CMRP-2 2683 **VNESAGF**-----**LF**API**KRQG**-DSSSTV**SAVCY**TVPK**SAMGSS**LYALES**GS** 2727  
CMRP-3 2808 **ISEDAGT**-----**VKIPVIRHGT**DLSTFT**SVWCAT**RPSPD**PASATPGV**----- 2848  
CMRP-4 2928 **VKEKEGV**-----**LHIPIIRSG**-DLSYESS**VR**CY**TQGHSAQVME**----- 2964  
CMRP-5 3049 **VREPAGPEAIAVLSIKVIRG**-DQ**NRTSKIRCSTRD**GS**AQSGV**----- 3090  
ECM3-1 1738 **VNETERY**-----**LN**IK**LVRG**-YLGETSF**VGIQTADGT**AI**ADE**----- 1774  
ECM3-2 1852 **IEEDIGE**-----**FLVPIRRTG**-DLSQEL**MASCSTMPGS**ATGSD**PSPVLSFS** 1896  
ECM3-3 1978 **VDENAPF**-----**VEVTVFRTG**TDVSK**MASVTVRSRAN**PV**SAVAGE**----- 2018  
ECM3-4 2098 **VNENDIR**-----**ITA**EV**VRSG**-DLSI**ESSVR**CY**TROGSAQVMM**----- 2134  
ECM3-5 2219 **ID**EPTD**LDLSVVTVSIPVIRMG**-D**NTQTSIVRVFTKDG**S**ARSGI**----- 2260  
CALX-b1 453 **VM**ENC**GE**-----**FEVRVVRG**-D**ISTYASVEY**ET**QDGTASAGT**----- 489  
NAC1-b1 415 **CL**ENC**GT**-----**VALTIIRGG**DLTNT**VFVDFRTE**D**GTANAGS**----- 452  
  
CMRP-1 2608 **DY**MEY**AGQ**-----**VQ**FDE**GESTK**S**CTVI**IN**DD**D**VF**---**ENIESFTVGL** 2647  
CMRP-2 2728 **DF**KSRGR**SAESR**-**VI**FG**PGVT**V**STCDVM**VI**DDSEY**---**EEEEEF**E**IAL** 2771  
CMRP-3 2849 **DY**VP**SSRK**-----**VE**FG**PGITEQY**CT**LTILDDTQYP**VI**EGL**ET**FV**V**FL** 2891  
CMRP-4 2965 **DF**EERR**NADSSR**-**IT**FL**GQKTKNCTVYIH**DD**SMF**---**EPEEQFRVYL** 3008  
CMRP-5 3091 **DY**YP**KSRV**-----**LK**FSP**GVDHIF**K**VEIL**SN**EDR**---**EW**H**ESF**SL**V**L 3130  
ECM3-1 1775 **DF**RG**K**SAR**Q**---**VQ**F**NPGQ**TEGF**WRVRIL**ND**R**LY---**EQ**AE**VFEIIL** 1815  
ECM3-2 1897 **DY**IS**RMEEDPD**N**MVAF**DK**GED**L**AYCRILI**DD**SLY**---**EE**DE**TFQV**KL 1941  
ECM3-3 2019 **DY**AG**ISRN**-----**LDF**AP**GVNQQT**V**KVYI**DD**RGQPR**LE**GP**ET**FELVL** 2061  
ECM3-4 2135 **DY**DERP**NTEASI**-**IT**FL**P**G**ERSKTCTVLL**M**DD**N**VF**---**EP**DE**A**F**R**LV**L** 2178  
ECM3-5 2261 **DY**N**PL**S**QV**-----**LE**FG**FN**TER**VVEIEIL**P**ED**RN---**EM**RE**A**F**T**L**HI** 2301  
CALX-b1 490 **DF**VGR**KGL**-----**LS**F**PP**GV**DEQR**F**RIE**VI**DD**D**VF**---**EE**DE**CFY**IR**L** 529  
NAC1-b1 453 **DY**E**F**TE**GT**-----**VV**F**K**PG**DTQ**KE**IRVGI**DD**DIF**---**EE**DE**N**F**L**V**H**L 492

**Εικ. 6: Μοτίβα τύπου Calx-beta**

Στοιχίσεις των 5 μοτίβων τύπου Calx-beta που εντοπίζονται στην πρωτεΐνη Fras1 με τα αντίστοιχα μοτίβα των πρωτεϊνών ECM3, CALX-beta1 και NAC1-beta1. Όσον αφορά την ECM3 αναγράφονται 5 μοτίβα, ενώ για τις CALX-beta1 και NAC1-beta1 σημειώνεται από ένα επαναληπτικό μοτίβο. Με έντονα γράμματα συμβολίζονται τα αμινοξέα που είναι συντηρημένα στα 5 μοτίβα τύπου Calx-beta και στη δεξιά και αριστερή πλευρά των μοτίβων υποδεικνύονται οι θέσεις των περιοχών στοίχισης σε κάθε πρωτεΐνη.

## II. Στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου *Fras1*

Μία από τις προσεγγίσεις μέσω της οποίας αποφασίστηκε να μελετηθεί η βιολογική λειτουργία του γονιδίου *Fras1* στον ποντικό, ήταν η απενεργοποίηση του χρησιμοποιώντας την μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού. Με την μέθοδο αυτή εισήχθηκε μόνιμα στο ενδογενές γονίδιο *Fras1* μια κατασκευή DNA (κασέτα), η οποία προκαλεί την απενεργοποίηση του *Fras1*, είτε μέσω πρόωρου τερματισμού της μεταγραφής του (με τα σινιάλα τερματισμού που περιέχει η κασέτα για την πολυμεράση RNA τύπου II), είτε μέσω πρόωρου τερματισμού της μετάφρασης του παραγόμενου μεταγράφου του *Fras1* (μέσω των κωδικονίων λήξης της κασέτας, στην περίπτωση που κάποια μόρια πολυμεράσης ξεπεράσουν τα σινιάλα τερματισμού της μεταγραφής της, readthroughs), είτε μέσω αλλαγής του πλαισίου διαβάσματος του μεγαλύτερου μέρους του μεταγράφου του *Fras1* (με την παρεμβολή των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών της κασέτας, στην περίπτωση που ξεπεραστούν και τα δύο παραπάνω εμπόδια).

Η ένθεση της κασέτας DNA στο γονίδιο *Fras1* απαιτεί τη δημιουργία κατάλληλης πλασμιδιακής κατασκευής, η οποία εισάγεται με ομόλογο ανασυνδυασμό στο γονιδίωμα των πολυδύναμων προγονικών κυττάρων (ES) και αντικαθιστά ένα τμήμα του ενδογενούς γονιδίου *Fras1*. Η πλασμιδιακή αυτή κατασκευή που ονομάζεται και κατασκευή στόχος (targeting construct), περιέχει ένα τμήμα του ενδογενούς *Fras1* και την κασέτα που αποφασίζεται να εισαχθεί στο *Fras1*. Η κασέτα περιλαμβάνει αλληλουχίες του πλασμιδιακού φορέα pGNA στις οποίες εντοπίζονται, σινιάλα τερματισμού της μεταγραφής, γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεϊνικά προϊόντα απαραίτητα για την επιλογή των ES στα οποία η κατασκευή ενσωματώνεται στο γονιδίωμα τους, καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν για ποικίλους πρωτεϊνικούς μάρτυρες.

Για τη δημιουργία της κατασκευής στόχου λαμβάνονται υπ' όψη οι παρακάτω προϋποθέσεις (εικ. 1):

**α)** Η κατασκευή στόχος οφείλει να περιέχει ένα τουλάχιστον εξόνιο του ενδογενούς γονιδίου, εντός του οποίου εισάγεται η κασέτα DNA, έτσι ώστε μετά τον ομόλογο ανασυνδυασμό και τη διαδικασία της συρραφής του μεταγράφου να είναι αδύνατη η απομάκρυνση της κασέτας.

**β)** Το εξόνιο του γονιδίου στην κατασκευή στόχο, εντός του οποίου γίνεται η εισαγωγή της κασέτας, επιλέγεται να κωδικοποιεί για την αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης (κατά προτίμηση η θέση εισαγωγής της κασέτας εντοπίζεται μετά το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης του ενδογενούς γονιδίου), έτσι ώστε το συγκεκριμένο γονιδιακό προϊόν να καταστραφεί σχεδόν από την αρχή του.

**γ)** Η περιοριστική θέση εντός του παραπάνω εξονίου, στην οποία επιλέγεται να εισαχθεί η κασέτα, είναι προτιμότερο να μην απαντάται συχνά στα υπόλοιπα τμήματα της κατασκευής στόχου (για μεγαλύτερη ευκολία στη δημιουργία αυτής της κατασκευής).

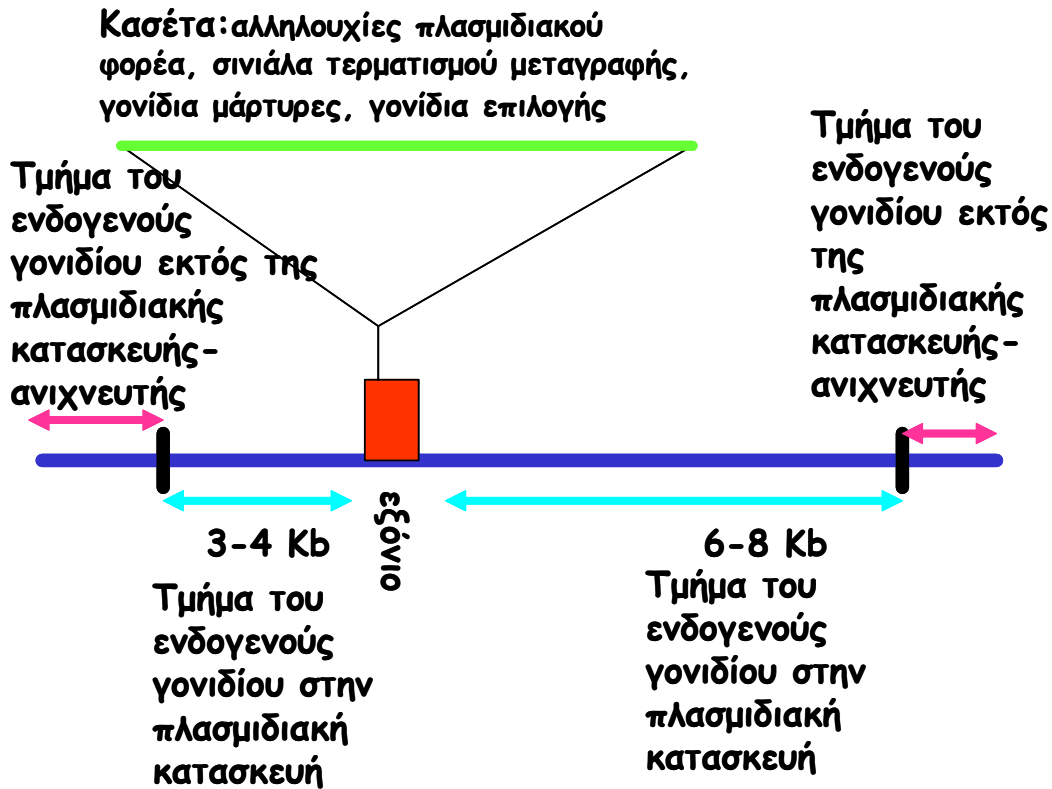
**δ)** Εκατέρωθεν της κασέτας στην κατασκευή στόχο οφείλονται να εντοπίζονται τμήματα του ενδογενούς γονιδίου στο οποίο θέλουμε να εισαχθεί η κασέτα, με συνολικό μέγεθος τουλάχιστον 9-10 Kb (κατά προτίμηση 3-4 Kb από τη μία μεριά και 6-8 Kb από την άλλη), έτσι ώστε ο ομόλογος ανασυνδυασμός ανάμεσα στην πλασμιδιακή κατασκευή και στο ενδογενές γονίδιο στα κύτταρα ES να πραγματοποιείται με αυξημένη συχνότητα.

**ε)** Οι γενωμικές περιοχές του ενδογενούς γονιδίου που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία της κατασκευής στόχου προέρχονται από γονιδίωμα του ίδιου στελέχους με τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα στα οποία εισάγεται η κατασκευή αυτή, έτσι ώστε να μην παρατηρούνται πολυμορφισμοί ανάμεσα στα τμήματα του ενδογενούς γονιδίου και στην πλασμιδιακή κατασκευή, οι οποίοι θα μείωναν το ποσοστό επιτυχίας του ομόλογου ανασυνδυασμού.

**ζ)** Στην περίπτωση που η κασέτα περιέχει κάποιο γονιδιακό μάρτυρα π.χ γαλακτοζιδάση χωρίς δικό του υποκινητή, η τοποθέτηση του μάρτυρα στην κατασκευή στόχο πραγματοποιείται κατά τέτοιο τρόπο έτσι ώστε το πλαίσιο ανάγνωσης του να συμβαδίζει με το πλαίσιο ανάγνωσης του εξονίου του ενδογενούς γονιδίου που προηγείται της κασέτας. Κατά συνέπεια ο εκάστοτε γονιδιακός μάρτυρας μπορεί να δώσει πληροφορίες για την έκφραση του στοχευόμενου γονιδίου, να διευκολύνει την ανάλυση του φαινοτύπου που προκύπτει μετά την απενεργοποίηση του γονιδίου, καθώς και να συμβάλλει στην δημιουργία κυτταροκαλλιιεργειών που να περιέχουν το απενεργοποιημένο γονίδιο.

**θ)** Η κατασκευή στόχος πρέπει να περιέχει μια μοναδική περιοριστική θέση, εκτός των γενωμικών τμημάτων του ενδογενούς γονιδίου και των λειτουργικών περιοχών της κασέτας, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει γραμμική πριν εισαχθεί στα κύτταρα ES (δεδομένου ότι η γραμμική μορφή ευνοεί τον ομόλογο ανασυνδυασμό).

ι) Τέλος προκειμένου να πιστοποιηθεί ο ομόλογος ανασυνδυασμός και να ελεγχθεί η ακεραιότητα της στοχευόμενης περιοχής στο 5' και 3' άκρο της, αφήνονται εκτός της πλασμιδιακής κατασκευής τα άκρα του τμήματος του ενδογενούς γονιδίου που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία της, ώστε να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια σαν ανιχνευτές.

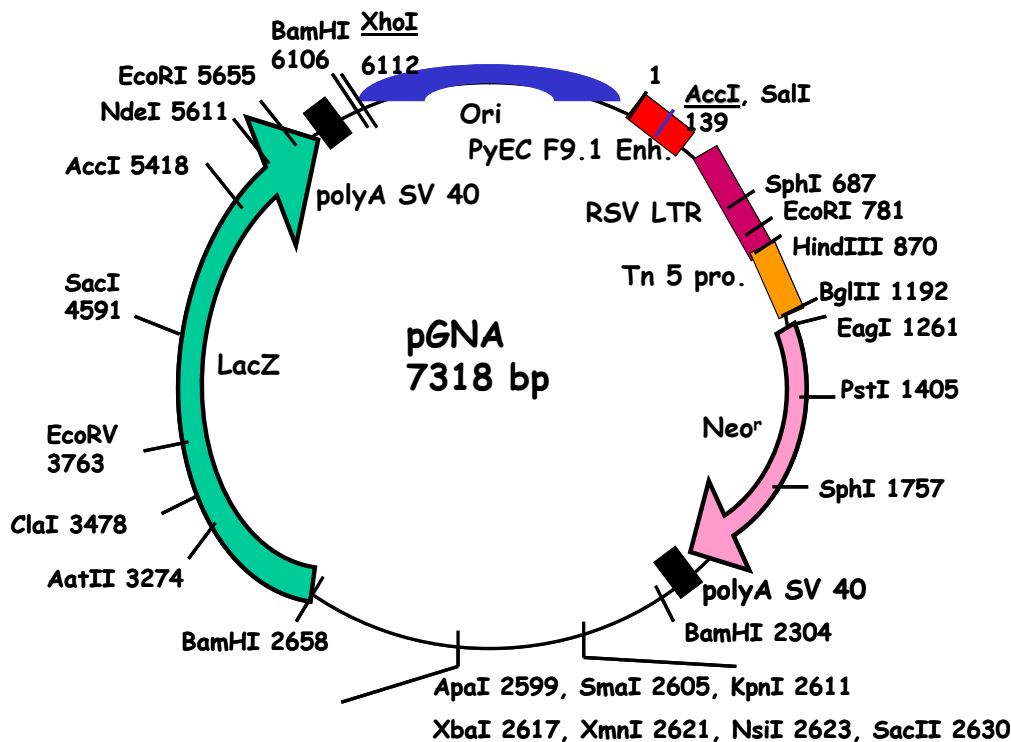


Εικ. 1: Σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής στόχου σε γραμμική μορφή

Η κατασκευή στόχος εντοπίζεται ανάμεσα στα όρια που περικλείονται από τις κάθετες μαύρες γραμμές

Στη συγκεκριμένη περίπτωση η κασέτα που εισήχθηκε στο γονίδιο *Fras1* αντιστοιχεί στον πλασμιδιακό φορέα pGNA, ενώ όσον αφορά το γενωμικό τμήμα του *Fras1* που χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή στόχο, αυτό προέκυψε ύστερα από διερεύνηση μιας γενωμικής βιβλιοθήκης.

Ο φορέας pGNA περιέχει ένα τμήμα DNA που κωδικοποιεί την βακτηριακή πρωτεΐνη γαλακτοζιδάση (περίπου 3000 bp) μαζί με το σινιάλο τερματισμού της μεταγραφής από τον SV40, χωρίς όμως ρυθμιστικά στοιχεία υποκινητή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα προκειμένου να μεταγραφεί η γαλακτοζιδάση να χρησιμοποιείται η πολυμεράση που προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου *Fras1*. Κατά συνέπεια, μετά την εισαγωγή της κασέτας στο γονίδιο *Fras1*, απαιτείται η διατήρηση του πλαισίου ανάγνωσης της γαλακτοζιδάσης. Στον φορέα pGNA περιλαμβάνεται επίσης το γονίδιο της νεομικίνης (1200 bp), το οποίο εκφράζεται στα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα υπό τον έλεγχο του υποκινητή RSV LTR και του ενισχυτή pγEC F9.1. Η μεταγραφή του γονιδίου της νεομικίνης σταματάει με τη βοήθεια ενσωματωμένων στην κατασκευή σινιάλων λήξης του SV40 (εικ. 2).



**Εικ. 2:** Ο πλασμιδιακός φορέας pGNA-Κασέτα

Ο φορέας pGNA/κασέτα (7318 bp) περιέχει το γονίδιο της γαλακτοζιδάσης (LacZ) και της νεομικίνης (Neo<sup>r</sup>), που υποδεικνύονται με βέλη, η φορά των οποίων συμβολίζει και τη φορά μεταγραφής τους. Ο φορέας αυτός περιλαμβάνει και μεταγραφικά σινιάλα τερματισμού από την ουρά πολυαδενυλίωσης (polyA) του SV40, τα οποία συμβολίζονται με τα μαύρα κουτάκια. Με τα έγχρωμα κουτάκια αναπαρίστανται ο ευκαρυωτικός υποκινητής RSV LTR και ο ενισχυτής pyEC F9.1, που ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου της νεομικίνης, ο προκαρυωτικός υποκινητής Tn 5, ενώ με την έλλειψη το σινιάλο έναρξης της αντιγραφής στα βακτήρια, Ori. Απεικονίζεται επίσης ο χάρτης ορισμένων περιοριστικών θέσεων, συμπεριλαμβανομένου του πολυσυνδέτη του φορέα. Οι περιοριστικές θέσεις XhoI και AccI που έχουν υπογραμμιστεί είναι μοναδικές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του φορέα.

## II.1 Ανίχνευση γενωμικής βιβλιοθήκης

Η φαγική γενωμική βιβλιοθήκη η οποία χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει ενθέματα γενωμικού DNA ποντικού του στελέχους Sv129 (129/OLA γενωμική βιβλιοθήκη στον φορέα λGEM<sub>TM</sub>-12). (Από αυτό το στέλεχος προέρχονται και τα κύτταρα ES στα οποία εισήχθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή που δημιουργήθηκε). Το μέγεθος των ενθεμάτων στους φορείς της βιβλιοθήκης κυμαίνεται από 9-23 Kb. Η διερεύνηση της γενωμικής βιβλιοθήκης έγινε με τον ανιχνευτή που περιλαμβάνει το κομμάτι του cDNA του *Fras1* από τα 787-1745 bp, στο οποίο περιέχεται το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (στα 859 bp του cDNA του *Fras1*), ώστε οι κλώνοι που ανιχνεύονται να κωδικοποιούν για τμήματα του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης *Fras1*. Η ανίχνευση της βιβλιοθήκης με τον συγκεκριμένο ανιχνευτή κατέληξε σε τέσσερις διαφορετικούς γενωμικούς κλώνους, οι οποίοι για ευκολία στους χειρισμούς κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pBS-II KS+. Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια τόσο χαρτογράφησης των γενωμικών αυτών κλώνων, όσο και τοποθέτησης τους σε σχέση με το cDNA του *Fras1*. Κατά συνέπεια οι γενωμικοί κλώνοι επωάστηκαν με μία σειρά περιοριστικών ενζύμων και υβριδοποιήθηκαν, είτε με ανιχνευτές από διάφορες περιοχές του cDNA του *Fras1*, είτε με ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν εν δυνάμει περιοριστικές θέσεις εισαγωγής της κασέτας μαζί με κάποια αλληλουχία από το cDNA του *Fras1*.



Με βάση τις προϋποθέσεις που οφείλονται να τηρούνται για τη δημιουργία της κατασκευής στόχου, ο γενωμικός κλώνος που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί αναπαριστάται στην εικ. **3a**. Ο κλώνος αυτός ονομάζεται *Wa*, έχει μέγεθος 14.358 bp και περιέχει στα 3.177 bp την περιοριστική θέση *MscI*, η οποία χρησιμοποιείται σαν θέση εισαγωγής της κασέτας. Η θέση αυτή αντιστοιχεί στη θέση *MscI* στα 1357 bp του cDNA του *Fras1*, στο έκτο εξόνιο του *Fras1* (μεγέθους 166 bp) και μάλιστα μετά τα πρώτα 16 bp του εξονίου, έτσι ώστε να μην είναι πολύ κοντά στις θέσεις συρραφής των εξονίων. Συγκεκριμένα εντοπίζεται στην περιοχή που κωδικοποιεί για το αμινοξύ 162 της πρωτεΐνης *Fras1*, στην αρχή του τρίτου μοτίβου τύπου VWC. Η επόμενη θέση *MscI* εντοπίζεται στα 9000 bp του γενωμικού κλώνου *Wa*. (Τονίζεται ότι τα εξόνια του γονιδίου *Fras1* προκύπτουν από συγκρίσεις της αλληλουχίας του cDNA του *Fras1* με τις αντίστοιχες γενωμικές αλληλουχίες ποντικού στη βάση δεδομένων *Celera*.)

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο γενωμικός κλώνος *Wa* ελέγχεται για χιμαιρισμό πριν χρησιμοποιηθεί στην πλασμιδιακή κατασκευή. Η επιβεβαίωση της αριότητας της αλληλουχίας του *Wa* διαπιστώθηκε με την εισαγωγή της στη βάση δεδομένων *Celera* και τη σύγκριση της με τις αντίστοιχες γενωμικές αλληλουχίες του ποντικού. Από την άλλη μεριά πραγματοποιήθηκε ενδεικτικά επώαση με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και υβριδοποίηση με τμήματα που προέρχονται από το εσωτερικό του *Wa*, τόσο του *Wa* όσο και γενωμικού DNA ποντικού του ίδιου στελέχους.

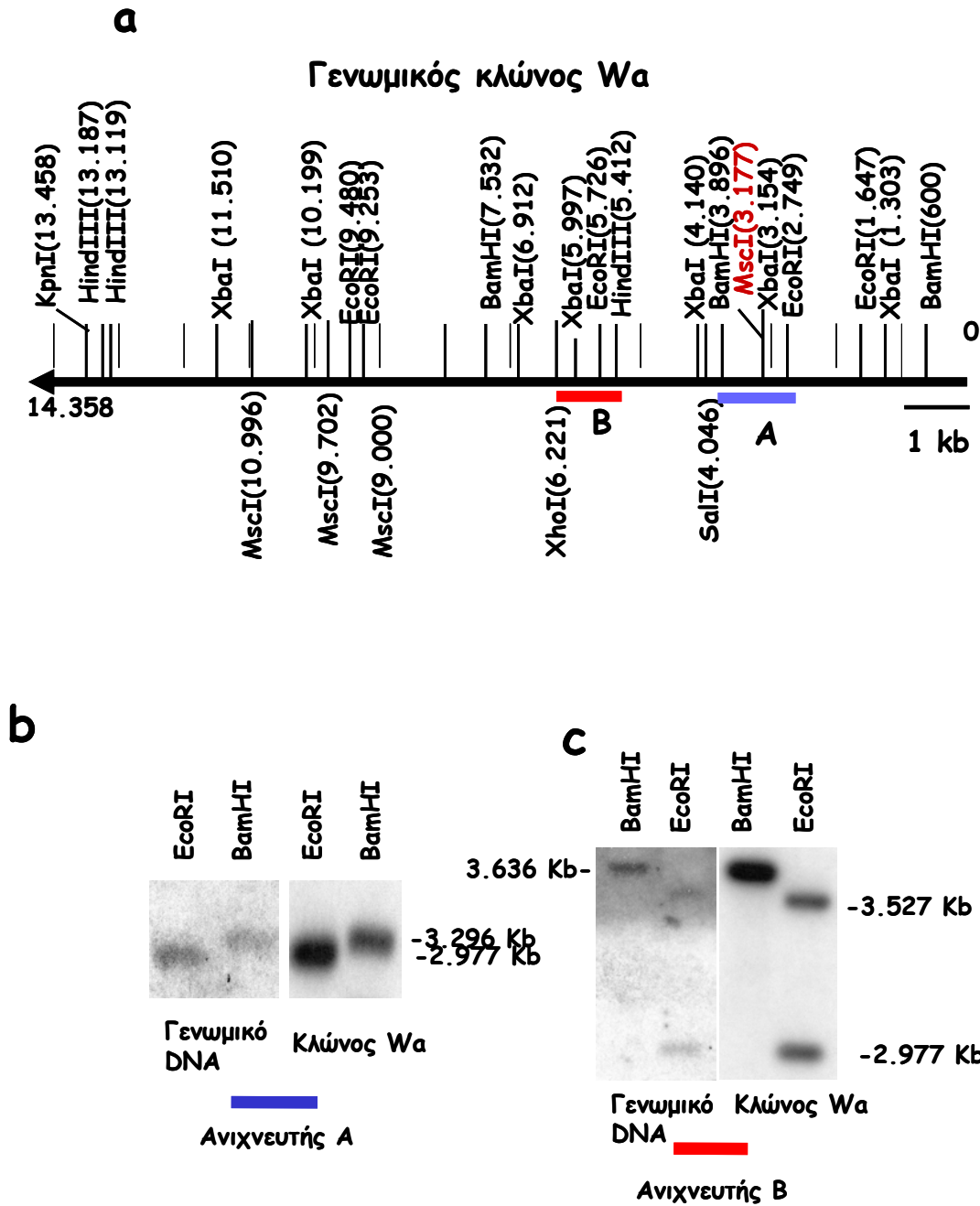
Συγκεκριμένα τόσο ο γενωμικός κλώνος *Wa* όσο και το γενωμικό DNA επωάστηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *BamHI* και στη συνέχεια υβριδοποιήθηκαν με τους ανιχνευτές A και B, που εντοπίζονται στον *Wa* μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *EcoRI* (2.749 bp)/*BamHI* (3.896 bp) και *HindIII* (5.412 bp)/*XhoI* (6.221 bp) αντίστοιχα (εικ. **3a**). Σε κάθε περίπτωση τόσο ο *Wa* όσο και το γενωμικό DNA του ποντικού, παρουσιάζουν και με τους δύο ανιχνευτές τα αναμενόμενα προϊόντα. Δηλαδή με επώαση με *EcoRI* και υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή A εντοπίζεται το τμήμα μεγέθους 2.977 bp, ενώ ύστερα από επώαση με *BamHI* τα τμήματα των 3.636 και 3.296 bp. Αντίστοιχα όταν ο γενωμικός κλώνος *Wa* και το γενωμικό DNA υβριδοποιηθούν με τον ανιχνευτή B, επιδεικνύουν με *EcoRI* τα προϊόντα των 3.527 bp και 2.977 bp, ενώ με *BamHI* το προϊόν των 3.636 bp (εικ. **3b, c**).

## II. II Δημιουργία της κατασκευής στόχου

Ο γενωμικός κλώνος *Wa* και ο πλασμιδιακός φορέας *pGNA* συνέβαλλαν στη δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής που χρησιμοποιήθηκε για την στοχευόμενη απενεργοποίηση του γονιδίου *Fras1*. Η δημιουργία αυτής της κατασκευής περιλαμβάνει τέσσερα στάδια, τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στην εικ. **4 a, b, c, d**.

Στο πρώτο στάδιο, εισάγεται στον πλασμιδιακό φορέα *pBS-II KS+* το τμήμα του γενωμικού κλώνου *Wa* από τα 600-3.177 bp (εικ. **4a**). Στο δεύτερο στάδιο, εισάγεται σε διαφορετικό πλασμιδιακό φορέα *pBS-II KS+* το τμήμα του γενωμικού κλώνου *Wa* από τα 3.177-13.458 bp (εικ. **4b**). Οι περιοχές από 0-600 bp και 13.458-14.358 bp του *Wa*, αφήνονται εκτός των παραπάνω πλασμιδιακών κατασκευών, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο του ομόλογου ανασυνδυασμού και της ακεραιότητας του 5' και 3' άκρου της στοχευόμενης περιοχής του γονιδίου *Fras1*. Στο τρίτο στάδιο, κλωνοποιούνται διαδοχικά στον ίδιο πλασμιδιακό φορέα *pBS-II KS+* και τα δύο παραπάνω τμήματα του *Wa* που χρησιμοποιήθηκαν στο **a** και **b**. Η κλωνοποίηση τους γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε, να προηγείται το τμήμα του *Wa* που κωδικοποιεί για το πιο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης *Fras1*, να έπεται αυτό που κωδικοποιεί για το πιο καρβοξυτελικό και να παρεμβάλλεται μεταξύ τους η μοναδική περιοριστική θέση *NotI* (εικ. **4c**). Τελικά τα τμήματα του *Wa* τα οποία διακόπτονται από την *NotI*, απομονώνονται από τον *pBS-II KS+* και κλωνοποιούνται στον φορέα *pGNA* (εικ. **4d**). Η κλωνοποίηση στον *pGNA* προϋποθέτει το πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου της γαλακτοζιδάσης της κασέτας να συμβαδίζει με το πλαίσιο ανάγνωσης των εξονίων του γενωμικού κλώνου από τα 600-3.177 bp.

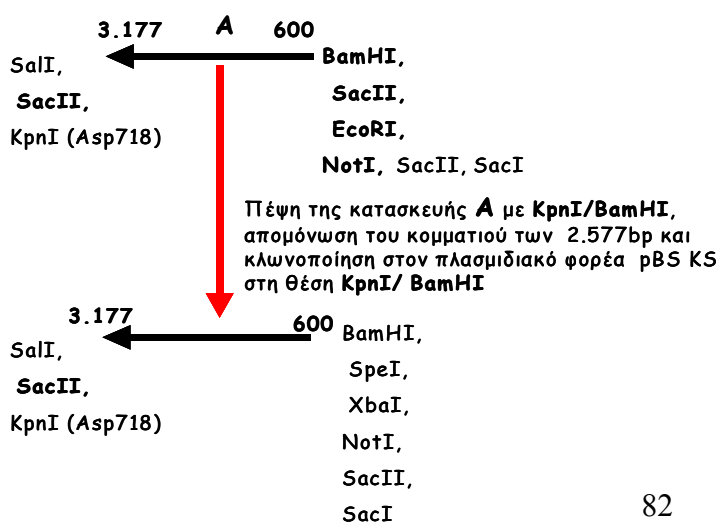
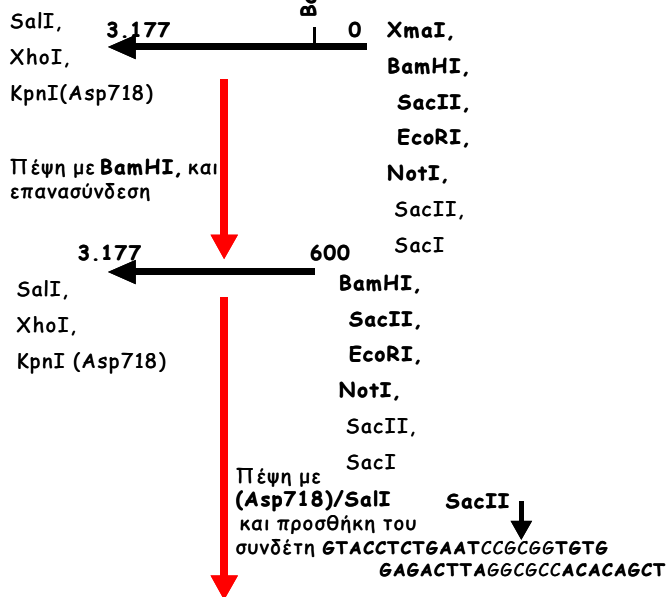
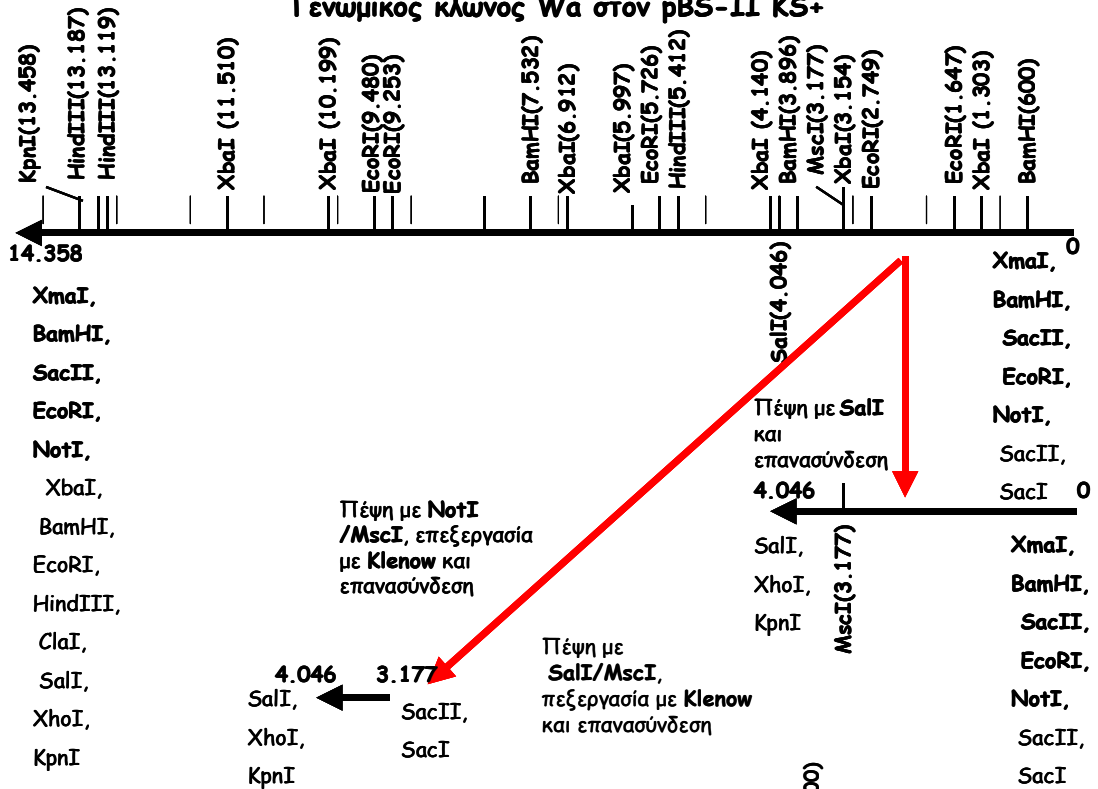
Κατά συνέπεια η κατασκευή στόχος περιλαμβάνει τόσο τις αλληλουχίες του *pGNA* που περιέχουν την κασέτα της γαλακτοζιδάσης/νεομυκίνης, όσο και τις γενωμικές αλληλουχίες του *Fras1*, μεγέθους 2.6 Kb (η περιοχή που κωδικοποιεί για το πιο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης) και 10.3 Kb αντίστοιχα, που περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες της κασέτας.



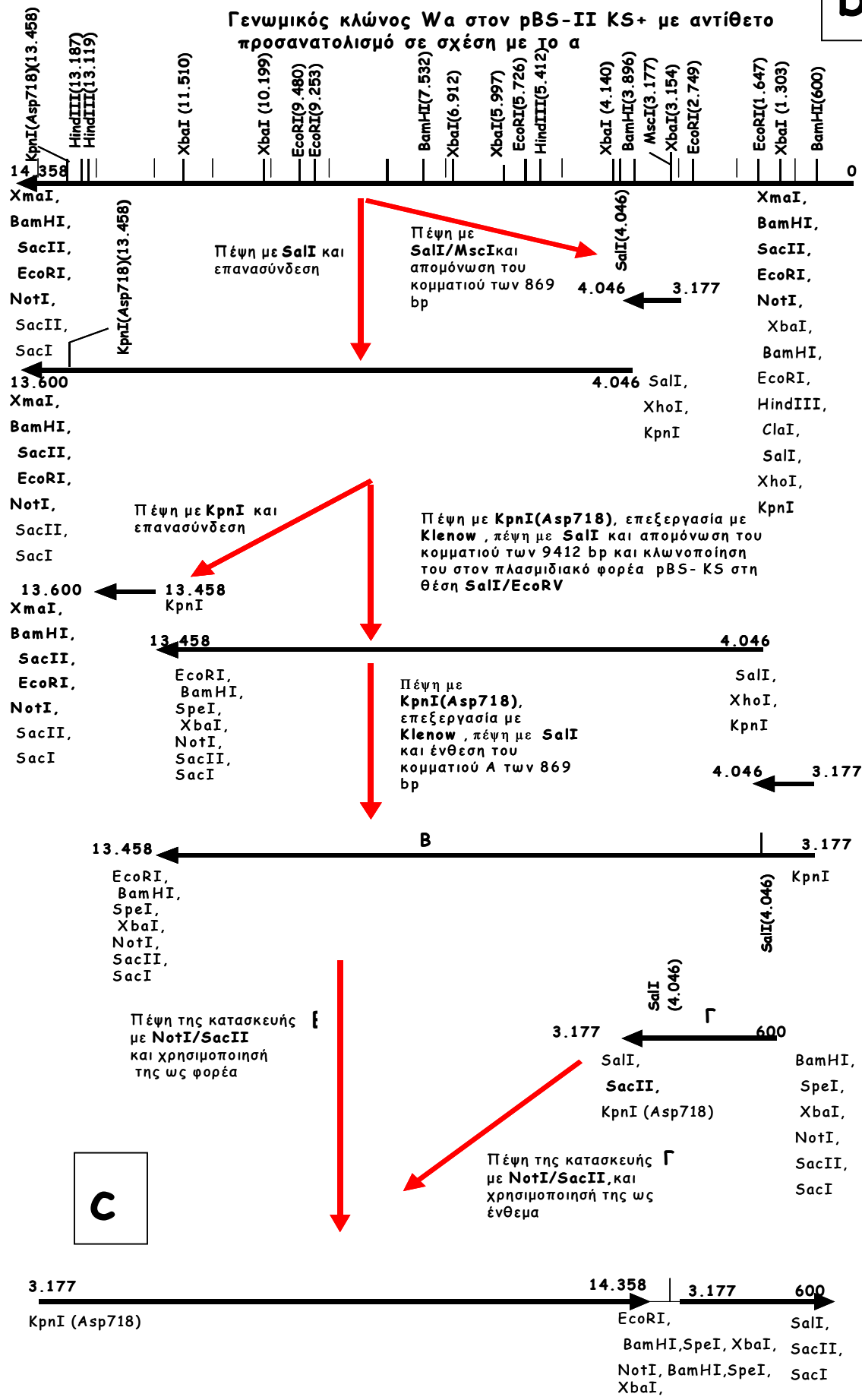
**Εικ. 3:** Περιοριστικός χάρτης του γενωμικού κλώνου Wa και επιβεβαίωση της αρτιότητας της αλληλουχίας του

**α.** Παρουσιάζεται ο χάρτης ορισμένων περιοριστικών θέσεων για τον γενωμικό κλώνο Wa, ενώ σημειώνεται και η περιοριστική θέση MscI στα 3.177 bp, στην οποία εισάγεται η κασέτα γαλακτοζιδάσης/νεομικίνης. Η κατεύθυνση του βέλους στον κλώνο υποδεικνύει τη φορά της μεταγραφής του γονιδίου *Fras1*. Επίσης οριοθετούνται οι ανιχνευτές A και B, από το 2.749-3.896 bp και από το 5.412-6.221 του Wa αντίστοιχα, με τους οποίους ανιχνεύεται η αρτιότητα της αλληλουχίας του Wa. Η κλίμακα μέτρησης αντιπροσωπεύει 1Kb. **β,** **γ.** Τόσο ο Wa όσο και το γενωμικό DNA παρουσιάζουν, όταν επωαστούν με EcoRI και BamHI και υβριδοποιηθούν με τους ανιχνευτές A και B, τα αναμενόμενα προϊόντα, γεγονός που επιβεβαιώνει την απουσία χημαισμού στον κλώνο Wa.

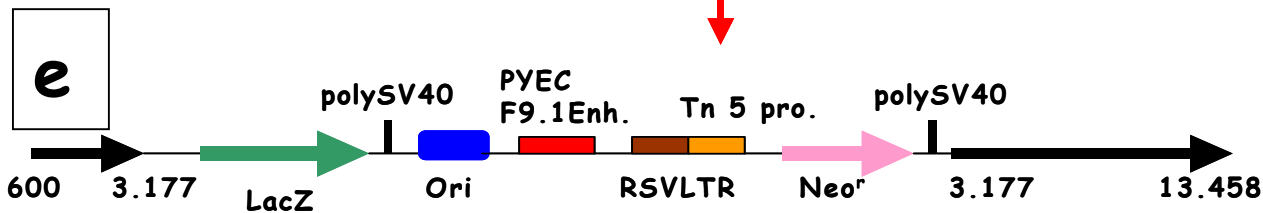
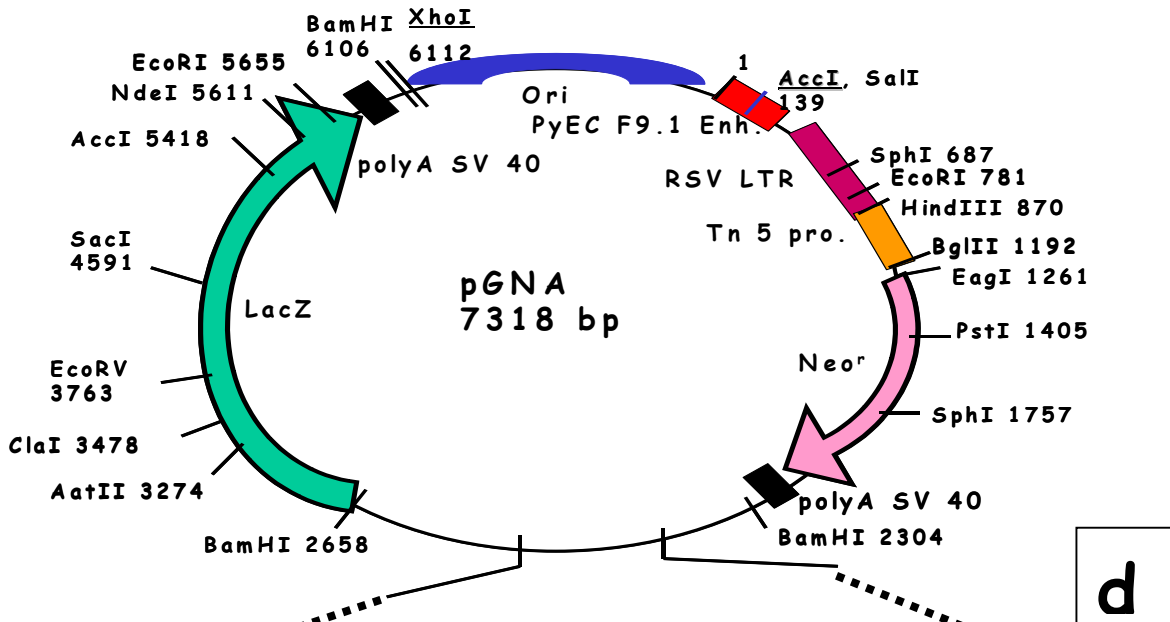
Γενωμικός κλώνος Wa στον ρBS-II KS+



**b**

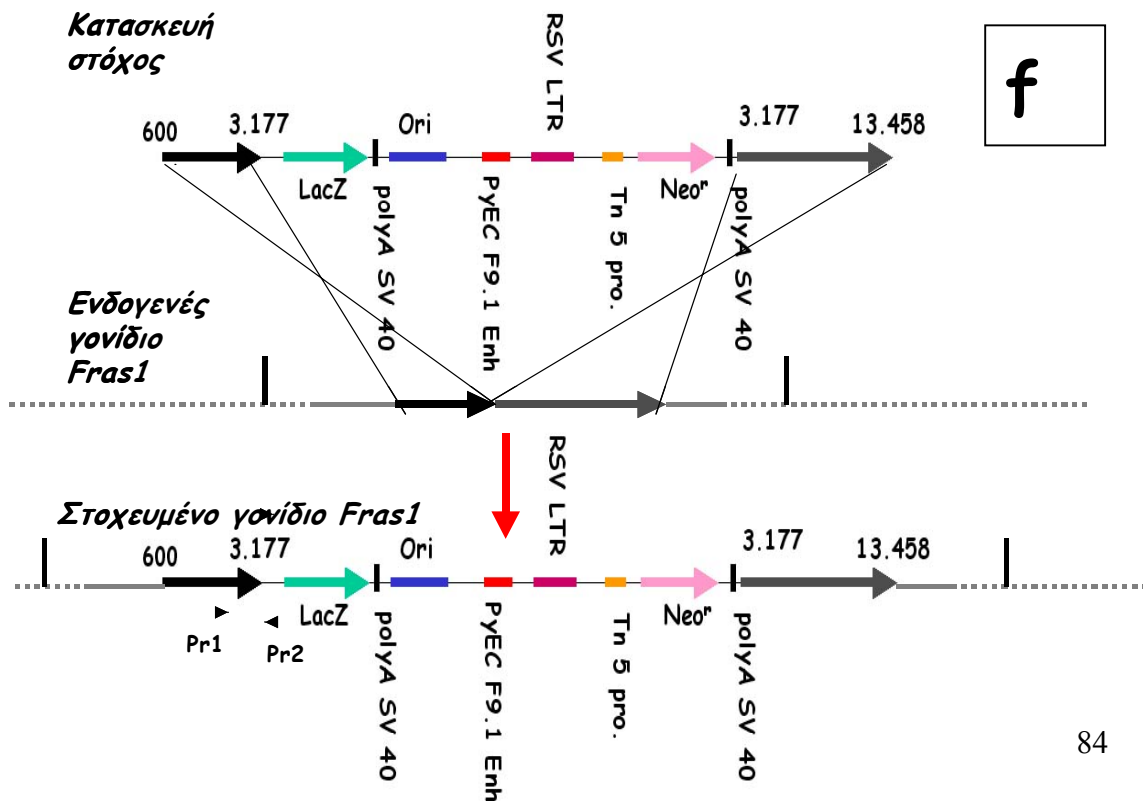


**C**



Ομόλογος ανασυνδυασμός  
ανάμεσα  
στην πλασμιδιακή κατασκευή  
και το ενδογενές γονίδιο *Fras1*

Κατασκευή  
στόχος



**Εικ. 4: Δημιουργία της κατασκευής στόχου και ενσωμάτωση της κασέτας που περιέχει στο ενδογενές γονίδιο *Fras1***

**a.** Εισαγωγή στον πλασμιδιακό φορέα pBS-II KS+ του τμήματος του Wa από τα 600-3.177 bp. **b.** Σε διαφορετικό πλασμιδιακό φορέα pBS-II KS+ προστίθεται το τμήμα του Wa από τα 3.177-13.458 bp. **c.** Κλωνοποίηση των τμημάτων του Wa από τα 600-3.177 bp και από τα 3.177-13.458 bp, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται η μοναδική θέση NotI, στον πλασμιδιακό φορέα pBS-II KS+. **d.** Εισαγωγή στον πλασμιδιακό φορέα pGNA των τμημάτων του Wa που χρησιμοποιήθηκαν στο (c). **e.** Γραμμοποίηση της κατασκευής στόχου ύστερα από πέψη με NotI. **f.** Ομόλογος ανασυνδυασμός ανάμεσα στην γραμμική κατασκευή στόχο και στο ενδογενές γονίδιο *Fras1*.

### II.III Παραγωγή χιμαιρικών ζώων

Η πορεία που ακολουθείται από τη δημιουργία της κατασκευής στόχου, μέχρι την παραγωγή χιμαιρικών ζώων που σε κάποιο ποσοστό των κυττάρων τους, συμπεριλαμβανομένης και της γαμετικής σειράς, περιέχουν το απενεργοποιημένο γονίδιο *Fras1* περιλαμβάνει:

**A)** Την εισαγωγή της γραμμικής μορφής της κατασκευής στόχου στα κύτταρα ES.

**B)** Την επιλογή των κυττάρων ES στα οποία η κατασκευή στόχος ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα τους.

**Γ)** Την επιλογή εκείνων των κυττάρων ES στα οποία έχει πραγματοποιηθεί ομόλογος ανασυνδυασμός ανάμεσα στην κατασκευή στόχο και στο ενδογενές γονίδιο *Fras1*.

**Δ)** Την συνάθροιση όλων των κλώνων ES, στους οποίους έχει αντικατασταθεί το ενδογενές γονίδιο από την κατασκευή στόχο, με έμβρυα αγρίου τύπου ποντικού στο στάδιο του μοριδίου.

**Ε)** Την εισαγωγή των παραπάνω συσσωματωμάτων στους αγωγούς ενός ψευδοεγκύου ποντικού αγρίου τύπου.

**Ζ)** Την επιλογή των χιμαιρικών απογόνων που συνεισφέρουν το τροποποιημένο αλληλόμορφο του *Fras1* στην επόμενη γενιά (germline transmission).

Στην συγκεκριμένη περίπτωση η κατασκευή στόχος επώαστηκε με NotI και η γραμμική της μορφή εισήχθηκε (electroporation) σε κύτταρα ES (η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε από τον Sharif Mansour στο εργαστήριο του P.Gruss). Μετά την εισαγωγή της στα κύτταρα ES η πλασμιδιακή κατασκευή είτε καταστρέφεται, είτε εισέρχεται στο γονιδίωμα των κυττάρων. Τα κύτταρα ES στα οποία ενσωματώθηκε η κασέτα της γαλακτοζιδάσης/νεομυκίνης, επιλέχθηκαν παρουσία του αντιβιοτικού G418, δεδομένου ότι το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου της νεομυκίνης που περιέχεται στην κασέτα τους προσφέρει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Μ' αυτόν τον τρόπο απομονώθηκαν 209 κλώνοι ES, οι οποίοι αναλύθηκαν στην συνέχεια με PCR και Southern blot προκειμένου να διαπιστωθεί σε ποιους έχει πραγματοποιηθεί ομόλογος ανασυνδυασμός (αφού ενδέχεται η ενσωμάτωση της κατασκευής στόχου στο γονιδίωμα των κυττάρων ES να γίνει και τυχαία). Ο έλεγχος αυτός βασίζεται στην εισαγωγή της κασέτας στο ενδογενές γονίδιο *Fras1*.

Στην περίπτωση του PCR οι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιούνται εντοπίζονται (εικ. 4f και 5a):

-Στην περιοχή της κασέτας που εισάγεται στο εξόνιο του γονιδίου *Fras1* και συγκεκριμένα στην αλληλουχία του πολυσυνδέτη πριν το γονίδιο της γαλακτοζιδάσης (εκκινητής pr2- reverse, με αντίστροφη κατεύθυνση), και

-Στην περιοχή του 5' άκρου του γονιδίου *Fras1*, που αντιστοιχεί στα πρώτα 600 bp του Wa, τα οποία δεν χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή στόχο (εκκινητής pr1-forward, με κατεύθυνση προς τα εμπρός).

Από τους 209 κλώνους ES μόνο τέσσερις παρουσιάζουν με PCR με τους παραπάνω εκκινητές το προϊόν των 3000 bp, που προκύπτει όταν έχει πραγματοποιηθεί ομόλογος ανασυνδυασμός.

Οι 209 κλώνοι ES ανιχνεύθηκαν για την παρουσία ομόλογου ανασυνδυασμού και με ανάλυση κατά Southern, κατά την οποία το γενωμικό τους DNA επώαστηκε με ApaI/ClaI και υβριδοποιήθηκε με τον ανιχνευτή P1. Ο ανιχνευτής P1 περιλαμβάνει το κομμάτι του γενωμικού κλώνου Wa από 0-600 bp, που εντοπίζεται στο 5' άκρο του γονιδίου *Fras1* και το οποίο δεν χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή στόχο. Όπως και στην ανάλυση με PCR μόνο τέσσερις από τους 209 κλώνους ES παρουσιάζουν το αναμενόμενο τμήμα των 5.0 kb, που προκύπτει όταν η κασέτα γαλακτοζιδάσης/νεομυκίνης εισάγεται με ομόλογο ανασυνδυασμό στο *Fras1*. Όλοι οι υπόλοιποι κλώνοι επιδεικνύουν το τμήμα των 6.8 kb, που παράγεται στην περίπτωση του αλληλομόρφου

αγρίου τύπου του *Fras1* (πρότυπο ανάλογο με αυτό της εικ. **5 a, b**, που αναφέρεται σε γενωμικό DNA εμβρύων).

Και οι τέσσερις θετικοί κλώνοι ES, που προέρχονται από το στέλεχος Sv129 (με καφέ χρώμα τριχώματος), συσσωματώνονται με έμβρυα αγρίου τύπου ποντικού (του στελέχους NMRI, με άσπρο χρώμα τριχώματος) σταδίου μοριδίου (στάδιο 8-16 κυττάρων). (Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε από την Silke Mayer στο εργαστήριο του P. Gruss). Τα συσσωματώματα αυτά εισάγονται στη συνέχεια στους ωαγωγούς ενός ψευδοεγκύου ποντικού (του στελέχους NMRI). Από τη μελέτη των απογόνων των εγκύων ποντικών διαπιστώθηκε ότι μόνο δύο από τους τέσσερις κλώνους παράγουν χιμαιρικούς απογόνους και από αυτούς οι χίμαιρες του ενός μόνο κλώνου συνεισφέρουν στην μεταφορά του στοχευόμενου γονιδίου *Fras1* στην επόμενη γενιά. (Οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του P. Gruss.) Ακολούθησαν διασταυρώσεις μεταξύ των ετερόζυγων απογόνων που περιέχουν το τροποποιημένο αλληλόμορφο του *Fras1* ( $Fras1^{+/-}$  x  $Fras1^{+/-}$ ), αλλά και διασταυρώσεις των ετερόζυγων απογόνων που προκύπτουν με ποντίκια αγρίου τύπου ( $Fras1^{+/+}$ ) του στελέχους NMRI (ετερομικτικό στέλεχος, outbred strain) ή του στελέχους C57BL/10 (ομομικτικό στέλεχος, inbred stain) (F1 γενεά). Οι παραπάνω διασταυρώσεις συνεχίζονται τουλάχιστον μέχρι την F5 γενεά και συμβάλλουν στην σταδιακή απαλλαγή του γενετικού υπόβαθρου των ποντικών από το στέλεχος Sv129, καθώς και στην ανάλυση της απενεργοποίησης του *Fras1* σε δύο στελέχη.

Η γονοτυπική ταυτοποίηση των απογόνων των διαφόρων γενεών έγινε με PCR. Συγκεκριμένα για την ταυτοποίηση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου του γονιδίου *Fras1*, οι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν εντοπίζονται (εικ. **5a**):

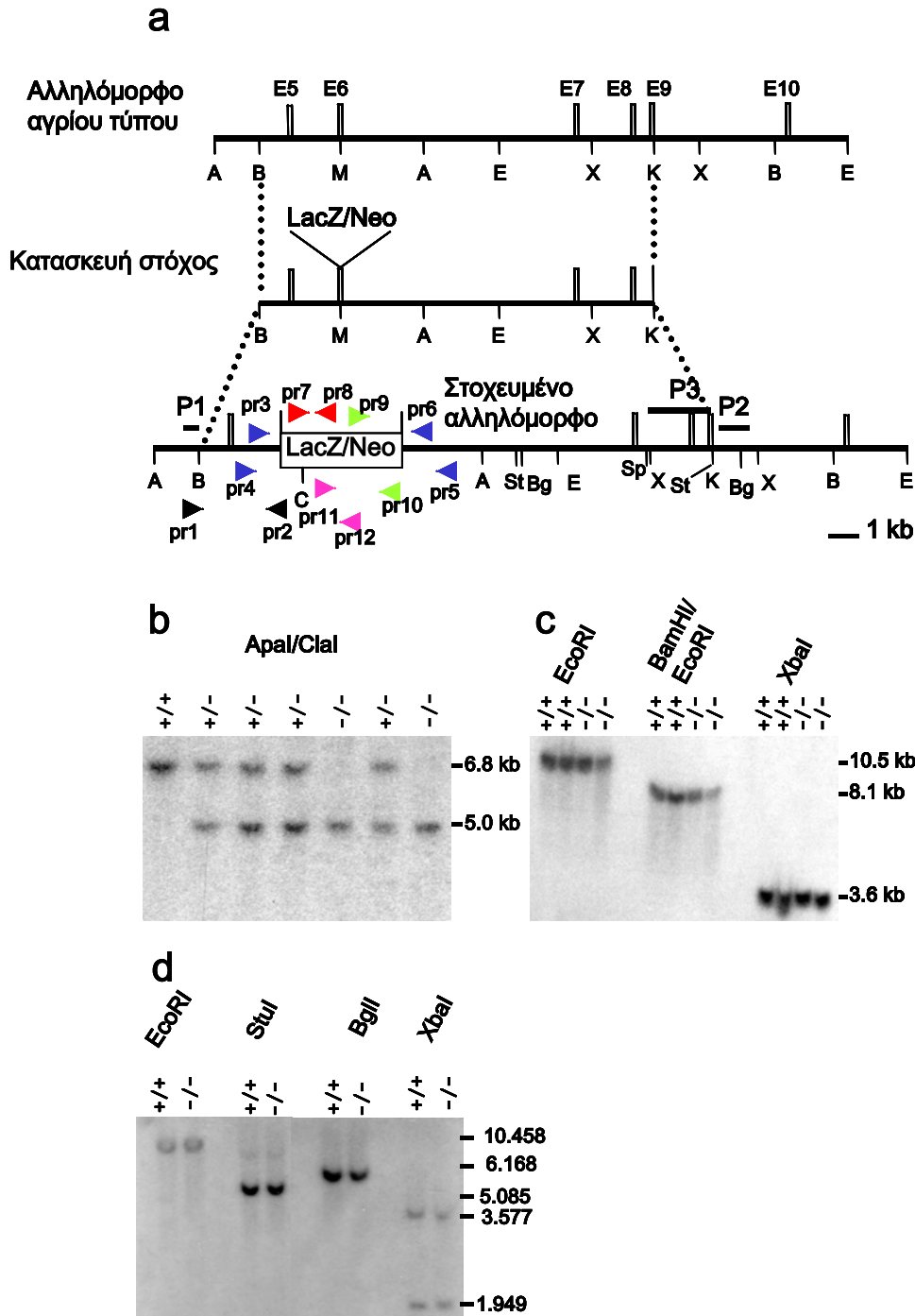
-Στην περιοχή του γονιδίου *Fras1* λίγο πριν τη θέση εισαγωγής της κασέτας γαλακτοζιδάσης/νεομυκίνης, (εκκινητές pr3 ή pr4-forward, με κατεύθυνση προς τα εμπρός) και  
-Στην περιοχή του γονιδίου *Fras1* λίγο μετά τη θέση ένθεσης της παραπάνω κασέτας (εκκινητές pr5 ή pr6-reverse, με αντίστροφη κατεύθυνση).

Η ανάλυση με PCR, χρησιμοποιώντας έναν από τους παραπάνω τέσσερις πιθανούς συνδυασμούς εκκινητών, έχει σαν αποτέλεσμα στην περίπτωση  $Fras1^{-/+}$  ή  $Fras1^{+/+}$  απογόνων, να προκύπτει προϊόν μεγέθους 250-350 bp (ανάλογα με τον συνδυασμό των εκκινητών που χρησιμοποιείται). Αντίθετα στην περίπτωση των  $Fras1^{-/-}$  απογόνων η παρεμβολή της κασέτας της γαλακτοζιδάσης/νεομυκίνης, μεγέθους περίπου 7 Kb, καθιστά αδύνατη την παραγωγή προϊόντος με τους παραπάνω συνδυασμούς εκκινητών.

Από την άλλη μεριά για την ταυτοποίηση του στοχευόμενου αλληλομόρφου του γονιδίου *Fras1*, οι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν εντοπίζονται εντός της κασέτας γαλακτοζιδάσης/νεομυκίνης, είτε στην περιοχή της γαλακτοζιδάσης, είτε στην περιοχή της νεομυκίνης. Στην περιοχή της γαλακτοζιδάσης χρησιμοποιούνται δύο ζευγάρια εκκινητών, **a)** το pr7-forward με pr8-reverse και το pr11-forward με pr12-reverse. Στην περίπτωση της νεομυκίνης οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι pr9-forward και pr10-reverse. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις το μέγεθος των παραγόμενων προϊόντων είναι περίπου 350 bp (εικ. **5a**).

## II.IV Έλεγχος της αρτιότητας του 5' και 3' άκρου της στοχευόμενης γενωμικής περιοχής του *Fras1*

Η αντικατάσταση του ενδογενούς τμήματος μιας γενωμικής περιοχής από μία κατασκευή στόχο, όπως συμβαίνει στον ομόλογο ανασυνδυασμό, είναι πιθανόν σε ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων ES να συνοδεύεται και από ταυτόχρονες διαταραχές (π.χ. ελλείψεις) στις περιοχές των άκρων του DNA που ανασυνδυάζονται. Από την άλλη μεριά έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις στο γονιδίωμα των κυττάρων ES, όπου εκτός του ομόλογου ανασυνδυασμού συμβαίνει και τυχαία ενσωμάτωση της κατασκευής στόχου. Στην περίπτωση που η ενσωμάτωση αυτή έχει πραγματοποιηθεί αρκετά κοντά στην περιοχή που έγινε ο ομόλογος ανασυνδυασμός, είναι πιθανόν τα δύο αυτά συμβάντα να μη διαχωρίζονται κατά τις επακόλουθες μειωτικές διαιρέσεις. Το γεγονός αυτό θα είχε σαν συνέπεια σε κάποια κύτταρα ES το γονιδίωμα με το τροποποιημένο αλληλόμορφο να φέρει και μια τυχαία ενσωμάτωση της κατασκευής στόχου, η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει ανεξέλεγκτες βλάβες σε άλλες χρωμοσωμικές περιοχές και να οδηγήσει σ' ένα πιο σύνθετο φαινότυπο. Για τους παραπάνω



**Εικ. 5: Κατευθυνόμενη απενεργοποίηση του γονιδίου *Fras1***

**a.** Σχηματική αναπαράσταση ενός τμήματος του ενδογενούς αλληλομόρφου του γονιδίου *Fras1* και του χάρτη ορισμένων περιοριστικών του θέσεων, της κατασκευής στόχου (targeting construct) και του αναμενόμενου αλληλομόρφου του *Fras1* ύστερα από επιτυχή ομόλογο ανασυνδυασμό. Ταυτόχρονα σημειώνονται με κουτάκια τα εξόνια E5, E6, E7, E8, E9, E10, καθώς και οι περιοριστικές θέσεις A, Apal; B, BamHI; M, MscI; E, EcoRI; X, XbaI; K, KpnI; Bg, BglII; St, StuI; Sp, SphI. Η κατασκευή στόχος περιέχει την κασέτα γαλακτοζιδάσης/νεομικίνης που εισάγεται στο εξόνιο E6, στην περιοριστική θέση MscI. Οι διακεκομμένες κάθετες γραμμές καθορίζουν τα όρια των ομόλογων περιοχών του *Fras1* που περιέχονται στην κατασκευή στόχο. Υποδεικνύονται οι θέσεις των εκκινήτων pr1 και pr2, που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του ομόλογου ανασυνδυασμού, καθώς και οι θέσεις των εκκινήτων pr3, pr4, pr5, pr6, που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου του γονιδίου *Fras1*. Σημειώνονται επίσης και οι εκκινήτες pr7, pr8, pr11, pr12 που εντοπίζονται στην περιοχή της γαλακτοζιδάσης και οι εκκινήτες pr9, pr10 που αντιστοιχούν σε αλληλουχίες της νεομικίνης και οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του στοχευμένου αλληλομόρφου του *Fras1*. Με P1 (στο 5' άκρο) και P2 (στο 3' άκρο), παριστάνονται αντίστοιχα οι



ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο του ομόλογου ανασυνδυασμού και της ακεραιότητας του 5' και 3' άκρου της στοχευόμενης γενωμικής περιοχής και με P3 ο ανιχνευτής για τον έλεγχο τυχαίας ενσωμάτωσης της κατασκευής στόχου. Η κλίμακα μέτρησης που σημειώνεται είναι 1 kb. Με ανάλυση κατά Southern του γενωμικού DNA απογόνων της διασταύρωσης *Fras1<sup>+/-</sup>* X *Fras1<sup>+/-</sup>* και επώαση με *ApaI/ClaI* (**b**), *EcoRI*, *BamHI/EcoRI*, *XbaI* (**c**) και *EcoRI*, *StuI*, *XbaI*, *BglIII* (**d**) και υβριδοποίηση με τους ανιχνευτές P1, P2 και P3 αντίστοιχα, επιβεβαιώνεται ο ομόλογος ανασυνδυασμός και η αρτιότητα του 5' (**b**) και 3' άκρου της στοχευόμενης περιοχής του αλληλομόρφου του γονιδίου *Fras1* (**c**) και αποκλείεται η τυχαία ένθεση της κατασκευής στόχου στους απογόνους που εξετάστηκαν (**d**).

λόγους και προκειμένου να ελέγξουμε την αρτιότητα της γενωμικής περιοχής του *Fras1* που υφίστανται ομόλογο ανασυνδυασμό, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Southern χρησιμοποιώντας γενωμικό DNA από τους απογόνους μιας διασταύρωσης *Fras1<sup>+/-</sup>* X *Fras1<sup>+/-</sup>* (εικ. **5**). Η αρτιότητα του 5' άκρου της στοχευόμενης γενωμικής περιοχής του γονιδίου *Fras1*, ελέγχθηκε με επώαση του γενωμικού DNA των παραπάνω απογόνων με *ApaI/ClaI* και υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή P1. (Δηλαδή πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανάλογος με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του ομόλογου ανασυνδυασμού στα κύτταρα ES.) Όλοι οι απόγονοι που μελετήθηκαν δεν παρουσίασαν κανένα πρόβλημα στο 5' άκρο της εξεταζόμενης γενωμικής περιοχής, αφού όπως φαίνεται στην εικ. **5b**, οι *Fras1<sup>-/-</sup>* απόγονοι παρουσίασαν μόνο το αναμενόμενο τμήμα των 5.0 kb, οι απόγονοι αγρίου τύπου το τμήμα των 6.8 kb και οι απόγονοι *Fras1<sup>+/-</sup>* και τα δύο αυτά τμήματα.

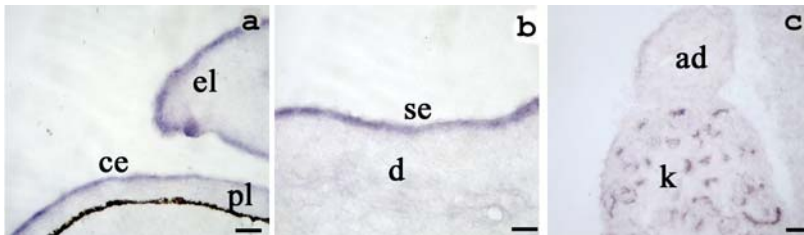
Από την άλλη μεριά για τον έλεγχο της ακεραιότητας του 3' άκρου της γενωμικής περιοχής όπου συνέβη ο ομόλογος ανασυνδυασμός, το γενωμικό DNA των παραπάνω απογόνων επώαστηκε με **i) EcoRI**, **ii) BamHI/EcoRI**, **iii) XbaI** και υβριδοποιήθηκε με τον ανιχνευτή P2. Ο ανιχνευτής αυτός εντοπίζεται στην περιοχή του γονιδίου *Fras1* που αντιστοιχεί στο τμήμα του Wα από τα 13.458-14.358 bp, το οποίο δεν χρησιμοποιήθηκε στην πλασμιδιακή κατασκευή (εικ. **5a**). Τα μεγέθη των προϊόντων που προκύπτουν για οποιονδήποτε γονότυπο απογόνου, πιστοποιούν την αρτιότητα του 3' άκρου της στοχευόμενης γενωμικής περιοχής, δεδομένου ότι είναι τα αναμενόμενα 10.5 Kb για το **i)**, 8.1 Kb για το **ii)** και 3.6 Kb για το **iii)** (εικ. **5 c**).

Η περίπτωση τυχαίας ενσωμάτωσης της κατασκευής στόχου, ελέγχθηκε με επώαση του γενωμικού DNA απογόνων *Fras1<sup>-/-</sup>* και απογόνων αγρίου τύπου με διάφορους συνδυασμούς περιοριστικών ενζύμων, όπως **i) EcoRI**, **ii) XbaI**, **iii) StuI**, **iv) BglIII** και υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή P3. Ο ανιχνευτής αυτός εντοπίζεται στην περιοχή του γονιδίου *Fras1* που αντιστοιχεί στο τμήμα του γενωμικού κλώνου Wα από τα 10.741-13.458 bp (το οποίο περιέχεται και στην κατασκευή στόχο) (εικ. **5a**). Όπως φαίνεται στην εικ. **5d**, όλοι οι απόγονοι που εξετάστηκαν με αυτόν τον τρόπο δεν παρουσιάζουν ενδείξεις για τυχαία ενσωμάτωση της κατασκευής στόχου, αφού ανεξαρτήτως γονότυπου δίνουν, ύστερα από επώαση με *EcoRI* σήμα υβριδοποίησης μεγέθους 10.548 bp, με *XbaI* τα προϊόντα 3.557 bp και 1.949 bp, με *StuI* 5.085 bp και με *BglIII* 6.168 bp. Δηλαδή προκύπτουν τα αναμενόμενα προϊόντα που προβλέπονται με βάση τη χαρτογράφηση της σχετικής περιοχής του γονιδίου *Fras1*.

### III. Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *Fras1*

Από πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του mRNA του γονιδίου *Fras1* που έχουν διεξαχθεί από τον Καθ. Γ. Χαλεπάκη, όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο της εισαγωγής, είναι γνωστό ότι το γονίδιο *Fras1* εκφράζεται από διάφορες κατηγορίες επιθηλιακών κυττάρων κατά την εμβρυογένεση (ήδη από την ημέρα 9.5, E9.5), καθώς επίσης και από μέχρι τώρα μη καθορισμένους κυτταρικούς τύπους στον εγκέφαλο εμβρύων και ενηλίκων ποντικών. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε στις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες υβριδοποίησης είναι μεγέθους 896 bp και αντιστοιχεί στην περιοχή του cDNA του *Fras1* από 1291-2187 bp, η οποία κωδικοποιεί για μοτίβα τύπου VWC.

Η επιθηλιακή έκφραση του γονιδίου *Fras1* κατά την εμβρυογένεση επιβεβαιώθηκε και από συμπληρωματικά πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του mRNA του, τα οποία πραγματοποιήθηκαν στην πορεία, σε τομές εμβρύων ποντικού *Fras1*<sup>-/-</sup> ή *Fras1*<sup>+/-</sup> διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων. Στις περιπτώσεις αυτές ο ανιχνευτής μεγέθους 646 bp που χρησιμοποιήθηκε, εντοπίζεται στο cDNA του *Fras1* από 10.324-10.970 bp, που κωδικοποιεί για μια περιοχή στα επαναλαμβανόμενα μοτίβα Calx-beta (εικ. 1).



**Εικ. 1:** Ανίχνευση του mRNA του γονιδίου *Fras1*

Πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του mRNA του γονιδίου *Fras1* σε εγκάρσιες (**a**, **b**) και επιμήκεις (**c**) κρουτομές τομές εμβρύων ποντικού ημέρας 14.5. Σημειώνεται η έκφραση του γονιδίου *Fras1* στο επιθήλιο του κερατοειδούς (**ce**; **a**) και του βλεφάρου (**el**; **a**), στο επιδερμικό επιθήλιο (**se**; **b**) και στα εσωτερικά επιθήλια του αναπτυσσόμενου νεφρού (**k**; **c**). Συντομεύσεις: el:eyelid epithelium; ce:cornea epithelium; pl:pigment layer of the retina (χρωμοφόρος στοιβάδα του αμφιβληστροειδή); se:skin epithelium; d:dermis (δερμίδα); ad:adrenal gland (επινεφρίδια); k:kidney.

Στο ίδιο συμπέρασμα οδήγησαν και πειράματα ανοσοανίχνευσης της γαλακτοζιδάσης (που υπάρχει στην κασέτα που εισήχθη στο γονίδιο *Fras1*) σε τομές εμβρύων ποντικού *Fras1*<sup>+/-</sup> ή *Fras1*<sup>-/-</sup> από διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο II, η γαλακτοζιδάση περιέχεται στην κασέτα που εισήχθη με ομόλογο ανασυνδυασμό στο *Fras1* και εκφράζεται μέσω του υποκινητή του γονιδίου *Fras1*. Κατά συνέπεια η ανοσοανίχνευση της γαλακτοζιδάσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό των κυτταρικών τύπων που παράγουν το *Fras1*, δεδομένου ότι παραμένει στο εσωτερικό των κυττάρων που την εκφράζουν αφού δεν χρησιμοποιήθηκαν σινιάλα για την έκκριση της.

Προκειμένου να ταυτοποιήσουμε τον κυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης *Fras1* (ενδοκυτταρική ή εξωκυτταρική τοποθέτηση), πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοανίχνευσης της σε κρουτομές εμβρύων ποντικού αγρίου τύπου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα για την *Fras1* (το οποίο δημιουργήθηκε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης του μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης), για την παρασκευή του οποίου πραγματοποιήθηκε ανοσοποίηση κουνελιού με πεπτιδίον μεγέθους 313 αμινοξέων (1212αα-1525 αα), το οποίο εντοπίζεται στην περιοχή της *Fras1* που παρουσιάζει ομολογία με την NG2 (εικ.3a Κεφάλαιο I).

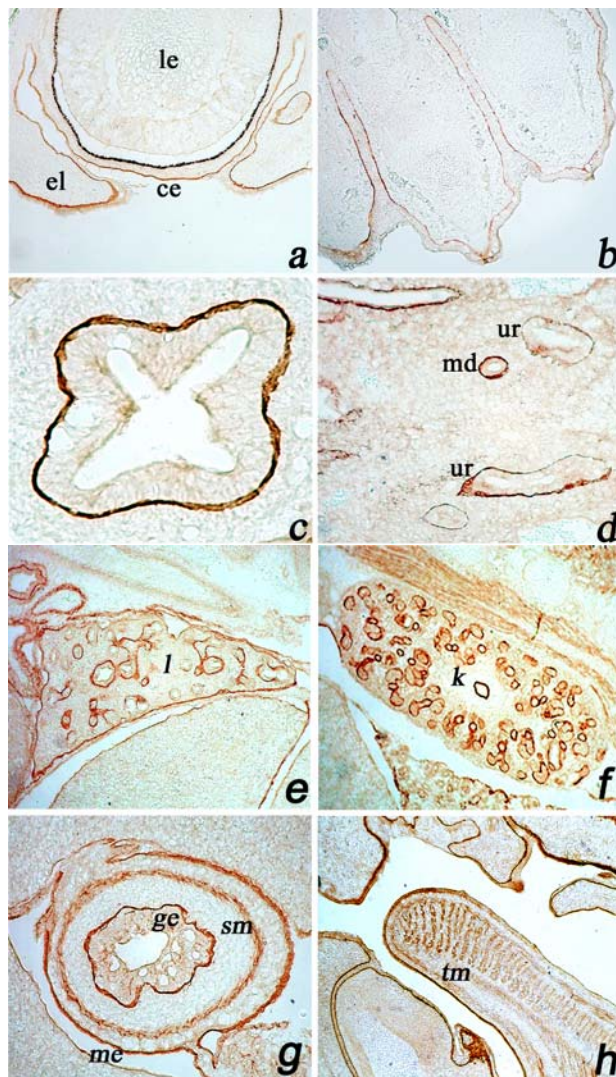
Με τα πειράματα ανοσοιστοχημείας διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη *Fras1* ανιχνεύεται, υπό τη μορφή ενός γραμμικού προτύπου χρώσης, στον εξωκυττάριο χώρο που υπόκειται της βασικής πλευράς αρκετών εμβρυϊκών επιθηλίων. Ενδεικτικά αναφέρονται τα επιθήλια της επιδερμίδας, του κερατοειδή χιτώνα (εικ.2a), των βλεφάρων (εικ.2a), των άκρων (εικ.2b), του εντέρου (εικ.2c), του αναπτυσσόμενου ουρητήρα (εικ.2d), του μεσονεφρικού σωλήνα (εικ.2d), των νεφρών (εικ.2f), των πνευμόνων (εικ.2e), του χοριοειδούς πλέγματος, της στοματικής κοιλότητας, του αναπτυσσόμενου αναπνευστικού σωλήνα, του οισοφάγου.

Ο εντοπισμός της *Fras1* στον εξωκυττάριο χώρο της βασικής πλευράς των περισσότερων επιθηλίων, έρχεται σε συμφωνία με την προβλεπόμενη ύπαρξη ενός πεπτιδίου σινιάλου για εισαγωγή της *Fras1* στο ενδοπλασματικό δίκτυο και ολοκλήρωση της σύνθεσης της, αλλά και με την παρουσία στην *Fras1* διαφόρων πρωτεϊνικών περιοχών που απαντώνται σε εκκρινόμενους ή

διαμεμβρανικούς παράγοντες και επιβεβαιώνεται ότι η Fras1 αποτελεί ένα καινούργιο εξωκυττάριο συστατικό (εκκρινόμενη ή διαμεμβρανική πρωτεΐνη).

Στον εξωκυττάριο χώρο της βασικής πλευράς των επιθηλίων, όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή, εντοπίζεται μία ειδική κατηγορία εξωκυττάριας ουσίας, το βασικό έλασμα. Παρά το γεγονός ότι με το οπτικό μικροσκόπιο το γραμμικό πρότυπο έκφρασης της Fras1 κάτω από το επιθήλιο είναι ανάλογο με το πρότυπο έκφρασης πρωτεϊνών του βασικού ελάσματος, δεν μπορεί να υποστηριχτεί με βεβαιότητα ότι η Fras1 αποτελεί συστατικό της ειδικής αυτής εξωκυττάριας ουσίας. Μόνο υπερδομικές μέθοδοι (ultrastructural methods) μπορούν να αποδείξουν ότι ένας εξωκυτταρικός παράγοντας αποτελεί συστατικό του βασικού ελάσματος και ανάλογα πειράματα πρόκειται να πραγματοποιηθούν μελλοντικά.

Η Fras1 ανιχνεύθηκε, με κάποιες επιφυλάξεις και στο εσωτερικό αρκετών μυών π.χ των γραμμωτών μυών της γλώσσας και των λείων μυών του εντέρου (εικ. **2g,h**). Η επιβεβαίωση της έκφρασης της Fras1 στους μύες απαιτεί όμως τη διεξαγωγή και άλλων πειραμάτων.



**Εικ. 2:** Ανοσολογική ανίχνευση της πρωτεΐνης Fras1

**a.** Με ανοσολογική χρώση υπεροξειδάσης η Fras1 εντοπίζεται στη βασική πλευρά του κερατοειδή επιθηλίου (ce) και του επιθηλίου του βλεφάρου (el), σε επιμήκη τομή εμβρύου ημέρας 14.5 (E.14.5). **b.** Απεικονίζεται η

χρώση της υπεροξειδάσης στη βασική πλευρά του επιδερμικού επιθηλίου των άκρων, σε επιμήκη τομή εμβρύου ημέρας 16.5 (E.16.5). **c**. Εγκάρσια τομή εντέρου από έμβryo ημέρας 16.5 (E.16.5), στην οποία η πρωτεΐνη *Fras1* απαντάται στη βασική πλευρά του εντερικού επιθηλιακού τοιχώματος. **d**. Η χρώση της υπεροξειδάσης ανιχνεύεται στη βασική πλευρά των επιθηλιακών δεσμίδων του ουρητήρα (*ur*) και του μεσонеφρικού σωλήνα (*md*), σε εγκάρσια τομή εμβρύου ημέρας 11.5. Ανάλογο πρότυπο έκφρασης του *Fras1* παρουσιάζεται στα τοιχώματα των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα (*l*) (**e**), του νεφρού (*k*) (**f**), και του μεσοεπιθηλίου (*me*) του εντέρου (**g**), όπου η χρώση της υπεροξειδάσης συγκεντρώνεται στη βασική πλευρά των επιθηλίων αυτών. Το *Fras1* ανιχνεύεται και στο εσωτερικό μυών, όπως του λείου μυ του εντέρου (*sm*) (**g**) και των σκελετικών γραμμωτών μυών της γλώσσας (*tm*) (**h**). Συντομεύσεις: *el*, eyelid (βλέφαρο); *le*, lens (φακός); *ce*, cornea epithelium (επιθήλιο του κερατοειδή); *k*, kidney (νεφρός); *l*, lung (πνεύμονας); *sm*, smooth muscle (λείος μυς); *me*, mesothelium (μεσοθήλιο); *ur*, ureter (ουρητήρας); *md*, mesonephric duct (μεσонеφρικός σωλήνας); *ge*, gut epithelium (εντερικό επιθήλιο); *tm*, tongue muscle (μυς της γλώσσας).

#### IV. Ανάλυση του φαινοτύπου των ποντικών *Fras1*<sup>-/-</sup>

Η μελέτη των αποτελεσμάτων της απενεργοποίησης ενός γονιδίου στον ποντικό πραγματοποιείται σε περισσότερα από ένα στελέχη, δεδομένου ότι το διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο με τους ξεχωριστούς γενετικούς τροποποιητές (modifiers) επηρεάζει την εκφραστικότητα του μεταλλαγμένου γονιδίου και συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας του. Για το λόγο αυτό πραγματοποιούνται διασταυρώσεις των ετερόζυγων απογόνων των χιμαιρικών ζώων για το απενεργοποιημένο αλληλόμορφο του *Fras1*, με ποντίκια αγρίου τύπου των στελεχών στα οποία αποφασίζεται να γίνει η ανάλυση των αποτελεσμάτων (F1γενιά). Επιπρόσθετα η φαινοτυπική ανάλυση διεξάγεται σε κάθε στέλεχος ύστερα από ένα σημαντικό αριθμό γενεών, έτσι ώστε σταδιακά να εξαλείφεται από τους απογόνους το μεγαλύτερο μέρος του γενετικού υπόβαθρου του στελέχους Sv129, από το οποίο προέρχονται τα πρόδρομα προγονικά κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε ο ομόλογος ανασυνδυασμός ανάμεσα στην κατασκευή στόχο και στο ενδογενές γονίδιο.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση τα αποτελέσματα της απενεργοποίησης του *Fras1* μελετήθηκαν σε δύο στελέχη ποντικού, στο NMRI (ετερομικτικό, outbred) και στο C57BL/10 (ομομικτικό, inbred), στην F5 γενεά.

#### IV.1 Εμφάνιση αιμορραγικών φουσκαλών στα *Fras1*<sup>-/-</sup> έμβρυα

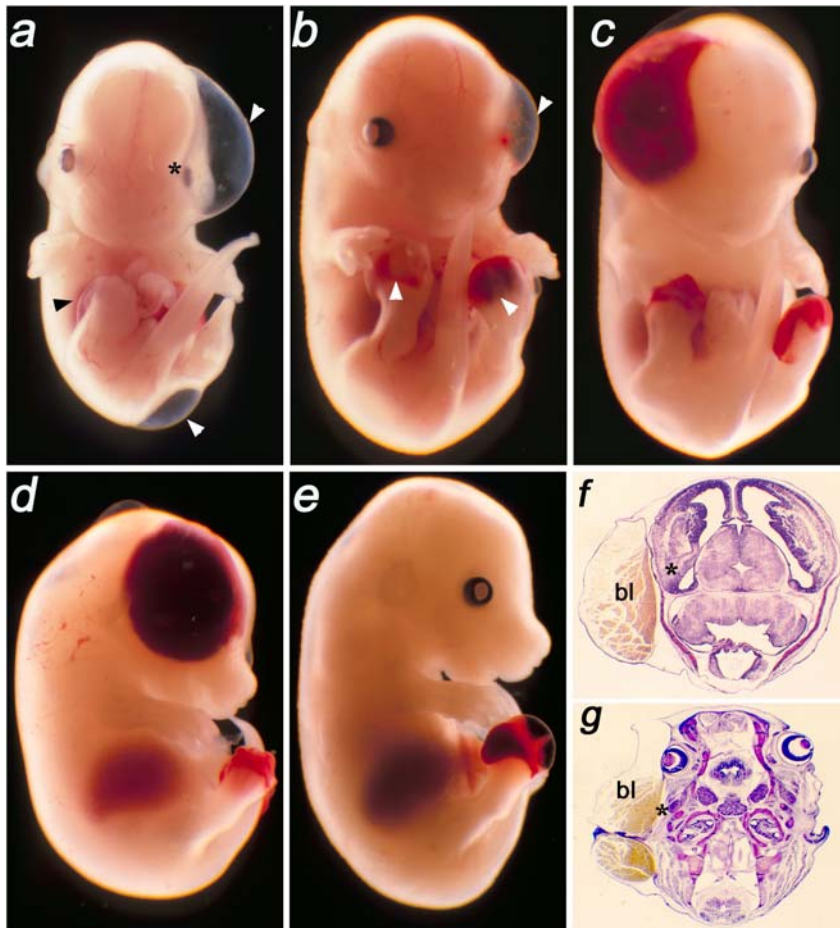
Οι διασταυρώσεις των ετερόζυγων ποντικών για το τροποποιημένο αλληλόμορφο του γονιδίου *Fras1*, στο στέλεχος C57BL/10, παράγουν μόνο αγρίου τύπου και ετερόζυγους απογόνους, υποδηλώνοντας την εμβρυϊκή θνησιμότητα των *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών.

Προκειμένου να διαπιστωθεί το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο εκδηλώνεται ο φαινότυπος των *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών, καθώς και το στάδιο στο οποίο πεθαίνουν τα ομόζυγα μεταλλαγμένα έμβρυα, εξετάστηκε ο γονότυπος και ο φαινότυπος ενός μεγάλου αριθμού εμβρύων (αναλύθηκαν περίπου 1000 έμβρυα που προέκυψαν από πολλές διασταυρώσεις ανάμεσα σε ετερόζυγα *Fras1*<sup>+/-</sup> ποντίκια) διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων. Διαπιστώθηκε ότι την ημέρα 11.5 (E11.5) τα έμβρυα *Fras1*<sup>-/-</sup> απαντώνται στην αναμενόμενη μεντελική συχνότητα και δεν παρουσιάζουν καμία φαινοτυπική ανωμαλία. Η έναρξη των προβλημάτων στα έμβρυα *Fras1*<sup>-/-</sup> εμφανίζεται την ημέρα 12.5 της εμβρυογένεσης (E12.5) και συνοδεύεται από την παρουσία δερματικών φουσκαλών (blebs/blisters). Οι φουσκάλες αυτές εντοπίζονται κυρίως στο κεφάλι στην περιοχή των ματιών και αρκετά συχνά στο ακραίο τμήμα των άκρων, ενώ σπανιότερα παρατηρούνται στη ράχη των ομόζυγων μεταλλαγμάτων και ποτέ δεν έχουν εντοπιστεί στην κοιλιακή χώρα. Αρχικά οι φουσκάλες είναι γεμάτες από ένα διάφανο υγρό, ενώ όσο προχωρεί η εμβρυογένεση από διαφανείς γίνονται κόκκινες (εικ. **1a, b, c, d, e**). Η σύσταση της φουσκάλας δεν έχει διαλευκανθεί, αλλά πιστεύεται ότι οφείλει το κόκκινο χρώμα της στην είσοδο ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι, σε τομές εμβρύων στην περιοχή της φουσκάλας που έχουν κατεργαστεί με ιστολογικές χρώσεις που βάφουν υποκυτταρικά οργανίδια, εντοπίζονται μη χρωματισμένα κύτταρα, που πιθανότατα είναι ερυθρά αιμοσφαίρια (εικ. **1f, g**). Κατά συνέπεια το διάφανο υγρό στα πρώτα στάδια εξέλιξης της φουσκάλας μπορεί να είναι πλάσμα του αίματος, ενώ στη συνέχεια με την είσοδο ερυθρών αιμοσφαιρίων, οι φουσκάλες γίνονται αιμορραγικές. Τελικά τα *Fras1*<sup>-/-</sup> έμβρυα πεθαίνουν, κυρίως μεταξύ των εμβρυϊκών ημερών 14.5 και 16.5 (E14.5-E16.5), αφού σ' αυτά και στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια δεν ακολουθεί η αναμενόμενη μεντελική συχνότητα για τους *Fras1*<sup>-/-</sup> απογόνους. Ο θάνατος των *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών στην εμβρυϊκή ηλικία, πιθανότατα οφείλεται σε επιπλοκές που ανακύπτουν από την παρατηρούμενη αιμορραγία.

Τονίζεται ότι οι φουσκάλες στα *Fras1*<sup>-/-</sup> έμβρυα είναι ιδιαίτερα σταθερές, δεδομένου ότι παραμένουν ανεπηρέαστες κατά την κατεργασία τους με αλκαλικό διάλυμα KOH (το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του σκελετού των εμβρύων).

Όπως φαίνεται στην εικ. **1a, f, g**, οι φουσκάλες στην περιοχή του ματιού πιθανότατα εξασκούν πιέσεις που οδηγούν σε τοπικές παραμορφώσεις των γειτονικών περιοχών. Παρόλα αυτά η ανάπτυξη των δομών του ματιού π.χ φακοί, αμφιβληστροειδής δεν φαίνεται να επηρεάζεται (εικ. **1f, g**).

Σπανιότερα σε ορισμένα έμβρυα *Fras1*<sup>-/-</sup> παρατηρήθηκε διάταση της κοιλιακής περιοχής ή εξωγεγεφαλία (exencephaly).



**Εικ. 1: Δυναμική της εξέλιξης των φουσκάλων σε έμβρυα  $Fras1^{-/-}$**

Όλα τα έμβρυα που χρησιμοποιήθηκαν είναι στελέχους C57BL/10. **a**, Έμβρυο  $Fras1^{-/-}$  ημέρας 12.5, που παρουσιάζει τρεις διαφανείς φουσκάλες, μία στο δεξιό κάτω άκρο, μία στην περιοχή του αριστερού ματιού και την τελευταία στο κάτω μέρος της ράχης, οι οποίες σημειώνονται με ένα μαύρο βέλος και δύο άσπρα βέλη αντίστοιχα. Ο αστερίσκος υποδεικνύει τις μηχανικές παραμορφώσεις που προκαλεί η φουσκάλα στην περιοχή του ματιού. **b**, Έμβρυο  $Fras1^{-/-}$  ημέρας 13.5, με τρεις φουσκάλες στις οποίες έχει ξεκινήσει η αιμορραγία, οι οποίες εκδηλώνονται στο αριστερό μάτι και στα κάτω άκρα και σημειώνονται με τρία άσπρα βέλη. **c**, Έμβρυο  $Fras1^{-/-}$  ημέρας 14.5, με τρεις αιμορραγικές φουσκάλες, οι οποίες εντοπίζονται στα κάτω άκρα και στη δεξιά περιοχή του ματιού. **d**, Φωτογραφία που δείχνει την δεξιά πλευρική περιοχή του εμβρύου που φαίνεται στο **(c)**. **e**, Δεξιά πλευρά ενός εμβρύου  $Fras1^{-/-}$  ημέρας 13.5, το οποίο παρουσιάζει μία αιμορραγική φουσκάλα στο κάτω άκρο του. **f**, Εγκάρσια τομή η οποία έχει βαφτεί με την χρωστική Cresyl violet, εγκεφάλου εμβρύου  $Fras1^{-/-}$  ημέρας 14.5, το οποίο παρουσιάζει φουσκάλα στη δεξιά πλευρά του κεφαλιού του, που υποδεικνύεται από την συντόμευση "bl". **g**, Χρώση με Cresyl violet εγκάρσιας τομής στην περιοχή του ματιού, του εμβρύου που χρησιμοποιείται και στο **(f)**, με την ίδια φουσκάλα (που συμβολίζεται με "bl"). Ο σχηματισμός της φουσκάλας στην δεξιά περιοχή του κεφαλιού, οδηγεί σε μηχανικές παραμορφώσεις των γειτονικών περιοχών, όπως υποδηλώνεται από τους αστερίσκους στις **(f)**, **(g)**. Η ανάπτυξη του ματιού παρόλα αυτά φαίνεται να μην έχει επηρεαστεί **(g)**.

Όσον αφορά τα  $Fras1^{-/-}$  έμβρυα του στελέχους NMR1, αυτά επιδεικνύουν ένα πανομοιότυπο αλλά περιστασιακά ελαφρώς ηπιότερο φαινότυπο, σε σχέση με τα έμβρυα του στελέχους C57BL/10, που επιτρέπει στο 50% των  $Fras1^{-/-}$  ποντικών να επιβιώσει και να αναπτυχθεί φυσιολογικά. Τα νεογέννητα ομόζυγα μεταλλαγμένα ποντίκια  $Fras1^{-/-}$  έχουν συγκρίσιμο μέγεθος με τα ετερόζυγα ή αγρίου τύπου ποντίκια, αλλά παρουσιάζουν αμέσως μετά τη γέννηση μία καθυστέρηση στην ανάπτυξη τους. Σχεδόν τα μισά από τα νεογέννητα  $Fras1^{-/-}$  πεθαίνουν εντός του πρώτου μήνα της ζωής τους, ενώ τα  $Fras1^{-/-}$  που καταφέρνουν να επιβιώσουν αναρρώνουν πλήρως μετά από τρεις

μήνες, για να φτάσουν τελικά στην ενηλικίωση όπου εξελίσσονται και συμπεριφέρονται σαν τα φυσιολογικά και διασταυρώνονται δίνοντας γόνιμους απογόνους.

Σημειώνεται ότι τα νεογέννητα ποντίκια *Fras1<sup>-/-</sup>* παρουσιάζουν συχνά φουσκάλες που έχουν διατηρηθεί από την εμβρυϊκή ηλικία. Αυτές οι φουσκάλες περιορίζονται κυρίως στην περιφέρεια των άκρων και σταδιακά εξαφανίζονται, ενώ δημιουργούνται μόνιμες παραμορφώσεις στα άκρα (IV.II). Αξίζει να σημειωθεί ότι μεγάλες αιμορραγικές φουσκάλες, εμβρυϊκά προσχηματισμένες, δεν έχουν παρατηρηθεί ποτέ σε νεογέννητα *Fras1<sup>-/-</sup>* στην περιοχή του κεφαλιού (χωρίς βέβαια να αποκλείεται η παρουσία μικροφουσκαλών), υποδηλώνοντας ότι πιθανόν οι φουσκάλες στην περιοχή αυτή να οδηγούν σε εμβρυϊκή θνησιμότητα. Σε καμία περίπτωση πάντως δεν παρατηρείται στα νεογέννητα ποντίκια *Fras1<sup>-/-</sup>* σχηματισμός καινούργιων φουσκαλών και δεν υπάρχει καμία ένδειξη επιδερμικής ανωμαλίας, υποστηρίζοντας την άποψη ότι οι συγκεκριμένες αιμορραγικές φουσκάλες δημιουργούνται μόνο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των *Fras1<sup>-/-</sup>* ποντικών και σε κάποιες περιπτώσεις (κάτω άκρα) συντηρούνται και στα αρχικά στάδια της ενηλικίωσης.

Τα ετερόζυγα ποντίκια για τη μεταλλαγή *Fras1* (*Fras1<sup>+/-</sup>*), τόσο στο γενετικό υπόβαθρο NMRI, όσο και στο C57BL/10, δεν διαφέρουν σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου (*Fras1<sup>+/+</sup>*).

#### IV.II Εμφάνιση κρυπτοφθαλμίας και συνδακτυλίας σε ενήλικα *Fras1<sup>-/-</sup>* ποντίκια

Τα εξωτερικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ενήλικων *Fras1<sup>-/-</sup>* ποντικών του στελέχους NMRI, περιλαμβάνουν την εμφάνιση κλειστών βλεφάρων είτε και στα δύο μάτια (σε ποσοστό 20%) (εικ. **2b**), είτε στο ένα μάτι (σε ποσοστό 75%) (εικ. **2c**). Το υπόλοιπο 5% των *Fras1<sup>-/-</sup>* ποντικών παρουσιάζει μερικώς κλεισμένα βλέφαρα που συνοδεύονται από περιορισμένο βλεφαρικό άνοιγμα. Ανατομία του δέρματος που καλύπτει την περιοχή των ματιών σε ποντίκια *Fras1<sup>-/-</sup>* με κλειστά βλέφαρα, αποκάλυψε την μόνιμη σύνδεση των βλεφάρων, δηλαδή την ύπαρξη κρυπτοφθαλμίας (εικ. **2e, f**). Οι διαταραχές στο άνοιγμα των βλεφάρων πιστεύεται ότι δεν επηρεάζουν την ανάπτυξη και την μορφολογία των οφθαλμικών δομών. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, από ιστολογικές παρατηρήσεις τομών στην περιοχή του ματιού, εμβρύων με φουσκάλα στην περιοχή αυτή, στις οποίες φάνηκε η ακεραιότητα της δομής του ματιού, τουλάχιστον μακροσκοπικά (εικ. **1g**).

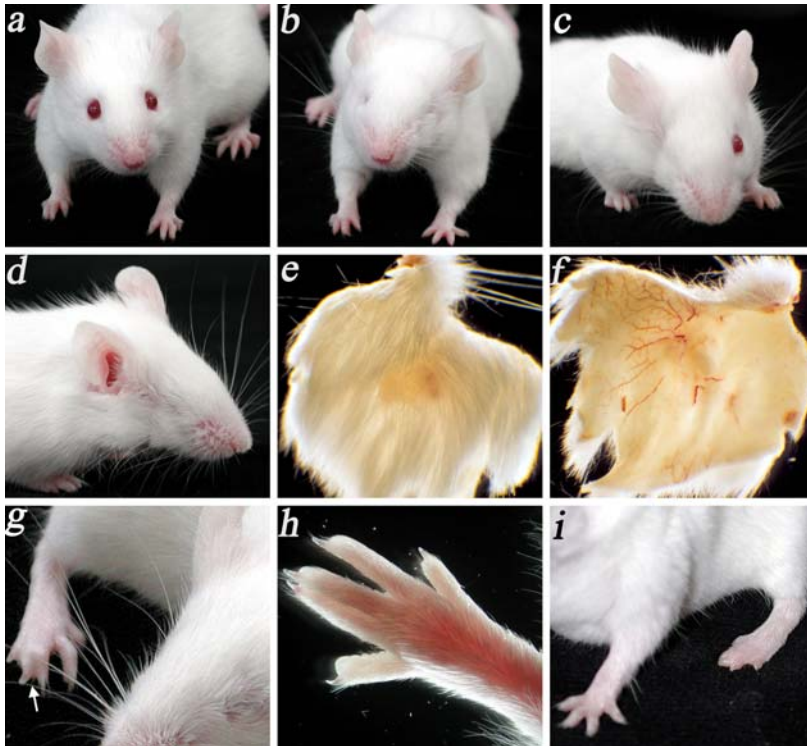
Εκτός από τις συγχωνεύσεις των βλεφάρων, άλλες ορατές συγχωνεύσεις οι οποίες παρατηρούνται στο 90% των *Fras1<sup>-/-</sup>* ποντικών, είναι αυτές που εντοπίζονται στα δάκτυλα των άκρων (ιδιαίτερα των κάτω). Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν συγχωνεύσεις είτε μερικών (εικ. **2g, h**) (απαντάται στο 2% των ομόζυγα μεταλλαγμένων ζώων που παρουσιάζουν συνδακτυλία), είτε όλων των δακτύλων (εικ. **2i**). Τονίζεται ότι στην ολική περίπτωση συνδακτυλίας, οι συγχωνεύσεις όλων των δακτύλων συνοδεύονται συνήθως από πολύ σοβαρές δυσμορφίες των άκρων.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τα ενήλικα ποντίκια *Fras1<sup>-/-</sup>* παρουσιάζουν ανωμαλίες που σχετίζονται με συγχωνεύσεις, στις ίδιες περιοχές που παρατηρούνται οι φουσκάλες στα έμβρυα *Fras1<sup>-/-</sup>* και των δύο στελεχών.

#### IV.III Νεφρικές ανωμαλίες στα *Fras1<sup>-/-</sup>* ποντίκια

Από την ιστολογική ανάλυση *Fras1<sup>-/-</sup>* εμβρύων διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων και των δύο στελεχών, διαπιστώθηκε η μονόπλευρη (σε ποσοστό 30% των εμβρύων με νεφρικές ανωμαλίες) ή η αμφίπλευρη νεφρική αγενεσία (σε ποσοστό 50% των εμβρύων με προβλήματα στα νεφρά). Ειδικότερα στην περίπτωση εμβρύων ημέρας 15.5 (E15.5), εντοπίστηκε μονόπλευρη ή αμφίπλευρη νεφρική αγενεσία στο 50% των περιπτώσεων.

Ανάλογος φαινότυπος μονόπλευρης ή αμφίπλευρης νεφρικής αγενεσίας, αλλά και νεφρικές δυσπλασίες, παρατηρήθηκαν και στα ενήλικα *Fras1<sup>-/-</sup>* ποντίκια του στελέχους NMRI και

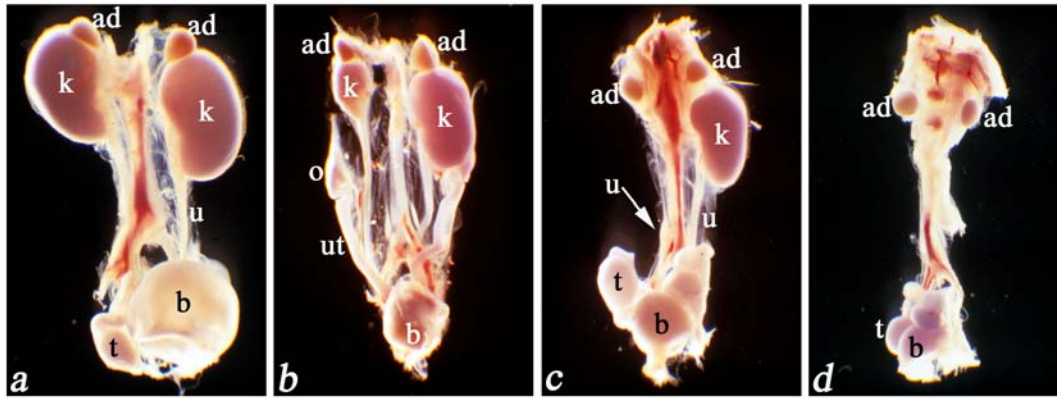


**Εικ. 2: Εξωτερικά χαρακτηριστικά ενηλίκων ποντικών  $Fras1^{-/-}$  του στελέχους NMRI**

**a**, Εμπρός-πίσω απεικόνιση ενηλίκου ποντικού αγρίου τύπου, του στελέχους NMRI. **b**, Φωτογραφία ενηλίκου ποντικού  $Fras1^{-/-}$ , που παρουσιάζει αμφοτεροπλευρώς κλειστά βλέφαρα. **c**, Ποντικός  $Fras1^{-/-}$  με τα δεξιά βλέφαρα κλειστά. **d**, Φωτογραφία της δεξιάς πλευρικής περιοχής του κεφαλιού του ποντικού στο **(c)**. **e**, Φωτογραφία της εξωτερικής πλευράς του δέρματος, που περικλείει την περιοχή ενός ματιού με κλειστά βλέφαρα, η οποία αποκαλύπτει ότι τα βλέφαρα είναι μόνιμα συνδεδεμένα. Όπως φαίνεται στη φωτογραφία δεν υπάρχει φανερό άνοιγμα ή δομή βλεφάρου. **f**, Φωτογραφία της εσωτερικής πλευράς του δέρματος που απεικονίζεται στο **(e)**. Παρομοίως δεν εμφανίζονται δομές βλεφάρων ή ορατό άνοιγμα. **g**, Φωτογραφία ποντικού  $Fras1^{-/-}$  ο οποίος παρουσιάζει αριστερή κρυπτοφθαλμία και συνένωση τριών δακτύλων στο δεξιό άνω άκρο του, όπως συμβολίζεται με το βέλος. **h**, Σπάνια μορφή συνδακτυλίας στην οποία παρατηρείται μερική συγχώνευση δύο δακτύλων. **i**, Φωτογραφία ποντικού  $Fras1^{-/-}$  με συγχωνευμένα όλα τα δάκτυλα στο αριστερό κάτω άκρο του και φυσιολογικό άνω άκρο.

όπως προέκυψε από ανατομικές αναλύσεις του ουρογεννητικού συστήματος νεογέννητων ποντικών, η νεφρική αγενεσία εντοπίζεται και πάλι στο 50% των περιπτώσεων (εικ. 3). Στην περίπτωση ενηλίκων ποντικών  $Fras1^{-/-}$  που και τα δύο νεφρά είναι παρόντα, παρατηρείται σποραδικά το φαινόμενο της μονόπλευρης ή αμφίπλευρης νεφρικής δυσπλασίας ή υποπλασίας. Γενικότερα τα  $Fras1^{-/-}$  ποντίκια παρουσιάζουν ποικίλους συνδυασμούς νεφρικής αγενεσίας ή δυσπλασίας/υποπλασίας. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι παρά την έλλειψη, τη δυσπλασία, ή την υποπλασία των νεφρών, τα επινεφρίδια, οι όρχεις και οι ωθήκες παρουσιάζουν φυσιολογική μορφολογία, με πιθανή εξαίρεση την ουροδόχο κύστη που ίσως είναι λίγο μικρότερη.





**Εικ. 3: Ανάλυση του ουρογεννητικού συστήματος νεογέννητων ποντικών αγρίου τύπου και  $Fras1^{-/-}$**

Τα νεογέννητα ποντίκια στελέχους NMRI μονιμοποιούνται πρώτα σε παραφορμαλδεΐδη (PFA) και στη συνέχεια ακολουθεί η ανατομική τους ανάλυση. **a**, Το ουρογεννητικό σύστημα φυσιολογικού νεογέννητου αρσενικού ποντικού. **b**, Δεξιά νεφρική υποπλασία σε θηλυκό ποντίκι  $Fras1^{-/-}$ . **c**, Δεξιά νεφρική αγενεσία σε αρσενικό ποντίκι  $Fras1^{-/-}$ . Με το βέλος συμβολίζεται ο δεξιός ουρητήρας με την τυφλή άκρη του. **d**, Αμφοτερόπλευρη νεφρική αγενεσία σε αρσενικό ποντίκι  $Fras1^{-/-}$ , όπου οι δομές των ουρητήρων δεν ανιχνεύονται. Συντομεύσεις: ad, adrenal gland (επινεφρίδιο); t, testes (όρχεις); b, bladder (ουροδόχος κύστη); u, ureter (ουρητήρας); k, kidney (νεφρός); o, ovary (ωοθήκη); ut, uterus (μήτρα).

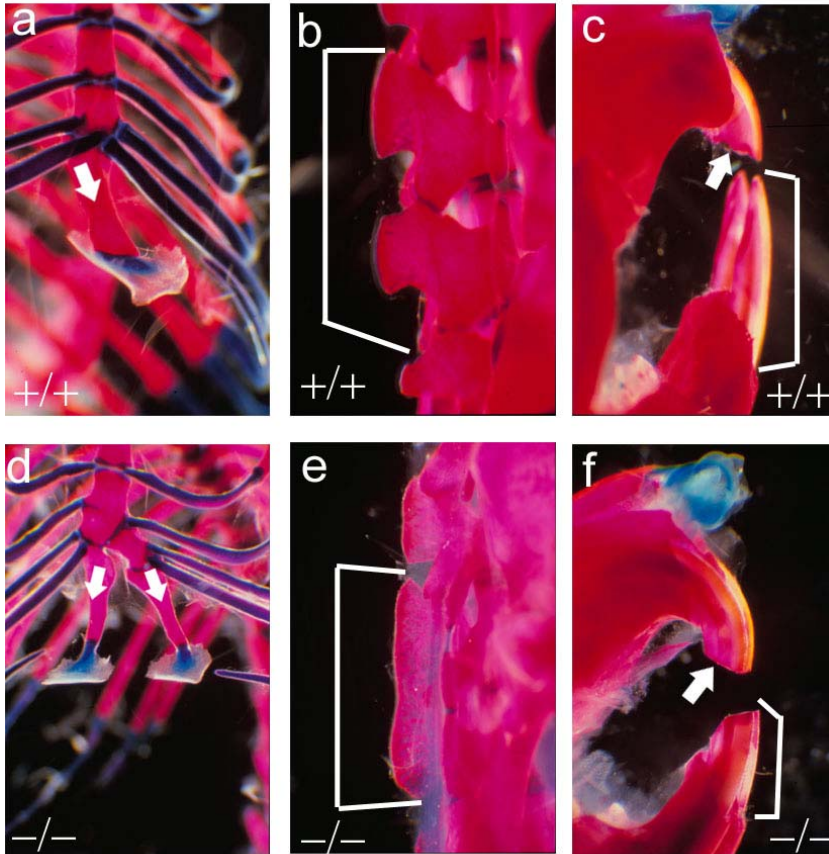
#### IV.IV Σκελετικά προβλήματα $Fras1^{-/-}$ ενηλίκων ποντικών

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα που προέκυψαν ύστερα από κατάλληλη κατεργασία ενηλίκων ποντικών του στελέχους NMRI για την παρασκευή του σκελετού τους. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι όλα τα ποντίκια  $Fras1^{-/-}$  που μελετήθηκαν (συνολικά αναλύθηκαν 40 ποντίκια) εμφανίζουν δισχιδή ξιφοειδή απόφυση του στέρνου τους, ενώ το 5-10% των  $Fras1^{-/-}$  ποντικών παρουσιάζει συνοστέωση των ακανθωδών αποφύσεων των σπονδύλων και λείανση ή κολόβωση των δοντιών τους (εικ. 4). Δηλαδή σε αναλογία με την συγχώνευση των βλεφάρων ή των δαχτύλων των άκρων που αναφέρθηκαν προηγουμένως, παρατηρείται και συγχώνευση των οστών στις αποφύσεις των σπονδύλων.

#### IV.V Μοριακός χαρακτηρισμός της μεταλλαγής $Fras1$

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η σύνδεση των επιθηλίων με τον υποκείμενο συνδετικό ιστό επιτυγχάνεται μέσω ενός ειδικού δικτύου εξωκυττάριων πρωτεϊνών, που συνιστούν το βασικό έλασμα, το οποίο στην περίπτωση του δέρματος συμβάλει στη σύνδεση της επιδερμίδας με την δερμίδα και λέγεται βασικό έλασμα της επιδερμίδας. Η εμφάνιση δερματικών φουσκαλών ανάλογων με τις φουσκάλες που εντοπίζονται στα  $Fras1^{-/-}$  ποντίκια, χαρακτηρίζει μία σειρά ασθενειών του δέρματος οι οποίες συνοδεύονται από ταυτόχρονη αποκόλληση της επιδερμίδας από την δερμίδα. Οι περισσότερες από τις παραπάνω δερματικές ασθένειες, όπως η Πομφολυγώδης Επιδερμόλυση (Epidermolysis bullosa) και το σύνδρομο Alport, οφείλονται σε ανωμαλίες στα συστατικά του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας. Ανάλογες φουσκάλες εντοπίζονται και σε μία σειρά μοντέλων ποντικού, στα οποία έχει πραγματοποιηθεί απενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν για συστατικά του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας τους. Οι φουσκάλες που εντοπίζονται στις παραπάνω περιπτώσεις, επάγονται σαν αποτέλεσμα μηχανικού τραύματος ή τριβής σε νεογέννητα ή ενήλικα μεταλλάγματα, σε αντίθεση με τις φουσκάλες στα  $Fras1^{-/-}$  έμβρυα που αναπτύσσονται μέσα στη μήτρα.

Η εμφάνιση των δερματικών φουσκαλών σε συνδυασμό με την έκφραση της  $Fras1$  στον εξωκυττάριο χώρο της βασικής πλευράς των επιθηλίων, οδήγησε στην συγκριτική μελέτη



**Εικ. 4: Σκελετικές ανωμαλίες σε ποντίκια *Fras1*<sup>-/-</sup>**

Ενήλικα ποντίκια αγρίου τύπου και *Fras1*<sup>-/-</sup> υφίστανται κατάλληλη επεξεργασία για παρασκευή του σκελετού τους, κατά την οποία οι οστέινες περιοχές βάφονται κόκκινες και οι χόνδρινες μπλε, με τις χρωστικές Alizarin red και Alcian blue αντίστοιχα. **a**, Το άσπρο βέλος δείχνει την ξιφοειδή απόφυση του στέρνου σε ποντίκι αγρίου τύπου, η οποία διχάζεται στα τμήματα που υποδεικνύονται από τα άσπρα βέλη σε ποντίκι *Fras1*<sup>-/-</sup> (**d**). **b**, Οι άσπρες γραμμές οριοθετούν το χώρο μεταξύ δύο ακανθωδών αποφύσεων των σπονδύλων σε ποντίκι αγρίου τύπου. **e**, Σε ποντίκι *Fras1*<sup>-/-</sup>, όπως φαίνεται από το μαρκάρισμα με τις άσπρες γραμμές δύο διαδοχικών ακανθωδών αποφύσεων των σπονδύλων, παρατηρείται συνοστέωση αυτών των αποφύσεων. **f**, Όπως φαίνεται στην εικόνα, σε ποντίκι *Fras1*<sup>-/-</sup> εντοπίζεται λείανση των πάνω δοντιών και κολόβωση των κάτω, συγκρίνοντας τα με τα πάνω και τα κάτω δόντια αγρίου τύπου ποντικού (**c**). Στις (**c**) και (**f**) τα άνω δόντια σημειώνονται με άσπρα βέλη και τα κάτω οριοθετούνται από τις άσπρες γραμμές.

της σύστασης και της κατανομής των συστατικών του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας στα *Fras1*<sup>-/-</sup> μεταλλάγματα και στα ποντίκια αγρίου τύπου. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με τον Δρ. Πέτρο Πέτρου πειράματα ανοσοφθορισμού, τόσο με το αντίσωμα που έχει δημιουργηθεί για την πρωτεΐνη *Fras1*, όσο και με αντισώματα που αναγνωρίζουν ορισμένα συστατικά του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας.

Η χρήση του αντισώματος για την *Fras1* επιβεβαίωσε το γνωστό γραμμικό πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης *Fras1* στον εξωκυττάριο χώρο της βασικής πλευράς των επιθηλίων, το οποίο προκύπτει και από τα ανοσολογικά πειράματα με τη χρώση υπεροξειδάσης (κεφάλαιο III). Συγκεκριμένα η *Fras1* εντοπίστηκε στον εξωκυττάριο χώρο που υπόκειται της βασικής πλευράς της επιδερμίδας, σε τομές εμβρύων αγρίου τύπου (εικ. **5a**), ενώ δεν ανιχνεύθηκε σε έμβρυα *Fras1*<sup>-/-</sup> (εικ. **5b**), επιβεβαιώνοντας την αποτελεσματικότητα της απενεργοποίησης του γονιδίου *Fras1*.

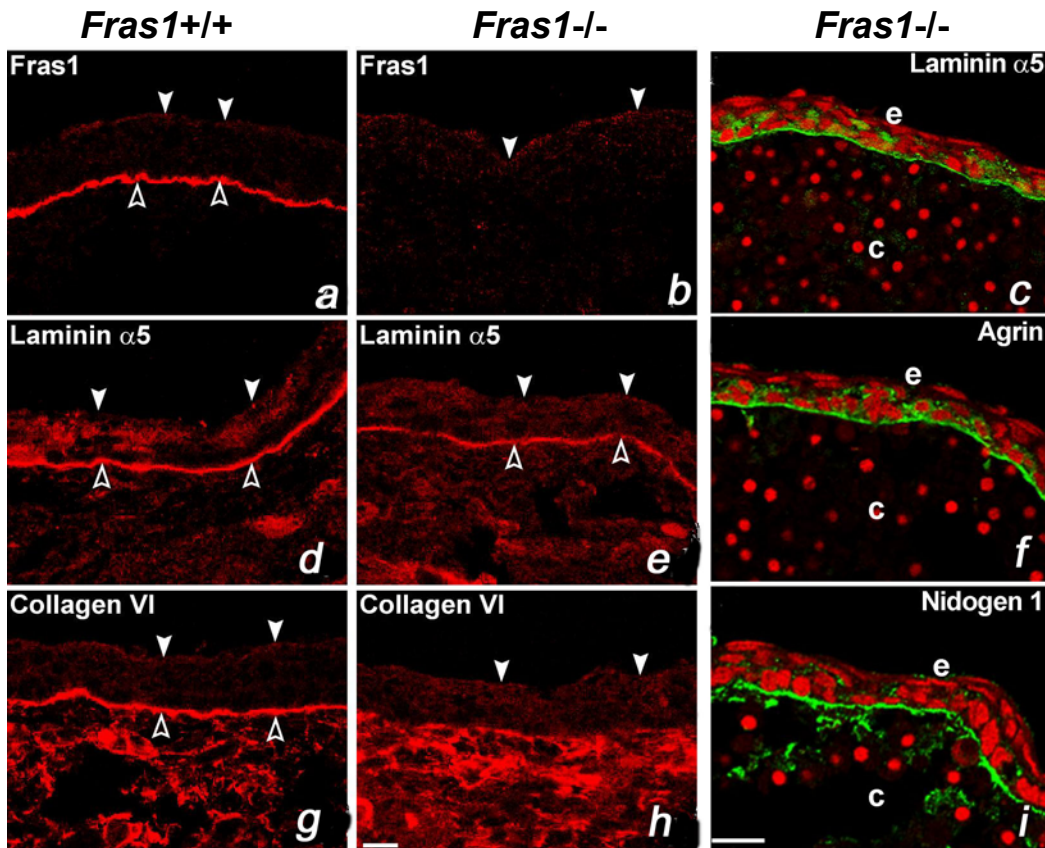
Αξίζει να σημειωθεί ότι η αποτελεσματικότητα της απενεργοποίησης του γονιδίου *Fras1* στα έμβρυα *Fras1*<sup>-/-</sup> ενισχύθηκε, τόσο με την απουσία σήματος σε πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του mRNA του *Fras1* με τους δύο διαφορετικούς ανιχνευτές που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο III, όσο και με την ανίχνευση της γαλακτοζιδάσης που περιέχεται στην κασέτα που εισήχθη στο *Fras1* μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, σε πειράματα ανοσοιστοχημείας με αντίσωμα για την γαλακτοζιδάση.

Από την άλλη μεριά χρησιμοποιώντας αντισώματα για μάρτυρες του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, όπως η λαμινίνη-α5 (Laminin-α5), καθώς και η λαμινίνη-γ1 (Laminin-γ1), το νιδογόνο-1 (Nidogen-1), το κολλαγόνο VII (Col VII) και η αγκρίνη (Agrin), σε μη προβληματικές επιδερμικές περιοχές εμβρύων *Fras1*<sup>-/-</sup> (εικ. **5e**), διαπιστώθηκε μια ελαφρά εξασθένηση του τυπικού γραμμικού φθορίζοντος προτύπου ανίχνευσης που παρουσιάζουν αυτά τα συστατικά, στον εξωκυττάριο χώρο της βασικής πλευράς του επιδερμικού επιθηλίου σε έμβρυα αγρίου τύπου (εικ. **5d**). Κατά συνέπεια μπορεί να υποθεθεί ότι δεν παρατηρούνται ρήξεις, τουλάχιστον σοβαρές, του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας στα έμβρυα *Fras1*<sup>-/-</sup>.

Αντίθετα το κολλαγόνο VI (Collagen VI), το οποίο παράγεται από τον συνδετικό ιστό της δερμίδας και αποτελεί συστατικό της δερμικής πλευράς του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, ανιχνεύεται σε έμβρυα αγρίου τύπου τόσο στο βασικό έλασμα όσο και στον υποκείμενο συνδετικό ιστό (εικ. **5g**), ενώ σε έμβρυα *Fras1*<sup>-/-</sup> η έκφραση του απαλείφεται από το βασικό έλασμα και περιορίζεται μόνο στην δερμίδα (εικ. **5h**).

Προκειμένου να καθοριστεί το επίπεδο του δέρματος στο οποίο λαμβάνει χώρα η αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοιστοχημείας για μάρτυρες του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας σε τομές εμβρύων *Fras1*<sup>-/-</sup> που έχει δημιουργηθεί φουσκάλα (εικ. **5 c, f, i**). (Συγκεκριμένα οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν εντοπίζονται στις ζώνες της Lamina Lucida και της Lamina Densa).

Με τα πειράματα αυτά διαπιστώθηκε ότι, η λαμινίνη-α5 (Laminin-α5), το νιδογόνο-1 (Nidogen-1), η αγκρίνη (Agrin) καθώς και η λαμινίνη-γ1 (Laminin-γ1), ανιχνεύονται στη περιοχή που υπόκειται του αποχωριζομένου επιδερμικού επιθηλίου, στην οροφή της φουσκάλας. Μ' αυτόν τον τρόπο υποδηλώνεται ότι το επίπεδο αποκόλλησης της επιδερμίδας από τη δερμίδα λαμβάνει χώρα πιθανότατα κάτω από την lamina densa. Δηλαδή η απουσία της *Fras1* επηρεάζει τη σύνδεση της δερμίδας με την επιδερμίδα στη δερμική πλευρά της επιδερμικής βασικής μεμβράνης, συντελώντας στη δημιουργία υποεπιδερμικών φουσκάλων.



Εικ. **5**: Ανάλυση ανοσοφθορισμού συστατικών του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας σε έμβρυα αγρίου τύπου και *Fras1*<sup>-/-</sup>

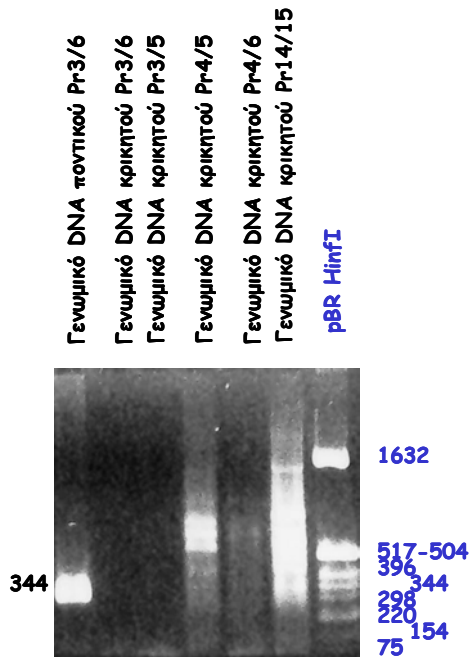
Επιμήκεις κρουτομές από έμβρυα ημέρας 15.5, επώαστηκαν με τα αναγράφοντα πρωτογενή αντισώματα, ανιχνεύθηκαν με δευτερογενή φθορίζοντα αντισώματα (συζευγμένα με Alexa 594) και παρατηρήθηκαν με συνεσσιακό μικροσκόπιο. Οι τομές στα **(a)**, **(d)**, **(g)** προέρχονται από έμβρυα αγρίου τύπου και στα **(b)**, **(e)**, **(h)**, **(c)**, **(f)**, **(i)**, από έμβρυα *Fras1<sup>-/-</sup>*. Οι φωτογραφίες στα **(a)**, **(d)**, **(g)**, **(b)**, **(e)**, **(h)**, αναπαριστούν συγκρίσιμες επιμήκεις τομές από την επιδερμίδα της ραχιαίας πλευράς εμβρύων, στο επίπεδο των νεφρών (και από μη προβληματικές περιοχές στην περίπτωση των μεταλλαγμένων εμβρύων). Τα γεμισμένα βέλη στις **(a)**, **(d)**, **(g)**, **(b)**, **(e)**, **(h)**, οριοθετούν την εξωτερική επιφάνεια του επιθηλιακού στρώματος της επιδερμίδας, ενώ τα άδεια βέλη σκιαγραφούν το φθορίζον σήμα στο βασικό έλασμα. Οι τομές στις εικόνες **(c)**, **(f)**, **(i)** περιλαμβάνουν συγκρίσιμες περιοχές της επιδερμίδας γύρω από το μάτι ενός μεταλλαγμένου εμβρύου *Fras1<sup>-/-</sup>*, το οποίο παρουσιάζει φουσκάλα. **a**, Η πρωτεΐνη *Fras1* ανιχνεύεται στη βασική πλευρά του επιδερμικού επιθηλίου, εντός του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, σε έμβρυα αγρίου τύπου. **b**, Αντίθετα παρατηρείται απουσία αντιγονικότητας για την *Fras1* σε τομές εμβρύων *Fras1<sup>-/-</sup>*. **d**, **e**, Η λαμινίνη-α5 (*Laminin-α5*) εντοπίζεται στο βασικό έλασμα της επιδερμίδας και στον υποκείμενο συνδετικό ιστό, σε τομές από έμβρυο αγρίου τύπου **(d)**, ενώ παρουσιάζει ελαφρά μειωμένη αντιγονικότητα ανάλογου προτύπου, σε έμβρυα *Fras1<sup>-/-</sup>* **(e)**. Αντίθετα στην περίπτωση του κολλαγόνου VI (*Collagen VI*), το οποίο παράγεται από το συνδετικό ιστό και ανιχνεύεται τόσο στα κύτταρα του, όσο και στην δερμική πλευρά του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας σε τομή από έμβρυο αγρίου τύπου **(g)**, το φθορίζον σήμα του περιορίζεται στον συνδετικό ιστό της δερμίδας, στην περίπτωση τομής από έμβρυο *Fras1<sup>-/-</sup>* **(h)**. **c**, **f**, **i**, Τόσο η λαμινίνη-α5 (*Laminin-α5*) **(c)**, όσο και η αγκρίνη (*Aggrin*) **(f)** και το νιδογόνο-1 (*Nidogen 1*) **(i)** ανιχνεύονται στην οροφή της φουσκάλας, γύρω από το μάτι ενός μεταλλαγμένου εμβρύου *Fras1<sup>-/-</sup>*, κάτω από το αποχωριζόμενο επιθήλιο. Η κλίμακα μέτρησης στις **(a)**, **(d)**, **(g)**, **(b)**, **(e)**, **(h)**, είναι 10μm και στις **(c)**, **(f)**, **(i)**, είναι 20μm. Συντομεύσεις: e;epidermis (επιδερμίδα), d;dermis (δερμίδα), c;blister cavity (κοιλότητα της φουσκάλας).

## V. Ταυτοποίηση των χρωμοσωμικών θέσεων των γονιδίων *Fras1* και *FRAS1*

Η φυσική χαρτογράφηση του *Fras1* στο γονιδίωμα του ποντικού, αλλά και του ομόλογου γονιδίου *FRAS1* στο γονιδίωμα του ανθρώπου, επιτεύχθηκε με τη χρησιμοποίηση υβριδίων σωματικών κυττάρων (Somatic cell hybrids) ποντικού-κρικητού και ανθρώπου-κρικητού αντίστοιχα (σε συνεργασία με τον Δρ. Kenji Imai, στην ερευνητική ομάδα του Καθ. Rudi Balling στο GSF του Μονάχου). (Όταν πραγματοποιήθηκε η συγκεκριμένη διαδικασία χαρτογράφησης δεν αρκούσαν οι πληροφορίες που ήταν διαθέσιμες από τις βάσεις δεδομένων.) Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), με εκκινητές που εντοπίζονται σε περιοχές ιντρονίων (οι οποίες ως επί το πλείστον δεν είναι συντηρημένες), στο γονιδίωμα του ποντικού, ή του ανθρώπου αντίστοιχα.

Για τη χαρτογράφηση του *Fras1*, οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν εντοπίζονται στις ιντρονιακές αλληλουχίες εκατέρωθεν του έκτου εξονίου (περιοχή μοτίβων VWC της *Fras1*), μεγέθους 134 bp και είναι ο pr3 (με κατεύθυνση προς τα εμπρός, forward) με τον pr6 (με αντίστροφη κατεύθυνση, reverse). Οι εκκινητές αυτοί ελέγχθηκαν προηγουμένως για την ειδικότητα τους με PCR, όπου χρησιμοποιήθηκε σαν μήτρα DNA γονιδίωμα ποντικού ή κρικητού και διαπιστώθηκε ότι μόνο στον ποντικό οι παραπάνω εκκινητές παράγουν το αναμενόμενο προϊόν των 344 bp (εικ. 1).

Τελικά το *Fras1* χαρτογραφήθηκε στη μεσαία περιοχή του χρωμοσώματος 5 (MMU), κοντά στον γενετικό μάρτυρα *D5Mit20* και στον γενετικό τόπο *Fgf5*.



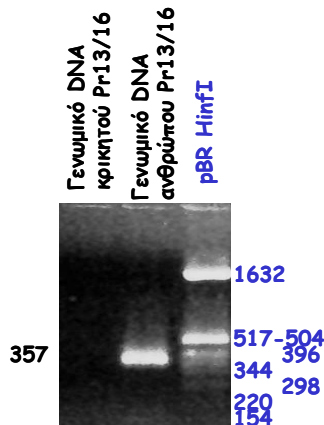
Εικ. 1: Ειδικότητα των εκκινητών pr3 και pr6

Οι εκκινητές pr3 και pr6 προσδίδουν το προϊόν των 344 bp σε αντίδραση PCR, όταν χρησιμοποιείται σαν μήτρα DNA το γονιδίωμα του ποντικού, ενώ δεν παράγουν κάποιο προϊόν όταν χρησιμοποιείται το γονιδίωμα του κρικητού. Οι υπόλοιποι συνδυασμοί εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν απορρίπτονται, αφού δεν είναι ειδικοί για το γονιδίωμα του ποντικού και παράγουν προϊόντα όταν πραγματοποιείται αντίδραση PCR με μήτρα το γονιδίωμα του κρικητού. Εξαιρείται ο συνδυασμός εκκινητών pr3 και pr5, ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά αντί του pr3 και pr6.

Η χαρτογράφηση του *Fras1* στην συγκεκριμένη περιοχή του χρωμοσώματος 5, επιβεβαιώθηκε αργότερα με έρευνες στις διεθνείς βάσεις δεδομένων.

Στην εύρεση των κατάλληλων εκκινητών για τη χαρτογράφηση του *FRAS1* στο γονιδίωμα του ανθρώπου, συνέβαλλε η ανίχνευση ενός ανθρώπινου γενωμικού κλώνου BAC για το *FRAS1*, από τις διεθνείς βάσεις δεδομένων. Ο κλώνος αυτός παρουσιάζει σ' ένα τμήμα του υψηλή ταυτότητα (81%) με την περιοχή του cDNA του *Fras1* από τα 3285-3450 bp (καρβοξυτελικό άκρο της *Fras1*). Εκατέρωθεν αυτής της ομόλογης περιοχής των 165 bp, εντοπίζονται οι εκκινητές pr13 (forward) και

pr16 (reverse) που χρησιμοποιήθηκαν για τη χαρτογράφηση του *FRAS1*. Οι εκκινητές αυτοί δίνουν προϊόν μεγέθους 357 bp σε αντίδραση PCR με μήτρα DNA το γονιδίωμα του ανθρώπου. Η ειδικότητα των εκκινητών αυτών επιβεβαιώθηκε, ανάλογα με προηγουμένως, με την εφαρμογή PCR στα γονιδιώματα του ανθρώπου και του κρικητού και την παραγωγή του προβλεπόμενου προϊόντος των 357 bp μόνο όταν χρησιμοποιείται σαν μήτρα DNA το ανθρώπινο γονιδίωμα (εικ. 2).



**Εικ. 2: Ειδικότητα των εκκινητών pr13 και pr16**

Οι εκκινητές pr13 και pr16 παράγουν με PCR το προϊόν των 357 bp, όταν χρησιμοποιείται σαν μήτρα DNA το γονιδίωμα του ανθρώπου. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται σαν μήτρα το γονιδίωμα του κρικητού δεν προκύπτει αποτέλεσμα.

Το *FRAS1* εντοπίστηκε σε γειτονική περιοχή με τους μάρτυρες STS, SHGC-20205 και SHGC-1003, στη θέση 4q13-q21 του ανθρώπινου χρωμοσώματος (HSA). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε αργότερα με την εύρεση ανθρώπινων γενωμικών κλώνων από τις διεθνείς βάσεις δεδομένων, οι οποίοι παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με το γονίδιο *Fras1* και οι οποίοι χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα 4 και μάλιστα στην περιοχή 4q21.1.

Τονίζεται ότι οι χρωμοσωμικές περιοχές MMU5 και HSA4 είναι συντενικές.

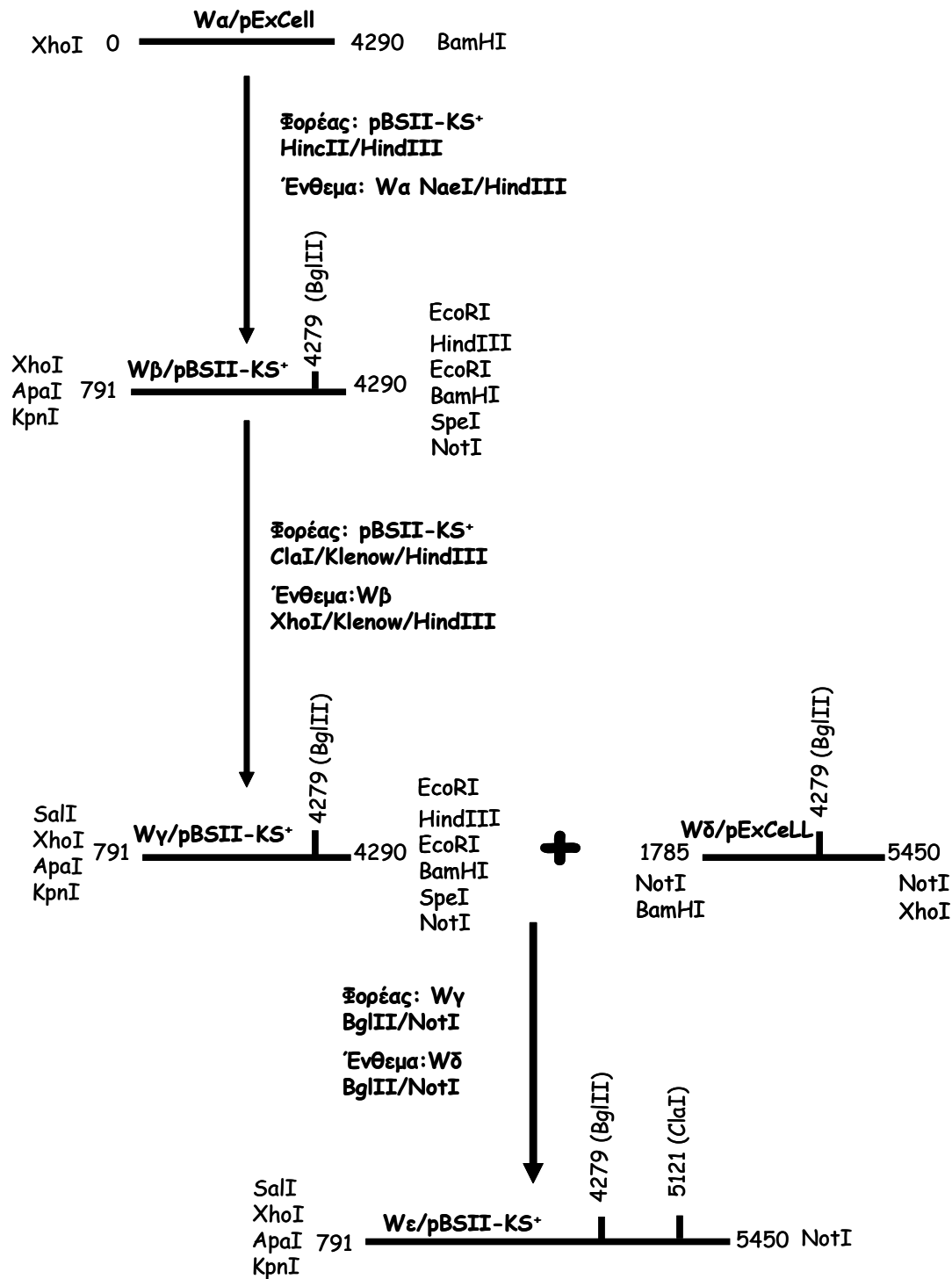
## VI. Κλωνοποίηση του μεταφραζόμενου cDNA του γονιδίου *Fras1* στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript II-KS<sup>+</sup>

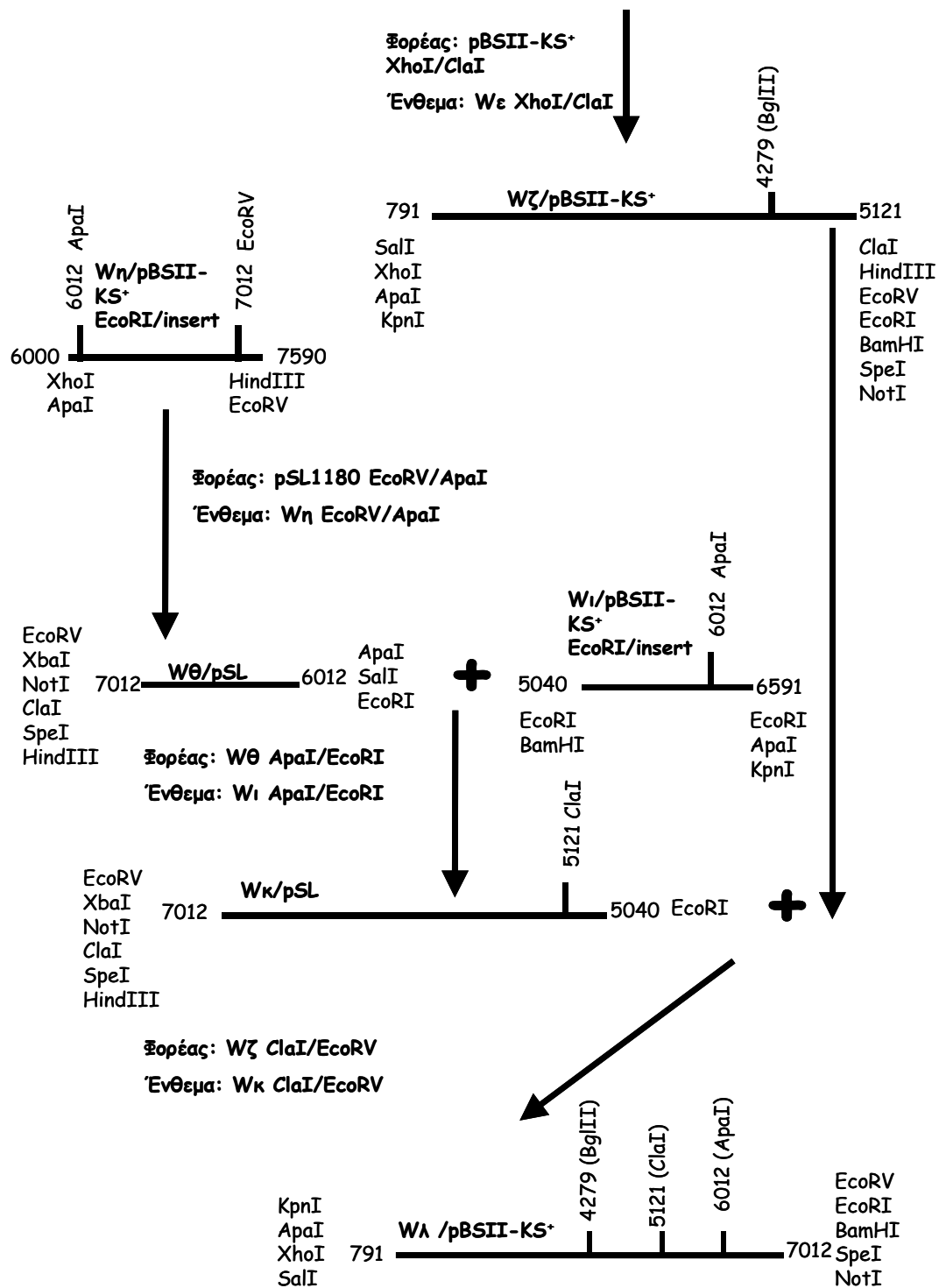
Το μεταφραζόμενο τμήμα του cDNA του γονιδίου *Fras1* κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript (pPBSII-KS<sup>+</sup>). Η πορεία κλωνοποίησης και οι ενδιάμεσες κατασκευές που προκύπτουν μέχρι την τελική, παρουσιάζονται σχηματικά παρακάτω.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο η τελική κατασκευή, όσο και όλες οι ενδιάμεσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μια σειρά λειτουργικών πειραμάτων, όπως για τη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων, καθώς και σε πειράματα έκφρασης του *Fras1* σε κυτταροκαλλιέργειες. Σε κάθε περίπτωση απαιτείται η εισαγωγή των αντίστοιχων τμημάτων cDNA του *Fras1* σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς.

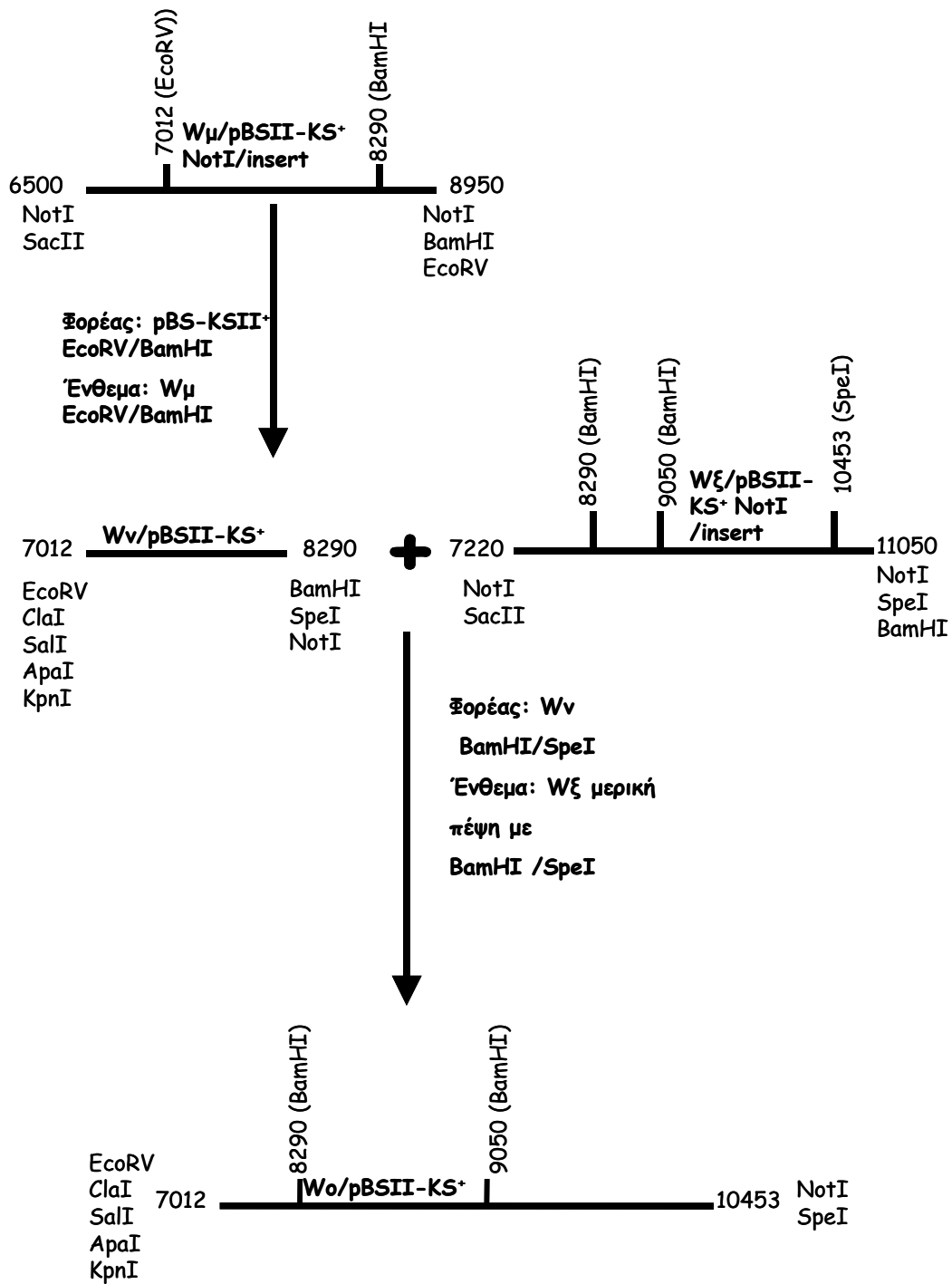
Το τελευταίο διάστημα στο εργαστήριο το cDNA του γονιδίου *Fras1* μεταφέρθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pBluescript, στον ευκαρυωτικό φορέα pCMV και εκφράστηκε παροδικά σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων ηπατοκυττάρων (HepG2). Τα πειράματα αυτά έγιναν προκειμένου να διαλευκανθεί αν η πρωτεΐνη *Fras1* είναι διαμεμβρανική ή εκκρινόμενη, αλλά δυστυχώς δεν έχουν οδηγήσει ακόμα σε κάποια ξεκάθαρη απάντηση.

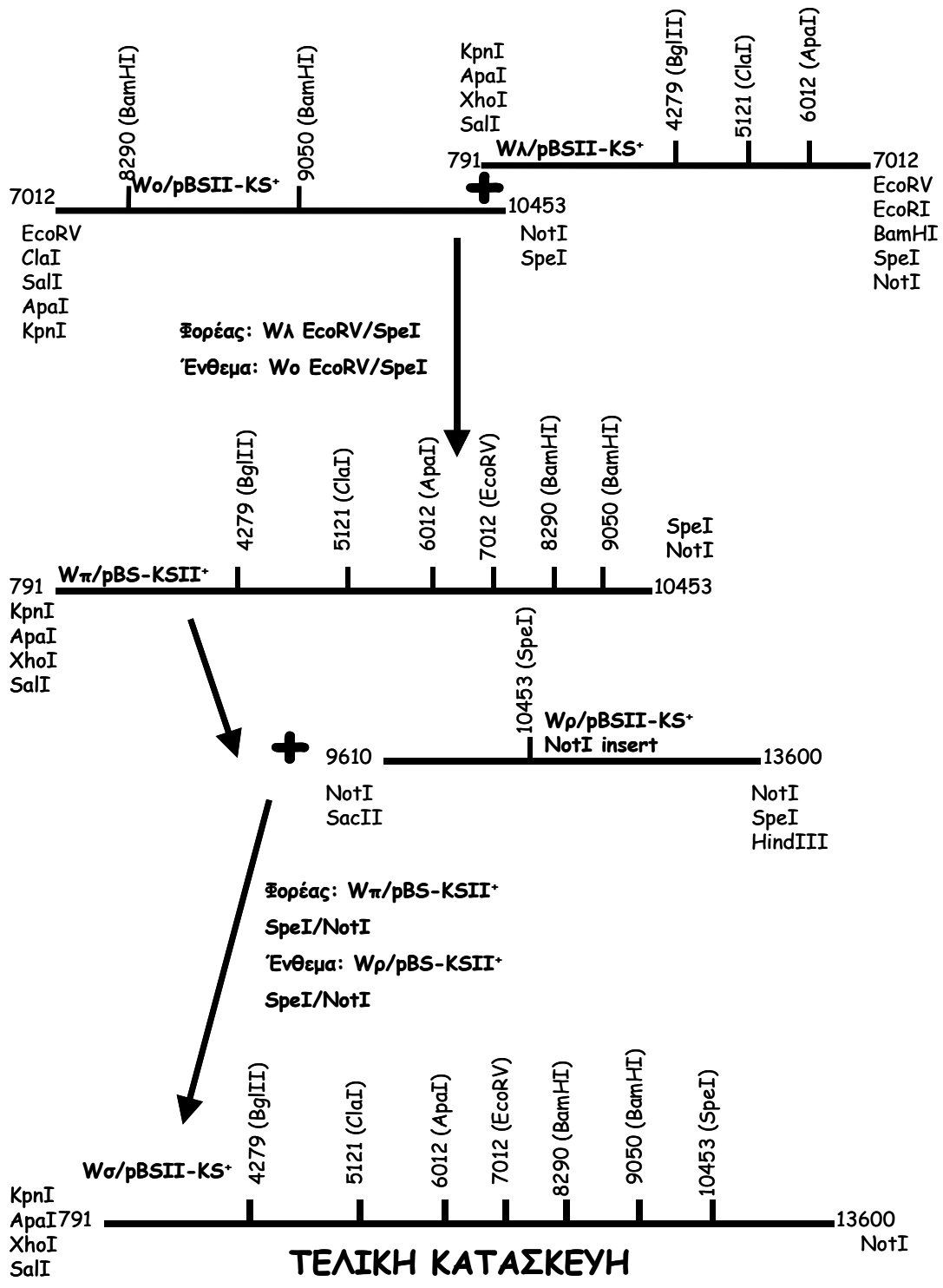
**ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ  
ΜΕΤΑΦΡΑΖΟΜΕΝΟΥ cDNA ΤΟΥ *Fras1* ΣΤΟΝ  
pBSII-KS<sup>+</sup>**











## I. Γενικά

Στη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής ολοκληρώθηκε η ταυτοποίηση της αλληλουχίας cDNA ενός καινούργιου γονιδίου στον ποντικό, του *Fras1*, μεγέθους 15.865 bp. Η νουκλεοτιδική αυτή αλληλουχία που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 4010 αμινοξέων, περιέχει το κωδικόνιο έναρξης και λήξης της μετάφρασης, το 3' μη μεταφραζόμενο άκρο (3' UTR) και την ουρά πολυαδενυλίωσης (PolyA tail) και πιθανότατα και το 5' μη μεταφραζόμενο άκρο (5'UTR) του γονιδίου. Όσον αφορά τη γενωμική οργάνωση του *Fras1*, διαπιστώθηκε ότι περιλαμβάνει πολλά και μικρά εξόνια και μεγάλα ιντρόνια. Συγκεκριμένα με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων Celega, εντοπίστηκαν 74 εξόνια με μέγεθος κατά μέσο όρο 150-200 νουκλεοτίδια, με το μικρότερο εξόνιο να έχει μέγεθος 30 και το μεγαλύτερο 1800 νουκλεοτίδια.

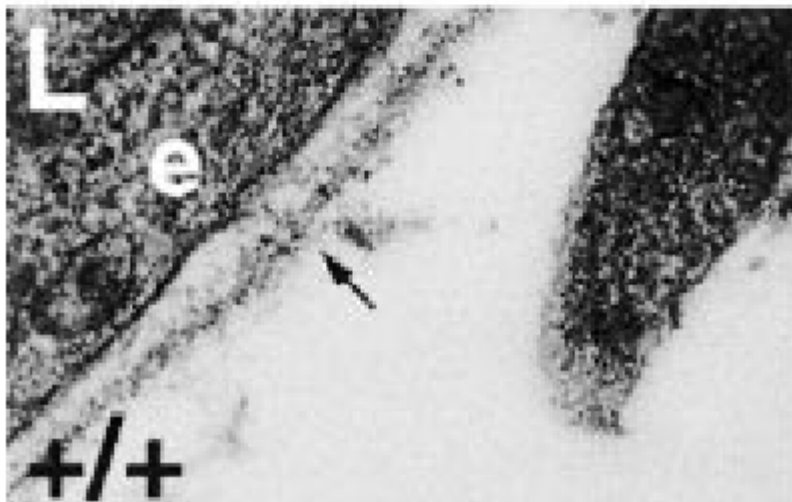
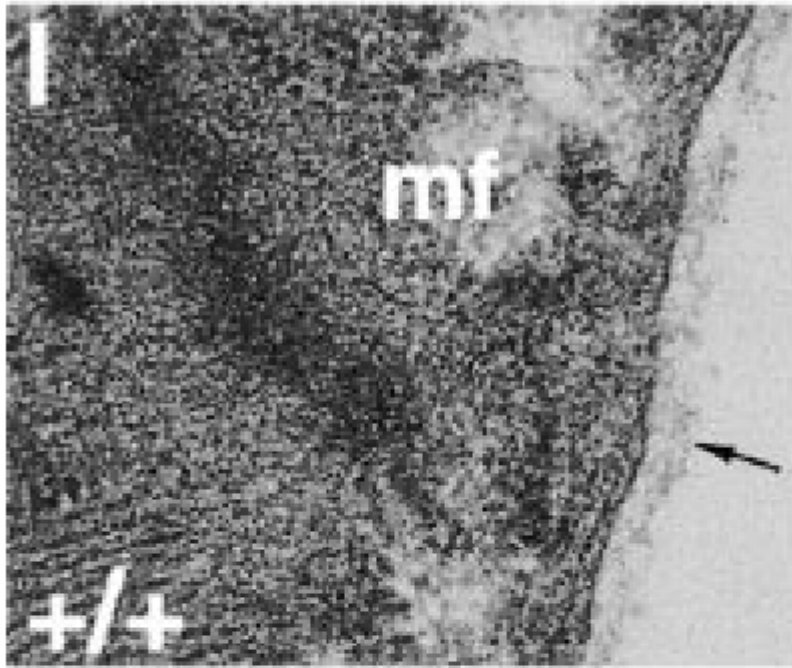
Η πρωτεΐνη *Fras1* με βάση την προβλεπόμενη αμινοξική της αλληλουχία, διακρίνεται σε τέσσερις ξεχωριστές πρωτεϊνικές περιοχές, που έχουν ταυτιστεί με συγκεκριμένες λειτουργίες και οι οποίες εντοπίζονται σε διαφορετικές πρωτεΐνες ποικίλων οργανισμών. Τονίζεται ότι οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν, σε αντίθεση με την *Fras1*, η κάθε μία μόνο ένα είδος από τα παραπάνω τέσσερα πρωτεϊνικά πρότυπα. Συγκεκριμένα ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης *Fras1* απαντώνται δύο διαφορετικές περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνες, εκ των οποίων η πρώτη περιέχει 6 επαναλαμβανόμενα μοτίβα που συναντώνται στην περιοχή C του παράγοντα Von Willebrand και η δεύτερη 13 επαναλήψεις που εντοπίζονται στις πρωτεάσες της οικογένειας των Φουρινών, οι οποίες όμως δεν συμπίπτουν με την καταλυτική περιοχή των πρωτεασών αυτών. Στη συνέχεια ανιχνεύεται η περιοχή που παρουσιάζει ομολογία με την πρωτεογλυκάνη NG2, που εντοπίζεται στα θηλαστικά και προσδένει θειική χονδροϊτίνη και ακολουθεί η περιοχή με τα 5 μοτίβα πρόσδεσης ασβεστίου (Calx beta), που συναντώνται σε ιοντοανταλλάκτες  $Na^+-Ca^{+2}$  της κατηγορίας NCX1, NCX3, στα θηλαστικά και στη δροσόφιλα. Τέλος καρβοξυτελικά της *Fras1*, εμφανίζεται μία περιοχή 1000 περίπου αμινοξέων που δεν εμφανίζει ομολογία με καμία γνωστή πρωτεΐνη. Σημειώνεται ότι με διάφορα προγράμματα ανάλυσης πρωτεϊνικών δομών, στο καρβοξυτελικό άκρο της *Fras1* εντοπίζεται μία πιθανή διαμεμβρανική περιοχή, ενώ στο αμινοτελικό της άκρο ένα πεπτίδιο σινιάλο για την εισαγωγή της στο ενδοπλασματικό δίκτυο και την ολοκλήρωση της σύνθεσης της.

Το γονίδιο *Fras1*, για το οποίο έχουν εντοπιστεί ESTs που καλύπτουν το 20% της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας, ανιχνεύθηκε με διερεύνηση στις διεθνείς βάσεις δεδομένων και στο γονιδίωμα του ανθρώπου. Το αντίστοιχο γονίδιο του *Fras1* στον άνθρωπο, *FRAS1*, το οποίο μελετήθηκε στο εργαστήριο του P.J.Scambler (ύστερα από την προσφορά από το εργαστήριο μας του *Fras1*), διαπιστώθηκε ότι κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μεγέθους 4007 αμινοξέων, η οποία παρουσιάζει 85% ταυτότητα με την *Fras1*. Η πρωτεΐνη αυτή περιλαμβάνει, σε αναλογία με την *Fras1*, ένα πεπτίδιο σινιάλο στο αμινοτελικό άκρο της, μοτίβα τύπου Von Willebrand, μοτίβα τύπου φουρίνης, μία περιοχή που παρουσιάζει ομολογία με την NG2, μοτίβα τύπου Calx-beta, καθώς και μία πιθανή διαμεμβρανική περιοχή. Από την άλλη μεριά περιοχές του γονιδίου *Fras1*, μετά τα μοτίβα των κυστεϊνών, εντοπίστηκαν και σε άλλους οργανισμούς, όπως στον αχινό και στο Zebrafish. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη ECM3 του αχινού παρουσιάζει 32% ταυτότητα με την περιοχή του *Fras1* από το αμινοξύ 1102 μέχρι το αμινοξύ 3937 (Hodor *et al.*, 2000), ενώ στο Zebrafish εντοπίζεται μια μικρή περιοχή που παρουσιάζει 79% βαθμό ταυτότητας με το τμήμα της *Fras1* από το αμινοξύ 3171 μέχρι το αμινοξύ 3297.

Όσον αφορά την πρόελευση των μεταγράφων του γονιδίου *Fras1*, διαπιστώθηκε με πειράματα *in situ* υβριδοποίησης και ανιχνευτές που εντοπίζονται στις περιοχές που κωδικοποιούν για μοτίβα τύπου von Willebrand και για μοτίβα τύπου Calx-beta, ότι τα μετάγραφα αυτά εντοπίζονται σε ποικίλα στρώματα επιθηλιακών κυττάρων και επομένως ότι στην περίπτωση του δέρματος η πρωτεΐνη *Fras1* είναι επιδερμικής και όχι δερμικής πρόελευσης. Μετάγραφα του *Fras1* εντοπίζονται επίσης σε μη καθορισμένους κυτταρικούς τύπους του εγκεφάλου εμβρύων και ενηλίκων ποντικών.

Από την άλλη μεριά, προκειμένου να διαπιστωθεί ο κυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης *Fras1*, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοεντοπισμού με τα οποία η *Fras1* ανιχνεύθηκε υπό τη μορφή ενός γραμμικού συνεχόμενου προτύπου στην εξωκυττάρια περιοχή της βασικής πλευράς των περισσότερων επιθηλίων. Είναι γνωστό ότι στον εξωκυττάριο χώρο τόσο της βασικής πλευράς των επιθηλίων, όσο και άλλων ιστών, εντοπίζεται ένας λεπτός και

ευέλικτος σχηματισμός εξωκυττάριας ουσίας, το βασικό έλασμα, το οποίο διακρίνεται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σε τρεις διακριτές επιφάνειες (Lamina lucida, Lamina

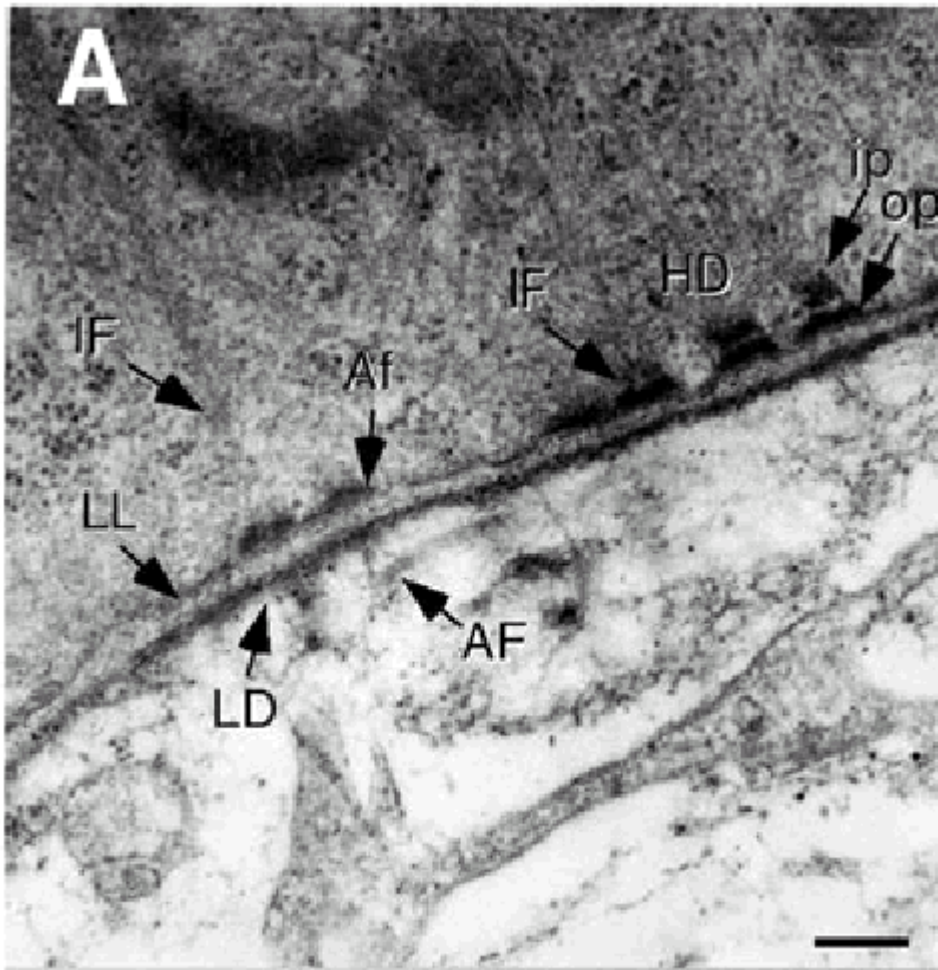


**Εικ. 1: Βασικό έλασμα εμβρύων ημέρας 10.5**

Απεικονίζεται το βασικό έλασμα του καρδιακού μύ (l) και το βασικό έλασμα της επιδερμίδας (L), το οποίο περιλαμβάνει τη ζώνη της Lamina lucida και της Lamina densa, οι οποίες υποδεικνύονται με τα βέλη. Συντομεύσεις: mf, muscle filament (μυϊκό νημάτιο); e, epithelial cell (επιθηλιακό κύτταρο) (Costell M *et al.*, 1999).

densa, Sub Lamina densa) (εικ. 1, 2). Κατά συνέπεια το αποτέλεσμα της ανοσοανίχνευσης της Fras1 με το οπτικό ή το συνεστιακό μικροσκόπιο, υποδηλώνει ότι πιθανότατα ανήκει στην περιοχή του βασικού ελάσματος των επιθηλίων. Βέβαια η ταυτοποίηση ενός εξωκυττάριου συστατικού σαν συστατικό του βασικού ελάσματος, πραγματοποιείται μόνο μέσω εντοπισμού του με ηλεκτρονική μικροσκοπία σε κάποια από τις τρεις ζώνες του βασικού ελάσματος. Για το λόγο αυτό σχεδιάζεται μελλοντικά ο ανοσοεντοπισμός της Fras1 με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και την εφαρμογή υπερδομικών μεθόδων, όπως η ανοσοχρίζουσα ιστοχημεία (immunogold histochemistry). Σημειώνεται ότι για ευκολία η Fras1 θα αναφέρεται παρακάτω σαν συστατικό του βασικού ελάσματος.

Ο εντοπισμός της Fras1 στον εξωκυττάριο χώρο του βασικού ελάσματος των επιθηλίων έρχεται σε συμφωνία με την αλληλουχία σινιάλο στα πρώτα 20 αμινοτελικά αμινοξέα της, η



**Εικ. 2: Ηλεκτρονική μικροσκοπία του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας ενηλίκων**

Σημειώνονται οι χαρακτηριστικές ζώνες του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας και οι χαρακτηριστικές τους δομές. Συντομεύσεις: Anchoring filaments (Af) (νημάτια αγκυροβόλησης), Anchoring fibrils (AF) (ινίδια αγκυροβόλησης), Hemidesmosome (HD) (ημιδεσμόςωμα), Lamina Lucida (LL) (διαυγής υμένας), Lamina Densa (LD) (σκοτεινός υμένας), Intermediate filaments (IF) (ενδιάμεσα νημάτια), inner plaque (ip) (εσωτερική πλάκα), outer plaque (op) (εξωτερική πλάκα), (Spirito *et al.*, 2001).

οποία οδηγεί την Fras1 στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο για ολοκλήρωση της σύνθεσης της, καθώς και με τη πιθανή διαμεμβρανική περιοχή στο καρβοξυτελικό της άκρο. Ταυτόχρονα συμφωνεί και με τις πρωτεϊνικές περιοχές που περιέχει η Fras1, οι οποίες εντοπίζονται σε εξωκυττάρια ή διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Αυτό που μένει να διαλευκανθεί είναι αν η πρωτεΐνη Fras1 είναι όντως διαμεμβρανική, ή αν αποτελεί εκκρινόμενη εξωκυττάρια πρωτεΐνη.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αν και η Fras1 εντοπίζεται στην περιοχή του βασικού ελάσματος σχεδόν όλων των επιθηλίων, δεν ανιχνεύεται στον εξωκυττάρια χώρο του βασικού ελάσματος των νεύρων και των ενδοθηλίων. Εύλογα λοιπόν τίθεται το ερώτημα αν η παρουσία της Fras1 είναι απαγορευτική για το βασικό έλασμα αυτών των κυτταρικών τύπων, ή απλώς πλεονάζουσα. Επομένως θα ήταν πολύ ενδιαφέρον και αποτελεί και μελλοντικό στόχο του εργαστηρίου, να εκφραστεί εκτοπικά το *Fras1* στα παραπάνω κύτταρα στον ποντικό και να μελετηθούν τα αποτελέσματα αυτής της επέμβασης στην έκφραση του.

Από την άλλη μεριά σημειώνεται ότι, ενώ η παρουσία του *Fras1* έχει διαπιστωθεί με πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του mRNA του σε εγκεφάλους εμβρύων και ενηλίκων ποντικών, στάθηκε αδύνατη η ανοσοανίχνευση της Fras1 στην περιοχή του εγκεφάλου. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα *in situ* υβριδοποίησης εντοπίζονται στην περιοχή που κωδικοποιεί είτε για μοτίβα τύπου VWC, είτε για την περιοχή μοτίβων Calx-beta, ενώ τα πεπτιδία

που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοποίηση και την παραγωγή των αντισωμάτων ανήκουν στην περιοχή που παρουσιάζει ομολογία με την NG2. Θα μπορούσε επομένως να υποθεθεί ότι στον εγκέφαλο των ποντικών εκφράζεται ένα εναλλακτικό προϊόν συναρμολόγησης του *Fras1*, το οποίο δεν περιλαμβάνει την περιοχή που κωδικοποιεί για το μέρος της NG2 που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση. Στην υπόθεση αυτή συμβάλλει η εύρεση με ανάλυση κατά Northern και χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το τμήμα του cDNA του *Fras1* που κωδικοποιεί για μοτίβα τύπου VWC (και όχι τον ανιχνευτή που κωδικοποιεί για μοτίβα φουρινών), εκτός από το πλήρες μετάγραφο των 15.865 bp και ενός μικρότερου μεταγράφου μεγέθους 4.8 kb. Το μετάγραφο αυτό θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει το μετάγραφο εναλλακτικής συναρμολόγησης του *Fras1* στον εγκέφαλο.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η έκφραση του *Fras1* στον εγκέφαλο θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν:

**α)** Πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του mRNA του *Fras1*, χρησιμοποιώντας ανιχνευτές από διάφορες περιοχές του cDNA του.

**β)** Πειράματα ανοσοεντοπισμού της *Fras1* με ποικιλία αντισωμάτων, που θα δημιουργηθούν με τη χορήγηση πεπτιδίων για ανοσοποίηση, τα οποία θα προέρχονται από περιοχές σε όλο το εύρος της *Fras1*.

**γ)** Πειράματα παραγωγής μεταγράφων του *Fras1* με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase, RT-PCR), χρησιμοποιώντας εκκινητές που να καλύπτουν όλο το *Fras1*.

Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η ανάλυση της έκφρασης του *Fras1* δεν πραγματοποιήθηκε σε ενήλικα στάδια, με εξαίρεση τα πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του mRNA του, με τα οποία διαπιστώθηκε και η έκφραση του σε εγκεφάλους ενηλίκων. Μελέτες όμως που έγιναν το τελευταίο διάστημα στο εργαστήριο από τον Π.Πέτρου και οι οποίες αφορούν την ανάλυση της έκφρασης του *Fras1* στους πνεύμονες, απέδειξαν ότι η παρατηρούμενη έκφραση του στα εμβρυικά στάδια στο βασικό έλασμα του ορογόνου υμένα (pleura) και των βρόγχων των πνευμόνων, εξαφανίζεται την ημέρα 17.5 (E17.5) της εμβρυογένεσης αλλά και κατά την ενηλικίωση. Το ίδιο συμβαίνει και με την εμβρυϊκή έκφραση του *Fras1* στο βασικό έλασμα των νεφρών και της επιδερμίδας, η οποία δεν συντηρείται στα ενήλικα ποντίκια. Πιθανότατα λοιπόν το *Fras1*, τουλάχιστον στο βασικό έλασμα των επιθηλίων, να σταματάει να εκφράζεται μετά τη γέννηση των ποντικών. Η ορθότητα αυτής της υπόθεσης οφείλει να διαλευκανθεί είτε πραγματοποιώντας πιο εξονυχιστικά πειράματα ανοσοιστοχημείας σε ενήλικα ποντίκια, είτε με διαδικασίες *in situ* υβριδοποίησης και RT-PCR. Στην περίπτωση που επιβεβαιωθεί η απουσία της έκφρασης του *Fras1* στο βασικό έλασμα των επιθηλίων στο ενήλικο στάδιο, θα ήταν σκόπιμο να μελετηθούν τα αποτελέσματα της παράτασης της έκφρασης του κατά την ενηλικίωση με την χρήση διαγονιδιακών ζώων.

## I.I Ανάλυση του φαινοτύπου των *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών

Η αποτελεσματικότητα της απενεργοποίησης του ενδογενούς γονιδίου *Fras1* στα *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντίκια διαπιστώθηκε, τόσο με την απουσία μεταγράφων του *Fras1*, όσο και της πρωτεΐνης *Fras1*, σε πειράματα *in situ* υβριδοποίησης και ανοσοεντοπισμού αντίστοιχα. Από την άλλη μεριά πραγματοποιήθηκαν (σε *Fras1*<sup>-/-</sup> έμβρυα) πειράματα ανοσοανίχνευσης της γαλακτοζιδάσης, που περιέχεται στην κασέτα που χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή στόχο για την απενεργοποίηση του *Fras1*, με τα οποία επιβεβαιώθηκε η ένθεση της κασέτας στο ενδογενές γονίδιο.

### I.I.1 Υποεπιδερμικές φουσκάλες (Subepidermal Blisters)

Το κύριο χαρακτηριστικό των *Fras1*<sup>-/-</sup> εμβρύων και των δύο στελεχών που μελετήθηκαν αποτελεί η δημιουργία μεγάλων δερματικών φουσκαλών. Η εκδήλωση του συγκεκριμένου φαινοτύπου ξεκινάει την ημέρα 12.5 της εμβρυογένεσης και προοδευτικά οι φουσκάλες εξελίσσονται από διαφανείς σε κόκκινες. Οι φουσκάλες αυτές εντοπίζονται κυρίως στο κεφάλι, στην περιοχή γύρω από τα μάτια, αλλά και στα άκρα και σπανιότερα στη ράχη των μεταλλαγμένων εμβρύων. Συχνά οι φουσκάλες στα άκρα διατηρούνται και μετά τη γέννηση, για να εξαφανιστούν σταδιακά σε σύντομο χρονικό διάστημα. Αντίθετα δεν έχει παρατηρηθεί ποτέ απομεινάρι εμβρυϊκά προσχηματισμένης φουσκάλας στην περιοχή του κεφαλιού, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι φουσκάλες σ' αυτή τη θέση επιφέρουν

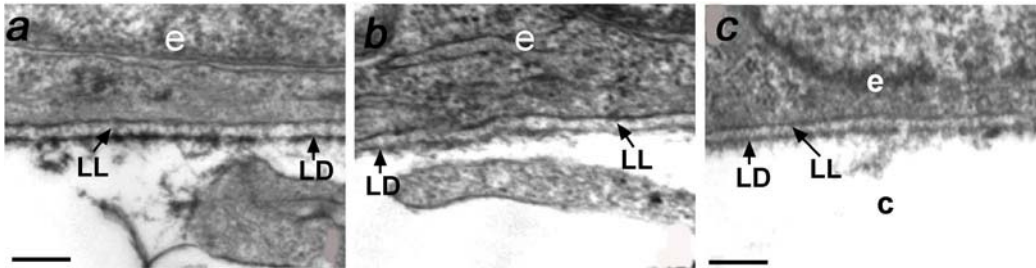
πιθανότητα εμβρυϊκή θνησιμότητα. Από την άλλη μεριά δεν υπάρχει ένδειξη για τη δημιουργία καινούργιων φουσκάλων μετά την γέννηση των μεταλλαγμένων ζώων, υπονοώντας ότι οι συγκεκριμένες παραμορφώσεις αναπτύσσονται μόνο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και κάποιες φορές συντηρούνται για σύντομο χρονικό διάστημα και στα ενήλικα μεταλλαγμένα ποντίκια (μόνο στα άκρα). Η αδυναμία δημιουργίας καινούργιων φουσκάλων στα νεογέννητα ή ενήλικα μεταλλαγμένα ποντίκια, οφείλεται πιθανότατα στην απουσία έκφρασης του γονιδίου *Fras1* στην επιδερμίδα των ενήλικων ποντικών, με αποτέλεσμα το *Fras1* να μπορεί να θεωρηθεί αναπτυξιακό γονίδιο.

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή παρόμοιες φουσκάλες εμφανίζονται σε διάφορες δερματικές ασθένειες του ανθρώπου, οι οποίες προκαλούνται από μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν για συστατικά του βασικού ελάσματος των επιδερμικών επιθηλίων. Από την άλλη μεριά ανάλογες φουσκάλες εντοπίζονται και σε ποντίκια, σαν αποτέλεσμα της απενεργοποίησης αντίστοιχων γονιδίων. Και στις δύο περιπτώσεις οι φουσκάλες επάγονται σε νεογέννητα ή ενήλικα άτομα, ύστερα από την πρόκληση μηχανικών τραυματισμών ή τριβών. Μοναδική μέχρι τώρα εξαίρεση δημιουργίας φουσκάλες στην εμβρυϊκή ηλικία, καταγραμμένη στην βιβλιογραφία όμως περισσότερο σαν ανεπιβεβαίωτη υπόθεση, αποτελεί μία περίπτωση απενεργοποίησης της αλυσίδας  $\alpha 3$  της ιντεγκρίνης, όπου ορισμένα  $\alpha 3^{-/-}$  έμβρυα παρουσιάζουν σπανιότατα ίχνη από “φουσκάλες” πολύ μικρής διαμέτρου προς το τέλος της εμβρυϊκής τους ηλικίας (DiPersio *et al.*, 1997). Αντίθετα η περίπτωση των *Fras1*<sup>-/-</sup> εμβρύων αποτελεί την μοναδική ξεκάθαρη περίπτωση δημιουργίας φουσκάλων αποκλειστικά και μόνο στην εμβρυϊκή ηλικία, εντός της μήτρας (utero), όπου οι τριβές είναι ελάχιστες.

Στις γνωστές περιπτώσεις δερματικών ασθενειών που χαρακτηρίζονται από φουσκάλες, οι διαταραχές στη σύσταση των βασικών ελασμάτων της επιδερμίδας εξαιτίας της έλλειψης κάποιων συστατικών τους προκαλούν την ευπάθεια του δέρματος σε τριβές ή ακόμα και σε ήπιους μηχανικούς τραυματισμούς και την αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα. Το αποτέλεσμα των ερεθισμάτων αυτών είναι η έναρξη φλεγμονώδους αντίδρασης (inflammation) και η απελευθέρωση τοπικά σηματοδοτικών μορίων, κυρίως από τα κύτταρα του συνδετικού ιστού, αλλά και από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος (complement activation). Τα μόρια αυτά επιδρούν στα γειτονικά τριχοειδή της δερμίδας και αναγκάζουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα που τα αποτελούν να χάσουν τη συνεκτικότητα τους, ενώ αυξάνουν ταυτόχρονα την ικανότητα των λευκοκυττάρων που κυκλοφορούν στο αίμα για προσκόλληση στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Κατά συνέπεια τόσο το πλάσμα του αίματος, όσο και τα λευκοκύτταρα διαπερνούν τα ενδοθήλια και μεταναστεύουν στην προβληματική περιοχή προκαλώντας τη δημιουργία φουσκάλας (Bruckner-Tuderman Leena, 1999; Chan LS, 1997; Leino Tomi, 2000). Πολύ σπάνια μεταναστεύουν στην περιοχή αυτή και ερυθρά αιμοσφαίρια, με αποτέλεσμα οι φουσκάλες να αποκτούν κόκκινο χρώμα.

Η παρουσία ελάχιστης ποσότητας αίματος στις φουσκάλες αυτές σε σχέση με τις μεγάλες αιμορραγικές φουσκάλες που χαρακτηρίζουν τα *Fras1*<sup>-/-</sup> έμβρυα, χαρακτηρίζει **α)** τα ποντίκια Col VII<sup>-/-</sup> ποντίκια (Heinonen Seppo *et al.*, 1999), **β)** τα ποντίκια  $\beta 4^{-/-}$  στα οποία εκφράζεται εκτοπικά η αλυσίδα  $\beta 4$  της ιντεγκρίνης στα τριχωτά επιθήλια της επιδερμίδας (Van der Neut R *et al.*, 1999) και **γ)** τα ποντίκια στα οποία πραγματοποιήθηκε η απενεργοποίηση της αλυσίδας  $\alpha 3$  της ιντεγκρίνης (Hodivala-Dilke KM *et al.*, 1998) ή **δ)** της αλυσίδας  $\alpha 3$  της λαμινίνης 5 (Ryan Maureen C *et al.*, 1999 ; Van der Neut R *et al.*, 1999). Στην περίπτωση της απενεργοποίησης του κολλαγόνου VII (Col VII) οι φουσκάλες εντοπίζονται με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στο επίπεδο της Sub Lamina densa, με αποτέλεσμα η παρουσία αίματος στο εσωτερικό τους να μπορεί να εξηγηθεί με την διάρρηξη των λεπτών αιμοφόρων αγγείων που εντοπίζονται στα όρια επιδερμίδας δερμίδας από την πίεση της φουσκάλας. Στην δεύτερη περίπτωση η εμφάνιση αιμορραγικών φουσκάλων στις παλάμες και στα πέλματα, είτε στην περιοχή της Lamina lucida, είτε ενδοεπιδερμικά (intraepidermal split), πιστεύεται ότι οφείλεται στην αυξημένη πίεση που προκαλείται στα όρια μεταξύ των περιοχών με υψηλή και χαμηλή έκφραση της αλυσίδας  $\beta 4$  (δηλαδή στα σύνορα των τριχωτών και των μη τριχωτών τμημάτων αντίστοιχα). Η πίεση αυτή οδηγεί σε διαταραχή του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας σε πιο βαθιά στρώματα κοντά στη δερμίδα και επομένως σε ρήξεις και στα τριχοειδή αιμοφόρα αγγεία της. Τα  $\alpha 3\beta 1^{-/-}$  ποντίκια παρουσιάζουν σπανιότατα πολύ μικρές φουσκάλες με ίχνη αίματος, ενώ στα LAMA3<sup>-/-</sup> ποντίκια η αιμορραγία πολλές φορές προηγείται της δημιουργίας φουσκάλας. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η επαγωγή της αιμορραγίας λόγω ανωμαλιών στην έκφραση της λαμινίνης 5, δεν οφείλεται στη διαταραχή του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, αλλά πιθανότατα στην παραγωγή ελαττωματικών τριμερών όπως η λαμινίνη 6 ή 7. Προκειμένου να διαλευκανθεί η διαφορετικότητα των φουσκάλων στα *Fras1*<sup>-/-</sup> έμβρυα, πραγματοποιήθηκε μοριακή

ανάλυση του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας τους. Μ' αυτόν τον τρόπο διαπιστώθηκε ότι η απουσία του *Fras1* έχει σαν αποτέλεσμα την ελαφρά εξασθένηση της έκφρασης ορισμένων από τους μάρτυρες του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα της λαμινίνης-α5 (Laminin-α5), της λαμινίνης-γ1 (Laminin-γ1), του νιδογόνου-1 (Nidogen-1), τα οποία αποτελούν συστατικά της Lamina Lucida και της Lamina densa, αλλά και του κολλαγόνου VII (Col VII) που αποτελεί τον χαρακτηριστικότερο μάρτυρα της Sub Lamina densa. Οι παραπάνω διαπιστώσεις υποδηλώνουν ότι δεν εντοπίζονται προβλήματα σοβαρής διάρρηξης στο βασικό έλασμα της επιδερμίδας των *Fras1*<sup>-/-</sup> εμβρύων (τουλάχιστον σε μη προβληματικές περιοχές). Πράγματι με βάση παρατηρήσεις σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τομών επιδερμίδας αγρίου τύπου και *Fras1*<sup>-/-</sup> εμβρύων (σε μη προβληματικές περιοχές) (που έγιναν με τη βοήθεια του Καθ. Β. Γαλανόπουλου), διαπιστώθηκε ότι οι ζώνες του βασικού ελάσματος της Lamina Lucida και της Lamina densa διατηρούνται στα *Fras1*<sup>-/-</sup> έμβρυα, αν και παρουσιάζονται ελαφρώς λεπτότερες (εικ. 3a, b).



### Εικ. 3: Εξέταση με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM) του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας εμβρύων αγρίου τύπου και *Fras1*<sup>-/-</sup>

Ανάλυση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης σε επιμήκεις κρουτομές εμβρύων αγρίου τύπου (a) και *Fras1*<sup>-/-</sup> (b, c) ημέρας 15.5, από συγκρίσιμες περιοχές της επιδερμίδας, της ραχιαίας τους πλευράς, στο επίπεδο των νεφρών (και από μη προβληματικές περιοχές στην περίπτωση των μεταλλαγμένων εμβρύων *Fras1*<sup>-/-</sup>) (a, b) καθώς και από περιοχές της επιδερμίδας στην οροφή φουσκάλας που δημιουργείται γύρω από το μάτι ενός μεταλλαγμένου εμβρύου *Fras1*<sup>-/-</sup> (c). Τα βέλη υποδεικνύουν τη Lamina Lucida και την Lamina Densa. Οι ζώνες της Lamina Lucida και της Lamina Densa διατηρούνται, αν και ελαφρώς ασθενέστερες, σε μη προβληματικές περιοχές της επιδερμίδας *Fras1*<sup>-/-</sup> εμβρύων (b), σε σχέση με τις αντίστοιχες ζώνες σε συγκρίσιμες περιοχές της επιδερμίδας εμβρύων αγρίου τύπου (a). Στην περίπτωση φουσκάλας σε *Fras1*<sup>-/-</sup> έμβρυο, οι ζώνες της Lamina Lucida και της Lamina Densa τοποθετούνται κάτω από το αποχωριζόμενο από τη δερμίδα επιθήλιο της επιδερμίδας, στην οροφή της φουσκάλας (c).

Συντομεύσεις: e;epidermis (επιδερμίδα), c;blister cavity (κοιλότητα της φουσκάλας), LL;Lamina Lucida (φωτεινός υμέντας), LD;Lamina Densa (σκοτεινός υμέντας). Η κλίμακα μέτρησης είναι 300nm.

Οι ελαφρώς ασθενέστερες ζώνες της Lamina Lucida και της Lamina Densa στα *Fras1*<sup>-/-</sup> έμβρυα, συμβαδίζουν με την παρατηρούμενη μείωση στην αντιγονικότητα των μαρτύρων αυτών των ζωνών του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας. Μελλοντικά θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί λεπτομερέστερα με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και η μορφολογία των χαρακτηριστικών δομών του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας στα *Fras1*<sup>-/-</sup> έμβρυα, όπως των ενδιάμεσων νηματίων κερατίνης, των ημιδεσμοσωμάτων, των νηματίων και των ινιδίων αγκυροβόλησης (anchoring fibrils).

Από την άλλη μεριά το κολλαγόνο VI (Col VI), το οποίο παράγεται φυσιολογικά από τα κύτταρα του συνδετικού ιστού της δερμίδας και εντοπίζεται τόσο στο συνδετικό ιστό αλλά και στη δερμική πλευρά του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας (συγκεκριμένα εντοπίζεται στο στρώμα της Sub Lamina densa, συμβάλλοντας στη σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης της επιδερμίδας με τον υποκείμενο συνδετικό ιστό), στα *Fras1*<sup>-/-</sup> έμβρυα απουσιάζει από το βασικό έλασμα και ανιχνεύεται μόνο στη δερμίδα. Η εξαφάνιση του κολλαγόνου VI (Col VI) από το στρώμα του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας στα *Fras1*<sup>-/-</sup> έμβρυα, μπορεί να οφείλεται στην μειωμένη παρουσία των μακρομορίων που συνιστούν το βασικό αυτό έλασμα, όπως διαφαίνεται τόσο από την μειωμένη αντιγονικότητα τους, όσο και από τα πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.



Κατά συνέπεια η επακόλουθη εξασθένηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών των μακρομορίων, θα μπορούσε να συμβάλλει στην αποδυνάμωση της κατακράτησης και του Col VI στο βασικό έλασμα της επιδερμίδας.

Εναλλακτικά το Col VI ενδέχεται να αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη Fras1 και μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης να συγκρατείται στη δερμική πλευρά του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι τόσο το κολλαγόνο V (Col V), όσο και το Col VI, αλληλεπιδρούν *in vitro* με την κεντρική μη σφαιρική περιοχή της NG2 (Tillet *et al.*, 1997), η οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί παρουσιάζει ομολογία με την μεσαία περιοχή της Fras1. Σύμφωνα με την παραπάνω υπόθεση η απουσία της Fras1 στα *Fras1<sup>-/-</sup>* έμβρυα, οδηγεί στην κατάργηση της σύνδεσης των μορίων αυτών, στην διάχυση του Col VI και στην απομάκρυνση του από την περιοχή της Sub Lamina densa.

Όσον αφορά τον καθορισμό του επιπέδου του δέρματος εντός του οποίου πραγματοποιείται η αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα κατά τη δημιουργία της φουσκάλας, διαπιστώθηκε ότι τόσο η λαμινίνη-α5 (Laminin-α5), το νιδογόνο-1 (Nidogen-1), η λαμινίνη-γ1 (Laminin-γ1) και η αγκρίνη (Agrin), που αποτελούν συστατικά της Lamina Lucida και της Lamina Densa του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, υπόκεινται του επιδερμικού επιθηλίου που αποχωρίζεται από την δερμίδα και βρίσκονται στην οροφή της δημιουργούμενης φουσκάλας. Ταυτόχρονα με ιστολογική χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη του αποχωριζόμενου επιδερμικού επιθηλίου και της οροφής της φουσκάλας, διαπιστώθηκε ότι η κοιλότητα της φουσκάλας περιβάλλεται στην οροφή της μόνο από επιθηλιακά κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι ο αποχωρισμός δερμίδας επιδερμίδας λαμβάνει χώρα εντός του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας. Για τη λεπτομερέστερη οριοθέτηση της φουσκάλας θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι πρωτεϊνικοί μάρτυρες του βασικού επιδερμικού ελάσματος, όπως το Col IV και το Col VII. Συγκεκριμένα το κολλαγόνο VII (Col VII) αποτελεί τον κυριότερο πρωτεϊνικό μάρτυρα της Sub Lamina densa και το κύριο συστατικό των ινιδίων αγκυροβόλησης, με αποτέλεσμα η ανίχνευση του στην οροφή ή στο δάπεδο της φουσκάλας να είναι καθοριστική. Δυστυχώς όμως η προσπάθεια εντοπισμού του στάθηκε αδύνατη. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι η απουσία ενός συστατικού του βασικού ελάσματος, όπως του Col VII, από το βασικό έλασμα της επιδερμίδας σε περιοχές με φουσκάλες στα *Fras1<sup>-/-</sup>* έμβρυα, δεν οφείλεται απαραίτητα στο ότι διαχέεται στο ελαφρά αποδιοργανωμένο βασικό έλασμα. Εναλλακτικά μπορεί να σημαίνει ότι παύει να εκφράζεται από τα κύτταρα από τα οποία παράγεται φυσιολογικά, λόγω διαταραχών που προκαλούνται σε αυτά από την αποκόλληση δερμίδας επιδερμίδας (στην περίπτωση του Col VII τα κύτταρα που το εκφράζουν είναι κυρίως τα επιθηλιακά και λιγότερο τα μεσεγγυματικά της υποκείμενης δερμίδας).

Παρόλα αυτά η χαρτογράφηση της φουσκάλας στα *Fras1<sup>-/-</sup>* έμβρυα έγινε με την πραγματοποίηση αναλύσεων ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (με τη βοήθεια του Κ. Β. Γαλανόπουλου), στην περιοχή του αποκομμένου από τη δερμίδα επιδερμικού επιθηλίου εξαιτίας της δημιουργίας φουσκάλας. Με τις μελέτες αυτές διαπιστώθηκε ότι οι ζώνες της Lamina Lucida και της Lamina Densa του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, ακολουθούν το αποσπασμένο επιδερμικό επιθήλιο και εντοπίζονται στην οροφή της φουσκάλας (εικ. 3c). Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι το επίπεδο αποκόλλησης του ιστού στα *Fras1<sup>-/-</sup>* έμβρυα πραγματοποιείται κάτω από τη Lamina Densa, με αποτέλεσμα οι φουσκάλες που δημιουργούνται να χαρακτηρίζονται υποεπιδερμικές (Sub epidermal).

Από τα παραπάνω και σε συνδυασμό με τον κυτταρικό της εντοπισμό προκύπτει ότι η Fras1 αποτελεί ένα καινούργιο συστατικό του εξωκυττάριου χώρου των επιθηλίων, το οποίο συνεισφέρει στο να δημιουργηθεί το απαραίτητο δομικό ικρίωμα για την συνάθροιση, ορισμένων τουλάχιστον, συστατικών του κατώτερου στρώματος του βασικού ελάσματος (π.χ Col VI) της επιδερμίδας. Κατά συνέπεια η απουσία της Fras1 στα *Fras1<sup>-/-</sup>* έμβρυα, επηρεάζει καθοριστικά την σύνδεση της επιδερμίδας με τη δερμίδα μετά το στρώμα της Lamina Densa, οδηγώντας στην αποκόλληση του επιδερμικού επιθηλίου από την υποκείμενη δερμίδα και στη δημιουργία φουσκάλων εντός της Sub Lamina densa (υποεπιδερμικές φουσκάλες).

Πιο συγκεκριμένα οι επαγόμενες φουσκάλες στα *Fras1<sup>-/-</sup>* έμβρυα, είναι πιθανότατα αποτέλεσμα ενός συνδυασμού γεγονότων που περιλαμβάνουν, την ευθραυστότητα που παρουσιάζουν τα επιδερμικά τους επιθήλια και την πρόκληση μηχανικών τριβών στο κεφάλι και στα άκρα λόγω της συχνής επαφής αυτών των ιστών με το τοίχωμα της μήτρας.

Σημειώνεται ότι οι αιμορραγικές φουσκάλες στην περίπτωση απουσίας του *Fras1*, μπορούν να εξηγηθούν από την παρατηρούμενη, όπως αναφέρθηκε, διαταραχή στη δερμική πλευρά του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας και στην επακόλουθη αποσταθεροποίηση της. Η μείωση της συνοχής της επιδερμίδας με τη δερμίδα προκαλεί σε κάποιες περιοχές (συγκεκριμένα στα άκρα και

στο κεφάλι, λόγω των επαφών τους με τα τοιχώματα της μήτρας), την αποκόλληση του κατώτερου στρώματος του βασικού της ελάσματος από την δερμίδα. Κατά συνέπεια δημιουργούνται ρήξεις και στα βαθύτερα στρώματα της δερμίδας, ενώ είναι δυνατόν να προκληθεί χαλάρωση και διάσπαση των απολήξεων των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων που εντοπίζονται στα όρια δερμίδας επιδερμίδας. Σαν φυσικό επόμενο πραγματοποιείται αρχικά απελευθέρωση υγρού πλάσματος και στη συνέχεια λαμβάνει χώρα τοπική εκτόνωση του φαινομένου στο σημείο στο οποίο έχει συμβεί η αποκόλληση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διάφανης φουσκάλας. Με την πάροδο του χρόνου η χαλάρωση των τριχοειδών απολήξεων μεγαλώνει όλο και περισσότερο και εισρέουν στη φουσκάλα και ερυθρά αιμοσφαίρια, τα οποία της προσδίδουν το κόκκινο χρώμα της.

Με τα υπάρχοντα δεδομένα από το φαινότυπο και από τη μοριακή ανάλυση του επιδερμικού βασικού ελάσματος των *Fras1*<sup>-/-</sup> εμβρύων, μπορεί να διατυπωθεί ένα μοντέλο στο οποίο η πρωτεΐνη *Fras1* είναι μια εξωκυττάρια πρωτεΐνη, που εντοπίζεται στη δερμική πλευρά της επιδερμίδας και αλληλεπιδρά είτε άμεσα είτε έμμεσα με το Col VI. Επιβάλλεται όμως να διαλευκανθεί αν η *Fras1* είναι διαμεμβρανική ή εκκρινόμενη, το στρώμα του βασικού ελάσματος στο οποίο τοποθετείται, καθώς και να εξακριβωθεί ο τρόπος που αλληλεπιδρά με άλλα συστατικά του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, όπως το Col VI.

Συμπερασματικά, δεδομένου ότι η *Fras1* εντοπίζεται στον εξωκυττάριο χώρο πολλών επιθηλιακών κυττάρων, θα μπορούσε να συμβάλλει εκτός από τη σταθερότητα του επιδερμικού βασικού ελάσματος και στη διατήρηση της συνοχής και άλλων επιθηλιακών βασικών ελασμάτων.

## **I.1.2 Συμμετοχή του *Fras1* στη διαδικασία της οργανογένεσης και σε παθολογικές διαδικασίες**

Η απουσία της *Fras1* επηρεάζει εκτός από το δέρμα και διάφορα άλλα εσωτερικά όργανα. Για να κατανοηθεί ο τρόπος με τον οποίο το *Fras1*, ως συστατικό του εξωκυττάρια χώρου των επιθηλίων, θα μπορούσε να συμμετέχει στη διαδικασία της οργανογένεσης, αναφέρονται αναλυτικά οι παρακάτω πληροφορίες.

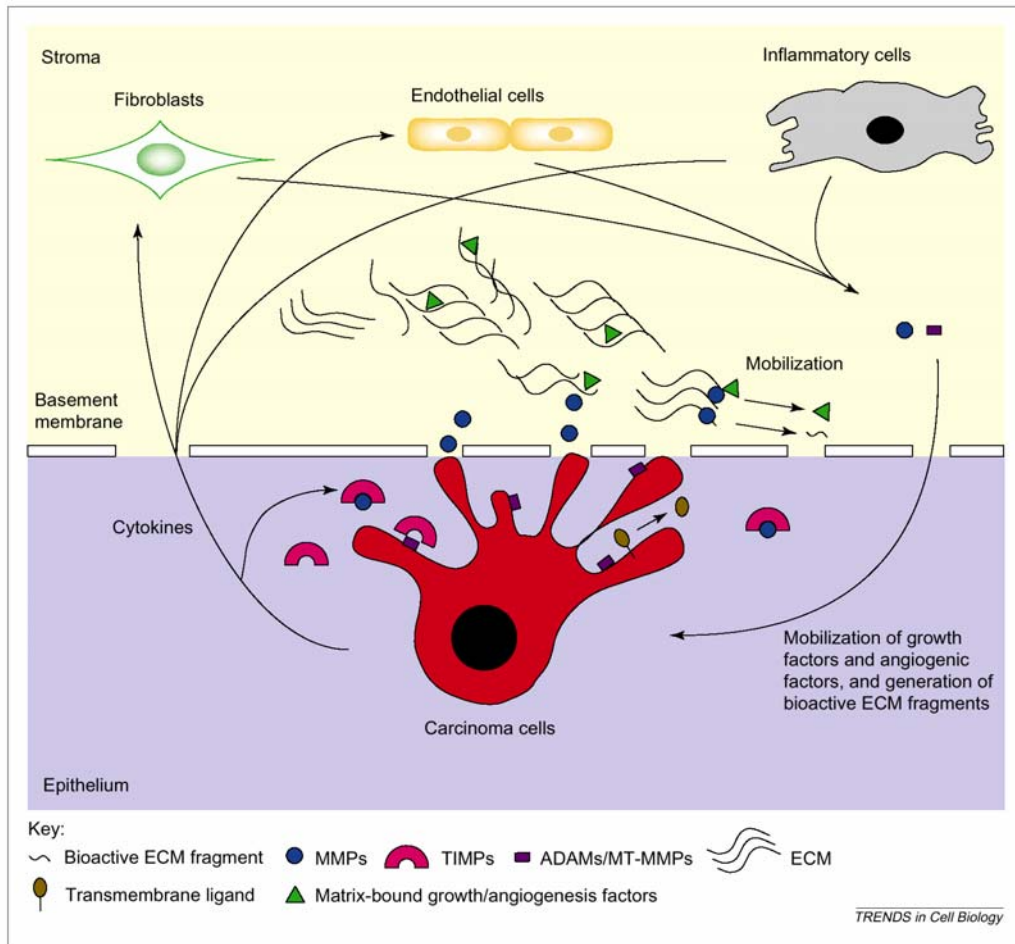
### **I.1.2.α Διαμόρφωση και αναδιαμόρφωση του βασικού ελάσματος**

Τόσο κατά την ανάπτυξη, όσο και κατά την διαφοροποίηση αλλά και στην περίπτωση του καρκίνου, διαδικασίες όπως της οργανογένεσης, της επούλωσης των πληγών, της αγγειογένεσης, της απόφυσης των νευρικών αξόνων και γενικότερα της κυτταρικής μετακίνησης αλλά και της καρκινικής μετάστασης, προϋποθέτουν την προσπέλαση του βασικού ελάσματος και γενικότερα του εξωκυττάρια περιβάλλοντος διαφόρων ιστών, υποθάλλοντας ταυτόχρονα και την αναδιάρθρωση των ιστών. Η διείσδυση ενός εξωκυττάρια χώρου από διάφορες κατηγορίες ιστών, υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι μία ελεγχόμενη διαδικασία και ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες που ωθούν ορισμένα κύτταρα στην εισβολή εξωκυττάρια χώρων. Συγκεκριμένα η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται μέσω της δράσης κατάλληλων πρωτεασών, οι οποίες με τη σειρά τους χαρακτηρίζονται από ρυθμιζόμενη ενεργοποίηση και δράση. Στην κατηγορία των πρωτεασών που διασπούν την εξωκυττάρια ουσία ανήκουν οι πρωτεάσες σερίνης, κυστεΐνης και οι μεταλλοπρωτεάσες. Οι μεταλλοπρωτεάσες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τις μεταλλοπρωτεάσες μήτρας (matrix metalloproteases, MMPs) και τις μεταλλοπρωτεάσες με περιοχές ιντεγκρινών (membrane type metalloproteases-disintegrins, ADAMs/MT-MMPs). Οι MMPs περιλαμβάνουν μία οικογένεια 20 ενζύμων, που δυνητικά είναι ικανά να πρωτεολύσουν (παρουσία ψευδαργύρου ή ασβεστίου) όλα τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, παρουσιάζοντας όμως το κάθε ένα εξειδίκευση υποστρώματος. Από την άλλη μεριά, οι ADAMs/MT-MMPs είναι διαμεμβρανικές πρωτεάσες με ιδιότητες κυτταρικής προσκόλλησης, που τους προσδίδουν μία πιο περιορισμένη δράση. Ταυτόχρονα η ύπαρξη ειδικών ρυθμιζόμενων αναστολέων για τις παραπάνω πρωτεάσες (tissue inhibitors of metalloproteases, TIMPs), συμβάλλει στον έλεγχο της δράσης των πρωτεασών και επομένως στην ελεγχόμενη τροποποίηση της εξωκυττάριας ουσίας (Chang Chieh and Werb Zena, 2001).

Η δράση των μεταλλοπρωτεασών στις παραπάνω διαδικασίες δεν αφορά μόνο την διάσπαση εξωκυττάρια πρωτεϊνικών παραγόντων, αλλά και την απελευθέρωση και ταυτόχρονη ενεργοποίηση διαμεμβρανικών μορίων ή μορίων συνδεδεμένων με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας (π.χ αυξητικών παραγόντων), συμβάλλοντας μ' αυτόν τον τρόπο στη διαθεσιμότητα τους και σε πιο απομακρυσμένους ιστούς. Επιπρόσθετα οι μεταλλοπρωτεάσες είναι ικανές να απενεργοποιήσουν διαμεμβρανικούς υποδοχείς, αποκόπτοντας τους από τις πλασματικές

μεμβράνες και αναστέλλοντας τη μετάδοση σήματος στο εσωτερικό των κυττάρων (απενεργοποίηση των αντίστοιχων ενδοκυτταρικών μονοπατιών) (Vu TH, 2001; Chang Chieh and Werb Zena, 2001).

Στην περίπτωση του καρκίνου η δράση των μεταλλοπρωτεασών είναι ανεξέλεγκτη και συμβάλλει στην επιδείνωση του καρκινικού φαινομένου. Συγκεκριμένα στην περίπτωση επιθηλιακών καρκινωμάτων, απελευθερώνονται διάφορες ουσίες (χυμοκίνες, κυτοκίνες, και επαγωγείς μεταλλοπρωτεασών—Extracellular Matrix MetalloPRotease Inducer, EMMPRIN), οι οποίες προκαλούν την απελευθέρωση μεταλλοπρωτεασών από κύτταρα του συνδετικού ιστού (ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, φλεγμονώδη κύτταρα). Οι ουσίες αυτές διασπούν εξωκυττάρια πρωτεΐνες, αποδεσμεύοντας συχνότατα ενεργά εξωκυτταρικά πρωτεϊνικά κομμάτια, καθώς και τις πρωτεΐνες του βασικού ελάσματος. Ταυτόχρονα απελευθερώνουν και κινητοποιούν αυξητικούς και αγγειογενετικούς παράγοντες, οι οποίοι είναι εγκλωβισμένοι στην εξωκυττάρια ουσία, καθώς και διαμεμβρανικούς δεσμευτές, που προάγουν τον πολλαπλασιασμό και την αγγείωση του όγκου. Η δράση αναστολέων των πρωτεασών (TIMPs), οι οποίοι παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα, περιορίζει τη δράση των μεταλλοπρωτεασών στην επίμαχη εξωκυττάρια περιοχή και καθορίζει τόσο τον τόπο όσο και τον χρόνο της μετάστασης (εικ. 4).



**Εικ. 4:** Αλληλεπίδραση μεσεγχυματικών κυττάρων του στρώματος (συνδετικός ιστός) με κακοήγη επιθηλιακά κύτταρα για την διάρρηξη του βασικού τους ελάσματος από μεταλλοπρωτεάσες

Αξίζει να σημειωθεί ότι το εξωκυττάριο περιβάλλον είναι τόσο σημαντικό όσο και το ενδοκυττάριο για την καρκινική εκδήλωση και ταυτόχρονα, εξασφαλίζοντας την διατήρηση ορισμένων σηματοδοτικών μορίων, όπως αυξητικών παραγόντων, στην σωστή τους θέση (δηλαδή έχοντας ανάλογη δράση όπως και σε φυσιολογικές συνθήκες), συμβάλλει στη διατήρηση και στην εξέλιξη της καρκινογένεσης. Στην περίπτωση αντικατάστασης του παθολογικού εξωκυτταρίου περιβάλλοντος ενός καρκινώματος από φυσιολογικό, είναι δυνατή η αναστροφή της κακοήθειας του όγκου, γεγονός που επιβεβαιώνει την αποφασιστική επίδρασή του στην εξέλιξη της καρκινογένεσης. Επιπρόσθετα όπως ο εξωκυτταριος χώρος ενός αναπτυσσόμενου οργάνου μεταβάλλεται διαρκώς, συμβάλλοντας στη στήριξη, στη παροχή κατάλληλων πληροφοριών και στη προστασία του συγκεκριμένου ιστού, έτσι και το εξωκυττάριο περιβάλλον ενός όγκου στην διάρκεια της καρκινογένεσης χαρακτηρίζεται από μεταβολές στη σύσταση και στη δομή του (Bissell Mina J. and Radisky Derek, 2001; Hood John D. and Cheresch David, 2002).

## Ι.Ι.2.β Οργανογένεση και επιθήλιο-μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις

Η ανάπτυξη ενός οργανισμού βασίζεται στις αμοιβαίες επαγωγικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων ή ιστών αλλά και στις αλληλεπιδράσεις αυτών με την εξωκυττάρια ουσία. Το σύνολο των παραπάνω αλληλεπιδράσεων εξασφαλίζει τις απαραίτητες πληροφορίες για τον τελικό σχηματισμό των οργάνων.

Γενικότερα η διαδικασία της οργανογένεσης περιλαμβάνει τρία θεμελιώδη στάδια:

**α)** Το στάδιο της έναρξης, κατά το οποίο παρέχεται η πληροφορία για να αρχίσει η διαδικασία σχηματισμού του εκάστοτε οργάνου στην σωστή θέση και την κατάλληλη χρονική στιγμή.

**β)** Το στάδιο της μορφογένεσης, όπου τα καθορισμένα κύτταρα σχηματίζουν ένα υποτυπώδες όργανο.

**γ)** Το στάδιο της διαφοροποίησης, στο οποίο δημιουργούνται οι ειδικές δομές του οργάνου.

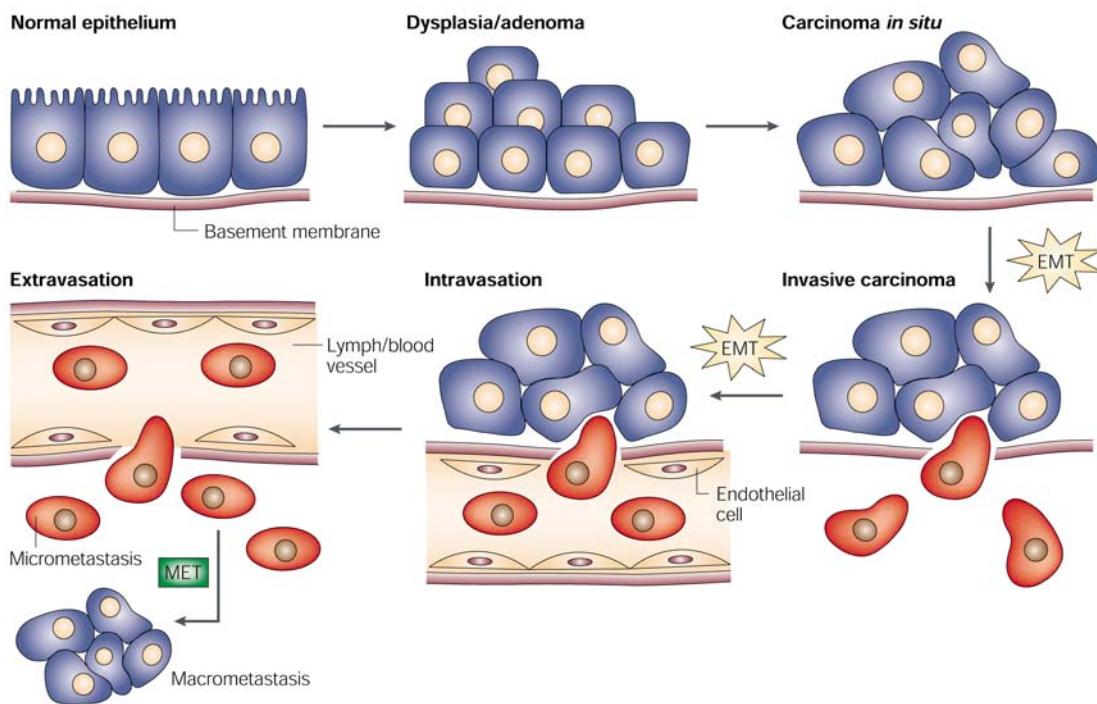
Η διαδικασία της μορφογένεσης στους πολυκύτταρους οργανισμούς διέπεται από τον συντηρημένο μηχανισμό της επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT). Η μετάβαση αυτή αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της πρώιμης εμβρυογένεσης, όπου για παράδειγμα στην περίπτωση των σπονδυλωτών, συμβάλλει στην υπέρβαση του σταδίου της βλάστουλας και στη δημιουργία των τριών στρώσεων του εμβρύου κατά τη γαστριδίωση. Γενικότερα η δημιουργία μεσεγχυματικών κυττάρων (μη συνδεδεμένα κύτταρα, αραιά τοποθετημένα στην εξωκυττάρια ουσία και ικανά για μετακίνηση) από ένα πρωτόγονο επιθήλιο χαρακτηρίζει την ανάπτυξη στα περισσότερα μετάζωα. Ο μηχανισμός της EMT είναι απαραίτητος και στις ιστογενετικές διαδικασίες των σπονδυλωτών, όπως ο σχηματισμός της καρδιάς, του μυϊκοσκελετικού συστήματος, αρκετών κраниοπροσωπικών δομών και του περιφερικού νευρικού συστήματος. Στην περίπτωση των νεφρών συντελείται η αντίστροφη διαδικασία της μεσεγγυμο-επιθηλιακής μετάβασης (Mesenchymal Epithelial Transition, MET), η οποία στην περίπτωση σχηματισμού των σωματιών και της καρδιάς εναλλάσσεται με την επιθήλιο-μεσεγγυματική μετάβαση.

Κατά την επιθήλιο-μεσεγγυματική και μεσεγγυμο-επιθηλιακή μεταμόρφωση, λαμβάνει χώρα μετατροπή επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγγυματικά και μεσεγγυματικών σε επιθηλιακά αντίστοιχα, με ταυτόχρονη διάρρηξη ή δημιουργία βασικού ελάσματος και γενικότερα τροποποίηση της σύστασης και της δομής του εξωκυτταρίου περιβάλλοντος. Οι μεταβολές της εξωκυτταρίας ουσίας επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις της με τα περιβάλλοντα κύτταρα και είναι απαραίτητες τόσο για την μεταμόρφωσή τους, όσο και για τη διατήρηση της καινούργιας υπόστασης των κυττάρων.

Η διαδικασία της επιθήλιο-μεσεγγυματικής και της μεσεγγυμο-επιθηλιακής μετάβασης σε συνδυασμό με την διάσπαση ή τη δημιουργία βασικών ελασμάτων, αποτελούν δυναμικούς μηχανισμούς έναρξης και εξέλιξης της καρκινογένεσης (Arias AM, 2001; Boudreau N, Bissell MJ, 1998). Σαν παράδειγμα αναφέρεται η πρόκληση επιθηλιακών δυσπλασιών ή αδενωμάτων που εξελίσσονται σε μεταστατικά καρκινώματα. Αρχικά παρατηρείται ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των επιθηλιακών κυττάρων και στη συνέχεια σταδιακή μετατροπή τους, μέσω επιγενετικών αλλαγών ή γενετικών τροποποιήσεων, σε καρκινώματα *in situ*. Πρόσθετες τροποποιήσεις των καρκινωμάτων, μέσω του μηχανισμού της επιθήλιο-μεσεγγυματικής μεταμόρφωσης (EMT) που τους επιφέρει μεσεγγυματικές ιδιότητες, τα τροποποιεί σε μεταστατικά (invasive carcinoma). Συγκεκριμένα ύστερα από επαγωγή της διάρρηξης του βασικού ελάσματος που περιβάλλει το καρκίνωμα, επιτυγχάνεται τοπική διασπορά των καρκινικών κυττάρων και μετανάστευσή τους στο αίμα ή στη λέμφο. Το πέρασμα στην αγγειακή ή λεμφική κυκλοφορία (intravasation) προϋποθέτει

ταυτόχρονα τη διατάραξη του βασικού ελάσματος των αγγείων ή της εξωκυττάριας ουσίας των λεμφοκυττάρων και επιτυγχάνεται μέσω της δράσης παραγόντων που ελευθερώνονται από το καρκίνωμα. Μ' αυτόν τον τρόπο ο όγκος μεταφέρεται σε πιο απομακρυσμένες θέσεις και ύστερα από την έξοδο του από την κυκλοφορία (extravasation) προσβάλλει άλλους ιστούς, εισβάλλοντας στον εξωκυττάριο χώρο τους και διαπερνώντας σε ορισμένες περιπτώσεις ιστών και το σχηματισμό του βασικού τους ελάσματος. Στις δευτερογενείς αυτές θέσεις τα καρκινικά κύτταρα είτε παραμένουν μόνα τους (micrometastasis), είτε οργανώνονται σε νέα καρκινώματα που περιβάλλονται από το δικό τους εξειδικευμένο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Η διαδικασία αυτή εξασφαλίζεται μέσω της μεσεγγυμοεπιθηλιακής μετάβασης (MET) των καρκινικών κυττάρων και τη δημιουργία βασικού ελάσματος (macrometastasis) (Thiery Jean Paul, 2002) (εικ. 5).

Το *Fras1* επομένως είτε ως συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας των επιθηλίων, με δομικό ή/και λειτουργικό ρόλο, είτε ως μόριο διαμόρφωσης της (π.χ μεταλλοπρωτεάση), θα μπορούσε να ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιθηλίων ή του επιθηλίου-μεσεγγύματος, που είναι απαραίτητες διαδικασίες τόσο στην οργανογένεση όσο και σε άλλες λειτουργίες (φυσιολογικές ή παθογενετικές) του οργανισμού κατά την ανάπτυξη και την ενηλικίωση.



**Εικ. 5: EMT και MET στην καρκινική εμφάνιση και εξέλιξη**

### 1.1.2.γ Ανάπτυξη των νεφρών

Όπως αναφέρθηκε, τα *Fras1*<sup>-/-</sup> έμβρυα και των δύο στελεχών που μελετήθηκαν, αλλά και τα ενήλικα ομόζυγα μεταλλάγματα, χαρακτηρίζονται από νεφρικές ανωμαλίες. Πριν αναφερθούν οι πιθανές αιτίες δημιουργίας του συγκεκριμένου φαινοτύπου παραθέτονται ορισμένες πληροφορίες για την οργανογένεση των νεφρών.

Στο αρχικό στάδιο της ανάπτυξης τους όλα τα όργανα παρουσιάζουν ένα παρόμοιο αρχέγονο πρότυπο που αποτελείται από ένα επιθηλιακό εκβλάστημα και το γειτονικό του μεσέγγυμα. Η τελική μορφή κάθε οργάνου εξαρτάται από το πρότυπο διακλάδωσης του πρωτογενούς επιθηλίου και από τον ρυθμό πολλαπλασιασμού του, που καθορίζονται μέσω σηματοδότησης από το γειτονικό μεσέγγυμα, το οποίο τελικά κατευθύνει την επιθηλιακή διαφοροποίηση. Η διακλάδωση του επιθηλίου περιλαμβάνει τέσσερα επαναλαμβανόμενα στάδια, την ανάκυψη του εκβλαστήματος, τον καθορισμό του προσανατολισμού του, την επιμήκυνση του και την τελική του διαφοροποίηση. Σε

μερικά όργανα, όπως στα νεφρά η διαδικασία της επιθηλιακής διακλάδωσης ενέχει και τους μηχανισμούς της κυτταρικής μετακίνησης και σύντηξης.

Η ανάπτυξη των νεφρών στα θηλαστικά περιλαμβάνει τρεις διαδοχικούς εκκριτικούς σχηματισμούς, που προέρχονται από το ενδιάμεσο μεσόδερμα. Αυτοί είναι ο προνεφρός χωρίς λειτουργικό ρόλο στο έμβρυο, ο μεσонеφρός με εκκριτική λειτουργία κατά την εμβρυογένεση και ο τελικός νεφρός ή μετανεφρός. Και τα τρία αυτά όργανα μοιράζονται κοινά τμήματα και αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας συντηρημένα μοριακά μονοπάτια.

Η ανάπτυξη του μετανεφρού στα θηλαστικά ξεκινάει με την επαγωγή του ουρητηρικού εκβλαστήματος (ureteric bud) από τον σωλήνα Wolffian (μεσонеφρικός σωλήνας, mesonephric duct), που προέρχεται από το μεσонеφρό (ενδιάμεσο μεσόδερμα). Συγκεκριμένα το θεωρούμενο μετανεφρικό μεσέγγυμα (metanephric mesenchyme, blastema) ύστερα από άγνωστη διαδικασία προκαθορισμού του, παράγει τον παράγοντα GDNF (Glial cell Derived Neurotrophic Factor, Νευροτροφικός παράγοντας που παράγεται από τα νευρογλοιακά κύτταρα), ο οποίος με τη συμμετοχή και άλλων μοριακών σιγνάλων επάγει την έκφυση του ουρητήρα. Στην επαγωγή αυτή συμμετέχει μεταξύ άλλων και η δέσμευση του παράγοντα GDNF, από το σύμπλοκο του υποδοχέα GFRa-1 και Ret, τα οποία εκφράζονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του ουρητήρα (Sariola H, Sainio K, 1997; Baloh RH *et al.*, 2000). Η ενεργοποίηση του παραπάνω συμπλόκου, έχει σαν αποτέλεσμα εκτός από την εμφάνιση της προεκβολής του ουρητήρα, την επιμήκυνση της και την εισβολή της στο μετανεφρικό μεσέγγυμα, που πραγματοποιείται την ημέρα 10-11.5 στον ποντικό. Η εισβολή αυτή επιφέρει τη συμπίκνωση του μετανεφρικού μεσεγγύματος που γεινιάζει με τον ουρητήρα, περιβάλλοντας τον σαν καπέλο. Το συμπτωκνωμένο μεσέγγυμα επάγει με τη σειρά του την περαιτέρω ανάπτυξη αλλά και τη διακλάδωση του ουρητήρα. Σημειώνεται ότι στην περιφέρεια του συμπτωκνωμένου μεσεγγύματος αλλά και μεταξύ των διακλαδώσεων του ουρητήρα, αναπτύσσεται το στρώμα, το οποίο ενώ δεν διαφοροποιείται σε νεφρώνες και στο σύστημα των αθροιστικών σωληναρίων, ρυθμίζει μέσω κατάλληλης σηματοδότησης την νεφρική ανάπτυξη και επηρεάζεται από αυτή. Στην κορυφή κάθε ουρητηρικής διακλάδωσης το συμπτωκνωμένο μεσέγγυμα που τις περιβάλλει σχηματίζει συναθροίσεις (aggregates), οι οποίες υφίστανται μεσέγγυμο-επιθηλιακή μετάβαση (MET) για να σχηματίσουν τελικά τους επιθηλιακούς εκκριτικούς σωλήνες του νεφρού. Αυτοί οι σωλήνες εξελίσσονται σε νεφρώνες ύστερα από μία σειρά ενδιάμεσων σταδίων ανάπτυξης. Το πρώτο στάδιο ανάπτυξης τους είναι το στάδιο που ο σωλήνας παίρνει τη μορφή κόμματος (comma-shaped body), ενώ στη συνέχεια ο σωλήνας μορφοποιείται σε τελικό σίγμα (S-shaped body). Η μορφή του τελικού σίγμα σχηματίζει το σπείραμα (glomerulus) και τα εγγύς και απομακρυσμένα σωληνάκια (proximal and distal tubules). Αυτά συγχωνεύονται με τον επιθηλιακό ουρητηρικό σωλήνα, που είναι αποτέλεσμα των συνεχόμενων επιθηλιακών διακλαδώσεων του ουρητήρα. Το μεσαίο κομμάτι των σωληναρίων σχηματίζει την αγκύλη του Henle (loop of Henle), η οποία μαζί με τα εγγύς σωληνάκια είναι υπεύθυνη για την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών και αλάτων της ουρίας πριν αυτή περάσει στα αθροιστικά σωληνάκια. Οι διακλαδώσεις του ουρητήρα σχηματίζουν το σύστημα των αθροιστικών σωληναρίων (collecting duct system), που συγκεντρώνουν την ουρία στη νεφρική πύελο και στην ουροδόχο κύστη.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι κατά τη διαδικασία σχηματισμού των διακλαδώσεων του επιθηλιακού σωλήνα του ουρητήρα (που προκύπτουν ύστερα από την διαρκή επαγωγή του από το μεσέγγυμα, με αποτέλεσμα την επιμήκυνση και την ανάπτυξη του), η κορυφή κάθε καινούργιας ουρητηρικής διακλάδωσης λειτουργεί ως επαγωγικό κέντρο για την έναρξη της νεφρογένεσης. Η επαγωγή των επιθηλιακών σωληνών του μεσεγγύματος, που οδηγούν στο σχηματισμό νεφρώνων, επαναλαμβάνεται περίπου 12.000 φορές στο ποντίκι και γύρω στις 500.000-1.000.000 φορές στον άνθρωπο. Τελικά προκειμένου να δημιουργηθούν λειτουργικοί νεφροί, πραγματοποιείται μετακίνηση και ενδοθηλιακών κυττάρων (τα οποία προέρχονται από το περιφερειακό μεσέγγυμα) και μεσαγγειακών κυττάρων στο σπείραμα, έτσι ώστε να επιτευχθεί η αγγείωση του. Τονίζεται ότι η νεφρογένεση είναι μια διαδικασία που στον άνθρωπο σταματάει στη γέννηση, ενώ στο ποντίκι συνεχίζει και μετά τη γέννηση (Vainio Seppo and Lin Yanfeng, 2002; McCright B *et al.*, 2001; Horster MF *et al.*, 1999).

Συμπερασματικά η διαδικασία της μετανεφρογένεσης περιλαμβάνει αμοιβαίες επαγωγικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο διαφορετικών ιστών (επιθηλιομεσεγγυματικές αλληλεπιδράσεις), του επιθηλίου του ουρητηρικού εκβλαστήματος και του γειτονικού μεσεγγύματος. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές οδηγούν στις δύο συντηρημένες μορφογενετικές διαδικασίες, της μεσεγγυμο-επιθηλιακής μετάβασης και της επιθηλιακής διακλάδωσης. Η διαδικασία της μεσεγγυμο-επιθηλιακής μετάβασης δημιουργεί τους νεφρώνες και οι επιθηλιακές διακλαδώσεις του ουρητήρα το σύστημα των αθροιστικών του σωληναρίων.

Στις εικόνες **6**, **7** σημειώνονται τα γονίδια που έχουν ανιχνευθεί ότι εμπλέκονται στη διαδικασία της νεφρογένεσης (Burrow Christopher R, 2000; Schedl Andreas and Hastie Nicholas D, 2000). Με

βάση τα παραπάνω γονίδια γίνεται κατανοητό ότι οι απαραίτητες επιθηλιο-μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις κατά την νεφρογένεση, προϋποθέτουν ρυθμιζόμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων μακρομορίων. Σ' αυτά τα μακρομόρια περιλαμβάνονται γλυκοπρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας (π.χ λαμινίνες, Willem *et al.*, 2002), ένζυμα διάσπασης ή τροποποίησης της εξωκυττάριας ουσίας, αλλά και αναστολείς αυτών των ενζύμων (π.χ MMP-9, TIMP-2), μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (CAMs, Cell Adhesion Molecules), υποδοχείς της εξωκυττάριας ουσίας (ECM receptors, π.χ ιντεγκρίνες integrin  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta$ , Muller *et al.*, 1997; Kreidberg JA *et al.*, 1996), ενδοκυτταρικές κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες και υποδοχείς τους [π.χ επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF) και υποδοχέας του (epidermal growth factor receptor, EGFR), GDNF και υποδοχέας cRet, Kuure *et al.*, 2000]. Όλα τα παραπάνω συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, οι υποδοχείς και τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, υπόκεινται σε χρονική και τοπική ρύθμιση. Μερικά απ' αυτά εκφράζονται στο μεσέγχυμα ή στο μεσέγχυμο-επιθηλιακό χώρο, λειτουργώντας σαν δεσμευτές, ενώ άλλα εντοπίζονται στο επιθήλιο του ουρητήρα και δρουν σαν υποδοχείς. Εκτός από τα παραπάνω μόρια, απαραίτητοι για την νεφρογένεση είναι και ορισμένοι μεταγραφικοί παράγοντες (π.χ PAX-2, EMX-2), αλλά και αρκετά πρωτοογκογονίδια (π.χ υποδοχέας cRet, Kuure *et al.*, 2000).

Στον πίνακα 1 σημειώνονται περιπτώσεις απενεργοποίησης γονιδίων που προκαλούν ανωμαλίες στη νεφρική ανάπτυξη (Kuure S *et al.*, 2000).

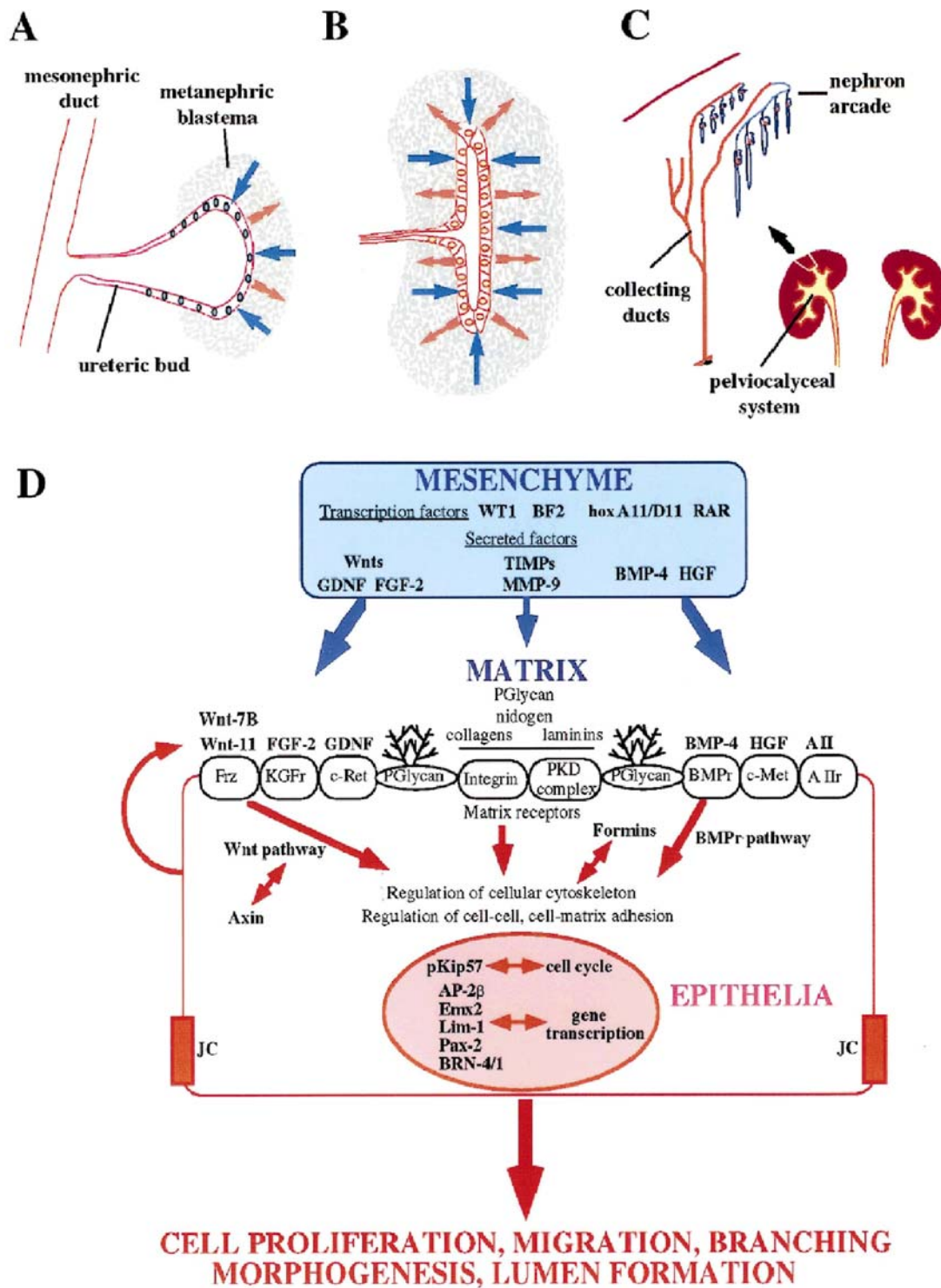
### I.1.3 Νεφρικές ανωμαλίες των *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών

Τα *Fras1*<sup>-/-</sup> έμβρυα και των δύο στελεχών που μελετήθηκαν, χαρακτηρίζονται από μονόπλευρη ή αμφίπλευρη νεφρική αγενεσία (τονίζεται ότι το ποσοστό των εμβρύων ημέρας 15.5 που παρουσιάζει νεφρικά προβλήματα είναι περίπου 50%). Ταυτόχρονα το 50% των ενηλίκων *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών του στελέχους NMRI που επιβιώνει, παρουσιάζει μονόπλευρη νεφρική αγενεσία ή/και μονόπλευρη ή αμφίπλευρη νεφρική δυσπλασία ή υποπλασία. Γενικότερα πάντως τα *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντίκια εμφανίζουν διάφορους συνδυασμούς νεφρικής αγενεσίας και δυσπλασίας/υποπλασίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε *Fras1*<sup>-/-</sup> νεογέννητα ποντίκια εντοπίστηκαν και περιπτώσεις μονόπλευρης νεφρικής αγενεσίας, στις οποίες ανιχνεύθηκαν αμφίπλευρα οι δομές του ουρητήρα. Γίνεται επομένως κατανοητό ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου *Fras1* δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του μετανεφρού στο στάδιο της έκφυσης του ουρητήρα, αλλά πιθανότατα διαταράσσει κάποια από τις μετέπειτα διαδικασίες επιθηλιο-μεσεγχυματικής αλληλεπίδρασης, που περιλαμβάνουν την μεσέγχυμο-επιθηλιακή μετάβαση του μετανεφρικού μεσεγχύματος και τις επιθηλιακές διακλαδώσεις του ουρητήρα.

Ο τρόπος με τον οποίο η *Fras1* θα μπορούσε να επηρεάζει τις επιθηλιο-μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις για τη δημιουργία των νεφρών, είναι είτε άμεσος, σαν λειτουργικό μόριο σηματοδότησης ή σαν υποδοχέας κατάλληλων δεσμευτών, είτε έμμεσος, μέσω της δομικής διαταραχής που προκαλεί στον εξωκυττάριο χώρο των εμπλεκόμενων ιστών. Στη δεύτερη περίπτωση η παραμόρφωση στην οργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας είναι δυνατόν να επιδρά στην αποθήκευση αυξητικών παραγόντων ή και άλλων σηματοδοτικών μορίων (τα οποία αλληλεπιδρούν με συστατικά του πολύπλοκου μακρομοριακού δικτύου της εξωκυττάριας ουσίας) (Aszodi *et al.*, 1998), καθώς και στην ενεργοποίηση αυτών των αποθηκευμένων συστατικών (Vu TH, 2001; Raghunath M *et al.*, 1998).

Ένας αυξητικός παράγοντας ο οποίος ενδέχεται να επηρεάζεται από το *Fras1* και που θα μπορούσε να συμβάλλει στην εκδήλωση των νεφρικών ανωμαλιών είναι ο TGF- $\beta$ .

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η προσθήκη του αυξητικού παράγοντα Bmp7 (που ανήκει στην υπεροικογένεια των TGF- $\beta$ s) σε καλλιέργεια που περιέχει υποτυπώδες νεφρικό ιστό από έμβρυο ποντικού ημέρας 10.5 (E10.5) (mouse embryonic metanephric rudiment), προκαλεί την αναστολή της ικανότητας του μετανεφρικού μεσεγχύματος να δημιουργήσει νεφρώνες. Από την άλλη μεριά η απενεργοποίηση του Bmp7 στον ποντικό προκαλεί

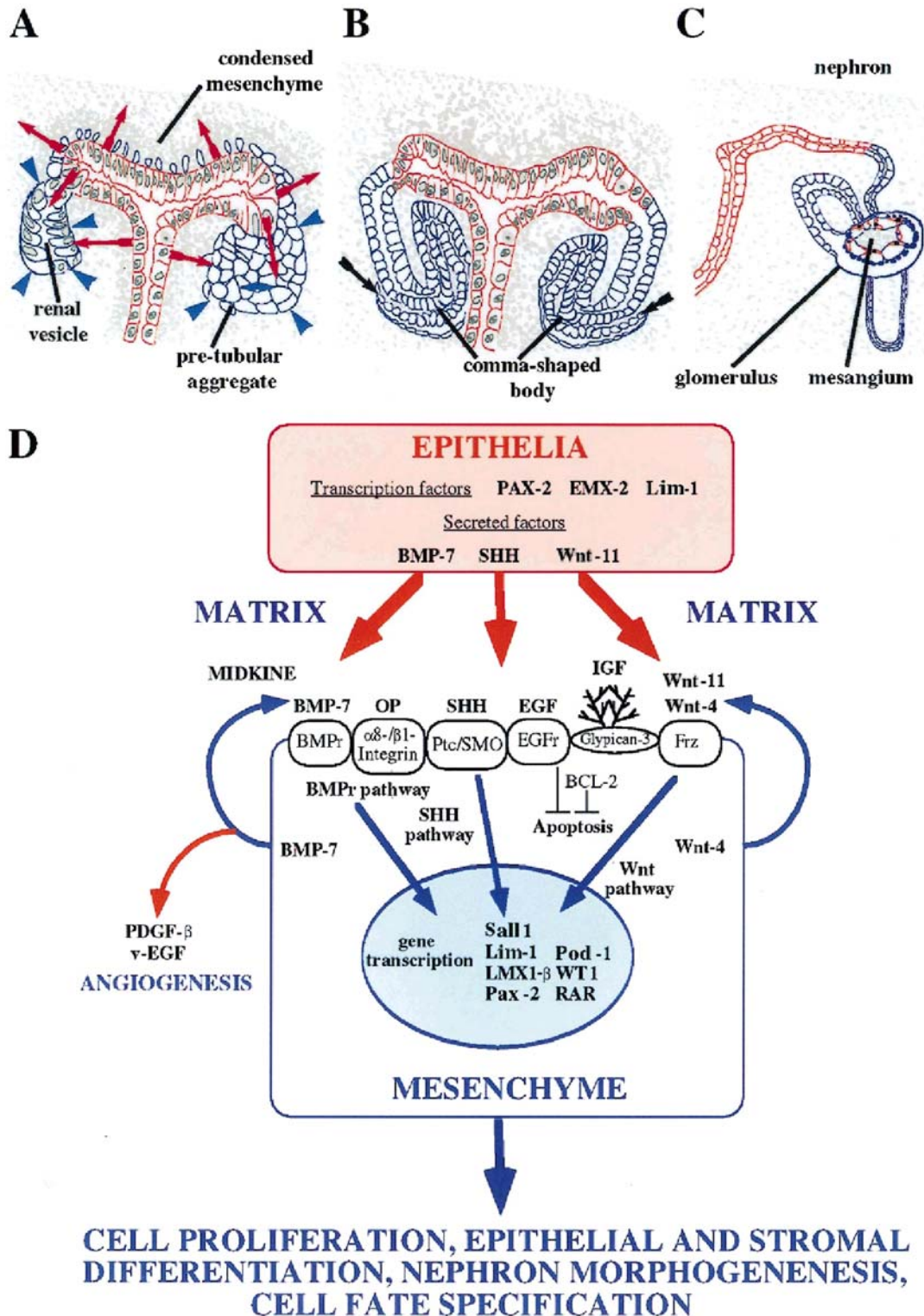


**Εικ. 6: Επιθηλιακή μορφογένεση του ουρητήρα και σχηματισμός των αθροιστικών σωληναρίων των νεφρών.**

**A**, Το μετανεφρικό μεσέγχυμα επάγει την έκφυση του ουρητήρα (μπλέ βέλη) και αντιστρόφως (κόκκινα βέλη).  
**B**, Σημειώνεται η πρώτη διακλάδωση του ουρητήρα. Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι διακλαδώσεων παράγουν το σύστημα των αθροιστικών σωληναρίων εντός του νεφρικού παρεγχύματος καθώς και το πελοκαλυκοειδές σύστημα (pelvicalyceal system), το οποίο φαίνεται στο **(C)**. Στο **(D)** γίνεται αναφορά των γονιδίων του μετανεφρικού μεσεγχύματος που επάγουν την έκφυση του ουρητηρικού εκβλαστήματος, καθώς και των γονιδίων που συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη μετακίνηση, στην επιθηλιακή μορφογένεση



του ουρητηρικού σωλήνα και στο σχηματισμό των αθροιστικών σωληναρίων. Με JC (junctional complex, συνδετικό σύμπλεγμα) σημειώνονται οι στενοσύνδεσμοι των επιθηλιακών κυττάρων.



**Εικ. 7: Νεφρική μορφογένεση και σχηματισμός νεφρώνων**

**A**, Τα επαγωγικά φαινόμενα του ουρητήρα (κόκκινα βέλη) καταλήγουν στην συμπίκνωση του νεφρικού μεσεγγύματος και στο σχηματισμό προ-σωληνωτών συναθροίσεων (pre-tubular aggregates), καθώς και πρωτόγονων νεφρικών κυστιδίων (renal vesicle), τα οποία συμβολίζονται με μπλε βέλη. **B**, Σημειώνεται το

στάδιο του κόμματος (comma shaped body) του αναπτυσσόμενου νεφρώνα. Ευκίνητα ενδοθηλιακά κύτταρα εισβάλουν στη σχισμή της παραπάνω δομής (μαύρα βέλη) και η ολοκλήρωση της μορφογένεσης επάγει τη δημιουργία του νεφρώνα στο (C). D, Αναφορά των γονιδίων του ουρητηρικού επιθηλίου που επάγουν το μετανεφρικό μεσέγγυμα, καθώς και των γονιδίων του μεσεγγύματος που προκαλούν κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση στρώματος και επιθηλίων, νεφρική μορφογένεση και κυτταρικό καθορισμό.

Table 1  
Summary of knockouts resulting in defects during kidney development

Knockout	Defect	Reference
<i>Pax-2</i>	Several abnormalities throughout urogenital development	Torres et al., 1995
<i>Lim-1</i>	Several abnormalities during urogenital development	Shawlot and Behringer, 1995
<i>N-myc</i>	Defects in mesonephros formation	Stanton et al., 1992
<i>WT-1</i>	Failure in ureter formation and failure of the mesenchyme to respond to ureter-derived signals	Kriedberg et al., 1993
<i>Eya-1</i>	Defects in ureter ingrowth	Xu et al., 1999
<i>Formin (IV)</i>	Sd related phenotype	Wynshaw-Boris et al., 1997
<i>GDNF</i>	Defects in ureter formation, ingrowth and branching	For review see Robertson and Mason, 1997
<i>GDNFα1</i>	Similar to GDNF and c-ret phenotypes	Enomoto et al., 1998
<i>c-ret</i>	Defects in ureter formation, ingrowth and branching	For review see Robertson and Mason, 1997
<i>HS2ST</i>	Abnormal ureter branching	Bullock et al., 1998
<i>Integrin α8</i>	Defects in ingrowth and branching of ureter	Müller et al., 1997
<i>Bmp-7</i>	Defects in epithelialization of mesenchymal cell	For review see Hogan, 1996
<i>Emx-2</i>	Defects in differentiation of ureter and mesenchyme after initial induction	Miyamoto et al., 1997
<i>Wnt-4</i>	Defects in epithelialization of mesenchyme	Stark et al., 1994
<i>PDGF</i>	Defect in formation of capillary tuft of the glomerulus	Soriano, 1994; Leveen et al., 1994
<i>FGF-7</i>	Reduced number of nephrons	Qiao et al., 1999
<i>AP-2</i>	Apoptosis in collecting duct and distal tubular epithelia	Moser et al., 1997
<i>Bcl-2</i>	Defects in branching of ureter	Weis et al., 1993
<i>BF-2</i>	Failures in formation of duct system and nephrons	Hatini et al., 1996

## Πίνακας 1: Περίληψη των γονιδίων που η απενεργοποίησή τους προκαλεί προβλήματα κατά την νεφρική ανάπτυξη

αναστολή της νεφρογένεσης μετά την ημέρα 14.5 της εμβρυογένεσης (Vainio Seppo and Lin Yanfeng, 2002).

Το *Fras1* θα μπορούσε να αλληλεπιδρά με μέλη της οικογένειας των TGF-β, είτε μέσω των μοτίβων τύπου VWC, είτε μέσω των μοτίβων που συναντώνται στις φουρίνες.

Συγκεκριμένα τα μοτίβα τύπου VWC εκτός από την περιοχή C του παράγοντα Von Willebrand, εντοπίζονται και σε πληθώρα εξωκυτταρικών πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων της Χορδίνης (chordin), των Ινωδών προκολλαγόνων I, II, III, V (fibrillar procollagens I, II, III, V), πρωτεϊνών που προσομοιάζουν σε μέλη της οικογένειας Nel (Nel-like family), καθώς και των πρωτεϊνών CRIM-1, Κιελίνης (Kielin), Amnionless, Νευραλίνης (Neuralin), Crossveinless2, Θρομβοσπονδίνη 1 (Thrombospondin 1), Θρομβοσπονδίνη 2 (Thrombospondin 2) (Larrain et al., 2000; Larrain et al., 2001). Από τις παραπάνω πρωτεΐνες έχειδειχθεί ότι η πρωτεΐνη χορδίνη του βατράχου αλληλεπιδρά, *in vivo* και *in vitro* μέσω αυτών των μοτίβων, με τον παράγοντα BMP4 (Larrain et al., 2000; Larrain et al., 2001), ενώ η πρωτεΐνη procollagen IIA αλληλεπιδρά *in vitro* με τους αυξητικούς παράγοντες TGF-β1 και BMP4 (Larrain et al., 2000; Zhu Y et al., 1999). Επιπρόσθετα για αρκετές από τις εξωκυττάρειες πρωτεΐνες που αναφέρθηκαν, όπως για τις CRIM-1, Crossveinless2, Κιελίνη και Νευραλίνη, υπάρχουν ενδείξεις ότι τροποποιούν τη σηματοδότηση του TGF-β/BMP (Larrain et al., 2001) και επομένως εικάζεται ότι θα μπορούσαν να προσδέσουν, ανάλογα με την αλληλουχία τους και μέσω των μοτίβων VWC, διάφορα μέλη της οικογένειας TGF-β, (ρυθμίζοντας μ' αυτόν τον τρόπο τα μονοπάτια που σηματοδοτούν οι αυξητικοί αυτοί παράγοντες). Κατά συνέπεια η υποθετική αλληλεπίδραση του *Fras1* με κάποιο μέλος της οικογένειας των TGF-β, μέσω των μοτίβων VWC που περιέχει, μπορεί να οδηγήσει στην απενεργοποίησή του. Το αποτέλεσμα αυτό προκύπτει στην περίπτωση που η δέσμευση του μέλους του TGF-β από τη *Fras1* εμποδίζει την πρόσδεση στον

υποδοχέα του, ή τη δράση πρωτεασών, όπως **α**) η Matrix Metalloproteinase2 (MMP-2) που ενεργοποιεί τον TGF-β πρωτεολύοντας την LAP (Vu TH, 2001), ή **β**) οι φουρίνες, που χρησιμοποιούνται για την ενδοκυτταρική επεξεργασία του. Από την άλλη μεριά η αλληλεπίδραση της Fras1 με τον TGF-β θα μπορούσε εναλλακτικά να οδηγήσει στην ενεργοποίηση του (αν η δέσμευση του από τη Fras1 συμβάλλει στην ευκολότερη μεταφορά και πρόσληψη από τον υποδοχέα του). Συνεπώς η αντίστοιχη υπερέκφραση ή η αναστολή της λειτουργικότητας του συγκεκριμένου TGF-β στα *Fras1<sup>-/-</sup>* ποντίκια, θα μπορούσε να ευθύνεται για τις ποικίλες νεφρικές ανωμαλίες.

Η υποθετική αλληλεπίδραση της Fras1 με τον παράγοντα TGF-β, θα μπορούσε να επιτευχθεί και μέσω των μοτίβων τύπου φουρίνης που περιέχει η Fras1.

Οι φουρίνες αποτελούν μια οικογένεια πρωτεασών σερίνης στα θηλαστικά, η οποία είναι μέλος μιας μεγαλύτερης οικογένειας πρωτεασών, των σαμππιλισινών (eukaryotic subtilisin-like family of serine proteases). Γενικότερα οι πρωτεάσες σερίνης διακρίνονται σε αυτές που παρουσιάζουν ομοιότητες με την θρυψίνη (trypsin) (trypsin-like) και σε αυτές που μοιάζουν στην σαμππιλίσίνη (subtilisin) (subtilisin-like). Οι δύο αυτές κατηγορίες πρωτεασών έχουν στο ενεργό τους κέντρο σερίνη, αλλά παρουσιάζουν διαφορετική πρωτεϊνική διαμόρφωση. Ειδικότερα οι φουρίνες χρησιμοποιούνται για την πρωτεολυτική επεξεργασία ορισμένων πρόδρομων πρωτεϊνών, που ακολουθούν το συστατικό μονοπάτι μεταφοράς (constitutive pathway). Η δράση τους εντοπίζεται στο μοτίβο που περιέχει τα βασικά αμινοξέα της μορφής Arg-X-Lys/Arg-Arg, το οποίο βρίσκεται και προς την καρβοξυτελική περιοχή των φουρινών. Το πρώτο μέλος της οικογένειας των φουρινών που ανιχνεύθηκε ήταν η ανθρώπινη φουρίνη, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *FUR*, αλλά στη συνέχεια εντοπίστηκαν και άλλα μέλη της οικογένειας στο ποντίκι, στον αρουραίο και στο βάτραχο, με πολύ μεγάλες ομοιότητες στην αμινοξική τους αλληλουχία. Η *FUR*, η οποία είναι αγκυροβολημένη είτε στη μεμβράνη της *trans* πλευράς του συμπλέγματος Golgi (Trans Golgi Network, TGN), είτε στην επιφάνεια του κυττάρου, παρουσιάζει καθολική έκφραση σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των φουρινών. Όσον αφορά τα υποστρώματα της *FUR*, αυτά είναι είτε διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, είτε διαλυτές εκκρινόμενες πρωτεΐνες.

Γενικά οι φουρίνες συντίθενται σαν πρόδρομα μόρια και διακρίνονται στις παρακάτω περιοχές, ξεκινώντας από την αμινοτελική τους άκρο:

- Στην πρόδρομη περιοχή (propro domain), η οποία περιέχει ένα αποκοπτόμενο πεπτίδιο σινιάλο.
- Στην καταλυτική περιοχή που προσομοιάζει αυτής των σαμππιλισινών (subtilisin-like catalytic domain), η οποία περιέχει αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα εντοπισμένα είτε εντός, είτε κοντά στην περιοχή σύνδεσης με το υπόστρωμα και τα οποία είναι υπεύθυνα όχι μόνο για την ενεργότητα αλλά και για την ειδικότητα των φουρινών.
- Στην μεσαία περιοχή (middle domain).
- Στην πλούσια σε κυστεΐνες περιοχή (cysteine-rich region), στην οποία εντοπίζονται και τα μοτίβα που παρουσιάζει η *Fras1* και τα οποία πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση των φουρινών με τα υποστρώματα τους.
- Στην διαμεμβρανική περιοχή.
- Στην κυτταροπλασματική περιοχή.

Οι τρεις πρώτες περιοχές εντοπίζονται σε όλα τα μέλη της οικογένειας των φουρινών, ενώ η μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ των μελών της οικογένειας, παρατηρείται στην καταλυτική τους περιοχή (De Strooper *et al.*, 1995, Roebroek *et al.*, 1992, Roebroek *et al.*, 1994, Bergeron *et al.*, 2000).

Από την άλλη μεριά είναι γνωστό ότι ο παράγοντας TGF-β συντίθεται από όλους τους τύπους κυττάρων και εκκρίνεται σαν μέρος ενός συμπλόκου (L-TGF-β), το οποίο ενεργοποιείται όταν απελευθερώνεται από το λανθάνον συνδεδεμένο πεπτίδιο (latent associated peptide, LAP). Συγκεκριμένα μετά την παραγωγή της πρόδρομης μορφής του TGF-β, πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά πρωτεόλυση αυτής της μορφής από φουρίνες. Μ' αυτόν τον τρόπο παράγεται το LAP, που αποτελεί το αμινοτελικό τμήμα της πρόδρομης μορφής του TGF-β, καθώς και το καρβοξυτελικό ώριμο άκρο του TGF-β. Τα δύο αυτά πρωτεϊνικά τμήματα συναθροίζονται σε διμερή, και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ενδοκυτταρικά (μη ομοιοπολικά) σχηματίζοντας το L-TGF-β. Η μορφή αυτή διευκολύνει την μεταφορά του TGF-β έξω από το κύτταρο, μέσω αλληλεπίδρασης του L-TGF-β με την λανθάνουσα προσδεδεμένη πρωτεΐνη (Latency binding protein, LTBP) στο ενδοκυτταρικό οργανίδιο του Golgi, αλλά ταυτόχρονα εμποδίζει την πρόσδεση του TGF-β με τον υποδοχέα του αναστέλλοντας την ενεργότητά του. Μέχρι σήμερα έχουν διατυπωθεί δύο μηχανισμοί ενεργοποίησης του L-TGF-β, είτε μέσω απελευθέρωσης της LAP πρωτεΐνης, είτε μέσω αλλαγής της διαμόρφωσής της, έτσι ώστε να μην αποδεσμεύεται από τον TGF-β, αλλά να απελευθερώνει την θέση πρόσδεσής του για τον υποδοχέα (Vu TH, 2001; Khalil N, 1999).

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι και μέσω των μοτίβων της *Fras1* που εντοπίζονται στην πλούσια σε κυστεΐνες περιοχή των φουρινών και τα οποία στις φουρίνες ενδέχεται να συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση με τα υποστρώματα τους, μπορεί να επιτευχθεί αλληλεπίδραση της *Fras1* με τον TGF-β. Η αλληλεπίδραση αυτή θα παρεμπόδιζε την φυσιολογική ενδοκυτταρική επεξεργασία του TGF-β από τις φουρίνες και επομένως θα συνέβαλλε στην απενεργοποίηση του TGF-β. Σημειώνεται ότι στην περίπτωση αυτή η υποθετική αλληλεπίδραση της *Fras1* με τον TGF-β, απαιτεί ενδοκυτταρική επικοινωνία των δυο πρωτεϊνικών μορίων και θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί κατά τη διέλευση του *Fras1* από το εκκριτικό μονοπάτι.

Συμπερασματικά το *Fras1* μπορεί να αποτελεί ένα από τους παράγοντες ρύθμισης της ενεργότητας του TGF-β, του οποίου η δράση όπως αναφέρθηκε πρέπει να είναι εντός συγκεκριμένων ορίων για να μην προκαλεί διαταραχές, όπως νεφρικές ανωμαλίες. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι η έλλειψη του TGF-β θα μπορούσε να εξηγήσει εν μέρει και τις σκελετικές ανωμαλίες των *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών, αφού στην περίπτωση στοχευόμενης απενεργοποίησης του BMP7 (που αποτελεί μέλος της οικογένειας TGF-β), προκύπτουν εκτός από νεφρικές ανωμαλίες και παρόμοια σκελετικά προβλήματα (Jena N, et al., 1997).

Εναλλακτικά, αν και είναι ελάχιστα πιθανό, οι ανωμαλίες που παρατηρούνται στη διαδικασία της μετανεφρικής ανάπτυξης στα *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντίκια, δεν αποκλείεται να οφείλονται στην ύπαρξη μικροφουσαλών στην κορυφή του ουρητήρα (οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλούν μηχανικές παραμορφώσεις).

#### **1.1.4 Συγχωνεύσεις βλεφάρων και άκρων στα *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντίκια**

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των ενηλίκων *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών του στελέχους NMRI, είναι οι συγχωνεύσεις που παρατηρούνται στα βλέφαρα και στα άκρα τους. Συγκεκριμένα όλα τα *Fras1*<sup>-/-</sup> ενήλικα ποντίκια χαρακτηρίζονται από τελείως κλειστά ή μερικώς κλειστά βλέφαρα, στο ένα ή και στα δύο μάτια, ενώ το 80-90% των ενηλίκων *Fras1*<sup>-/-</sup> χαρακτηρίζεται από συγχωνεύσεις των δαχτύλων στα άκρα.

Τόσο τα δάχτυλα των άκρων όσο και τα βλέφαρα αποτελούν δομές οι οποίες, ενώ έχουν αποκτήσει πρώιμα στην εμβρυογένεση μια πρωτογενή μορφή του τελικού τους προτύπου, συγχωνεύονται στη συνέχεια προσωρινά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μέχρι να ανασχηματιστούν τελικά την κατάλληλη χρονική περίοδο. Οι πρόδρομες μορφές αυτών των οργάνων είναι αποτέλεσμα αποπτωτικών διαδικασιών στην περίπτωση των άκρων (Kaufman M, 1994; Dunker N et al., 2002) και αποτέλεσμα εγκοπώσεων και μεταναστεύσεων στα βλέφαρα (Kaufman M, 1994; Teraishi, T, and Yoshioka, M, 2001; Swiergiel, J.J et al., 2000; Juriloff DM et al., 2000; Li C et al., 2001; Flugel-Koch C et al., 2002; Reneker LW et al., 2000). Συγκεκριμένα, αφού δημιουργηθούν οι αρχικές μορφές των βλεφαρικών επιθηλίων των ποντικών, τα αντίστοιχα επιδερμικά επιθήλια πολλαπλασιάζονται και μετατοπίζονται ώστε να συγχωνευθούν την ημέρα 15.5-16.5 (E15.5-E16.5) της εμβρυογένεσης. Οι συγχωνεύσεις αυτές αποχωρίζονται 12-14 μέρες μετά την γέννηση, οπότε τα βλέφαρα αποκτούν την τελική τους μορφή. Ανάλογα την ημέρα 12.5 της εμβρυογένεσης πραγματοποιείται η συγχώνευση των αρχέγονων μορφών των δακτύλων, ενώ ο τελικός αποχωρισμός τους ολοκληρώνεται την ημέρα 17.5 της εμβρυογένεσης. Σημειώνεται ότι η συνένωση των πρόδρομων μορφών τόσο των βλεφάρων όσο και των δακτύλων, επιτυγχάνεται με την ανάπτυξη κατάλληλων δεσμών (π.χ δεσμοσώματα) μεταξύ των γειτονικών επιδερμικών επιθηλίων. Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σ' αυτές τις συνδέσεις είναι μεταξύ άλλων οι Καδερίνες (Cadherins) και οι ιντεγκρίνες (Stepp M.A, 1999). Οι δεσμοί που αναπτύσσονται δεν είναι μόνιμοι (όπως συμβαίνει στην περίπτωση άλλων οργάνων) και την κατάλληλη χρονική στιγμή διαταράσσονται, προκαλώντας την απομάκρυνση των συνδεδεμένων στρωμάτων των επιθηλιακών κυττάρων, τη διαφοροποίηση και τελικά τη νέκρωση και την αποκόλληση τους από το υποκείμενα επιθήλια, ενώ σχηματίζονται τα βλέφαρα και τα δάχτυλα των άκρων. Η συγχώνευση των επιθηλιακών ιστών μέσω των παραπάνω δεσμών, χαρακτηρίζεται από την διατήρηση του βασικού ελάσματος των εμπλεκόμενων επιδερμικών επιθηλίων. Το γεγονός αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αφού συνήθως το αποτέλεσμα της συγχώνευσης επιθηλιακών ιστών (όπως για παράδειγμα στον ουρανίσκο) συνοδεύεται από διάρρηξη του βασικού ελάσματος των αλληλεπιδρώντων επιθηλίων, έτσι ώστε να σχηματίζεται ένας μόνιμα συνδεδεμένος ιστός. Στην περίπτωση των άκρων και των βλεφάρων τα συγχωνευμένα επιθήλια, πιθανότατα λόγω παρουσίας συγκεκριμένων ινοβλαστικών

κυττάρων στην υποκείμενη δερμίδα τους, λόγω διαφορετικής δομικής σύστασης των βασικών μεμβρανών τους και με αφορμή την παρουσία ξεχωριστών ιστοειδικών παραγόντων, διατηρούν τα βασικά τους ελάσματα στην περιοχή της σύνδεσης (Stepp MA, 1999; Mah MG, 2000; Teraiishi, T., and Yoshioka, M, 2001; Carroll JM *et al.*, 1998).

Οι αιτίες των συγχωνεύσεων στα άκρα και στα βλέφαρα δεν έχουν ακόμα διαλευκανθεί αλλά μπορεί να οφείλονται:

**α)** Στις μηχανικές παραμορφώσεις που προκαλούν οι φουσκάλες που εντοπίζονται στις αντίστοιχες εμβρυϊκές περιοχές. Πολλές φορές στα κάτω άκρα ενήλικων μεταλλαγμένων ποντικών παρατηρούνται ίχνη εμβρυϊκών φουσκάλων, οι οποίες στη συνέχεια διαλύονται και εξαφανίζονται, ενώ ταυτόχρονα παρατηρούνται παραμορφώσεις στα άκρα. Οι πιέσεις που ασκούνται από αυτές τις φουσκάλες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνες για τις διαταραχές στα άκρα. Από την άλλη μεριά στα ενήλικα *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντίκια δεν έχουν εντοπιστεί φουσκάλες στην περιοχή του κεφαλιού, υποδηλώνοντας ότι πιθανότατα οδηγούν σε εμβρυϊκή θνησιμότητα. Θα μπορούσε όμως να υποθεθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις οι φουσκάλες στην περιοχή του κεφαλιού εκτονώνονται νωρίς στην εμβρυϊκή ηλικία, με αποτέλεσμα τα ομόζυγα μεταλλάγματα να γλιτώνουν το θάνατο, προκαλώντας στο ενήλικο στάδιο ποικίλες παραμορφώσεις στα βλέφαρα.

Σημειώνεται ότι δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα παρουσίας εμβρυϊκά προσχηματισμένων μικροφουσκάλων στις περιοχές των βλεφάρων των ενήλικων ζώων (μικροφουσκάλες δεν έχουν μέχρι τώρα ανιχνευθεί), οι οποίες θα ευθύνονταν για τις ανωμαλίες στις περιοχές αυτές.

**β)** Σε διαταραχές στις αποπτωτικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των άκρων. Αν και οι πρόδρομες μορφές των άκρων, που δημιουργούνται μέσω απόπτωσης, έχουν παρατηρηθεί σε ιστολογικές τομές εμβρύων *Fras1*<sup>-/-</sup>, δεν έχει ξεκαθαριστεί αν ο σχηματισμός των δαχτύλων επιτυγχάνεται στο φυσιολογικό επίπεδο. Κατά συνέπεια ο έλεγχος για αποπτωτικές ανωμαλίες στις περιοχές μεταξύ των δαχτύλων κρίνεται απαραίτητος. Πειραματικές διαδικασίες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν TUNEL assays (που έγιναν τελευταία από τον Λ.Παναγή και τον Π.Πέτρου), έδειξαν ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων, στο χώρο μεταξύ των δακτύλων, σε έμβρυα αγρίου τύπου και *Fras1*<sup>-/-</sup>, ημέρας 14.5 (την ημέρα 13.5 και 14.5 της εμβρυογένεσης πραγματοποιείται έντονη απόπτωση στις συγκεκριμένες περιοχές, Kaufman M, ; Dunker N *et al.*, 2002). Κατά συνέπεια το πρόβλημα στα άκρα των *Fras1*<sup>-/-</sup> εμβρύων εντοπίζεται πιθανότατα στις διαδικασίες μετά την συγχώνευση των αρχέγονων μορφών τους, οι οποίες δεν σχετίζονται με απόπτωση.

**γ)** Σε ανωμαλίες στις επιθηλιακές αλληλεπιδράσεις των συγχωνευμένων επιθηλίων των βλεφάρων και των δαχτύλων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, που θα οδηγούσαν σε αναστολή της φυσιολογικής διαδικασίας αποχωρισμού τους. Η διατήρηση της συνεκτικότητας των επιθηλιακών κυττάρων θα μπορούσε να οφείλεται σε διαταραχές στα βασικά ελάσματα των συνδεδεμένων επιθηλιακών περιοχών, γεγονός που μπορεί να συσχετιστεί με την απουσία της *Fras1* πρωτεΐνης στα *Fras1*<sup>-/-</sup> έμβρυα. Οι παραμορφώσεις στα βασικά ελάσματα των αλληλεπιδρώντων επιθηλίων ενδέχεται να οδηγούν σε ανωμαλίες στα βιομηχανοδοτικά μονοπάτια των επιθηλιακών κυττάρων και κατά συνέπεια σε διαταραχές στην έκφραση και στην τοποθέτηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων που δημιουργούν τις μεταξύ τους συνδέσεις.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι, στα *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντίκια παρατηρούνται διαταραχές στο δέρμα, με την παρατηρούμενη αποκόλληση επιδερμίδας-δερμίδας, στα νεφρά, καθώς και σε διάφορα άλλα εσωτερικά όργανα, συμπεριλαμβανομένων των οστών (στέρνο και δόντια), του ήπατος και του εντέρου. Επίσης διαπιστώνονται προβλήματα στην οργανογένεση δομών, όπως τα άκρα, τα βλέφαρα, οι ακανθώδεις αποφύσεις των σπονδύλων και οι πνεύμονες, που αφορούν ανώμαλες συγχωνεύσεις επιθηλίων. Κατά συνέπεια το *Fras1* παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της οργανογένεσης, που επιτυγχάνεται μέσω επιθηλιακών και επιθήλιο-μεσεγχυματικών αλληλεπιδράσεων.

Μέχρι τώρα οι μοριακές και δομικές ανωμαλίες στον εξωκυττάριο χώρο των επιθηλίων, η δημιουργία υποεπιδερμικών φουσκάλων και τα προβλήματα στα διάφορα όργανα, συμπεριλαμβανομένων των νεφρών, των βλεφάρων, των άκρων και των οστών, δεν έχουν διαλευκανθεί. Όλα όσα προαναφέρθηκαν αποτελούν υποθέσεις, με τις οποίες η *Fras1* θα μπορούσε να υποστηρίξει τον πολυπαραγοντικό της ρόλο και να εξηγήσει τον πολύπλοκο φαινότυπο. Συμπερασματικά οι πολλαπλές λειτουργίες της *Fras1* (δομικές ή λειτουργικές), που υποδηλώνονται από την πολύπλοκη αρχιτεκτονική της, με τις διαφορετικές λειτουργικές περιοχές της, τον κυτταρικό εντοπισμό της και από τον παρατηρούμενο φαινότυπο των *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών, θα μπορούσαν να επιτελούνται:

**α)**είτε μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, όπως κολλαγόνα, μεταλλοπρωτεάσες (π.χ η αλληλεπίδραση με το Col VI θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μέσω της περιοχής της *Fras1* που παρουσιάζει ομολογία με την NG2),

**β)**είτε μέσω πρόσδεσης με αυξητικούς παράγοντες, όπως ο TGF-β (π.χ μέσω των μοτίβων VWC, ή των μοτίβων που συναντώνται στις φουρίνες), με άλλους εξωκυττάριους δεσμευτές, ή με διαμεμβρανικούς υποδοχείς

**γ)**είτε ρυθμίζοντας τις τοπικές συγκεντρώσεις των ιόντων ασβεστίου (μέσω των μοτίβων τύπου Calx-beta).

**δ)**είτε προκαλώντας ανωμαλίες στη συγκέντρωση των σηματοδοτικών μορίων που αποθηκεύονται στην περιοχή του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας (μέσω των δομικών διαταραχών που προκαλεί η *Fras1* στο επιδερμικό βασικό έλασμα)

Τελικά αυτό που μπορεί να υποστηριχτεί με βεβαιότητα, είναι ότι το *Fras1* αποτελεί ένα αναπτυξιακό γονίδιο, που η απουσία του επηρεάζει την οργάνωση και την ακεραιότητα του κατώτερου στρώματος του εμβρυϊκού βασικού ελάσματος, τουλάχιστον της επιδερμίδας, προκαλώντας άμεσα τον παρατηρούμενο δερματικό φαινότυπο και έμμεσα, μέσω διαταραχών στις επιθήλιο-μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις (οι οποίες θα μπορούσαν να οφείλονται σε διαταραχές στα βασικά ελάσματα των εμβρυϊκών εσωτερικών επιθηλίων), την ανάπτυξη διαφόρων οργάνων.

### I.1.5 Θνησιμότητα των *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών

Η σημασία του γονιδίου *Fras1* υποδηλώνεται από το ποσοστό θνησιμότητας των *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών και στα δύο στελέχη που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, όλα τα *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντίκια του στελέχους C57BL10 και το 50% των ομόζυγων μεταλλαγμάτων του στελέχους NMRI, πεθαίνουν στην εμβρυϊκή ηλικία. Η διαφορά στην ικανότητα επιβίωσης των ομόζυγων μεταλλαγμάτων στα δύο στελέχη, οφείλεται στην παρουσία διαφορετικών γενετικών τροποποιητών (genetic modifiers), οι οποίοι επηρεάζουν τη διεισδυτικότητα και την εκφραστικότητα του φαινοτύπου. Φαινοτυπικές διαφορές, χαρακτηριστική ποικιλομορφία και διαφορετική ευπάθεια στη θνησιμότητα, παρατηρούνται και στα *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντίκια του ίδιου στελέχους, ακόμα και στην F5 γενιά. Η ποικιλομορφία αυτή οφείλεται στο γενετικό υπόβαθρο των ποντικών που αναλύονται, που αποτελεί μίγμα του στελέχους Sv129 (από το οποίο προέρχονται τα κύτταρα ES) και του στελέχους στο οποίο αποφασίζεται να μελετηθεί ο φαινότυπος. Κατά συνέπεια τα ποντίκια που προκύπτουν ύστερα από σειρά κατάλληλων διασταυρώσεων, παρουσιάζουν διαφορετική χρωμοσωμική συνεισφορά από το κάθε στέλεχος, δηλαδή διαφορετικό ποσοστό από το κάθε γενετικό υπόβαθρο και κατά συνέπεια διαφορές στη σύσταση των γενετικών τροποποιητών. Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι, η παρατηρούμενη φαινοτυπική ποικιλομορφία στα ομόζυγα μεταλλάγματα είναι αποτέλεσμα στοχαστικών γεγονότων.

Σ' αυτή τη φάση μπορούν να γίνουν μόνο υποθέσεις για τις αιτίες θνησιμότητας στα *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντίκια, οι οποίες ενδέχεται να δρουν και συνεργατικά.

Όσον αφορά την αιτία θανάτου των εμβρύων *Fras1*<sup>-/-</sup>, τα μέχρι τώρα δεδομένα συνηγορούν στην εκτεταμένη ανισορροπία υγρού που προκύπτει στο σώμα των ποντικών εξαιτίας των φουσκάλων, οι οποίες ενίοτε περιέχουν πολύ μεγάλες ποσότητες πλάσματος. Αρκετά συχνά οι φουσκάλες συσσωρεύουν και μεγάλες ποσότητες αίματος, ιδιαίτερα όταν εντοπίζονται στην περιοχή του ματιού, με αποτέλεσμα να επέρχεται θάνατος λόγω της εξασθενημένης καρδιακής λειτουργίας, η οποία λόγω της διαρροής του αίματος σε μια περιοχή τροφοδοτεί με ολόένα και χαμηλότερη πίεση τους ιστούς με αίμα. Η σοβαρότητα των επιπλοκών που προκαλούν οι φουσκάλες στην περιοχή του ματιού, υποστηρίζεται από την καθολική απουσία τους από την περιοχή αυτή σε ενήλικα ομόζυγα μεταλλάγματα.

Από την άλλη μεριά ο θάνατος του 50% των ενήλικων ποντικών *Fras1*<sup>-/-</sup> τον πρώτο μήνα της ζωής τους, μπορεί να οφείλεται στην λειτουργική ανεπάρκεια διαφόρων οργάνων τους. Κι αυτό γιατί το *Fras1* θα μπορούσε να συμβάλλει στην ακεραιότητα της δομής ή της σύστασης των βασικών ελασμάτων πολλών επιθηλιακών οργάνων (σε αναλογία με το βασικό έλασμα του δέρματος) και κατ' επέκταση στις καθοριστικές για την ανάπτυξη τους επιθήλιο-μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις. Τα όργανα για τα οποία υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορούν να επηρεάζονται είναι, **α)** τα νεφρά και **β)** οι πνεύμονες. Σε κάποιες περιπτώσεις (λόγω στοχαστικών γεγονότων), οι αλλοιώσεις στις δομές των νεφρών και των πνευμόνων (που είναι καθολικές στα *Fras1*<sup>-/-</sup> ενήλικα ποντίκια) μπορεί να είναι

καθοριστικές για την επιβίωση των ποντικών. Τα ομόζυγα μεταλλαγμένα ζώα σ' αυτή την περίπτωση πεθαίνουν, είτε λόγω νεφρικής ανεπάρκειας, είτε λόγω αναπνευστικών προβλημάτων, με επακόλουθο την κυάνωση. Επιπρόσθετα, στα *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντίκια ενδέχεται να προκύπτουν παθολογικές καταστάσεις λόγω προβλημάτων στα επιθήλια του γαστροεντερικού και αναπνευστικού τους συστήματος (σημειώνεται ότι έχει παρατηρηθεί στένωση του αεραγωγού σε μία περίπτωση *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικού). Εκτός από ανωμαλίες στις επιθηλιομεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις για την ανάπτυξη των παραπάνω οργάνων, οι παρατηρούμενες διαταραχές μπορεί να οφείλονται στην ύπαρξη μικροφουσκάλων στα επιθηλιακά τους στρώματα, που τελικά εμποδίζουν τις λειτουργίες της απέκκρισης, της αναπνοής και την ικανότητα πέψης της τροφής.

Η διατήρηση της έκφρασης του *Fras1* στα ενήλικα στάδια στην περιοχή του εγκεφάλου και η εμφάνιση *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών με υπερκινητικά προβλήματα, υποδηλώνει ότι ο θάνατος τους σε κάποιες περιπτώσεις πιθανόν να οφείλεται σε εγκεφαλικές διαταραχές. Ανάλογα η παρατήρηση *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών με μυϊκές δυσλειτουργίες και η ανίχνευση του *Fras1* στο εσωτερικό ποικίλων μυών, αφήνει υπόνοιες για αναστολή της λειτουργίας ζωτικών μυών.

Εναλλακτικά τα νεογέννητα *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντίκια, λόγω της αρχικά καθυστερημένης ανάπτυξης τους, χαρακτηρίζονται και από μειωμένη ικανότητα πρόσληψης τροφής σε σχέση με τα αγρίου τύπου ή ετερόζυγα ζώα, γεγονός που σταδιακά θα μπορούσε να οδηγήσει κάποια από αυτά στο θάνατο.

### **I.1.6 Συσχετισμός της απενεργοποίησης του *Fras1* με το μετάλλαγμα “Blebbbed” στον ποντικό και με το σύνδρομο Fraser στον άνθρωπο**

Η εύρεση της χρωμοσωμικής θέσης του γονιδίου *Fras1* στο γονιδίωμα του ποντικού βοήθησε καθοριστικά στην συσχέτιση του με το υπάρχον μετάλλαγμα “Blebbbed” (bl).

Το μετάλλαγμα “Blebbbed” αποτελεί μία κατηγορία των μεταλλαγών ‘Bleb’ στο ποντίκι, οι οποίες παρουσιάζουν παρόμοιους φαινοτύπους, που χαρακτηρίζονται από την παρουσία φουσκάλων (blebs/blisters) κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευθεί στο ποντίκι 5 μεταλλαγές ‘Bleb’, η “Blebbbed” (bl), η “Eye-blebs” (eb), η “Head bleb” (heb), η “Myelencephalic blebs” (my) και η “Fetal haematomata” (fh). Οι μεταλλαγές ‘Bleb’ χαρτογραφούνται σε διαφορετικά χρωμοσώματα (πίνακας 2), επιδεικνύουν πάντοτε ανωμαλίες στις περιοχές των ματιών και των κάτω άκρων, είναι υπολειπόμενες και εμφανίζουν ποικίλη διεισδυτικότητα και εκφραστικότητα. Ειδικότερα τα μεταλλάγματα “Blebbbed”, εκτός από τις ανωμαλίες στις περιοχές των ματιών και στα κάτω άκρα, παρουσιάζουν και προβλήματα στα νεφρά (Winter RM, 1990; Darling, S., and Gossler, A., 1994).

Κατά συνέπεια το *Fras1* είναι πιθανότατα το γονίδιο το οποίο επηρεάζεται στην μεταλλαγή bl. Από τη μια μεριά το μετάλλαγμα αυτό χαρτογραφείται, μαζί με μια σειρά από άλλα μεταλλάγματα, στο χρωμόσωμα 5, κοντά στον γενετικό τόπο *Fgf5* που χαρτογραφείται και το *Fras1*. Από την άλλη μεριά παρατηρείται φαινοτυπική ταύτιση των *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών με τα μεταλλάγματα “Blebbbed”.

Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε από την απώλεια έκφρασης, στα ομόζυγα “Blebbbed” ποντίκια, της πρωτεΐνης *Fras1*, σε αντίθεση με άλλους μάρτυρες του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας που εξακολουθούν να ανιχνεύονται. Ταυτόχρονα, η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου *Fras1* σε αρκετά μεταλλάγματα “Blebbbed” (McGregor L *et al.*, 2003), κατέληξε στην ανίχνευση ενός είδους μεταλλαγής στο γονίδιο *Fras1*. Η συγκεκριμένη μεταλλαγή δημιουργεί ένα πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού και συμβάλλει στην απομάκρυνση 1810 αμινοξέων από το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης *Fras1*.

Οι διαταραχές στα άκρα και στα μάτια που παρουσιάζονται στα ποντίκια Bleb, πιστεύεται ότι οφείλονται στις μηχανικές παρεμβολές που προκαλούν οι φουσκάλες τους, οι οποίες όμως δεν μπορούν να δικαιολογήσουν τα διάφορα άλλα συμπτώματα που ανακύπτουν (Winter RM, 1990; Darling, S., and Gossler, A., 1994). Όσον αφορά τα γονίδια στα οποία οφείλονται οι μεταλλαγές ‘Bleb’, αυτά είτε εμπλέκονται σε διαφορετικά στάδια του ίδιου ή πολύ παρόμοιων μονοπατιών, είτε αποτελούν μία καινούργια οικογένεια γονιδίων (Winter RM, 1990; Darling, S., and Gossler, A., 1994). Η εύρεση του γονιδίου *Fras1* μπορεί να συμβάλλει στην ανίχνευση και των υπολοίπων γονιδίων ‘Bleb’ και στην εξακρίβωση του αν είναι ομόλογα ή εντελώς διαφορετικά γονίδια. Εκτός από τον κλασσικό τρόπο κλωνοποίησης των υπόλοιπων γονιδίων

Mutant Phenotype								
Mutation	Eye	Foot	Kidney	Skin/ Hair	Cranio facial	CNS	Mouse Chromosome location	Possible Region(s) of homology in humans
Blebbled (bl)	+	+	+	+	-	-	5	4p/4q
Eye-blebs (eb)	+	+	+	-	-	-	10	Not mapped
Fetal haematoma (fh)	+	+	-	-	-	-	Not known	Not mapped
Head bleb (heb)	+	+	-	-	+	-	4	1p/9
Myelencephalic Blebs (my)	+	+	+	+	+	+	3	4q

+ , abnormality present; - , abnormality absent

## Πίνακας 2: Μεταλλαγές 'Bleb' στο ποντίκι

'Bleb', η ανίχνευση τους μπορεί να γίνει και *in silico*. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιείται το τελευταίο διάστημα στο εργαστήριο, διερεύνηση των βάσεων δεδομένων για τον εντοπισμό τμημάτων DNA στον ποντικό που παρουσιάζουν ομολογία με περιοχές του *Fras1*. Στη συνέχεια θα ελεγχθούν οι χρωμοσωμικές περιοχές χαρτογράφησης των τμημάτων αυτών, προκειμένου να διαπιστωθεί αν κάποια από αυτά μπορούν να συσχετιστούν με τα υπόλοιπα γονίδια 'Bleb'.

Βασίζόμενος στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των μεταλλαγών 'Bleb', καθώς και στα ιστολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Fraser, ο R. Winter υπέθεσε το 1998, ότι ένα ή και περισσότερα από τα μεταλλάγματα 'Bleb' είναι δυνατόν να αποτελούν μοντέλο εργασίας για το σύνδρομο αυτό στον άνθρωπο (Winter RM, 1998; Winter RM, 1990).

Το σύνδρομο Fraser είναι μία σπάνια γενετική ασθένεια (με συχνότητα 1/10.000), η οποία χαρακτηρίζεται σχεδόν πάντα από κρυπτοφθαλμία (μερική ή ολική συγγώνευση των βλεφάρων), πολύ συχνά από δερματική συνδακτυλία και συνήθως από νεφρική δυσπλασία ή από μονόπλευρη ή αμφίπλευρη νεφρική αγενεσία. Στους ασθενείς με σύνδρομο Fraser παρατηρούνται επίσης παραμορφώσεις στα γεννητικά όργανα, λαρυγγική ατρησία (laryngial atresia), ή στένωση (stenosis), κρανιοπροσωπικές και ακουστικές ανωμαλίες, πνευματική καθυστέρηση και μυοσκελετικές ανωμαλίες. Τονίζεται ότι το 25% των ασθενών με σύνδρομο Fraser πεθαίνει στη γέννηση, ενώ το 20% τον πρώτο χρόνο της ζωής τους (Slavotinek AM, and Tiffit CJ, 2002). Εκτός από τις φαινοτυπικές ομοιότητες των μεταλλαγών 'Bleb' με το σύνδρομο Fraser και τα δύο παρουσιάζουν υπολειπόμενη κληρονομικότητα, καθώς και ποικιλία στην διεισδυτικότητα και στην εκφραστικότητα του φαινοτύπου τους και επηρεάζονται από το γενετικό τους υπόβαθρο. Βέβαια από τη στιγμή που το σύνδρομο Fraser δεν έχει χαρτογραφηθεί γενετικά και καμιά από τις μεταλλαγές 'Bleb' δεν έχει αναλυθεί στο μοριακό επίπεδο, πρέπει να αποδειχθεί ότι τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στην εκδήλωση του συνδρόμου Fraser (Winter RM, 1990; Darling, S., and Gossler, A., 1994). Από τη στιγμή που τα γονίδια αυτά κλωνοποιηθούν θα είναι εύκολη η απομόνωση των αντίστοιχων ανθρώπινων γονιδίων και ο έλεγχος της ύπαρξης μεταλλαγών σε ασθενείς με σύνδρομο Fraser.

Με βάση λοιπόν την υπόθεση ότι οι μεταλλαγές 'Bleb' αποτελούν μοντέλο εργασίας για το σύνδρομο Fraser και την διαπίστωση ότι το γονίδιο *Fras1* είναι υπεύθυνο για την μεταλλαγή bl, υποστηρίζεται ότι τα συμπτώματα του συνδρόμου Fraser οφείλονται σε μεταλλαγές στο ανθρῶπινο ομόλογο του *Fras1*. Το γεγονός αυτό ενισχύεται από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ενήλικων *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών που περιλαμβάνουν την κρυπτοφθαλμία, την συνδακτυλία και την νεφρική αγενεσία ή δυσπλασία και τα οποία αποτελούν τα κυριότερα συμπτώματα του συνδρόμου Fraser. Από την άλλη μεριά η εύρεση μεταλλαγών (έξι διαφορετικών) εντός του *FRAS1*, δηλαδή στο ανθρώπινο ομόλογο του γονιδίου *Fras1* (McGregor L *et al.*, 2003), επιβεβαιώνει την καινούργια αυτή υπόθεση. Οι παρατηρούμενες μεταλλαγές (σημειακές ή ένθεσης) προκαλούν πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης της παραγόμενης πρωτεΐνης και εντοπίζονται στην περιοχή της *FRAS1* μετά τα μοτίβα των κυστεινών.



Η εμπλοκή του γονιδίου *Fras1* στο σύνδρομο Fraser διευκολύνει την απαρχή της κατανόησης αυτού του συνδρόμου στο μοριακό επίπεδο. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα δεν ενισχύεται η υπάρχουσα αντίληψη ότι το σύνδρομο Fraser οφείλεται σε αποπτωτικές διαταραχές. Εναλλακτικά υποστηρίζεται η άποψη ότι τα προβλήματα που παρουσιάζονται στο σύνδρομο Fraser οφείλονται σε διαταραχές του εξωκυττάριου χώρου που υπόκειται της βασικής πλευράς των επιθηλίων, οι οποίες επηρεάζουν τις απαραίτητες για την ανάπτυξη επιθηλιο-μεσεγχυματικές και επιθηλιακές αλληλεπιδράσεις.

Οι παραπάνω μελέτες, μέσω της ανακάλυψης όλο και περισσότερων μεταλλαγών στο *FRAS1*, θα μπορούσαν μελλοντικά να συμβάλλουν στην πρόγνωση και στην προγενετική διάγνωση του συνδρόμου Fraser, αλλά και στην γονιδιακή του θεραπεία. Τέλος το ζωικό μοντέλο των *Fras1*<sup>-/-</sup> ποντικών για αυτό το σύνδρομο, μπορεί να βοηθήσει αποφασιστικά στον έλεγχο των πιθανών τρόπων θεραπείας πριν αυτές δοκιμαστούν στους ασθενείς.

## **Βιβλιογραφία**

**Aberdam D**, Virolle T, Simon-Assmann P. Transcriptional regulation of laminin gene expression. *Microsc Res Tech.* 2000, Nov 1;51(3):228-37.

**Alcorn D**, Maric C, McCausland J. Development of the renal interstitium. *Pediatr Nephrol.* 1999 May;13(4):347-54.

**Andrä Kerstin**, Lassmann Hans, Bittner Reginald, Shorny Sigrid, Fässler Reinhard, Propst Friedrich, and Wiche Gerhard. Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes Dev.* Vol. 11, No. 23, pp. 3143-3156, December 1, 1997.

**Arias AM** (2001). Epithelial mesenchymal interactions in cancer and development. *Cell.* May, 18;105(4):425-31.

**Arin Meral J.** and Roop Dennis R. Disease model: heritable skin blistering. *TRENDS in Molecular Medicine.* Vol.7, No.9 September 2001, p.422.

**Aszodi A**, Pfeifer A, Wendel M, Hiripi L, Fassler R. Mouse models for extracellular matrix diseases. *J Mol Med.* 1998, Mar;76(3-4):238-52.

**Aumailley Monique**, Rousselle Patricia. Laminins of the dermo-epidermal junction. *Matrix Biology.* 1999, 18, 19-28.

**Bader BL**, Rayburn H, Crowley D, Hynes RO. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell.* 1998, Nov 13;95(4):507-19.

**Baloh RH**, Enomoto H, Johnson EM Jr, Milbrandt J. The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol.* 2000, Feb;10(1):103-10.

**Belkin AM**, Stepp MA. Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech.* 2000 Nov 1;51(3):280-301.

**Bergeron F**, Leduc R, Day R. Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J Mol Endocrinol.* 2000, Feb;24(1):1-22.

**Bissell Mina J.** and Radisky Derek. Putting tumours in context. *Nature /Reviews/Cancer.* October 2001, Volume 1, 46-54.

**Bonaldo P**, Braghetta P, Zanetti M, Piccolo S, Volpin D, Bressan GM. Collagen VI deficiency induces early onset myopathy in the mouse: an animal model for Bethlem myopathy. *Hum Mol Genet.* 1998, Dec;7(13):2135-40.

**Borradori L**, Sonnenberg A (1996). Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling and human diseases. *Curr Opin Cell Biol.* Oct;8(5):647-56.

**Boudreau N**, Bissell MJ. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr Opin Cell Biol.* 1998, Oct;10(5):640-6.

**Brakebusch C**, Grose R, Quondamatteo F, Ramirez A, Jorcano JL, Pirro A, Svensson M, Herken R, Sasaki T, Timpl R, Werner S, Fassler R. Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta 1 integrin expression on keratinocytes. *EMBO J.* 2000, Aug 1;19(15):3990-4003.

**Bruckner-Tuderman Leena** (1999). Hereditary skin diseases of anchoring fibrils. *Journal of Dermatological Science.* 20, 122–133.

**Bruckner-Tuderman L**, Bruckner P. (1998) Genetic diseases of the extracellular matrix: more than just connective tissue disorders. *J Mol Med.* 1998 Mar;76(3-4):226-37.

**Bruckner-Tuderman Leena**, Hopfner Bianca, Hammami-Hauasli Nadja. Biology of anchoring fibrils: lessons from dystrophic epidermolysis bullosa. *Matrix Biology.* 18, 1999, 43-54.

**Burgeson RE**, Christiano AM (1997). The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol.* Oct;9(5):651-8.

**Burrow Christopher R.** (2000). Regulatory molecules in kidney development. *Pediatr. Nephrol.* 14:240–253.

**Carbonetto S**, Lindenbaum M. The basement membrane at the neuromuscular junction: a synaptic mediatrix. *Curr Opin Neurobiol.* 1995 Oct;5(5):596-605.

**Carroll JM**, Luetkeke NC, Lee DC, Watt FM. Role of integrins in mouse eyelid development: studies in normal embryos and embryos in which there is a failure of eyelid fusion. *Mech Dev.* 1998, Nov;78(1-2):37-45.

**Chamberlain Jeffrey** (1999). The dynamics of dystroglycan. *Nature Genetics.* November, Volume 23.

**Chan LS** (1997). Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases. *Front Biosci.* 1997, Jul 15;2:d343-352.

**Chang Chieh** and Werb Zena. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in Cell Biology.* Volume 11, Issue 11, 1 November 2001, Pages S37-S43.

**Clark Amander T.**, and Bertram John F.. Molecular regulation of nephron endowment. *The American Physiological Society.* 1999, 485-497.

**Cohn RD**, Henry MD, Michele DE, Barresi R, Saito F, Moore SA, Flanagan JD, Skwarchuk MW, Robbins ME, Mendell JR, Williamson RA, Campbell KP. Disruption of DAG1 in differentiated skeletal muscle reveals a role for dystroglycan in muscle regeneration. *Cell.* 2002 Sep 6;110(5):639-48.

**Copeland NG**, Jenkins NA, Court DL. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet.* 2001, Oct;2(10):769-79.

**Cosgrove D**, Meehan DT, Grunkemeyer JA, Kornak JM, Sayers R, Hunter WJ, Samuelson GC. Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev.* 1996, Dec 1;10(23):2981-92.

**Costell M**, Gustafsson E, Aszodi A, Morgelin M, Bloch W, Hunziker E, Addicks K, Timpl R, Fassler R. Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol.* 1999, Nov 29;147(5):1109-22.

**Darling, S.**, and Gossler, A., (1994). A mouse model for Fraser syndrome ? *Clin. Dysmorph.* 3, 91-95.

**Dennis Carina**, (2002). news feature: Mouse genome: A forage in the junkyard. *Nature* 420, 05 December, 458 – 459.

**De Strooper B**, Creemers JW, Moechars D, Huylebroeck D, Van De Ven WJ, Van Leuven F, Van den Berghe H. Amyloid precursor protein is not processed by furin, PACE 4, PC1/3, PC2, PC4 and PC5/6 of the furin family of proprotein processing enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1995, Jan 19;1246(2):185-8.

**DiPersio CM**, Hodivala-Dilke KM, Jaenisch R, Kreidberg JA, Hynes RO. Alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *J Cell Biol.* 1997, May 5;137(3):729-42.

**Dressler GR** (1999). Kidney development branches out. *Dev Genet.* 24(3-4):189-93

**Dunker N**, Schmitt K, Krieglstein K. TGF-beta is required for programmed cell death in interdigital webs of the developing mouse limb. *Mech Dev.* 2002 May;113(2):111-20.

**Ekblom P** (1996). Receptors for laminins during epithelial morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* Oct;8(5):700-6.

**Fassler R**, Georges-Labouesse E, Hirsch E. Genetic analyses of integrin function in mice. *Curr Opin Cell Biol.* 1996, Oct;8(5):641-6.

**Flugel-Koch C**, Ohlmann A, Piatigorsky J, Tamm ER. Disruption of anterior segment development by TGF-beta1 overexpression in the eyes of transgenic mice. *Dev Dyn.* 2002 Oct;225(2):111-25.

**Fuchs Elaine** and Raghavan Srikala. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature Reviews /Genetics.* Volume 3, March 2002, 199-209.

**Ganz T** (2002). Epithelia: not just physical barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, Mar 19;99(6):3357-8.

**Georges-Labouesse E**, Messaddeq N, Yehia G, Cadalbert L, Dierich A, Le Meur M. Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat Genet.* 1996, Jul;13(3):370-3.

**Graham Patricia L.**, Johnson Jeffrey J., Wang Shaoru, Sibley Marion H., Gupta Malini C., and Kramer James M.. Type IV Collagen Is Detectable in Most, but Not All, Basement Membranes of *Caenorhabditis elegans* and Assembles on Tissues That Do Not Express It. *The Journal of Cell Biology*. Volume 137, Number 5, June 2, 1997 1171–1183.

**Green MC** (1989). Catalog of mutant genes and polymorphic loci. In MF Lyon, AG Searle (eds): “Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse” 2nd Edition. Oxford University Press.

**Guerini D.** (1998). The Ca<sup>2+</sup> pumps and the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers. *Biometals* 11, 319-330.

**Gustafsson E**, Fassler R. (2000) Insights into extracellular matrix functions from mutant mouse models. *Exp Cell Res*. Nov 25;261(1):52-68.

**Haberkorn U**, Altmann A, Eisenhut M. Functional genomics and proteomics-the role of nuclear medicine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002, Jan;29(1):115-32.

**Heinonen Seppo**, Männikkö Minna, Klement John F., Whitaker-Menezes Diana, Murphy George F. and Uitto Jouni. Targeted inactivation of the type VII collagen gene (*Col7a1*) in mice results in severe blistering phenotype: a model for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Journal of Cell Science*. (1999), 112, 3641-3648.

**Hodivala-Dilke KM**, DiPersio CM, Kreidberg JA, Hynes RO. Novel roles for alpha3beta1 integrin as a regulator of cytoskeletal assembly and as a trans-dominant inhibitor of integrin receptor function in mouse keratinocytes. *J Cell Biol*. 1998, Sep 7;142(5):1357-69.

**Hodor PG**, Illies MR, Broadley S, Etensohn CA. Cell-substrate interactions during sea urchin gastrulation: migrating primary mesenchyme cells interact with and align extracellular matrix fibers that contain ECM3, a molecule with NG2-like and multiple calcium-binding domains. *Dev Biol*. 2000 Jun 1;222(1):181-94.

**Hood John D.** and Cheresch David A.. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Reviews Cancer*. Volume 2, February 2002, 91-100.

**Hopf Michael**, Göhring Walter, Ries Albert, Timpl Rupert and Hohenester Erhard. Crystal structure and mutational analysis of a perlecan-binding fragment of nidogen-1. *Nature Structural Biology*. July 2001, volume 8, number 7.

**Horster M**, Huber S, Tschop J, Dittrich G, Braun G. Epithelial nephrogenesis. *Pflugers Arch*. 1997, Nov;434(6):647-60.

**Horster MF**, Braun GS, Huber SM. Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1157-91.

**Hutter H**, Vogel BE, Plenefisch JD, Norris CR, Proenca RB, Spieth J, Guo C, Mastwal S, Zhu X, Scheel J, Hedgecock EM. Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science*. 2000, Feb 11;287(5455):989-94.

**Hynes RO** (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. Sep 20;110(6):673-87.

**Jena N**, Martin-Seisdedos C, McCue P, Croce CM. BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye. *Exp Cell Res*. 1997, Jan 10;230(1):28-37.

**Jones JC**, Dehart GW, Gonzales M, Goldfinger LE. Related Articles, Links  
Laminins: an overview. *Microsc Res Tech*. 2000 Nov 1;51(3):211-3.

**Josso N**, di Clemente N. Serine/threonine kinase receptors and ligands. *Curr Opin Genet Dev*. 1997, Jun;7(3):371-7.

**Juriloff DM**, Harris MJ, Banks KG, Mah DG. Gaping lids, gp, a mutation on centromeric chromosome 11 that causes defective eyelid development in mice. *Mamm Genome*. 2000, Jun;11(6):440-7.

**Kaufman M. H**, 1994. Atlas of mouse development. Academic Press.

**Keene DR**, Marinkovich MP, Sakai LY. Immunodissection of the connective tissue matrix in human skin. *Microsc Res Tech*. 1997 Aug 15;38(4):394-406.

**Khalil Nasreen**. TGF- $\beta$ :from latent to active. *Microbes and Infection*, 1, 1999, 1255-1263.

**Ko MS**. Embryogenomics: developmental biology meets genomics. *Trends Biotechnol*. 2001 Dec;19(12):511-8.

**Kreidberg JA**, Donovan MJ, Goldstein SL, Rennke H, Shepherd K, Jones RC, Jaenisch R. Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development*. 1996, Nov;122(11):3537-47.

**Kuure S**, Vuolteenaho R, Vainio S. Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech Dev*. 2000 Mar 15;92(1):31-45.

**Larrain J**, Bachiller D, Lu B, Agius E, Piccolo S, De Robertis EM. (2000). BMP-binding modules in chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space. *Development*. Feb;127(4):821-30.

**Larrain Juan**, Oelgeschläger Michael, Ketpura Nan I., Reversade Bruno, Zakin Lise, and De Robertis E. M.. Proteolytic cleavage of Chordin as a switch for the dual activities of Twisted gastrulation in BMP signalling. *Development* 2001, 128: 4439-4447.

**Leivo Tomi**. Basement membrane zone proteins, epithelial integrins and TGF- $\beta$  system in reepithelialization, dermatitis herpetiformis and psoriasis. Modulation by isotretinoin, betamethasone and calcipotriol. Thesis Oulu University Library, 2000.

**Li C**, Guo H, Xu X, Weinberg W, Deng CX. Fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) plays an important role in eyelid and skin formation and patterning. *Dev Dyn*. 2001, Nov;222(3):471-83.

**Leu-Fen H. Lin** (1996). Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) : A Comprehensive Review. *Neural Notes*. Volume 11. Issue 3, 3-7.

**Liddington Robert C.** (2001). Mapping out the basement membrane. *Nature Structural Biology*. July, Volume 8, number 7, 573-574.

**Lussier C,** Basora N, Bouatrouss Y, Beaulieu JF. Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa. *Microsc Res Tech*. 2000, Oct 15;51(2):169-78.

**Matsui Masaru,** Mizuseki Kenji, Nakatani Jin, Nakanishi Shigetada, and Sasai Yoshiki. Xenopus Kielin: A dorsalizing factor containing multiple chordin-type repeats secreted from the embryonic midline. *PNAS*. (2000), 97: 5291-5296;  
**Mech Dev. 2000 Mar 15;92(1):31-45.**

**McCallum T,** Milunsky J, Munarriz R, Carson R, Sadeghi-Nejad H, Oates R. Unilateral renal agenesis associated with congenital bilateral absence of the vas deferens: phenotypic findings and genetic considerations. *Hum Reprod*. 2001, Feb;16(2):282-8.

**McCright B,** Gao X, Shen L, Lozier J, Lan Y, Maguire M, Herzlinger D, Weinmaster G, Jiang R, Gridley T. Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation. *Development*. 2001, Feb;128(4):491-502.

**McGowan KA,** Marinkovich MP. Laminins and human disease. *Microsc Res Tech*. 2000 Nov 1;51(3):262-79.

**McGregor L,** Makela V, Darling S M, Vrontou S, Chalepakis G, Roberts C, Smart N, Rutland P, Prescott N, Hopkins J, Bentley E, Shaw A, Roberts E, Mueller R, Jadeja S, Philip N, Nelson J, Francannet C, Perez-Aytes A, Megarbane A, Kerr B, Wainwright B, Woolf A S, Winter R M & Scambler P J. Fraser syndrome and mouse blebbed phenotype caused by mutations in FRAS1/Fras1 encoding a putative extracellular matrix protein. *Nature Genetics*, June 2003. Volume 34, Number 2, 203-208.

**Miner JH,** Sanes JR. Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications for Alport syndrome. *J Cell Biol*. 1996, Dec;135(5):1403-13.

**Miosge N** (2001). The ultrastructural composition of basement membranes in vivo. *Histol Histopathol*. Oct;16(4):1239-48.

**Moore MW,** Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carver-Moore K, Rosenthal A. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*. 1996, Jul 4;382(6586):76-9.

**Mouellic, H.L.,** Lallemand, Y., and Brulet, P. (1990). Targeted replacement of the Homeobox gene Hox-3.1 by the Escherichia coli LacZ in mouse chimeric embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4712-4716.

**Muller U**, Wang D, Denda S, Meneses JJ, Pedersen RA, Reichardt LF. Integrin alpha8beta1 is critically important for epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis. *Cell*. 1997 Mar 7;88(5):603-13.

**Nakamura T**, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S, Cheng CF, Kobuke K, Dalton N, Takada Y, Tashiro K, Ross Jr J, Honjo T, Chien KR. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature*. 2002 Jan 10;415(6868):171-5.

**Nelson WJ**, Yeaman C. Protein trafficking in the exocytic pathway of polarized epithelial cells. *Trends Cell Biol*. 2001, Dec;11(12):483-6.

**Nishiyama, A.**, Dahlin, K.J., Price, J.T., Johnstone, S.R., and Stallcup, W.B. (1991). The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan. *J. Cell Biol.* 114, 359-371.

**O'Brien Lucy Erin**, Zegers Mirjam M. P. and Mostov Keith E.. Building epithelial architecture:insights from three-dimensional culture models. *Nature Reviews /Molecular Cell Biology*. Volume 3, July 2002, 531-537.

**Patton Bruce L.** (2000). Laminins of the Neuromuscular System. *Microscopy Research and Technique*. 51:247-261.

**Pichel JG**, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ, Sariola H, Westphal H. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature*. 1996, Jul 4;382(6586):73-6.

**Pluschke Gerd**, Vanek Miroslava, Evans Amanda, Dittmar Tanja, Schmid Peter, Itin Peter, Filardo Edward J., and Reisfeld Ralph A.. Molecular cloning of a human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *PNAS*. (1996), 93: 9710-9715.

**Pluschke, G.**, Vanek, M., Evans, A., Dittmar, T., Schmid, P., Itin, P., Filardo, E.J., and Reisfeld, R.A. (1996). Molecular cloning of a human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9710-9715.

**Pulkkinen Leena**, Uitto Jouni. Mutation analysis and molecular genetics of epidermolysis bullosa. *Matrix Biology*. 1999, 18, 29-42.

**Raghavan S**, Bauer C, Mundschau G, Li Q, Fuchs E. Conditional ablation of beta1 integrin in skin. Severe defects in epidermal proliferation, basement membrane formation, and hair follicle invagination. *J Cell Biol*. 2000, Sep 4;150(5):1149-60.

**Raghunath M**, Unsold C, Kubitscheck U, Bruckner-Tuderman L, Peters R, Meuli M. The cutaneous microfibrillar apparatus contains latent transforming growth factor-beta binding protein-1 (LTBP-1) and is a repository for latent TGF-beta1. *J Invest Dermatol*. 1998 Oct;111(4):559-64.

**Reneker LW**, Silversides DW, Xu L, Overbeek PA. Formation of corneal endothelium is essential for anterior segment development - a transgenic mouse model of anterior segment dysgenesis. *Development*. 2000 Feb;127(3):533-42.



**Roebroek, A.J.M.**, Creemers, J.W.M., Pauli, I.G.L., Kurzik-Dumke, U., Rentrop, M., Gateff, E.A.F., Leunissen, J.A.M., and Van de Ven, W.J.M. (1992). Cloning and functional expression of Dfurin2, a Subtilisin-like proprotein processing enzyme of *Drosophila melanogaster* with multiple repeats of a cysteine motif. *J. Biol. Chem.* 267, 17208-17215.

**Roebroek, A.J.M.**, Creemers, J.W.M., Ayoubi, TAY., Van de Ven, WJM. (1994). Furin mediated proprotein processing activity: Involvement of negatively charged amino acid residues in the substrate binding region. *Biochimie.* 76, 210-216.

**Rosen ED**, Chan JC, Idusogie E, Clotman F, Vlasuk G, Luther T, Jalbert LR, Albrecht S, Zhong L, Lissens A, Schoonjans L, Moons L, Collen D, Castellino FJ, Carmeliet P. Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. *Nature.* 1997, Nov 20;390(6657):290-4.

**Ryan Maureen C.**, Lee Keesook, Miyashita Yuko, and Carter William G. Targeted Disruption of the LAMA3 Gene in Mice Reveals Abnormalities in Survival and Late Stage Differentiation of Epithelial Cells. *The Journal of Cell Biology.* Volume 145, Number 6, June 14, 1999 1309–1323.

**Sarma M** (2000). GDNF - a stranger in the TGF-beta superfamily? *Eur J Biochem.* Dec;267(24):6968-71.

**Sadler, J.E.** (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 395-424.

**Sanchez MP**, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature.* 1996, Jul 4;382(6586):70-3.

**Sariola H**, Sainio K. The tip-top branching ureter. *Curr Opin Cell Biol.* 1997, Dec;9(6):877-84.

**Schedl Andreas** and Hastie Nicholas D. Cross-talk in kidney development. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2000, 10:543–549.

**Schwarz, E.M.**, and Benzer, S. (1997). Calx, a Na-Ca exchanger gene in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10249-10254.

**Seitz CS**, Giudice GJ, Balding SD, Marinkovich MP, Khavari PA. BP180 gene delivery in junctional epidermolysis bullosa. *Gene Ther.* 1999, Jan;6(1):42-7.

**Slavotinek AM**, and Tifft CJ. Fraser syndrome and cryptophthalmos: review of the diagnostic criteria and evidence for phenotypic modules in complex malformation syndromes. *J Med Genet* 2002 Sep;39(9):623-33.

**Smith RS**, Zabaleta A, Savinova OV, John SW. The mouse anterior chamber angle and trabecular meshwork develop without cell death. *BMC Dev Biol.* 2001;1(1):3.

**Spirito F**, Chavanas S, Prost-Squarcioni C, Pulkkinen L, Freitag S, Bodemer C, Ortonne JP, Meneguzzi G. Reduced expression of the epithelial adhesion ligand laminin 5 in the skin causes intradermal tissue separation. *J Biol Chem.* 2001, Jun 1;276(22):18828-35.

**Stepp, M.A.** (1999). A9 and  $\beta 8$  integrin expression correlates with the merger of the developing eyelids. *Dev. Dyn.* 214, 216-228.

**Swiergiel, J.J.**, Funderburgh, J.L., Justice, M.J., and Conrad, G.W. (2000). Developmental eye and neural tube defects in the Eye Blebs mouse. *Dev. Dyn.* 219, 21-27.

**Taipale J**, Keski-Oja J. (1997). Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* Jan;11(1):51-9

**Teller Inga C.** and Jean-Francois Beaulieu. Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 28 September 2001, 1-18.

**Teraishi, T.**, and Yoshioka, M. (2001). Electron-microscopic and immunohistochemical studies of eyelid reopening in the mouse. *Anat. Embryol.* 2004, 101-107.

**Thiery Jean Paul** (2002). Epithelial-Mesenchymal Transitions in tumour progression. *Nature Reviews/Cancer.* Volume 2, June, 442-454

**Tillet E**, Ruggiero F, Nishiyama A, Stallcup WB. (1997). The membrane-spanning proteoglycan NG2 binds to collagens V and VI through the central nonglobular domain of its core protein. *J Biol Chem.* 1997 Apr 18;272(16):10769-76.

**Timpl Rupert**, Tisi Dominic, Talts Jan F., Andac Zeynep, Sasaki Takako, Hohenester Erhard. Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biology.* 2000, 19, 309-317.

**Timpl R** (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol.* Oct;8(5):618-24.

**Treanor JJ**, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE, Rosenthal A. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature.* 1996, Jul 4;382(6586):80-3.

**Tsiper MV**, Yurchenco PD. Laminin assembles into separate basement membrane and fibrillar matrices in Schwann cells. *J Cell Sci.* 2002, Mar 1;115(Pt 5):1005-15.

**Tunggal Patrick**, Smyth Neil, Paulsson Mats, and Ott Mark-Christoph. Laminins: Structure and Genetic Regulation. *Microscopy Research and Technique.* 51:214-227 (2000).

**Vize PD**, Seufert DW, Carroll TJ, Wallingford JB. Model systems for the study of kidney development: use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning. *Dev Biol.* 1997, Aug 15;188(2):189-204.

**Van der Neut R**, Cachaco AS, Thorsteinsdottir S, Janssen H, Prins D, Bulthuis J, van der Valk M, Calafat J, Sonnenberg A. Partial rescue of epithelial phenotype in integrin beta4 null mice by a keratin-5 promoter driven human integrin beta4 transgene. *J Cell Sci.* 1999, Nov;112 ( Pt 22):3911-22.

**Van der Neut R**, Krimpenfort P, Calafat J, Niessen CM, Sonnenberg A. Epithelial detachment due to absence of hemidesmosomes in integrin beta 4 null mice. *Nat Genet.* 1996, Jul;13(3):366-9.

**Vainio Seppo** and Lin Yanfeng. Coordinating early kidney development:Lessons from gene targeting. *Nature Reviews Genetics*, Volume 3, July, 2002

**Vu TH** (2001).Don't mess with the matrix. *Nat Genet.* Jul;28(3):202-3.

**Wallner Elisabeth I.**, Yang Qiwei, Peterson Darryl R., Wada Jun, and Kanwar Yashpal S.. Relevance of extracellular matrix, its receptors, and cell adhesion molecules in mammalian nephrogenesis. *The American Physiological Society.* 1998, 467-477.

**Wang Tsing-Hong**, Linsey James D., Weinreb Robert N.. Laminin isoform distribution in the human optic nerve head. *Exp. Eye Res.* (1996) 62, 121-125.

**Willem M**, Miosge N, Halfter W, Smyth N, Jannetti I, Burghart E, Timpl R, Mayer U. Specific ablation of the nidogen-binding site in the laminin gamma1 chain interferes with kidney and lung development. *Development.* 2002 Jun;129(11):2711-22

**Winter RM** (1988). Malformations syndromes; a review of mouse/human homology. *J. Med. Genet.* 25, 480-487

**Winter RM** (1990). Fraser syndrome and mouse "bleb" mutants. *Clin. Genet.* 37, 494-495.

**Yaspo Marie-Laure** (2001). Taking a functional genomics approach in molecular medicine. *Trends in Molecular Medicine.* Vol.7, November No.11, 494-502.

**Yanagisawa H**, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature.* 2002 Jan 10;415(6868):168-71

**Zhu Y**, Oganessian A, Keene DR, Sandell LJ. (1999) Type IIA procollagen containing the cysteine-rich amino propeptide is deposited in the extracellular matrix of prechondrogenic tissue and binds to TGF-beta1 and BMP-2. *J Cell Biol.* Mar 8;144(5):1069-80