

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΙΤΛΟΣ: ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ
FRAS1 ΣΤΟΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΕΜΒΡΥΩΝ
ΠΟΝΤΙΚΩΝ

ΦΟΙΤΗΤΗΣ: ΜΑΚΡΥΓΙΑΝΝΑΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΑΜ:1516
ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΧΑΛΕΠΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου κ.Χαλεπάκη που με δέχτηκε στο εργαστήριό του και με βοήθησε να εφαρμόσω στην πράξη ένα κομμάτι αυτών που είχα διδαχτεί αυτά τα τέσσερα χρόνια των σπουδών μου στο τμήμα Βιολογίας στο Πανεπιστήμιο Κρήτης. Επίσης τον ευχαριστώ εκ βαθέων για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθειά που μου προσέφερε σε οποιοδήποτε πρόβλημα αντιμετώπισα στην διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά την Τζένη Καλογεράκη για την τεράστια βοήθεια και καθοδήγησή της κατά της διάρκεια αυτής της εργασίας. Η παρέα της, εντός και εκτός εργαστηρίου ήταν πολύ σημαντική και νιώθω τυχερός που γνώρισα και συνεργάστηκα με ένα τόσο ταλαντούχο άτομο.

Ευχαριστώ τον Απόστολο Μακρυγιάννη για την βοήθεια και τις συζητήσεις του στο χώρο του εργαστηρίου.

Ευχαριστώ την οικογένειά μου που με βοηθάει και με στηρίζει σε όλους τους τομείς καθώς επίσης και τους φίλους μου και όλα τα σημαντικά πρόσωπα της ζωής μου, για την κατανόηση και την στήριξή τους με κάθε τρόπο σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου και της περιόδου που διήρκεσε η πτυχιακή μου εργασία.

Περίληψη

Η βασική μεμβράνη αποτελεί ένα εξωκυττάριο σχηματισμό που οριοθετεί τους ιστούς και λειτουργεί ως φραγμός για την ανεξέλεγκτη διέλευση μακρομορίων, παγιδεύοντας σηματοδοτικά μόρια και αυξητικούς παράγοντες. Σε αυτήν την περιοχή εντοπίζεται μια πρωτεΐνη του εξωκυττάρου χώρου, η Fras1 (Fraser syndrome protein 1), που κωδικοποιείται από το γονίδιο *Fras1*.

Η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται στην βασική μεμβράνη όλων των επιθηλιακών δομών του ποντικού κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Σε *Fras1*^{-/-} έμβρυα ποντικού παρατηρούνται υπο-επιδερμικές αιμορραγικές φουσκαλίδες στην κεφαλή και τα άκρα καθώς και δυσπλασία ή ακόμα και αγενεσία των νεφρών. Τα ενήλικα ποντίκια παρουσιάζουν συνδακτυλία και κρυπτοφθαλμία. Ο φαινότυπος αυτός εμφανίζεται και σε μια κατηγορία μεταλλαγμάτων ποντικού που ονομάζονται 'bleb'. Μια από τις 5 bleb μεταλλαγές, η *blebbed* έχει αποδοθεί στο γονίδιο *Fras1*. Επίσης, μεταλλάξεις του *Fras1* έχουν ανιχνευτεί σε ασθενείς με σύνδρομο Fraser.

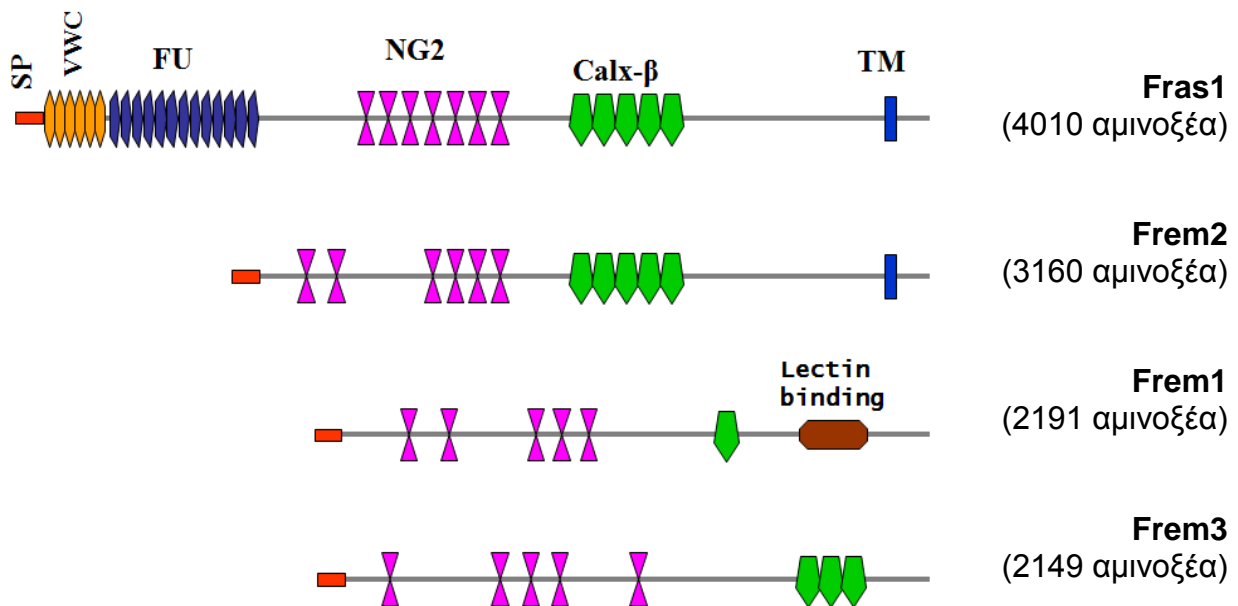
Το βασικό θέμα της εργασίας ήταν να ερευνήσουμε σε ποιές περιοχές εντοπίζεται η πρωτεΐνη Fras1 στον εγκέφαλο ποντικών. Πειράματα RNA in situ σε εγκεφάλους ενηλίκων ποντικών είχαν αποκαλύψει διάφορες περιοχές που εντοπίζεται το RNA του *Fras1* στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όπως ο αμυγδαλοειδής πυρήνας, ο ιππόκαμπος και ο φλοιός. Δεν ήταν όμως δυνατόν να εντοπιστεί η πρωτεΐνη Fras1 στις περιοχές αυτές.

Για τον εντοπισμό της Fras1 εκμεταλλευτήκαμε τα ποντίκια *Fras1*^{-/-} στα οποία το λειτουργικό γονίδιο *Fras1* έχει αντικατασταθεί από το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Συνεπώς, ανιχνεύοντας της πρωτεΐνη β-γαλακτοσιδάση εντοπίζουμε έμμεσα τα κύτταρα που συνθέτουν την Fras1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στον εγκέφαλο εμβρύων ποντικού η β-γαλακτοσιδάση ανιχνεύεται μόνο στο χοριοειδές πλέγμα.

Εισαγωγή

ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ *Fras1/Frem*

Το γονίδιο *Fras1* και τα ομόλογα του *Frem1*, *Frem2* και *Frem3*, κωδικοποιούν πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου. Ορθόλογα γονίδια των παραπάνω συναντώνται αποκλειστικά και μόνο σε όλους τους δευτεροστόμιους οργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, συναντώνται στα θηλαστικά, όπως τον άνθρωπο που φέρει τα *FRAS1*, *FREM1*, *FREM2* και *FREM3*, στα ερπετά, τα πτηνά, όπου δεν υπάρχει ομόλογο του *Frem3* και τον αχινό, ο οποίος φέρει το *ECM3* (extracellular matrix protein 3) που είναι ομόλογο της πρωτεΐνης *Frem2*.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των δομών των *Fras1/Frem* πρωτεϊνών. Το πεπτιδιο-σινιάλο (SP) διατηρείται σε όλες τις πρωτεΐνες της *Fras1/Frem* οικογένειας. Επιπλέον, σε όλες υπάρχουν περιοχές πρόσδεσης ασβεστίου (Galx-β) και CSPG-μοτίβα (Chondroitin Sulfate Proteoglycan) παρόμοια με αυτά της NG2 πρωτεογλυκάνης. Διαμεμβρανική περιοχή (TM) συναντάται στις πρωτεΐνες *Fras1* και *Frem2*, ενώ στη *Frem1* ανιχνεύεται ένα μοτίβο λεκτίνης τύπου C. Η πρωτεΐνη *Fras1* διαθέτει επίσης μια περιοχή με επαναλαμβανόμενα μοτίβα κυστεϊνών παρόμοια με αυτά της περιοχής C του παράγοντα von Willebrandt (VWC), καθώς επίσης και επαναλαμβανόμενα μοτίβα κυστεϊνης παρόμοια με αυτά των πρωτεασών φουρινών (FU).

Κύριο χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών της οικογένειας *Fras1/Frem* είναι ότι αποτελούνται από έναν μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων μοτίβων τα οποία συναντώνται και σε άλλες γνωστές πρωτεΐνες (εικ. 1).

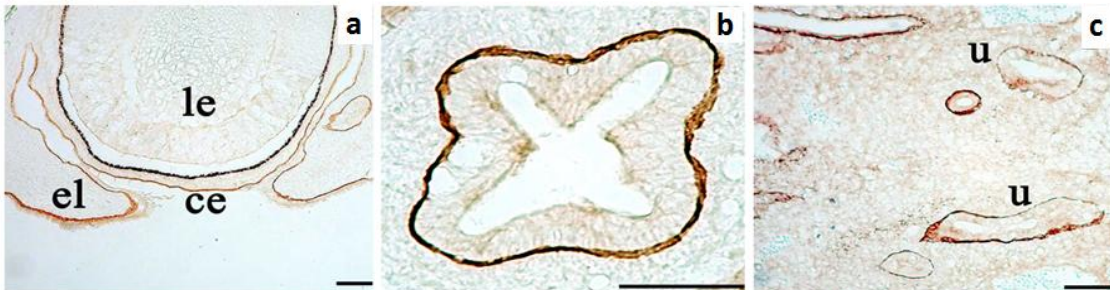
Και τα τέσσερα μέλη της οικογένειας *Fras1/Frem* διαθέτουν στο αμινοτελικό τους άκρο ένα πεπτιδιο σινιάλο για την στόχευση τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο (SP). Επιπλέον, όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας περιοχής ομολογίας με την πρωτεογλυκάνης θειικής χονδροϊτίνης NG2 (CSPG-μοτίβα) (Nishiyama *et al.*, 1991), αλλά και μοτίβα πρόσδεσης ασβεστίου (Galx-β) παρόμοια με των πρωτεϊνών ιοντοανταλλακτών Ca^{++} - Na^{+} (Schwarz and Berzer, 1999).

Οι πρωτεΐνες Fras1 και Frem2 είναι οι μόνες που έχουν διαμεμβρανικό τμήμα (TM) στο καρβοξυτελικό τους άκρο και μια μικρή κυτταροπλασματική περιοχή με μοτίβα πρόσδεσης PDZ πρωτεϊνών (Jadeja *et al.*, 2005). Επιπλέον, η πρωτεΐνη Frem1 διαθέτει μια καρβοξυτελική περιοχή ομολογίας με τις λεκτίνες τύπου C, ενώ ενδείξεις για διαμεμβρανική περιοχή ή για μοτίβο πρόσδεσης PDZ πρωτεϊνών δεν υπάρχουν (Smyth *et al.*, 2004).

Η πρωτεΐνη Fras1 χαρακτηρίζεται από την παρουσία επιπλέον μοτίβων που δεν απαντώνται στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας και αυτά είναι: 6 επαναλαμβανόμενα μοτίβα κυστεϊνών παρόμοια με αυτά της περιοχής C του παράγοντα von Willebrandt (Sadler J.E., 1998) και 13 μοτίβα κυστεϊνης παρόμοια με αυτά των πρωτεασών φουρινών (FU: furin- like cysteine repeats) (Roebroek *et al.*, 1992), τα οποία σε άλλες πρωτεΐνες έχει βρεθεί ότι μπορούν να αλληλεπιδρούν με αυξητικούς παράγοντες.

ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Fras1/Frem ΣΤΟΝ ΠΟΝΤΙΚΟ

Από πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του mRNA βρέθηκε ότι τα *Fras1* και *Frem2* εκφράζονται από τα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης από διάφορες κατηγορίες επιθηλιακών κυττάρων (Vrontou *et al.*, 2003), ενώ μετάγραφα του *Fras1* ανιχνεύθηκαν επίσης και στον εγκέφαλο ενηλίκων ποντικών (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Το γονίδιο *Frem1* παρουσιάζει δυναμική έκφραση κατά την εμβρυογένεση σε περιοχές επιθηλιακών-μεσεγχυματικών αλληλεπιδράσεων και το γονίδιο για το *Frem3*, εκφράζεται κυρίως από μεσεγχυματικά κύτταρα.

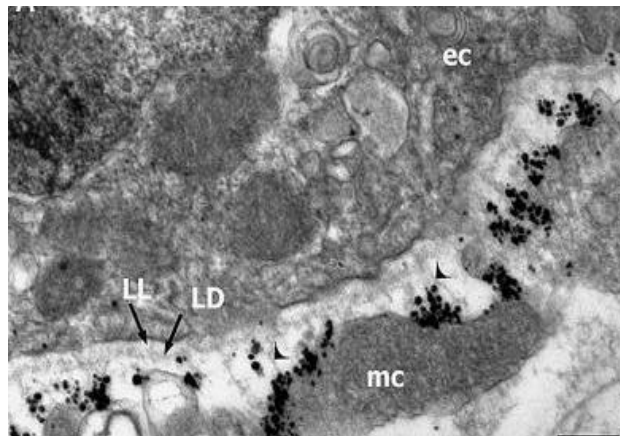


Εικόνα 2: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1. Α. εντοπισμός σε φακό (le), βλέφαρα (el) και κερατοειδικό επιθήλιο (ce) κατά την E14.5, Β. εντοπισμός σε αυλό εντέρου (lu) κατά την E16.5 και C. εντοπισμός σε ουρητήρα (u) κατά την E11.5 (Vrontou *et al.*, 2003).

Στα έμβρυα, η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται σε ποικίλες επιθηλιακές δομές, όπως η επιδερμίδα, το πεπτικό και το ουροποιητικό σύστημα, το μάτι, ο πνεύμονας και τμήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως ο νευρικός σωλήνας και το χοριοειδές πλέγμα (Vrontou *et al.* 2003 ; Petrou *et al.*, 2007a ; Chiotaki *et al.*, 2007) (εικ. 2) αλλά και σε δομές μεσοθηλιακών στιβάδων, όπως εκείνων που περιβάλλουν το έντερο και τον πνεύμονα (Chiotaki *et al.*, 2007). Με πειράματα ανοσοϊστοχημείας βρέθηκε ότι όλες οι πρωτεΐνες Fras1/Frem συνεντοπίζονται στη βασική μεμβράνη όλων σχεδόν των εμβρυϊκών επιθηλίων (Chiotaki *et al.*, 2007). Η πρωτεΐνη Frem1, εκτός από την βασική μεμβράνη έχει βρεθεί να εντοπίζεται ενδοκυτταρικά σε περιδερμικά κύτταρα όπως επίσης και σε μια ειδική κατηγορία επιθηλιακών κυττάρων στην βάση του αναπτυσσόμενου τριχοθηλακίου (Petrou *et al.*, 2007).

Σε ενήλικα ποντίκια, ανοσοϊστοχημικά πειράματα έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες Fras1/Frem συνεντοπίζονται μόνο σε περιοχές που εμφανίζουν έντονο πολλαπλασιασμό όπως είναι τα άκρα, η ουρά και τα βλέφαρα. Η πρωτεΐνη Frem3 αντίθετα είναι η μόνη που εξακολουθεί να υπάρχει στη βασική μεμβράνη πολλών επιθηλίων στα ενήλικα ποντίκια, αλλά, επιπλέον εντοπίζεται και στη βασική μεμβράνη των επιθηλίων σε *Fras1^{-/-}* ποντίκια όπου οι άλλες Fras1/Frem πρωτεΐνες δεν ανιχνεύονται (Pavlakis *et al.*, 2008).

Με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM), οι Fras1/Frem πρωτεϊνών εντοπίστηκαν στην sublamina densa της βασικής μεμβράνης επιθηλιακών δομών κατά την εμβρυογένεση (Dalezios *et al.*, 2007). Στις φωτογραφίες του TEM, οι κόκκοι χρυσού/αργύρου (μαύρες κουκίδες) που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες Fras1/Frem, φαίνεται να ξεκινούν από την lamina densa και να καταλήγουν σε μεσεγγυματικά κύτταρα (εικ. 3).



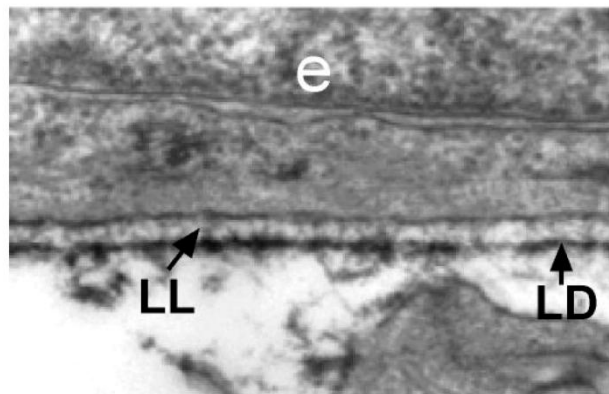
Εικόνα 3: Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης, ως μαύροι κόκκοι (clusters-χρυσού/ αργύρου) στην περιοχή της sublamina densa. ec: επιθηλιακό κύτταρο, mc: μεσεγγυματικό κύτταρο, LL: lamina lucida, LD: lamina densa

ΒΑΣΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Η βασική μεμβράνη αποτελεί μια πυκνή στιβάδα εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, η οποία βρίσκεται ανάμεσα στη βασική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων και στο συνδετικό ιστό. Η βασική μεμβράνη παίζει ρόλο στη δομική υποστήριξη καθώς συμμετέχει στην σύνδεση επιθηλίου με τον υποκείμενο συνδετικό ιστό. Έκτος από τον δομικό της ρόλο έχει και λειτουργικό καθώς σχηματίζει φραγμό, που παραβιάζεται μόνο αν το επιθήλιο υποστεί κακοήγη μετασχηματισμό. Με αυτόν τον τρόπο εμπλέκεται και στον έλεγχο της επιθηλιακής αύξησης και διαφοροποίησης. Κατέχει επίσης κρίσιμο ρόλο στην ρύθμιση της διαπερατότητας λειτουργώντας ως εμπόδιο για την ανεξέλεγκτη διέλευση μακρομορίων (Hood and Chersesh, 2002). Ταυτόχρονα, έχει την ιδιότητα να παγιδεύει ένα σημαντικό αριθμό σηματοδοτικών μορίων και αυξητικών παραγόντων (Timpl R., 1996; Liddington R, 2001), να κινητοποιεί σηματοδοτικούς μηχανισμούς που επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη, την μετακίνηση και την πολικότητα, ενώ ακόμα εμπλέκεται και στην επούλωση πληγών (Hood and Chersesh, 2002; Brukner-Tuderman and Brukner, 1998).

Η βασική μεμβράνη περιβάλλει όλα τα σπλαχνικά όργανα, τους μύες, τα κύτταρα του λιπώδη ιστού καθώς και τα κύτταρα Schwann, του περιφερειακού νευρικού συστήματος. Ενώ υπάρχει ομοιογένεια στην εμφάνιση που παρουσιάζουν οι βασικές μεμβράνες, παρόλα αυτά, η μοριακή τους σύσταση μπορεί να διαφέρει

από ιστό σε ιστό ή ακόμα και από περιοχή σε περιοχή μέσα στον ίδιο ιστό. Το πάχος τους κυμαίνεται μεταξύ 50 - 150 nm ανάλογα με τον ιστό. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στη βασική μεμβράνη διακρίνονται δύο στιβάδες (εικ. 4). Μια σχετικά ηλεκτρονιοδιαπερατή στιβάδα, lamina lucida που γειτνιάζει με τη βασικοπλευρική μεριά των επιθηλιακών κυττάρων και μια ηλεκτρονιοσπυκνοτική γνωστή ως lamina densa με πάχος ανάλογο με τον ιστό. Κάτω από τη lamina densa υπάρχει μια σχετικά ηλεκτρονιοδιαπερατή περιοχή, η lamina fibroreticularis ή sublamina densa, η οποία συγχωνεύεται με τον υποκείμενο συνδετικό ιστό και περιλαμβάνει ινώδεις δομές και πλάκες αγκυροβόλησης. Τυπικά συστατικά των βασικών μεμβρανών αποτελούν οι λαμίνες, τα νιδογόνα, το κολλαγόνο τύπου IV, οι πρωτεογλυκάνες και γενικά ένα πλήθος δομικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών συγκόλλησης (Miosge N, 2001).



Εικόνα 4: Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM) όπου διακρίνεται η βασική μεμβράνη. LL: lamina lucida, LD: lamina densa.

ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *Fras1*

Η μελέτη της βιολογικής λειτουργίας της *Fras1* διεξάγεται σε διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία το γονίδιο *Fras1* έχει απενεργοποιηθεί με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού. Με την μέθοδο αυτή, τοποθετήθηκε στο ενδογενές γονίδιο του *Fras1*, μια κατασκευή DNA που περιέχει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης και το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό νεομυκίνη (*LacZ/Neo*) (Vrontou *et al.*, 2003). Ο προκύπτων φαινότυπος μελετήθηκε σε δύο διαφορετικά στελέχη ποντικών το C57BL/10 (inbred) και το NMRI (outbred). Και στα δύο στελέχη τα ετερόζυγα άτομα δεν παρουσιάζουν φαινότυπο. Ομόζυγα έμβρυα στο στέλεχος C57BL/10 οδηγούνται σε πρώιμο θάνατο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη μεταξύ E13.5 και E16.5, ενώ στο στέλεχος NMRI ένα ποσοστό ομοζυγών εμβρύων (περίπου 50%) επιβιώνει, ενηλικιώνεται και διασταυρώνεται.

Ένα από τα πιο συχνά εμφανιζόμενα χαρακτηριστικά του φαινοτύπου των *Fras1*^{-/-} εμβρύων αποτελεί η δημιουργία μεγάλων υποεπιδερμικών φουσκαλίδων. Η εμφάνισή τους ξεκινάει από την ημέρα 12.5 της εμβρυογένεσης (E12.5) που είναι γεμάτες διάφανο υγρό και προοδευτικά γίνονται αιμορραγικές έως την ημέρα E16.5.

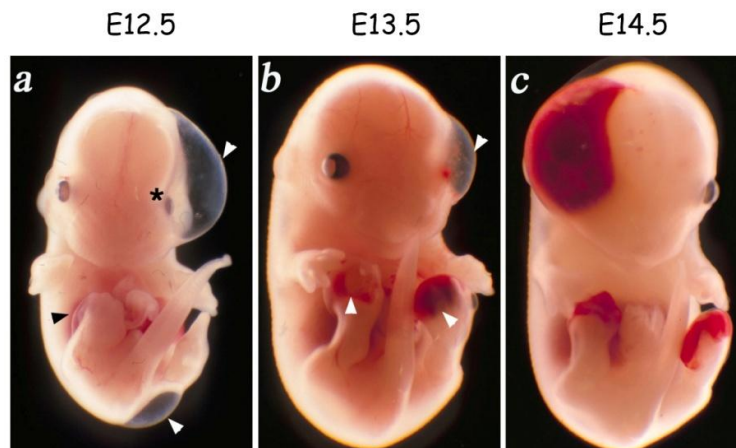
Η απώλεια της *Fras1* από την βασική μεμβράνη της επιδερμίδας φαίνεται ότι εξασθενεί τη σύνδεση της επιδερμίδας με την υποκείμενη δερμίδα με αποτέλεσμα την εισχώρηση υγρού (πλάσματος) μεταξύ τους και την δημιουργία φουσκαλίδας. Παρόλα αυτά, η έλλειψη της πρωτεΐνης *Fras1* δεν προκαλεί δομικές διαταραχές

στην βασική μεμβράνη (Vrontou *et al.*, 2003). Με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης διαπιστώθηκε ότι στην κορυφή της φουσκαλίδας, όπου υπάρχει η μέγιστη αποκόλληση της επιδερμίδας, η βασική μεμβράνη ακολουθεί το αποσπασμένο επιδερμικό επιθήλιο. Αυτό δείχνει ότι το επίπεδο αποκόλλησης του ιστού συμβαίνει στο επίπεδο κάτω από την lamina densa (sublamina densa) στα ινίδια αγκυροβόλησης, στο σημείο όπου εντοπίζεται και η Fras1 πρωτεΐνη.

Οι αιμορραγικές φουσκαλίδες σχηματίζονται μόνο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και σε καμία περίπτωση μετά την γέννηση. Ο εντοπισμός τους γίνεται κυρίως στην περιοχή της κεφαλής, γύρω από τα μάτια, αρκετά συχνά στα άκρα και ελάχιστες φορές στην ράχη (εικ. 5).

Διάφορες δερματικές ασθένειες του ανθρώπου παρουσιάζουν φαινότυπο με αιμορραγικές φουσκαλίδες, που έχουν προκληθεί από μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν για συστατικά της βασικής μεμβράνης των επιδερμικών επιθηλίων. Όμως, αυτή είναι η μοναδική περίπτωση έως σήμερα που παρατηρείται αποκόλληση της επιδερμίδας από την δερμίδα και δημιουργία επιδερμικών φουσκαλίδων σε εμβρυϊκά στάδια, αφού τα υπάρχοντα μοντέλα περιγράφουν μόνο περιπτώσεις αιμορραγικών φουσκαλίδων σε ενήλικα άτομα και νεογνά μετά από κάποιο μηχανικό τραύμα (Bruckner-Tuderman and Bruckner, 1998 ; Arin Meral J. and Roop Dennis R, 2001).

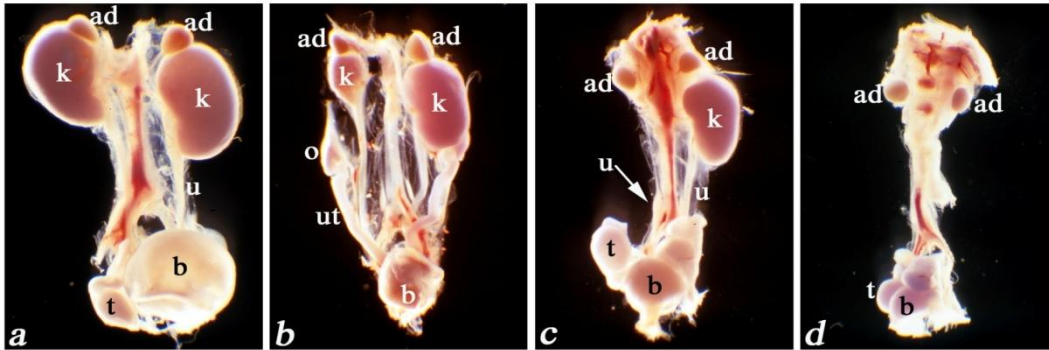
Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των *Fras1*^{-/-} ποντικών του στέλεχους NMRI που επιβιώνουν, είναι οι συγχωνεύσεις που παρατηρούνται στα βλέφαρα και στα άκρα. Συγκεκριμένα, ένα μεγάλο ποσοστό των *Fras1*^{-/-} ενηλίκων ποντικών χαρακτηρίζεται από τελείως κλειστά ή μερικώς κλειστά βλέφαρα, στο ένα ή και στα δύο μάτια, καθώς επίσης και από συγχωνεύσεις των δακτύλων στα άκρα.



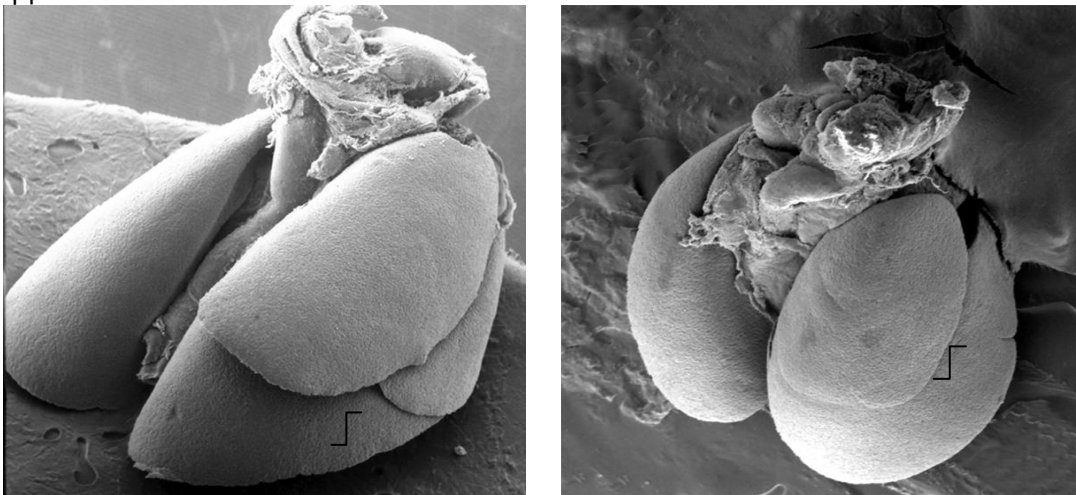
Εικόνα 5: Δημιουργία και εξέλιξη φουσκαλίδων σε *Fras1*^{-/-} έμβρυα ποντικού. a) Στο εμβρυϊκό στάδιο E12.5 το έμβρυο έχει αναπτύξει διαφανή φουσκαλίδα στην περιοχή του ματιού, στο δεξί κάτω άκρο και στην πίσω πλευρά όπως δείχνουν τα βέλη. b) Κατά τη μέρα E13.5 αρχίζουν να εισέρχονται ερυθρά αιμοσφαίρια στη φουσκαλίδα. c) Φουσκαλίδες γεμάτες με αίμα στην περιοχή του ματιού και στα άκρα, ενός *Fras1*^{-/-} εμβρύου E14.5

Επιπλέον, τα *Fras1*^{-/-} έμβρυα χαρακτηρίζονται από μονόπλευρη ή αμφίπλευρη νεφρική αγενεσία ή δυσπλασία (Vrontou *et al.*, 2003) (εικ. 6). Επίσης, παρατηρείται συγχώνευση των λοβών του δεξιού πνεύμονα, ως αποτέλεσμα του μη σωστού διαχωρισμού τους κατά την ανάπτυξη (εικ. 7). Στον πνεύμονα *Fras1*^{-/-}

ποντικών παρατηρείται αποδιοργάνωση των τριχοειδών αγγείων των κυψελίδων και έξοδος ερυθρών αιμοσφαιρίων στους αεροφόρους αγωγούς, στα τελικά στάδια της ανάπτυξης (Petrou *et al*, 2005). Σε αγρίου τύπου ποντίκια τα τριχοειδή αγγεία δεν περνούν πέρα από το όριο της βασικής μεμβράνης, της οποίας ο ρόλος φυσιολογικά είναι να αποτελεί φυσικό φραγμό. Σύμφωνα με τα παραπάνω, προκύπτει ένας πιθανός ρόλος του γονιδίου *Fras1* στις αγγειογενετικές διαδικασίες τουλάχιστον στον πνεύμονα (Petrou *et al*, 2005).



Εικόνα 6: a) Ουροποιητικό σύστημα αγρίου τύπου νεογέννητου αρσενικού ποντικού. b) Υποπλασία ενός νεφρού σε *Fras1*^{-/-} ποντίκι. c) Έλλειψη ενός νεφρού σε *Fras1*^{-/-} ποντίκι. d) Αγενεσία και των δύο νεφρών σε *Fras1*^{-/-} ποντίκι. K: kidney, ad: επινεφρίδια, u: ουρητήρας, b: ουροδόχος κύστη, t: όρχεις, ut: μήτρα.







Εικόνα 7: Σύγκριση πνευμόνων αγρίου τύπου ποντικού (αριστερά) με *Fras1*^{-/-} ποντίκι (δεξιά) σε εμβρυϊκό στάδιο E18.5. Παρατηρείται ότι στο μεταλλαγμένο ποντίκι έχει συγχωνευθεί ο κεντρικός και ο οπίσθιος λοβός του πνεύμονα στα σημεία όπου δείχνουν τα βέλη.

Ο *Fras1*^{-/-} φαινότυπος στα ποντίκια είναι πανομοιότυπος με αυτόν της μεταλλαγής ‘*blebbed*’ (*bl*) που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση υπο-επιδερμικών φουσκάλων (blebs/blisters) κατά την εμβρυογένεση στην περιοχή των ματιών και στα άκρα, καθώς και συγχώνευση των βλεφάρων και των άκρων. Σε *bl* ποντίκια έχουν βρεθεί διάφορες μεταλλάξεις στο γονίδιο *Fras1* (Green M.C, 1989). Επίσης, στα ποντίκια αυτά δεν ανιχνεύεται η πρωτεΐνη *Fras1* επιβεβαιώνοντας έτσι ότι οι μεταλλαγές στο γονίδιο *Fras1* οδηγούν στον *bl* φαινότυπο (Vrontou *et al.*, 2003).

ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ 'BLEB'

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί στο ποντίκι πέντε 'bleb' μεταλλάξεις που ονομάζονται 'blebbed' (*bl*), 'myelencephalic blebs' (*my*), 'eye blebs' (*eb*), 'head blebs' (*heb*) και 'fetal hematoma' (*fh*) (Darling and Gossler, 1994). Ο τρόπος κληρονόμησης των μεταλλαγών αυτών είναι υπολειπόμενος, ενώ παρουσιάζει υψηλά επίπεδα διεισδυτικότητας και εκφραστικότητας. Όλες οι μεταλλάξεις 'bleb' παρουσιάζουν παρόμοια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με αυτά των *Fras1*^{-/-} ποντικών.

Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε στη συνέχεια η μοριακή συσχέτιση μεταλλάξεων των γονιδίων *Fras1*/*Frem* με το φαινότυπο *bleb*. Έτσι μεταλλάξεις στο γονίδιο *Fras1* προκαλούν τον φαινότυπο *bl* (Vrondou *et al.*, 2003 ; McGregor *et al.*, 2003) ενώ μεταλλάξεις στα γονίδια *Frem1* (Smyth *et al.*, 2004 ; Kiyozumi *et al.*, 2006), *Frem2* (Jadeja *et al.*, 2003 ; Timmer *et al.*, 2005) και *Grip1* (Glutamate receptor binding protein 1) (Takamiya *et al.*, 2004) προκαλούν τους φαινοτύπους *my*, *heb* και *eb* αντίστοιχα. Το γονίδιο *Frem3* πιθανά είναι υπεύθυνο για την μετάλλαξη *fh*, όμως δεν είναι δυνατό να συσχετιστεί με αυτή γιατί τα ποντίκια του στελέχους αυτού δεν υπάρχουν πια (πίνακας 1).

Protein	Protein aa	Mouse chromosome	Human chromosome	Mouse mutant
Fras1 	4.010	5E3	4q21.21	blebbed (<i>bl</i>)
Frem2 	3.160	3C	13q13.3	myelencephalic bleb (<i>my</i>)
Frem1 	2.191	4C3	9p22.3	head bleb (<i>heb</i>)
Frem3 	2.127	8C2	4q31.21	fetal hematoma (<i>fh</i>) ???

Πίνακας 1: Οι μεταλλάξεις *bleb* στο ποντίκι και αντιστοίχηση με τα γονίδια και τις χρωμοσωμικές περιοχές, που είναι υπεύθυνα για κάθε μετάλλαξη σε ποντίκι και άνθρωπο.

Η *Grip1* είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που περιέχει 7 PDZ περιοχές. Οι PDZ περιοχές είναι αλληλουχίες 80-90 αμινοξέων που έχουν την δυνατότητα να αναγνωρίζουν μικρές πεπτιδικές αλληλουχίες στο καρβοξυτελικό άκρο πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν, ενώ μπορούν και να ετεροδιμερίζονται με PDZ περιοχές

άλλων πρωτεϊνών (Brennan *et al.*, 1996 ; Hiller *et al.*, 1999). Η καρβοξυτελική κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης Fras1 διαθέτει μια συντηρημένη αλληλουχία, που περιλαμβάνει τα τέσσερα καρβοξυτελικά αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης και που αναγνωρίζεται και προσδένεται από την πρωτεΐνη Grip1 μέσω των PDZ περιοχών. Έχει δειχθεί, *in vitro*, ότι οι περιοχές αυτές των δύο πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν φυσικά ενώ μετάλλαξη στο καρβοξυτελικό μοτίβο της Fras1 αποτρέπει την αλληλεπίδραση με την Grip1 (Takamiya *et al.*, 2004).

Η αλληλεπίδραση της Grip1 με τις Fras1 και Frem2 είναι απαραίτητη για την στοχευμένη έξοδο αυτών από το κύτταρο και το σωστό εντοπισμό τους στη βασική μεμβράνη των επιθηλίων. Στα ποντίκια όπου η Grip1 έχει απενεργοποιηθεί, οι Fras1 και Frem2 δεν οδηγούνται εκτός του κυττάρου, με αποτέλεσμα ο φαινότυπος των *Grip1^{-/-}* ποντικών να είναι παρόμοιος με το φαινότυπο των *Fras1^{-/-}* και *Frem2^{-/-}* (Kiyozumi *et al.*, 2006).

Λόγω της φαινοτυπικής ομοιότητας των μεταλλαγμάτων 'bleb' με τα συμπτώματα των ασθενών που πάσχουν από το σύνδρομο Fraser (Winter, 1988,1990), ακολούθησε ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια FRAS1/FREM από τους παραπάνω ασθενείς. Έτσι, εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στα γονίδια FRAS1 (McGregor *et al.*, 2003) και σε πολύ μικρότερη συχνότητα στο FREM2 (Jadeja *et al.*, 2005).

ΣΥΝΔΡΟΜΟ FRASER

Το σύνδρομο Fraser είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη γενετική ασθένεια του ανθρώπου, η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλη γενετική ετερογένεια όπως διαπιστώθηκε έπειτα από μελέτες σε ασθενείς οι οποίοι παρουσίαζαν μεγάλη ποικιλομορφία στην κλινική τους εικόνα (Fraser, 1962). Σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *FRAS1* που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4, στην περιοχή 4q21.21, και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μήκους 4007 αμινοξέων με 85% ομολογία με την Fras1 του ποντικού, όσο αφορά την αμινοξική τους αλληλουχία (Mc Gregor *et al.*, 2003). Μεταλλαγές του *FREM2* έχουν, επίσης, εντοπισθεί σε ασθενείς με σύνδρομο Fraser (Jadeja *et al.*, 2005).

Το σύνδρομο Fraser χαρακτηρίζεται από κρυπτοφθαλμία, συνδακτυλία, ανωμαλίες στο λάρυγγα και στο ουροποιητικό σύστημα, κρανιακές δυσμορφίες, διανοητική καθυστέρηση και μυοσκελετικές ανωμαλίες. Μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστές αναφορές για διαγνωστικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες σε ασθενείς (Slavotinek and Tiffit, 2002). Είναι γεγονός ότι το σύνδρομο Fraser έχει πολύπλοκο και πλειοτροπικό φαινότυπο και έχει κοινά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με άλλες δυσμορφίες όπως το σύνδρομο Barder-Biedl (Katsanis *et al.*, 2001).

Το σύνδρομο Fraser είναι σχετικά σπάνιο με συχνότητα 1/10000 (Smyth & Scambler, 2005), η οποία αυξάνεται αν ληφθούν υπόψη οι πρώιμες αποβολές. Μεγάλη ποικιλομορφία σε ότι έχει να κάνει με την βιωσιμότητα εμφανίζεται στα άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο Fraser. Ένα ποσοστό (περίπου 45%) πεθαίνει κατά τις πρώτες εβδομάδες της κύησης ή τον πρώτο χρόνο εξαιτίας προβλημάτων στον πνεύμονα ή στα νεφρά (Boyd *et al.*, 1988).



Εικόνα 8: Σύνδρομο Fraser στον άνθρωπο. Φωτογραφίες από νεογέννητο με αμφίπλευρη κρυπτοφθαλμία, υπολείμματα φουσκάλων στο άνω αριστερό άκρο και συνδακτυλία. Αυτά αποτελούν δυο από τα κύρια διαγνωστικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Fraser.

Η διάγνωση του συνδρόμου Fraser γίνεται με βάση κάποια κριτήρια, τα οποία χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, (Thomas *IT et al.*, 1986). Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα κύρια φαινοτυπικά διαγνωστικά χαρακτηριστικά όπως κρυπτοφθαλμία (εμφανίζεται στο 90% των ασθενών), συνδακτυλία (εμφανίζεται στο 62% των ασθενών), ανωμαλίες στα γεννητικά όργανα (αποτελεί το τρίτο σε συχνότητα εμφάνιση σύμπτωμα και αφορά ένα 36.8% στα θηλυκά άτομα και ένα 31.5% στα αρσενικά) με διάφορες ανωμαλίες και οικογενειακό ιστορικό για την ασθένεια (το 10% των ασθενών έχουν τέτοιο ιστορικό). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει δευτερεύοντα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά διάκρισης όπως ανωμαλίες στη διαμόρφωση της μύτης και των αυτιών, ανωμαλίες στις αναπνευστικές οδούς και στους πνεύμονες που έχουν να κάνουν κυρίως με λαρυγγική στένωση ή ατρησία, μυοσκελετικές ανωμαλίες που σχετίζονται κυρίως με απουσία ή υποπλασία των οστών της κεφαλής, καθώς και με ανωμαλίες στην οστεοποίηση των κρανιακών οστών, γαστρεντερικές ανωμαλίες που αφορούν εδρική στένωση ή ατρησία, νεφρικές ανωμαλίες που αφορούν αγενεσία νεφρών (και των δυο ή μόνο του ενός) παρουσιάζοντας ή όχι και αγενεσία των ουρητήρων, όπως και μικρότερου μεγέθους ή σε πλήρη έλλειψη ουροδόχο κύστη. Ανωμαλίες στον εγκέφαλο παρουσιάζουν μικρότερα ποσοστά εμφάνισης (π.χ. εγκεφαλοκήλη, υδροκεφαλία), όπως επίσης στις καρδιακές ανωμαλίες (π.χ. υπερτροφική καρδιά), στις ανωμαλίες στο θύμο (απουσία ή υποπλασία) και ακόμα στην αναπτυξιακή ή ψυχοκινητική καθυστέρηση (Slavotinek & Tift, 2002 ; Thomas *et al.*, 1986). Δύο κύρια κριτήρια και ένα δευτερεύον ή ένα κύριο και τουλάχιστον τέσσερα δευτερεύοντα απαιτούνται για την διάγνωση του συνδρόμου (Gattuso *et al.*, 1987).

Σκοπός της εργασίας

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω έπειτα από πειράματα RNA in situ για το *Fras1* είχαν εντοπιστεί μετάγραφα του σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο αμυγδαλοειδής πυρήνας, ο ιππόκαμπος και ο φλοιός. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα ανοσοϊστοχημείας, που είχαν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο με την χρήση διαφορετικών αντισωμάτων ειδικών για την πρωτεΐνη *Fras1* δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση της στον εγκέφαλο ενηλίκων ποντικών.

Από την άλλη δεν είχαν γίνει πολλές προσπάθειες για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης *Fras1* στον εγκέφαλο εμβρύων ποντικών κάτι που θελήσαμε να μελετήσουμε στην συγκεκριμένη εργασία. Σκοπός, λοιπόν, της εργασίας αυτής ήταν ο εντοπισμός της πρωτεΐνης *Fras1* στον εγκέφαλο εμβρύων ποντικών.

Κατα την διαδικασία απενεργοποίησης του *Fras1* με την μέθοδο του ομόλογου ανασυνδιασμού στα ποντίκια, χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης, το οποίο εισήχθη στο ίδιο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης με το γονίδιο του *Fras1* ώστε να απενεργοποιηθεί. Στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια λοιπόν, η έκφραση του *Fras1* έχει αντικατασταθεί με την έκφραση της β-γαλακτοζιδάσης και άρα όπου εντοπίζεται στα αγρίου τύπου ποντίκια η *Fras1*, θα εντοπίζεται, στα μεταλλαγμένα η β-γαλακτοζιδάση. Έτσι με στόχο να παρατηρήσουμε πιθανές περιοχές εντοπισμού της πρωτεΐνης *Fras1*, χρησιμοποιήσαμε το αντίσωμα της β-γαλακτοζιδάσης σε *Fras1*^{+/-} έμβρυα ποντικού.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ανοσοϊστοχημικές διαδικασίες

1. Προετοιμασία εμβρύων για κρυτομές

Για να πραγματοποιηθούν κρυτομές στα έμβρυα θα πρέπει προηγουμένως να επεξεργαστούν κατάλληλα και να μονιμοποιηθούν. Τα υλικά που χρησιμοποιούμε είναι το ισοπεντάνιο, 30% σουκρόζη σε PBS και PFA 4%.

Διαλύματα:

- **PFA 4%** (για 250 ml)
100 ml PBS 1x
10 gr PFA

Ανάδευση υπό θέρμανση, αφού διαλυθεί συμπληρώνεται PBS μέχρι τα 250 ml.
Αποθήκευση στους -20°C

- **Διάλυμα PB 10x**, για 1 lt:
10.9 gr Na₂HPO₄
3.2 gr KH₂PO₄
συμπληρώνουμε με H₂O

- **Διάλυμα PBS 1x pH 7.4**, για 1 lt :
100 ml PB
9 gr NaCl
900 ml H₂O

Διαδικασία:

- Απομόνωση εμβρύων από τη μήτρα ποντικού
- Τοποθέτησή τους σε παγωμένο PFA 4% και επώασή στους 4°C. (ο χρόνος επώασης εξαρτάται από το μέγεθος του ιστού)
- Επώαση με 30% σουκρόζη σε PBS στους 4°C (ο χρόνος επώασης εξαρτάται και πάλι από το μέγεθος του ιστού)
- Πάγωμα σε ισοπεντάνιο στους -80°C για 5 min ώστε να παγώσουν και εσωτερικά και φύλαγμα στους -80°C

2. Ανοσοϊστοχημεία σε κρυτομές

Στην αρχή κοβονται τομές από τα μονιμοποιημένα και ψυγμένα έμβρυα στη κρυτοτόμο στους -25°C, αφού αυτά καλυφθούν με κρυοπροστατευτικό υλικό (O.C.T.). Οι τομές γίνονται σε πάχος 10 μm και κολλάνε πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα εξαιτίας της διαφοράς θερμοκρασίας. Η αντικειμενοφόρος πλάκα βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου ενώ η τομή έχει την θερμοκρασία της κρυτοτόμου, δηλαδή -25°C.

Αφότου, οι κρυτομές τοποθετηθούν στην αντικειμενοφόρο πλάκα πρέπει να

υποστούν μια συγκεκριμένη διαδικασία επώασης αντισωμάτων και ξεπλυμάτων με διάφορα διαλύματα ώστε να γίνει δυνατή η παρατήρηση του αντισώματος στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Υλικά και διαλύματα:

- Διάλυμα **PBS** 1x pH 7.4
- Διάλυμα **PB** 10x
- 0.05% **Tween** σε **PBS**
- 0.1% **Triton** σε **PBS**
- **Blocking serum** (1% FBS σε 0.1% Triton / PBS)
- Αντίσωμα με το οποίο θα ανιχνεύσουμε την συγκεκριμένη πρωτεΐνη
- Δεύτερο αντίσωμα που θα αναγνωρίζει το πρώτο φθορίζον
- **0.1 mg/μl RnaseA**
- **Propidium iodide**
- **Mowiol**

Διαδικασία

Το πρωτόκολλο της ανοσοϊστοχημείας έχει ως εξής:

- Τοποθέτηση στην ειδική συσκευή των αντικειμενοφόρων πλακών με 250 μl 0.05 % Tween σε PBS
- 3 ξεπλύματα των 5 min με 0.05 % Tween σε PBS, pH 4.0
- Επώαση με 0.1 % Triton σε PBS για 10 min
- 3 ξεπλύματα των 5 min, με 0.05 % Tween σε PBS, pH 4.0
- Επώαση με blocking serum για 1 ώρα
- Επώαση με πρώτο αντίσωμα αραιωμένο κατάλληλα σε blocking serum στους 4°C ολονύκτια
- Την επόμενη μέρα γίνονται 3 ξεπλύματα των 5 min με 0.05 % Tween σε PBS, pH 7.0
- Επώαση με το δεύτερο αντίσωμα (φθορίζον) σε αραιώση 1:500 σε blocking serum για 1 ώρα στο σκοτάδι. Όλες οι διαδικασίες από εδώ και κάτω γίνονται υπό σκοτάδι
- Ακολουθούν 3 ξεπλύματα των 5 min με 0.05 % Tween σε PBS, pH 7.0
- Επώαση με RNAse σε αραιώση 1:500 σε 0.05 % Tween σε PBS, pH 7.0 για 30 min στους 37°C
- 3 ξεπλύματα των 5 min με 0.05 % Tween σε PBS, pH 7.0
- Χρώση με propidium iodide σε (βάφει τους πυρήνες των κυττάρων) αραιώση 1:1000 σε 0.05 % Tween σε PBS, pH 7.0 και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου
- 3 ξεπλύματα των 5 min με 0.05 % Tween σε PBS, pH 7.0
- Κάλυψη των αντικειμενοφόρων με 50 μl mowiol
- Παρακολούθηση σε μικροσκόπιο φθορισμού

3. *Επεξεργασία αντικειμενοφόρων πλακών με ζελατίνη*

Οι αντικειμενοφόροι πρέπει να επιστρωθούν με ζελατίνη ώστε να είναι κατάλληλες για κολλήσουν οι τομές.

Διαλύματα και υλικά

- **Αντικειμενοφόροι**
- **Διάλυμα ζελατίνης**
300 ml dH₂O
1.5 gr ζελατίνη
150 mg KCr(SO₄)₂ x 12 H₂O

Διαδικασία

- προσθήκη 1.5 gr ζελατίνης σε 300 ml H₂O και ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα στους 50° C
- Όταν διαλυθεί η ζελατίνη προστίθενται 150 mg KCr(SO₄)₂ x 12H₂O και συνεχίζεται η ανάδευση
- Μόλις κρυώσει το διάλυμα εμβαπτίζονται σε αυτό οι αντικειμενοφόροι πλάκες αντικειμενοφόρους για 10 min μέσα σε ειδικό μπανάκι.
- Τέλος οι αντικειμενοφόροι μεταφέρονται ολονύκτια στους 37⁰C για να στεγνώσουν.

4. *Free floating*

Διαδικασία:

- Τομές 50 μm πάχος, μεταφέρονται σε PBS (ice cold 4 °C).
- 3 επιπλέον ξεπλύματα σε ice cold PBS.
- 1 ώρα σε διάλυμα 1% FBS σε PBS-Triton 0.1%.
- διάλυση του αντισώματος στο παραπάνω διάλυμα και ολονύκτια επώαση στους 4 °C).
- 3 ξεπλύματα 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.
- διάλυση του δεύτερου αντισώματος, αραιωμένου, σε διάλυμα FBS 1% σε PBS-Triton 0.1% σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3 ξεπλύματα 5 λεπτών σε PBS.
- 5 λεπτά επώαση σε DAPI για βάψιμο πυρήνων.
- 3 ξεπλύματα 5 λεπτών σε PBS.
- μεταφορά σε πλακάκι και κάλυψη.

Αποτελέσματα

Σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα που είχαν πραγματοποιηθεί δεν ήταν δυνατόν να ανιχνευτεί η πρωτεΐνη *Fras1* στον εγκέφαλο ποντικών. Απεναντίας, σε πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του RNA, εντοπίστηκε το mRNA του *Fras1* σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου όπως είναι η αμυγδαλή και ο ιππόκαμπος. Με στόχο να διερευνήσουμε τον εντοπισμό της πρωτεΐνης *Fras1* στον εγκέφαλο πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοιστοχημείας με αντίσωμα που αναγνωρίζει την β-γαλακτοσιδάση.

Προκειμένου να αποκαλυφθούν οι περιοχές εντοπισμού της πρωτεΐνης *Fras1* στο κεντρικό νευρικό σύστημα του ποντικού, αφού δεν είχαν αποδώσει οι άλλες προσπάθειες, αποφασίσαμε να εκμεταλλευτούμε τον τρόπο με τον οποίο έχει γίνει το knock-out. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια, η κατασκευή με την οποία πραγματοποιήθηκε η απενεργοποίηση του *Fras1* γονιδίου περιέχει το γονίδιο LacZ ενσωματωμένο στο ίδιο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια να εκφράζεται η β-γαλακτοσιδάση έναντι του γονιδίου του *Fras1*. Ο εντοπισμός λοιπόν της β-γαλακτοσιδάσης στα μεταλλαγμένα αυτά ποντίκια αποτελεί ένδειξη των περιοχών στις οποίες θα εντοπίζεται η πρωτεΐνη *Fras1* στα αγρίου τύπου ποντίκια. Αυτό σημαίνει ότι μπορούμε να εξάγουμε πληροφορίες για τον εντοπισμό της *Fras1* έμμεσα χρησιμοποιώντας την β-γαλακτοσιδάση.

Για αυτό το λόγο αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί αντίσωμα ειδικό για την β-γαλακτοσιδάση ώστε με ανοσοϊστοχημικές διαδικασίες να αποκαλυφθούν οι περιοχές που αυτή εντοπίζεται.

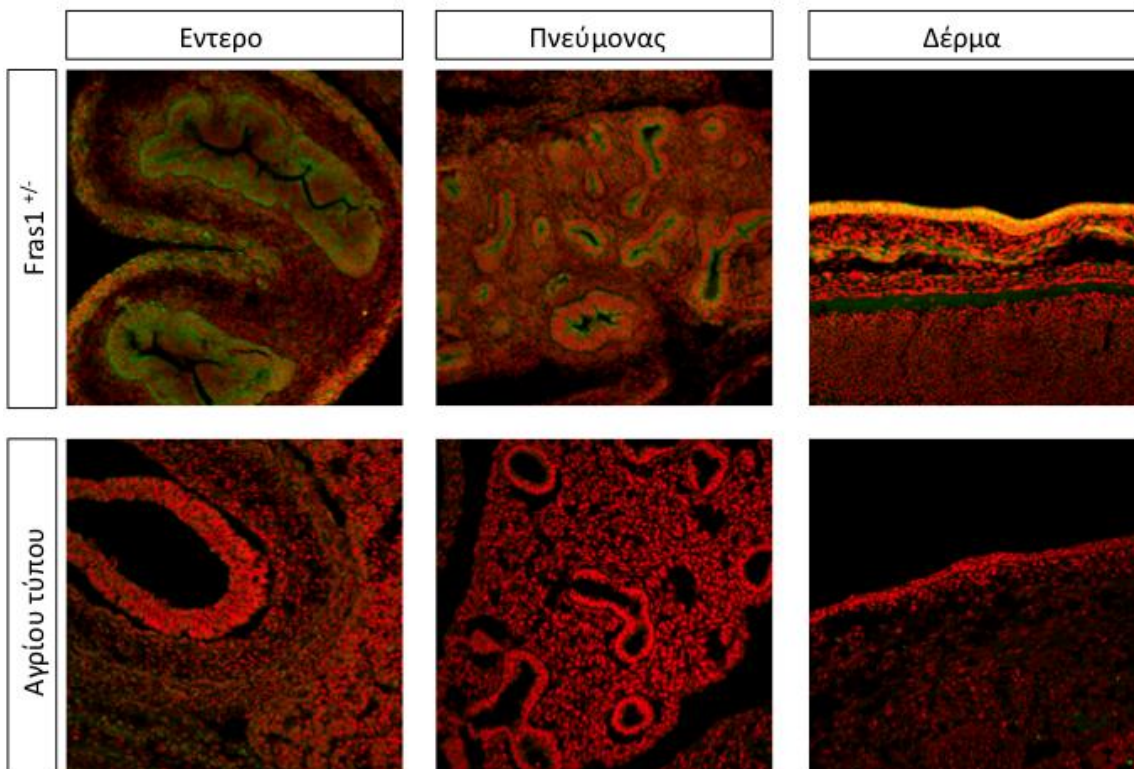
Αρχικά, υπήρχαν διαθέσιμα δυο διαφορετικά αντισώματα ειδικά για την β-γαλακτοσιδάση, ένα anti-rabbit και ένα anti-mouse. Όποτε έγιναν πιλοτικά πειράματα ώστε να επιλεγεί το καταλληλότερο από τα δύο αντισώματα για την συνέχεια. Κριτήρια για την επιλογή αποτέλεσαν η ειδικότητα του σήματος, η ένταση και η ύπαρξη όσο το δυνατόν λιγότερου θορύβου. Παράλληλα επιλέχθηκε και η βέλτιστη αραιώση για την χρήση του αντισώματος σε πειράματα ανοσοιστοχημείας.

Για την επιλογή του κατάλληλου αντισώματος, λοιπόν, πραγματοποιήθηκαν κρουτομές τόσο από ετερόζυγα όσο και από αγρίου τύπου έμβρυα ποντικού 14.5 ημερών (E14.5). Οι τομές από τα αγρίου τύπου έμβρυα αποτέλεσαν το αρνητικό κόντρόλ διότι δεν εκφράζεται η β-γαλακτοσιδάση στα έμβρυα ποντικού από κανονικές συνθήκες. Οι τομές που έγιναν ήταν ολόκληρων εμβρύων κομμένες οβελιαία.

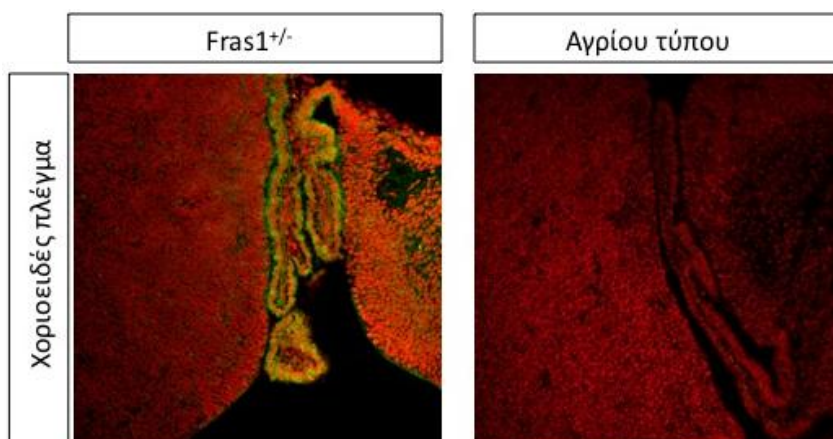
Για το anti-rabbit αντίσωμα χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω αραιώσεις 1:100, 1:1500 και 1:2000. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος αποφασίστηκε ότι η καλύτερη αραιώση του αντισώματος ήταν 1:1500, καθώς στις υπόλοιπες είτε η ένταση του φθορισμού ήταν μειωμένη είτε υπήρχε μη ειδικό σήμα. Όσο αφορά το αντίσωμα anti-mouse, ο έλεγχος έγινε για τις αραιώσεις 1:50, 1:200 και 1:500. Στις αραιώσεις 1:200 και 1:500 το σήμα ήταν έντονο αλλά υπήρχε και στα δύο μη ειδικό σήμα που δημιουργούσε «θόρυβο». Επιπλέον, το γεγονός ότι αυτό το αντίσωμα είναι anti-mouse και επομένως αναγνωρίζει τα IgG του ποντικού δημιουργεί περισσότερο μη ειδικό σήμα οπότε και η τελική εικόνα δεν είναι ξεκάθαρη. Από τις παραπάνω παρατηρήσεις προκύπτει το συμπέρασμα ότι για την συγκεκριμένη περίπτωση θα ήταν προτιμότερο να χρησιμοποιηθεί το anti-rabbit αντίσωμα για την β-γαλακτοσιδάση και συγκεκριμένα σε αραιώση 1:1500.

Στην συνέχεια, για να διερευνηθεί αν εντοπίζεται β-γαλακτοσιδάση στον εγκέφαλο χρησιμοποιήθηκε το επιλεγμένο αντίσωμα (anti-rabbit) σε πειράματα

ανοσοϊστοχημείας. Χρησιμοποιήθηκαν για τον σκοπό αυτό τομές από ολόκληρα *Fras1*^{-/-} έμβρυα E14.5. Αυτό δίνει το πλεονέκτημα να υπάρχει θετικός έλεγχος στην ίδια τομή από το σήμα που δίνουν τα επιθήλια του εμβρύου, ενώ παράλληλα μπορεί να εξεταστεί και ο εντοπισμός της πρωτεΐνης σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Έπειτα από την ανοσοϊστοχημική διαδικασία παρατηρήθηκε ότι στον εγκέφαλο των εμβρύων δεν υπήρχε καθόλου σήμα εκτός από την περιοχή του χοριοειδούς πλέγματος, ενώ στο σώμα του εμβρύου σήμα υπήρχε μόνο στα εσωτερικά επιθήλια και όχι στα εξωτερικά (εικ. 9)



Εικόνα 9: Ανοσοϊστοχημεία σε E14.5 έμβρυο με το αντίσωμα της Β-γαλακτοσιδάσης. Η β-γαλακτοσιδάση φαίνεται να εντοπίζεται μόνο στα εσωτερικά επιθήλια στο έντερο και στον νεφρό καθώς και στο δέρμα. Μεγέθυνση 10x.

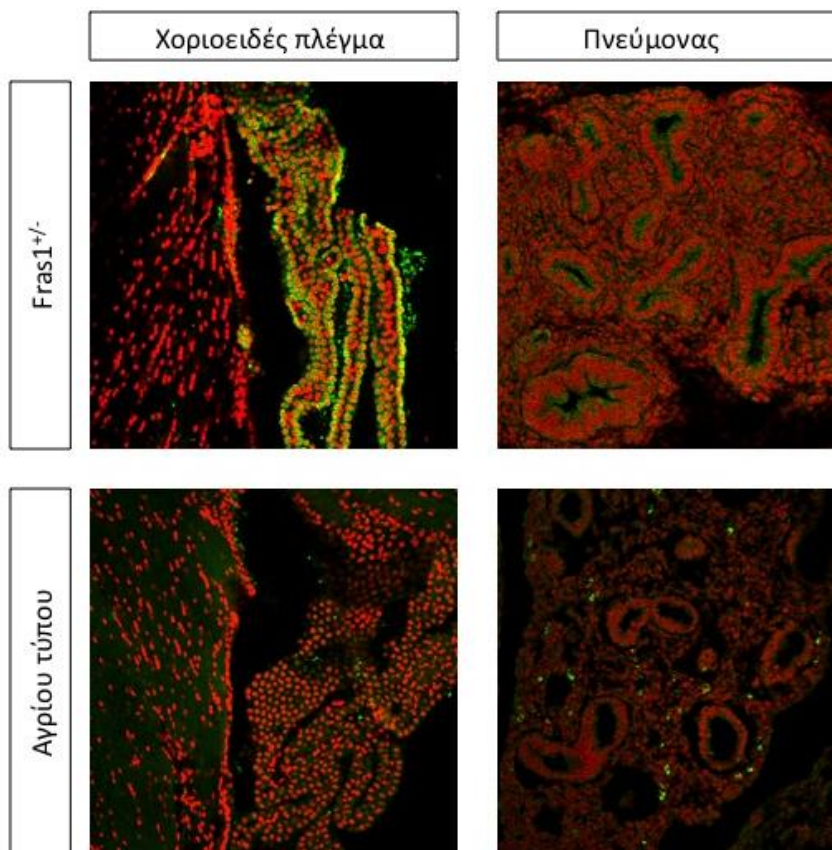


Εικόνα 10: Ανοσοϊστοχημεία σε E14.5 ετερόζυγο έμβρυο με το αντίσωμα της β-γαλακτοσιδάσης. Στον εγκέφαλο παρατηρείται εντοπισμός της β-γαλακτοσιδάσης μόνο στην περιοχή του χοριοειδούς πλέγματος. Μεγέθυνση 10x.

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν αλλαγές στις συνθήκες του πειραμάματος ώστε να γίνει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αύξηση στην ένταση του σήματος στα επιθήλια αλλά και για να ελεγχθεί και με άλλους τρόπους αν εντοπίζεται η πρωτεΐνη στον εγκέφαλο.

Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας με unmasking μια διαδικασία που επιτρέπει την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων. Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι πιθανόν η πρωτεΐνη είτε να έχει τέτοια διαμόρφωση στο χώρο ώστε να μην επιτρέπει την αναγνώριση συγκεκριμένων επιτόπων από το αντίσωμα, είτε να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες που εμποδίζουν το αντίσωμα να εντοπίσει τον κατάλληλο επίτοπο. Για την αποκάλυψη επιτόπων χρησιμοποιούνται διάφοροι τρόποι όπως η υψηλή θερμοκρασία ή διαλύματα με ακραία pH.

Στην συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκαν τομές από ολόκληρα ετερόζυγα έμβρυα 14.5 ημερών, οι οποίες μετά από μονιμοποίηση εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα Sodium Citrate 10 mM PH 6,0 και έβρασαν για 2 min. Έπειτα ακολούθησε η διαδικασία της ανοσοϊστοχημείας σύμφωνα με τον συνήθη τρόπο. Και με αυτή την μέθοδο παρατηρήσαμε ότι δεν υπήρχε σήμα στον εγκέφαλο εκτός από την περιοχή του χοριοειδούς πλέγματος ενώ πάλι μόνο τα εσωτερικά επιθήλια έδιναν σήμα.



Εικόνα 11: Ανοσοϊστοχημεία με unmasking σε E14.5 έμβρυο. Παρατηρούνται οι διαφορές στο φθορισμό στα αγρίου τύπου σε σχέση με τα ετερόζυγα, πράγμα που δείχνει την ύπαρξη της

πρωτεΐνης στα σημεία αυτά. Στα αγρίου τύπου ο φθορισμός που φαίνεται είναι λόγω μη ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος.

Σύμφωνα με τις παραπάνω παρατηρήσεις καταλήξαμε σε δύο πιθανές υποθέσεις. Η πρώτη υπόθεση είναι ότι υπάρχει πιθανότητα η παραγωγή της Fras1 πρωτεΐνης να έχει σταματήσει στο στάδιο E14.5 και γι' αυτό να μην εντοπίζεται β-γαλακτοσιδάση σε όλα τα επιθήλια. Η δεύτερη υπόθεση είναι ότι τα εξωτερικά επιθήλια δεν παράγουν την πρωτεΐνη Fras1, αλλά αυτή φτάνει εκεί από τα εσωτερικά επιθήλια όπου και αποθηκεύεται.

Για να ελεγχθεί η πρώτη πιθανότητα πραγματοποιήθηκαν τα παραπάνω πειράματα σε ένα μικρότερο αναπτυξιακό στάδιο και συγκεκριμένα σε E12.5 ετερόζυγα έμβρυα ποντικού χρησιμοποιώντας και πάλι ως κοντρόλ συνομήλικα τους αγρίου τύπου έμβρυα. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από αυτά τα πειράματα ήταν ίδια με το στάδιο E14.5, δηλαδή εντοπίζεται η β-γαλακτοσιδάση στο χοριοειδές πλέγμα και όχι σε άλλη περιοχή του εγκεφάλου και επίσης εντοπίζεται μόνο σε εσωτερικά επιθήλια και όχι εξωτερικά. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η πρώτη υπόθεση δεν ισχύει και επομένως πρέπει να διερευνηθεί αν η δεύτερη είναι σωστή.

Στη συνέχεια της προσπάθειας να εντοπιστεί η Fras1 πρωτεΐνη στον εγκέφαλο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των free floating. Με αυτό τον τρόπο υπάρχει η δυνατότητα να ελεγχθούν περισσότερα επίπεδα της τομής καθώς οι τομές έχουν μεγαλύτερο πάχος. Έτσι μπορούμε να δούμε σε μεγαλύτερο βάθος στον ιστό.

Πραγματοποιήθηκαν, λοιπόν, τομές από κεφάλι ετερόζυγων εμβρύων 14.5 ημερών και ακολουθήθηκε η ανοσοϊστοχημική διαδικασία με την μέθοδο του free floating (βλ Υλικά και Μέθοδοι). Οι παρατηρήσεις και με αυτή την μέθοδο ήταν όμοιες με την τα προηγούμενα πειράματα ανοσοϊστοχημείας, δηλαδή η πρωτεΐνη εντοπίζεται μόνο στην περιοχή του χοριοειδούς πλέγματος και σε κανένα άλλο σημείο εντός του εγκεφαλικού ιστού.

Συζήτηση

Το γονίδιο *Fras1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη του εξωκυττάριου χώρου και έχει γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τα τελευταία χρόνια. Η πρωτεΐνη *Fras1* εντοπίζεται στην εξωκυττάρια ύλη των επιθηλιακών κυττάρων και συγκεκριμένα στη βασική μεμβράνη. Ένας τρόπος μελέτης του βιολογικού ρόλου του γονιδίου *Fras1* στον ποντικό, ήταν η απενεργοποίησή του με την μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού.

Ο *Fras1*^{-/-} φαινότυπος στα ποντίκια χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση υπο-επιδερμικών φουσκάλων (blebs/blisters) κατά την εμβρυογένεση στην περιοχή των ματιών και στα άκρα, καθώς και συγχώνευση των βλεφάρων και των άκρων. Τα *Fras1*^{-/-} έμβρυα, χαρακτηρίζονται επίσης από μονόπλευρη ή αμφίπλευρη νεφρική агенεσία ή δυσπλασία και ακόμη συχνά παρατηρούμε συγχώνευση των λοβών του δεξιού πνεύμονα, ως αποτέλεσμα του μη σωστού διαχωρισμού τους κατά την ανάπτυξη. Επιπλέον, σε πειράματα συμπεριφοράς που έγιναν και πιο συγκεκριμένα πειράματα εξαρτημένης μνήμης του φόβου βρέθηκε ότι τα *Fras1*^{-/-} ενήλικα ποντίκια παρουσιάζουν διαταραχές στο κύκλωμα της μνήμης του φόβου, πιο συγκεκριμένα φαίνεται να μην συνδυάζουν τα δυο ερεθίσματα με αποτέλεσμα να μην φοβούνται (αδημοσίεута αποτελέσματα).

Σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα RNA in situ υβριδοποίησης, μετάγραφα του *Fras1* έχουν βρεθεί στον εγκέφαλο ενηλίκων σε διάφορες περιοχές όπως είναι η αμυγδαλή και ο ιππόκαμπος (αδημοσίεута αποτελέσματα). Όμως, η πρωτεΐνη *Fras1* δεν είναι ανιχνεύσιμη στον εγκέφαλο ποντικών με ανοσοϊστοχημεία παρόλο που έχουν δοκιμαστεί οχτώ διαφορετικά αντισώματα ειδικά για διάφορες περιοχές της πρωτεΐνης *Fras1*.

Όπως αναφέρεται παραπάνω, για να γίνει η απενεργοποίηση του γονιδίου του *Fras1* έχει μπει in frame το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της β-γαλακτοζιδάσης. Αυτό σημαίνει ότι στις περιοχές που εντοπίζεται στα *Fras1*^{-/-} η γαλακτοσιδάση, θα εκφράζεται στα αγρίου τύπου ποντίκια η *Fras1*. Χρησιμοποιώντας λοιπόν στην συγκεκριμένη εργασία το αντίσωμα της β-γαλακτοσιδάσης προσπαθήσαμε να εξάγουμε συμπεράσματα και να αποκαλύψουμε τις περιοχές που εντοπίζεται η *Fras1*. Τα πειράματα έγιναν σε ετερόζυγα για το *Fras1* έμβρυα όπου μπορούμε ευκολότερα να εντοπίσουμε την β-γαλακτοσιδάση.

Πραγματοποιώντας μια σειρά από πειράματα ανοσοϊστοχημείας και δοκιμάζοντας διάφορους τρόπους αποκάλυψης επιτόπων δεν καταφέραμε να εντοπίσουμε την β-γαλακτοσιδάση σε άλλες περιοχές του εγκεφαλικού ιστού παρά μόνο στην περιοχή του χοριοειδούς πλεγματος, όπου είχε εντοπιστεί προηγουμένως και η πρωτεΐνη *Fras1* στα αγρίου τύπου ποντίκια.

Το γεγονός ότι η πρωτεΐνη *Fras1* δεν εντοπίζεται στον εγκέφαλο μπορεί να ερμηνευτεί με διάφορους τρόπους. Αρχικά θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η πρωτεΐνη *Fras1* διαχέεται και δεν συσσωρεύεται σε κάποιο σημείο. Αν συμβαίνει κάτι τέτοιο τότε ο εντοπισμός της θα ήταν δύσκολος με κλασικές μεθόδους ανοσοϊστοχημείας και θα πρέπει να βγάλουμε συμπεράσματα για τον εντοπισμό της με διαφορετικό τρόπο. Ένας τρόπος που θα μπορούσε να απαντηθεί αυτό το ερώτημα είναι με western blot χρησιμοποιώντας εκχύλισμα πρωτεϊνών από τον εγκέφαλο αγρίου τύπου ποντικών.

Επιπλέον, θα μπορούσε να υποθέσει κανείς ότι η πρωτεΐνη *Fras1* δεν εκφράζεται στον νευρικό ιστό αλλά υπάρχει μόνο ως RNA το οποίο μπορεί να μεταφράζεται μόνο κάτω από συγκεκριμένα ερεθίσματα, όπως για παράδειγμα μετά από επαγωγή του φόβου. Για να ελεγχθεί μια τέτοια πιθανότητα θα μπορούσε να

γίνει επαγωγή του φόβου σε ποντίκια και αμέσως μετά να αφαιρεθούν οι εγκεφαλοι και να ελεγχθούν ως προς την παρουσία Fras1 πρωτεΐνης.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η μοναδική περιοχή όπου εντοπίζεται η πρωτεΐνη Fras1 είναι το χοριοειδές πλέγμα. Το χοριοειδές πλέγμα είναι ένα πολύ λεπτό επιθήλιο που βρίσκεται μέσα στις κοιλίες του εγκεφάλου και είναι υπεύθυνο για την έκκριση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Γενικά είναι μια περιοχή όπου μπορεί να συσσωρεύεται η πρωτεΐνη Fras1 καθιστώντας με αυτόν τον τρόπο εύκολο τον εντοπισμό της. Φυσικά η παρουσία της πρωτεΐνης εκεί οδηγεί στην υπόθεση ότι επιτελεί κάποια συγκεκριμένη λειτουργία στο σημείο αυτό.

Γενικά, επειδή το χοριοειδές πλέγμα είναι υπεύθυνο για την έκκριση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, η παρουσία της Fras1 εκεί θα μπορούσε να έχει σχέση με αυτήν την λειτουργία αφού θα μπορούσε να δεσμεύει αυξητικούς παράγοντες και να αλλάζει την σύσταση του. Για να επιβεβαιωθεί κάτι τέτοιο απαιτούνται βέβαια περισσότερα πειράματα που θα αφορούν τόσο την σύσταση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού όσο και την ικανότητα της Fras1 να δεσμεύει κάποιους παράγοντες.

Τέλος είναι σημαντικό να διερευνηθεί ο ρόλος που επιτελεί η πρωτεΐνη Fras1 στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Για αυτό το λόγο πρέπει να γίνουν περαιτέρω πειράματα και συγκριτικές μελέτες στον εγκεφαλο μεταξύ Fras1^{-/-} και αγρίου τύπου ποντικών ώστε να μπορέσουμε να παρατηρηθούν πιθανές αλλοιώσεις.

Βιβλιογραφία

Arin, M.J. & Roop, D.R. (2001). Disease model: heritable skin blistering. *Trends Mol. Med.*, 7, 422-424.

Boyd P.A., Keeling J.W. & Lindenbaum R.H., (1988), Fraser syndrome (cryptophthalmos-syndactyly syndrome): a review of eleven cases with postmortem findings, *American Journal of Medical Genetics*, V: 31, I: 1, pp.: 159-168.

Chiotaki R., Petrou P., Giakoumaki E., Pavlakis E., Sitaru C. & Chalepakis G., (2007), Spatiotemporal distribution of Fras1/Frem proteins during mouse embryonic development, *Gene Expression Patterns*, V: 7, I: 4, pp.: 381-388.

Dalezios Y., Papasozomenos B., Petrou P. & Chalepakis G., (2007), Ultrastructural localization of Fras1 in the sublamina densa of embryonic epithelial basement membranes, *Archives of Dermatological Research*, V: 299, I: 7, pp.: 337-343.

Darling S. & Gossler A., (1994) A mouse model for Fraser syndrome?, *Clinical Dysmorphology*, V: 3, pp.: 91-95.

Fraser G.R., (1962), Our genetical 'load': a review of some aspects of genetical variation, *Annals of Human Genetics*, V: 25, pp.: 387-415.

Gattuso J, Patton MA, Baraitser M. (1987) The clinical spectrum of Fraser syndrome: report of three new cases and review. *Med. Genetics* 24, 549-55.

Green M.C., (1989), Catalog of mutant genes and polymorphic loci. In MFLyon, AG Searle (eds): "Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse", 2nd edition, *Oxford University Press*, Oxford.

Hood J.D. & Cheresch D. A. (2002) Role of intergrins in cell invasion and migration. *Nature Reviews Cancer. Volume 2*, 91-100.

Jadeja S., Smyth I., Pitera J.E., Taylor M.S., van Haelst M., Bentley E., McGregor L., Hopkins J., Chalepakis G., Philip N., Perez Aytes A., Watt F.M., Darling S.M., Jackson I., Woolf A.S. & Scambler P.J., (2005), Identification of a new gene mutated in Fraser syndrome and mouse myelencephalic blebs, *Nature Genetics*, V: 37, I: 5, pp.: 520-525.

Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, Scambler PJ, Davidson WS, Beales PL, Lupski JR. (2001) Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science*, 293, 2256-2259.

Kiyozumi, D., Sugimoto, N., Sekiguchi, K. (2006) Breakdown of the reciprocal stabilization of QBRICK/Frem1, Fras1 and Frem2 at the basement membrane provokes Fraser syndrome-like defects. *PNAS.*, 103, 11981-11986.

Liddington R. (2001) Mapping out the basement membrane, *Nature structural biology*, Vol8, 573-574.

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., (2003), Fraser syndrome and mouse blebbed phenotype caused by mutations in *FRAS1/Fras1* encoding a putative extracellular matrix protein, *Nature Genetics*, V: 34, I: 2, pp.: 203-208.

Miosge N., (2001). The ultrastructural composition of basement membranes in vivo. *Histol Histopathol.* Oct; 16(4):1239-48.

Nishiyama A. & Stallcup W.B., (1993), Expression of NG2 proteoglycan causes retention of type VI collagen on the cell surface, *Molecular Biology of the Cell*, V: 4, pp.: 1097-1108.

Pavlakis E., Makrygiannis AK, Chiotaki R, Chalepakis G. (2008) Differential localization profile of *Fras1/Frem* proteins in epithelial basement membranes of newborn and adult mice, *Histochem Cell Biol.* Oct;130(4):785-93.

Petrou P., Pavlakis E., Dalezios Y., Galanopoulos V.K. & Chalepakis G., (2005), Basement membrane distortions impair lung lobation and capillary organization in the mouse model for Fraser Syndrome, *The Journal of Biological Chemistry*, V: 280, No: 11, pp.: 10350-10356.

Petrou P., Chiotaki R., Dalezios Y. & Chalepakis G., (2007), Overlapping and divergent localization of *Frem1* and *Fras1* and its functional implications during mouse embryonic development, *Experimental Cell Research*, V: 313, I: 5, pp.: 910-920.(a)

Roebroek A.J., Creemers J.W., Pauli I.G., Kurzik-Dumke U., Rentrop M., Gateff E.A., Leunissen J.A., Van de Ven W.J., (1992), Cloning and functional expression of *Dfurin2*, a subtilisin-like proprotein processing enzyme of *Drosophila melanogaster* with multiple repeats of a cysteine motif, *The Journal of Biological Chemistry*, V: 267, I: 24, pp.: 17208-17215.

Sadler J.E. (1998) Biochemistry and genetics of von Willebrand factor, *Annual Reviews of Biochemistry*, V: 67, pp.: 395-424.

Schwarz E. & Benzer S. (1999) The recently reported N1beta domain is already known as the Calx-beta motif, *Trends in Biochemical Science*, V: 24, No: 7, pp.: 260.

Slavotinek A. M. & Tift C. J., (2002), Fraser syndrome and cryptophthalmos: review of the diagnostic criteria and evidence for phenotypic modules in complex malformation syndromes, *Journal of Medical Genetics*, V: 39, I: 9, pp.: 623-633.

Smyth, I., Du, X., Taylor, M.S., Justice, M.J., Beutler, B. and Jackson, I.J. (2004) The extracellular matrix gene *Frem1* is essential for the normal adhesion of the embryonic epidermis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101, 13560–13565.

Smyth I. & Scambler P., (2005), The genetics of Fraser syndrome and the blebs mouse mutants, *Human Molecular Genetics*, V: 14, I: 2, pp.:R269-R274.

Takamiya K., Kostourou V., Adams S., Jadeja S., Chalepakis G., Scambler P.J., Haganir R.L. & Adams R.H., (2004), A direct functional link between the multi-PDZ domain protein *GRIP1* and the Fraser syndrome protein *Fras1*, *Nature Genetics*, V: 36, I: 2, pp.: 172-177.

Timmer J.R., Mak T.W., Manova K., Anderson K.V. & Niswander L., (2005), Tissue

morphogenesis and vascular stability require the Frem2 protein, product of the mouse myelencephalic blebs gene, *PNAS-USA*, V: 102, I: 33, pp.: 11746-11750.

Timpl, R., Brown, J.C. (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays*, 18, 123-132.

Thomas IT, Frias JL, Felix V, Sanchez de Leon L, Hernandez RA, Jones MC. (1986) Isolated and syndromic cryptophthalmos. *Am. J. Med. Genet*, 25, 85-98.

Vrontou S., Petrou P., Meyer B.I., Galanopoulos V.K., Imai K., Yanagi M., Chowdhury K., Scambler P.J. & Chalepakis G., 2003, *Fras1* deficiency results in cryptophthalmos, renal agenesis and blebbed phenotype in mice, *Nature Genetic*, V: 34, I: 2, pp.: 209-214.

Winter, R.M. (1988) Malformation syndromes: a review of mouse/human homology. *J. Med. Genet.*, 25, 480-487.

Winter R.M., (1990), Fraser syndrome and mouse “*bleb*” mutants, *Clinical Genetics*, V: 37, pp.: 494-495.