ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΜΣ: ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΙΤΛΟΣ: ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ Fras1 ΣΤΟ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΟ ΚΝΣ ΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟΝ *Fras1*$^{-/-}$ ΕΓΚΕΦΑΛΟ

ΚΑΛΟΓΕΡΑΚΗ ΕΥΓΕΝΙΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΧΑΛΕΠΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Ηράκλειο, Σεπτέμβριος 2011

UNIVERSITY OF CRETE
BIOLOGY DEPARTMENT
MSC MOLECULAR BIOLOGY & BIOMEDICINE

TITLE: IDENTIFICATION OF Fras1 IN THE DEVELOPING CNS IN MOUSE AND CORRELATION WITH MOLECULAR DEFECTS IN *Fras1*$^{-/-}$ BRAINS

KALOGERAKI EVGENIA
LABORATORY: MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY
SUPERVISOR: CHALEPAKIS GEORGIS

Heraklion, September 2011

Περίληψη

Η βασική μεμβράνη αποτελεί ένα σχηματισμό εξωκυττάριας ουσίας που οριοθετεί τους ιστούς και λειτουργεί ως εμπόδιο για την ανεξέλεγκτη διέλευση μακρομορίων, παγιδεύοντας σηματοδοτικά μόρια και αυξητικούς παράγοντες. Η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται στην βασική μεμβράνη όλων των επιθηλιακών δομών του ποντικού κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και κατέχει σημαντικό ρόλο στην καθιέρωση της επιθηλιακής/μεσεγχυματικής σύνδεσης.

Σύμφωνα με προηγούμενα αδημοσίευτα αποτελέσματα το γονίδιο *Fras1* εκφράζετε σε περιοχές του εγκεφάλου που παίζουν σημαντικό ρόλο σε διεργασίες όπως είναι η μνήμη και η έκφραση των συναισθημάτων. Στην παρούσα εργασία αναζητήσαμε περιοχές που εντοπίζεται η πρωτεΐνη Fras1 στον εγκέφαλο εμβρύων ποντικών. Βρέθηκε ότι ο εντοπισμός της Fras1 περιορίζεται στη χοριοειδή μήνιγγα, η οποία περιβάλλει τον εγκέφαλο, ακλουθώντας ένα ασυνεχές πρότυπο. Επιπλέον, πρωτεΐνη Fras1 εντοπίστηκε και στο χοριοειδές πλέγμα που βρίσκεται μέσα στις κοιλίες του εγκεφάλου.

Πειράματα συμπεριφοράς σε *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια αποκάλυψαν προβλήματα στην έκφραση του εξαρτημένου φόβου. Στο κύκλωμα αυτό συμμετέχουν περιοχές όπως η αμυγδαλή, ο ιππόκαμπος και ο φλοιός. Για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν κυτταρικές αλλοιώσεις σε εγκεφαλικές δομές που σχετίζονται με την εμφάνιση εξαρτημένου φόβου, επιλέξαμε να μελετήσουμε τον φλοιό με την χρήση μοριακών δεικτών. Πράγματι σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, υπάρχουν διαταραχές στην κατανομή κάποιων κυτταρικών τύπων στον φλοιό.

<u>Λέξεις κλειδιά</u>: βασική μεμβράνη, φλοιός, χοριοειδής μήνιγγα, χοριοειδές πλέγμα

Abstract

Basement membranes are sheet like arrangements rich in extracellular matrix proteins that serve a variety of functions including the physical separation of cell layers and tissues. Fras1 protein is located in the basement membrane of several mouse epithelia during embryonic development and plays an important role in the establishment of a functional epithelial/mesenchymal adhesion.

According to previous results, *Fras1* is expressed in areas of the brain which play an important role in processes such as the memory of emotional reactions. Here we investigate areas where Fras1 protein is localized in brains of mice embryos. We found that Fras1 is localized at pia mater following a discontinuous pattern. Also, Fras1 protein is detected at choroid plexus.

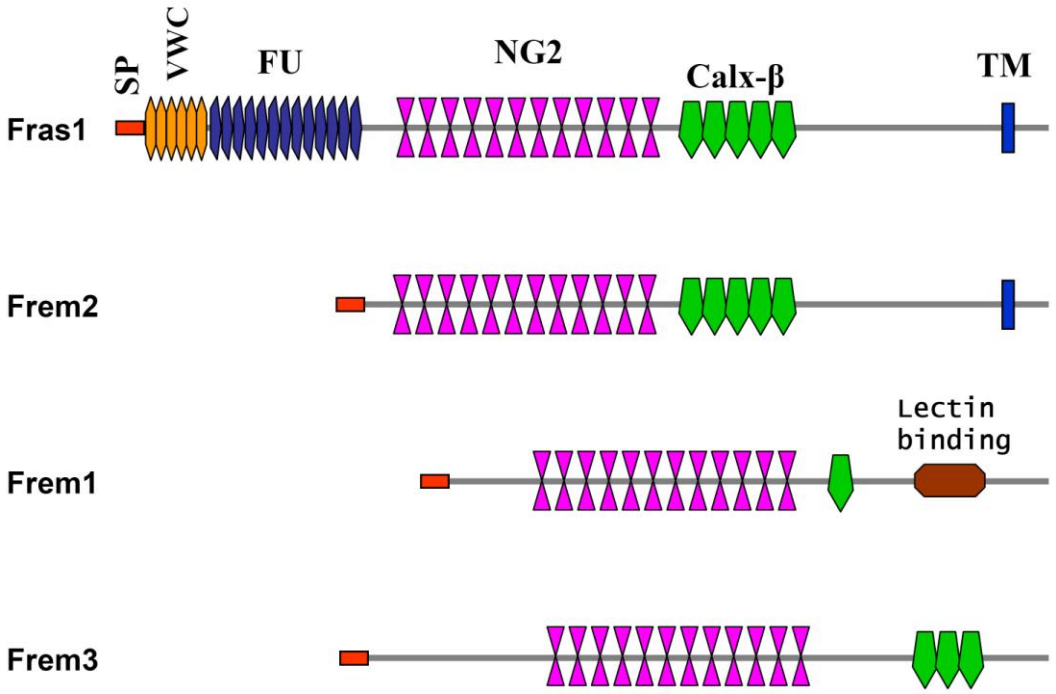
Fear conditioning experiments have revealed that *Fras1*$^{-/-}$ mice have defective memory of fear. This circuit involves various areas such as amygdala, hippocampus and cortex. To determine if there are cellular defects in those mice we studied the cortex with molecular markers. Our results reveal that there are disturbances in allocation of some cellular types in the cortex.

Keywords: basement membrane, cortex, pia mater, choroid plexus

Α.1. Εισαγωγή

Οι Fras1/Frem αποτελούν μέλη μιας νέας οικογένειας πρωτεϊνών του εξωκυττάριου χώρου που περιλαμβάνει τέσσερα μέλη τα οποία κωδικοποιούνται από τέσσερα παράλογα γονίδια, τα *Fras1* (Fraser syndrome protein 1), *Frem1* (Frem: Fras1-related extracellular matrix proteins), *Frem2* και *Frem3* (εικ.1). Όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας είναι συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας και εντοπίζονται στην βασική μεμβράνη (Short *et al.*, 2007 ; Pavlakis *et al.*, 2011).

Η βασική μεμβράνη είναι μια εξωκυττάρια δομή που βρίσκεται ανάμεσα στην βασικοπλευρική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων και τον συνδετικό ιστό. Περιβάλλει όλα τα επιθήλια, τα ενδοθήλια, τα μυϊκά κύτταρα, τα κύτταρα του λιπώδους ιστού καθώς και τα κύτταρα Schwann του περιφερικού νευρικού συστήματος (Timpl R and Brown JC, 1996). Παρέχει δομική υποστήριξη συμμετέχοντας στην σύνδεση επιθηλίου με τον υποκείμενο συνδετικό ιστό αλλά κατέχει και λειτουργικό ρόλο, συμμετέχοντας στον έλεγχο της επιθηλιακής αύξησης και διαφοροποίησης, σχηματίζοντας έναν αδιαπέραστο φραγμό (Hood and Cheresh, 2002). Έχει την ικανότητα να παγιδεύει πληθώρα σηματοδοτικών μορίων και αυξητικών παραγόντων (Timpl R. and Brown JC, 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 Cheresh, 2002; Brukner-Tuderman and Brukner, 1998). Τυπικά συστατικά των βασικών μεμβρανών αποτελούν οι λαμινίνες, τα νιδογόνα, το κολλαγόνο τύπου IV, οι πρωτεογλυκάνες και γενικά πληθώρα δομικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών συγκόλλησης (Miosge N, 2001).

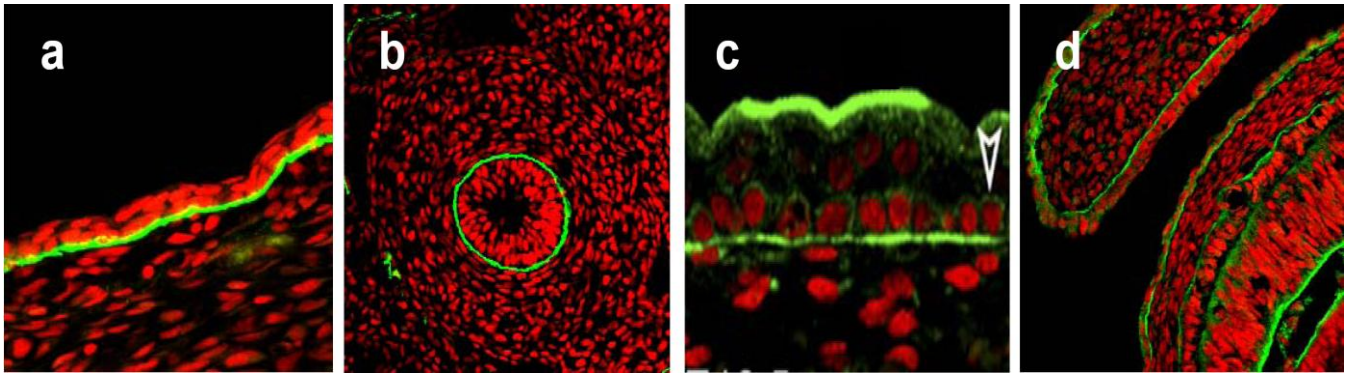


<u>Εικόνα 1:</u> Τα τέσσερα μέλη της οικογένειας Fras1/Frem και τα δομικά χαρακτηριστικά τους. Το πεπτίδιο-σινιάλο (SP) διατηρείται σε όλες τις πρωτεΐνες της οικογένειας. Επιπλέον, σε όλες υπάρχουν 1-5 μοτίβα πρόσδεσης ασβεστίου (Galx-β) και 12 GSPG μοτίβα (Chondroitin Sulfate ProteoGlycan motifs). Διαμεμβρανική περιοχή (TM) διαθέτουν μόνο οι πρωτεΐνες Fras1 και Frem2, ενώ στη Frem1 παρατηρείται ένα μοτίβο που συναντάται και στις λεκτίνες τύπου C. Η πρωτεΐνη Fras1 διαθέτει επίσης μια περιοχή με 6 επαναλαμβανόμενα μοτίβα κυστεϊνών παρόμοια με αυτά της περιοχής C του παράγοντα von Willebrandt (VWC), καθώς επίσης και 13 επαναλαμβανόμενα μοτίβα κυστεΐνης παρόμοια με αυτά των πρωτεασών φουρινών (FU).

Α.2. Έκφραση των *Fras1/Frem* και εντοπισμός των αντίστοιχων πρωτεϊνών

Από πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του mRNA βρέθηκε ότι τα γονίδια *Fras1* και *Frem2* εκφράζονται από διάφορες κατηγορίες επιθηλιακών κυττάρων από την ημέρα 9.5 της εμβρυογένεσης (E9.5), όπως το επιθήλιο του εντέρου, του ουρητήρα, της επιδερμίδας, καθώς και το επιθήλιο του κερατοειδούς (Vrontou *et al.*, 2003). Αντιθέτως, τα γονίδια *Frem1* και *Frem3* φαίνεται να έχουν κυρίως μεσεγχυματική προέλευση, με το *Frem1* να παρουσιάζει ιδιαίτερα δυναμική έκφραση σε περιοχές επιθηλιακών-μεσεγχυματικών αλληλεπιδράσεων (Petrou *et al.*, 2007).

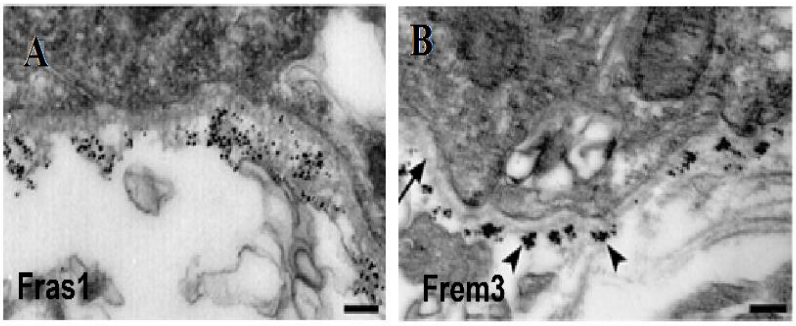
Σε εμβρυϊκό επίπεδο, όλα τα μέλη της οικογένειας Fras1/Frem συνεντοπίζονται στην βασική μεμβράνη όλων σχεδόν των επιθηλίων (Chiotaki *et al.*, 2007). Ενδεικτικά αναφέρονται τα επιθήλια της επιδερμίδας, του αμφιβληστροειδούς, των νεφρών και του χοριοειδούς πλέγματος (Vrontou *et al.* 2003 , Petrou *et al.*, 2007a , Chiotaki *et al.*, 2007) καθώς επίσης και τα μεσοθήλια όπως εκείνα που περιβάλλουν το έντερο και τον πνεύμονα (Chiotaki *et al.*, 2007). Επιπλέον, η πρωτεΐνη Frem1 έχει βρεθεί να εντοπίζεται ενδοκυτταρικά σε περιδερμικά κύτταρα καθώς επίσης σε μια ειδική κατηγορία επιθηλιακών κυττάρων στην βάση του αναπτυσσόμενου τριχοθηλακίου αλλά και στην βασική του μεμβράνη (Petrou *et al.*, 2007) (εικ. 2).



<u>Εικόνα 2</u>: Εντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1/Frem στη βασική μεμβράνη εμβρυϊκών επιθηλίων ποντικού. **(a)** Εντοπισμός της Fras1 στη βασική μεμβράνη του επιδερμικού επιθηλίου την E14.5. **(b)** Η πρωτεΐνη Frem2 στη βασική μεμβράνη του επιθηλίου του εντέρου την E14.5. **(c)** Εντοπισμός της Frem1 τόσο στη βασική μεμβράνη του επιδερμικού επιθηλίου, όσο και σε περιδερμικά κύτταρα, την E16.5 το βέλος δείχνει τον ενδοκυτταρικό εντοπισμός της Frem1 στο στάδιο αυτό. **(d)** Εντοπισμός της Frem3 σε βασικές μεμβράνες στο μάτι και στο βλέφαρο την E14.5

Σε ενήλικα ποντίκια, οι πρωτεΐνες Fras1/Frem συνεντοπίζονται στη βασική μεμβράνη του δέρματος μόνο σε περιοχές με έντονο πολλαπλασιασμό, όπως τα άκρα, η άκρη της ουράς και τα βλέφαρα. Η πρωτεΐνη Frem3, αντίθετα, είναι η μόνη που εξακολουθεί να υπάρχει στη βασική μεμβράνη όλων των επιθηλίων των ενηλίκων ποντικών όταν οι άλλες απουσιάζουν (Pavlakis *et al.*, 2008).

Η ταυτοποίηση της ακριβούς θέσης των πρωτεϊνών Fras1/Frem στη βασική μεμβράνη διαφόρων εμβρυϊκών επιθηλίων έγινε με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (εικ. 3) και βρέθηκε ότι όλες εντοπίζονται στην sublamina densa της βασικής μεμβράνης (Dalezios *et al.*, 2007 ; Petrou *et al.*, 2007). Στη βασική μεμβράνη με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης διακρίνονται δύο στιβάδες, η lamina lucida και η lamina densa. Η sublamina densa, βρίσκεται κάτω από την lamina densa και είναι μια σχετικά ηλεκτρονιοδιαπερατή περιοχή που συνορεύει και συγχωνεύεται με τον υποκείμενο συνδετικό ιστό.

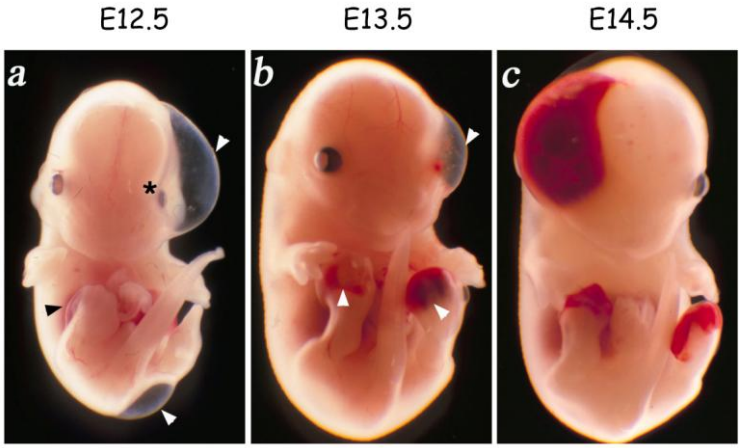


<u>Εικόνα 3:</u> Συγκριτική ανάλυση του εντοπισμού των πρωτεϊνών Fras1 (A) και Frem3 (B) με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης. Οι πρωτεΐνες Fras1 και Frem3 εντοπίζονται ως μαύρα κοκκία (clusters χρυσού/αργύρου) στην περιοχή της sublamina densa της βασικής μεμβράνης. Το βέλος δείχνει την βασική μεμβράνη ενώ οι κεφαλές από τα βέλη αναφέρονται στην πρωτεΐνη Frem3 (Petrou *et al.*, 2007).

Α.3. Διερεύνηση της βιολογικής λειτουργίας του γονιδίου *Fras1*

Με σκοπό την κατανόηση του βιολογικού ρόλου του γονιδιακού προϊόντος του *Fras1* στον ποντικό, πραγματοποιήθηκε η απενεργοποίηση του γονιδίου με την μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού (Vrontou *et al.*, 2003). Ο προκύπτων φαινότυπος μελετήθηκε σε δύο διαφορετικά στελέχη ποντικού το C57BL/10 (inbred) και το NMRI (outbred). Και στα δύο στελέχη τα ετερόζυγα άτομα δεν παρουσιάζουν διαταραχές. Ομόζυγα για την *Fras1* μετάλλαξη 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 ομοζυγωτών εμβρύων (περίπου 50%) επιβιώνει, ενηλικιώνεται και διασταυρώνεται.

Κύριο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό των *Fras1*$^{-/-}$ εμβρύων αποτελεί η δημιουργία μεγάλων υποεπιδερμικών φουσκαλίδων (εικ. 4), που εντοπίζονται ήδη από την ημέρα E12.5 ως διαφανείς φουσκαλίδες που προοδευτικά γίνονται αιμορραγικές ως την ημέρα E16.5. Εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή της κεφαλής, γύρω από τα μάτια, αρκετά συχνά στα άκρα και σπανιότερα στην ράχη.



<u>Εικόνα 4:</u> 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. Τα βέλη δείχνουν τις περιοχές όπου υπάρχουν φουσκαλίδες και ο αστερίσκος την παραμόρφωση που προκύπτει από την εξέλιξη της φουσκαλίδας (Vrontou *et al.*, 2003).

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των *Fras1*$^{-/-}$ ενηλίκων ποντικών είναι οι συγχωνεύσεις που παρατηρούνται στα βλέφαρα (κρυπτοφθαλμίες) και στα άκρα (συνδακτυλίες) (εικ. 5). Συγκεκριμένα, ένα ποσοστό περίπου 60% των *Fras1*$^{-/-}$ ενηλίκων ποντικών χαρακτηρίζεται από τελείως κλειστά ή μερικώς κλειστά βλέφαρα, στο ένα ή και στα δύο μάτια, ενώ μεγάλο ποσοστό χαρακτηρίζεται από συγχωνεύσεις των δακτύλων στα άκρα. Επιπλέον, στα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια παρατηρείται μονόπλευρη ή αμφίπλευρη νεφρική αγενεσία ή δυσπλασία (Vrontou *et al*., 2003), αλλά και συγχωνευμένοι λοβοί στον δεξιό πνεύμονα, ως αποτέλεσμα του μη σωστού διαχωρισμού τους κατά την ανάπτυξη (Petrou *et al*, 2005).

<u>Εικόνα 5</u>: Ο φαινότυπος των ενηλίκων *Fras1*$^{-/-}$ ποντικών. **(a)** ποντίκι αγρίου τύπου, **(b)** ποντίκι *Fras1*$^{-/-}$ με κρυπτοφθαλμία στο δεξί μάτι και **(c)** *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκι με συνδακτυλία στο πίσω πόδι (Vrontou *et al.*, 2003).

Ανάλογες διαταραχές έχουν περιγραφεί και σε μια ομάδα μεταλλαγμάτων ποντικών που ονομάζονται *bleb* και έχουν συσχετιστεί με μεταλλάξεις στα γονίδια της οικογένειας Fras1/Frem (Smyth and Scambler, 2005). Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις του γονιδίου *Fras1* προκαλούν τον φαινότυπο *'blebbed' (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. Η Grip1 είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που φέρει PDZ περιοχές μέσω των οποίων αλληλεπιδρά με καρβοξυτελικά κατάλοιπα των Fras1 και Frem2. Η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να είναι απαραίτητη για την στοχευμένη έξοδο των πρωτεϊνών αυτών από το κύτταρο και το σωστό εντοπισμό τους στη βασική μεμβράνη. Στα *Grip1*$^{-/-}$ ποντίκια, οι Fras1 και Frem2 δεν οδηγούνται εκτός του κυττάρου, με αποτέλεσμα ο *Grip1*$^{-/-}$ φαινότυπος να είναι παρόμοιος με το φαινότυπο των *Fras1*$^{-/-}$ και *Frem2*$^{-/-}$ (Kiyozumi *et al.*, 2006). Το γονίδιο *Frem3* πιθανόν να είναι υπεύθυνο για την μετάλλαξη *fh*, όμως δεν είναι δυνατό να συσχετιστεί με αυτή διότι τα ποντίκια του στελέχους αυτού δεν είναι πλέον διαθέσιμα.

Στον άνθρωπο, αντίστοιχες διαταραχές με τα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια εμφανίζουν όσοι πάσχουν από το σύνδρομο Fraser. Το σύνδρομο Fraser είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη γενετική ασθένεια, που διαθέτει μεγάλη γενετική ετερογένεια (Fraser, 1962). Χαρακτηρίζεται από κρυπτοφθαλμία, συνδακτυλία, ανωμαλίες στο λάρυγγα και στην ουρογεννητική οδό, κρανιακές δυσμορφίες, διανοητική καθυστέρηση και μυοσκελετικές ανωμαλίες (Slavotinek and Tifft, 2002).

Τα τελευταία χρόνια το σύνδρομο Fraser συσχετίστηκε με μεταλλάξεις στο γονίδιο *FRAS1* (4q21.21) έπειτα από αλληλούχιση του γονιδίου σε ασθενείς με το συγκεκριμένο σύνδρομο (Mc Gregor *et al*., 2003). Μεταλλαγές του *FREM2* έχουν, επίσης, εντοπισθεί σε ασθενείς με σύνδρομο Fraser (Jadeja *et al*, 2005).

Α.4. Σκοπός

Το έναυσμα για την διατύπωση των στόχων της παρούσας εργασίας δόθηκε από τις παρακάτω παρατηρήσεις/δεδομένα. Σε ασθενείς που πάσχουν από σύνδρομο Fraser έχουν περιγραφεί διανοητικές διαταραχές. Το γονίδιο *Fras1* εκφράζεται στον εγκέφαλο ενηλίκων ποντικών σε περιοχές που σχετίζονται με μηχανισμούς μνήμης και μάθησης (Γ. Χαλεπάκης, Ε. Παυλάκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα) και τέλος πειράματα συμπεριφοράς έδειξαν ότι τα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια παρουσιάζουν προβλήματα στην ανάπτυξη του εξαρτημένου φόβου (Α. Σταματάκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Αναλυτικότερα, το πείραμα εξαρτημένης αντίδρασης φόβου (fear conditioning) σχετίζεται με την εκμάθηση φόβου νέων ερεθισμάτων και αποτελεί μια μορφή μάθησης κατά την οποία ο φόβος συνδέεται με δυο διαδοχικά ερεθίσματα. Το ένα ερέθισμα είναι ουδέτερο π.χ. ένας ήχος, και ακολουθείται από ένα δεύτερο ερέθισμα που είναι επώδυνο π.χ. ηλεκτροσόκ. Μετά από μερικές επαναλήψεις των ερεθισμάτων τα φυσιολογικά ποντίκια μαθαίνουν να συσχετίζουν το ουδέτερο ερέθισμα με το επώδυνο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το άκουσμα του ήχου από μόνο του να τους προκαλεί φόβο. Η απόκριση του ποντικού σε τέτοιου είδους καταστάσεις είναι το πάγωμα (freezing), κατά το οποίο το ζώο μετά το ηχητικό ερέθισμα θυμάται τι θα επακολουθήσει (ηλεκτροσόκ), φοβάται και παραμένει ακίνητο για ένα σύντομο χρονικό διάστημα (LeDoux, 1996). Τα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια, παρόλο του ακούν τον ήχο δεν τον συνδυάζουν με το επώδυνο ερέθισμα, με αποτέλεσμα να μην φοβούνται και άρα είτε να μην παγώνουν, είτε να παγώνουν για ελάχιστο χρονικό διάστημα.

Κεντρικό ρόλο στην επεξεργασία των ερεθισμάτων για την έκφραση του φόβου διαδραματίζει η αμυγδαλή. Επίσης, ο νεοφλοιός αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του κυκλώματος φόβου καθώς στέλνει στην αμυγδαλή πληροφορίες, αλλά επιπλέον, λειτουργεί και ως αποθήκη ήδη επεξεργασμένων πληροφοριών οι οποίες έχουν σταλεί εκεί από την αμυγδαλή.

Για την κατανόηση της λειτουργίας της πρωτεΐνης Fras1 αλλά και των διανοητικών διαταραχών που προκαλεί η έλλειψη της, διερευνήσαμε το πρότυπο εντοπισμού της στον εγκέφαλο ποντικών. Παράλληλα με τον εντοπισμό της Fras1 μελετήσαμε τον νεοφλοιό των μεταλλαγμένων ποντικών για τυχόν διαταραχές ανιχνεύσιμες με ιστολογικές τεχνικές.

Στόχος των πειραμάτων αυτών ήταν η συλλογή πειραματικών δεδομένων ώστε να συμβάλλουμε στη συσχέτιση της λειτουργίας της Fras1 με τις φυσιολογικές εγκεφαλικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκεται.

Β. Υλικά και μέθοδοι

Β.1. Προετοιμασία ιστών για κρυοτομές

Για τη μικροσκοπική παρατήρηση ιστολογικών τομών εμβρύων στο μικροσκόπιο πραγματοποιείται αρχικά μονιμοποίηση των ιστών.

Υλικά:
- 4 % PFA σε PBS
- 30 % σουκρόζη σε PBS
- Ισοπεντάνιο

Διαδικασία:
- Απομόνωση εμβρύων/ιστών σε PBS και ξέπλυμα στο ίδιο διάλυμα
- Μονιμοποίηση σε 4% PFA στους 4° C. Ο χρόνος επώασης εξαρτάται από το μέγεθος του ιστού, όσο μεγαλύτερο το μέγεθος του ιστού τόσο μεγαλύτερος και ο χρόνος επώασης. Ενδεικτικά:
  Έμβρυα E10.5-E14.5: 4-6 ώρες
  Έμβρυα E15.5-E18.5: 6-8 ώρες
  Απομονωμένοι εγκέφαλοι από έμβρυα: 4-5 ώρες
  Εγκέφαλοι ενηλίκων ποντικών: ενδοκαδριακή έγχυση με 4% PFA και 2 ώρες επώαση
- Κρυοπροστασία στους 4° C σε διάλυμα 30% σουκρόζης, έως ότου κατακρημνιστούν οι ιστοί (συνήθως ολονύχτια)
- Πάγωμα σε ισοπεντάνιο για 5 min στους -80° C
- Αποθήκευση τους -80° C

Β.2. Επεξεργασία αντικειμενοφόρων πλακών με ζελατίνη

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για ιστολογία πρέπει να καλυφθούν με ζελατίνη ώστε να παραμείνουν προσκολλημένες οι τομές καθόλη την διάρκεια των διαδικασιών.

Υλικά:
- Διάλυμα ζελατίνης (1.5 gr ζελατίνη, 300 ml dH_2O, 150 mg $KCr(SO_4)_2$ x 12 H_2O)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες

Διαδικασία:

Προσθήκη 1.5 gr ζελατίνης σε 300 ml H_2O και ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα στους 50° C. Αφού διαλυθεί η ζελατίνη προστίθενται 150 mg $KCr(SO_4)_2$ x 12 H_2O και συνεχίζεται η ανάδευση. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίζονται στο διάλυμα ζελατίνης σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μεταφέρονται για στέγνωμα 20 hrs στους 37° C.

Β.3. Ανοσοϊστοχημεία σε ιστολογικά παρασκευάσματα

Υλικά:
- PB 10x (10.9 gr Na_2HPO_4, 3.2 gr KH_2PO_4, H_2O έως 1lt)
- PBS 1x pH 7.4 (100 ml PB, 9 gr NaCl, H_2O έως 1lt)
- Διάλυμα παρεμπόδισης (blocking) (1 % FBS σε PBS/Triton 0.1 %)

- Mowiol (για 250 ml: 24 g analytical grade glycerol, 9.6 g Mowiol, 24 ml dH_2O, 0.2 M Tris-Cl, pH 8,5)

Διαδικασία:

- Παραγωγή ιστολογικών τομών πάχους 10 μm, σε κρυοτόμο στους -25° C, με χρήση κρυοπροστατευτικού υλικού O.C.T. compound (Tissue Tek)
- Χρήση ειδικής συσκευής για ανοσοϊστοχημεία στην οποία προσαρμόζονται οι αντικειμενοφόρες πλάκες με 300 μl 0.05 % Tween σε PBS
- 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε PBS
- επώαση με 0.1 % Triton σε PBS για 10 min σε RT
- 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε PBS
- επώαση με διάλυμα παρεμπόδισης για 1 ώρα σε RT
- επώαση με πρώτο αντίσωμα αραιωμένο κατάλληλα σε διάλυμα παρεμπόδισης στους 4 °C ολονύκτια

Την επόμενη μέρα:

- 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε PBS
- επώαση με το δεύτερο αντίσωμα σε αραίωση 1:500 σε διάλυμα παρεμπόδισης για 1 ώρα σε RT
- 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε PBS
- επώαση με 0.01 mg RNAse A σε 0.05 % Tween σε PBS για 30 min στους 37° C
- 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε PBS
- χρώση πυρήνων με propidium iodide (1:1000 σε 0.05 % Tween σε PBS) για 5 min σε RT
- 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε PBS
- οι τομές καλύπτονται με 50 μl Mowiol και ακολουθεί παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού

Εναλλακτικά γίνεται χρώση των πυρήνων με DAPI (1:1000 σε 0.05 % Tween σε PBS) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου οπότε δεν είναι απαραίτητη η επώαση με RNase A.

Β.4. Ενίσχυση σήματος σε κρυοτομές

Στις περιπτώσεις που ήταν απαραίτητη η ενίσχυση του σήματος χρησιμοποιήθηκε ειδικό kit (TSA fluorescing: tyramide signal amplification της εταιρίας PercinElmer) για φθορισμό και το σύμπλοκο αβιδίνης- βιοτίνης (Vectastain ABC kit της Vector laboratories) για πολλαπλασιασμό του σήματος.

Διαδικασία:

-Επώαση των ιστολογικών παρασκευασμάτων για 15 min σε RT και σε σκοτάδι σε διάλυμα υπεροξειδίου που περιέχει:

124 ml μεθανόλη
125 ml PBS
2.5 ml υπεροξέιδιο

- ξέπλυμα σε PBS για 5 min σε RT
- 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε PBS
- επώαση με 0.1 % Triton σε PBS για 10 min σε RT
- 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε PBS
- επώαση με διάλυμα παρεμπόδισης για 1 ώρα σε RT
- επώαση με πρώτο αντίσωμα αραιωμένο κατάλληλα σε διάλυμα παρεμπόδισης στους 4° C

ολονύκτια

Την δεύτερη ημέρα:

- 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε PBS
- επώαση με δεύτερο αντίσωμα, βιοτινιλιωμένο σε αραίωση 1:200 σε διάλυμα παρεμπόδισης για 30 min σε RT και σκοτάδι
- Παράλληλα ετοιμάζεται το σύμπλοκο αβιδίνης - βιοτίνης, με 1:50 αβιδίνη και 1:50 βιοτίνη σε διάλυμα παρεμπόδισης και επωάζεται για 30 min στον πάγο και σε σκοτάδι
- Μετά την επώαση με το αντίσωμα, ακολουθούν 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε PBS
- επώαση με το σύμπλοκο αβιδίνης - βιοτίνης για 20 min σε RT
- 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε PBS
- επώαση με το αντιδραστήριο Tyramide (1:500 σε amplification diluent) για 5 min σε RT
- 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε PBS
- επώαση με 0.01 mg RNAse A σε 0.05 % Tween σε PBS για 30 min στους 37° C
- 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε PBS
- χρώση πυρήνων με propidium iodide (1:1000 σε 0.05 % Tween σε PBS) για 5 min σε RT
- 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε PBS
- κάλυψη με 50 μl Mowiol και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Β.5 Αποκάλυψη επιτόπων για ανοσοϊστοχημικές μελέτες

Σε αρκετές περιπτώσεις απαιτείται αποκάλυψη των επιτόπων (επιτόπου) για μια πιο αποτελεσματική ανίχνευση από το αντίσωμα. Για τον σκοπό αυτό απαιτείται ειδική επεξεργασία. Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο τρόποι για την αποκάλυψη επιτόπων: Α) επώαση με διάλυμα όξινου pH και Β) βράσιμο των τομών σε διάλυμα χαμηλού pH.

Α τρόπος: Επώαση με διάλυμα όξινου pH

Υλικά:

- ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος με όξινο φωσφορικό νάτριο (77.1 mM Na_2HPO_4 και 61.45 mM citric acid buffer, pH 4.0)

Διαδικασία:

- οι αντικειμενοφόρες πλάκες προσαρμόζονται στην ειδική συσκευή με 300 μl 0.05 % Tween σε PBS
- 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε διάλυμα κιτρικού οξέος pH 4.0
- επώαση με 0.1 % Triton σε διάλυμα κιτρικού οξέος pH 4.0 για 10 min σε RT
- 3 x 5 min ξεπλύματα με 0.05 % Tween σε διάλυμα κιτρικού οξέος pH 4.0
- επώαση με διάλυμα παρεμπόδισης για 1 ώρα σε RT
- επώαση με πρώτο αντίσωμα αραιωμένο κατάλληλα σε διάλυμα παρεμπόδισης στους 4°C ολονύκτια

Στην συνέχεια η διαδικασία είναι ίδια με αυτή που περιγράφετε στην παράγραφο Β.3.

Β τρόπος: Βράσιμο τομών σε διάλυμα χαμηλού pH

Υλικά:

- διάλυμα κιτρικού νατρίου 10 mM, pH 6.0

Διαδικασία:

- οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφήνονται 20 min σε RT
- μονιμοποίηση των τομών για 2 min με 4 % PFA σε RT
- 3 x 5 min ξεπλύματα με PBS
- βράσιμο για 1 min σε διάλυμα κιτρικού νατρίου pH 6.0 (οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τα ιστολογικά παρασκευάσματα τοποθετούνται στο διάλυμα και ο χρόνος μετράει από την στιγμή που θα αρχίσει ο βρασμός)
- τα πλακάκια παραμένουν στο διάλυμα έως ότου αυτό φτάσει σε RT, όπου και προσαρμόζονται στην συσκευή και ακολουθείτε η διαδικασία της ανοσοϊστοχημείας (βλ. παράγραφο Β.3.)

Πίνακας 1

Αντίσωμα	**Αραίωση**	**Εταιρία**	**Ενίσχυση/unmasking**
Fras1 2-NG2 (rabbit polyclonal)	1:200	Παρασκευή του εργαστηρίου μας	ναι/όχι
Fras1 3-NG2 (rabbit polyclonal)	1:200	Παρασκευή του εργαστηρίου μας	ναι/όχι
Laminin β2 (rabbit polyclonal)	1:250	προσφορά του Timpl R.	όχι/όχι
Satb2 (mouse monoclonal)	1:500	Abcam	όχι/ναι (2ος τρόπος)
Ctip2 (rat monoclonal)	1:1000	Abcam	όχι/ναι (2ος τρόπος)
Nestin (rabbit polyclonal)	1:500	GenScript	όχι/ναι (1ος τρόπος)
Alexa Flour 488 Goat anti rabbit	1:500	Molecular Probe	
Alexa Frour 488 goat anti mouse	1:500	Molecular Probe	
Alexa Frour 488 goat anti rat	1:500	Molecular Probe	

Πίνακας 1: Περιγραφή των αντισωμάτων και των αραιώσεων που χρησιμοποιήθηκαν. Η πρώτη στήλη αντιστοιχεί στο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε, η δεύτερη στήλη αφορά στην αραίωση που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίσωμα, η τρίτη στήλη στην εταιρία που παρασκευάζει το κάθε αντίσωμα και η τέταρτη στήλη στον τρόπο με τον οποίο έγιναν τα πειράματα ανοσοιστοχημείας για κάθε αντίσωμα, αν χρησιμοποιήθηκε ενίσχυση ή κάποιος τρόπος αποκάλυψης επιτόπων.

Γ. Αποτελέσματα

Γ.1. Χαρακτηρισμός του νεοφλοιού με μοριακούς δείκτες

Για να κατανοήσουμε τον ρόλο της Fras1 στον εγκέφαλο ποντικών αναζητήσαμε μοριακές διαταραχές σε διάφορες περιοχές οι οποίες σχετίζονται με το κύκλωμα φόβου χρησιμοποιώντας μοριακούς δείκτες. Το συγκεκριμένο κύκλωμα περιλαμβάνει περιοχές του θαλάμου, του σωματοαισθητικού φλοιού, της αμυγδαλής, του υποθαλάμου και του εγκεφαλικού στελέχους.

Στο πρώτο κομμάτι της εργασίας αυτής, έγινε χρήση μοριακών δεικτών που είναι χαρακτηριστικοί για τον νεοφλοιό ώστε να διερευνηθεί αν υπάρχουν, στην περιοχή αυτή, διαφοροποιήσεις μεταξύ αγρίου τύπου και *Fras1*$^{-/-}$ ποντικών. Για τον σκοπό αυτό αναλύθηκαν εγκέφαλοι τόσο από έμβρυα όσο και από ενήλικα ποντίκια με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας σε κρυοτομές.

Ο νεοφλοιός είναι μια δομή στον εγκέφαλο των σπονδυλωτών με χαρακτηριστικές λειτουργικές και δομικές ιδιότητες. Διαδραματίζει κεντρικό ρόλο σε όλες τις ανώτερες εγκεφαλικές λειτουργίες όπως η αίσθηση, η μνήμη, η προσοχή, η αντίληψη, η σκέψη, η γλώσσα και η συνείδηση. Οι περισσότερες περιοχές του νεοφλοιού έχουν έξι διαφορετικές στοιβάδες. Από την επιφάνεια του προς τα μέσα, αυτές είναι: η μοριακή (I), η έξω κοκκιώδης (II), η έξω πυραμιδική (III), η έσω κοκκιώδης (IV), η έσω πυραμιδική (V) και η στοιβάδα VI με πολύμορφα κύτταρα. Είναι χαρακτηριστικό ότι κατά την ανάπτυξη οι εσωτερικές στοιβάδες σχηματίζονται πριν τις εξωτερικές.

Ο κυρίαρχος τύπος κυττάρων στον νεοφλοιό του εγκεφάλου είναι οι πυραμιδικοί νευρώνες που καταλαμβάνουν το 75-85 %, ενώ το υπόλοιπο 15-25 % αποτελούν οι ενδιάμεσοι νευρώνες. Οι πυραμιδικοί νευρώνες χρησιμοποιούν το γλουταμινικό οξύ ως νευροδιαβιβαστή και κάνουν μακριές συνδέσεις με άλλες περιοχές του φλοιού. Η προέλευση των πυραμιδικών κυττάρων είναι κυρίως από την κοιλιακή και υποκοιλιακή ζώνη του εμβρυϊκού χιτωνίου και μεταναστεύουν ακτινωτά για να σχηματίσουν τελικά τις στοιβάδες του φλοιού. Από την άλλη, οι ενδιάμεσοι νευρώνες χρησιμοποιούν ως νευροδιαβιβαστή το γ-αμινοβουτυρικό οξύ και συνδέουν μεταξύ τους κοντινούς νευρώνες δημιουργώντας τοπικά κυκλώματα. Αυτού του τύπου οι νευρώνες προέρχονται από τον βασικό τελεγκέφαλο (basal telencephalon) και η μετανάστευση τους γίνεται εφαπτομενικά μέσα στον φλοιό (Hevner, 2006).

Οι πυραμιδικοί νευρώνες στον εγκεφαλικό νεοφλοιό των θηλαστικών χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τους νευρώνες που δημιουργούν ενδοφλοιϊκές συνδέσεις (corticocortical projections) και σε αυτούς που κάνουν υποφλοιϊκές συνδέσεις (subcortical projections). Οι νευρώνες που βρίσκονται στα εξωτερικά στρώματα του φλοιού παράγονται στην υποκοιλιακή ζώνη (subventricular zone) και απαιτείται σε αυτούς η έκφραση του Satb2 για την δημιουργία αξονικών προεκβολών που συνδέουν μεταξύ τους τα δυο εγκεφαλικά ημισφαίρια. Αντίθετα, οι νευρώνες που εντοπίζονται στα εσωτερικά στρώματα του φλοιού εκφράζουν μεταγραφικούς παράγοντες όπως Ctip2 και Fetz2, που παίζουν σημαντικό ρόλο για την δημιουργία προεκβολών σε υποφλοιϊκές περιοχές. Τα μονοπάτια Ctip2/Fetz2 και Satb2 φαίνεται να δρουν ανταγωνιστικά εξασφαλίζοντας ότι κάθε νευρώνας θα υιοθετήσει ένα συγκεκριμένο χαρακτήρα σχετικά με τον τύπο των προεκβολών που θα σχηματίσει (Leone *et al*, 2008).

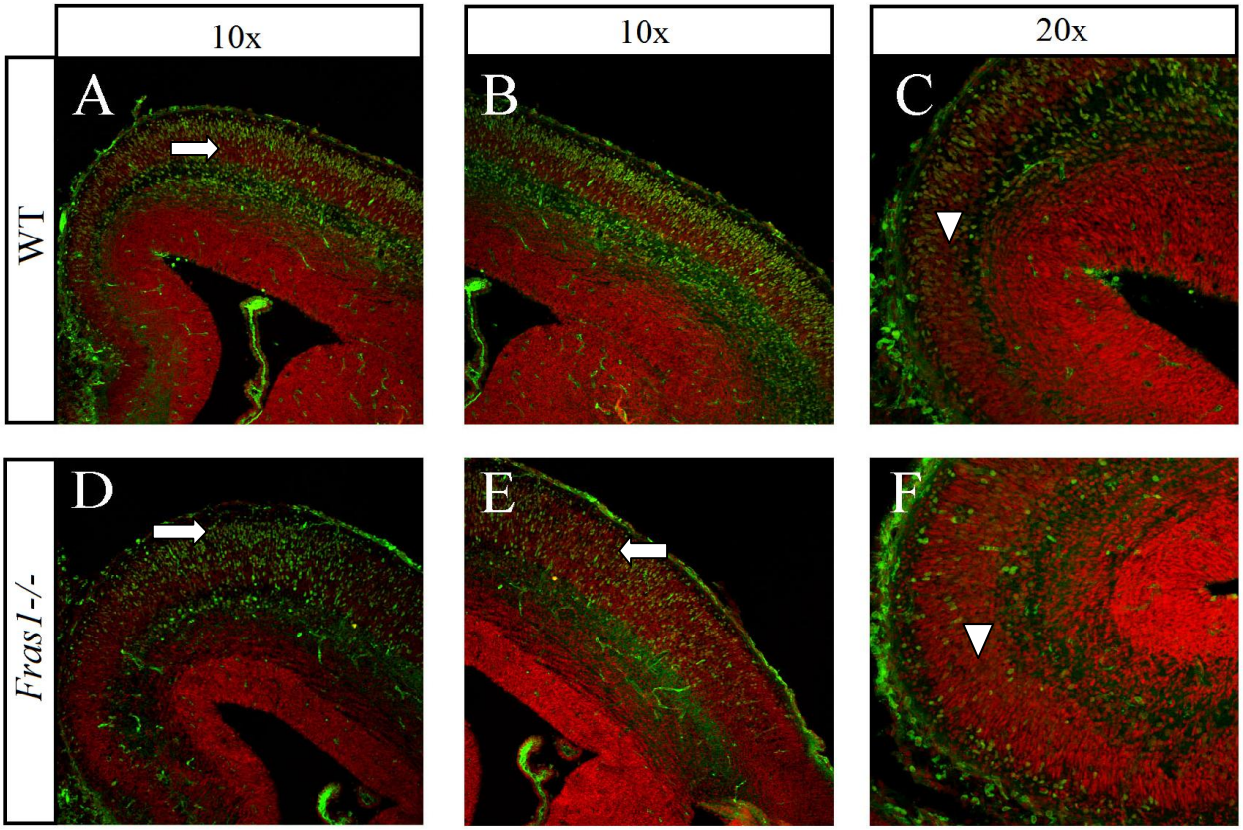
Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε αρχικά αντίσωμα ενάντια στην πρωτεΐνη Satb2. Η Satb2 είναι μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με την αναδιοργάνωση της χρωματίνης και όπως αναφέρθηκε προηγουμένως εκφράζεται σε πυραμιδικούς νευρώνες που εκτείνουν άξονες στο αντίθετο ημισφαίριο μέσω του μεσολόβιου (corpus callosum). Το αντίσωμα αυτό λοιπόν, αναγνωρίζει νευρώνες κυρίως στις στοιβάδες II έως IV του φλοιού.

Χρησιμοποιώντας το αντίσωμα Satb2 με τις καθιερωμένες τεχνικές ανοσοϊστοχημείας διαπιστώθηκε ότι το σήμα φθορισμού ανίχνευσης της πρωτεΐνης δεν ήταν ικανοποιητικό. Με στόχο τη βελτίωση του σήματος, ελέγχτηκαν διάφορες συνθήκες μονιμοποίησης των ιστών και αποκάλυψης των επιτόπων. Χρησιμοποιώντας 4 % PFA για μονιμοποίηση και βράζοντας τις τομές

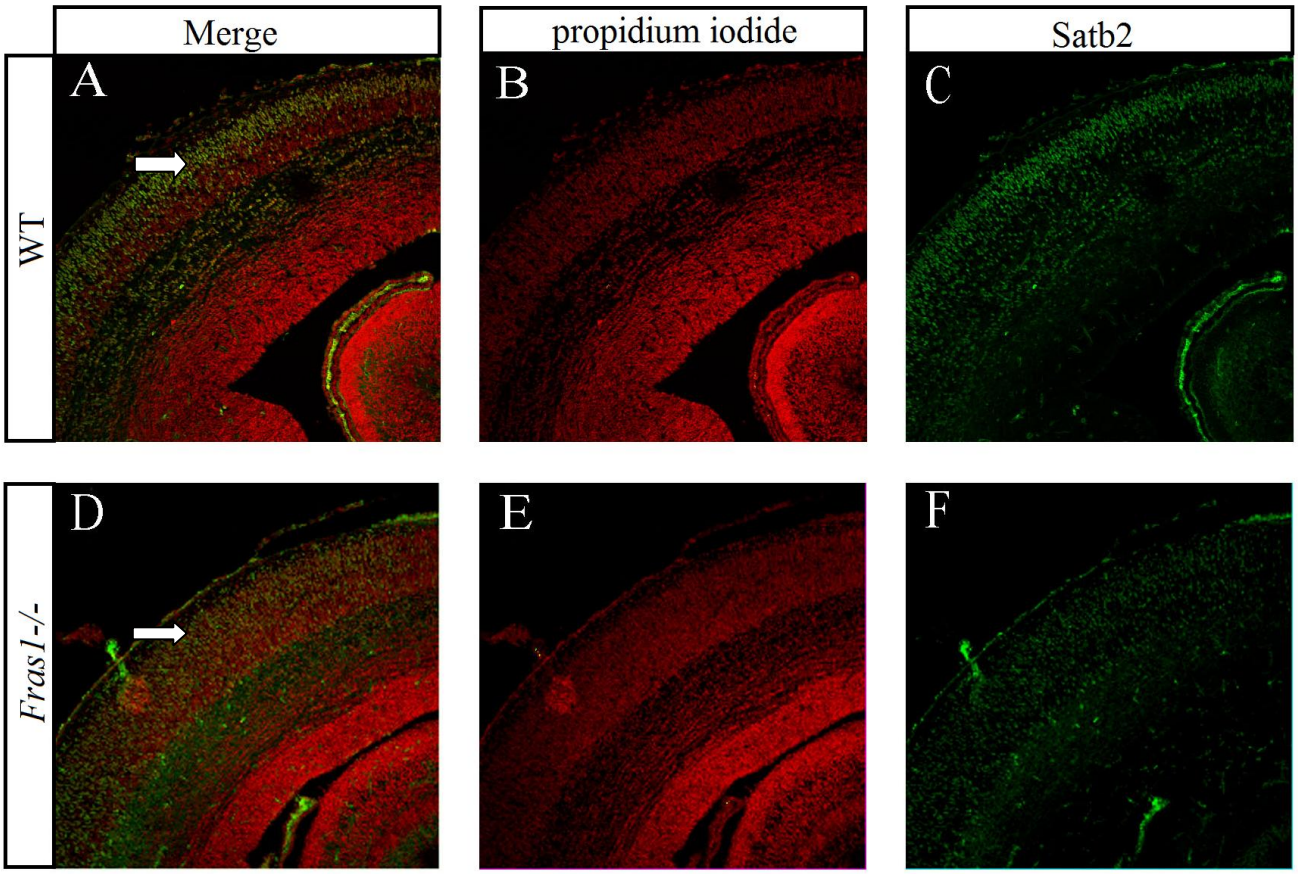
σε διάλυμα κιτρικού νατρίου pH 6.0 (βλ. Ενότητα Β.5.) επιτεύχθηκαν βέλτιστες ανίχνευσης του ειδικού σήματος φθορισμού.

Το αντίσωμα ενάντια στην Satb2 χρησιμοποιήθηκε σε εγκάρσιες τομές εμβρυϊκών εγκεφάλων. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν εγκέφαλοι από έμβρυα 14.5, 16.5 και 18.5 ημερών τόσο αγρίου τύπου όσο και *Fras1*$^{-/-}$.

Το γενικό πρότυπο εντοπισμού της Satb2 στον εμβρυϊκό εγκέφαλο ήταν παρόμοιο μεταξύ φυσιολογικών και *Fras1*$^{-/-}$ ποντικών. Ωστόσο, όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες παρατηρούνται κάποιες διαφορές στην κατανομή των Satb2 θετικών κυττάρων σε όλο το μήκος του νεοφλοιού. Έτσι, στις τομές από εμβρυϊκούς εγκεφάλους αγρίου τύπου τα συγκεκριμένα πυραμιδικά κύτταρα είναι τακτοποιημένα σε στιβάδες με συγκεκριμένο προσανατολισμό και πυκνότητα, ενώ σε αντίστοιχες τομές των *Fras1*$^{-/-}$ εμβρύων διακρίνεται μια αταξία στην κατανομή των Satb2 θετικών κυττάρων στον φλοιού, όπου φαίνεται να είναι οργανωμένα πιο αραιά και όχι σε συγκεκριμένες στιβάδες (εικ. 7D). Επιπλέον, σε περιοχές όπου ενώνονται τα δύο ημισφαίρια, όπως η δευτερεύουσα κινητική περιοχή ή ο οπισθοσπλήνιος φλοιός, η πυκνότητα τους είναι αρκετά μειωμένη (εικ. 7F). Οι διαφοροποιήσεις αυτές παρατηρήθηκαν σε όλα τα εμβρυϊκά στάδια που αναλύθηκαν.



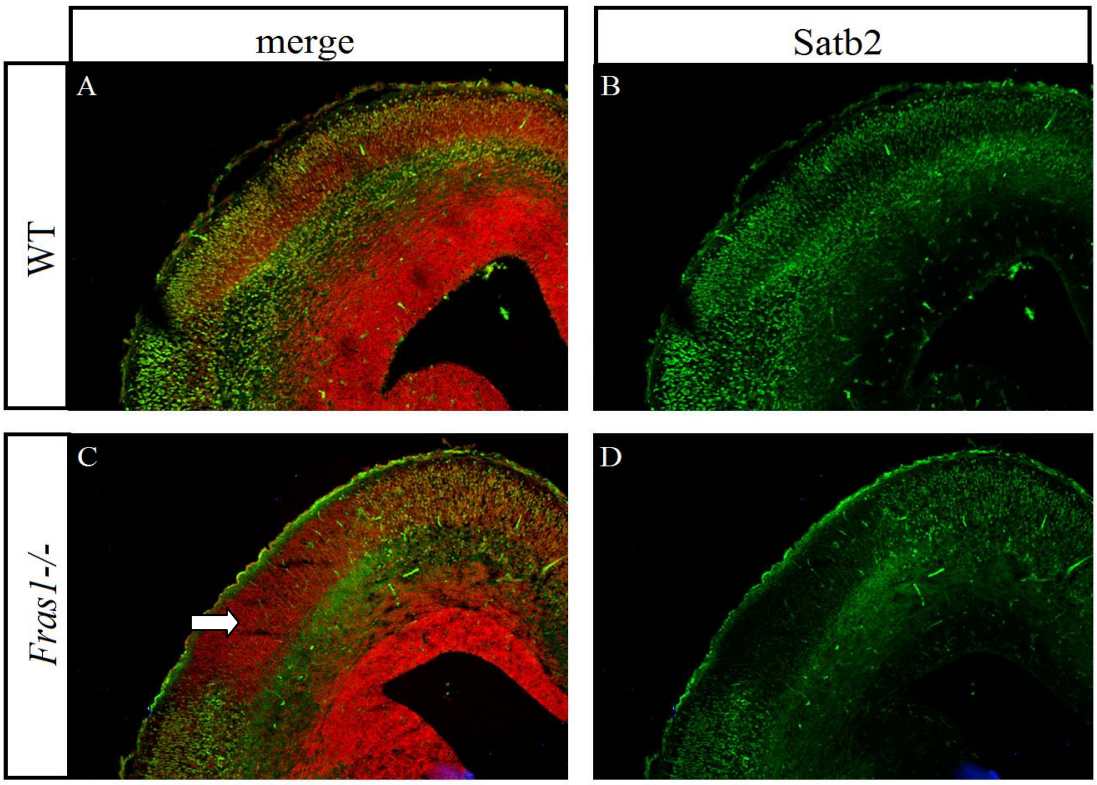
<u>Εικόνα 7:</u> Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης Satb2 σε εμβρυϊκούς εγκεφάλους E14.5. Κατανομή των Satb2 θετικών πυραμιδικών κυττάρων (πράσινο) στην περιοχή του νεοφλοιού σε αγρίου τύπου **(A, B, C)** και *Fras1*$^{-/-}$ έμβρυα **(D, E, F)** σε εγκάρσιες τομές. Τα βέλη δείχνουν τις διαφορές στην κατανομή των Satb2 θετικών κυττάρων και οι κεφαλές των βέλων τις περιοχές όπου τα κύτταρα (εντοπίζονται οι πυρήνες με κόκκινο) είναι πιο αραιά.



<u>Εικόνα 8:</u> Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης Satb2 σε εγκεφάλους από έμβρυα E18.5. (A, B, C) περιοχή νεοφλοιού από αγρίου τύπου έμβρυο, **(D, E, F)** αντίστοιχη περιοχή νεοφλοιού *Fras1*$^{-/-}$ εμβρύου. Τα βέλη αναφέρονται στην επιφανειακή στοιβάδα του νεοφλοιού όπου παρατηρείται διαφορά ως προς την πυκνότητα των Satb2 θετικών κυττάρων μεταξύ των εγκεφάλων αγρίου τύπου και *Fras1*$^{-/-}$ εμβρύων. Με κόκκινο ανιχνεύονται οι πυρήνες **(B, E)** με πράσινο η πρωτεΐνη Satb2 **(C, F)** (εγκάρσιες τομές 10μm).

Όπως παρατηρείται στην εικ. 8, η πυκνότητα των Satb2 θετικών κυττάρων της εξωτερικής στιβάδας στα μεταλλαγμένα έμβρυα είναι μικρότερη από αυτή των φυσιολογικών εμβρύων. Η διαφορά περιγράφεται καλύτερα όταν από την εικόνα αφαιρέσουμε τη χρώση των πυρήνων και συγκρίνουμε μόνο το πρότυπο εντοπισμού της Satb2 (εικ. 8C, 8F).

Επιπλέον, σε αρκετά *Fras1*$^{-/-}$ έμβρυα εντοπιστήκαν περιοχές στον νεοφλοιό όπου η ανίχνευση της Satb2 διακόπτεται και μετά από ένα κενό (gap) στην έκφρασή της συνεχίζει με το γνωστό πρότυπο (εικ. 9). Ως κενά αναφέρονται περιοχές του φλοιού με πλήρη έλλειψη της πρωτεΐνης Satb2, δημιουργώντας έτσι ένα διακεκομμένο πρότυπο εντοπισμού της σε σχέση με το συνεχόμενο πρότυπο που είναι χαρακτηριστικό για τα αγρίου τύπου. Οι περιοχές του φλοιού που εντοπίζονται τα κενά δεν είναι συγκεκριμένες και συνήθως παρατηρούνται περισσότερα από ένα, είτε στο ένα είτε και στα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια. Επιπλέον, εκτός από την έλλειψη της Satb2 στις περιοχές αυτές παρατηρείται μεγαλύτερη πυκνότητα των πυρήνων.

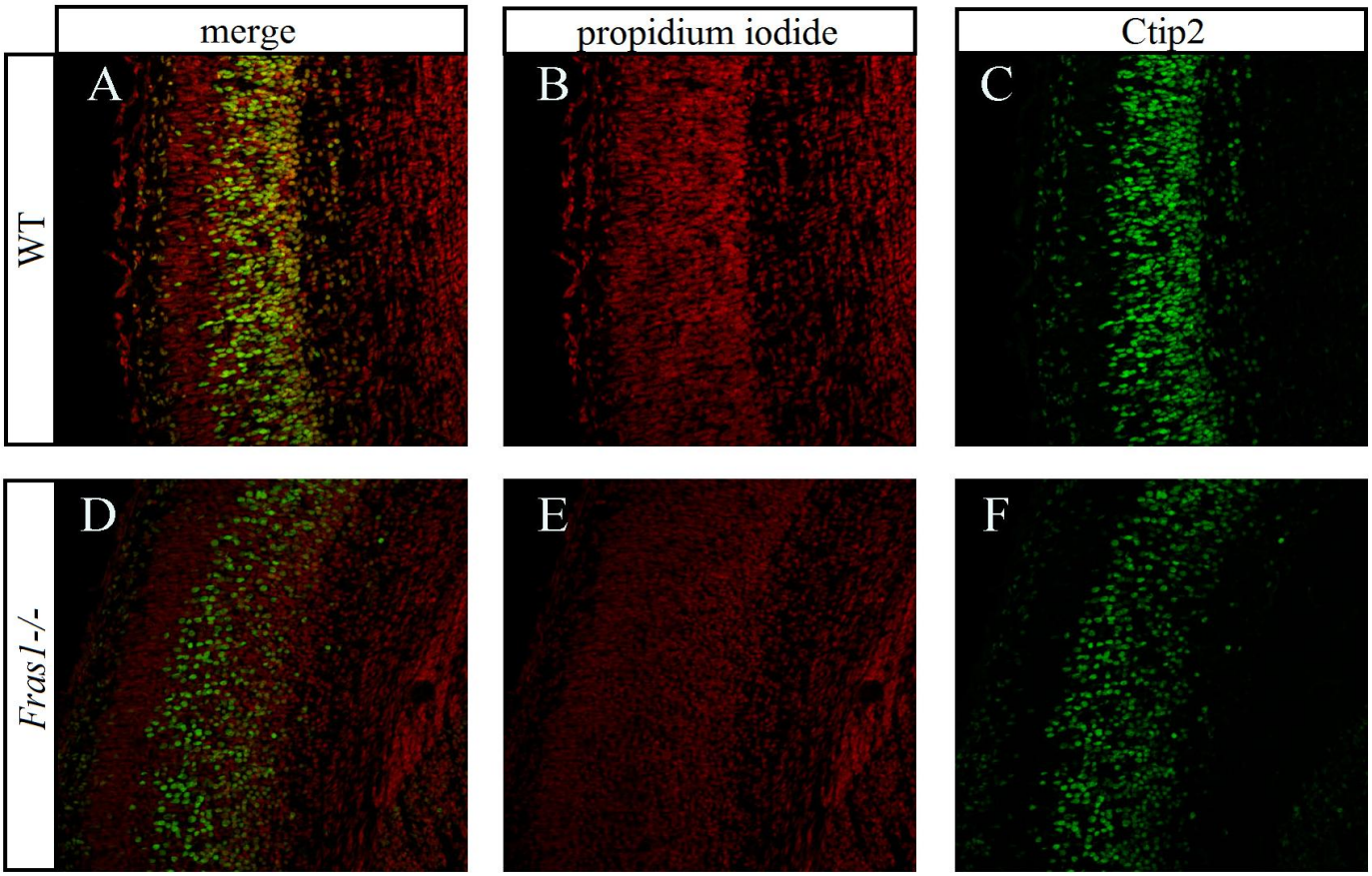


<u>Εικόνα 9</u>: Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης Satb2 σε εγκεφάλους από έμβρυα E16.5. Η πρωτεΐνη Satb2 (πράσινο) όπως εντοπίζεται στο νεοφλοιό από αγρίου τύπου **(A, B)** και *Fras1*$^{-/-}$ **(C, D)** έμβρυα. Το βέλος δείχνει την περιοχή όπου εντοπίζεται το κενό στο πρότυπο του Satb2 στα *Fras1*$^{-/-}$ έμβρυα. Με κόκκινο ανιχνεύονται οι πυρήνες (εγκάρσιες τομές 10μm, μεγέθυνση 10x).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση εγκεφάλων νεογέννητων (P1, P4 και P7) και ενηλίκων ποντικών (P30 και P60) με τον ίδιο μοριακό δείκτη. Όσο αφορά τα νεογέννητα οι παρατηρήσεις ήταν κατά βάση όμοιες με τα έμβρυα, δηλαδή εντοπίζονται περιοχές που υπάρχει διαφορετική κατανομή των Satb2 θετικών κυττάρων στον φλοιό αλλά και περιοχές με μικρότερη πυκνότητα σε σχέση με τα αγρίου τύπου. Από την άλλη, στα ενήλικα ποντίκια που αναλύθηκαν οι διαφορές είναι λιγότερο έντονες. Σε αυτά εντοπίστηκαν μόνο μικρές περιοχές με πιο αραιή κατανομή των Satb2 θετικών κυττάρων στον φλοιό των *Fras1*$^{-/-}$ ποντικών. Όσο αφορά τα κενά εντοπίζονται στα νεογέννητα ποντίκια έως και την ημέρα 4 μετά την γέννηση (P4) ενώ σε μεγαλύτερα στάδια και σε ενήλικα ποντίκια δεν εντοπίζονται καθόλου.

Ένας άλλος μοριακός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για περιγραφή του φλοιού είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Ctip2 που εκφράζεται κυρίως από πυραμιδικά κύτταρα στις στοιβάδες V και VI. Και σε αυτή την περίπτωση η μέθοδος ανοσοϊστοχημείας που εφαρμόστηκε ήταν ίδια με το Satb2, δηλαδή αποκάλυψη επιτόπων με βράσιμο σε διάλυμα κιτρικού νατρίου pH 6.0, καθώς επίσης και οι εγκέφαλοι που αναλύθηκαν προέρχονταν από τα ίδια στάδια.

Αρχικά, στους εμβρυϊκούς και νεογνικούς εγκεφάλους παρατηρήθηκαν διαφορές στην κυτταρική πυκνότητα των Ctip2 θετικών νευρώνων του φλοιού. Όπως φαίνεται στην εικόνα 10, στους *Fras1*$^{-/-}$ εγκεφάλους τα Ctip2 θετικά κύτταρα είναι πιο αραιά σε σχέση με την αντίστοιχη περιοχή στα αγρίου τύπου και καταλαμβάνουν μεγαλύτερη περιοχή του φλοιού.

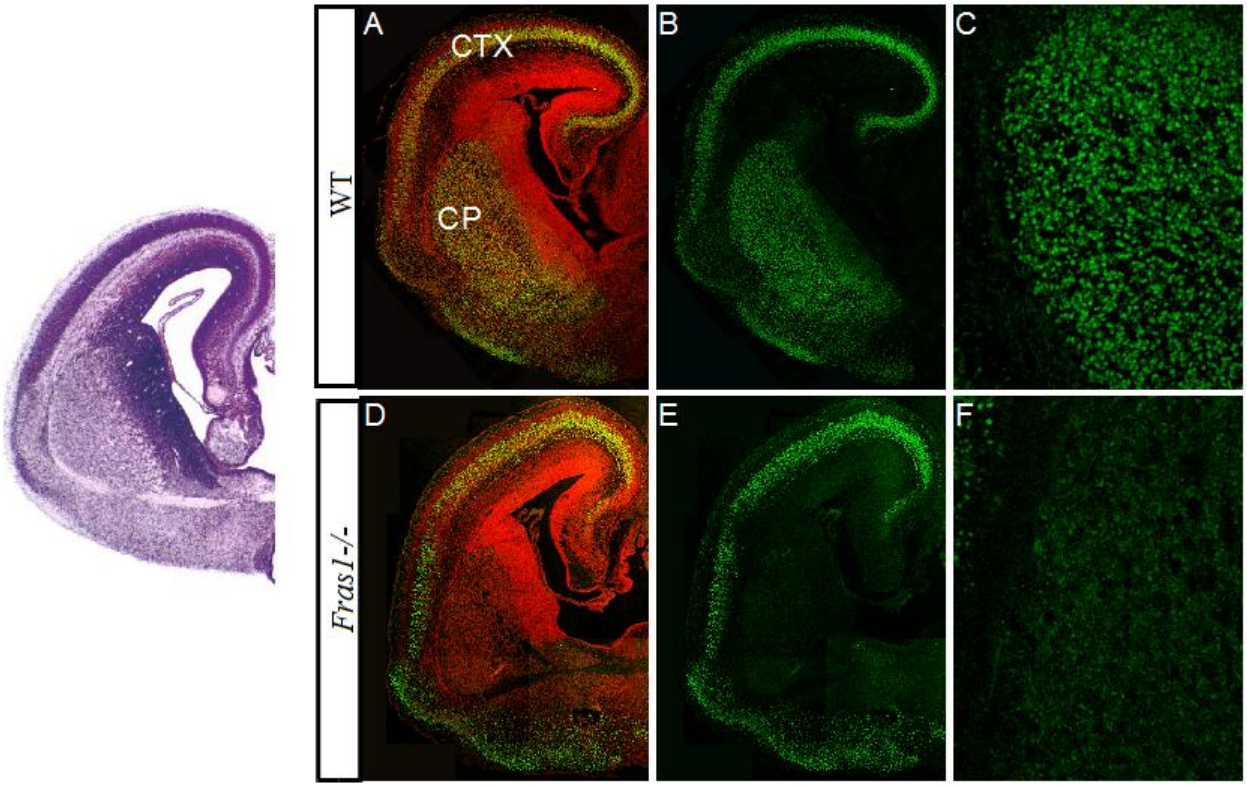


<u>Εικόνα 10:</u> Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης Ctip2 σε εγκέφαλο από έμβρυο E16.5. (A, B, C) νεοφλοιός από αγρίου τύπου ποντίκι, **(D, E, F)** νεοφλοιός από *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκι. Με κόκκινο ανιχνεύονται οι πυρήνες **(B, E)** και με πράσινο η πρωτεΐνη **(C, F)** (εγκάρσιες τομές 10μm, μεγέθυνση 10x).

Επιπλέον, και με αυτόν τον μοριακό δείκτη ανιχνεύονται κενά στον φλοιό. Χρησιμοποιώντας διαδοχικές τομές από τον ίδιο εγκέφαλο *Fras1*$^{-/-}$ για ανοσοϊστοχημεία και με τα δύο αντισώματα (Satb2 και Ctip2) διαπιστώθηκε ότι τα κενά εντοπίζονται στις ίδιες περιοχές. Επίσης, παρατηρούνται και με το αντίσωμα για το Ctip2 έως την ημέρα 4 μετά την γέννηση (P4), ενώ σε μετέπειτα σταδία δεν εντοπίζονται καθόλου. Σε εγκεφάλους από ενήλικα ποντίκια που αναλύθηκαν δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στην κατανομή των Ctip2 θετικών κυττάρων στην περιοχή του φλοιού.

Εκτός από τις στοιβάδες V και VI του φλοιού, Ctip2 θετικά κύτταρα υπάρχουν και στο ραβδωτό (striatum). Το ραβδωτό βρίσκεται κάτω από τον φλοιό προς το εσωτερικό μέρος του εμπρόσθιου εγκεφάλου, αποτελεί κύριο σταθμό ερεθισμάτων των βασικών γαγγλίων και δέχεται ερεθίσματα από τον φλοιό. Γενικά το ραβδωτό είναι μια αρκετά ετερογενής περιοχή όσο αφορά την σύσταση του σε νευρικά κύτταρα. Από αυτά τα κύτταρα, το μεγαλύτερο ποσοστό (περίπου 90%) είναι GABAεργικοί μεσαίοι ακανθωτοί νευρώνες (medium spiny neurons) και εκφράζουν Ctip2, που είναι απαραίτητο για την διαφοροποίηση τους (Arlotta *et al*, 2008).

Σε ένα ποσοστό περίπου 60 % των εγκεφάλων από *Fras1*$^{-/-}$ έμβρυα που αναλύθηκαν (στάδια E14.5 και E16.5), παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις σχετικά με τον εντοπισμό του Ctip2 στο ραβδωτό. Αυτές οι διαφορές αφορούν την μερική έλλειψη του Ctip2 είτε και στις δύο πλευρές είτε μόνο στην μια, χωρίς ωστόσο να μεταβάλλεται η πυκνότητα των κυττάρων του ραβδωτού σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια. Σε ένα μικρό ποσοστό των *Fras1*$^{-/-}$ εγκεφάλων η έλλειψη ήταν ολική. Στα ενήλικα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια δεν ανιχνεύτηκε καμία διαφορά στο ραβδωτό σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου.



<u>Εικόνα 11</u>: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της πρωτεΐνης Ctip2 σε εμβρυϊκούς εγκεφάλους E16.5. (A, B) Σύνθετη εικόνα από εγκέφαλο αγρίου τύπου όπου η Ctip2 ανιχνεύεται με πράσινο σε νεοφλοιό και ραβδωτό **(C)** ραβδωτό από αγρίου τύπου ποντίκι, **(D, E)** σύνθετη εικόνα από *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκι, με πράσινο φαίνεται το Ctip2, διακρίνεται η έλλειψη σήματος στο ραβδωτό αλλά και ένα μικρό κενό στον νεοφλοιό, **(F)** ραβδωτό από *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκι με εμφανή έλλειψη Ctip2 θετικών κυττάρων. Οι σύνθετες εικόνες προέκυψαν από ένωση μικρότερων με μεγέθυνση 10x. CTX; cortex, CP: caudalputament (εγκάρσιες τομές 10μm).

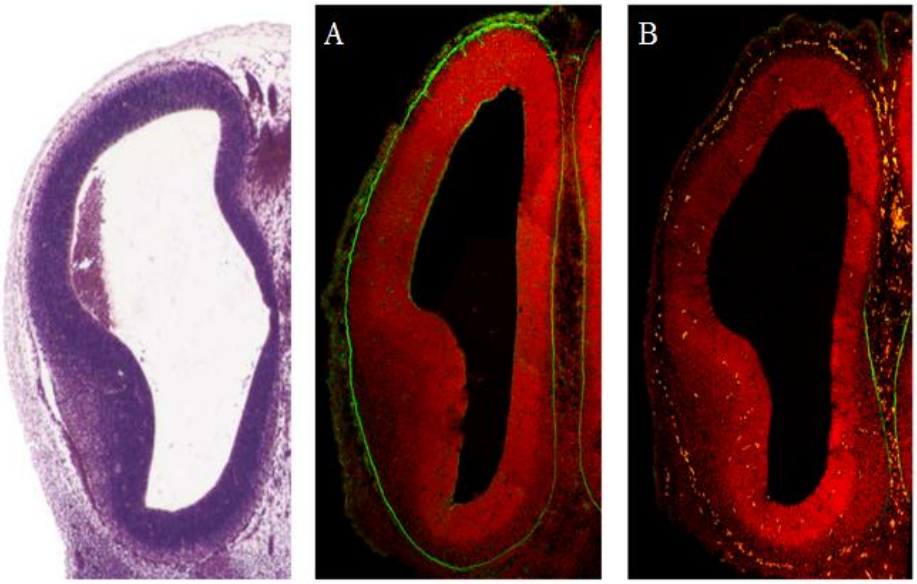
Γ.2. Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στην χοριοειδή μήνιγγα του εγκεφάλου

Βάση αδημοσίευτων αποτελεσμάτων, έχουν εντοπιστεί μετάγραφα του *Fras1* σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Επειδή η πρωτεΐνη Fras1 δεν έχει ανιχνευτεί στον νευρικό ιστό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με δύο διαφορετικά αντισώματα ενάντια στην περιοχή NG2 της πρωτεΐνης Fras1 ώστε να βρεθούν περιοχές που πιθανά εντοπίζεται. Παρά τις δοκιμές με διάφορα πρωτόκολλα ανοσοϊστοχημείας για αποκάλυψη επιτόπων δεν ανιχνεύτηκε Fras1 εντός του νευρικού ιστού. Όμως, η πρωτεΐνη εντοπίστηκε στην περιοχή του χοριοειδούς πλέγματος (choroid plexus) και στην χοριοειδή μήνιγγα (pia mater).

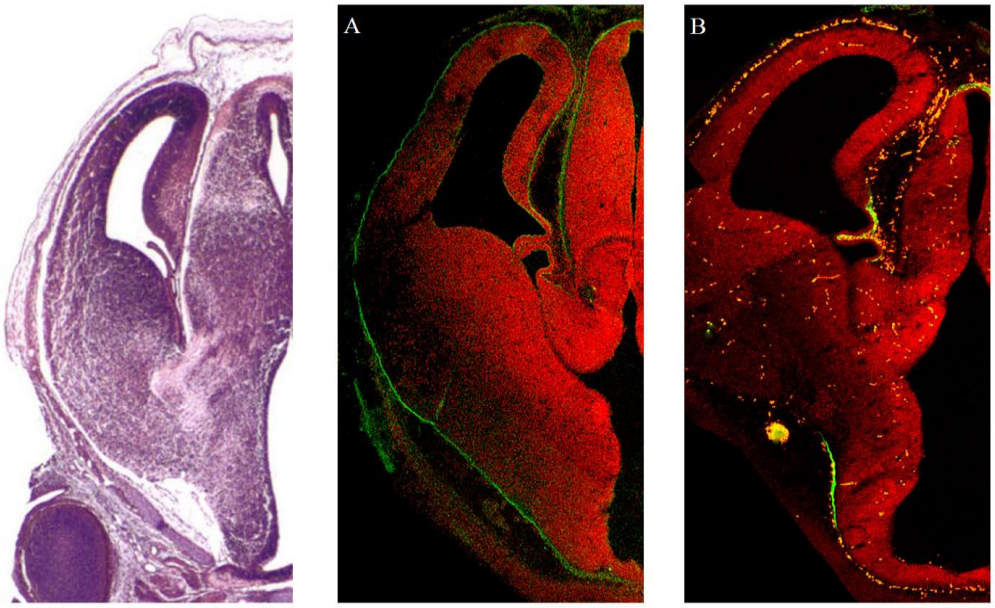
Ο εγκέφαλος για να προστατεύεται από μηχανική βλάβη περιβάλλεται από τρία μεμβρανώδη περιβλήματα που λέγονται μήνιγγες. Από μέσα προς τα έξω είναι η χοριοειδής, η αραχνοειδής και η σκληρή μήνιγγα. Η χοριοειδής μήνιγγα βρίσκεται σε άμεση επαφή με τον εγκέφαλο, ακολουθώντας όλες τις αύλακες του. Είναι μια λεπτή ινώδης δομή, αρκετά αδιαπέραστη σε διαλυτούς παράγοντες συγκρατώντας με τον τρόπο αυτό το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Ο ρόλος της είναι να προστατεύει τον εγκέφαλο καθώς και να παρέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζεται αφού επιτρέπει σε ορισμένα αγγεία να περνάνε προς αυτόν (Fricke *et al*, 2001). Η χοριοειδής μήνιγγα παρουσιάζει προεκβολές με αγγεία, που έχουν εισχωρήσει μέσα στις κοιλίες του εγκεφάλου, τα οποίο ονομάζονται χοριοειδή πλέγματα και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του

εγκεφαλονωτιαίου υγρού.

Για την μελέτη της πρωτεΐνης Fras1 στους εγκεφάλους πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημείας με ενίσχυση ώστε να μεγιστοποιηθεί η ένταση του φθορισμού. Η Fras1 πρωτεΐνη εντοπίζεται σε αγρίου τύπου έμβρυα στην περιοχή της χοριοειδούς μήνιγγας μόνο σε συγκεκριμένα σημεία ακολουθώντας ένα ασυνεχές πρότυπο. Για να προσδιοριστεί η χοριοειδής μήνιγγα στα αγρίου τύπου έμβρυα χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης το αντίσωμα για την λαμινίνη β2 που αποτελεί συστατικό της. Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία σε διαδοχικές τομές από αγρίου τύπου εγκεφάλους με τα αντισώματα για την λαμινίνη β2 και για την Fras1 αντίστοιχα. Με τον τρόπο αυτό και χρησιμοποιώντας τον ίδιο εγκέφαλο κάθε φορά ταυτοποιήθηκαν οι περιοχές στις οποίες εναποτίθεται η Fras1 και πραγματοποιήθηκε η χαρτογράφηση τους (εικ.12,13).



<u>Εικόνα 12:</u> Εντοπισμός της Fras1 στην χοριοειδή μήνιγγα E12.5 εμβρύων. Αριστερά εικόνα από άτλαντα εμβρυϊκού εγκεφάλου, στο κέντρο με πράσινο χρώμα η χοριοειδής μήνιγγα με το αντίσωμα της λαμινίνης β2 **(A)** και δεξιά με πράσινο χρώμα η πρωτεΐνη Fras1 **(B)**. Το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί στους πυρήνες (εγκάρσιες τομές 10μm, σύνθετες εικόνες)

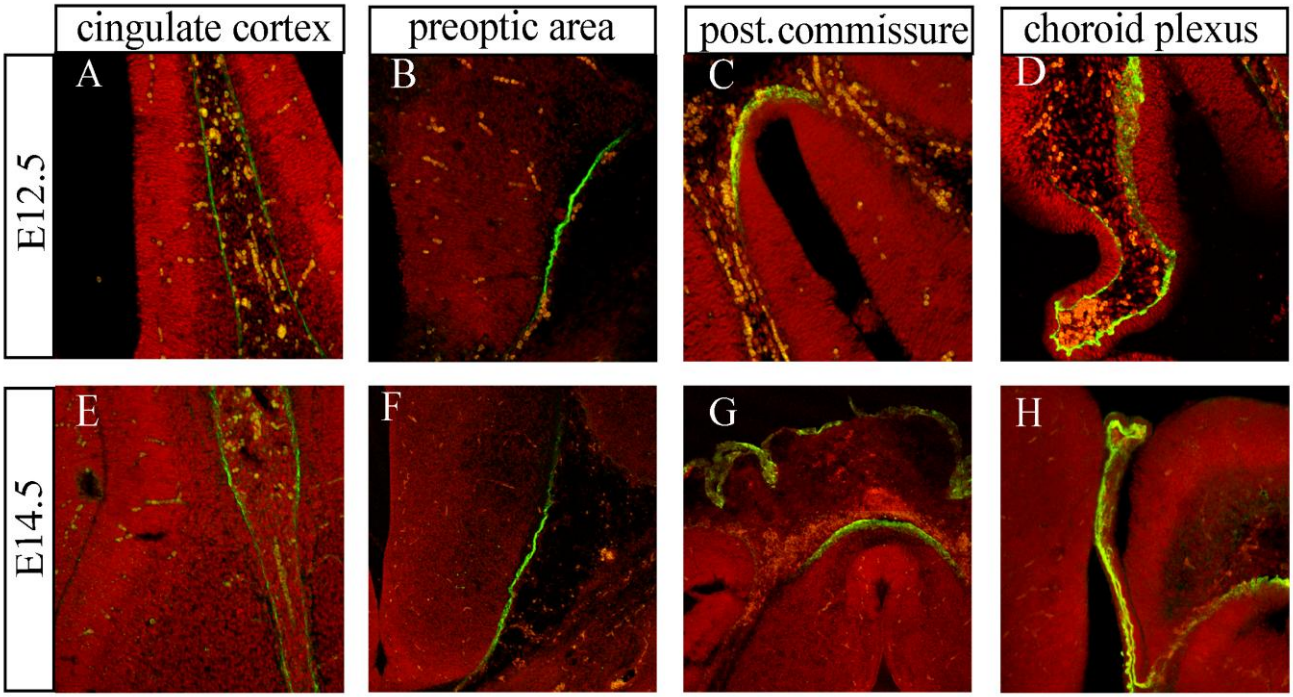


<u>Εικόνα 13:</u> Εντοπισμός της Fras1 στην χοριοειδή μήνιγγα E14.5 εμβρύων. Αριστερά εικόνα από

άτλαντα εμβρυϊκού εγκεφάλου, στο κέντρο με πράσινο χρώμα η χοριοειδής μήνιγγα με το αντίσωμα της λαμινίνης β2 **(A)** και δεξιά με πράσινο χρώμα η πρωτεΐνη Fras1 με το αντίσωμα 2NG2 **(B)**. Το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί στους πυρήνες (εγκάρσιες τομές 10μm, σύνθετες εικόνες).

Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται στην χοριοειδή μήνιγγα στα σημεία που εφάπτεται με τον γυροειδή φλοιό (cingulate cortex), την προ-οπτική περιοχή (preoptic area), τον οπίσθιο σύνδεσμο (postirior commissure) και το οπτικό χίασμα (optic chiasm) από την E11.5 έως την E16.5 όπου και περιορίζεται μόνο στην προ-οπτική περιοχή (εικ 14). Επιπλέον σε όλα τα στάδια που αναλύθηκαν η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται στο χοριοειδές πλέγμα.

Σε έμβρυα πριν από την ημέρα E11.5 η πρωτεΐνη Fras1 δεν είναι ανιχνεύσιμη. Επίσης, σε μεγαλύτερα εμβρυϊκά στάδια από E16.5 και πάλι η Fras1 δεν εντοπίζεται στην χοριοειδή μήνιγγα γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχει ένα παράθυρο στην έκφραση της Fras1 στην χοριοειδή μήνιγγα σε εμβρυϊκά στάδια. Εξαίρεση αποτελεί το χοριοειδές πλέγμα όπου η πρωτεΐνη συνεχίζει να εντοπίζεται και σε ενήλικα ποντίκια (αναλύθηκαν ποντίκια έως 2 μηνών).



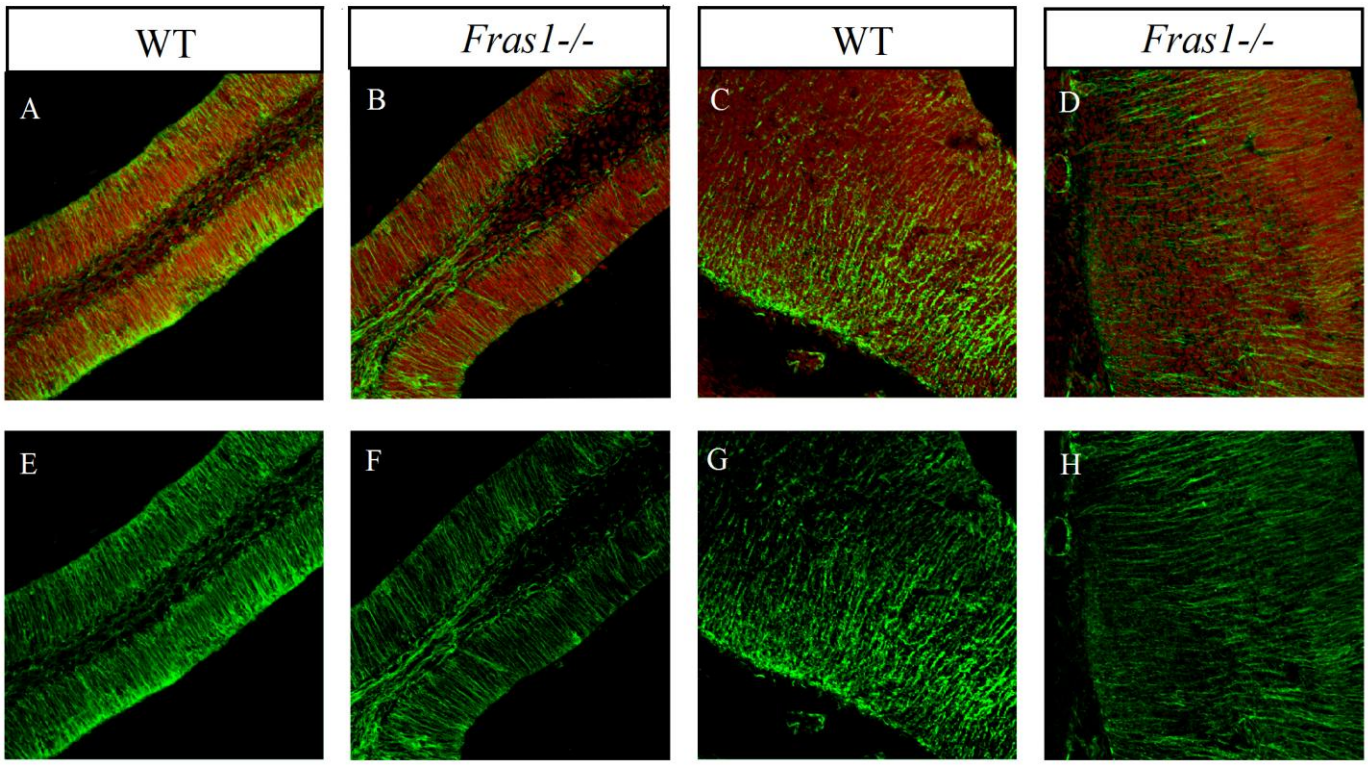
<u>Εικόνα 14</u>: Εντοπισμός της Fras1 στην χοριοειδή μήνιγγα. Εικόνες από κεφάλια εμβρύων αγρίου τύπου E12.5 **(A, B, C και D)**, και E14.5 **(E, F, G και H)** από τις περιοχές που εντοπίζεται η πρωτεΐνη Fras1. Με πράσινο χρώμα φαίνεται η πρωτεΐνη Fras1 ενώ με κόκκινο οι πυρήνες (εγκάρσιες τομές 10μm, μεγέθυνση 10x).

Για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν αλλοιώσεις στην χοριοειδή μήνιγγα από την έλλειψη της Fras1, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα για την λαμινίνη β2 σε εγκεφάλους *Fras1*$^{-/-}$ εμβρύων. Έπειτα από πειράματα ανοσοϊστοχημείας δεν παρατηρήθηκε καμία διαφοροποίηση στην δομή της χοριοειδούς μήνιγγας των *Fras1*$^{-/-}$ εμβρύων. Εντούτοις, δεν θα μπορούσε να αποκλειστεί η πιθανότητα η έλλειψη της Fras1 να δημιουργεί κάποιες διαταραχές σε νευρικά κύτταρα γειτονικών περιοχών.

Εφόσον, η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται μόνο σε ορισμένες περιοχές στην χοριοειδή μήνιγγα θεωρήθηκε πιθανό να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στις συγκεκριμένες περιοχές. Με σκοπό να μελετηθεί το ενδεχόμενο αυτό, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πειράματα ανοσοϊστοχημείας. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν κάποιοι μοριακοί δείκτες ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχουν διαταραχές στον νευρικό ιστό στις περιοχές που γειτνιάζουν με τα συγκεκριμένα σημεία στα *Fras1*$^{-}$

$^{/-}$ ποντίκια.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ενάντια στην πρωτεΐνη nestin. Η nestin είναι πρωτεΐνη τύπου VI των ενδιάμεσων ινιδίων που εκφράζεται κυρίως σε πρόδρομα νευρικά κύτταρα και εμπλέκεται στην ακτινωτή ανάπτυξη των αξόνων. Εκφράζεται από πολλούς κυτταρικούς τύπους κατά την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος αλλά η έκφραση της καταστέλλεται μετά την διαφοροποίηση και αντικαθιστάται από ενδιάμεσα ινίδια ειδικά για κάθε ιστό (Wiese *et al*, 2004).



<u>Εικόνα 15:</u> Ανοσοεντοπισμός της nestin σε E12.5. Εντοπισμός της nestin σε αγρίου τύπου εγκέφαλο στην περιοχή του cingulate cortex **(A, E)** και αντίστοιχες περιοχές από *Fras1*$^{-/-}$ έμβρυα **(B, F)**. Εντοπισμός της nestin σε αγρίου τύπου εγκέφαλο στην preoptic περιοχή **(C, G)** και αντίστοιχη περιοχή σε *Fras1*$^{-/-}$**(D, H)** κόκκινο χρώμα: πυρήνες, πράσινο χρώμα: nestin. (εγκάρσιες τομές 10μm, μεγέθυνση 10x).

Έπειτα από ανοσοϊστοχημεία σε εγκεφάλους από έμβρυα E12.5 και E14.5 με το αντίσωμα ενάντια στην nestin, η μόνη περιοχή που εντοπίστηκε διαφορά είναι η προ-οπτική περιοχή. Όπως φαίνεται στην εικόνα 15 η περιοχή του γυροειδή φλοιού δεν παρουσιάζει κάποια διαφορά στο πρότυπο εντοπισμού της nestin. Αντιθέτως, η διαφορά είναι εμφανής στην προ-οπτική περιοχή όπου στα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια η πυκνότητα των ινών που εντοπίζονται με την nestin είναι μικρότερη σε σχέση με τα αγρίου τύπου. Όμως δεν είναι ξεκάθαρο αν οι ίνες είναι λιγότερες ή αν είναι διαφορετικά κατανεμημένες (πιο μακριά η μια από την άλλη).

Στην συνέχεια, για να διερευνηθεί περαιτέρω η ύπαρξη διαταραχών στις περιοχές αυτές πραγματοποιήθηκαν πειράματα και με άλλους μοριακούς δείκτες όπως b-tubulin III, MAP-2 a,b (πρωτεΐνη των μικροσωλινήσκων) και neurofilament (πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων) σε *Fras1*$^{-/-}$ εγκεφάλους. Παρόλο που εντοπίστηκαν κάποιες διαφορές με τα αντισώματα αυτά θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περισσότερα πειράματα σε μεγαλύτερο αριθμό εγκεφάλων ώστε να εξαχθούν ακριβέστερα συμπεράσματα.

Δ. Συζήτηση

Από προηγούμενα αδημοσίευτα αποτελέσματα (Chalepakis G., Pavlakis E.) είναι γνωστό ότι το γονίδιο Fras1 εκφράζεται στον εγκέφαλο σε περιοχές όπως ο φλοιός, η αμυγδαλή, και ο ιππόκαμπος που συμμετέχουν στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης. Επιπλέον, πειράματα εξαρτημένης αντίδρασης φόβου που πραγματοποιήθηκαν συγκριτικά σε φυσιολογικά και *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια, αποκάλυψαν ότι τα μεταλλαγμένα ζώα έχουν προβλήματα στην ανάπτυξη του εξαρτημένου φόβου.

Είναι γνωστό ότι στην αμυγδαλή πραγματοποιείται αποκωδικοποίηση των συγκινήσεων αλλά και άλλων ιδιαίτερων ερεθισμάτων που λαμβάνει ο οργανισμός και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει ενεργά στο μονοπάτι του φόβου. Η αμυγδαλή δέχεται αισθητήριες πληροφορίες από πολλές εισόδους και αφού τις επεξεργαστεί τις στέλνει σε άλλες περιοχές ανάλογα με το κύκλωμα που συμμετέχουν ώστε ο οργανισμός να αντιδράσει ανάλογα. Τα μηνύματα (πληροφορίες) φτάνουν στην αμυγδαλή για επεξεργασία είτε από τον αισθητήριο θάλαμο είτε από τον σωματοαισθητικό φλοιό. Ο φλοιός συμμετέχει στο κύκλωμα του φόβου καθώς στέλνει στην αμυγδαλή πληροφορίες, αλλά επιπλέον, λειτουργεί και ως αποθήκη ήδη επεξεργασμένων πληροφοριών οι οποίες έχουν σταλεί εκεί από την αμυγδαλή (Baxter και Murray, 2002). Συνεπώς, ο φλοιός αποτελεί ένα αναπόσπαστο κομμάτι του κυκλώματος φόβου.

Προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο μας έχουν δείξει αλλοιώσεις στο κυτταρικό περιεχόμενο της αμυγδαλής (αδημοσίευτα αποτελέσματα Α. Μακρυγιάννης). Λόγω της δεδομένης διαταραχής στο συγκεκριμένο κύκλωμα στα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια, στην συγκεκριμένη εργασία αναζητήσαμε αλλοιώσεις στην περιοχή του νεοφλοιού των *Fras1*$^{-/-}$ ποντικών με στόχο να συμβάλλουμε στην κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων η Fras1 συμμετέχει στη διαδικασία ανάπτυξης του φόβου. Επιπλέον, προσεγγίσαμε ένα πολύ σημαντικό ερώτημα σχετικά με τον εντοπισμό της Fras1 στον εγκέφαλο εμβρύων και νεογέννητων ποντικών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται σε έμβρυα σε τμήματα της χοριοειδούς μήνιγγας που περιβάλει τον εγκέφαλο. Η κατανομή της Fras1 στην χοριοειδή μήνιγγα είναι περιορισμένη σε συγκεκριμένες περιοχές, ακολουθώντας ένα συγκεκριμένο ασυνεχές πρότυπο. Το πρότυπο εντοπισμού της Fras1 είναι πρωτότυπο και ταυτόχρονα ενδιαφέρον καθώς η χοριοειδής μήνιγγα διαφέρει λειτουργικά από περιοχή σε περιοχή. Επίσης, η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται στο χοριοειδές πλέγμα, που αποτελεί ουσιαστικά ένα διαφοροποιημένο τμήμα της χοριοειδούς μήνιγγας, τόσο σε έμβρυα όσο και σε ενήλικα ποντίκια.

Αν και έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ανίχνευσης της πρωτεΐνης Fras1 στον νευρικό ιστό δεν έγινε δυνατός ο εντοπισμός της. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί με διάφορους τρόπους. Μια πιθανή υπόθεση θα ήταν ότι η πρωτεΐνη Fras1 διαχέεται εντός του νευρικού ιστού, δεν συσσωρεύεται σε κάποιο σημείο και άρα δεν είναι δυνατή η ανίχνευση της με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας. Από την άλλη είναι πιθανό η πρωτεΐνη Fras1 να παράγεται στον εγκέφαλο μόνο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες π.χ επαγωγή του φόβου. Αυτό σημαίνει ότι το mRNA μπορεί να συσσωρεύεται σε διάφορα σημεία όπου μεταφράζεται άμεσα σε πρωτεΐνη έπειτα από κάποιο ερέθισμα, κάτι που παρατηρείται συχνά στον εγκέφαλο για πολλές πρωτεΐνες.

Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις μας στα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια η κατανομή συγκεκριμένων νευρικών δεικτών των πυραμιδικών κυττάρων στον φλοιό (Satb2 και Ctip2) διαφέρει από τα αγρίου τύπου, καθώς παρατηρούνται διαταραχές στην διαστρωμάτωση του νεοφλοιού, κυρίως κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου. Οι διαταραχές αυτές στον νεοφλοιό πιθανά να μπορούν να ερμηνευτούν λαμβάνοντας υπόψη το πρότυπο εντοπισμού της πρωτεΐνης τόσο στο χοριοειδές πλέγμα όσο και στην χοριοειδή μήνιγγα.

Αρχικά, η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται στο χοριοειδές πλέγμα τόσο σε έμβρυα όσο και σε ενήλικα ποντίκια. Γνωρίζουμε ότι το χοριοειδές πλέγμα είναι υπεύθυνο για την παραγωγή και την έκκριση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, το οποίο είναι πλούσιο σε αυξητικούς παράγοντες και γενικά πρωτεΐνες που επάγουν την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση του νευρικού ιστού. Θα μπορούσαμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι η Fras1 μπορεί να επηρεάζει την διαστρωμάτωση του

φλοιού συμμετέχοντας στον έλεγχο της έκκρισης κάποιων αυξητικών παραγόντων και κατά συνέπεια αλλάζοντας στην σύσταση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού.

Από την άλλη, υπάρχουν αναφορές ότι η χοριοειδής μήνιγγα συμμετέχει σε διεργασίες αναπτυξιακές του εγκεφάλου όπως είναι η διαφοροποίηση και η μετανάστευση νευρικών κυττάρων. Τα ακτινωτά κύτταρα γλοίας (radial glia cells) διαθέτουν προεκβολές οι οποίες εφάπτονται στην βασική μεμβράνη του εγκεφάλου (χοριοειδής μήνιγγα) και λειτουργούν τόσο ως πρόδρομα κύτταρα που θα διαφοροποιηθούν και θα δώσουν νευρικά κύτταρα αλλά και ως διάδρομοι μετανάστευσης για τα νευρικά κύτταρα που θα τα οδηγήσουν στις τελικές τους θέσεις. Έχουν περιγραφεί διαταραχές στην σύσταση της χοριοειδούς μήνιγγας που έχουν ως αποτέλεσμα να μην πραγματοποιούνται σωστά αυτές οι διεργασίες. Για παράδειγμα απενεργοποίηση της λαμινίνης γ1 επηρεάζει την θέση των ακτινωτών κυττάρων γλοίας, οι προεκβολές των οποίων σταματούν πριν ακουμπήσουν στην χοριοειδή μήνιγγα. Αυτή η διαφοροποίηση έχει ως αποτέλεσμα διαφορές στην διαστρωμάτωση του φλοιού χωρίς ωστόσο, να επηρεάζεται η διαφοροποίηση των ακτινωτών κυττάρων γλοίας σε νευρικά κύτταρα παρά μόνο την θέση τους (Haubst *et al.,* 2006).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η έλλειψη της Fras1 από την περιοχή του γυροειδούς φλοιού που εντοπίζεται στην χοριοειδή μήνιγγα πιθανά να επηρεάζει τις προεκβολές των ακτινωτών κυττάρων γλοίας. Όμως αυτή η παραδοχή δεν μπορεί να μπορεί να ερμηνεύσει άμεσα την διαφορά στην διαστρωμάτωση του νεοφλοιού που εντοπίζουμε. Η έλλειψη της Fras1 από την προοπτικής περιοχής είναι πιθανό να επηρεάζει διάφορα μεταναστευτικά μονοπάτια τα οποία ακολουθούν τα κύτταρα για να δημιουργήσουν την περιοχή της αμυγδαλής.

Μια ακόμα σημαντική παρατήρηση είναι ορισμένα κενά στον εντοπισμό του Satb2 και του Ctip2 στον φλοιό του εγκεφάλου. Σύμφωνα με δημοσιεύσεις κενά στην έκφραση κάποιων δεικτών, κυρίως GABAεργικών κυττάρων παρατηρούνται στον νεοφλοιό ποντικών και συσχετίζονται με την εμφάνιση αυτισμού στα ποντίκια (Gogolla *et al.*, 2009). Επιπλέον, αλλοιώσεις στην περιοχή του ραβδωτού οδηγούν σε αυτισμό. Με βάση αυτά θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η έλλειψη της Fras1 οδηγεί στην εμφάνιση αυτισμού. Για να διερευνηθεί αυτό το ενδεχόμενο θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περισσότερα πειράματα με μοριακούς δείκτες για GABAεργικούς νευρώνες και να διαπιστωθεί αν εντοπίζονται κενά και με αυτούς. Επιπλέον πειράματα συμπεριφοράς θα δείξουν αν τα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια εμφανίζουν χαρακτηριστικά αυτισμού.

Γίνεται σαφές λοιπόν ότι θα πρέπει να πραγματοποιηθούν επιπλέον πειράματα ώστε να αποκαλυφθεί ο τρόπος με τον οποίο συμμετέχει η πρωτεΐνη Fras1 στο κύκλωμα του φόβου. Όσο αφορά την υπόθεση ότι η Fras1 ελέγχει την έκκριση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, πρέπει να μελετηθεί η αλληλεπίδραση της με αυξητικούς παράγοντες αλλά και η σύσταση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού στα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια συγκριτικά με τα αγρίου τύπου. Επιπλέον, θα πρέπει να μελετηθούν περισσότερο οι περιοχές του εγκεφάλου που συνορεύουν με τα σημεία που εντοπίζεται η Fras1 στην χοριοειδή μήνιγγα ως προς την σύσταση τους σε ακτινωτά κύτταρα γλοίας αλλά και κατά πόσο αυτά εφάπτονται στην χοριοειδή μήνιγγα. Επίσης θα πρέπει να εντοπιστούν και να μελετηθούν τα μεταναστευτικά μονοπάτια που συμμετέχουν στην δημιουργία των περιοχών που υπάρχουν αλλοιώσεις και να παρατηρηθεί ο τρόπος με τον οποίο τα κύτταρα μεταναστεύουν.

Ε. Βιβλιογραφία

Arin MJ and Roop DR, (2001). Disease model: heritable skin blistering. *Trends in Molecular Medicine* 7:422-424.

Arlotta P, Molyneaux BJ, Jabaudon D, Yoshida Y, and Macklis JD, (2008). Ctip2 controls the differentiation of medium spiny neurons and the establishment of the cellular architecture of the striatum. J*ournal of Neuroscience*. 28:622-632.

Baxter MG and Murray EA, (2002). The amygdala and reward. *Nature Reviews Neuroscience* 3:563-573.

Bruckner-Tuderman L and Bruckner P, (1998). Genetic diseases of the extracellular matrix: more than just connective tissue disorders. *J Mol. Med*. 76:226-237.

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

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

Fricke B, Andres KH and Von During M, (2001). Nerve fibers innervating the cranial and spinal meninges: morphology of nerve fiber terminals and their structural intergration. *Microscopy research and technique*. 53: 96-105.

Gogolla N, LeBlanc JJ, Quast KB, Sudhof TC, Fagiolini M, Hensch TK, (2009). Common cirtuit defect of excitatoryinhibitory balance in mouse models of autism. *J Neurodevelop Disord*. 1:172-181.

Haubst N, Georges-Labouesse E, De Arcangelis A, Mayer U, Gotz M, (2006). Basement membrane attachment is dispensable for radial glia cell fate and for proliferation, but affects positioning of neuronal subtypes. Development 133: 3245-3254.

Hevner RF, (2006). From Radial Glia to Pyramidal-Projection Neuron. Transcription Factor Cascades in Cerebral Cortex Development. *Molecular Neurobiology*. 33: 033–050

Hood JD and Cheresh DA, (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Reviews Cancer*. 2: 91-100.

Heinonen S, Mannikko M, Klement JF, Whitaker-Menezes D, Murphy GF, Uitto J. (1999). Targeted inactivation of the type VII collagen gene (Col7a1) in mice results in severe blistering phenotype: a model for recessive dystrophic epidermolysis bullosa., *J Cell Sci* 112:3641-8.

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

Kiyozumi D, Sugimoto N and 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.

LeDoux JE, (1996). The Emotional Brain: The Mysterious Underpinnings of Emotional Life. *Simon & Schuster: New York*.

Leone DP, Srinivasan K, Chen B, Alcamo E and McConnell SK, (2008). The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Current opinion in Neurobiology.* 18:28-35.

Liddington RC, (2001). Mapping out the basement membrane. *Nature Structural Biology* 8:573-574.

Mc Gregor L, Makela V, Darling SM, 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, Woolf AS, Winter R, Scambler P, (2003). Fraser syndrome and mouse blebbed phenotype caused by mutations in FRAS1/Fras1 encoding a putative extracellular matrix protein. *Nature Genetics* 34:203-208.

Pavlakis E, Makrygiannis A.K., Chiotaki R, Chalepakis G, (2008). Differential localization profile of Fras1/Frem proteins in epithelial basement membranes of newborn and adult mice, *Histochem Cell Biol*, V: 130, I: 4, pp.: 785-793.

Pavlakis E, Chiotaki R, Chalepakis G, (2011). The role of Fras1/Frem proteins in the structure and function of basement membrane. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 487-95.

Petrou P, Pavlakis P, Dalezios Y, Galanopoulos VK, Chalepakis G, (2005). Basement membrane distortions impair lung lobation and capillary organization in the mouse model for Fraser syndrome. *The Journal of Biological Chemistry*. 280:10350-10356.

Petrou P, Pavlakis E, Dalezios Y, Chalepakis G, (2007). Basement membrane localization of Frem3 is independent of the Fras1/frem1/Frem2 protein complex within the sublamina densa. *Matrix Biology*. 26:652-658.

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. *Exp.Cell Res*. 313:910-920.

Slavotinek AM and Tifft CJ, (2002). Fraser syndrome and cryptophthalmos: Review of the diagnostic criteria and evidence for phenotypic modules in complex malformation syndromes. J Med.Genet. 39, 623-633.

Smyth I, Du X, Taylor MS, Justice MJ, Beutler B, Jackson IJ, (2004). The extracellular matrix gene *Frem1* is essential for the normal adhesion of the embryonic epidermis. *PNAS* 101:13560-

13565.

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

Short K, Wiradjaja F and Smyth I, (2007). Let's stick together: The role of Fras1 and Frem proteins in epidermal adhesion. *IUBMB life*. 59:427-435.

Takamiya K, Kostourou V, Adams S, Jadeja S, Chalepakis G, Scambler PJ, Huganir RL, Adams R, (2004). A direct functional link between the multi-PDZ domain protein GRIP1 and the Fraser syndrome protein Fras1. *Nature Genetics*. 36:172-177.

Timmer JR, Mak TW, Manova K, Anderson KV and Niswander L, (2005). Tissue morphogenesis and vascular stability require the Frem2 protein, product of the mouse myelencephalic blebs gene. PNAS. 102, 11746-11750.

Timpl R and Brown JC, (1996). Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* 18:123-132.

Vrontou S, Petrou P, Meyer BI, Galanopoulos VK, Imai K, Yanagi M, Chowdhury K, Scambler PJ, Chalepakis G, (2003). *Fras1* deficiency results in cryptophthalmos, renal agenesis and blebbed phenotype in mice. *Nature Genetics*. 34:209-214.

Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler K R and Wobus AM, (2004). Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells?. *Cell. Mol. Life Sci*.61: 2510–22.