ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ FRAS1 ΣΤΟΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΣΤΑ FRAS1-/- ΠΟΝΤΙΚΙΑ»

ΜΗΝΑ ΜΑΡΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Γ. ΧΑΛΕΠΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012

Στους γονείς μου,

στους οποίους χρωστάω όλα όσα έχω καταφέρει μέχρι σήμερα...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γ.Χαλεπάκη γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω καλύτερα τον κόσμο της επιστήμης, υπό την πολύτιμη καθοδήγησή του.

Επίσης, μέσα από αυτή την εργασία θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Απόστολο Μακρυγιάννη, την Ευγενία Καλογεράκη και τη Δέσποινα Κατσούγρη για τις πρόθυμες συμβουλές τους και την ευχάριστη συνεργασία μας.

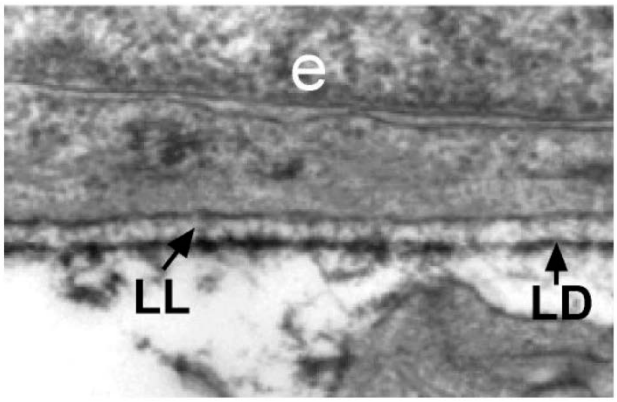
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ 4
1.1 Οικογένεια Fras1/Frem πρωτεϊνών 4
1.2 Βιολογική λειτουργία του γονιδίου Fras1 7
1.3 Ο ρόλος της Fras1 στο κεντρικό νευρικό σύστημα..... 8
1.3.1 Διανοητικές διαταραχές σε άτομα με σύνδρομο Fraser 8
1.3.2 Ο εντοπισμός μεταγράφων του Fras1 στον εγκέφαλο ποντικών υποδεικνύει συσχετισμό του με τους μηχανισμούς μνήμης και μάθησης 9
1.3.3 Εγκέφαλος και διαδικασίες μνήμης-μάθησης..... 10
1.3.4 Πειράματα συμπεριφοράς στα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια αποκαλύπτουν αδυναμία στη μνήμη του φόβου 13
1.4 Σκοπός της εργασίας 14
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 15
2.1 Ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι.....15
2.1.1 Διαλύματα.....15
2.1.2 Επεξεργασία αντικειμενοφόρων με ζελατίνη..... 16
2.1.3 Προετοιμασία εγκεφάλων για κρυοτομές.....17
2.1.4 Ανοσοϊστοχημεία σε κρυοτομές.....18
2.1.5 Ανοσοεντοπισμός με χρώση υπεροξειδάσης και ενίσχυση σήματος σε κρυοτομές.....19
2.2 Ιστολογία.....21
2.2.1 Προετοιμασία εγκεφάλων για παραφίνες.....21
2.2.2 Χρώση Cresyl/Violet.....23
2.3 Κατάλογος Αντισωμάτων.....23
2.4 Πειράματα συμπεριφοράς.....24
2.4.1 Unconditioned Fear (Μη Εξαρτημένος Φόβος)..... .24
2.4.2 Fear Conditioning (Εξαρτημένη Αντίδραση Φόβου).....25
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....28
3.1 Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στον εγκέφαλο εμβρύων και ενηλίκων ποντικών.....28
3.1.1 Πρότυπο εντοπισμού της πρωτεΐνης Fras1 στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο.....28
3.1.2 Η πρωτεΐνη Fras1 δεν εντοπίζεται στον εγκέφαλο ενηλίκων ποντικών.30
3.1.3 Συγκριτική μελέτη του εντοπισμού της πρωτεΐνης Fras1 με τη λαμινίνη β2 στην βασική μεμβράνη της χοριοειδούς μήνιγγας.....31
3.2 Πειράματα Συπεριφοράς.....34
3.2.1 Unconditioned Fear (Μη Εξαρτημένος Φόβος).....34
3.2.2 Fear Conditioning (Εξαρτημένη Αντίδραση Φόβου).....36
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 38
4.1 Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στον εγκέφαλο εμβρύων και ενηλίκων ποντικών..... 38
4.1.1 Στα αναπτυξιακά στάδια η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται σε περιοχές της χοριοειδούς μήνιγγας.....38
4.2 Τα πειράματα συμπεριφοράς αποκάλυψαν λεπτομέρειες για την αδυναμία της μνήμης του φόβου στα Fras1-/- ποντίκια.....41
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 43

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

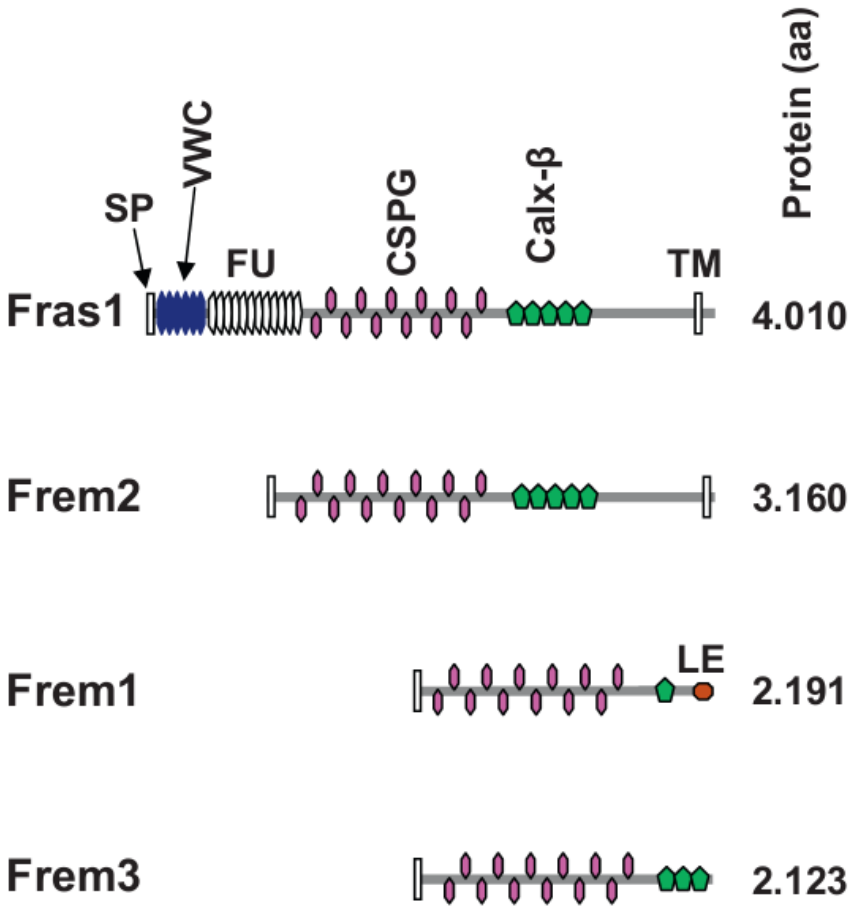
1.1 Οικογένεια Fras1/Frem πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες ***Fras1*** (Fraser syndrome protein 1), ***Frem1***, ***Frem2*** και ***Frem3*** (Frem: Fras1-related extracellular matrix proteins), είναι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας και εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη εμβυϊκών επιθηλίων. Η βασική μεμβράνη είναι μία πυκνή στοιβάδα εξωκυττάριας ουσίας που βρίσκεται ανάμεσα στη βασική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων και στον συνδετικό ιστό. Αποτελεί ένα καλά οργανωμένο δίκτυο πρωτεϊνών και ο ρόλος της είναι τόσο δομικός όσο και λειτουργικός, εφόσον εμπλέκεται στον έλεγχο της επιθηλιακής αύξησης και διαφοροποίησης σχηματίζοντας έναν φραγμό (Timpl R and Brown JC, 1996). Μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, φαίνεται ότι η βασική μεμβράνη διαχωρίζεται σε 2 διακριτές περιοχές (εικόνα 1). Η lamina lucida είναι η πρώτη στοιβάδα, που είναι σχετικά ηλεκτρονιο-διαπερατή και γειτνιάζει άμεσα με τα επιθηλιακά κύτταρα. Διατρέχεται από συμπλέγματα πλούσια σε λαμινίνη, τα λεγόμενα συνδετικά ινίδια, τα οποία συμβάλλουν στην προσκόλληση κυττάρων-μήτρας. Επόμενη στοιβάδα, είναι η lamina densa, μία ηλεκτρονιο-πυκνωτική στοιβάδα που συντίθεται πρωτίστως από κολλαγόνο IV, λαμινίνες και νιδογόνα. Στο επίπεδο κάτω από τη lamina densa, βρίσκεται η lamina fibroreticularis ή sublamina densa, μία περιοχή που στα νεογέννητα και τους ενήλικες περιέχει συνδετικά ινίδια πλούσια σε κολλαγόνο VII.



Εικόνα 1: Η επιδερμική βασική μεμβράνη αποτελεί ένα καλά οργανωμένο δίκτυο εξωκυτταρικών πρωτεϊνών με δομικές και ρυθμιστικές λειτουργίες. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM) όπου διακρίνεται η βασική μεμβράνη. LL: lamina lucida, LD: lamina densa.

Οι πρωτεΐνες *Fras1, Frem1, Frem2* και *Frem3* περιέχουν έναν μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων μοτίβων, που συναντώνται και σε άλλες γνωστές πρωτεΐνες, και αυτό αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό της δομής τους.

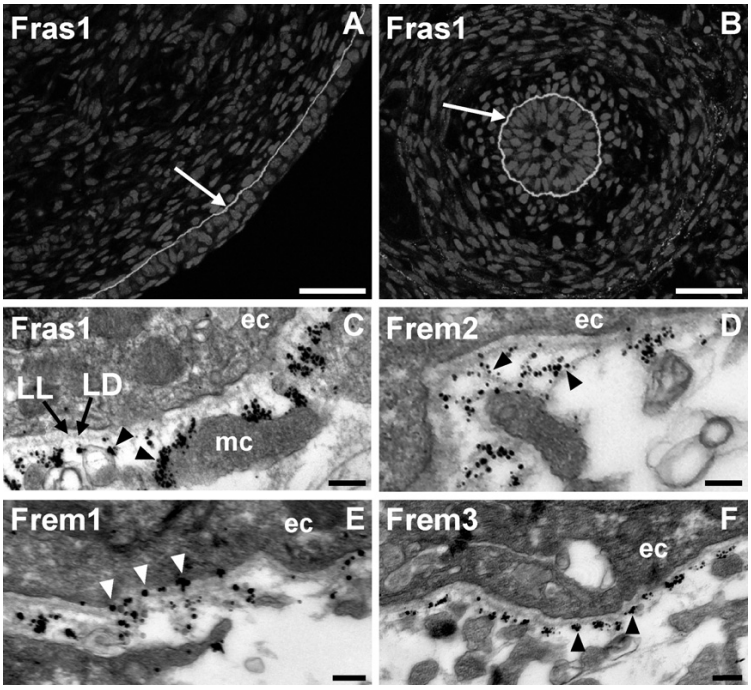


Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των δομών των πρωτεϊνών της Fras1/Frem οικογένειας.

Συγκεκριμένα, τα κοινά μοτίβα που ανιχνεύονται σε όλες τις πρωτεΐνες της οικογένειας περιλαμβάνουν ένα πεπτίδιο-σινιάλο (SP) στο N-τελικό άκρο τους για τη στόχευση στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μία περιοχή ομόλογη των CSPG (chondroitin sulfate proteoglycan) μοτίβων της πρωτεΐνης NG2, καθώς και έναν ποικίλο αριθμό μοτίβων πρόσδεσης ασβεστίου (Galx-β). Ένα διαμεμβρανικό τμήμα (TM) ανιχνεύεται αποκλειστικά στο C-τελικό άκρο των Fras1 και Frem2 πρωτεϊνών, ενώ ένα καρβοξυτελικό μοτίβο ομολογίας με τις λεκτίνες τύπου C (LE) υπάρχει μόνο στην Frem1. Επιπλέον, ένα μοναδικό χαρακτηριστικό της Fras1 πρωτεΐνης είναι η παρουσία, στο N-τελικό της άκρο, επαναλαμβανόμενων μοτίβων κυστεϊνης παρόμοια με αυτά της περιοχής C του παράγοντα von Willebrandt (VWC) (Sadler JE, 1998)

και μοτίβων κυστεΐνης παρόμοια με αυτά των πρωτεασών φουρινών (FU: furin- like cysteine repeats) (Roebroek AJM. et al, 1992).

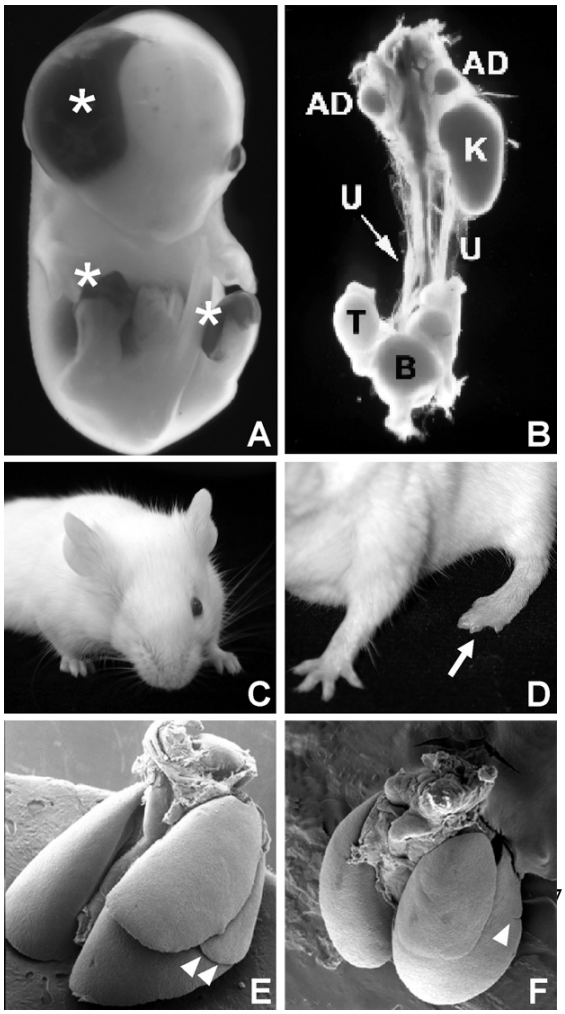
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η οικογένεια Fras1/Frem πρωτεϊνών είναι εγκατεστημένη στη βασική μεμβράνη εμβρύων και, ειδικότερα, στην στοιβάδα sublamina densa. Ο εντοπισμός αυτών των πρωτεϊνών, σε όλες σχεδόν τις επιθηλιακές δομές, λαμβάνει χώρα κυρίως κατά την ανάπτυξη, ενώ αργότερα, στο ενήλικο άτομο, περιορίζεται. Σε εμβρυϊκό επίπεδο, με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται σε ποικίλες επιθηλιακές δομές, όπως η επιδερμίδα, το πεπτικό σύστημα, το ουροποιητικό, το μάτι , ο πνεύμονας και τμήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος και πιθανότατα των μεσοθηλιακών στιβάδων, όπως εκείνων που περιβάλλουν το έντερο και τον πνεύμονα (εικόνα 3) (Pavlakis et al., 2011).



Εικόνα 3: Εντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1/Frem σε επιθηλιακές βασικές μεμβράνες. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της Fras1 στη βασική μεμβράνη του δέρματος (A) και του οισοφάγου (B) σε δείγματα από E14.5 έμβρυα ποντικού αγρίου τύπου (Dalezios et al., 2007). Όλες οι Fras1/Frem πρωτεΐνες εμφανίζονται στο ίδιο γραμμικό μοτίβο σε οποιαδήποτε επιθηλιακή βασική μεμβράνη κατά την εμβρυική ανάπτυξη ποντικών. Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, που απεικονίζουν τον εντοπισμό των πρωτεϊνών Fras1 (C), Frem2 (D), Frem1 (E) και Frem3 (F) ως μαύρες κουκκίδες (clusters-χρυσού/ αργύρου) στην περιοχή της sublamina densa (Petrou et al., 2007).

1.2 Βιολογική λειτουργία του γονιδίου Fras1

Απουσία καθεμίας ξεχωριστά από τις πρωτεΐνες της οικογένειας Fras1/Frem , η βασική μεμβράνη των εμβρύων εμφανίζει σοβαρές δυσλειτουργίες, με κυριότερη την εξασθένιση της σύνδεσης της επιδερμίδας με την επικείμενη δερμίδα. Η Fras1 πρωτεΐνη ήταν η πρώτη της οικογένειας που κλωνοποιήθηκε και μελετήθηκε συστηματικά στον ποντικό μέσω στοχευμένης απενεργοποίησης του γονιδίου της. Το κύριο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό των *Fras1*$^{-/-}$ εμβρύων είναι η δημιουργία μεγάλων φουσκαλίδων γεμάτων με υγρό, που εμφανίζονται περίπου την ημέρα 12.5 της εμβρυογένεσης (E12.5). Οι φουσκαλίδες, που μετατρέπονται από διαφανείς σε αιμορραγικές κατά την εμβρυική ανάπτυξη, εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή του κεφαλιού, γύρω από τα μάτια, και στο κατώτερο τμήμα των άκρων (Vrontou et al., 2003). Άλλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των *Fras1*$^{-/-}$ ποντικών περιλαμβάνουν νεφρική αγενεσία ή δυσπλασία, συγχωνεύσεις των δαχτύλων (συνδακτυλία) και των βλεφάρων (κρυπτοφθαλμία) στα ενήλικα άτομα (Vrontou et al., 2003), και συγχώνευση των λοβών των πνευμόνων (Petrou et al., 2005) (εικόνα 4). Αυτές οι βλάβες εμφανίζονται με ποικιλία σοβαρότητας που εξαρτάται από το εξεταζόμενο στέλεχος ποντικού.



Εικόνα 4: Ενδεικτικά αναφέρονται διάφορες φαινοτυπικές ανωμαλίες που παρουσιάζουν τα ποντίκια με *Fras1* knockout . (A) Fras1−/− έμβρυο E14,5 με αιμορραγική φουσκαλίδα στην περιοχή του ματιού και στα άκρα. (B) Ουροποιητικό σύστημα νεογέννητου Fras1−/− αρσενικού ποντικού όπου φαίνεται η αγενεσία του ενός νεφρού. (C) *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκι με κρυπτοφθαλμία στο δεξί μάτι. (D) *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκι με πλήρη συγχώνευση δακτύλων (συνδακτυλία) (Vrontou et al., 2003). (E και F) Σύγκριση πνευμόνων αγρίου τύπου ποντικού (E) με *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκι (F) σε εμβρυϊκό στάδιο E18.5. Παρατηρούμε ότι στο μεταλλαγμένο ποντίκι έχει συγχωνευθεί ο κεντρικός και ο οπίσθιος λοβός του πνεύμονα στα σημεία όπου δείχνουν τα βέλη (Petrou et al., 2005).

~

Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν παραπάνω, έχουν επίσης αποδοθεί σε μία ομάδα μεταλλαγμένων ποντικών που ονομάζονται *'blebbed' (bl)* και αποτελούν μία από τις πέντε κατηγορίες μεταλλαγών των ποντικών 'bleb'. Συγκεκριμένα, ο φαινότυπος *'blebbed'* (Green MC, 1989) χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση υπο-επιδερμικών φουσκαλίδων (blebs/blisters) κατά την εμβρυογένεση στην περιοχή των ματιών και στα άκρα, καθώς και συγχώνευση των βλεφάρων και των άκρων. Είναι προφανές ότι τα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια έχουν φαινοτυπική ομοιότητα με τα ποντίκια *'blebbed'* , και το γεγονός αυτό οδήγησε στη συσχέτιση της Fras1 μεταλλαγής με τον *bl* φαινότυπο. Έτσι, η επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής ήρθε με την εύρεση διαφόρων μεταλλαγών του γονιδίου *Fras1* σε *bl* ποντίκια, καθώς και με την ανικανότητα ανίχνευσης της πρωτείνης Fras1 στα ποντίκια αυτά (Vrontou *et al*., 2003).

Έχει παρατηρηθεί ότι τα ποντίκια με φαινότυπο *bleb* εμφανίζουν παρόμοιες βλάβες με τους ασθενείς που πάσχουν από σύνδρομο Fraser, και η παρατήρηση αυτή αποτέλεσε ισχυρή ένδειξη ότι τα 'bleb' μεταλλάγματα και η ανθρώπινη αυτή διαταραχή είναι αποτέλεσμα μεταλλαγών σε παράλογα γονίδια (Winter RM, 1990, Darling and Gossler, 1994, Mc Gregor et al., 2003). Σε ασθενείς που πάσχουν από σύνδρομο Fraser έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις των γονιδίων *Fras1* και *Frem2*. Το σύνδρομο Fraser είναι μία αυτοσωμική υπολειπόμενη γενετική διαταραχή, που εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια και σχετική σπανιότητα, καθώς έχει συχνότητα 1/10000 η οποία αυξάνεται αν ληφθούν υπόψη οι πρώιμες αποβολές. Η συσχέτιση, αυτή των μεταλλαγών 'bleb' με το σύνδρομο Fraser αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στην μελέτη του συνδρόμου, καθώς τα 'bleb' ποντίκια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως το ζωικό μοντέλο μελέτης του.

1.3 Ο ρόλος της Fras1 στο κεντρικό νευρικό σύστημα

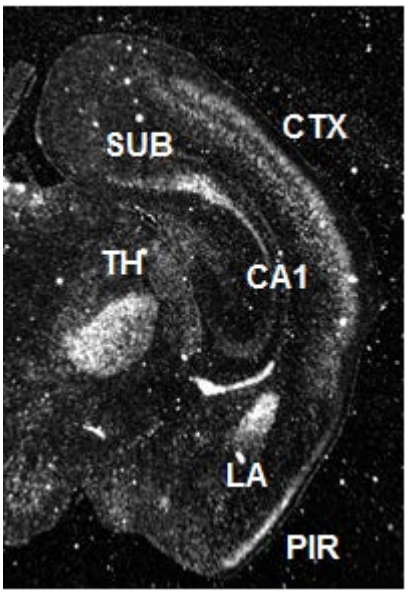
1.3.1 Διανοητικές διαταραχές σε άτομα με σύνδρομο Fraser

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά των ασθενών που πάσχουν από σύνδρομο Fraser ανήκει και η διανοητική καθυστέρηση. Οι ακριβείς αιτίες που οδηγούν σε διανοητικές διαταραχές δεν έχουν αναλυθεί

εκτενώς, όμως σε κλινικές μελέτες ασθενών έχουν περιγραφεί αρκετά περιστατικά εγκεφαλικών δυσμορφιών, όπως υδροκεφαλία, εγκεφαλοκηλίες και πολυμικρογυρία (Van Haelst et al, 2007). Επίσης, άλλα ευρύματα αποτελούν η ήπια υποπλασία της παρεγκεφαλίδας, η ολοπροσεγκεφαλία με υδρομελία του νωτιαίου μυελού, η διάχυτη γλοίωση του εγκεφάλου και το χαμηλό βάρος εγκεφάλου (Slavotinek, 2002). Η καταγραφή των παραπάνω δεδομένων, δίνει το έναυσμα για τη διατύπωση ερωτημάτων όπως το αν η Fras1 πρωτείνη μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην σωστή ανάπτυξη και λειτουργία του εγκεφάλου.

1.3.2 Ο εντοπισμός μεταγράφων του Fras1 στον εγκέφαλο ποντικών υποδεικνύει συσχετισμό του με τους μηχανισμούς μνήμης και μάθησης

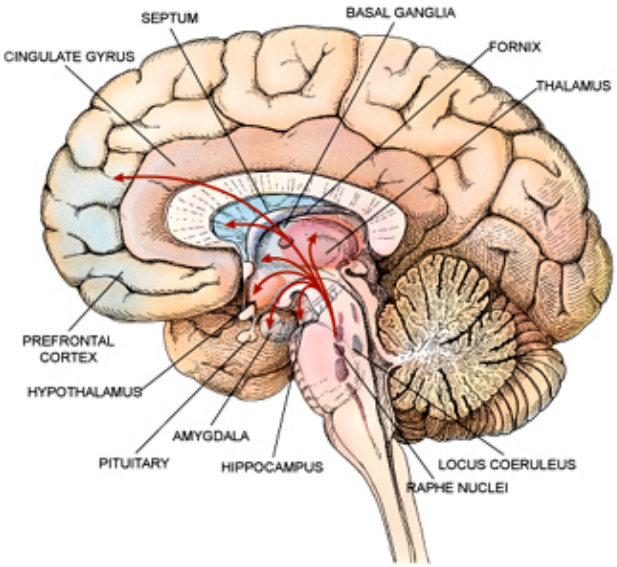
Προκειμένου να ξεκινήσει η μελέτη του φαινοτύπου του γονιδίου Fras1 στον εγκέφαλο, είχαν πραγματοποιηθεί πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του mRNA του, σε ιστολογικές τομές εγκεφάλων από έμβρυα και ενήλικα ποντίκια, με τα οποία είχε διαπιστωθεί το πρότυπο έφρασης του στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Γ. Χαλεπάκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Ειδικότερα, τα πειράματα αυτά κατέδειξαν ότι σε αναπτυξιακά στάδια φαίνεται να υπάρχει έκφραση κυρίως στο χοριοειδές πλέγμα και τη χοριοειδή μήνιγγα, αλλά και σε περιοχές όπως ο τελεγκέφαλος, το χιτώνιο και το μεσαίο, πλευρικό γαγγλιονικό έπαρμα. Από την άλλη πλευρά, στον εγκέφαλο των ενήλικων ποντικών, το mRNA εντοπίζεται στο ανάπτυγμα του ραβδωτού σώματος, στον επικλινή πυρήνα, στον απιοειδή λοβό, αλλά περιορίζεται κυρίως σε περιοχές που σχετίζονται με τη μνήμη και τη μάθηση, όπως ο φλοιός, η αμυγδαλή και ο ιππόκαμπος, γεγονός που προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον.



Εικόνα 4: Μετάγραφα του γονιδίου Fras1 σε στεφανιαία (coronal) τομή εγκεφάλου ενηλίκου ποντικού. Εντοπισμός στον φλοιό (CTX), στον πλευρικό αμυγδαλοειδή πυρήνα (LA), στο πυραμιδικό σύστημα ιππόκαμπου (CA1), στο υπόθεμα ιπποκάμπου (SUB), στον απιοειδή λοβό (PIR) και στον κοιλιακό-οπίσθιο-μεσαίο θαλαμικό πυρήνα (VPM) (Γ.Χαλεπάκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

1.3.3 Εγκέφαλος και διαδικασίες μνήμης-μάθησης

Το νευρικό σύστημα αποτελεί το κέντρο ελέγχου και επικοινωνίας του σώματος, καθώς δέχεται πληροφορίες τόσο από το περιβάλλον, μέσω των αισθητήριων οργάνων, όσο και από τα εσωτερικά όργανα του σώματος. Στη συνέχεια, οι πληροφορίες αυτές μεταφέρονται στον εγκέφαλο, και συγκεκριμένα σε τμήματα του εγκεφαλικού φλοιού, όπου επεξεργάζονται. Έτσι, στον εγκέφαλο δημιουργούνται τα σήματα σχετικά με την απόκριση/συμπεριφορά του οργανισμού, τα οποία στέλνονται στους μύες για να εκτελεστούν. Το νευρικό σύστημα χωρίζεται σε δύο μέρη, το κεντρικό και το περιφερειακό. Το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) (των θηλαστικών) περιλαμβάνει τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Ο εγκέφαλος βρίσκεται εντός του εγκεφαλικού κρανίου και περιβάλλεται από τρεις προστατευτικούς υμένες, ή μήνιγγες: α) τη σκληρή μήνιγγα, β) την αραχνοειδή και γ) την χοριοειδή. Γενικά, ο εγκέφαλος χωρίζεται σε τέσσερα μέρη: 1) τελεγκέφαλο, 2) διάμεσο εγκέφαλο, 3) μεσεγκέφαλο και 4) οπισθεγκέφαλο.

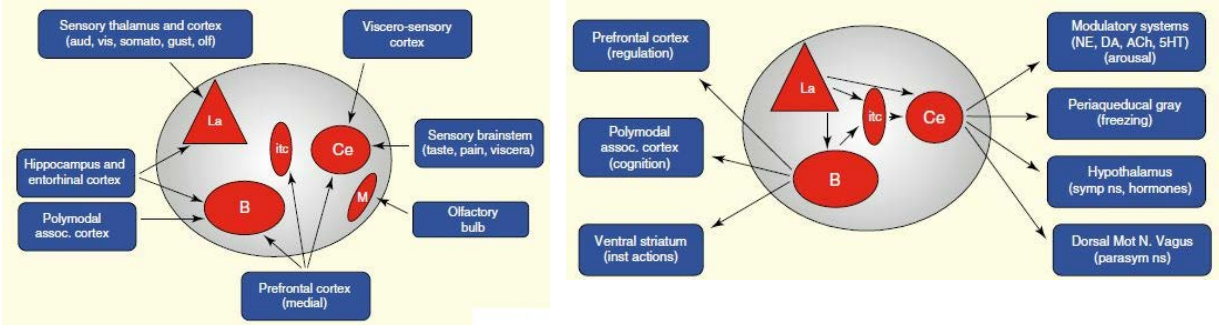


Εικόνα 5: Οβελιαία τομή του εγκεφάλου. Thalamus: Θάλαμος, Hypothalamus: Υποθάλαμος, amygdala: Αμυγδαλή, Pituitary: Υπόφυση, Hippocampus: Ιππόκαμπος, Septum: Διάφραγμα, Fornix: ψαλίδα, Prefrontal Cortex: προμετωπιαίος φλοιός, Locus Coeruleus: υπομέλανας τόπος, Raphe Nuclei: πυρήνες ραφής, Basal Ganglia: βασικά γάγγλια.

Ο εγκέφαλος είναι το υπεύθυνο όργανο για τη λεγόμενη «νόηση», καθώς αποτελεί τη βάση για την ανάπτυξη νοητικών αποκρίσεων όπως η σκέψη, το συναίσθημα, η μνήμη και η μάθηση, η αντίληψη, η περιέργεια και γενικά η συμπεριφορά. Μάθηση είναι η διαδικασία με την οποία ο άνθρωπος και τα ζώα αποκτούν γνώσεις για τον κόσμο, ενώ Μνήμη είναι η συγκράτηση και αποθήκευση αυτών των γνώσεων (Kandel et al., 2009). Χωρίς τη μνήμη, το άτομο δεν είναι ικανό για τίποτα εκτός από απλά αντανακλαστικά και στερεότυπες συμπεριφορές. Για τον λόγο αυτό, η ικανότητα της μνήμης και μάθησης αποτελεί ένα από τα πιο ενταντικά μελετούμενα θέματα στον τομέα της νευροεπιστήμης (Okano et al., 2000).

Μία από τις δομές του εγκεφάλου που σχετίζεται με την έκδηλη μνήμη είναι ο Ιππόκαμπος. Η έκδηλη μνήμη κωδικοποιεί πληροφορίες για αυτοβιογραφικά συμβάντα και τεκμηριωμένες γνώσεις και τα περιεχόμενά της ανακαλούνται με μια σκόπιμη διαδικασία ανάκλησης. Ο Ιππόκαμπος βρίσκεται μέσα στον κροταφικό λοβό και είναι η εγκεφαλική δομή όπου αποθηκεύονται προσωρινά και επεξεργάζονται οι πληροφορίες που εισέρχονται από τα αισθητηριακά συστήματα του εγκεφάλου. Αποτελεί παροδικό μόνο χώρο αποθήκευσης της μακρόχρονης μνήμης καθώς, μετά την επεξεργασία τους, οι πληροφορίες που αποκτήθηκαν μεταφέρονται σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού για μόνιμη αποθήκευση (Kandel et al.,2009).

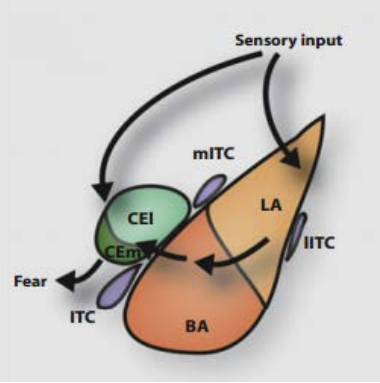
Από την άλλη πλευρά, μία ακόμα σημαντική δομή που εμπλέκεται στις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης, και κυρίως στην μάθηση των συναισθημάτων, είναι η αμυγδαλή. Οι δύο αμυγδαλές του εγκεφάλου, στην αριστερή και δεξιά πλευρά αντίστοιχα, αποτελούν ομάδες πυρήνων αμυγδαλοειδούς σχήματος, που βρίσκονται μέσα στον διάμεσο κροταφικό λοβό και θεωρούνται τμήμα του στεφανιαίου συστήματος. Κάθε πυρήνας της αμυγδαλής σχηματίζει συνδέσεις με άλλες περιοχές του εγκεφάλου (Εικόνα 6). Έτσι, η αμυγδαλή καθίσταται ικανή να δέχεται ερεθίσματα που την ενημερώνουν για πιθανούς κινδύνους στο περιβάλλον, και να στέλνει μηνύματα που έχουν ως αποτέλεσμα κάποια απόκριση, όπως το πάγωμα ή την έκκριση ορμονών (LeDoux, 2007).



Εικόνα 6: Παρουσίαση των συνδέσεων της αμυγδαλής. Αριστερά: είσοδος ερεθισμάτων σε ομάδες συγκεκριμένων πυρήνων. Δεξιά: έξοδος μηνυμάτων από τους πυρήνες. (B: basal nucleus, Ce: central nucleus, itc: intercalated cells, LA: lateral nucleus, M: medial nucleus).

Πρωταρχικός ρόλος της αμυγδαλής αποτελεί η ανάπτυξη και αποθήκευση της μνήμης του φόβου, στον οποίο συμπεριλαμβάνεται και ο εξαρτημένος φόβος, που είναι αποτέλεσμα συνδυασμού δύο ερεθισμάτων. Οι πυρήνες που συμμετέχουν στο κύκλωμα του εξαρτημένου φόβου είναι ο πλευρικός (lateral, LA), ο βασοπλευρικός (basolateral, BLA), ο κεντρικός (central, CeA) και οι παρεμβαλλόμενοι νευρώνες (intercalated cells, ITCs) (Εικόνα 7). Συγκεκριμένα, ο LA αποτελεί την πύλη εισόδου των αισθητικών πληροφοριών από τον θάλαμο και τον αντίστοιχο αισθητικό φλοιό και, ταυτόχρονα, των πληροφοριών πόνου από τον οπίσθιο ενδοελασματικό πυρήνα (posterior intralaminar nucleus, PIN) του θαλάμου αλλά και του σωματοαισθητικού φλοιού. Έτσι, στον LA πραγματοποιείται η σύγκλιση και ο συνδυασμός τέτοιων πληροφοριών και η μετέπειτα αποθήκευση τους. Στη συνέχεια, οι νευρώνες του LA διεγείρουν τον CeA είτε άμεσα, μέσω προβολής τους προς τον πλευρικό υποπυρήνα του CeAl, είτε έμμεσα, προβάλλοντας πρώτα στο BLA και τα ITCs και μετά ενεργοποιώντας τον CeA (Maren, 2001).

Ο κεντρικός πυρήνας της αμυγδαλής (CeA) αποτελεί την κύρια πύλη εξόδου, καθώς προβάλλει νευρώνες που κάνουν συνδέσεις με διαφορετικές περιοχές του εγκεφαλικού στελέχους και του υποθαλάμου, ώστε να ενορχηστρώσουν τις αποκρίσεις του φόβου. Μπορεί να πραγματοποιηθεί περεταίρω διαχωρισμός του σε δύο υποπυρήνες, τον πλευρικό (CeI) και τον μεσαίο (CeAm). Όπως είναι προφανές, η σωστή λειτουργία του CeA καθίσταται απαραίτητη προκειμένου να είναι δυνατή η έκφραση του φόβου (Ehrlich et al., 2009).



Εικόνα 7: Σχήμα της βασικής οργάνωσης της αμυγδαλής και της ροής της πληροφορίας στο κύκλωμα φόβου.
LA: πλευρική αμυγδαλή, BA: βασοπλευρική αμυγδαλή, Cel: πλευρικός υποπυρήνας του κεντρικού, Cem: μεσαίος υποπυρήνας του κεντρικού, mITC: μεσαία ITC δεσμίδα, lITC: πλευρική ITC δεσμίδα .

1.3.4 Πειράματα συμπεριφοράς στα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια αποκαλύπτουν αδυναμία στη μνήμη του φόβου

Η παρουσία διανοητικών διαταραχών σε άτομα που πάσχουν από σύνδρομο Fraser, σε συνδυασμό με τον εντοπισμό του mRNA του γονιδίου Fras1 σε περιοχές που σχετίζονται με τη μνήμη και τη μάθηση, όπως η αμυγδαλή, ώθησαν στην διενέργεια πειραμάτων συμπεριφοράς στα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν από την κυρία Φ. Στυλιανοπούλου και τον κύριο Α. Σταματάκη στην Νοσηλευτική σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών, καταδεικνύοντας την αδυναμία των *Fras1*$^{-/-}$ ενήλικων ποντικών να αναπτύξουν εξαρτημένο φόβο (conditioned fear).

Πιο συγκεκριμένα, το κύριο συμπεριφορικό πείραμα που διεξήχθη ήταν αυτό της εξαρτημένης αντίδρασης φόβου (Fear Conditioning), που αποτελεί μία μορφή μάθησης κατά την οποία ένα ουδέτερο ερέθισμα, π.χ. ένας συγκεκριμένος ήχος, συσχετίζεται με ένα ακόλουθο επώδυνο ερέθισμα, π.χ. ηλεκτροσόκ, καταλήγοντας στην έκφραση του φόβου ως απόκριση στο αρχικό ουδέτερο ερέθισμα. Η διαδικασία απαιτεί πολλές επαναλήψεις των δύο διαδοχικών ερεθισμάτων, ώστε τελικά το εξαρτημένο ερέθισμα (conditioned stimulus), δηλαδή ο ήχος, να αρκεί για την παραγωγή του φόβου, χωρίς την παρουσία του μη εξαρτημένου ερεθίσματος (unconditioned stimulus), δηλαδή του ηλεκτροσόκ (LeDoux, 1996). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών αποκάλυψαν αδυναμία των *Fras1*$^{-/-}$ ποντικών να εκφράσουν φόβο ως απόκριση στο εξαρτημένο ερέθισμα, καταδεικνύοντας μία πιθανή βλάβη στη δομή ή τη λειτουργία της αμυγδαλής, που είναι υπεύθυνη για τη συσχέτιση των δύο ερεθισμάτων και την

τελική απόκριση του φόβου. Η διαταραχή στην ανάπτυξη εξαρτημένου φόβου έδωσε το έναυσμα για περαιτέρω πειράματα συμπεριφοράς, ώστε να αποκαλυφθούν οι μηχανισμοί που σχετίζονται με τη βλάβη και να αποσαφηνιστεί η αιτία της.

1.4 Σκοπός της εργασίας

Η περιγραφή διανοητικών διαταραχών σε άτομα που πάσχουν από σύνδρομο Fraser, η έκφραση του γονιδίου *Fras1* σε περιοχές που σχετίζονται με τη μνήμη και τη μάθηση, και τα προβλήματα των *Fras1*$^{-/-}$ ποντικών στην ανάπτυξη εξαρτημένου φόβου, είναι τα βασικά δεδομένα που αποτέλεσαν τη βάση για τη διατύπωση των στόχων της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Οι παρατηρήσεις αυτές ενίσχυσαν το ενδιαφέρον για λεπτομερή μελέτη της εναπόθεσης της πρωτεΐνης Fras1 στο κεντρικό νευρικό σύστημα και της συσχέτιση της λειτουργίας της με τις φυσιολογικές εγκεφαλικές διαδικασίες στις οποίες εμπλέκεται.

Ως αρχικός στόχος της εργασίας καθίσταται η διερεύνηση του προτύπου εντοπισμού της πρωτεΐνης Fras1 στον αναπτυσσόμενο και ενήλικο εγκέφαλο ποντικών. Το αναμενόμενο αποτέλεσμα της μελέτης αυτής θα ήταν η πρωτεΐνη να βρίσκεται τόσο στις αντίστοιχες περιοχές που έχει εντοπιστεί το mRNA του γονιδίου *Fras1*, όπως η αμυγδαλή, ο ιππόκαμπος, το χοριοειδές πλέγμα κλπ, όσο και στη βασική μεμβράνη της χοριοειδούς μήνιγγας (pia matter), όπως καταδεικνύει το γενικότερο πρότυπο του γονιδίου στο σώμα. Η λεπτομερής περιγραφή του εντοπισμού της πρωτεΐνης θα συμβάλλει στην κατανόηση της λειτουργίας της, αλλά και των διανοητικών διαταραχών που προκαλεί η απουσία της.

Ο δεύτερος στόχος της εργασίας αφορά τη διενέργεια επιπλέον πειραμάτων συμπεριφοράς, που θα συντελέσουν στον προσδιορισμό της ακριβούς αιτίας που οδηγεί σε αδυναμία μνήμης του φόβου στα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν πρώτα πειράματα μη εξαρτημένου φόβου (unconditioned fear), ώστε να αποδειχτεί αν τα ποντίκια αυτά είναι ικανά να αναπτύξουν φόβο ως απόκριση μόνο στο μη εξαρτημένο ερέθισμα, δηλαδή το ηλεκτροσόκ, και, στη συνέχεια, επαναλήφθηκαν τα πειράματα της εξαρτημένης αντίδρασης φόβου (Fear Conditioning) με σκοπό να επιβεβαιωθούν τα ήδη υπάρχοντα αποτελέσματα και να επιλεχθούν οι πιο αποδοτικές συνθήκες.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

.

2.1.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα Ζελατίνης

- 1.5 gr ζελατίνη
- 300 ml dH_2O
- 150 mg $KCr(SO_4)_2$ x 12 H_2O

Διάλυμα PB 10x pH 7.4 (για 1 lt)

- 10.9 gr Na_2HPO_4 άνυδρο
- 3.2 gr KH_2PO_4 άνυδρο
- Συμπλήρωση με H_2O μέχρι τον τελικό όγκο

Διάλυμα PBS 1x pH 7.4 (για 1 lt)

- 100 ml PB
- 900 ml H_2O
- 9 gr NaCl

4% PFA (για 250 ml)

- 100 ml PBS 1x
- 10 gr PFA (παραφορμαλδεΰδη)

Ανάδευση παράλληλα με θέρμανση και, όταν διαλυθεί, συμπλήρωση με PBS μέχρι τα 250 ml και αποθήκευση στους -20°C.

Blocking serum

0,1% FBS σε διάλυμα PBS/Triton 0.1%

Διάλυμα υπεροξειδίου για ενίσχυση

- 124 ml μεθανόλη
- 124 ml PBS
- 2.5 ml H_2O_2

2.1.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΩΝ ΜΕ ΖΕΛΑΤΙΝΗ

Η χρήση των αντικειμενοφόρων για την τοποθέτηση κρυοτομών απαιτεί την κάλυψή τους με ζελατίνη.

Υλικά

1) Διάλυμα Ζελατίνης
2) Αντικειμενοφόροι
3) $KCr(SO_4)_2$ x $12H_2O$

Διαδικασία

Αρχικά, γίνεται προσθήκη 1,5 gr ζελατίνης σε 300 ml H_2O και ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα στους 50°C. Όταν η ζελατίνη διαλυθεί, γίνεται προσθήκη 150 mg $KCr(SO_4)_2$ x $12H_2O$ και η ανάδευση συνεχίζεται. Μόλις το διάλυμα κρυώσει, εισάγωνται σε αυτό οι αντικειμενοφόροι για 10 min και, στη συνέχεια, μεταφέρονται στους 37°C για όλη τη νύχτα προκειμένου να στεγνώσουν.

2.1.3 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΓΚΕΦΑΛΩΝ ΓΙΑ ΚΡΥΟΤΟΜΕΣ

i) Γενικό Πρωτόκολλο

Προκειμένου να καταστεί δυνατή η παρατήρηση ιστολογικών τομών από εγκέφαλο στο μικροσκόπιο, αρχικά απομονώνονται και, στη συνέχεια, πραγματοποιείται μονιμοποίησή τους. Η μονιμοποίηση χρησιμεύει για να εμποδίσει την αποσύνθεση των ιστών και τη διατήρηση της γενικής υφής των ιστών. Μετά την μονιμοποίηση, οι εγκέφαλοι κόβονται σε ιστολογικές τομές στην κρυοτόμο.

Υλικά

1) 4% PFA
2) 30% σουκρόζη σε PBS
3) Ισοπεντάνιο

Διαδικασία

Αρχικά, απομονώνονται οι εγκέφαλοι από τους ποντικούς και τοποθετούνται σε παγωμένη 4% παραφορμαλδεΰδη (PFA). Στη συνέχεια, παραμένουν στους 4°C (cold room), ώστε να επωαστούν για χρόνο ανάλογο με το μέγεθος του ιστού. Η επόμενη επώαση γίνεται με 30% σουκρόζη σε PBS στους 4°C για κρυοπροστασία, για χρόνο ανάλογο πάλι με το μέγεθος του ιστού, μέχρι αυτός να βυθιστεί. Τέλος, γίνεται πάγωμα των εμβρύων σε προπαγωμένο στους -80°C ισοπεντάνιο για 10 min, ώστε να παγώσουν και εσωτερικά, και διατηρούνται στους -80°C μέχρι τη χρήση τους.

ii) Μονιμοποίηση εγκεφάλων από ενήλικα ποντίκια με ενδοκαρδιακή έγχυση

Μία εναλλακτική μέθοδος μονιμοποίησης εγκεφάλων, που χρησιμοποιήθηκε σε περιπτώσεις απομόνωσης τους από ενήλικα ποντίκια, είναι αυτή της έγχυσης υγρού (φυσιολογικού ορού και 4% παραφορμαλδεΰδης) δια μέσου της καρδιάς (trans-cardial perfusion). Το ποντίκι αρχικά αναισθητοποιείται με 22.5μl Avertine 2.5% ανά gr ζώου. Κατόπιν, ανοίγεται ο θώρακας και εκτίθεται η καρδιά. Τοποθετείται μια βελόνα στην αριστερή κοιλία, η οποία διοχετεύει αρχικά φυσιολογικό ορό και έπειτα φορμόλη, και κόβεται ο δεξιός κόλπος ώστε να φεύγει το αίμα. Με αυτό τον

τρόπο, αντικαθιστούμε το αίμα στο κυκλοφορικό σύστημα με το μονιμοποιητικό υγρό. Στη συνέχεια, απομονώνεται ο εγκέφαλος και μονιμοποιείται επιπλέον σε 4% PFA για 2-4 ώρες στους 4°C υπό ανακίνηση.

2.1.4 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΣΕ ΚΡΥΟΤΟΜΕΣ

Οι μονιμοποιημένοι εγκέφαλοι λαμβάνονται από τους -80°C και, αφού καλυφθούν με ειδικό κρυοπροστατευτικό υλικό (O.C.T.), κόβονται σε ιστολογικές τομές στην κρυοτόμο σε θερμοκρασία -25˚C. Οι τομές γίνονται σε πάχος 10μm και, στη συνέχεια, τοποθετούνται στην αντικειμενοφόρο στην οποία κολλάνε εύκολα λόγω της διαφοράς θερμοκρασίας (η αντικειμενοφόρος έχει θερμοκρασία δωματίου, ενώ οι τομές έχουν θερμοκρασία -25˚C). Όταν όλες οι κρυοτομές τοποθετηθούν σε αντικειμενοφόρους, υπόκεινται σε ανοσοϊστοχημεία, δηλαδή σε μία διαδικασία επώασης αντισωμάτων και ξεπλυμάτων με διάφορα διαλύματα, που έχει σκοπό την παρατήρηση της επιθυμητής πρωτεΐνης στο μικροσκόπιο φθορισμού.

<u>Υλικά</u>

1) Διάλυμα 1x PBS pH 7.4
2) Διάλυμα 10x PB
3) 0.1% Tween σε PBS
4) 0.1% Triton σε PBS
5) Blocking serum.
6) Αντίσωμα με το οποίο θα ανιχνεύσουμε συγκεκριμένη πρωτεΐνη στις κρυοτομές (rabbit anti-mouse).
7) Δεύτερο αντίσωμα goat- anti rabbit φθορίζον
8) RNAse A
9) Propidium iodide (Research Ornanigs)
10) Mowiol

Διαδικασία

Πρώτο βήμα είναι η εισαγωγή 800 μl 0.05% Tween σε PBS στα ειδικά stand των αντικειμενοφόρων και η τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων που έχουν τις κρυοτομές πάνω σε αυτά. Έτσι, οι αντικειμενοφόροι προσαρμόζονται στην συσκευή της ανοσοϊστοχημείας και πραγματοποιούνται 3 ξεπλύματα των 5 min με 0.1% Tween σε PBS. Στη συνέχεια, γίνεται επώαση με 0.1% Triton σε PBS για 10 min και ακολουθούν άλλα 3 ίδια ξεπλύματα με 0.1% Tween σε PBS. Έπειτα, οι τομές επωάζονται πρώτα με blocking serum για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και, μετά, με το πρώτο αντίσωμα αραιωμένο κατάλληλα σε blocking serum, για όλη τη νύχτα στους 4°C.

Την επόμενη μέρα, πραγματοποιούνται 3 ξεπλύματα με 0.1% Tween σε PBS και γίνεται επώαση με το δεύτερο αντίσωμα (φθορίζον) σε αραίωση 1:500 σε blocking serum για 1 ώρα στο σκοτάδι. Όλα τα βήματα που ακολουθούν μετά από αυτό το σημείο πραγματοποιούνται στο σκοτάδι. Το επόμενο βήμα είναι άλλα 3 ξεπλύματα των τομών με 0.1% Tween σε PBS και επώασή τους, για 30 min στους 37°C, με RNAση σε αραίωση 1:500 σε 0.1% Tween σε PBS, ώστε να καταστραφεί το RNA στα κύτταρα. Ακολουθεί, αφού γίνουν 3 ξεπλύματα ακόμα με 0.1% Tween σε PBS, η χρώση των τομών με propidium iodide σε αραίωση 1:1000 σε 0.1% Tween σε PBS. Η επώαση με propidium iodide, το οποίο βάφει το DNA στους πυρήνες των κυττάρων, γίνεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 3 ξεπλύματα με 0.1% Tween σε PBS, οι αντικειμενοφόροι είναι έτοιμες να καλυφθούν με 50 μl mowiol για μετέπειτα παρατήρησή του αντισώματος σε μικροσκόπιο φθορισμού.

2.1.5 ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΜΕ ΧΡΩΣΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΣΕ ΚΡΥΟΤΟΜΕΣ

Σε περίπτωση που το σήμα από τον φθορισμό δεν είναι αρκετά έντονο για την παρατήρηση, πρέπει να προβούμε σε ενίσχυσή του με συγκεκριμένη διαδικασία. Μια μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι η ενίσχυση του σήματος με χρώση υπεροξειδάσης. Για την διαδικασία αυτή, χρησιμοποιούμε το ειδικό χρωμογόνο

υπόστρωμα 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) για την χρώση καθώς και το σύμπλοκο αβιδίνης- βιοτίνης (Vectastain ABC kit της Vector laboratories) για ενίσχυση του σήματος.

Διαδικασία

Αφού τοποθετηθούν οι κρυοτομές στις αντικειμενοφόρους, γίνεται επώασή τους για 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό σκοτάδι, σε διάλυμα υπεροξειδίου που περιέχει: 124 ml μεθανόλη

124 ml PBS

2,5 ml υπεροξέιδιο

Η επώαση στο διάλυμα αυτό γίνεται για να λάβει χώρα απενεργοποίηση της δράσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης.

Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόροι προσαρμόζονται στην ειδική συσκευή ανοσοϊστοχημείας και υπόκεινται σε ένα ξέπλυμα με PBS για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 ξεπλύματα με διάλυμα PBS/Tween 0.1% επώασή των τομών για 10 min με διάλυμα PBS/Triton 0.1% και ακόμα 3 ίδια ξεπλύματα με διάλυμα PBS/Tween 0.1%. Αφού επωαστούν με blocking serum για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, αφήνονται για ολονύχτια επώαση στους 4ºC με το πρώτο αντίσωμα σε κατάλληλη αραίωση.

Την επόμενη μέρα, πραγματοποιούνται 3 ξεπλύματα των τομών με PBS/Tween 0.1% και επώασή τους με το δευτερογενές βιοτινιλιωμένο αντίσωμα σε αραίωση 1:500 σε blocking serum για 30 λεπτά στο σκοτάδι. Όλα τα βήματα που ακολουθούν μετά από αυτό το σημείο πραγματοποιούνται στο σκοτάδι. Παράλληλα φτιάχνεται το σύμπλοκο αβιδίνης-βιοτινιλιωμένης υπεροξειδάσης, με 1:50 αβιδίνη και 1:50 βιοτίνη σε blocking serum, και επωάζεται για 30 min στον πάγο και σε σκοτάδι. Ο χρόνος που απαιτείται για να δημιουργηθεί το σύμπλοκο αυτό είναι 30 λεπτά και ο σχηματισμός του πραγματοποιείται στους 4°C.

Μετά την επώαση των τομών με το δεύτερο αντίσωμα, υποβάλλονται σε 3 ξεπλύματα με PBS/Tween 0.1% και επωάζονται με το σύμπλοκο αβιδίνης-βιοτινιλιωμένης υπεροξειδάσης για 20 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθούν 3 ακόμα ξεπλύματα με PBS/Tween 0.1% και, στη συνέχεια, οι τομές επωάζονται με το χρωμογόνο υπόστρωμα DAB [Σε 5ml H_2O, 1 ταμπλέτα DAB και 1 ταμπλέτα Urea Hydrogen Peroxide, (Sigma)]. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στο

σκοτάδι για διάστημα 2-12 λεπτών, μέχρι να παρουσιαστεί ικανοποιητική χρώση. Τέλος, πραγματοποιείται ένα ξέπλυμα 5 λεπτών σε PBS για να σταματήσει η αντίδραση, και οι τομές αφυδατώνονται σε διαλύματα 70, 95 και 100% αιθανόλης (2 λεπτά παραμονή σε κάθε διάλυμα), εμβαπτίζονται σε ξυλένιο (για 10 λεπτά), καλύπτονται με neomount και τοποθετείται καλυπτρίδα. Έτσι, οι τομές του εγκεφάλου είναι έτοιμες για παρατήρηση της χρώσης σε οπτικό μικροσκόπιο.

2.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

2.2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΓΚΕΦΑΛΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΦΙΝΕΣ

Για να παρατηρήσουμε ιστολογικά τον εγκέφαλο των εμβρύων, πραγματοποιούμε έγκλεισή τους σε παραφίνες και, έπειτα, χρώση τους με cresyl/violet. Επίσης, η χρήση της μεθόδου έγκλεισης των εγκεφάλων σε παραφίνες μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για ανοσοεντοπισμό μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Για τον σκοπό αυτό, πρέπει πρώτα τα έμβρυα να μονιμοποιηθούν και να επεξεργαστούν με διαλύματα αιθανόλης, ώστε να αφυδατωθεί ο ιστός. Έτσι, κατασκευάζονται κύβοι παραφίνης, στους οποίους έχει εμβαπτιστεί ο ιστός, για να γίνει εφικτό το κόψιμο σε μικροτόμο.

<u>Υλικά</u>

1) 4% PFA
2) PBS
3) NaCl 0.86%
4) Διαλύματα αιθανόλης (30%- 100%)
5) Ξυλένιο
6) Παραφίνη

Διαδικασία

Αρχικά, απομονώνονται οι εγκέφαλοι από ποντικούς και εισάγωνται σε 4% PFA για μονιμοποίηση. Στη συνέχεια, αφαιρείται το 4% PFA και ξεπλένεται ο ιστός με PBS για 2 ώρες ώστε να απομακρυνθεί εντελώς το PFA. Έπειτα, ο ιστός ξεπλένεται για 2 ώρες με NaCl 0.86%, για να απομακρυνθούν τα φωσφορικά, και εισάγεται σε 30% αιθανόλη (EtOH), όπου παραμένει για 2 ώρες υπό ανακίνηση. Ακολουθούν διαδοχικές επωάσεις του ιστού σε αιθανόλη 50% (2ώρες), 70 ή 75% (όλη τη νύχτα), 80% (όλη τη μέρα), 90 ή 95% (όλη τη νύχτα) και 100% (όλη τη μέρα), υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Έτσι, με την προσθήκη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης, πετυχαίνουμε την σταδιακή αφυδάτωση του ιστού.

Επόμενο βήμα είναι η προσθήκη του ιστού σε ξυλένιο προκειμένου να απομακρυνθεί η αιθανόλη. Η αιθανόλη δεν διαλύεται στην παραφίνη, επομένως ο ιστός θα πρέπει να έχει απομακρυνθεί από την αιθανόλη, μέσω του ξυλενίου, πριν τοποθετηθεί στην παραφίνη. Ο ιστός θα παραμείνει στο ξυλένιο έως ότου γίνει διάφανος. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη του σε λιωμένη παραφίνη-χλωροφόρμιο (1:1) στους 63˚ C, όπου παραμένει για όλη τη νύχτα. Το ξυλένιο δεν χρειάζεται να αφαιρεθεί πριν την προσθήκη της παραφίνης, αφού αυτή διαλύεται στο ξυλένιο. Η προσθήκη χλωροφορμίου συμβάλλει στη διάλυση των λιπών (μυελίνη) του εγκεφάλου. Με την πάροδο της μίας νύχτας, αλλάζουμε την παραφίνη και αφήνουμε τον ιστό σε αυτήν για 48 ώρες στους 61˚ C.

Την επόμενη μέρα, τοποθετούμε τον ιστό σε ειδικά καλούπια στα οποία προσθέτουμε παραφίνη, αφήνοντας τα να παγώσουν λίγο στον πάγο και μετά στο ψυγείο. Όταν οι κύβοι παραφίνης έχουν πλέον παγώσει, κόβουμε τομές πάχους 10μm σε μικροτόμο και, αφού τις τοποθετήσουμε σε αντικειμενοφόρους, τις αφήνουμε να στεγνώσουν στους 37˚C για όλο το βράδυ.

2.2.2 ΧΡΩΣΗ CRESYL/VIOLET

Προκειμένου να παρατηρήσουμε ιστολογικά τις τομές των εγκεφάλων μας, μπορούμε να πραγματοποιήσουμε χρώση cresyl/violet, η οποία βάφει τους ιστούς με χαρακτηριστικό βιολετί χρώμα.

Υλικά

1) cresyl/violet
2) Διαλύματα αιθανόλης (70%, 90%,100%)
3) Ξυλένιο
4) dd H_2O

Διαδικασία

Αρχικά, εμβαπτίζουμε τις αντικειμενοφόρους με τις τομές σε H_2O για 5min και μετά σε cresyl/violet για 1 ώρα. Στη συνέχεια, τις τοποθετούμε πάλι σε H_2O για 1min δύο φορές. Μετά τις βάζουμε για 1-2 min σε 70% αιθανόλη και για άλλα 1-2 min σε 90% και σε 100% αιθανόλη. Αφού σκουπίσουμε την αιθανόλη από τις αντικειμενοφόρους, τις εισάγουμε σε ξυλένιο όπου τις αφήνουμε για 3-5 min για να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη. Έτσι, οι τομές έχουν πλέον βαφτεί και μπορούν να παρατηρηθούν τα ιστολογικά χαρακτηριστικά τους σε οπτικό μικροσκόπιο.

2.3 Κατάλογος Αντισωμάτων

Αντίσωμα	**Προέλευση**	**Αραίωση**
Fras1 rabbit polyclonal	Homemade	1:50-1:250
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG	Molecular Probes	1:500
Anti-Rabbit IgG Biotinylated	Vector Laboratories	1:500
Laminin β2 chain domain IV	Gifted	1:300

2.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ

2.4.1 UNCONDITIONED FEAR (ΜΗ ΕΞΑΡΤΗΜΕΝΟΣ ΦΟΒΟΣ)

Συνθήκες

- Το κλουβί για το ηλεκτροσόκ ήταν τοποθετημένο μέσα σε ξύλινο ντουλάπι
- Χωρίς white noise μέσα στο ντουλάπι
- Λάμπα λευκού φωτός
- Χρήση 70% αιθανόλης λίγα λεπτά πριν το πείραμα
- Η διαδικασία διεξήχθη από το ίδιο άτομο για όλα τα ποντίκια
- Εξέταση ενήλικων ποντικών αγρίου τύπου και *Fras1*$^{-/-}$ που ήταν αδέλφια.

Διαδικασία

Αρχικά, τα κλουβιά που περιέχουν τα ποντίκια μεταφέρονται στο δωμάτιο που θα γίνει το πείραμα και αφήνονται 30-60 λεπτά για εγκλιματισμό. Προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία του πειράματος, το ποντίκι μεταφέρεται γρήγορα στο κουτί και παραμένει εκεί 3 λεπτά χωρίς διακοπή ώστε να προσαρμοστεί. Αμέσως μόλις περάσει αυτό το διάστημα, γίνεται ηλεκτροσόκ ρεύματος 0.7mA και διάρκειας ενός δευτερολέπτου. Ακολουθεί παύση 3 λεπτών και επαναλαμβάνεται ακόμα ένα ηλεκτροσόκ ίδιας έντασης και διάρκειας. Όλη η διαδικασία μαγνητοσκοπείται σε ξεχωριστό video για κάθε ποντίκι.

Ανάλυση της κινητικότητας

Η επεξεργασία του video πραγματοποιείται με χρήση του προγράμματος JWatcher (V1.0) και στηρίζεται στην ανάλυση της κινητικής δραστηριότητας του ποντικού.

Για την ανάλυση αυτή γίνεται διαχωρισμός της διάρκειας του πειράματος σε τρία τμήματα:

a. Προσαρμογή 2 λεπτά
b. Test a (μετά το 1 ηλεκτροσόκ) 3 λεπτά
c. Test b (μετά το 2 ηλεκτροσόκ) 3 λεπτά

2.4.2 FEAR CONDITIONING (ΕΞΑΡΤΗΜΕΝΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΦΟΒΟΥ)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το πείραμα της εξαρτημένης αντίδρασης φόβου (Fear Conditioning) σχετίζεται με δύο ερεθίσματα, το μη εξαρτημένο ερέθισμα (unconditioned stimulus), δηλαδή το ηλεκτροσόκ, και το εξαρτημένο ερέθισμα (conditioned stimulus), δηλαδή έναν χαρακτηριστικό ήχο. Για τον σκοπό αυτό, η διαδικασία λαμβάνει χώρα δύο συνεχόμενες ημέρες. Κατά την πρώτη μέρα, πραγματοποιείται η συσχέτιση των δύο διαδοχικών ερεθισμάτων με συνεχείς επαναλήψεις τους, ενώ την δεύτερη μέρα εφαρμόζεται μόνο το εξαρτημένο ερέθισμα, ώστε να ελεγθεί η ικανότητα του ποντικού για παραγωγή φόβου ως απόκριση μόνο σε αυτό. Επομένως, είναι αναγκαίο να αλλάξουν κάποιες συνθήκες στο περιβάλλον του πειράματος τη δεύτερη μέρα, ώστε το ποντίκι να παράγει φόβο στηριζόμενο μόνο στην μνήμη του χαρακτηριστικού ήχου.

<u>Συνθήκες Α ημέρας</u>

- Το κλουβί για το ηλεκτροσόκ ήταν τοποθετημένο μέσα σε ξύλινο ντουλάπι
- Χρήση μεταλλικής πλάκας για δάπεδο
- Χωρίς white noise μέσα στο ντουλάπι
- Λάμπα λευκού φωτός
- Χρήση 70% αιθανόλης λίγα λεπτά πριν το πείραμα
- Η διαδικασία διεξήχθη από Α άτομο
- Εξέταση ενήλικων ποντικών αγρίου τύπου και *Fras1*$^{-/-}$ που ήταν αδέλφια αντίστοιχα.

<u>Διαδικασία Α ημέρας</u>

Αρχικά, τα κλουβιά που περιέχουν τα ποντίκια μεταφέρονται στο δωμάτιο που θα γίνει το πείραμα και αφήνονται 30 λεπτά για εγκλιματισμό. Προκειμένου να

ξεκινήσει η διαδικασία του πειράματος, το ποντίκι μεταφέρεται γρήγορα στο κουτί και παραμένει εκεί 2 λεπτά χωρίς διακοπή ώστε να προσαρμοστεί. Αμέσως μόλις περάσει αυτό το διάστημα, ενεργοποιείται τόνος έντασης 5kHz για 30 δευτερόλεπτα και ακολουθεί ηλεκτροσόκ ρεύματος 0.7mA και διάρκειας ενός δευτερολέπτου. Κατόπιν, επέρχεται διάμεση παύση 30 δευτερολέπτων και επαναλαμβάνονται ακόμα μία φορά τα δύο διαδοχικά ερεθίσματα αντίστοιχης έντασης και διάρκειας. Ακολουθεί μία ακόμα διάμεση παύση 30 δευτερολέπτων και άλλη μία επανάληψη των δύο διαδοχικών ερεθισμάτων. Τέλος, το ποντίκι μαγνητοσκοπείται για 60 ακόμα δευτερόλεπτα σε ηρεμία.

Συνθήκες Β ημέρας

- Το κλουβί για το ηλεκτροσόκ ήταν τοποθετημένο μέσα σε ξύλινο ντουλάπι
- Χρήση πλαστικοποιημένου κόκκινου χαρτονιού για δάπεδο
- Χρήση μαύρων χαρτιών για κάλυψη των πλευρικών τμημάτων του κλουβιού
- Χωρίς white noise μέσα στο ντουλάπι
- Λάμπα λευκού φωτός
- Χρήση πρώτα 70% αιθανόλης και στη συνέχεια προσθέτουμε οξικό όξύ
- Η διαδικασία διεξήχθη από Β άτομο (διαφορετικό του Α ατόμου)
- Εξέταση ενήλικων ποντικών αγρίου τύπου και *Fras1*$^{-/-}$ που ήταν αδέλφια αντίστοιχα.

Διαδικασία Β ημέρας

Αρχικά, τα κλουβιά που περιέχουν τα ποντίκια μεταφέρονται στο δωμάτιο που θα γίνει το πείραμα και αφήνονται 30 λεπτά για εγκλιματισμό. Προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία του πειράματος, το ποντίκι μεταφέρεται γρήγορα στο κουτί και παραμένει εκεί 2 λεπτά χωρίς διακοπή ώστε να προσαρμοστεί. Αμέσως μόλις περάσει αυτό το διάστημα, ενεργοποιείται τόνος έντασης 5kHz για 30 δευτερόλεπτα

και ακολουθεί διάμεση παύση 30 δευτερολέπτων. Αυτή η διαδικασία εφαρμογής τόνου και παύσης επαναλαμβάνεται άλλες τρεις φορές και ακολουθεί ένα διάστημα 60 δευτερολέπτων ώστε να ηρεμήσει το ποντίκι.

Ανάλυση της κινητικότητας

Η επεξεργασία του video πραγματοποιείται με χρήση του προγράμματος JWatcher (V1.0) και στηρίζεται στην ανάλυση της κινητικής δραστηριότητας του ποντικού μόνο κατά τη δεύτερη μέρα του πειράματος.

Για την ανάλυση αυτή γίνεται καταμέτρηση μόνο κατά τη διάρκεια που ακούγεται ο τόνος, δήλαδή τέσσερις φορές των 30 δευτερολέπτων η καθεμία:

a. Test a (πρώτος τόνος) 30 δευτερόλεπτα
b. Test b (δεύτερος τόνος) 30 δευτερόλεπτα
c. Test c (τρίτος τόνος) 30 δευτερόλεπτα
d. Test d (τέταρτος τόνος) 30 δευτερόλεπτα

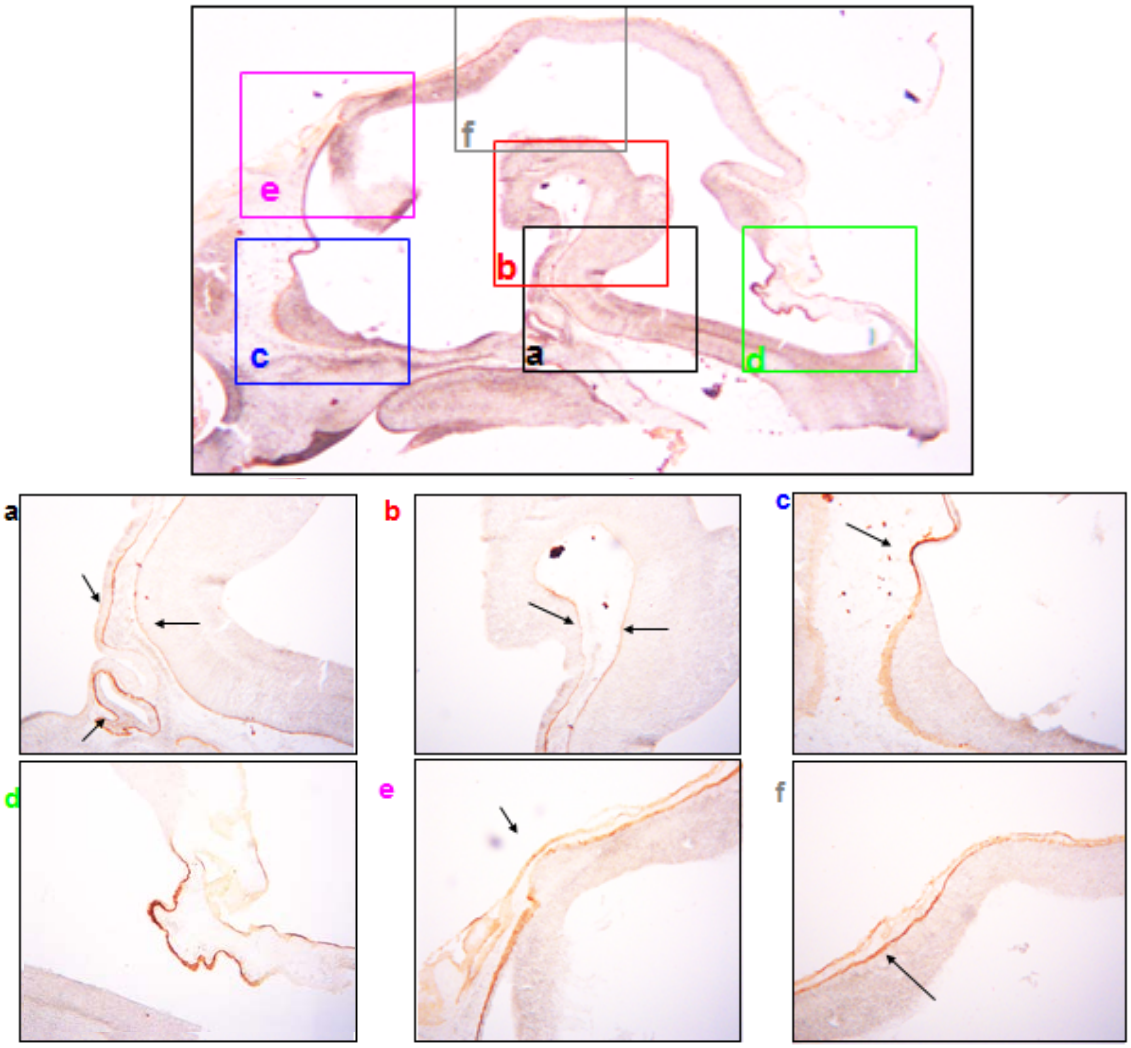
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στον εγκέφαλο εμβρύων και ενηλίκων ποντικών

3.1.1 Πρότυπο εντοπισμού της πρωτεΐνης Fras1 στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο

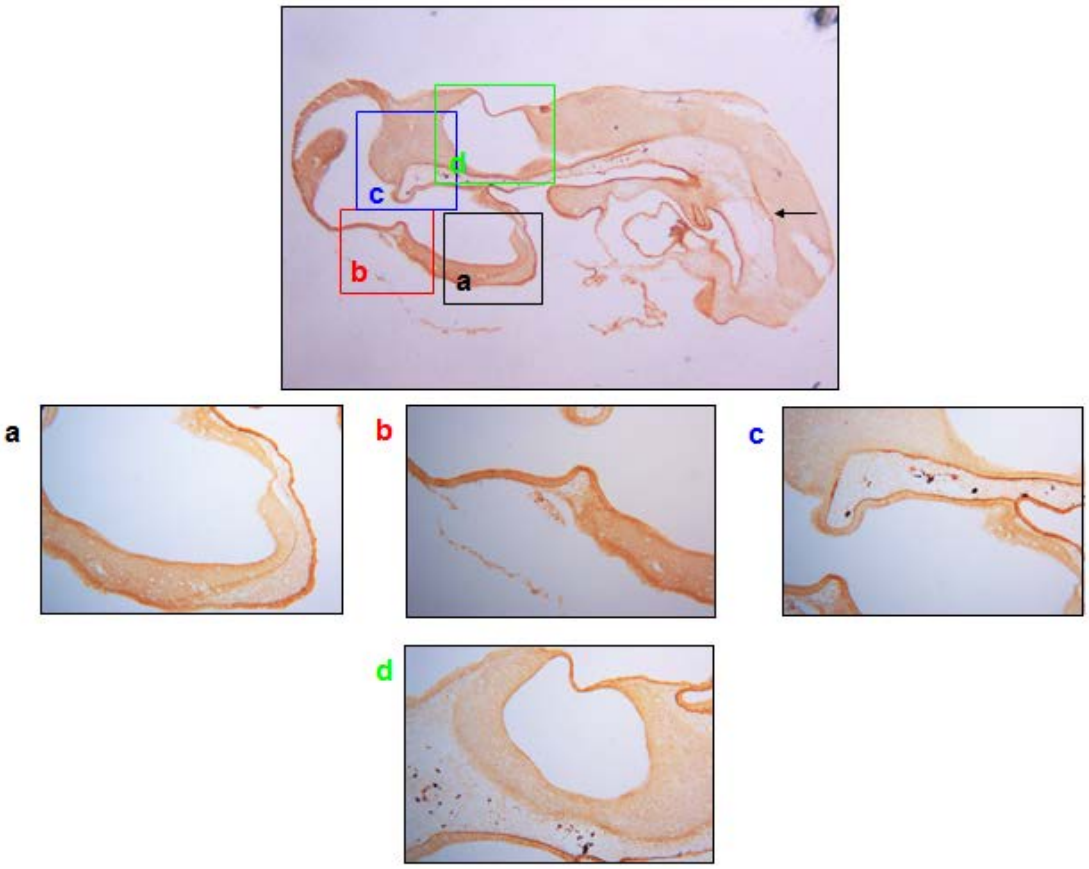
Για τη λεπτομερή περιγραφή του εντοπισμού της πρωτεΐνης Fras1 στο κεντρικό νευρικό σύστημα ποντικών δοκιμάστηκε ένας αριθμός πρωτοκόλλων, ώστε να επιλεγεί αυτό που δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα και καθιστά την περιγραφή πιο εκτενή. Έτσι, σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κρυοτομές και η πρωτεΐνη εντοπίστηκε είτε με τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού είτε με χρώση υπεροξειδάσης. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου του ανοσοεντοπισμού με χρώση υπεροξειδάσης, διότι αποδείχτηκε η πιο αποτελεσματική και έδωσε ένα λεπτομερές πρότυπο της πρωτεΐνης στον εγκέφαλο μόνο των εμβρυϊκών σταδίων.

Στους εγκεφάλους εμβρύων ποντικών, το Fras1 mRNA έχει ανιχνευτεί με πειράματα RNA in situ υβριδοποίησης σε δομές όπως ο τελεγκέφαλος, το χιτώνιο και το μεσαίο, πλευρικό γαγγλιονικό έπαρμα. Η πρωτεΐνη, όμως, στα αναπτυξιακά στάδια δεν ανιχνεύεται σε καμία από τις δομές του εγκεφάλου που υπάρχει έκφραση του mRNA, αλλά εντοπίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές της βασικής μεμβράνης της χοριοειδούς μήνιγγας (pia matter). Ενδεικτικά, σε έμβρυα της ημέρας E12.5 οι πιο σημαντικές από αυτές είναι η περιοχή του ιπποκάμπου, η μαστική περιοχή (mammillary), το πυραμιδικό δεμάτιο (pyramidal tract), το χοριοειδές πλέγμα (choroid plexus), η περιοχή της υπόφυσης (pituitary), η περιοχή του πρόσθιου φλοιού (frontal cortex) και το roof του διεγκεφάλου (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στην χοριοειδή μήνιγγα. Εικόνες από κεφάλια εμβρύων E12.5 αγρίου τύπου. Η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται στις περιοχές: a) της υπόφυσης (pituitary)-κάτω, μαστική (mammillary area)-αριστερά και πυραμιδικό δεμάτιο (pyramidal tract)- δεξιά, b) μαστική (mammillary area)-αριστερά και πυραμιδικό δεμάτιο (pyramidal tract)- δεξιά, c) του ιπποκάμπου (Hippocampal area), d) χοριοειδές πλέγμα (choroid plexus), e) του roof του διεγκεφάλου, και f) του roof του διεγκεφάλου και μεσεγκεφάλου.

Αντίστοιχα, σε έμβρυα της ημέρας E10.5 η πρωτεΐνη εντοπίζεται πάλι σε περιοχές της βασικής μεμβράνης της χοριοειδούς μήνιγγας, όπως η περιοχή της μελλοντικής υπόφυσης (pituitary), του τελεγκεφάλου (telencephalon), το χοριοειδές πλέγμα (choroid plexus) και η περιοχή της μέσης γραμμής (midline) του μεσεγκεφάλου (mesencephalon), του οπισθεγκεφάλου (hindbrain) και του νευρικού σωλήνα (neural tube). Οι περιοχές αυτές φαίνονται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 9: Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στην χοριοειδή μήνιγγα. Εικόνες από κεφάλια εμβρύων E10.5 αγρίου τύπου. Η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται στις περιοχές: a) του τελεγκεφάλου (telencephalon), b) του διεγκεφάλου (diencephalon)- αριστερά και του roof του τελεγκεφάλου- δεξιά, c) της μελλοντικής υπόφυσης (pituitary)-δεξιά, του κοιλιακού διεγκεφάλου- αριστερά, της κοιλιακής μέσης γραμμής (midline) του διεγκεφάλου και του οπισθεγκεφάλου (hindbrain)- πάνω και d) του χοριοειδούς πλέγματος (choroid plexus). Με βέλος καταδεικνύεται η περιοχή της μέσης γραμμής (midline) του νευρικού σωλήνα (neural tube).

3.1.2 Η πρωτεΐνη Fras1 δεν εντοπίζεται στον εγκέφαλο ενηλίκων ποντικών

Έπειτα από εφαρμογή ποικίλων πρωτοκόλλων και διαφορετικών συνθηκών, ο εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 κατέστη αδύνατος στο κεντρικό νευρικό σύστημα ποντικών οποιασδήποτε ενήλικης ηλικίας. Το γεγονός αυτό έρχεται σε σύγκρουση με την έκφραση του γονιδίου σε επίπεδο mRNA στον εγκέφαλο, που, όπως έχει αναφερθεί, είναι εμφανής σε δομές που σχετίζονται με τη μνήμη και τη μάθηση

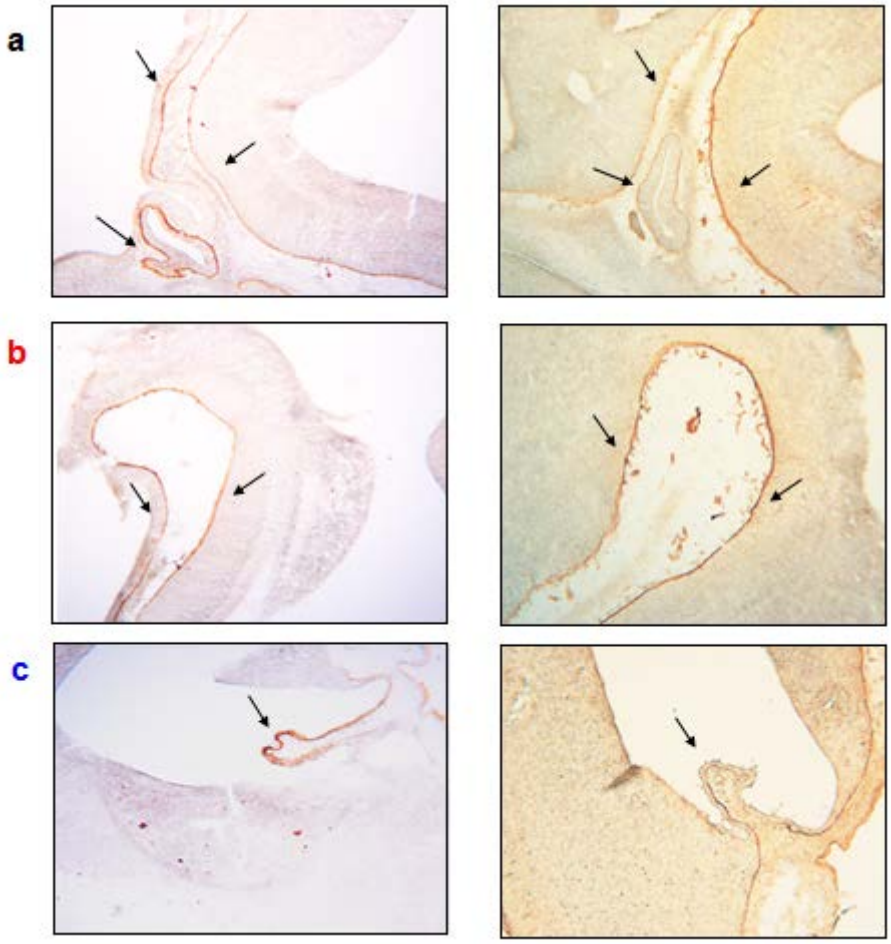
όπως φλοιός, η αμυγδαλή και ο ιππόκαμπος, αλλά και σε άλλες περιοχές όπως το ανάπτυγμα του ραβδωτού σώματος, ο επικλινής πυρήνας και ο απιοειδής λοβός.

3.1.3 Συγκριτική μελέτη του εντοπισμού της πρωτεΐνης Fras1 με τη λαμινίνη β2 στην βασική μεμβράνη της χοριοειδούς μήνιγγας

Οι λαμινίνες είναι μία οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας που αποτελούν το κυρίαρχο συστατικό της βασικής μεμβράνης. Συμμετέχουν σε ποικιλία βιολογικών διαδικασιών και αποτελούνται από 3 αλυσίδες, τις α, β και γ. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί πέντε α, τρεις β και τρεις γ αλυσίδες που με διαφορετικούς συνδυασμούς δίνουν ποικίλες ισομορφές λαμινίνης. Καθεμία από τις αλυσίδες κωδικοποιείται από διαφορετικό γονίδιο. Ο εντοπισμός των λαμινινών στη βασική μεμβράνη έδωσε το έναυσμα για την εξακρίβωση της θέσης που καταλαμβάνει η χοριοειδής μήνιγγα. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε ξανά η μέθοδος του ανοσοεντοπισμού με χρώση υπεροξειδάσης, ώστε να παρουσιαστεί το πρότυπο εντοπισμού της Fras1 σε σύγκριση με το αντίστοιχο της λαμινίνης.

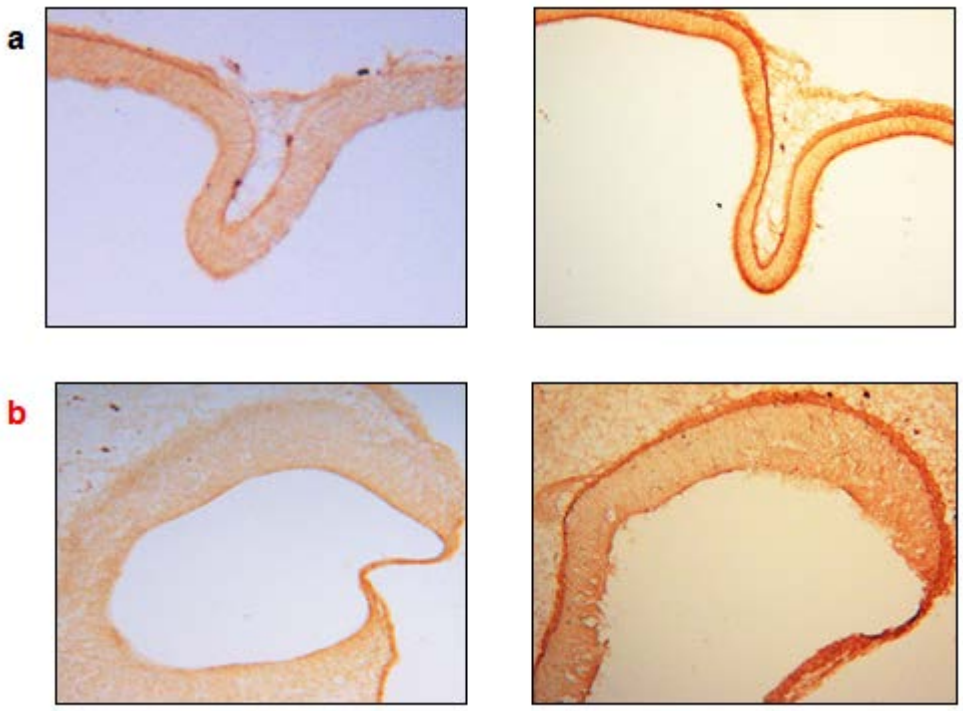
Για το συγκεκριμένο πείραμα ανιχνεύτηκε η λαμινίνη β2, διότι η αλυσίδα β2 παρουσιάζει ένα αρκετά ευρύ μοτίβο έκφρασης. Στις παρακάτω δύο εικόνες παρουσιάζεται η ίδια περιοχή από εγκεφάλους εμβρύων ημέρας E12.5 και E10.5, όπου αριστερά φαίνεται ο ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1, ενώ δεξιά της λαμινίνης β2.

Στην Εικόνα 10 φαίνεται η σύγκριση του σήματος αντίστοιχων περιοχών από εγκεφάλους εμβρύων ημέρας E12.5. Συγκεκριμένα, απεικονίζεται η περιοχή της υπόφυσης (pituitary), η μαστική περιοχή (mammillary), το πυραμιδικό δεμάτιο (pyramidal tract) και το χοριοειδές πλέγμα (choroid plexus). Η μαστική περιοχή βρίσκεται οπίσθια και κοιλιακά του διεγκεφάλου, ενώ το πυραμιδικό δεμάτιο εντοπίζεται στη μέση γραμμή (midline) του οπισθεγκεφάλου.



Εικόνα 10: Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1(αριστερά) και της λαμινίνης β2 (δεξιά) στη βασική μεμβράνη της χοριοειδους μήνιγγας. Εικόνες από κεφάλια εμβρύων E12.5 αγρίου τύπου. Απεικονίζονται οι περιοχές: a) της υπόφυσης (pituitary)-κάτω, μαστική (mammillary area)-αριστερά και πυραμιδικό δεμάτιο (pyramidal tract)- δεξιά, b) μαστική (mammillary area)-αριστερά και πυραμιδικό δεμάτιο (pyramidal tract)- δεξιά και c) το χοριοειδές πλέγμα (choroid plexus).

Ενδεικτικά, στην Εικόνα 11 φαίνεται η σύγκριση του σήματος αντίστοιχων περιοχών από εγκεφάλους εμβρύων ημέρας E10.5. Συγκεκριμένα, απεικονίζεται η περιοχή μετάβασης από το roof του τελεγκεφάλου στο roof του διεγκεφάλου, καθώς και η περιοχή της τέταρτης κοιλίας.



Εικόνα 11: Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1(αριστερά) και της λαμινίνης β2 (δεξιά) στη βασική μεμβράνη της χοριοειδους μήνιγγας. Εικόνες από κεφάλια εμβρύων E10.5 αγρίου τύπου. Απεικονίζονται οι περιοχές: a) της μετάβασης από το roof του τελεγκεφάλου-αριστερά στο roof του διεγκεφάλου- δεξιά και b) της τέταρτης κοιλίας.

Το συνεχές σήμα που έδωσε ο ανοσοεντοπισμός της λαμινίνης, οδηγεί στο σημαντικό συμπέρασμα ότι η βασική μεμβράνη περιβάλλει ομοιόμορφα τον εγκέφαλο, αλλά και ότι και πρωτεΐνες, όπως η λαμινίνη β2, εντοπίζονται σχεδόν ομοιόμορφα σε όλη την έκτασή της. Απεναντίας, η πρωτεΐνη Fras1 δεν εμφανίζει το ίδιο συνεχές πρότυπο εντοπισμού σε όλες τις περιοχές της βασικής μεμβράνης. Επομένως, η Fras1 πρωτεΐνη όντως εντοπίζεται σε περιοχές της βασικής μεμβράνης της χοριοειδούς μήνιγγας και όχι σε κάποια άλλη περιοχή του εγκεφάλου, αλλά με έναν αυνεχή τρόπο.

3.2 Πειράματα Συμπεριφοράς

3.2.1 UNCONDITIONED FEAR (ΜΗ ΕΞΑΡΤΗΜΕΝΟΣ ΦΟΒΟΣ)

Τα πειράματα του μη εξαρτημένου φόβου (unconditioned fear) πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να διερευνηθεί αν τα Fras1-/- ποντίκια είναι ικανά να αναπτύξουν φόβο ως απόκριση μόνο στο μη εξαρτημένο ερέθισμα, δηλαδή το ηλεκτροσόκ. Για τον λόγο αυτό, στο πείραμα εξετάστηκαν τόσο Fras1-/- όσο και αγρίου τύπου ποντίκια, ώστε να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων. Στους πίνακες και στο διάγραμμα που ακολουθούν παρουσιάζεται η ανάλυση της μη κινητικότητας των ποντικών ξεχωριστά για τα αγρίου τύπου και για τα Fras1-/- ποντίκια. Η μη κινητικότητα των ποντικών αποτελεί ένδειξη του φόβου που αναπτύσσουν.

Στον πίνακα 1 φαίνονται τα αποτελέσματα για τα αγρίου τύπου ποντίκια. Κατά τη διάρκεια της προσαρμογής (habituation), τα ποντίκια αυτά παρουσιάζουν σε μέσο όρο ένα ποσοστό μη κινητικότητας (not moving) 42%, το οποίο όμως αυξάνεται μετά το πρώτο ηλεκτροσόκ (test a) σε περίπου 53,6%. Με τη διενέργεια και του δεύτερου ηλεκτροσόκ (test b), το ποσοστό αυτό αυξάνεται ακόμα περισσότερο σε μέσο όρο 64,2%.

wt	**habituation**			**Test a**			**Test b**	
	moving	not moving		moving	not moving		moving	not moving
1	1,566558333	1,326666667		1,570675	1,341691667		1,000541667	1,897633333
2	1,783483333	1,106741667		1,121616667	1,779425		1,067825	1,826566667
averages	1,675020833	1,216704167		1,346145833	1,560558333		1,034183333	1,8621
not moving %	0,42075376			0,536882408			0,64292743	

Πίνακας 1: Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης moving-not moving για τα αγρίου τύπου ποντίκια. Τρεις φάσεις ανάλυσης: 1) προσαρμογή (habituation), 2) μετά το πρώτο ηλεκτροσόκ (test a), 3) μετά το δεύτερο ηλεκτροσόκ (test b).

Αντίστοιχα, στον πίνακα 2 απεικονίζονται τα αποτελέσματα για Fras1-/- ποντίκια. Κατά τη διάρκεια της προσαρμογής (habituation), τα ποντίκια αυτά παρουσιάζουν σε μέσο όρο ένα ποσοστό μη κινητικότητας (not moving) περίπου 44%, το οποίο όμως αυξάνεται μετά το πρώτο ηλεκτροσόκ (test a) σε περίπου 46%.

Με τη διενέργεια και του δεύτερου ηλεκτροσόκ (test b), το ποσοστό αυτό αυξάνεται ακόμα περισσότερο σε μέσο όρο περίπου 59,6%.

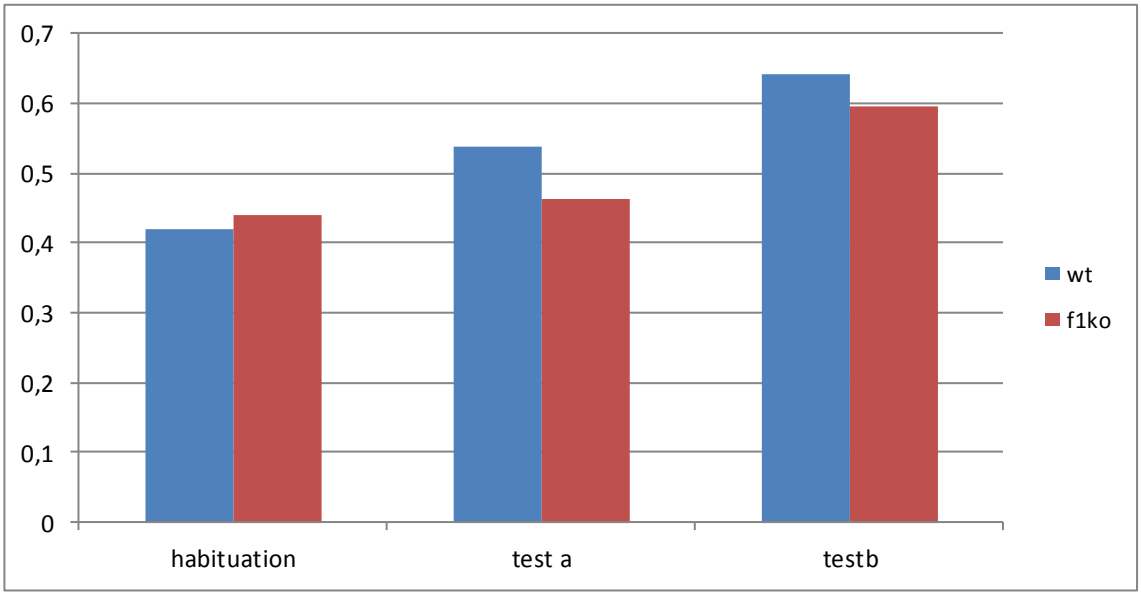
f1ko	**habituation**			**Test a**			**Test b**	
	moving	not moving		moving	not moving		moving	not moving
RE	1,441927778	1,464933333		1,090766667	1,807416667		0,83395	2,031408333
LE	1,792355556	1,086983333		2,01915	0,860141667		1,489716667	1,395183333
averages	1,617141667	1,275958333		1,554958333	1,333779167		1,161833333	1,713295833
not moving %	0,441034991			0,461716984			0,595902213	

Πίνακας 2: : Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης moving-not moving για τα Fras1-/- ποντίκια. Τρεις φάσεις ανάλυσης: 1) προσαρμογή (habituation), 2) μετά το πρώτο ηλεκτροσόκ (test a), 3) μετά το δεύτερο ηλεκτροσόκ (test b).

Τα συνολικά αποτελέσματα παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 3 και υποδεικνύουν ότι τόσο στα Fras1-/- όσο και στα αγρίου τύπου ποντίκια υπάρχει μία κλιμάκωση της μη κινητικότητας, δηλαδή μία σταδιακή αύξηση του φόβου που προκαλείται από το ηλεκτροσόκ. Η κλιμάκωση αυτή είναι συγκρίσιμη στους δύο τύπους ποντικών, υποδεικνύοντας ότι τα Fras1-/- ποντίκια μπορούν να αναπτύσσουν φόβο όπως τα φυσιολογικά ποντίκια.

	habituation	**test a**	**testb**		
wt	0,42075376	0,536882408	0,642927		0,528037278
f1ko	0,441034991	0,461716984	0,595902		0,351144977

Πίνακας 3: Παρουσίαση των συνολικών αποτελεσμάτων της ανάλυσης moving-not moving για τα αγρίου τύπου και τα Fras1-/- ποντίκια. Τρεις φάσεις ανάλυσης: 1) προσαρμογή (habituation), 2) μετά το πρώτο ηλεκτροσόκ (test a), 3) μετά το δεύτερο ηλεκτροσόκ (test b).



Εικόνα 12 : Διάγραμμα των συνολικών αποτελεσμάτων της μη κινητικότητας για τα αγρίου τύπου και τα Fras1-/- ποντίκια. . Τρεις φάσεις ανάλυσης: 1) προσαρμογή (habituation), 2) μετά το πρώτο ηλεκτροσόκ (test a), 3) μετά το δεύτερο ηλεκτροσόκ (test b).

3.2.2 FEAR CONDITIONING (ΕΞΑΡΤΗΜΕΝΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΦΟΒΟΥ)

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα ήδη υπάρχοντα αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκε επανάληψη των πειραμάτων της εξαρτημένης αντίδρασης φόβου (Fear Conditioning), τα οποία είχαν ήδη αποκαλύψει αδυναμία των *Fras1*$^{-/-}$ ποντικών να εκφράσουν φόβο ως απόκριση στο εξαρτημένο ερέθισμα. Τα πειράματα, όμως, που ακολούθησαν δεν έδωσαν κάποιο συμπέρασμα, διότι τα αγρίου τύπου ποντίκια που εξετάστηκαν, δεν παρουσίασαν παραγωγή φόβου όταν άκουγαν τον ήχο. Το γεγονός αυτό υπέδειξε κάποια διαταραχή στη συσχέτιση του εξαρτημένου και του μη εξαρτημένου ερεθίσματος, όπως και στα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια. Η υπόθεση αυτή απορρίφθηκε, λαμβάνοντας υπόψη ότι τα ποντίκια δεν ανταποκρίνονται το ίδιο σε όλες τις συχνότητες του ήχου. Έτσι, η ένταση των 5kHz που χρησιμοποιήθηκε πιθανόν να μην ήταν η κατάλληλη και αυτό επιβεβαιώθηκε όταν δοκιμάστηκε η συχνότητα των 3kHz, με την οποία προέκυψαν τα ίδια αποτελέσματα με αυτά των πειραμάτων που είχαν ήδη πραγματοποιηθεί στη Νοσηλευτική σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Για τον λόγο αυτό, για την ανάλυση των συμπεριφορικών διαταραχών των *Fras1*$^{-/-}$ ποντικών, λαμβάνονται υπόψη τα αποτελέσματα από τα αρχικά πειράματα, που αποκάλυψαν αδυναμία των *Fras1*$^{-/-}$ ποντικών να εκφράσουν φόβο ως απόκριση στο εξαρτημένο ερέθισμα, καταδεικνύοντας μία πιθανή βλάβη στη δομή ή τη λειτουργία της αμυγδαλής, που είναι υπεύθυνη για τη συσχέτιση των δύο ερεθισμάτων και την τελική απόκριση του φόβου.

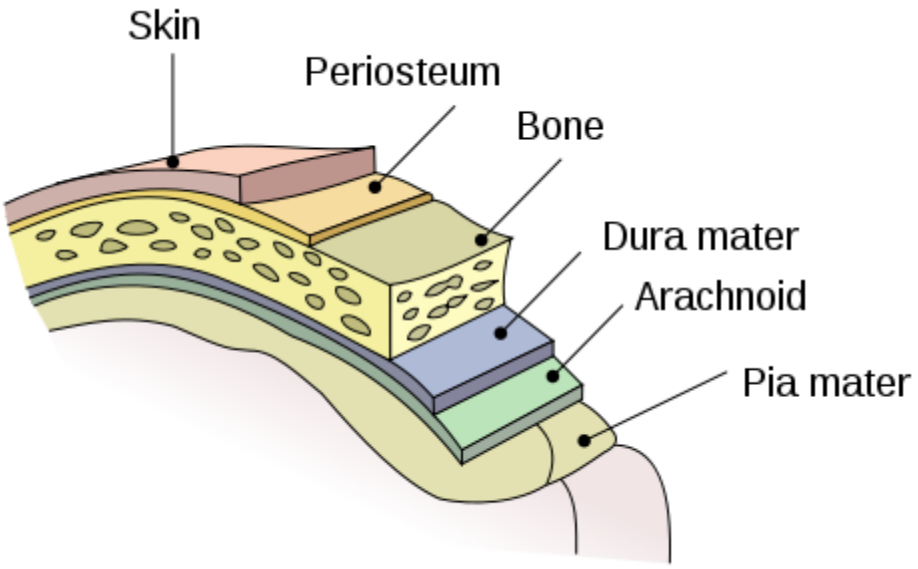
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στον εγκέφαλο εμβρύων και ενηλίκων ποντικών

4.1.1. Στα αναπτυξιακά στάδια η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται σε περιοχές της χοριοειδούς μήνιγγας του ποντικού

Μετάγραφα του γονιδίου Fras1 έχουν ανιχνευτεί με πειράματα RNA in situ υβριδοποίησης σε εγκεφάλους εμβρύων ποντικού σε περιοχές όπως ο τελεγκέφαλος, το χιτώνιο και το μεσαίο, πλευρικό γαγγλιονικό έπαρμα, δίνοντας το έναυσμα για μελέτη του εντοπισμού και της πρωτεΐνης στον εγκέφαλο. Έτσι, με τη μέθοδο του ανοσοεντοπισμού με χρώση υπεροξειδάσης, η πρωτεΐνη Fras1 στα αναπτυξιακά στάδια δεν ανιχνεύτηκε σε καμία από τις δομές του εγκεφάλου που υπάρχει έκφραση του mRNA, αλλά εντοπίστηκε σε συγκεκριμένες περιοχές της βασικής μεμβράνης της χοριοειδούς μήνιγγας (pia matter).

Η χοριοειδής μήνιγγα αποτελεί το ένα τμήμα από τις μήνιγγες που περιβάλλουν το κεντρικό νευρικό σύστημα (Εικόνα 13). Οι μήνιγγες είναι ένα σύστημα μεμβρανών και, στα θηλαστικά, αποτελούνται από τρεις στοιβάδες, την σκληρή (Dura mater), την αραχνοειδή (Arachnoid mater) και την χοριοειδή (Pia mater). Πρωταρχική λειτουργία των μηνίγγων καθίσταται η μηχανική προστασία του ενηλίκου εγκεφάλου. Εντούτοις, αποκαλύπτονται όλο και περισσότερα στοιχεία που υποστηρίζουν ότι οι μήνιγγες των εμβρύων παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου. Μέσω της έκκρισης διάχυτων παραγόντων, μπορούν να επηρεάσουν τις σχετικές με τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση συμπεριφορές των νευρικών προγονικών κυττάρων και των νευρώνων του πρόσθιου και οπίσθιου εγκεφάλου. Τα κύτταρα της μήνιγγας, επίσης εκκρίνουν και οργανώνουν την βασική μεμβράνη της χοριοειδούς μήνιγγας, ένα κρίσιμο σημείο για την αγκυροβόληση των ινών των νευροεπιθηλιακών βλαστικών κυττάρων (Siegenthaler and Pleasure, 2011).



Εικόνα 13: Οι μήνιγγες που περιβάλλουν το κεντρικό νευρικό σύστημα. Skin: δέρμα, Periosteum: περιόστεο, Bone: οστό, Dura mater: σκληρή μήνιγγα, Arachnoid: αραχνοειδής μήνιγγα και Pia mater: χοριοειδής μήνιγγα.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, δεν έγινε δυνατός ο εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στον νευρικό ιστό, αλλά μόνο σε κάποιες περιοχές της χοριοειδούς μήνιγγας των εμβρύων ποντικών. Για την απουσία της από τον νευρικό ιστό, μία πιθανή υπόθεση θα ήταν ότι η πρωτεΐνη Fras1 διαχέεται στον εξωκυττάριο χώρο και δεν συσσωρεύεται σε κάποιο σημείο, γεγονός που καθιστά αδυνατή την ανίχνευσή της με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας. Από την άλλη πλευρά, είναι πιθανόν η πρωτεΐνη Fras1 να παράγεται στον εγκέφαλο μόνο υπό συγκεκριμένες συνθήκες π.χ κατά επαγωγή του φόβου. Αυτό σημαίνει ότι το mRNA μπορεί να συσσωρεύεται σε κάποιους κυτταρικούς πληθυσμούς όπου μεταφράζεται άμεσα σε πρωτεΐνη έπειτα από κάποιο ερέθισμα, κάτι που παρατηρείται συχνά στον εγκέφαλο για πολλές πρωτεΐνες.

Αντίστοιχα πειράματα για την ανίχνευση της Fras1 στον εγκέφαλο ενηλίκων ποντικών, είχαν το ίδιο αρνητικό αποτέλεσμα. Παρά την εφαρμογή ποικίλων πρωτοκόλλων και συνθηκών, η πρωτεΐνη Fras1 δεν εντοπίστηκε στο κεντρικό νευρικό σύστημα των ενηλίκων ποντικών, ανεξαρτήτου ηλικίας. Μπορούν να προταθούν διάφοροι πιθανοί λόγοι για την αδυναμία ανίχνευσης της πρωτεΐνης Fras1, όπως είναι πρωτίστως η έλλειψη κατάλληλων πειραματικών συνθηκών και πρωτοκόλλων. Μία άλλη πιθανή υπόθεση είναι το γονίδιο Fras1 να δρα μόνο σε επίπεδο mRNA στον εγκέφαλο των ενηλίκων ποντικών ή η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης να λαμβάνει χώρα μόνο μετά από συγκεκριμένα ερεθίσματα και με παροδικό τρόπο. Επίσης, μία άλλη λογική εξήγηση θα ήταν η πρωτεΐνη να εκκρίνεται

από τα κύτταρα που την παράγουν και να διαχέεται, καθιστώντας δύσκολο τον εντοπισμό της. Τέλος, σε επίπεδο εγκεφάλου, η πρωτεΐνη θα μπορούσε να υιοθετεί μία διαμόρφωση που να οδηγεί σε καλυμμένους επιτόπους, με αποτέλεσμα να μην μπορούν αυτοί και πάλι να ανιχνευτούν αποτελεσματικά.

Το πρότυπο εντοπισμού της πρωτεΐνης Fras1 στη χοριοειδή μήνιγγα του εγκεφάλου, κατά τα αναπτυξιακά στάδια, περιορίζεται σε συγκεκριμένες μόνο περιοχές, όπως είναι για παράδειγμα το χοριοειδές πλέγμα (choroid plexus) και η περιοχή της υπόφυσης (pituitary). Ένα σημαντικό εύρημα της μελέτης που πραγματοποιήθηκε είναι το γεγονός ότι το πρότυπο αυτό της Fras1 είναι ασυνεχές, σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης, όπως η λαμινίνη β2, οι οποίες πορουσιάζουν σχεδόν ομοιόμορφη κατανομή σε όλη τη χοριοειδή μήνιγγα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι είναι η πρώτη φορά που κάποια πρωτεΐνη της βασικής μεμβράνης της χοριοειδούς μήνιγγας αποδεικνύεται να ακολουθεί ένα ασυνεχές πρότυπο, όπως αυτό που παρουσιάζει η πρωτεΐνη Fras1.

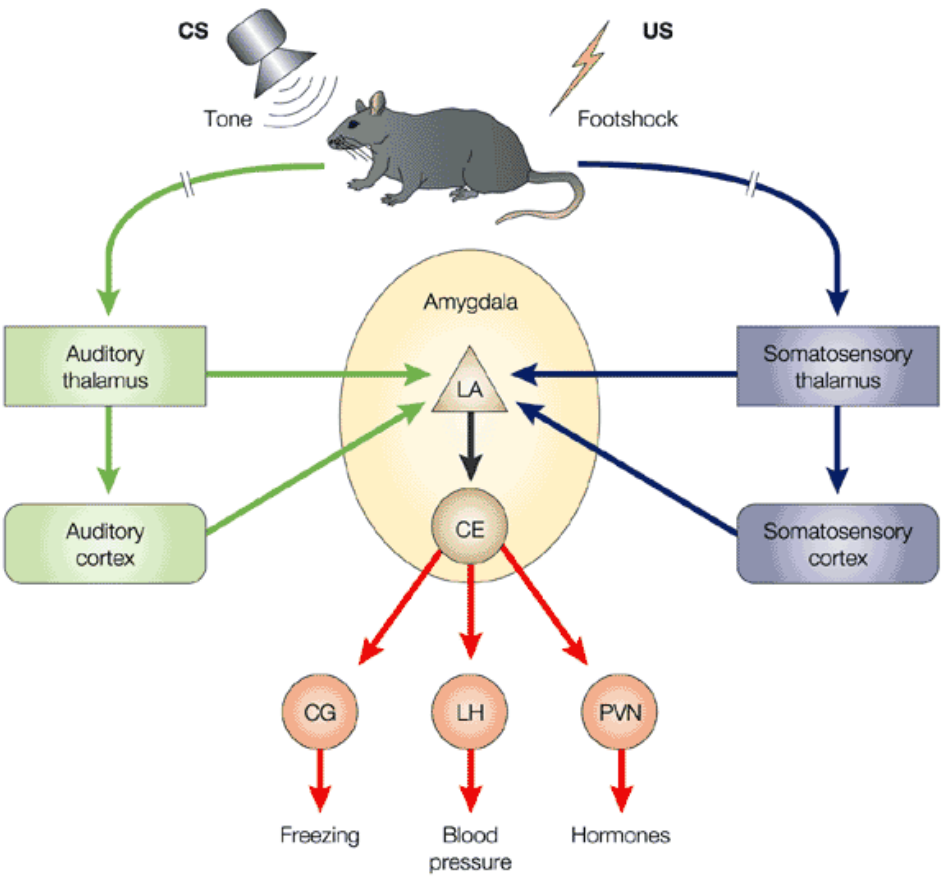
Η ασυνεχής κατανομή της Fras1 υποδεικνύει ότι οι περιοχές της μήνιγγας όπου εντοπίζεται η πρωτεΐνη, διαφέρουν λειτουργικά ή δομικά από τις υπόλοιπες περιοχές ή ότι οι περιοχές αυτές σχετίζονται λειτουργικά μεταξύ τους. Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει το ερώτημα του κατά πόσον η παρουσία της Fras1 στις περιοχές της μήνιγγας όπου δεν ανιχνεύεται, είναι απαγορευτική ή ότι αναπληρώνεται από την παρουσία άλλων πρωτεϊνών διαφορετικές από τις Fras1/Frem. Είναι προφανές ότι χρειάζονται μελλοντικά πειράματα, που θα αποκαλύψουν τί είναι αυτό που μπορεί να προσφέρει στη σωστή λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος η παρουσία της Fras1 μόνο στις περιοχές αυτές. Ένα παράδειγμα που δίνει το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη είναι το γεγονός ότι στον τελεγκέφαλο, η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται στο χοριοειδές πλέγμα αλλά όχι στην περιοχή του φλοιού (cortex). Θα πρέπει, λοιπόν, να αποσαφηνιστεί τί το ιδιαίτερο υπάρχει στη χοριοειδή μήνιγγα, ώστε αυτή να χρειάζεται και να διατηρεί την πρωτεΐνη Fras1.

4.2 Τα πειράματα συμπεριφοράς αποκάλυψαν διαταραχές της μνήμης του φόβου στα Fras1-/- ποντίκια

Η πραγματοποίηση των πειραμάτων μη εξαρτημένου φόβου (unconditioned fear) οδήγησε στην εξαγωγή του βασικού συμπεράσματος ότι τα Fras1-/- ποντίκια είναι ικανά να αναπτύξουν φόβο ως απόκριση στο μη εξαρτημένο ερέθισμα, δηλαδή το ηλεκτροσόκ. Το γεγονός ότι αυτά τα ποντίκια μπορούν να εκδηλώσουν φόβο, καταδεικνύει ότι όλα τα νευρικά κύτταρα που συμμετέχουν στο κύκλωμα παραγωγής της αίσθησης του φόβου, παρουσιάζουν κανονικές αποκρίσεις.

Εντούτοις, η διενέργεια των πειραμάτων εξαρτημένης αντίδρασης φόβου (Fear Conditioning) απέδειξε αδυναμία των *Fras1*$^{-/-}$ ποντικών να αναπτύξουν εξαρτημένο φόβο, δηλαδή να φοβηθούν αποκρινόμενα στο εξαρτημένο ερέθισμα. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη φυσιολογική διαδικασία, το εξαρτημένο ερέθισμα, δηλαδή ο ήχος, αρκεί για την παραγωγή του φόβου, χωρίς την παρουσία του μη εξαρτημένου ερεθίσματος, δηλαδή του ηλεκτροσόκ, διότι αυτά τα δύο ερεθίσματα έχουν προηγουμένως συσχετιστεί. Η μη ανάπτυξη εξαρτημένου φόβου καταδεικνύει ότι τα *Fras1*$^{-/-}$ ποντίκια παρουσιάζουν μία ανικανότητα συσχέτισης των δύο ερεθισμάτων, που πιθανόν οφείλεται σε βλάβη της αμυγδαλής, η οποία είναι υπεύθυνη για αυτή τη συσχέτιση και την τελική απόκριση του φόβου.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 14, κατά την εξαρτημένη αντίδραση φόβου, το εξαρτημένο ερέθισμα (CS) και το μη εξαρτημένο ερέθισμα (US) μεταδίδονται στον πλευρικό πυρήνα της αμυγδαλής (LA) μέσω του θαλάμου και του περιφερειακού φλοιού του ακουστικού και σωματοαισθητικού συστήματος, αντίστοιχα. Έτσι, στον LA πραγματοποιείται η σύγκλιση και ο συνδυασμός τέτοιων πληροφοριών και η μετέπειτα αποθήκευση τους. Στη συνέχεια, οι νευρώνες του LA διεγείρουν τον κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής (CE), ο οποίος αποτελεί την κύρια πύλη εξόδου, καθώς προβάλλει νευρώνες που κάνουν συνδέσεις με διαφορετικές περιοχές του εγκεφαλικού στελέχους και του υποθαλάμου. Οι περιοχές αυτές ενορχηστρώνουν μετέπειτα τις αποκρίσεις του φόβου, όπως το πάγωμα (freezing), την αύξηση της πίεσης του αίματος (blood pressure) και την έκριση ορμονών (hormone realease).



Εικόνα 14: Το κύκλωμα παραγωγής φόβου στην αμυγδαλή, κατά τη διαδικασία της εξαρτημένης αντίδρασης φόβου. CS: conditioned stimulus, US: unconditioned stimulus, CG: central grey, LH: lateral hypothalamus (πλευρικός υποθάλαμος), PVN: paraventricular hypothalamus (παρακοιλιακός υποθάλαμος) (Medina et al., 2002).

Η ικανότητα παραγωγής φόβου ως απόκριση στο ηλεκτροσόκ δείχνει ότι οι περιοχές της αμυγδαλής που εμπλέκονται στο σχετικό μονοπάτι, όπως το LA, το BLA και ο CE, λειτουργούν κανονικά. Επομένως, το πρόβλημα της έλλειψης του εξαρτημένου φόβου οφείλεται σε αδυναμία απομνημόνευσης του συσχετισμού των δύο πληροφοριών, η οποία λαμβάνει χώρα στα προβολικά (projectory) κύτταρα του LA. Συνεπώς, τα κύτταρα αυτά μπορούν να αποκρίνονται φυσιολογικά, αλλά δεν επιτελούν τη λειτουργία της αποθήκευσης, ώστε στη συνέχεια να μπορέσει το ποντίκι να θυμηθεί τη σύνδεση του ήχου με το επερχόμενο ηλεκτροσόκ.

Ένας τρόπος με τον οποίο μελλοντικά μπορεί να επιβεβαιωθεί το εύρημα του προβλήματος αποθήκευσης στο LA, είναι η χρήση του αντισώματος c-Fos. Έτσι, θα αποδειχθεί αν μετά τη διαδικασία της εξαρτημένης αντίδρασης φόβου τα νευρικά κύτταρα της αμυγδαλής είναι ικανά να ενεργοποιηθούν φυσιολογικά.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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.

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.

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 Fr em1 and Fras1 and its functional implications during mouse embryonic development. *Exp.Cell Res*. 313:910-920.

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.

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

Sadler JE, (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Biochem*. 67:395-424.

Roebroek AJM, Creemer JWM, Ayoubi TAY, Van de Ven WJM, (1992). Cloning and functional expression of Dfurin2, a Subtilisin-like pr oprotein processing enzyme of Drosophila melanogaster with multiple repeats of a cystein motif. *J. Biol. Chem*. 267:17208-17215.

Green MC, (1989). Catalog of mutant genes and polymorphic loci. In MF Lyon, AG Searle (eds): "Genetic variants and strains of the laboratory mouse" 2nd Edition. *Oxford University Press*.

Winter RM, (1990). Fraser syndrome and mouse "bleb" mutants. *Clin. Genet*. 37:494-495.

Darling S and Gossler AA, (1994). A mouse model for Fraser syndrome? *Clin. Dysmorph*. 3: 91-95.

Mc Gregor L, Makela V, Darling SM, Vrontou S, Chalepakis G, Roberts C, Smart N, Rutland P, Prescott N, Hopk ins 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.

van Haelst MM, Scambler PJ, Fraser Syndrome Collaboration Group, Hennekam RCM, (2007). Fraser syndrome: A clinical study of 59 cases and evaluation of diagnostic criteria. *Am J Med Genet Part A* 143A:3194–3203.

A M Slavotinek , C J Tifft, (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.

H. Okano, T. Hirano, E. Balaban, (2000). Learning and memory. *PNAS.* 97:12403–12404.

Kandel ER, Schwartz J, Jessell T, (2009). Principles of neural science, *McGraw-Hill Medical*, 4 edition.

Joseph E. LeDoux, (2007). Emotional Memory. *Scholarpedia*, 2(7):180

Maren S, (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu. Rev. Neurosci.* V: 24, pp.: 897–931.

Ehrlich I., Humeau Y., Grenier F., Ci occhi S., Herry C. & Lüthi A., (2009). Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron*, V: 62, I: 6, pp.: 757-771.

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

J. A. Siegenthaler, S. J. Pleasure, (2011). We have got you 'covered': how the meninges control brain Development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21:249–255.

JF. Medina, JC. Repa, M. D. Mauk, JE. LeDoux, (2002). Parallels between cerebellum- and Amygdala-Dependant conditioning *Nature Reviews Neuroscience* 3, 122-131.