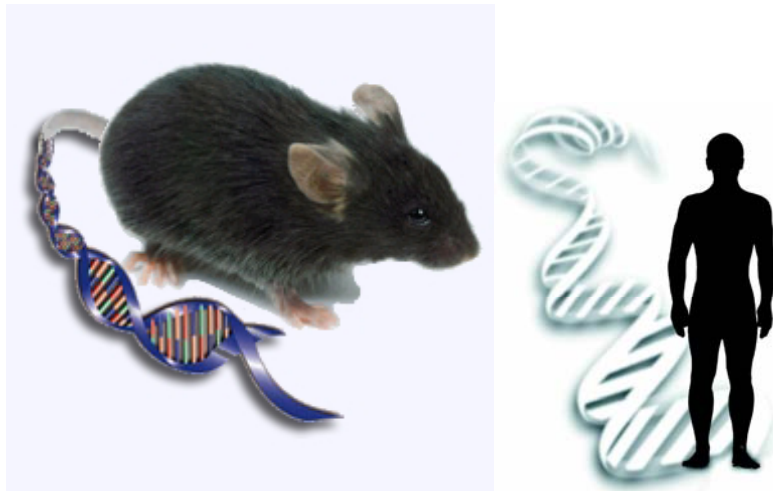


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ: 'ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ'**

**«ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *Fras1/Frem* ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ»**



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΧΙΩΤΑΚΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΧΑΛΕΠΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2009

**Στον αγαπημένο μου αείμνηστο πατέρα Στέφανο
και στα μικρά μου ανηψάκια Ελευθερίτσα και Στέφανο**

Ευχαριστίες

Πριν ξεκινήσω την εργασία αυτή, οφείλω να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν όλα αυτά τα χρόνια.

Αρχικά ευχαριστώ τον καθηγητή μου, Δρ Γεώργιο Χαλεπάκη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του και να αποκτήσω περισσότερα εφόδια για το μέλλον, καθώς επίσης και για τις πολύτιμες συμβουλές του πάνω σε επιστημονικά ζητήματα. Χωρίς τη βοήθεια του και την συνεχή καθοδήγησή του, δεν θα κατάφερα να φτάσω στο τέλος αυτής της διαδρομής.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, την Δρ Ειρήνη Αθανασάκη και τον Δρ Ιωάννη Δαλέζιο για την βοήθειά τους και την υποστήριξή τους, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εφταμελούς επιτροπής Δρ Βασίλειο Μπουριώτη, Δρ Μιχαήλ Κοκκινίδη, Δρ Εμμανουήλ Λαδουκάκη και Δρ Κυριάκο Πετράτο.

Ευχαριστώ τον Δρ Πέτρο Πέτρο για την υποστήριξη του, τη φιλία του και την πρόθυμη βοήθειά του στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας, καθώς επίσης και για την υπεροχη φιλοξενία του στην Κύπρο.

Ευχαριστώ τον καλό μου φίλο Χρήστο Ανδρεάδη για την πολύτιμη φιλία και στήριξη που μου προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια. Τον ευχαριστώ επίσης για τη βοήθεια και τις συμβουλές που μου προσέφερε με μεγάλη προθυμία στο πειραματικό μέρος της εργασίας.

Ευχαριστώ την Έφη, το Νίκο, τη Μαριάνθη, την Κωστούλα, τον Ανδρέα, για την φιλία τους και την ψυχραιμία που μου μεταδίδουν σε περιόδους έντονου άγχους.

Ευχαριστώ όλα τα παιδιά που πέρασαν από το εργαστήριο, τον Αποστόλη Μακρυγιάννη για την διαρκή συμπαράσταση και τη φιλία του, την Παναγιώτα Δημοσθένους και την Εμμανουέλα Καλλέργη, για την υπέροχη παρέα τους.

Ευχαριστώ το Βαγγέλη Παυλάκη για την βοήθειά του στα πειράματα *in situ* υβριδισμού και για τη διακριτική και ευγενική παρουσία του κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ευχαριστώ τον αδερφό μου Αντώνη και την νύφη μου Μαριάννα για τη βοήθειά τους και την συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ τους γονείς μου για την αγάπη τους και τη στήριξή τους.

Ρένα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	4
Abstract	6
Εισαγωγή	7
A) Η οικογένεια των πρωτεϊνών Fras1/Frem	7
B) Η βασική μεμβράνη	11
B1) Συστατικά της βασικής μεμβράνης	15
B1α) Τα κολλαγόνα τύπου IV και VII	15
B1β) Οι λαμνίνες	18
B1γ) Η περλεκάνη	20
B1δ) Οι ιντεγκρίνες	21
B1ε) Τα νιδογόνα	25
B1στ) Η αγκρίνη	25
B1ζ) Η δυστρογλυκάνη	26
B1η) Το κολλαγόνο τύπου XVII (BPAG2, bullous pemphigoid antigen)	26
B1θ) Η πλεκτίνη	27
B1ι) Η φιμπρονεκτίνη	27
B2) Ασθένειες του ανθρώπου που οφείλονται σε προβλήματα της βασικής μεμβράνης	27
B3) Ο ρόλος της βασικής μεμβράνης στην εμβρυογένεση	30
B3α) Η εξωκυττάρια ύλη στα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης	31
B4) Ο ρόλος της βασικής μεμβράνης στη μετάσταση	32
B4α) Προβλήματα στη βασική μεμβράνη κατά την ανάπτυξη νεοπλασιών	33
B4β) Εισβολή στους γειτονικούς ιστούς	34
B4γ) Αγγειογένεση	35
Γ) Σκοπός της εργασίας	36
Υλικά και μέθοδοι	37
A) Μέθοδοι ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων-τεχνικές ανασυνδυασμού του DNA	37
A1α) Απομόνωση βακτηριακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxiprep)	37
A1β) Απομόνωση βακτηριακού DNA σε μεγάλη κλίμακα με τη χρήση του nucleobond xtra midi kit (macherey-nagel)	38
A2) Απομόνωση βακτηριακού DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep)	38
A3) Παρασκευή χημειοεπιδεκτικών κυττάρων	39
A4) Μετασηματισμός χημειοεπιδεκτικών κυττάρων	39
A5) Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης	39
A6) Κατακρήμιση DNA	40
A7) Καθαρισμός προϊόντος PCR	40
A8) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)/πέψη με περιοριστικά ένζυμα	40
B) Τεχνικές χειρισμού του σακχαρομύκητα (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	41
B1) Μετασηματισμός κυττάρων ζύμης με πλασμιδιακό DNA	41
B2) Πειραματική διαδικασία σύζευξης στη ζύμη	42
B3) Ανοσοφορισμός σε μετασηματισμένα κύτταρα ζύμης	42
B4) Παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου με χρωμογόνο υπόστρωμα X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-d-galactoside).	44
Γ) Τεχνικές χειρισμού ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών	44
Γ1) Προσωρινή διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη μέθοδο της κατακρήμισης με φωσφορικό ασβέστιο.	44
Γ2) Προσωρινή διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη μέθοδο της λιποδιαμόλυνσης (lipofection)	45

Γ3) Προσωρινή διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη μέθοδο της χρήσης λιπιδίων (lipid-mediated transfection)	45
Γ4) Αραίωση ευκαρυωτικής καλλιέργειας με τη χρήση θρυψίνης (split)	46
Γ5) Πάγωμα ευκαρυωτικών κυττάρων (δημιουργία stocks)	46
Γ6) Ανοσοφθορισμός σε ευκαρυωτικά κύτταρα	46
Δ) Ιστολογική ανάλυση δειγμάτων	47
Δ1) Μονιμοποίηση δειγμάτων	47
Δ2) Επεξεργασία αντικειμενοφόρων με 0.5% ζελατίνη/0.05% KCr(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	47
Δ3) Διαδικασία έγκλεισης δειγμάτων για επεξεργασία τους σε κρυστόμο	48
Δ4) In situ υβριδισμός RNA (DIG-LAB)	48
Δ5) Ανοσοφθορισμός σε κρυστομές	49
Ε) Μέθοδοι ανάλυσης και χειρισμού πρωτεϊνών	50
Ε1) Μεταφορά πρωτεϊνών από πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη PVDF	50
Ε2) Western blotting	51
Ε3) Απομόνωση πρωτεΐνης από παρασκευαστικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12%.	52
Ε4) Επαγωγή πρωτεϊνικής έκφρασης με τη χρήση IPTG (isopropyl-beta-d-thiogalactopyranoside)	52
Ε5) Καθαρισμός και απομόνωση πρωτεΐνης με χρήση σφαιριδίων νικελίου (QIAGEN)	53
Ε6) Συμπύκνωση πρωτεϊνών	54
ΣΤ) Αντισώματα	54
ΣΤ1) Αντιγονικά πεπτίδια	54
ΣΤ2) Διαδικασία καθαρισμού των πολυκλωνικών αντισωμάτων	55
ΣΤ3) Απομόνωση ορού από το αίμα	55
ΣΤ4) Έλεγχος εξειδίκευσης ορού και καθαρισμένου αντισώματος	55
Ζ) Ολιγονουκλεοτίδια	56
Η) Γονδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν	58
Θ) Πειραματική καρκινογένεση δύο σταδίων	65
Αποτελέσματα	66
Α) Εντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1/Frem στα εμβρυϊκά στάδια του ποντικού	66
A1) Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1/Frem στον οφθαλμό κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη	66
A2) Ανίχνευση των πρωτεϊνών Fras1/Frem στα άκρα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη	68
A3) Εντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1/Frem στα επιθήλια του πνεύμονα	69
A4) Εντοπισμός των Fras1/Frem στα νεφρά	70
A5) Συνεντοπισμός των Fras1/Frem στη βασική μεμβράνη ποικίλων εμβρυϊκών δομών	71
A6) Το κολλαγόνο VII, συστατικό των ινιδίων αγκυροβόλησης της sublamina densa, εντοπίζεται στα έμβρυα όταν τα επίπεδα των Fras1/Frem φθίνουν	72
Β) Αλληλεπίδραση της Fras1 με τον αυξητικό παράγοντα VEGF	75
B1) Ο VEGF164 και η Fras1/ch εντοπίζονται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα στα κύτταρα mIMCD	77
B2) Οι πρωτεΐνες VEGF164 και Fras1/ch αλληλεπιδρούν μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο	78
B3) Ολόκληρη η Fras1 δεν έχει τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με τον VEGF164 στο ενδοπλασματικό δίκτυο	78
B4) Η περιοχή της Fras1 που είναι υπεύθυνη για τη στερεοχημική παρεμπόδιση περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1417-3450	79
B5) Τα πρώτα 5 συνεχόμενα μοτίβα τύπου χορδίνης της Fras1 είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση με τον VEGF164	81
B6) Η Fras1/ch αλληλεπιδρά με όλες τις ισομορφές του VEGF	82
Γ) Αλληλεπίδραση της Fras1/ch και του VEGF164 στο σακχαρομύκητα-	83

σύστημα δύο υβριδίων	
Γ1) Γενικά για το σύστημα δύο υβριδίων	83
Γ2) Γονδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν	83
Γ3) Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός των Fras1/ch και VEGF164 στο σακχαρομύκητα	84
Γ4) Η ενεργοποίηση των γονιδίων μαρτύρων λαμβάνει χώρα μόνο κατά τη συνέκφραση των Fras1/ch και VEGF164 στον πυρήνα των κυττάρων	85
Γ4α) Όλα τα διπλά μετασηματισμένα στελέχη σακχαρομύκητα αναπτύσσονται σε πλούσιο θρεπτικό μέσο	85
Γ4β) μόνο τα διπλά μετασηματισμένα στελέχη Fras1ch/pACT2+ VEGF164/PGBT9 αναπτύσσονται απουσία ιστιδίνης	86
Γ4γ) Μόνο τα διπλά μετασηματισμένα στελέχη Fras1ch/pACT2+ VEGF164/PGBT9 αναπτύσσονται απουσία αδενίνης εμφανίζοντας χαρακτηριστικό χρώμα	86
Γ4δ) Τα διπλά μετασηματισμένα στελέχη Fras1ch/pACT2+ VEGF164/PGBT9 εμφανίζουν μπλε χρώμα όταν μεγαλώνουν σε υπόστρωμα XGal	86
Γ5) Τα διπλοειδή στελέχη Fras1ch/pACT2+VEGF164/PGBT9 επιβιώνουν απουσία ιστιδίνης έπειτα από πειραματική διαδικασία σύζευξης	88
Δ) Ο ρόλος της Grip1 και της Fras1 στην αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου	91
Δ1) Η αλληλεπίδραση Fras1/Grip1 οδηγεί στο συνεντοπισμό τους σε ευκαρυωτικά κύτταρα	91
Δ2) Η Fras1ΔCOOH δεν αλληλεπιδρά με τη Grip1	92
Δ3) Οι Grip1, Fras1 και VEGF164 συνεντοπίζονται σε ευκαρυωτικά κύτταρα	93
Δ4) Οι Grip1 και VEGF164 δε συνεντοπίζονται χωρίς τη μεσολάβηση της Fras1	93
Δ5) Η Grip1 δε συνεντοπίζεται με τις Fras1ΔCOOH και VEGF164	94
Δ6) Η αλλαγή της τοπολογίας του VEGF164 είναι ανεξάρτητη από τα μοτίβα τύπου χορδίνης της Fras1	95
Δ7) Ταυτοποίηση της τοπολογίας των Fras1 c-terminus και Grip1 με ενδοκυτταρικούς μάρτυρες	96
Δ8) Η συνέκφραση των Fras1 c-terminus και Grip1 στο κύτταρο οδηγεί σε αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου	98
Δ9) Οι τρεις πρώτες PDZ περιοχές της Grip1 είναι απαραίτητες για την αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου	99
Δ10) Η αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου δεν επηρεάζει μορφολογικά το δίκτυο των μικροσωληνίσκων	100
Δ11) Το καρβοξυτελικό τμήμα της Frem2 δεν αλληλεπιδρά με τη Grip1 ενδοκυτταρικά	100
Ε) Ανίχνευση των πρωτεϊνών Fras1/Frem σε δερματικές νεοπλασίες ενηλίκων ποντικών	102
E1) Πειραματική καρκινογένεση δύο σταδίων	102
E2) Μορφολογικές διαταραχές της νεοπλαστικής επιδερμίδας	103
E3) Η Frem3 είναι η μόνη πρωτεΐνη της οικογένειας των Fras1/Frem που ανιχνεύεται σε νεοπλασίες	103
E4) Η Frem3 δεν εντοπίζεται σε όλα τα αγγεία του παθολογικού συνδετικού ιστού	105
E5) Η Frem3 εκφράζεται από νεοπλαστικά κύτταρα	106
Συζήτηση	108
A) Συνεντοπισμός των Fras1/Frem κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη	108
B) Αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Fras1 με τον αυξητικό παράγοντα VEGF	112
Γ) Αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω της αλληλεπίδρασης Fras1/Grip1	120
Δ) Οι Fras1/Frem σε νεοπλασίες της επιδερμίδας	126
Βιβλιογραφία	131

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεΐνες *Fras1/Frem* αποτελούν μία οικογένεια δομικά συγγενικών εξωκυττάρων πρωτεϊνών, που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες *Fras1*, *Frem1*, *Frem2* και *Frem3*. Με την εξαίρεση της *Frem3*, η απενεργοποίησή τους ξεχωριστά στον ποντικό οδηγεί σε παρόμοιο φαινότυπο, το λεγόμενο '*bleb*', που χαρακτηρίζεται από την αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, με αποτέλεσμα το σχηματισμό υπο-επιδερμικών πομφολυγών, κρυπτοφθαλμία, συνδακτυλίες και νεφρικές διαταραχές.

Στην παρούσα εργασία, δεδομένης της δομικής ομολογίας των *Fras1/Frem* και των παρόμοιων φαινοτυπικών διαταραχών που προκύπτουν από την απενεργοποίησή τους, πραγματοποιήθηκε μία ανοσοϊστοχημική μελέτη εντοπισμού τους κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του ποντικού, ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο παρόμοιο είναι και το πρότυπο εντοπισμού τους στα εμβρυϊκά στάδια. Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι η τοπολογία τους είναι κοινή, καθώς όλες εντοπίστηκαν στη βασική μεμβράνη μιας πληθώρας επιθηλιακών δομών. Επιπλέον, η *Frem1* εμφάνισε ένα ενδοκυτταρικό πρότυπο έκφρασης στα περιδερμικά κύτταρα της επιδερμίδας. Σε παράλληλα πειράματα, το κολλαγόνο VII, του οποίου η απενεργοποίηση οδηγεί σε παρόμοιο φαινότυπο με αυτό των *Fras1/Frem*, με τη διαφορά ότι αυτός παρατηρείται μόνο μετά τη γέννηση, ανιχνεύτηκε στα όψιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, όταν τα επίπεδα των *Fras1/Frem* αρχίζουν να φθίνουν. Το γεγονός αυτό μας οδήγησε στην υπόθεση ότι το ρόλο των *Fras1/Frem* κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη τον διαδραματίζει το κολλαγόνο VII στον ενήλικα οργανισμό και το αντίθετο.

Στην κατανόηση της λειτουργικής δράσης των πρωτεϊνών συμβάλλει και η ταυτοποίηση των αλληλεπιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν. *In vivo* παρατηρήσεις που αφορούσαν την απώλεια του αγγειογενετικού αυξητικού παράγοντα VEGF από τη βασική μεμβράνη των επιθηλίων των *Fras1*^{-/-} έμβρυων, μας οδήγησαν στη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών *Fras1* και VEGF. Στα πειράματά μας αποδείχθηκε για πρώτη φορά, ότι τα έξι πρώτα πρωτεϊνικά μοτίβα τύπου χορδίνης της *Fras1* αλληλεπιδρούν με τον VEGF, και ταυτοποιήθηκαν οι περιοχές της *Fras1* και του VEGF που είναι κρίσιμες για την αλληλεπίδραση αυτή. Τα συστήματα μελέτης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα mIMCD και το ετερόλογο σύστημα δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα. Δεδομένου ότι ο VEGF διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία νεοπλασιών, πραγματοποιήθηκε επιπλέον ο προσδιορισμός του προτύπου έκφρασης της *Fras1* και των υπολοίπων πρωτεϊνών *Fras1/Frem* σε χημικά επαγόμενους όγκους της επιδερμίδας. Διαπιστώθηκε ότι το μοναδικό μέλος της οικογένειας που ανιχνεύεται στη βασική μεμβράνη των νεοπλαστικών επιθηλίων και των παθολογικών αιμοφόρων αγγείων του συνδετικού ιστού είναι η πρωτεΐνη *Frem3*. Με πειράματα *in situ* υβριδισμού διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο *Frem3* εκφράζεται από τα καρκινικά επιθήλια.

Εκτός από τον VEGF, η πρωτεΐνη *Fras1* αλληλεπιδρά μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη *Grip1*, η οποία τη στοχεύει προς έκκριση στη βασικοπλασματική μεριά των επιθηλίων. Στα πλαίσια της

μελέτης της αλληλεπίδρασης αυτής, βρέθηκε ότι κατά τη συνέκφραση των Fras1 και Grip1 σε ευκαρυωτικά κύτταρα, πραγματοποιείται μία αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου των κυττάρων, με αποτέλεσμα να συγκεντρώνεται στις περιοχές συνεντοπισμού των δύο παραπάνω πρωτεϊνών. Η αναδιοργάνωση αυτή χαρακτηρίστηκε με συγκεκριμένους ενδοκυτταρικούς μάρτυρες και ταυτοποιήθηκαν οι περιοχές των δύο πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την πρόκληση του φαινομένου αυτού. Το γεγονός ότι η Frem2, μία πρωτεΐνη της οικογένειας των Fras1/Frem πρωτεϊνών που έχει δειχθεί *in vitro* ότι αλληλεπιδρά με τη Grip1 δεν φάνηκε στις μελέτες μας να προκαλεί αντίστοιχο φαινόμενο, φανερώνει ότι η Fras1 είναι η μοναδική πρωτεΐνη της οικογένειας Fras1/Frem που πιθανόν εμπλέκεται στον καθορισμό της κυτταρικής δομής.

ABSTRACT

Fras1, Frem1, Frem2 and Frem3, which comprise a group of four structurally correlated proteins, are the members of the Fras1/Frem extracellular matrix protein family. With the exception of Frem3, deficiency in the individual *Fras1/Frem* genes gives rise to the 'bleb' phenotype, the hallmark features of which are embryonic dermal-epidermal detachment and subsequent formation of sub-epidermal blisters, cryptophthalmos, syndactyly and renal defects.

Given Fras1/Frem structural similarities and related phenotypic defects caused by their deficiency, in the present study we concentrated on defining their localization profile during mouse embryogenesis, in order to examine if their analogous structural and functional characteristics are also reflected in their topology. Indeed, they all display a similar localization pattern in the basement membrane of all embryonic epithelia examined. Furthermore, Frem1 displayed an intracellular expression pattern in the periderm cells of the epidermis. In parallel experiments, Collagen VII, the deficiency of which results in postnatal, rather than embryonic dermal-epidermal detachment, is detected in the basal lamina of many embryonic epithelia at late embryonic stages, when Fras1/Frem levels decline. This fact led us to the interesting assumption that collagen VII compensates for the loss of Fras1/Frem in adult life and vice versa.

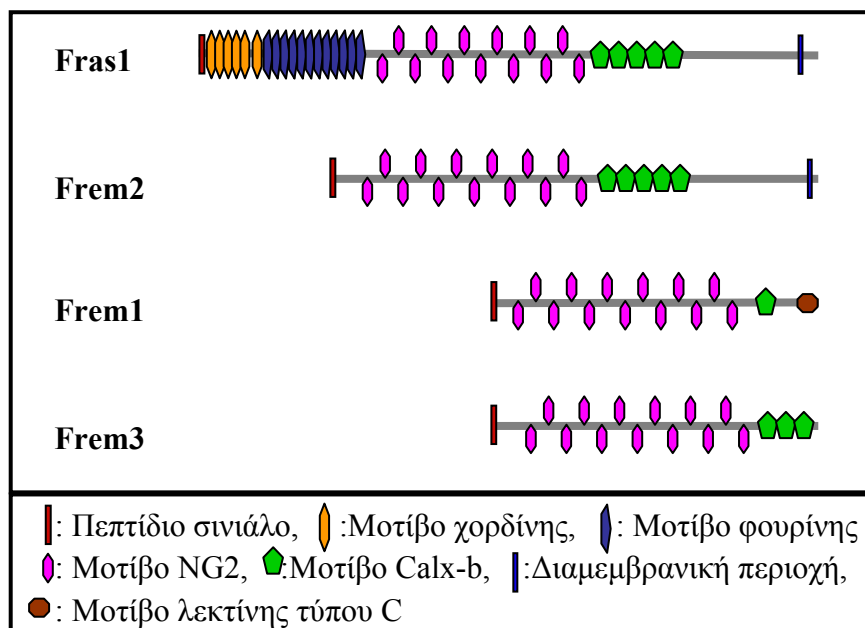
With a view to elucidate the function of a protein, its interactions with other proteins should be examined. *In vivo* observations of VEGF loss from epithelial basement membrane structures in *Fras1*^{-/-} embryos, urged us to examine a possible interaction between Fras1 and VEGF. In this study, for the first time we demonstrate that the first six chordin-type cysteine rich motifs of Fras1 can directly interact with VEGF and determined the regions that are essential for this interaction. For the requirements of this study, mIMCD polarised epithelial cells and the heterologous two hybrid system in *Saccharomyces cerevisiae* were utilized. Given the fact that VEGF plays an essential role in tumour progression, we determined Fras1/Frem localization profile in chemically induced epidermal tumours. The only member of Fras1/Frem protein family that was detected in the basement membrane of neoplastic epithelia and tumour blood vessels of the underlying connective tissue was Frem3 which, as shown by RNA in situ hybridization experiments, is expressed by tumourigenic epithelia.

Besides VEGF, Fras1 can also interact with the cytoplasmic protein Grip1, which targets Fras1 for secretion to the basolateral site of epithelia. Here we show that co-expression of Fras1 and Grip1 in eukaryotic cells results in endoplasmic reticulum reorganization. The ER aggregates at the points of Fras1/Grip1 co-localization. We studied this phenomenon utilizing specific intracellular markers and identified the regions of the two proteins that are causative for this ER relocation. Frem2, another member of the Fras1/Frem protein family, which has been shown to interact *in vitro* with Grip1, does not cause similar ER rearrangement. Thus, Fras1 appears to be the only Fras1/Frem member implicated so far in the modification of the cellular structure.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

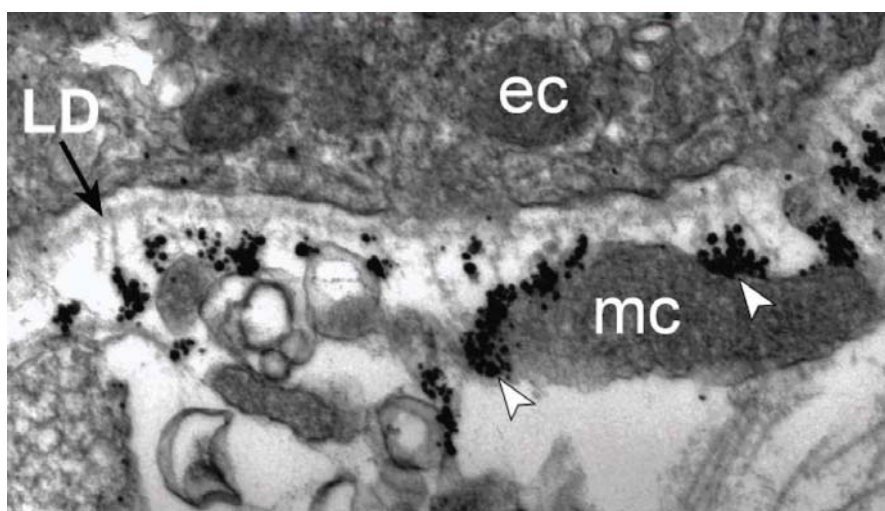
Α) Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Fras1/Frem

Η πρωτεΐνη Fras1 είναι το ιδρυτικό μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών Fras1/Frem, οι οποίες αποτελούν εξωκυττάρειες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη των εμβρυϊκών επιθηλίων του ποντικού και απαντώνται στους δευτεροστόμιους οργανισμούς (Petrou *et al.*, 2008). Τα μέλη της οικογένειας αυτής είναι τέσσερα: Η Fras1 (Fraser syndrome associated protein1), Η Frem1 (Fras1 Related Extracellular Matrix protein 1), η Frem2 (Fras1 Related Extracellular Matrix protein 2) και η Frem3 (Fras1 Related Extracellular Matrix protein 3). Οι πρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται τόσο από περιοχές ομολογίας μεταξύ τους, όσο και από χαρακτηριστικές για την κάθε πρωτεΐνη περιοχές. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό όλων των πρωτεϊνών της οικογένειας των Fras1/Frem είναι ότι όλες περιέχουν ένα πεπτίδιο σινιάλο για την στόχευσή τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μία περιοχή ομολογίας με την NG2 πρωτεογλυκάνη της θειικής χονδροϊτίνης και 1 (Frem1) έως 5 (Fras1, Frem2) μοτίβα πρόσδεσης ασβεστίου. Εκτός από τα κοινά χαρακτηριστικά τους, η Fras1 περιέχει πριν από την περιοχή ομολογίας με την θειική χονδροϊτίνη, 6 πρωτεϊνικά μοτίβα πλούσια σε κυστεΐνη παρόμοια με αυτά που απαντώνται στην περιοχή C του Von Willebrandt Factor και 13 μοτίβα κυστεϊνών παρόμοια με αυτά που συναντώνται στις πρωτεάσες φουρίνες (Vrontou *et al.*, 2003, McGregor *et al.*, 2003). Η Frem1 ή QBRICK (Kiyozumi *et al.*, 2005) περιέχει πριν από την περιοχή ομολογίας με τη θειική χονδροϊτίνη ένα μοτίβο RGD (αργινίνη, αλανίνη και ασπαραγίνη), το οποίο έχει βρεθεί ότι είναι υπεύθυνο για τη πρόσδεση ιντεγκρινών καθώς επίσης και μετά την περιοχή ομολογίας NG2, μια περιοχή λεκτίνης τύπου C (Smyth *et al.*, 2004). Επιπλέον από την οικογένεια αυτή μόνο οι Fras1 και Frem2 περιέχουν μία διαμεμβρανική περιοχή (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της οικογένειας των πρωτεϊνών Fras1/Frem.

Όπως προαναφέρθηκε, οι πρωτεΐνες Fras1/Frem εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη των εμβρυϊκών επιθηλίων του ποντικού, όπως αυτών της επιδερμίδας, του κεντρικού νευρικού συστήματος, των νεφρών, του εντέρου, του πνεύμονα και του οισοφάγου (Chiotaki *et al.*, 2007). Με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου βρέθηκε ότι όλες οι Fras1/Frem συνεντοπίζονται στην περιοχή της sublamina densa της βασικής μεμβράνης όπου και ασκούν τη δράση τους (Εικόνα 2). Πράγματι, βρέθηκε ότι στα μεταλλαγμένα στελέχη η αποκόλληση της επιδερμίδας από το συνδετικό ιστό λαμβάνει χώρα στην περιοχή της sublamina densa, γεγονός που συμφωνεί με την τοπολογία τους (Dalezios *et al.*, 2007; Petrou *et al.*, 2007). Οι Fras1 και Frem2 παράγονται από επιθήλια, ενώ οι Frem1 και η Frem3 από επιθηλιακά και μεσεγχυματικά κύτταρα. Οι πρωτεΐνες Fras1, Frem1 και Frem2 σχηματίζουν ένα σύμπλοκο στη βασική μεμβράνη, στη σταθεροποίηση του οποίου συμβάλλουν εξίσου και τα τρία συστατικά του. Η απώλεια έστω και μίας πρωτεΐνης οδηγεί στην αποσταθεροποίηση του συμπλόκου και απώλεια και των υπολοίπων. (Kiyozumi *et al.*, 2006; Petrou *et al.*, 2007). Ο εντοπισμός της Frem3 είναι ανεξάρτητος από το σύμπλοκο Fras1/Frem1/Frem2, καθώς αυτή συνεχίζει να εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη σε *Fras1*^{-/-} έμβρυα. (Petrou *et al.*, 2007).

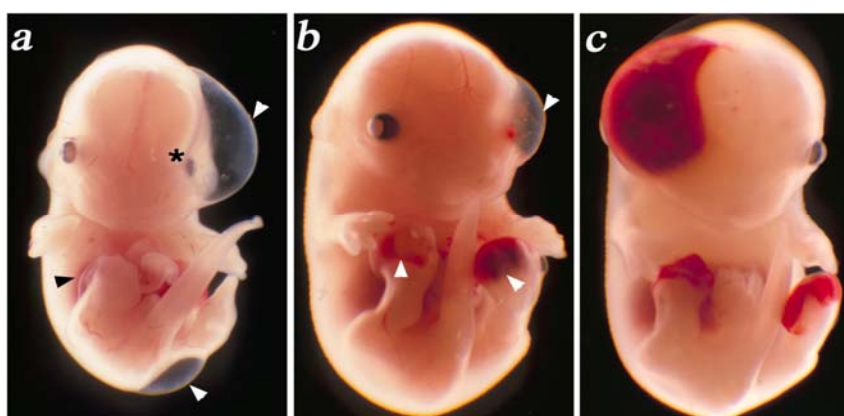


Εικόνα 2: Ηλεκτρονικός εντοπισμός της Fras1 στη sublamina densa της επιδερμίδας εμβρύου E14.5 (άσπρες κεφαλές βέλους). Συντομογραφίες: LD: lamina densa, EC: epithelial cell, MC: mesenchymal cell (Dalezios *et al.*, 2007).

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αντίθεση με τις υπόλοιπες Fras1/Frem, η Frem1 εντοπίζεται και ενδοκυτταρικά σε ορισμένους επιδερμικούς σχηματισμούς όπως τα περιδερμικά κύτταρα, τα οποία συμμετέχουν σε αναπτυξιακές διαδικασίες όπως η σύντηξη των βλεφάρων και των δακτύλων (Petrou *et al.*, 2007). Πρόσφατες μελέτες σε ενήλικα στάδια (Pavlakis *et al.*, 2008) κατέδειξαν ότι οι πρωτεΐνες Fras1, Frem2, Frem3 αλλά όχι η Frem1 συνεντοπίζονται στη βασική μεμβράνη της ουράς, ρύγχους, αρσενικών αναπαραγωγικών οργάνων, πελμάτων και αυτιών ενήλικων ποντικών. Η Frem3 εντοπίζεται επίσης στα ενήλικα στάδια στη βασική μεμβράνη της ραχιαίας

επιδερμίδας και στη βασική μεμβράνη των περισσότερων επιθηλίων όπως στα νεφρά, τους όρχεις, τον οισοφάγο, το έντερο και την τραχεία.

Οι *Fras1/Frem* παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομαλή ανάπτυξη του ποντικού καθώς μεταλλαγές στα γονίδια που τις κωδικοποιούν απαντώνται σε μία ομάδα από 5 στελέχη μεταλλαγμένων ποντικών, τα λεγόμενα 'bleb', τα οποία είχαν προκύψει από απενεργοποίηση των γονιδίων με τη μέθοδο της μεταλλαξιγένεσης με ακτινοβολία των ποντικών με ακτίνες X. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι οι *blebbed (bl)*, *eye blebs (eb)*, *myelencephalic bleb (my)*, *head blebs (heb)* και *fetal hematoma (fh)* (Darling and Gossler, 1994). Με την εξαίρεση της *Frem3*, που δεν έχει συσχετιστεί με κάποιο φαινότυπο, οι μεταλλαγές *blebbed*, *head blebs*, *myelencephalic blebs* οφείλονται σε μεταλλαγές των *Fras1*, *Frem1* και *Frem2*, αντίστοιχα (Mc Gregor *et al.*, 2003; Smyth *et al.*, 2004, Jadeja *et al.*, 2005). Το κύριο χαρακτηριστικό αυτών των μεταλλαγμάτων είναι η αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη κατά την ημέρα E11.5 κυρίως στην περιοχή της κεφαλής και των άκρων (ανασκόπηση από Short *et al.*, 2007). Η αποκόλληση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό πομφολυγών, οι οποίες κατά την ημέρα E12.5 γεμίζουν με αίμα, με αποτέλεσμα την αιμορραγία και το θάνατο του εμβρύου κατά την εμβρυϊκή ημέρα E14.5 (Vrontou *et al.*, 2003; Jadeja *et al.*, 2005; Timmer *et al.*, 2005) (Εικόνα 3). Ένα ποσοστό από τα μεταλλαγμένα ζώα καταφέρνει να επιβιώσει και να γεννηθεί, εμφανίζοντας, εντούτοις, σημαντικές αναπτυξιακές διαταραχές, όπως συνδακτυλία, συγχώνευση των βλεφάρων (κρυπτοφθαλμία), και διαταραχές στην ανάπτυξη των νεφρών, όπως νεφρική αγενεσία ή υποπλασία του ενός ή και των δύο νεφρών, λόγω διαταραχών στις επιθηλιομεσεγχευματικές αλληλεπιδράσεις στην περιοχή του ουρητήρα κατά το σχηματισμό του μετανεφρού (ανασκόπηση από Smyth and Scambler, 2005). Επιπλέον, παρατηρούνται και προβλήματα στη συγχώνευση των λοβών του πνεύμονα τόσο στα *Fras1*^{-/-}, *Frem2*^{-/-}, όχι όμως στα *Frem1*^{-/-} ζώα (Petrou *et al.*, 2005).

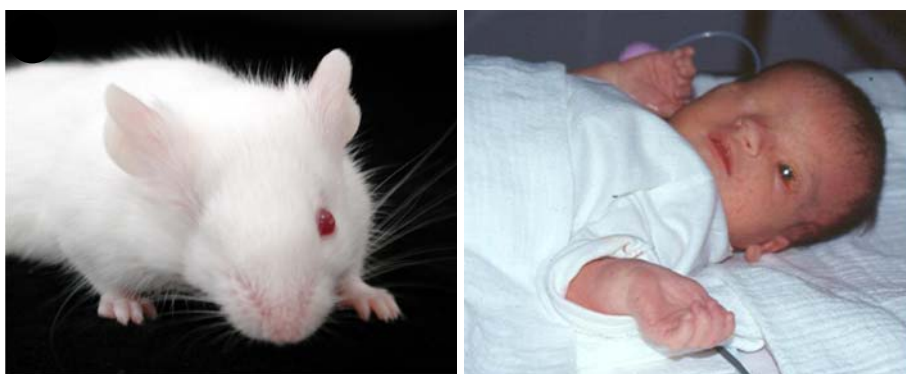


Εικόνα 3: Σχηματισμός υπο-επιδερμικών πομφολυγών στα *Fras1*^{-/-} έμβρυα. Η αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα λαμβάνει χώρα κατά την ημέρα E11.5 (a). Οι πομφόλυγες κατά την ημέρα E12.5 καθίστανται αιμορραγικές (b) με αποτέλεσμα το θάνατο κατά την E14.5 πιθανόν λόγω αιμορραγίας (c) (Vrontou *et al.*, 2003).

Η μεταλλαγή *eye blebs* σχετίζεται με το γονίδιο που κωδικοποιεί την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Grip1 (Glutamate Receptor Interacting Protein 1), μία

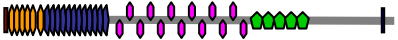



πρωτεΐνη με 7 PDZ επικράτειες, που συνδέεται λειτουργικά με τις πρωτεΐνες Fras1 και Frem2. Η Grip1 αλληλεπιδρά με τα τελευταία καρβοξυτελικά αμινοξέα της Fras1 και Frem2 που προεξέχουν στο κυτταρόπλασμα και τις στοχεύει στη βασικοπλευρική επιφάνεια των κυττάρων (Takamiya *et al.*, 2004). Μάλιστα, η αλληλεπίδραση με τη Fras1 εξαρτάται από τις δύο πρώτες PDZ περιοχές της Grip1 (Long *et al.*, 2008). Αρχικά, η Grip1 έγινε γνωστή για το ρόλο της στο νευρικό σύστημα και την αλληλεπίδρασή της με το καρβοξυτελικό άκρο των υποδοχέων AMPA και τη στόχευσή τους στο συναπτικό χώρο. Αποτελεί μία πρωτεΐνη 130 kD που απαντάται άφθονη στον εγκέφαλο, με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στο φλοιό, ιππόκαμπο και οσφρητικό λωβό (Dong *et al.*, 1999). Η απενεργοποίησή της στον ποντικό οδήγησε στην αποκόλληση της επιδερμίδας και δερμίδας (Bladt *et al.*, 2002; Takamiya *et al.*, 2004) με αποτέλεσμα να αποκαλυφθεί και ο ρόλος της στη δερμοεπιδερμική ένωση μέσω της αλληλεπίδρασής της με τις Fras1 και Frem2.

Αντίστοιχα προβλήματα με τα μεταλλαγμένα ποντίκια εμφανίζουν και άνθρωποι οι οποίοι πάσχουν από το σύνδρομο Fraser, μία αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομική διαταραχή. Οι ασθενείς που πάσχουν από το σύνδρομο Fraser συνήθως εμφανίζουν παρόμοιες ανωμαλίες, όπως κρυπτοφθαλμία (συγχώνευση των βλεφάρων), συνδακτυλίες, νεφρική αγενεσία και ποικίλες άλλες ανωμαλίες όπως προβλήματα στα γεννητικά όργανα, στην καρδιά και στον πνεύμονα (Slavotinek and Tiffit, 2002). Ένα μεγάλο ποσοστό των πασχόντων πεθαίνουν μέχρι το πρώτο έτος της ζωής τους συχνά λόγω αναπνευστικών και νεφρικών διαταραχών. Η πρόταση που έγινε από τον Robin Winter το 1990 (Winter RM, 1990) ήταν ότι η ομάδα των *bleb* μεταλλαγμάτων αποτελεί το ζωικό μοντέλο για το ανθρώπινο σύνδρομο Fraser (Εικόνα 4). Πράγματι, μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στα ανθρώπινα γονίδια FRAS1 (McGregor *et al.*, 2003) και FREM2 (Jadeja *et al.*, 2005) σε ανθρώπους που πάσχουν από το σύνδρομο αυτό.



Εικόνα 4: Φαινοτυπικές ομοιότητες μεταξύ μεταλλαγμένων *Fras1*^{-/-} ποντικών και ανθρώπων με σύνδρομο Fraser (Vrontou *et al.*, 2003; Smyth *et al.*, 2007).

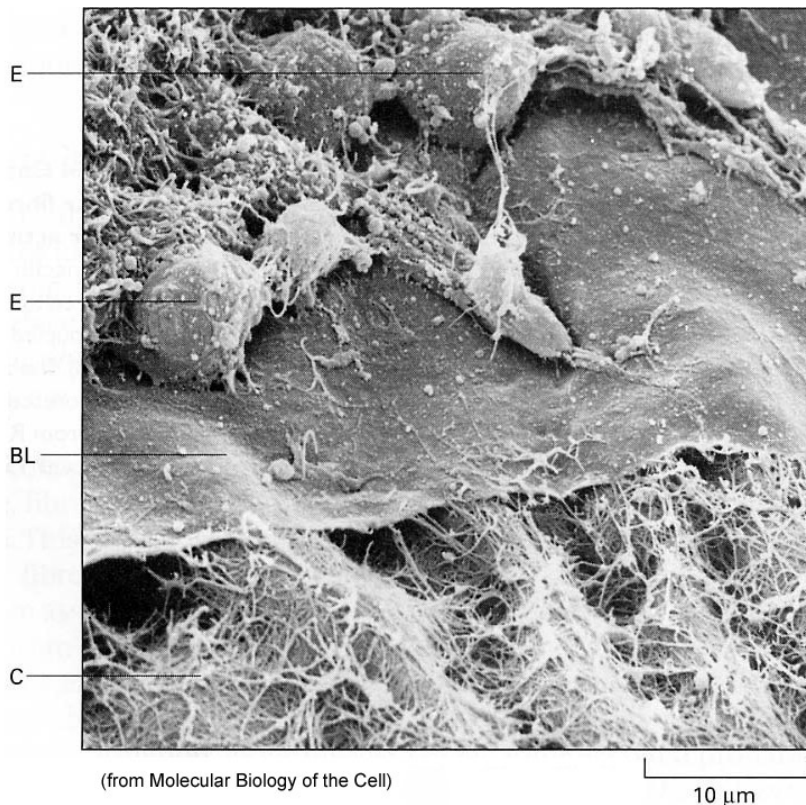
Στην Εικόνα 5 παρουσιάζεται η δομή των Fras1/Frem, το μέγεθός τους, ο χρωμοσωμικός εντοπισμός τους στον άνθρωπο και τον ποντικό και οι παθολογικές καταστάσεις στις οποίες συμμετέχουν.

	Protein	Protein aa	Mouse chromosome	Human chromosome	Mouse mutant	Human syndrome
Fras1		4.010	5E3	4q21.21	blebbed (bl)	Fraser
Frem2		3.160	3C	13q13.3	myelencephalic bleb (my)	Fraser
Frem1		2.191	4C3	9p22.3	head bleb (heb)	-
Frem3		2.127	8C2	4q31.21	-	-

Εικόνα 5: Η δομή και το μέγεθος των Fras1/Frem, οι θέσεις τους στο γονιδίωμα του ανθρώπου και του ποντικού και οι παθολογικές καταστάσεις στις οποίες συμμετέχουν.

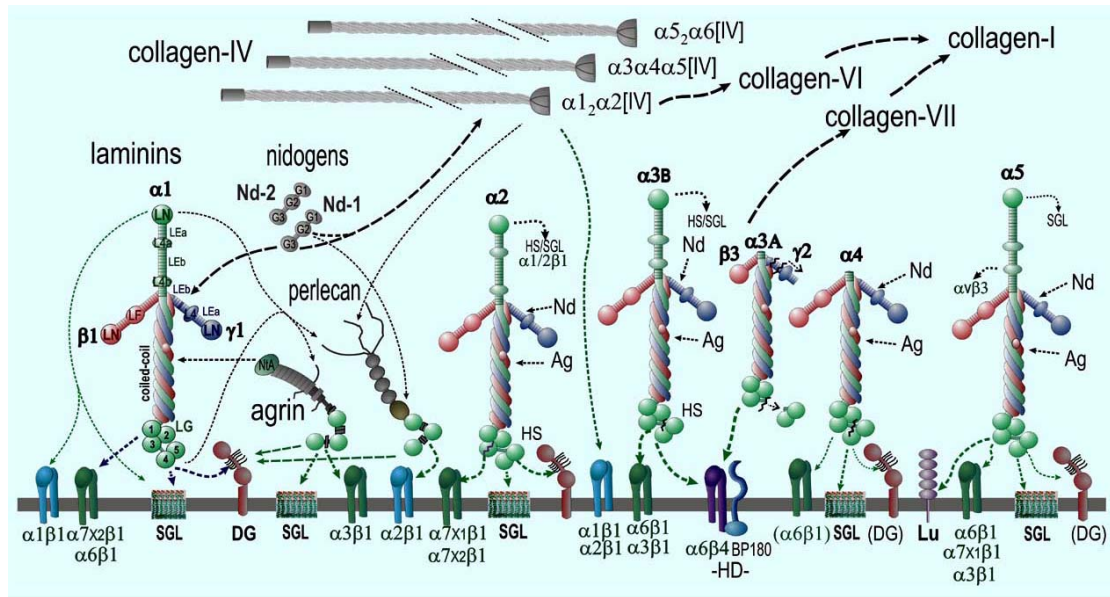
B) Η ΒΑΣΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Η βασική μεμβράνη είναι μία εύκαμπτη, λεπτή δομή της εξωκυττάριας ύλης η οποία εντοπίζεται κάτω από τη βασική πλευρά κάθε επιθηλιακής στιβάδας, περιβάλλει το ενδοθηλιακό στρώμα, όπως επίσης και συγκεκριμένες κατηγορίες κυττάρων, όπως τα μυϊκά κύτταρα, τα λιπώδη κύτταρα και τα κύτταρα Schwann (όπου περιβάλλει τους άξονες των περιφερικών νεύρων σχηματίζοντας τη μυελίνη). Η βασική μεμβράνη διαχωρίζει αυτά τα κύτταρα από τον υποκείμενο ή περιβάλλοντα συνδετικό ιστό (Εικόνα 6) και συντίθεται κυρίως από τα κύτταρα υπό τα οποία εντοπίζεται. Αποτελεί έναν φραγμό για την διέλευση των διαφόρων μορίων και ελέγχει την κυτταρική οργάνωση και διαφοροποίηση μέσω των αλληλεπιδράσεών της με τους κυτταρικούς υποδοχείς.

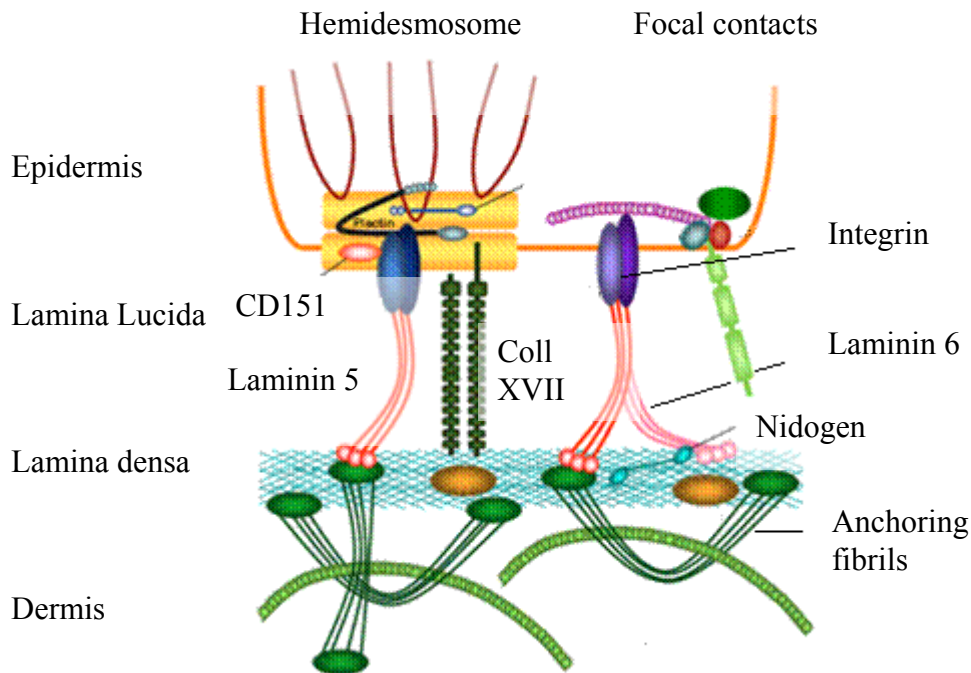


Εικόνα 6: Η βασική μεμβράνη (BL) αποτελεί ένα λεπτό στρώμα εξωκυττάριας ύλης που διαχωρίζει τα επιθηλιακά κύτταρα (E) από τον υποκείμενο συνδετικό ιστό (C).

Παρόλο που η σύστασή της ποικίλλει από ιστό σε ιστό και συχνά από περιοχή σε περιοχή, η βασική μεμβράνη περιέχει κολλαγόνο τύπου IV, την μεγάλη πρωτεογλυκάνη θεικής ηπαρίνης περλεκάνη, και τις γλυκοπρωτεΐνες λαμινίνη και νιδογόνο (Liddington RC, 2001; Yurchenco and Patton, 2009). Τα μόρια αυτά μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με άλλα μόρια όπως η αγκρίνη και συστατικά της κυτταρικής επιφάνειας, όπως οι ιντεγκρίνες, η δυστρογλυκάνη και η πρωτεΐνη BP180 (Bullous Pemphigoid Antigen) σχηματίζοντας εκτεταμένα δίκτυα (Εικόνα 7). Με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, η βασική μεμβράνη διακρίνεται σε τρεις σχηματισμούς: Τη lamina lucida (φωτεινός υμένας) που αντιπροσωπεύει μία ηλεκτρονικά διαυγή ζώνη, τη lamina densa (σκοτεινός υμένας) που είναι μία σκοτεινή ζώνη ηλεκτρονικά πυκνής δομής που υπόκειται της lamina lucida και τη sublamina densa ή lamina fibroreticularis, η οποία συνδέει την lamina densa με τον υποκείμενο συνδετικό ιστό με τη βοήθεια πρωτεϊνών όπως το κολλαγόνο VII, που σχηματίζει χαρακτηριστικούς σχηματισμούς, τα ινίδια αγκυροβόλησης (Εικόνα 8) (Miosge N, 2001).



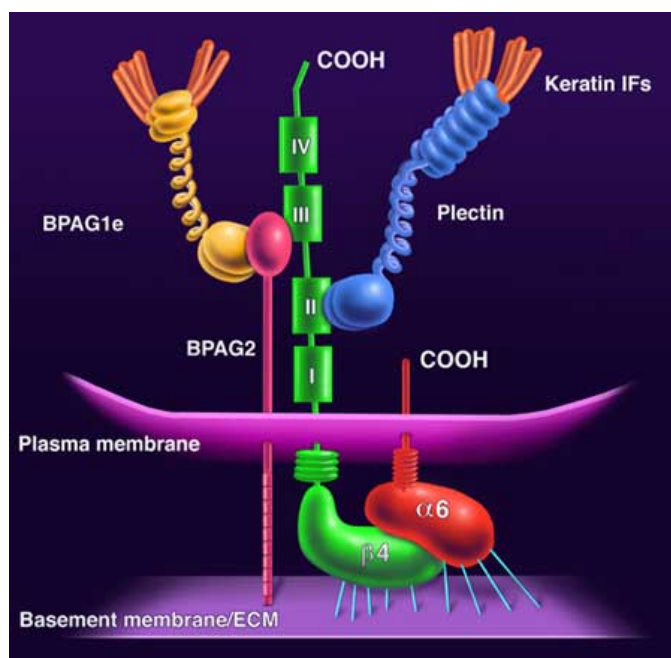
Εικόνα 7: Η βασική μεμβράνη χαρακτηρίζεται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λαμινινών και άλλων συστατικών της. Πολλές πρωτεολυτικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα ρυθμίζοντας τη δράση τους (παράλληλες γραμμές). Τα κολλαγόνα τύπου IV είναι ετεροτριμερή που αποτελούνται συνήθως από τις αλυσίδες $\alpha 1\alpha 2$. Επιπλέον απεικονίζονται και άλλα συστατικά της εξωκυττάριας ύλης όπως τα νιδογόνα (Nd1, Nd2) και οι πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης αγκρίνη (Ag) και περλεκάνη (perl). Οι κύριες αλληλεπιδράσεις απεικονίζονται με έντονα διακεκομμένα βέλη ενώ οι δευτερεύουσες με λεπτά διακεκομμένα βέλη. Οι αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα ανάμεσα στα δομικά συστατικά (μαύρες γραμμές) με τα συστατικά της κυτταρικής επιφάνειας (πράσινες γραμμές για ιντεγκρίνες, την Ν-δυστρογλυκάνη (NDG), την ημιδεσμοσωμική BP180, τα θειονυλιωμένα γλυκολιπίδια (SGL) και το αντιγόνου Lu) (Yurchenco and Patton, 2009).



Εικόνα 8: Κάτω από τα επιθηλιακά κύτταρα διαμορφώνεται η βασική μεμβράνη, η οποία διακρίνεται σε δύο περιοχές, τη lamina lucida (διαυγής) και lamina densa (σκοτεινή). Τα επιθηλιακά

κύτταρα συνδέονται με τη lamina lucida μέσω των ημιδεσμοσωμάτων και των εστιακών επαφών. Η lamina lucida περιλαμβάνει πρωτεΐνες, όπως η λαμινίνη 5, 6 και το κολλαγόνο XVII. Η lamina densa περιλαμβάνει την περλεκάνη και το νιδογόνο. Στην περιοχή της sublamina densa απαντώνται τα ινίδια και πλάκες αγκυροβόλησης με κύριο συστατικό το κολλαγόνο τύπου VII (<http://www.oulu.fi/iho/project2.html>).

Η lamina lucida των επιδερμικών επιθηλίων έρχεται σε επαφή με τη βασική περιοχή των βασικών κερατινοκυττάρων. Στη βασική περιοχή αυτή παρατηρούνται ηλεκτρονιακά πυκνοί σχηματισμοί που ονομάζονται ημιδεσμοσώματα. Η κυτταροπλασματική πλάκα προσκόλλησης των ημιδεσμοσωμάτων διακρίνεται στην εσωτερική και την εξωτερική. Η εξωτερική εντοπίζεται πάνω στην κυτταρική μεμβράνη και περιέχει συστατικά όπως οι εξωκυττάριες περιοχές των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ιντεγκρινών $\alpha\beta 4$ και του κολλαγόνου XVII (BPAG2 ή BP180 bullous pemphigoid antigen). Οι υποδοχείς αυτοί αλληλεπιδρούν με διάφορα συστατικά της βασικής μεμβράνης. Η εσωτερική πλάκα του ημιδεσμοσώματος συνίσταται από τα ενδιάμεσα ινίδια κερατίνης του κυτταροσκελετού και τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες με τις οποίες προσδέονται, όπως την πλεκτίνη και την BPAG1 ή BP230- bullous pemphigoid antigen 1, με τις οποίες αλληλεπιδρούν η ιντεγκρίνη $\alpha\beta 4$ και το κολλαγόνο XVII αντίστοιχα στο εσωτερικό του κυττάρου. Με τον τρόπο αυτόν σχηματίζεται μία γέφυρα μεταξύ των ινιδίων κερατίνης του κυτταροσκελετού και των διαμεμβρανικών υποδοχέων των ημιδεσμοσωμάτων (Legan *et al.*, 1992; McMillan *et al.*, 1996). Η τυπική δομή ενός ημιδεσμοσώματος παρουσιάζεται στην Εικόνα 9.



Εικόνα 9: Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη δομή του ημιδεσμοσώματος. Η σύνδεση του επιθηλιακού κυττάρου με τη βασική μεμβράνη πραγματοποιείται από τις εξωκυττάριες περιοχές των ιντεγκρινών $\alpha\beta 4$ και του BPAG2, οι οποίες συνδέονται ενδοκυτταρικά με την πλεκτίνη, τις κερατίνες και το BPAG1 (<http://www.rockefeller.edu/labheads/fuchs/researchEpidermal.php>).

Η βασική μεμβράνη επιτελεί πολλές και σημαντικές λειτουργίες στον οργανισμό. Εκτός από το δομικό/στηρικτικό της ρόλο, μπορεί να έχει και άλλες λειτουργίες που αφορούν την κυτταρική πολικότητα, τον κυτταρικό μεταβολισμό, την επιβίωση και διαφοροποίηση καθώς και την κυτταρική μετανάστευση. Για παράδειγμα, στα νεφρικά σπειράματα των νεφρών, η βασική μεμβράνη αποτελεί φίλτρο για τη διέλευση διαφόρων μορίων από το αίμα στα ούρα καθώς αυτά σχηματίζονται. Βλάβες της οδηγούν σε απώλεια της ικανότητας φιλτραρίσματος των νεφρικών σπειραμάτων (Yoshikawa et al., 2005).

Αποτελεί ένα φυσικό φραγμό στη μετακίνηση των κυττάρων και εμποδίζει τους ινοβλάστες να έρθουν σε επαφή με τα επιθηλιακά κύτταρα. Εντούτοις, δεν εμποδίζει τα μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα, ή τις νευρικές απολήξεις να τη διαπεράσουν. Επίσης, συμμετέχει στην αναγέννηση των ιστών μετά από πιθανό τραυματισμό. Όταν οι ιστοί, όπως οι μύες, τα νεύρα και τα επιθήλια υποστούν τραυματισμό, η βασική μεμβράνη παρέχει τη «σκαλωσιά» πάνω στην οποία μετακινούνται τα διαιρούμενα κύτταρα, με αποτέλεσμα τη διατήρηση της αρχικής αρχιτεκτονικής του ιστού. Η μελέτη της νευρομυϊκής σύναψης (περιοχή επαφής ενός κινητικού νευρώνα με ένα σκελετικό μυ) φανερώνει τη σημασία της βασικής μεμβράνης στην αναδιοργάνωση του ιστού έπειτα από τραύμα. Η βασική μεμβράνη στην περιοχή αυτή εμφανίζει μία ιδιαίτερη χημική σύσταση περιέχοντας ειδικές ισομορφές του κολλαγόνου IV, της λαμνίνης και μίας πρωτεογλυκάνης θειικής ηπαρίνης, την αγκρίνη (Oldfors and Fardeu, 1983).

Τέλος, παγιδεύει μία πληθώρα αυξητικών παραγόντων, μορφογενετικών μορίων, ορμονών και γενικότερα σηματοδοτικών μορίων και επηρεάζει εκτός από φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες, όπως την καρκινική μετάσταση, καθώς η αποικοδόμησή της αποτελεί κύριο γεγονός για την έναρξη της μεταστατικής διαδικασίας (Liotta LA, 1984).

B1) ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΒΑΣΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

B1α) Τα κολλαγόνα τύπου IV και VII

Γενικά, τα κολλαγόνα συνιστούν μία οικογένεια ινωδών πρωτεϊνών που απαντώνται σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς, με σημαντικό ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση, καρκίνο, αγγειογένεση και μορφογένεση. Εκκρίνονται από κύτταρα του συνδετικού ιστού καθώς και από άλλους τύπους κυττάρων. Αποτελούν το κύριο συστατικό του δέρματος και των οστών και είναι η πιο άφθονη οικογένεια πρωτεϊνών στα θηλαστικά, αποτελώντας το 25% της μάζας τους. Το κύριο χαρακτηριστικό όλων των κολλαγόνων είναι ότι σχηματίζουν τριπλές α έλικες, (πολυπεπτιδικές αλυσίδες κολλαγόνου) οι οποίες είναι πλούσιες σε προλίνη και γλυκίνη. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 25 α έλικες κολλαγόνου, καθεμία από τις οποίες κωδικοποιείται από διαφορετικά γονίδια. Σε κάθε ιστό απαντάμε διαφορετικούς συνδυασμούς α ελίκων που συγκροτούν τους διαφορετικούς τύπους κολλαγόνου (Myllyharju and Kivirikko, 2001). Μέχρι σήμερα είναι γνωστοί

τουλάχιστον 28 τύποι, από τους οποίους οι κυριότεροι που απαντώνται στους συνδετικούς ιστούς είναι το κολλαγόνο τύπου I, II, III, V και XI. Ο πιο συνηθισμένος τύπος στο δέρμα και στα οστά είναι ο I (Kadler *et al.*, 2007). Συνοπτικά, όλοι οι τύποι κολλαγόνου παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Οι δύο τύποι κολλαγόνου που συμμετέχουν στη δομή της βασικής μεμβράνης είναι το κολλαγόνο τύπου IV και το κολλαγόνο τύπου VII. Το κολλαγόνο τύπου IV εμφανίζει πολλές ισομορφές, οι οποίες είναι πολύ εύκαμπτες. Η τριπλή τους έλικα διακόπτεται σε 26 περιοχές, επιτρέποντας πολλαπλές κυρτώσεις. Δεν πρωτεολύονται μετά την έκκρισή τους, αλλά αλληλεπιδρούν με σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μέσω των μη πρωτεολυμένων, μη κολλαγονωδών περιοχών τους στα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα τους και σχηματίζουν ένα δίκτυο, αποτελώντας το βασικό συστατικό της βασικής μεμβράνης στα σπονδυλωτά και στα ασπόνδυλα. Στα θηλαστικά εντοπίζονται 6 αλυσίδες α , εκ των οποίων οι $\alpha 1$ και $\alpha 2$ εκφράζονται σε έμβρυα και ενήλικα άτομα, ενώ οι $\alpha 3$ και $\alpha 6$ σε συγκεκριμένες δομές. Στη βασική μεμβράνη των νεφρικών σπειραμάτων οι αλυσίδες $\alpha 1$ και $\alpha 2$ αντικαθίστανται από τις $\alpha 3$ και $\alpha 5$. Στην περίπτωση απενεργοποίησης της αλυσίδας $\alpha 3$ του κολλαγόνου IV στον ποντικό παρατηρείται νεφρικός φαινότυπος καθώς αλλοιώνεται η σύσταση της βασικής μεμβράνης των νεφρικών σπειραμάτων λόγω έλλειψης των αλυσίδων $\alpha 4$ και $\alpha 5$ με τις οποίες αλληλεπιδρά η $\alpha 3$ και άλλες διαφοροποιήσεις στη σύστασή τους, με αποτέλεσμα τη διάρρηξη του σπειραματικού φίλτρου (Miner and Sanes, 1996).

Το κολλαγόνο τύπου VII είναι μία μακριά πρωτεΐνη, μήκους 426 nm και αποτελεί το κύριο συστατικό των ινιδίων αγκυροβόλησης, που εκτείνονται από τη *sublamina densa* της βασικής μεμβράνης στην άνω περιοχή της δερμίδας, συντελώντας στη σταθεροποίηση της σύνδεσης της επιδερμίδας και της δερμίδας. Όπως όλα τα κολλαγόνα, αποτελείται από 3 πολυπεπτιδικές αλυσίδες $[\alpha(\text{VII})]_3$. Το κεντρικό τμήμα του τριμερούς αποτελείται από ένα κολλαγονώδες τμήμα με επαναλαμβανόμενα Gly-Xaa-Yaa αμινοξέα που διακόπτεται από ατέλειες όπως μία αλληλουχία 39 αμινοξέων (αρμός) στη μέση της κολλαγονώδους αλληλουχίας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η τριπλή έλικά του να διακρίνεται σε 2 τμήματα, τις κολλαγονώδεις περιοχές 1 και 2 ίδιου μεγέθους. Οι κολλαγονώδεις περιοχές διαχωρίζονται με μία (145 KDa) μη κολλαγονώδη αμινοτελική σφαιρική περιοχή (NC1) και μία μικρότερη (20KDa) σφαιρική καρβοξυτελική περιοχή (NC2). Το κολλαγόνο VII συντίθεται κυρίως από επιδερμικά κερατινοκύτταρα αλλά και ινοβλάστες, σε μικρότερο βαθμό. Μετά την έκκριση, το τμήμα NC2 απομακρύνεται πρωτεολυτικά και ενδομοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί σταθεροποιούν το μόριο. Ένας μεγάλος αριθμός διμερών κολλαγόνου VII ενώνονται σε ινίδια αγκυροβόλησης. Δύο

Collagen type	Classification	Distribution/remarks
I	Fibril-forming	Non-cartilaginous connective tissues – e.g. tendon, ligament, cornea, bone, annulus fibrosis, skin
II	Fibril-forming	Cartilage, vitreous humour and nucleus pulposus
III	Fibril-forming	Co-distributes with collagen I, especially in embryonic skin and hollow organs
IV	Network-forming	Basement membranes
V	Fibril-forming	Co-distributes with collagen I, especially in embryonic tissues and in cornea
VI	Beaded-filament-forming	Widespread, especially muscle
VII	Anchoring fibrils	Dermal-epidermal junction
VIII	Network-forming	Descemet's membrane
IX	FACIT	Co-distributes with collagen II, especially in cartilage and vitreous humour
X	Network-forming	Hypertrophic cartilage
XI	Fibril-forming	Co-distributes with collagen II
XII	FACIT	Found with collagen I
XIII	Transmembrane	Neuromuscular junctions, skin
XIV	FACIT	Found with collagen I
XV	Endostatins	Located between collagen fibrils that are close to basement membranes; found in the eye, muscle and microvessels; a close structural homologue of collagen XVIII
XVI	FACIT	Integrated into collagen fibrils and fibrillin-1 microfibrils
XVII	Transmembrane	Also known as the bullous pemphigoid antigen 2/BP180; localised to epithelia; an epithelial adhesion molecule; ectodomain cleaved by ADAM proteinases
XVIII	Endostatins	Associated with basement membranes; endostatin is proteolytically released from the C-terminus of collagen XVIII; important for retinal vasculogenesis
XIX	FACIT	Rare; localised to basement membrane zones; contributes to muscle physiology and differentiation
XX	FACIT	Widespread distribution, most prevalent in corneal epithelium
XXI	FACIT	Widespread distribution
XXII	FACIT	Localised at tissue junctions – e.g. myotendinous junction, cartilage-synovial fluid, hair follicle-dermis
XXIII	Transmembrane	Limited tissue distribution; exists as a transmembrane and shed form
XXIV	Fibril-forming	Shares sequence homology with the fibril-forming collagens; has minor interruptions in the triple helix; selective expression in developing cornea and bone

XXV	Transmembrane	CLAC-P – precursor protein for CLAC (collagenous Alzheimer amyloid plaque component)
XXVI	Beaded-filament forming	Also known as EMI domain-containing protein 2, protein Emu2, Emilin and multimerin domain-containing protein 2
XXVII	Fibril-forming	Shares sequence homology with the fibril-forming collagens; has minor interruptions in the triple helix; found in embryonic cartilage, developing dermis, cornea, inner limiting membrane of the retina and major arteries of the heart; restricted to cartilage in adults; found in fibrillar-like assemblies
XXVIII	Beaded-filament forming	A component of the basement membrane around Schwann cells; a von Willebrand factor A domain-containing protein with numerous interruptions in the triple helical domain
Ectodysplasin A	Transmembrane	Ectoderm
Gliomedin	Transmembrane	Myelinating Schwann cells

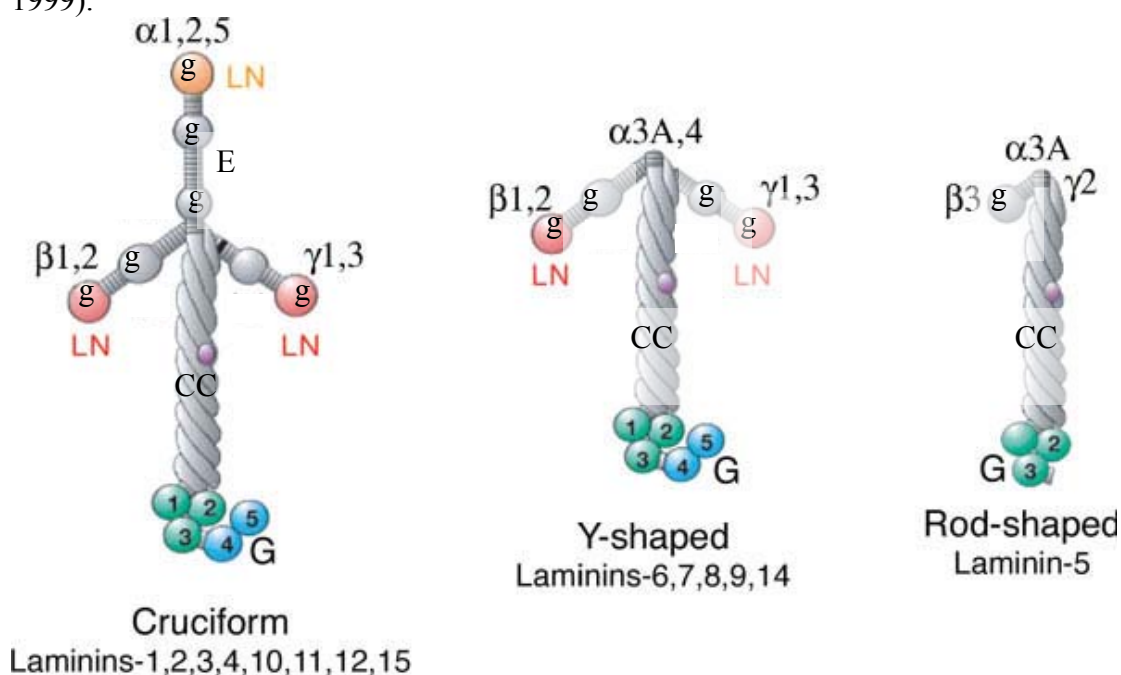
Πίνακας 1. Τα διαφορετικά είδη κολλαγόνου και ο εντοπισμός τους στον οργανισμό (Kadler *et al.*, 2007).

μόρια κολλαγόνου VII σχηματίζουν ένα αντιπαράλληλο διμερές και στη συνέχεια τα διμερή συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζουν το ινίδιο αγκυροβόλησης, μήκους 785 nm (Sakai LY, 1986; Keene *et al.*, 1987). Η έλλειψη του κολλαγόνου VII στον άνθρωπο οδηγεί σε μία ασθένεια γνωστή ως δυστροφική πομφολυγώδη επιδερμόλυση (Dystrophic Epidermolysis Bullosa, DEB) που οδηγεί σε αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα στο επίπεδο της sublamina densa, λόγω καταστροφής των ινιδίων αγκυροβόλησης, των οποίων αποτελεί το μείζον συστατικό (Bruckner-Tuderman L, 1999). Πράγματι, η απενεργοποίηση του γονιδίου αυτού στον ποντικό οδηγεί σε παρόμοιο φαινότυπο (Heinonen *et al.*, 1999).

B1β) Λαμίνες

Νωρίς κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, οι βασική μεμβράνη περιέχει ελάχιστο κολλαγόνο IV και πολλά μόρια λαμινίνης. Η λαμινίνη είναι μία μεγάλη ελαστική πρωτεΐνη που συντίθεται από τρεις πολύ μακριές πολυπεπτιδικές αλυσίδες (α, β, γ) που συδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς σε μία δομή με σχήμα ασύμμετρου σταυρού, σχήματος Y ή ραβδοειδές (Εικόνα 10). Υπάρχουν πολλές διαφορετικές ισομορφές των αλυσίδων (όπως α1, α2, α3 κτλ) οι οποίες έχουν διαφορετικό βαθμό ομολογίας μεταξύ τους. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 5 α, 4 β και 3 γ γονίδια στα σπονδυλωτά και οι αλυσίδες που κωδικοποιούνται μπορούν να σχηματίσουν 15 ετεροτριμερή που σχηματίζουν τη μεγάλη οικογένεια των λαμινινών. Οι αλυσίδες α

έχουν 3 σφαιρικές επικράτειες στο αμινοτελικό τους άκρο που διαχωρίζονται με μοτίβα παρόμοια με αυτά του αυξητικού παράγοντα EGF (EGF-like). Περιέχουν επίσης και μία υπερελικωμένη (coiled-coil) επικράτεια και μία μεγάλη σφαιρική επικράτεια (G) στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Οι β και γ αλυσίδες είναι μικρότερες από τις α, και περιέχουν μόνο 2 σφαιρικές επικράτειες και EGF μοτίβα στο αμινοτελικό τους άκρο, ενώ δεν έχουν τη μεγάλη σφαιρική επικράτεια στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Το πλήρες μόριο της λαμινίνης σχηματίζεται με αλληλεπίδραση των καρβοξυτελικών άκρων των αλυσίδων. Δισουλφιδικοί δεσμοί συνδέουν τις αλυσίδες κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο, ενώ το αμινοτελικό παραμένει ελεύθερο προσδίδοντας στη λαμινίνη τη χαρακτηριστική της μορφή (Aumailley *et al.*, 1999).



Εικόνα 10: Αναπαράσταση των τριών τύπων ετεροτριμερών λαμινίνης. Η κλασσική μορφή ασύμμετρου σταυρού είναι η πιο επικρατής ανάμεσα στις λαμινίνες. Αυτά τα τριμερή περιέχουν αμινοτελικές περιοχές (LN), με σφαιρικές επικράτειες (g) που διαχωρίζονται από EGF-like μοτίβα (E), που τους επιτρέπουν να πολυμερίζονται σε δίκτυα. Η σχήματος Y λαμινίνη δεν πολυμερίζεται, ενώ η ραβδόμορφη συμβάλλει στη συγκρότηση των ημιδεσμοσωμάτων. Στο καρβοξυτελικό άκρο τους περιέχουν μία υπερελικωμένη περιοχή (CC) και μία σφαιρική περιοχή (G) με εσωτερικά μοτίβα επαναλήψεων (Hallmann *et al.*, 2005).

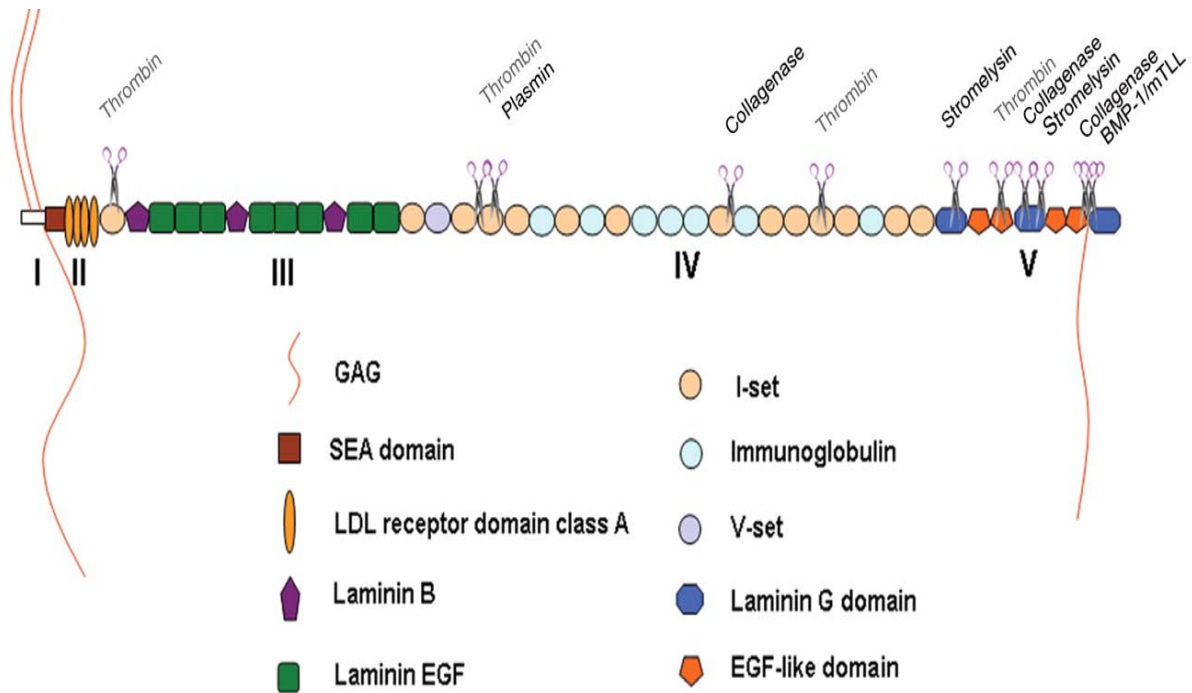
Ο ρόλος τους στη βασική μεμβράνη είναι δομικός και λειτουργικός. Με την ικανότητά τους να προσδένουν άλλα μόρια της βασικής μεμβράνης όπως περλεκάνη, νιδογόνο καθώς και υποδοχείς λαμινίνης στην επιφάνεια των κυττάρων, παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό και την οργάνωση της βασικής μεμβράνης. Στην υπόθεση αυτή συντελεί το γεγονός ότι η λαμινίνη 1 και 10 είναι τα πρώτα μόρια της εξωκυττάριας ύλης που συντίθενται κατά την εμβρυογένεση, πριν από τη γαστριδίωση κατά την E7.0. Διπλή απενεργοποίηση τους οδηγεί σε εμβρυϊκό θάνατο κατά την ημέρα E5.5 λόγω έλλειψης των πρώιμων βασικών μεμβρανών στο έμβρυο, όπως η μεμβράνη του Reichert (Miner J, 2008). Οι λαμινίνες έχουν την ικανότητα να

πολυμερίζονται καθώς είναι προσδεμένες σε κυτταρικούς υποδοχείς. Μία σημαντική κατηγορία αυτών των υποδοχέων είναι οι ιντεγκρίνες και η διαμεμβρανική πρωτεΐνη δυστρογλυκάνη.

Η λαμινίνη 5 είναι ένα βασικό συστατικό της βασικής μεμβράνης, αποτελείται από $\alpha 3$, $\beta 3$ και $\gamma 2$ αλυσίδες και έχει μήκος 100nm. Συνδέεται με την ιντεγκρίνη $\alpha 6 \beta 4$ μέσω μίας σφαιρικής περιοχής του καρβοξυτελικού άκρου της $\alpha 3$ αλυσίδας της. Επίσης προσδένει την NC-1 περιοχή του κολλαγόνου τύπου VII. Με τον τρόπο αυτόν συνδέει τα ημιδεσμοσώματα με τα ινίδια αγκυροβόλησης. Στον άνθρωπο, μεταλλάξεις στη λαμινίνη 5 προκαλούν συνδεσμική πομφολυγώδη επιδερμόλυση (Junctional Epidermolysis Bullosa, JEB), μία σοβαρή θανατηφόρο ασθένεια αποκόλλησης της επιδερμίδας από τη δερμίδα. Γενικά, μεταλλάξεις στα γονίδια της λαμινίνης οδηγούν σε πολλές αναπτυξιακές διαταραχές. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *Lama2* οδηγεί σε μυϊκή δυστροφία λόγω αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης των μυοϊνιδίων (Di Blasi *et al.*, 2005) και του *Lama5* σε κατάρρευση της βασικής μεμβράνης των νεφρικών σπειραμάτων, αποδιοργάνωση των αγγείων τους και ανικανότητα φίλτραρίσματος. (Miner and Li, 2000).

B1γ) Η περλεκάνη

Η περλεκάνη είναι μία μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη που προσδένει συστατικά της εξωκυττάριας ύλης. Συντίθεται από ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα και είναι πολύ συντηρημένη ανάμεσα στα είδη. Η περλεκάνη αποτελείται από μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 450kD, συνδεόμενη με 3 αλυσίδες Γλυκοζαμινογλυκανών και διακρίνεται σε 5 περιοχές. Η αμινοτελική περιοχή περιέχει περιοχές πρόσδεσης θεικής ηπαρίνης. Η πρόσδεση με τις Γλυκοζαμινογλυκάνες θεικής ηπαρίνης είναι σημαντική για τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Η δεύτερη περιοχή αποτελείται από 4 επαναλήψεις ομόλογες με την περιοχή του LDL υποδοχέα που προσδένει συνδέτες, η τρίτη περιοχή εμφανίζει ομολογία με τις περιοχές IVa και IVβ της λαμινίνης και αποτελείται από περιοχές ανοσοσφαιρινών και η πέμπτη καρβοξυτελική περιοχή, που εμφανίζει ομολογία με τη G επικράτεια της λαμινίνης, είναι υπεύθυνη για τον αυτοπολυμερισμό και το σχηματισμό βασικής μεμβράνης (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση του μορίου της περλεκάνης με τις πέντε διακριτές περιοχές (I-V). Με τα ψαλίδια αναπαριστώνται οι περιοχές πρωτεόλυσης που προκύπτουν από ανάλυση της αλληλουχίας της. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι περιοχές πρωτεόλυσης από θρομβίνη είναι κρυπτικές, καθώς η περλεκάνη δεν εμφανίζεται ευαίσθητη σε αυτήν την πρωτεάση (Farach and Carson, 2007).

Η περλεκάνη σχετίζεται με σημαντικές διαδικασίες, όπως τη διατήρηση της ομοιόστασης των αγγείων και τη ρύθμιση αυξητικών παραγόντων όπως ο FGF2, TGF- β (Transforming Growth Factor- β), η ιντερλευκίνη και ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Η πρωτεόλυση είναι ένας τρόπος ρύθμισης της λειτουργικότητάς της από την πρωτεάση καθεψίνη S (Farach and Carson, 2007). Η σημασία της περλεκάνης για την επιβίωση φαίνεται από την απενεργοποίηση της, όπου τα μισά μεταλλαγμένα ζώα πεθαίνουν κατά την εμβρυϊκή ημέρα E10.5, την περίοδο που η περλεκάνη αρχίζει να εκφράζεται στον ποντικό. Άλλα πεθαίνουν μετά τη γέννηση με σημαντικά προβλήματα, όπως αδυναμία σχηματισμού βασικής μεμβράνης, ελαττωματική ανάπτυξη των κεφαλικών και μακρών οστών και αχονδροπλασία. Η περλεκάνη συνδέεται με πολλές ανθρώπινες ασθένειες, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης και καρδιαγγειακά προβλήματα (Farach and Carson, 2007).

B1δ) Οι ιντεγκρίνες

Η σύνδεση της εξωκυττάριας ύλης με τα κύτταρα απαιτεί διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που δρουν ως υποδοχείς μορίων της εξωκυττάριας ύλης και την συνδέουν με τον κυτταροσκελετό του κυττάρου. Οι κύριοι παράγοντες πρόσδεσης κολλαγόνου, λαμίνης, φιβρονεκτίνης είναι οι ιντεγκρίνες, μία οικογένεια ομόλογων διαμεμβρανικών μορίων. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα χρησιμεύουν και ως μόρια πρόσδεσης και μεταξύ των κυττάρων. Οι ιντεγκρίνες προσδέονται με μικρή συγγένεια

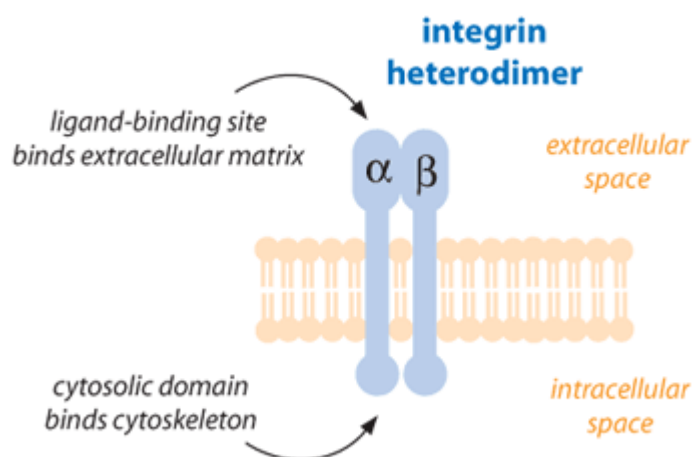
τους συνδέτες τους και βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση στην επιφάνεια των κυττάρων. Η ασθενής πρόσδεση είναι και αναστρέψιμη για να μην παρεμποδίζεται η κυτταρική μετανάστευση. Επίσης, ενεργοποιούν ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης και μεταδίδουν σήματα από την εξωκυττάρια ύλη. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι κυριότεροι εξωκυττάριοι συνδέτες των ιντεγκρινών.

Receptor/ Anchor	Ligands
Integrin $\alpha 1\beta 1$	Col-I, Col-IV, $\alpha 1$ -laminins ($\alpha 1$ LN) and $\alpha 2$ -laminins ($\alpha 2$ LN).
Integrin $\alpha 2\beta 1$	Col-I, Col-IV, $\alpha 2$ - laminin LN domains, Perlecan LG domains (endorepellin)
Integrin $\alpha 3\beta 1$	$\alpha 3$ - and $\alpha 5$ -laminins, nidogens.
Integrin $\alpha 6\beta 1$	$\alpha 1$ -, $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ -laminins. The integrin interacts with LG domains 1-3 & the distal coiled-coil.
Integrin $\alpha 6\beta 4$	$\alpha 3$ - and $\alpha 5$ -laminins. Mediates attachment to hemidesmosomes.
Integrin $\alpha 7X1\beta 1$	$\alpha 2$ -laminins (0.6 nM) > $\alpha 5$ -Lms (1.2 nM*) (LG1-3/distal coiled-coil)
Integrin $\alpha 7X2\beta 1$	$\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -laminins.
Integrin $\alpha \nu\beta 3/\beta 1$	$\alpha 5$ -Lms (domain L4b)

Πίνακας 2: Τα μόρια της εξωκυττάριας ύλης που αλληλεπιδρούν με τις ιντεγκρίνες (Yurchenco and Patton, 2009).

Ένα μόριο ιντεγκρίνης αποτελεί ένα ετεροδιμερές που συντίθεται από 2 μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες υπομονάδες (διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες) που λέγονται α και β (Εικόνα 12). Και οι α και οι β υπομονάδες, με την εξαίρεση της ιντεγκρίνης $\beta 4$, περιέχουν μία μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή και μία μικρή ενδοκυτταρική. Επειδή το ίδιο μόριο ιντεγκρίνης μπορεί να προσδένει διαφορετικούς συνδέτες ανάλογα με τον τύπο του ιστού που εντοπίζεται, φαίνεται ότι ενέχονται και πρόσθετοι παράγοντες στη ρύθμιση της πρόσδεσης. Η πρόσδεση των ιντεγκρινών σε

συνδέτες εξαρτάται από κατιόντα Ca^{++} και Mg^{++} . Πολλές πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ύλης στα σπονδυλωτά αναγνωρίζονται από πολλές ιντεγκρίνες. Για παράδειγμα, τουλάχιστον 8 ιντεγκρίνες προσδένουν τη φιβρονεκτίνη και τουλάχιστον 5 προσδένουν τη λαμινίνη. Μία ποικιλία ετεροδιμερών ανθρώπινων ιντεγκρινών σχηματίζεται από 9 τύπους β υπομονάδων και 24 τύπους α . Αυτή η ποικιλία αυξάνει με εναλλακτικό μάτισμα κάποιων mRNA. Οι $\beta 1$ υπομονάδες δημιουργούν διμερή με τουλάχιστον 12 α υπομονάδες. Η $\alpha 5\beta 1$ πχ είναι υποδοχέας φιβρονεκτίνης και η $\alpha 6\beta 1$ υποδοχέας λαμινίνης. Τα μεταλλαγμένα ποντίκια που αδυνατούν να συνθέσουν $\beta 1$ ιντεγκρίνες πεθαίνουν κατά την εμβρυογένεση, ενώ ποντίκια που δε συνθέτουν την $\alpha 7$ (μαζί με $\beta 1$ συμμετέχουν στο σχηματισμό των μυών) επιβιώνουν, αλλά χαρακτηρίζονται από μυϊκή δυστροφία (Guo *et al.*, 2006).

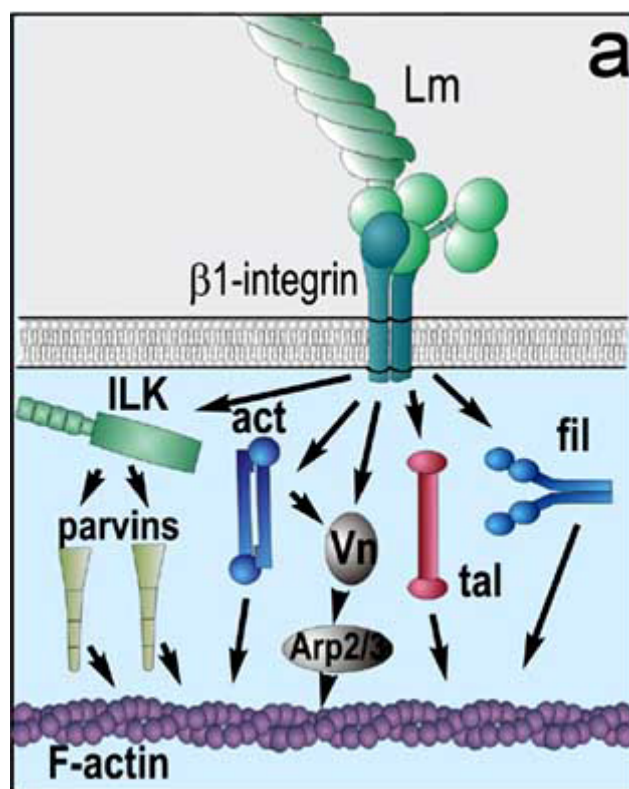


Εικόνα 12: Οι ιντεγκρίνες αποτελούν ετεροδιμερή υπομονάδων α και β . Και οι δύο αποτελούνται από ένα εξωκυττάριο τμήμα που προσδένει συνδέτες της εξωκυττάριας ύλης, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα που ενέχεται στην κυτταρική σηματοδότηση και τη σύνδεση με τον κυτταροσκελετό (<http://www.scq.ubc.ca/the-role-of-integrins-in-wound-healing/>).

Οι $\beta 2$ υπομονάδες σχηματίζουν διμερή με τουλάχιστον 4 τύπους υπομονάδων α . Εκφράζονται στην επιφάνεια των λευκών αιμοσφαιρίων και ενισχύουν το ρόλο τους στην άμυνα. Οι $\beta 2$ συνήθως μεσολαβούν περισσότερο σε διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις παρά σε αλληλεπιδράσεις με την εξωκυττάρια ύλη, όπως στα ενδοθηλιακά κύτταρα επιτρέποντας, για παράδειγμα, στα λευκά αιμοσφαίρια να μετακινούνται πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε περιόδους μόλυνσεων. Άνθρωποι με την ασθένεια LED (Leucocyte Adhesion Efficiency) δε συνθέτουν την υπομονάδα $\beta 2$ και δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν βακτηριακές μολύνσεις (Hogg *et al.*, 2000).

Οι $\beta 3$ ιντεγκρίνες απαντώνται σε πολλά κύτταρα, όπως τα αιμοπετάλια και προσδένουν πρωτεΐνες όπως το φιβρινογόνο. Τα αιμοπετάλια προσδένουν φιβρινογόνο κατά την διαδικασία της πήξης του αίματος. Άνθρωποι που πάσχουν από την ασθένεια του Glanzmann (Glanzmann disease), δε συνθέτουν την υπομονάδα $\beta 3$ και χαρακτηρίζονται από συχνές αιμορραγίες (Baker *et al.*, 1997).

Οι ιντεγκρίνες συνδέονται με τον κυτταροσκελετό συνήθως με την πρόσδεσή τους σε ινίδια ακτίνης. Για παράδειγμα, η ιντεγκρίνη αββ4, συστατικό των ημιδεσμοσωμάτων, συνδέεται σε ενδιάμεσα ινίδια. Μετά την πρόσδεση μίας ιντεγκρίνης στο συνδέτη της στην εξωκυττάρια ύλη, η κυτταροπλασματική περιοχή των β υπομονάδων προσδένεται σε αρκετούς ενδοκυτταρικούς παράγοντες αγκυροβόλησης όπως ταλίνη, την ιντεγκρινοσυνδεδεμένη κινάση (ILK), την α-ακτινίνη και φιλαμίνη. Αυτές οι πρωτεΐνες αγκυροβόλησης προσδένονται απευθείας στην ακτίνη ή σε άλλες πρωτεΐνες αγκυροβόλησης όπως η βινκουλίνη, η α και β παρβίνη και το σύμπλοκο Arp2/3 συνδέοντας την ακτίνη με την ιντεγκρίνη στην περιφέρεια του κυττάρου (Εικόνα 13). Αυτή η σύνδεση οδηγεί στη συσσώρευση ιντεγκρινών και ακτίνης σε σημεία που ονομάζονται εστιακές επαφές (Focal Adhesions). Αν η κυτταροπλασματική περιοχή της β υπομονάδας απαλειφθεί, οι ιντεγκρίνες παρόλο που προσδένουν τους συνδέτες τους, δε σχηματίζουν εστιακές επαφές και δεν προσδένονται ισχυρά. Προϋπόθεση της ισχυρής πρόσδεσης μίας ιντεγκρίνης με την εξωκυττάρια ύλη αποτελεί η αλληλεπίδραση με τον κυτταροσκελετό ακτίνης. Οι ιντεγκρίνες δε σχηματίζουν πάντα εστιακές επαφές. Κατά τη μετανάστευση των κυττάρων οι ασθενείς επαφές δημιουργούν εστιακά σύμπλοκα. Για να ωριμάσουν σε επαφές απαιτείται η δράση των Rho GTPασών, που στρατολογούν περισσότερη ακτίνη στο σημείο πρόσδεσης (Ziegler *et al.*, 2008).



Εικόνα 13: Τα διαφορετικά μονοπάτια με τα οποία συνδέονται οι ιντεγκρίνες με τον κυτταροσκελετό ακτίνης. Μετά τη σύνδεση της β1 ιντεγκρίνης με το συνδέτη της ενεργοποιείται μία σειρά αλληλεπιδράσεων που έχουν ως τελικό αποδέκτη τον κυτταροσκελετό ακτίνης (Yurchenco and Patton, 2009).

B1ε) Τα νιδογόνα

Το νιδογόνο 1, το οποίο είναι γνωστό και ως εντακτίνη, είναι πολύ σημαντικό γιατί σταθεροποιεί τη βασική μεμβράνη. Είναι ένα μικρό ραβδόμορφο μόριο με 3 σφαιρικές περιοχές (G1,G2,G3) συνδεδεμένες μεταξύ τους με έναν εύκαμπτο σύνδεσμο. Εκτός από την περλεκάνη, το νιδογόνο 1 δεσμεύει ισχυρά τη λαμινίνη 1. Προσδένεται επίσης στο κολλαγόνο τύπου IV και αποτελεί μία πρωτεΐνη σύνδεσμο που σταθεροποιεί το σχηματισμό δικτύου στη βασική μεμβράνη. Το νιδογόνο 2 είναι ένα πρόσφατο μέλος της οικογένειας των νιδογόνων, εμφανίζει 46% ομολογία στην αλληλουχία του με το νιδογόνο 1 και έχει παρόμοια δομή με αυτό. Το μοριακό του βάρος είναι 200 kD, εκφράζεται σε πολλούς ενήλικες ιστούς και προσδένεται στη λαμινίνη 100-1000 φορές ασθενέστερα από το νιδογόνο 1. Αντίθετα, προσδένεται με την ίδια ισχύ στην περλεκάνη και το κολλαγόνο τύπου IV. Η απενεργοποίηση ξεχωριστά του νιδογόνου 1 και του νιδογόνου 2 δεν οδηγεί σε βλάβες στη βασική μεμβράνη, γεγονός που φανερώνει το γεγονός ότι η δράση των μορίων αυτών πιθανότατα είναι συμπληρωματική. Η απενεργοποίηση, εντούτοις, της θέσης πρόσδεσης του νιδογόνου 1 στην αλυσίδα $\gamma 1$ της λαμινίνης οδηγεί σε νεφρικές και πνευμονικές ανωμαλίες που οφείλονται σε βλάβες στη δομή της βασικής μεμβράνης στον επιμήκη σωλήνα Wolfiann στα νεφρά και των κυψελιδικών κυστιδίων στους πνεύμονες (Miosge *et al.*, 2000, 2001).

B1στ) Η αγκρίνη

Η αγκρίνη είναι μία μεγάλη πρωτεογλυκάνη, με εννέα επικράτειες παρόμοιες με αυτές των αναστολέων πρωτεασών. Η αγκρίνη παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό της νευρομυϊκής σύναψης κατά την εμβρυογένεση καθώς συμμετέχει στη συσσώρευση των υποδοχέων ακετυλοχολίνης κατά την συναπτογένεση. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, το αναπτυσσόμενο άκρο των νευραξόνων των κινητικών νευρώνων εκκρίνει την αγκρίνη. Η πρωτεΐνη αυτή προσδένεται σε αρκετούς υποδοχείς στην επιφάνεια των σκελετικών μυών, οι οποίοι ονομάζονται MuSK (Muscle Specific Kinase) υποδοχείς, οι οποίοι ξεκινούν σηματοδοτικά μονοπάτια μέσα στο κύτταρο. Εκτός από τους MuSK, η αγκρίνη προσδένει και άλλες πρωτεΐνες της επιφάνειας των μυϊκών κυττάρων, όπως δυστρογλυκάνες και λαμινίνες για τη σταθεροποίηση της νευρομυϊκής ένωσης. Απενεργοποίηση της αγκρίνης ή των MuSK οδηγεί στην αποτυχία σχηματισμού νευρομυϊκής ένωσης (Gautam *et al.*, 1999).

Στην πρωτοταγή δομή της αγκρίνης υπάρχουν 3 πιθανές περιοχές πρόσδεσης θεικής ηπαρίνης αλλά μόνο δύο έχει αποδειχθεί ότι προσδένουν *in vivo*. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αγκρίνη αποτελεί τη βασική πρωτεογλυκάνη στη βασική μεμβράνη των νεφρικών σπειραμάτων, πιθανόν με σημαντικό ρόλο στο φιλτράρισμα μικρομορίων (Razzaque and Taguchi, 2000).

B1ζ) Η δυστρογλυκάνη

Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη δυστρογλυκάνη αρχικά απομονώθηκε από τους σκελετικούς μύες ως ένα από τα συστατικά του συμπλόκου της γλυκοπρωτεΐνης δυστροφίνης (DGC), ένα σύμπλοκο της μεμβράνης των σκελετικών μυών, το οποίο προσφέρει σταθερότητα στο σαρκόλλειμα κατά τη συστολή (Ervasti and Campbell, 1991, Ibraghimov-Beskronnaya *et al.*, 1992). Βλάβες σε συστατικά του συμπλόκου αυτού οδηγούν σε μυοπάθειες, όπως τη μυϊκή δυστροφία Duchenne. Εκτός από τους μύες, η δυστρογλυκάνη παίζει ρόλο και στην επιθηλιακή μορφογένεση, κυτταρική προσκόλληση, συναπτογένεση και κυτταρική σηματοδότηση. Το ανθρώπινο γονίδιο *DAG1* που την κωδικοποιεί χαρτογραφήθηκε στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 3p21 και το αντίστοιχο στον ποντικό στο χρωμόσωμα 9 (Gorecki *et al.*, 1994, Ibraghimov-Beskronnaya *et al.*, 1993). Το γονίδιο περιέχει δύο εξόνια που διαχωρίζονται μεταξύ τους από ένα ιντρόνιο. Η δυστρογλυκάνη αποτελείται από δύο υπομονάδες (α και β) και συντίθεται ως προπεπτίδιο που πρωτεολύεται σε δύο μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες πρωτεΐνες. Οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις οδηγούν στην παραγωγή των δύο ώριμων πρωτεϊνών, της α-δυστρογλυκάνης και της β-δυστρογλυκάνης. Η α δυστρογλυκάνη είναι εξωκυττάρια και περιέχει 3 περιοχές N-συνδεδεμένης γλυκοζιλίωσης. Η 43kD β-δυστρογλυκάνη περιέχει μία διαμεμβρανική περιοχή, μία περιοχή N-συνδεδεμένης γλυκοζιλίωσης και μία κυταροπλασματική περιοχή 121 αμινοξέων πλούσια σε προλίνη (Barresi *et al.*, 2005). Ανάλογα με τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα σε κάθε ιστό υπάρχουν και διαφορετικού μοριακού βάρους δυστρογλυκάνες σε κάθε έναν. Οι α και β δυστρογλυκάνες εκτός από τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση, συνδέονται και με άλλες πρωτεΐνες. Μερικοί εξωκυττάριοι συνδέτες της δυστρογλυκάνης είναι η λαμινίνη, η αγκρίνη, η περλεκάνη στους μύες και η νευρεξίνη στον εγκέφαλο. Κάθε μία από αυτές έχει περιοχές ομολογίας με τη λαμινίνη G και προσδένεται στη δυστρογλυκάνη με τη μεσολάβηση ιόντων ασβεστίου.

Η δυστρογλυκάνη παίζει μέσω των συνδετών της εξωκυττάριας ύλης που προσδένει σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση και διατήρηση της βασικής μεμβράνης. Στον ποντικό, η απενεργοποίηση του γονιδίου *Dag1* οδηγεί σε εμβρυϊκό θάνατο κατά την ημέρα E5.5 λόγω ανωμαλιών στην μεμβράνη του Reichert, που σχηματίζεται νωρίς κατά την ανάπτυξη και διαχωρίζει το έμβρυο από την μητρική κυκλοφορία (Williamson *et al.*, 1997). Η δυστρογλυκάνη είναι άφθονη στη βασική μεριά των περισσότερων επιθηλιακών κυττάρων και ενέχεται στις επιθηλιομεσεγγυματικές αλληλεπιδράσεις κατά τη διακλάδωση του νεφρού, του ουρητήρα και των σιελογόνων αδένων. Η απώλειά της από την εξωκυττάρια ύλη εμφανίζεται σε περιπτώσεις νεοπλασιών όπως το επιθηλιακό πλακώδες καρκίνωμα. (Herzog *et al.*, 2004; Jing *et al.*, 2004).

B1η) Το κολλαγόνο τύπου XVII (BPAG2, Bullous Pemphigoid Antigen)

Στα ημιδεσμοσώματα απαντώνται δύο τύποι BPAGs, μία ενδοκυτταρική πρωτεΐνη μεγέθους 230kD, που ονομάζεται BPAG ή BP230 και μία τύπου II

διαμεμβρανική πρωτεΐνη 180kD που ονομάζεται BPAG2 ή BP180. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η BPAG2 αποτελείται από 1532 αμινοξέα από τα οποία τα 1000 συγκροτούν μια μεγάλη καρβοξυτελική εξωκυττάρια περιοχή με 15 κολλαγονώδεις περιοχές (Giudice *et al.*, 1992, Gatalica *et al.*, 1997). Για το λόγο αυτόν χαρακτηρίζεται και ως κολλαγόνο τύπου XVII. Το μόριο αυτό περιλαμβάνει μία σφαιρική περιοχή διαμέτρου 25-35 nm, που σχηματίζει ένα τριμερές, μία κεντρική ραβδόμορφη περιοχή 60-70 nm, που αποτελείται από τη μεγαλύτερη κολλαγονώδη περιοχή και μία ελαστική περιοχή 100-130 nm με ποικίλα σχήματα. Με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας βρέθηκε ότι η απόσταση της πλασματικής μεμβράνης των βασικών κερατινοκυττάρων μέχρι το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης BPAG2 είναι 41 nm, γεγονός που φανερώνει ότι εντοπίζεται στη lamina densa, αποτελώντας το μοναδικό μόριο που συνδέει τα κερατινοκύτταρα με τη lamina densa (Masunaga *et al.*, 1997).

B10) Η πλεκτίνη

Η πλεκτίνη είναι μία μεγάλη κυτταροπλασματική πρωτεΐνη μοριακού βάρους παραπάνω από 500kD και μήκους 200nm. Απαντάται σε διάφορα επιθήλια, μύες και στον εγκέφαλο. Μαζί με το BPAG1 ανήκει στην οικογένεια των πλακινών και συμμετέχει στη σύνδεση των ινιδίων κερατίνης στα ημιδεσμοσώματα, καθώς προσδένει και κυτοκερατίνη και ιντεγκρίνη β4. Με ηλεκτρονική μικροσκοπία βρέθηκε ότι η πλεκτίνη εντοπίζεται στην εσωτερική περιοχή των ημιδεσμοσωμάτων όπου εισέρχονται τα ινίδια κερατίνης. Τα μόρια της πλεκτίνης στα ημιδεσμοσώματα έχουν διαφορετικό προσανατολισμό (Okumura *et al.*, 1999; Leung *et al.*, 2002).

B11) Η φιμπρονεκτίνη

Η φιμπρονεκτίνη είναι μία μεγάλη εξωκυττάρια γλυκοπρωτεΐνη που απαντάται σε όλα τα σπονδυλωτά και αποτελεί ένα διμερές που συγκροτείται από δύο μεγάλες υπομονάδες συνδεδεμένες με δισουλφιδικούς δεσμούς στο ένα άκρο. Παρόλο που απαντάται σε στη βασική μεμβράνη των εμβρυϊκών επιθηλίων, δε θεωρείται κύριο συστατικό της. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από λειτουργικά διακριτές επικράτειες, από τις οποίες άλλη είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση κολλαγόνου, άλλη ηπαρίνης και άλλη για την πρόσδεση σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων. Η φιμπρονεκτίνη περιέχει ένα μοτίβο πρόσδεσης RGD (Arg-Gly-Asp), το οποίο βρίσκεται και σε άλλα μόρια όπως ο παράγοντας πήξης του αίματος φιμπρινογόνο. Το μοτίβο αυτό αναγνωρίζεται από αρκετά μέλη της οικογένειας των ιντεγκρινών, υποδοχέων που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων και συνδέουν το εσωτερικό του κυττάρου με την εξωκυττάρια ύλη (Pankov *et al.*, 2002).

B2) ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΒΑΣΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Δύο κατηγορίες πομφολυγωδών διαταραχών είναι αποτέλεσμα διαταραχών στη βασική μεμβράνη, οι κληρονομήσιμες και οι αυτοάνοσες (Schmidt *et al.*, 2000). Η

πομφολυγώδης επιδερμόλυση (Epidermolysis Bullosa, EB) αποτελεί ένα σύνολο σπάνιων κληρονομήσιμων διαταραχών της επιδερμίδας που χαρακτηρίζονται από σχηματισμό πομφολυγών στο δέρμα και τους βλεννογόνους των ασθενών έπειτα από την παραμικρή μηχανική πίεση. Ανάλογα με το επίπεδο στο οποίο συμβαίνει η αποκόλληση, έχουμε τρεις τύπους: α) Στην EB simplex οι πομφόλυγες εντοπίζονται μέσα στην επιδερμίδα, β) στην EB junctional στην lamina lucida και γ) στην EB dystrophic κάτω από τη lamina densa (Εικόνα 15). Από την άλλη, οι ασθένειες Bullous Pemphigoid, Cicatrical Pemphigoid και Epidermolysis Bullosa aquisita είναι χαρακτηριστικά αυτοάνοσα νοσήματα της βασικής μεμβράνης. Σε αυτές τις ασθένειες, παράγονται αυτοαντισώματα για συστατικά της βασικής μεμβράνης, τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν ανοσοϊστοχημικά κατά μήκος αυτής. Η πρόσδεση των αυτοαντισωμάτων στα συστατικά της βασικής μεμβράνης εμποδίζει την συμμετοχή τους στη συνοχή της επιδερμίδας με τη δερμίδα, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό πομφολυγών (Arin *et al.*, 2001).

EB simplex (EBS) : Στην ασθένεια αυτή, οι πομφόλυγες σχηματίζονται μέσα στην επιδερμίδα. Στις περισσότερες περιπτώσεις προκαλείται από μεταλλάξεις στα γονίδια *KRT5* ή *KRT14*, τα οποία κωδικοποιούν την κερατίνη 5 και 14 αντίστοιχα. Ένας άλλος τύπος EB συνοδεύεται από μυϊκή δυστροφία (EBS-MD) και οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου της πλεκτίνης *PLEC1*, που όπως προαναφέρθηκε εντοπίζεται στην εσωτερική ημιδεσμοσωμική πλάκα. Οι πομφόλυγες στην περίπτωση αυτή χαρακτηρίζονται από κυτταρική λύση πάνω από τα ημιδεσμοσώματα στα βασικά κερατινοκύτταρα, όπου και φυσιολογικά εντοπίζεται η πλεκτίνη. Η EB κληρονομείται με επικρατή τρόπο ενώ η EBS-MD με υπολειπόμενο (Sasaki *et al.*, 1999; Pfendner *et al.*, 2005).

Junctional EB (JEB): Εδώ η αποκόλληση συμβαίνει στο επίπεδο της lamina lucida, ο αριθμός των ημιδεσμοσωμάτων είναι ελαττωμένος και εμφανίζει ελάχιστη προσκόλληση στο κυτταρόπλασμα των κερατινοκυττάρων. Οι περισσότερες περιπτώσεις JEB είναι αυτοσωμικές υπολειπόμενες. Η JEB διακρίνεται σε διάφορες κατηγορίες, όπως η Herlitz JEB, pyloric atresia JEB και μη Herlitz JEB. Υπάρχουν πολλά υποψήφια γονίδια για την JEB. Η θνησιγόνος Herlitz JEB απορρέει από μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα 3 γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες της λαμινίνης 5, (*LAMA3*, *LAMB3* και *LAMC2*). Χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα οδηγώντας σε θάνατο των προσβεβλημένων νεογνών. Η pyloric atresia-JEB οφείλεται σε μεταλλάξεις των γονιδίων *ITGA6* και *ITGB4* που κωδικοποιούν την ιντεγκρίνη α6 και β4 αντίστοιχα και χαρακτηρίζεται από επιδερμόλυση και πυλωρική ατρησία. Μεταλλάξεις στην μη Herlitz JEB αναφέρονται στο γονίδιο που κωδικοποιεί το κολλαγόνο XVII, (*COL17A1*) και το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β3 αλυσίδα της λαμινίνης 5 (*LAMB3*). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες της lamina lucida και των ημιδεσμοσωμάτων. Όπως προαναφέρθηκε, το κολλαγόνο τύπου XVII, αποτελεί ένα διαμεμβρανικό κολλαγόνο που εντοπίζεται στα ημιδεσμοσώματα των επιθηλίων στην περιοχή της βασικής μεμβράνης της επιδερμίδας. Οι ασθενείς εκτός από τις πομφόλυγες στην επιδερμίδα εμφανίζουν πρόωμη απώλεια του τριχωτού της κεφαλής (Masunaga T, 2006).

Dystrophic EB (DEB): Στην περίπτωση αυτή, ο σχηματισμός της πομφόλυγας λαμβάνει χώρα κάτω από τη lamina densa και τα ινίδια αγκυροβόλησης εμφανίζονται ελαττωματικά και λιγότερα από το φυσιολογικό. Υπάρχουν και αυτοσωμικά επικρατή και υπολειπόμενα πρότυπα κληρονομησης της ασθένειας αυτής. Το γονίδιο, μεταλλαγές του οποίου προκαλούν αυτή την ασθένεια, είναι το *COL7A1* που κωδικοποιεί το κολλαγόνο VII. Το γονίδιο αυτό περιέχει 118 εξόνια (τον μεγαλύτερο γνωστό αριθμό εξονίων μέχρι σήμερα). Η αντικατάσταση της γλυκίνης στην κολλαγονώδη περιοχή του ενός αλληλίου του κολλαγόνου τύπου VII οδηγεί σε επικρατή DEB ενώ ο συνδυασμός πρόωρων κωδικονίων λήξης οδηγεί στο σύνδρομο Hallopeau-Siemens DEB, μία βαριά μορφή της ασθένειας (Bruckner-Tuderman L, 1999).

Bullous pemphigoid: Στην ασθένεια αυτή, η αποκόλληση λαμβάνει χώρα στη lamina lucida. Υπάρχουν δύο τύποι αυτοαντισωμάτων, τα αυτοαντισώματα εναντίον του BPAG1 και του BPAG2. Έχει δειχθεί ότι τα αυτοαντισώματα αντι-BPAG2 προσδένονται στη πλασματική μεμβράνη των ημιδεσμοσωμάτων, ενώ τα αντι-BPAG1 στην εσωτερική πλάκα τους. Τα αυτοαντισώματα αντι-BPAG2 παίζουν σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια του σχηματισμού της πομφόλυγας κατά την BP καθώς η BPAG2 αποτελεί διαμεμβρανική πρωτεΐνη και τα αυτοαντισώματα καλύπτουν σημεία σύνδεσής της με εξωκυττάρια πρωτεΐνες (Ishiko *et al.*, 1993). Οι επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα αυτοαντισώματα εντοπίζονται στην NC16a περιοχή που βρίσκεται στην εξωκυττάρια ύλη κοντά στη διαμεμβρανική περιοχή (Sato *et al.*, 1998).

Cicatricial pemphigoid: Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από αυτοαντισώματα για τη λαμινίνη 5 ή την BPAG2 στη βασική μεμβράνη και διακρίνεται σε δύο υποκατηγορίες: Στην πρώτη, τα αυτοαντισώματα αλληλεπιδρούν με τη δερμική περιοχή και στη δεύτερη, την επιδερμική περιοχή δέρματος επεξεργασμένου με 1M NaCl (Shimizu *et al.*, 1995).

EB acquisita: Εδώ παρατηρούνται αυτοαντισώματα για την NC1 περιοχή του κολλαγόνου τύπου VII και σπάνια για την NC2 της κεντρικής κολλαγονώδους περιοχής. Τα NC1 δρουν στη lamina densa και τα NC2 κάτω από αυτήν, στη sublamina densa (Masunaga T, 2006).

Άλλες μεταλλάξεις που οδηγούν σε κληρονομικές ασθένειες αφορούν συστατικά όπως το κολλαγόνο IV. Μία κληρονομική ασθένεια των νεφρών γνωστή ως σύνδρομο Alport, που χαρακτηρίζεται από προοδευτική νεφρίτιδα, απώλεια ακοής και προβλήματα στην όραση προκαλείται από μεταλλαγές στα γονίδια *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5* και *COL4A6*. Οι μεταλλάξεις στα *COL4A3* και *COL4A4* σχετίζονται με την αυτοσωμική, ενώ η μετάλλαξη του *COL4A5* με τη φυλοσύνδετη κληρονομηση της ασθένειας αυτής. Σε περιπτώσεις που μεγάλες ελλείψεις επηρεάζουν τα γονίδια *COL4A5* και *COL4A6*, η νεφρίτιδα συνδυάζεται με λειομυομάτωση (Bruckner-Tuderman *et al.*, 1998).

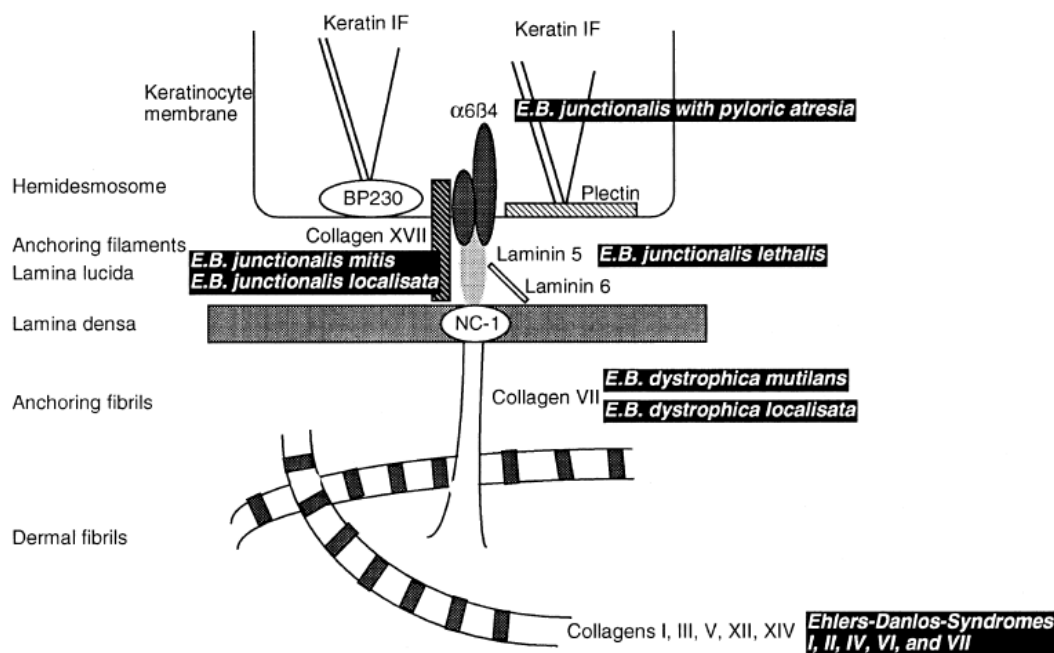
Η βασική μεμβράνη εμπεριέχει και διάφορα άλλα μόρια, για παράδειγμα το GDA-JF3 και το TIN αντιγόνο καθώς και τις φιμπουλίνες που αποτελούν υποψήφια γονίδια για κληρονομικές διαταραχές. Το σύνδρομο Fraser, μία αυτοσωμική

υπολειπόμενη ασθένεια του ανθρώπου, όπως αναφέρθηκε, προκαλείται από μεταλλάξεις των γονιδίων FRAS1 και FREM2.

Βλάβες στα γονίδια που κωδικοποιούν για τους διάφορους τύπους κολλαγόνου στη δερμίδα προκαλούν ασθένειες όπως το σύνδρομο Ehlers Danlos, το οποίο χαρακτηρίζεται από υπερελαστικότητα της επιδερμίδας λόγω βλαβών του κολλαγόνου I, III, V, XII, XIV (Εικόνα 14, 15) (Bruckner-Tuderman *et al.*, 1998).



Εικόνα 14: Υπερελαστική επιδερμίδα σε άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο Ehlers Danlos (<http://www.healthcentral.com/ency/408/imagepages/2409.html>).



Εικόνα 15: Γενετικές ασθένειες της εξωκυττάριας ύλης της επιδερμίδας. Η αποκόλληση λαμβάνει χώρα μέσα στην επιδερμίδα, στην lamina lucida ή στη sublamina densa (Bruckner-Tuderman L, 1999).

B3) Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΒΑΣΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΣΤΗΝ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ

Κατά τη διάρκεια των αναπτυξιακών διαδικασιών, όπως η οργανογένεση, οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις παίζουν μείζονα ρόλο. Πρόσφατα ευρήματα δείχνουν

ότι μόρια που συμμετέχουν σε αυτές τις διαδικασίες εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων και στην εξωκυττάρια ύλη. Πράγματι, κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης έχει αναφερθεί μία σειρά από αναπτυξιακές αλλαγές στη σύσταση της εξωκυττάριας ύλης:

- ✓ Κατά τη διάρκεια της επαγωγής των νεφρικών σωληναρίων η εξωκυττάρια ύλη από στρώμα μετατρέπεται σε βασική μεμβράνη κατά την συμπύκνωση του επιθηλιοποιημένου μεσεγγύματος. Η βασική μεμβράνη είναι απαραίτητη για την τελική διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων.
- ✓ Στη διαφοροποίηση των σιελογόνων αδένων, οι γλυκοζαμινογλυκάνες της βασικής μεμβράνης των αναπτυσσόμενων λοβών ρυθμίζονται από το γειτονικό μεσέγγυμα.
- ✓ Η κατανομή και η ποσότητα των κολλαγόνων, φιμπρονεκτίνης, λαμινίνης και πρωτεογλυκανών (πχ συνδεκάνης) μεταβάλλονται κατά την χονδρογένεση που λαμβάνει χώρα κατά την διαφοροποίηση των άκρων.
- ✓ Ανοσοϊστοχημικές και ηλεκτρονικές μελέτες δείχνουν ότι τα συστατικά της εξωκυττάριας ύλης παρέχουν καθοδήγηση για τη μετανάστευση εμβρυϊκών κυτταρικών τύπων, όπως τα neural crest cells.
- ✓ Το κολλαγόνο προάγει τη σύντηξη των μυοβλαστών σε γραμμωτά μυϊκά κύτταρα και η λαμινίνη επηρεάζει τη μορφολογία, την κινητικότητα και διαίρεση των σκελετικών μυοβλαστών.
- ✓ Κατά την ανάπτυξη του οφθαλμού, κολλαγονώδη εξωκυττάρια συστατικά εκκρίνονται από το φακό του ματιού και προκαλούν την παραγωγή του στρώματος του κερατοειδή από το επιθήλιό του.
- ✓ Η φιμπρονεκτίνη και η λαμινίνη ενισχύουν την προσκόλληση και ανάπτυξη της βλαστοκύστης in vitro (Leivo and Wartiovaara, 1989).

B3α) Η εξωκυττάρια ύλη στα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης

Νωρίς κατά την εμβρυογένεση του ποντικού είναι δυνατή η ανίχνευση συστατικών της εξωκυττάριας ύλης ακόμα και σε πολύ πρώιμα στάδια. Για παράδειγμα, όταν το έμβρυο αποτελείται από 2-4 κύτταρα, η λαμινίνη ανιχνεύεται και ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά και διατηρείται μέχρι και το στάδιο των 8-16 κυττάρων (Cooper and McQueen, 1983). Μερικές μεγάλες πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης ανιχνεύονται στις κυτταρικές επιφάνειες κατά το στάδιο 2-4 κυττάρων, ενώ η εντακτίνη/νιδογόνο εντοπίζεται στο στάδιο 8-16 κυττάρων. Στο στάδιο της βλαστοκύστης το έμβρυο περιέχει τρεις διακριτούς κυτταρικούς τύπους: Το εκτόδερμα και το πρώιμο ενδόδερμα σχηματίζουν την Εσωτερική Κυτταρική Μάζα (Inner Cell Mass, ICM) και η εξωτερική επιφάνεια του εμβρύου καλύπτεται από τροφοεκτοδερμικά κύτταρα. Στη βλαστοκύστη 3-4 ημερών η λαμινίνη, η εντακτίνη και το κολλαγόνο τύπου IV εντοπίζονται και μέσα στα κύτταρα της ICM και στην εξωκυττάρια ύλη τους. Η ενδοκυτταρική εμφάνιση της λαμινίνης πριν από τη συγκρότηση της βασικής μεμβράνης συμπίπτει με μία περίοδο αλλαγών στις κυτταρικές επαφές. Πιθανόν στη φάση αυτή να συμμετέχει σε κυτταρικές

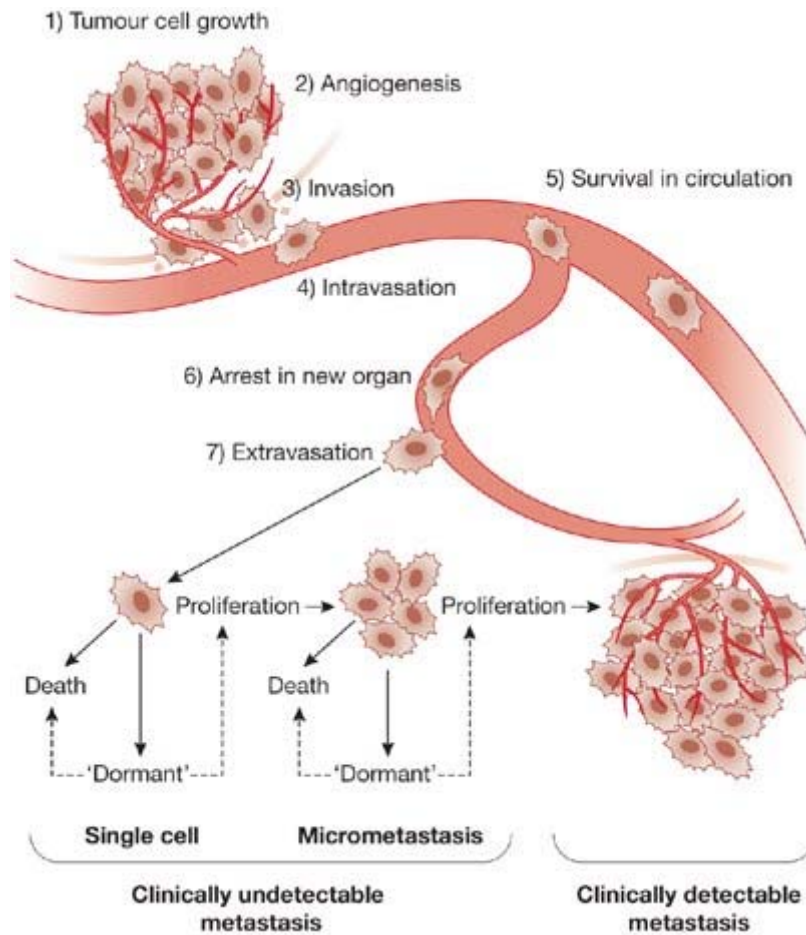
αλληλεπιδράσεις. Το γεγονός ότι όλα τα συστατικά της εξωκυττάριας ύλης δεν εμφανίζονται ταυτόχρονα, μπορεί να συμβάλλει σε κάποιους αναπτυξιακούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς (Leivo and Wartiovaara, 1989).

Κατά την ημέρα E5.0, η ICM επεκτείνεται στην κοιλότητα του βλαστοκόιλου. Σε αυτό το στάδιο η λαμινίνη, η εντακτίνη, το κολλαγόνο τύπου IV, και η φιμπρονεκτίνη ανιχνεύονται στη βασική μεμβράνη ανάμεσα στο εκτόδερμα και το πρόωμο ενδόδερμα καθώς και στη μεμβράνη του Reichert. Αργότερα, η λαμινίνη, η εντακτίνη, το κολλαγόνο IV και η φιμπρονεκτίνη εντοπίζονται σε περιοχές σχηματισμού καινούριων εξωκυττάριας δομών. Η πρώτη ανίχνευση κολλαγόνων I και III σημειώνεται στο μεσέγχυμα της κεφαλής και της καρδιάς και σε εμβρυϊκές μεμβράνες εμβρύου E8.0 (Leivo and Wartiovaara, 1989).

B4) Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΒΑΣΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ

Η μετάσταση αποτελεί το κύριο αίτιο θανάτου για ασθενείς με κακοήθεις όγκους. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπισή τους, όπως η χειρουργική επέμβαση και η χημειοθεραπεία μπορούν πλέον να θεραπεύσουν 50% των ασθενών που αναπτύσσουν έναν κακοήθη όγκο. Οι μεταστάσεις είναι συχνά πολλαπλές και αυξάνουν σε αριθμό με το χρόνο. Η τοπική εισβολή του όγκου στον γειτονικό συνδετικό ιστό είναι το πρώτο βήμα στη διαδικασία που οδηγεί στη μετάσταση. Στη συνέχεια, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να εισβάλλουν στο τοίχωμα των αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων για να εξαπλωθούν. Το μέγεθος της εξάπλωσης εξαρτάται από την αγγείωση του όγκου, τον αριθμό των καρκινικών κυττάρων που μπαίνουν στην κυκλοφορία του αίματος, τους ανατομικούς παράγοντες και τις ιδιότητες των κυττάρων του όγκου. Τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να καταφέρουν να αποφύγουν τους μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού, να επιβιώσουν από τα μηχανικά τραύματα λόγω της ροής του αίματος και τελικά να σταματήσουν σε ένα συγκεκριμένο όργανο (Engbring JA and Kleinman, 2003). Το τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται είτε μηχανικά, είτε με παγίδευση στα αιμοπετάλια και τη φιμπρίνη, με προσκόλληση στο ενδοθήλιο και αλληλεπίδραση με εκτεθειμένες υποενδοθηλιακές εξωκυττάριας δομές (Εικόνα 16).

Στη συνέχεια, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να εξέλθουν από τα αγγεία και να εισέλθουν στο παρέγχυμα του οργάνου στο οποίο μεθίστανται. Το καρκινικό κύτταρο όντας πλέον εκτός του αγγείου, πρέπει να έχει την ικανότητα να μεγαλώσει σε ένα περιβάλλον διαφορετικής σύστασης από την περιοχή που προήλθε ώστε να σχηματίσει μία αποικία. Στο σκοπό αυτόν συμβάλλει η αλληλεπίδρασή του με αυξητικούς παράγοντες του περιβάλλοντα εξωκυττάριας χώρου ή με αυτοκρινείς αυξητικούς παράγοντες που παράγει το ίδιο το κύτταρο. Η αλληλεπίδραση του καρκινικού κυττάρου με την εξωκυττάρια ύλη αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα πεδία επιστημονικής μελέτης. Η βασική μεμβράνη φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο των κακοήθων όγκων και στην κυκλοφορία των καρκινικών κυττάρων στο αίμα (Liotta LA, 1984).



Εικόνα 16: Τα βήματα για την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Αρχικά, τα καρκινικά κύτταρα αφού πολλαπλασιασθούν επάγουν το σχηματισμό νέων αγγείων στα οποία εισέρχονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και αφού καταφέρουν να επιβιώσουν εξέρχονται από τα αγγεία και διαιρούνται σχηματίζοντας έναν καινούριο όγκο (McGee *et al.*, 2006).

B4α) Προβλήματα στη βασική μεμβράνη κατά την ανάπτυξη νεοπλασιών

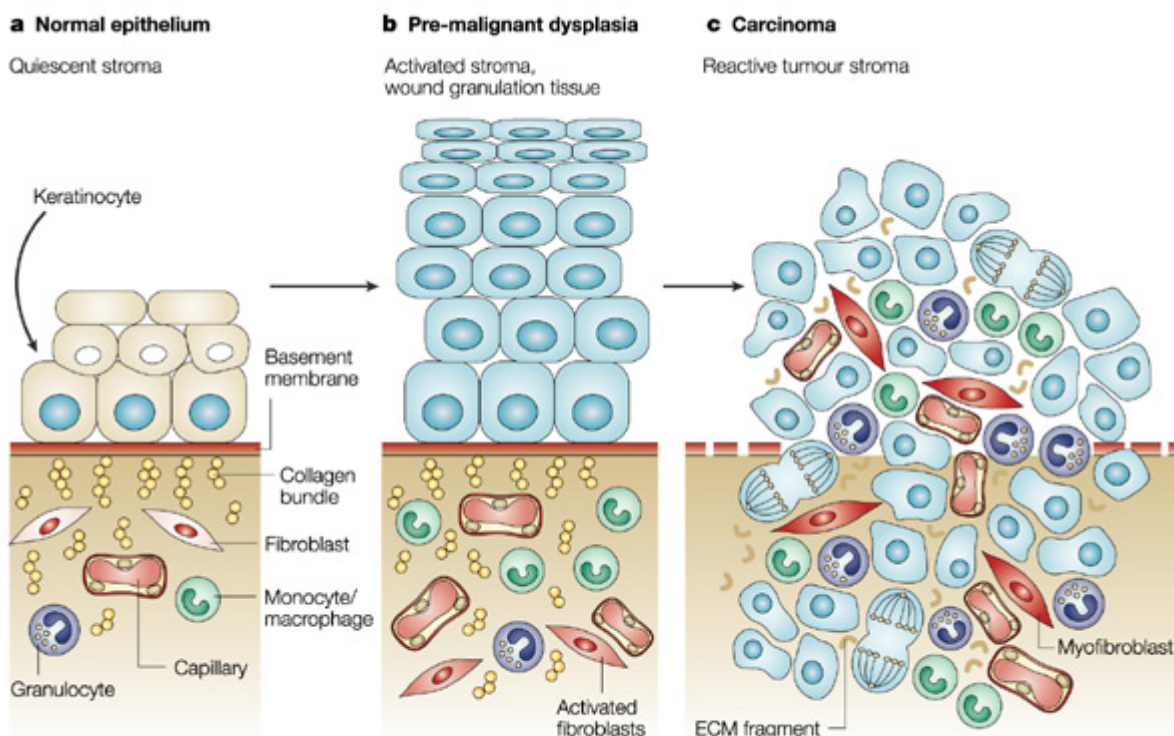
Σε νεοπλαστικές καταστάσεις, οι αλληλεπιδράσεις των φυσιολογικών κυττάρων και της εξωκυττάριας ύλης μεταβάλλονται, γεγονός που επηρεάζει την διαίρεση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Ένας όγκος μπορεί να τροποποιήσει την εξωκυττάρια ύλη με τρεις τρόπους: 1) Προκαλεί λύση των συστατικών της εξωκυττάριας ύλης στο σημείο της εισβολής. 2) Μπορεί να προκαλέσει δεσμοπλασία (αυξημένη συσσώρευση συστατικών της εξωκυττάριας ύλης από τα κύτταρα ξενιστές που ενεργοποιούνται από την παρουσία του όγκου). 3) Συνθέτει εκ νέου συστατικά της εξωκυττάριας ύλης. Οι εξωκυττάρια πρωτεΐνες (όπως το κολλαγόνο) που παράγει ένα καρκινικό κύτταρο είναι του ίδιου τύπου με αυτές που παράγονται από ένα αντίστοιχο φυσιολογικό κύτταρο. Συνήθως η εξωκυττάρια ύλη που παράγει ένα καρκινικό κύτταρο εξαρτάται από το στάδιο της διαφοροποίησης του όγκου (Liotta LA, 1984).

Στη μετάβαση ενός φυσιολογικού κυττάρου σε μεταστατικό εμπλέκονται κάποια γονίδια, αρκετά από τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ύλης. Για παράδειγμα, η αύξηση στην έκφραση της φιμπρονεκτίνης συνδέεται με την μετάσταση και την ογκογένεση. Αρκετά γονίδια εμπλέκονται στην προσκόλληση των κυττάρων στη βασική μεμβράνη. Η απώλεια αυτής της ικανότητας προσκόλλησης οδηγεί σε διείσδυση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Για παράδειγμα, η ελάττωση στην έκφραση του *Dab2*, το οποίο είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εμπλέκεται στον καρκίνο των ωοθηκών συνδέεται με την ελάττωση της λαμινίνης στη βασική μεμβράνη. Η απώλεια της λειτουργίας του *BRCA1* ογκοκατασταλτικού γονιδίου, το οποίο ρυθμίζει τη λαμινίνη α3, οδηγεί σε καρκίνο των ωοθηκών και του στήθους. Η ελάττωση των επιπέδων E-καντερίνης (cadherin) και η αύξηση των επιπέδων του HGF (Hepatocyte Growth Factor), του υποδοχέα Met και της αλυσίδας γ2 της λαμινίνης αποτελούν δείκτες για μετάσταση. Η αλυσίδα γ2 της λαμινίνης πρωτεολύεται από την MMP-2 πρωτεϊνάση με αποτέλεσμα την έκθεση κρυπτικών σημείων υπεύθυνων για τη μετανάστευση των κυττάρων (Rundhaug, 2003).

B4β) Εισβολή στους γειτονικούς ιστούς

Η βασική μεμβράνη αποτελεί ένα φυσιολογικό φραγμό για τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων διαχωρίζοντας το επιθήλιο από το συνδετικό ιστό και το αγγειακό ενδοθήλιο. Κατά τη δημιουργία ενός όγκου ο φραγμός αυτός διαταράσσεται (Εικόνα 17). Για τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων σε διάφορα όργανα, όπως προαναφέρθηκε, είναι απαραίτητη η επαφή τους με τα αγγεία του συνδετικού ιστού, γεγονός που επιτυγχάνεται με την απώλεια της βασικής μεμβράνης. Στη φάση αυτή αυξάνονται τα επίπεδα των πρωτεϊνών που δρουν σε διάφορα συστατικά της εξωκυττάριας ύλης. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι μία οικογένεια ενδοπρωτεασών που πρωτεολύουν συστατικά της εξωκυττάριας ύλης. Οι περισσότερες παράγονται από ινοβλάστες, φλεγμονώδη κύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα που περιβάλλουν όγκους. Οι MMP-1,-2,-9 αυξάνονται σε επιθετικά μελανώματα, η κολλαγενάση τύπου IV σε μελανωματικά και ινοσαρκωματικά κύτταρα. Η έκφραση ενεργοποιητών του πλασμινογόνου που ενέχονται στην ενεργοποίηση πρωτεασών που αποικοδομούν την εξωκυττάρια ύλη ρυθμίζεται από τη λαμινίνη-1. Η λαμινίνη 5, οποία φυσιολογικά συμμετέχει στη διατήρηση των ημιδεσμοσωμάτων, πρωτεολύεται από τις MMP-1-2 και MT1-MMP και ένα πρωτεολυτικό κρυπτικό προϊόν αυτής της πρωτεόλυσης ενεργοποιεί την μετανάστευση των κυττάρων. Στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα η έκκριση λαμινίνης 5 οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων των επιφανειακών β4 ιντεγκρινών, οι οποίες αναδιοργανώνουν τα ημιδεσμοσώματα στα σημεία της διείσδυσης των καρκινικών κυττάρων στον υποκείμενο συνδετικό ιστό (Rundhaug, 2003). Η λαμινίνη-6 παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην εισβολή των καρκινικών κυττάρων στο μεσέγχυμα. Η G4-5 επικράτεια της λαμινίνης 6 φυσιολογικά καταστέλλει την κυτταρική προσκόλληση αλλά όταν απελευθερωθεί από τη δομή της προάγει την εισβολή. Επιπλέον, η έκφραση και λειτουργία μορίων κυτταρικής προσκόλλησης που λέγονται καντερίνες μπορεί να μεταβληθεί, οδηγώντας σε μετάσταση. Η εισβολή των καρκινικών κυττάρων στην εξωκυττάρια ύλη με τη

βοήθεια συγκεκριμένων πρωτεϊνών και η αλλαγή στη σύσταση και λειτουργία των πρωτεϊνών προσκόλλησης των κυττάρων μεταξύ τους και με την εξωκυττάρια ύλη, επιτρέπει στα κύτταρα να έρθουν σε επαφή με τα αγγεία του αίματος και της λέμφου.



Nature Reviews | Cancer

Εικόνα 17: Υπό φυσιολογικές συνθήκες στην επιδερμίδα η βασική μεμβράνη παραμένει ακέραιη. Κατά τον καρκινικό μετασχηματισμό η δράση των μεταλλοπρωτεασών σε συνδυασμό με τη μηχανική πίεση καταστρέφει τη βασική μεμβράνη (Mueller and Fusenig, 2004).

B4γ) Αγγειογένεση

Η εξωκυττάρια ύλη παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση, δηλαδή το σχηματισμό αγγείων από ήδη προϋπάρχοντα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων φυσιολογικά παραμένουν σε ανενεργή κατάσταση όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό τους. Ο ανεξέλεγκτος σχηματισμός νέων αγγείων παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη του όγκου. Τα αγγειογενετικά σήματα που προέρχονται από τον όγκο οδηγούν στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ύλης, γεγονός που προάγει την κυτταρική μετανάστευση και διαίρεση. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα η βασική μεμβράνη είναι βιολογικά ενεργή και αποτελεί σημείο αποθήκευσης πολλών αυξητικών παραγόντων, όπως οι basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Epidermal Growth Factor (EGF), οι οποίοι κατά την αποικοδόμησή της απελευθερώνονται και προάγουν την αγγειογένεση. Υπάρχουν αρκετά πρωτεολυτικά προϊόντα της εξωκυττάριας ύλης που προάγουν την αγγειογένεση, όπως η 25 kD θρομβοσπονδίνη. Αντίθετα, η ενδοστατίνη όπως προαναφέρθηκε (που προέρχεται από το κολλαγόνο XVIII), η αγγειοστατίνη (από το πλασμινογόνο), οι NC1 περιοχές

του κολλαγόνου IV, αρκετά πεπτίδια θρομβοσπονδίνης και η ενδορεπελλίνη (από το καρβοξυτελικό τμήμα της περλεκάνης) δρουν αγγειοκατασταλτικά.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η αγγειογένεση μπορεί να ρυθμιστεί και από πεπτίδια λαμινίνης, η οποία εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη των ενδοθηλίων. Πάνω από 20 πεπτίδια που προέρχονται από τη λαμινίνη-1 με αγγειογενετική δράση έχουν χαρακτηρισθεί (Sherwood *et al.*, 2006).

Γ) ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η λειτουργική μελέτη της οικογένειας των πρωτεϊνών *Fras1/Frem* σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα που αφορούσαν:

A) Τον προσδιορισμό του προτύπου εντοπισμού των πρωτεϊνών της οικογένειας *Fras1/Frem* κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του ποντικού. Τα ευρήματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι όλα τα μέλη της οικογένειας συνεντοπίζονται στη βασική μεμβράνη όλων των εμβρυϊκών επιθηλιακών δομών που εξετάστηκαν, όπως της επιδερμίδας, των οφθαλμικών επιθηλίων, του πνεύμονα και των νεφρών και μίας ποικιλίας εσωτερικών οργάνων. Επίσης, διαπιστώθηκε ένα ενδοκυτταρικό πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης *Frem1* στα περιδερμικά κύτταρα της επιδερμίδας. Τέλος, βρέθηκε ότι το κολλαγόνο VII, η απενεργοποίηση του οποίου οδηγεί σε παρόμοιο φαινότυπο με αυτό των *Fras1/Frem*, με τη διαφορά ότι αυτός παρατηρείται μόνο μετά τη γέννηση, εντοπίστηκε στα όψιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, την περίοδο που τα επίπεδα των *Fras1/Frem* αρχίζουν να φθίνουν. Το γεγονός αυτό μας οδήγησε στην υπόθεση ότι το ρόλο των *Fras1/Frem* κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη τον διαδραματίζει το κολλαγόνο VII στον ενήλικα οργανισμό και αντίστροφα.

B) Τον προσδιορισμό του προτύπου εντοπισμού των *Fras1/Frem* σε παθολογικές καταστάσεις, όπως σε νεοπλασίες της επιδερμίδας, έπειτα από χημική καρκινογένεση δύο σταδίων, όπου διαπιστώθηκε ότι μόνο η *Frem3* εκφράζεται από τα καρκινικά επιθήλια και εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη των παθολογικών επιθηλίων και ορισμένων αγγείων.

Γ) Τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων του ιδρυτικού μέλους της οικογένειας, *Fras1*, με άλλες πρωτεΐνες, όπως η *Grip1*, στα πλαίσια της οποίας διαπιστώθηκε ότι η συνέκφρασή τους σε ευκαρυωτικά κύτταρα προκαλεί αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου, η οποία χαρακτηρίστηκε με ενδοκυτταρικούς μάρτυρες και προσδιορίστηκαν οι περιοχές των δύο πρωτεϊνών που είναι κρίσιμες για αυτό το φαινόμενο

Δ) Τον έλεγχο, έπειτα από *in vivo* παρατηρήσεις της απώλειας του αγγειογενετικού αυξητικού παράγοντα VEGF από τη βασική μεμβράνη των επιθηλίων των *Fras1*^{-/-} έμβρυων, της αλληλεπίδρασης της *Fras1* με τον αγγειογενετικό αυξητικό παράγοντα VEGF. Στα πειράματά μας αποδείχθηκε για πρώτη φορά, ότι τα έξι πρώτα πρωτεϊνικά μοτίβα τύπου χορδίνης της *Fras1* αλληλεπιδρούν με τον VEGF, και ταυτοποιήθηκαν οι περιοχές της *Fras1* και του VEGF που είναι κρίσιμες για την αλληλεπίδραση αυτή.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A) ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ-ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΤΟΥ DNA

A1α) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (MAXIPREP)

Διαλύματα:

P1:

15mM Tris pH8

10mM EDTA

P2:

0.2M NaOH

1% SDS

P3:

60% 5M CH₃COOK

11.5% CH₃COOH

Ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνάσης K:

0.01M Tris pH7.8

0.005 M EDTA

0.5% SDS

Διαδικασία

Αναπτύσσεται βακτηριακή καλλιέργεια 50ml με το επιθυμητό πλασμίδιο σε LB/αντιβιοτικό επιλογής στους 37 °C και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20' στις 3000 rpm. Στην πελέτα προστίθενται 5ml διαλύματος P1 και ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex), προσθήκη 5ml διαλύματος P2 και ήπια ανάδευση, επώαση για 3' σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη 5 ml από το διάλυμα P3, το οποίο ανακινείται ελαφρά και επώαζεται στον πάγο για 20'. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 30' στις 10000 rpm στους 4°C, προσθήκη 12ml ισοπροπανόλης στο υπερκείμενο και ανάδευση (vortex). Ακολουθεί επαναφυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και ξέπλυμα της πελέτας με 5 ml 75% αιθανόλη. Η πελέτα επαναδιαλύεται σε 200μl TE και προστίθενται 20μl RNaseA (10mg/ml). Η επώαση πραγματοποιείται στους 37°C για 2 ώρες. Ακολουθεί προσθήκη 200μl CHCl₃/ισοαμυλική αλκοόλη 24:1 και έντονη ανάδευση, φυγοκέντρηση για 5' στις 13000 rpm στους 4°C και συλλογή του υπερκειμένου, στο οποίο προστίθενται 850μl παγωμένη 100% αιθανόλη. Στη συνέχεια πραγματοποιείται πολύ καλή ανάδευση και κατακρήμνιση του DNA

χωρίς φυγοκέντρηση, υπό την επίδραση της βαρύτητας (το βήμα επαναλαμβάνεται τρεις φορές) και στην πελέτα προστίθενται 800μl 75% αιθανόλη. Έπειτα από φυγοκέντρηση για 2' στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου, η πελέτα επαναδιαλύεται σε 200 μl 1X ρυθμιστικό buffer πρωτεΐνάσης K. Στο διάλυμα προστίθενται 10μl πρωτεΐνάσης K και ακολουθεί επώαση στους 56°C για 3 ώρες. Ακολουθεί εκ νέου προσθήκη 200μl CHCl₃/ισοαμυλική αλκοόλη 24:1 και έντονη ανάδευση, φυγοκέντρηση για 5' στις 13000 rpm στους 4°C και συλλογή του υπερκειμένου, στο οποίο προστίθενται 850μl παγωμένη 100% αιθανόλη. Στη συνέχεια πραγματοποιείται πολυ καλή ανάδευση και κατακρήμνιση του DNA χωρίς φυγοκέντρηση, υπό την επίδραση της βαρύτητας (το βήμα επαναλαμβάνεται τρεις φορές) και στην πελέτα προστίθενται 800μl 75% αιθανόλη. Έπειτα από φυγοκέντρηση για 2' στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου, η πελέτα επαναδιαλύεται σε 70μl H₂O και το διάλυμα ποσοτικοποιείται.

A1β) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΚΛΙΜΑΚΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ NUCLEOBOND XTRA MIDI KIT (MACHEREY-NAGEL)

Υλικά:

NUCLEOBOND XTRA MIDI KIT (MACHEREY-NAGEL)

Διαδικασία

Πραγματοποιείται ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας σε 100ml LB/αντιβιοτικό επιλογής στους 37 °C και φυγοκέντρηση για 20' στις 3000 rpm, επαναδιάλυση της πελέτας σε 8ml ρυθμιστικού διαλύματος RES+RNAseA, προσθήκη 8ml ρυθμιστικού διαλύματος LYS, ήπια ανάδευση 5 φορές και επώαση για 5' σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 8ml ρυθμιστικού διαλύματος NEU και ήπια ανάδευση 10 φορές, εισαγωγή του δείγματος στο φίλτρο της στήλης (η οποία έχει εξισορροπηθεί με 12 ml ρυθμιστικού διαλύματος EQU) και απομάκρυνση με τη βοήθεια της βαρύτητας. Έπειτα από ξέπλυμα του φίλτρου με 5 ml EQU, ακολουθεί απομάκρυνση του φίλτρου, ξέπλυμα με 8 ml ρυθμιστικού διαλύματος WASH και προσθήκη 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ELU το οποίο και συλλέγεται. Ακολουθεί προσθήκη 3.5 ml ισοπροπανόλης, ανάδευση και φυγοκέντρηση για 30' στις 10500 rpm στους 4 °C, ξέπλυμα της πελέτας με 2 ml 75% αιθανόλη, επαναδιάλυση σε 80 μl H₂O και ποσοτικοποίηση.

A2) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (MINIPREP)

Διαλύματα:

P1, P2, P3: Βλ. Παράγραφο A1α.

Διαδικασία

Μία οληνύκτια καλλιέργεια βακτηρίων του 1.5 ml φυγοκεντρείται για 1' στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα από την απομάκρυνση του υπερκείμενου προστίθενται 200 μl P1 και αναδεύεται. Ακολουθεί προσθήκη 200μl P2, ελαφρά ανακίνηση και επώαση για 3' σε θερμοκρασία δωματίου. Στο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 200 μl P3 και ακολουθεί ανακίνηση με το χέρι, φυγοκέντρωση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη στο υπερκείμενο 420 μl ισοπροπανόλη και το μείγμα αναδεύεται έντονα (vortex), ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου και ξέπλυμα της πελέτας με 800μl 75% αιθανόλη. Η πελέτα επαναδιαλύεται σε 20 μl H₂O.

A3) ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΧΗΜΕΙΟΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Υλικά

LB (1lt):

10 gr tryptone peptone

8 gr NaCl

5 gr yeast extract

7.5 ml 1M NaOH

Διαδικασία

50 ml θρεπτικού διαλύματος LB εμβολιάζονται με 1/100 ολονύκτιας καλλιέργειας κυττάρων μέχρι η OD=0.6. Ακολουθεί επώαση της καλλιέργειας στον πάγο (4°C) για 10' και φυγοκέντρωση στις 3000 rpm στους 4°C. Η πελέτα επαναδιαλύεται σε 5 ml παγωμένου 100 mM CaCl₂ και επωάζεται στον πάγο για 45'. Ακολουθεί επαναφυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες και επαναδιάλυση σε 2 ml παγωμένου 100mM CaCl₂/10% γλυκερόλη. Τα κύτταρα μοιράζονται σε δείγματα των 100 μl και φυλάσσονται στους -80°C.

A4) ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΧΗΜΕΙΟΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα χημειοεπιλεκτικά κύτταρα αφήνονται να ξεπαγώσουν στον πάγο (4°C) και σε αυτά προστίθενται 10 ng πλασμιδίου ή 10 μl από την αντίδραση λιγάσης. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30', πραγματοποίηση θερμικού σοκ στους 42°C για 1' 30'' και επώαση στον πάγο για 1'. Στο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 800μl LB και η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί στους 37 °C για 45'. Τέλος ακολουθεί επίστρωση σε τριβλίο επιλογής.

A5) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του QIAGEN Gel Extraction KIT. Κατά τη διαδικασία αυτήν,

απομονώνεται το τμήμα της αγαρόζης που περιέχει το ζητούμενο DNA και έπειτα από τη ζύγισή του, προστίθενται 300μl QX1 ρυθμιστικό διάλυμα για κάθε 100mg αγαρόζης και 10μl glassmilk (ανακινείται καλά πριν τη χρήση του). Ακολουθεί επώαση στους 56°C για 10', φυγοκέντρηση για 20'' στις 13000rpm, επαναδιάλυση σε 500 μl QX1, επαναφυγοκέντρηση και επαναδιάλυση σε 500μl PE ρυθμιστικό διάλυμα με επακόλουθη φυγοκέντρηση (δισ). Η πελέτα επαναδιαλύεται σε 20 μl H₂O και αφήνεται στους 56°C για 10'. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 30'' στις 13000rpm και συλλογή του υπερκειμένου.

A6) ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ DNA

Ο όγκος της αντίδρασης αυξάνεται στα 100μl με H₂O, προστίθεται ίσος όγκος phenol/CHCl₃ και πραγματοποιείται έντονη ανάδευση (vortex). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5' στις 13000 rpm και προσθήκη στο υπερκείμενο 10μl 3M CH₃COONa και 500μl 100% αιθανόλη. Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex), φυγοκέντρηση για 10' στις 13000 και ξέπλυμα της πελέτας με 800μl 70% αιθανόλης. Η πελέτα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο TE ή H₂O.

A7) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR

Πραγματοποιείται αύξηση του όγκου της αντίδρασης στα 100μl με νερό, προσθήκη 1μl 0,5M EDTA, pH 8.0, προσθήκη 100μl phenol/CHCl₃ και έντονη ανάδευση (vortex), φυγοκέντρηση για 5' στις 13000 rpm και προσθήκη στο υπερκείμενο 15 μl NH₄OAc και 500μl 100% αιθανόλη και έντονη ανάδευση (vortex). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10' στις 13000 rpm, απομάκρυνση του υπερκειμένου, ξέπλυμα της πελέτας με 800μl 70% και επαναδιάλυση σε 20μl H₂O.

A8) ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)/ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ENZYMA

Οι συνθήκες για τις αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν για την σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παραγωγή των αντιγονικών πεπτιδίων των Frem1, Frem2 και Frem3 περιελάμβαναν 30 κύκλους στους 59°C με τη χρήση των σετ εκκινήτων RC5/RC6, RC1/RC2 και RC3/RC4 αντίστοιχα (βλ Παράγραφο Z, ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ). Τα προϊόντα PCR έπειτα από τον καθαρισμό τους υπέστησαν πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI/XhoI (Frem1) και NdeIKlenow/XhoI (Frem2, Frem3) και κλωνοποιήθηκαν στους προκαρυωτικούς φορείς pJC20 (Clos and Brandau, 1994) στις θέσεις BamHI/XhoI (Frem1) και pRSETA (Invitrogen) στις θέσεις BamHIKlenow/XhoI (Frem2, Frem3). Αναλυτικότερα, οι αντιδράσεις περιγράφονται στην εργασία του μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης.

B) ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ (*Saccharomyces cerevisiae*)

B1) ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΖΥΜΗΣ ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA

Υλικά:

YPD (1lt):

6.0 g Yeast extract
12.0 g Peptone
12.0 gr γλυκόζη
60 mg Adenine hemisulphate
12 g Bacto-agar

SC (1lt):

6.7 g Yeast Nitrogen Base (w/o aminoacids)
20 gr γλυκόζη
2 gr μείγματος αμινοξέων (Ala, Arg, Asp, Asn, Cys, Glu, Gln, Gly, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val)
20 gr αγαρ

Διαλύματα:

Λευκίνη (Leu) 180M 100x:

2.36 gr σε 100ml H₂O

Ουρακίλη (Ura) 20mM 100x:

0.2242 gr σε 100ml H₂O

Ιστιδίνη (His) 100mM 300x:

1.552 gr σε 100ml H₂O

Τρυπτοφάνη (Trp) 55mM 100x:

1.123 gr σε 100ml H₂O

Αδενίνη (Ade) 100mM 100x:

0.23 gr σε 50ml H₂O

Διαδικασία

5 ml καλλιέργειας ζύμης αφήνεται να αναπτυχθεί σε θρεπτικό YPD. Την επόμενη ημέρα η καλλιέργεια αραιώνεται ώστε η OD=0.25. Όταν η OD=0.6, η

καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 5' στις 3000 rpm και η πελέτα επαναδιαλύεται σε ½ του όγκου της αρχικής καλλιέργειας απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5' στις 3000 rpm και επαναδιάλυση σε 1ml 100 mM LiAc. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται για 10'' στις 13000 rpm και η πελέτα επαναδιαλύεται σε 400 µl 100 mM LiAc. Ακολουθεί κατανομή σε δοκιμαστικούς σωλήνες του 1.5 ml ανάλογα με τον αριθμό των μετασχηματισμών που πραγματοποιούνται (~10⁸ κύτταρα ανα μετασχηματισμό) και φυγοκέντρηση για 10'' στις 13000 rpm. Έπειτα από την αφαίρεση του LiAc, προστίθενται (με τη σειρά που αναγράφονται):

240 µl 50% PEG 3350

30 µl 1M LiAc

5 µl φορέας DNA (5µg/µl)

70 µl H₂O και DNA (συνολικά 7µg)

Τα κύτταρα επαναδιαλύονται με έντονη ανάδευση (vortex), επωάζονται για 30' στους 30°C, στη συνέχεια για 30' στους 42°C. Έπειτα από το πέρας των επωάσεων, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10'' στις 13000 rpm και και αφαίρεση του υπερκειμένου. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 200 µl θρεπτικού SC και επιστρώνονται σε πιάτο επιλογής.

B2) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΥΖΕΥΞΗΣ ΣΤΗ ΖΥΜΗ

Στελέχη ζυμομύκητα διαφορετικού συζευκτικού τύπου (**PJ69-4a** και **PJ69-4A**) μετασχηματίζονται με πλασμιδιακό DNA και αναπτύσσονται σε τριβλία που δεν περιέχουν το συστατικό επιλογής ώστε να καταστεί απαραίτητη η διατήρηση του μετασχηματισθέντος πλασμιδίου στο κύτταρο (το πλασμίδιο περιέχει τα γονίδια για τη σύνθεση των συστατικών επιλογής). Έπειτα από απομόνωση μοναδιαίων αποικιών, αυτές αναπτύσσονται σε υγρή καλλιέργεια των 20 ml σε πλούσιο θρεπτικό μέσο YPD έως ότου η OD=0.6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5' στις 3000 rpm και επαναδιάλυση της πελέτας σε 100 µl YPD. Οι πελέτες από κύτταρα διαφορετικού συζευκτικού τύπου αναμιγνύονται προσεκτικά πάνω σε στερεό θρεπτικό μέσο YPD και επωάζονται στους 30°C για 6 ώρες. Έπειτα από το πέρας του χρονικού διαστήματος αυτού, τα διπλοειδή κύτταρα μπορούν να παρατηρηθούν στο οπτικό μικροσκόπιο, καθώς εμφανίζουν μία χαρακτηριστική μορφολογία (shmoo). Τα διπλοειδή κύτταρα απομακρύνονται από το θρεπτικό μέσο YPD και επαναδιαλύονται σε 150µl SC. Ακολουθεί επίστρωσή τους σε τριβλίο επιλογής (στη συγκεκριμένη περίπτωση περιέχει αδενίνη, ουρακίλη και 3mM 3- Aminotriazole) και παρατήρηση της ανάπτυξης των κυττάρων.

B3) ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΖΥΜΗΣ

Διαλύματα:

A:

40mM KPO₄

500mM MgCl₂/0.8 ml 10% φορμαλδεΰδη

B:

Ρυθμιστικό διάλυμα A χωρίς φορμαλδεΰδη

Γ:

Ρυθμιστικό διάλυμα B /1.2 M σορβιτόλη

Blocking solution:

0.1M Tris/HCl pH 7.5

0.15M NaCl

0.5% blocking reagent (Perkin-Elmer)

Διαδικασία

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε 5ml θρεπτικό επιλογής έως ότου η OD=0.6. Στη συνέχεια προστίθενται 3.4 ml 10% φορμαλδεΰδη και τα κύτταρα αναδεύονται στους 30°C για 10'. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 3', επαναδιάλυση σε 1.2 ml ρυθμιστικού διαλύματος A και επώαση για μία ώρα στους 30°C. Τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα B, μία φορά με ρυθμιστικό διάλυμα Γ, φυγοκεντρούνται στις 2000 rpm για 3' και επαναδιαλύονται σε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος Γ. Στα κύτταρα προστίθενται 2μl 10mg/ml ζυμολύση (100T) για μιάμιση ώρα στους 30°C, ακολουθεί ξέπλυμα των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα Γ και επαναδιάλυση σε 100μl από αυτό. Στην αντικειμενοφόρο τοποθετούνται 20 μl από τα κύτταρα, αφού προηγουμένως έχει υποστεί επεξεργασία με διάλυμα πολυλυσίνης (Sigma) για 1 ώρα στους 65°C, έπειτα από καθάρισμα με αιθανόλη. Για την προσκόλληση των κυττάρων στην αντικειμενοφόρο απαιτείται να αφεθούν σε αυτήν για 30' σε θερμοκρασία δωματίου σε περιβάλλον κορεσμένο με υδρατμούς ώστε να μην αφυδατωθούν. Έπειτα από το πέρας του μισαώρου, τα κύτταρα εμβαπτίζονται σε παγωμένη μεθανόλη για 6' και αμέσως μετα σε παγωμένη ακετόνη για 30'. Ακολουθούν 3x4' ξεπλύματα με 0,05% Tween/PBS, 1x10' ξέπλυμα με 0.1% Triton X-100/PBS, 3x4' ξεπλύματα με 0,05% Tween/PBS και επώαση για 1 ώρα με blocking solution. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα διαλυμένο σε blocking solution και την επόμενη ημέρα ακολουθούν 3x4' ξεπλύματα με 0,05% Tween/PBS, επώαση για 30' με το κατάλληλο φθορίζον δευτερογενές αντίσωμα σε αραιώση 1:500 (Molecular Probes), 3x4' ξεπλύματα με 0,05% Tween/PBS, 1x5' επώαση με DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) για χρώση του πυρήνα και 3x4' ξεπλύματα με 0,05% Tween/PBS. Τέλος οι αντικειμενοφόροι καλύπτονται με Moviol και τα δείγματα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο.

B4) ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΤΕΡΕΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ ΜΕ ΧΡΩΜΟΓΟΝΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactoside)

Σε 200 ml H₂O προστίθενται 1.4 gr YNB-AA, 4 gr γλυκόζης, 3 gr άγαρ τα οποία διαλύονται έπειτα από αποστείρωση. Το διάλυμα ψύχεται στους 65°C και προστίθενται 20 ml 0.7M Potassium Phosphate pH7 (για 1 λίτρο αναμιγνύονται 75 gr KH₂HPO₄ και 36.88 gr KH₂PO₄) και 200μl X-gal (40mg/ml). Το μείγμα μοιράζεται σε τριβλία petri και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου απουσία φωτός.

Γ) ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

Γ1) ΠΡΟΣΩΡΙΝΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ ΜΕ ΦΩΣΦΟΡΙΚΟ ΑΣΒΕΣΤΙΟ

Διαλύματα:

2X HBS pH7.1:

274mM NaCl
10mM KCl
1.5 mM Na₂HPO₄·7H₂O
12mM Dextrose
42mM HEPES

Γενικά

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ανάμειξη του DNA με ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν φωσφορικά άλατα και χλωριούχο ασβέστιο, τα οποία προκαλούν το σχηματισμό εξαιρετικά μικρών κόκκων και στην μετέπειτα παρουσία αυτού του μείγματος στο θρεπτικό μέσο όπου αναπτύσσονται τα κύτταρα (μπορεί να επιτευχθεί απόδοση που φτάνει σ' ένα αριθμό 10-15 % σταθερά διαμολυσμένων κυττάρων). Παρακάτω περιγράφεται η διαδικασία διαμόλυνσης σε ένα πιάτο καλλιέργειας 35x10mm (SARSTEDT).

Διαδικασία

Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα (A) των 2ml προστίθενται 125 μl 2x HBS. Σε έναν δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα (B) προστίθενται 15.5 μl 2M CaCl₂, ο κατάλληλος όγκος πλασμιδιακού DNA ποσότητας 6μg, και ddH₂O μέχρι τα 125μl. Το περιεχόμενο του B αναμιγνύεται (vortex) στάγδην με το περιεχόμενο του A, το

μείγμα επωάζεται για 30' σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται στα κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε πυκνότητα 70% -80% στο πιάτο. Ο έλεγχος της επιτυχίας της διαδικασίας πραγματοποιείται με ανοσοφθορισμό έπειτα από 24-36 ώρες.

Γ2) ΠΡΟΣΩΡΙΝΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΛΙΠΟΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ (LIPOFECTION)

Γενικά

Η τεχνική χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό καλλιεργούμενων κυτταρικών σειρών και βασίζεται στη χρήση ενός συνθετικού κατιοντικού λιπιδίου, του DOTMA, N – {1 – (2, 3- dioleyloxy) propyl } – N, N, N- trimethylammonium chloride. Το μόριο αυτό ενώνεται αυθόρμητα με DNA και σχηματίζει κυστίδια μέσα στα οποία παγιδεύεται σε ποσοστό 100% το DNA. Η αποτελεσματικότητα της τεχνικής είναι 60-80 φορές μεγαλύτερη εκείνης που βασίζεται στους κόκκους συγκαθιζήματος DNA και φωσφορικού ασβεστίου.

Διαδικασία

Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα (A) των 2ml προστίθενται 245 μl DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) και 5 μl Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen). Το μίγμα αφήνεται να επωαστεί 5'. Σε ένα δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα (B) εισάγονται DMEM και κατάλληλος όγκος πλασμιδιακού DNA ποσότητας 2 μg, συνολικού όγκου 250 μl. Το περιεχόμενο του B προστίθεται στον A και ακολουθεί ήπια ανάδευση με το χέρι. Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30' και προστίθεται στα κύτταρα, τα οποία βρίσκονται σε πυκνότητα 70%-90% στο πιάτο. Η επιτυχία της διαμόλυνσης ελέγχεται με ανοσοφθορισμό έπειτα από 24-36 ώρες.

Γ3) ΠΡΟΣΩΡΙΝΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ (LIPID-MEDIATED TRANSFECTION)

Γενικά

Η παραπάνω τεχνική βασίζεται στη χρήση λιποσωμάτων (κυστιδίων φωσφολιπιδίων) που μεταφέρουν DNA, τα οποία συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων που διαμολύνουν. Το DNA διαπερνά το κυτταρόπλασμα και εν συνεχεία μπαίνει στον πυρήνα. Η δυσκολία εν μέρει της τεχνικής αυτής εντοπίζεται στην πολυπλοκότητα των τεχνικών παρασκευής λιποσωμάτων. Χρησιμοποιείται για τη δημιουργία τόσο προσωρινών μετασχηματισμένων κυττάρων, όσο και για μόνιμες (σταθερές) κυτταρικές σειρές και, παρόλο που η απόδοση δεν είναι υψηλότερη εκείνης άλλων τεχνικών, εν

τούτοις είναι χρήσιμη για διαμόλυνση κυτταρικών τύπων που δεν μετασηματίζονται χρησιμοποιώντας άλλες τεχνικές.

Διαδικασία

Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα (A) 2ml προστίθενται 95 μl 150mM NaCl και 5 μl Jet Pei Transfection Reagent. Το μίγμα αφήνεται να επωαστεί 5'. Σε ένα δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα (B) εισάγονται 150mM NaCl και κατάλληλος όγκος πλασμιδιακού DNA ποσότητας 2 μg, συνολικού όγκου 100 μl. Το περιεχόμενο του B προστίθεται στον A και ακολουθεί ήπια ανάδευση με το χέρι. Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30' και προστίθεται στάγδην στα κύτταρα, τα οποία βρίσκονται σε πυκνότητα 70% στο πιάτο. Ο έλεγχος της διαμόλυνσης πραγματοποιείται με ανοσοφθορισμό έπειτα από 24-36 ώρες.

Γ4) ΑΡΑΙΩΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΘΡΥΨΙΝΗΣ (SPLIT)

Αφού αφαιρεθεί το θρεπτικό μέσο, προστίθενται στην καλλιέργεια 5 ml αποστειρωμένου PBS, το οποίο αναδεύεται ήπια. Το PBS απομακρύνεται και προστίθενται 3 ml θρυψίνης/EDTA 1X (Biosera). Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 5' και προσθήκη 7 ml θρεπτικού μέσου DMEM (High glucose, L0104/500, Biosera)/10%FBS (Biosera)/0.1% Gentamycin sulphate 50mg/ml (Biosera). Έπειτα από φυγοκέντρηση για 5' στις 1000 rpm, αφαιρείται το υπερκείμενο και η πελέτα επαναδιαλύεται σε 10ml θρεπτικού μέσου ώστε να αραιωθεί κατάλληλα.

Γ5) ΠΑΓΩΜΑ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ STOCKS)

Ακολουθούνται τα βήματα 1-5 του πρωτοκόλλου 'ΑΡΑΙΩΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΘΡΥΨΙΝΗΣ (SPLIT)', η πελέτα επαναδιαλύεται σε 1700 μl θρεπτικού μέσου και έπειτα από καλή επαναδιάλυση με πιπετάρισμα μοιράζεται ισόποσα σε 2 cryo-vials του 1 ml (Nalgene). Στα cryo-vials προστίθενται 150 μl DMSO και ακολουθεί ήπια ανάδευση και μεταφορά τους στους -80°C για μία ημέρα. Την επόμενη ημέρα μεταφέρονται σε ατμούς υγρού αζώτου (-196°C) όπου και διατηρούνται.

Γ6) ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Διαλύματα:

Blocking solution:

0.1M Tris/HCl pH 7.5

0.15M NaCl

0.5% blocking reagent (Perkin-Elmer)

Τα κύτταρα μονιμοποιούνται στην καλυπτρίδα με 4% PFA (Paraformaldehyde) για 5' και ακολουθούν 3x4' ξεπλύματα με 0,05% Tween/PBS, 1x10' ξέπλυμα με 0.1% Triton X-100/PBS, 3x4' ξεπλύματα με 0,05% Tween/PBS και επώαση για 1 ώρα με blocking solution. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα διαλυμένο σε blocking solution, 3x4' ξεπλύματα με 0,05% Tween/PBS, επώαση για 30' με το κατάλληλο φθορίζον δευτερογενές αντίσωμα σε αραιώση 1:500 (Molecular Probes), 3x4' ξεπλύματα με 0,05% Tween/PBS, 1x5' επώαση με DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) για χρώση του πυρήνα, 3x4' ξεπλύματα με 0,05% Tween/PBS και κάλυψη με Moviol, ώστε τα δείγματα να παρατηρηθούν στο οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού.

Δ) ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Δ1) ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ:

Υλικά:

PBS (Phosphate-buffered saline-φωσφορικό άλας):

1.5M NaCl

0.4M Na₂HPO₄

0.05M NaH₂PO₄

PFA (Paraformaldehyde- παραφορμαλδεΰδη 4%):

40 gr PFA διαλύονται σε 1xPBS (προθερμασμένο στους 60°C). Το μείγμα ανακατεύεται ήπια στους 58-60°C, μέχρι να διαλυθεί. Στην περίπτωση που το μείγμα δεν διαλύεται γρήγορα προστίθενται μερικές σταγόνες 1M NaOH, ωστόσο γίνει διαυγές. Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι 7.4-7.6. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

Διαδικασία

Τα δείγματα μονιμοποιούνται σε 4% PFA, στους 4°C με ήπια ανακίνηση. Ο χρόνος μονιμοποίησης εξαρτάται από το μέγεθος των δειγμάτων. Όσο μεγαλώνει το μέγεθος, μεγαλώνει και ο χρόνος παραμονής στο διάλυμα. Ακολουθούν ξεπλύματα με PBS ανάλογα με το μέγεθος των δειγμάτων.

Δ2) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΩΝ ΜΕ 0.5% ΖΕΛΑΤΙΝΗ, 0.05% KCr(SO₄)₂-12H₂O

Σε 300ml H₂O προσθέτουμε 1,5 gr ζελατίνης και αναδεύουμε με μαγνητικό αναδευτήρα στους 50°C. Όταν διαλυθεί η ζελατίνη, προσθέτουμε 150mg

KCr(SO₄)₂·12H₂O και συνεχίζουμε την ανάδευση. Περιμένουμε να κρυώσει το διάλυμα και εμβαπτίζουμε για 10' τα πλακάκια σε αυτό.

Δ3) ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΓΚΛΕΙΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥΣ ΣΕ ΚΡΥΟΤΟΜΟ

Υλικά:

10% σουκρόζη σε 1x PBS

30% σουκρόζη σε 1x PBS

Διαδικασία

Μετά την μονιμοποίηση με PFA 4%, τα δείγματα ανακινούνται για 30' σε διάλυμα που περιέχει 10% σουκρόζη σε PBS στους 4°C, και στη συνέχεια με διάλυμα που περιέχει 30% σουκρόζη έως ότου το δείγμα να απορροφήσει τη σουκρόζη. Έπειτα από την αφαίρεση της περίσσειας σουκρόζης, το δείγμα παγώνεται σε ισοπεντάνιο και αποθηκεύεται στους -80°C. Πριν τη χρησιμοποίηση για κρυοτομές, τα δείγματα περιβάλλονται από υγρό κρυοπροστασίας (OCT).

Δ4) IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ RNA (DIG-LAB)

Υλικά:

Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης:

50% φορμαμίδιο

5% SSC

5x Denhardts

250μg/ml yeast t-RNA

500μg/ml herring sperm DNA

B1:

0.1M Tris pH 7.5 και 0.15 NaCl

B2:

B1 + 1% FCS

B3:

0.1M Tris pH9.5, 0.1M NaCl, 50mM MgCl₂

Διάλυμα ακετυλίωσης:

295ml H₂O

4ml triethanolamine

0.525ml 37% HCl

0.75ml οξικός ανυδρίτης

Διαδικασία

Μέρα 1:

Οι αντικειμενοφόροι μονιμοποιούνται σε 4% PFA-PBS για 10' σε θερμοκρασία δωματίου, ξεπλένονται 3 φορές με PBS/Tween 0.1% και ακολουθεί ακετυλίωση σε διάλυμα ακετυλίωσης, το οποίο έχει αναδευθεί καλά, για 10' σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 ξεπλύματα με PBS/Tween 0.1% και σε κάθε αντικειμενοφόρο τοποθετούνται 200-300μl ρυθμιστικού διαλύματος προϋβριδοποίησης. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε 5xSSC, 50% φορμαμίδιο (Για 100 ml: 12.5ml 20xSSC, 50ml φορμαμίδιο και H₂O) και οληνύκτια επώαση στους 72°C.

Μέρα 2:

Οι καλυπτρίδες απομακρύνονται σε 5xSSC στους 72 °C και οι αντικειμενοφόροι μεταφέρονται σε 0.2xSSC στους 72 °C για 1 ώρα (Για 100ml: 1ml 20xSSC, 99ml H₂O), σε 0.2xSSC σε θερμοκρασία δωματίου για 5' και σε διάλυμα B1 σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Πάνω στις αντικειμενοφόρους τοποθετείται ~1ml B1 με 10% FCS για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια 300-400 μl αντι-DIG αντίσωμα (αραίωση 1:5000) σε B1 και 1% FCS. Ακολουθεί οληνύκτια επώαση στους 4°C.

Μέρα 3:

Οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται τρεις φορές επί 5' με B1, ακολουθούν τρία δεκάλεπτα ξεπλύματα με B3 και στις αντικειμενοφόρους τοποθετείται 1ml από το διάλυμα B4. Η επώαση διαρκεί για αρκετές ώρες η ημέρες και η αντίδραση σταματάει με TE ή PBS. Ακολουθεί αφυδάτωση με κλιμακούμενη διαβάθμιση αιθανόλης, ξυλόλης και κάλυψη με Entellan.

Δ5) ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΡΥΟΤΟΜΕΣ

Υλικά:

Blocking solution:

0.1M Tris/HCl pH 7.5

0.15M NaCl

0.5% blocking reagent (Perkin-Elmer)

Διαδικασία

Τα δείγματα ξεπλένονται 3 φορές με 0.05% Tween in PBS, ακολουθεί ένα 10λεπτο ξέπλυμα με 0.1% Triton in PBS, 3 ξεπλύματα με 0.05% Tween in PBS και επώαση με blocking solution για 1 ώρα. Στη συνέχεια ακολουθεί οληνύκτια επώαση με κατάλληλη αραίωση του πρώτου αντισώματος σε blocking solution στους 4°C, 3 ξεπλύματα με 0.05% Tween in PBS και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα (goat- anti rabbit) σε 1:500 αραίωση σε blocking solution για 30' στο

σκοτάδι. Τα δείγματα ξεπλένονται 2 φορές με 0,05% Tween in PBS και πραγματοποιείται επώαση με RNase A (1:500 αραιώση) σε 0.05% PBS-Tween για 30' στους 37°C, 3 ξεπλύματα με 0,05% Tween in PBS, χρώση με propidium iodide (αραιώση 1:1000) σε 0.05% PBS-Tween για 5' σε θερμοκρασία δωματίου, 3 ξεπλύματα με 0.05% Tween in PBS και κάλυψη με Moviol.

Ε) ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ε1) ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΣΕ MEMBRANE PVDF

Υλικά:

Running buffer (12%)

4.8ml 30% ακρυλαμίδη
3.55 ml H₂O
3.35 ml 1M Tris pH 8.9
133.5 μl 10% SDS
187 μl 10% APS
13.5μl TEMED

Stacking buffer (12%)

1.7 ml 30% ακρυλαμίδη
4.7 ml H₂O
3.4 ml 0.5M Tris pH 6.8
99 μl 10% SDS
149 μl 10% APS
10 μl TEMED

Transfer buffer

20 mM Tris
150mM glycine
10% Methanol

PAGE (1x)

0.19M γλυκίνη
25mM Tris base
0.1% SDS

Loading buffer (2X):

0.1M Tris/HCl pH 8
0.2% μερκαπτοαιθανόλη
20% γλυκερόλη
2% SDS

0.002% bromophenol blue

Διαδικασία

Έπειτα από ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε διάλυμα PAGE (1x), το πήκτωμα τοποθετείται στην ειδική συσκευή για μεταφορά (transfer), αφού μετρηθούν οι διαστάσεις του. Στη συσκευή τοποθετείται ένα μικρό σφουγγάρι εμποτισμένο με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer), ένα χαρτί wattmann κομμένο στις διαστάσεις του πηκτώματος εμποτισμένο με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, το πήκτωμα, το οποίο φροντίζουμε να διατηρούμε υγρό και στη συνέχεια εφάπτεται με προσοχή η μεμβράνη PVDF, η οποία έχει εμποτιστεί με μεθανόλη. Ακολουθώντας, εφάπτεται ένα δεύτερο χαρτί watmann και σφουγγαράκι πάνω από τη μεμβράνη η συσκευή εφαρμόζεται στο ειδικό δοχείο, το οποίο γεμίζουμε με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Η μεταφορά πραγματοποιείται O/N στα 60V, 110 mA στους 4°C.

E2) WESTERN BLOTTING

Υλικά:

Διάλυμα A:

10mM Tris pH 7.5

0.9% NaCl

0.05% Tween

Διάλυμα B:

0.2% SDS

0.9% NaCl

0.5% Triton X-100

TBS:

20 mM Tris pH 7.5

150mM NaCl

Έπειτα από τη διαδικασία της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη PVDF, αυτή ξεπλένεται με με 5% dry milk σε TBS (blocking solution) για 2 ώρες σε RT, επώαζεται οληνυκτίς με το πρώτο αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση σε blocking solution στους 4°C και την επόμενη ημέρα ξεπλένεται με διάλυμα A για 10'. Ακολουθεί ξέπλυμα της μεμβράνης με διάλυμα B για 10' και στη συνέχεια με διάλυμα A για 10', επώαση με το δεύτερο αντίσωμα anti- HRP (αραιώση 1:10000 σε blocking solution) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ξέπλυμα της μεμβράνης με διάλυμα A για 10', με διάλυμα B για 10' και με διάλυμα A για 10'. Τέλος, στη μεμβράνη τοποθετείται μείγμα 700μl Oxidizing Reagent και 700μl Enhanced Luminal Reagent (Pierce) και επώαζεται για 5' στο σκοτάδι. Ακολουθεί έκθεση του φιλμ.

E3) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΑΠΟ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ 12%

Υλικά:

Running buffer(100 ml)

40 ml 30% ακρυλαμίδη
29.57 ml H₂O
27.9 ml 1M Tris pH 8.9
1108.05 µl 10% SDS
1557.71 µl 10% APS
112.455µl TEMED

Stacking buffer (40 ml)

6.18 ml 30% ακρυλαμίδη
16.92 ml H₂O
12.24 ml 0.5M Tris pH 6.8
356.4 µl 10% SDS
536.4 µl 10% APS
36 µl TEMED

Διαδικασία

Έπειτα από οληνύκτια ηλεκτροφόρηση (100V, 300mA) απομονώνεται η ζώνη πολυακρυλαμίδης που εμπεριέχει την πρωτεΐνη, αφού το πήκτωμα βαφεί πρώτα με υδατοδιαλυτή 0,75% Coomassie για 20'-1 ώρα. Με τη βοήθεια μιας σύριγγας τεμαχίζεται η πολυακρυλαμίδη και τοποθετείται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα 15 ml, στον οποίο προστίθενται 5ml 10mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl. Ακολουθεί O/N ανάδευση στους 4°C και την επόμενη μέρα η πολυακρυλαμίδη φυγοκεντρείται στις 2000 rpm για 20' στους 4°C, συλλέγεται το υπερκείμενο και επαναφυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες, ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα πολυακρυλαμίδης. Έπειτα από αποστείρωση, ακολουθεί έλεγχος και ποσοτικοποίηση με ηλεκτροφόρηση σε 12% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

E4) ΕΠΑΓΩΓΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)

Υλικά:

LB/Chl/Amp-agar (150ml)

1.6 gr NaCl
1 gr Yeast extract
0.035 mg/ml chloramphenicol

0.05 mg/ml Ampicillin
3 gr agar

Γενικά:

Το συνθετικό μόριο IPTG προσδένεται στον αναστολέα του υποκινητή της T7 πολυμεράσης και επάγει την ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου που μας ενδιαφέρει. Με τον τρόπο αυτόν πραγματοποιείται η έκφραση του εισαγόμενου γονιδίου σε μεγάλες ποσότητες. Τα στελέχη που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι BL21 βακτήρια, τα οποία περιέχουν και το πλασμίδιο PlysS (τους προσδίδει ανθεκτικότητα στη χλωραμφαινικόλη και ρυθμίζει αρνητικά τη διαδικασία αυτήν).

Διαδικασία

Αραίωση οληνύκτιας καλλιέργειας κυττάρων 1/100 έως ότου OD=0.6-0.7, προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM και επώαση για 3-6 ώρες υπό ανάδευση στους 37°C. Έλεγχος της έκφρασης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

E5) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ ΝΙΚΕΛΙΟΥ (QIAGEN)

Υλικά:

Ni-NTA agarose (QIAGEN)

Διαδικασία

Για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία αυτή, έχει προηγηθεί η επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών με IPTG σε καλλιέργειες των 50 ml και φυγοκέντρησή τους στις 3000 rpm για 20'. Ακολουθεί επαναδιάλυση της πελέτας σε 5 ml 50mM Tris pH7.5 και διάρρηξη των κυττάρων με την εφαρμογή υπερήχων (sonication). Η διαδικασία πραγματοποιείται στους 4°C, 10 φορές (80 παλμοί/δευτερόλεπτο με ενδιάμεσα διαλείμματα των 30'). Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 30' στις 13000 rpm, 4°C και συλλέγεται το υπερκείμενο, ενώ οι πελέτες επαναδιαλύονται σε 1ml 50mM Tris pH7.5/8M Urea και αναδεύονται έντονα. Έπειτα από επαναφυγοκέντρωση, συλλέγεται το υπερκείμενο και η πελέτα επαναδιαλύεται σε 1ml 50mM Tris pH 7.5/8M Urea. Η πρωτεΐνη εντοπίζεται με ηλεκτροφόρηση σε 12% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Πριν από τη διαδικασία καθαρισμού είναι απαραίτητη η εξισορρόπηση των σφαιριδίων νικελίου με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris pH7.5/8M Urea).

Εξισορρόπηση σφαιριδίων: 300μl σφαιριδίων, φυγοκεντρούνται για 5' στις 3000 rpm, το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθενται 2ml 50mM Tris pH 7.5/8M Urea και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5' στις 3000rpm και απομάκρυνση του υπερκειμένου (δισ).

Τα σφαιρίδια αναμιγνύονται με το πρωτεϊνικό διάλυμα και επωάζονται για 30'-60' στους 4°C υπό ανάδευση, φυγοκεντρώνται στις 3000 rpm για 5' και φυλάσσεται το υπερκείμενο. Στα σφαιρίδια προστίθενται 2ml 50mM Tris pH7.5/8M Urea και ακολουθεί φυγοκέντρωση 3 φορές στις 3000 rpm για 5' και απομάκρυνση του υπερκειμένου.

Για την έκλυση της πρωτεΐνης προστίθεται διαδοχικά 1 ml 50mM, 100mM και 200mM ημιδαζόλη σε 50mM Tris pH 7.5/8M Urea και έπειτα από ανακίνηση ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 5' και φύλαξη του υπερκειμένου. Τέλος πραγματοποιείται έλεγχος σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης για τον εντοπισμό της καθαρισμένης πρωτεΐνης.

E6) ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Υλικά:

Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices (MILLIPORE)

Οι συσκευές ξεπλένονται με 10 ml ddH₂O και εισάγεται το πρωτεϊνικό διάλυμα, το οποίο φυγοκεντρείται για 40' στις 2000rpm, 20°C. Απομακρύνουμε το flowthrough, εισάγουμε στη συσκευή 5 ml 10mM Tris pH 7.5/100mM NaCl και ανακατεύουμε με πιπετάρισμα. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 30' στις 2000 rpm, 20°C. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές μέχρι να απομακρυνθεί η ουρία. Ο τελικός όγκος του διαλύματος είναι 1.5 ml. Για την ποσοτικοποίηση του δείγματος πραγματοποιείται έλεγχος σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

ΣΤ) ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

ΣΤ1) ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ

Τα αντιγονικά πεπτίδια που παρήχθησαν έπειτα από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε γενωμικό DNA ποντικού είναι:

Frem1 (αμινοξέα 1500-1637):

VDSGGVAYQHSGGGAREDYFTFLATDRKNQGFVVDGKVKQKEPVRFTIQ
AMGLLNKGCYGIYITSRVLKASDPDTEDDQIFKILRGPLYGRLENTTTGEF
IHERFSQKDLSHKTILYIINPSLQVTSDILEFQAMDPT

Frem2 (αμινοξέα 231-400):

QVQGGAGDRGTSKTLMDCKAFQELGVRYRHTAPSRSPNRDWLPMVVE
LHSRGAPEGSPALKREHFQVLVRIRGGAENTAPKPSFVAMMMMEVDQFV
LTALTPDMLAAEDAESDPDLLIFNLTSAFQPGQGYLVSTDDRSPLSSFTQ
RDLRLLKIA YQPPSESDQERL

Frem3 (αμινοξέα 576-750):

EDEHLEGKEEETHEDLAPGSYSSSQHPGNMLLRQAEPSSLLYSDWHYVE
KEGLYETVVTEWLQRDIMEGRFFSHPGPHSPSPVAHLAFHVQDDQDPPN
LSNQHFFTISIQPADTSQPQLSPETTLEMTVQGYQLTPFQQKYLYTDQNS
DEQNLWYTLLTRPTDADSNHQVQA

ΣΤ2) ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Υλικά:

TBS:

20 mM Tris pH 7.5
150mM NaCl

Blocking Solution:

5% Dry milk σε TBS

Έπειτα από τη διαδικασία μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF, απομονώνεται η περιοχή που περιλαμβάνει την πρωτεΐνη υπό εξέταση και τοποθετείται για 5' στη χρωστική Ponceau (Sigma). Η χρωστική απομακρύνεται με νερό ώστε να αποκαλυφθεί η ζώνη που εμπεριέχει την πρωτεΐνη και η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε blocking solution για 45' (γίνονται δύο ενδιάμεσες αλλαγές). Ακολουθεί επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με τον ορρό του ανοσοποιημένου κουνελιού, 3 πεντάλεπτα ξεπλύματα της μεμβράνης με TBS και αυστηρά πεντάλεπτη έκλουση των αντισωμάτων με 400μl παγωμένης 0.2M γλυκίνης/HCl pH 2.5. Έπειτα από το πέρας της επώασης, ακολουθεί πρόσθεση στο διάλυμα 400μl 1M Tris pH 8.0/2% BSA και φύλαξη στους -20°C.

ΣΤ3) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΡΡΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΑΙΜΑ

Έπειτα από την αφαίμαξη, τα δείγματα αφήνονται 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή εναλλακτικά οληνυκτίς στους 4°C, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 30' στους 5°C, ο ορρός διαμοιράζεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες του 1.5 ml και φυγοκεντρείται για 3' στις 10000 rpm. Το υπερκείμενο συλλέγεται και αποθηκεύεται στους -20°C.

ΣΤ4) ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΟΡΡΟΥ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΕΝΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

Για τον έλεγχο της εξειδίκευσης του ορρού και των καθαρισμένων αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε western blot στο οποίο φάνηκε ότι ανιχνεύονται ειδικά οι πρωτεΐνες Frem1, Frem2 και Frem3 από τα αντισώματα καθώς και διαμόλυνση

ευκαρυωτικών κυττάρων με τα συγκεκριμένα πεπτίδια κλωνοποιημένα σε ευκαρυωτικούς φορείς έκφρασης, τα οποία ανιχνεύθηκαν με τα παραχθέντα αντισώματα (βλ. εργασία μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης).

Z) ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

Τα ολιγονουκλεοτίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάσθηκαν στο εργαστήριο μικροχημείας του ΙΤΕ και είναι:

Α) Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή αντισωμάτων:

RC1

5'-GGA AGG ATC CCA TAT GGC CGG AGA TAG AGG GAC CTC

RC2

5'-GGA ACT CGA GTT ATC CTT CAG GGT CCA CTA TCT CC

RC3

5'-GGA AGG ATC CCA TAT GGA AGA CGA ACA CCT GGA AGG

RC4

5'-GGA ACT CGA GTT ACT GGA CTT GAT GGT TGC TGT CAG

RC5

5'-GAC GCC AAG CTT GGG ACA CAA GAG CCC ATG CTG

RC6

5'-GAC GCC GGA TCC TTG CCT GGA TTG TGA AGC GAA C

β) Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του τμήματος των έξι πρώτων μοτίβων κυστεϊνών της Fras1 για κλωνοποίηση στον φορέα pACT2 και χρήση στο σύστημα 2 υβριδίων:

RC7

5'-GGA CGG ATC CGT GCT TGT CTG TAT CAG GGC TCC

RC8

5' - GGT CCT CGA GGG TGG CAG TGT ACT GGT GTG C

γ) Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του τμήματος του αυξητικού παράγοντα VEGF 164 που κλωνοποιήθηκε στο φορέα pGBT9 και χρησιμοποιήθηκε στο σύστημα 2 υβριδίων:

RC9

5'-GGA CGA ATT CCA GGC TGC ACC CAC GAC AG

RC10

5' - GGA CCT CGA GCC TGG CTC ACC GCC TTG G

δ) Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των καρβοξυτελικών κατασκευών των πρωτεϊνών Fras1 και Frem2:

GC242

5'-GAC CGA AGC TTG GCG CCA CAG CCT GAG G

RC11

5'-CCT GTG TCG ACT GCA TAT TCA GAT CCT CTT CTG

RC12

5'-GAC CGC TCG AGA GAG ATG AGG GAG GCC TTC AC

RC13

5'- CCT GTG ATA TCT TCT GAG GCA CAC GGA AGA GA

ε) Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την αφαίρεση τμημάτων χορδινών στα πειράματα κυτταρικής διαμόλυνσης:

RC14

5'-TAT AGG GAG ACC CAA GCT GGC TAG

RC15

5'-GGT CGG ATC CCT GGT GTG CAG TCT GGA CAG C

RC16

5'-GGT CGG ATC CTT GAA ATG CAT TCT GGG CAG C

RC17

5'-GGT CGG ATC CTG TCA GGA GTC GCA CAT TC

στ) Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την ένθεση του polylinker στην κατασκευή RC102

RC18

5'-AGG CTA GCA TGG TAC CAG TTA ACA GGA TAT

RC19

5'-CTA GAT ATC CTG TTA ACT GGT ACC ATG CTA GC

ζ) Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την ένθεση του Vegf σε ευκαρυωτικό φορέα έκφρασης

GC267

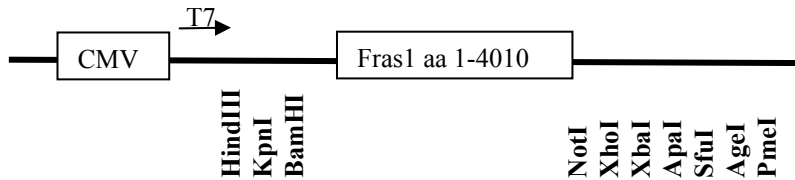
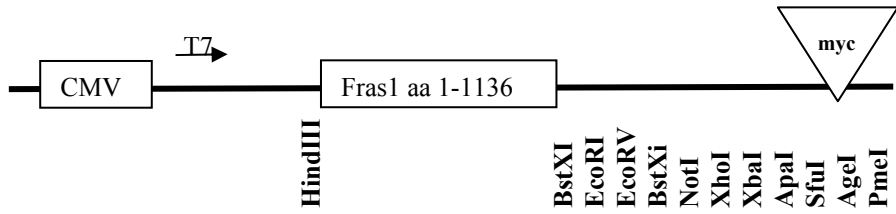
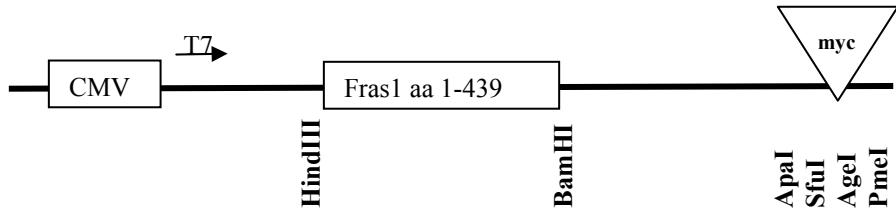
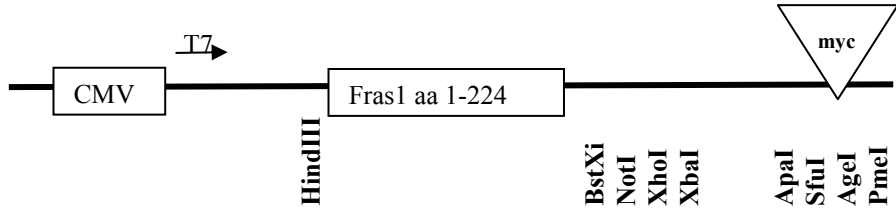
5'-CAG AGG ATC CAT GAA CTT TCT GCT CTC TTG

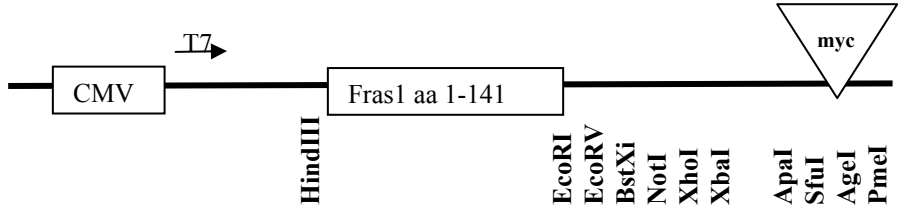
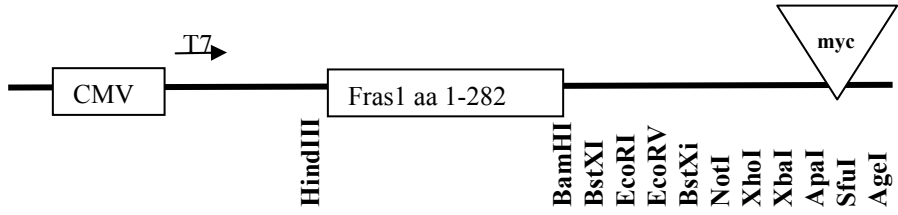
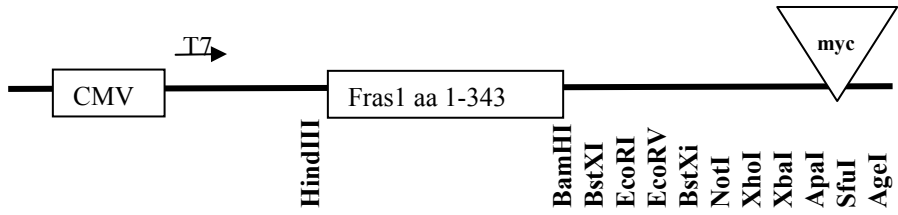
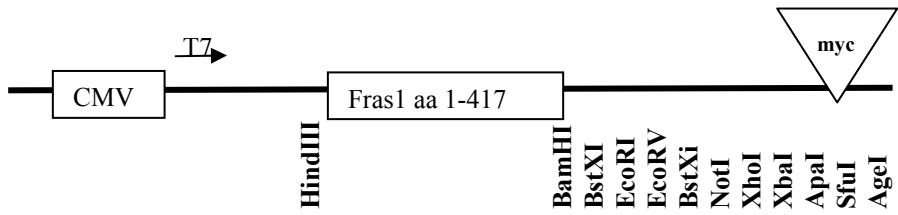
GC268

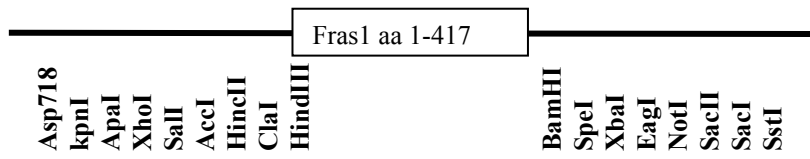
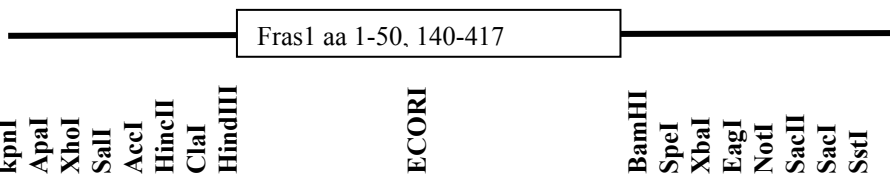
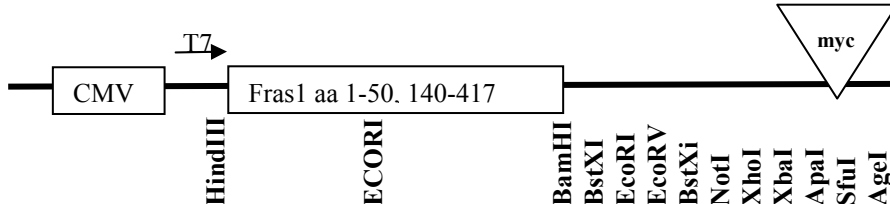
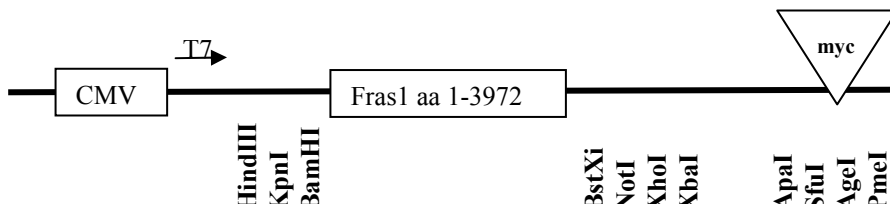
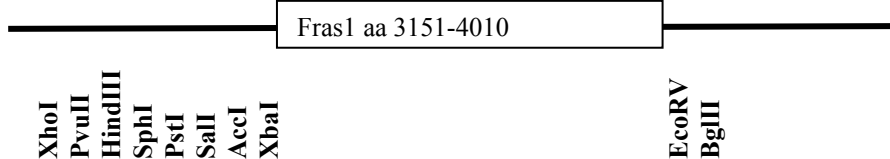
5'-GCT GTC TAG ACC GCC TTG GCT TGT CAC A

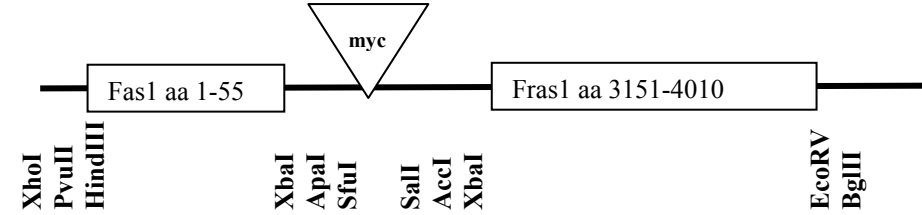
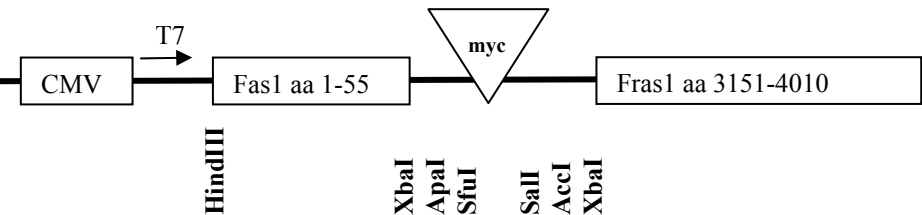
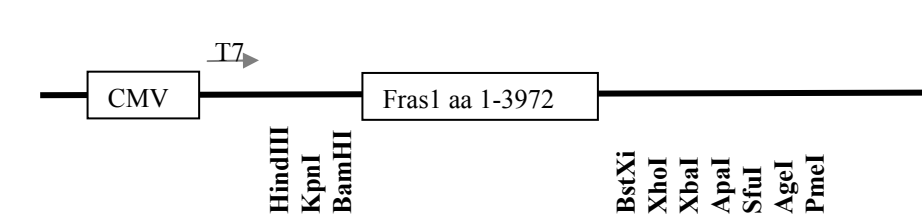
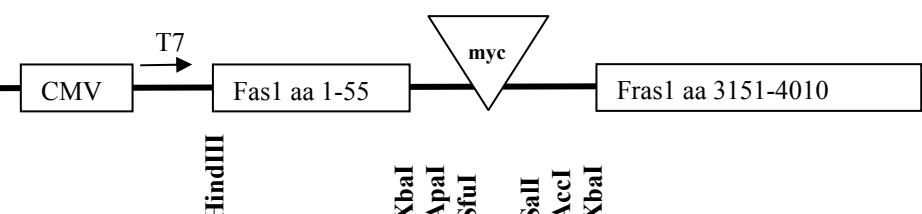
Η) ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

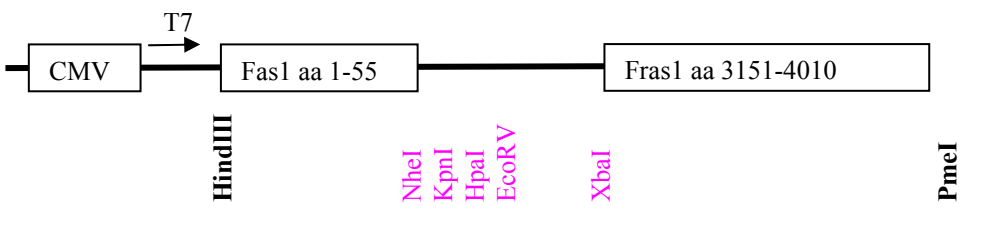
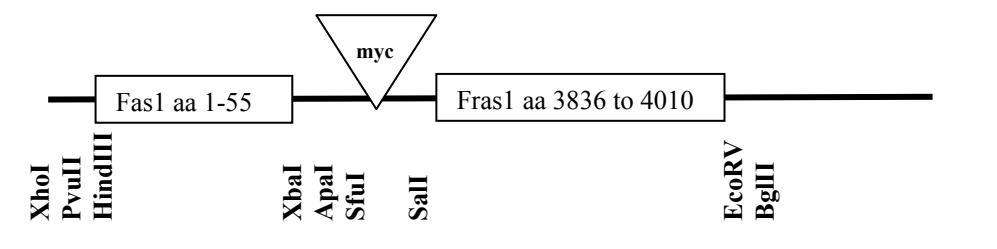
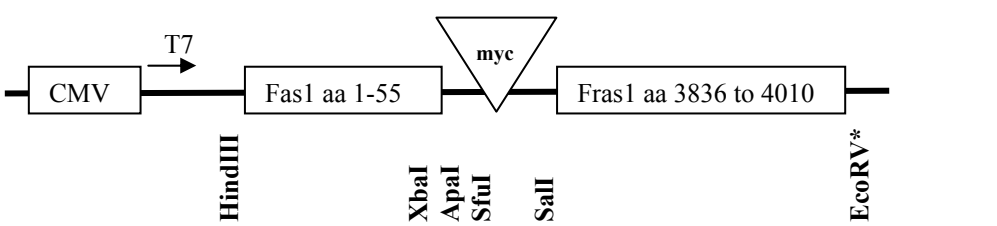
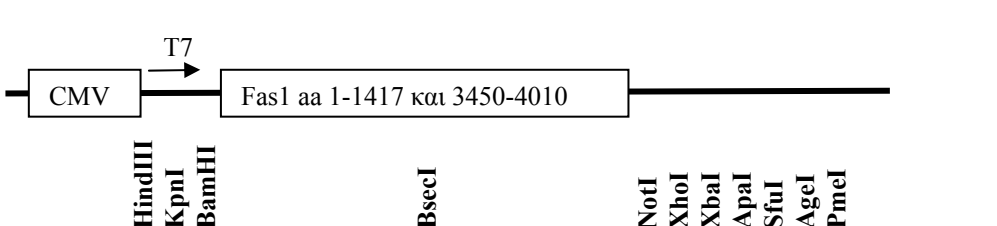
Οι γονιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

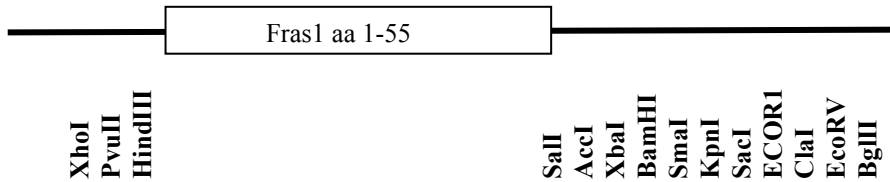
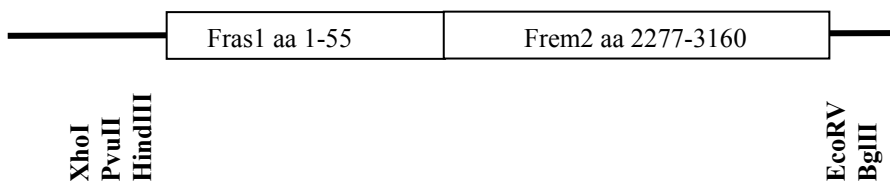
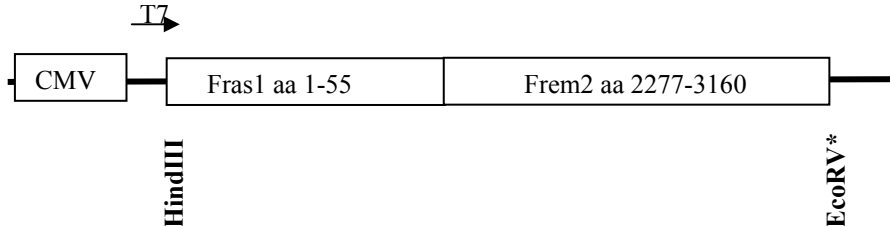
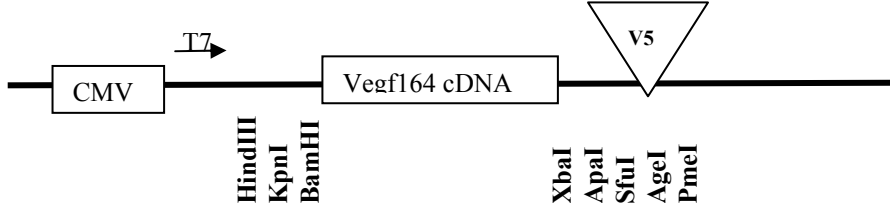
<p>RC61</p>	 <p>Φορέας: pCDNA31 V5 HisA, ECORV/NotI Ένθεμα: Fras1 cDNA, από το πλασμίδιο pW219, Sall(b)/NotI</p>
<p>PP28</p>	 <p>Φορέας: pCDNA31 myc HisC, HindIII(b)/BamHI Ένθεμα: Fras1 νουκλεοτίδια 1 έως 3492 (αμινοξέα 1-1136), από το πλασμίδιο pW219 Sall(b)/BglII</p>
<p>PP30</p>	 <p>Φορέας: pCMV-Fras1/Flag, BamHI (b) / XbaI(b) και επανασυγκόλληση (περιλαμβάνει τα νουκλεοτίδια 1-1401 του Fras1)</p>
<p>RC108</p>	 <p>Φορέας: pCDNA31 myc HisA, HindIII/ECORV Ένθεμα: Fras1 νουκλεοτίδια 1 έως 754 (αμινοξέα 1-224), από το πλασμίδιο PP30, HindIII/PvuII</p>

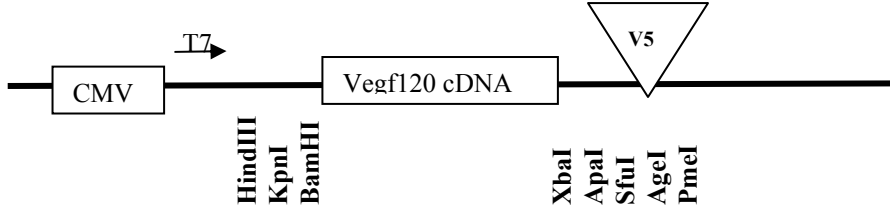
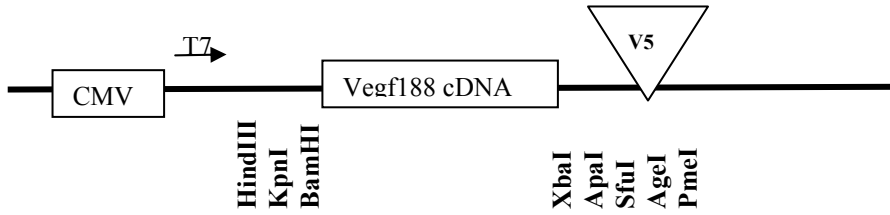
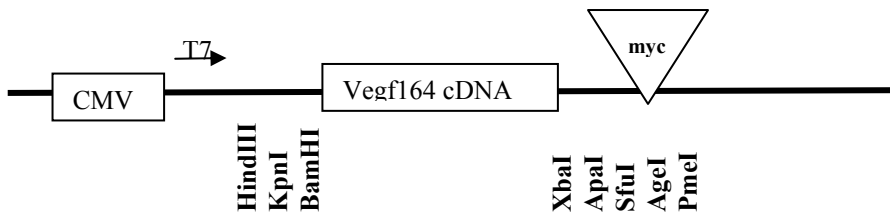
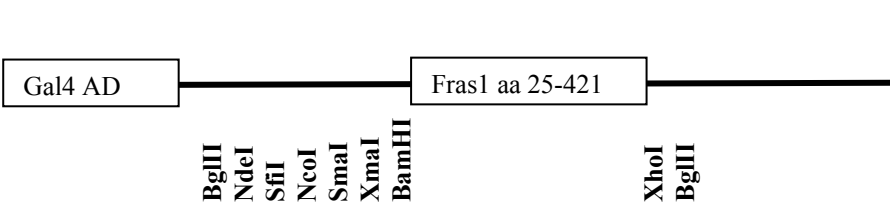
<p>RC109</p>	 <p>Φορέας: pCDNA31 myc HisA, BglII/EcoRI Ένθεμα: Fras1 νουκλεοτίδια 1 έως 505 (αμινοξέα 1-141), από το πλασμίδιο PP30, BglII/EcoRI</p>
<p>RC114</p>	 <p>Φορέας: pCDNA31 myc HisA, HindIII/BamHI Ένθεμα: Fras1 νουκλεοτίδια 1 έως 934 (αμινοξέα 1-282), από το πλασμίδιο PP30 πέψη προϊόντος PCR (εκκινητές RC14/RC17, βλ παρ. Ζ. Ολιγονουκλεοτίδια), HindIII/BamHI</p>
<p>RC115</p>	 <p>Φορέας: pCDNA31 myc HisA, HindIII/BamHI Ένθεμα: Fras1 νουκλεοτίδια 1 έως 1120 (αμινοξέα 1-343), από το πλασμίδιο PP30 πέψη προϊόντος PCR (εκκινητές RC14/RC16, βλ παρ. Ζ. Ολιγονουκλεοτίδια), HindIII/BamHI</p>
<p>RC116</p>	 <p>Φορέας: pCDNA31 myc HisA, HindIII/BamHI Ένθεμα: Fras1 νουκλεοτίδια 1 έως 1340 (αμινοξέα 1-417), από το πλασμίδιο PP30 πέψη προϊόντος PCR (εκκινητές RC14/RC15, βλ παρ. Ζ. Ολιγονουκλεοτίδια), HindIII/BamHI</p>

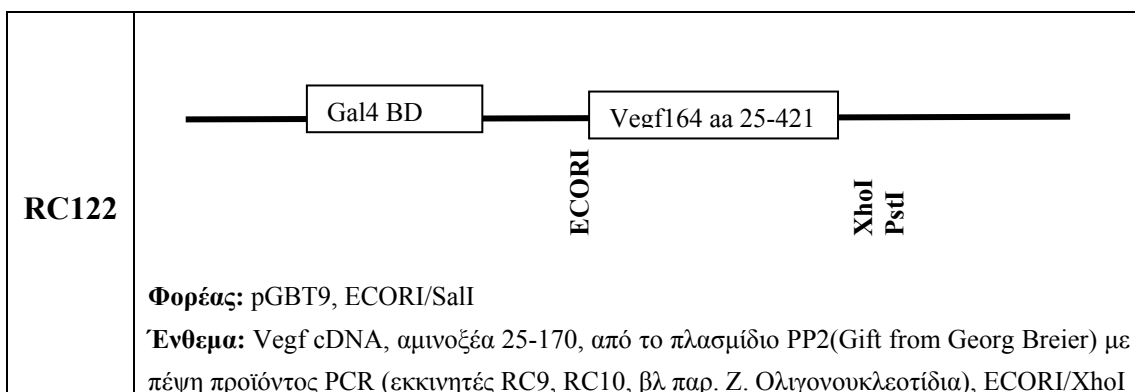
<p>RC117</p>	 <p>Φορέας: pBluescript KS, HindIII/BamHI Ένθεμα: Fras1 νουκλεοτίδια 1 έως 1340 (αμινοξέα 1-417), από το πλασμίδιο PP30 πέψη προϊόντος PCR (εκκινητές RC14/RC15, βλ παρ. Ζ. Ολιγονουκλεοτίδια), HindIII/BamHI</p>
<p>RC117 a</p>	 <p>Φορέας: RC117, NcoI(b)/EcoRI(b) και επανασυγκόλληση (περιλαμβάνει τα νουκλεοτίδια 1-237 και 505-1340 του Fras1, αμινοξέα 1-50 και 140-417)</p>
<p>RC120</p>	 <p>Φορέας: pCDNA31 myc HisA, HindIII/BamHI Ένθεμα: RC117a πέψη με HindIII/BamHI</p>
<p>PP23</p>	 <p>Φορέας: pCDNA31 myc HisA, HindIII/EcoRV Ένθεμα: Fras1 νουκλεοτίδια 1 έως 12001 (αμινοξέα 1-3972), από το πλασμίδιο RC61 πέψη HindIII/FspI</p>
<p>RC43</p>	 <p>Φορέας: psp72, XbaI/EcoRV Ένθεμα: PP14 (Fras1 στον pBluescript KS) πέψη με XbaI/EcoRV (νουκλεοτίδια 9537-12488, αμινοξέα 3151-4010)</p>

<p>RC70</p>	 <p>Φορέας: RC43, HindIII/SalI Ένθεμα: Fras1 νουκλεοτίδια 3-251 (αμινοξέα 1-55) μαζί με Myc επίτοπο, από το πλασμίδιο PP27 με πέψη προϊόντος PCR (εκκινητές GC242/RC11, βλ παρ. Z. Ολιγονουκλεοτίδια), HindIII/SalI</p>
<p>RC72</p>	 <p>Φορέας: pCDNA31 myc HisA, HindIII/ECORV *=βλ Polylinker pCDNA3.1 MycHisA Ένθεμα: RC70 πέψη με HindIII/ECORV</p>
<p>RC100</p>	 <p>Φορέας: PP23, NotI (b) και επανασυγκόλληση (περιλαμβάνει τα νουκλεοτίδια 1-12001 του Fras1)</p>
<p>RC102</p>	 <p>Φορέας: RC72, EcoRV AgeI(b) και επανασυγκόλληση</p>

<p>RC103</p>	 <p>Φορέας: RC102, XbaI Ένθεμα: Συνθετικός polylinker βλ. RC18-RC19 παρ Z. Ολιγονουκλεοτίδια</p>
<p>RC104 a</p>	 <p>Φορέας: RC70, AccI(b)/StuI (νουκλ. 11592 του Fras1, αμινοξύ 3836) και επανασυγκόλληση</p>
<p>RC104</p>	 <p>Φορέας: pCDNA31 myc HisA, HindIII/ECORV *=βλ Polylinker pCDNA3.1 MycHisA Ένθεμα: RC104a, HindIII/ECORV</p>
<p>RC126</p>	 <p>Φορέας: RC61, BSecI (νουκλ. 4334-10433) του Fras1, (φεύγουν τα αμινοξέα 1417- 3450) και επανασυγκόλληση</p>

<p>RC69</p>	 <p>Φορέας: psp72, HindIII/SalI Ένθεμα: Πέψη προϊόντος PCR από το πλασμίδιο RC34 με τους εκκινητές GC242-RC11, βλ παρ. Z. Ολιγονουκλεοτίδια (νουκλεοτίδια 3-251, αμινοξέα 1-55) , HindIII/SalI</p>
<p>RC71</p>	 <p>Φορέας: RC69, SalI/ECORV Ένθεμα: Πέψη προϊόντος PCR από τον Fras2 IMAGE κλώνο (καρβοξυτελικό τμήμα) με τους εκκινητές RC12-RC13, βλ παρ. Z. Ολιγονουκλεοτίδια (αμινοξέα 2277-3160), XhoI/ECORV</p>
<p>RC73</p>	 <p>Φορέας: pCDNA3.1 Myc HisA, HindIII/ECORV * =βλ polylinker pCDNA31 MycHisA Ένθεμα: RC71, HindIII/ECORV</p>
<p>PP8</p>	 <p>Φορέας: pCDNA31 V5 HisA, BamHI/XbaI Ένθεμα: Το cDNA του Vegf 164 από PCR του PP2 (Gift from Georg Breier) με τους εκκινητές GC267-GC268, βλ παρ. Z. Ολιγονουκλεοτίδια, BamHI/XbaI</p>

<p>PP7</p>	 <p>Φορέας: pCDNA31 V5 HisA, BamHI/XbaI Ένθεμα: Το cDNA του Vegf 120 από PCR του PP1 (Gift from Georg Breier) με τους εκκινητές GC267-GC268, βλ παρ. Z. Ολιγονουκλεοτίδια, BamHI/XbaI</p>
<p>PP9</p>	 <p>Φορέας: pCDNA31 V5 HisA, BamHI/XbaI Ένθεμα: Το cDNA του Vegf 188 από PCR του PP3 (Gift from Georg Breier) με τους εκκινητές GC267-GC268, βλ παρ. Z. Ολιγονουκλεοτίδια, BamHI/XbaI</p>
<p>PP5</p>	 <p>Φορέας: pCDNA31 Myc HisA, BamHI/XbaI Ένθεμα: Το cDNA του Vegf 164 από PCR του PP2 (Gift from Georg Breier) με τους εκκινητές GC267-GC268, βλ παρ. Z. Ολιγονουκλεοτίδια, BamHI/XbaI</p>
<p>RC124</p>	 <p>Φορέας: pActII, BamHI/XhoI Ένθεμα: Fras1 νουκλεοτίδια 161-1352 (αμινοξέα 25-421), από το πλασμίδιο PP30 με πέψη προϊόντος PCR (εκκινητές RC7, RC8, βλ παρ. Z. Ολιγονουκλεοτίδια), BamHI/XhoI</p>



Σημείωση:

Οι κατασκευές με το πρόθεμα PP κατασκευάστηκαν από τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Πέτρο Πέτρου.

Οι γενετικές κατασκευές της πρωτεΐνης Frem3 που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα τριπλής διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων παρασκευάστηκαν από τον υποψήφιο διδάκτορα Ευάγγελο Παυλάκη και περιλαμβάνουν α) Το τμήμα αμινοξέων 1-1640 (θέση BamHI), κλωνοποιημένο στη θέση BamHI του pCDNA31 Myc HisC και β) Το τμήμα αμινοξέων 1-1013 (θέση SpeI) του Frem3 κλωνοποιημένο στη θέση XhoI του pCDNA3.1MycHisC

Οι κατασκευές για την πρωτεΐνη Grip1, pGRIP1-GFP, pGRIP1-123GFP, pGRIP1-345GFP, pGRIP1b-GFP είναι μία ευγενική χορηγία του Δρ. R. Haganir.

Θ) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΔΥΟ ΣΤΑΔΙΩΝ

Στο ραχιαίο δέρμα, την ουρά και τα αυτιά νεογνών ποντικών στελέχους NMRI εφαρμόζονται 50 μl 0.4% DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene, Sigma) σε ακετόνη. Έπειτα από το πέρας 10 ημερών εφαρμόζονται εβδομαδιαίως 25 μl 2.5 % Croton Oil (Sigma) σε DMSO, ωσότου παρατηρηθεί η ανάπτυξη όγκων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

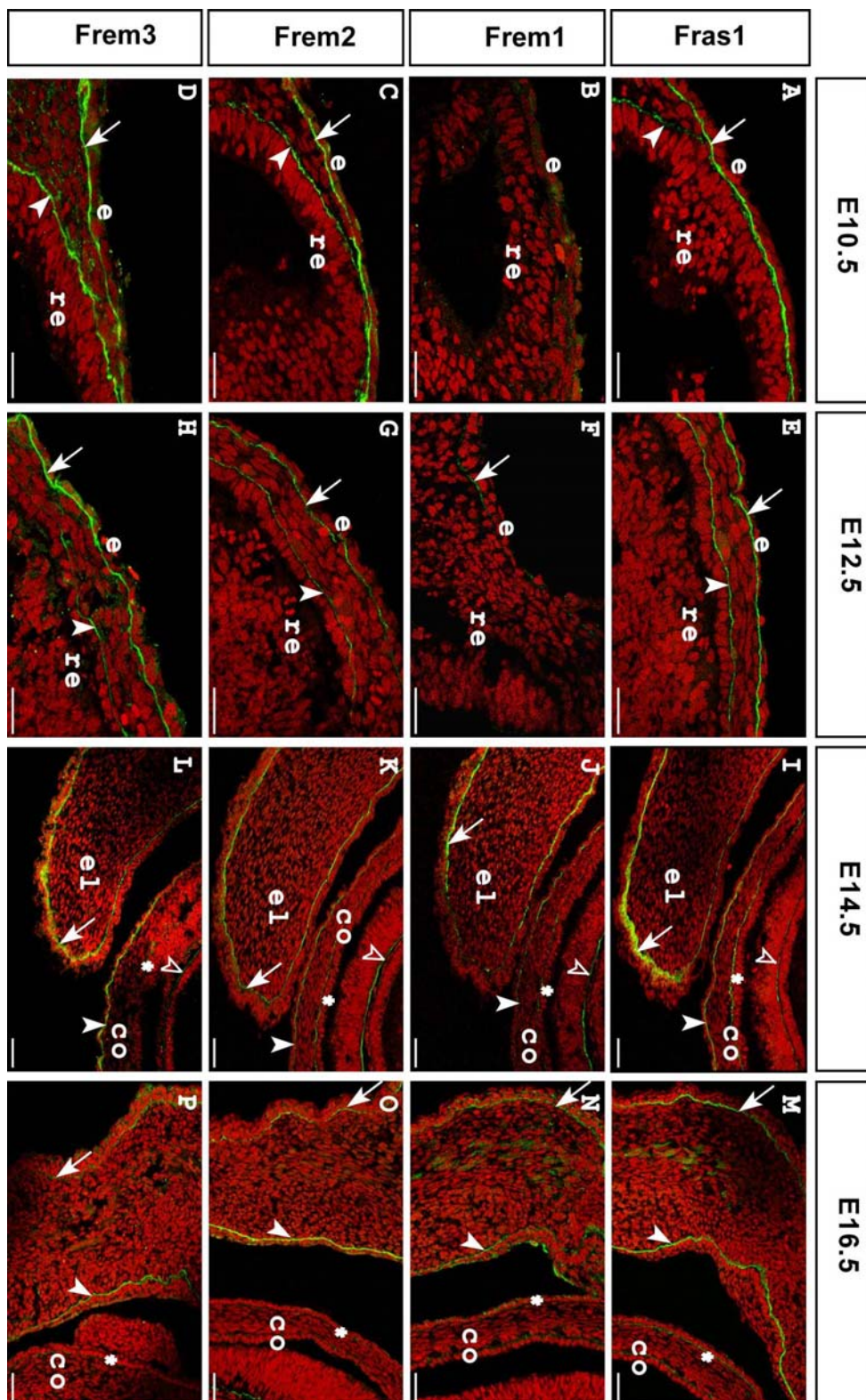
Α) ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Fras1/Frem ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΪΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Όπως προαναφέρθηκε, η έλλειψη των πρωτεϊνών Fras1/Frem στον ποντικό (με την εξαίρεση της Frem3, η απενεργοποίηση της οποίας βρίσκεται υπό εξέλιξη) οδηγεί σε παρόμοιο εμβρυϊκό φαινότυπο, που χαρακτηρίζεται από αποκόλληση της εμβρυϊκής επιδερμίδας από τη δερμίδα κυρίως στην περιοχή της κεφαλής και των άκρων, σε κρυπτοφθαλμία, συνδακτυλία και νεφρικές διαταραχές, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι πρωτεΐνες αυτές πιθανόν συμμετέχουν σε παρόμοια αναπτυξιακά μονοπάτια. Για να διαπιστωθεί κατά πόσο η παρεμφερής λειτουργική δράση των Fras1/Frem αντικατοπτρίζεται στην τοπολογία τους, πραγματοποιήθηκε μία ανοσοϊστοχημική μελέτη του προτύπου έκφρασής τους, κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του ποντικού.

Α1) Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1/Frem στον οφθαλμό κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη

Το πρώτο βήμα στη μελέτη του εντοπισμού των πρωτεϊνών Fras1/Frem κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του ποντικού ήταν ο προσδιορισμός του προτύπου ανίχνευσής τους στην περιοχή του οφθαλμού, η οποία, μαζί με τα άκρα, εμφανίζει αυξημένη συχνότητα εμφάνισης πομφολυγών στα μεταλλαγμένα για τα αντίστοιχα γονίδια στελέχη. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του ανοσοφθορισμού. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ένταση του σήματος στον ανοσοφθορισμό δεν αποτελεί ποσοτική ένδειξη των επιπέδων των πρωτεϊνών, καθώς σχετίζεται με πολλούς παράγοντες, όπως η ευαισθησία ανίχνευσης του αντισώματος και οι εκάστοτε πειραματικές συνθήκες. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε από την εμβρυϊκή ημέρα E10.5, λίγο πριν την εκδήλωση του φαινοτύπου της επιδερμικής αποκόλλησης, η οποία συνήθως λαβάνει χώρα κατά την ημέρα E11.5, μέχρι και την ημέρα E16.5. Το αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημείας ήταν η ανίχνευση των πρωτεϊνών Fras1/Frem στη βασική μεμβράνη όλων των εμβρυϊκών επιθηλιακών δομών που εξετάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ημέρα E10.5, οι Fras1, Frem2 και Frem3 ανιχνεύονται στη βασική μεμβράνη του επιδερμικού επιθηλίου κοντά στην πρόδρομη οφθαλμική κοιλότητα και του πρόδρομου αμφιβληστροειδή (Εικόνες 18A, C και D), ενώ δεν παρατηρήθηκε εντοπισμός της Frem1 στις περιοχές αυτές (Εικόνα 18B). Χαμηλά επίπεδα της Frem1 ανιχνεύθηκαν από την ημέρα E11.5 μέχρι την ημέρα E12.5 στη βασική μεμβράνη του εκτοδέρματος του κερατοειδή και στο εσωτερικό στρώμα του αμφιβληστροειδή (Εικόνα 18F). Τα άλλα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Fras1/Frem (Εικόνα 18E, G και H) επίσης εντοπίζονται στις περιοχές αυτές. Ο εντοπισμός των Fras1/Frem συνεχίζεται την ημέρα E14.5 στη βασική μεμβράνη των βλεφάρων, το επιφανειακό και κερατοειδικό επιθήλιο και το κυβοειδές επιθήλιο του φακού (Εικόνα 18I-L). Την ημέρα E16.5, οι πρωτεΐνες συνεντοπίζονται στη βασική μεμβράνη του επιθηλίου του επιπεφυκότα, των βλεφάρων και του κερατοειδή (Εικόνα

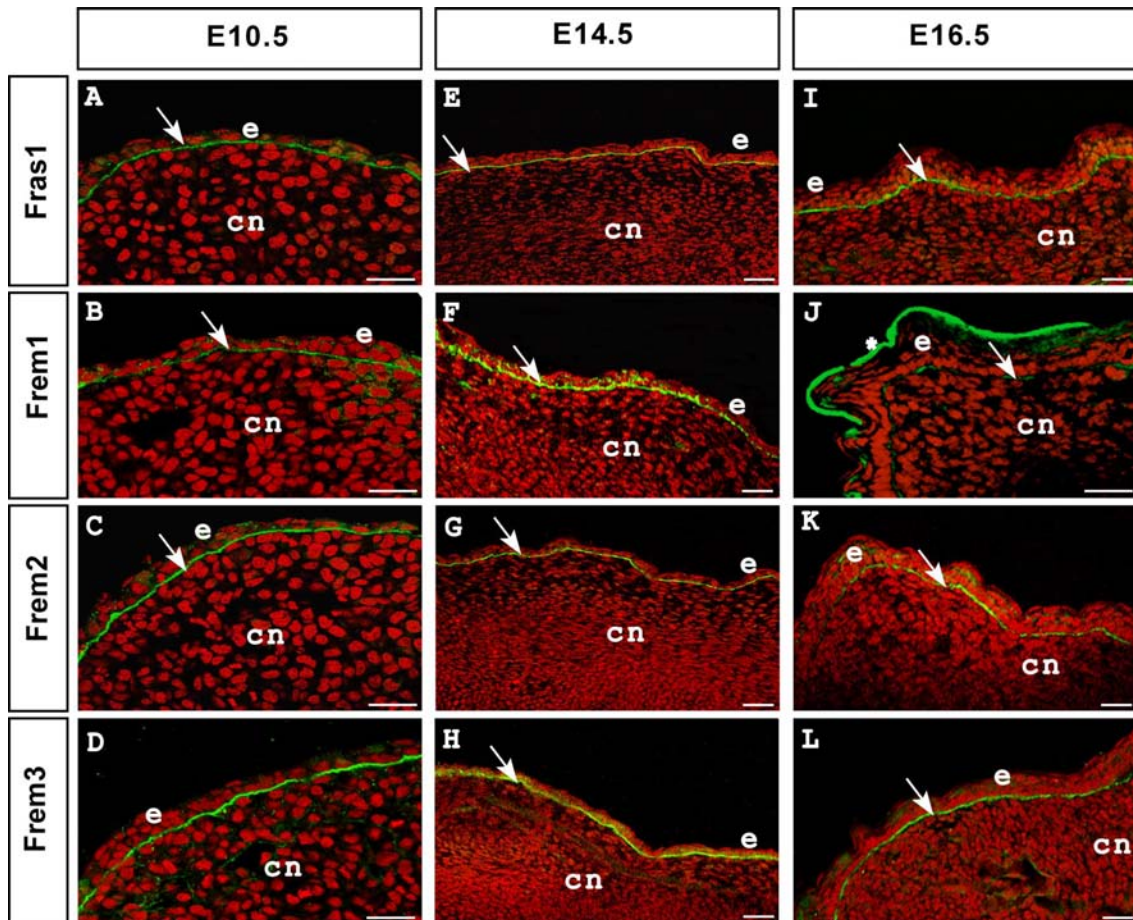
18 M-P). Συνοπτικά, με την εξαίρεση της Frem1, η έκφραση της οποίας ανιχνεύεται κάπως καθυστερημένα συγκριτικά με τα άλλα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Fras1/Frem, φαίνεται ότι όλες οι πρωτεΐνες Fras1/Frem συνεντοπίζονται στην περιοχή του οφθαλμού.



Εικόνα 18: Ανοσοεντοπισμός των Fras1/Frem κατά την ανάπτυξη του οφθαλμού. Την E10.5, οι Fras1, Frem2 και Frem3 συνεντοπίζονται στη βασική μεμβράνη του επιθηλιακού επιθηλίου (βέλη) και του πρόδρομου αμφιβληστροειδή (κεφαλές βέλους) (A, C, D), ενώ ελάχιστα επίπεδα Frem1 ανιχνεύονται σε αυτό το στάδιο (B). Την E12.5, η Frem1 εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη του εκτοδέρματος του κερατοειδή (F, βέλος) μαζί με τα άλλα μέλη της οικογένειας (E, G, H κεφαλές βέλους), ενώ οι Fras1, Frem2 και Frem3 ανιχνεύονται επιπλέον στη βασική μεμβράνη του εσωτερικού στρώματος του αμφιβληστροειδή (E, G, H, κεφαλές βέλους). Την E14.5, το σήμα των Fras1/Frem είναι ισχυρό στη βασική μεμβράνη των βλεφάρων (I-L βέλη), του επιφανειακού επιθηλίου (άσπρες κεφαλές βέλους), του μεσοθηλίου του κερατοειδή (αστερίσκοι) και του κυβοειδούς επιθηλίου των φακών (διαφανείς κεφαλές βέλους). Την E16.5 το σήμα είναι εμφανές στη βασική μεμβράνη των βλεφάρων (M-P βέλη), του επιθηλίου του επιπεφυκότα (κεφαλές βέλους) του κερατοειδικού επιφανειακού επιθηλίου (αστερίσκοι). Συντομογραφίες: ge: πρόδρομος αμφιβληστροειδής, e: επιφανειακό επιθήλιο, el: βλέφαρο, co: κερατοειδής.

A2) Ανίχνευση των πρωτεϊνών Fras1/Frem στα άκρα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη

Στα άκρα, όλες οι πρωτεΐνες Fras1/Frem εντοπίζονται κατά την εμβρυϊκή ημέρα E10.5 στη βασική μεμβράνη του κορυφαίου εκτοδερμικού επάρματος (AER, Apical Ectodermal Ridge) (Εικόνα 19A-D). Σε αντίθεση με τον οφθαλμό, όπου η Frem1 ανιχνεύεται ελάχιστα την ημέρα E10.5, στις προεξοχές των άκρων (limb buds) εμφανίζει χρονικά το ίδιο πρότυπο έκφρασης με τις υπόλοιπες. Την ημέρα E14.5, οι Fras1/Frem ανιχνεύονται στη βασική μεμβράνη των διαφοροποιούμενων άκρων (Εικόνα 19E-H) και η έκφρασή τους συνεχίζει να υφίσταται μέχρι την ημέρα E16.5 (Εικόνα 19I-L). Αξίζει να σημειωθεί ότι την E16.5, εκτός από συστατικό της βασικής μεμβράνης, η Frem1 εντοπίζεται επιπλέον ενδοκυτταρικά στα περιδερμικά κύτταρα της επιδερμίδας των άκρων (Εικόνα 19J), τα οποία στρατολογούνται τοπικά σε περιοχές επιδερμικής διαφοροποίησης κατά την E15.0 και συμμετέχουν σε προσωρινές εμβρυϊκές επιθηλιακές συντήξεις όπως αυτές που λαμβάνουν χώρα στα δάκτυλα, τους λωβούς των αυτιών και κατά την σύντηξη των βλεφάρων (Macconnachie EA, 1979; Harris and McLeod, 1982). Συμπερασματικά, η ανοσοϊστοχημεία κατέδειξε ότι οι πρωτεΐνες Fras1/Frem συνεντοπίζονται στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας των άκρων σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια που εξετάστηκαν. Επιπλέον, σε αργότερα αναπτυξιακά στάδια, η Frem1 εμφανίζει ένα ενδοκυτταρικό πρότυπο εντοπισμού στα περιδερμικά κύτταρα της διαφοροποιημένης επιδερμίδας.

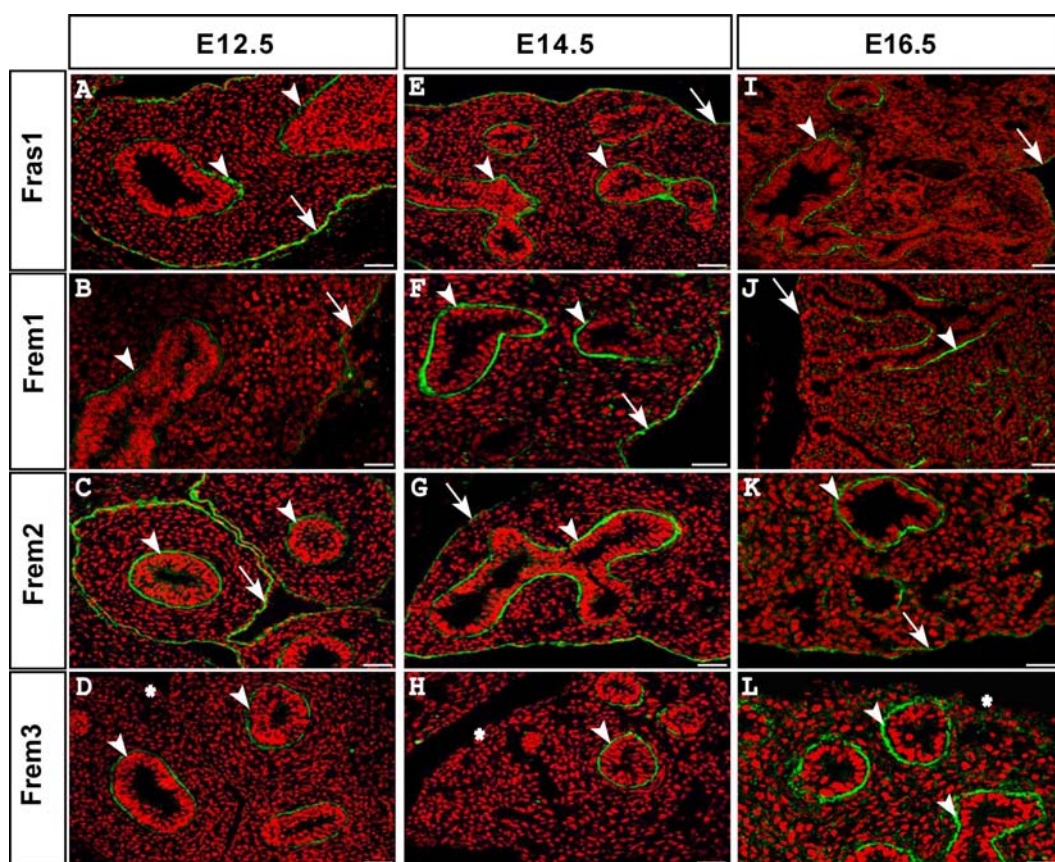


Εικόνα 19: Εντοπισμός των Fras1/Frem στα άκρα του ποντικού κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Την E10.5, όλες οι πρωτεΐνες Fras1/Frem συνεντοπίζονται στη βασική μεμβράνη του κορυφαίου εκτοδερμικού επάρματος, AER (A-D, βέλη). Την E12.5 και E14.5 (E-H), ο ανοσοφθορισμός στη βασική μεμβράνη διατηρείται (βέλη). Κατά την E16.5, εκτός από τη βασική μεμβράνη (J, βέλος), η Frem1 ανιχνεύεται επιπλέον και στα περιδερμικά κύτταρα (J, αστερίσκος). Οι Fras1, Frem2 και Frem3 ανιχνεύονται στη βασική μεμβράνη (I, K, L, βέλη). Συντομογραφίες: e: επιδερμίδα, cn: συνδετικός ιστός.

A3) Εντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1/Frem στα επιθήλια του πνεύμονα

Πρόσφατα δείχθηκε ότι τα *Fras1*^{-/-} και *Frem2*^{-/-} μεταλλαγμένα ποντίκια εμφανίζουν συγχώνευση των πνευμονικών λοβών τους λόγω ανεπαρκούς διαχωρισμού κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Petrou *et al.*, 2005, Timmer *et al.*, 2005). Επιπλέον, τα *Fras1*^{-/-} έμβρυα, την ημέρα E18.5, εμφανίζουν διαταραχές της βασικής μεμβράνης του επιθηλίου των βρογχιολίων και των αιμοφόρων αγγείων του υποκείμενου συνδετικού ιστού. Πιο συγκεκριμένα, η βασική μεμβράνη κάτω από τα αεροφόρα επιθήλια εμφανίζεται αποδιοργανωμένη και το δίκτυο των αγγείων έχει απωλέσει την αρχιτεκτονική δομή του (Petrou *et al.*, 2005). Επειδή τα συγκεκριμένα προβλήματα στους πνεύμονες έχουν παρατηρηθεί μόνο στα *Fras1*^{-/-} και *Frem2*^{-/-} μεταλλαγμένα στελέχη, εξετάστηκε η έκφραση όλων των πρωτεϊνών Fras1/Frem στον πνεύμονα, ξεκινώντας από την E12.5 έως την E16.5. Την E12.5, όλες οι πρωτεΐνες εντοπίζονται

στη βασική μεμβράνη του μεσοθηλίου του πνεύμονα και του επιθηλίων των βρογχιολίων (Εικόνα 20Α-Δ), εκτός από την Frem3, η οποία δεν ανιχνεύθηκε στη βασική μεμβράνη του μεσοθηλίου που καλύπτει την επιφάνεια του πρώιμου εκβλαστήματος των πνευμόνων (lung bud). Την E14.5, η έκφραση διατηρείται στη βασική μεμβράνη των επιθηλίων στους τελικούς βρόγχους και τη βασική μεμβράνη του μεσοθηλίου, στην οποία δεν εντοπίστηκε και πάλι η Frem3 (Εικόνα 20Ε-Η). Τέλος, την εμβρυϊκή ημέρα E16.5, όλες οι πρωτεΐνες εντοπίζονται στα επιθήλια των τελικών αεροφόρων σάκων (20Ι-Λ). Γενικά, όλες οι Fras1/Frem πρωτεΐνες εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη του μεσοθηλίου και των αεροφόρων επιθηλίων του πνεύμονα, με την εξαίρεση της Frem3, που είναι απύσα από την εξωκυττάρια ύλη του πλευρικού μεσοθηλίου.

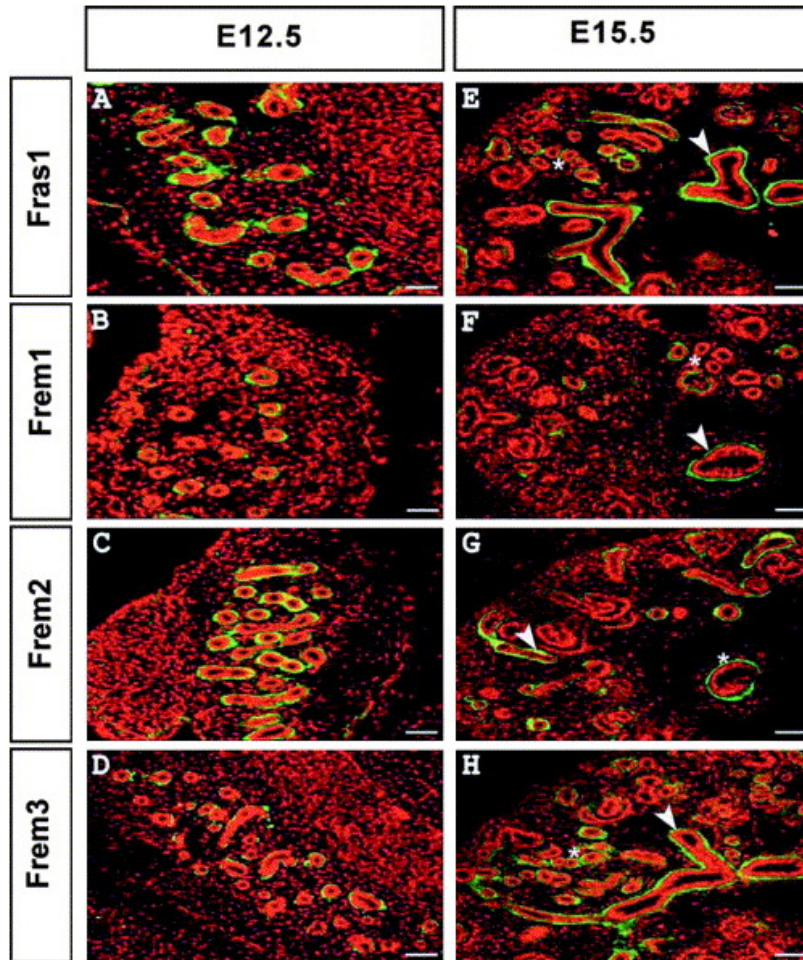


Εικόνα 20: Ανοσοεντοπισμός των Fras1/Frem στον πνεύμονα. Σε όλα τα στάδια που εξετάστηκαν, οι Fras1/Frem εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη των επιθηλίων των βρογχιολίων (κεφαλές βέλους) και του μεσοθηλίου (βέλη), εκτός από τη Frem3, που εντοπίζεται ελάχιστα στη βασική μεμβράνη του μεσοθηλίου (αστερίσκοι στα D, H, L).

A4) Εντοπισμός των Fras1/Frem στα νεφρά

Είναι γεγονός ότι τα *bleb* στελέχη παρουσιάζουν νεφρικές ανωμαλίες ποικίλης σοβαρότητας (Vrontou *et al.*, 2003) λόγω βλαβών στις επιθηλιακές-μεσεγγυματικές αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά την ανάπτυξη και συμβάλλουν στη

μορφογένεση των μετανεφρών. Δεδομένου ότι οι νεφρικές ανωμαλίες λαμβάνουν χώρα νωρίς στην εμβρυογένεση, θεωρήθηκε σημαντικό να ελεγχθεί το πρότυπο έκφρασης των Fras1/Frem στον μετανεφρό ξεκινώντας από την ημέρα E12.5 μέχρι και τα αργότερα εμβρυϊκά στάδια. Την ημέρα E12.5, ο ανοσοεντοπισμός των Fras1/Frem παρατηρήθηκε στη βασική μεμβράνη των νεφρικών σωληναρίων (Εικόνα 21A-D). Την ημέρα E15.5, όλες οι Fras1/Frem εντοπίζονται στα επιθήλια των νεφρών και των συλλεκτικών σωληναρίων (Εικόνα 21E-H). Γενικά, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια που εξετάστηκαν, οι Fras1/Frem εμφανίζουν ανάλογη τοπολογία.

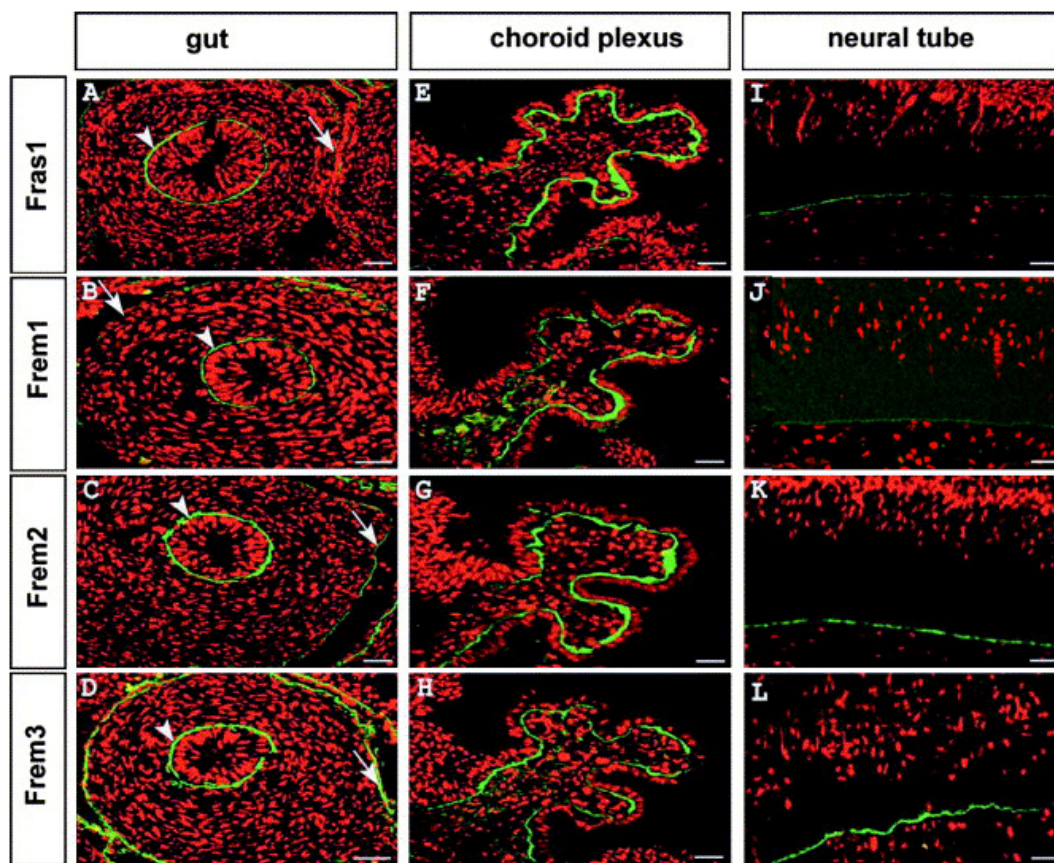


Εικόνα 21: Εντοπισμός των Fras1/Frem στα νεφρά. Οι Fras1/Frem εμφανίζουν κοινό πρότυπο έκφρασης στη βασική μεμβράνη των μετανεφρικών σωληναρίων την E12.5 (A-D). Την E15.5 η έκφραση είναι εμφανής στη βασική μεμβράνη του επιθηλίου των νεφρών (E-H αστερίσκοι) και των συλλεκτικών σωληναρίων (E-H κεφαλές βέλους).

A5) Συνεντοπισμός των Fras1/Frem στη βασική μεμβράνη ποικίλων εμβρυϊκών δομών

Εκτός από τη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας, του πνεύμονα και των νεφρών, οι Fras1/Frem εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη και πολλών άλλων εμβρυϊκών επιθηλίων. Η έκφρασή τους ανιχνεύθηκε ανοσοϊστοχημικά στη βασική μεμβράνη

διαφόρων τμημάτων του γαστρεντερικού σωλήνα, όπως του εντέρου (Εικόνα 22Α-Δ) και του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως αυτή του νευρικού σωλήνα (Εικόνα 22Ι-Λ) και του χοριοειδούς πλέγματος (Εικόνα 22Ε-Η). Επίσης ανιχνεύονται στη βασική μεμβράνη του στομάχου, του οισοφάγου και του οσφρητικού επιθηλίου.

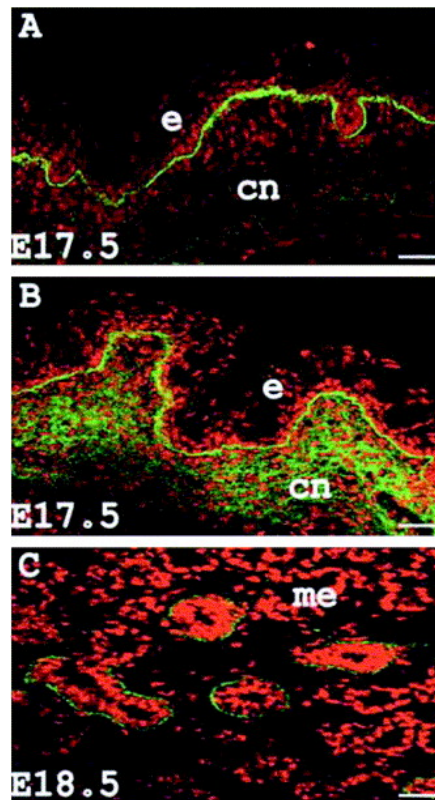


Εικόνα 22: Εντοπισμός των Fras1/Frem στη βασική μεμβράνη των επιθηλίων σε ποικίλα όργανα την εμβρυϊκή ημέρα E13.5. Οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται στη βασική μεμβράνη του εντερικού επιθηλίου (Α-Δ, κεφαλή βέλους) και μεσοθηλίου (Α-Δ, βέλος), του χοριοειδούς πλέγματος (Ε-Η) και του νευρικού σωλήνα (Ι-Λ).

Α6) Το κολλαγόνο VII, συστατικό των ινιδίων αγκυροβόλησης της sublamina densa, εντοπίζεται στα έμβρυα όταν τα επίπεδα των Fras1/Frem φθίνουν

Ο φαινότυπος *bleb* χαρακτηρίζεται από αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα στο επίπεδο της sublamina densa. Αντίστοιχος φαινότυπος παρατηρείται κατά την ασθένεια δυστροφική πομφολυγώδη επιδερμόλυση, η οποία είναι αποτέλεσμα της απώλειας του κολλαγόνου VII, του κύριου συστατικού των ινιδίων αγκυροβόλησης, τα οποία συμβάλλουν στη συνοχή της επιδερμίδας με τη δερμίδα (Heinonen *et al.*, 1999). Πρέπει να σημειωθεί εντούτοις, ότι στα *Col7a1*^{-/-} μεταλλαγμένα ποντίκια, σε αντίθεση με τα *bleb*, η εμφάνιση των πομφολυγών εντοπίζεται χρονικά μετά τη γέννηση και όχι κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Bruckner-Tuderman *et al.*, 1999; Heinonen *et al.*, 1999).

Το κολλαγόνο VII εντοπίζεται, όπως προαναφέρθηκε, στη sublamina densa όπως οι Fras1, Frem1, Frem2, Frem3 (Sakai *et al.*, 1986; Petrou *et al.*, 2005; Kiyozumi *et al.*, 2006; Petrou *et al.*, 2007). Για το λόγο αυτόν θεωρήθηκε απαραίτητος ο προσδιορισμός της κατανομής του σε διάφορους εμβρυϊκούς ιστούς. Όπως διαπιστώθηκε, τα επίπεδα του κολλαγόνου VII είναι ελάχιστα στο χρονικό διάστημα μεταξύ των εμβρυϊκών σταδίων E10.5 και E16.5, κατά τα οποία τα αντίστοιχα επίπεδα των Fras1/Frem είναι υψηλά. Αντίθετα, παρατηρείται σημαντική αύξησή τους κατά την E17.5, όπου τα επίπεδα των Fras1/Frem ελαττώνονται. Περιοχές υψηλής έκφρασης του κολλαγόνου VII είναι η βασική μεμβράνη του ραχιαίου δέρματος, (Εικόνα 23A), των άκρων (Εικόνα 23B), των νεφρικών επιθηλίων (Εικόνα 23C) και των βλεφάρων.



Εικόνα 23: Η κατανομή του κολλαγόνου VII στα όψιμα εμβρυϊκά στάδια. Την ημέρα E17.5, υψηλά επίπεδα κολλαγόνου VII είναι εμφανή στη βασική μεμβράνη του ραχιαίου δέρματος (A), καθώς επίσης και στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας των πίσω άκρων (B). Την E18.5, το κολλαγόνο VII ανιχνεύεται επίσης στη βασική μεμβράνη των νεφρικών σπειραμάτων. Συντομογραφίες: e: επιδερμίδα, cn: συνδετικός ιστός.

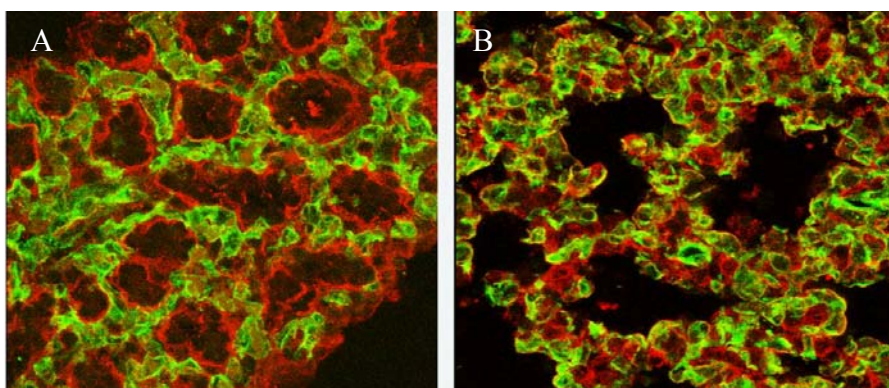
Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα:

✓ Με βάση τον ανοσοϊστοχημικό συνεντοπισμό των πρωτεϊνών Fras1/Frem σε όλα τα υπό εξέταση εμβρυϊκά επιθήλια του ποντικού, σε συνδυασμό με τις βιολογικές ενδείξεις της απενεργοποίησης τους θα μπορούσε να προταθεί ότι τουλάχιστον οι Fras1, Frem1 και Frem2 πρέπει να σχετίζονται δομικά και λειτουργικά συμβάλλοντας εξίσου στη διατήρηση της συνοχής της επιδερμίδας με τη δερμίδα, συμμετέχοντας πιθανώς σε παρόμοια αναπτυξιακά μονοπάτια. Η Frem1 φαίνεται να διαδραματίζει και έναν επιπλέον ρόλο ως συστατικό των περιδερμικών κυττάρων της επιδερμίδας. Η Frem3 σε γενικές γραμμές επίσης ακολουθεί το ίδιο πρότυπο έκφρασης με τις υπόλοιπες Fras1/Frem, με μερικές εντούτοις διαφοροποιήσεις.

✓ Το κολλαγόνο VII, συστατικό της sublamina densa, του οποίου η απενεργοποίηση οδηγεί στην αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα μετά τη γέννηση, εντοπίζεται στα όψιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, όταν τα επίπεδα των Fras1/Frem αρχίζουν να φθίνουν. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη για την πιθανή συμπληρωματική χρονικά δράση του στη διατήρηση της συνοχής της επιδερμίδας με τη δερμίδα.

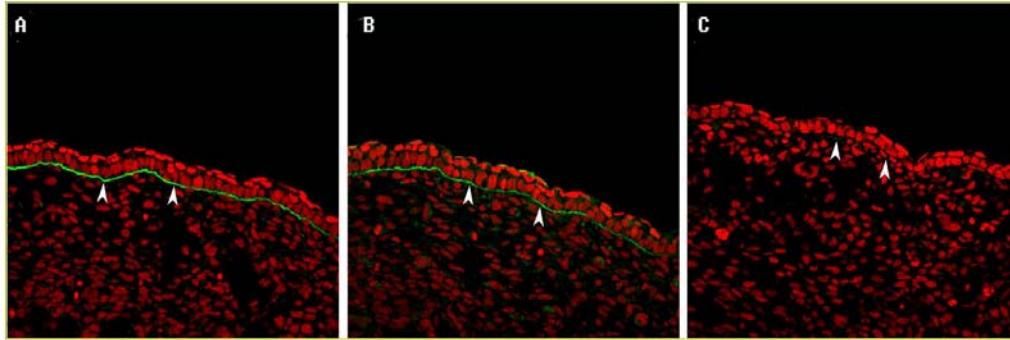
B) ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ *Fras1* ΜΕ ΤΟΝ ΑΥΞΗΤΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VEGF

Κατά τη διάρκεια της μελέτης του φαινοτύπου των *Fras1*^{-/-} ποντικών, παρατηρήθηκε ότι μία από τις διαταραχές που εμφανίζουν κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη είναι και η αποδιοργάνωση της βασικής μεμβράνης και των αιμοφόρων αγγείων που περιβάλλουν τους τελικούς αεροφόρους σάκους στον πνεύμονα (Petrou *et al.*, 2005). Ενώ στα αγρίου τύπου ζώα τα τελικά βρογχιόλια περιβάλλονται από μία καλά οργανωμένη βασική μεμβράνη στην οποία υπόκεινται τα αιμοφόρα αγγεία (Εικόνα 24A), τα μεταλλαγμένα ζώα εμφανίζουν αποδιοργάνωση της βασικής μεμβράνης και αποδιάταξη των αγγείων που βρίσκονται στο συνδετικό ιστό (Εικόνα 24B). Παρόμοιος αγγειακός φαινότυπος στον πνεύμονα απαντάται στα ετερόζυγα για τον μεταγραφικό παράγοντα Forkhead Box f1 ποντίκια *foxf* +/- . Ο φαινότυπος αυτός έχει αποδοθεί σε διαταραχές στα επίπεδα έκφρασης του αγγειακού αυξητικού παράγοντα VEGF (Kalinichenko *et al.*, 2001).



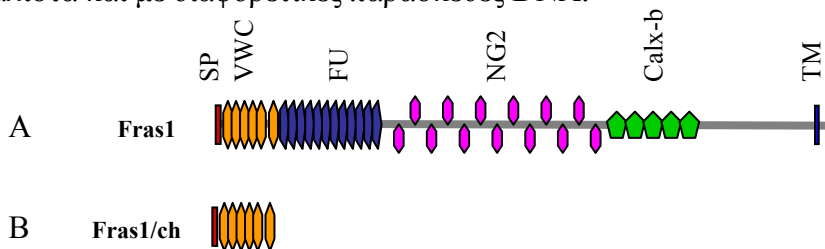
Εικόνα 24: Διαταραχές στον πνεύμονα των *Fras1*^{-/-} εμβρύων. Τα αγγεία στον εμβρυϊκό πνεύμονα αγρίου τύπου ημέρας E18.5 (A) είναι καλά οργανωμένα κάτω από τα τελικά βρογχιόλια (πράσινο, PECAM-1) και η βασική μεμβράνη που τα περιβάλλει εμφανίζεται συνεχής (κόκκινο, αγκρίνη). Αντίθετα, στα *Fras1*^{-/-} έμβρυα, και η βασική μεμβράνη και τα αγγεία εμφανίζονται αποδιοργανωμένα (B) (Petrou *et al.*, 2005).

Εφόσον παρόμοιες πνευμονικές φαινοτυπικές διαταραχές με τα *Fras1*^{-/-} ζώα έχουν σχετισθεί με τα επίπεδα του VEGF στον οργανισμό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στο εργαστήριό μας (Π. Πέτρου), στα οποία διερευνήθηκε αν η απώλεια της *Fras1* μπορεί να επηρεάσει το πρότυπο έκφρασης του παράγοντα αυτού. Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι σε αγρίου τύπου έμβρυα ο εντοπισμός του VEGF συμπίπτει με αυτόν της πρωτεΐνης *Fras1* στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας (Εικόνα 25A, B). Σε *Fras1*^{-/-} ποντίκια, ο εντοπισμός της *Fras1* και του VEGF χάνεται από τη βασική μεμβράνη (25C), αποτελώντας μία ένδειξη για την πιθανή αλληλεπίδρασή τους. Για το λόγο αυτόν εστιαστήκαμε στη διερεύνηση της πιθανότητας αλληλεπίδρασης αυτών των δύο πρωτεϊνών.



Εικόνα 25: Η έλλειψη της Fras1 από την εμβρυϊκή επιδερμίδα οδηγεί στην απώλεια του εντοπισμού του VEGF. Ανίχνευση με ανοσοφθορισμό της πρωτεΐνης Fras1 στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας αγρίου τύπου εμβρύου ημέρας E13.5 (A) και του αγγειογενετικού αυξητικού παράγοντα VEGF (B). Ο εντοπισμός του VEGF χάνεται σε μεταλλαγμένα *Fras1*^{-/-} έμβρυα (C).

Μία πρώτη προσέγγιση για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης ήταν η διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τα δύο μόρια ξεχωριστά και έπειτα η συνδιαμόλυνσή τους για να παρατηρήσουμε αν η συνδιαμόλυνση επιφέρει κάποια αλλαγή στην τοπολογία τους. Εφόσον η Fras1 παράγεται φυσιολογικά από πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα, για τα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε η πολωμένη επιθηλιακή κυτταρική σειρά mIMCD (mouse Medullary Collective Duct). Η πρωτεΐνη Fras1 περιλαμβάνει έξι πρωτεϊνικά μοτίβα πλούσια σε κυστεΐνες παρόμοια με αυτά που απαντώνται στις πρωτεΐνες χορδίνες και την περιοχή C του παράγοντα πήξης του αίματος Von Willebrandt (VWC). Τα μοτίβα τύπου χορδίνης απαντώνται σε πολλές εξωκυττάρια πρωτεΐνες και έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με αυξητικούς παράγοντες. Μάλιστα, η πρωτεΐνη CRIM1, μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εντοπίζεται στα εμβρυϊκά νεφρά, η απενεργοποίηση της οποίας οδηγεί σε παρόμοια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με τα *Fras1*^{-/-} ποντίκια, προσδένει τον αυξητικό παράγοντα VEGF-A των ποδοκυττάρων, ρυθμίζοντας την δράση του στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων (Wilkinson *et al.*, 2007). Για το λόγο αυτόν στα αρχικά πειράματα διαμόλυνσης που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε μία γονιδιακή κατασκευή (*Fras1/ch*) που περιελάμβανε την περιοχή των 6 μοτίβων τύπου χορδίνης της Fras1, κλωνοποιημένη στον ευκαρυωτικό φορέα έκφρασης pCDNA 3.1 Myc HisA (Εικόνα 26). Πρέπει να σημειωθεί ότι όλα τα πειράματα διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων στην παρούσα εργασία επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματά μας και μάλιστα και με διαφορετικές παρασκευές DNA.

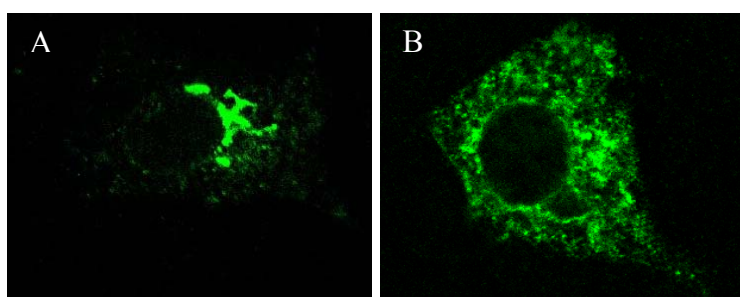


Εικόνα 26: (A): Η δομή της πρωτεΐνης Fras1. Η πρωτεΐνη Fras1 από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό της άκρο περιλαμβάνει ένα πεπτίδιο σινιάλο (SP), μία περιοχή με έξι μοτίβα πλούσια σε

κυστεΐνες παρόμοια με αυτά που απαντώνται στην περιοχή C του παράγοντα πήξης του αίματος Von Willebrandt (VWC), μία περιοχή ομολογίας με την NG2 πρωτεογλυκάνη θεικής χονδροϊτίνης (NG2), μία περιοχή με μοτίβα πρόσδεσης ασβεστίου (Calx-b) και μία διαμεμβρανική περιοχή. (B): Η γονιδιακή κατασκευή Fras1/ch κωδικοποιεί το πεπτιδίο σινιάλο της Fras1 και την περιοχή VWC.

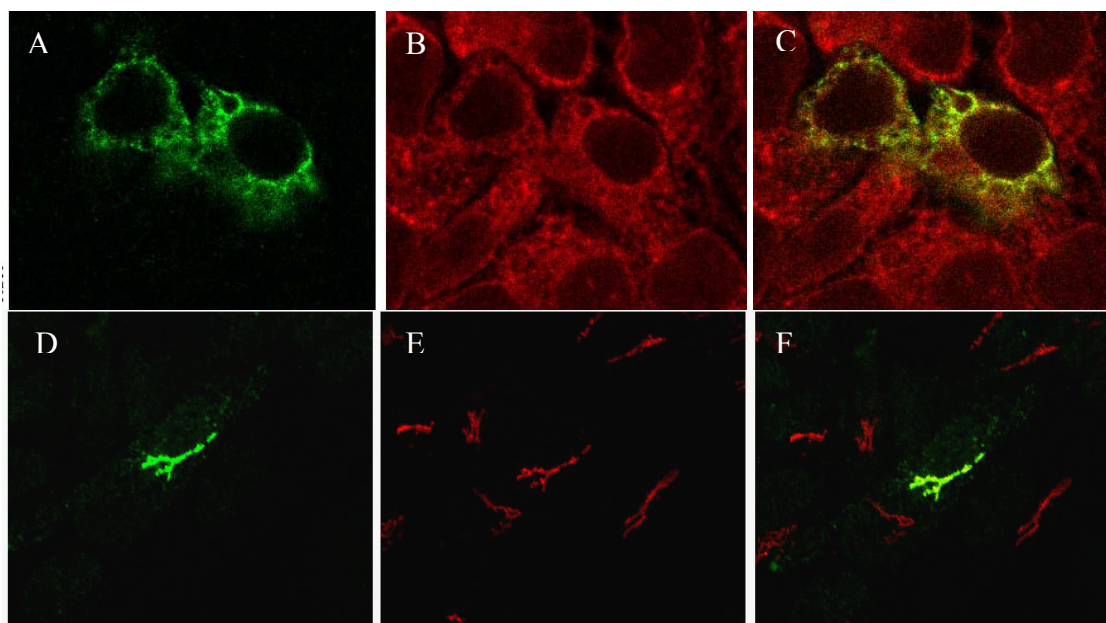
B1) Ο VEGF164 και η Fras1/ch εντοπίζονται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα στα κύτταρα mIMCD

Ο εντοπισμός των VEGF164 και Fras1/ch στα mIMCD κύτταρα ακολουθεί διαφορετικό πρότυπο. Η πρωτεΐνη Fras1/ch εμφανίζει μία διάχυτη κατανομή μέσα στο κύτταρο, ενώ ο VEGF εντοπίζεται σε μία μικρή περιοχή κοντά στα όρια του πυρήνα (Εικόνα 27A, B).



Εικόνα 27: Το πρότυπο εντοπισμού των VEGF164 και Fras1/ch στα mIMCD κύτταρα είναι διαφορετικό. Ο VEGF164 καταλαμβάνει ένα μικρό σε έκταση κυτταρικό τμήμα (A) σε σύγκριση με την Fras1/ch, η οποία εμφανίζει μια πιο διάχυτη τοπολογία (B).

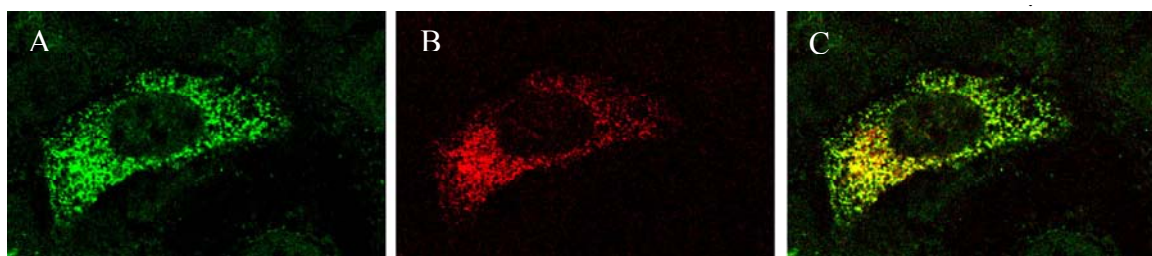
Με τη χρήση κατάλληλων ενδοκυτταρικών μαρτύρων, βρέθηκε ότι η Fras1/ch εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, καθώς συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη-μάρτυρα του οργανιδίου αυτού Concanavalin A (Εικόνα 28A-C) και ο VEGF164 ανιχνεύεται στο σύστημα cis Golgi καθώς συνεντοπίζεται με το μάρτυρα του cis Golgi, GM130 (Εικόνα 28D-F).



Εικόνα 28: Ταυτοποίηση της τοπολογίας των Fras1/ch και του VEGF164 στα πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα mIMCD με τη χρήση ενδοκυτταρικών μαρτύρων. Η Fras1/ch (A) εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπως φανερώνει ο συνεντοπισμός της με το μάρτυρα Concanavalin A (B, C). Ο VEGF164 (D) εντοπίζεται στο cis Golgi, όπως φανερώνει ο συνεντοπισμός του με το μάρτυρα GM130 (E, F).

B2) Οι πρωτεΐνες VEGF164 και Fras1/ch αλληλεπιδρούν μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο

Η συνέκφραση των VEGF164 και Fras1/ch στα mIMCD κύτταρα οδηγεί στην αλλαγή της τοπολογίας του VEGF164. Ενώ, φυσιολογικά ο VEGF164 εντοπίζεται ανοσοϊστοχημικά στο cis Golgi (Εικόνα 28F), όταν συνεκφραστεί με τη Fras1/ch εντοπίζεται διάχυτος στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ακολουθώντας το πρότυπο της Fras1/ch (Εικόνα 29). Μία πιθανή αλληλεπίδραση της Fras1/ch και του VEGF164, η οποία οδηγεί στη συγκράτηση του δεύτερου στο ενδοπλασματικό δίκτυο, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η μετάβασή του στο σύστημα Golgi θα μπορούσε να εξηγήσει το φαινόμενο αυτό.

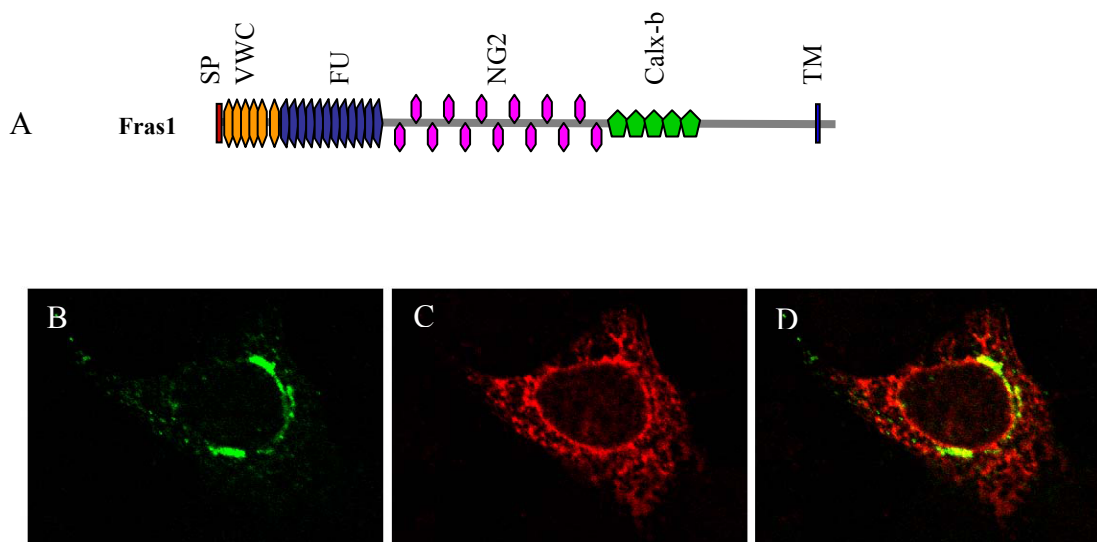


Εικόνα 29: Αλληλεπίδραση των Fras1/ch και VEGF164 στο ενδοπλασματικό δίκτυο των mIMCD κυττάρων. Όταν οι VEGF 164 (A) και Fras1/ch (B) συνεκφραστούν στα mIMCD κύτταρα, συνεντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (C).

B3) Ολόκληρη η Fras1 δεν έχει τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με τον VEGF164 στο ενδοπλασματικό δίκτυο

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η Fras1/ch έχει την ικανότητα να προσδένει τον VEGF164 στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Το επόμενο ερώτημα προς διερεύνηση ήταν αν την ικανότητα αυτή την έχει και ολόκληρη η Fras1. Αντίστοιχα πειράματα συνέκφρασης των Fras1 και VEGF164 φανέρωσαν ότι ολόκληρη η πρωτεΐνη Fras1 δεν έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τον VEGF164 στο εκκριτικό μονοπάτι. Η συνέκφραση των δύο αυτών μορίων στα κύτταρα mIMCD δεν οδηγεί στην αλλαγή της τοπολογίας του VEGF164, ο οποίος συνεχίζει να εντοπίζεται στο cis Golgi (Εικόνα

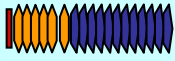


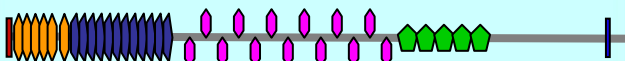
30). Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στην υπόθεση ότι πιθανόν λόγω κάποιας στερεοχημικής παρεμπόδισης (masking) που λαμβάνει χώρα παρουσία κάποιων από τις υπόλοιπες περιοχές της Fras1, ολόκληρο το μόριο δεν έχει τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με τον VEGF164 στο εκκριτικό μονοπάτι.



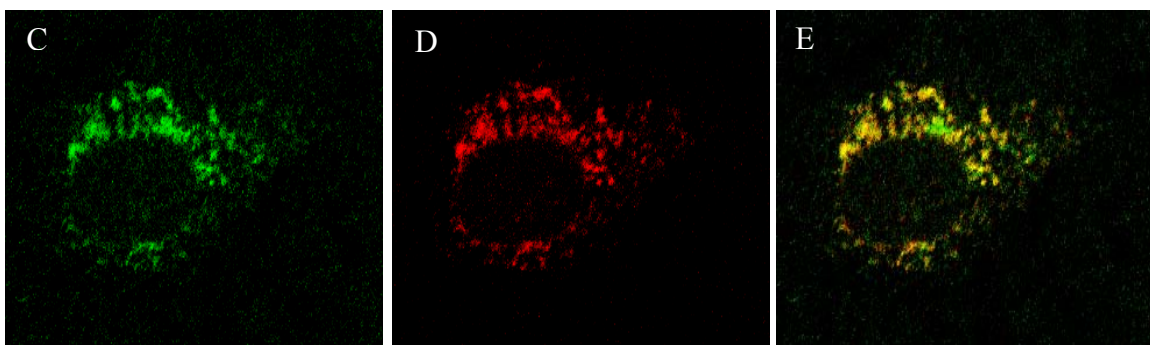
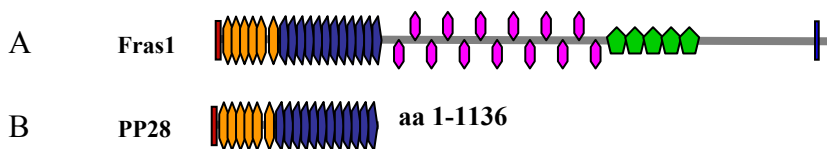
Εικόνα 30: Ολόκληρη η Fras1 δεν αλληλεπιδρά με τον VEGF164 στο ενδοπλασματικό δίκτυο των mIMCD. (A): Η δομή της πρωτεΐνης Fras1. (B-D): Η συνέκφραση των VEGF164 (B) και της πρωτεΐνης Fras1 (C) δεν έχει κάποια επίδραση στην τοπολογία του πρώτου (C).

B4) Η περιοχή της Fras1 που είναι υπεύθυνη για τη στερεοχημική παρεμπόδιση περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1417-3450

Για να προσδιοριστεί η περιοχή στην οποία οφείλεται η στερεοχημική παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης Fras1 και VEGF164 στο ενδοπλασματικό δίκτυο των mIMCD, πραγματοποιήθηκαν οι γονιδιακές κατασκευές που περιγράφονται στον Πίνακα 3. Βρέθηκε ότι η περιοχή των κυστεϊνών που περιλαμβάνει και τα 13 επιπλέον μοτίβα παρόμοια με αυτά των πρωτεασών φουρινών έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τον VEGF164 στο εκκριτικό μονοπάτι (Εικόνα 31). Πραγματοποιώντας μία γονιδιακή κατασκευή στην οποία αφαιρέθηκε ένα μεγάλο εσωτερικό τμήμα της Fras1 από το τέλος της περιοχής των φουρινών μέχρι λίγο μετά τα μοτίβα ασβεστίου (αφαίρεση των αμινοξέων 1417-3450) και συνεκφράζοντάς την με τον VEGF164, παρατηρείται και πάλι αλληλεπίδρασή τους. Η έλλειψη της διαμεμβρανικής περιοχής της Fras1 (αμινοξέα 3701-4010) δεν επηρεάζει τη συμπεριφορά ολόκληρης. Το συμπέρασμα από τα παραπάνω πειράματα είναι ότι η στερεοχημική παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης Fras1-VEGF στο εκκριτικό μονοπάτι οφείλεται στην περιοχή της Fras1 που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1417-3450.

Fras1 deletions	Interaction?
	αα 1-1136 YES
	αα 1-1417, 3450-4010 YES
	αα 1-3701 NO
	αα 1-4010 NO

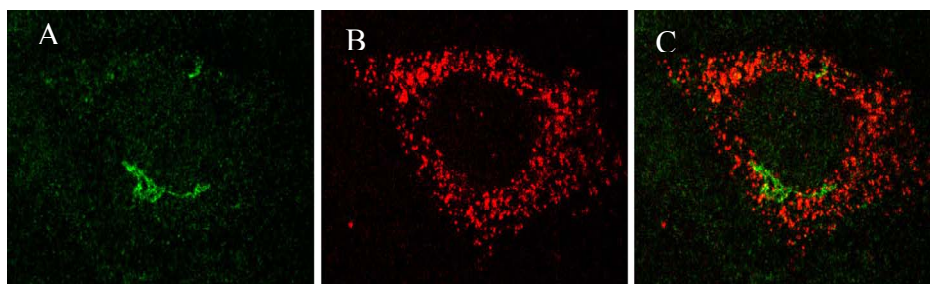
Πίνακας 3: Οι γονιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της περιοχής της Fras1 που είναι υπεύθυνη για τη στερεοχημική παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης με το VEGF164.









Εικόνα 31: Ο αυξητικός παράγοντας VEGF164 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PP28, η οποία περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1-1136 της Fras1, στο ενδοπλασματικό δίκτυο των mIMCD. (A): Η δομή της Fras1 (B): Η δομή της πρωτεΐνης PP28. (C): Εντοπισμός του VEGF164 στο ενδοπλασματικό δίκτυο των mIMCD έπειτα από συνέκφραση με την PP28. (D): Η PP28 φυσιολογικά εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (E): Η συνέκφραση των VEGF164 και PP28 οδηγεί στο συνεντοπισμό τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

B5) Τα πρώτα 5 συνεχόμενα μοτίβα τύπου χορδίνης της Fras1 είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση με τον VEGF164

Ένα επόμενο ερώτημα που τέθηκε υπό μελέτη ήταν αν και τα έξι μοτίβα τύπου χορδίνης της Fras1 απαιτούνται για την αλληλεπίδραση με τον VEGF 164, ή αν η αλληλεπίδραση οφείλεται μόνο σε ορισμένα από αυτά. Προς απάντηση του ερωτήματος αυτού, πραγματοποιήθηκε μία σειρά από γονιδιακές κατασκευές οι οποίες περιελάμβαναν διάφορους συνδυασμούς μοτίβων χορδίνης, ώστε να διαπιστωθεί ποιοι από αυτούς είναι απαραίτητοι για να πραγματοποιηθεί η αλληλεπίδραση με τον VEGF164 στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Οι κατασκευές που πραγματοποιήθηκαν περιελάμβαναν τα μοτίβα χορδίνης 1^{1/2} (Εικόνα 32), 1-3, 1-4, 1-5, 1-6 και 3-6 στον ευκαρυωτικό φορέα έκφρασης pCDNA 3.1 Myc HisA. Έπειτα από μία σειρά πειραμάτων συνέκφρασης με τον VEGF164, διαπιστώθηκε ότι για την αλληλεπίδραση της Fras1/ch με τον VEGF164 απαιτούνται τα 5 πρώτα μοτίβα τύπου χορδίνης. Συνοπτικά, τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.



Εικόνα 32: Το πρώτο ενάμισι μοτίβο τύπου χορδίνης της Fras1 δεν αλληλεπιδρά με το VEGF164 στα mIMCD. (A): Εντοπισμός του VEGF164 στο cis-Golgi των mIMCD έπειτα από συνέκφραση με την γονιδιακή κατασκευή που περιέχει το πρώτο ενάμισι μοτίβο τύπου χορδίνης της Fras1, η οποία φυσιολογικά εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (B). Η τοπολογία του VEGF164 δεν αλλάζει έπειτα από συνδιαμόλυνση με τη κατασκευή B (C).

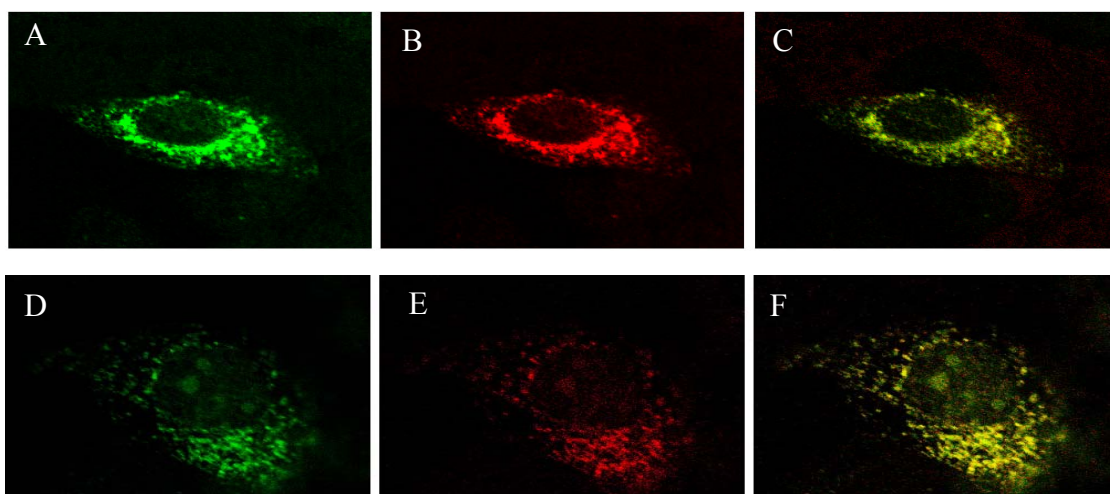
Chordin motifs	Interaction?
 Motifs 1 ^{1/2}	NO
 Motifs 1-3	YES/NO
 Motifs 1-4	NO
 Motifs 1-5	YES
 Motifs 1-6	YES
 Motifs 3-6	NO

Πίνακας 4: Η παρουσία τουλάχιστον των 5 πρώτων μοτίβων τύπου χορδίνης της *Fras1* είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με το VEGF164. Το ενάμισο πρώτο μοτίβο, όπως και τα πρώτα τρία, τέσσερα και τα τρία τελευταία δεν είχαν την ικανότητα να προσδέσουν το VEGF164. Να σημειωθεί ότι τα 3 πρώτα μοτίβα εμφάνισαν μία ικανότητα πρόσδεσης, η οποία δεν εμφανίστηκε σε όλα τα διαμολυσμένα κύτταρα.

B6) Η *Fras1*/ch αλληλεπίδρα με όλες τις ισομορφές του VEGF

Στον ποντικό, το γονίδιο του VEGF, το οποίο αποτελείται από 8 εξόνια, δίνει με εναλλακτικό μάτισμα τρεις ισομορφές, την VEGF120, VEGF164 και VEGF188 (Ferrara *et al.*, 1992; Shima *et al.*, 1996). Ο VEGF120, ο οποίος δεν περιέχει τα εξόνια 6 και 7 που είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση της εξωκυττάριας πρωτεογλυκάνης θειικής ηπαρίνης, είναι διάχυτος. Ο VEGF188 περιέχει και τα 8 εξόνια και προσδέεται στην εξωκυττάρια ύλη και ο VEGF164 έχει ενδιάμεσες ιδιότητες καθώς του λείπει μόνο το εξόνιο 6. Στα παραπάνω πειράματα όπως αναφέρθηκε, χρησιμοποιήθηκε η 164 ισομορφή του VEGF και βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τα 6 μοτίβα τύπου χορδίνης της *Fras1*.

Ένα επόμενο ερώτημα που τέθηκε ήταν η δυνατότητα και των υπολοίπων ισομορφών του VEGF να αλληλεπιδρούν με τη *Fras1*/ch. Πράγματι, η ισομορφή VEGF120 και η ισομορφή VEGF 188 μπορούν επίσης να αλληλεπιδράσουν με τη *Fras1*/ch στο εκκριτικό μονοπάτι όπως φανερώνουν αντίστοιχα με το VEGF164 πειράματα συνέκφρασης σε mIMCD (Εικόνα 33). Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι η περιοχή αλληλεπίδρασης του VEGF με τη *Fras1*/ch δεν περιλαμβάνει το τμήμα που κωδικοποιείται από τα εξόνια 6 και 7 (τα μη κοινά εξόνια των τριών ισομορφών). Αξίζει να σημειωθεί ότι ολόκληρη η *Fras1* δεν είχε την ικανότητα αλληλεπίδρασης ούτε με τις υπόλοιπες ισομορφές του VEGF στο ενδοπλασματικό δίκτυο.



Εικόνα 33: Η *Fras1*/ch αλληλεπιδρά στο εκκριτικό μονοπάτι των mIMCD με όλες τις ισομορφές του VEGF. Οι VEGF120 (A) και VEGF188 (D) ανιχνεύονται διάχυτοι στο ενδοπλασματικό δίκτυο

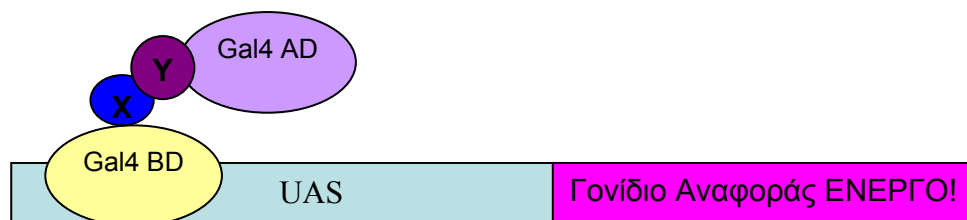
έπειτα από συνέκφραση με την Fras1/ch. (B, E): Η Fras1/ch ανιχνεύεται διάχυτη στο ενδοπλασματικό δίκτυο mIMCD κυττάρων. Η συνέκφραση των VEGF188 και VEGF120 με τη Fras1/ch οδηγεί στο συνεντοπισμό τους (C, F).

Γ) Αλληλεπίδραση της Fras1/ch και του VEGF164 στο σακχαρομύκητα-Σύστημα δύο υβριδίων

Η αλληλεπίδραση των μοτίβων τύπου χορδίνης της Fras1 και του αυξητικού παράγοντα VEGF μελετήθηκε μέχρι τώρα με τη μέθοδο συνέκφρασης σε ευκαρυωτικά κύτταρα mIMCD. Στη συνέχεια, η αλληλεπίδραση αυτή επιβεβαιώθηκε και με τη χρήση ενός ετερόλογου συστήματος μελέτης, του συστήματος δύο υβριδίων στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

Γ1) Γενικά για το σύστημα δύο υβριδίων

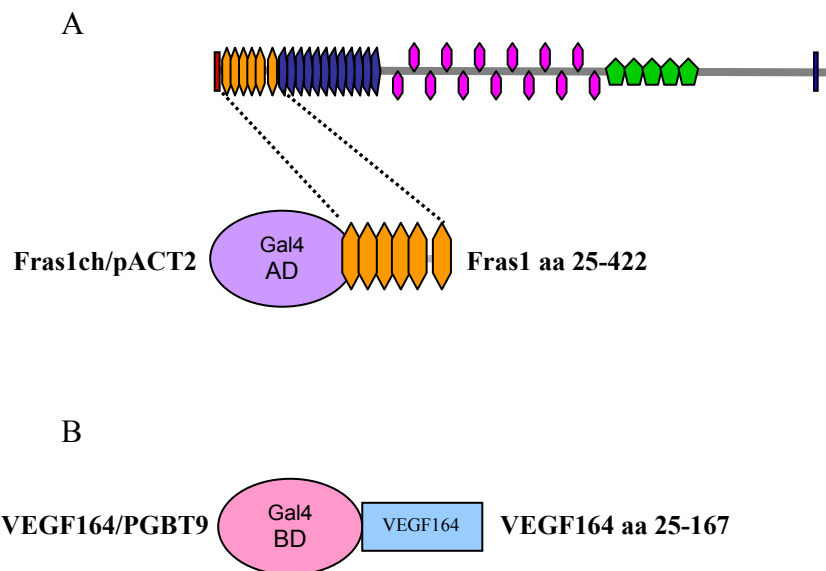
Ο σκοπός της δοκιμασίας αυτής είναι η κατεύθυνση στον πυρήνα του σακχαρομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*) των δύο υπό μελέτη πρωτεϊνών, η μία από τις οποίες (X) έχει συντηχθεί με την περιοχή πρόσδεσης (binding domain) και η άλλη (Y) με την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (activating domain) του μεταγραφικού παράγοντα Gal4. Στην περίπτωση αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών, ο μεταγραφικός παράγοντας προσδένεται στην αλληλουχία UAS (upstream activation sequence) και ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων ADE2, HIS3 και LacZ, που κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση αδερίνης, ιστιδίνης και τη β-γαλακτοσιδάση αντίστοιχα (Εικόνα 34).



Εικόνα 34: Ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς στην περίπτωση αλληλεπίδρασης δύο υποθετικών πρωτεϊνών X και Y μέσω της συνδυασμένης δράσης των Gal4 AD και Gal4 BD.

Γ2) Γονιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν

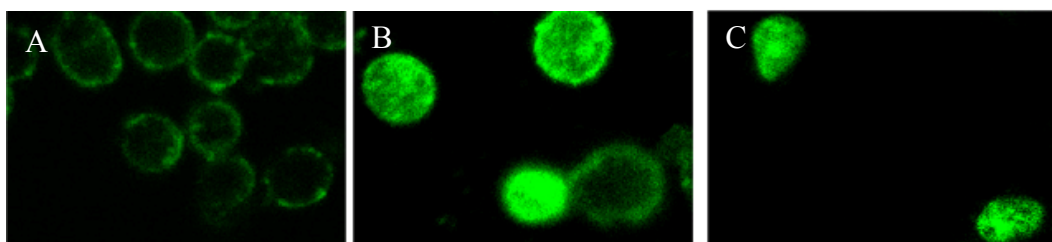
Για να πραγματοποιηθεί η δοκιμασία δύο υβριδίων παρήχθησαν δύο γονιδιακές κατασκευές. Η μία (Fras1ch/pACT2) κωδικοποιεί τα έξι μοτίβα τύπου χορδίνης της Fras1 (αμινοξέα 25-422) μαζί με την περιοχή ενεργοποίησης του Gal4 μεταγραφικού παράγοντα (Εικόνα 35A) και η δεύτερη (VEGF164/PGBT9) την περιοχή του VEGF164 που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 25-170 μαζί με την περιοχή πρόσδεσης DNA του μεταγραφικού παράγοντα Gal4 (Εικόνα 35B). Οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι pACT2 και PGBT9.



Εικόνα 35: Οι γονιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμασία δύο υβριδίων. (A): Η κατασκευή Fras1ch/pACT2 περιλαμβάνει τα έξι πρώτα μοτίβα τύπου χορδίνης της Fras1 (αμινοξέα 25-422) και την περιοχή ενεργοποίησης του Gal4 μεταγραφικού παράγοντα. (B): Η κατασκευή VEGF164/PGBT9 περιλαμβάνει τα αμινοξέα 25-167 του VEGF164 και την περιοχή DNA πρόσδεσης του Gal4 μεταγραφικού παράγοντα (B).

Γ3) Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός των Fras1/ch και VEGF164 στο σακχαρομύκητα

Με τις παραπάνω γονιδιακές κατασκευές μετασηματίστηκαν κύτταρα σακχαρομύκητα στελέχους PJ69-4A. Για να ελεγχθεί η έκφραση των χημικών πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτές πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός στα κύτταρα. Για την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των Fras1/ch χρησιμοποιήθηκε ορός από ανοσοποιημένο κουνέλι για το τμήμα των αμινοξέων 21-199 της Fras1 και για την ανίχνευση του VEGF 164, εμπορικό αντίσωμα anti-VEGF (Acris). Πράγματι, οι πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου φθορισμού, στον πυρήνα αλλά και στο κυτταρόπλασμα των μετασηματισθέντων κυττάρων (Εικόνα 36). Επειδή απαραίτητη προϋπόθεση για την ανίχνευση των πρωτεϊνών είναι η επεξεργασία των κυττάρων με ζυμολύση, ένα ένζυμο που διασπά το κυτταρικό τοίχωμα της ζύμης, ώστε τα αντισώματα να εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου, και η δράση της ποικίλλει ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες, η ανοσοϊστοχημική χρώση δεν ήταν εμφανής σε όλα τα κύτταρα.



Εικόνα 36: Ανοσοφθορισμός σε κύτταρα σακχαρομύκητα για την ανίχνευση των πρωτεϊνών Fras1/ch και VEGF164. (A): Κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με φορέα pACT2 και δεν περιέχουν καμία από τις δύο πρωτεΐνες. (B): Κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με τη γονιδιακή κατασκευή Fras1ch/pACT2, στα οποία ανιχνεύεται η πρωτεΐνη Fras1/ch. (C): Κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με VEGF164/PGBT9 στα οποία ανιχνεύεται ο VEGF164.

Γ4) Η ενεργοποίηση των γονιδίων μαρτύρων λαμβάνει χώρα μόνο κατά τη συνέκφραση των Fras1/ch και VEGF164 στον πυρήνα των κυττάρων

Έπειτα από την επιβεβαίωση της έκφρασης των πρωτεϊνών Fras1/ch και VEGF164 στο σακχαρομύκητα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διπλού μετασχηματισμού με τους εξής συνδυασμούς:

- 1) PACT2+PGBT9
- 2) PACT2+VEGF164/PGBT9
- 3) Fras1ch/PACT2+ PGBT9
- 4) Fras1ch/PACT2+ VEGF164/PGBT9

Από τους παραπάνω συνδυασμούς μόνο ο 4) περιλαμβάνει και τις δύο υπό εξέταση πρωτεΐνες Fras1/ch και VEGF164.

Γ4α) Όλα τα διπλά μετασχηματισμένα στελέχη σακχαρομύκητα αναπτύσσονται σε πλούσιο θρεπτικό μέσο

Από τα διπλά μετασχηματισμένα στελέχη (1,2,3,4) απομονώθηκαν μοναδιαίες αποικίες, οι οποίες επιστρώθηκαν ως 'patches' σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε όλα τα απαραίτητα για την ανάπτυξή τους αμινοξέα: αδενίνη, ουρακίλη, ιστιδίνη (η λευκίνη και η τρυπτοφάνη κωδικοποιούνται από γονίδια που εμπεριέχονται στους φορείς έκφρασης), ώστε να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπάρχει κάποιο πρόβλημα στην ανάπτυξη των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες. Πράγματι, οι αποικίες στο τριβλίο που ήταν εμπλουτισμένο με όλα τα απαραίτητα αμινοξέα αναπτύχθηκαν φυσιολογικά. Μία παρατήρηση που έγινε ήταν ότι οι αποικίες στις οποίες εκφράστηκε η Fras1/ch είχαν μία δυσκολία στη ανάπτυξη και κατά κύριο λόγο ήταν μικρότερου μεγέθους από τις υπόλοιπες, γεγονός που μας έδειξε ότι η παραγωγή των μοτίβων τύπου χορδίνης στο σακχαρομύκητα μπορεί να επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξή του (Πίνακας 5, στήλη Α).

Γ4β) Μόνο τα διπλά μετασηματισμένα στελέχη Fras1ch/PACT2+ VEGF164/PGBT9 αναπτύσσονται απουσία ιστιδίνης

Στην επόμενη φάση του πειράματος, οι αποικίες επιστρώθηκαν σε ένα τριβλίο με θρεπτικό, στο οποίο δεν υπήρχε το απαραίτητο αμινοξύ ιστιδίνη και επιπλέον είχε επιστρωθεί 3mM Αμινοτριαζόλη. Η αμινοτριαζόλη είναι απαραίτητη γιατί υπό φυσιολογικές συνθήκες, έχουν παρατηρηθεί χαμηλά επίπεδα συστατικής έκφρασης του γονιδίου HIS3. Οι μοναδικές αποικίες που αναπτύχθηκαν ήταν μόνο οι διπλά μετασηματισμένες με τις κατασκευές Fras1ch/pACT2+VEGF164/PGBT9. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι το γονίδιο μάρτυρας για τη βιοσύνθεση της ιστιδίνης ενεργοποιήθηκε έπειτα από αλληλεπίδραση των δύο υπό εξέταση πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του Gal4 μεταγραφικού παράγοντα (Πίνακας 5, στήλη Β).






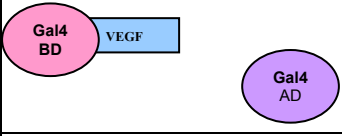




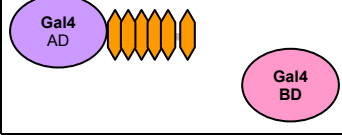




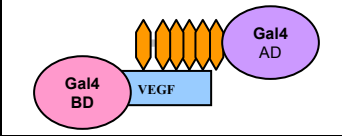




Γ4γ) Μόνο τα διπλά μετασηματισμένα στελέχη Fras1ch/PACT2+ VEGF164/PGBT9 αναπτύσσονται απουσία αδενίνης εμφανίζοντας χαρακτηριστικό χρώμα

Σε ένα επόμενο στάδιο, τα διπλά μετασηματισμένα στελέχη αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο, το οποίο δεν περιείχε το απαραίτητο αμινοξύ αδενίνη. Στην περίπτωση αυτή, λόγω της αλληλεπίδρασης του VEGF164 και της Fras1/ch, τα διπλά μετασηματισμένα στελέχη Fras1ch/pACT2+VEGF 164/PGBT9, είχαν τη δυνατότητα ανάπτυξης και εμφάνισαν ροζ χρώμα, λόγω της ενεργοποίησης του γονιδίου ADE2, το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο phosphoribosylamino-imidazole-carboxylase, που συμμετέχει στην βιοσύνθεση της αδενίνης. Η παραγωγή της αδενίνης οδηγεί σε άσπρο χρώμα αποικιών. Το γεγονός ότι οι αποικίες εμφανίζονται ροζ πιθανότατα σχετίζεται με την ποσότητα του προϊόντος που παράγεται (Πίνακας 5, στήλη Γ).

Γ4δ) Τα διπλά μετασηματισμένα στελέχη Fras1ch/PACT2+ VEGF164/PGBT9 εμφανίζουν μπλε χρώμα όταν μεγαλώνουν σε υπόστρωμα XGal

Το τελευταίο βήμα για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης των Fras1/ch και VEGF164 ήταν η ανάπτυξη των διπλά μετασηματισμένων στελεχών σε θρεπτικό που περιείχε όλα τα απαραίτητα αμινοξέα (ουρακίλη, ιστιδίνη, αδενίνη) και επιπλέον το χρωμογόνο υπόστρωμα XGal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactoside). Με την ενεργοποίηση του γονιδίου LacZ παράγεται β-γαλακτοσιδάση, η οποία γίνεται ορατή από τη συσσώρευση μπλε χρώματος στο θρεπτικό. Πράγματι, στα διπλά μετασηματισμένα στελέχη Fras1ch/pACT2+ VEGF164/PGBT9 συσσωρεύθηκε μπλε χρώση στο θρεπτικό. Αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένες από τις διπλά μετασηματισμένες αποικίες εμφάνισαν και άσπρο και μπλε χρώμα. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί λόγω πιθανών μεταλλαγών που προκαλούνται στη Fras1/ch καθώς

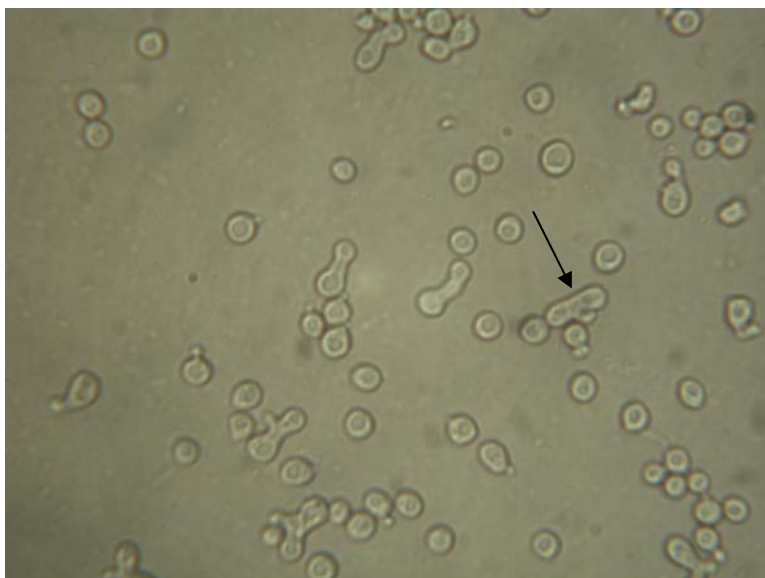
στην πορεία των πειραμάτων διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή του πολυπεπτιδίου αυτού στα κύτταρα καθυστερεί την ομαλή ανάπτυξή τους. Ένας από τους μηχανισμούς που αναπτύσσει το κύτταρο για να αντιμετωπίσει το γεγονός αυτό είναι η μετάλλαξιγένεση. Μία επιπλέον παρατήρηση ήταν το γεγονός ότι οι αποικίες που είχαν μετασηματισθεί με τις κατασκευές Fras1/ch/pACT2+PGBT9 εμφάνισαν γαλάζια χρώση (Πίνακας 5 στήλη Δ).

	A Πλήρες θρεπτικό	B -His, 3mM AT	Γ -Ade	Δ XGal
1 PACT2+PGBT9 				
2 PACT2+VEGF164/PGBT9 				
3 Fras1ch/PACT2+ PGBT9 				
4 Fras1ch/PACT2+ VEGF164/PGBT9 				

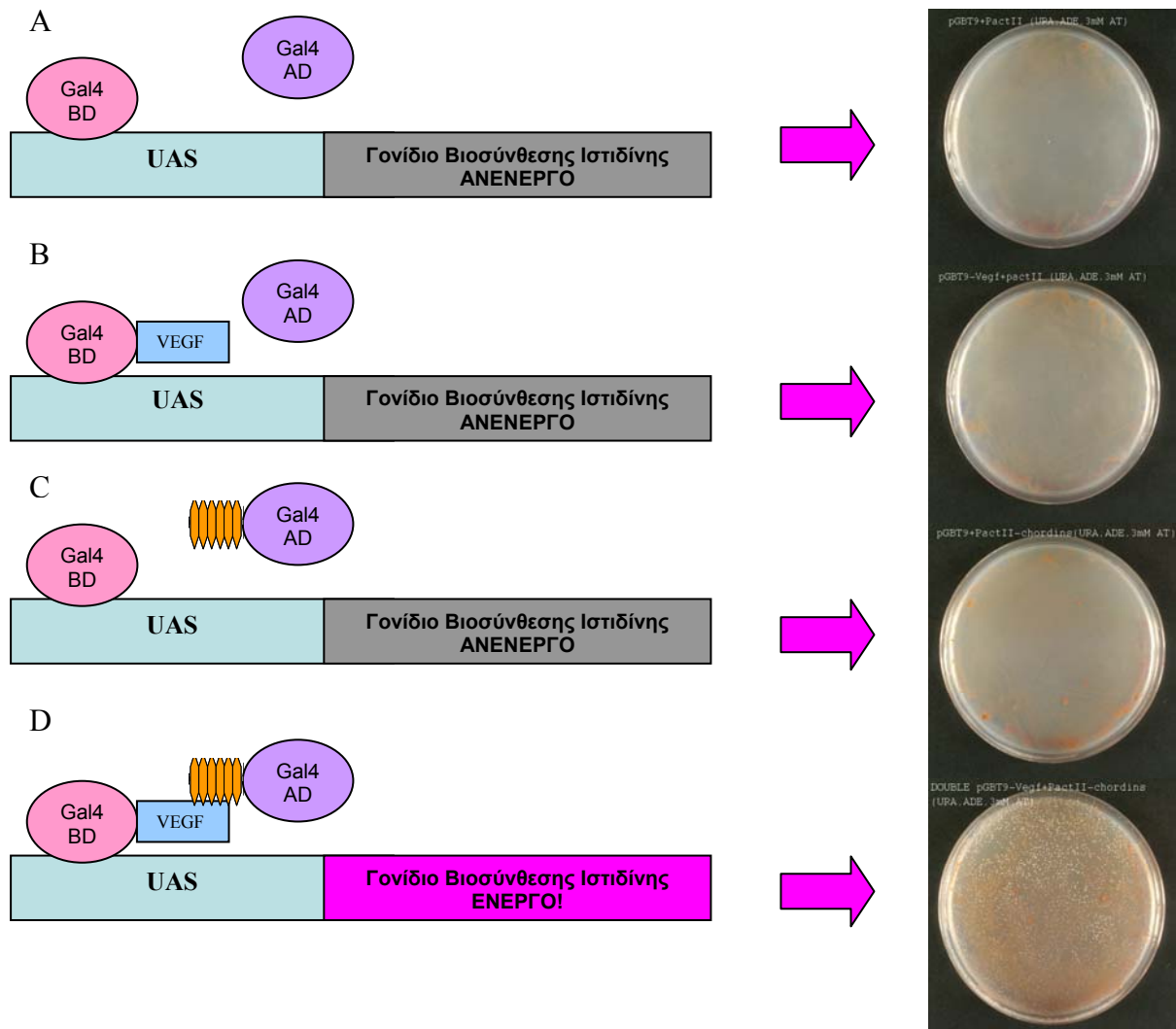
Πίνακας 5: Δοκιμασία δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα. Παρουσία όλων των απαραίτητων αμινοξέων, όλες οι αποικίες αναπτύσσονται κανονικά, με μία ελαφριά καθυστέρηση στην ανάπτυξη αυτών που εκφράζουν την πρωτεΐνη Fras1/ch (Στήλη A). Απουσία ιστιδίνης αναπτύσσονται μόνο τα διπλά μετασηματισμένα στελέχη Fras1ch/PACT2+ VEGF164/PGBT9 (Στήλη B), όπως επίσης και απουσία αδενίνης, όπου και αποκτούν επιπλέον ροζ χρώμα (Στήλη Γ). Όταν τα στελέχη αυτά αναπτυχθούν σε θρεπτικό που περιέχει το χρωμογόνο υπόστρωμα XGal αποκτούν μπλε χρώμα (Στήλη Δ). Η γαλάζια χρώση στον μετασηματισμό 3 πιθανόν οφείλεται σε κάποια ενδογενή ενεργοποίηση.

Γ5) Τα διπλοειδή στελέχη *Fras1ch/pACT2+VEGF164/PGBT9* επιβιώνουν απουσία ιστιδίνης έπειτα από πειραματική διαδικασία σύζευξης

Ένα από τα πλεονεκτήματα του σακχαρομύκητα ως πειραματικό εργαλείο είναι η ικανότητά του να σχηματίζει διπλοειδή στελέχη έπειτα από σύζευξη απλοειδών στελεχών διαφορετικού συζευκτικού τύπου. Βάσει αυτής της ιδιότητας, δημιουργήσαμε διπλοειδή στελέχη που περιείχαν τους συνδυασμούς 1,2,3,4 (βλ Παράγραφο Γ4) έπειτα από πειραματική σύζευξη απλοειδών στελεχών. Συγκεκριμένα, στα στελέχη συζευκτικού τύπου **PJ69-4a** εισήχθησαν ξεχωριστά οι κατασκευές *Fras1ch/pACT2* και *pACT2* και στα στελέχη **PJ69-4A** εισήχθησαν ξεχωριστά οι κατασκευές *VEGF164/PGBT9* και *PGBT9*. Με τη σύζευξη των παραπάνω στελεχών, σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς παρήχθησαν διπλοειδή στελέχη τα οποία περιελάμβαναν τις κατασκευές: 1)*PACT2+PGBT9* 2)*PACT2+VEGF164/PGBT9* 3)*Fras1ch/PACT2+PGBT9* 4)*Fras1ch/PACT2+VEGF164/PGBT9*. Τα διπλοειδή στελέχη, έπειτα από την ολοκλήρωση της διαδικασίας σύζευξης, η οποία ελέγχθηκε με παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο (τα συζευγμένα στελέχη εμφανίζουν μία χαρακτηριστική δομή, *shmoo*, Εικόνα 37), αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό με 3mM 3-Αμινοτριάζόλη, το οποίο δεν περιείχε το απαραίτητο αμινοξύ της ιστιδίνης. Τα μόνα στελέχη που αναπτύχθηκαν, όπως αναμενόταν ήταν τα 4), στα οποία συνεκφάζονται οι *Fras1/ch* και *VEGF164* καθώς η αλληλεπίδρασή τους μέσα στον πυρήνα του κυττάρου οδηγεί στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου *HIS3*, που είναι υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση της ιστιδίνης. (Εικόνα 38).



Εικόνα 37: Σύζευξη απλοειδών στελεχών συζευκτικού τύπου PJ69-4a και PJ69-4A στο σακχαρομύκητα. Παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές συζευκτικές δομές 'shmoo' (βέλος) .



Εικόνα 38: Ανάπτυξη διπλοειδών στελεχών σακχαρομύκητα στα οποία συνεκφράζονται οι πρωτεΐνες Fras1/ch και VEGF164, σε θρεπτικό χωρίς ιστιδίνη με 3mM 3-Αμινοτριάζόλη (D). Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις που λείπει είτε η μία, είτε η άλλη πρωτεΐνη (A, B, C) δεν παρατηρείται ανάπτυξη των αποικιών λόγω της μη ενεργοποίησης του γονιδίου βιοσύνθεσης ιστιδίνης HIS3.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω πειράματα που αφορούν την αλληλεπίδραση της Fras1 με τον αυξητικό παράγοντα VEGF :

- ✓ Σε πολωμένα επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα ποντικού mIMCD, τα έξι μοτίβα τύπου χορδίνης της πρωτεΐνης Fras1 αλληλεπιδρούν στο ενδοπλασματικό δίκτυο με όλες οι ισομορφές του VEGF (VEGF188, VEGF164, VEGF120), γεγονός που καταδεικνύει ότι η περιοχή αλληλεπίδρασης εντοπίζεται στην κοινή περιοχή των ισομορφών αυτών..

- ✓ Ολόκληρη η πρωτεΐνη Fras1 δεν έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τον αυξητικό παράγοντα VEGF 164, καθώς η περιοχή μεταξύ των μοτίβων φουρινών και του τέλους των μοτίβων πρόσδεσης ασβεστίων που περιέχει είναι υπεύθυνη για τη στερεοχημική παρεμπόδιση (masking) της αλληλεπίδρασης.
- ✓ Η παρουσία τουλάχιστον των πέντε πρώτων μοτίβων χορδινών της Fras1 είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα VEGF 164 στο εκκριτικό μονοπάτι.
- ✓ Η αλληλεπίδραση αυτή επιβεβαιώνεται και σε ένα ετερόλογο σύστημα, όπως ο σακχαρομύκητας, με αποτέλεσμα έπειτα από σύζευξη ή διπλό μετασχηματισμό να ενεργοποιούνται συγκεκριμένοι γονιδιακοί μάρτυρες που επιτρέπουν την επιβίωση των στελεχών απουσία απαραίτητων αμινοξέων και την παραγωγή μπλε χρωστικής έπειτα από ανάπτυξη σε θρεπτικό με χρωμογόνο υπόστρωμα XGal.

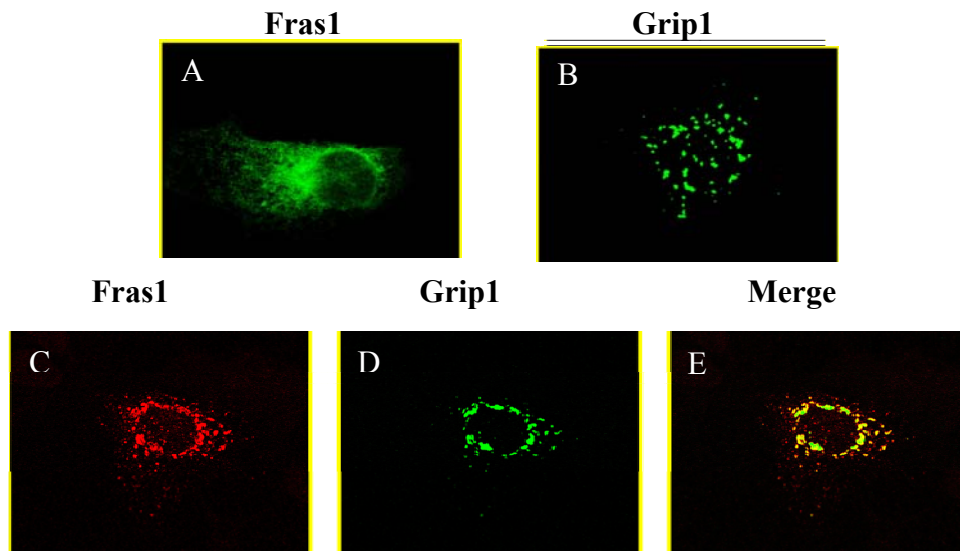
Δ) Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ Grip1 ΚΑΙ ΤΗΣ Fras1 ΣΤΗΝ ΑΝΑΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ

Στα παραπάνω πειράματα διαπιστώθηκε ότι τα μοτίβα τύπου χορδίνης της Fras1 αλληλεπιδρούν με τον αυξητικό παράγοντα VEGF στο εκκριτικό μονοπάτι. Είναι γνωστό ότι για την έκκριση της πρωτεΐνης Fras1 απαιτείται η αλληλεπίδρασή της με την κυτταροπλασματική PDZ domain πρωτεΐνη Grip1 (Takamiya *et al.*, 2004). Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στη στόχευση της Fras1 στη βασικοπλευρική πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων, όπου και εκκρίνεται. Για την αλληλεπίδραση αυτήν απαραίτητη είναι η παρουσία των τεσσάρων τελευταίων καρβοξυτελικών αμινοξέων GTEV της Fras1, που αποτελούν μοτίβο πρόσδεσης για τις PDZ επικράτειες. Όσον αφορά τη Grip1, απαραίτητη είναι η παρουσία των δύο πρώτων από τις 7 συνολικά PDZ περιοχές που περιέχει για τη σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης (Long *et al.*, 2008). Το ερώτημα που τέθηκε ήταν αν η αλληλεπίδραση της Fras1 με την PDZ πρωτεΐνη Grip1 που λαμβάνει χώρα επίσης ενδοκυτταρικά μπορεί να επηρεάσει τον εντοπισμό του VEGF στο κύτταρο ή ακόμα μπορεί να εμπλέκεται και στην έκκρισή του στον εξωκυττάριο χώρο.

Για τα αρχικά πειράματα διαμόλυνσης που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές mIMCD και COS7. Τα αποτελέσματα που προήλθαν από τη μελέτη τους ήταν τα ίδια. Εφόσον οι κυτταρικές σειρές αυτές εμφάνισαν την ίδια συμπεριφορά, επιλέξαμε να συνεχίσουμε τα πειράματά μας σε COS7 κύτταρα, τα οποία έχουν το πλεονέκτημα ότι εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα διαμόλυνσης από τα mIMCD.

Δ1) Η αλληλεπίδραση Fras1/Grip1 οδηγεί στο συνεντοπισμό τους σε ευκαρυωτικά κύτταρα

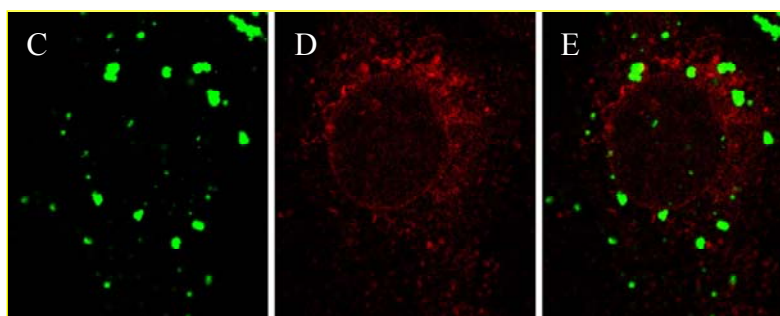
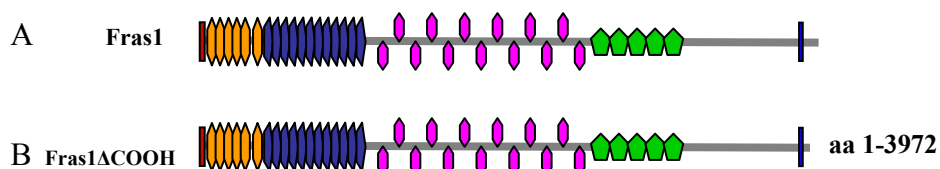
Η αλληλεπίδραση των Fras1 και Grip1 είναι εμφανής σε πειράματα συνδιαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών (mIMCD και COS7), όπου παρουσία της Grip1, παρατηρείται αλλαγή στην τοπολογία της Fras1. Φυσιολογικά, η πρωτεΐνη Fras1 εμφανίζει ένα διάχυτο πρότυπο εντοπισμού στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Εικόνα 39A) και η κυτταροπλασματική PDZ domain πρωτεΐνη Grip1 ένα στικτό πρότυπο (Εικόνα 39B). Κατά τη συνέκφρασή τους, οι δύο πρωτεΐνες ανιχνεύονται σε διακριτές περιοχές συνεντοπισμού (Εικόνα 39C-E).



Εικόνα 39: Οι πρωτεΐνες Fras1 και Grip1 συνεντοπίζονται κατά τη συνέκφραση τους σε COS7 κύτταρα. (A): Διαμόλυνση των κυττάρων με Fras1, κατά την οποία η πρωτεΐνη εντοπίζεται διάχυτη στο ενδοπλασματικό δίκτυο. (B): Διαμόλυνση των κυττάρων με Grip1, κατά την οποία η πρωτεΐνη εντοπίζεται σε διακριτά ενδοκυτταρικά συσσωματώματα. (C-E): Συνδιαμόλυνση των Grip1 και Fras1. Παρατηρείται συνεντοπισμός τους σε στικτά σημεία του κυττάρου.

Δ2) Η Fras1 ΔCOOH δεν αλληλεπιδρά με τη Grip1

Η αλληλεπίδραση αυτή όπως προαναφέρθηκε, οφείλεται στα τέσσερα τελευταία καρβοξυτελικά αμινοξέα της Fras1 (GTEV). Με την αφαίρεση των αμινοξέων αυτών, δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στην τοπολογία της Fras1 παρουσία της Grip1 (Εικόνα 40).



Εικόνα 40: Η Fras1 ΔCOOH δεν αλληλεπιδρά με τη Grip1 σε COS7 κύτταρα. (A) Η δομή της Fras1. (B): Η κατασκευή Fras1ΔCOOH, στην οποία λείπουν τα τελευταία καρβοξυτελικά αμινοξέα της

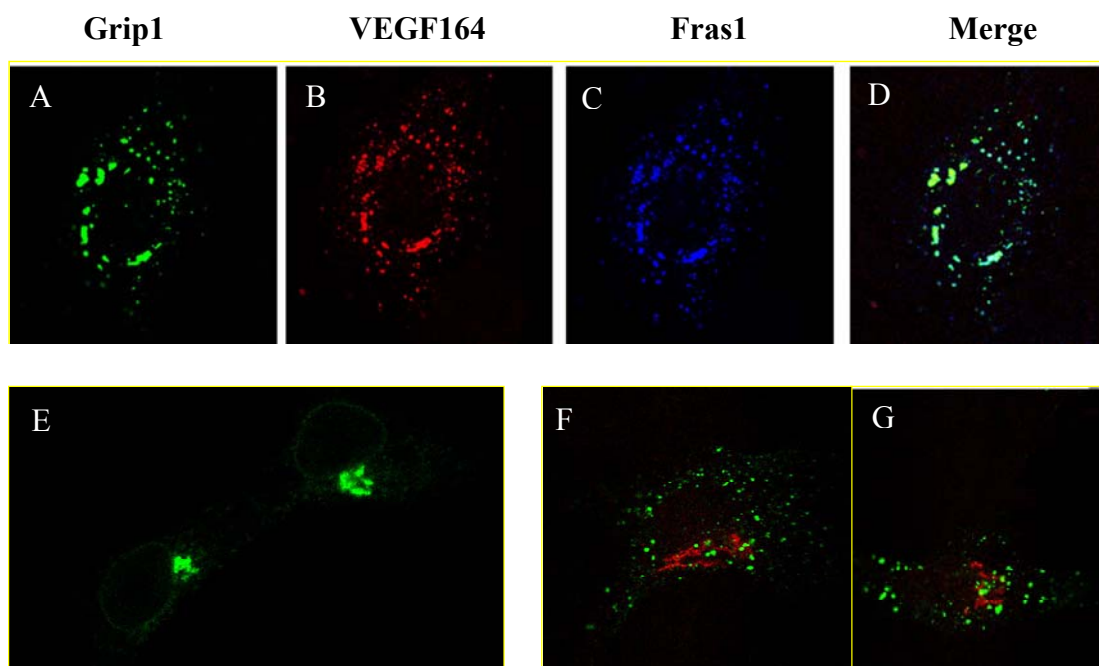
Fras1 (C-E): Συνέκφραση των Grip1 και Fras1ΔCOOH. (C): Εντοπισμός της πρωτεΐνης Grip1 στα κύτταρα. (D): Εντοπισμός της Fras1ΔCOOH στα κύτταρα. (E): Η συνέκφραση Grip1 και Fras1ΔCOOH δεν οδηγεί στο συνεντοπισμό τους.

Δ3) Οι Grip1, Fras1 και VEGF164 συνεντοπίζονται σε ευκαρυωτικά κύτταρα

Το ερώτημα που διερευνήθηκε αρχικά ήταν ποιο είναι το πρότυπο εντοπισμού του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF164 στην περίπτωση συνέκφρασης με τις πρωτεΐνες Fras1 και Grip1. Εφόσον η πρωτεΐνη Fras1 έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά αφενός με τον αυξητικό παράγοντα VEGF164 μέσω των μοτίβων κυστεΐνης τύπου χορδίνης (WVC) που περιέχει και αφετέρου με τη Grip1 μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου, εξετάσθηκε κατά πόσο μπορεί να οδηγήσει τον VEGF164 στις περιοχές συνεντοπισμού με την Grip1. Πράγματι, σε πειράματα τριπλής διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων παρατηρήθηκε ότι ο VEGF164 συγκεντρώνεται στα σημεία συνεντοπισμού Fras1-Grip1 (Εικόνα 41 A-D).

Δ4) Οι Grip1 και VEGF164 δε συνεντοπίζονται χωρίς τη μεσολάβηση της Fras1

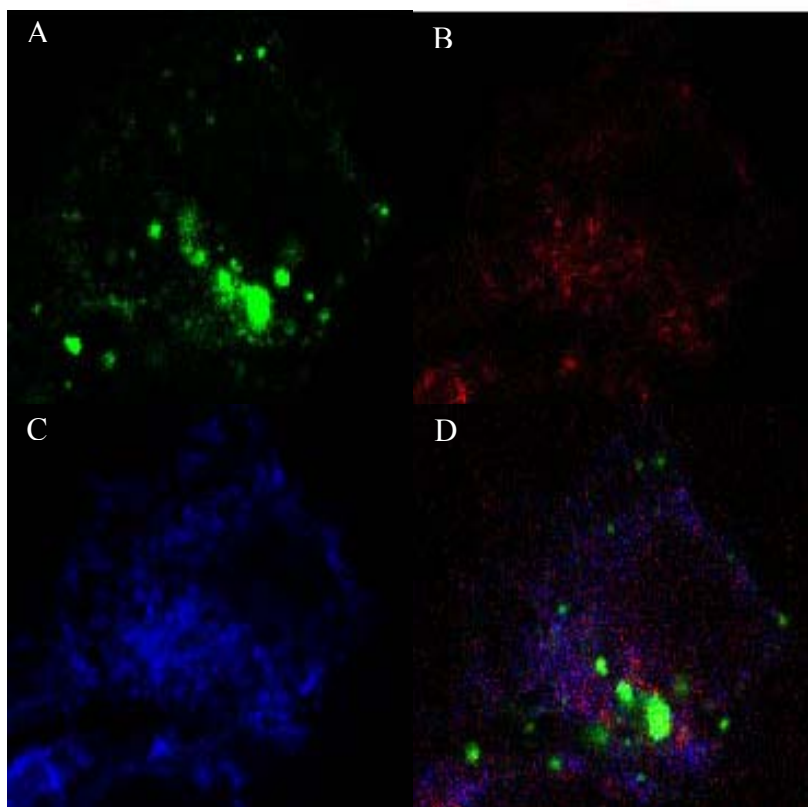
Για να επιβεβαιωθεί ότι η αλλαγή της τοπολογίας του VEGF164 δεν οφείλεται σε πιθανή αλληλεπίδρασή του με την Grip1, πραγματοποιήθηκε συνέκφραση των Grip1 και VEGF164 στα κύτταρα (Εικόνα 41E-G). Καμία αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση αυτή στην τοπολογία του VEGF164, ο οποίος συνεχίζει να εντοπίζεται στο σύστημα Golgi, ενώ η πρωτεΐνη Grip1 εντοπίζεται σε διακριτές ενδοκυτταρικές περιοχές. Η αλληλεπίδραση Grip1/Fras1 επομένως οδηγεί στην αλλαγή του προτύπου έκφρασης του VEGF164.



Εικόνα 41: Συνεντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1, Grip1 και VEGF164 κατά τη συνέκφρασή τους σε κύτταρα COS7. Κατά την τριπλή διαμόλυνση με Grip1 (A), VEGF164 (B) και Fras1 (C), παρατηρείται συνεντοπισμός τους μέσα στο κύτταρο (D). Κατά την απλή διαμόλυνση με VEGF164, η πρωτεΐνη εμφανίζει ένα περιορισμένο πρότυπο εντοπισμού μέσα στο κύτταρο (E). Το πρότυπο εντοπισμού του VEGF164 δεν επηρεάζεται από την πρωτεΐνη Grip1 σε πειράματα συνδιαμόλυνσης Grip1/VEGF164 (F,G). Η πρωτεΐνη Grip1 ανιχνεύεται με πράσινο χρώμα και ο VEGF164 με κόκκινο.

Δ5) Η Grip1 δε συνεντοπίζεται με τις Fras1 ΔCOOH και VEGF164

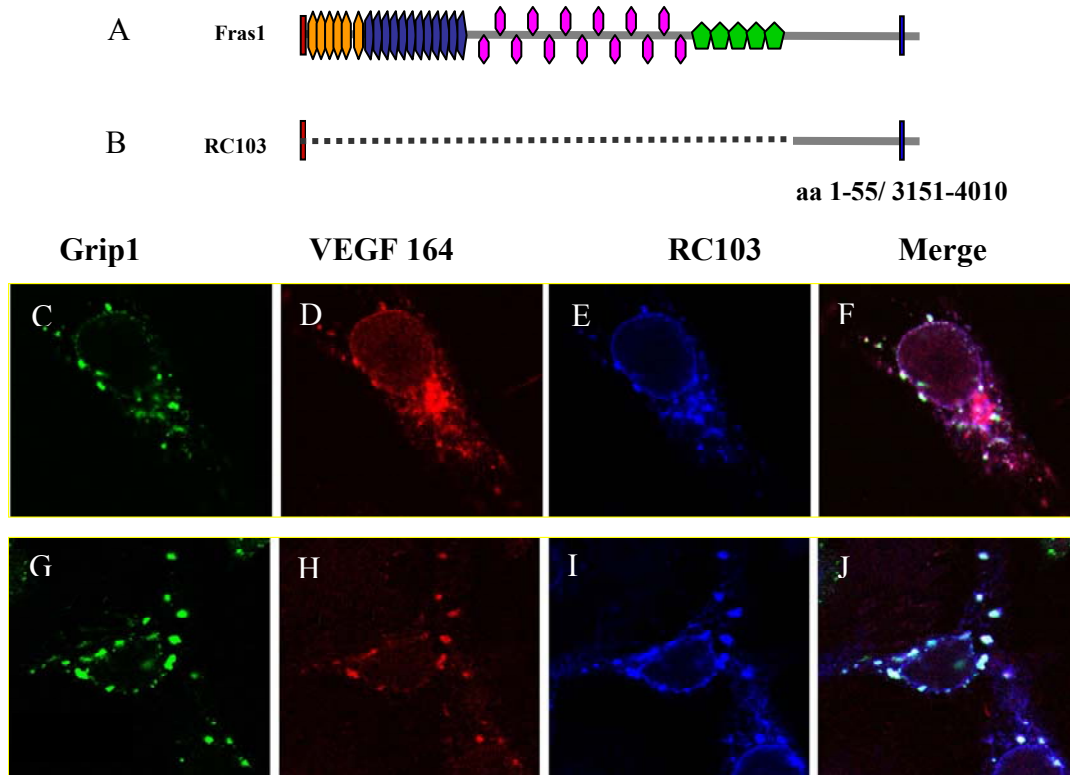
Για να επιβεβαιωθεί ότι η αλλαγή στην τοπολογία του VEGF164 οφείλεται στην αλληλεπίδραση Fras1/Grip1, πραγματοποιήθηκε τριπλή διαμόλυνση των κυττάρων με το cDNA των VEGF164, Grip1 και Fras1ΔCOOH (Για την περιγραφή της Fras1ΔCOOH βλ. Εικόνα 40). Η αφαίρεση των τελευταίων καρβοξυτελικών αμινοξέων της πρωτεΐνης Fras1 αναστέλλει την αλληλεπίδρασή της με το Grip1. Όταν η Fras1 ΔCOOH εκφράστηκε στα κύτταρα μαζί με την Grip1 και τον VEGF164, δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης του τελευταίου (Εικόνα 42).



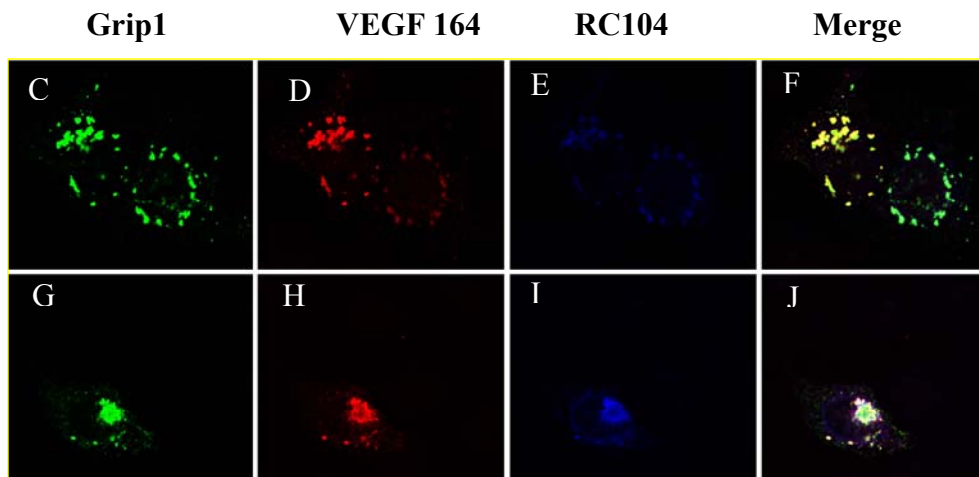
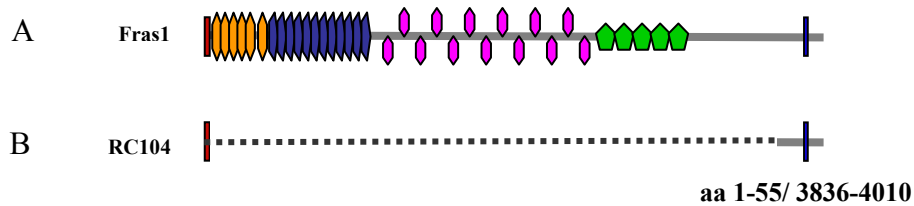
Εικόνα 42: Η Grip1 δε συνεντοπίζεται με τις Fras1ΔCOOH και VEGF164. Κατά την τριπλή διαμόλυνση Grip1 (A), Fras1 ΔCOOH (C) και VEGF164 (B) δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης των δύο τελευταίων (D).

Δ6) Η αλλαγή της τοπολογίας του VEGF164 είναι ανεξάρτητη από τα μοτίβα τύπου χορδίνης της Fras1

Η υπόθεση που πραγματοποιήθηκε αρχικά ήταν ότι η αφαίρεση του τμήματος των έξι μοτίβων τύπου χορδίνης της Fras1 θα οδηγούσε στην αναίρεση του συνεντοπισμού του VEGF164 με τις Fras1 και Grip1, καθώς η περιοχή αυτή της Fras1 είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση με τον VEGF164. Αφαιρώντας ένα μεγάλο εσωτερικό τμήμα της πρωτεΐνης Fras1 (αμινοξέα 55-3151, RC103) παρατηρήθηκε και πάλι συνεντοπισμός της με τον VEGF164 και τη Grip1 (Εικόνα 43). Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι η περιοχή μοτίβων χορδίνων δεν είναι υπεύθυνη για το φαινόμενο αυτό και πιθανότατα ο συνεντοπισμός και των τριών πρωτεϊνών δεν έχει σχέση με την αλληλεπίδραση της Fras1/ch και του VEGF164, αλλά εμπλέκει κάποια άλλη περιοχή της πρωτεΐνης Fras1. Για το λόγο αυτόν, αφαιρέθηκε ένα ακόμα μεγαλύτερο εσωτερικό τμήμα της Fras1 (αμινοξέα 55-3836, RC104) και διαπιστώθηκε ότι και πάλι δεν επηρεάζεται ο συνεντοπισμός τους (Εικόνα 44).



Εικόνα 43: Συνεντοπισμός των Grip1, VEGF164 και RC103 σε κύτταρα COS7. (A): Η δομή της Fras1. (B) Η RC103 περιλαμβάνει το πεπτίδιο σινιάλο της Fras1 (aa 1-55) και ένα καρβοξυτελικό τμήμα της (aa 3151-4010). Η τριπλή έκφραση σε COS7 κύτταρα των Grip1 (C, G), VEGF164 (D, H) και της πρωτεΐνης RC103 (E, I) οδηγεί στο συνεντοπισμό των πρωτεϊνών σε διακριτά σημεία του κυττάρου (F, J).

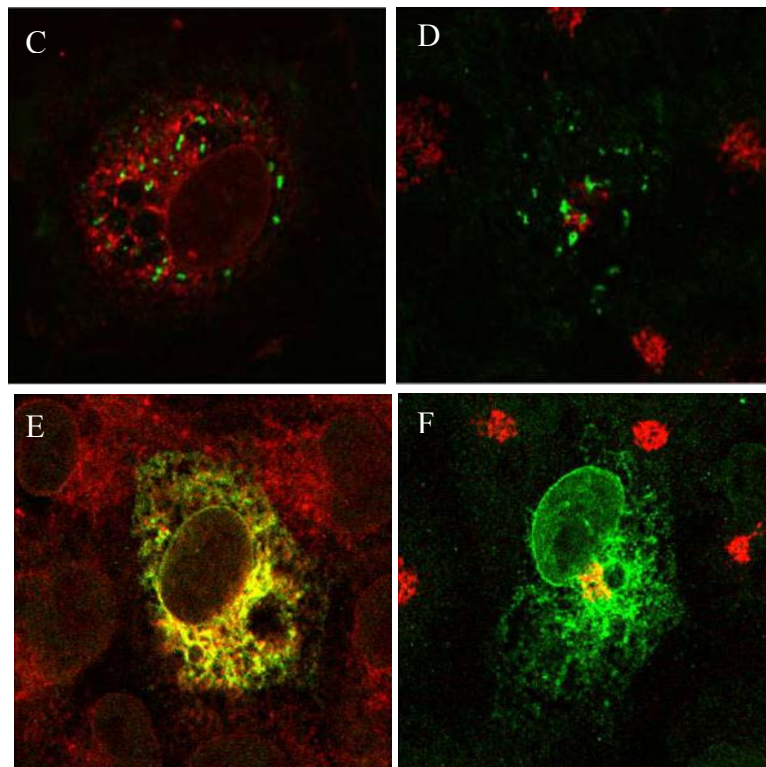
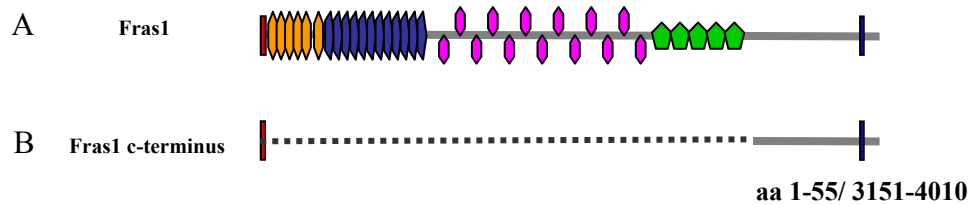


Εικόνα 44: Συνεντοπισμός των Grip1, VEGF164 και RC104 σε κύτταρα COS7. (A): Η δομή της Fras1. (B) Η RC104 περιλαμβάνει το πεπτίδιο σινιάλο της Fras1 και ένα καρβοξυτελικό τμήμα της (aa 1-55/ 3836-4010). Η τριπλή έκφραση σε COS7 κύτταρα των Grip1 (C, G), VEGF164 (D, H) και της πρωτεΐνης RC104 (E, I) οδηγεί στο συνεντοπισμό των πρωτεϊνών σε διακριτά σημεία του κυττάρου (F, J).

Δ7) Ταυτοποίηση της τοπολογίας των Fras1 c-terminus και Grip1 με ενδοκυτταρικούς μάρτυρες

Μέχρι τώρα, διαπιστώθηκε ότι όταν ο VEGF164 συνεκφρασθεί με την πρωτεΐνη Fras1 (ή τμήματά της που περιλαμβάνουν το καρβοξυτελικό άκρο της) και την Grip1 σε ευκαρυωτικά κύτταρα, ανιχνεύεται στα σημεία συνεντοπισμού των δύο τελευταίων. Η υπόθεση που πραγματοποιήθηκε ήταν ότι εφόσον οι υπό εξέταση πρωτεΐνες διασχίζουν το ενδοπλασματικό δίκτυο για την έκκρισή τους, μία πιθανή αλλοίωση της δομής του, λόγω της αλληλεπίδρασης Fras1/Grip1 θα μπορούσε να αλλάξει την τοπολογία τους στο κύτταρο. Για το λόγο αυτόν στραφήκαμε στη μελέτη της δομής του ενδοπλασματικού δικτύου κατά τη συνέκφραση των Fras1 και Grip1. Αρχικά διερευνήθηκε η τοπολογία της Grip1 και μίας καρβοξυτελικής κατασκευής της Fras1 που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1-55 και 3151-4010 (Εικόνα 45B, Fras1 c-terminus) όταν εκφραστούν ξεχωριστά στα κύτταρα. Με τη χρήση των μαρτύρων Concanavalin A (ενδοπλασματικό δίκτυο) και GM130 (cis Golgi), διαπιστώθηκε ότι η Fras1 c-

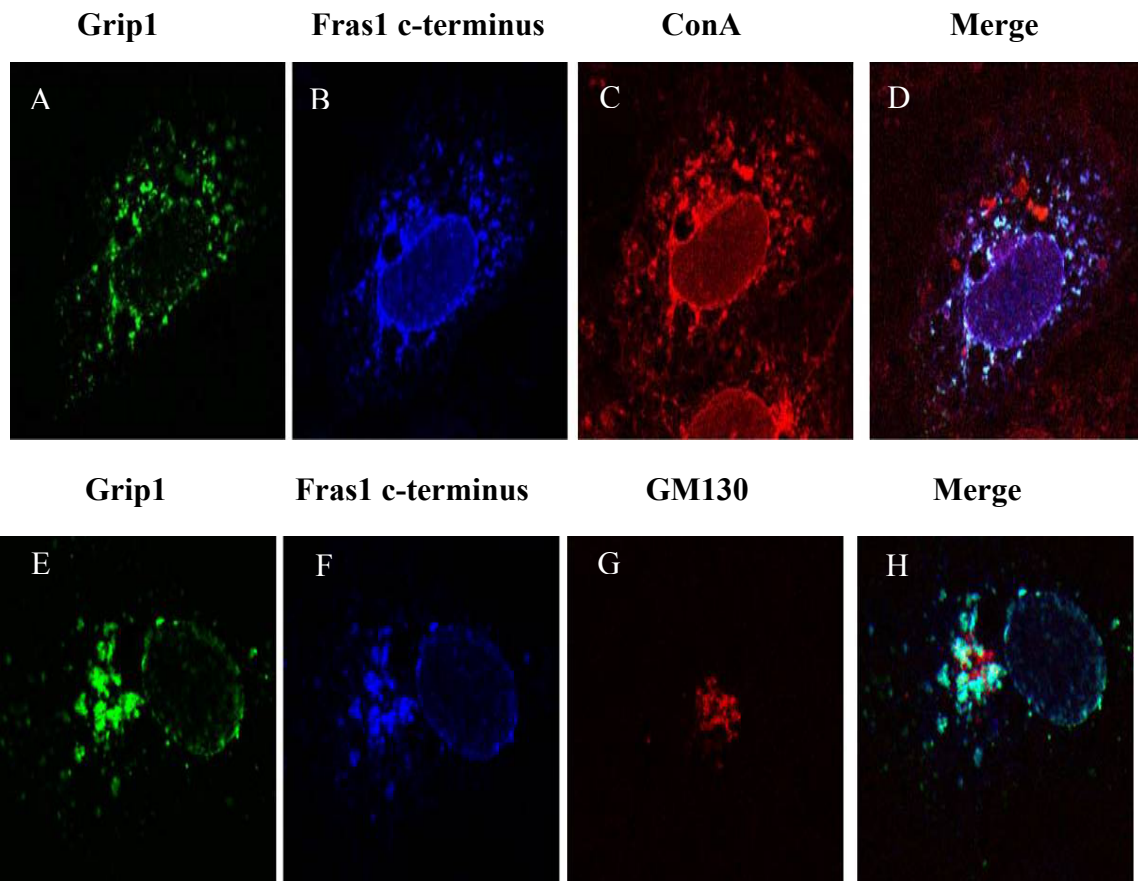
terminus ανιχνεύεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, καθώς συνεντοπίζεται με τον μάρτυρα Concanavalin A, όχι όμως με τον GM130 (Εικόνα 45E, F). Η πρωτεΐνη Grip1 δεν εντοπίζεται ούτε στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ούτε στο σύστημα Golgi (Εικόνα 45C, D) όπως ήταν αναμενόμενο, εφόσον πρόκειται για μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη.



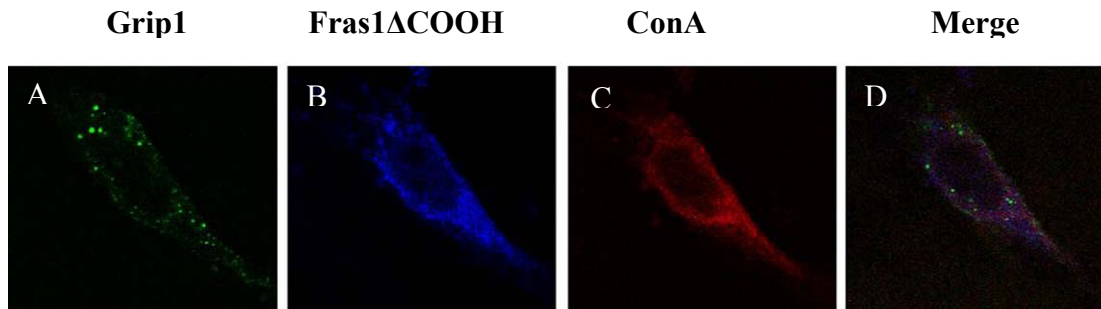
Εικόνα 45: Ταυτοποίηση της τοπολογίας των πρωτεϊνών Grip1 και Fras1 c-terminus σε COS7 κύτταρα με τη χρήση των ενδοκυτταρικών μαρτύρων Concanavalin A και GM130. (A): Η δομή της πρωτεΐνης Fras1. (B): Η κατασκευή Fras1 c-terminus περιλαμβάνει το πεπτίδιο σινιάλο της Fras1 και ένα καρβοξυτελικό τμήμα της (aa 1-55/ 3151-4010) (C): Κατά την απλή διαμόλυνση με Grip1, διαπιστώθηκε ότι τα σημεία στα οποία εντοπίζεται η πρωτεΐνη δεν εμφανίζουν σύσταση ενδοπλασματικού δικτύου καθώς δε συνεντοπίζεται με την Concanavalin A. (D): Η Grip1 δε συνεντοπίζεται ούτε με το μάρτυρα του cis-Golgi GM130. (E): Το καρβοξυτελικό τμήμα της Fras1 (Fras1 c-terminus) ταυτίζεται τοπολογικά με τον μάρτυρα του ενδοπλασματικού δικτύου Concanavalin A. (F): Η Fras1 c-terminus δε συνεντοπίζεται με τον μάρτυρα του cis Golgi GM130.

Δ8) Η συνέκφραση των Fras1 c-terminus και Grip1 στο κύτταρο οδηγεί σε αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου

Για να διαπιστωθεί κατά πόσο η συνέκφραση των Fras1 c-terminus και Grip1, επηρεάζει τη δομή του ενδοπλασματικού δικτύου στο κύτταρο, χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας Concanavalin A, με τη βοήθεια του οποίου διαπιστώθηκε ότι κατά την ταυτόχρονη έκφραση Grip1/Fras1 c-terminus, το ενδοπλασματικό δίκτυο συγκεντρώνεται στις περιοχές αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών χάνοντας τη διάχυτη χαρακτηριστική του δομή (Εικόνα 46A-D). Η δομή του cis Golgi παραμένει ανεπηρέαστη από την αλληλεπίδραση αυτή (Εικόνα 46E-H), γεγονός που φανερώνει ότι επηρεάζεται επιλεκτικά η δομή μόνο του συγκεκριμένου κυτταρικού οργανιδίου. Η παρατήρηση αυτή ερμηνεύει το γεγονός του συνεντοπισμού όλων των υπό εξέταση πρωτεϊνών με τις Grip1 και τα καρβοξυτελικά τμήματα της Fras1 που παρατηρήθηκε σε προηγούμενα πειράματα. Αντίστοιχο φαινόμενο παρατηρήθηκε και κατά την τριπλή έκφραση των Fras1, Grip1 και δύο ξεχωριστών πολυπεπτιδικών τμημάτων (αμινοξέα 1-1640 και 1-1013) της Frem3, ενός από τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Fras1/Frem. Όταν αφαιρεθούν τα τελευταία καρβοξυτελικά αμινοξέα της Fras1 (Fras1 ΔCOOH, βλ. Εικόνα 40), με αποτέλεσμα την ανικανότητα αλληλεπίδρασης με τη Grip1, η δομή του ενδοπλασματικού δικτύου παραμένει αναλλοίωτη (Εικόνα 47). Αξίζει να σημειωθεί ότι αντίστοιχη αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου παρατηρείται και όταν χρησιμοποιηθεί μία παλμιτουλιωμένη μορφή της Grip1 (Grip1-b) η οποία έχει την ικανότητα πρόσδεσης σε μεμβρανικές δομές μέσα στο κύτταρο.



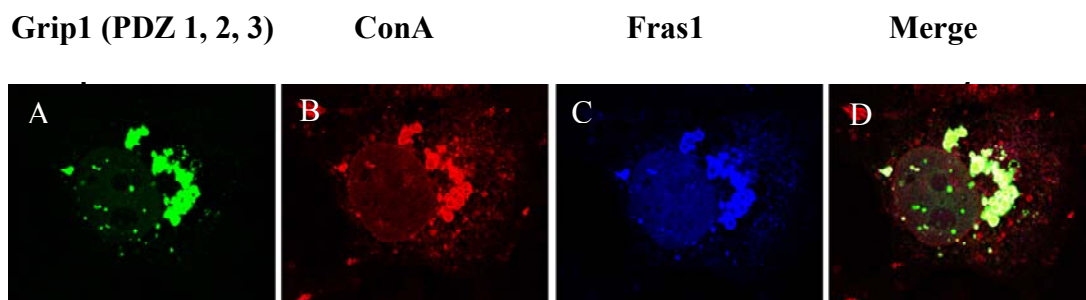
Εικόνα 46: Αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου έπειτα από συνέκφραση των Grip1 και Fras1 c-terminus σε COS7 κύτταρα. Κατά τη συνδιαμόλυνση των Grip1 (A, E) και Fras1 c-terminus (B, F) πραγματοποιείται αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου όπως φαίνεται με τη χρήση του μάρτυρα του ενδοπλασματικού δικτύου Concanavalin A (C) ο οποίος συγκεντρώνεται σε διακριτές περιοχές συνεντοπισμού με τις παραπάνω πρωτεΐνες στο κύτταρο (D). Το σύστημα Golgi (cis) δεν επηρεάζεται από αυτήν την ανακατανομή όπως φαίνεται με τη χρήση του μάρτυρα GM130 (G, H).

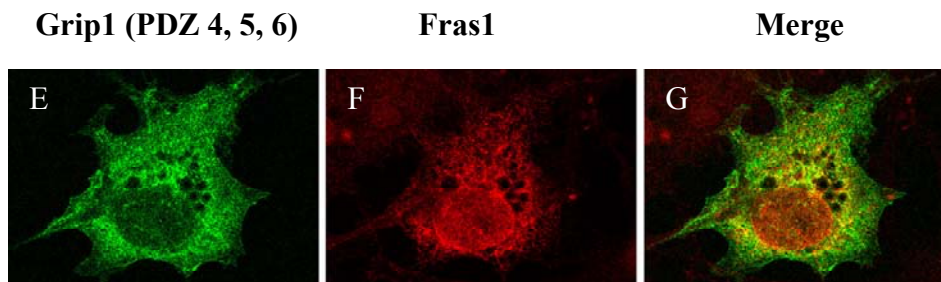


Εικόνα 47: Η συνέκφραση των Grip1 και Fras1ΔCOOH δεν επιφέρει καμία αλλαγή στη διαμόρφωση του ενδοπλασματικού δικτύου. Κατά τη συνδιαμόλυνση Grip1 (A) και Fras1ΔCOOH (B), δεν παρατηρείται συνεντοπισμός τους στα COS7 κύτταρα. Η δομή του ενδοπλασματικού δικτύου παραμένει διάχυτη και αμετάβλητη (C,D).

Δ9) Οι τρεις πρώτες PDZ περιοχές της Grip1 είναι απαραίτητες για την αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου

Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι για την αλληλεπίδραση των Fras1 και Grip1 σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι δύο πρώτες από τις εφτά PDZ περιοχές της Grip1 (Long *et al.*, 2008). Για το λόγο αυτόν πραγματοποιήθηκαν πειράματα συνέκφρασης της Grip1 με τη Fras1 χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές γενετικές κατασκευές, η μία εκ των οποίων περιείχε τις τρεις πρώτες PDZ περιοχές της Grip1 και η δεύτερη τις τρεις τελευταίες. Βρέθηκε ότι η συνέκφραση της πρώτης κατασκευής με τη Fras1 μπορεί να προκαλέσει αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου (Εικόνα 48 A-D), ενώ της δεύτερης όχι. Μάλιστα, η τελευταία δεν εντοπίζεται σε διακριτά συσσωματώματα στο κύτταρο, αλλά εμφανίζει ένα διάχυτο πρότυπο έκφρασης (Εικόνα 48E-G).





Εικόνα 48: Οι τρεις πρώτες PDZ περιοχές της Grip1 οδηγούν σε αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου έπειτα από συνέκφραση με τη Fras1, σε αντίθεση με τις τρεις τελευταίες. Η συνέκφραση της Grip1 (PDZ 1, 2, 3) (A) και της Fras1 (C) οδηγεί σε αναδιοργάνωση της δομής του ενδοπλασματικού δικτύου όπως φαίνεται από το μάρτυρα Concanavalin A (B) στα σημεία συνεντοπισμού τους (D). Αντίθετα, η συνδιαμόλυνση Fras1 και Grip1 (PDZ 4, 5, 6), η οποία εμφανίζει ένα διάχυτο πρότυπο έκφρασης σε σχέση με την Grip1 (PDZ 1, 2, 3) (E), δεν επηρεάζει την τοπολογία της Fras1 (F, G).

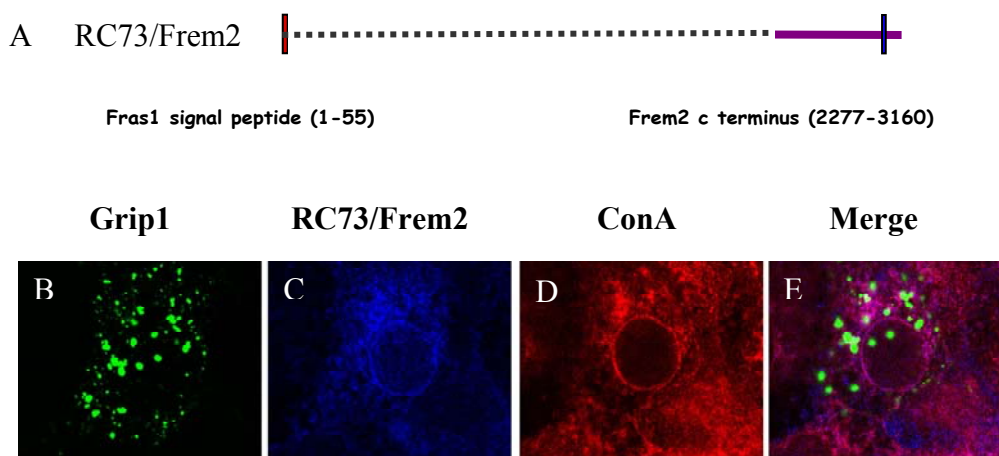
Δ10) Η αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου δεν επηρεάζει μορφολογικά το δίκτυο των μικροσωληνίσκων

Για να διαπιστωθεί αν η αναδιαμόρφωση του ενδοπλασματικού δικτύου σχετίζεται με μια πιθανή αλλαγή στο πρότυπο κατανομής των μικροσωληνίσκων στο κύτταρο, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα EB1 (Santa Cruz). Η οικογένεια των πρωτεϊνών EB1 αποτελεί μία καλά συντηρημένη ομάδα πρωτεϊνών που απαντώνται από τις ζύμες μέχρι και τον άνθρωπο και εντοπίζονται στους μικροσωληνίσκους της ατράκτου και του κυτταροπλάσματος, ειδικά στα μακρινά άκρα τους. Με ανοσοϊστοχημικές μελέτες δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στο πρότυπο κατανομής των μικροσωληνίσκων στα κύτταρα που συνεκφράστηκαν οι Grip1 και Fras1.

Δ11) Το καρβοξυτελικό τμήμα της Frem2 δεν αλληλεπιδρά με τη Grip1 ενδοκυτταρικά

Η πρωτεΐνη Frem2 αποτελεί ένα μέλος της οικογένειας των Fras1/Frem πρωτεϊνών, η οποία έχει δειχθεί *in vitro* ότι αλληλεπιδρά με την Grip1 μέσω των τελευταίων καρβοξυτελικών αμινοξέων της (SSEV) καθώς αποτελούν μοτίβο πρόσδεσης για PDZ επικράτειες (Takamiya *et al.*, 2004). Το ερώτημα που προέκυψε από τα προηγούμενα πειράματα ήταν αν η πρωτεΐνη Frem2 μπορεί να προκαλέσει αντίστοιχο φαινόμενο αναδιοργάνωσης του ενδοπλασματικού δικτύου κατά τη συνέκφρασή της με τη Grip1. Για το λόγο αυτόν πραγματοποιήθηκε μία γενετική κατασκευή, η οποία περιείχε το πεπτίδιο σινιάλο της Fras1 για τη στόχευσή της στο

ενδοπλασματικό δίκτυο και το καρβοξυτελικό τμήμα της Frem2 (RC73, αμινοξέα 2277-3160). Σε αντίθεση με τα αναμενόμενα αποτελέσματα, διαπιστώθηκε ότι το καρβοξυτελικό άκρο της Frem2 δε φαίνεται να συνεντοπίζεται με την Grip1 στο κύτταρο (Εικόνα 49), παρόλο το γεγονός ότι διαθέτει την PDZ συνδεόμενη αλληλουχία SSEV. Πιθανόν για την αλληλεπίδρασή της με τη Grip1 εμπλέκονται επιπλέον παράγοντες που χρειάζεται να διερευνηθούν σε μελλοντικά πειράματα.



Εικόνα 49: (A): Η κατασκευή RC73 περιλαμβάνει το πεπτιδίο σινιάλο της Fras1 (αμινοξέα 1-55) και το καρβοξυτελικό τμήμα της Frem2 (αμινοξέα 2277-3160). (B-E): Συνέκφραση σε COS7 κύτταρα των Grip1 (B) και της RC73 (C). Δεν παρατηρείται συνεντοπισμός τους, όπως επίσης και καμία αλλαγή στη δομή του ενδοπλασματικού δικτύου, όπως φαίνεται με τη χρήση του μάρτυρα Conocanavalin A (D, E).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα:

- ✓ Κατά τη συνέκφραση Grip1-Fras1 πραγματοποιείται μία αναδιοργάνωση στη δομή του ενδοπλασματικού δικτύου, όπως φαίνεται με το μάρτυρα Conocanavalin A, κατά την οποία το ενδοπλασματικό δίκτυο συγκεντρώνεται στις περιοχές αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών. Το αποτέλεσμα της αναδιάταξης αυτής είναι οποιαδήποτε πρωτεΐνη συνεκφραστεί με τις Grip1-Fras1, όπως ο VEGF164 και τμήματα της Frem3, να οδηγείται σε συγκεκριμένα σημεία μέσα στο κύτταρο. Το φαινόμενο ισχύει σε πολωμένα (mIMCD) και μη (COS7) ευκαρυωτικά κυτταρικά συστήματα μελέτης.
- ✓ Το σύστημα Golgi δεν επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση αυτήν.
- ✓ Στο φαινόμενο αυτό δεν επηρεάζεται η δομή των μικροσωληνίσκων, όπως κατέδειξε η χρήση του μάρτυρα EB1.
- ✓ Η αφαίρεση των τελευταίων καρβοξυτελικών αμινοξέων της Fras1 και των δύο πρώτων PDZ περιοχών της Grip1 οδηγούν στην αναίρεση του φαινομένου αυτού, καθώς εμποδίζεται η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών.
- ✓ Το καρβοξυτελικό τμήμα της Frem2, παρόλο που περιέχει ένα μοτίβο πρόσδεσης PDZ (SSEV) δε φαίνεται να προσδένεται στην πρωτεΐνη Grip1 ώστε να προκαλέσει αντίστοιχο φαινόμενο.

E) ANIXNEYΣH TΩN ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ *Fras1/Frem* ΣΕ ΔΕΡΜΑΤΙΚΕΣ ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

Η ανάπτυξη και η εξάπλωση ενός όγκου απαιτεί ένα αγγειοβριθές περιβάλλον, το οποίο να μπορεί να υποστηρίξει τις ανάγκες του σε θρεπτικά συστατικά. Για το λόγο αυτόν, σε νεοπλασίες έχει βρεθεί ότι αυξάνονται δραματικά τα επίπεδα του VEGF, του κατεξοχήν αγγειογενετικού αυξητικού παράγοντα, που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ογκογενετική διαδικασία και την επακόλουθη δημιουργία μεταστάσεων. Στην υπερέκφραση του VEGF οφείλεται και η αυξημένη διαπερατότητα των νεοπλαστικών αγγείων. Σε μία μεγάλη ποικιλία νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένου και των χημικά επαγόμενων όγκων της επιδερμίδας με τη χρήση 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (Larcher *et al.*, 1996) ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα VEGF.

Στα προηγούμενα πειράματα διαπιστώσαμε ότι τα μοτίβα κυστεΐνης τύπου χορδίνης της *Fras1* μπορούν να προσδέσουν αυτόν τον παράγοντα. Δεδομένου ότι η ρύθμιση της δράσης πολλών αυξητικών παραγόντων ρυθμίζεται από μόρια της εξωκυττάριας ύλης θεωρήσαμε ενδιαφέροντα τον προσδιορισμό του προτύπου έκφρασης της *Fras1*, μαζί με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας *Fras1/Frem* σε επιδερμικές νεοπλασίες ενηλίκων ποντικών. Σε πρόσφατες μελέτες της έκφρασης των πρωτεϊνών *Fras1/Frem* σε ενήλικα ποντίκια (Pavlakis *et al.*, 2008) διαπιστώθηκε ότι στη βασική μεμβράνη του ραχιαίου δέρματος αγρίου τύπου ενηλίκων ποντικών εκφράζεται μόνο η πρωτεΐνη *Frem3*, ενώ στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας των αυτιών και της ουράς εκφράζονται όλα τα μέλη της οικογένειας, εκτός από τη *Frem1*. Το ερώτημα που τέθηκε ήταν ποιο είναι το πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών *Fras1/Frem* σε νεοπλασίες της επιδερμίδας και κατά πόσον ο καρκινικός μετασχηματισμός μπορεί να οδηγήσει στην επαγωγή ή καταστολή της έκφρασής τους στην επιδερμίδα.

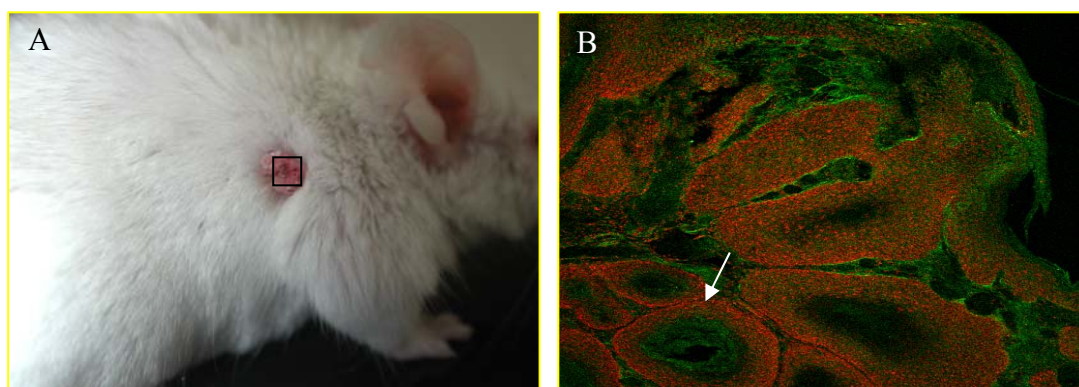
E1) Πειραματική καρκινογένεση δύο σταδίων

Για την επαγωγή όγκων στην επιδερμίδα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της πειραματικής καρκινογένεσης δύο σταδίων, κατά το οποίο πραγματοποιείται μία πρώτη επάλειψη της επιδερμίδας με 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA, Sigma), ένα ισχυρό καρκινογόνο το οποίο προκαλεί μεταλλαγές στα επιδερμικά επιθηλιακά κύτταρα και επακόλουθες επαλείψεις με Croton Oil (Sigma), το οποίο δρα ως μιτογόνο για τα καρκινικά μετασχηματισμένα κύτταρα (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Συνολικά, τα ποντίκια στα οποία εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο ήταν 43 αγρίου τύπου (στελέχους balb-c). Η εφαρμογή πραγματοποιήθηκε στο ραχιαίο δέρμα όλων των ζώων, σε 16 από αυτά επιπλέον και στην ουρά και στα 27 και στην περιοχή των αυτιών. Από τα ζώα αυτά, τέσσερα εμφάνισαν όγκους στη ραχιαία περιοχή (ποσοστό 9%), ενώ κανένα δεν εμφάνισε όγκους στην ουρά ή τα αυτιά (0%). Στην περιοχή των αυτιών και της ουράς η διαδικασία αυτή, παρόλο που δεν οδήγησε στο σχηματισμό κάποιου όγκου, οδήγησε σε επιδερμική υπερπλασία, παρόμοια με φλεγμονή. Τα δείγματα ελήφθησαν από ζώα 15

μηνών και χρησιμοποιήθηκαν σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες για τον εντοπισμό των Fras1/Frem.

E2) Μορφολογικές διαταραχές της νεοπλαστικής επιδερμίδας

Η αρχιτεκτονική της επιδερμίδας στην περιοχή της νεοπλασίας εμφανίστηκε ιδιαίτερα διαταραγμένη, καθώς τα επιθηλιακά κύτταρα είχαν πολλαπλασιασθεί ανεξέλεγκτα, δημιουργώντας ασύμμετρες δομές μέσα στο συνδετικό ιστό. Η δομή του ιστού εμφανίστηκε ανομοιομορφή με κύριο χαρακτηριστικό τα λεγόμενα ‘tumor nests’, κυκλικούς επιθηλιακούς σχηματισμούς που σχηματίζουν «νησίδες» μέσα στο συνδετικό ιστό με χαρακτηριστικά επιδερμίδας (Εικόνα 50). Βιβλιογραφικά, έχει δειχθεί ότι οι περισσότεροι όγκοι που επάγονται με τη χρήση DMBA εμφανίζουν χαρακτηριστικά καρκινώματος του πλακώδους επιθηλίου (squamous cell carcinoma). Στον άνθρωπο, αποτελεί τη δεύτερη πιο συνηθισμένη μορφή καρκίνου του δέρματος μετά από το βασοκυτταρικό καρκίνωμα. Ο λόγος για τον οποίο εμφανίζεται είναι η μετάλλαξη των κερατινοκυττάρων του πλακώδους επιθηλίου.

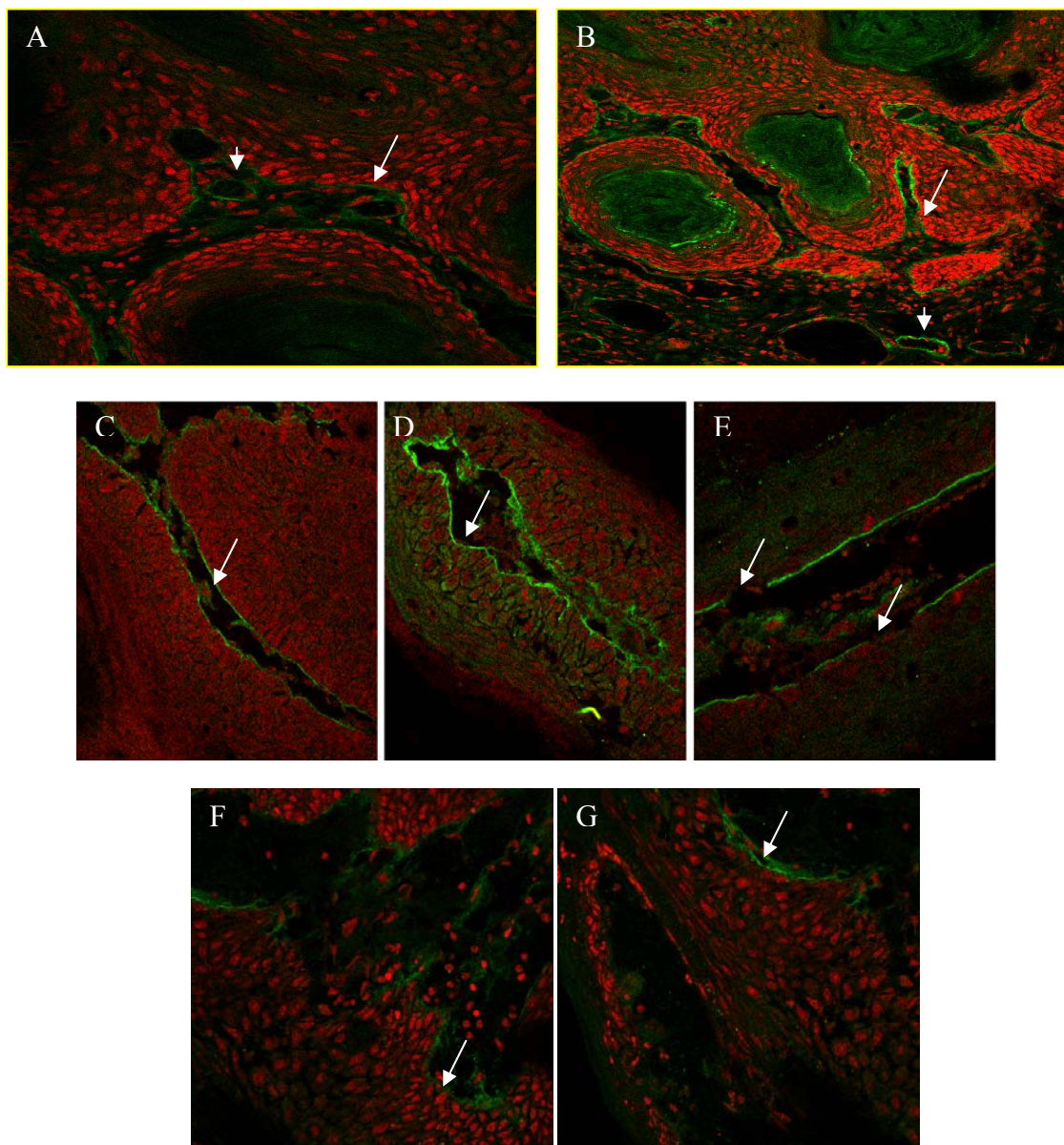


Εικόνα 50: Εμφάνιση νεοπλασίας στο ραχιαίο δέρμα ποντικού 15 μηνών (A). Ο όγκος είναι αποτέλεσμα της ανεξέλεγκτης διαίρεσης πολλών επιθηλιακών κυττάρων, που σχηματίζουν ανομοιομορφες μάζες διαιρούμενων επιθηλίων που επεκτείνονται μέσα στο συνδετικό ιστό. Παρατηρούνται επίσης ‘νησίδες’ επιθηλιακών δομών κυκλικού σχήματος, τα λεγόμενα ‘tumor nests’, που περιβάλλονται από συνδετικό ιστό (B, βέλος).

E3) Η Frem3 είναι η μόνη πρωτεΐνη της οικογένειας των Fras1/Frem που ανιχνεύεται σε νεοπλασίες

Με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων (βλ. Υλικά και Μέθοδοι), βρέθηκε ότι η μόνη πρωτεΐνη της οικογένειας Fras1/Frem που εκφράζεται στη βασική μεμβράνη των παθολογικών επιθηλίων είναι η Frem3, ακολουθώντας παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με την πρωτεΐνη-μάρτυρα της βασικής μεμβράνης αγκρίνη. Η Frem3 εκφράζεται στη βασική μεμβράνη των νεοπλαστικών επιθηλίων της επιδερμίδας καθώς και στη βασική μεμβράνη των tumor nests. Επιπλέον, εκφράζεται στη βασική

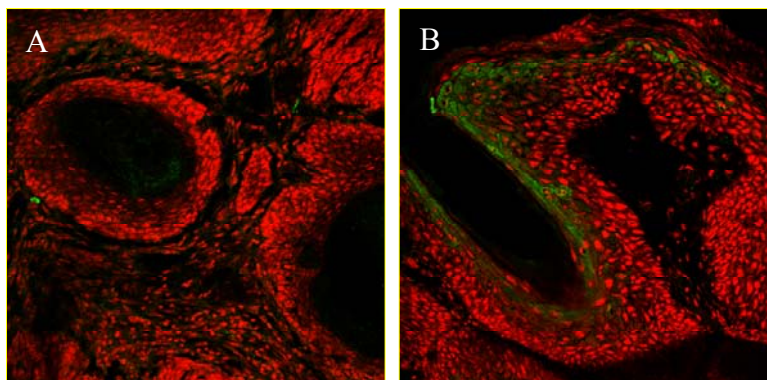
μεμβράνη πολλών αγγείων του συνδετικού ιστού, μερικά από τα οποία βρίσκονται σε στενή επαφή με τα παθολογικά επιθήλια. Το πρότυπο έκφρασής της σε αρκετά σημεία παρουσιάζει ασυνέχειες, κάτι το οποίο αποτελεί ένδειξη αποδιοργάνωσης της βασικής μεμβράνης, χαρακτηριστικό γνώρισμα των βασικών μεμβρανών που περιβάλλουν όγκους (Εικόνα 51).



Εικόνα 51: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της πρωτεΐνης Frem3 σε νεοπλασίες ενηλίκων ποντικών. Η Frem3 εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη νεοπλασιών (A, B, βέλη), καθώς επίσης και στη βασική μεμβράνη των αγγείων του συνδετικού ιστού που περιβάλλει τον όγκο (A, B, μικρά βέλη). Η βασική μεμβράνη σε αρκετά σημεία εμφανίζεται ανομοιομόρφη σε πάχος (B, βέλος), ασυνεχής (E, βέλη) και αποδιοργανωμένη (F, G, βέλη).

Τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των Fras1/Frem δεν εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη των νεοπλαστικών δομών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανώτερη επιθηλιακή

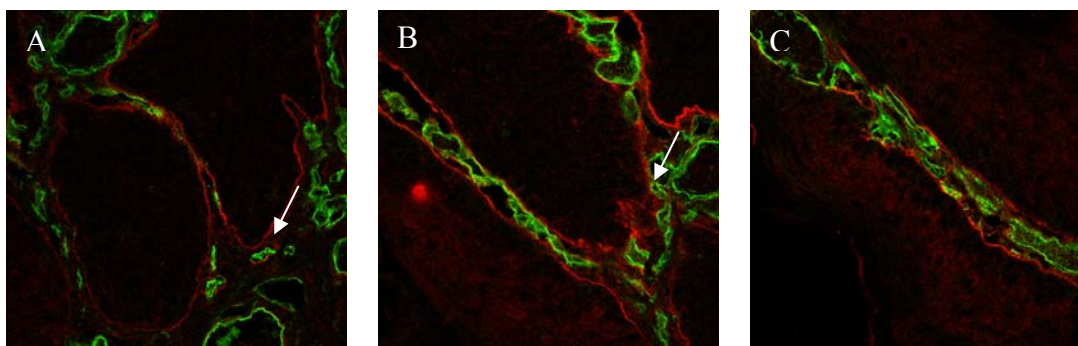
στιβάδα (stratum spinosum) των παθολογικών επιθηλίων φαίνεται να δίνει ένα ενδοκυτταρικό θόρυβο όσον αφορά τη Frem1 (Εικόνα 52).



Εικόνα 52: Εκτός από τη Frem3, τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας Fras1/Frem δεν ανιχνεύονται στη βασική μεμβράνη των νεοπλασιών. (A): Απουσία της Fras1 από τη βασική μεμβράνη των επιδερμικών όγκων. (B): Μη ειδική χρώση του αντί-Frem1 αντισώματος στην περιοχή stratum spinosum της παθολογικής επιδερμίδας.

E4) Η Frem3 δεν εντοπίζεται σε όλα τα αγγεία του παθολογικού συνδετικού ιστού

Η πρωτεΐνη Frem3 δεν εκφράζεται στη βασική μεμβράνη όλων των αγγείων που περιβάλλουν το παθολογικό επιθήλιο, όπως φανέρωσε ο διπλός ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός των πρωτεϊνών PECAM-1 και Frem3. Η PECAM-1 είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων όλων των αγγείων. Παρατηρώντας τα αγγεία στις περιοχές των όγκων, διαπιστώθηκε ότι ποικίλλουν σε διάμετρο, ορισμένα μάλιστα εμφανίζονται υπερτροφικά, περιβάλλουν τον παθολογικό ιστό και βρίσκονται σε πολύ στενή σύνδεση με τη βασική μεμβράνη του (Εικόνα 53). Σε πολλές περιπτώσεις εμφανίζουν μία σχετικά αποδιοργανωμένη αρχιτεκτονική και αρκετά από αυτά, δεν εμπεριέχουν Frem3 στη βασική μεμβράνη τους. Ένα ποσοστό εμφανίζει ασυνεχές και ασύμμετρο πρότυπο έκφρασης της Frem3.

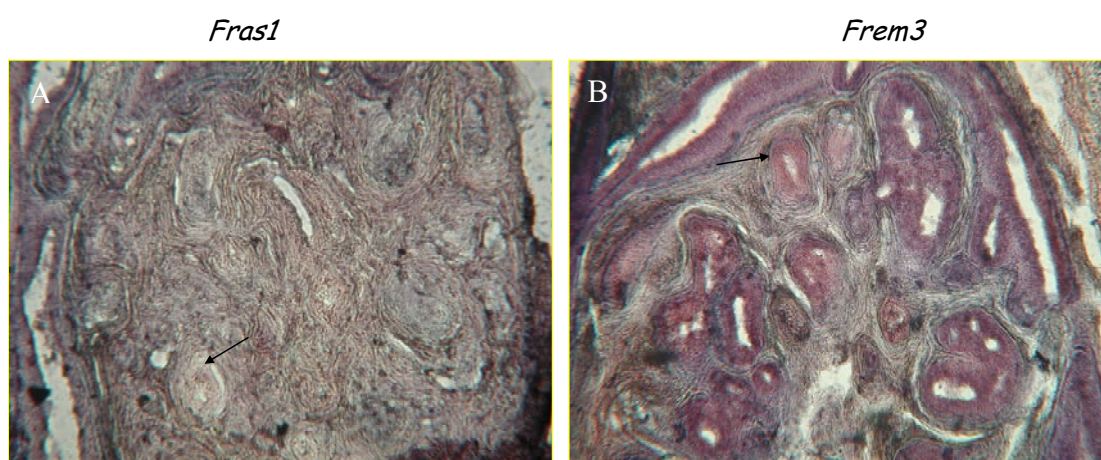


Εικόνα 53: Οι νησίδες καρκινικών κυττάρων περιβάλλονται από βασική μεμβράνη, συστατικό της οποίας αποτελεί η Frem3 (κόκκινο, A, B, C), η οποία σε πολλά σημεία εμφανίζει ασυνεχείες και

αποδιοργάνωση (B, βέλος). Σε στενή σύνδεση με τα παθολογικά επιθήλια βρίσκονται τα αιμοφόρα αγγεία τα οποία σημαίνονται με τον ενδοθηλιακό μάρτυρα PECAM-1 (πράσινο, A, B, C). Η *Frem3* επίσης εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη πολλών αιμοφόρων αγγείων (A, βέλος).

E5) Η *Frem3* εκφράζεται από νεοπλαστικά κύτταρα

Για να διαπιστωθεί αν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες *Fras1*/*Frem* εκφράζονται από τα νεοπλαστικά κύτταρα, πραγματοποιήθηκε *in situ* υβριδισμός RNA για την ανίχνευση των μεταγράφων τους στο νεοπλαστικό ιστό. Το μόνο γονίδιο που βρέθηκε να εκφράζεται στα νεοπλαστικά επιθηλιακά κύτταρα ήταν το *Frem3*, το οποίο ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή για την περιοχή που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 244-471 της *Frem3* (Εικόνα 54).



Εικόνα 54: *In situ* υβριδισμός RNA για την ανίχνευση των *Fras1*/*Frem* πρωτεϊνών. Το RNA των *Fras1* (A), *Frem1*, *Frem2* δεν ανιχνεύεται στα επιθηλιακά κύτταρα των όγκων. Αντίθετα, το mRNA του *Frem3* ανιχνεύεται στα επιθηλιακά κύτταρα των tumor nests και της νεοπλαστικής επιδερμίδας (B, βέλη).

Συνοπτικά, τα συμπεράσματα της μελέτης αυτής ήταν τα εξής:

✓ Κατά την επαγωγή όγκων στην επιδερμίδα ενηλίκων ποντικών με τη χρήση του χημικού καρκινογόνου DMBA, επάγεται ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των επιθηλιακών κυττάρων της επιδερμίδας και σχηματίζονται ανομοιομορφες επιθηλιακές δομές που περιβάλλονται από συνδετικό ιστό. Μάλιστα, τα αγγεία του συνδετικού ιστού βρίσκονται σε στενή επαφή με το παθολογικό επιθήλιο.

✓ Στη βασική μεμβράνη των παθολογικών επιθηλίων, η οποία συχνά είναι αποδιοργανωμένη και ασυνεχής, ανιχνεύεται η πρωτεΐνη *Frem3*, ενώ τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας *Fras1*/*Frem* δεν ανιχνεύονται.

✓ Εκτός από τη βασική μεμβράνη, των νεοπλαστικών επιθηλίων, η *Frem3* ανιχνεύεται στη βασική μεμβράνη πολλών αγγείων που περιβάλλουν τα επιθήλια και βρίσκονται μέσα στο συνδετικό ιστό. Τα αγγεία αυτά εμφανίζουν μία

αποδιοργανωμένη εικόνα και πολλά από αυτά δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη Frem3 στη βασική μεμβράνη τους.

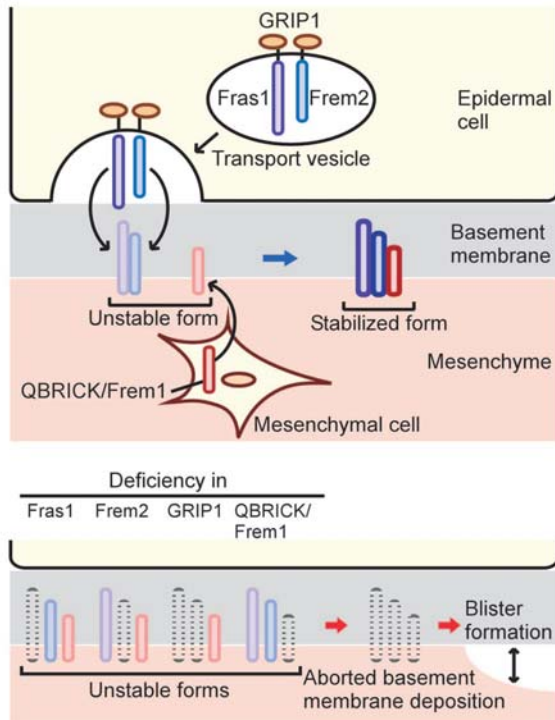
✓ Πειράματα *in situ* υβριδισμού έδειξαν ότι το γονίδιο *Frem3* παράγεται από τα παθολογικά επιθηλιακά κύτταρα του όγκου, συγκεκριμένα από τα tumor nests και το παθολογικό επιθήλιο της επιδερμίδας.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Α) ΣΥΝΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ *Fras1/Frem* ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών *Fras1/Frem* συνεντοπίζονται στη βασική μεμβράνη όλων των υπό εξέταση εμβρυϊκών επιθηλιακών δομών του ποντικού, συμπεριλαμβανομένου της επιδερμίδας, των οφθαλμικών δομών, του πνεύμονα, των νεφρών, του εντερικού επιθηλίου, του χοριοειδούς πλέγματος, του νευρικού σωλήνα, του στομάχου, του οισοφάγου και του οσφρητικού επιθηλίου. Το γεγονός ότι οι *Fras1/Frem* συνεντοπίζονται εμβρυϊκά βρίσκεται σε συμφωνία με πρόσφατες μελέτες, στις οποίες δείχθηκε ότι οι πρωτεΐνες *Fras1*, *Frem1* και *Frem2* σχηματίζουν ένα σύμπλοκο στη βασική μεμβράνη των επιθηλίων, με καθοριστικό ρόλο στην σύνδεση της επιδερμίδας και της δερμίδας, το οποίο για να σταθεροποιηθεί απαιτεί την ταυτόχρονη παρουσία και των τριών συστατικών του. Απουσία τουλάχιστον μίας από τις τρεις πρωτεΐνες αυτές οδηγεί στην αποσταθεροποίηση του προαναφερθέντος συμπλόκου και σε απώλεια ή δραματική μείωση των επιπέδων των άλλων δύο στη βασική μεμβράνη, όπως φανερώνουν ανοσοϊστοχημικά πειράματα ανίχνευσης του εντοπισμού τους σε μεταλλαγμένα για τα αντίστοιχα γονίδια έμβρυα ποντικού. Ο σχηματισμός του συμπλόκου επιβεβαιώνεται και με πειράματα συνδιαμόλυνσης κυτταρικών σειρών, όπου μόνο παρουσία και των τριών πρωτεϊνών *Fras1*, *Frem1* και *Frem2* μπορεί να πραγματοποιηθεί συνανοσοκατακρήμνισή τους. (Kiyozumi *et al.*, 2006). Το τέταρτο μέλος της οικογένειας, η πρωτεΐνη *Frem3*, δεν αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης στην παραπάνω έρευνα.

Έχει βρεθεί ότι οι *Fras1* και *Frem2*, οι οποίες είναι οι μοναδικές πρωτεΐνες της οικογένειας που διαθέτουν μία διαμεμβρανική περιοχή, είναι επιθηλιακής προέλευσης και οι *Frem1* και *Frem3* είναι ως επί το πλείστον μεσεγχυματικής και λιγότερο επιθηλιακής προέλευσης (Petrou *et al.*, 2008). Το μοντέλο που έχει προταθεί από την ερευνητική ομάδα του K. Sekiguchi για την αμοιβαία σταθεροποίηση των *Fras1/Frem1/Frem2* στη βασική μεμβράνη περιλαμβάνει την έξοδο των *Fras1/Frem2* από τα επιθηλιακά κύτταρα με τη μεσολάβηση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης *Grip1* και τη σταθεροποίηση της δομής τους έπειτα από την πρόσδεση της *Frem1*, η οποία προέρχεται από το συνδετικό ιστό (Εικόνα 55).



Εικόνα 55: Το μοντέλο της αμοιβαίας σταθεροποίησης των Fras1, Frem1, Frem2 στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας. Έπειτα από την έξοδο των Fras1/Frem2 από τα επιθηλιακά κύτταρα της επιδερμίδας με τη μεσολάβηση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης Grip1, ακολουθεί η αγκυροβόλησή τους στη βασική μεμβράνη σε μία ασταθή διαμόρφωση, η οποία σταθεροποιείται έπειτα από την πρόσδεση της Frem1, που προέρχεται από το υποκείμενο μεσέγγυμα (Kiyozumi *et al.*, 2006).











Η κοινή τοπολογία των Fras1/Frem στη βασική μεμβράνη των επιθηλιακών δομών φανερώνεται και με ηλεκτρονικές μελέτες, στις οποίες οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται στην περιοχή της sublamina densa (Dalezios *et al.*, 2007; Petrou *et al.*, 2007). Χαρακτηριστικός είναι ο σχηματισμός συσσωματωμάτων (clusters) που εκτείνονται από τη sublamina densa μέχρι το συνδετικό ιστό, φανερώνοντας της σημασία τους στη διατήρηση της σύζευξης της επιδερμίδας με τη δερμίδα.

Το γεγονός ότι στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης (E10.5) δεν ανιχνεύσαμε τη Frem1 στην περιοχή του οφθαλμού μαζί με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες Fras1/Frem, ενώ όπως προαναφέρθηκε η παρουσία και των τριών είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση του συμπλόκου Fras1/Frem1/Frem2, μπορεί να σχετίζεται πιθανώς με τη μειωμένη ικανότητα του αντισώματος που παρήχθη να ανιχνεύει χαμηλά επίπεδα της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Δεν μπορεί να αποκλεισθεί και η πιθανότητα απουσία της Frem1, οι Frem2 και Frem3 να υφίστανται στη βασική μεμβράνη σε μία ασταθή, μη λειτουργική διαμόρφωση, η οποία να σταθεροποιείται σε αργότερα στάδια από τη Frem1 πιθανόν μετά την E11.5 (καθώς το χρονικό διάστημα αυτό εκδηλώνεται ο φαινότυπος της εμβρυϊκής αποκόλλησης στα μεταλλαγμένα στελέχη).

Το τέταρτο μέλος της οικογένειας Fras1/Frem, η πρωτεΐνη Frem3, ακολουθεί στην παρούσα μελέτη ως επί το πλείστον το πρότυπο έκφρασης των υπολοίπων, με

εξαιρεση τη βασική μεμβράνη του μεσοθηλίου των πνευμόνων. Η πρωτεΐνη αυτή έχει δειχθεί ότι μπορεί να αγκυροβολεί στη βασική μεμβράνη ανεξάρτητα από το σύμπλοκο *Fras1/Frem1/Frem2* (Petrou *et al.*, 2007; Kiyozumi *et al.*, 2007), καθώς δεν παρατηρείται απώλεια του εντοπισμού της σε *Fras1*^{-/-} ποντίκια. Για το λόγο αυτόν η διαφοροποίηση του προτύπου ανίχνευσής της από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας *Fras1/Frem* είναι αναμενόμενη. Περισσότερες πληροφορίες για το ρόλο της *Frem3* στην εμβρυϊκή ανάπτυξη αναμένεται να δώσει η απενεργοποίησή του γονιδίου *Frem3* στον ποντικό.

Η *Frem1*, εκτός από τη βασική μεμβράνη, ανιχνεύθηκε και ενδοκυτταρικά στα περιδερμικά κύτταρα, που είναι ένα στρώμα της επιδερμίδας που συμμετέχει σε προσωρινές επιθηλιακές συντήξεις (Macconnachie, 1979; Harris and McLeod, 1982). Στον ποντικό τα δάχτυλα υφίστανται σύντηξη κατά την ημέρα E15.5-E16.0 (Εικόνα 56) και ο διαχωρισμός τους πραγματοποιείται περίπου την έκτη ημέρα μετά τη γέννηση. Φαίνεται λοιπόν, πως η *Frem1*, εκτός από το ρόλο της σύνδεση της επιδερμίδας με τη δερμίδα πιθανώς παίζει ρόλο και σε άλλες αναπτυξιακές διαδικασίες. Μελέτες έδειξαν ότι ο ενδοκυτταρικός ενοπισμός της *Frem1* είναι ανεξάρτητος από το σύμπλοκο *Fras1/Frem1/Frem2* (Petrou *et al.*, 2006). Σε αυτές δείχθηκε ότι η *Frem1* εντοπίζεται και στα περιδερμικά κύτταρα του οφθαλμού, τα οποία συμμετέχουν στη σύντηξη των βλεφάρων κατά την E15.5 με επακόλουθο διαχωρισμό τους την δωδέκατη ημέρα μετά τη γέννηση (Findlater *et al.*, 1993), γεγονός που συνδέεται πιθανόν με τον φαινότυπο 'eyes open at birth', που αποτελεί μοναδικό χαρακτηριστικό των *Frem1*^{-/-} ποντικών (Smyth *et al.*, 2004).

Stage	Characteristics	Gestation Time (Grüneberg 1943)
1	 Distinct footplate	11 days
2	 Slight indentation	12 days
3	 Clear indentation	13 days
4	 Digits start to separate	14 days
5	 Continuation of separation	
6	 Digits separate and widely spread	15 days
7	 Fusion begins at base of digits	16 days
8	 Fusion continues along the digits	
9	 Digits fused, all surface wrinkled	17 days
10	 Periderm shed, digits stay fused until after birth	18/19 days

Εικόνα 56: Η πορεία διαφοροποίησης των άκρων του ποντικού από την E11.0 μέχρι την E19.0 (Macconnachie, 1979).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το εμβρυϊκό πρότυπο συνεντοπισμού των *Fras1/Frem* δεν συνεχίζει να υφίσταται κατά την ενήλικη ζωή. Πρόσφατες μελέτες σε ενήλικα ποντίκια (Pavlakakis *et al.*, 2008), έδειξαν ότι στα ενήλικα ζώα το πρότυπο εντοπισμού των *Fras1/Frem* εμφανίζει διαφοροποιήσεις. Για παράδειγμα, στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας της ουράς και δομών όπως το ρύγχος, εντοπίζονται όλες οι *Fras1/Frem* εκτός από τη *Frem1* και στο ραχιαίο δέρμα εντοπίζεται μόνο η *Frem3*.

Ένα από τα συμπεράσματα της παρούσης μελέτης ήταν και το γεγονός ότι το κολλαγόνο VII, συστατικό των ινιδίων αγκυροβόλησης που συμβάλλουν στη σύνδεση της lamina densa με το υποκείμενο μεσέγγυμα, εμφανίζει χρονικά συμπληρωματικό πρότυπο αντίχενωσης με τις *Fras1/Frem* στα έμβρυα του ποντικού. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασής του ανεβαίνουν δραματικά κατά την E17.5, όταν τα αντίστοιχα επίπεδα των *Fras1/Frem* μειώνονται. Είναι γνωστό ότι τα *bleb* στελέχη εμφανίζουν αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα στο επίπεδο της sublamina densa αποκλειστικά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αντίθετα, τα ποντίκια *Col7a1* *-/-*, εμφανίζουν αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα στο ίδιο επίπεδο μετά τη γέννηση. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι το ρόλο των *Fras1/Frem* αναλαμβάνει το κολλαγόνο VII στα όψιμα στάδια της εμβρυογένεσης και στην ενήλικη ζωή (Chiotaki *et al.*, 2006), καθώς επίσης και ότι κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, το ρόλο του κολλαγόνου VII πιθανόν διαδραματίζουν οι *Fras1/Frem*. Μελέτες σε *Fras1* *-/-* έμβρυα E17.5 (Vrontou *et al.*, 2003) έδειξαν ότι ο εντοπισμός του κολλαγόνου VII δεν επηρεάζεται από την απώλεια της *Fras1*, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο, εφόσον τα χρονικά παράθυρα στα οποία ασκούν τη δράση τους είναι συμπληρωματικά. Αν και για τον ίδιο λόγο, η μελέτη του εντοπισμού των *Fras1/Frem* σε *Col7a1* *-/-* δεν θα αναμενόταν να επηρεασθεί από την έλλειψη του κολλαγόνου VII, θα μπορούσε εντούτοις, να διερευνηθεί αν η απώλεια του κολλαγόνου VII επηρεάσει το χρονικό παράθυρο έκφρασης των *Fras1/Frem*.

Οι πρωτεΐνες *Fras1/Frem* φαίνεται να εντοπίζονται σε πολλές δομές, στο σχηματισμό των οποίων συμμετέχουν επιθηλιακές-μεσεγγυματικές αλληλεπιδράσεις, όπως τα νεφρά, οι πνεύμονες, το χοριοειδές πλέγμα. Η διαταραχή των αλληλεπιδράσεων αυτών οδηγεί σε πολλές αναπτυξιακές βλάβες, όπως η νεφρική αγενεσία. Ο ρόλος της βασικής μεμβράνης σε αυτές τις περιπτώσεις εκτός από δομικός είναι και λειτουργικός. Οι πρωτεΐνες *Fras1/Frem* περιέχουν περιοχές ομολογίας με άλλες γνωστές πρωτεΐνες που έχειδειχθεί ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της δράσης ορισμένων αυξητικών παραγόντων και εξωκυττάρων πρωτεϊνών. Οι *Fras1/Frem* περιέχουν μία κοινή περιοχή 12 μοτίβων ομολογίας με την NG2 πρωτεογλυκάνη θειικής χονδροϊτίνης (CSPG, Chondroitin Sulphate Proteoglycan). Η NG2 αλληλεπιδρά με άλλες εξωκυττάρια πρωτεΐνες και αυξητικούς παράγοντες, όπως τα κολλαγόνα V και VI, ο bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), ο PDGFA (Platelet Derived Growth Factor) (Ανασκόπηση Smyth *et al.*, 2007). Τα πρωτεϊνικά μοτίβα κυστεΐνης τύπου χορδίνης, έχειδειχθεί ότι προσδένουν αυξητικούς παράγοντες της οικογένειας BMP (Bone Morphogenetic Growth Factors) (Wilkinson

et al., 2003) και VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Wilkinson et al., 2007; αδημοσίευτα αποτελέσματά μας)

Στα *Fras1*^{-/-} έμβρυα βρέθηκε ότι χάνεται ο εντοπισμός του κολλαγόνου VI, φανερώνοντας ένα πιθανό ρόλο των μοτίβων NG2 της *Fras1* στη σύνδεσή της με άλλες εξωκυττάρειες πρωτεΐνες (Vrontou *et al.*, 2003). Επειδή η περιοχή NG2 είναι κοινή στις *Fras1/Frem* πιθανώς να συμμετέχει και στο μεταξύ τους διμερισμό ή ολιγομερισμό για το σχηματισμό εξωκυττάρων δικτύων. Επιπλέον, η *Frem1* περιέχει ένα μοτίβο πρόσδεσης σε ιντεγκρίνες (RGD) και πιθανόν συμμετέχει στην κυτταρική προσκόλληση μέσω αλληλεπιδράσεων με ιντεγκρίνες (Kiyozumi *et al.*, 2005).

Ένα από τα αναπάντητα ερωτήματα που χρήζουν διερεύνησης είναι για ποιό λόγο, παρόλο που οι *Fras1/Frem* εκφράζονται κατά μήκος όλης της εμβρυϊκής επιδερμίδας, ο σχηματισμός πομφολυγών λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένα σημεία, όπως στην περιοχή της κεφαλής και των άκρων. Άγνωστο παραμένει ακόμα αν το γεγονός αυτό σχετίζεται με μηχανικά αίτια, ή με τη σύσταση της βασικής μεμβράνης στις περιοχές αυτές

Αξιόλογο είναι το γεγονός ότι όλα σχεδόν τα όργανα στα οποία ανιχνεύσαμε τις πρωτεΐνες *Fras1/Frem* εμφανίζουν διαταραχές στους ασθενείς με σύνδρομο Fraser. Οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από νεφρικές και αναπνευστικές διαταραχές, στις οποίες οφείλεται ένα μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας κατά τον πρώτο εβδομάδα της ζωής τους, οφθαλμικές ανωμαλίες, προβλήματα στα άκρα, γαστρεντερικά και νευρικά προβλήματα (Slavotinek and Tiffit, 2006). Μέχρι τώρα σε ασθενείς με σύνδρομο Fraser έχουν εντοπιστεί μεταλλαγές μόνο στα ανθρώπινα γονίδια *FRAS1* και *FREM1*. Η διερεύνηση της εμφάνισης μεταλλαγών και στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας αυτής στον άνθρωπο παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον.

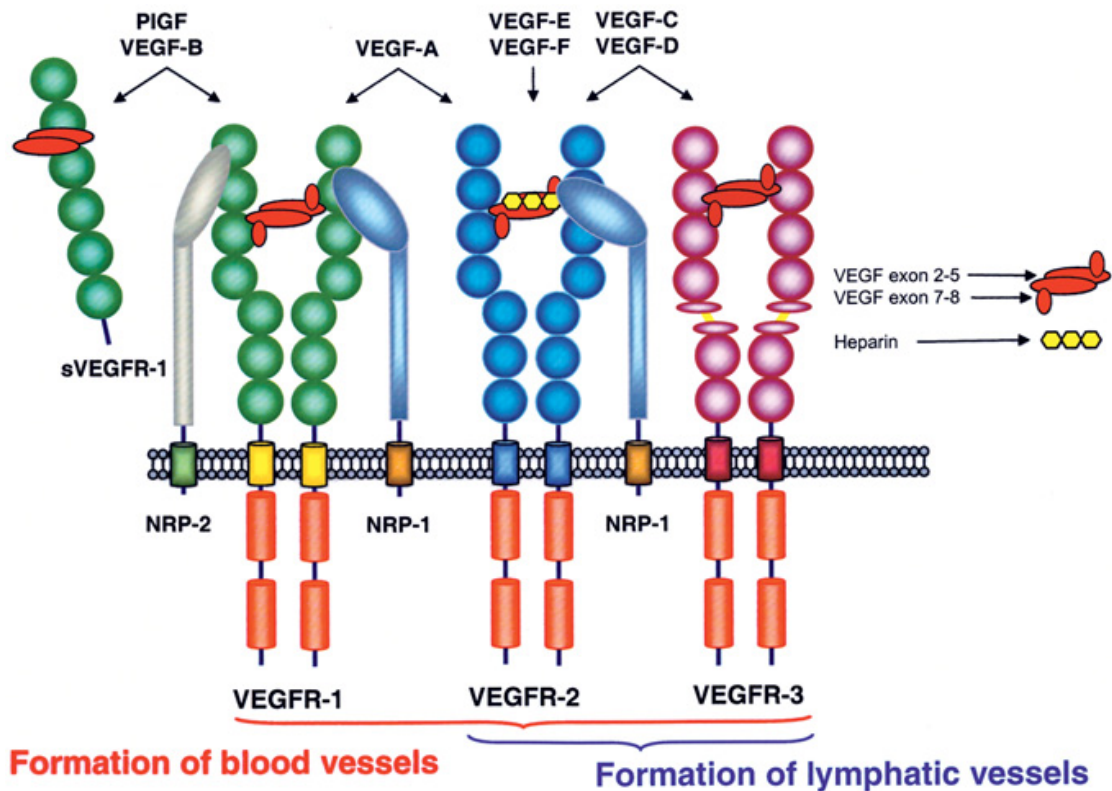
B) ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ *Fras1* ΜΕ ΤΟΝ ΑΥΞΗΤΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VEGF

Η δημιουργία του αγγειακού συστήματος ενός οργανισμού αποτελεί μία από τις σημαντικότερες διαδικασίες κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, που καθορίζουν την επιβίωσή του. Η διαδικασία αυτή βασίζεται στην εκ νέου δημιουργία αγγείων από πρόδρομα κύτταρα (vasculogenesis) και την δημιουργία νέων αγγείων από ήδη προϋπάρχοντα (angiogenesis). Η αγγειογένεση, εκτός από την εμβρυϊκή ανάπτυξη, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στον ενήλικα οργανισμό, κατά την επούλωση πληγών και τον αναπαραγωγικό κύκλο, αλλά εμπλέκεται και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, οι ρετινοπάθειες, η ψωρίαση, η αρθρίτιδα (Ferrara *et al.*, 1997; Zachary, 2003; McColl *et al.*, 2004). Στην αγγειογένεση, τον κυριότερο ρυθμιστικό ρόλο διαδραματίζει ο αγγειογενετικός αυξητικός παράγοντας VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ο οποίος επάγεται σε υποξικές συνθήκες, ασκεί τη δράση του σε ενδοθηλιακά κύτταρα, και ελέγχει την διαίρεσή τους, την επιβίωσή τους μέσω της έκφρασης των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και A1 (Gerber *et al.*, 1998), τη μετακίνησή τους (Zachary *et al.*, 2003), τη διάμετρο των

αγγείων που σχηματίζουν (Nakatsu *et al.*, 2003) και τη διαπερατότητά τους (Senger *et al.*, 1983; Connolly *et al.*, 1989).

Ο VEGF-A είναι το πρώτο μέλος μιας οικογένειας συγγενικών αυξητικών παραγόντων, που περιλαμβάνει τον VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (κωδικοποιείται από ιούς της οικογένειας Orf), VEGF-F (απομονώθηκε από δηλητήριο φιδιών) και PlGF. Η οικογένεια αυτή χαρακτηρίζεται από μία περιοχή ομολογίας VEGF (VEGF Homology Domain, VHD), που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση σε υποδοχείς, καθώς και ένα συντηρημένο μοτίβο κόμβων κυστεΐνης (cystein knot motif). Η σηματοδότηση των μορίων γίνεται μέσω των υποδοχέων τους που είναι κινάσες τυροσίνης και περιλαμβάνουν τους υποδοχείς Flt-1 (VEGFR1), KDR (VEGFR2/Flk-1), Flt-4(VEGFR3). Ο VEGF-A σηματοδοτεί μέσω των δύο πρώτων ενώ ο τρίτος υποδοχέας προσδένει κυρίως VEGF-C και VEGF-D. Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούνται από ένα εξωκυττάριο τμήμα, το οποίο περιλαμβάνει 7 περιοχές ομολογίας με τις ανοσοσφαιρίνες (Ig-like), μία διαμεμβρανική περιοχή (TM) και μία κυτταροπλασματική περιοχή κινάσης τυροσίνης που διακόπτεται από ένα μικρό πεπτιδίο (kinase insert domain) και ακολουθείται από μία αλληλουχία με πολλά κατάλοιπα κυστεΐνης, η οποία έχει σηματοδοτικό ρόλο (Εικόνα 57). Εκτός από τους παραπάνω υποδοχείς, βρέθηκε ότι στο σηματοδοτικό μονοπάτι των VEGF συμμετέχουν και οι νευροφιλίνες 1 και 2 (NP1 και NP2), οι οποίες δρουν ως συνυποδοχείς των VEGFR2 και VEGFR3 αντίστοιχα. Επιπλέον, ο sFlt αποτελεί έναν διαλυτό υποδοχέα που ανταγωνίζεται τη δράση των υπολοίπων (αρνητική ρύθμιση) προσδένοντας ελεύθερα μόρια VEGF μορίων (Cebe-Suarez *et al.*, 2006).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον VEGF-A (στον οποίο θα αναφερόμαστε εφεξής με το γενικότερο όνομα VEGF) περιέχει 8 εξόνια. Με εναλλακτικό μάτισμα παράγονται πέντε πρωτεϊνικές ισομορφές στον άνθρωπο ανάλογα με τον αριθμό των αμινοξέων που περιέχουν (VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 και VEGF206) και τρεις στον ποντικό (VEGF120, VEGF164, VEGF188). Οι ισομορφές αυτές διαφέρουν στην ικανότητά τους να προσδένουν ηπαρίνη. Στον ποντικό, η μικρότερη ισομορφή (VEGF120), η οποία δεν περιέχει τα εξόνια 6 και 7 είναι διαλυτή, η μεγάλη (VEGF188) περιέχει και τα 8 εξόνια και προσδένεται σε ηπαρίνη και η μεσαία (VEGF164), η οποία είναι πιο άφθονη στον οργανισμό και δεν περιέχει το εξόνιο 7, έχει ενδιάμεσες ιδιότητες. Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι η ισομορφή VEGF189 που προσδένεται σε ηπαρίνη, απελευθερώνονται με πρωτεόλυσή της από την πρωτεάση ουροκινάση στον εξωκυττάριο χώρο (Neufeld *et al.*, 1999). Η σημασία του VEGF για την επιβίωση του οργανισμού φαίνεται από το γεγονός ότι η απενεργοποίηση ενός μόνο αλληλίου οδηγεί σε εμβρυϊκό θάνατο στον ποντικό (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1993).



Εικόνα 57: Σχηματική αναπαράσταση των συνδέτων και υποδοχέων της οικογένειας των VEGF πρωτεϊνών. Οι υποδοχείς VEGFR1, VEGFR2 και VEGFR3 αποτελούνται από ένα εξωκυττάριο τμήμα, με 7 περιοχές ομολογίας με τις ανοσοσφαιρίνες (Ig-like, σφαιρικά τμήματα), μία διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτταροπλασματική περιοχή κινάσης τυροσίνης που διακόπτεται από ένα μικρό πεπτίδιο, η οποία έχει σηματοδοτικό ρόλο. Πάνω από τους υποδοχείς παρουσιάζονται οι συνδέτες τους. Εκτός από την αγγειογένεση, οι δύο τελευταίοι συμμετέχουν και στη λεμφοαγγειογένεση. Στο σηματοδοτικό μονοπάτι των VEGF συμμετέχουν και οι νευροφιλίνες 1 και 2 (NP1 και NP2), οι οποίες δρουν ως συνυποδοχείς των VEGFR2 και VEGFR3 αντίστοιχα. Ο sFlt είναι διαλυτός υποδοχέας που ανταγωνίζεται τη δράση των υπολοίπων προσδένοντας ελεύθερα μόρια VEGF μορίων (Cebe-Suarez *et al.*, 2006).

Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν τη σημασία του VEGF στην ομαλή λειτουργία του νευρικού συστήματος και την εμπλοκή του σε μηχανισμούς μνήμης και μάθησης. Ο VEGF εκφράζεται και από νευρικά κύτταρα ως νευροτροφικός παράγοντας. Πειραματικά αποδείχθηκε ότι κατά τη διάρκεια της μάθησης αυξάνει η νευρογένεση και τα επίπεδα του VEGF στον ιππόκαμπο. Ποντίκια στα οποία υπερεκφράσθηκε ο παράγοντας αυτός εμφανίζουν αυξημένη νευρογένεση και καλύτερη απόδοση στα τεστ μάθησης (Cao *et al.*, 2004; Greenberg and Jin, 2004). Αξιοσημείωτο είναι το εύρημα ότι ο VEGF120 εμφανίζει αντικαταθλιπτική δράση και ρυθμίζει τη διάθεση, το φόβο και την επιθετικότητα (Udo *et al.*, 2008).

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο VEGF κλωνοποιήθηκε αρχικά ως VPF (Vascular Permeability Factor), καθώς έχει την ικανότητα να αυξάνει τη διαπερατότητα των

αγγείων, με αποτέλεσμα την έξοδο πλάσματος από αυτά (Senger *et al.*, 1983; Connolly *et al.*, 1989). Η υπερέκφραση του VEGF στην επιδερμίδα του ποντικού με τη χρήση του υποκινητή κερατίνης K14 οδηγεί σε μία φλεγμονώδη κατάσταση που εμφανίζει πολλές ομοιότητες με την ψωρίαση. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση της διαπερατότητας των υπο-επιδερμικών αγγείων και υπερπλασία της επιδερμίδας (Xia *et al.*, 2003). Σε μία άλλη μελέτη, η υπερέκφραση του VEGF στην επιδερμίδα με τη χρήση του υποκινητή K6 οδηγεί στο θάνατο των ποντικών λίγες μέρες μετά τη γέννηση. Τα ζώα εμφανίζουν οίδημα στην επιδερμίδα, αυξημένη διαπερατότητα στα αγγεία και εισβολή λευκών αιμοσφαιρίων στο δέρμα. Τα στελέχη που επιβιώνουν εμφανίζουν υψηλή συχνότητα καρκίνου (Larcher *et al.*, 1998). Η υπερέκφραση του VEGF στον πνεύμονα οδηγεί επίσης σε οίδημα με αυξημένη ποσότητα πλάσματος μέσα στον ιστό λόγω αυξημένης διαπερατότητας των αγγείων (Kaner *et al.*, 2000). Στη ρύθμιση της διαπερατότητας των αγγείων βρέθηκε ότι εμπλέκεται το μονοπάτι σηματοδότησης Akt (Six *et al.*, 2002). Τέλος, ο VEGF φαίνεται να υπερεκφράζεται σε πομφολυγώδεις ασθένειες που χαρακτηρίζονται από οίδημα παθολογία, όπως οι Bullous Pemphigoid, Dermatitis Hepatiformis και Erythema Multiforme (Brown *et al.*, 1995).

Στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε για πρώτη φορά πως τα έξι πρώτα πρωτεϊνικά μοτίβα τύπου χορδίνης της πρωτεΐνης Fras1, τα οποία απαντώνται σε πολλές πρωτεΐνες, όπως στις χορδίνες και στον παράγοντα πήξης του αίματος Von Willebrandt, έχουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τον αυξητικό παράγοντα VEGF μέσα στο εκκριτικό μονοπάτι. Η αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε *ex vivo* σε ευκαρυωτικές πολωμένες κυτταρικές σειρές (mIMCD), όπου ο VEGF, ενώ φυσιολογικά εντοπίζεται στο *cis* Golgi, κατά τη συνδιαμόλυνση με τα μοτίβα τύπου χορδίνης της Fras1, συγκρατείται από αυτά στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η αλληλεπίδραση αυτή επιβεβαιώθηκε περαιτέρω και στο ετερόλογο σύστημα 2 υβριδίων στο σακχαρομύκητα, με τη στόχευση του VEGF και των μοτίβων τύπου χορδίνης της Fras1 στον πυρήνα του *S. cerevisiae*, σε σύντηξη με την περιοχή DNA πρόσδεσης και με την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Gal4 αντίστοιχα, και την ενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς για τη βιοσύνθεση ιστιδίνης, αδενίνης και την παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης, η μεταγραφή των οποίων ελέγχεται από τον παραπάνω μεταγραφικό παράγοντα.

Γενικά, τα μοτίβα τύπου χορδίνης είναι πολύ καλά συντηρημένα στη φύση και απαντώνται σε πολλές εξωκυττάρειες πρωτεΐνες, όπως τα προκολλαγόνα I, II, III, V, η οικογένεια Nel, η διαμεμβρανική πρωτεΐνη Crim1 (Cysteine Rich transmembrane BMP regulator 1) και οι πρωτεΐνες Kielin και Neuralin. Τα μοτίβα αυτά εμπλέκονται στη ρύθμιση της δράσης αυξητικών παραγόντων. Οι χορδίνες είναι πρωτεΐνες που δρουν ως ανταγωνιστές του BMP αυξητικού παράγοντα, και συμμετέχουν στον καθορισμό της πολικότητας στη δροσόφιλα και την ανάπτυξη των οστών στα θηλαστικά (Garcia Abreu *et al.*, 2002). Με μία σειρά γονιδιακών κατασκευών που πραγματοποιήθηκαν για να ελεγχθεί ποια από τα έξι μοτίβα τύπου χορδίνης της Fras1 είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση με τον VEGF, διαπιστώθηκε ότι απαιτούνται τα πέντε πρώτα συνεχόμενα μοτίβα. Αναμένεται με μελλοντικά πειράματα να

χαρακτηρισθεί λεπτομερέστερα ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται η αλληλεπίδραση αυτή, με τον προσδιορισμό της στερεοδιάταξης των μορίων κατά την αλληλεπίδρασή τους και την ταυτοποίηση των καθοριστικών για την αλληλεπίδραση μοτίβων της *Fras1*.

Ένα ενδιαφέρον ερώτημα προς διερεύνηση είναι εάν η *Fras1*, εκτός από τον VEGF, έχει την ικανότητα να προσδένει και άλλους αυξητικούς παράγοντες. Υποψήφιοι για αλληλεπίδραση με τη *Fras1* είναι οι αυξητικοί παράγοντες της οικογένειας BMP, όπως ο BMP4 και BMP7, οι οποίοι σχετίζονται με τη σκελετική ανάπτυξη, καθώς η απενεργοποίηση του *Fras1* οδηγεί σε σκελετικές ανωμαλίες, όπως η συνοστέωση των ακανθωδών αποφύσεων των σπονδύλων και ο διπλασιασμός της ξιφοειδούς απόφυσης του στέρνου (Vrontou S, 2003, διδακτορική διατριβή). Το σύστημα συνδιαμόλυνσης των mIMCD κυττάρων δυστυχώς δεν ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της αλληλεπίδρασης της *Fras1* με αυτούς τους παράγοντες, καθώς η έκφρασή τους ανιχνεύθηκε στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Άλλοι αυξητικοί παράγοντες που μπορεί να σχετίζονται με τη *Fras1*, είναι οι TGF- β (Transforming Growth Factor- β) και BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), οι οποίοι εμπλέκονται σε οστεογενετικές και νευρολογικές διαδικασίες, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο PDGF-A (Platelet Derived Growth Factor-A) εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, εφόσον η απενεργοποίηση του υποδοχέα του οδηγεί σε παρόμοιο φαινότυπο με τα *Fras1*^{-/-} ζώα, δηλαδή σχηματισμό υπο-επιδερμικών πομφολυγών κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Anderson *et al.*, υπό δημοσίευση). Τέλος, αξίζει να διερευνηθεί αν και τα άλλα μέλη της οικογένειας των VEGF πρωτεϊνών μπορούν να προσδένονται στα μοτίβα τύπου χορδίνης της *Fras1*.

Ο VEGF, εκτός από τους υποδοχείς του, έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την ηπαρίνη και τις πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης, την προαναφερθείσα διαμεμβρανική πρωτεΐνη Crim1 και τον αυξητικό παράγοντα CTGF (connective tissue growth factor).

Η Crim1, η οποία επίσης περιέχει έξι μοτίβα τύπου χορδίνης, ρυθμίζει τη δράση του παράγοντα VEGF από τα ποδοκύτταρα στο νεφρικό ενδοθήλιο (Wilkinson *et al.*, 2007). Η απώλειά της στα νεφρά οδηγεί σε υπερτροφικά αγγεία, απώλεια ποδοκυττάρων και μεσαγγειόλυση. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ποντίκια στα οποία έχει μερικώς απενεργοποιηθεί η Crim1 εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά στα οποία έχουν απενεργοποιηθεί οι πρωτεΐνες *Fras1*/*Frem*, όπως συνδακτυλία και πομφόλυγες κατά την ημέρα E12,5 (Pennisi *et al.*, 2007). Όσον αφορά τον CTGF, περιέχει επίσης παρόμοια μοτίβα χορδίνης με τις *Fras1* και Crim1 (τα οποία όμως δε συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το VEGF), προσδένει τον VEGF και καταστέλλει την σύνδεσή του με τον υποδοχέα του KDR (Inoki *et al.*, 2001).

Τα μοτίβα χορδινών προσδένουν μόρια της οικογένειας των TGF- β αυξητικών παραγόντων. Στην περίπτωση της *Fras1* και της Crim1 φάνηκε ότι μπορούν να προσδέσουν και μέλη άλλων οικογενειών αυξητικών παραγόντων (VEGF). Στην περίπτωση της Crim1, σε πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης σε ευκαρυωτικά κύτταρα COS7, η αλληλεπίδραση σχετίστηκε με το μοτίβο κόμβων κυστεΐνης

(cysteine knot) που περιέχουν τα μέλη της οικογένειας των VEGF, καθώς παράγοντες που δεν το περιέχουν δεν μπορούν να προσδεθούν σε αυτήν. Στην παραπάνω μελέτη, παρόλο που υπάρχουν βιολογικές ενδείξεις για την αλληλεπίδραση Crim1-VEGF, όπως η ελάττωση των επιπέδων του VEGF στα ποδοκύτταρα και η αυξημένη φωσφορυλίωση του KDR κατά την έλλειψη της Crim1, σε καμία περίπτωση δεν παρατηρείται η δραματική εικόνα της πλήρους απώλειας του VEGF από τα φυσιολογικά σημεία εντοπισμού του, όπως συμβαίνει στα *Fras1*^{-/-} έμβρυα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός ότι ολόκληρη η *Fras1* αδυνατεί να συγκρατήσει τον VEGF στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η υπεύθυνη για τη στερεοχημική παρεμπόδιση περιοχή είναι αυτή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1417-3450. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει την περιοχή ομολογίας με την NG2 πρωτεογλυκάνη και τα μοτίβα πρόσδεσης ασβεστίου. Ο έλεγχος μέσω της στερεοχημικής παρεμπόδισης της αλληλεπίδρασης *Fras1*/VEGF πιθανόν αποτελεί έναν τρόπο ρύθμισης της δράσης του VEGF.

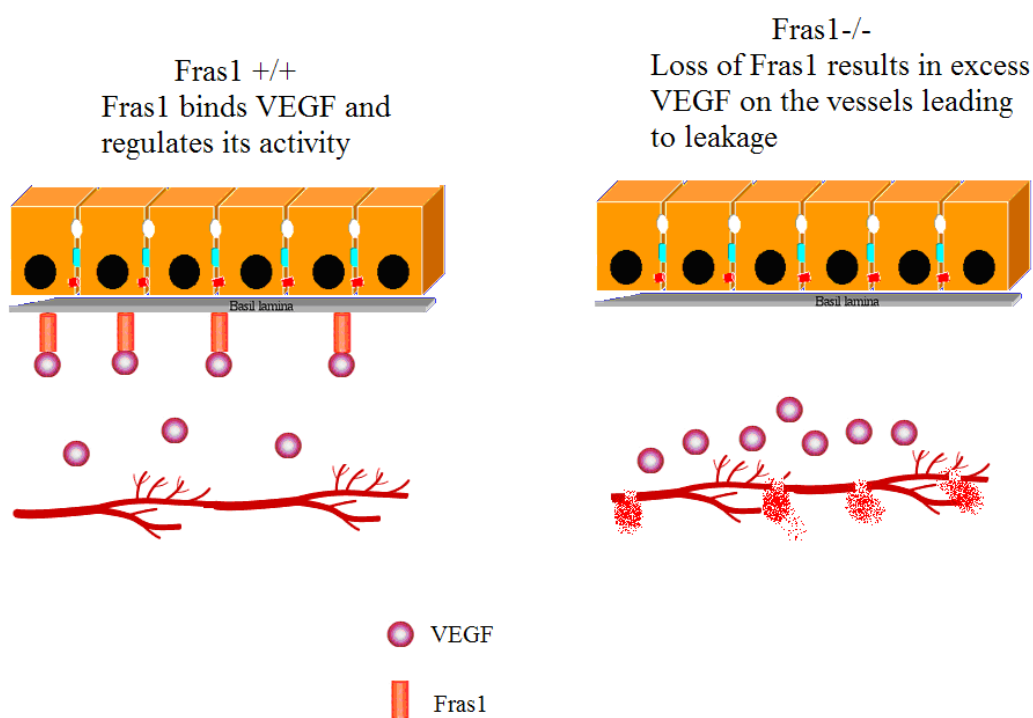
Τέλος, διαπιστώθηκε ότι όλες οι ισομορφές του VEGF μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα μοτίβα χορδινών της *Fras1*, γεγονός που φανερώνει ότι η περιοχή αλληλεπίδρασης του VEGF με τα μοτίβα αυτά δεν περιλαμβάνει το τμήμα που κωδικοποιείται από τα μη κοινά εξόνια πρόσδεσης ηπαρίνης 6 και 7. Η διαπίστωση αυτή φανερώνει ότι η περιοχή αλληλεπίδρασης του VEGF με τη *Fras1* είναι διαφορετική από την περιοχή αλληλεπίδρασης με την ηπαρίνη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ισομορφές του VEGF σε μερικές περιπτώσεις εντοπίζονται σε διαφορετικά όργανα, γεγονός που φανερώνει ότι μπορούν να δράσουν ανεξάρτητα. Στα ενήλικα, για παράδειγμα, η ισομορφή VEGF188 εκφράζεται κυρίως σε όργανα που αγγειώνονται μέσω της αγγειακής διαφοροποίησης (vasculogenesis), όπως ο πνεύμονας, η καρδιά και το συκώτι, ενώ οι VEGF164 και VEGF120 εκφράζονται σε κυρίως σε όργανα που αγγειώνονται ως επί το πλείστον με τη διαδικασία της αγγειογένεσης (angiogenesis) όπως ο εγκέφαλος, τα μάτια, οι μύες και τα νεφρά (Ng *et al.*, 2001).

Η αλληλεπίδραση των μοτίβων τύπου χορδίνης της *Fras1* και του VEGF μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο είναι ένα φαινόμενο που παρατηρήθηκε *ex vivo*. Άγνωστο παραμένει ακόμα εάν η αλληλεπίδραση αυτή λαμβάνει χώρα ενδοκυτταρικά υπό φυσιολογικές συνθήκες μέσα στον οργανισμό, και ρυθμίζει την έκκριση του VEGF, ή αν αντικατοπτρίζει μία αλληλεπίδραση που λαμβάνει χώρα στον εξωκυττάριο χώρο. Βιβλιογραφικά, υπάρχουν αρκετά παραδείγματα ρυθμιζόμενης έκκρισης μίας πρωτεΐνης μέσω αλληλεπίδρασης με μία άλλη στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η πρωτεΐνη Crim1 μπορεί να αλληλεπιδρά στο ενδοπλασματικό δίκτυο με τον αυξητικό παράγοντα BMP και να προσδέεται με αυτόν στην επιφάνεια των κυττάρων. Η αλληλεπίδραση αυτή δρα κατασταλτικά στη δράση του, καθώς καθυστερεί την ωρίμανσή του και μειώνει τη διαθεσιμότητα του στον εξωκυττάριο χώρο (Wilkinson *et al.*, 2003). Η απολιποπρωτεΐνη B και η πρωτεΐνη MT (Microsomal Triglyceride Transfer) αλληλεπιδρούν στο ενδοπλασματικό δίκτυο με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της έκκρισης της πρώτης (Patel *et al.*, 1996). Πρέπει να σημειωθεί ότι η παρουσία του διαμεμβρανικού τμήματος της

Fras1, το οποίο συμβάλλει στην έκκρισή της καθώς αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Grip1, δε φαίνεται να είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση του VEGF και των μοτίβων τύπου χορδίνης της Fras1.

Ενδείξεις για την αλληλεπίδραση Fras1-VEGF εξωκυτταρικά, αποτελούν μελέτες στο εργαστήριό μας, στις οποίες φάνηκε ότι η Fras1 συνεντοπίζεται με τον VEGF στη βασική μεμβράνη της εμβρυϊκής επιδερμίδας και η απώλειά της οδηγεί επίσης στην απώλεια του VEGF από τη δομή αυτή. Συχνά οι πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης δρουν ως «αποθήκες» αυξητικών παραγόντων δεσμεύοντάς τους και ρυθμίζοντας με τον τρόπο αυτόν τη διαθεσιμότητά τους στον εξωκυττάριο χώρο. Στην περίπτωση που η Fras1 δεσμεύει τον VEGF, η απώλειά της στα *Fras1*^{-/-} έμβρυα θα είχε σαν αποτέλεσμα τη διάχυσή του στο συνδετικό ιστό, με επακόλουθη έκθεση των αγγείων του συνδετικού ιστού σε αυξημένα επίπεδα VEGF, με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και τη διαρροή πλάσματος (Εικόνα 58). Ο φαινότυπος της αγγειακής αποδιοργάνωσης του εμβρυϊκού πνεύμονα που παρατηρήθηκε στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια (Petrou *et al.*, 2005), ο οποίος μπορεί να προκληθεί και έπειτα από υπερέκφραση του VEGF, αποτελεί μία ακόμα ένδειξη για την πιθανή ρύθμιση της δράσης του VEGF από τη Fras1. Το ενδεχόμενο ο VEGF να μην εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο, σε περίπτωση που η Fras1 συνέβαλλε στην έκκρισή του, δε φαίνεται πιθανό, καθώς στα *Fras1*^{-/-} έμβρυα ο VEGF δεν εντοπίστηκε ενδοκυτταρικά.



Εικόνα 58: Προτεινόμενο μοντέλο για την αυξημένη διαρροή των αγγείων στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια. Η έλλειψη της πρωτεΐνης Fras1 οδηγεί σε υπερέκθεση των αγγείων στον παράγοντα VEGF, ο οποίος φυσιολογικά συγκρατείται από αυτήν, με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητάς τους.

Για να διαπιστωθεί *in vivo* αν η διαρροή του πλάσματος και ο επακόλουθος αιμορραγικός φαινότυπος των *Fras1*^{-/-} εμβρύων οφείλεται στη δράση του VEGF, θα μπορούσε να παραχθεί ένα διαγονιδιακό ζώο, στο οποίο τα μοτίβα χορδινών της *Fras1* θα στοχεύονταν στη βασική μεμβράνη των *Fras1*^{-/-} ποντικών συνδεόμενα με μία πρωτεΐνη που εκφράζεται στη βασική μεμβράνη των ζώων αυτών ανεξάρτητα από τις *Fras1*, *Frem1* και *Frem2*, όπως η *Frem3*. Με τον τρόπο αυτόν θα μπορούσε ο VEGF να συγκρατηθεί στη βασική μεμβράνη, με αποτέλεσμα μία πιθανή αντιμετώπιση των βλαβών που προέρχονται από την υπερέκφραση του.

Η μελέτη της ρύθμισης της δράσης του αυξητικού παράγοντα VEGF είναι σημαντική επιπλέον και λόγω της εμπλοκής του στη δημιουργία νεοπλασιών. Ο VEGF υπερεκφράζεται σε μία πληθώρα νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένου και των DMBA επαγόμενων όγκων της επιδερμίδας (Larcher *et al.*, 1996; Pradeep *et al.*, 2005). Για το λόγο αυτόν στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη της έκφρασης της *Fras1* σε χημικά επαγόμενους όγκους της επιδερμίδας. Μια μελλοντική προοπτική θα μπορούσε να εμπλέξει την πρωτεΐνη *Fras1* στη ρύθμιση του παράγοντα αυτού σε παθολογικές καταστάσεις, με πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές.

Αξιόλογο, επίσης, είναι το γεγονός ότι τα *Fras1*^{-/-} ποντίκια εμφανίζουν προβλήματα στη συμπεριφορά του φόβου (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Ο VEGF αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή. Η πρωτεΐνη *Fras1*, εντούτοις, δεν έχει εντοπισθεί εμβρυϊκά στον εγκέφαλο αν και το mRNA της έχει ανιχνευθεί από τον υποψήφιο διδάκτορα Ευάγγελο Παυλάκη. Αναπάντητο μένει το ερώτημα αν η *Fras1* μέσω της ρύθμισης του VEGF μπορεί να εμπλακεί στη ρύθμιση της συμπεριφοράς.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο VEGF εκφράζεται εμβρυϊκά σε όργανα με αγγεία με ενδοθηλιακές θυρίδες (fenestrations), όπως τα νεφρικά σπειράματα και το χοριοειδές πλέγμα και ασκεί συνεχώς τη δράση του στον υποδοχέα του, KDR, ο οποίος είναι συνεχώς φωσφορυλιωμένος για τη διατήρηση της αρχιτεκτονικής των αγγείων (Dumont *et al.*, 1995; Breier *et al.*, 1992). Στη βασική μεμβράνη του χοριοειδούς πλέγματος και των νεφρικών σπειραμάτων παρατηρείται έντονη έκφραση της *Fras1* καθόλη τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (Chiotaki *et al.*, 2007). Θα μπορούσε να διερευνηθεί η πιθανότητα η *Fras1* προσδεδεμένη στον VEGF να συμμετέχει στη ρύθμιση των διαθέσιμων για πρόσδεση στον KDR επιπέδων του παράγοντα αυτού για τη διατήρηση της λειτουργικότητας των αγγειακών δομών στις περιοχές αυτές. Ανοσοϊστοχημικά, ο VEGF έχει ανιχνευθεί στη βασική μεμβράνη των βρογχιολίων του πνεύμονα, της επιδερμίδας και του οσφρητικού επιθηλίου κατά τα εμβρυϊκά στάδια E12.5 και E14.5. Στις περιοχές αυτές συνεντοπίζεται με την *Fras1*.

Στον ενήλικα οργανισμό η έκφραση του VEGF και του KDR διατηρείται στο χοριοειδές πλέγμα και τα νεφρικά σπειράματα, όπου ο δεύτερος συνεχίζει να παραμένει φωσφορυλιωμένος για τη διατήρηση των fenestrations. Ο VEGF στον ενήλικα εκφράζεται επίσης από τα κύτταρα Purkinje της περεγκεφαλίδας στον εγκέφαλο, στα εκκριτικά όργανα όπως τα επινεφρίδια, τους σιελογόνους αδένες, το πάγκρεας, στους όρχεις, τον προστάτη, τους καρδιακούς και σκελετικούς μύες και τα

λιποκύτταρα. (Maharaj *et al.*, 2006). Αν και ο VEGF συνεχίζει να εκφράζεται και στον ενήλικα, η έκφραση της *Fras1* περιορίζεται στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας της ουράς και των αυτιών, στα αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα, το δέρμα των πελμάτων, του ρύγχους και στη βασική μεμβράνη των νεφρικών σπειραμάτων (Pavlakakis *et al.*, 2008). Πιθανόν στην ενήλικη ζωή, ο ρόλος της *Fras1* στη ρύθμιση του VEGF να περιορίζεται σε συγκεκριμένα μόνο όργανα, όπως τα νεφρά.

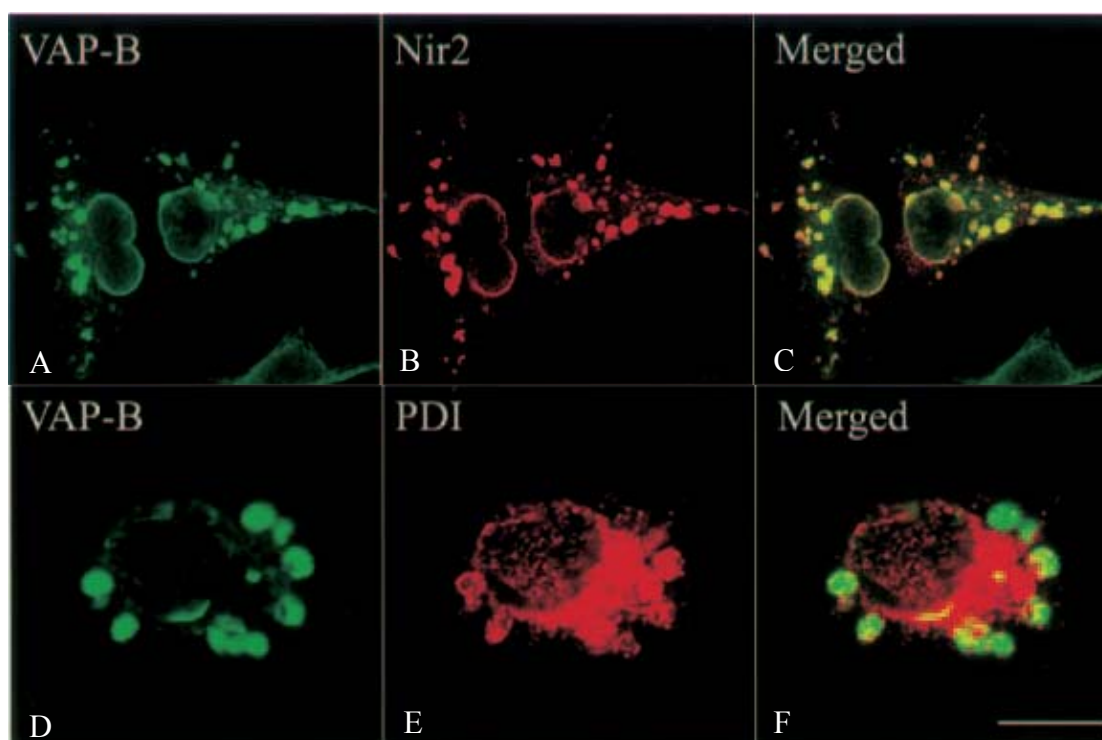
Γ) ΑΝΑΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ *Fras1*/*Grip1*

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) είναι ένα εκτεταμένο δίκτυο μεμβρανών που αποτελείται από μία σειρά από διασυνδεδεμένους σωληνίσκους και κύστες, το οποίο ξεκινάει από τον πυρηνικό φάκελο και εκτείνεται περιφερειακά στο κυτταρόπλασμα. Περιέχει δομικά διακριτές περιοχές, όπως τον πυρηνικό φάκελο, το λείο και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και περιοχές που συνδέονται με άλλα οργανίδια όπως το σύστημα Golgi, τα όψιμα ενδοσώματα, λυσοσώματα, μιτοχόνδρια, περοξισώματα και την πλασματική μεμβράνη. Συμμετέχει στη σύνθεση λιπιδίων, το μεταβολισμό των υδατανθράκων, την απομάκρυνση τοξικών χημικών ουσιών από το κύτταρο και είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση, μετατόπιση, γλυκοζιλίωση, αναδίπλωση και γενικά επεξεργασία εκκρινόμενων και μεμβρανικών πρωτεϊνών και δρα σαν αποθηκευτικός και ρυθμιστικός χώρος για τα ιόντα ασβεστίου.

Σε αυτήν τη μελέτη δείχθηκε ότι η αλληλεπίδραση της *Fras1*, του ιδρυτικού μέλους της οικογένειας των *Fras1*/*Frem* πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ύλης που εμπλέκεται στη διατήρηση της συνοχής της επιδερμίδας και δερμίδας και της κυτταροπλασματικής PDZ-domain πρωτεΐνης *Grip1*, που στοχεύει τη *Fras1* προς έκκριση στη βασικοπλευρική μεριά των επιθηλίων, οδηγεί στην αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου σε επιθηλιακές ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές, πολωμένες και μη. Η αναδιοργάνωση αυτή χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό διακριτών ενδοκυτταρικών συσσωματωμάτων που συνεντοπίζονται με το μάρτυρα του ενδοπλασματικού δικτύου Κονκαναβαλίνη Α (Concanavalin A). Η δομή του συστήματος Golgi και πιο συγκεκριμένα του cis-Golgi παραμένει ανεπηρέαστη, όπως φαίνεται με τον ενδοκυτταρικό μάρτυρα του cis-Golgi GM130. Η αναδιοργάνωση αυτή δεν οφείλεται στην υπερέκφραση των πρωτεϊνών *Grip1* και *Fras1*, αλλά στην αλληλεπίδρασή τους, καθώς η διαμόλυνση των κυττάρων με καθεμία από τις δύο πρωτεΐνες ξεχωριστά δεν προκαλεί καμία αναδιάταξη στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Επιπλέον, αν αφαιρεθούν τα τελευταία καρβοξυτελικά αμινοξέα της πρωτεΐνης *Fras1* (GTEV), ή οι δύο πρώτες PDZ περιοχές της *Grip1*, που μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση *Fras1*/*Grip1*, το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται.

Η αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω της αλληλεπίδρασης δύο πρωτεϊνών είναι ένα φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί ξανά. Πρόσφατες μελέτες (Amarilio *et al.*, 2005) κατέδειξαν ότι η αλληλεπίδραση δύο πρωτεϊνών σε

ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές HeLa, της Nir2 (ανήκει στην οικογένεια των Nir/rdgB πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεμβρανικής κυκλοφορίας, το μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων και της κυτταρικής σηματοδότησης) και της VAP-B (μίας τύπου II μεμβρανικής πρωτεΐνης, που εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύστημα Golgi και ανήκει σε μία οικογένεια που εμπλέκεται σε πολλές διαδικασίες όπως η απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και η μεταφορά πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο Golgi) οδηγεί σε παρόμοια αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου, όπως φαίνεται με το μάρτυρα PDI (Protein Disulphide Isomerase) (Εικόνα 59). Με τη βοήθεια ηλεκτρονικής μικροσκοπίας παρατηρήθηκε ότι στο ενδοπλασματικό δίκτυο δημιουργούνται περιοχές συσσώρευσης μεμβρανών, στο σχηματισμό των οποίων παίζει σημαντικό ρόλο ο ολιγομερισμός της VAP-B. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η έκκριση των πρωτεϊνών παρεμποδίζεται από αυτές τις δομές.

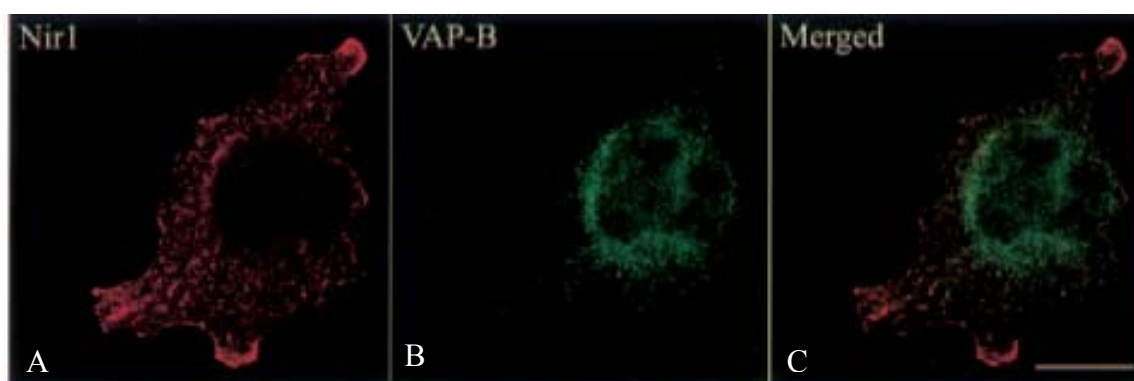


Εικόνα 59: Συνδιαμόλυνση HeLa ευκαρυωτικών κυττάρων με τις πρωτεΐνες VAP-B (A) και Nir2 (B). Οι πρωτεΐνες συνεντοπίζονται σε διακριτά σημεία του κυττάρου (C). Με τη χρήση του ενδοπλασματικού μάρτυρα PDI (E) φαίνεται ότι τα σημεία αυτά κατά τη συνδιαμόλυνση των δύο πρωτεϊνών (φαίνεται μόνο η VAP-B, D) έχουν σύσταση ενδοπλασματικού δικτύου (F) (Amarilio *et al.*, 2005).

Ένα από τα μελλοντικά πειράματα που θα ακολουθήσουν στην περίπτωση των Fras1 και Grip1 είναι ο χαρακτηρισμός της δομής που αποκτά το ενδοπλασματικό δίκτυο κατά την αλληλεπίδρασή τους σε ηλεκτρονικό επίπεδο. Με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου θα καταστεί δυνατή η παρατήρηση και ανάλυση των μεμβρανικών δομών που συμμετέχουν σε αυτήν την αναδιάταξη.

Το φαινόμενο αυτό είναι μοναδικό χαρακτηριστικό της Fras1, καθώς παρόλο που η Frem2 περιέχει ένα αντίστοιχο καρβοξυτελικό μοτίβο πρόσδεσης σε PDZ domain πρωτεΐνες (SSEV) και έχει δείχτει ότι μπορεί να αλληλεπιδρά με τη Grip1 *in vitro* (Takamiya *et al.*, 2004), το καρβοξυτελικό της τμήμα δε φαίνεται να προκαλεί αντίστοιχο φαινόμενο ή να αλληλεπιδρά με τη Grip1 μέσα στα κύτταρα. Το γεγονός ότι μία *in vitro* αλληλεπίδραση δεν επιβεβαιώνεται κυτταρικά δεν είναι καινοφανές. Πράγματι, και στην προαναφερθείσα μελέτη (Amarilio *et al.*, 2005) αν και *in vitro* έχει βρεθεί ότι οι Nir1 (ένα μέλος της οικογένειας των Nir/rdgB πρωτεϊνών) και VAP-B αλληλεπιδρούν, εντούτοις δε συνεντοπίζονται σε ευκαρυωτικά κύτταρα HeLa και ούτε προκαλούν αναδιαμόρφωση του ενδοπλασματικού δικτύου (Εικόνα 60). Στην περίπτωση της Frem2 πιθανόν να έχουμε ένα παρόμοιο φαινόμενο.

Στη μελέτη της αλληλεπίδρασης Grip1/Frem2 χρησιμοποιήθηκε το καρβοξυτελικό τμήμα της Frem2. Υπάρχει η πιθανότητα για την αλληλεπίδραση Grip1/Frem2 να απαιτείται ολόκληρο το μόριο της Frem2. Πιθανόν, ορισμένες εσωτερικές περιοχές της, όπως αυτή της ομολογίας με την NG2, να σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση, μέσω της πρόσδεσής τους με άλλες πρωτεΐνες, όπως η Fras1 ή άλλα μέλη της οικογένειας Fras1/Frem, που περιέχουν παρόμοια μοτίβα.

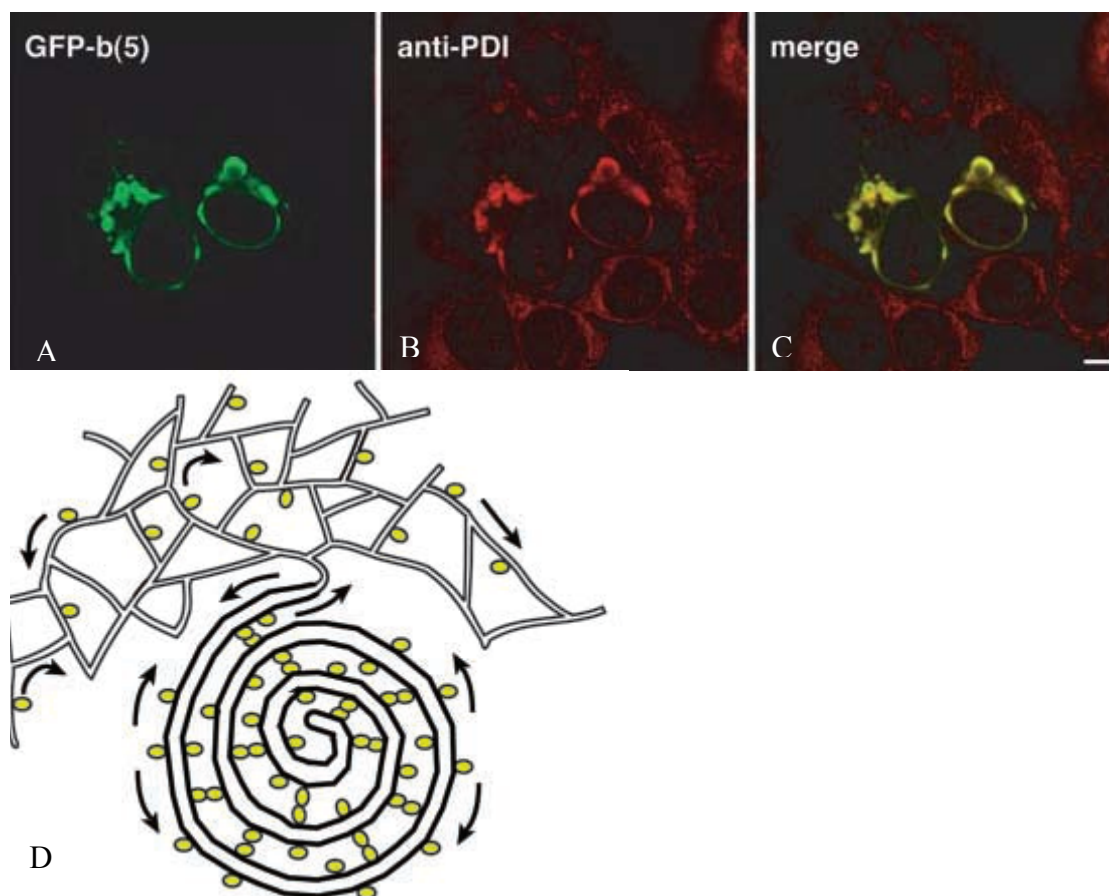


Εικόνα 60: Παρόλο που οι πρωτεΐνες Nir1 (A) και VAP-B (B) έχει δείχτει ότι αλληλεπιδρούν *in vitro*, δε φαίνεται να συνεντοπίζονται στα ευκαρυωτικά κύτταρα (C) (Amarilio *et al.*, 2005).

Η αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου είναι ένα φαινόμενο που μπορεί να προκληθεί και σε άλλες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα με την υπερέκφραση ορισμένων πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου όπως οι καλά συντηρημένες από τις ζύμες μέχρι τα θηλαστικά HMG-CoA ρεδοκτάση (HMGR) και το κυτόχρωμα P450 (P450) (Jones and Fawcett, 1966; Black, 1972; Wright *et al.*, 1988; Menzel *et al.*, 1966). Η αναδιάταξη του ενδοπλασματικού δικτύου και ο σχηματισμός χαρακτηριστικών μεμβρανικών δομών οφείλεται εν μέρει στον ολιγομερισμό των πρωτεϊνών αυτών μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Σε μία πρόσφατη μελέτη (Federovich *et al.*, 2008), βρέθηκε ότι η αναδιοργάνωση που προκαλείται στο σακχαρομήκυτα στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου από τις δύο ισομορφές της HMG-CoA, Hmg1p και Hmg2p εμφανίζει διακριτά χαρακτηριστικά ανάλογα με την ισομορφή που την προκαλεί. Συγκεκριμένα, η πρώτη

οδηγεί στο σχηματισμό των λεγόμενων karmellae (Wright *et al.*, 1988), που είναι συνήθως περιπυρηνικά και η δεύτερη στο σχηματισμό περιφερειακών δομών συνδεδεμένων με τον πυρηνικό φάκελο (Koning *et al.*, 1996). Στη δεύτερη περίπτωση μάλιστα χαρακτηρίστηκε και μία σειρά από γονίδια, τα λεγόμενα HER (Hmg2p-inducer of remodelling) που συμμετέχουν στο φαινόμενο αυτό.

Η υπερέκφραση του κυτοχρώματος b5 σε cos7 κύτταρα προκαλεί το μετασχηματισμό του ενδοπλασματικού δικτύου από δίκτυο σωλήνων σε στιβαγμένες μεμβράνες, τις λεγόμενες OSER (Organised Smooth Endoplasmic Reticulum), οι οποίες είναι δυναμικές δομές που επιτρέπουν την ελεύθερη κίνηση των πρωτεϊνών. (Snapp *et al.*, 2003) (Εικόνα 61). Ο ρόλος των δομών αυτών δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί, αλλά πιθανόν συμμετέχουν στην αποτοξίνωση του κυττάρου από επιβλαβείς ουσίες αλλά και σε παθογενετικές καταστάσεις στην περίπτωση μεταλλαγμένων πρωτεϊνών που συσσωρεύονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο.



Εικόνα 61: Η υπερέκφραση του κυτοχρώματος b5 (A) οδηγεί στην αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου όπως φαίνεται με το μάρτυρα PDI (B, C). Οι δομές OSER είναι δυναμικές κυκλικές δομές της μεμβράνης στις οποίες παρατηρούνται συνεχείς μετακινήσεις και αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών (D) (Snapp *et al.*, 2003).

Η αναδιαμόρφωση του ενδοπλασματικού δικτύου είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται τόσο σε φυσιολογικές, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Η είσοδος του ιού της πολιομυελίτιδας σε ευκαρυωτικά κύτταρα οδηγεί στο σχηματισμό

ενδοπλασματικών συσσωματωμάτων (Suhy *et al.*, 2000). Σε καλλιεργούμενα χονδροκύτταρα, το μη υδροξυλιωμένο προκολλαγόνο συσσωρεύεται σε παρόμοιες δομές στο ενδοπλασματικό δίκτυο, οι οποίες εξαφανίζονται με την επίδραση ασκορβικού οξέος που προκαλεί την υδροξυλίωσή του και οδηγεί σε έκκριση (Pacifici and Iozzo, 1988).

Στα φυτικά κύτταρα έχουν παρατηρηθεί δομές του ενδοπλασματικού δικτύου, οι λεγόμενες Z-μεμβράνες (Z-membranes) που στερούνται βασικών ενδοπλασματικών συστατικών, όπως ορισμένες πρωτεάσες (Gong *et al.*, 1996). Στις δομές αυτές αποθηκεύονται, χωρίς να εκκρίνονται, ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που εισάγονται εξωγενώς, ώστε να αποφύγουν την πρωτεολυτική αποικοδόμηση.

Η υπερέκφραση της p63, μιας τύπου II μεμβρανικής πρωτεΐνης του ενδοπλασματικού δικτύου οδηγεί στην αναδιαμόρφωση του ενδοπλασματικού δικτύου, το οποίο αποκτά μία περισσότερο σωληνώμορφη δομή, η οποία ταυτίζεται με το δίκτυο των μικροσωληνίσκων (Klorpfenstein *et al.*, 1998).

Οι περισσότερες περιπτώσεις αναδιαμόρφωσης του ενδοπλασματικού δικτύου στη βιβλιογραφία σχετίζονται με την υπερέκφραση πρωτεϊνών-συστατικών του. Στην παρούσα μελέτη συσχέτισαμε για πρώτη φορά την αναδιοργάνωση αυτή όχι με την υπερέκφραση, αλλά με την αλληλεπίδραση δύο μη ενδοπλασματικών πρωτεϊνών, μίας εξωκυττάριας και μίας κυτταροπλασματικής. Αναπάντητος μένει ακόμα ο ακριβής μηχανισμός και η σειρά των γεγονότων με την οποία λαμβάνει χώρα το φαινόμενο αυτό.

Το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι μια εξαιρετικά δυναμική δομή που χαρακτηρίζεται από συνεχή αναδόμηση των κυστιδίων του. Για την αναδόμηση αυτή απαιτείται η σύνδεσή του με μικροσωληνίσκους με τις πρωτεΐνες κινητήρες κινεσίνη και δυνείνη (Walker and Sheetz, 1993; Holzbaur and Vallee, 1994; Schroerer and Gill, 1996; Vallee and Sheetz, 1996; Presley *et al.*, 1997; Schnapp, 1997; Hirokawa, 1998). Για τη διατήρηση της θέσης του ενδοπλασματικού δικτύου στο κύτταρο χρειάζονται σταθερότερες αλληλεπιδράσεις που επιτυγχάνονται με τη σύνδεση με μη πρωτεΐνες κινητήρες όπως οι CLIPS (Rickard and Kreis, 1996).

Δύο είναι οι κύριες μορφές κίνησης του ενδοπλασματικού δικτύου πάνω σε μικροσωληνίσκους, αυτή που γίνεται με τη μεσολάβηση του TAC (Tip Attachment Complex) και η δεύτερη με το λεγόμενο sliding. Στην πρώτη, η απόληξη του ενδοπλασματικού δικτύου προσδένεται στο + άκρο του αναπτυσσόμενου μικροσωληνίσκου και ακολουθεί τη δομή του και στη δεύτερη το ενδοπλασματικό γλυστράει κατά μήκος του άξονά του μικροσωληνίσκου (English *et al.*, 2009; Grigoriev *et al.*, 2008).

Στην πρώτη κατηγορία κίνησης συμμετέχουν οι πρωτεΐνες EB1 των μικροσωληνίσκων. Για να διαπιστώσουμε αν επηρεάζεται το σύστημα των μικροσωληνίσκων κατά την αλληλεπίδραση Fras1/Grip1, ανιχνεύσαμε την πρωτεΐνη EB1 σε διπλά διαμολυσμένα Fras1/Grip1 κύτταρα και είδαμε ότι το πρότυπο έκφρασής της παραμένει ανεπηρέαστο. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι αν και κατά κανόνα η κίνηση του ενδοπλασματικού δικτύου στα ζωικά κύτταρα γίνεται πάνω στους μικροσωληνίσκους, σε πολλές περιπτώσεις η κίνησή του είναι ανεξάρτητη από

αυτούς, αλλά εξαρτώμενη από τα το σκελετό των ινιδίων ακτίνης, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στους φωτουποδοχείς της μέλισσας (Baumann, 1991). Επιπλέον μελέτες (Terasaki and Jaffe, 1991) έδειξαν ότι η αναδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτύου σε αυγά αχινού δεν σχετίζεται καθόλου με μικροσωληνίσκους αλλά με ινίδια ακτίνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι στα φυτικά κύτταρα πολύ συχνά οι μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου μετακινούνται με τη βοήθεια ινιδίων ακτίνης (Quader *et al.*, 1987; Kachar and Reese, 1988; Lichtscheidl *et al.*, 1990; Hepler *et al.*, 1990).

Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι η πρωτεΐνη Fras1 μέσω της αλληλεπίδρασής της με τη Grip1, εμπλέκεται στον καθορισμό της τοπολογίας ενός ενδοκυτταρικού οργανιδίου, του ενδοπλασματικού δικτύου. Ένας αντίστοιχος ρόλος για την πρωτεΐνη αυτή φανερώνεται σε πρόσφατες μελέτες από τους Barasch και Viltard, σε συνεργασία με το εργαστήριό μας (αδημοσίευτα αποτελέσματα), στις οποίες βρέθηκε ότι η πολικότητα που εμφανίζει το συμπυκνωμένο μεσέγχυμα γύρω από τον ουρητήρα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του ποντικού χάνεται στα *Fras1*^{-/-} έμβρυα, με αποτέλεσμα να χάνεται ο φυσικός εντοπισμός του συστήματος Golgi, να αλλοιώνεται ο προσανατολισμός του, τα κύτταρα να εμφανίζονται οριζόντια αντί για κάθετα και να παρατηρείται απώλεια της N-cadherin που φυσιολογικά βρίσκεται στην πλευρική επιφάνεια των κυττάρων. Τα πειράματα αυτά καθιστούν την Fras1 σημαντική για τον καθορισμό της πολικότητας των κυττάρων.

Γενικά, η πολικότητα ενός επιθηλιακού κυττάρου εξαρτάται από τη στοχευμένη μεταφορά των παραγόμενων πρωτεϊνών στη βασικοπλευρική ή κορυφαία περιοχή του κυττάρου (trafficking) και από τα συστατικά που περιέχονται στην κυτταρική μεμβράνη ανάλογα με την τοπολογία της. Κάθε επιφάνεια περιέχει χαρακτηριστικές δομές: Στην κορυφαία περιοχή των κυττάρων απαντούμε τους στενοσυνδέσμους (tight junctions), στην πλευρική τους συνδέσμους προσκόλλησης (adherent junctions) που περιλαμβάνουν καντερίνες (cadherins), και τα δεσμοσώματα (desmosomes). Οι πρωτεΐνες κατανέμονται ανάλογα με ενδογενή σινιάλα που περιέχουν στην κορυφαία η βασικοπλευρική επιφάνεια των κυττάρων έπειτα από διαλογή στο TGN. (Martin-Belmonte and Rodriguez- Fraticelli, 2009).

Σε πολλές ασθένειες, όπως ο καρκίνος, τα κύτταρα χάνουν την πολικότητά τους. Η έλλειψη πολικότητας αποτελεί δείκτη διαφοροποίησης των νεοπλασιών. Η κυτταροπλασματική έκφραση της ZO-1, μίας PDZ πρωτεΐνης, συστατικού των στενοσυνδέσμων οδηγεί τα πολωμένα MDCK ευκαρυωτικά κύτταρα σε απώλεια της πολικότητάς τους, με αποτέλεσμα να αποκτούν έναν μεσεγχυματικό καρκινικό χαρακτήρα. Στη διαδικασία αυτή εμπλέκεται το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt που ρυθμίζει την πολικότητα των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (Reichert *et al.*, 2000). Άλλες ασθένειες που σχετίζονται με διαταραχές στην πολικότητα των επιθηλιακών κυττάρων είναι η κυστική ίνωση, η ασθένεια Wilson στο ήπαρ, η οικογενής υπερχοληστερολαιμία (Martin-Belmonte and Rodriguez- Fraticelli, 2009).

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα mIMCD θα μπορούσε να εξετασθεί κατά πόσο εκτός από την τοπολογία του ενδοπλασματικού δικτύου επηρεάζεται και η σύσταση της κυτταρικής τους

μεμβράνης. Αυτό θα ήταν εφικτό με ειδικούς μάρτυρες για την κορυφαία και βασική επιφάνεια των κυττάρων.

Το τελευταίο ερώτημα που θα ήταν ωφέλιμο να απαντηθεί είναι αν η αναδιαμόρφωση του ενδοπλασματικού δικτύου κατά την αλληλεπίδραση Grip1/Fras1 επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Η πιθανή ανικανότητα του ενδοπλασματικού δικτύου να λειτουργήσει ομαλά έπειτα από την αναδιάταξή του κατά την αλληλεπίδραση Fras1/Grip1 θα μπορούσε να επηρεάσει την κυτταρική επιβίωση. Για να διαπιστωθεί κατά πόσο επηρεάζεται η επιβίωση του κυττάρου με το πέρασ του χρόνου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα από το μεταπτυχιακό φοιτητή Απόστολο Μακρυγιάννη, στα οποία τα διπλά διαμολυσμένα Fras1/Grip1 κύτταρα παρατηρήθηκαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (24, 48 και 72 ώρες). Διαπιστώθηκε ότι με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται αύξηση του κυτταρικού ιζήματος και αρκετά διπλά διαμολυσμένα κύτταρα με παραμορφωμένους, πιθανόν αποπτωτικούς πυρήνες και ανώμαλη μορφολογία. Το φαινόμενο αυτό ήταν εντονότερο στις 72 ώρες. Πιθανόν η αλλοίωση της δομής του ενδοπλασματικού δικτύου να επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από κάποιο χρονικό διάστημα στο συγκεκριμένο σύστημα.

Δ) ΟΙ Fras1/Frem ΣΕ ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑΣ

Στην παρούσα μελέτη για πρώτη φορά διερευνήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών Fras1/Frem σε νεοπλασίες της επιδερμίδας έπειτα από καρκινογένεση με τη χρήση των χημικών ουσιών DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene) και Croton oil, βάσει του πρωτοκόλλου της πειραματικής καρκινογένεσης δύο σταδίων. Το DMBA αποτελεί έναν πολυκυκλικό υδρογονάνθρακα, ο οποίος προσδένεται απευθείας σε αζωτούχες βάσεις αδενίνης στο DNA. Τα στάδια της χημικά επαγόμενης καρκινογένεσης είναι τρία: α) *έναρξη* (Initiation), η οποία περιλαμβάνει την πρόσδεση του καρκινογόνου στο DNA και την πρόκληση γενετικών βλαβών στα κύτταρα. Αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι η δημιουργία καρκινικών κυττάρων που βρίσκονται σε λανθάνουσα φάση (latent cells), τα οποία όμως δεν έχουν τη δυνατότητα από μόνα τους να σχηματίσουν όγκους β) *διαίρεση* (Proliferation), όπου η μιτογόνο ουσία Croton Oil προάγει επιλεκτικά τον πολλαπλασιασμό των παραπάνω κυττάρων και γ) *εξέλιξη* (Progression) των κυττάρων αυτών σε καρκινικά, φαινόμενο μη αναστρέψιμο, που χαρακτηρίζεται από γενετική αστάθεια των κυττάρων, εισβολή τους σε γειτονικούς ιστούς, αγγειογένεση και πιθανή μετάσταση (Oliveira *et al.*, 2007).

Οι όγκοι που σχηματίζονται με τη χρήση των παραπάνω χημικών είναι στην πλειοψηφία τους καλοήθεις και ανήκουν στην κατηγορία των παπιλωμάτων και των καρκινωμάτων του πλακώδους επιθηλίου (squamous cell carcinoma, SCC) (Stenback *et al.*, 1986). Στα πειράματά μας, οι νεοπλασίες κατατάχθηκαν βάσει της χαρακτηριστικής μορφολογίας τους στην κατηγορία των καρκινωμάτων του πλακώδους επιθηλίου (SCC). Μορφολογικά χαρακτηρίζονται από ανομοιομορφες ασύμμετρες διαιρούμενες επιθηλιακές δομές που συχνά σχηματίζουν καρκινικές

νησίδες (tumor nests), οι οποίες περιβάλλονται από πλούσιο σε αγγεία συνδετικό ιστό. Με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων για τις πρωτεΐνες της οικογένειας Fras1/Frem διαπιστώθηκε ότι η μόνη πρωτεΐνη της οικογένειας αυτής που ανιχνεύεται στις παραπάνω νεοπλασίες είναι η Frem3. Η Frem3 εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη των νεοπλαστικών επιθηλίων και των καρκινικών νησίδων καθώς και στη βασική μεμβράνη πολλών αιμοφόρων αγγείων που περιβάλλουν τα παθολογικά επιθήλια. Τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας δεν ανιχνεύθηκαν. Με πειράματα *in situ* υβριδισμού διαπιστώθηκε ότι η Frem3 παράγεται από τα νεοπλαστικά επιθήλια.

Το πρότυπο έκφρασης της Frem3 στη βασική μεμβράνη των νεοπλασιών είναι παρόμοιο με αυτό που εμφανίζουν οι πρωτεΐνες λαμινίνη και κολλαγόνο IV, το οποίο έχει περιγραφεί σε ανάλογες παλαιότερες μελέτες (Stenback *et al.*, 1986). Βρέθηκε ότι σε αντίστοιχου σταδίου DMBA επαγόμενες νεοπλασίες της επιδερμίδας (πλακώδη καρκινώματα) τα παραπάνω συστατικά διατηρούνται στη βασική μεμβράνη, η οποία αν και σε πολλά σημεία εμφανίζει ανωμαλίες, όπως ασυνέχειες ή αύξηση του πάχους της, φαίνεται να διατηρείται σχεδόν ακέραιη στα παθολογικά επιθήλια. Η ίδια εικόνα παρατηρείται και στο πρότυπο έκφρασης της Frem3. Η ύπαρξη μιας σχετικά ακέραιης βασικής μεμβράνης στα παθολογικά επιθήλια, ήταν αναμενόμενη, δεδομένου ότι ο βαθμός κακοήθειας στις DMBA επαγόμενες νεοπλασίες γενικά είναι χαμηλός.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά ο ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της Frem3 σε νεοπλασίες. Μία ένδειξη για την εμπλοκή της πρωτεΐνης αυτής σε ανάλογες παθολογικές καταστάσεις στον άνθρωπο φαίνεται σε μία πρόσφατη μελέτη (Surace *et al.*, 2005) σε έναν ασθενή με καρκίνωμα μαλακού ιστού (Soft Tissue Carcinoma), η οποία φανέρωσε ότι μία ένθεση της περιοχής του χρωμοσώματος Xp στην περιοχή του χρωμοσώματος 4 (4q31), είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη όγκου στον άνθρωπο. Ένα από τα γονίδια που επηρεάστηκαν από την ένθεση αυτή κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη με 29% ομολογία με την πρωτεΐνη FRAS1, η οποία περιέχει και μία περιοχή ομολογίας με την NG2 πρωτεογλυκάνη θεικής χονδροϊτίνης. Δεδομένου ότι το ανθρώπινο γονίδιο FREM3 έχει χαρτογραφηθεί στη χρωμοσωμική θέση 4q31.21, αποτελεί πιθανότατα το γονίδιο που αναφέρεται στην παραπάνω μελέτη.

Η βασική μεμβράνη, είναι ένας φυσιολογικός φραγμός για την εξάπλωση των όγκων. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των κακοήθων επιθηλίων είναι η απώλεια συστατικών της βασικής μεμβράνης τους. Για να εξετασθεί κατά πόσο η ελάττωση των επιπέδων της Frem3 μπορεί να επηρεάσει τη συχνότητα και εξέλιξη μίας νεοπλασίας, βρίσκονται υπό εξέλιξη πειράματα χημικής καρκινογένεσης σε ετερόζυγα για το γονίδιο *Frem3* ζώα (*Frem3*^{+/-}) από το μεταπτυχιακό φοιτητή Απόστολο Μακρυγιάννη.

Πρέπει να σημειωθεί ότι πολλές φορές οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ύλης, συμβάλλουν θετικά στην εξέλιξη των νεοπλασιών. Τα καρκινικά κύτταρα παράγοντας μεταλλοπρωτεάσες διασπών την προϋπάρχουσα βασική μεμβράνη και στη συνέχεια υπερεκφράζουν δικά τους εξωκυττάρια συστατικά, τα οποία

χρησιμοποιούν σαν ‘σκαλωσιά’ πάνω στην οποία θα μετακινηθούν. Η λαμινίνη 322, για παράδειγμα, η οποία παράγεται σε φυσιολογικά επίπεδα στα επιδερμικά κύτταρα πριν από τον καρκινικό μετασχηματισμό, υπερεκφράζεται σε SCC και μαζί με το κολλαγόνο VII και την ιντεγκρίνη $\alpha 4\beta 6$, συντονίζει την εξάπλωση του όγκου (Marinkovich, 2007). Υπάρχει, επομένως η πιθανότητα η *Frem3* να εμφανίζει αυξημένα επίπεδα σε σχέση με τη φυσιολογική επιδερμίδα (κάτι το οποίο δεν μπορούμε να προσδιορίσουμε ανοσοϊστοχημικά) και να συμμετέχει σε αντίστοιχες διαδικασίες συντονισμού της εξάπλωσης του όγκου. Με πειράματα στα *Frem3* +/- ποντίκια θα διαλευκανθεί, όπως προαναφέρθηκε ο ρόλος της *Frem3* στην εξέλιξη των νεοπλασιών.

Ενδιαφέρον επίσης εμφανίζει ο καθορισμός του προτύπου έκφρασης της *Frem3* κατά τα διάφορα στάδια του καρκινικού μετασχηματισμού. Είναι γεγονός ότι πολλές πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης χρησιμοποιούνται ως δείκτες κακοήθειας. Για παράδειγμα, στον καρκίνο του στοματικού βλεννογόνου στον άνθρωπο, η φιμπρονεκτίνη χρησιμοποιείται ως μάρτυρας των τελευταίων σταδίων του όγκου, κατά τα οποία επάγεται η έκφρασή της (Kannan *et al.*, 1994). Μία συγκριτική μελέτη της έκφρασης της *Frem3* σε νεοπλασίες ποικίλων σταδίων θα μπορούσε να μας αποκαλύψει τον πιθανό ρόλο της *Frem3* ως μάρτυρα καρκινικής διαφοροποίησης.

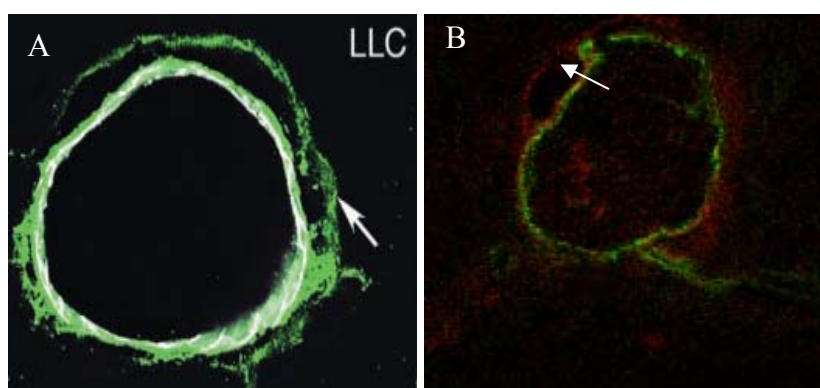
Είναι γνωστό ότι τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης του αγγειακού αυξητικού παράγοντα VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) αυξάνονται κατά την DMBA-επαγόμενη καρκινογένεση (Larcher *et al.*, 1996). Ο VEGF επάγεται από την υποξία και την έλλειψη γλυκόζης (Shweiki *et al.*, 1992; Shweiki, *et al.*, 1995), συνθήκες που επικρατούν στις περιοχές των όγκων. Ο ρόλος του στην πρόοδο της καρκινογένεσης είναι καίριος, καθώς με αντισώματα κατά του VEGF μπορεί να αναχαιτισθεί η ανάπτυξη των όγκων σε πολλές περιπτώσεις (Plate *et al.*, 1992). Με την παρεμπόδιση της λειτουργίας του υποδοχέα του VEGFR2 εμποδίζεται η ανάπτυξη των DMBA επαγόμενων όγκων των γαλακτοφόρων αδένων στον ποντικό (Heffelfinger *et al.*, 2004). Για το λόγο αυτό αποτελεί τον κυριότερο στόχο των αντικαρκινικών φαρμάκων για τη θεραπεία του καρκίνου στον άνθρωπο.

Μία από τις υποθέσεις που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν αν η πρωτεΐνη *Fras1*, η οποία βρέθηκε ότι μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον αυξητικό παράγοντα VEGF, επάγεται κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης, πιθανόν διαδραματίζοντας κάποιο ρόλο στη ρύθμιση του παράγοντα αυτού. Η επαγωγή μίας εξωκυττάριας πρωτεΐνης η οποία δεσμεύει τον VEGF, θα μπορούσε να αποτελέσει έναν ‘αμυντικό μηχανισμό’ για τον οργανισμό κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης. Η έκφραση της *Fras1* ελέγχθηκε με δύο αντισώματα, ένα για το κεντρικό και ένα για το αμινοτελικό τμήμα της (που περιέχει τα μοτίβα χορδινών), σε περίπτωση που υφίσταται ως πρωτεολυτικό προϊόν και δεν μπορεί να ανιχνευθεί με το πρώτο. Και στις δύο περιπτώσεις δεν ανιχνεύθηκε η έκφρασή της, πιθανώς γιατί η παρουσία της θα μπορούσε να είναι ανασταλτική για την εξέλιξη του όγκου. Σε περιοχές που φυσιολογικά εκφράζεται η *Fras1* πρωτεΐνη στα ενήλικα ζώα, όπως τα αυτιά και η ουρά δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη νεοπλασιών στο χρονικό διάστημα της πραγματοποίησης του πειράματος. Μελλοντικά πειράματα καρκινογένεσης στα αυτιά

και την ουρά μεταλλαγμένων *Fras1*^{-/-} ποντικών θα μπορούσαν να φανερώσουν αν οι περιοχές αυτές καθίστανται επιρρεπείς στη δημιουργία όγκων έπειτα από την απώλεια της *Fras1*. Αναπάντητο μένει ακόμα το ερώτημα αν η πρωτεΐνη *Frem3* εμπλέκεται με κάποιο τρόπο στη ρύθμιση του αυξητικού παράγοντα VEGF, παρόλο που δεν διαθέτει μοτίβα κυστεϊνών.

Η *Frem3* ανιχνεύθηκε και στη βασική μεμβράνη των αγγείων του συνδετικού ιστού που περιβάλλει τα παθολογικά επιθήλια. Είναι γνωστό ότι τα αγγεία που περιβάλλουν έναν όγκο εμφανίζουν πολλές ανωμαλίες. Η διαρροή πλάσματος λόγω της υπερέκφρασης του VEGF/VPF (Vascular Permeability Factor) είναι ένα από τα χαρακτηριστικά των καρκινικών αγγείων. Μάλιστα, η συνεχής έξοδος πλάσματος από αυτά οδηγεί στο φαινόμενο EPR (Enhanced Permeability and Retention effect), όπου οι γειτονικοί με τα αγγεία ιστοί είναι πλούσιοι σε βιολογικά μακρομόρια που προέρχονται από το πλάσμα. Η ροή του αίματος στα παθολογικά αγγεία δεν είναι φυσιολογική, αλλά συχνά διακόπτεται και μπορεί και να αλλάζει φορά. Επίσης, συχνά παρατηρείται απώλεια των λείων μυϊκών κυττάρων που φυσιολογικά περιβάλλουν τα αγγεία (Maeda *et al.*, 2003). Τέλος, η βασική μεμβράνη των αγγείων αυτών σε πολλά σημεία εμφανίζεται αποδομημένη και έχει ανώμαλο πάχος (Baluk *et al.*, 2003).

Πράγματι, το πρότυπο έκφρασης της *Frem3* στα παθολογικά αγγεία εμφανίζει αντίστοιχες ανωμαλίες. Σε πολλά σημεία φαίνεται διάχυτο και αποδιοργανωμένο, ενώ σε πολλά αγγεία η σύνδεση της βασικής μεμβράνης με τα ενδοθήλια είναι υπερβολικά χαλαρή (Εικόνα 62). Η έλλειψη της *Frem3* σε αρκετά αγγεία ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι η βασική τους μεμβράνη είναι απύσα ή αποδιοργανωμένη. Μία διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση με μάρτυρες της βασικής μεμβράνης των αγγείων θα μπορούσε να μας φανερώσει την κατάσταση των βασικών μεμβρανών στις οποίες δεν ανιχνεύεται η *Frem3*.



Εικόνα 62: (A): Η βασική μεμβράνη (βέλος) ενός παθολογικού αγγείου σε καρκίνωμα Lewis του πνεύμονα (κολλαγόνο IV, πράσινο) έχει χάσει τη στενή σύνδεσή της με το ενδοθήλιο (CD31, άσπρο). (B): Η βασική μεμβράνη (βέλος) ενός παθολογικού αγγείου σε SCC (*Frem3*, κόκκινο), έχει χάσει τη στενή σύνδεσή της με το ενδοθήλιο (PECAM-1, πράσινο) (Baluk *et al.*, 2003).

Πρέπει να σημειωθεί ότι η Frem3 σε φυσιολογικούς ιστούς εκφράζεται από το επιθήλιο και από το μεσέγχυμα. Στην περίπτωση των νεοπλασιών η έκφρασή του γονιδίου της ανιχνεύθηκε μόνο στο παθολογικό επιθήλιο. Εφόσον παράγεται από τα νεοπλαστικά επιθήλια, θα πρέπει με κάποιο τρόπο να στοχεύεται στα αγγεία του συνδετικού ιστού. Η διαλεύκανση του μηχανισμού αυτού αποτελεί μία ενδιαφέρουσα πρόκληση.

Τέλος, όπως διαπιστώθηκε, η Frem3 βρίσκεται στην επιφάνεια πολλών αγγείων που βρίσκονται σε στενή σύνδεση με το παθολογικό επιθήλιο, αλλά δεν φαίνεται να εισχωρούν σε αυτό. Το ερώτημα που προκύπτει από αυτήν την παρατήρηση είναι αν η Frem3 που αποτελεί συστατικό της βασικής μεμβράνης και των δύο κυτταρικών τύπων συμμετέχει στην εγκαθίδρυση ενός ενδοθηλιακού φραγμού, τόσο στην παθολογική, όσο και στη φυσιολογική επιδερμίδα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amarilio R, Ramachandran S, Sabanay H and Lev S** (2005). Differential regulation of endoplasmic reticulum structure through VAP-Nir protein interaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 280, 5934-5944
- Anderson RC, Pickett EA, Kiyozumi D, Smith CL, Sekiguchi K and Tallquist MD** (2007). Dermal PDGF receptor alpha deficiency results in embryonic epidermal blistering in the absence of hypoplasia. *The Journal of Investigative Dermatology* (under review)
- Arin MJ and Roop DR** (2001). Disease model: heritable skin blistering. *Trends in Molecular Medicine*. 7, 422-424
- Aumailley M, Rousselle P** (1999). Laminins of the dermo-epidermal junction. *Matrix Biology*. 18, 19-28
- Baker EK, Collins Tozer E, Pfaf M, Shattil SJ, Loftus JC and Ginsberg MH** (1997). A genetic analysis of integrin function: Glanzmann thrombasthenia in vitro. *PNAS*. 94, 1973-1978
- Baluk P, Morikawa S, Haskell A, Mancuso M and McDonald D** (2003). Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *American Journal of Pathology*. 163, 1801-1815
- Barresi R and Campell KP** (2005). Dystroglycan: From biosynthesis to pathogenesis of human disease. *Journal of Cell Science*. 119, 199-207
- Baumann O** (1992). Structural interactions of actin filaments and endoplasmic reticulum in honeybee photoreceptor cells. *Cell Tissue Res*. 268, 71-79
- Black VH** (1972). The development of smooth-surfaced endoplasmic reticulum in adrenal cortical cells of fetal guinea pigs. *Am. J. Anat*. 135, 381-417
- Bladt F, Tafuri A, Gelkop S, Langille L and Pawson T** (2002). Epidermolysis bullosa and embryonic lethality in mice lacking the multi-PDZ protein GRIP1. *PNAS*. 99, 6816-6821
- Breier G, Albrecht U, Sterrer S and Risau W** (1992). Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*. 114, 521-532
- Brown LF, Harrist TJ, Yeo KT, Stähle-Bäckdahl M, Jackman RW, Berse B, Tognazzi K, Dvorak HF and Detmar M** (1995). Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in bullous pemphigoid, dermatitis herpetiformis and erythema multiforme. *J. Invest. Dermatol*. 104, 744-9
- Bruckner-Tuderman L** (1999). Biology and pathology of the skin basement membrane zone. *Matrix Biology*. 18, 3-4
- Bruckner-Tuderman L** (1999). Hereditary skin diseases of anchoring fibrils. *Journal of dermatological science*. 20, 122-133
- 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

- Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D and During MJ** (2004). VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nature*. 36, 827-835
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W and Nagy A** (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 380, 435-439
- Cébe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A and Ballmer-Hofer K** (2006). The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 601–615
- 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
- Clos J and Brandau S** (1994). pJC20 and pJC40: Two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 5, 133-137
- Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R and Feder J** (1989). Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem*. 264,20017-24
- Cooper AR and MacQueen HA** (1983). Subunits of laminin are differentially synthesized in mouse eggs and early embryos. *Dev. Biol.* 96, 467-471
- Dalezios G, Papasozomenos B, Petrou P, Chalepakis G** (2007). Ultrastructural localization of Fras1 in the sublamina densa of embryonic epithelial basement membranes. *Arch. Dermatol. Res.* 299, 337-343
- Darling S and Gossler A** (1994). A mouse model for Fraser syndrome? *Clin. Dysmorphol.* 3,91-95
- Di Blasi C, Brioschi P, Moroni I, Pini A, Ruggieri A, Zanotti S, Uziel G, Jarre L, Della Giustina E, Scuderi C, Jonsrud C, Mantegazza R, Morandi L and Mora M** (2005). *LAMA2* gene analysis in congenital muscular dystrophy: new mutations, prenatal diagnosis, and founder effect. *Arch Neurol.* 62, 1582-1586
- Dong H, Zhang P, Song I, Petralia RS, Liao D, Haganir R** (1999). Characterization of the Glutamate Receptor Interacting Proteins GRIP1 and GRIP2. *The journal of Neuroscience.* 19, 6930-6941
- Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K and Breitman ML** (1995). Vascularization of the mouse embryo: A study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Developmental dynamics.* 203, 80-92
- Engbring JA and Kleinman HK** (2003). The basement membrane matrix in malignancy. *J Pathol.* 200, 465-470
- English AR, Zurek N and Voeltz GK** (2009). Peripheral ER structure and function. *Current Opinion in Cell Biology.* 21, 596-602

- Ervasti JM and Campbell KP** (1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*. 66, 1121-1131
- Federovitch CM, Jones YJ, Tong AH, Boone C, Prinz WA and Hampton RY** (2008). Genetic and structural analysis of Hmpg2p-induced endoplasmic reticulum remodelling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 19, 4506-4520
- Ferrara N and Davis-Smyth T** (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews*. 18, 4-25
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ and Moore MW** (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 380, 439-442
- Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW** (1992). Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*. 13,18-32
- Findlater GS, McDougall RD and Kaufman MH** (1993). Eyelid development, fusion and subsequent reopening in the mouse. *J. Anat*. 183, 121-129
- Garcia Abreu J, Coffinier C, Larraín J, Oelgeschläger M and De Robertis EM** (2002). Chordin-like CR domains and the regulation of evolutionarily conserved extracellular signaling systems. *Gene*. 287, 39-47
- Gatalica B, Pulkkinen L, Li K, Kuokkanen K, Ryyanen M, McGrath JA and Uitto J** (1997). Cloning of the human type XVII collagen gene (*COL17A1*), and detection of novel mutations in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Am. J. Hum. Genet*. 60, 352-365
- Gautam M, De Chiara TM, Glass DJ, Yancopoulos GD and Sanes JR** (1999). Distinct phenotypes of mutant mice lacking agrin, MuSK, or rapsyn. *Developmental Brain Research*. 114, 171-178
- Gerber HP, Dixit V and Ferrara N** (1998). Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem*. 273, 13313-6
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V and Ferrara N** (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem*. 273, 30336-43
- Gong FC, Giddings TH, Meehl JB, Staehelin LA and Galbraith DW** (1995). Z-Membranes: Artificial organelles for overexpressing recombinant integral membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93, 2219-2223
- Gorecki DC, Derry JM and Barnard EA** (1994). Dystroglycan: brain localisation and chromosome mapping in the mouse. *Hum. Mol. Genet*. 3, 1589-1597
- Greenberg DA, Jin K** (2004). Experiencing VEGF. *Net. Genet*. 36, 792-793
- Grigoriev I, Montenegro Gouveia S, van der Vaart B, Demmers J, Smyth JT, Honnappa S, Splinter D, Steinmetz MO, Putney Jr JW, Hoogenraad CC and Akhmanova A** (2008). STIM1 is a microtubule plus end tracking protein involved in remodelling of the endoplasmic reticulum. *Curr. Biol*. 18, 177-182

- Guo C, Willem M, Werner A, Raivich G, Emerson M, Neyses L, Mayer U** (2006). Absence of $\alpha 7$ integrin in dystrophin-deficient mice causes a myopathy similar to Duchenne muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*. 15, 989-998
- Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F and Sorokin LM** (2005). Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol. Rev.* 85, 979-1000
- Harris MJ, McLeod MJ** (1982). Eyelid growth and fusion in fetal mice: a scanning electron microscope study. *Anat. Embryol.* 164, 207-220
- Heffelfinger SC, Yan M, Gear RB, Schneider J, LaDow K and Warshawsky D** (2004). Inhibition of VEGFR2 prevents DMBA-induced mammary tumor formation. *Laboratory Investigation*. 84, 989-998
- Heinonen S, Mannikko M, Klement JF, Whitaker-Menezes D, Murphy GF and 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. *Journal of Cell Science*. 112, 3641-3648
- Hepler PK, Palevitz BA, Lancelle SA, McCauley MM, Lichtscheidl I** (1990). Cortical endoplasmic reticulum in plants. *J. Cell Sci.* 96, 355-373
- Herzog C, Has C, Franzke CW, Echtermeyer FG, Schlotzer-Schrehardt U, Kroger S, Gustafsson E, Fassler R and Bruckner-Tuderman L** (2004). Dystroglycan in skin and cutaneous cells: beta-subunit is shed from the cell surface. *J. Invest. Dermatol.* 122, 1372
- Hirokawa N** (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*. 279, 519-526
- Hogg N, Bates PA** (2000). Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biol.* 19, 211-22
- Holzbaur EL and Valee RB** (1994). Dyneins: molecular structure and cellular function. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 339-372
- Ibraghimov-Beskrovnya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW and Campbell KP** (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*. 355, 696-702
- Ibraghimov-Beskrovnya O, Milatovich, A, Ozelik T, Yang B, Koepnick K, Francke U and Campbell KP** (1993). Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1651-1657
- Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, Enomoto H, Nakamura H, Makino K, Ikeda E, Takata S, Kobayashi K and Okada Y** (2002). Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *The FASEB Journal*. 16, 219-21
- Ishiko A, Shimizu H, Kikuchi A, Ebihara T, Hashimoto T and Nishikawa T** (1993). Human autoantibodies against the 230-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG1) bind only to the intracellular domain of the hemidesmosome, whereas those against the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2) bind along the plasma membrane of the hemidesmosome in normal human and swine skin. *J. Clin. Invest.* 91, 1608-1615

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

Jing J, Lien CF, Sharma S, Rice J, Brennan PA and Górecki DC (2004). Aberrant expression, processing and degradation of dystroglycan in squamous cell carcinomas. *Eur. J. Cancer*. 40, 2143-2151

Jones AL and Fawcett DW (1966). Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by Phenobarbital (with a review on the functions of this organelle in liver). *J. Histochem. Cytochem.* 14, 215-232

Kachar B, Reese TS (1988). The mechanism of cycloplasmic streaming in characean algal cells: sliding of endoplasmic reticulum along actin filaments. *J. Cell Biol.* 106, 1545-1552

Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP (2007). Collagens at a glance. *Journal of cell science*. 120, 1955-1958

Kalinichenko VV, Lim L, Stolz DB, Shin B, Rausa FM, Clark J, Whitsett JA, Watkins SC and Costa RH (2001) Defects in pulmonary vasculature and perinatal lung hemorrhage in mice heterozygous null for the Forkhead Box f1 transcription factor. *Dev. Biol.* 235, 489–507

Kaner RJ, Ladetto JV, Singh R, Fukuda N, Matthay MA and Crystal RG (2000). Lung overexpression of the vascular endothelial growth factor gene induces pulmonary edema. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22, 657-64

Kannan S, Balaram P, Chandran GJ, Pilllai MR, Matthew B, Nalinakumari KR and Nair MK (1994). Alterations in expression of basement membrane proteins during tumor progression in oral mucosa. *Histopathology*. 24, 531-537

Keene D, Sakai LY, Lunstrum GP, Morris NP and Burgeson RE (1987). Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *The Journal of Cell Biology*. 104, 611-621

Kiyozumi D, Osada A, Sugimoto N, Weber CN, Ono Y, Imai T, Okada A, Sekiguchi K (2005). Identification of a novel cell adhesive protein spatiotemporally expressed in the basement membrane of mouse developing hair follicle. *Experimental Cell Research*. 306, 9-23

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

Kiyozumi D, Sugimoto N, Nakano I and Sekiguchi K (2007). Frem3, a member of the 12 CSPG repeats-containing extracellular matrix protein family, is a basement membrane protein with tissue distribution patterns distinct from those of Fras1, Frem2 and QBRICK/Frem1. *Matrix Biology*. 26,456-462

Klopfenstein DRCh, Kappeler F and Hauri HP (1998). A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *The EMBO Journal*. 17, 6168-6177

Koning AJ, Roberts CJ and Wright RL (1996). Different subcellular localization of *Saccharomyces cerevisiae* HMG-CoA reductase isoenzymes at elevated levels

corresponds to distinct endoplasmic reticulum membrane proliferations. *Mol. Biol. Cell.* 7, 769-789

Larcher F, Murillas R, Bolontrade M, Conti CJ and Jorcano JL (1998). VEGF/VPF overexpression in skin of transgenic mice induces angiogenesis, vascular hyperpermeability and accelerated tumor development. *Oncogene.* 17, 303-11

Larcher F, Robles AI, Duran H, Murillas R, Quintanilla M, Cano A, Conti CJ and Jorcano JL (1996). Up-regulation of vascular endothelial growth factor/ Vascular permeability factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated Hras expression levels. *Cancer research.* 56, 5391-5396

Legan PK, Collins JE and Garrod DR (1992). The molecular biology of desmosomes and hemidesmosomes: “what’s in a name?” *BioEssays.* 14, 385–393

Leivo I and Wartiovaara J (1989). Basement membrane matrices in mouse embryogenesis, teratocarcinoma differentiation and in neuromuscular maturation. *Int. J. Dev. Biol.* 33, 81-89

Leung CL, Green KJ and Liem RKH (2002). Plakins—a family of versatile cytolinker proteins. *Trends. Cell Biol.* 12, 37–45

Lichtscheidl IK, Lancelle SA, Hepler PK (1990). Actin-endoplasmic reticulum complexes in *Drosera*. *Protoplasma.* 155, 116-126

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

Liotta LA (1984). Tumor invasion and metastases: Role of the basement membrane. *APJ.* 11, 339- 348

Long J, Wei Z, Feng W, Yu C, Zhao Y and Zhang M (2008). Supramodular nature of Grip1 revealed by the structure of its PDZ12 tandem in complex with the carboxy tail of Fras1. *J.Mol. Biol.* 375, 1457-1468

Lugassy C, Barnhill RL (2007) Angiotropic melanoma and extravascular migratory metastasis: a review. *Adv. Anat. Pathol.* 14,195-201

Lugassy C, Haroun RI, Brem H, Tyler BM, Jones RV, Fernandez PM, Patierno SR, Kleinman HK and Barnhill RL (2002). Pericytic –like angiotropism of glioma and melanoma cells. *Am J. Dermatopathol.* 24, 473-478

Maconnachie EA (1979). A study of digit fusion in the mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 49, 259–276

Maeda H, Fang J, Inutsuka T and Kitamoto Y (2003). Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. *International Immunopharmacology.* 3, 319-328

Maharaj ASR, Saint-Geniez M, Maldonado AE and D’Amore PA (2006). Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *American Journal of Pathology.* 168, 639-648

Marinkovich P (2007). Laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat. Rev. Cancer.* 7, 370-380

Martin Belmonte F and Rodriguez-Fraticcelli A (2009). Chapter Three: Aquisition of membrane polarity in epithelial tube formation: Patterns, signaling pathways,

molecular mechanisms and disease. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 274, 129-174

Masunaga T (2006). Epidermal basement membrane: Its molecular organization and blistering disorders. *Connective Tissue Research*. 47, 55-66

Masunaga T, Shimizu H, Yee C, Borradori L, Lazarova Z, Nishikawa T and Yancey KB (1997). The extracellular domain of BPAG2 localizes to anchoring filaments and its carboxyl terminus extends to the lamina densa of normal human epidermal basement membrane. *The Journal of Investigative Dermatology*. 109, 200-206

Mc Gee S, Lanigan F, Gilligan E and Groner B (2006). Mammary gland biology and breast cancer. Conference on common molecular mechanisms of mammary gland development and breast cancer progression. *EMBO reports*. 7, 1084-1088

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 and 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

McColl BK, Stacker SA and Achen MG (2004). Molecular regulation of the VEGF family - inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. *APMIS*. 112, 463-80

McMillan JR and Eady RAJ (1996). Hemidesmosome ontogeny in digit skin of the human fetus. *Arch. Dermatol. Res*. 288, 91-97

Menzel R, Kargel E, Vogel F, Bottcher C and Schunk WH (1996). Topogenesis of a microsomal cytochrome P450 and induction of endoplasmic reticulum membrane proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys*. 330, 97-109

Miner J (2008). Laminins and their role in mammals. *Microscopy Research And Technique*. 71, 349-356

Miner JH and Li C (2000). Defective glomerulogenesis in the absence of laminin $\alpha 5$ demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. *Developmental Biology*. 217, 278-289

Miner JH and Sanes JR (1996). Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen $\alpha 3(\text{IV})$: Implications for Alport Syndrome. *The Journal of Cell Biology*. 135, 1403-1413

Miosge N (2001). The ultrastructural composition of basement membranes in vivo. *Histol. Histopathol*. 16, 1239-1248

Miosge N, Holzhausen S, Zelent C, Sprysch P and Herken R (2001). Nidogen-1 and nidogen-2 are found in basement membranes during human embryonic development. *The Histochemical Journal*. 33, 523-530

Miosge N, Quondamatteo F, Klenczar C and Herken R (2000). Nidogen-1: Expression and ultrastructural localization during the onset of mesoderm formation in the early mouse embryo. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 48, 229-237

- Mueller MM and Fusenig NE** (2004). Friends or foes-Bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 4, 839-849
- Myllyharju J and Kivirikko KI** (2001). Collagens and collagen-related diseases. *Ann. Med.* 33, 7-21
- Myllyharju J and Kivirikko KI** (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 20, 33-43
- Nakatsu MN, Sainson RC, Pérez-del-Pulgar S, Aoto JN, Aitkenhead M, Taylor KL, Carpenter PM and Hughes CC** (2003). VEGF(121) and VEGF(165) regulate blood vessel diameter through vascular endothelial growth factor receptor 2 in an in vitro angiogenesis model. *Lab. Invest.* 83, 1873-85
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S and Poltorak Z** (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*. 13, 9-22
- NG YS, Rohan R, Sunday ME, Demello DE and D' Amore PA** (2001). Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Developmental Dynamics*. 220, 112-121
- Okumura M, Uematsu J, Hirako Y, Nishizawa Y, Shimizu H, Kido N, Owaribe K** (1999). Identification of the hemidesmosomal 500 kDa protein (HD1) as Plectin. *J. Biochem.* 126, 1144-1150
- Oldfors A and Fardeau M** (1983). The permeability of the basal lamina at the neuromuscular junction. An ultrastructural study of rat skeletal muscle using particulate tracers. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 9, 419-432
- Oliveira PA, Colaco A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz LF and Lopes C** (2007). Chemical carcinogenesis. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 79, 593-616
- Pacifici M and Iozzo RV** (1988). Remodeling of the Rough Endoplasmic Reticulum during stimulation of procollagen secretion by ascorbic acid in cultured chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 263, 2483-2492
- Pankov R, Yamada KM** (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*. 115, 3861-3
- Patel SB and Grundy SM** (1996). Interactions between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B within the endoplasmic reticulum in a heterologous expression system. *The Journal of Biological Chemistry*. 271, 18686-18694
- Pavlakakis E, Makrygiannis AK, Chiotaki R, Chalepakis G** (2008). Differential localization profile of Fras1/Frem proteins in epithelial basement membranes of newborn and adult mice. *Histochemistry and Cell Biology*. 130, 785-793
- Pennisi DJ, Wilkinson L, Kolle G, Sohaskey ML, Gillinder K, Piper MJ, McAvoy JW, Lovicu FJ and Little MH** (2007). Crim1KST264/KST264 mice display a disruption of the Crim1 gene resulting in perinatal lethality with defects in multiple organ systems. *Dev. Dyn.* 236, 502-11
- Petrou P, Chiotaki R, Dalezios Y and 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

- Petrou P, Makrygiannis A and Chalepakis G** (2008). The Fras1/Frem Family of extracellular matrix proteins: Structure, function, and association with Fraser syndrome and mouse bleb phenotype. *Connective Tissue Research*. 49, 277-282
- 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 Biol*. 26, 652-658
- Petrou P, Pavlakis E, 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
- Pfendner E, Rouan F and Uitto J** (2005). Progress in epidermolysis bullosa—the phenotypic spectrum of plectin mutations. *Exp. Dermatol*. 14, 241–249
- Plate K, Breier G, Weich HA and Risau W** (1992). Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*. *Nature*. 359, 845-848
- Pradeep CR, Sunila ES and Kuttan G** (2005). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr. Cancer Ther*. 4, 315-321
- Presley JF, Cole NB, Schroer TA, Hirschberg K, Zaal KJM and Lippincott-Schwartz J** (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature*. 389, 81-85
- Quader H, Hofmann A, Schnepf E** (1987). Shape and movement of the endoplasmic reticulum in onion bulb epidermis cells: possible involvement of actin. *Eur. J. Cell Biol*. 44, 17-26
- Razzaque MS and Taguchi T** (2000). Evidence of increased expression of synaptic basal lamina protein agrin in glomerulosclerosis. *Kidney International*. 57, 1774-1775
- Reichert M, Muller T and Hunziker W** (2000). The PDZ domains of Zonula Occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby Canine Kidney I Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 275, 9492-9500
- Richard JE and Kreis TE** (1996). CLIPs for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol*. 6, 178-183
- Rundhaug JE** (2003) Matrix Metalloproteinases, Angiogenesis, and Cancer. *Clinical Cancer Research*. 9, 551-554
- Sakai LY, Keene DR, Morris NP, Burgeson RE** (1986). Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *The Journal of Cell Biology*. 103, 1577-1586
- Sasaki Y, Shimizu H, Akiyama M, Hiraoka Y, Takizawa Y, Yamada S, Morishima Y, Yamanishi K, Aiso S and Nishikawa T** (1999). A recurrent keratin 14 mutation in Dowling-Meara epidermolysis bullosa simplex. *Br. J. Dermatol*. 141, 747–748
- Sato M, Shimizu H, Ishiko A, Masunaga T, Akiyama M, Hashimoto T, Kitajima Y and Nishikawa T** (1998). Precise ultrastructural localization of *in vivo* deposited IgG antibodies in fresh perilesional skin of patients with bullous pemphigoid. *Br. J. Dermatol*. 138, 965–971

- Schmidt E and Zillikens D** (2000). Autoimmune and inherited subepidermal blistering diseases—advances in the clinic and the laboratory. *Adv. Dermatol.* 16, 113–157
- Schnapp BJ** (1997). Retroactive motors. *Neuron.* 18, 523-526
- Schroer TA and Gill SR** (1996). Interactions between microtubules and intracellular membranes: The role of microtubule based motors and accessory proteins. *Curr. Top. Membr.* 43, 27-52
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS and Dvorak HF** (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 219, 983-5
- Sherwood DR** (2006). Cell invasion through basement membranes: An anchor of understanding. *Trends in Cell Biology.* 16, 250-256
- Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, Ng YS, Adamis AP, D'Amore PA** (1996). The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J Biol Chem.* 271, 3877-83
- Shimizu H, Masunaga T, Ishiko A, Matsumura K, Hashimoto T, Nishikawa T, Domloge-Hultsch N, Lazarova Z and Yancey K.B** (1995). Autoantibodies from patients with cicatricial pemphigoid target different sites in epidermal basement membrane. *J. Invest. Dermatol.* 104, 370–373
- Short K, Wiradjaja F and Smyth I** (2007). Let's stick together: The role of the Fras1 and Frem proteins in epidermal adhesion. *IUBMB Life.* 59,427-435
- Shweiki D, Itin A, Doffer D, Keshet E** (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxiamay mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 359, 843-845
- Shweiki D, Neeman M, Itin A and Keshet E** (1995). Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and glucose deficiency in multicell spheroids: Implications in tumor angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 768-772
- Six I, Kureishi Y, Luo Z and Walsh K** (2002). Akt signalling mediates VEGF/VPF vascular permeability in vivo. *FEBS lett.* 532, 67-69
- Slavotinek AM and Tiffit 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 and Scambler P** (2005). The genetics of Fraser syndrome and the blebs mouse mutants. *Human Molecular Genetics.* 14, R269-R274
- 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
- Snapp EI, Hedge RS, Francolini M, Lombardo F, Colombo S, Pedrazzini E, Borgese N and Lippincott-Schwartz J** (2003). Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *The Journal of Cell Biology.* 163, 257-269
- Stenback F, Wasenius VM and Kallioinen M** (1986). Basement membranes in experimentally induced skin tumors. *J. Invest. Dermatol.* 87: 185-189

- Suhy DA, Giddings Jr TH and Kirkegaard K** (2000). Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: An autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *Journal of Virology*. 74, 8953-8965
- Surace C, Storlazzi CT, Engellau J, Domanski DA, Gustafson P, Panagopoulos I, D'Addabbo P, Rocchi M, Mandahl N and Mertens F** (2005). Molecular cytogenetic characterization of an ins (4;X) occurring as the sole abnormality in an aggressive, poorly differentiated soft tissue sarcoma. *Virchows Arch*. 447, 869-874
- Takamiya K, Kostourou V, Adams S, Jadeja S, Chalepakis G, Scambler PJ, Huganir RL and 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
- Terasaki M and Jaffe LA** (1991). Organization of the sea urchin egg endoplasmic reticulum and its reorganization at fertilization. *J. Cell Biol*. 114, 929-940
- 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
- Udo H, Yoshida Y, Kino T, Ohnuki K, Mizunoya W, Mukuda T and Sugiyama H** (2008). Enhanced adult neurogenesis and angiogenesis and altered affective behaviors in mice overexpressing vascular endothelial growth factor 120. *The Journal of Neuroscience*. 28, 14522-14536
- Vallee RB and Sheetz MP** (1996). Targeting of motor proteins. *Science*. 271, 1539-1544
- Voeltz GK, Rolls MM and Rapoport TA** (2002). Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO reports*. 3, 944-950
- Vrontou S, Petrou P, Meyer BI, Galanopoulos VK, Imai K, Yanagi M, Chowdhury K, Scambler PJ and Chalepakis G** (2003). *Fras1* deficiency results in cryptophthalmos, renal agenesis and blebbed phenotype in mice. *Nature Genetics*. 34, 209-214
- Walker RA and Sheetz MP** (1993). Cytoplasmic microtubule-associated motors. *Annu. Rev. Biochem*. 62, 429-451
- Wilkinson L, Gilbert T, Kinna G, Ruta LA, Pennisi D, Kett M and Little MH** (2007). *Crim1*^{KST264/KST264} mice implicate *Crim1* in the regulation of Vascular Endothelial Growth Factor-A activity during glomerular vascular development. *J. Am. Soc. Nephrol*. 18, 1697-1708
- Wilkinson L, Kolle G, Wen D, Piper M, Scott J and Little M** (2003). CRIM1 regulates the rate of processing and delivery of bone morphogenetic proteins to the cell surface. *J. Biol. Chem*. 278, 34181-8
- Williamson RA, Henry MD, Daniels KJ, Hrstka RF, Lee JC, Sunada Y, Ibraghimov-Beskrovnaya O and Campbell KP** (1997). Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice. *Hum. Mol. Genet*. 6, 831-841
- Winter RM** (1990). Fraser syndrome and mouse 'bleb' mutants. *Clin. Genet*. 37, 494-495

Wright R, Basson M, D'Ari L and Rine J (1988). Increased amounts of HMG-CoA reductase induce 'karmellae': a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. *J. Cell Biol.* 107, 101-114

Xia YP, Li B, Hylton D, Detmar M, Yancopoulos GD, Rudge JS (2003). Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to an inflammatory condition resembling human psoriasis. *Blood.* 102, 161-8

Yoshikawa N, Cameron AH and White RHR (2005). The glomerular basal lamina in hereditary nephritis. *The journal of Pathology.* 135, 199-209

Yurchenco PD and Patton BL (2009). Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1277-1294

Zachary I (2003). VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biocemical Society Transactions.* 31, 1171-1177

Ziegler WH, Gingras AR, Critchley DR and Emsley J (2008). Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 235-239