

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ-ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**“ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ
Fras1/Frem ΕΚΤΟΣ ΤΗΣ ΒΑΣΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ
ΤΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΩΝ”**

ΠΑΥΛΑΚΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Γ. ΧΑΛΕΠΑΚΗΣ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2009

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
SUMMARY	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Επιθήλια	4
1.2 Δομή και λειτουργία της βασικής μεμβράνης	4
1.3 Δομική ανάλυση των πρωτεϊνών <i>Fras1/Frem</i>	6
1.4 Έκφραση και εντοπισμός των πρωτεϊνών <i>Fras1/Frem</i>	9
1.5 Ακριβής εντοπισμός των πρωτεϊνών <i>Fras1/Frem</i> στη βασική μεμβράνη, με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης	11
1.6 Απενεργοποίηση των γονιδίων <i>Fras1</i> , <i>Frem1</i> και <i>Frem2</i> στον ποντικό	12
1.7 Οι μεταλλαγές 'bleb' στον ποντικό	17
1.8 Οι πρωτεΐνες <i>Fras1/Frem</i> δημιουργούν ένα αλληλοεξαρτώμενο σύμπλοκο στη βασική μεμβράνη των επιθηλίων.....	19
1.9 Μεταλλαγές των γονιδίων <i>FRAS1</i> και <i>FREM2</i> προκαλούν το σύνδρομο Fraser στον άνθρωπο	21
1.10 Ανθρώπινες δερματικές ασθένειες που χαρακτηρίζονται από την παρουσία φυσαλίδων	23
1.11 Σκοπός της εργασίας	24
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	27
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	28
2.1 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων	28
i) Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών	28
ii) Απομόνωση γενωμικού DNA από πολυδύναμα προγονικά κύτταρα	28
iii) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια, σε μικρή κλίμακα	29
iv) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια, σε μεγάλη κλίμακα	29
v) Απομόνωση ολικού RNA από ιστούς ποντικού	30
vi) Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	30
2.2 Τεμαχισμός μορίων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού	31
2.3 Παρασκευή τυφλών άκρων	31
2.4 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (ligation)	32
2.5 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	32
i) Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	32
ii) Ηλεκτροφόρηση συνολικού RNA από ιστούς ποντικού σε πήκτωμα	33
2.6 Μετασχηματισμός βακτηρίων με υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA.....	33
i) Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού σοκ(heat shock)	33
ii) Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο της ηλεκτρικής εκκένωσης	34
2.7 Ανάλυση μορίων DNA κατά Southern.....	35

2.8 Ραδιο/νση μορίων DNA με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινήτων ...	37
2.9 Υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων	38
i) Προϋβριδοποίηση γενωμικού DNA από πολυδύναμα εμβρυϊκά κύτταρα	38
ii) Υβριδοποίηση γενωμικού DNA από πολυδύναμα εμβρυϊκά κύτταρα.....	38
iii) Πλυσίματα φίλτρων μετά την υβριδοποίηση	38
iv) Αυτοραδιογραφία	39
v) Υβριδοποίηση αποικιών ακινητοποιημένων σε μεμβράνη	39
2.10 Παρασκευή ανιχνευτή RNA με αντίδραση μεταγραφής in vitro	39
2.11 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής	40
2.12 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	41
i) Ταυτοποίηση ομόλογου ανασυνδυασμού με τη μέθοδο PCR.....	41
ii) Γονοτυπική ταυτοποίηση ποντικών με τη μέθοδο PCR.....	43
iii) Ανάκτηση τεμαχίων DNA για την κατασκευή ανιχνευτών	43
iv) Ανάκτηση τεμαχίων DNA για τη δημιουργία κατασκευής στόχου	44
v) Ανάκτηση τμημάτων DNA μέσω PCR για την κλωνοποίηση σε βακτηριακούς φορείς έκφρασης με στόχο τη δημιουργία πολυκλωνικών αντισωμάτων.....	45
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	46
2.13 Παραγωγή πρωτεϊνών σε βακτήρια με επαγωγή	46
2.14 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	46
i) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολ/λαμίδης.....	46
ii) Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie blue και υδατοδιαλυτή Coomassie blue ...	47
2.15 Απομόνωση πρωτεϊνών από παρασκευαστικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.....	48
2.16 Καθαρισμός πολυκλωνικών αντισωμάτων	49
i) Απομόνωση ορού από το αίμα κουνελιών	49
ii) Διαδικασία καθαρισμού αντισωμάτων από ανοσοποιημένο ορό.....	49
2.17 Ανάλυση πρωτεϊνών με Western.....	50
i) Υγρή ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών	50
ii) Ανάλυση Western.....	50
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΩΝ ΠΟΝΤΙΚΟΥ	51
2.18 Μονιμοποίηση δειγμάτων	51
i) Μονιμοποίηση εμβρύων και ιστών ποντικού (εκτός εγκεφάλων).....	51
ii) Μονιμοποίηση εγκεφάλων με ενδοκαρδιακή έγχυση.....	51
2.19 Διαδικασία έγκλησης ιστών για επεξ/σία τους σε κρυοτόμο	52
i) Έγκληση ιστών για κρυοτομές (εκτός εγκεφάλων)	52
ii) Έγκληση εγκεφάλων για κρυοτομές.....	52
2.20 Διαδικασία έγκλησης ιστών και εμβρύων σε παραφίνη	53
i) Έγκληση εμβρύων μέχρι E16.5 και μικρών σε μέγεθος ιστών σε παραφίνη ..	53
ii) Έγκληση εμβρύων (E16.5-E18.5) και μεγάλων ιστών σε παραφίνη.....	53
2.21 Παραγωγή τομών σε μικροτόμο ή κρυοτόμο	54
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ.....	55
2.22 Προετοιμασία αντικειμενοφόρων για τη συλλογή τομών	55
2.23 Ιστολογική χρώση με Cresyl Violet.....	55
2.24 In situ υβριδοποίηση RNA	56

i) Υβριδοποίηση	56
ii) Πλυσίματα και επώαση με αντίσωμα	57
iii) Πλυσίματα και εμφάνιση	57
2.25 Ανοσοϊστοχημική μελέτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....	58
i) Ενδοπεριτοναϊκή ένεση BrdU σε ποντικό	58
ii) Ανοσοϊστοχημεία BrdU σε κρυοτομές	58
2.26 Ανοσοφ/ισμός και ανοσοεντοπισμός σε ιστολογικές τομές	59
i) Ανοσοφθορισμός σε τομές ιστών/εμβρύων (εκτός εγκεφάλων)	59
ii) Ανοσοφθορισμός σε τομές ιστών και εμβρύων με ενίσχυση του σήματος .	60
iii) Ανοσοφθορισμός σε τομές εγκεφάλων	61
iv) Ανοσοεντοπισμός με χρώση υπεροξειδάσης.....	61

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ-ΚΥΤΤΑΡΟ/ΡΓΕΙΕΣ

2.27 Κυτταροκαλλιέργειες.....	62
i) Κυτταρικές σειρές	62
ii) Διατήρηση κυτταροκαλλιεργειών	62
iii) Κρυοδιατήρηση κυττάρων και επανακαλλιέργεια	62
2.28 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με πλασμιδιακό DNA.....	63
2.29 Πλασμιδιακές κατασκευές.....	64
i) Κατασκευή Νο 1 για την στοχευμένη απενεργοποίηση του <i>Frem3</i>	64
ii) Κατασκευή Νο 2 για την στοχευμένη απενεργοποίηση του <i>Frem3</i>	70
iii) Κατασκευή Νο 3 για την στοχευμένη απενεργοποίηση του <i>Frem3</i>	73
iv) Κατασκευές αντισωμάτων <i>Fras1</i> , <i>Frem3</i>	75
v) Κατασκευές για την κλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου <i>Frem3</i>	76
vi) Κατασκευές ανιχνευτών <i>Frem3</i> , για Southern.....	80
vii) Κατασκευές ανιχνευτών <i>Fras1</i> για mRNA in situ υβριδοποίηση.....	81
2.30 Βακτηριακά στελέχη.....	81
2.31 Κυτταρικές σειρές.....	82
2.32 Βακτηριακοί φορείς	83
2.33 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων και κυτταρικών σειρών θηλαστικών	84
2.34 Λίστα αντισωμάτων	85
2.35 Λίστα ολιγονουκλεοτιδίων	86

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....

3.1 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ <i>FREM3</i> ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ <i>FREM3-N2</i>	90
i) Η <i>Frem3</i> εντοπίζεται με το αντίσωμα <i>Frem3-N2</i> στη βασική μεμβράνη επιθηλίων <i>Fras1</i> ^{-/-} ποντικών, όπου οι υπόλοιπες <i>Fras1</i> / <i>Frem</i> απουσιάζουν	90
ii) Εντοπισμός της <i>Frem3</i> με το αντίσωμα <i>Frem3-N2</i> στη βασική μεμβράνη των επιθηλίων, όλων των ενήλικων οργάνων, όταν οι άλλες <i>Fras1</i> / <i>Frem</i> απουσιάζουν.	91
iii) Η πρωτεΐνη <i>Frem3</i> με το αντίσωμα <i>Frem3-N2</i> είναι η μοναδική από τις πρωτεΐνες της οικογένειας που εντοπίζεται στα αιμοφόρα αγγεία	97

3.2 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ <i>Frem3</i> ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ <i>Frem3-C2</i>	99
i) Εντοπισμός της <i>Frem3</i> με το αντίσωμα <i>Frem3-C2</i> στα περιφερικά νεύρα και σε κύτταρα του αίματος κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη	100
3.3 ΝΕΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΤΗ <i>Frem3</i>	101
3.4 ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>Frem3</i> ΣΤΟΝ ΠΟΝΤΙΚΟ	102
i) Κατασκευή 1 ^η για τη στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου <i>Frem3</i> -Έλεγχος για την παρουσία ομόλογου ανασυνδυασμού με ανάλυση κατά Southern στο 5' άκρο	102
ii) Κατασκευή 2 ^η για τη στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου <i>Frem3</i> -Έλεγχος για την παρουσία ομόλογου ανασυνδυασμού με ανάλυση κατά Southern στο 5' άκρο	105
iii) Κατασκευή 3 ^η για τη στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου <i>Frem3</i> -Έλεγχος για την παρουσία ομόλογου ανασυνδυασμού με ανάλυση PCR στο 5' άκρο..	107
iv) Κατασκευή 3 ^η για τη στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου <i>Frem3</i> -Έλεγχος για την παρουσία ομόλογου ανασυνδυασμού με ανάλυση PCR στο 3' άκρο..	110
v) Κατασκευή 3 ^η για τη στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου <i>Frem3</i> -Έλεγχος για την παρουσία ομόλογου ανασυνδυασμού με ανάλυση κατά Southern στο 3' άκρο	118
3.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΖΩΩΝ	120
3.5 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	122
i) Τα ομόζυγα <i>Frem3</i> ^{-/-} μεταλλαγμένα ποντίκια πεθαίνουν πριν τη εμβρυϊκή μέρα 5.5	122
ii) Τα <i>Frem3</i> ^{+/-} ποντίκια εμφανίζουν καχεξία, νανισμό & πρόωρη θνησιμότητα .	124
iii) Τα <i>Frem3</i> ^{+/-} νεογέννητα ποντίκια εμφανίζουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ιχθύωσης	125
iv) Τα <i>Frem3</i> ^{+/-} ποντίκια εμφανίζουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά δερματίτιδας και αλωπεκίας	126
iv) Κρυφορχία και στειρότητα στην πλειονότητα των αρσενικών ετερόζυγων απογόνων του κλώνου 19	129
3.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ <i>Fras1</i> ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	140
i) Εγκέφαλος-Μάθηση και μνήμη	140
ii) Η έκφραση του <i>Fras1</i> στον εγκέφαλο ενήλικων ποντικών, υποδηλώνει τη σχέση του γονιδίου με τις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης.....	144
iii) Τα <i>Fras1</i> ^{-/-} ποντίκια παρουσιάζουν ελλιπή μνήμη του φόβου	145
iv) Η πρωτεΐνη <i>Fras1</i> δεν εντοπίζεται στον εγκέφαλο ενηλίκων ποντικών	147
v) Μοριακή – ιστολογική ανάλυση του φαινοτύπου με τη χρήση διαφόρων δεικτών	148
vi) Ο εγκέφαλος των <i>Fras1</i> ^{-/-} ποντικών παρουσιάζει αυξημένο αριθμό GFAP-θετικών κυττάρων	150
vii) Τα <i>Fras1</i> ^{-/-} ποντίκια έχουν μειωμένο αριθμό ολιγοδενδροκυττάρων	155
viii) Στην Εξωτερική στιβάδα του φλοιού και του απιοειδούς λοβού, παρουσιάζονται αυξημένα νευρικά κύτταρα στα <i>Fras1</i> ^{-/-} ποντίκια	160
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	163
4.1 Μελέτη του προτύπου εντοπισμού της πρωτεΐνης <i>Frem3</i>	165
4.2 Απενεργοποίηση του γονιδίου <i>Frem3</i> ποντικό	169
4.3 Μελέτη του φαινοτύπου των <i>Frem3</i> ^{+/-} ποντικών	170

4.4 Μελλοντικά πειράματα.....	178
4.5 Ο φαινότυπος των <i>Fras1</i> ^{-/-} ποντικών στον εγκέφαλο	179
4.3 Μελέτη του φαινοτύπου των <i>Frem3</i> ^{+/-} ποντικών	170
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	182

Περίληψη

Στα ευρύτερα πλαίσια της λειτουργικής μελέτης των πρωτεϊνών *Fras1/Frem*, αναζητήσαμε περιοχές πιθανούς λειτουργίας τους, διαφορετικές από την βασική μεμβράνη των επιθηλίων. Η πρωτεΐνη *Frem3* είναι η μοναδική από τις πρωτεΐνες της οικογένειας που αφενός μεν συνεντοπίζεται και συμπεριφέρεται όπως τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, αφετέρου δε παρουσιάζει και διαφορετικό πρότυπο εντοπισμού. Συγκεκριμένα, περιβάλλει τα εμβρυικά επιθήλια όπως οι υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας, και επιπλέον, εντοπίζεται σε όλα τα αιμοφόρα αγγεία, περιφερικά νεύρα και κύτταρα του αίματος και στη βασική μεμβράνη όλων των επιθηλίων στα ενήλικα άτομα.

Με στόχο την κατανόηση της βιολογικής λειτουργίας της *Frem3*, πραγματοποιήθηκε η στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3* στον ποντικό με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού σε συνεργασία με τον Dr. Kamal Chowdhury (Max Planck Institute, Goettingen, Γερμανία).

Από διασταυρώσεις μεταξύ ετεροζυγωτών δεν έχουν εντοπιστεί ζώντα ομόζυγα άτομα από την εμβρυική ημέρα 4.5 (E4.5) και αργότερα. Η E4.5 οριοθετεί το στάδιο της εμφύτευσης του εμβρύου στη μήτρα και είναι πιθανόν τα *Frem3*^{-/-} έμβρυα να πεθαίνουν στο στάδιο της βλαστοκύστης. Η μελέτη και ανάλυση των μεταλλαγμένων ετεροζυγωτών ποντικών παρουσιάζει μια πληθώρα συμπτωμάτων όπως, φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αλωπεκίας, ιχθύωσης, δερματίτιδας, ορχίτιδας και επιδιδυμίτιδας και κατά συνέπεια στειρότητα στα αρσενικά. Τα φαινοτυπικά αυτά χαρακτηριστικά είναι ενδεικτικά για ένα γενικό μηχανισμό αυτοανοσίας, για την επιβεβαίωση του οποίου θα πρέπει να διεξαχθούν συγκεκριμένα πειράματα, με στόχο την ακριβή ταυτοποίηση των μηχανισμών μέσω των οποίων η μερική έλλειψη της *Frem3* συμβάλλει στις παραπάνω διαταραχές.

Όσον αφορά την πρωτεΐνη *Fras1*, το έναυσμα για την εκτενέστερη μελέτη της, αποτέλεσαν πειράματα mRNA *in situ* σε εγκεφάλους ενηλίκων ποντικών, απ' όπου αναδείχθηκε η έκφραση του *Fras1* σε συγκεκριμένες περιοχές που σχετίζονται με μαθησιακές διεργασίες, παρόλο που, μέχρι τώρα έχει σταθεί αδύνατο να εντοπιστεί η πρωτεΐνη σε εγκεφάλους. Πειράματα συμπεριφοράς στα μεταλλαγμένα *Fras1*^{-/-} ποντίκια απέδειξαν ότι τα ποντίκια αυτά έχουν ελλιπή μνήμη του φόβου, ενώ ανοσοϊστοχημική ανάλυση με τη χρήση διαφόρων δεικτών δείχνει διαταραχές στον αριθμό γλοιακών κυττάρων.

Summary

The *Fras1/Frem* gene family encodes for structurally similar proteins of the extracellular matrix, functionally correlated with embryonic dermal-epidermal adhesion as deduced from the appearance of sub-epidermal blisters in mouse mutants compromising the function of *Fras1*, *Frem1* and *Frem2* proteins. Throughout the wider examination of the role of *Fras1/Frem* proteins, we began exploring areas of possible function of these proteins, other than the epithelial basement membrane.

While all *Fras1/Frem* proteins are co-localized in all embryonic epithelial basement membranes, *Frem3* is the only member of the family which shows a differential localization pattern, being detected on blood vessels and peripheral nerves, surrounding blood cells in embryos and being present in all adult epithelial basement membranes.

Towards the understanding of the biological role of *Frem3*, we accomplished the targeted inactivation of the *Frem3* gene in the mouse, in co-operation with Dr Kamal Chowdhury (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Gottingen, Germany). One of the first observations is that crosses between *Frem3*^{+/-} mice do not result in living homozygous animals, from the embryonic day E4.5 onwards. Since E4.5 defines the point when the embryo is implanted in the uterine wall, it is possible that the homozygous mutants die at the blastocyst stage. Analysis of the heterozygous mice revealed a plethora of phenotypic features such as characteristics of ichthyosis, dermatitis, alopecia, orchitis and epididymitis. The latter have also resulted in sterility of a very high proportion of the *Frem3*^{+/-} male mice. The aforementioned phenotypic characteristics are indicative of a general mechanism of autoimmunity. Future experiments will have to disclose the exact role of the machinery leading to autoimmunity as well as how the partial shortage of *Frem3* may contribute to all that.

Regarding *Fras1*, previous mRNA *in situ* experiments, carried out on adult mouse brain sections, revealed that *Fras1* is expressed by areas of the brain which play an important role in processes such as the memory of emotional reactions. Fear conditioning experiments on adult *Fras1*^{-/-} mice suggest that these mice do not have any memory of the fear, whilst at the same time immunohistochemical experiments using various markers, revealed disturbances on the number of glial cells.

Πρόλογος

.....Το ταξίδι για την Ιθάκη έφτασε στο τέλος του...Και ο δρόμος ευτυχώς ήταν αρκετά μακρύς ώστε το ταξίδι αυτό να μου προσφέρει πολλές καινούριες και πολύτιμες εμπειρίες και γνώσεις. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής το οφείλω στον επιβλέπων καθηγητή μου κ Γεώργιο Χαλεπάκη. Το ευχαριστώ μοιάζει λίγο μπροστά σε όσα μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια. Για την καθοδήγησή του, την αμέριστη συμπαράστασή του, την πολύ παραγωγική συνεργασία μας και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή που ήρθα στο εργαστήριό του πριν από εφτά περίπου χρόνια, θα είμαι πάντα ευγνώμων.

.....Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη της τριμελούς και της εφταμελούς μου επιτροπής: την κυρία Ε. Αθανασάκη, την κυρία Δ. Καραγωγέως, την κυρία Ζαχαρίου, τον κύριο Γ. Δαλέζιο και τον κύριο Γ. Ταλιανίδη και ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην κυρία Δ. Αλεξανδράκη, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για τις πολύτιμες συμβουλές της και της κριτική της, που με βοήθησαν να γίνω καλύτερος.

.....Ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στην Τζένη Καλογεράκη και τη Νένα Παυλίδη. Η συμβολή τους στην παρούσα εργασία ήταν καθοριστική κατά τη διάρκεια της εκπόνησης των πτυχιακών τους, ενώ η φιλία τους μέσα και έξω από το εργαστήριο ήταν και είναι ότι πολυτιμότερο κέρδισα τον τελευταίο χρόνο. Δεν θα ξεχάσω ποτέ τις στιγμές που περάσαμε και τη δύναμη που μου έδιναν για να συνεχίσω, σε περιόδους που πίστευαν σε εμένα περισσότερο απ' ότι εγώ στον εαυτό μου.

.....Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου παρελθόντα και νεότερα καθώς και ιδιαίτερα τον Απόστολο Μακρυγιάννη για τη βοήθεια σε πολλά πειράματα, τις ατελείωτες «πρόβες» τις τελευταίες μέρες πριν από την παρουσίαση και την ηθική υποστήριξη. Επίσης, να ευχαριστήσω και τη Ρένα Χιωτάκη, με την οποία μαζί συμπορευτήκαμε όλα αυτά τα χρόνια στο εργαστήριο και μαζί τελειώσαμε.

.....Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, που όλα αυτά τα χρόνια είναι δίπλα μου και στηρίζει με αγάπη κάθε επιλογή μου ακόμα και όταν δεν τους βρίσκει απόλυτα σύμφωνους και να αφιερώσω την παρούσα εργασία στην αδερφή μου Ελένη.

Νοέμβριος, 2009

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

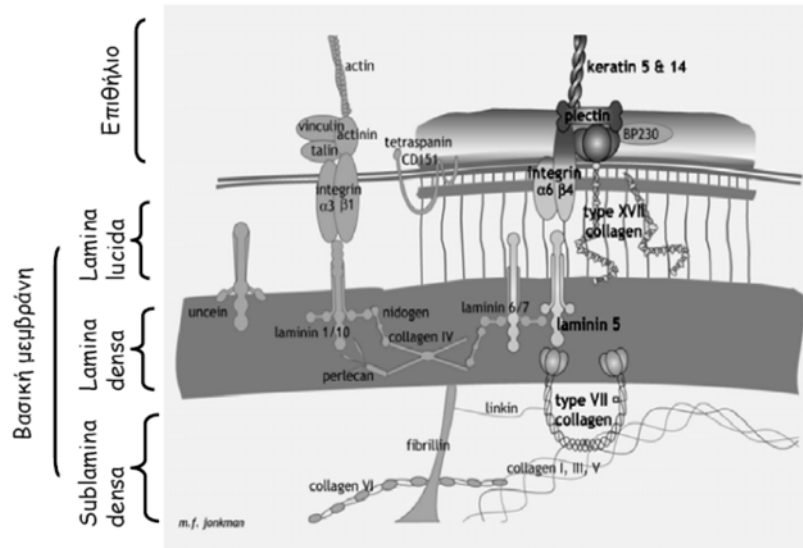
1.1 Επιθήλια

Τα επιθήλια αποτελούν μια ξεχωριστή κατηγορία ιστών και συγκροτούνται από συνεκτικά συνδεδεμένες δεσμίδες κυττάρων, δημιουργώντας πολύστοιβα και μονόστοιβα επιθήλια. Οι επιθηλιακές ζώνες περιβάλλουν όλες τις εξωτερικές και εσωτερικές επιφάνειες ενός οργανισμού καλύπτοντας όλες τις κοιλότητες και τους σωλήνες του, λειτουργώντας σαν ζώνες μεσόφρασης μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού περιβάλλοντος αλλά και μεταξύ των διαφορετικών εσωτερικών διαμερισμάτων του οργανισμού. Τα επιθηλιακά κύτταρα συνδέονται και αλληλεπιδρούν τόσο μεταξύ τους όσο και με συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας.

1.2 Δομή και λειτουργία της βασικής μεμβράνης

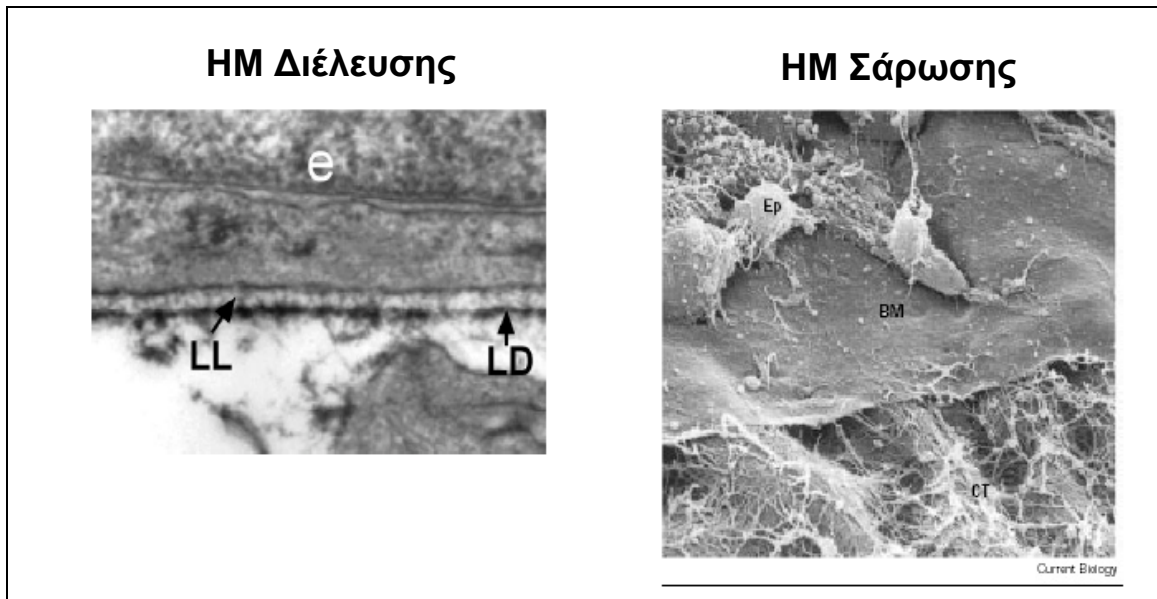
Μια ειδική κατηγορία της εξωκυττάριας ύλης όλων σχεδόν των πολυκύτταρων οργανισμών είναι και η βασική μεμβράνη ή βασικό έλασμα (Εικ.1) (Timpl R and Brown JC, 1996). Πρόκειται για έναν ευέλικτο λεπτό σχηματισμό εξωκυττάριας ουσίας ο οποίος αποτελεί και την πρώτη εξωκυττάρια ουσία που δημιουργείται κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης (Timpl R and Brown JC, 1996). Η βασική μεμβράνη βρίσκεται σε όλους σχεδόν τους πολυκύτταρους οργανισμούς, και μεταξύ άλλων, συμβάλλει στην οργάνωση, τη διαφοροποίηση και τη διαμερισματοποίηση των ιστών. Εντοπίζεται κάτω από τη βασική πλευρά κάθε επιθηλιακής στοιβάδας, καλύπτει το ενδοθηλιακό στρώμα προς το μέρος του συνδετικού ιστού, ενώ ακόμα έχει βρεθεί να περιβάλλει μυϊκά κύτταρα, κύτταρα του λιπώδους ιστού και κύτταρα Schwan, μια ειδική κατηγορία γλοιακών κυττάρων. Η βασική μεμβράνη διαχωρίζει τα κύτταρα από τον υποκείμενο ή περιβάλλοντα συνδετικό ιστό, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις τοποθετείται και μεταξύ δύο κυτταρικών στρωμάτων (π.χ. στις κυψελίδες των πνευμόνων και των αγγειωδών σπειραμάτων των νεφρών) δρώντας ως ειδικό φίλτρο για την ανεξέλεγκτη διέλευση ουσιών, ανάλογα με το μέγεθός τους (Timpl R and Brown JC, 1996, Liddington RC, 2001, Yurchenco PD and Patton BL, 2009). Ταυτόχρονα, μέσα στο πολύπλοκο

μακρομοριακό τους δίκτυο, παγιδεύουν μια πληθώρα αυξητικών παραγόντων και μορφογενετικών μορίων, έχουν τη δυνατότητα να κινητοποιούν σηματοδοτικούς μηχανισμούς που επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη, την μετακίνηση και την πολικότητα, ενώ ακόμα εμπλέκονται και στην επούλωση πληγών (Hood JD and Cheresch DA, 2002, Brukner-Tuderman L and Brukner P, 1998, Yurchenco PD and Patton BL, 2009).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση μιας τυπικής βασικής μεμβράνης κάτω από το επιθήλιο. Σημειώνονται οι διαφορετικές ζώνες (Lamina lucida, Lamina Densa, Sublamina densa), καθώς και μερικά από τα σημαντικότερα συστατικά που συναντώνται στις βασικές μεμβράνες (www.blisters.org.au/StructureofSkin.html).

Ενώ υπάρχει ομοιογένεια στη μακροσκοπική δομή της βασικής μεμβράνης, παρόλα αυτά, η μοριακή της σύσταση μπορεί να διαφέρει από ιστό σε ιστό ή ακόμα και από περιοχή σε περιοχή μέσα στον ίδιο ιστό. Το πάχος της κυμαίνεται μεταξύ 50 - 150 nm ανάλογα με τον ιστό. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στη βασική μεμβράνη διακρίνονται τρεις στιβάδες (Εικ.2). Μια σχετικά ηλεκτρονιοδιαπερατή στιβάδα, lamina lucida που γειτνιάζει με τη βασικοπλευρική μεριά των επιθηλιακών κυττάρων. Η ενδιάμεση στιβάδα είναι ηλεκτρονιοακά πυκνή, γνωστή ως lamina densa με πάχος ανάλογο με τον ιστό. Κάτω από τη lamina densa υπάρχει μια σχετικά ηλεκτρονιοακά διαπερατή στιβάδα, η lamina fibroreticularis ή sublamina densa, η οποία συγχωνεύεται με τον υποκείμενο συνδετικό ιστό και περιλαμβάνει ινώδεις δομές και πλάκες αγκυροβόλησης.



Εικόνα 2. Φωτογραφίες βασικής μεμβράνης από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αριστερα, εικόνα βασικής μεμβράνης από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, όπου διακρίνονται οι ζώνες της βασικής μεμβράνης (LL: lamina lucida, LD: lamina densa) και κομμάτι επιθηλιακού κυττάρου (e: epithelium). Δεξιά, εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, όπου διακρίνεται η βασική μεμβράνη (BM), σαν ένα “σεντόνι” μεταξύ επιθηλίου (Ep) και συνδετικού ιστού (CT)

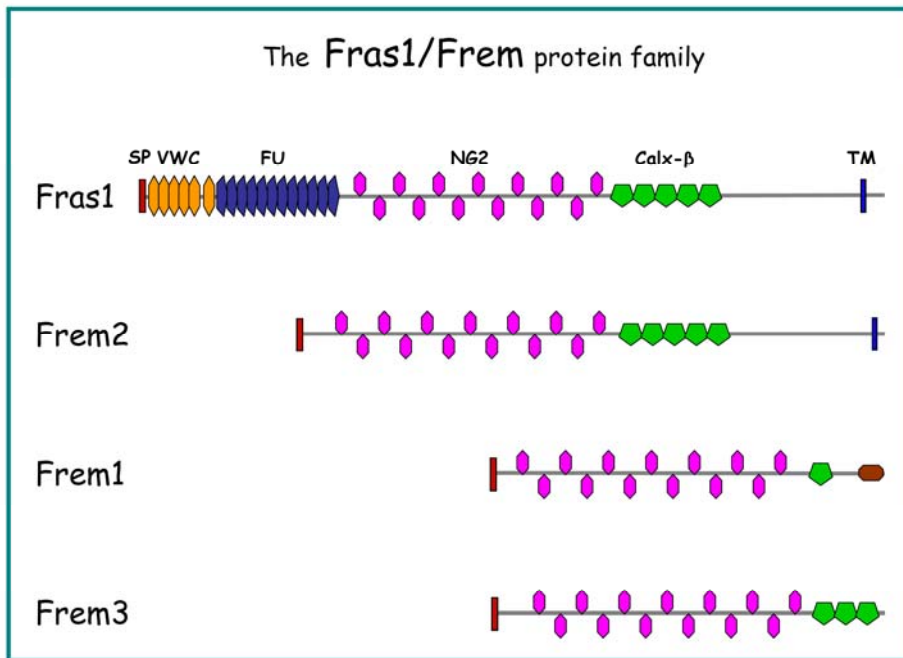
Τυπικά συστατικά της βασικής μεμβράνης (Εικ.1) αποτελούν οι λαμινίνες, τα νιδογόνα, το κολλαγόνο τύπου IV, οι πρωτεογλυκάνες και γενικά ένα πλήθος δομικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών συγκόλλησης (Miosge N, 2001).

1.3 Δομική ανάλυση των πρωτεϊνών *Fras1/Frem*

Το γονίδιο *Fras1* και τα ομόλογα του *Frem1*, *Frem2* και *Frem3*, κωδικοποιούν στον ποντικό, πρωτεΐνες που ανήκουν στον εξωκυττάριο χώρο και έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τα τελευταία χρόνια. Ορθόλογα γονίδια των παραπάνω συναντώνται αποκλειστικά και μόνο σε όλους τους δευτεροστόμιους οργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, στα θηλαστικά, όπως τον άνθρωπο που φέρει τα *FRAS1*, *FREM1*, *FREM2* και *FREM3*, στα ερπετά, στα πτηνά όπου δεν υπάρχει ομόλογο του *Frem3* και στον αχινό, ο οποίος φέρει το *ECM3* (extracellular matrix protein 3) που είναι ομόλογο του γονιδίου *Frem2*. Κύριο χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών της οικογένειας *Fras1/Frem* είναι

ότι παρουσιάζουν διάφορες χαρακτηριστικές περιοχές, που συναντώνται σε ποικίλες γνωστές πρωτεΐνες, με διαφορετικές λειτουργίες. Αποτελούνται από έναν μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων μοτίβων όπου λόγω των συχνών επαναλήψεων κάθε μοτίβου, μέσα σε κάθε μόριο δημιουργούνται ξεχωριστές ομάδες παρόμοιων μοτίβων.

Χαρακτηριστικά, το γονίδιο *Fras1* (Fraser syndrome protein 1), κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 4010 (χρωμόσωμα 5) και 4007 αμινοξέων (χρωμόσωμα 4q21), στον ποντικό και στον άνθρωπο αντίστοιχα. Η πρωτεΐνη *Fras1* που κωδικοποιείται από το εν λόγω γονίδιο, χαρακτηρίζεται από την παρουσία διαφορετικών πρωτεϊνικών περιοχών (Εικ.3), οι οποίες εντοπίζονται σε διάφορες κατηγορίες πρωτεϊνών ποικίλων οργανισμών, με ξεχωριστές λειτουργίες. Καθεμία από αυτές τις περιοχές εντοπίζεται σε κάποια άλλη πρωτεΐνη, ενώ μέχρι σήμερα δεν έχει παρατηρηθεί ο εντοπισμός όλων μαζί σε κάποιο γνωστό πρωτεϊνικό μόριο.



Εικόνα 3.
Σχηματική αναπαράσταση των δομών των Fras1/Frem πρωτεϊνών. Το πεπτιδιο-σινιάλο (SP) διατηρείται σε όλες τις πρωτεΐνες της Fras1/Frem οικογένειας. Επιπλέον, σε όλες υπάρχουν περιοχές πρόσδεσης ασβεστίου (Galx-β) και περιοχές ομολογίας με την NG2 πρωτεογλυκάνη θειικής χονδροϊτίνης. Διαμεμβρανική περιοχή (TM) συναντάμε στις πρωτεΐνες *Fras1* και *Frem2*, ενώ στη

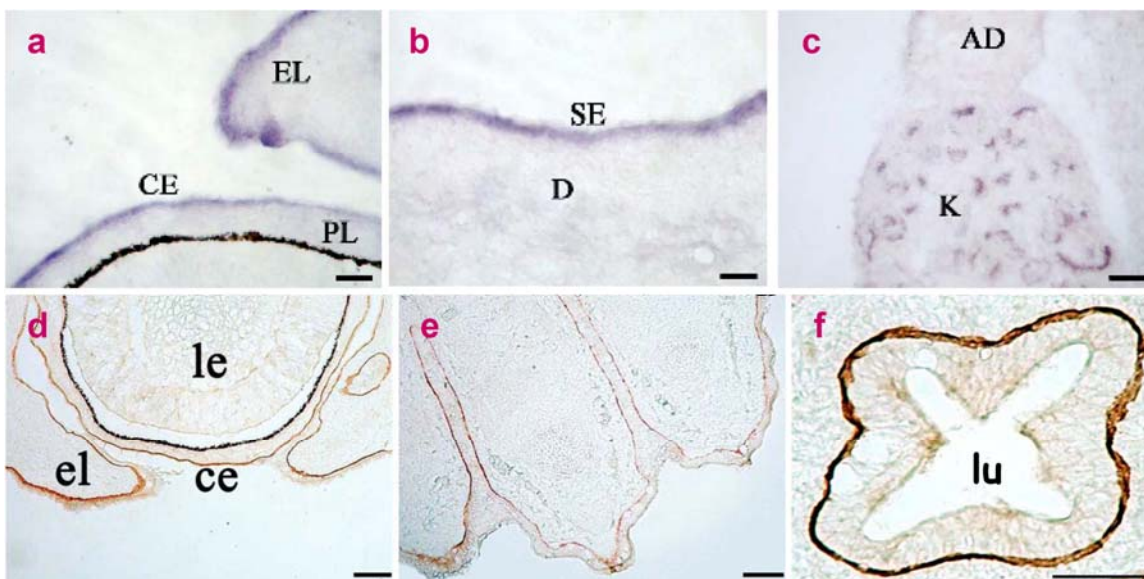
Frem1 ανιχνεύεται μια περιοχή ομολογίας με τις λεκτίνες τύπου C. Η πρωτεΐνη *Fras1* διαθέτει επίσης μια περιοχή με επαναλαμβανόμενα μοτίβα κυστεϊνών παρόμοια με αυτά της περιοχής C του παράγοντα von Willebrandt (VWC), καθώς επίσης και επαναλαμβανόμενα μοτίβα κυστεϊνής παρόμοια με αυτά των πρωτεασών φουρινών (FU).

Κοινά χαρακτηριστικά όλων των Fras1/Frem πρωτεϊνών (Εικ.3) είναι η παρουσία επαναλαμβανόμενων πρωτεϊνικών μοτίβων, ενώ διαφοροποίηση εντοπίζεται μόνο στον αριθμό των μοτίβων μεταξύ των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο όλες οι πρωτεΐνες φέρουν ένα πεπτίδιο σινιάλο για την είσοδό τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η δεύτερη κοινή περιοχή περιέχει επαναλαμβανόμενα πρωτεϊνικά μοτίβα χαρακτηριστικά της πρωτεογλυκάνης NG2 των θηλαστικών η οποία προσδένει θεϊκή χονδροϊτίνη (Nishiyama *et al.*, 1991). Μια ακόμα κοινή περιοχή μεταξύ των Fras1/Frem πρωτεϊνών, εντοπίζεται πιο καρβοξυτελικά, και περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενα μοτίβα Calx-β. Οι αλληλουχίες αυτές συναντώνται σε ιοντοανταλλάκτες Na⁺/Ca⁺⁺ (Na-Ca exchangers) της κατηγορίας των πρωτεϊνών NCX1, NCX3, στα θηλαστικά και στη δροσόφιλα έχουν χαρακτηριστεί ως θέσεις πρόσδεσης ασβεστίου (Schwarz EM and Benzer S, 1997).

Όσον αφορά τις διαφοροποιήσεις στη δομή, μεταξύ των πρωτεϊνών της οικογένειας, στην πρωτεΐνη Fras1 απαντώνται δύο διαφορετικές περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνες (Εικ.3). Συγκεκριμένα, ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο, το πεπτίδιο σινιάλο ακολουθεί η πρώτη πλούσια σε κυστεΐνες περιοχή, η οποία παρουσιάζει 6 επαναλαμβανόμενες πεπτιδικές αλληλουχίες, το μοτίβο των οποίων συναντάται σε διάφορες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας όπως η περιοχή C του παράγοντα Von Willebrand (VWC) (Sadler JE, 1998), η χορδίνη (Chordin), η πρωτεΐνη CRIM-1 (Cystein-Rich Motor Neuron 1 protein), τα Ινώδη Προκολλαγόνα I, II, III, V (fibrillar procollagens I, II, III, V), Θρομβοσπονδίνη 1 και 2 (Thrombospondin 1 and 2) και άλλες (Larrain *et al.*, 2000, Larrain *et al.*, 2001). Η δεύτερη πλούσια σε κυστεΐνες περιοχή, φέρει 13 επαναλαμβανόμενα πρωτεϊνικά μοτίβα, που εντοπίζονται στις πρωτεάσες της οικογένειας των Φουρινών (FU), τα οποία όμως δεν συμπίπτουν με την καταλυτική περιοχή των πρωτεασών αυτών (Roebroek AJM *et al.*, 1992). Ακόμα, τόσο η Fras1 όσο και η Frem2 πρωτεΐνη, φέρουν μια πιθανή διαμεμβρανική περιοχή στο καρβοξυτελικό τους άκρο, ενώ στην πρωτεΐνη Frem1 ανιχνεύεται και μια περιοχή που παρουσιάζει ομολογία με τις λεκτίνες τύπου C (Εικ.3).

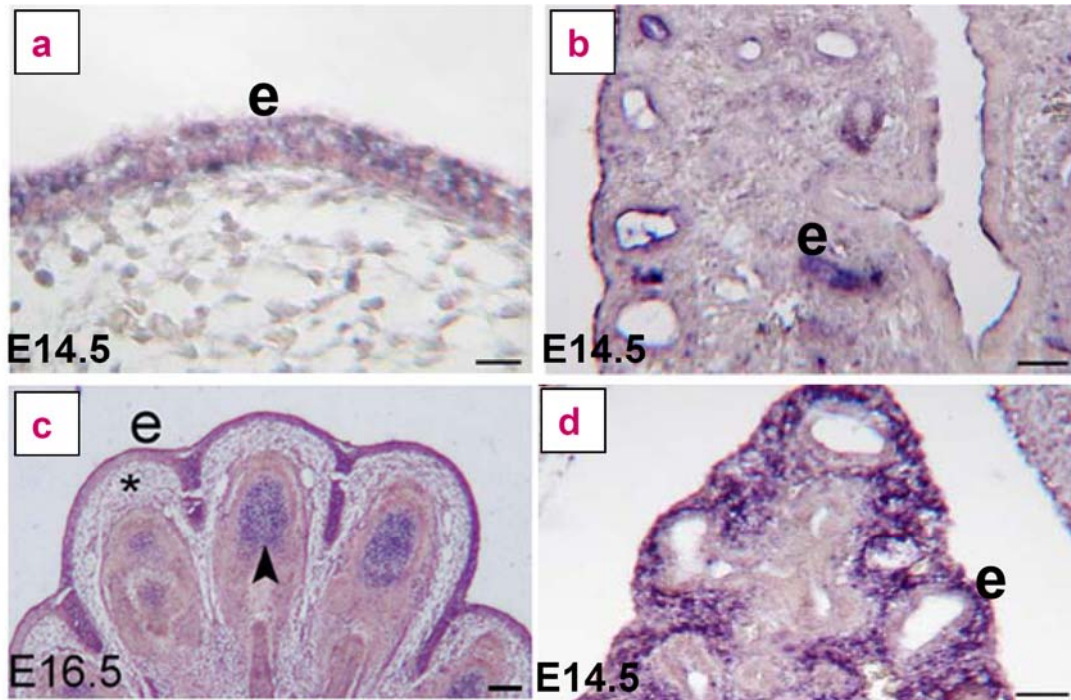
1.3 Έκφραση και εντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1/Frem

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Fras1/Frem εντοπίζονται στην εξωκυττάρια ύλη των επιθηλιακών κυττάρων και συγκεκριμένα στη βασική μεμβράνη, η οποία διαχωρίζει το επιθήλιο από τον υποκείμενο συνδετικό ιστό. Από πειράματα *in situ* υβριδοποίησης mRNA των γονιδίων *Fras1* και *Frem2*, έγινε γνωστό ότι τα γονίδια αυτά εκφράζονται από διάφορες κατηγορίες επιθηλιακών κυττάρων κατά την εμβρυογένεση. Το γονίδιο *Fras1* ανιχνεύεται ήδη από την εμβρυϊκή ημέρα 9.5 (E9.5) στα επιθήλια του εντέρου, της επιδερμίδας, τους σωμίτες στην περιοχή της ουράς, στο επιθήλιο του κερατοειδούς κ.α. (Εικ.4), ενώ παράλληλα μετάγραφα του *Fras1* έχουν εντοπιστεί και με Northern blot ανάλυση ήδη από την ημέρα 7.0 (Vrontou *et al.*, 2003). Επιπλέον, το Fras1 εκφράζεται και από μη καθορισμένους μέχρι τώρα κυτταρικούς τύπους στον εγκέφαλο εμβρύων αλλά και ενήλικων ποντικών, σε περιοχές όπως ο νεοφλοιός, ο ιππόκαμπος και οι αμυγδαλοειδείς πυρήνες.



Εικόνα 4. Έκφραση του *Fras1* και εντοπισμός της πρωτεΐνης σε διάφορα επιθήλια κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του ποντικού. *Fras1* mRNA *in situ* στο βλέφαρο (EL) και στον κερατοειδή χιτώνα (CE) του ματιού (a), επιδερμικό επιθήλιο (SE) (b), νεφρό (K) και επινεφρίδιο (AD) (c). Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στις βασικές μεμβράνες του βλεφάρου (el) και του κερατοειδούς χιτώνα (ce) στο στάδιο E14.5 (d), στο επιδερμικό επιθήλιο των άκρων την E16.5 (e), και στο επιθήλιο του εντέρου την E16.5 (f) (Vrontou *et al.*, 2003).

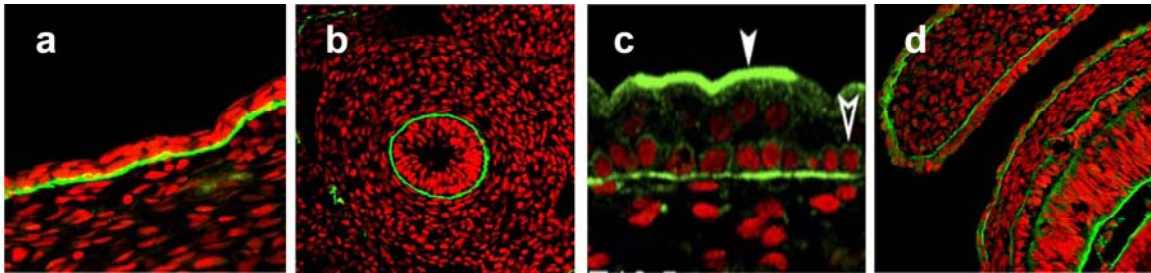
Παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με αυτό του *Fras1*, ακολουθεί και το γονίδιο *Frem2* (Εικ.5a-b), ενώ τα γονίδια *Frem1* (Εικ.5c-d) και *Frem3* φαίνεται να έχουν επιπλέον της επιθηλιακής και μεσεγχυματική προέλευση, με το *Frem1* να παρουσιάζει ιδιαίτερα δυναμική έκφραση κατά την εμβρυογένεση σε περιοχές επιθηλιακών-μεσεγχυματικών αλληλεπιδράσεων (Petrou *et al.*, 2007).



Εικόνα 5. Εντοπισμός mRNA *in situ* των *Frem1* και *Frem2* σε εμβρυϊκά επιθήλια ποντικού. (a) Εντοπισμός *Frem2* σε επιδερμικό επιθήλιο την E14.5. **(b)** Εντοπισμός *Frem2* στα επιθήλια των αεροφόρων αγωγών στον πνεύμονα την E14.5. **(c)** Εντοπισμός *Frem1* τόσο σε επιθηλιακά όσο και σε μεσεγχυματικά κύτταρα στα άκρα, την E16.5. **(d)** Εντοπισμός *Frem1* σε επιθηλιακά και σε μεσεγχυματικά κύτταρα στον αναπτυσσόμενο πνεύμονα την E14.5. (e: epithelium) (Petrou *et al.*, 2007).

Η ταυτοποίηση του προτύπου εναπόθεσης των πρωτεϊνών *Fras1/Frem* προέκυψε από πειράματα ανοσοϊστοχημείας, όπου διαπιστώθηκε η συν-ανίχνευσή τους υπό τη μορφή ενός γραμμικού προτύπου χρώσης στον εξωκυττάριο χώρο που υπόκειται της βασικής πλευράς όλων σχεδόν των αναπτυσσόμενων επιθηλίων (Εικ. 6) (Chiotaki *et al.*, 2007). Ενδεικτικά αναφέρονται τα επιθήλια της επιδερμίδας, του κερατοειδούς χιτώνα, των βλεφάρων, των άκρων, των νεφρών και των νεφρικών σωληναρίων και

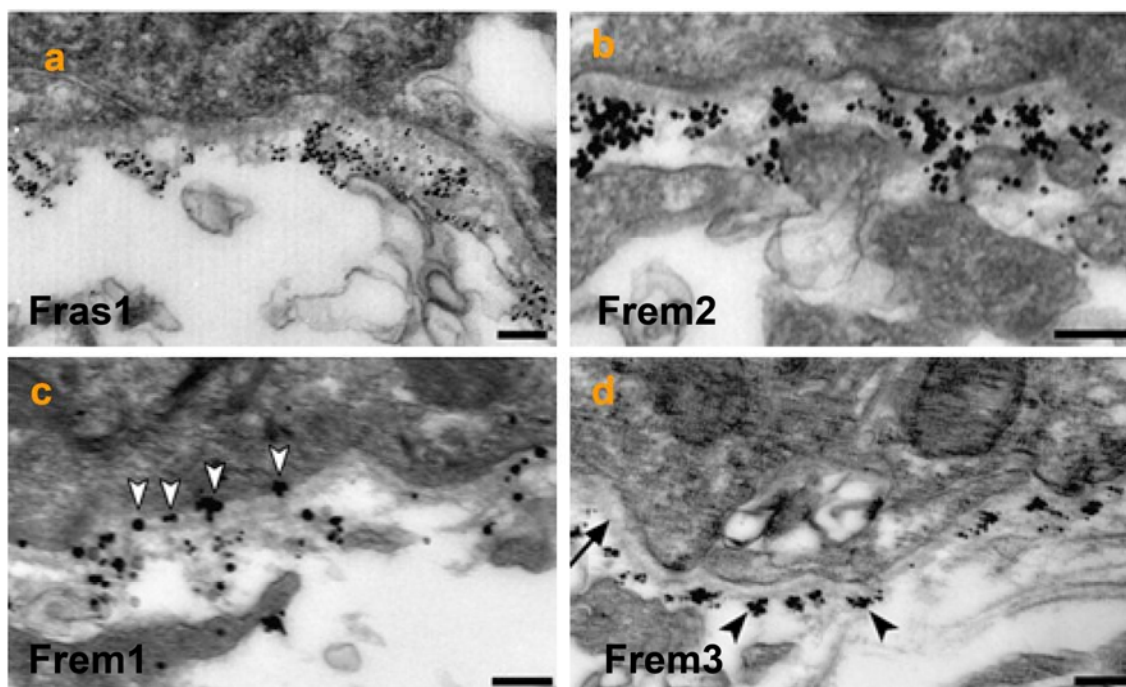
σπειραμάτων, του χοριοειδούς πλέγματος (Vrontou *et al.* 2003 , Petrou *et al.*, 2007a , Chiotaki *et al.*, 2007) καθώς επίσης και τα μεσοθήλια όπως εκείνα που περιβάλλουν το έντερο και τον πνεύμονα (Chiotaki *et al.*, 2007). Επιπλέον, η πρωτεΐνη Frem1 έχει βρεθεί να εντοπίζεται κατά την ανάπτυξη, ενδοκυτταρικά σε περιδερμικά κύτταρα (Εικ.6c) όπως επίσης και σε επιθηλιακά κύτταρα στην βάση του αναπτυσσόμενου τριχοθηλακίου αλλά και στην βασική του μεμβράνη (Petrou *et al.*, 2007a).



Εικόνα 6. Εντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1/Frem σε βασικές μεμβράνες εμβρυϊκών επιθηλίων ποντικού. (a) Εντοπισμός Fras1 στη βασική μεμβράνη του επιδερμικού επιθηλίου την E14.5. **(b)** Εντοπισμός Frem2 στη βασική μεμβράνη του επιθηλίου του εντέρου την E14.5. **(c)** Εντοπισμός Frem1 τόσο στη βασική μεμβράνη του επιδερμικού επιθηλίου, όσο και σε περιδερμικά κύτταρα, την E16.5. **(d)** Εντοπισμός Frem3 σε βασικές μεμβράνες στο μάτι την E14.5 (Petrou *et al.*, 2006, Chiotaki *et al.*, 2007).

1.4 Ακριβής εντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1/Frem στη βασική μεμβράνη, με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης

Ο χωροταξικός εντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1/Frem στον εξωκυττάριο χώρο και η ταυτοποίηση της ακριβούς θέσης των πρωτεϊνών με διακριτικότητα νανομέτρων, στη βασική μεμβράνη διαφόρων εμβρυϊκών επιθηλίων, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM) (Εικ.7). Έτσι οι πρωτεΐνες Fras1/Frem βρέθηκε ότι εντοπίζονται στην sublamina densa της βασικής μεμβράνης επιθηλιακών δομών κατά την εμβρυογένεση (Petrou *et al.*, 2007a). Στις φωτογραφίες του TEM, οι κόκκοι χρυσού/αργύρου φαίνεται να σχηματίζουν κουκίδες, στη βασική μεμβράνη, οι οποίες ξεκινούν από την lamina densa και καταλήγουν σε μεσεγχυματικά κύτταρα και δομές τις δερμίδας.



Εικόνα 7. Συγκριτική ανάλυση του εντοπισμού των *Fras1/Frem* πρωτεϊνών με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης. Οι εικόνες είναι από εμβρυϊκό ραχιαίο δέρμα και οι πρωτεΐνες *Fras1/Frem* εντοπίζονται ως μαύρες κουκκίδες (συσσωματόματα-χρυσού/ αργύρου) στην περιοχή της sublamina densa. (Κλίμακα, 200 nm) (Petrou *et al.*, 2007).

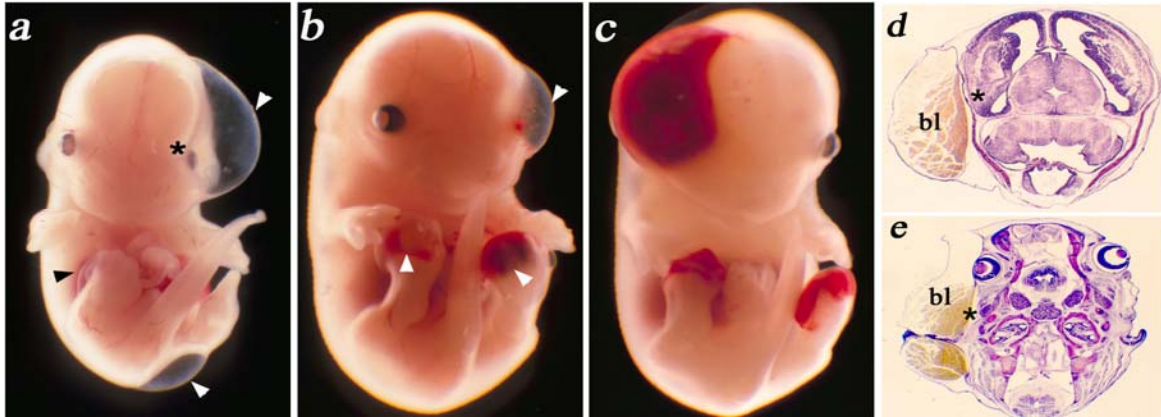
1.5 Απενεργοποίηση των γονιδίων *Fras1*, *Frem1* και *Frem2* στον ποντικό

Μια σημαντική προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη του βιολογικού ρόλου των γονιδίων *Fras1/Frem* στον ποντικό, ήταν η απενεργοποίησή τους. Το γονίδιο *Fras1* ήταν το πρώτο που απενεργοποιήθηκε στον ποντικό με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού. Με την μέθοδο αυτή, εισήχθη στο ενδογενές γονίδιο του *Fras1*, στην περιοχή που κωδικοποιεί το αμινοτελικό άκρο, μια κατασκευή DNA που περιέχει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης και το γονίδιο που προσφέρει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό νεομυκίνη (*LacZ/Neo*) (εικ. 5) (Vrontou *et al.*, 2003). Με την κατασκευή αυτή προκαλείται η απενεργοποίηση του γονιδίου, εξαιτίας πρόωρου τερματισμού της μετάφρασης του παραγόμενου μεταγράφου του *Fras1*. Μετά την απενεργοποίηση του *Fras1* στον ποντικό ακολούθησαν και τα knockout των *Frem1* και *Frem2* (Kiyozumi *et al.*, 2006, Jadeja *et al.*, 2005).

Η στοχευμένη απενεργοποίηση των γονιδίων *Fras1*, *Frem1* και *Frem2* και η επακόλουθη δημιουργία ομόζυγων μεταλλάγματων, επέτρεψε την αναλυτική μελέτη του φαινοτύπου, όπου όπως έγινε εμφανές ήταν πανομοιότυπος σε όλα τα μεταλλάγματα. Ενδεικτικά, όσον αφορά τα *Fras1*^{-/-} ποντίκια, ο φαινότυπος αναλύθηκε σε δυο διαφορετικά στελέχη, όπου τα ετερόζυγα άτομα δεν παρουσιάζουν φαινότυπο ενώ τα ομόζυγα του στελέχους C57BL/10 πεθαίνουν κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη μεταξύ E13.5 και E16.5. Ένα μικρό ποσοστό ομοζυγών (περίπου 50%) του NMRI στελέχους είναι βιώσιμο, οδηγείται στην ενηλικίωση και έχει τη δυνατότητα να διασταυρωθεί και να δώσει απογόνους (Vrontou *et al.*, 2003).

Ένα από τα βασικότερα κοινά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν τα *Fras1*^{-/-}, *Frem1*^{-/-}, και *Frem2*^{-/-} έμβρυα, είναι η δημιουργία μεγάλων υπό-επιδερμικών φυσαλίδων (Εικ.8) (Vrontou *et al.*, 2003). Η έναρξη του συγκεκριμένου φαινοτύπου τοποθετείται την εμβρυϊκή μέρα 12.5 ως διαφανείς φυσαλίδες, οι οποίες στα *Fras1*^{-/-} και *Frem2*^{-/-} ποντίκια, προοδευτικά γεμίζουν με αίμα και παρουσιάζονται στο κεφάλι στην περιοχή των ματιών και αρκετά συχνά στο ακραίο τμήμα των άκρων, ενώ ακόμα έχουν παρατηρηθεί και στην ράχη των ομόζυγων μεταλλάγματων (Εικ.8) (Vrontou *et al.*, 2003, Jadeja *et al.*, 2005). Οι φυσαλίδες αυτές αρχικά είναι γεμάτες από πλάσμα, ενώ στη συνέχεια γίνονται κόκκινες εξαιτίας της εισροής ερυθρών αιμοσφαιρίων, όπως παρατηρήθηκε και σε ιστολογικές τομές (Εικ.9B) (Vrontou *et al.*, 2003). Τελικά τα έμβρυα αυτά πεθαίνουν μέχρι την εμβρυϊκή μέρα 16.5, ενώ μέχρι σήμερα δεν έχει δειχθεί η δημιουργία νέων φυσαλίδων μετά τη γέννηση των μεταλλάγματων, υποδηλώνοντας ότι οι συγκεκριμένες παραμορφώσεις αναπτύσσονται μόνο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι στα *Frem1*^{-/-} έμβρυα, επίσης δημιουργείται φυσαλίδα, ωστόσο η αποκόλληση δεν συνοδεύεται από αιμορραγία ή εμβρυϊκό θάνατο (Smyth *et al.*, 2004). Σημαντικό είναι ακόμα να αναφερθεί ότι, αντίθετα με ότι συμβαίνει σε άλλες δερματικές ασθένειες, όπως η πομφολυγώδης επιδερμόλυση που θα συζητηθεί παρακάτω, ο φαινότυπος των *Fras1*, *Frem1* και *Frem2* μεταλλαγμένων εμβρύων, αποτελεί τη μοναδική ξεκάθαρη περίπτωση επιδερμικής αποκόλλησης και δημιουργίας φυσαλίδων αποκλειστικά και μόνο στην εμβρυϊκή ηλικία, μέσα στη μήτρα όπου οι τριβές είναι ελάχιστες. Από την άλλη μεριά,

ουδέποτε παρατηρήθηκαν φυσαλίδες ή άλλου είδους επιδερμικές διαταραχές σε ενήλικα *Fras1*^{-/-} ποντίκια.

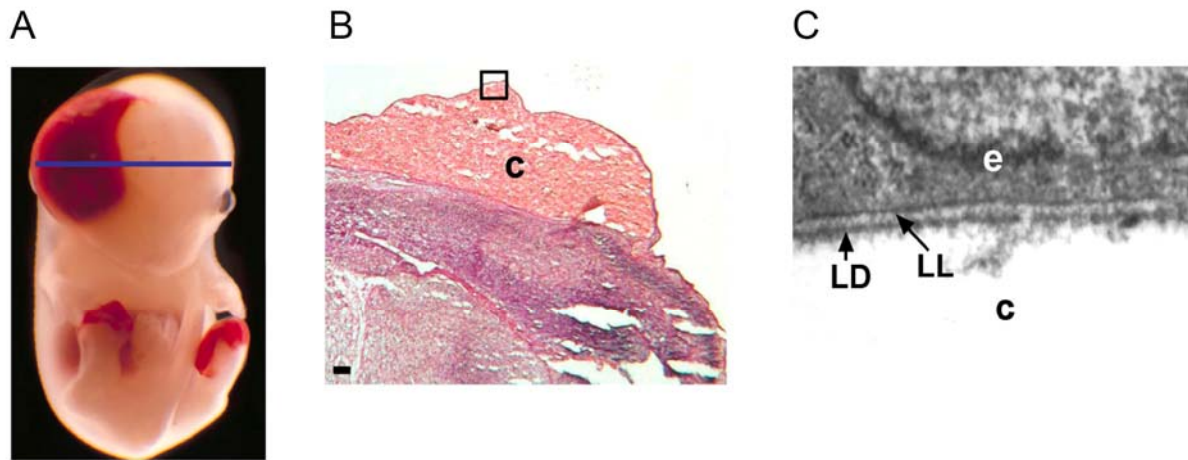


Εικόνα 8. Δημιουργία και εξέλιξη φυσαλίδων σε *Fras1*^{-/-} έμβρυα ποντικού. (a) *Fras1*^{-/-} έμβρυο σταδίου E12.5, με τρεις διαφανείς φυσαλίδες στην περιοχή του ματιού, στο δεξί κάτω άκρο και χαμηλά στην πίσω πλευρά όπως υποδεικνύουν τα βέλη. (b) Κατά την εμβρυϊκή μέρα 13.5, οι φυσαλίδες ξεκινούν να γίνονται αιμορραγικές. (c) Φυσαλίδες γεμάτες με αίμα στην περιοχή του ματιού και στα άκρα, ενός *Fras1*^{-/-} εμβρύου E14.5. (d-e) Ιστολογική ανάλυση φυσαλίδας (bl) στην περιοχή της κεφαλής όπου φαίνεται ότι οι δομές από κάτω (μάτι-εγκέφαλος) αναπτύσσονται κανονικά (Vrontou *et al.*, 2003).

Η απώλεια της *Fras1* από την βασική μεμβράνη της επιδερμίδας φαίνεται ότι εξασθενεί τη σύνδεση της επιδερμίδας με την υποκείμενη δερμίδα με αποτέλεσμα την εισχώρηση υγρού (πλάσματος) μεταξύ τους και την δημιουργία φυσαλίδας. Παρόλα αυτά, η έλλειψη της πρωτεΐνης *Fras1* δεν φαίνεται να προκαλεί δομικές διαταραχές στην βασική μεμβράνη καθώς σε πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης σε τομές επιδερμίδας αγρίου τύπου και *Fras1*^{-/-} εμβρύων, παρατηρήθηκε η διατήρηση των ζωνών lamina lucida και lamina densa (Εικ. 9C) (Vrontou *et al.*, 2003). Παράλληλα, πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην κορυφή της φυσαλίδας, όπου και παρατηρείται η μέγιστη αποκόλληση της επιδερμίδας από το χόριο της δερμίδας, έδειξαν ότι η βασική μεμβράνη και συγκεκριμένα οι ζώνες lamina lucida/lamina densa ακολουθεί το αποσχισμένο επιδερμικό επιθήλιο.

Αυτό οδήγησε στη διαπίστωση πώς το επίπεδο αποκόλλησης του ιστού συμβαίνει στην sub-lamina densa της βασικής μεμβράνης του επιθηλίου, στην περιοχή δηλαδή που εντοπίζονται οι *Fras1*/*Frem* πρωτεΐνες (Vrontou *et al.*, 2003). Αργότερα εισχωρούν ερυθρά αιμοσφαίρια ως φυσικό επακόλουθο της χαλάρωσης των τριχοειδών

απολήξεων στο σημείο όπου δημιουργείται η φυσαλίδα και αυτή μετατρέπεται σε αιμορραγική (Vrontou *et al.*, 2003).

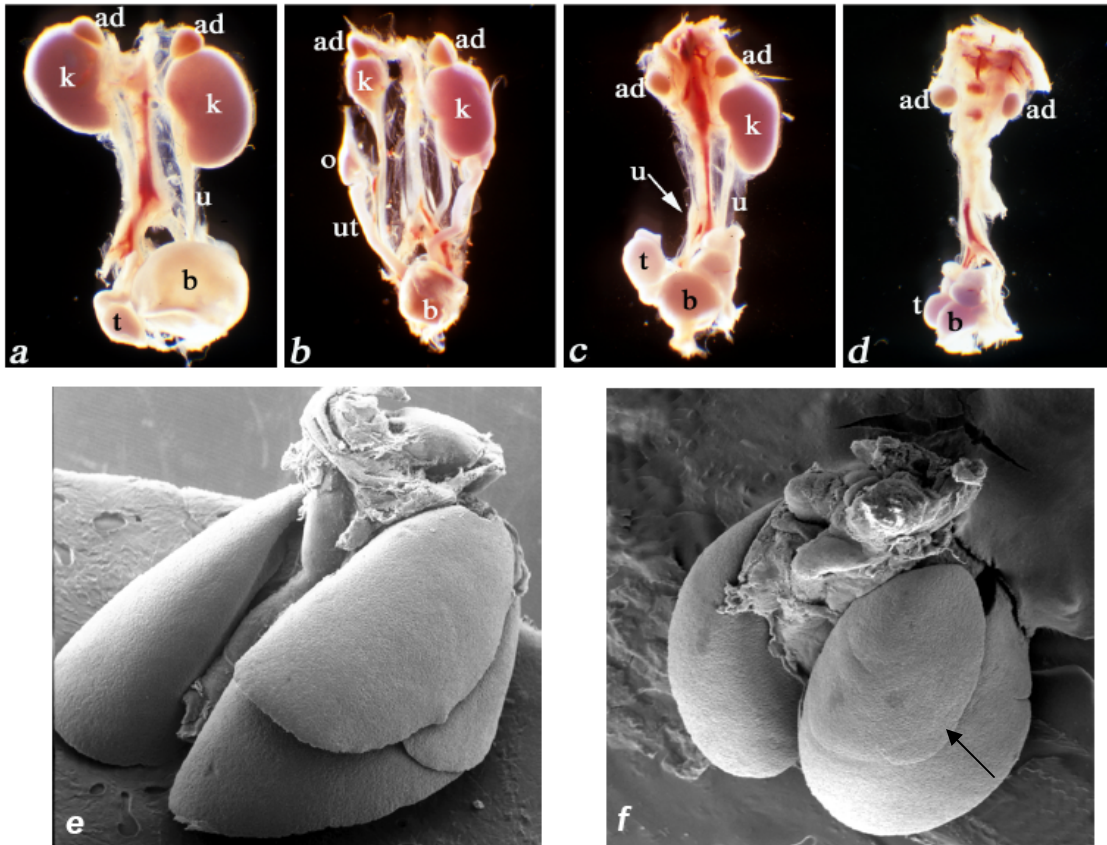


Εικόνα 9. Στην εικόνα (A) φαίνεται έμβρυο με αιμορραγικές φυσαλίδες στην περιοχή του ματιού και στα άκρα. Η μπλε γραμμή δηλώνει το επίπεδο της ιστολογικής ανάλυσης της εικόνας (B), και είναι η περιοχή όπου έχει συμβεί η μέγιστη αποκόλληση. Στην εικόνα (C) φαίνεται φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, από δέρμα *Fras1*^{-/-} εμβρύου, όπου δεν παρατηρούνται διαταραχές στις ζώνες της βασικής μεμβράνης.

Στον πνεύμονα των ομόζυγων μεταλλαγμάτων, η απουσία της *Fras1* οδηγεί σε συγχωνευμένους πνευμονικούς λοβούς στον δεξιό πνεύμονα, ως αποτέλεσμα του ατελούς διαχωρισμού τους κατά την ανάπτυξη (Eικ.10e-f) (Petrou *et al.*, 2005). Επιπλέον, παρατηρήθηκε αποδιοργάνωση των τριχοειδών αγγείων στις κυψελίδες με αποτέλεσμα τη εξαγγείωση και τη διάχυση αίματος στους αεροφόρους αγωγούς στα τελευταία στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (Petrou *et al.*, 2005). Σε αγρίου τύπου ποντίκια τα τριχοειδή αγγεία δεν περνούν πέρα από το όριο της βασικής μεμβράνης, η οποία, υπό φυσιολογικές συνθήκες, λειτουργεί ως φυσικός φραγμός.

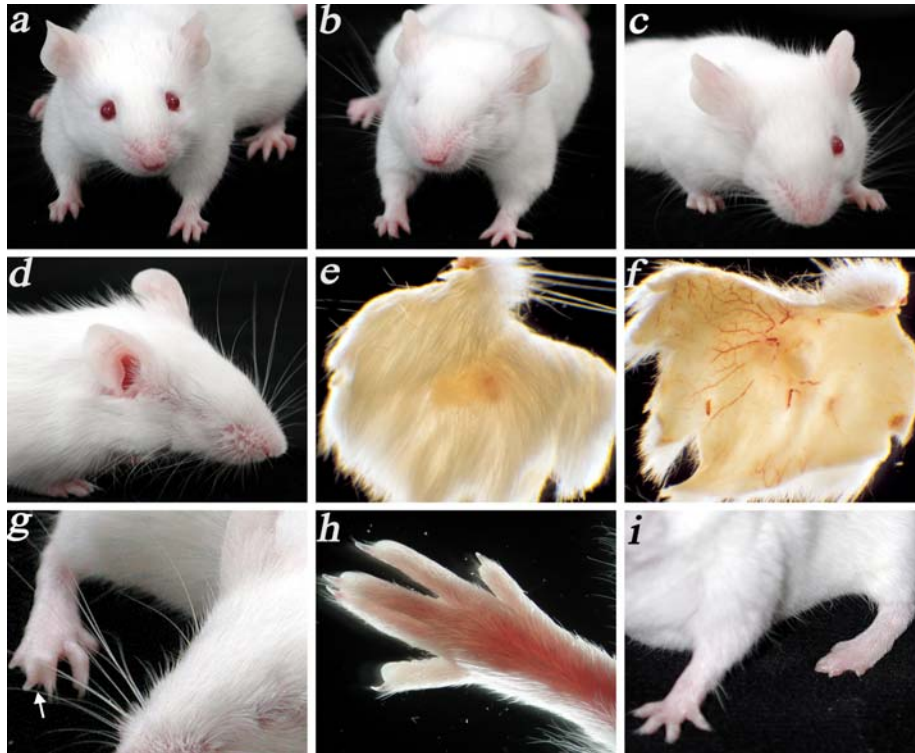
Από την ιστολογική ανάλυση των *Fras1*^{-/-} εμβρύων και των δυο στελεχών που μελετήθηκαν, διαπιστώθηκε μονόπλευρη ή αμφίπλευρη νεφρική αγενεσία, ή δυσπλασία (Vrontou *et al.*, 2003). Η μελέτη νεογέννητων *Fras1*^{-/-} ποντικών οδήγησε ακόμα στον εντοπισμό μονόπλευρης νεφρικής αγενεσίας, με παρουσία όμως των δομών του ουρητήρα αμφίπλευρα, κάτι το οποίο υποδηλώνει πως με την απενεργοποίηση του γονιδίου *Fras1* δεν επηρεάζεται η ανάπτυξη του μετανεφρού στο στάδιο της έκφυσης του

ουρητήρα, αντίθετα διαταράσσεται κάποια από τις μετέπειτα επιθήλιο-μεσεγγυματικές αλληλεπιδράσεις (Εικ 10a-d) (Kuure *et al.*, 2000).



Εικόνα 10. (a-d) Ουρογεννητικό σύστημα αγρίου τύπου (a) και *Fras1^{-/-}* αρσενικών ποντικών, την ημέρα της γέννησης, όπου διακρίνονται οι διάφορες διαταραχές που παρουσιάζονται (ad: επινεφρίδια, k: νεφρά, t: όρχεις, b: ουροδόχος κύστη, u: ουρητήρας) (b-d). (e-f) Πνεύμονες από έμβρυα E18.5. Η φωτογραφία (e), είναι από έμβρυο αγρίου τύπου, ενώ η (f) από *Fras1^{-/-}* έμβρυο. Στη φωτογραφία (f), φαίνεται ξεκάθαρα η συγχώνευση των λοβών στον δεξιό πνεύμονα (Vrontou *et al.*, 2003, Petrou *et al.*, 2005).

Τα εξωτερικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ενήλικων *Fras1^{-/-}* ποντικών του στελέχους NMRI, περιλαμβάνουν συγχωνεύσεις στην περιοχή των βλεφάρων και στα άκρα με αποτέλεσμα την εμφάνιση κρυπτοφθαλμίας, στο ένα (ποσοστό 70%) ή και στα δύο (ποσοστό 30%) μάτια, ενώ το 80% των ενηλίκων χαρακτηρίζεται και από συγχωνεύσεις των δακτύλων σε κάποια από τα άκρα (συνδακτυλίες) (Vrontou *et al.*, 2003).

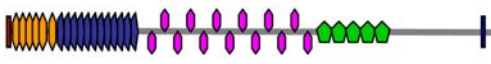
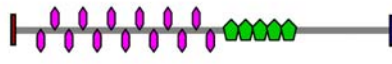
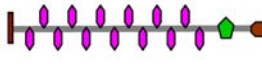
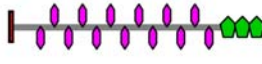


Εικόνα 11. Εμφάνιση κρυπτοφθαλμίας και συνδακτυλίας σε *Fras1*^{-/-} ενήλικα ποντίκια του στελέχους NMRI . (a) Φυσιολογικό ποντίκι. (b-d) Ποντίκια με αμφίπλευρη (b) ή μονόπλευρη (c-d) κρυπτοφθαλμία. (e-f) Εικόνες δέρματος από την περιοχή του ματιού, από ποντίκια που πάσχουν από κρυπτοφθαλμία. Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει καθόλου βλεφαρική σχισμή. (g-i) Ποντίκια με συνδακτυλίες.

1.6 Οι μεταλλαγές ‘bleb’ στον ποντικό

Μεταλλαγές των γονιδίων που κωδικοποιούν τις *Fras1*/*Frem* πρωτεΐνες, έχουν βρεθεί σε μια κατηγορία μεταλλαγών στον ποντικό, που ονομάζονται ‘bleb’. Τα μεταλλάγματα ‘bleb’ (Green MC, 1989), παρουσιάζουν παρόμοια φαινοτυπικά γνωρίσματα, που χαρακτηρίζονται από την παρουσία υπο-επιδερμικών φυσαλίδων κατά τη διάρκεια της εμβρυογέννησης. Η κληρονομηση των μεταλλαγών αυτών είναι υπολειπόμενη, ενώ παρουσιάζει μεγάλη διεισδυτικότητα και εκφραστικότητα. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί στον ποντικό 5 μεταλλαγές ‘bleb’ (Εικ.12), οι οποίες χαρακτηρίζονται πάντα από τη δημιουργία φυσαλίδων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, στην περιοχή των ματιών και στα άκρα, καθώς και από την εμφάνιση κρυπτοφθαλμίας

και συνδακτυλίας. Οι υπό συζήτηση μεταλλάξεις είναι οι ακόλουθες: 1) η *blebbed* (*bl*), 2) η *eye-blebs* (*eb*), 3) η *head-bleb* (*hb*), 4) η *myelencephalic-bleb* (*my*) και 5) η *fetal-hematoma* (*fh*). Οι τέσσερις πρώτες έχουν χαρτογραφηθεί σε διαφορετικά χρωμοσώματα, ενώ η τελευταία δεν έχει χαρτογραφηθεί ακόμα.

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

Εικόνα 12. Γενετική των *Fras1/Frem* πρωτεϊνών. Παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες της οικογένειας *Fras1/Frem*, Η χρωμοσωμική θέση των γονιδίων στον ποντικό και στον άνθρωπο και οι αντίστοιχες μεταλλάξεις ‘bleb’. Η *Frem3* πρωτεΐνη είναι η μόνη που δεν έχει συσχετιστεί μέχρι σήμερα με καμία μεταλλαγή ‘bleb’, παρόλα αυτά ενδέχεται να συσχετίζεται με τον φαινότυπο *fetal hematoma* (*fh*).

Τα υπεύθυνα γονίδια για τέσσερις από τους παραπάνω φαινοτύπους έχουν ήδη ταυτοποιηθεί (Εικ.12). Το γονίδιο *Fras1* έχει συνδεθεί με τον φαινότυπο *blebbed*. Καθώς τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των *Fras1*^{-/-} και των ‘bleb’ ποντικών είναι ταυτόσημα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αλληλουχίας του *Fras1* από ‘bleb’ μεταλλάγματα και δείχθηκε η ύπαρξη ενός πρόωρου κωδικωνίου τερματισμού, το οποίο οδηγεί στην

απομάκρυνση 1810 αμινοξέων από το C-τελικό άκρο της Fras1 πρωτεΐνης (Vrontou *et al.*, 2003, Mc Gregor *et al.*, 2003). Παράλληλα διαπιστώθηκε απουσία εντοπισμού της πρωτεΐνης Fras1 σε ομόζυγα ‘blebbed’ μεταλλάγματα (Vrontou *et al.*, 2003). Ακολούθως, το γονίδιο *Frem1* (*Fras1*-related extracellular matrix gene) συσχετίστηκε με το φαινότυπο head-blebs (Smyth *et al.*, 2004), ο φαινότυπος myelencephalic-blebs αποδόθηκε στο γονίδιο *Frem2* (Jadeja *et al.*, 2005) και τέλος, η μεταλλαγή eye-blebs στο γονίδιο *Grip1* (Takamiya *et al.*, 2004).

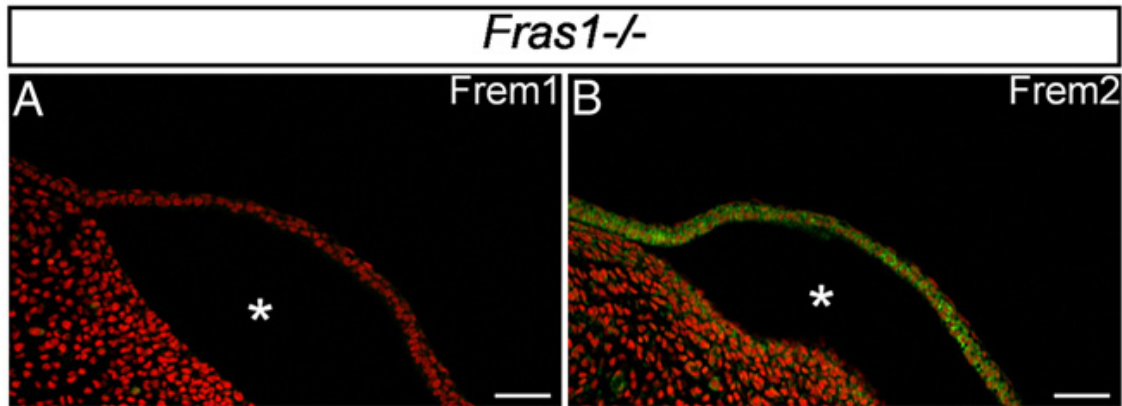
Η Grip1 (Glutamate Receptor Interacting Protein 1) είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη η οποία φέρει εφτά PDZ περιοχές των 80-90 αμινοξέων. Οι περιοχές αυτές, έχουν την δυνατότητα να αναγνωρίζουν μικρές πεπτιδικές αλληλουχίες στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν, ενώ μπορούν και να ετεροδιμερίζονται με PDZ περιοχές άλλων πρωτεϊνών (Brennan *et al.*, 1996, Hiller *et al.*, 1999). Με βάση τα αποτελέσματα από *in vitro* πειράματα, η Grip1 πρωτεΐνη, η οποία βρίσκεται προσκολλημένη πάνω σε οργάνδια του εκκριτικού μονοπατιού, παρουσιάζει την ικανότητα να αλληλεπιδρά φυσικά με την Fras1 και ειδικότερα φαίνεται να απαιτείται αναγνωρίζει τα 4 τελευταία C-τελικά της αμινοξέα (Takamiya *et al.*, 2004). Η Grip1 φαίνεται να συμμετέχει στη στοχευμένη μεταφορά των εκκριτικών κυστιδίων που μεταφέρουν τη Fras1 στη βασικοπλευρική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων (Takamiya *et al.*, 2004). Η αλληλεπίδραση της Grip1 με τις Fras1 και Frem2 είναι απαραίτητη για την στοχευμένη έξοδο αυτών από το κύτταρο και το σωστό εντοπισμό τους στη βασική περιοχή των επιθηλιακών κυττάρων. Στα ποντίκια όπου η Grip1 έχει απενεργοποιηθεί, οι Fras1 και Frem2 δεν οδηγούνται εκτός του κυττάρου, με αποτέλεσμα ο φαινότυπος των *Grip1^{-/-}* ποντικών να είναι παρόμοιος με το φαινότυπο των *Fras1^{-/-}* και *Frem2^{-/-}* (Kiyozumi *et al.*, 2006).

1.7 Οι πρωτεΐνες Fras1/Frem δημιουργούν ένα αλληλοεξαρτώμενο σύμπλοκο στη βασική μεμβράνη των επιθηλίων

Δεδομένου, λοιπόν ότι οι 5 παραπάνω ‘bleb’ μεταλλαγές στον ποντικό εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα και οι γενετικές βλάβες των αντίστοιχων

επιμέρους γονιδίων δίνουν παρόμοιους φαινοτύπους, διαφαίνεται ότι τα πέντε αυτά γονιδιακά προϊόντα, βρίσκονται σε μια λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Η παραπάνω υπόθεση φαίνεται να ενισχύεται και από πειράματα ανοσοεντοπισμού των πρωτεϊνών με τη χρήση μεταλλαγμάτων μεταλλαγμάτων *Frem1^{-/-}*, *Frem2^{-/-}* (Kiyozumi *et al.*, 2006) και *Fras1^{-/-}* (Petrou *et al.*, 2007).

Στην τελευταία περίπτωση, που παρουσιάζεται και στη Εικ.13 παρατηρήθηκε απουσία των πρωτεϊνών *Frem1* και *Frem2* από κάθε βασική μεμβράνη των *Fras1^{-/-}* εμβρύων. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η πρωτεΐνη *Frem2* η οποία στην περιοχή δημιουργίας της φουσαλίδας, ενώ απουσιάζει από τη βασική μεμβράνη ωστόσο εξακολουθεί να εντοπίζεται ενδοκυτταρικά στα κύτταρα του αποκολλημένου επιθηλίου (Petrou *et al.*, 2007).

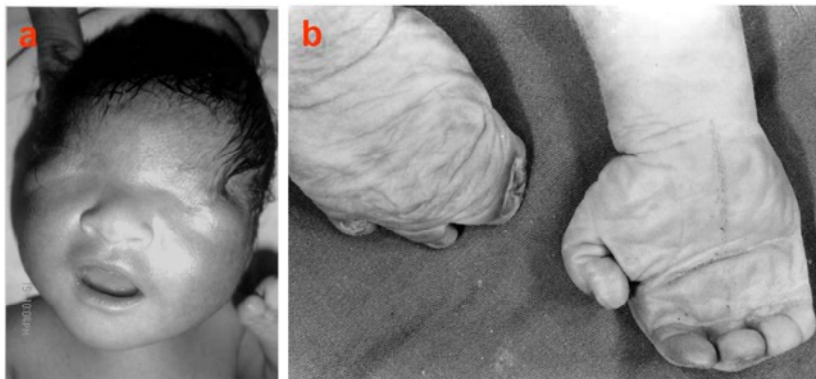


Εικόνα 13. Εντοπισμός των πρωτεϊνών *Frem1/Frem2* στη βασική μεμβράνη του αποσχισμένου εμβρυϊκού επιθηλίου σε *Fras1^{-/-}* έμβρυα ποντικού. (a) Απουσία της πρωτεΐνης *Frem1* από τη βασική μεμβράνη του επιδερμικού επιθηλίου την E14.5. (b) Απουσία της πρωτεΐνης *Frem2* από τη βασική μεμβράνη και εντοπισμός της ενδοκυτταρικά στα κύτταρα του αποκολλημένου επιθηλίου, την E14.5. Με αστερίσκο σημειώνεται η φουσκάλα. (Κλίμακα, 20 μm) (Petrou *et al.*, 2007).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις οι οποίες ενισχύθηκαν και από βιοχημικά πειράματα (Kiyozumi *et al.*, 2006) αποτελούν ενδείξεις ότι οι πρωτεΐνες *Fras1/Frem* δημιουργούν ένα μακρομοριακό σύμπλοκο στη βασική μεμβράνη των εμβρυϊκών επιθηλίων στο οποίο οι *Fras1/Frem* αλληλοσυνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε όλες να είναι απαραίτητες για τη συγκρότησή του.

1.8 Μεταλλαγές των γονιδίων FRAS1 και FREM2 προκαλούν το σύνδρομο Fraser στον άνθρωπο

Το σύνδρομο Fraser στον άνθρωπο είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη γενετική ασθένεια, η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλη γενετική ετερογένεια όπως διαπιστώθηκε έπειτα από μελέτες σε ασθενείς οι οποίοι παρουσίαζαν μεγάλη ποικιλομορφία στην κλινική τους εικόνα (Fraser GR, 1962). Το σύνδρομο Fraser χαρακτηρίζεται από κρυπτοφθαλμία, δερματική συνδακτυλία, ανωμαλίες στο λάρυγγα και στην ουρογεννητική οδό, κρανιακές δυσμορφίες, διανοητική καθυστέρηση και μυοσκελετικές ανωμαλίες (Εικ.14). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αναφορές για διαγνωστικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες σε ασθενείς (Slavotinek and Tiff, 2002). Είναι φανερό ότι το σύνδρομο Fraser έχει πολύπλοκο και πλειοτροπικό φαινότυπο και μοιράζεται φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με άλλες δυσμορφίες όπως το σύνδρομο Barder-Biedl (Katsanis *et al.*, 2001).



Εικόνα 14. Φωτογραφίες ασθενών που πάσχουν από σύνδρομο Fraser. (a) Ασθενής με αμφίπλευρη κρυπτοφθαλμία. **(b)** Ασθενής με συνδακτυλίες στα δάχτυλα των χεριών (http://www.gfmer.ch/genetic_diseases_v2/gendis_detail_list.php?cat3=699).

Βασιζόμενος στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των μεταλλαγών ‘bleb’ καθώς και στα ιστολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Fraser στον άνθρωπο, ο R. Winter πρότεινε το 1990, ότι ένα ή και περισσότερα μεταλλάγματα ‘bleb’ είναι δυνατόν να αποτελούν μοντέλο για το σύνδρομο Fraser στον άνθρωπο (Winter RM, 1990, Darling and Gossler, 1994). Πράγματι, τα τελευταία χρόνια το σύνδρομο Fraser

συσχετίστηκε με μεταλλάξεις στο γονίδιο *FRAS1* έπειτα από αλληλούχιση του γονιδίου σε ασθενείς που έπασχαν από το συγκεκριμένο σύνδρομο και όπου εντοπίστηκαν μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν είτε αλλαγή του πλαισίου διαβάσματος, είτε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης της παραγόμενης πρωτεΐνης (Mc Gregor *et al.*, 2003). Μεταλλάξεις του *FREM2* έχουν, επίσης, εντοπισθεί σε ασθενείς με σύνδρομο Fraser (Jadeja *et al.*, 2005).

Προκειμένου να γίνει μια διάκριση μεταξύ άλλων συνδρόμων με παρόμοια χαρακτηριστικά έχουν προταθεί κάποια διαγνωστικά κριτήρια (Thomas *et al.*, 1986) τα οποία χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα κύρια διαγνωστικά χαρακτηριστικά όπως κρυπτοθφαλμία (εμφανίζεται στο 90% των ασθενών), δερματική συνδακτυλία (εμφανίζεται στο 62% των ασθενών), ανωμαλίες στα γεννητικά όργανα (αποτελεί το τρίτο σε συχνότητα εμφάνισης σύμπτωμα και αφορά το 36.8% των θηλυκών ατόμων και το 31.5% των αρσενικών) με ποικίλες ανωμαλίες και οικογενειακό ιστορικό για την ασθένεια (το 10% των ασθενών έχουν τέτοιο ιστορικό). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει δευτερεύοντα χαρακτηριστικά όπως ανωμαλίες στη διαμόρφωση της μύτης και των αυτιών, ανωμαλίες στις αναπνευστικές οδούς και στους πνεύμονες που έχουν να κάνουν κυρίως με λαρυγγική στένωση ή ατρησία, μυοσκελετικές ανωμαλίες που σχετίζονται κυρίως με απουσία ή υποπλασία των οστών της κεφαλής, καθώς και με ανωμαλίες στην οστεοποίηση των κρανιακών οστών, γαστρεντερικές ανωμαλίες που αφορούν εδρική στένωση ή ατρησία, νεφρικές ανωμαλίες που αφορούν αγενεσία νεφρών (και των δυο ή μόνο του ενός) με ή χωρίς αγενεσία των ουρητήρων, καθώς και μικρότερου μεγέθους ή τελείως απύσα ουροδόχο κύστη. Μικρότερα ποσοστά εμφάνισης αντιστοιχούν στις ανωμαλίες στον εγκέφαλο (π.χ. εγκεφαλοκήλη, υδροκεφαλία), στις καρδιακές ανωμαλίες (π.χ. υπερτροφική καρδιά), στις ανωμαλίες στο θύμο (απουσία ή υποπλασία) και στην αναπτυξιακή ή ψυχοκινητική καθυστέρηση (Slavotinek & Tift, 2002, Thomas *et al.*, 1986). Δύο κύρια κριτήρια και ένα δευτερεύον ή ένα κύριο και τουλάχιστον τέσσερα δευτερεύοντα απαιτούνται για την διάγνωση του συνδρόμου (Gattuso *et al.*, 1987).

Το σύνδρομο Fraser είναι σχετικά σπάνιο με συχνότητα 1/10000 (Smyth & Scambler, 2005), η οποία αυξάνεται αν ληφθούν υπόψη οι πρώιμες αποβολές. Σε ότι αφορά τη βιωσιμότητα των ατόμων που πάσχουν από σύνδρομο Fraser, παρουσιάζεται

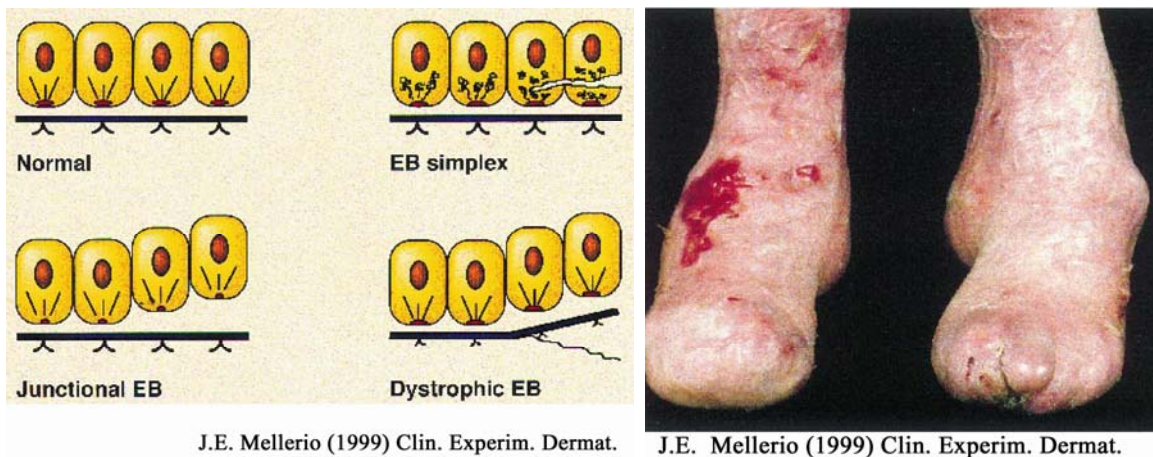
μεγάλη ποικιλομορφία. Ένα ποσοστό (περίπου 45%) πεθαίνει κατά τις πρώτες εβδομάδες της κύησης ή τον πρώτο χρόνο εξαιτίας προβλημάτων που δημιουργούνται στον πνεύμονα ή στα νεφρά (Boyd *et al.*, 1988).

1.9 Ανθρώπινες δερματικές ασθένειες που χαρακτηρίζονται από την παρουσία φυσαλίδων

Διαταραχές σε αρκετά από τα συστατικά του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας, που οφείλονται είτε σε μεταλλαγές των γονιδίων που τα κωδικοποιούν, είτε στη δημιουργία αυτοαντισωμάτων, οδηγούν σε μια σειρά δερματικών ασθενειών στον άνθρωπο, όπως η Πομφολυγώδης Επιδερμόλυση (Epidermolysis Bullosa-EB) και το σύνδρομο Alport (Chan LS, 1997). Παραδείγματα συστατικών του βασικού ελάσματος της επιδερμίδας που προσβάλλονται από αυτοαντισώματα αποτελούν το κολλαγόνο VII (που προκαλεί την ασθένεια Epidermolysis Bullosa acquisita), το κολλαγόνο XVII (Bullous pemphigoid), οι λαμινίνες 5 και 6 (αυτοαντισώματα των οποίων οδηγούν στην ασθένεια anti-laminin cicatrical pemphigoid) (Chan LS, 1997).

Όσον αφορά την περίπτωση που η ασθένεια οφείλεται σε διαταραχές συστατικών της βασικής μεμβράνης της επιδερμίδας, τότε με τον όρο EB περιγράφεται μια κατηγορία κληρονομήσιμων ασθενειών κύριο χαρακτηριστικό των οποίων είναι η αυξημένη ευπάθεια των επιδερμικών επιθηλίων σε μηχανικούς τραυματισμούς ή τριβές, με αποτέλεσμα τη δημιουργία φυσαλίδων ή κύστεων (Tuderman and Bruckner, 1998; Agin and Roop, 2001). Συνολικά έχουν ανιχνευθεί τροποποιήσεις σε τουλάχιστον 5 χαρακτηριστικά δομικά συστατικά των βασικών μεμβρανών της επιδερμίδας (κολλαγόνα IV, VII, XVII, λαμινίνη-5 και ιντεγκρίνες α6β4) σε ποικίλες κληρονομήσιμες ασθένειες του δέρματος. Για τη μελέτη των παραπάνω δερματολογικών ασθενειών έχουν δημιουργηθεί διάφορα μοντέλα ποντικών τα οποία φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που έχουν ταυτισθεί με τις ασθένειες αυτές (Aszodi *et al.*, 1998). Στα ποντίκια αυτά όπως και στους ασθενείς που πάσχουν από διάφορους τύπους EB, σχηματίζονται υποεπιδερμικές φυσαλίδες σαν αποτέλεσμα της χαλάρωσης των δεσμών μεταξύ επιδερμίδας και χορίου της δερμίδας. Οι φυσαλίδες αυτές επάγονται κατά

κύριο λόγο στα νεογέννητα ή στα ενήλικα άτομα έπειτα από την πρόκληση μηχανικών τραυματισμών ή τριβών, ενώ σε περιπτώσεις πιο εκτεταμένης κλινικής εκδήλωσης της ασθένειας, μπορεί να παρουσιάζονται ακόμα και σπλαχνικά προβλήματα οδηγώντας σε θάνατο. Η EB αρχικά κατηγοριοποιήθηκε, χρησιμοποιώντας κλινικά κριτήρια, σε τρεις κατηγορίες (Simplex, Dystrophic και Junctional). Έπειτα όμως από παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η διάκριση πλέον γίνεται σε 4 κατηγορίες (Simplex, Dystrophic, Hemidesmosomal, Junctional) (Εικ.14) ανάλογα με το σημείο σχηματισμού της φυσαλίδας στην περιοχή της βασικής μεμβράνης, δηλαδή σύμφωνα με το στρώμα στο οποίο πραγματοποιείται η αποκόλληση μεταξύ δερμίδας και επιδερμίδας (Pulkkinen L and Uitto J, 1998).



J.E. Mellerio (1999) Clin. Experim. Dermat.

J.E. Mellerio (1999) Clin. Experim. Dermat.

Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση των βλαβών που προκαλούνται στις διάφορες μορφές πομφολυγώδους επιδερμόλυσης (αριστερά). Στην EB simplex οι πομφόλυγες εντοπίζονται μέσα στην επιδερμίδα, στην EB junctional στην lamina lucida και στην EB dystrophic κάτω από τη lamina densa. Δεξιά φαίνεται φωτογραφία από ασθενή με πομφολυγώδη επιδερμόλυση.

1.10 Σκοπός της εργασίας

Στα ευρύτερα πλαίσια της λειτουργικής μελέτης των πρωτεϊνών Fras1/Frem, αναζητήσαμε περιοχές πιθανής λειτουργίας των επιμέρους πρωτεϊνών, διαφορετικές από την βασική μεμβράνη των επιθηλίων. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες μελέτες: 1) Αναλυτική μελέτη του γονιδίου *Frem3* στον ποντικό, μέσα από

τον εκτενή εντοπισμό της πρωτεΐνης. 2) Απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3* στον ποντικό με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού και ανάλυση του φαινοτύπου. 3) Μελέτη του φαινοτύπου των *Fras1^{-/-}* ποντικών στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Τα σημαντικότερα συμπεράσματα τα οποία προέκυψαν κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης εργασίας είναι τα παρακάτω:

- 1) Η πρωτεΐνη *Frem3* παρουσιάζει διαφοροποιημένη συμπεριφορά σε σύγκριση με τις άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας. Πειράματα ανοσοφθορισμού με αντισώματα ενάντια σε διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης, δείχνουν ότι η *Frem3* υπάρχει σε τουλάχιστον δυο τμήματα. Σε αντίθεση με τις άλλες *Fras1/Frem* πρωτεΐνες, το ένα τμήμα της *Frem3*, το πιο αμινοτελικό, παρόλο που εντοπίζεται σε όλες της βασικές μεμβράνες κατά την ανάπτυξη, βρίσκεται επιπλέον και στα αιμοφόρα αγγεία, στις βασικές μεμβράνες των επιθηλίων των *Fras1^{-/-}* ποντικών, αλλά και στις βασικές μεμβράνες όλων των ενήλικων οργάνων και ιστών. Αντίθετα, το πιο καρβοξυτελικό κομμάτι της πρωτεΐνης, φαίνεται να ακολουθεί το πρότυπο εντοπισμού των άλλων πρωτεϊνών της οικογένειας όσον αφορά τον εντοπισμό σε εμβρυϊκά επιθήλια, αλλά παράλληλα να εντοπίζεται επιπλέον στα περιφερικά νεύρα και στα κύτταρα του αίματος κατά την ανάπτυξη. Φαίνεται λοιπόν, ότι η *Frem3* έχει τη δυνατότητα να λειτουργεί ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας.
- 2) Τα *Frem3^{-/-}* μεταλλαγμένα ποντίκια πεθαίνουν πριν από τη μέρα E5.5. Ο φαινότυπος των *Frem3^{+/-}* φαίνεται αρκετά σύνθετος, με κύρια χαρακτηριστικά την παρουσία αλωπεκίας, δερματίτιδας, ιχθύωσης, στειρότητας των αρσενικών και σοβαρών αλλοιώσεων του γεννητικού τους συστήματος λόγω της εμφάνισης φλεγμονών. Τα μέχρι τώρα στοιχεία δηλώνουν τη ενδεχόμενη εμπλοκή του *Frem3* σε καταστάσεις αυτοανοσίας.
- 3) Τα *Fras1^{-/-}* ποντίκια παρουσιάζουν διαταραχή της μνήμης του φόβου. Ιστολογικές και μοριακές αναλύσεις του φαινοτύπου μέχρι τώρα έχουν δείξει

σημαντικές αλλοιώσεις σε περιοχές που σχετίζονται με τη μνήμη, καθώς και πιο γενικευμένες διαφορές σε πληθυσμούς γλοιακών κυττάρων (αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα). Ειδικότερα όσον αφορά το τελευταίο κομμάτι, ο φαινότυπος παρουσιάζει ιδιαίτερη ποικιλομορφία και πλαστικότητα.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Διαδικασίες χειρισμού νουκλεϊκών οξέων

2.1 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

i) Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών

Αρχικά κόβεται περίπου 0.5cm της ουράς του ποντικού και τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου erpendorf με 500μl διαλύματος λύσης (100 mM Tris.HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 10 % SDS, 5 M NaCl) και 10μl πρωτεΐνάσης K (200μg/ml). Ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 55°C υπό ανακίνηση, για να δράσει το ένζυμο. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13.000 στροφές το λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρά σωληνάκια όπου προστίθεται ισοπροπανόλη 650μl για την κατακρήμνιση του DNA. Το ίζημα ξεπλένεται με 750μl 70% EtOH και τελικά επαναδιαλύεται σε 100μl διαλύματος που περιέχει 10 mM Tris.HCl pH 8.0 και 0.1mM EDTA.

ii) Απομόνωση γενωμικού DNA από πολυδύναμα προγονικά κύτταρα

Όταν τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (ES) πυκνώσουν, αφαιρείται το θρεπτικό τους υλικό και προστίθενται 500 μl διαλύματος λύσης (100 mM Tris.HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2 % SDS, 200 mM NaCl). Στη συνέχεια το μείγμα μεταφέρεται σε σωληνάκια τύπου erpendorf και προστίθεται πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση υπό ανακίνηση στους 55°C. Ακολούθως, το γενωμικό DNA των κυττάρων ES κατακρημνίζεται με την προσθήκη 0.7 όγκων ισοπροπανόλης και φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές / λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Τέλος, το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε 50 μl TE (10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0).

iii) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια, σε μικρή κλίμακα

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή (5-10μg) κλίμακα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης. Μοναδιαίες αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων αναπτύσσονται σε 1-5ml LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό, στους 37°C, υπό ολονύκτια ανάδευση. Αρχικά, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση 1 λεπτό, στις 13000 στροφές / λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια επαναωρούνται σε 200μl διαλύματος P1 (50mM Glucose, 25mM Tris-Cl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0). Ακολουθεί λύση των κυττάρων με την προσθήκη 400μl διαλύματος αποδιάταξης P2 (200mM NaOH, 1% SDS), ήπια ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Η εξουδετέρωση γίνεται με προσθήκη 300μl διαλύματος P3 (3M CH₃COOK pH 5.5, 5M CH₃COOH) και ισχυρή ανάδευση. Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές / λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέγεται και ακολουθεί κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA με 0.7 όγκους ισοπροπανόλης και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Τέλος, το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε 20μl TE (10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0). Στην περίπτωση που ακολουθεί τεμαχισμός, χρησιμοποιείται το 1/3-1/6 του DNA.

iv) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια, σε μεγάλη κλίμακα

Σε αυτή την περίπτωση, η διαδικασία έχει όπως πριν αυξάνοντας όμως τον όγκο της βακτηριακής καλλιέργειας στα 50-100ml, χρησιμοποιώντας 5ml των διαλυμάτων P1, P2 και P3 και φυγοκεντρώντας στις 10000 στροφές / λεπτό, στους 4°C για 30 λεπτά. Η αρχική κατακρήμνιση του DNA γίνεται με 12ml ισοπροπανόλης και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Μετά το ξέπλυμα του ιζήματος με 70% αιθανόλη και την επαναδιάλυσή του σε 200μl TE, προστίθεται RNAση A σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml και επώαση για 1-2 ώρες στους 37°C, ώστε να απομακρυνθεί το RNA. Ακολουθούν εκχυλίσεις με ίσο όγκο φαινόλης/χλωροφορμίου και επανακατακρήμνιση με 800μl απόλυτη αιθανόλη. Το DNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές το λεπτό, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε

ρυθμιστικό διάλυμα δράσης πρωτεΐνάσης K (1x: 50mM Tris-Cl pH7.5, 100mM NaCl, 0.02% SDS, 2mM EDTA). Στη συνέχεια, προστίθεται πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml και ακολουθεί επώαση στους 55°C για 2-3 ώρες. Ακολουθεί εκχύλιση με ίσο όγκο φαινόλης/χλωροφορμίου όπως και πριν και στη συνέχεια το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 800μl απόλυτης αιθανόλης. Σε αυτό το στάδιο δεν πραγματοποιείται φυγοκέντρηση, αλλά διαδοχικές πλύσεις του DNA, αφαιρώντας και προσθέτοντας φρέσκια 100% αιθανόλη για 5-10 φορές, έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές και το DNA φαίνεται με τη μορφή νήματος. Τέλος, το DNA συλλέγεται με γυάλινη πιπέτα Pasteur με αγκιστροειδές τυφλό άκρο και αφού ξεπλυθεί με 70% αιθανόλη και στεγνώσει, επαναδιαλύεται σε 100μl TE.

v) Απομόνωση ολικού RNA από ιστούς ποντικού

Η απομόνωση των ολικών δειγμάτων RNA έγινε με τη χρήση του kit Trizol reagent (Invitrogen). Οι ιστοί αμέσως μετά την απομόνωσή τους πλένονται σε φυσιολογικό ορό και απευθείας ομογενοποιούνται σε 1ml διαλύματος Trizol / 50-100mg ιστού, το οποίο έχει ως βάση το θειοκυανικό γουανίδιο και την όξινη φαινόλη. Οι ομογενοποιημένοι ιστοί επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 15-30°C και στη συνέχεια γίνεται εκχύλιση με 0.2ml χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη / 1ml Trizol φυγοκεντρώντας για 15 λεπτά στις 12000 στροφές / λεπτό στους 4°C. Το διάλυμα χωρίζεται σε τρεις φάσεις με το RNA να βρίσκεται στην πιο πάνω υδατική φάση, η οποία και μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάκι. Η κατακρήμνιση γίνεται με 0.5ml ισοπροπανόλη / 1ml Trizol και φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές / λεπτό για 10 λεπτά, στους 4°C. Τέλος το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και αφού στεγνώσει, επαναδιαλύεται σε 50-100μl H₂O, απαλλαγμένο από RNAσες.

vi) Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η διαδικασία απομόνωσης μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται με τη χρήση κατάλληλου kit (QIAEX II gel extraction kit, Qiagen), όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο που παρέχεται από την εταιρία.

2.2 Τεμαχισμός μορίων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Για τον τεμαχισμό μορίων DNA χρησιμοποιήθηκαν περιοριστικές ενδονουκλεάσες σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστικών εταιρειών (Minotech και New England Biolabs). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε αναλογία 1μg DNA με 3-5 μονάδες ενζύμου σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και στην συνιστώμενη θερμοκρασία, βάση των οδηγιών, για 2-3 ώρες όταν ήταν επιθυμητή η πλήρης πέψη ή για 1 ώρα για διαγνωστικές πέψεις. Στην περίπτωση πέψεων γενωμικού DNA από ES πολυδύναμα εμβρυϊκά κύτταρα, οι συνθήκες ήταν λίγο διαφορετικές. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε αναλογία 1μg DNA με 10-15 μονάδες ενζύμου σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και θερμοκρασία, όπως προτείνεται από τις εταιρείες, ενώ η επώαση πραγματοποιήθηκε για περίπου 14-16 ώρες.

2.3 Παρασκευή τυφλών άκρων

Η κατασκευή τυφλών άκρων σε μόρια που έχουν 5' προεξέχοντα άκρα πραγματοποιήθηκε με την υπομονάδα Klenow της DNA πολυμεράσης. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται κατάλληλη ποσότητα DNA (300ng-1.5μg) που ο όγκος του ρυθμίζεται στα 30μl και ακολούθως προστίθενται 3μl ρυθμιστικού διαλύματος (10x: 100mM Tris-Cl pH 7.5, 50mM MgCl₂, 75mM DTT), 1.5μl dNTPs (0.5mM) και 1.5μl (5 units) ενζύμου (Minotech). Ακολουθεί επώαση στους 30°C για 30 λεπτά και στη συνέχεια απενεργοποίηση του ενζύμου με επώαση στους 75°C για 15 λεπτά. Ακολούθως πραγματοποιείται εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση του DNA, είτε με 0.7 όγκους ισοπροπανόλη, είτε με 1/10 του όγκου CH₃COONa και 3 όγκους απόλυτη αιθανόλη, φυγοκεντρώντας στις 13000 στροφές / λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Τέλος, το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα TE (10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0).

2.4 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (ligation)

Για τη σύνδεση γραμμικών μορίων DNA χρησιμοποιείται η λιγάση του DNA του βακτηριοφάγου T4. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10-20μl και σε αυτήν συμμετέχουν το ένθεμα και ο φορέας σε αναλογία από 3:1-10:1 αντίστοιχα, το ρυθμιστικό διάλυμα (10x: 300mM Tris-Cl pH 7.8, 100mM MgCl₂, 100mM DTT, 10mM ATP) και 6 Weiss units ενζύμου (Minotech). Η επώαση είναι είτε 2-4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, είτε 16 ώρες ολονύκτια.

2.5 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

i) Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα μόρια DNA λόγω του αρνητικού φορτίου τους, μεταναστεύουν σε πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητα με την οποία το DNA μετακινείται κατά την ηλεκτροφόρησή του εξαρτάται από το μέγεθός του, την διαμόρφωσή του (υπερελικωμένο, nicked, γραμμικό), τη συγκέντρωση της αγαρόζης, την τάση που εφαρμόζεται και την σύσταση και την ιοντική ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Η συγκέντρωση των πηκτωμάτων κυμαινόταν μεταξύ 0.7-2.5%. Η ηλεκτροφόρηση, αναλυτική και παρασκευαστική, πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE (50x TAE: 200mM Tris, 200mM CH₃COOH, 1mM EDTA pH8.0) ή 1x TBE (5xTBE: 445mM Tris, 445mM Boric Acid, 10mM EDTA) με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε συγκέντρωση 0.1μg/ml. Η διάρκεια και η τάση που εφαρμόστηκε κυμάνθηκε μεταξύ 30 λεπτών-16 ώρες και μεταξύ 30-150Volts αντίστοιχα. Πριν από την ηλεκτροφόρηση στα δείγματα προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης Orange G (0.25% Orange G, 15% Ficoll, 10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0) σε αναλογία 1μl / 10μl διαλύματος DNA.

ii) Ηλεκτροφόρηση συνολικού RNA από ιστούς ποντικού σε πήκτωμα αγαρόζης

Όπως και στην περίπτωση της ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, έτσι και εδώ η αναλυτική ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα συγκέντρωσης 2-2.5%, σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE (50x TAE: 200mM Tris, 200mM CH₃COOH, 1mM EDTA pH8.0) με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε συγκέντρωση 0.1μg/ml. Η διάρκεια και η τάση που εφαρμόστηκε κυμάνθηκε μεταξύ 30 λεπτών και 2 ωρών και μεταξύ 100-150Volts αντίστοιχα. Πριν από την ηλεκτροφόρηση στα δείγματα προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης Orange G (0.25% Orange G, 15% Ficoll, 10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0) σε αναλογία 1μl / 10μl διαλύματος RNA.

2.6 Μετασηματισμός βακτηρίων με υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA

Οι μέθοδοι μετασηματισμού βακτηρίων με μόρια υπερελικωμένων πλασμιδίων βασίζονται στην παρατήρηση ότι η κατεργασία βακτηριακών κυττάρων με παγωμένο διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου που συνοδεύεται με σύντομη θέρμανση, αυξάνει σημαντικά την ικανότητά τους να προσλαμβάνουν DNA πλασμιδίου (Cohen *et al*, 1972). Τροποποιήσεις της αρχικής μεθόδου με βελτιωμένα στελέχη *E. coli*, οδήγησαν σε απόδοση μετασηματισμού της τάξης των 10⁸ - 10⁹ μετασηματισμένων αποικιών ανά μg πλασμιδίου. Υψηλότερη όμως απόδοση (10⁹ - 10¹⁰ αποικίες / μg πλασμιδίου) επιτυγχάνεται μετασηματίζοντας τα βακτήρια με ηλεκτρική εκκένωση. Η τελευταία μέθοδος (Dower *et al*, 1988), αν και προκαλεί θάνατο στο 50-70% των βακτηρίων, μπορεί να επιτύχει υψηλές συχνότητες μετασηματισμού ρυθμίζοντας την ισχύ του ηλεκτρικού πεδίου, τη διάρκεια του παλμού και τη συγκέντρωση του DNA.

i) Μετασηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock)

Για την χημική κατεργασία των βακτηρίων πριν από το θερμικό σοκ, χρησιμοποιούνται δισθενή Ca²⁺ κατιόντα σε συγκέντρωση και χρόνο επώασης που

προτείνονται σε σχετικά πρωτόκολλα (Sambrook J, *et al*, 1989). Για την παρασκευή βακτηριακών κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό με θερμικό σοκ, καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* κατάλληλου στελέχους αναπτύσσεται σε 50ml θρεπτικού μέσου LB με ολονύκτια επώαση στους 37°C και ανακίνηση στις 200 στροφές / λεπτό. Στη συνέχεια, 500μl μεταφέρονται σε 50ml LB και η καλλιέργεια συνεχίζεται σε κωνική φιάλη στις ίδιες συνθήκες μέχρι να φτάσει σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης ($OD_{600}=0.6$) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 2000 στροφές / λεπτό στους 4°C. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 5ml διαλύματος 50mM $CaCl_2$, επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 2000 στροφές / λεπτό στους 4°C. Τέλος, το ίζημα επαναιωρείται σε 2.5ml παγωμένου διαλύματος 50mM $CaCl_2$ – 10% γλυκερόλη. Τα δεκτικά για μετασχηματισμό βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύονται στους -80°C σε όγκους των 100-200μl.

Για την διαδικασία μετασχηματισμού, τα δεκτικά για μετασχηματισμό βακτηριακά κύτταρα, μεταφέρονται από τους -80°C, όπου βρίσκονται αποθηκευμένα στον πάγο περίπου 10 λεπτά πριν από την προσθήκη του DNA. Η παραμονή στον πάγο συνεχίζεται για 30 λεπτά και στη συνέχεια ακολουθεί απότομη μεταφορά των κυττάρων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42°C για 90 δευτερόλεπτα, επαναφορά στον πάγο για 1 λεπτό, προσθήκη 800μl θρεπτικού μέσου LB και επώαση στους 37°C για 45 λεπτά – 1 ώρα υπό ανακίνηση. Τέλος τα μετασχηματισμένα βακτήρια αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό μέσο LB για 16 ώρες, στους 37°C, παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού.

ii) Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο της ηλεκτρικής εκκένωσης (electroporation)

Η παράμετρος που λαμβάνεται υπόψη στην Παρασκευή ηλεκτροδεκτικών κυττάρων, είναι η όσο το δυνατόν χαμηλότερη περιεκτικότητα του βακτηριακού εναιωρήματος σε άλατα, τα οποία μπορεί να αυξήσουν την ιοντική ισχύ, προκαλώντας αυξημένο κυτταρικό θάνατο κατά τη ηλεκτρική εκκένωση. Για την παρασκευή ηλεκτροδεκτικών κυττάρων, καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* κατάλληλου στελέχους αναπτύσσεται σε 50ml θρεπτικού μέσου TYM, σχετικά φτωχού σε άλατα, με ολονύκτια επώαση στους 37°C και ανακίνηση στις 200 στροφές / λεπτό. Στη συνέχεια, 500μl

μεταφέρονται σε 500ml LB και η καλλιέργεια συνεχίζεται σε κωνική φιάλη, στις ίδιες συνθήκες, μέχρι να φτάσει σε πυκνότητα αντίστοιχη της οπτικής απορρόφησης $OD_{600}=0.6-0.7$. Ακολουθεί επώαση σε πάγο για 30 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές / λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα των κυττάρων αρχικά επαναιωρείται σε 500ml παγωμένου, απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού, φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες και επαναιωρείται διαδοχικά σε H₂O όγκου 250ml, 50ml και 10ml. Τέλος, επαναιωρείται σε 1.5ml παγωμένου υδατικού διαλύματος γλυκερόλης 10%. Τα δεκτικά κύτταρα αποθηκεύονται στους -80°C σε όγκους 50μl.

Για τη διαδικασία μετασχηματισμού, τα δεκτικά για μετασχηματισμό βακτηριακά κύτταρα όγκου 50μl μεταφέρονται σε πάγο και αναμιγνύονται με 0.001-1ng υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA ή 3μl αντίδρασης σύνδεσης (ligation) μορίων DNA και παραμένουν στον πάγο για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, μεταφέρονται σε παγωμένες κυψελίδες τύπου BTX P/N 610, διαστάσεων 1cm x 1cm, με κενό διάστημα (chamber gap) πάχους 1mm, και υποβάλλονται σε ηλεκτρική εκκένωση τάσης 1600V για 4-6 δευτερόλεπτα σε ειδική συσκευή (Electro Cell Manipulator 600). Τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα μεταφέρονται σε 1ml θρεπτικού μέσου LB, επωάζονται στους 37°C για 1 ώρα υπό ανακίνηση και τέλος αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό μέσο LB για 16 ώρες στους 37°C, παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού.

2.7 Ανάλυση μορίων DNA κατά Southern

Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε πήκτωμα αγαρόζης, γραμμικά μόρια DNA μπορούν να μεταφερθούν σε μεμβράνες νάυλον με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων (Southern, 1975), ώστε να ακολουθήσουν πειράματα υβριδοποίησης με ραδιοσημασμένους ανιχνευτές και αυτοραδιογραφία. Αναλυτικότερα, ο ρυθμός μεταφοράς διαφορετικών τεμαχίων DNA εξαρτάται από το μέγεθός τους. Μικρά μόρια DNA (μικρότερα από 2Kb) μεταφέρονται ευκολότερα και σε συντομότερο χρονικό διάστημα από μόρια μεγαλύτερα (άνω των 10Kb). Για την αντιμετώπιση του παρόντος προβλήματος, τα μόρια DNA αποδιατάσσονται πριν τη μεταφορά τους, επωάζοντας το πήκτωμα αγαρόζης σε αλκαλικό διάλυμα, ενώ για τα μεγαλύτερα από 10Kb θραύσματα

DNA, πραγματοποιείται επιπλέον τεμαχισμός με μερική αποπουρίνωση σε ασθενές όξινο περιβάλλον.

Αρχικά τα διαχωρισμένα θραύσματα μορίων DNA φωτογραφήθηκαν σε υπεριώδη φωτισμό δίπλα σε υποδεκάμετρο και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αποπουρίνωση σε διάλυμα 0.25N HCl για 15 λεπτά, υπό ήπια ανακίνηση. Κατόπιν, ακολούθησε αποδιάταξη σε διάλυμα αποδιάταξης (1.5M NaCl, 0.5N NaOH) και ουδετεροποίηση σε διάλυμα ουδετεροποίησης (1M Tris-Cl pH 7.2, 1.5M NaCl) και στις δυο περιπτώσεις για 40 λεπτά υπό ήπια ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση σε διάλυμα 20x SSC (3M NaCl, 300mM $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{CO}_2)_3$) για 20 λεπτά.

Τα νουκλεϊκά οξέα μεταφέρθηκαν από τα πήκτωματα αγαρόζης σε νάλυον μεμβράνες (Amersham) σύμφωνα με τη μέθοδο της μεταφοράς μέσω τριχοειδών φαινομένων (capillary transfer). Πιο συγκεκριμένα, σε ένα πλαστικό δοχείο προστίθεται διάλυμα 20xSSC (3M NaCl, 300mM $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{CO}_2)_3$) έως ότου η στάθμη του διαλύματος να υπερβεί το μισό της μέγιστης επιφάνειας. Πάνω στο δοχείο τοποθετείται κάθετα μια γυάλινη επίπεδη επιφάνεια, πάνω στην οποία τοποθετείται απορροφητικό χαρτί Whatmann, το οποίο έχει εμβαπτιστεί προηγουμένως σε 20xSSC. Στο σημείο επαφής της γυάλινης επιφάνειας και του χαρτιού, τοποθετείται το πήκτωμα αγαρόζης και πάνω σε αυτό ένα κομμάτι μεμβράνης (τύπου Nytran N), ακριβώς ίδιων διαστάσεων με το πήκτωμα, η οποία έχει προηγουμένως εμβαπτιστεί σε 200ml διαλύματος 20xSSC για περίπου 2 λεπτά. Πάνω στη μεμβράνη τοποθετούνται δυο κομμάτια χαρτί Whatmann, οι διαστάσεις του οποίου πρέπει να συμπίπτουν με αυτές του πηκτώματος. Τέλος, πάνω από τα χαρτιά Whatmann, τοποθετούνται στοίβες χαρτιών, στην κορυφή των οποίων εναποτίθεται ένα βάρος περίπου 1Kgr, ώστε όλο το παραπάνω σύστημα να παραμείνει σταθερό. Η μεταφορά γίνεται για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ την επόμενη μέρα τα δεσμευμένα στη μεμβράνη μόρια DNA μονιμοποιούνται με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV cross-linking) για 20 λεπτά και θέρμανση της μεμβράνης στους 80°C για 2 ώρες.

2.8 Ραδιοσήμανση μορίων DNA με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών

Αυτή η μέθοδος ραδιοσήμανσης χρησιμοποιήθηκε για μόρια DNA >500bp τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές τόσο για την ταυτοποίηση του ομόλογου ανασυνδυασμού, όσο και για την ταυτοποίηση μοναδιαίων βακτηριακών αποικιών που φέρουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια, με υβριδοποίηση αποικιών ακινητοποιημένων σε μεμβράνη (colony hybridization). Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στη χρήση δμερών εκκινητών, ετερογενών όσον αφορά την αλληλουχία τους, για την έναρξη της σύνθεσης του DNA χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μονόκλωνο DNA. Λόγω της ετερογένειάς τους οι εκκινητές σχηματίζουν υβρίδια με διαφορετικές θέσεις του υποστρώματος και συνεπώς στο τελικό προϊόν αντιπροσωπεύονται εξίσου όλα σχεδόν τα τμήματα.

Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι η υπομονάδα Klenow της DNA πολυμεράσης I της E. Coli, ενώ το ένα από τα τέσσερα νουκελοτίδια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση του ανιχνευτή είναι ραδιοσημασμένο. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 50-100ng DNA του οποίου ο όγκος ρυθμίζεται στα 50μl με την προσθήκη TE (10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0). Το DNA αποδιατάσσεται με βρασμό για 5 λεπτά, τοποθετείται σε πάγο για 1 λεπτό και φυγοκεντρείται στιγμιαία. Στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα σε έτοιμο (kit) παγωμένο και ξηρό διάλυμα RediprimeII (Amersham) το οποίο περιέχει Klenow, Buffer, όλα τα dNTPs εκτός από dCTP και τυχαίους εκκινητές. Τέλος, προστίθενται 5μl από [α - 32 P] dCTP που αντιστοιχεί σε 40μCi, ειδικής ενεργότητας 3000Ci/mmol (Amersham) ειδικής ενεργότητας 10mCi/ml και το τελικό διάλυμα επωάζεται στους 37°C για 10 λεπτά. Ακολουθεί καθαρισμός των προϊόντων με τη χρήση ειδικών μικρό-στηλών ProbeQuant G-50 (GE Healthcare) όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο που παρέχεται από την εταιρία, και προσδιορισμός της ειδικής ενεργότητας του ανιχνευτή. Για την αποφυγή της ραδιόλυσής του, ο ανιχνευτής χρησιμοποιείται άμεσα ή αποθηκεύεται στους -20°C για σύντομο χρονικό διάστημα.

2.9 Υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων

i) Προϋβριδοποίηση γενωμικού DNA από πολυδύναμα εμβρυϊκά κύτταρα

Αρχικά γίνεται προϋβριδοποίηση των μεμβρανών για την αποφυγή της μη ειδικής σύνδεσης του ανιχνευτή στα φίλτρα. Αυτό επιτυγχάνεται αφενός με τα συστατικά του διαλύματος, αφετέρου με την προσθήκη DNA-φορέα. Η σύσταση του διαλύματος προϋβριδοποίησης είναι: 3.75ml 20x SSC (3M NaCl, 300mM $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{CO}_2)_3$, pH 7.5 με προσθήκη κιτρικού οξέος), 250μl 10% SDS, 5ml 50x Denhardtts (100x: 10g Ficoll 400-DL, 10g Polyvinyl pyrrolidone 40, 10g Bovine serum albumin), 250μl Salmon Sperm DNA 75ng/ml. Η προϋβριδοποίηση γίνεται σε γυάλινους κυλίνδρους, όπου προστίθενται 5-7ml προθερμασμένου στους 65°C διαλύματος προϋβριδοποίησης, για 2 ώρες στους 65°C.

ii) Υβριδοποίηση γενωμικού DNA από πολυδύναμα εμβρυϊκά κύτταρα

Η υβριδοποίηση γίνεται με 50μl ραδιοσημασμένου ανιχνευτή, με συγκέντρωση περίπου 3×10^5 cpm/ml διαλύματος υβριδοποίησης, και ειδική ενεργότητα από 10^7 - 10^9 cpm/μg. Αρχικά, αναμιγνύονται 50μl ανιχνευτή, 15 μl 20x SSC και 5μg DNA από ES κύτταρα, και επωάζονται πρώτα για 5 λεπτά στους 95°C και κατόπιν για 15 λεπτά στους 65°C. Στη συνέχεια, το διάλυμα αυτό προστίθεται σε 5ml διαλύματος προϋβριδοποίησης και όλο μαζί στο κύλινδρο που περιέχει τα φίλτρα. Η υβριδοποίηση γίνεται ολονυκτίως στους 65°C.

iii) Πλυσίματα φίλτρων μετά την υβριδοποίηση

Τα πλυσίματα των μεμβρανών πραγματοποιήθηκαν όλα στους 65°C. Αρχικά έγιναν δύο πλυσίματα, διάρκειας 30 λεπτών το καθένα, με διάλυμα A (2x SSC, 0.5% SDS). Στη συνέχεια ακολούθησε ένα πλύσιμο, διάρκειας 30 λεπτών σε διάλυμα B (0.1x SSC, 0.5% SDS).

iv) Αυτοραδιογραφία

Η έκθεση των φίλτρων εξαρτάται από την αναμενόμενη ένταση του σήματος. Ενδεικτικά η διάρκεια έκθεσης, παρουσία ειδικής οθόνης ενίσχυσης σήματος ήταν είτε 3-4ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, είτε 1-7 ημέρες στους -80°C .

v) Υβριδοποίηση αποικιών ακινητοποιημένων σε μεμβράνη

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για την ταυτοποίηση μοναδιαίων βακτηριακών αποικιών που φέρουν ανασυνδυνασμένα πλασμίδια. Περιλαμβάνει τη μεταφορά των αποικιών σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης, τη σύνδεσή του DNA τους στη μεμβράνη και την ακόλουθη υβριδοποίηση των μεμβρανών με κατάλληλους ραδιοσημασμένους ανιχνευτές. Αρχικά γίνεται μεταφορά των βακτηριακών αποικιών σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης, τοποθετώντας τη μεμβράνη στο τρυβλίο με τις βακτηριακές αποικίες μέχρι να υγρανθεί εντελώς. Για λόγους στοίχισης, τόσο η μεμβράνη όσο και το υποκείμενο θρεπτικό μέσο σημαδεύονται ασύμμετρα με βελόνα. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες σηκώνονται από το θρεπτικό υλικό και τοποθετούνται με τις αποικίες προς τα πάνω σε χαρτί Whatman 3MM εμποτισμένο μέχρι κορεσμού με διάλυμα αποδιάταξης (1.5M NaCl, 0.5M NaOH, pH 12-12.5) για 5 λεπτά, ακολούθως σε διάλυμα ουδετεροποίησης (1M Tris, 1.5M NaCl, ρύθμιση pH στο 7 με HCl) για 7 λεπτά και τελικά σε διάλυμα 2x SSC για 15 λεπτά. Τέλος οι μεμβράνες τοποθετούνται σε στεγνό χαρτί όπου και παραμένουν μέχρι να στεγνώσουν τελείως (> 30 λεπτά) και υφίστανται ακτινοβολία με UV ώστε να πραγματοποιηθεί η ομοιοπολική σύνδεση μεταξύ DNA και μεμβράνης. Η προϋβριδοποίηση, η υβριδοποίηση και τα πλυσίματα, έγιναν όπως περιγράφονται παραπάνω στην περίπτωση του γενωμικού DNA από πολυδύναμα εμβρυϊκά κύτταρα.

2.10 Παρασκευή ανιχνευτή RNA με αντίδραση μεταγραφής *in vitro*

Για την παρασκευή ανιχνευτών χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια τα οποία εμπεριείχαν τμήματα cDNA από τα κατάλληλα γονίδια (η περιγραφή των κατασκευών

βρίσκεται στην ενότητα των αποτελεσμάτων). Για τη σήμανση των ανιχνευτών πραγματοποιήθηκε μεταγραφή *in vitro* χρησιμοποιώντας το Riboprobe System Buffers Kit (Promega), T3 και T7 RNA πολυμεράσες (Roche) και UTP σημασμένο με διγοξυγενίνη (Digoxigenin-11-UTP, Roche). Η διαδικασία της *in vitro* μεταγραφής έγινε ως εξής: Σε σωληνάκια τύπου erppendorf αναμιγνύονται τα ακόλουθα υλικά με τη σειρά που αναφέρονται και επωάζονται για 3 ώρες στους 37°C: 7μl H₂O απαλλαγμένο από νουκλεάσες, 4μl 5x ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής, 2μl DTT 0.1M, 1μl rGTP 10mM, 1μl rCTP 10mM, 1μl rATP 10mM, 0.65μl rUTP 10mM, 0.35μl DIGrUTP, 1μl καταστολέα RNAσών (40 units), 1μl RNA πολυμεράση (20 units), 1μg γραμμοποιημένο πλασμιδιακό DNA. Η παύση της αντίδρασης γίνεται προσθέτοντας 20 μονάδες (units) από DNAση I απαλλαγμένη από RNAses (Roche) και επωάζοντας για 15 λεπτά στους 37°C. Ακολούθως γίνεται κατακρήμνιση του RNA με: 100μl TE (10mM Tris pH 8.0, 0.1mM EDTA pH 8.0), 10μl LiCl 4M, 300μl απόλυτη αιθανόλη, στους -20°C για 30 λεπτά. Κατόπιν γίνεται φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές / λεπτό, στους 4°C, ξέπλυμα του ιζήματος με 70% και επαναδιάλυση σε TE σε τελική συγκέντρωση 0.1μg/μl.

2.11 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Η μέθοδος αυτή σε συνδυασμό με την PCR, εφαρμόστηκε τόσο για τον έλεγχο της έκφρασης του *Fras1* και εναλλακτικών μεταγράφων του στον εγκέφαλο, όσο και για την ανάκτηση τεμαχίων cDNA για την επιμέρους κλωνοποίησή τους σε πλασμιδιακούς φορείς. Πριν την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής, το RNA που είχε απομονωθεί από ιστό επωάστηκε με 20 μονάδες ενζύμου / μg RNA, DNase I (Roche), παρουσία του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (200mM Tris-Cl pH 8.0, 50mM NaCl, 30mM MgCl₂), στους 37°C για 1 ώρα. Ακολούθησε εκχύλιση του RNA με φαινόλη / χλωροφόρμιο, κατακρήνιση με 3.5 όγκους μίγματος αιθανόλης και οξικού αμμωνίου 7.5M (αναλογία μίγματος 6:1) και επαναδιαλυτοποίηση σε H₂O. Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε το Kit SuperScript II RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen) σύμφωνα με τις ενδείξεις της εταιρείας αλλά και με μερικές επιπλέον τροποποιήσεις. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα, κατά

περίπτωση, 1μg ολικού RNA από εγκέφαλο ενήλικου ποντικού ή 1μg ολικού RNA από έμβρυα ποντικού E14.5. Αρχικά, αναμιγνύονται σε σωληνάκι τύπου eppendorf, το RNA με 150ng από τυχαίους εκκινητές (Random Primer mix, New England Biolabs), 1μl dNTPs (συγκέντρωσης 10mM το καθένα) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 12μl. Το δείγμα θερμαίνεται στους 65°C για 5 λεπτά και αμέσως μετά μεταφέρεται στον πάγο για άλλο 1 λεπτό. Στη συνέχεια προστίθενται σε αυτό 4μl από το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχεται, 2μl από 0.1M DTT και 40 μονάδες από καταστολέα RNAσων (RNAsin, Roche). Το μίγμα επωάζεται στους 25°C για 10 λεπτά και αφού προστεθούν σε αυτό 200 μονάδες από ένζυμο Superscript II παραμένει για άλλα 10 λεπτά στους 25°C και στη συνέχεια μεταφέρεται στους 42°C για 50 λεπτά. Η αντίδραση σταματάει με θέρμανση στους 72°C για 15 λεπτά και χρησιμοποιείται 1μl / αντίδραση PCR.

2.12 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος εφαρμόστηκε τόσο για την ανάκτηση τεμαχίων με σκοπό την κλωνοποίησή τους, όσο και για διαγνωστικούς λόγους στις περιπτώσεις ελέγχου για την παρουσία ομόλογου ανασυνδυασμού, σε γονοτυπική ταυτοποίηση ποντικών και στην ταυτοποίηση μοναδιαίων αποικιών που φέρουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια (minipreps).

i) Ταυτοποίηση ομόλογου ανασυνδυασμού με τη μέθοδο PCR

Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν περίπου 200ng γενωμικού DNA απομονωμένου από πολυδύναμα προγονικά κύτταρα. Οι εκκινητές PCR ήταν όλοι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια και χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις: 150ng ανά αντίδραση PCR συνολικού όγκου 20μl και 350ng ανά αντίδραση PCR συνολικού όγκου 50μl (Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στην ενότητα 2.35). Το μείγμα των αντιδράσεων περιελάμβανε ακόμα: 350μM από κάθε dNTP, 1x ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης, 1.5-2mM MgCl₂ και 0.5-3 μονάδες ενζύμου, ανάλογα την πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε και τον όγκο της αντίδρασης. Οι πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάκτηση τεμαχίων DNA μεγαλύτερων των 3Kb ήταν οι

DyNAzyme EXT DNA polymerase (Finnzymes) και η EXPAND long template PCR system (Roche), ενώ για τεμάχια μικρότερα των 3Kb χρησιμοποιήθηκε η Taq DNA polymerase (Minotech). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε αυτόματο θερμοανακυκλωτή που τυπικά ρυθμίζεται να εκτελέσει ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95-98°C και ένα στάδιο θερμοκικής ανακύκλωσης που επαναλαμβάνεται 30-35 φορές και περιλαμβάνει: α) αποδιάταξη του DNA στους 95-98°C, β) υβριδοποίηση των εκκινητών στις συμπληρωματικές αλληλουχίες στόχους, σε θερμοκρασία (T_m) που υπολογίζεται με βάση το ποσοστό των βάσεων GC στην αλληλουχία των εκκινητών και προκύπτει από τον τύπο: $T_m=81.5+16.6(\log M)+0.41(\%GC)-500/n$ (όπου: $16.6(\log M)= -22.04$, n =μήκος του ολιγονουκλεοτιδίου, M = molarity), γ) επέκταση των εκκινητών για σύνθεση της θυγατρικής αλυσίδας DNA σε θερμοκρασία όπου το ένζυμο παρουσιάζει την υψηλότερη ενεργότητα. Τέλος, ακολουθεί ένα στάδιο τελικής επέκτασης για 5-10 λεπτά.

Οι συνθήκες αντίδρασης (50μl) για τις PCR με εκκινητές Pr22-Pr19, Pr22-Pr20, Pr22-Pr21 και με πολυμεράση DyNAzyme EXT (Finnzymes) ήταν: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 3 λεπτά, 35 κύκλοι με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει: αποδιάταξη στους 94°C για 35 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση των εκκινητών στους 60°C για 1 λεπτό, επέκταση στους 72°C για 2.35 λεπτά και τελική επέκταση στους 72°C για 10 λεπτά. Για να ανακτηθούν τα τεμάχια DNA σε κάθε περίπτωση γινόταν μια αρχική PCR με εκκινητές Pr22-Pr19 και στη συνέχεια επαναληπτική PCR εκκινητές Pr22-20 ή Pr22-21, χρησιμοποιώντας 1μl από την αρχική αντίδραση.

Οι συνθήκες αντίδρασης (20μl) για τις PCR με εκκινητές Pr22-Pr19, Pr22-Pr20, Pr22-Pr21 και με πολυμεράση Taq DNA polymerase (Minotech) ήταν: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 4 λεπτά, 35 κύκλοι με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει: αποδιάταξη στους 94°C για 1 λεπτό, υβριδοποίηση των εκκινητών στους 60°C για 1 λεπτό, επέκταση στους 72°C για 2.45 λεπτά και τελική επέκταση στους 72°C για 5 λεπτά. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, έτσι και εδώ χρειάστηκε να γίνουν επαναληπτικές PCR για την ανάκτηση των τεμαχίων DNA.

Οι συνθήκες αντίδρασης (50μl) για τις PCR με εκκινητές Pr27-Pr29 και με πολυμεράση Expand long template PCR system (Roche) ήταν: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 3 λεπτά, 35 κύκλοι με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει: αποδιάταξη στους 94°C

για 20 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση των εκκινητών στους 60°C για 1 λεπτό, επέκταση στους 68°C για 6 λεπτά και τελική επέκταση στους 68°C για 7 λεπτά. Για να ανακτηθούν τα τεμάχια DNA απαιτήθηκε επαναληπτική PCR με εκκινητές Pr28-Pr29, χρησιμοποιώντας 1μl από την αρχική αντίδραση, με τις εξής συνθήκες: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 2.30 λεπτά, 35 κύκλοι με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει: αποδιάταξη στους 94°C για 15 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση των εκκινητών στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα, επέκταση στους 68°C για 5.30 λεπτά και τελική επέκταση στους 68°C για 7 λεπτά.

ii) Γονοτυπική ταυτοποίηση ποντικών με τη μέθοδο PCR

Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν περίπου 25-50ng γενωμικού DNA απομονωμένου από ουρές ενήλικων ποντικών. Οι εκκινητές PCR (NeoFOR και NeoREV) ήταν συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια και χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις: 150ng ανά αντίδραση PCR συνολικού όγκου 20μl. (Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων παρουσιάζονται στην ενότητα 2.35). Το μείγμα των αντιδράσεων περιελάμβανε ακόμα: 500μM από κάθε dNTP, 1x ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης, 1.5mM MgCl₂ και 1.5 μονάδες ενζύμου Taq DNA polymerase (Minotech). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε αυτόματο θερμοανακυκλωτή στις εξής συνθήκες: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 4 λεπτά, 30 κύκλοι με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει: αποδιάταξη στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση των εκκινητών στους 63°C για 1 λεπτό, επέκταση στους 72°C για 40 δευτερόλεπτα και τελική επέκταση στους 72°C για 5 λεπτά.

iii) Ανάκτηση τεμαχίων DNA για την κατασκευή ανιχνευτών

Οι ανιχνευτές P3 και P4 που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση του ομόλογου ανασυνδυασμού τόσο στο 5' όσο και στο 3' άκρο αντίστοιχα, με τη μέθοδο του Southern blot, ανακτήθηκαν με PCR. Και στις δύο περιπτώσεις οι PCR έγιναν με τη χρήση βελτιωμένης πολυμεράσης με ικανότητα επιδιόρθωσης (proofreading) των σφαλμάτων, DyNAzyme EXT (Finnzymes). Οι αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 50μl

με 1x ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης, 500μM από κάθε dNTP, 1.5mM MgCl₂, 150ng από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο και 3 μονάδες ενζύμου.

Στην περίπτωση του ανιχνευτή P3 η PCR έγινε με τους εκκινητές VP87-VP88, στις εξής συνθήκες: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 3 λεπτά, 30 κύκλοι με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει: αποδιάταξη στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση των εκκινητών στους 59°C για 1 λεπτό, επέκταση στους 72°C για 45 δευτερόλεπτα και τελική επέκταση στους 72°C για 5 λεπτά. S

Στην περίπτωση του ανιχνευτή P4 η PCR έγινε με τους εκκινητές VP95-VP96, στις εξής συνθήκες: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 2 λεπτά, 30 κύκλοι με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει: αποδιάταξη στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση των εκκινητών στους 55°C για 30 δευτερόλεπτα, επέκταση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα και τελική επέκταση στους 72°C για 5 λεπτά.

iv) Ανάκτηση τεμαχίων DNA για τη δημιουργία κατασκευής στόχου

Για τη δημιουργία της κατασκευής στόχου, η ανάκτηση των κατάλληλων γενωμικών αλληλουχιών του *Frem3*, με PCR με τους εκκινητές Pr17-Pr18 (για την απομόνωση των τμημάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο 5' άκρο της κατασκευής αλλά ταυτόχρονα και για την απομόνωση της κασέτας νεομυκίνης) και Pr15-Pr16 (για την απομόνωση των τμημάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο 3' άκρο της κατασκευής). Και στις δυο περιπτώσεις οι PCR έγιναν σε τελικό όγκο 50μl, με Expand long template PCR system (Roche) πολυμεράση (proofreading), 350ng από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο, 500μM από κάθε dNTP, 2mM MgCl₂, 1x ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης και 5 μονάδες ενζύμου.

Για την PCR με τους εκκινητές Pr17-Pr18 οι συνθήκες ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 3 λεπτά, 35 κύκλοι με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει: αποδιάταξη στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση των εκκινητών στους 65°C για 1 λεπτό, επέκταση στους 68°C για 4.50 λεπτά και τελική επέκταση στους 68°C για 7 λεπτά.

Για την PCR με τους εκκινητές Pr15-Pr16 οι συνθήκες ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 3 λεπτά, 35 κύκλοι με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει:

αποδιάταξη στους 94°C για 40 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση των εκκινητών στους 66°C για 1 λεπτό, επέκταση στους 68°C για 6 λεπτά και τελική επέκταση στους 68°C για 7 λεπτά.

ν) Ανάκτηση τμημάτων DNA μέσω PCR για την κλωνοποίηση σε βακτηριακούς φορείς έκφρασης με στόχο τη δημιουργία πολυκλωνικών αντισωμάτων

Τα τμήματα DNA που ανακτήθηκαν με PCR αφορούν την κατασκευή των αντισωμάτων Frem3-N1, Frem3-N2, Fras1-AbN1 και Fras1-AbC1 (οι αλληλουχίες των εκκινητών φαίνονται στην ενότητα 2.35). Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε βελτιωμένη πολυμεράση με ικανότητα επιδιόρθωσης (proofreading) των σφαλμάτων, DyNAzyme EXT (Finnzymes) για τα τμήματα που αφορούν τα αντισώματα ενάντια στη Frem3 και Phusion polymerase (Finnzymes) για τα τμήματα που αφορούν τα αντισώματα ενάντια στη Fras1. Οι αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 50μl με 1x ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης, 500μM από κάθε dNTP, 1.5mM MgCl₂, 150ng από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο και 3 μονάδες ενζύμου.

Οι PCR για τα Frem3-N1 και Frem3-C1 έγιναν με τους εκκινητές VP100-VP101 και VP102-VP103 αντίστοιχα, στις εξής συνθήκες: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 4 λεπτά, 35 κύκλοι με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει: αποδιάταξη στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση των εκκινητών στους 60°C (VP100-VP101) ή στους 57°C (VP102-VP103) για 1 λεπτό, επέκταση στους 72°C για 45 δευτερόλεπτα και τελική επέκταση στους 72°C για 5 λεπτά.

Οι PCR για τα Fras1-AbN1 και Fras1-AbC2 έγιναν με τους εκκινητές VP104-VP105 και VP106-VP107 αντίστοιχα, στις εξής συνθήκες: αρχική αποδιάταξη στους 98°C για 30 δευτερόλεπτα, 35 κύκλοι με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει: αποδιάταξη στους 98°C για 10 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση των εκκινητών στους 57°C για 30 δευτερόλεπτα, επέκταση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα και τελική επέκταση στους 72°C για 5 λεπτά.

Διαδικασίες χειρισμού πρωτεϊνών

2.13 Παραγωγή πρωτεϊνών σε βακτήρια με επαγωγή

Για την παραγωγή πολυπεπτιδίων σε βακτήρια στελέχους *E. coli* BL21-Codon Plus(DE3)-RIL, τα κατάλληλα τεμάχια DNA απομονώθηκαν με PCR και κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pGEX-4T-1, στο καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου θειοτρανσφεράση της γλουταθειόνης (Glutathione-S-Transferase, GST). Η έκφραση των χιμαιρικών γονιδίων πραγματοποιήθηκε με ενεργοποίηση του υποκινητή *tac* παρουσία IPTG (Isopropyl-beta-D-1-thiogalactopyranoside, C₉H₁₈O₅S) τελικής συγκέντρωσης 1mM για 3 ώρες στους 37°C. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ακόλουθη:

Αρχικά, μια αποικία ανασυνδυασμένων βακτηρίων αναπτύσσεται για 16 ώρες στους 37°C υπό ανακίνηση, σε καλλιέργεια όγκου 50ml (θρεπτικό μέσο LB, 50μg/ml αμπικιλίνη, 30μg/ml χλωραμφενικόλη). Στη συνέχεια, 500μl βακτηρίων μεταφέρονται σε 50ml θρεπτικού ίδιας σύστασης, για χρόνο επώασης μέχρι τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης (OD₆₅₀=0.65). Ακολουθεί επαγωγή με IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM, για 3 επιπλέον ώρες. Εν συνεχεία πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με φυγοκέντρηση για 20 λεπτά, στις 3000 στροφές / λεπτό σε θερμοκρασία 4°C, διαγνωστική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και φύλαξη της πελλέτας στους -20°C.

2.14 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

i) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS- PAGE)

Κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, τα μόρια διαχωρίζονται βάσει του μοριακού τους μεγέθους. Αυτό οφείλεται στην παρουσία του ανιονικού απορρυπαντικού SDS στο πήκτωμα, στο

διάλυμα ηλεκτροφόρησης και στο διάλυμα Laemmli που προστίθεται στα δείγματα. Τα πολυπεπίδια προσδένουν SDS, σε πόσότητα ανάλογη με το μέγεθός τους, φορτίζονται αρνητικά και παρουσία ηλεκτρικού πεδίου μετακινούνται προς την άνοδο. Επιπλέον, το SDS διασπά τους υδρογονικούς δεσμούς, τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και ουσιαστικά αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες. Πλήρης αποδιάταξη επιτυγχάνεται αφενός με την επίδραση της μερκαπτοαιθανόλης (συστατικό του διαλύματος Laemmli) και αφετέρου με τη θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C. Το πήκτωμα αποτελείται από δύο φάσεις: την ανώτερη στην οποία πραγματοποιείται ευθυγράμμιση των πρωτεϊνών σε ενιαίο μέτωπο και την υποκείμενη, δηλαδή το πήκτωμα διαχωρισμού. Οι συγκεντρώσεις των συστατικών του πηκτώματος ευθυγράμμισης είναι: 4.5% ακρυλαμίδη/δισακρυλαμίδη (29:1), 0.125M Tris-Cl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0,2% TEMED, και του πηκτώματος διαχωρισμού 0.375M Tris-Cl pH8.9, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.05% TEMED, ενώ η συγκέντρωσή του σε ακρυλαμίδη/δισακρυλαμίδη κυμαίνεται μεταξύ 8%-12% και επιλέγεται βάσει των μοριακών μεγεθών των πουπεπτιδίων. Τα πρωτεϊνικά δείγματα αποδιατάσσονται με προσθήκη διαλύματος 5xLaemmli (5x: 250mM Tris-Cl pH6.8, 10%SDS, 50% γλυκερόλη, 25% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.5% bromophenol blue) και θέρμανση στους 100°C για 5 λεπτά. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (10x: 250mM Tris, 1.92M γλυκίνη, 1% SDS, ρύθμιση του pH στο 8.3 με HCl), με σταθερή ένταση πεδίου 300mA (100-120Volts) και μετά το πέρας ακολούθησε χρώση ή ηλεκτρομεταφορά των πολυπεπτιδίων σε μεμβράνη.

ii) Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie blue και υδατοδιαλυτή Coomassie blue

Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα επώάζεται κατάλληλη χρωστική έτσι ώστε να γίνονται ορατές οι πρωτεΐνες. Στην περίπτωση των αναλυτικών πηκτωμάτων, η επώαση πραγματοποιείται για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, σε διάλυμα χρώσης που περιέχει 0.16% (w/v) Coomassie blue (Merck), 50% μεθανόλη και 12% οξικό οξύ. Στη συνέχεια, το πήκτωμα μεταφέρεται σε διάλυμα αποχρωματισμού (45% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) για 2-16ώρες. Στην περίπτωση παρασκευαστικών πηκτωμάτων, η επώαση πραγματοποιείται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε υδατικό διάλυμα Coomassie blue περιεκτικότητας 0.75% (w/v), ενώ στη συνέχεια το πήκτωμα αποχρωματίζεται μέσα

σε απιονισμένο νερό για 1-2 ώρες, μέχρις ότου τα όρια της πρωτεϊνική ζώνης προς απομόνωση είναι ευδιάκριτα.

2.15 Απομόνωση πρωτεϊνών από παρασκευαστικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε με στόχο την απομόνωση αρκετής ποσότητας πρωτεϊνών (Frem3-N1, Frem3-C1 και Fras1-AbN1, Fras1-AbC1) για την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων σε κουνέλια. Για την παρασκευή της κάθε ενέσιμης δόσης απαιτήθηκε ένα παρασκευαστικό πήκτωμα κάθε φορά, στο οποίο είχαν φορτωθεί και ηλεκτροφορηθεί 7-10ml (από σύνολο 50ml) βακτηριακής καλλιέργειας BL21 κυττάρων, στην οποία είχε επαχθεί η έκφραση των κατάλληλων πρωτεϊνών όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.11. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, τη χρώση και τον αποχρωματισμό των πηκτωμάτων (όπως περιγράφονται στην ενότητα 2.12), οι πρωτεϊνικές ζώνες προς απομόνωση, κόπηκαν με καθαρό νυστέρι από τα πηκτώματα. Στη συνέχεια, τα απομονωμένα τμήματα πολτοποιήθηκαν μέσα από μια σύριγγα των 2ml και τοποθετήθηκαν σε σωληνάκια τύπου eppendorf, μέσα σε 500-700μl διαλύματος έκλουσης (10mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl). Αφού παρέμειναν για έκλυση ολονυκτίως στους 4°C υπό έντονη ανάδευση, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στους 4°C για 20 λεπτά στις 3000 στροφές / λεπτό. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και αφού ποσοτικοποιήθηκαν με διαγνωστική ηλεκτοφόρηση, αναμίχθηκαν με 1.2 όγκους ανοσοδιεγερτικού διαλύματος Freund's adjuvant (Sigma) και κατόπιν χορηγήθηκαν σε κουνέλια τύπου Νέας Ζηλανδίας, σε τέσσερις διαδοχικές δόσεις, χρονικής απόστασης μεταξύ τους 3 εβδομάδων.

2.16 Καθαρισμός πολυκλωνικών αντισωμάτων

i) Απομόνωση ορού από το αίμα κουνελιών

Μετά την αφαίμαξη των κουνελιών, τα δείγματα τοποθετούνται στους 4°C ολονυκτίως. Στη συνέχεια το αίμα φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές / λεπτό για 20-30 λεπτά στους 4°C. Έτσι το αίμα διαχωρίζεται στα συστατικά του και προκύπτουν τρεις φάσεις με τα ερυθροκύτταρα να βρίσκονται χαμηλά, τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια στη μεσαία φάση και τέλος τον ορό στην ψηλότερη φάση. Ο ορός απομονώνεται, διαμοιράζεται σε σωληνάκια τύπου erpendorf σε δόσεις των 1-1.5ml και φυλάσσεται στους -20°C.

ii) Διαδικασία καθαρισμού πολυκλωνικών αντισωμάτων από ανοσοποιημένο ορό

Σε ένα παρασκευαστικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, φορτώνεται και ηλετροφορείται βακτηριακή πελλέτα που έχει προκύψει από καλλιέργεια 5-10ml, στην οποία έχει εκφραστεί το πεπτιδίο το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή αντισώματος, ύστερα από επαγωγή με IPTG. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρονται με ηλεκτροφορητική μεταφορά (transfer) σε PVDF μεμβράνη (PAL Life Sciences), ολονυκτίως στα 60V/110mA, στους 4°C (η διαδικασία της μεταφοράς περιγράφεται στην ενότητα 2.17). Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση της μεμβράνης σε χρωστική Poncaeu (Sigma) για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση και αποχρωματισμός σε απιονισμένο νερό για 1-3 λεπτά. Μόλις γίνουν διακριτές οι πρωτεΐνες στη μεμβράνη, απομονώνεται η ζώνη του υπερεκφραζόμενου πεπτιδίου η οποία στη συνέχεια επωάζεται, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανακίνηση, σε διάλυμα παρεμπόδισης (blocking solution) το οποίο αποτελείται από 1xTBS (20mM Tris-Cl pH 7.5, 150mM NaCl) και 5% ξηρή σκόνη γάλακτος (w/v). Ακολούθως η μεμβράνη μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου cryotube (Nunc) και επωάζεται με 1-1.5ml από το ορό που θέλουμε να καθαρίσουμε, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση. Στη συνέχεια ο ορός απομακρύνεται ενώ η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές για 5 λεπτά τη

φορά, με 3ml 1xTBS, σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση. Τέλος, η μεμβράνη επωάζεται σε 400μl παγωμένου διαλύματος γλυκίνης υψηλής οξύτητας (0.2M γλυκίνη, ρύθμιση του pH στο 2.5 με HCl), για 5 λεπτά, υπό έντονη ανακίνηση. Σε αυτές τις όξινες συνθήκες ξεκολλάει το μεγαλύτερο μέρος των αντισωμάτων που προσδέθηκαν στη μεμβράνη και απελευθερώνεται στο διάλυμα. Μετά το πέρας των 5 λεπτών, το διάλυμα συλλέγεται και αναμιγνύεται με 400μl διαλύματος ουδετεροποίησης (1M Tris-Cl pH8.0-8.8) και αφού διαμοιραστεί σε σωληνάκια τύπου erpendorf, φυλάσσεται στους -20°C.

2.17 Ανάλυση πρωτεϊνών με Western

i) Υγρή ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών

Μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, τα πολυπεπίδια του πηκτώματος μεταφέρονται σε μεμβράνη PVDF (PAL Life Sciences) με εφαρμογή πεδίου σταθερής έντασης 110mA, σε διάλυμα μεταφοράς (20mM Tris, 150mM γλυκίνη, 50% μεθανόλη), ολονύκτια στους 4°C. Η διάταξη περιλαμβάνει την τοποθέτηση στην ειδική κασέτα των εξής: σπόγγος, χαρτί Whatman 3MM (x2), πήκτωμα, μεμβράνη, χαρτί Whatman 3MM (x2), σπόγγος και την εφαρμογή πεδίου έτσι ώστε οι πρωτεΐνες να μεταφέρονται προς την άνοδο.

ii) Ανάλυση Western

Μετά την ηλεκτρομεταφορά, η μεμβράνη επωάζεται σε παρεμποδιστικό διάλυμα (blocking solution) (5% ξηρό γάλα σκόνη σε 1xTBS), για τουλάχιστον 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να καλυφθούν οι ελεύθερες θέσεις της. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση με το πρωτεύον αντίσωμα, σε κατάλληλη αραιώση σε παρεμποδιστικό διάλυμα, στους 4°C. Στη συνέχεια, απομακρύνεται η περίσσεια του αντισώματος με τρία διαδοχικά πλυσίματα, με διάλυμα A (10mM Tris pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.05% Tween) διάρκειας 10 λεπτά το καθένα. Ακολουθεί πλύσιμο της μεμβράνης με διάλυμα B (0.2% SDS, 0.9% NaCl, 0.5% Triton) για 10 λεπτά και μετά πάλι ξέπλυμα

με διάλυμα A για άλλα 10 λεπτά. Κατόπιν ακολουθεί επώαση με το κατάλληλο δευτερεύον αντίσωμα που είναι συζευγμένο με HRP, διαλυμένο σε παρεμποδιστικό διάλυμα, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την απομάκρυνση του μη προσδεμένου αντισώματος με πλυσίματα όπως προηγουμένως, προστίθενται τα υποστρώματα της HRP που παρουσία του ενζύμου παράγουν φώς το οποίο και αποτυπώνεται σε φιλμ. Η έκθεση του φιλμ διαρκεί από 30 δευτερόλεπτα-2 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα χημειοφωταύγειας της PIERCE σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Η παρούσα μέθοδος εφαρμόστηκε για τον έλεγχο του τίτλου των αντισωμάτων Frem-N1, Frem3-C1, Fras1-AbN1 και Fras1-AbC1. Για το Western τα αντισώματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1: 200-1:500, ενώ ακόμα χρησιμοποιήθηκε και ακαθάριστος ορός σε αραιώση 1:1000-1:10000.

Διαδικασίες χειρισμού ιστών και εμβρύων ποντικού

2.18 Μονιμοποίηση δειγμάτων

i) Μονιμοποίηση εμβρύων και ιστών ποντικού (εκτός εγκεφάλων)

Αρχικά τα ζώα θυσιάζονται με μεγάλη δόση χλωροφορμίου και οι ιστοί ή τα έμβρυα συλλέγονται σε φωσφορικό διάλυμα 1xPBS (10x: 0.4M Na₂HPO₄, 0.05M NaH₂PO₄, 1.5M NaCl, pH7.4). Τα δείγματα μονιμοποιούνται σε 4% παραφορμαλδεΐδη (w/v) (PFA) διαλυμένη σε 1xPBS. Η μονιμοποίηση γίνεται στους 4°C υπό ανακίνηση και ο χρόνος εξαρτάται από το μέγεθος και τη σύσταση των δειγμάτων (όσο μεγαλώνει ο χρόνος των δειγμάτων μεγαλώνει και ο χρόνος παραμονής τους στο διάλυμα). Γενικά όλες οι επωάσεις των δειγμάτων έγιναν από 2-16 ώρες.

ii) Μονιμοποίηση εγκεφάλων με ενδοκαρδιακή έγχυση

Στις περιπτώσεις που απαιτήθηκε απομόνωση εγκεφάλων από ποντικούς μετεμβρυϊκών αλλά και ενήλικων σταδίων, εφαρμόστηκε ενδοκαρδιακή έγχυση παραφορμαλδεΐδης 4% (perfusion), έπειτα από ολική νάρκωση με 22μl/g ζώου 2.5%

Avertine (Aldrich) και κατόπιν απομόνωση των εγκεφάλων. Ακολούθησε επιπλέον μονιμοποίηση σε 4% PFA (w/v) σε PBS για 2-4ώρες στους 4°C, υπό ανακίνηση.

2.19 Διαδικασία Έγκλεισης ιστών για επεξεργασία τους σε κρυοτόμο

i) Έγκλειση ιστών για κρυοτομές (εκτός εγκεφάλων)

Μετά τη μονιμοποίηση, τα δείγματα ξεπλένονται σε φωσφορικό διάλυμα 1xPBS (10x: 0.4M Na₂HPO₄, 0.05M NaH₂PO₄, 1.5M NaCl, pH7.4) για 15 λεπτά στους 4°C, υπό ανακίνηση και κατόπιν επώάζονται σε διάλυμα 30% σουκρόζης (w/v) σε PBS, στους 4°C για 16 ώρες. Τελικά τα δείγματα παγώνονται σε ισοπεντάνιο στους -80°C (5-10 λεπτά ανάλογα το μέγεθος του ιστού) και στη συνέχεια είτε αποθηκεύονται σε ερμητικά κλεισμένα δοχεία (για να αποφευχθεί η αφυδάτωση) στους -80°C, είτε εγκλείονται σε υγρό κρυοπροστασίας OCT compound (Tissue Tek) στους -25°C για άμεση επεξεργασία τους σε κρυοτόμο.

ii) Έγκλειση εγκεφάλων για κρυοτομές

Μετά τη μονιμοποίηση οι εγκεφαλοι ξεπλένονται σε PBS και επεξεργάζονται σε διάλυμα σουκρόζης, όπως περιγράφεται στην παραπάνω ενότητα. Στη συνέχεια, τα δείγματα εγκλείονται σε διάλυμα σουκρόζης/ζελατίνης (15% (w/v) σουκρόζη, 7.5% (w/v) ζελατίνη, 1xPBS, pH7.4) στους 4°C και τελικά παγώνονται σε ισοπεντάνιο στους -55°C για περίπου 1 λεπτό (η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους -55°C με την προσθήκη ξηρού πάγου). Τα δείγματα είτε φυλάσσονται σε ερμητικά κλεισμένα δοχεία στους -80°C, είτε επεξεργάζονται απευθείας στον κρυοτόμο.

2.20 Διαδικασία Έγκλεισης ιστών και εμβρύων σε παραφίνη

i) Έγκλειση εμβρύων μέχρι E16.5 και μικρών σε μέγεθος ιστών σε παραφίνη

Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε για την Έγκλειση σε παραφίνη εμβρύων E10.5-E15.5 καθώς και άλλων δειγμάτων όπως: όρχεις, νεφροί, ουρές. Μετά τη μονιμοποίησή τους, τα δείγματα ξεπλένονται σε φωσφορικό διάλυμα 1xPBS (10x: 0.4M Na₂HPO₄, 0.05M NaH₂PO₄, 1.5M NaCl, pH7.4) και κατόπιν μεταφέρονται σε διάλυμα φυσιολογικού ορού (0.36% (w/v) NaCl σε ddH₂O) και στις δυο περιπτώσεις για 1 ώρα υπό ανακίνηση. Στη συνέχεια πραγματοποιείται σταδιακή αφυδάτωση των δειγμάτων σε διαλύματα σταδικά αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) σε κάθε περίπτωση για 2 ώρες, με μια εναλλαγή στη 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανακίνηση. Ακολουθεί η διαδικασία της διαύγασης κατά την οποία τα δείγματα εμποτίζονται σε ξυλένιο για 1-2 ώρες (ανάλογα με το μέγεθος του δείγματος) σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση. Έπειτα πραγματοποιείται η σκλήνωση των δειγμάτων, η οποία περιλαμβάνει: αρχικά την επώασή τους σε 50% ξυλένιο-50% υγρή παραφίνη για 2 ώρες στους 65°C και κατόπιν τη μεταφορά τους σε υγρή παραφίνη για 16-24 ώρες στους 65°C. Τέλος, τα δείγματα τοποθετούνται μέσα σε ειδικά καλούπια, πάνω σε θερμαινόμενη στους 65°C πλάκα και περιλούονται με υγρή παραφίνη. Τα δείγματα μέσα στα καλούπια, μεταφέρονται στον πάγο όπου εντέλει παγιδεύονται μέσα στην παραφίνη καθώς αυτή παγώνει και παίρνει το σχήμα του κύβου. Η αποθήκευσή τους γίνεται στους 4°C για αρκετούς μήνες.

ii) Έγκλειση εμβρύων (E16.5-E18.5) και μεγάλων σε μέγεθος ιστών σε παραφίνη

Η συγκεκριμένη διαδικασία εφαρμόστηκε για την Έγκλειση σε παραφίνη: εμβρύων E16.5-E18.5, νεογέννητων ποντικών σταδίων P1-P2, και εγκεφάλων από νεογέννητους και ενήλικες ποντικούς. Μετά τη μονιμοποίησή τους, τα δείγματα ξεπλένονται σε φωσφορικό διάλυμα 1xPBS (10x: 0.4M Na₂HPO₄, 0.05M NaH₂PO₄, 1.5M NaCl, pH7.4) και κατόπιν μεταφέρονται σε διάλυμα φυσιολογικού ορού (0.36%

(w/v) NaCl σε ddH₂O) και στις δυο περιπτώσεις για 4-5 ώρες υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια πραγματοποιείται σταδιακή αφυδάτωση των δειγμάτων σε διαλύματα σταδιακά αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) σε κάθε περίπτωση για 12-24 ώρες, με μια εναλλαγή ενδιάμεσα, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανακίνηση. Ακολουθεί η διαδικασία της διαύγασης κατά την οποία τα δείγματα εμποτίζονται σε χλωροφόρμιο για 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση. Έπειτα πραγματοποιείται η σκλήνωση των δειγμάτων, η οποία περιλαμβάνει: αρχικά την επώασή τους σε 50% χλωροφόρμιο-50% υγρή παραφίνη για 24-48 ώρες στους 65°C και κατόπιν τη μεταφορά τους σε υγρή παραφίνη για 48 ώρες στους 65°C. Τέλος, τα δείγματα τοποθετούνται μέσα σε ειδικά καλούπια, πάνω σε θερμαινόμενη στους 65°C πλάκα και περιλούνται με υγρή παραφίνη. Τα δείγματα μέσα στα καλούπια, μεταφέρονται στον πάγο όπου εντέλει παγιδεύονται μέσα στην παραφίνη καθώς αυτή παγώνει και παίρνει το σχήμα του κύβου. Η αποθήκευσή τους γίνεται στους 4°C για αρκετούς μήνες.

2.21 Παραγωγή τομών σε μικροτόμο ή κρυοτόμο

Τα δείγματα που έχουν εγκλειστεί σε παραφίνη επεξεργάζονται σε μικροτόμο, ενώ εκείνα που έχουν εγκλειστεί σε υγρό κρυοπροστασία ή σε διάλυμα σουκρόζης/ζελατίνης, επεξεργάζονται σε κρυοτόμο. Στις τομές παραφίνης το πάχος διατομής κυμάνθηκε μεταξύ 8-12μm, με τις τομές να απλώνονται πρώτα σε υδατόλουτρο στους 42°C ώστε να ξεδιπλώσουν πλήρως και κατόπιν να συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους και να αφήνονται να στεγνώσουν στους 37°C ολονυκτίως. Στις κρυοτομές το πάχος διατομής κυμάνθηκε μεταξύ 10-18μm, η διάτμηση πραγματοποιήθηκε στους -25°C ή -30°C και οι τομές συλλέχθηκαν σε αντικειμενοφόρους. Σε κάθε περίπτωση οι αντικειμενοφόροι είτε είχαν υποστεί ειδική επεξεργασία, ώστε οι τομές να προσκολλώνται σε αυτούς, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.20.

Ιστολογικές και ανοσοϊστοχημικές διαδικασίες

2.22 Προετοιμασία αντικειμενοφόρων για τη συλλογή τομών

Αρχικά ετοιμάζεται διάλυμα 0.5% ζελατίνης σε ddH₂O, το οποίο θερμαίνεται στους 65°C για 1 ώρα υπό ανάδευση ώστε να διαλυθεί πλήρως η ζελατίνη. Κατόπιν, μεταφέρεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αφήνεται να κρυώσει για περίπου 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται σταδιακά KCr(SO₄)₂·12H₂O σε ποσοστό 0.05%, υπό διαρκή ανάδευση. Αφού διαλυθεί, οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίζονται μέσα στο διάλυμα για 10 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρονται στους 37°C για να στεγνώσουν ολονυκτίως. (Στα πειράματα *in situ* υβριδοποίησης χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα επεξεργασμένοι αντικειμενοφόροι SuperFrost^R της εταιρείας Thermo Scientific)

2.23 Ιστολογική χρώση με Cresyl Violet

Η ιστολογική χρώση με Cresyl Violet βάφει τα νουκλεοσώματα, τα ριβοσώματα και τα σωμάτια Nissl στο νευρικό σύστημα. Όλη η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου Αρχικά οι τομές επωάζονται σε ξυλόλη για 10-15 λεπτά, γίνεται μια εναλλαγή και επωάζονται και πάλι για 2-5 λεπτά. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε απόλυτη 100% αιθανόλη για 2 λεπτά, σε 96% αιθανόλη για 1-2 λεπτά και σε 70% αιθανόλη για 1-2 λεπτά. Κατόπιν μεταφέρονται σε ddH₂O για 2-5 λεπτά και στη συνέχεια σε διάλυμα χρωστικής Cresyl Violet συγκέντρωσης 0.1% (w/v) σε νερό, για 10-15 λεπτά. Ακολουθούν 2 πλυσίματα σε ddH₂O για 10 λεπτά το καθένα και σταδιακή αφυδάτωση σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης (70%, 90%, 100%), διάρκειας 20-30 λεπτών σε κάθε διάλυμα με μια εναλλαγή ενδιάμεσα στο καθένα. Τέλος, οι τομές μεταφέρονται σε ξυλόλη για 10-15 λεπτά και καλύπτονται με συνθετική ακρυλακρική ρητίνη (Entellan, AlterChem) και τοποθέτηση καλυπτρίδας.

2.24 *In situ* υβριδοποίηση RNA

Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται τομές παραφίνης, προηγείται αποπαραφίνωση και ενυδάτωση των τομών μέσα από ξυλόλη και διαλύματα αιθανόλης σταδιακά μειούμενης συγκέντρωσης.

i) Υβριδοποίηση

Αρχικά οι τομές αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά με 1 ώρα και στη συνέχεια μονιμοποιούνται με 4% (w/v) PFA σε 1xPBS (10x: 0.4M Na₂HPO₄, 0.05M NaH₂PO₄, 1.5M NaCl, pH7.4) για 10 λεπτά. Ακολουθούν 3 πλυσίματα με 0.1% (v/v) Tween σε 1xPBS, για 5 λεπτά το καθένα. Ακολούθως, οι τομές μεταφέρονται σε διάλυμα δράσης πρωτεΐνάσης K (Για 250ml: 12,5ml 1M Tris-Cl pH 8.0, 2.5ml 0.5M EDTA, 250μl 10mg/ml πρωτεΐνάση K), για 5 λεπτά στους 37°C και στη συνέχεια σε διάλυμα 20% (w/v) γλυκίνης σε 1xPBS. Ακολουθούν, 2 πλυσίματα σε 0.1% (v/v) Tween σε 1xPBS, για 5 λεπτά το καθένα και επαναμονιμοποίηση των τομών σε 4% (w/v) PFA σε 1xPBS, για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί ακετυλίωση, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε διάλυμα ακετυλίωσης (Για 300ml διαλύματος: 4ml τριεθανολαμίνη, 0.525ml HCl 37%, 0.75ml οξικός ανυδρίτης, ddH₂O) και 3 πλυσίματα σε 0.1% (v/v) Tween σε 1xPBS, για 3 λεπτά το καθένα. Έπειτα πραγματοποιείται προϋβριδοποίηση στους 65°C σε διάλυμα προϋβριδοποίησης (1x: 50% φορμαμίδιο, 5x Denhardts, 250mg/ml yeast tRNA, 5xSSC και 500mg/ml salmon sperm DNA). Τέλος, γίνεται υβριδοποίηση με 400ng/ml σημασμένου με διγοξυγενίνη ανιχνευτή (DIG-RNA probe) σε διάλυμα προϋβριδοποίησης, στους 72°C για 14-16 ώρες. Ακριβώς πριν από την προσθήκη του ανιχνευτή στις τομές, προηγείται βράσιμό του, μέσα στο διάλυμα υβριδοποίησης, στους 80°C για 5 λεπτά και άμεση μεταφορά στον πάγο. (Οι τομές καλύπτονται με καλυπτρίδες για την αποφυγή εξάτμισης του ανιχνευτή, ενώ τόσο η υβριδοποίηση όσο και η προϋβριδοποίηση πραγματοποιούνται μέσα σε δοχείο με περιβάλλον κορεσμένο σε υγρασία με 5xSSC και 50% φορμαμίδιο).

ii) Πλυσίματα και επώαση με αντίσωμα

Αρχικά οι τομές εμβαπτίζονται σε 5xSSC (20x: 3M NaCl, 300mM Sodium Citrate, ρύθμιση pH 4.5 με κιτρικό οξύ) για να απομακρυνθούν οι καλυπτρίδες, για 5 λεπτά στους 72°C και στη συνέχεια μεταφέρονται σε 0.2x SSC, στους 72°C για 1 ώρα. Ακολουθούν 2 πλυσίματα με διάλυμα B1 (0.1M Tris-Cl pH 7.5, 0.15M NaCl) για 5 λεπτά το καθένα και επώαση σε διάλυμα παρεμπόδισης (blocking solution) (10% FBS σε B1) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος πραγματοποιείται επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα για τη διγοξυγενίνη το οποίο είναι συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση (Anti-DIG-AP Fab fragments, Roche). Το αντίσωμα χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:5000 σε 1% FCS σε B1 και η επώαση πραγματοποιείται ολονυκτίως στους 4°C.

iii) Πλυσίματα και εμφάνιση

Αρχικά πραγματοποιούνται 3 πλύσεις σε διάλυμα B1, για 5 λεπτά η κάθε μια και στη συνέχεια 3 πλύσεις σε διάλυμα B2 (0.1M Tris pH 9.5, 1M NaCl, 50mM MgCl₂) για 10 λεπτά η κάθε μια (όλες οι πλύσεις σε θερμοκρασία περιβάλλοντος). Η αντίδραση της εμφάνισης πραγματοποιείται στο σκοτάδι έως ότου παρουσιαστεί ικανοποιητική χρώση και γίνεται ως εξής: επώαση των τομών σε διάλυμα B3 [(0.1M Tris pH 9.5, 1M NaCl, 50mM MgCl₂, 75mg/ml NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride, Roche), 50mg/ml BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3 Indolyl phosphate, 4-toluidine salt, Roche)]. Για την παύση της αντίδρασης, πραγματοποιούνται πολλαπλές πλύσεις σε 1x PBS και κάλυψη με διάλυμα 10% ζελατίνη-10% γλυκερόλη. [Στην περίπτωση που έχουν χρησιμοποιηθεί τομές παραφίνης, μετά το τέλος της αντίδρασης εμφάνισης πραγματοποιείται αφυδάτωση μέσα από διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης και κάλυψη με συνθετική ακρυλακρική ρητίνη (Entellan, AlterChem)].

2.25 Ανοσοϊστοχημική μελέτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού (BrdU)

i) Ενδοπεριτοναϊκή ένεση BrdU σε ποντικό

Το BrdU solution (Bromodeoxyuridine, Sigma), παρασκευάζεται διαλυτοποιώντας 10mg/ml σκόνη BrdU σε στείρο διάλυμα 1xPBS (10x: 0.4M Na₂HPO₄, 0.05M NaH₂PO₄, 1.5M NaCl, pH7.4). Η διάλυση γίνεται στους 37°C και το διάλυμα διατηρείται στους -20°C μέχρι τη χρήση του. Αρχικά το ζώο ζυγίζεται (στη συγκεκριμένη περίπτωση, έγκυες θηλυκές ή νεογέννητα μέχρι 2 ημερών) και ενύεται με 0.1mg BrdU solution / g βάρους, χρησιμοποιώντας σύριγγα ινσουλίνης και βελόνα διαμέτρου 30G. Στην περίπτωση των εγκύων, η ένεση πραγματοποιείται 2 ημέρες πριν από το αναπτυξιακό στάδιο που πρόκειται να μελετηθεί (π.χ. εάν πρόκειται να γίνει μελέτη σε στάδιο E16.6, τότε η ένεση γίνεται την E14.5). Στην περίπτωση των νεογέννητων, τα ζώα θυσιάζονται 2 ώρες μετά την ένεση, ξεπλένονται σε παγωμένο 1xPBS και μονιμοποιούνται στους 4°C ολονυκτίως μέσα σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεϋδη σε 1xPBS. (όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.18).

ii) Ανοσοϊστοχημεία BrdU σε κρυτομές

Οι τομές μεταφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά και στη συνέχεια ξεπλένονται σε 1xPBS για 10 λεπτά. Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα 2N HCl για 45 λεπτά και εξουδετέρωση σε διάλυμα 0.1M Sodium Borate (55% 0.2M Boric Acid, 45% 0.05M Borax), pH 8.5, για 20 λεπτά με μια εναλλαγή ενδιάμεσα. Κατόπιν, πραγματοποιούνται 2 πλυσίματα σε διάλυμα 1xPBS και ακολουθεί η διαδικασία ανοσοφθορισμού όπως περιγράφεται στη ενότητα 2.26ί.

2.26 Ανοσοφθορισμός και ανοσοεντοπισμός σε ιστολογικές τομές

i) Ανοσοφθορισμός σε τομές ιστών/εμβρύων (εκτός εγκεφάλων) και σε ευκαρυωτικά κύτταρα

Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται τομές παραφίνης, προηγείται αποπαραφίνωση και ενυδάτωση των τομών μέσα από ξυλόλη και διαλύματα αιθανόλης σταδιακά μειούμενης συγκέντρωσης. Όλες οι πλύσεις που αναφέρονται στην ακόλουθη διαδικασία πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά η κάθε μια. Αρχικά οι τομές ξεπλένονται 3 φορές σε διάλυμα Α [0.05% (v/v) Tween σε φωσφορικό διάλυμα κιτρικού οξέος (77.1mM Na₂HPO₄ – 61.45mM Citric acid buffer, pH 4.0)] (Pavlakis *et al.*, 2008). Στη συνέχεια επωάζονται με επαρκή ποσότητα διαλύματος Β (0.1% Triton σε φωσφορικό διάλυμα κιτρικού οξέος, pH 4.0) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα ξεπλένονται ξανά 3 φορές σε διάλυμα Α. Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα παρεμπόδισης [0.1 M Tris-Cl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5% blocking reagent (PerkinElmer)] σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και ολονύκτια επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση, σε διάλυμα παρεμπόδισης, στους 4°C. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιούνται 3 πλύσεις σε διάλυμα C (0.05% (v/v) Tween σε 1xPBS) και έπειτα οι τομές επωάζονται με το δευτερογενές αντίσωμα, κατάλληλα αραιωμένο σε διάλυμα παρεμπόδισης, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθούν 3 πλύσεις σε διάλυμα C και στη συνέχεια πραγματοποιείται χρώση των πυρήνων των κυττάρων είτε με DAPI (Research Organics), είτε με Propidium Iodide (Research Organics). Στην πρώτη περίπτωση οι τομές επωάζονται με DAPI κατάλληλη αραιώση σύμφωνα με τις υποδείξεις της εταιρείας (συνήθως 1:1000) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη δεύτερη περίπτωση, λόγω του ότι το Propidium Iodide βάφει και το RNA αλλά και το DNA, αρχικά πραγματοποιείται επώαση με 0.01mg RNase A σε διάλυμα C για 30 λεπτά στους 37°C, πλύση σε διάλυμα C και επώαση με Propidium Iodide αραιωμένο σε διάλυμα C (σε αραιώση που προτείνεται από την εταιρεία) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα από τη χρώση των πυρήνων, οι τομές ξεπλένονται 3 φορές σε διάλυμα C και στη συνέχεια καλύπτονται με επαρκή

ποσότητα Mowiol Solution [Για 250ml: 24g analytical grade glycerol, 9.6g Mowiol 4-88 (Calbiochem), 24ml ddH₂O, 0.2M Tris-Cl, pH 8.5) και τοποθέτηση καλυπτρίδας.

ii) Ανοσοφθορισμός σε τομές ιστών και εμβρύων με ενίσχυση του σήματος

Σε περιπτώσεις όπου κρίθηκε απαραίτητη η ενίσχυση του σήματος φθορισμού, χρησιμοποιήθηκαν συνδυαστικά τα ακόλουθα Kit: 1) Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories), 2) TSA Fluorescein System (PerkinElmer). Η διαδικασία είναι η εξής: Αρχικά οι τομές επωάζονται σε διάλυμα απενεργοποίησης της δράσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης (0.3% H₂O₂, 49.85% Μεθανόλη, 49.85% 1xPBS), για 15 λεπτά, στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια η διαδικασία είναι ίδια με αυτήν που περιγράφεται στην πιο πάνω ενότητα, μέχρι και την προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος. Ακολούθως, πραγματοποιούνται πλύσεις σε διάλυμα C και επώαση με το δευτερογενές βιοτινιωμένο αντίσωμα (Vectastain Elite ABC Kit) σε αραιώση 1:200 σε διάλυμα παρεμπόδισης, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Όσο πραγματοποιείται η επώαση με το αντίσωμα, προχωράμε στη δημιουργία του μακρομοριακού συμπλόκου Αβιδίνης-βιοτινιωμένης υπεροξειδάσης (Vectastain Elite ABC Kit) (1:50 Avidin, 1:50 Biotin, σε διάλυμα παρεμπόδισης). Ο χρόνος που απαιτείται για να δημιουργηθεί το σύμπλοκο αυτό είναι 30 λεπτά και ο σχηματισμός του πραγματοποιείται στους 4°C, στο σκοτάδι. Ακολουθούν 3 πλύσεις σε διάλυμα C και επώαση με το σύμπλοκο Αβιδίνης-Βιοτίνης, αυστηρά για 20 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, στο σκοτάδι. Κατόπιν, πραγματοποιείται μια πλύση σε διάλυμα C και επώαση με το αντιδραστήριο Tyramide (TSA Fluorescein System) αραιωμένο 1:50-1:200 σε Amplification Diluent (TSA Fluorescein System), για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Τέλος πραγματοποιούνται 3 πλύσεις σε διάλυμα C και η διαδικασία χρώσης των πυρήνων και κάλυψης.

iii) Ανοσοφθορισμός σε τομές εγκεφάλων

Αρχικά πραγματοποιούνται πλύσεις των τομών σε 0.1% Tween σε 1xPBS (10x: 0.4M Na₂HPO₄, 0.05M NaH₂PO₄, 1.5M NaCl, pH7.4). (Όλες οι πλύσεις στη συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιούνται 3 φορές, στο προαναφερθέν διάλυμα, σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 λεπτά η κάθε μια). Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα παρεμπόδισης (0.1% Triton, 1% FCS σε 1xPBS) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, και επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα κατάλληλα αραιωμένο σε διάλυμα παρεμπόδισης, ολονύκτια στους 4°C. Την επομένη, πραγματοποιούνται πλύσεις, επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα κατάλληλα αραιωμένο σε διάλυμα παρεμπόδισης, σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες και ξανά πλύσεις, ενώ τέλος ακολουθεί η διαδικασία χρώσης των πυρήνων και κάλυψης.

iv) Ανοσοεντοπισμός με χρώση υπεροξειδάσης

Στη συγκεκριμένη μέθοδο ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 2.26ii μέχρι και το στάδιο προσθήκης του μακρομοριακού συμπλόκου αβιδίνης-βιοτινιλιωμένης υπεροξειδάσης. Στη συνέχεια, και αφού πραγματοποιηθούν 3 πλύσεις σε διάλυμα 0.05% (v/v) Tween σε 1xPBS, οι τομές επωάζονται με το χρωμογόνο υπόστρωμα DAB [Σε 10ml H₂O, 1 ταμπλέτα DAB και 1 ταμπλέτα Urea Hydrogen Peroxide, (Sigma)]. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στο σκοτάδι για διάστημα 2-10 λεπτών, μέχρι να παρουσιαστεί ικανοποιητική χρώση. Τέλος, οι τομές αφυδατώνονται σε διαλύματα 70, 95 και 100% αιθανόλης (2 λεπτά παραμονή σε κάθε διάλυμα), εμβαπτίζονται σε ξυλένιο (για 15 λεπτά) και καλύπτονται με συνθετική ακρυλακρική ρητίνη (Entellan, AlterChem) και τοποθέτηση καλυπτρίδας.

Διαδικασίες χειρισμού ευκαρυωτικών κυττάρων - κυτταροκαλλιέργειες

2.27 Κυτταροκαλλιέργειες

i) Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές COS7 και HEK-293 χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών Frem3 και Fras1. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σχηματίζοντας μονοστοιβάδες, σε θρεπτικό μέσο DMEM (Invitrogen) στους 37°C παρουσία 5% CO₂.

ii) Διατήρηση κυτταροκαλλιεργειών

Η κυτταροκαλλιέργεια διατηρείται σε τρυβλία διαμέτρου 3-10cm. Τα κύτταρα διαχωρίζονται και συλλέγονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης, όταν δηλαδή έχουν καλύψει το 70% της διαθέσιμης επιφάνειας. Κατά προσέγγιση, η ανανέωση της καλλιέργειας πραγματοποιείται κάθε 2-3 μέρες. Η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια καλλιέργειας γίνεται με τρυψίνη ως εξής: μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού, τα κύτταρα ξεπλένονται με ικανή ποσότητα διαλύματος 1xPBS και επωάζονται με 2ml διαλύματος τρυψίνης προθερμασμένου στους 37°C. Μόλις αρχίσει η αποκόλληση των κυττάρων (2-10 λεπτά) προστίθεται θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με FBS που αναστέλλει τη δράση της τρυψίνης (8ml). Η συλλογή των κυττάρων γίνεται με φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές / λεπτό, στους 4°C για 5 λεπτά, και η επαναιώρησή τους σε 5ml θρεπτικό μέσο. Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε τρυβλία σε ποσότητα εξαρτώμενη από τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων.

iii) Κρυοδιατήρηση κυττάρων και επανακαλλιέργεια

Τα κύτταρα πρέπει να φτάσουν σταδιακά στην τελική θερμοκρασία κατάψυξης, ώστε να προηγηθεί η αφυδάτωση του ενδοκυτταρικού σχηματισμού κρυστάλλων. Ως κρυοπροστατευτικό μέσο χρησιμοποιείται το DMSO (Dimehtylsulfoxide, Cell culture

grade, Sigma). Η κατάψυξή τους γίνεται όταν βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης (~70% κάλυψη της διαθέσιμης επιφάνειας για κύτταρα που αναπτύσσονται σε μονοστοιβάδα). Μετά το ξέπλυμα, την τρυψινόλυση και την συλλογή τους, επαναιωρούνται σε DMEM με FBS σε συγκέντρωση 10^6 - 10^7 /ml. Στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος 20% DMSO (σε DMEM με 10% FBS). Ακολουθεί μεταφορά του δείγματος σε κατάλληλο φιαλίδιο (Cryotube, Nunc), η ολονύκτια επώασή του στους -80°C και η αποθήκευσή του σε δεξαμενή υγρού αζώτου στους -196°C έως -156°C .

Τα κύτταρα που έχουν καταψυχθεί σε υγρό άζωτο και πρόκειται να επανακαλλιεργηθούν, μεταφέρονται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 λεπτό (μέχρι την πλήρη τήξη του θρεπτικού). Η ταχεία τήξη εμποδίζει τον σχηματισμό ενδοκυτταρικών κρυστάλλων κατά τη διαδικασία της ενυδάτωσής τους. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση του DMSO, επαναιώρησή τους σε κατάλληλο όγκο DMEM με 10% FBS και μεταφορά τους σε τρυβλίο καλλιέργειας.

2.28 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με πλασμιδιακό DNA

Με την παροδική διαμόλυνση, πραγματοποιείται εισαγωγή αντιγράφων του DNA στο κύτταρο χωρίς να γίνεται ενσωμάτωση στο γονιδίωμα. Με αυτή την μέθοδο επιτυγχάνονται υψηλά επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου, η παραγωγή όμως του προϊόντος είναι παροδική. Ωστόσο, τα επίπεδα των πρωτεϊνών είναι ικανοποιητικά ώστε να χρησιμοποιηθούν σε βιοχημικές μελέτες, σε πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού, σε ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων κ.τ.λ.

Η μέθοδος της παροδικής διαμόλυνσης που ακολουθήθηκε στηρίζεται στην συνκατακρήμνηση του DNA με $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Graham FL and Van der EB AJ, 1973). Κατά αυτήν, τα αντίστοιχα μόρια cDNA κλωνοποιούνται σε κατάλληλους φορείς έκφρασης ώστε να βρίσκονται υπό το έλεγχο υποκινητών που έχουν δυνατότητα ισχυρής ενεργοποίησης (π.χ. CMV, SV40). Η μέθοδος στηρίζεται σε θετικά φορτισμένα μόρια-φορείς που σχηματίζουν σύμπλοκα υπό μορφή λεπτόκοκκου ιζήματος με το DNA και

στη συνέχεια προσκολλώνται στην κυτταρική μεμβράνη και εισέρχονται στο κύτταρο με ενδοκύττωση. Το ποσοστό των διαμολυσμένων κυττάρων ανέρχεται κυμαίνεται μεταξύ 10-30%, ενώ η απόδοση εξαρτάται κυρίως από την καθαρότητα του πλασμιδιακού DNA και την καλή κατάσταση των κυττάρων. Η διαμόλυνση πραγματοποιείται 6-16 ώρες μετά την επίστρωση των κυττάρων ενώ η κάλυψη της διαθέσιμης επιφάνειας της καλλιέργειας είναι 60%.

Για τρυβλίο διαμέτρου 3cm η διαδικασία έχει ως εξής: στο διάλυμα του DNA (~3-4μg συνολικά) προστίθενται 15.5μl CaCl₂ και ρυθμίζεται ο όγκος στα 125μl. Το διάλυμα αυτό προστίθεται σταδιακά και με ταυτόχρονη περιδίνηση σε 125μl διαλύματος 2xHBS (280mM NaCl, 50mM Hepes, 5mM Na₂HPO₄, pH 7.12). Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά έτσι ώστε να σχηματιστεί το λεπτόκοκκο ίζημα Ca₃(PO₄)₂-DNA, το οποίο και προστίθεται στάγδην στα κύτταρα. Η επώαση των κυττάρων με το ίζημα, πραγματοποιείται για 24-48 ώρες, ενώ στην περίπτωση του 48ωρου, ανανεώνεται το θρεπτικό των κυττάρων πάνω στις 24 ώρες.

2.29 Πλασμιδιακές κατασκευές

i) Κατασκευή Νο 1 για την στοχευμένη απενεργοποίηση του *Frem3*

Η στρατηγική κλωνοποίησης γενωμικών τμημάτων του *Frem3*, με σκοπό τη δημιουργία της πρώτης κατασκευής στόχου για την απενεργοποίηση του γονιδίου, περιγράφεται ως εξής:

Βήμα 1. PCR αντιδράσεις για την απομόνωση των κατάλληλων τμημάτων upstream από το ATG του Frem3 (Εικ. 1a).

Συνολικά απομονώσαμε με PCR 2.3kb upstream και 6.2kb downstream, από την περιοχή έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου *Frem3*.

Η PCR 1 έγινε με τους εκκινητές Pr1 /Pr2 (τμήμα 1)

Η PCR 2 έγινε με τους εκκινητές Pr3 /Pr4 (τμήμα 2)

Βήμα 2. Κλωνοποιήσεις των επιμέρους κομματιών σε πλασμιδιακούς φορείς και τελική συνένωσή τους σε έναν φορέα (Εικ. 1a).

Κατασκευή 1. Το τμήμα 1 που προκύπτει από την πρώτη PCR, κλωνοποιήθηκε απευθείας στον πλασμιδιακό φορέα pGEM T-easy (Promega).

Κατασκευή 2. Το τμήμα που προκύπτει από τη δεύτερη PCR, τεμαχίστηκε με την ακόλουθη πέψη: AvaI (Klenow)/PstI και ενσωματώθηκε στην κατασκευή 1, στις θέσεις Sall (Klenow)/PstI.

Κατασκευή 3. Η κατασκευή 2 επώαστηκε με τα περιοριστικά ένζυμα ApaI/SacI. Το τμήμα εκείνο που περιέχει τις γενωμικές αλληλουχίες του *Frem3* απομονώθηκε από τον φορέα pGEM T-easy (Promega) και ενσωματώθηκε στον φορέα pEGFP-C1 (Clontech), με στόχο την ευκολότερη διαχείριση του στα επόμενα στάδια.

*Βήμα 3. PCR αντιδράσεις για την απομόνωση των κατάλληλων τμημάτων downstream από το ATG του *Frem3* (Εικ. 1b).*

Η PCR 3 έγινε με τους εκκινητές Pr5 /Pr6 (τμήμα 3)

Η PCR 4 έγινε με τους εκκινητές Pr7 /Pr8 (τμήμα 4)

Η PCR 5 έγινε με τους εκκινητές Pr9 /Pr10 (τμήμα 5)

Η PCR 6 έγινε με τους εκκινητές Pr11 /Pr12 (τμήμα 6)

Βήμα 4. Κλωνοποιήσεις των επιμέρους κομματιών σε πλασμιδιακούς φορείς και τελική συνένωσή τους σε έναν φορέα (Εικ. 1b-1c).

Κατασκευή 4. Το τμήμα 4 προκύπτει από την τέταρτη PCR επώαστηκε με τα ένζυμα EcoRV/SpeI και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript-KSII (+/-) (Fermentas).

Κατασκευή 5. Το τμήμα 5 που προέκυψε από την πέμπτη PCR κλωνοποιήθηκε απευθείας στον πλασμιδιακό φορέα pGEM T-easy (Promega).

Κατασκευή 6. Το τμήμα 6 που προκύπτει από την έκτη PCR κόπηκε με τα ένζυμα EcoRV/HpaI και ενσωματώθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript-KSII (+/-) (Fermentas) στη θέση EcoRV (CIP).

Κατασκευή 7. Πέψη της κατασκευής 5 με XhoI/EcoRV, απομόνωση των γενωμικών τμημάτων του *Frem3* και ενσωμάτωσή τους στην κατασκευή 6 στις αντίστοιχες θέσεις.

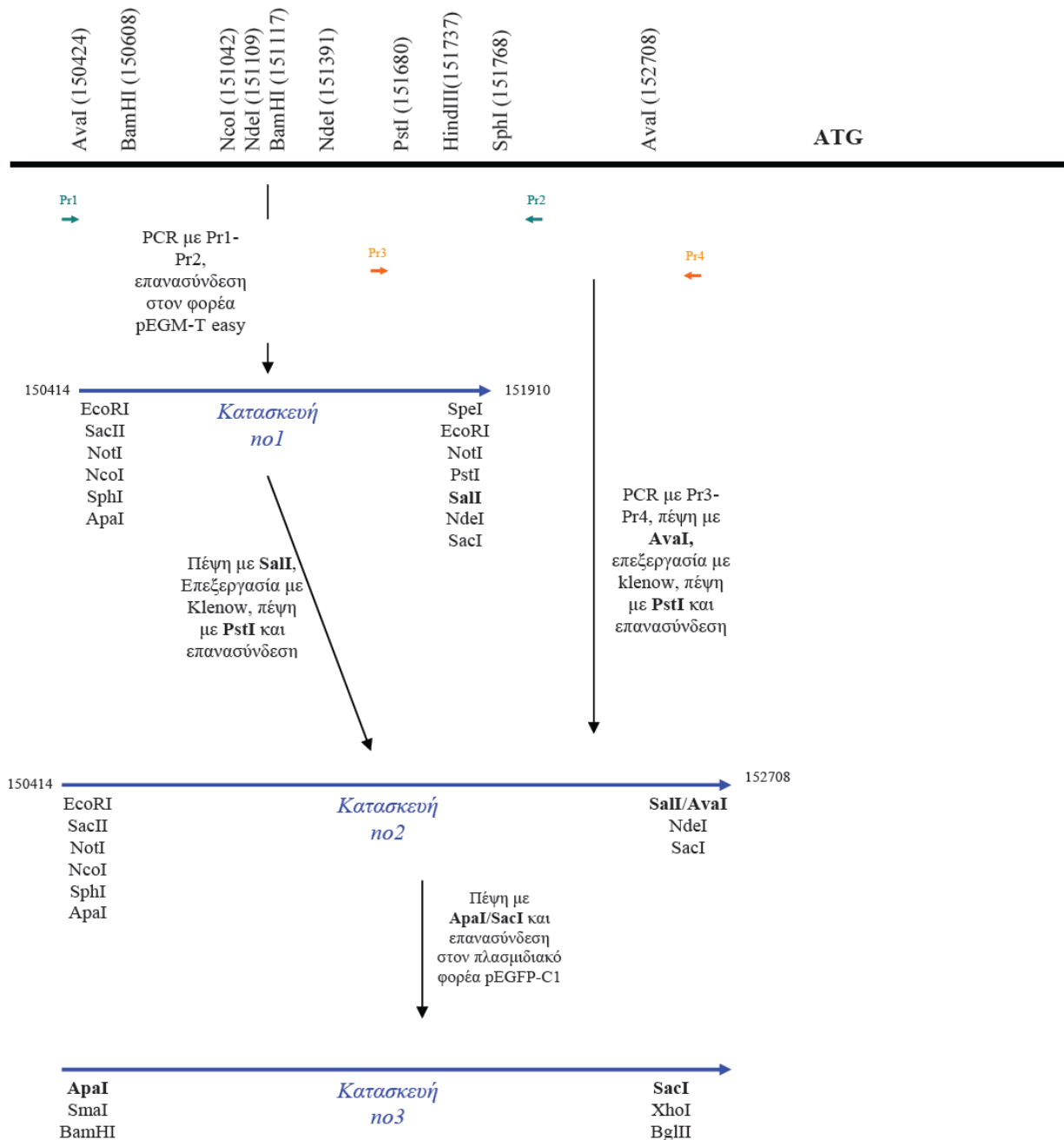
Κατασκευή 8. Το τμήμα 3 που προκύπτει από την τρίτη PCR επώαστηκε με τα ένζυμα ApaI/EcoRV. Το κομμάτι που περιέχει τις γενωμικές αλληλουχίες του *Frem3* απομονώθηκε και ενσωματώθηκε στην κατασκευή 4.

Κατασκευή 9. Η κατασκευή 7 κόπηκε με τα ένζυμα XhoI/NotI. Το τμήμα που περιέχει τις γενωμικές αλληλουχίες του *Frem3* απομονώθηκε και ενσωματώθηκε στην κατασκευή 8 στις αντίστοιχες θέσεις.

Κατασκευή 10. Πέψη της κατασκευής 3 με τα ένζυμα EcoRI (Klenow)/XhoI (Klenow), απομόνωση των γενωμικών *Frem3* τμημάτων (150414-152716 bp) και ενσωμάτωσή τους στον φορέα pBluescript loxp-NEO-loxp στη θέση SalI (Klenow). Ακόμα, πέψη της κατασκευής 9 με EcoRI (Klenow), απομόνωση των γενωμικών *Frem3* αλληλουχιών και ενσωμάτωσή τους στην παραπάνω κατασκευή στη θέση EcoRI (Klenow/CIP).

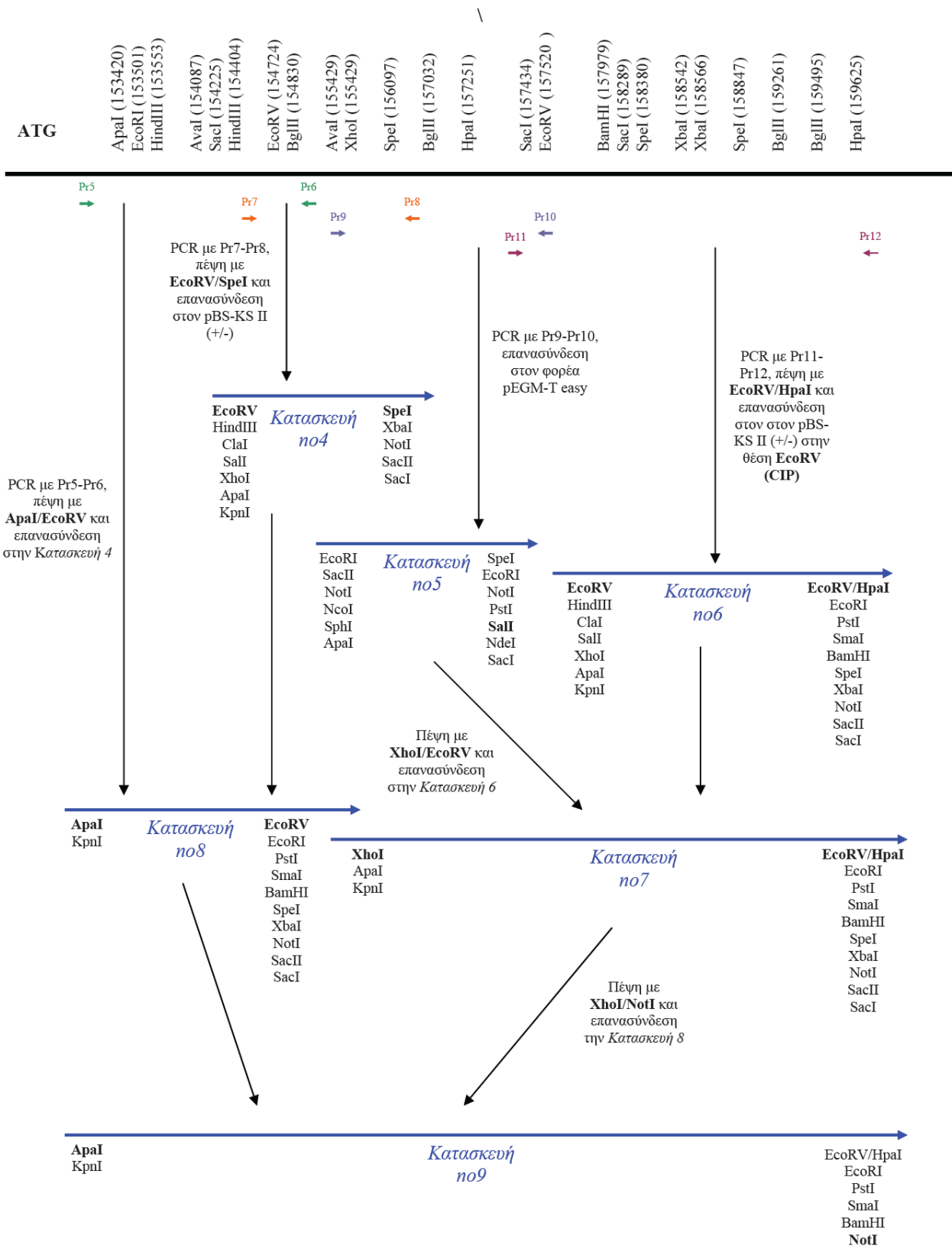
a

Γενομική περιοχή του *Frem3* πριν από το ATG



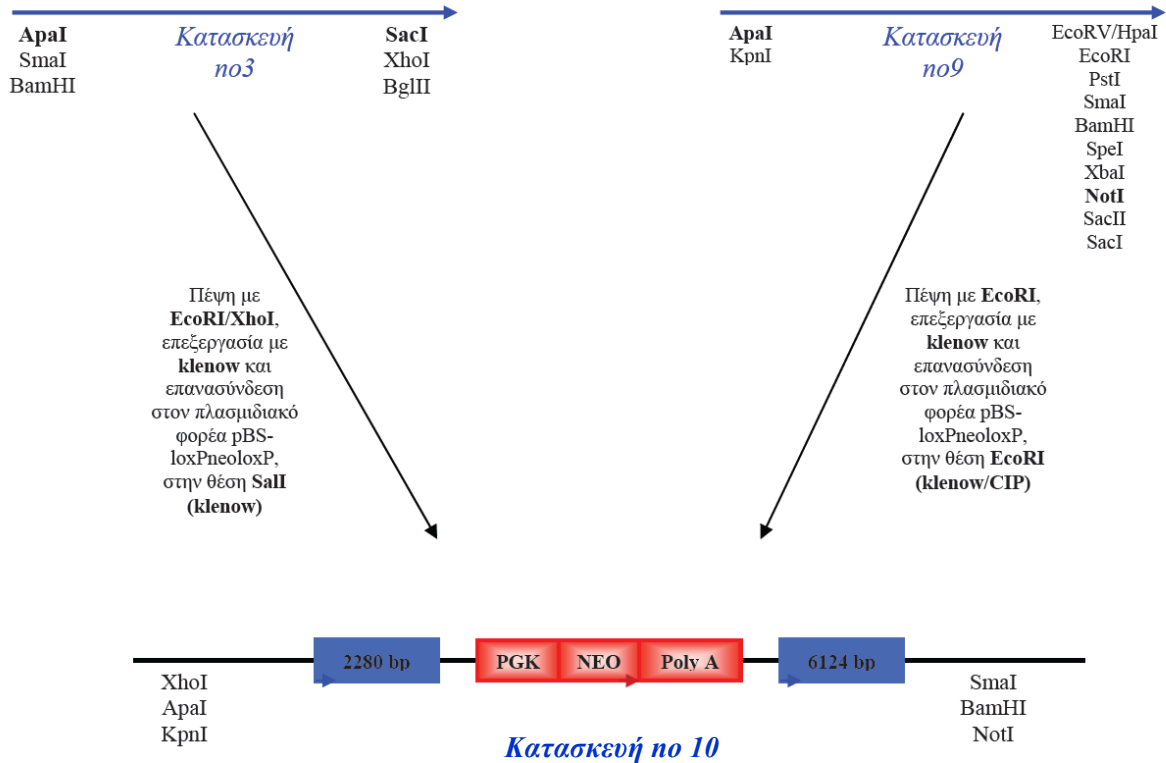
b

Γενωμική περιοχή του Frem3 μετά από το ATG



c

Τελική κατασκευή για το *Frem3* knockout



Εικόνα 1. Κατασκευή 1^η για την απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3*

Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας κατασκευής στόχου και της ενσωμάτωσης της κασέτας που περιέχει στο γονίδιο *Frem3*. **a)** Δημιουργία “Κατασκευής 3”. Εισαγωγή των γενωμικών αλληλουχιών του *Frem3* από 150414-152708 bp, στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1 στις θέσεις ΑραI/SacI (5’ περιοχή ομολογίας). **b)** Δημιουργία “Κατασκευής 9”. Εισαγωγή των γενωμικών τμημάτων του *Frem3* από 153420-159625 bp, στον φορέα pBS-KS II (+/-) στις θέσεις ΑραI/(EcoRV-HpaI) (3’ περιοχή ομολογίας). **c)** Τελική κατασκευή όπως προκύπτει έπειτα από την ένθεση των κατασκευών 3 και 9, στον φορέα pBluescriptI loxP-Neo^r-loxP. Η κατασκευή στόχος περιέχει την κασέτα νεομυκίνης που εισάγεται στο πρώτο εξόνιο του *Frem3* και αντικαθιστά την περιοχή από 152708-153420 bp, συμπεριλαμβανομένου και του ATG.

ii) Κατασκευή Νο 2 για την στοχευμένη απενεργοποίηση του *Frem3*

Η στρατηγική κλωνοποίησης γενωμικών τμημάτων του *Frem3*, με σκοπό τη δημιουργία της κατασκευής στόχου Νο 2 για την απενεργοποίηση του γονιδίου, περιγράφεται ως εξής:

Βήμα 1. PCR αντιδράσεις για την απομόνωση των κατάλληλων τμημάτων upstream και downstream από το ATG του Frem3 (Εικ. 2a-2b).

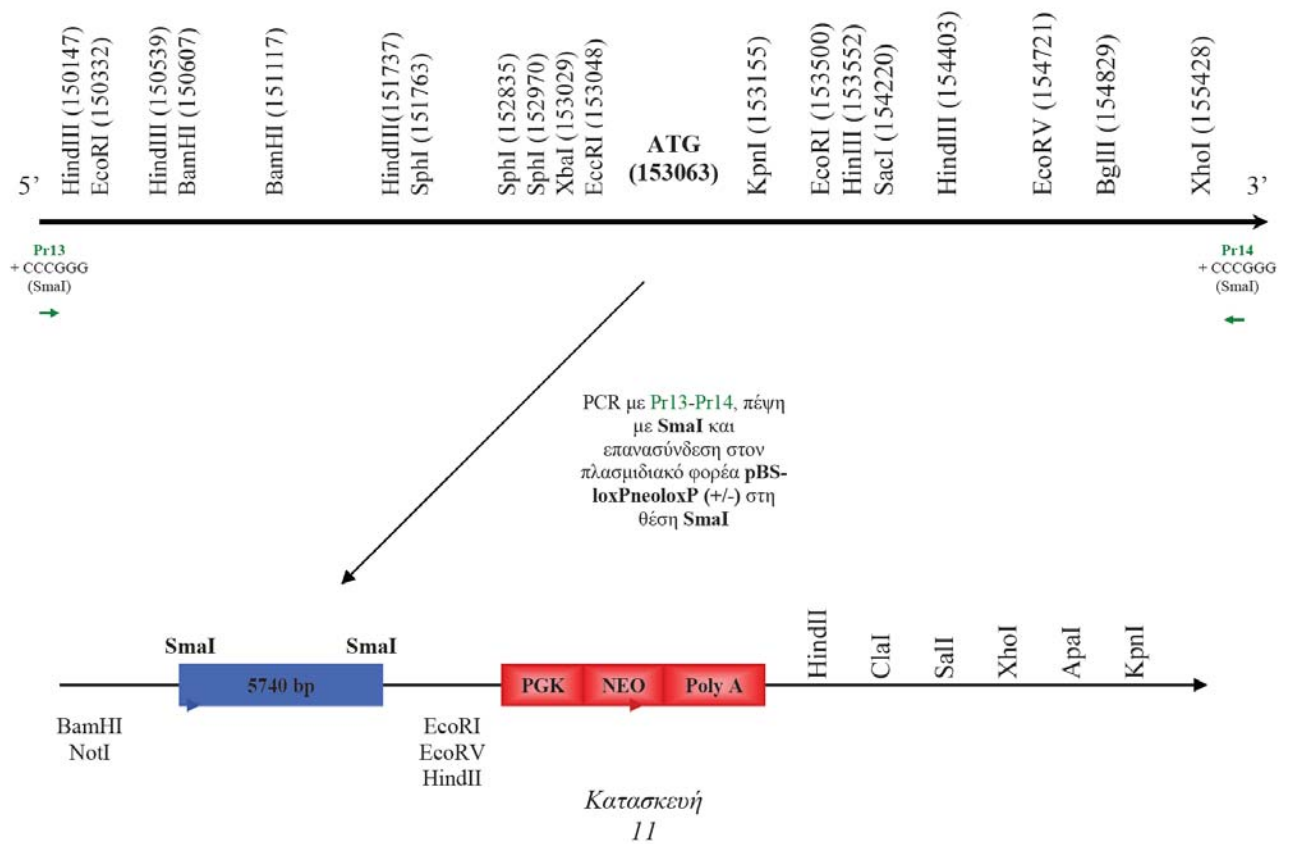
Συνολικά απομονώσαμε με PCR 5740bp upstream και 5658bp downstream, από την περιοχή έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου *Frem3*.

Η PCR 1 έγινε με τους εκκινητές Pr13 / Pr14 (τμήμα 1)

Η PCR 2 έγινε με τους εκκινητές Pr15 / Pr16 (τμήμα 2)

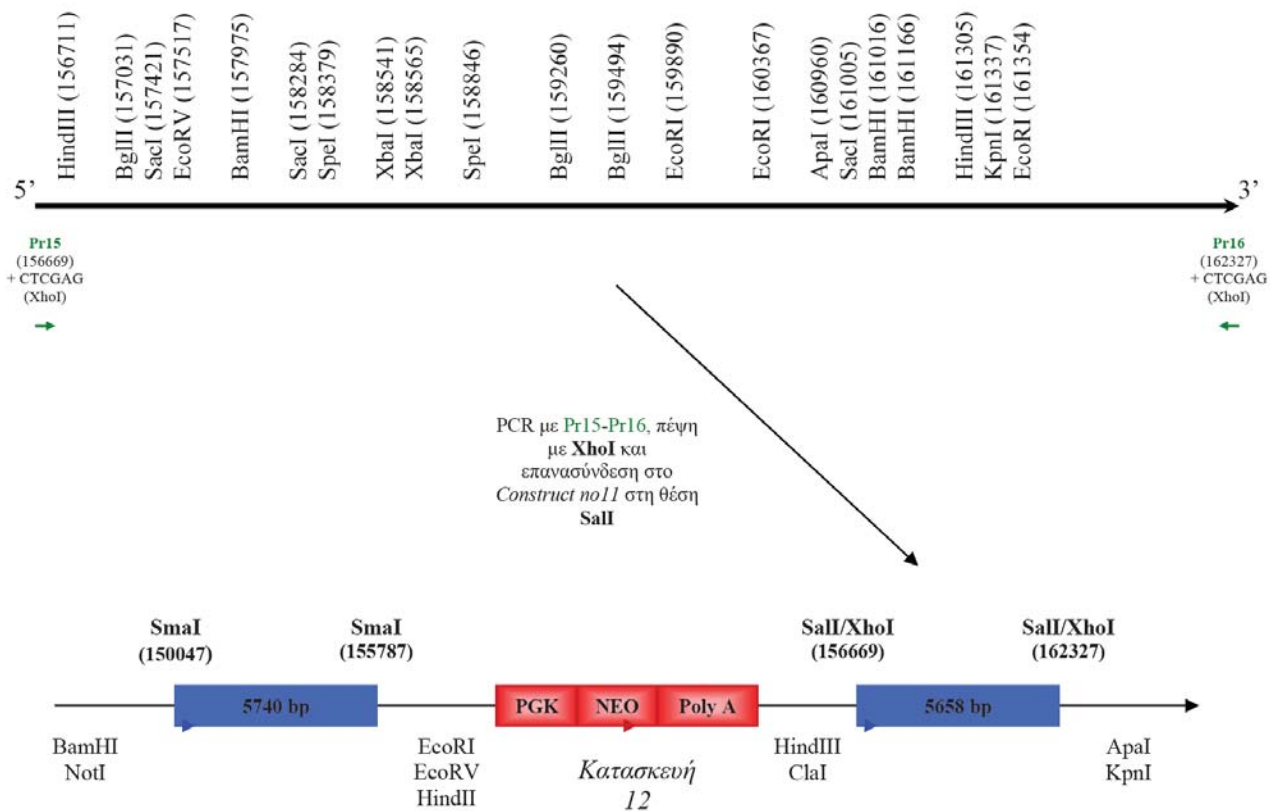
Κατασκευή 11. Το τμήμα που προέκυψε από την πρώτη PCR, επώαστηκε με το περιοριστικό ένζυμο SmaI (περιοριστική θέση που εισήχθη στους εκκινητές Pr13-Pr14) και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε στη αντίστοιχη θέση του πλασμιδιακού φορέα pBluescript loxp-Neo^r-loxp.

Κατασκευή 12. Το κομμάτι που προέκυψε από τη δεύτερη PCR κόπηκε με το ένζυμο XhoI (περιοριστική θέση που εισήχθη στους εκκινητές Pr15-Pr16) και στη συνέχεια εντέθηκε στη θέση SalI του πλασμιδιακού φορέα pBluescript loxp-Neo^r-loxp.



Εικόνα 2α. Κατασκευή 2^η για την απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3*

Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας κατασκευής στόχου και της ενσωμάτωσης της κασέτας που περιέχει στο γονίδιο *Frem3*. Εισαγωγή των γενωμικών αλληλουχιών του *Frem3* από 150047-155787 bp, στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript loxp-Neo^r-loxp στη θέση SmaI (Κατασκευή 11). Σημειώνονται οι εκκινητές Pr13/Pr14 που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των γενωμικών αλληλουχιών του *Frem3*. Το προϊόν που προέκυψε, επώαστηκε με το ένζυμο SmaI και ενσωματώθηκε στον φορέα pBluescript loxp-Neo^r-loxp.



Εικόνα 2b. Κατασκευή 2^η για την απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3*

Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας κατασκευής στόχου και της ενσωμάτωσης της κασέτας που περιέχει στο γονίδιο *Frem3*. Εισαγωγή των γενωμικών τμημάτων του *Frem3* από 156669-162327 bp, στην “Κατασκευή 11” (Κατασκευή 12). Η κατασκευή στόχος περιέχει την κασέτα νεομυκίνης που εισάγεται στο πρώτο εξόνιο του *Frem3* και αντικαθιστά την περιοχή από 155808-156669 bp, συμπεριλαμβανομένου και του ATG.

iii) Κατασκευή Νο 3 για την στοχευμένη απενεργοποίηση του *Frem3*

Η στρατηγική κλωνοποίησης γενωμικών τμημάτων του *Frem3*, με σκοπό τη δημιουργία της κατασκευής στόχου Νο 3 για την απενεργοποίηση του γονιδίου, περιγράφεται ως εξής:

Βήμα 1. PCR αντιδράσεις για την απομόνωση των κατάλληλων τμημάτων upstream και downstream από το ATG του Frem3 (Εικ. 3).

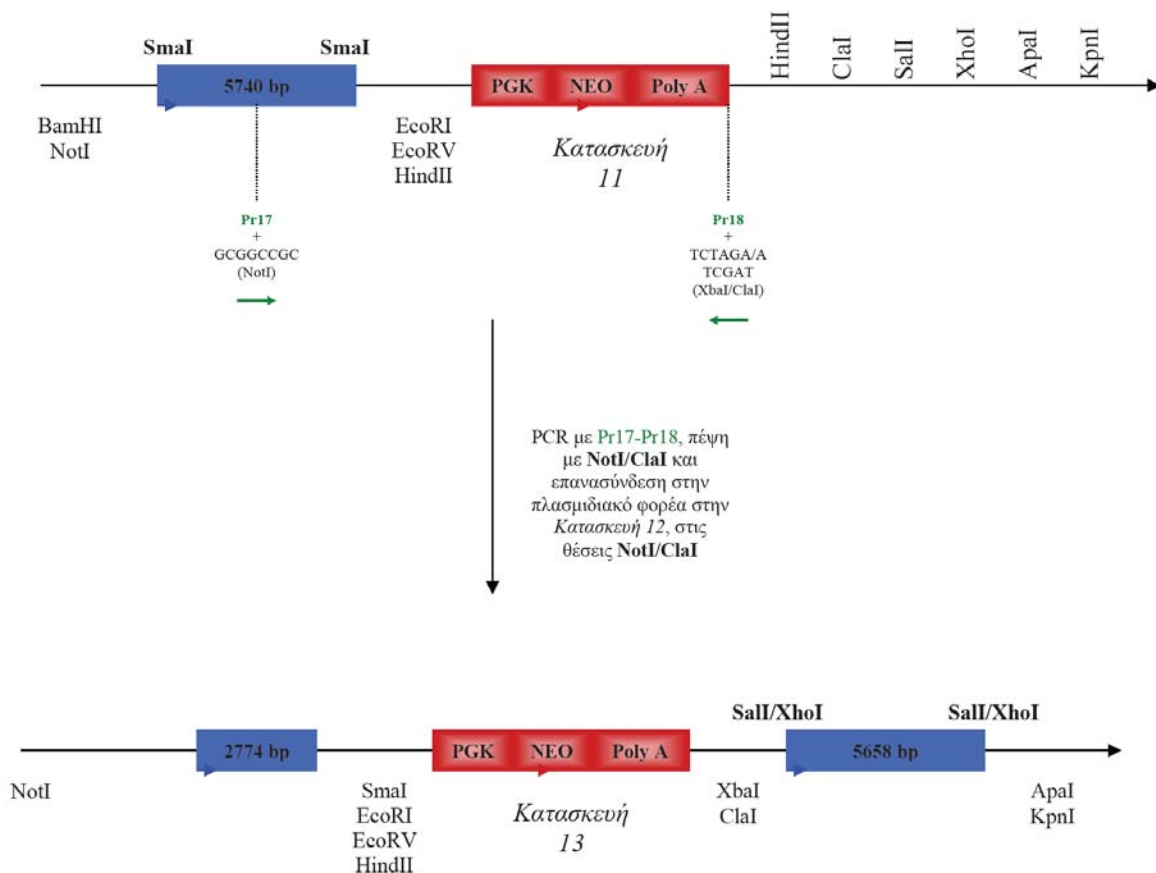
Συνολικά απομονώθηκαν με PCR 2774bp upstream και 5658bp downstream, από την περιοχή έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου *Frem3*.

Η PCR έγινε με τους εκκινήτες Pr17/Pr18 (τμήμα 1). Ο εκκινήτης Pr17 εντοπίζεται στη θέση 153507 bp του γενωμικού DNA του *Frem3* και φέρει την περιοριστική θέση NotI. Ο εκκινήτης Pr18 κατασκευάστηκε στο τέλος (1883 bp) του PGK terminator, του πλασμιδιακού φορέα pBluescript loxp-Neo^r-loxp και φέρει τις περιοριστικές θέσεις XbaI και ClaI.

Κατασκευή 13. Για την πρώτη PCR αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως μητρικό DNA η “Κατασκευή 11”. Κατά συνέπεια, το κομμάτι που προκύπτει από τη συγκεκριμένη PCR, περιλαμβάνει με τη σειρά: 1) Γενωμικές αλληλουχίες του γονιδίου *Frem3* από 153507 έως 155787 bp, 2) αλληλουχίες του πολυσυνδέτη του φορέα pBluescript loxp-NEO-loxp με τις περιοριστικές θέσεις EcoRI, EcoRV και HindIII και 3) Την κασέτα με τον υποκινητή του PGK, το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη (Neo^r) και PGK terminator με τα σινιάλα λήξης της μεταγραφής. Το παραπάνω κομμάτι, επώαστηκε με τα περιοριστικά ένζυμα NotI/ClaI και εντέθηκε στην “Κατασκευή 12”, η οποία προηγουμένως είχε κοπεί με τα ένζυμα NotI/ClaI με σκοπό να απομακρυνθούν τα 5.7kb γενωμικών αλληλουχιών του *Frem3* που είχαμε ενθέσει προηγουμένως, καθώς επίσης και η κασέτα: “PGK promoter-Neo^r-PGK terminator”. Έτσι δημιουργήθηκε η “Κατασκευή 13” (κατασκευή-στόχος) η οποία περιέχει την κασέτα νεομυκίνης που εισάγεται στο πρώτο εξόνιο του *Frem3* και αντικαθιστά την ενδογενή περιοχή από

155808-156669 bp. Η κατασκευη-στόχος περιλαμβάνει: από τη μια μεριά 2774 bp του *Frem3*, και από τη άλλη μεριά 5658 bp, φτάνοντας μέχρι και λίγο παρακάτω από το τέλος του δεύτερου εξονίου.

Τελική κατασκευή για τη στοχευμένη απενεργοποίηση του *Frem3*



Εικόνα 3. Κατασκευή 3^η για την απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3*

Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας κατασκευής στόχου και της ενσωμάτωσης της κασέτας που περιέχει στο γονίδιο *Frem3*. Για τη δημιουργία της τελικής αυτής κατασκευής, αρχικά έγινε PCR χρησιμοποιώντας ως μητρικό DNA την “Κατασκευή 11” και εκκινητές Pr17/Pr18 οι οποίοι φέρουν τις θέσεις NotI και XbaI/ClaI αντίστοιχα. Η κατασκευη-στόχος περιέχει την κασέτα νεομυκίνης που εισάγεται στο πρώτο εξόνιο και αντικαθιστά την ενδογενή περιοχή από 155808-156669 bp. Έτσι, η κατασκευη-στόχος περιλαμβάνει: από τη μια μεριά 2774 bp του *Frem3* και από τη άλλη μεριά 5658 bp, φτάνοντας μέχρι και λίγο μετά το τέλος του δεύτερου εξονίου.

iv) Κατασκευές αντισωμάτων Fras1, Frem3

Κατασκευή 14 (Fras1-N1 Ab/pGEX-4T1).

Πλασμιδιακή κατασκευή για την παραγωγή αντισώματος ενάντια στο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης Fras1. Για την παραγωγή αυτού του αντισώματος, παράχθηκε το πεπτίδιο που αντιστοιχεί στις θέσεις 25-215 της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Fras1 (91bp-611bp αντιστοιχία cDNA). Το κομμάτι αυτό, το οποίο περιλαμβάνει τα τρία πρώτα μοτίβα Von Willebrand, απομονώθηκε με PCR (εκκινητές Pr40-Pr41) χρησιμοποιώντας ως μητρικό DNA, πλασμιδιακή κατασκευή που περιέχει ολόκληρο το cDNA του γονιδίου Fras1. Το τμήμα κόπηκε με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και XhoI (θέσεις οι οποίες υπάρχουν πάνω στους εκκινητές) και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEX-4T1 στις αντίστοιχες θέσεις.

Κατασκευή 15 (Frem3-N1/pGEX-4T1)

Πλασμιδιακή κατασκευή για την παραγωγή αντισώματος ενάντια στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης Frem3. Για την παραγωγή του συγκεκριμένου αντισώματος, παράχθηκε το πεπτίδιο που αντιστοιχεί στις θέσεις 243-471 της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Frem3 (θέσεις: 764-1446bp στο cDNA). Το τμήμα αυτό ανακτήθηκε με PCR, με τους εκκινητές Pr36-Pr37, χρησιμοποιώντας ως μητρικό DNA την κατασκευή 20. Αφού κόπηκε με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI/XhoI (θέσεις πάνω στους εκκινητές), κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις στον φορέα pGEX-4T1.

Κατασκευή 16 (Frem3-C1/pGEX-4T1)

Πλασμιδιακή κατασκευή για την παραγωγή αντισώματος ενάντια στο μέσον της πρωτεΐνης Frem3. Για την παραγωγή του συγκεκριμένου αντισώματος, παράχθηκε το πεπτίδιο που αντιστοιχεί στις θέσεις 964-1155 της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Frem3 (θέσεις: 2926-3498bp στο cDNA). Το τμήμα αυτό ανακτήθηκε με PCR, με τους εκκινητές Pr38-Pr39, χρησιμοποιώντας ως μητρικό DNA την κατασκευή 20. Αφού κόπηκε με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI/XhoI (θέσεις πάνω στους εκκινητές), κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις στον φορέα pGEX-4T1.

v) Κατασκευές για την κλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου Frem3

Κατασκευή 17 (Frem3 XbaI-BamHI / pGEM T-easy)

Η κατασκευή αυτή περιέχει τμήμα του cDNA του γονιδίου *Frem*, από τη θέση XbaI που βρίσκεται 33bp πριν από το ATG του γονιδίου, μέχρι και το τέλος του πρώτου εξονίου στη θέση 4957bp (BamHI). Το τμήμα αυτό ανακτήθηκε με PCR, με εκκινητές Pr30-Pr44 και χρησιμοποιώντας ως μητρικό DNA, γενομικό DNA ποντικού από 129SV ES κύτταρα. Το τεμάχιο απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε απευθείας στον φορέα pGEM T-easy (Εικ. 4).

Κατασκευή 18 (Frem3 BamHI-Stop / pGEM T-easy)

Η κατασκευή αυτή περιέχει τμήμα του cDNA του γονιδίου *Frem*, από τη θέση BamHI στο τέλος του πρώτου εξονίου στη θέση 4957bp (BamHI), μέχρι και λίγο μετά το σημείο λήξης της μεταγραφής στη θέση 6887bp. Το τμήμα αυτό ανακτήθηκε με PCR, με εκκινητές Pr45-Pr46 και χρησιμοποιώντας ως μητρικό DNA, συνολικό cDNA ποντικού που προέκυψε από έμβρυα E14.5. Το τεμάχιο απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε απευθείας στον φορέα pGEM T-easy (Εικ. 4).

Κατασκευή 19 (Frem3 total cDNA / pGEM T-easy)

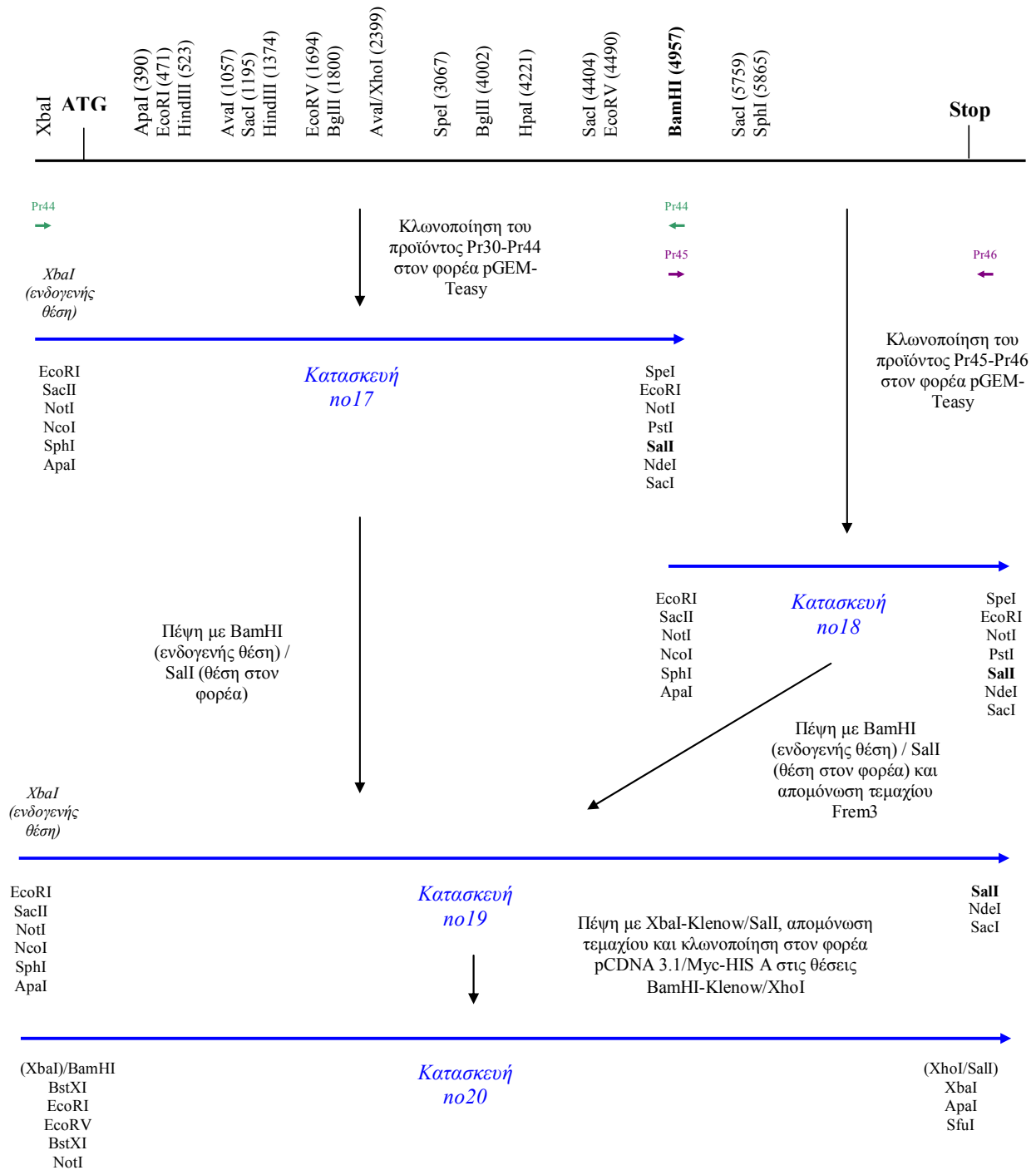
Η κατασκευή αυτή περιέχει ολόκληρο το cDNA του γονιδίου *Frem3*, από τη θέση XbaI που βρίσκεται 33bp πριν από το ATG του γονιδίου, μέχρι και λίγο μετά το σημείο λήξης της μεταγραφής στη θέση 6887bp, στον φορέα pGEM T-easy. Για τη δημιουργία της συγκεκριμένης κατασκευής ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: 1) επώαση της *κατασκευής 17* με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και SalI (η θέση SalI βρίσκεται στον φορέα pGEM T-easy), 2) επώαση της *κατασκευής 18* με τα ένζυμα BamHI και SalI, απομόνωση του ενθέματος (Frem3 cDNA από BamHI-Stop) και 3) αντίδραση σύνδεσης με λιγάση των δυο παραπάνω τμημάτων (Εικ. 4).

Κατασκευή 20 (Frem3 total cDNA / pCDNA 3.1/Myc-HIS A)

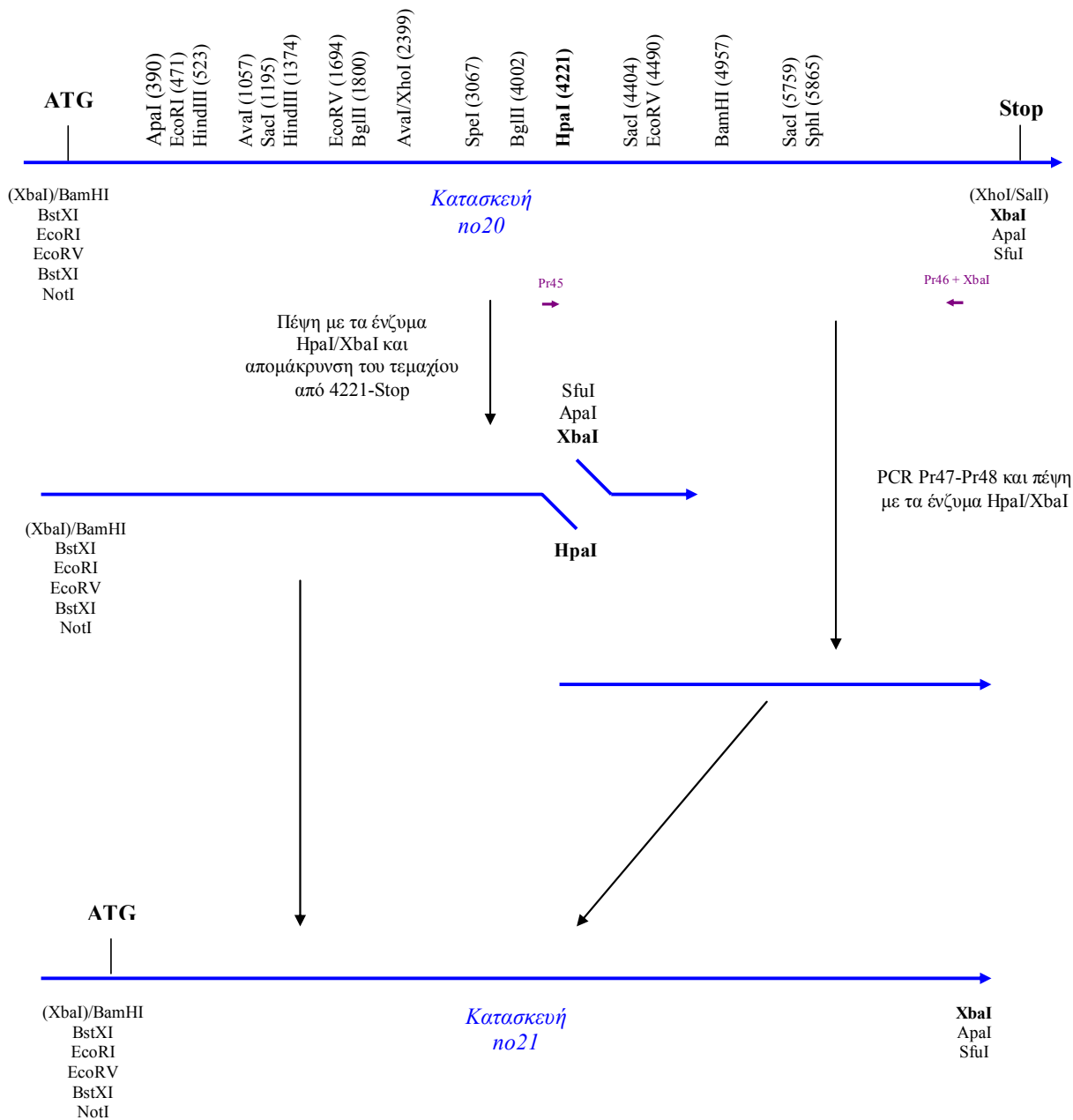
Η κατασκευή αυτή περιέχει ολόκληρο το cDNA του γονιδίου *Frem3*, από τη θέση XbaI που βρίσκεται 33bp πριν από το ATG του γονιδίου, μέχρι και λίγο μετά το σημείο λήξης της μεταγραφής στη θέση 6887bp, στον φορέα pCDNA 3.1/Myc-HIS A. Για τη δημιουργία της συγκεκριμένης κατασκευής ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: 1) επώαση της κατασκευής 19 με το περιοριστικό ένζυμο XbaI, επεξεργασία με Klenow για τη δημιουργία τυφλών άκρων, 2) επώαση της κατασκευής 19 με το ένζυμο SalI, 3) απομόνωση του ενθέματος (Frem3 cDNA από XbaI-Stop) και 4) αντίδραση σύνδεσης με λιγάση του παραπάνω ενθέματος με τον φορέα pCDNA 3.1/Myc-HIS A στις θέσεις BamHI (Klenow)-XhoI. (Έτσι, στην τελική κατασκευή η θέση BamHI αναγεννιέται ενώ τόσο η SalI όσο και η XhoI παύουν να είναι λειτουργικές. Επιπλέον, καθώς το ένθεμα περιλαμβάνει και το σημείο λήξης της μεταγραφής, δεν παράγεται το Myc του φορέα) (Εικ. 4).

Κατασκευή 21 (Frem3 total cDNA-ΔStop / pCDNA 3.1/Myc-HIS A)

Η κατασκευή αυτή περιέχει ολόκληρο το cDNA του *Frem3* χωρίς το σημείο λήξης της μεταγραφής, στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με τον επίτοπο Myc του φορέα pCDNA 3.1/Myc-HIS A. Για τη δημιουργία της συγκεκριμένης κατασκευής ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα: 1) Πέννη της κατασκευής 20 με τα περιοριστικά ένζυμα HpaI (θέση 4229bp στο cDNA)-XbaI (θέση πάνω στον φορέα pCDNA 3.1/Myc-HIS A). Αυτό γίνεται για την απομάκρυνση του τμήματος του cDNA από τη θέση HpaI μέχρι και το Stop του γονιδίου. 2) ανάκτηση του τεμαχίου του cDNA του *Frem3*, από τη θέση 3046bp μέχρι το τέλος στη θέση 6780bp πριν από το κωδικόνιο λήξης του γονιδίου. Η PCR έγινε με τους εκκινητές Pr47-Pr48 και ως μητρικό DNA χρησιμοποιήθηκε η κατασκευή 20, ενώ το παραγόμενο τεμάχιο κόπηκε με τα ένζυμα HpaI και XbaI (θέση πάνω στον εκκινητή). 3) Αντίδραση σύνδεσης με λιγάση, των δυο παραπάνω (βήμα 1-2) τμημάτων (Εικ. 5).



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση των Κατασκευών 17-20, για την κλωνοποίηση του cDNA του *Frem3*



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία της Κατασκευής 21

vi) Κατασκευές ανιχνευτών *Frem3*, για Southern

Κατασκευή 22 (Frem3 Probe1-2 / pGEM T-easy)

Η κατασκευή περιέχει γενωμικές αλληλουχίες του *Frem3* από τη θέση 148621-149318bp του γενωμικού DNA του γονιδίου. Το κομμάτι αυτό ανακτήθηκε με PCR με τους εκκινητές Pr50-Pr51 και μητρικό DNA απομονωμένο από ES κύτταρα. Η κλωνοποίηση έγινε στον φορέα pGEM T-easy και η κατασκευή αφορά τους ανιχνευτές 1 και 2 (P1-P2) που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο του ομόλογου ανασυνδυασμού στο 5' άκρο, κατά την πρώτη και δεύτερη προσπάθεια απενεργοποίησης του *Frem3*, αντίστοιχα.

Κατασκευή 23 (Frem3 Probe 3 / pGEM T-easy)

Η κατασκευή περιέχει αλληλουχίες του *Frem3* ξεκινώντας από 32bp πριν από το ATG και φτάνοντας μέχρι τη θέση 470bp στο cDNA του γονιδίου. Το κομμάτι αυτό ανακτήθηκε με PCR με τους εκκινητές Pr22-Pr49 και μητρικό DNA την κατασκευή 19. Η κλωνοποίηση έγινε στον φορέα pGEM T-easy και η κατασκευή αφορά τον ανιχνευτή 3 (P3) που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ομόλογου ανασυνδυασμού στο 5' άκρο, κατά την τρίτη προσπάθεια απενεργοποίησης του *Frem3*.

Κατασκευή 24 (Frem3 Probe 4 / pGEM T-easy)

Η κατασκευή περιέχει γενωμικές αλληλουχίες του *Frem3* από τη θέση 164124-164557bp του γενωμικού DNA του γονιδίου. Το κομμάτι αυτό ανακτήθηκε με PCR με τους εκκινητές Pr34-Pr35 και μητρικό DNA απομονωμένο από ES κύτταρα. Η κλωνοποίηση έγινε στον φορέα pGEM T-easy και η κατασκευή αφορά τον ανιχνευτή 4 (P4) που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ομόλογου ανασυνδυασμού στο 3' άκρο, κατά την τρίτη προσπάθεια απενεργοποίησης του *Frem3*.

vii) Κατασκευές ανιχνευτών *Fras1* για mRNA *in situ* υβριδοποίηση

Κατασκευή 25 [Fras1 ISH probe 1 / pBluescript II KS (+/-)]

Η κατασκευή αυτή αφορά τη δημιουργία ανιχνευτή *Fras1* για χρήση σε mRNA *in situ* hybridization (ISH). Το κομμάτι απομονώθηκε από κατασκευή που περιείχε ολόκληρο το cDNA του *Fras1* στον φορέα pCNA3.1/Myc-HIS A, έπειτα από πέψη BglII/ClaI και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pBluescript II KS (+/-) στις θέσεις BamHI/ClaI. Το τμήμα αυτό βρίσκεται στις θέσεις 3492-4334bp στο cDNA του γονιδίου *Fras1*. Για τη δημιουργία του ανιχνευτή, η κατασκευή γραμμοποιείται με XbaI πέψη και το μη-νοηματικό RNA (anti-sense RNA) γίνεται με T3 RNA πολυμεράση.

Κατασκευή 26 [Fras1 ISH probe 2 / pBluescript II KS (+/-)]

Η κατασκευή αυτή αφορά τη δημιουργία ανιχνευτή *Fras1* για χρήση σε mRNA *in situ* hybridization (ISH). Το κομμάτι απομονώθηκε από την κατασκευή 14 έπειτα από πέψη BamHI/XhoI και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pBluescript II KS (+/-) στις αντίστοιχες θέσεις. Για τη δημιουργία του ανιχνευτή, η κατασκευή γραμμοποιείται με BamHI πέψη και το μη-νοηματικό RNA (anti-sense RNA) γίνεται με T3 RNA πολυμεράση.

2.30 Βακτηριακά στελέχη

DH5a: Χρησιμοποιούνται σε μετασχηματισμό κατά την κλωνοποίηση τεμαχίων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς καθώς η απόδοση είναι υψηλή και υπάρχει δυνατότητα επιλογής των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων λόγω της μεταλλαγής που φέρουν στο γονίδιο *LacZ* που εμποδίζει τη σύνδεση των υπομονάδων (και την ενεργότητα) της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία όμως συμπληρώνεται με από φορείς που παράγουν το α-πολυπεπτιδίο. Έτσι, τα μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια αποκαθιστούν στα μετασχηματισμένα βακτήρια την ενεργότητα του ενζύμου, ενώ αυτά που έχουν δεχθεί ένθεμα όχι. Κατ' επέκταση οι αντίστοιχες αποικίες είναι λευκές παρουσία X-gal.

BL21 (DE3) CodonPlus: (Stratagene, #230245): Χρησιμοποιούνται για την επαγόμενη από IPTG (*Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside*) έκφραση πεπτιδίων. Τα βακτήρια αυτού του στελέχους επιτρέπουν την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών σε υψηλά επίπεδα, ιδιαίτερα εκείνων που ελέγχονται από υποκινητή T7, γιατί φέρουν γονίδιο που επάγεται από IPTG και εκφράζει T7 RNA πολυμεράση. Επιπλέον, φέρουν το πλασμίδιο RIL, το οποίο εκτός του γονιδίου ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη, φέρει και τα γονίδια για tRNAs της αργινίνης (*argU*), της ισολευκίνης (*ileY*) και της λευκίνης (*leuW*), τα οποία συναντώνται σε χαμηλά επίπεδα στα βακτήρια.

2.31 Κυτταρικές σειρές

COS-7: Κυτταρική σειρά με μορφολογικά χαρακτηριστικά ινοβλαστών, προερχόμενη από τον μετασχηματισμό κυττάρων CV-1 (κύτταρα νεφρού αρσενικού πράσινου Αφρικάνικου πιθήκου) με ιό SV40 μεταλλαγμένο στην περιοχή έναρξης της αντιγραφής του (ori), ο οποίος όμως παράγει T αντιγόνο. Η σειρά αυτή είναι κατάλληλη για πειράματα διαμόλυνσης με υψηλά ποσοστά επιτυχίας, ειδικά στην περίπτωση πλασμιδίων που φέρουν την αρχή αντιγραφής του SV40. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σχηματίζοντας μονοστιβάδες σε θρεπτικό μέσον DMEM 90%, Fetal Bovine Serum 10%, γενταμυκίνη 50μg/ml στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.

HEK 293: Τα Human Embryonic Kidney 293 κύτταρα προέρχονται από ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού μετασχηματισμένα με αδενοϊό 5, και χρησιμοποιούνται ευρέως για πειράματα διαμόλυνσης με υψηλά ποσοστά επιτυχίας. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σχηματίζοντας μονοστιβάδες σε θρεπτικό μέσον DMEM 90%, Fetal Bovine Serum 10%, γενταμυκίνη 50μg/ml στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.

2.32 Βακτηριακοί φορείς

pGEX-4T1 (Amersham Biosciences, #27-4803-01): Φορέας επαγόμενης έκφρασης χμιαϊκικών πρωτεϊνών με την GST στο N-τελικό τους άκρο. Η έκφραση των πολυπεπτιδίων ελέγχεται από τον υποκινητή *tac* στον οποίο είναι προσδεμένος ο καταστολέας $lacI^q$, που παράγεται επίσης από τον φορέα. Σε περίπτωση επαγωγής IPTG, ο $lacI^q$ συνδέεται με αυτό απελευθερώνοντας έτσι τον υποκινητή. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ανιχνεύεται με το anti-GST και μπορεί να απομονωθεί με χρωματογραφία συγγένειας με σεφαρόζη-γλουταθειόνη.

pCDNA 3.1/Myc-HIS A (Invitrogen, #V80020): Φορέας με τον οποίο οι χμιαϊκές πρωτεΐνες εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα λόγω του υποκινητή CMV σε σύντηξη με τους επίτοπους 6-HIS και Myc στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Έτσι είναι εφικτός ο εντοπισμός τους είτε υποκυτταρικά, είτε *in vitro* με χρήση των αντίστοιχων αντισωμάτων. Επιπλέον, ο φορέας έχει τη θέση έναρξης της αντιγραφής του ιού SV40 και έτσι πολλαπλασιάζεται σε κύτταρα θηλαστικών που εκφράζουν το αντιγόνο T.

pGEM-T easy (Promega, #A3600): Παρέχεται σαν γραμμικός φορέας και είναι κατάλληλος για την κλωνοποίηση προϊόντων PCR καθώς στα 3' άκρα του φέρει προεξέχοντα νουκλεοτίδια θυμιδίνης που υβριδοποιούνται με τα προεξέχοντα νουκλεοτίδια αδενίνης που προστίθενται από πολλές DNA πολυμεράσες στα 5' άκρα των προϊόντων PCR. Επιπλέον, έχει πολλαπλές επιλογές στον πολυσυνδέτη του και περιλαμβάνει τους υποκινητές T7 και SP6 που επιτρέπουν την αλληλούχηση με τη χρήση των αντίστοιχων εκκινητών και τις αντιδράσεις μεταγραφής *in vitro* με τις αντίστοιχες RNA πολυμεράσες. Τέλος περιλαμβάνει το γονίδιο *lacZ* για χρωματική επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων.

pBluescript II KS (+/-) (Stratagene, #212207): Απλός φορέας για την κλωνοποίηση ενθεμάτων. Περιέχει πολλαπλές επιλογές ένθεσης στον πολυσυνδέτη του και φέρει το γονίδιο *lacZ* καθιστώντας εύκολη την επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων. Παράλληλα περιέχει και τους εκκινητές T3 και T7 που επιτρέπουν την αλληλούχηση με

τη χρήση των αντίστοιχων εκκινητών και τις αντιδράσεις μεταγραφής *in vitro* με τις αντίστοιχες RNA πολυμεράσες.

pEGFP-C1 (BD Biosciences Clontech, #6084-1): Φορέας στον οποίο οι χιμαιρικές πρωτεΐνες φέρουν την EGFP στο καρβοξυτελικό τους άκρο, επιτρέποντας έτσι τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους και την ανίχνευσή τους με το αντίστοιχο αντίσωμα. Η EGFP είναι ιδιαίτερα σταθερή πρωτεΐνη και ο φθορισμός της διατηρείται μια μεγάλη χρονικά διαστήματα. Ο φορέας έχει τον υποκινητή CMV που παρέχει υψηλά επίπεδα έκφρασης και τη θέση έναρξης της αντιγραφής του ιού SV40 που του επιτρέπει να πολλαπλασιάζεται σε κύτταρα θηλαστικών που εκφράζουν το αντιγόνο T.

2.33 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων και κυτταρικών σειρών θηλαστικών

LB: Για την ανάπτυξη στελεχών *E.coli* DH5a, BL21-Codon Plus-DE3-RIL, DH10b. Αποτελείται από 1% NaCl, 1% Bacto-Tryptone, 0.5% Yeast extract, pH 7.0. Για τη δημιουργία στερεού θρεπτικού μέσου προστίθεται άγαρ τελικής συγκέντρωσης 1.5%.

TYM: Θρεπτικό μέσο το οποίο λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης αλάτων, χρησιμοποιείται για την παρασκευή δεκτικών κυττάρων στα πειράματα μετασχηματισμού με τη μέθοδο της ηλεκτρικής εκκένωσης. Αποτελείται από 0.6% NaCl, 0.25% MgSO₄, 2% Bacto-Tryptone, 0.5% Yeast extract, pH7.0.

DMEM: Το Dulbecco's Modified Eagle's Medium αποτελείται από 4mM L-glutamine, 0.45% glucose, 0.15% sodium bicarbonate σε συγκέντρωση 90% και ορό FBS (Fetal Bovine Serum) σε συγκέντρωση 10%. Το θρεπτικό αυτό χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη και διατήρηση κυτταρικών σειρών θηλαστικών (COS-7 και HEK 293).

2.34 Κατάλογος αντισωμάτων

Αντίσωμα	Προέλευση	Αραίωση
BrdU-N1 mouse monoclonal	Thermo Scientific	1:500
GFAP-C1 rabbit polyclonal	Thermo Scientific	1:200
BLBP (Neuronal marker) rabbit polyclonal	Abcam	1:200
Calretinin (SP13) rabbit polyclonal	Thermo Scientific	1:200
Neurofilament-Ab1 mouse monoclonal	Thermo Scientific	1:50
CNPase-Ab1 mouse monoclonal	Thermo Scientific	1:100
MBP (aa82-87) rat monoclonal	AbD Serotec	1:200
MAP 2a,b-Ab2 mouse monoclonal	Thermo Scientific	1:200
PECAM-1 (CD31) rat monoclonal	BD Biosciences Pharmigen	1:50
Calbinding (D-28K) rabbit polyclonal	Chemicon	1:1000
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG	Molecular Probes	1:500
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG	Molecular Probes	1:500
Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG	Molecular Probes	1:500
Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG	Molecular Probes	1:500
Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG	Molecular Probes	1:500
Alexa Fluor 568 goat anti-rat IgG	Molecular Probes	1:500
Anti-Rabbit IgG Biotinylated	Vector Laboratories	1:200
Anti-DIG-AP Fab fragments	Roche	1:5000
Fras1/Frem rabbit polyclonal	Homemade	1:10-1:100

2.35 Κατάλογος ολιγονουκελοτιδίων

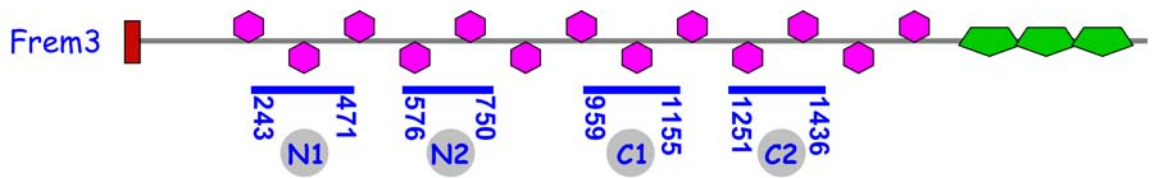
Όνομα	Αλληλουχία 5' - 3'	Tm
Pr1 FOR	CAACCCCGAGATTCCACTTCACTCCAG	68°C
Pr2 REV	GTGATAATCCATTGCACGCTCGGAACCAGGC	66°C
Pr3 FOR	CAGTGGTGTGGTCCTGGCTATGGCAG	65°C
Pr4 REV	CACATAGCGAGCATGCAGGCACTCC	65°C
Pr5 FOR	GATCGATTTCGAGTGCAGCGCGG	63°C
Pr6 REV	GTCACTACCGTCTCATAAAGGCC	61°C
Pr7 FOR	GGCAAGTGGTCCAGATATCCCC	61°C
Pr8 REV	CACCACTAGTGTGAACATAGC	55°C
Pr9 FOR	GAATCTTGGCATTGTACCTCGAG	57°C
Pr10 REV	GATATCTTGTTTCTGGCCAGTTG	55°C
Pr11 FOR	CTCAGCTTCAACTGGCCAGAAAC	59°C
Pr12 REV	GCCATAATGACTTGGACCTGTTAAC	57°C
Pr13 FOR	CCC GGG-GAGGTGGAGTAGCATTCACTC	59°C
Pr14 REV	CCC GGG-GGTGCACTCCATCACTTACCTC	59°C
Pr15 FOR	CTCGAG -CCTCACTGGTCAATGGAGTAG	57°C
Pr16 REV	CTCGAG -CTCAGTCCTCACCGCTTACTCC	61°C
Pr17 FOR	<i>TAGTAC</i> - GCGGC - CGCT GGTGCTGCCCTTCACTC	63°C
Pr18 REV	TCTAGA - ATCGAT -AGCTTCTGATGGAATTAGAAC	55°C
Pr19 REV	CAAGCGGCCGGAGAACCTGCGTG	66°C
Pr20 REV	GCAAAGCTGCTATTGGCCGCTG	62°C
Pr21 REV	GACTAGTGAGACGTGCTACTTCC	59°C
Pr22 FOR	<i>GATTAC</i> - GCGGCCG C-CAACTCCAGAATTCCATCGGAC	57°C
Pr23 FOR	ACACTGCAGGCAACAGTGTGTCAG	60°C
Pr24 FOR	GACCTGGCACTCACGTCACTC	61°C
Pr25 REV	GCAGGAGTGAGCTTTTCAGCTTCAG	60°C
Pr26 REV	<i>GTAAT</i> - GCGGCCG C-GAGTGAAGGGCAGCACCAGCG	57°C
Pr27 FOR	CGAGATCAGCAGCCTCTGTTCCAC	62°C
Pr28 FOR	GCTCATTCCTCCCACATCATGATC	57°C
Pr29 REV	CTTGTCGAATCTTATAGGGAGG	54°C
Pr30 FOR	GGCATCCTCTAGATATATCAACTC	57°C
Pr31 FOR	GCCGCAGAAGAGCTGAGAATGG	61°C
Pr32 REV	CTCTGCCTCCTGCGTGCTAGG	62°C
Pr33 FOR	GATGGATGCGAAGTGTAATTACTGG	57°C
Pr34 REV	GTGTAGGCTCTCTGAAGCTG	58°C
Pr35 FOR	CTAATAGTGCTACTCCCCATG	55°C
Pr36 FOR	<i>GGAC</i> - GAATTC -CAGCATACCACCACACCATCC	59°C
Pr37 REV	<i>GGAC</i> - CTCGAG -CCCGTGTGCAAACCTCTGAC	59°C
Pr38 FOR	<i>GGAC</i> - GAATTC -ACTATGGATGTTACTCATGGCAG	55°C
Pr39 REV	<i>GGAC</i> - CTCGAG -TTGATCTGCTCCTGGTTCTATTCC	57°C

Pr40 FOR	<i>GGAC</i> - GGATCC - CATTGTGAAGGTGCTTGTCTGTATC	57°C
Pr41 REV	<i>GGAC</i> - CTCGA - GTTACAAAACAGAGGCTGGCACTG	59°C
Pr42 FOR	CAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTG	62°C
Pr43 REV	CCATGATATTCCGGCAAGCAGGCATCG	62°C
Pr44 REV	GGGCTTATCTGGATCCCACTG	59°C
Pr45 FOR	CGTGCCTCAGACAGTGTGGATCCAG	59°C
Pr46 REV	ACAATGTCATTACACAGAGTCACTAAGC	59°C
Pr47 FOR	GCTATGTTCACTAGTGGTG	55°C
Pr48 REV	<i>GGAC</i> - TCTAGA - CTCTTCACAGTTGGTGACACTGTC	59°C
Pr49 REV	<i>GTAAT</i> - GCGGCCGC - GAGTGAAGGGCAGCACCAGCG	62°C
Pr50 FOR	GTGCTTACTGTGTGCTTGGCAGTATTC	62°C
Pr51 REV	CCAGTCACAAGGCTCTGCGAGTCATG	64°C

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μέχρι σήμερα, έχουν μελετηθεί εκτενέστερα οι πρωτεΐνες Fras1, Frem1 και Frem2, για τις οποίες έχουν δημιουργηθεί και τα αντίστοιχα μεταλλαγμένα ποντίκια, στα οποία έχει κατασταλεί η λειτουργία τους. Από τα μέχρι τώρα δεδομένα, φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες Fras1, Frem1, Frem2 και Frem3 συνεντοπίζονται στις βασικές μεμβράνες όλων των εμβρυϊκών επιθηλίων (Chiotaki *et al.*, 2007), ενώ επιπλέον με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM), για τον ακριβή εντοπισμό των Fras1/Frem πρωτεϊνών, βρέθηκε ότι εντοπίζονται στην sublamina densa της βασικής μεμβράνης επιθηλιακών δομών κατά την εμβρυογένεση (Dalezios *et al.*, 2007; Petrou *et al.*, 2007a). Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι Fras1, Frem1 και Frem2 πρωτεΐνες σχηματίζουν ένα λειτουργικό πλέγμα στη βασική μεμβράνη, από το οποίο έλλειψη της μίας πρωτεΐνης από τη βασική μεμβράνη οδηγεί στην απουσία και των υπόλοιπων και άρα στην αποδιοργάνωση του συμπλόκου. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από δύο διαφορετικές ομάδες (Petrou *et al.*, 2007b ; Kiyozumi *et al.*, 2007) ενώ η άμεση αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Fras1, Frem1 και Frem2, δείχθηκε και με βιοχημικά πειράματα συν-κατακρήμισης τους (Kiyozumi *et al.*, 2006). Η μοναδική από τις πρωτεΐνες της οικογένειας η οποία δεν έχει μελετηθεί τόσο αναλυτικά όσο οι υπόλοιπες είναι η πρωτεΐνη Frem3, για την οποία δεν έχει δημιουργηθεί ούτε το αντίστοιχο μετάλλαγμα ποντικού. Για τους παραπάνω λόγους αποφασίσαμε να μελετήσουμε εκτενέστερα την πρωτεΐνη Frem3.

Πειράματα που έχουν γίνει με το αντίσωμα Frem3-C2 που αναγνωρίζει μια κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα τα αμινοξέα 1251-1436 (Εικ. 1), έδειξαν ότι το πρότυπο εντοπισμού της Frem3 δεν διαφέρει από τις άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας, δηλαδή εντοπίζεται στις βασικές μεμβράνες όλων των εμβρυϊκών επιθηλίων ενώ στα *Fras1*^{-/-} μεταλλάγματα, απουσιάζει από τη βασική μεμβράνη. Στα πλαίσια του εκτενέστερου χαρακτηρισμού της πρωτεΐνης Frem3 δημιουργήθηκε ένα δεύτερο αντίσωμα (Frem3-N2) ενάντια στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα στην περιοχή 576-750 αμινοξέα Εικ.1. Με το αντίσωμα αυτό, παρατηρήσαμε τρεις πολύ ενδιαφέρουσες διαφοροποιήσεις στον εντοπισμό της Frem3, οι οποίες παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά.

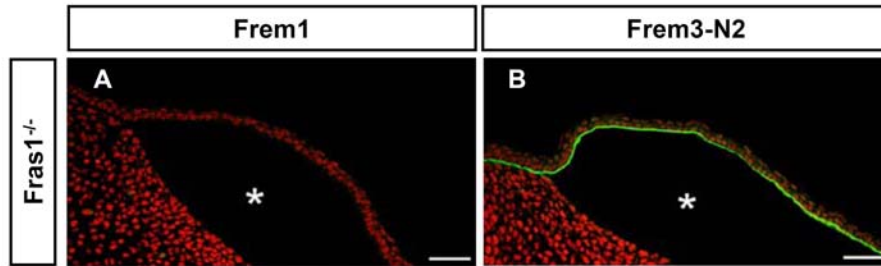


Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης Frem3 και των αντισωμάτων ενάντια σε διαφορετικές περιοχές, στο αμινοτελικό και στο καρβοξυτελικό άκρο.

3.1 Διαφοροποιήσεις στον εντοπισμό της πρωτεΐνης Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2.

i) Η Frem3 εντοπίζεται με το αντίσωμα Frem3-N2 στη βασική μεμβράνη επιθηλίων *Fras1*^{-/-} ποντικών, όπου οι υπόλοιπες *Fras1/Frem* απουσιάζουν

Όπως συζητήθηκε και προηγουμένως, μελέτες μέχρι τώρα είχαν δείξει ότι έλλειψη μιας εκ των *Fras1*, *Frem1* ή *Frem2* πρωτεϊνών από τη βασική μεμβράνη, οδηγεί σε κατάρρευση του συμπλόκου και άρα σε απουσία και των άλλων πρωτεϊνών της οικογένειας από τη βασική μεμβράνη. Η παρατήρηση αυτή ισχύει και για την πρωτεΐνη *Frem3*, όταν εντοπίζεται με το αντίσωμα Frem3-C2, όπου για παράδειγμα στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια παύει να εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη. Ενδιαφέρον παρόλα αυτά παρουσιάζει το γεγονός ότι με το αντίσωμα Frem3-N2, η *Frem3* εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη *Fras1*^{-/-} μεταλλαγμάτων, ακόμα και όταν οι υπόλοιπες *Fras1/Frem* πρωτεΐνες απουσιάζουν. Ενδεικτικά στην Εικ.2 φαίνονται ο εντοπισμός της *Frem1* και της *Frem3-N2* στη φυσαλίδα από *Fras1*^{-/-} έμβρυα ποντικού.



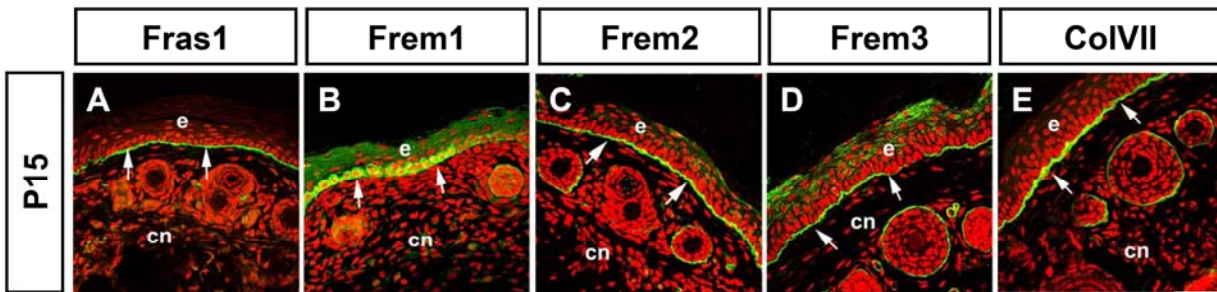
Εικόνα 2. Εντοπισμός των πρωτεϊνών Frem1 (A) και Frem3 (B), με το αντίσωμα Frem3-N2, στην περιοχή της φουσαλίδας *Fras1*^{-/-} εμβρύου E14.5. Όπως φαίνεται η Frem1 παύει να εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη, απουσία της *Fras1*. Αντίθετα η Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2 εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη, η οποία ακολουθεί το αποσχισμένο επιθήλιο (ο αστερίσκος δείχνει το εσωτερικό της φουσαλίδας).

ii) Εντοπισμός της Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2 στη βασική μεμβράνη των επιθηλίων, όλων των ενήλικων οργάνων, όταν οι άλλες *Fras1/Frem* απουσιάζουν.

Οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει τον συνεντοπισμό όλων των *Fras1/Frem* πρωτεϊνών στη βασική μεμβράνη εμβρυϊκών επιθηλίων. Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν μελέτες που να ασχολούνται με τον εντοπισμό των πρωτεϊνών αυτών σε στάδια μετά τη γέννηση. Έχοντας ήδη πολυκλωνικά αντισώματα για όλες τις *Fras1/Frem* πρωτεΐνες, στη συνέχεια μελετήσαμε τον εντοπισμό τους με ανοσοφθορισμό, αρχικά σε δέρμα από ουρά ποντικού και κατ' επέκταση σε μια πληθώρα ιστών και οργάνων, σε στάδια μετά τη γέννηση. Στα πειράματά μας συμπεριλάβαμε και το ColVII, το οποίο βρίσκεται στη βασική μεμβράνη, στην περιοχή της sublamina densa, ως βασικό συστατικό των ινιδίων προσκόλλησης (anchoring fibrils) και του οποίου η απενεργοποίηση στον ποντικό οδηγεί σε φαινότυπο παρόμοιο με αυτόν των *Fras1/Frem* (Heinonen *et al.*, 1999). Επιπλέον, προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει μια συμπληρωματικότητα όσον αφορά τον εντοπισμό του ColVII και των *Fras1/Frem* πρωτεϊνών στη βασική μεμβράνη εμβρύων, με το πρώτο να εντοπίζεται εντονότερα στα τελευταία εμβρυϊκά στάδια, ενώ η έκφραση των άλλων πρωτεϊνών φθίνει (Chiotaki *et al.*, 2007).

Εξετάσαμε διάφορα στάδια, ξεκινώντας από μια μέρα μετά τη γέννηση και συνεχίζοντας μέχρι και τους δυο μήνες (P1-P60). Αρχικά χρησιμοποιήσαμε δέρμα από ουρές ποντικών (P15, P30 και P60) και παρατηρήσαμε ότι ενώ οι πρωτεΐνες

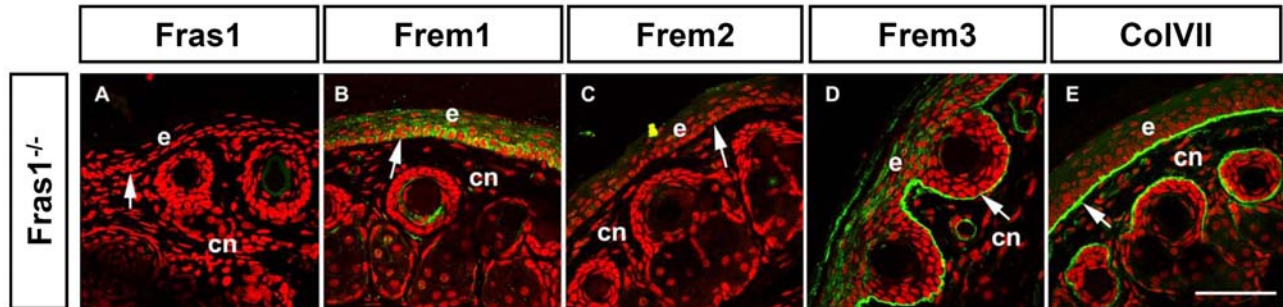
Fras1/Frem2-3 και ColVII εντοπίζονται κανονικά στη βασική μεμβράνη του επιδερμικού επιθηλίου αλλά και στη βασική μεμβράνη των τριχοθυλακίων, η Frem1 απουσιάζει και εντοπίζεται μόνο ενδοκυτταρικά, στη στιβάδα των βασικών κερατινοκυττάρων (Εικ.3). Αυτό υποδεικνύει ότι οι Fras1/Frem2-3 πρωτεΐνες έχουν τη δυνατότητα να αγκυροβολούν στη βασική μεμβράνη ακόμα και όταν η Frem1 δεν αποτελεί μέρος του συμπλόκου.



Εικόνα 3. Ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1/Frem και collagen VII σε ουρά ποντικού ηλικίας 15 ημερών μετά τη γέννηση. Οι πρωτεΐνες Fras1, Frem2, Frem3 και ColVII φαίνεται να συνεντοπίζονται τόσο στη βασική μεμβράνη του επιδερμικού επιθηλίου όσο και στη βασική μεμβράνη των τριχοθυλακίων. Από την άλλη μεριά, η Frem1 ενώ υπάρχει στη βασική μεμβράνη του επιδερμικού επιθηλίου, ωστόσο φαίνεται να εντοπίζεται κυρίως ενδοκυτταρικά στα βασικά κερατινοκύτταρα. (e: επιθήλιο, cn: συνδετικός ιστός). Bar = 120 μ m

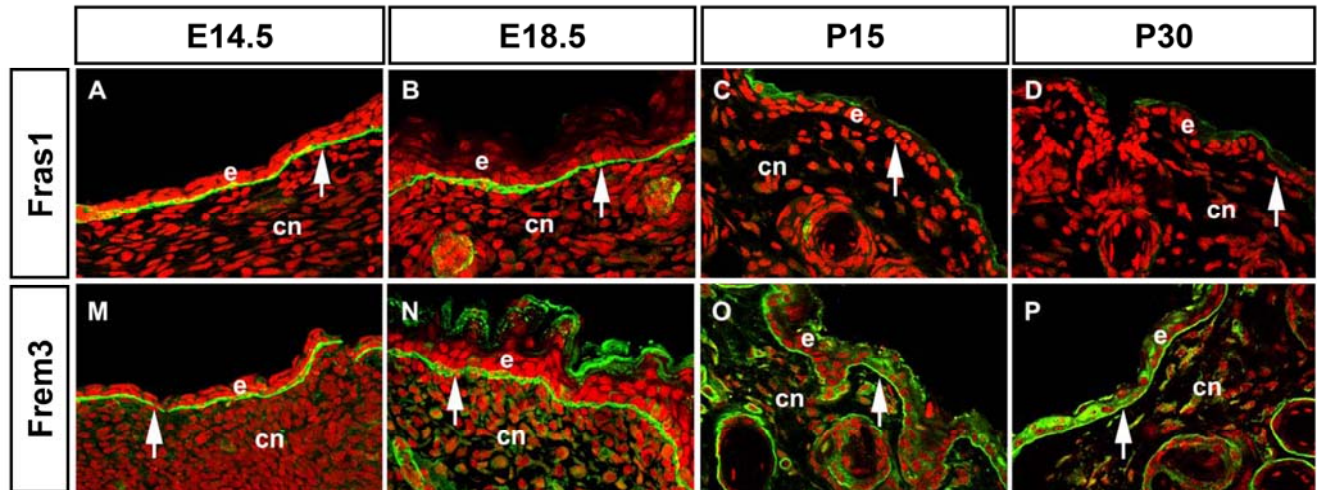
Από προηγούμενες μελέτες είχε διαπιστωθεί ότι οι πρωτεΐνες Fras1, Frem1 και Frem2 δημιουργούν ένα πολυμοριακό σύμπλοκο στη βασική μεμβράνη του εμβρυϊκού επιδερμικού επιθηλίου, σταθεροποιώντας με αυτόν τον τρόπο η μια την άλλη (Kiyozumi *et al.*, 2006). Η παρατήρηση αυτή ενισχύθηκε ακόμα περισσότερο και από ανοσοϊστοχημικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε *Fras1*^{-/-} έμβρυα, οι οποίες έδειξαν ότι η εξάλλειψη της Fras1 πρωτεΐνης από τη βασική μεμβράνη, οδηγεί στην απουσία και των πρωτεϊνών Frem1 και Frem2, ενώ η Frem3 εξακολουθεί να παραμένει (Petrou *et al.*, 2007b). Με σκοπό να επιβεβαιώσουμε αν αυτό είναι πραγματικότητα και στα ενήλικα άτομα, αναλύσαμε ανοσοϊστοχημικά δέρμα από ουρές ποντικών *Fras1*^{-/-} ηλικίας ενός μήνα μετά τη γέννηση. Αυτό που παρατηρήσαμε ήταν ότι ενώ οι πρωτεΐνες Frem1 και Frem2 δεν εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη απουσία της Fras1, αντίθετα τόσο η Frem3 όσο και το ColVII εξακολουθούν να παραμένουν (Εικ.4). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τις προηγούμενες μελέτες, υποδεικνύοντας ότι: 1) η πρωτεΐνη Frem3, με

το αντίσωμα Frem3-N2 ακολουθεί ένα διαφορετικό και ανεξάρτητο μονοπάτι, όντας ικανή να αγκυροβολεί στη βασική μεμβράνη ακόμα και όταν οι υπόλοιπες Fras1/Frem πρωτεΐνες απουσιάζουν και 2) ότι η πρωτεΐνη Frem3 εξακολουθεί να συν-εντοπίζεται με το ColVII ακόμα και στα ενήλικα στάδια.



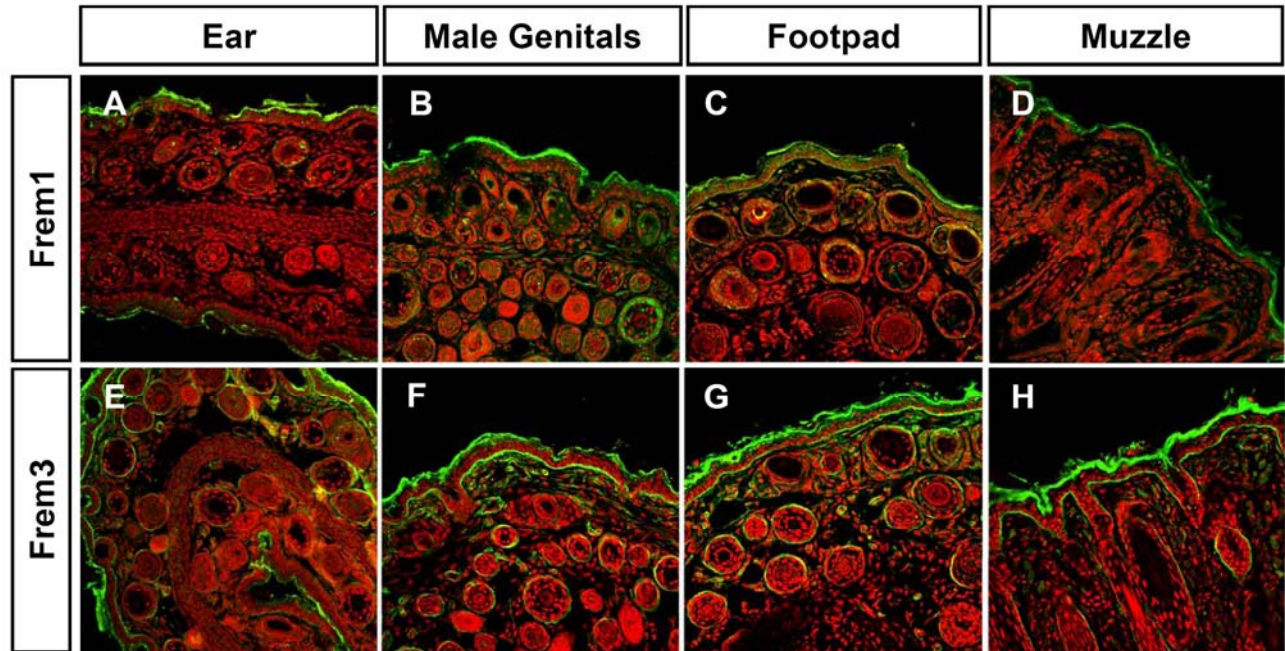
Εικόνα 4. Ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1/Frem και collagen VII, σε ουρές *Fras1^{-/-}* ποντικών. Η έλλειψη της Fras1 από τη βασική μεμβράνη έχει σαν αποτέλεσμα και την απώλεια των πρωτεϊνών Frem1 & Frem2. Αντίθετα, τόσο η πρωτεΐνη Frem3, με το αντίσωμα Ab2, όσο και το collagenVII εξακολουθούν να εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη του επιδερμικού επιθηλίου και των τριχοθυλακίων. . (e: επιθήλιο, cn: συνδετικός ιστός). Κλίμακα, 120 μ m.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα προχωρήσαμε στην ταυτοποίηση του χωροχρονικού καταμερισμού των Fras1/Frem πρωτεϊνών, σε ραχιαίο δέρμα ποντικών τόσο στα εμβρυϊκά στάδια E14.5 και E18.5, όσο και στα στάδια P15 και P30 μετά τη γέννηση. Όπως ήταν αναμενόμενο, όλες οι Fras1/Frem πρωτεΐνες εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη στα εμβρυϊκά στάδια, με μοναδική απόκλιση την Frem1 η οποία αν και εντοπίζεται ωστόσο φαίνεται εμφανώς μειωμένη την ημέρα E18.5 (Εικ.5). Αντιθέτως, μετά τη γέννηση, οι πρωτεΐνες Fras1, Frem1, Frem 2 παύουν να εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη ενώ η Frem3, εντοπιζόμενη με το αντίσωμα Frem3-N2, εξακολουθεί να παραμένει ανεξάρτητα από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, παρατήρηση η οποία ενισχύει ακόμα περισσότερο την πεποίθηση ότι η πρωτεΐνη Frem3, ακολουθεί ένα ανεξάρτητο μονοπάτι (Εικ.5).



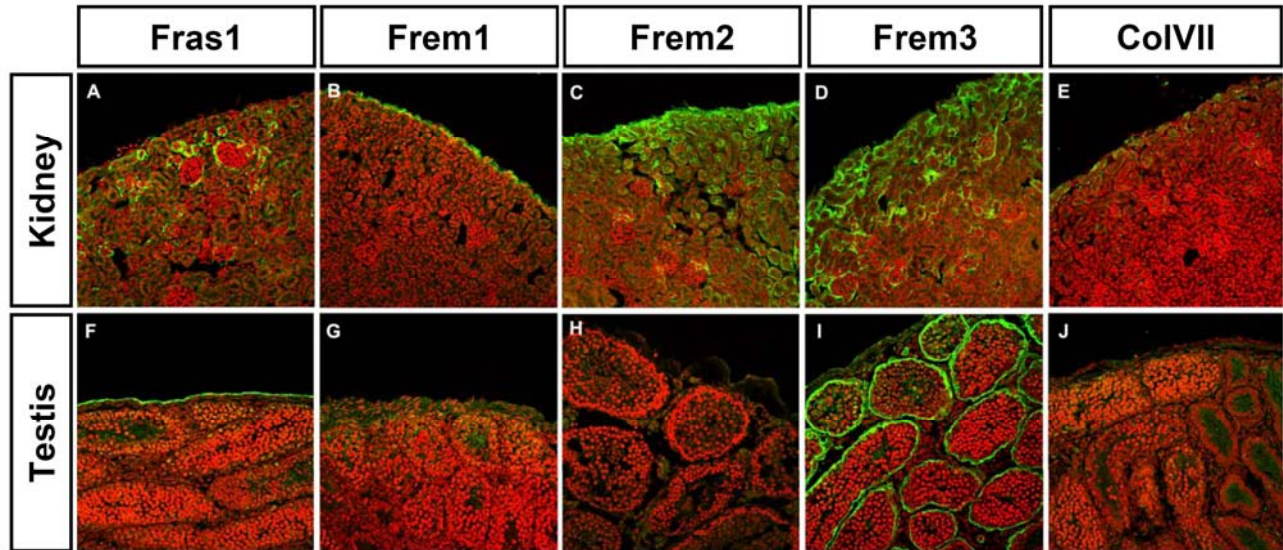
Εικόνα 5 Ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών **Fras1/Frem3** σε κρυστομές από ραχιαίο δέρμα ποντικού. Η Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2, εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη του επιδερμικού επιθηλίου και των τριχοθυλακίων καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ενήλικης ζωής. Αντίθετα, οι πρωτεΐνη Fras1 (όπως και οι Frem1-Frem2), εντοπίζεται μόνο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, ενώ μετά γέννηση παύουν να εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη. (e: επιθήλιο, cn: συνδετικός ιστός).

Στη συνέχεια, με στόχο να ολοκληρώσουμε την εικόνα του εντοπισμού των Fras1/Frem πρωτεϊνών στο δέρμα ενήλικων ποντικών, εξετάσαμε διάφορα μέρη του δέρματος από την περιοχή των ματιών, των άκρων, του ρύγχους, των αυτιών, των γεννητικών οργάνων, καθώς και κοιλιακό δέρμα. Στην τελευταία περίπτωση παρατηρήσαμε ολοκληρωτική απουσία των Fras1/Frem2 και ενδοκυτταρικό εντοπισμό της Frem1, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες (Frem3 και ColVII) εντοπίζονταν κανονικά στη βασική μεμβράνη. Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις (μάτι, άκρα, ρύγχος αυτιά και γεννητικά όργανα) οι Fras1/Frem2-3 και το ColVII, εντοπίζονται στις βασικές μεμβράνες, ενώ η Frem1 απουσιάζει (Εικ.6). Τα συμπεράσματα που βγαίνουν από τις μέχρι τώρα παρατηρήσεις είναι ότι: 1) οι Fras1/Frem2 πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να αγκυροβολούν στη βασική μεμβράνη, ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες, ακόμα και όταν η Frem1 λείπει και 2) η Frem3 μπορεί να στηρίζεται στη βασική μεμβράνη εντελώς ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες, ενδεχομένως αλληλεπιδρώντας με το ColVII.



Εικόνα 6. Συγκριτική μελέτη ανοσοεντοπισμού των πρωτεϊνών Frem1/Frem3 σε διαφορετικές περιοχές δέρματος ενήλικων ποντικών (P30). Η πρωτεΐνη Frem3-Ab2 (όπως και οι πρωτεΐνες Fras1/Frem2 & collagenVII) εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη του επιδερμικού επιθηλίου, σε κάθε μέρος του δέρματος που εξετάστηκε (όπως: αυτή, εξωτερικά γεννητικά όργανα, άκρα, μουσούδα). Αντίθετα η πρωτεΐνη Frem1, φαίνεται να απουσιάζει πλήρως από τη βασική μεμβράνη του επιθηλίου του δέρματος. (e: επιθήλιο, cn: συνδετικός ιστός).

Ακολούθως, προχωρήσαμε στη μελέτη του εντοπισμού των Fras1/Frem πρωτεϊνών σε διάφορα όργανα και ιστούς (νεφρά, οισοφάγος, έντερο, τραχεία, εγκέφαλος, όρχεις, μάτι) σε ενήλικα στάδια. Προηγούμενες αναφορές παρουσιάζουν τον συνεντοπισμό τους σε όλες τις βασικές μεμβράνες των εμβρυϊκών επιθηλίων, στα ενήλικα όμως στάδια παρατηρήσαμε αρκετές διαφοροποιήσεις. Η πρωτεΐνη Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2 φαίνεται να εντοπίζεται στις βασικές μεμβράνες, σε όλα τα όργανα και τους ιστούς που μελετήθηκαν, ενώ αντίθετα, οι Fras1/Frem2 εντοπίζονται αποκλειστικά στη βασική μεμβράνη των νεφρικών σωληναρίων, η Frem1 απουσιάζει από παντού και το ColVII παρουσιάζεται μόνο στις βασικές μεμβράνες των επιθηλίων του οισοφάγου και της τραχείας (Εικ.7).

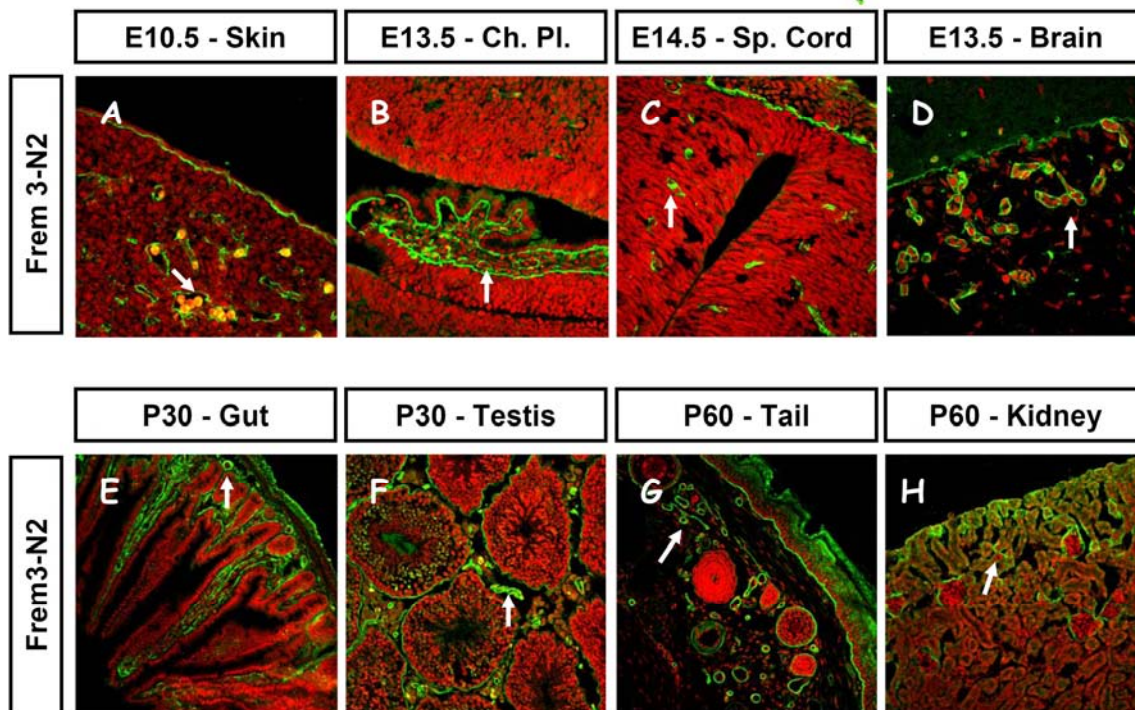


Εικόνα 7. Συγκριτικός ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1/Frem και collagenVII, σε κρυστομές όρχεων και νεφρών, ενήλικων ποντικών (P30). Η πρωτεΐνη Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2 φαίνεται να εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη των σπερματοφόρων σωληναρίων, των νεφρικών σωληναρίων και γενικά σε κάθε όργανο και ιστό που εξετάστηκε (π.χ. οισοφάγος, τραχεία, έντερο κ.α.). Αντίθετα, οι πρωτεΐνες Fras1/Frem2 εντοπίζονται αποκλειστικά και μόνο στις βασικές μεμβράνες των νεφρικών σωληναρίων, η Frem1 απουσιάζει εντελώς από οποιαδήποτε βασική μεμβράνη και το ColVII, εντοπίζεται μονάχα στη βασική μεμβράνη του επιθηλίου του οισοφάγου (e: επιθήλιο, cp: συνδετικός ιστός).

Από τα παραπάνω ενισχύεται περαιτέρω η θεωρία ότι οι Fras1/Frem2 πρωτεΐνες αγκυροβολούν ανεξάρτητα από την Frem1 στη βασική μεμβράνη, ενώ η Frem3 φαίνεται να ακολουθεί ένα δικό της πρότυπο, ανεξάρτητα από όλες τις υπόλοιπες, ακόμα και από το ColVII. Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι: 1) η Frem3 ενδεχομένως ακολουθεί ένα ξεχωριστό μονοπάτι, ανεξάρτητο από το σύμπλοκο Fras1/Frem1-2, 2) η Frem3 πρωτεΐνη θα μπορούσε να αποτελεί ουσιαστικά το μόριο πάνω στο οποίο στηρίζεται το υπόλοιπο σύμπλοκο Fras1/Frem1-2, με αποτέλεσμα να εξακολουθεί να παραμένει ανεπηρέαστη και άρα αγκυροβολημένη στη βασική μεμβράνη, ακόμα και όταν οι υπόλοιπες πρωτεΐνες απουσιάζουν. Παρόλα αυτά, προκειμένου να διευκρινιστούν *in vivo* οι πιθανοί μηχανισμοί αλληλεπίδρασης των Fras1/Frem πρωτεϊνών μεταξύ τους, κρίνεται απαραίτητη η απενεργοποίηση του γονιδίου Frem3 στον ποντικό. Έχοντας το knockout αυτό θα είμαστε σε θέση να απαντήσουμε τόσο για την τύχη των άλλων Fras1/Frem πρωτεϊνών, όσο και για την ύπαρξη δυο διαφορετικών συμπλόκων ή ενός.

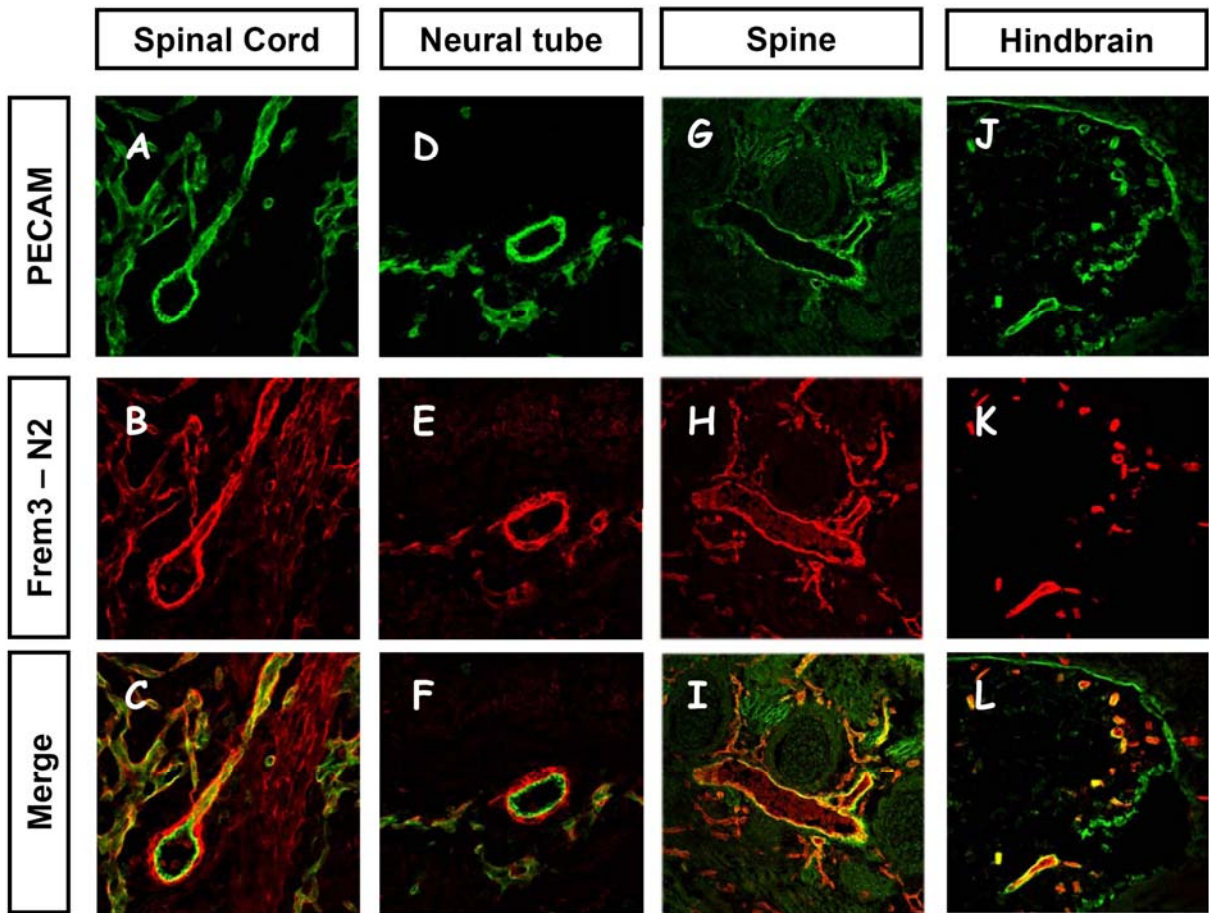
iii) Η πρωτεΐνη Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2 είναι η μοναδική από τις πρωτεΐνες της οικογένειας που εντοπίζεται στα αιμοφόρα αγγεία

Με βάση όλες τις παραπάνω διαφοροποιήσεις που προέκυψαν στον εντοπισμό της Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2 σε ιστούς ενηλίκων και *Fras1*^{-/-} μεταλλαγμάτων, σε σύγκριση με τις άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας, αποφασίσαμε να προχωρήσουμε σε εκτενέστερο χαρακτηρισμό του εντοπισμού της πρωτεΐνης, ξεκινώντας από πειράματα ανοσοφθορισμού σε έμβρυα ποντικού αγρίου τύπου, E10.5-E18.5. Σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκε εντοπισμός της πρωτεΐνης Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2 στη βασική μεμβράνη όλων των ιστών που εξετάστηκαν, όπως ακριβώς συμβαίνει τόσο και με τις υπόλοιπες *Fras1/Frem* πρωτεΐνες, όσο και με την Frem3, όταν αυτή εντοπίζεται με το αντίσωμα Frem3-C2. Παρόλα αυτά, εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N1 εντοπίζεται επιπλέον στη βασική μεμβράνη των ενδοθηλίων, όπου μέχρι σήμερα δεν έχει εντοπιστεί κανένα άλλο μέλος της οικογένειας. Όπως φαίνεται ενδεικτικά και στην Εικ.7A-D, η Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2 εντοπίζεται σε μια πληθώρα αγγείων στο δέρμα (A), στο χοριοειδές πλέγμα στον εγκέφαλο (B), στο νωτιαίο μυελό (C), στον ρομβοειδή εγκέφαλο (D) αλλά και σε αγγεία πολλών άλλων ιστών και οργάνων όπως: στον πνεύμονα, στο έντερο, στα νεφρά, στο συκώτι και άλλα (τα αποτελέσματα αυτά δεν παρουσιάζονται). Πέρα από τα έμβρυα όμως, το ίδιο συμβαίνει και στους ενήλικες ποντικούς, όπως φαίνεται και στην Εικ.7E-H, στο έντερο, στους όρχεις, στο δέρμα, στους νεφρούς αλλά γενικότερα και σε κάθε όργανο και ιστό που εξετάστηκε. Δεδομένου ότι μέχρι σήμερα δεν έχουν εντοπιστεί άλλες *Fras1/Frem* πρωτεΐνες στα αιμοφόρα αγγεία, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η Frem3, έχει τη δυνατότητα να λειτουργεί ανεξάρτητα από τις άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας.



Εικόνα 7. Εντοπισμός της πρωτεΐνης Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2 με ανοσοφθορισμό στη βασική μεμβράνη των ενδοθηλίων. (A) Εντοπισμός της Frem3 σε τριχοειδή υπό-επιδερμικά αγγεία, σε έμβryo E10.5. (B) Εντοπισμός της Frem3 τόσο στα αγγεία όσο και στη βασική μεμβράνη του χοριειδούς πλέγματος του εγκεφάλου, εμβρύου E13.5. Εντοπισμός της Frem3 σε τριχοειδή αγγεία στον νευρικό σωλήνα εμβρύου E14.5, (C) και στον ρομβοειδή εγκέφαλο εμβρύου E13.5 (D). Η Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2, εξακολουθεί να εντοπίζεται σε όλες τις βασικές μεμβράνες κατά την ενήλικη ζωή, και άρα και στα αιμοφόρα αγγεία. Εδώ φαίνεται ο εντοπισμό της σε αγγεία του εντέρου (E), των όρχεων (F), της ουράς (G) και των νεφρών (H).

Με στόχο την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού με τα αντισώματα Frem3-N2 και PECAM, το οποίο εντοπίζει τη μεμβρανική πρωτεΐνη CD31 των ενδοθηλιακών κυττάρων, και άρα χρησιμοποιείται ως δείκτης των αιμοφόρων αγγείων. Όπως έγινε εμφανές και από τα αποτελέσματα, η πρωτεΐνη Frem3-N2, συνεντοπίζεται με το PECAM σε όλα τα αιμοφόρα αγγεία. Στην Εικ.8 ενδεικτικά φαίνονται αγγεία από τις περιοχές του νωτιαίου μυελού (A-C), του νευρικού σωλήνα (D-F), της σπονδυλικής στήλης ανάμεσα στους σωμίτες (G-I) και του ρομβοειδούς εγκεφάλου (J-L). Επιπλέον, στα μεγαλύτερα αγγεία που έχουν πιο πολύπλοκη δομή, όπως αυτά του νευρικού σωλήνα και του νωτιαίου μυελού, φαίνεται ότι η πρωτεΐνη Frem3 περιβάλλει την PECAM, δείχνοντας ότι ενώ η CD31 είναι διαμεμβρανική η Frem3 βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο.



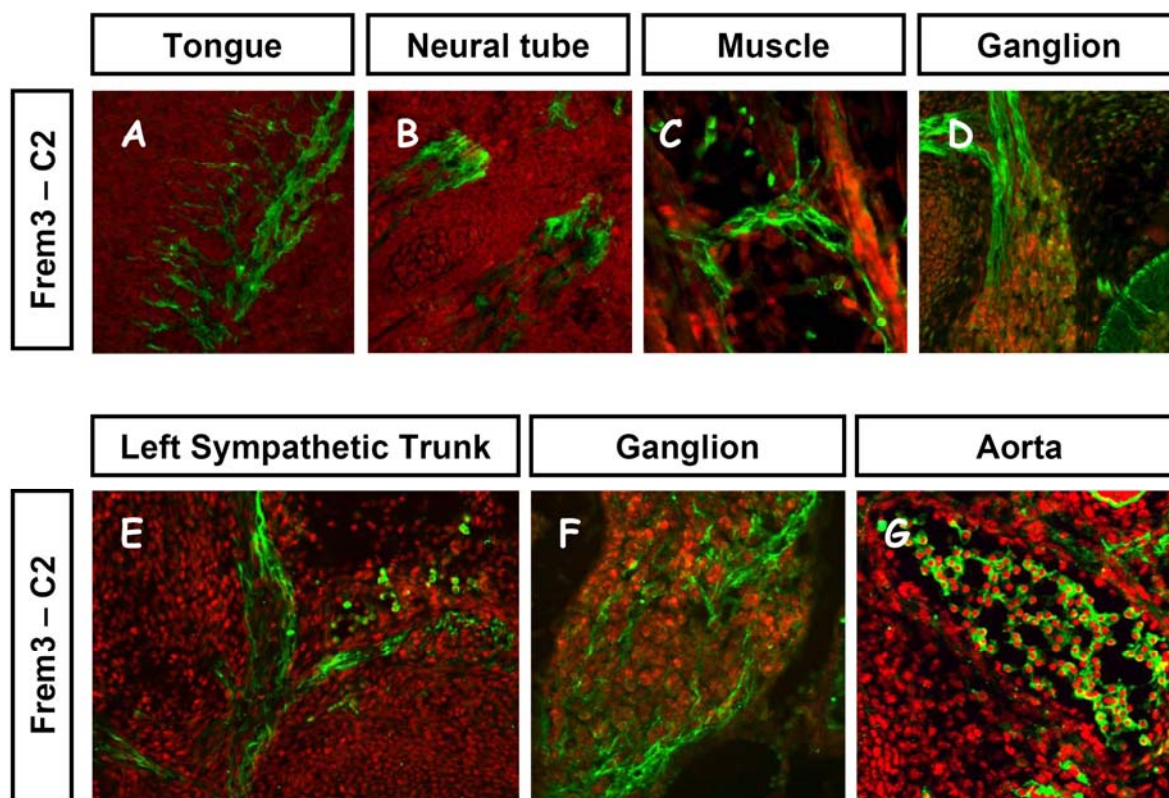
Εικόνα 8. Εντοπισμός των πρωτεϊνών Frem3 με το αντίσωμα N2 και PECAM σε αγγεία, στην περιοχή του νωτιαίου μυελού (spinal cord) (A-C), στην περιοχή του νευρικού σωλήνα (neural tube) (D-F), στη σπονδυλική στήλη ανάμεσα στους σωμίτες (spine) (G-I) και στον ρομβοειδή εγκέφαλο (hindbrain) (J-L).

3.2 Διαφοροποιήσεις στον εντοπισμό της πρωτεΐνης Frem3 με το αντίσωμα Frem3-C2.

Πέρα από τις διαφοροποιήσεις που παρατηρήσαμε στον εντοπισμό της Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2, ο περαιτέρω χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης με το αντίσωμα Frem3-C1 σε έμβρυα ποντικού, μας κατέδειξε δύο ενδιαφέροντα ευρήματα, τα οποία συνοψίζονται ακολούθως.

i) Εντοπισμός της Frem3 με το αντίσωμα Frem3-C2 στα περιφερικά νεύρα και σε κύτταρα του αίματος κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη

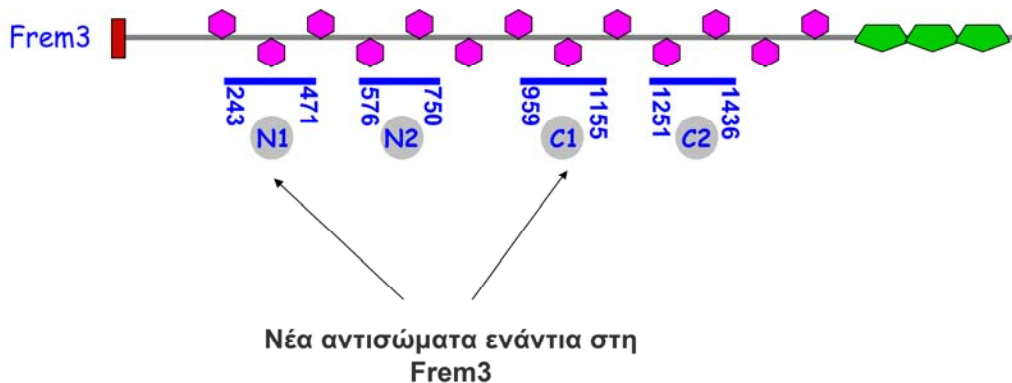
Η Frem3 πρωτεΐνη φαίνεται να εντοπίζεται σε νεύρα του περιφερικού νευρικού συστήματος κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη καθώς και σε κύτταρα του αίματος. Παρόλα αυτά, μέχρι τώρα δεν έχει χαρακτηριστεί η ακριβής θέση της πρωτεΐνης στους παραπάνω ιστούς. Αξίζει παρόλα αυτά και πάλι να σημειωθεί ότι μέχρι σήμερα, καμία άλλη πρωτεΐνη της οικογένειας δεν έχει εντοπιστεί σε περιφερικά νεύρα ή κύτταρα του αίματος.



Εικόνα 9. Εντοπισμός της πρωτεΐνης Frem3-C2 στα περιφερικά νεύρα (A-F) και στα κύτταρα του αίματος (G).

3.3 Νέα αντισώματα ενάντια στη Frem3

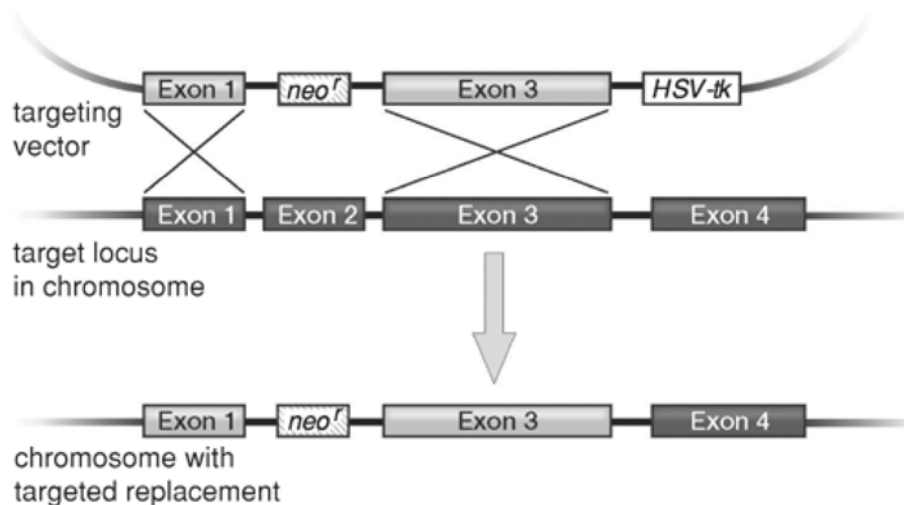
Για την επιβεβαίωση των παραπάνω παρατηρήσεων και την εξαγωγή συμπεράσματος σχετικά με την διττή συμπεριφορά της πρωτεΐνης Frem3, παρασκευάστηκαν δύο νέα αντισώματα για την πρωτεΐνη αυτή σε περιοχές κοντά σε αυτές που αναγνωρίζουν τα ήδη υπάρχοντα αντισώματα Frem3-N2 και Frem3-C2. Αυτό έγινε για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα από τα αρχικά αντισώματα, δεδομένου ότι δεν υπήρχαν ποντίκια στα οποία να έχει καταστραφεί το γονίδιο Frem3 ώστε να χρησιμοποιηθούν για το έλεγχο της ειδικότητας των αντισωμάτων. Η επιλογή των κατάλληλων περιοχών έγινε με βάση τις περιοχές που ήδη αναγνωρίζουν τα προϋπάρχοντα αντισώματα. Τα αντισώματα παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στην ενότητα “Υλικά και μέθοδοι-πλασμιδιακές κατασκευές”, ενώ συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παραγωγή τους περιελάμβανε την απομόνωση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών από τις οποίες θα προέλθουν τα αντιγονικά πεπτιδία, την ένθεσή τους σε φορείς έκφρασης για την υπερπαραγωγή των πεπτιδίων, την απομόνωση των πεπτιδίων και χορήγησή τους σε κουνέλια και τέλος, τη λήψη ορού, τον καθαρισμό και τον έλεγχο των αντισωμάτων. Τα νέα αντισώματα Frem3-N1 και Frem3-C1, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, είναι ενάντια σε διαφορετικά τμήματα της περιοχής που παρουσιάζει ομολογία με την NG2 πρωτεογλυκάνη.



Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανοσοφθορισμού επιβεβαίωσαν, με ελαφριές διαφοροποιήσεις, τις προηγούμενες παρατηρήσεις, με το αντίσωμα Frem3-N1 να συμπεριφέρεται όπως ακριβώς και το Frem3-N2, και αντίστοιχα το αντίσωμα Frem3-C1 να δίνει το ίδιο πρότυπο εντοπισμού με το Frem3-C2.

3.4 Απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3* στον ποντικό

Μια από τις προσεγγίσεις μέσω της οποίας αποφασίστηκε να μελετηθεί η βιολογική λειτουργία του γονιδίου *Frem3*, είναι η απενεργοποίησή του στον ποντικό, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού (Εικ.10). Με τη μέθοδο αυτή εισάγεται στο ενδογενές γονίδιο *Frem3* μια κατασκευή DNA (κασέτα) η οποία προκαλεί πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης με αποτέλεσμα να καταστρέφεται η λειτουργική πρωτεΐνη. Για την ένθεση της κασέτας DNA στο *Frem3* απαιτήθηκε η δημιουργία κατάλληλης πλασμιδιακής κατασκευής η οποία εισήχθη με ομόλογο ανασυνδυασμό στο γονιδίωμα των πολυδύναμων προγονικών κυττάρων (ES cells) και αντικατέστησε ένα τμήμα του ενδογενούς γονιδίου *Frem3*. Η πλασμιδιακή αυτή κατασκευή, η οποία ονομάζεται και κατασκευή στόχος (targeting construct), περιέχει ένα τμήμα του ενδογενούς *Frem3* καθώς επίσης και την κασέτα που θέλουμε να εισαχθεί στο *Frem3*. Η κασέτα περιλαμβάνει αλληλουχίες του πλασμιδιακού φορέα 'pBluescript loxPneoIoxP'. Στις αλληλουχίες αυτές συμπεριλαμβάνονται: το γονίδιο neomycin phosphotransferase (Neo^r : το οποίο προσφέρει ανοχή στο ανάλογο της νεομυκίνης, G418). Το γονίδιο αυτό αντικατέστησε ένα τμήμα του πρώτου εξονίου του *Frem3* το οποίο κωδικοποιεί το N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης.



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση της στοχευμένης απενεργοποίησης ενός γονιδίου με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού. Πάνω φαίνονται η κατασκευή στόχος (targeting vector) στην οποία το 2^ο εξόνιο του γονιδίου προς στόχευση, έχει αντικατασταθεί από το γονίδιο που προσφέρει ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη, το γονίδιο προς στόχευση (target locus in chromosome) και το στοχευμένο αλληλόμορφο (chromosome with targeted replacement).

Η έκφραση του γονιδίου *Neo^r*, ελέγχεται από ένα PGK (phosphoglycerate kinase) υποκινητή, ο οποίος είναι ενεργός στα ES κύτταρα, ενώ η μεταγραφή του γονιδίου της νεομυκίνης, σταματάει με τη βοήθεια ενσωματωμένων αλληλουχιών λήξης. Εκατέρωθεν της κασέτας στην κατασκευή στόχο, εντοπίζονται τμήματα του ενδογενούς γονιδίου *Frem3* έτσι ώστε ο ομόλογος ανασυνδυασμός ανάμεσα στην πλασμιδιακή κατασκευή και στο ενδογενές γονίδιο στα κύτταρα ES να πραγματοποιείται με αυξημένη συχνότητα. Οι γενωμικές περιοχές του ενδογενούς γονιδίου που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία της κατασκευής στόχο προήλθαν με τη διαδικασία της PCR, χρησιμοποιώντας proof-reading πολυμεράση για την αποφυγή λαθών, από γονιδίωμα του ίδιου στελέχους με τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (Sv129) στα οποία εισάχθηκε η κατασκευή, έτσι ώστε να μην παρατηρούνται πολυμορφισμοί ανάμεσα στα τμήματα του ενδογενούς γονιδίου προς στόχευση και στην πλασμιδιακή κατασκευή, οι οποίοι θα μείωναν το ποσοστό επιτυχίας του ομόλογου ανασυνδυασμού.

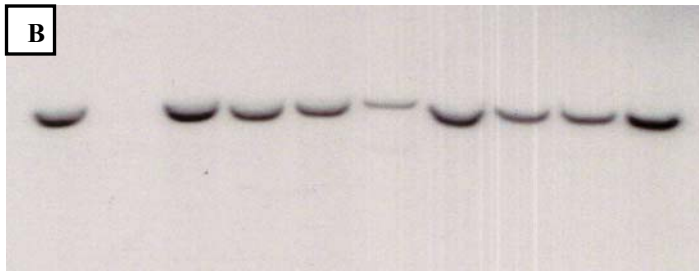
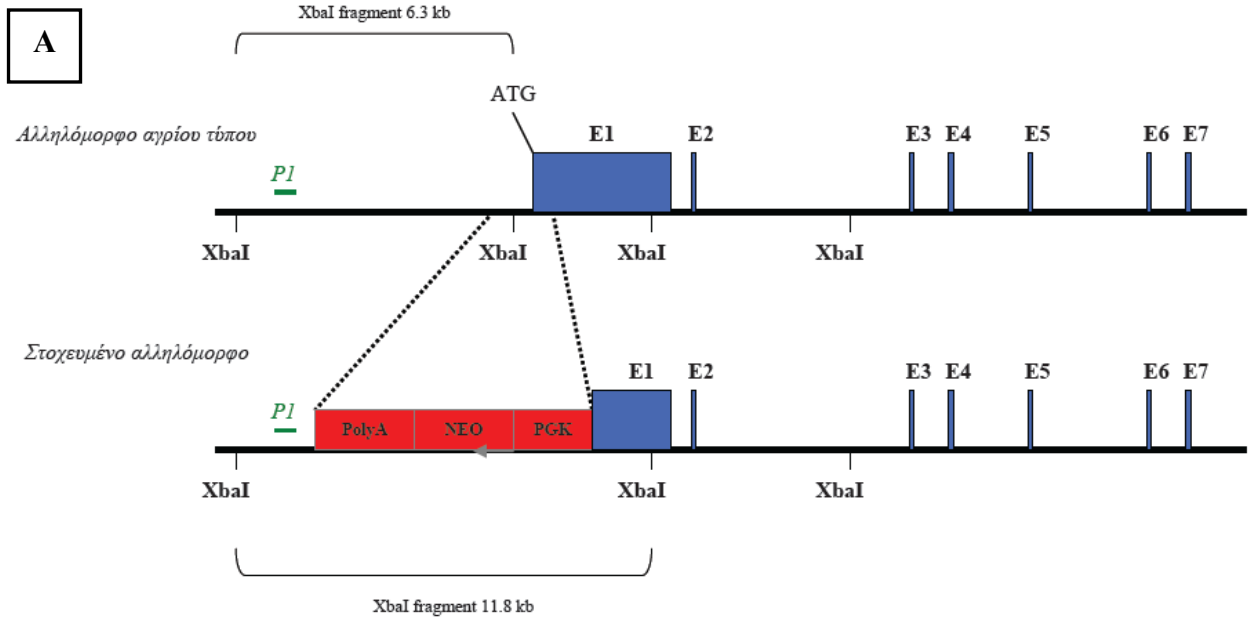
Η κατασκευή στόχος εισάγεται σε RI εμβρυϊκά πολυδύναμα κύτταρα με electroporation (η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο Max Planck, Goettingen σε συνεργασία με τον Dr Kamal Chowdhury). Ακόμα, η κατασκευή στόχος περιέχει μια μοναδική περιοριστική θέση (NotI), εκτός των γενωμικών τμημάτων του ενδογενούς γονιδίου και της κασέτας, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει γραμμική πριν εισαχθεί στα κύτταρα ES, αφού η γραμμική μορφή ευνοεί το ομόλογο ανασυνδυασμό. Τέλος, τα κύτταρα τα οποία επιβιώνουν παρουσία του G418, είναι αυτά που περιέχουν την κατασκευή στόχο. Η αντικατάσταση του ενδογενούς τμήματος μιας γενωμικής περιοχής από μια κατασκευή στόχο, όπως συμβαίνει τον ομόλογο ανασυνδυασμό, είναι πιθανόν σε ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων να συνοδεύεται και από ταυτόχρονες διαταραχές, στις περιοχές των άκρων που ανασυνδυάζονται. Ακόμα, σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να συμβαίνει και τυχαία ενσωμάτωση της κατασκευής στόχο. Για τους λόγους αυτούς αλλά και για να ελέγξουμε αν έγινε ομόλογος ανασυνδυασμός, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Southern καθώς και PCR των κλώνων εκείνων που επιβίωσαν παρουσία του G418. Ακολουθεί η λεπτομερής περιγραφή της διαδικασίας ελέγχου του ομόλογου ανασυνδυασμού και για τις τρεις κατασκευές. Παρόλα αυτά, η κατασκευή η οποία έδωσε επιτυχή ομόλογο ανασυνδυασμό είναι η τρίτη. Η διαδικασία

των κλωνοποιήσεων για τη δημιουργία των κατασκευών περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα “Υλικά και μέθοδοι”.

i) Κατασκευή 1^η για τη στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3*- Έλεγχος για την παρουσία ομόλογου ανασυνδυασμού με ανάλυση κατά Southern στο 5' άκρο

Στην πρώτη προσπάθεια για την απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3* η κατασκευή στόχος επωάστηκε με το ένζυμο NotI και η γραμμική μορφή της εισήχθη με ηλεκτρική εκκένωση (electroporation) στα ES κύτταρα (η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο Max Planck, Goettingen σε συνεργασία με τον Dr Kamal Chowdhury). Τα κύτταρα ES στα οποία ενσωματώθηκε επιλέχθηκαν παρουσία του αντιβιοτικού G418, αφού το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου της νεομυκίνης που περιέχεται στην κασέτα τους προσφέρει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Με αυτόν τον τρόπο απομονώθηκαν 228 κλώνοι ES, οι οποίοι αναλύθηκαν με Southern blot, προκειμένου να διαπιστωθεί σε ποιους έχει πραγματοποιηθεί ομόλογος ανασυνδυασμός (δεδομένου ότι η ενσωμάτωση της κατασκευής στόχου στο γονιδίωμα των ES, μπορεί να γίνει και τυχαία).

Το γενωμικό DNA από τους 228 θετικούς κλώνους επωάστηκε με XbaI και στη συνέχεια υβριδοποιήθηκε με τον ανιχνευτή *PI*. Ο ανιχνευτής *PI* βρίσκεται στο 5' άκρο του *Frem3*, ακριβώς πριν από την περιοχή ομολογίας που χρησιμοποιήσαμε στην κατασκευή-στόχο (Εικ.11A). Στην περίπτωση επιτυχούς ανασυνδυασμού αναμένεται μια ζώνη 11.8 kb, που προκύπτει όταν η κασέτα “*PGK promoter-Neo^r-PGK terminator*” εισάγεται με ομόλογο ανασυνδυασμό στο *Frem3* (Εικ.11A). Στην περίπτωση του αλληλόμορφου αγρίου τύπου γονιδίου *Frem3*, παράγεται μια ζώνη 6.3 kb (Εικ.11A). Από τους κλώνους που ελέγξαμε, κανένας δεν επέδειξε την μπάντα των 11.8kb και άρα δεν υπήρξε ομόλογος ανασυνδυασμός (Εικ.11B).



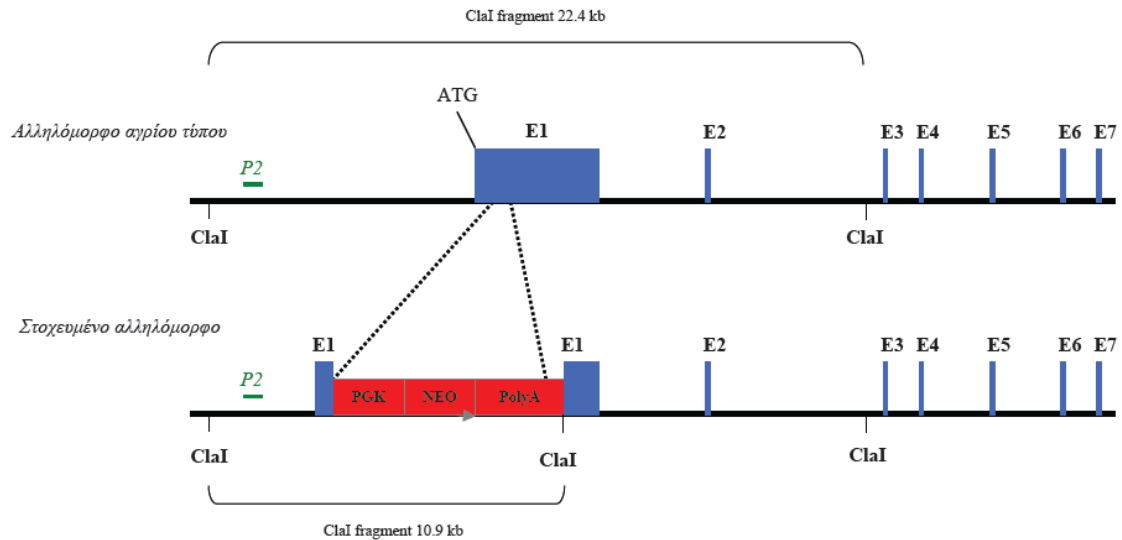
Εικόνα 11. Έλεγχος για ομόλογο ανασυνδυασμό στο 5' άκρο με γενωμικό Southern blot **(A)** Σχηματική αναπαράσταση ενός τμήματος του ενδογενούς αλληλόμορφου του γονιδίου *Frem3* και του αναμενόμενου αλληλόμορφου έπειτα από επιτυχή ομόλογο ανασυνδυασμό. Ταυτόχρονα σημειώνονται με κουτάκια τα εξόνια E1-E7, οι θέσεις περιορισμού XbaI καθώς και ο ανιχνευτής P1 που

λογου ανασυνδυασμού και της ακεραιότητας του 5' άκρου της στοχευμένης περιοχής. Η κατασκευή στόχος περιέχει την κασέτα νεομυκίνης που εισάγεται στο εξόνιο 1 (E1) και αντικαθιστά την περιοχή από 152716-153317 bp, συμπεριλαμβανομένου και του ATG. **(B)** Ανάλυση κατά Southern, γενωμικού DNA (κλώνοι 1-9) για το έλεγχο παρουσίας ομόλογου ανασυνδυασμού. Η υβριδοποίηση έγινε με τον ανιχνευτή P1, ενώ το DNA επώαστηκε με το ένζυμο XbaI. Όλοι οι κλώνοι δίνουν μόνο την αγρίου τύπου ζώνη των 6.3 kb.

ii) Κατασκευή 2^η για τη στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου Frem3- Έλεγχος για την παρουσία ομόλογου ανασυνδυασμού με ανάλυση κατά Southern στο 5' άκρο

Στη δεύτερη προσπάθεια για την απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3* η κατασκευή στόχος επώαστηκε και αυτή τη φορά με το ένζυμο NotI και η γραμμική μορφή της εισήχθη με ηλεκτρική εκκένωση στα ES κύτταρα. Τα κύτταρα ES στα οποία ενσωματώθηκε επιλέχθηκαν παρουσία του αντιβιοτικού G418, αφού το πρωτεϊνικό

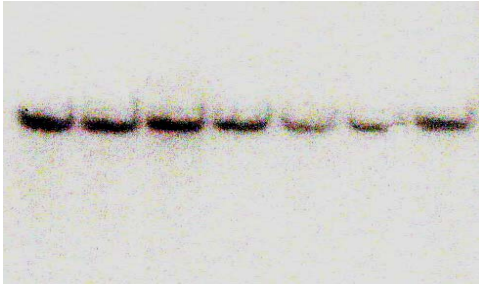
προϊόν του γονιδίου της νεομυκίνης που περιέχεται στην κασέτα τους προσφέρει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Με αυτόν τον τρόπο απομονώθηκαν 242 κλώνοι ES, οι οποίοι αναλύθηκαν με Southern blot, προκειμένου να διαπιστωθεί σε ποιους έχει πραγματοποιηθεί ομόλογος ανασυνδυασμός.



Εικόνα 12. Στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3*. Σχηματική αναπαράσταση του τμήματος του ενδογενούς αλληλόμορφου του γονιδίου *Frem3* και του αναμενόμενου αλληλόμορφου έπειτα από επιτυχή ομόλογο ανασυνδυασμό. Ταυτόχρονα σημειώνονται με κουτάκια τα εξόνια E1-E7, οι θέσεις περιορισμού *Cla*I καθώς και ο ανιχνευτής P2 που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ομόλογου ανασυνδυασμού και της ακεραιότητας του 5' άκρου της στοχευμένης περιοχής. Η κατασκευή στόχος περιέχει την κασέτα νεομυκίνης που εισάγεται στο εξόνιο 1 (E1) και αντικαθιστά την περιοχή από 155808-156669 bp, ενώ αυτή τη φορά το ATG έχει συμπεριληφθεί στη κατασκευή-στόχο.

Το γενωμικό DNA από τους 242 θετικούς κλώνους επωάστηκε με *Cla*I και στη συνέχεια υβριδοποιήθηκε με τον ανιχνευτή P2 (Εικ.12). Η *Cla*I βρίσκεται στις θέσεις: 146743 bp και 169227 bp στο αγρίου τύπου αλληλόμορφο *Frem3* (Εικ.12). Στο στοχευμένο αλληλόμορφο υπάρχει μια επιπλέον θέση *Cla*I η οποία έχει εισαχθεί μέσω της κατασκευής-στόχου και βρίσκεται πάνω στον πολυσυνδέτη του φορέα pbluescrip loxp-Neo-loxp, ακριβώς μετά το τέλος του PGK terminator (Εικ.12). Ο ανιχνευτής P2 βρίσκεται στο 5' άκρο του *Frem3*, ακριβώς πριν από την περιοχή ομολογίας που χρησιμοποιήσαμε στην κατασκευή-στόχο. Στην περίπτωση επιτυχούς ανασυνδυασμού περιμένουμε μια μπάνα 10.9 kb, που προκύπτει όταν η κασέτα “PGK promoter-Neo^r-PGK terminator” εισάγεται με ομόλογο ανασυνδυασμό στο *Frem3* (Εικ.12). Στην

περίπτωση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου γονιδίου *Frem3*, παράγεται μια ζώνη 22.4 kb (Εικ.12). Από τους κλώνους που ελέγξαμε, κανένας δεν επέδειξε την μπάντα των 10.9kb και άρα δεν υπήρξε ομόλογος ανασυνδυασμός (Εικ.13).



Εικόνα 13. Ανάλυση κατά Southern, γενωμικού DNA (κλώνοι 1-9) για το έλεγχο παρουσίας ομόλογου ανασυνδυασμού. Η υβριδοποίηση έγινε με τον ανιχνευτή P2, ενώ το DNA επώαστηκε με το ένζυμο *ClaI*. Όλοι οι κλώνοι δίνουν την αγρίου τύπου ζώνη των 22.4 kb.

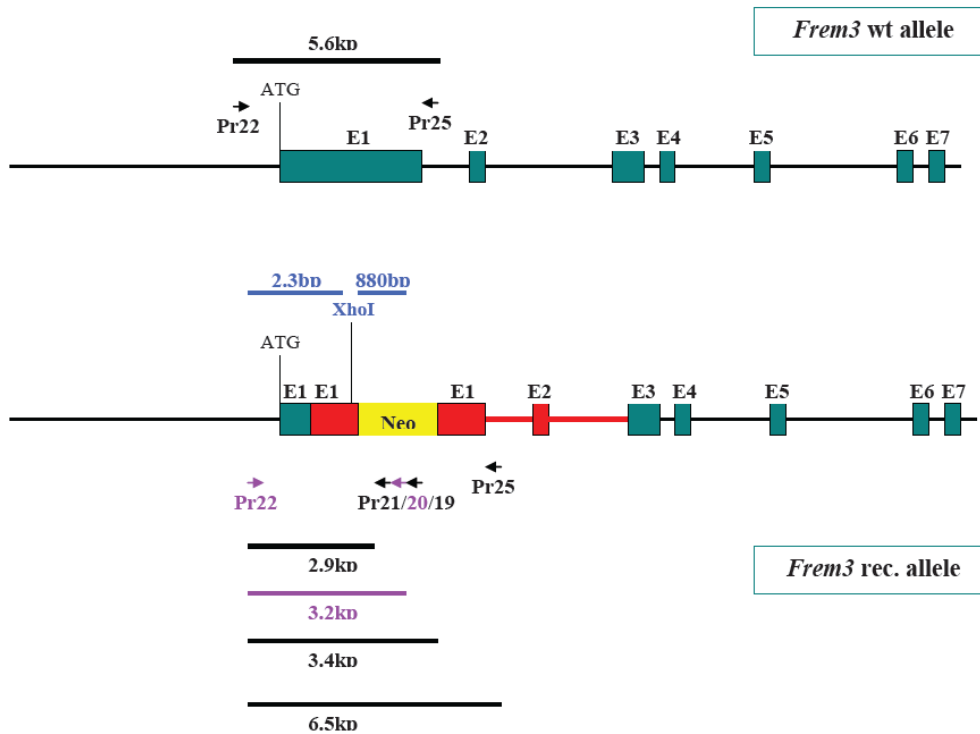
iii) Κατασκευή 3^η για τη στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3*- Έλεγχος για την παρουσία ομόλογου ανασυνδυασμού με ανάλυση PCR στο 5' άκρο

Στην τρίτη προσπάθεια για την απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3* η κατασκευή στόχος επώαστηκε με το ένζυμο *NotI* και η γραμμική μορφή της εισήχθηκε με ηλεκτρική εκκένωση στα ES κύτταρα (η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο Max Planck, Goettingen σε συνεργασία με τον Dr Kamal Chowdhury). Τα κύτταρα ES στα οποία ενσωματώθηκε επιλέχθηκαν παρουσία του αντιβιοτικού G418, αφού το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου της νεομυκίνης που περιέχεται στην κασέτα τους προσφέρει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Με αυτόν τον τρόπο απομονώθηκαν 250 κλώνοι ES, οι οποίοι αναλύθηκαν με PCR και Southern blot, προκειμένου να διαπιστωθεί σε ποιους έχει πραγματοποιηθεί ομόλογος ανασυνδυασμός.

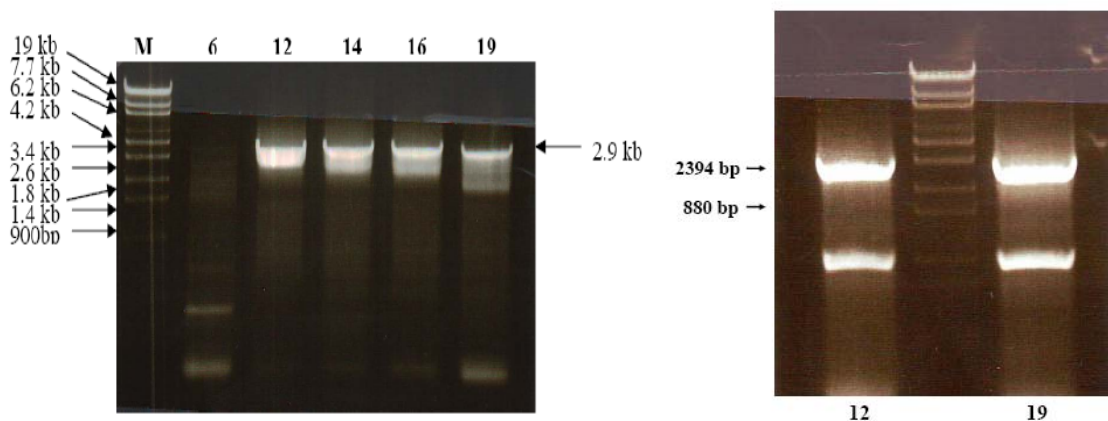
Για την ανάλυση με PCR στο 5' άκρο, σχεδιάστηκαν αρχικά οι εκκινητές:

- 1) Pr22 ο οποίος βρίσκεται ακριβώς 2 bp πριν από το ATG του γονιδίου και κατά συνέπεια έξω από την 5' περιοχή ομολογίας που χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή στόχο (Εικ. 14),
- 2) Pr19 (653 bp), Pr20 (414 bp) και Pr21 (340 bp) εκκινητές οι οποίοι εντοπίζονται είτε σε αλληλουχίες της νεομυκίνης (Pr19), είτε πάνω στον PGK υποκινητή (Pr20/Pr21) (Εικ. 14).

Με τους συνδυασμούς Pr22-Pr19, Pr22-Pr20 και Pr22-Pr21 γίνεται ο έλεγχος για την ταυτοποίηση του στοχευμένου αλληλομόρφου του *Frem3*. Το μέγεθος των παραγόμενων προϊόντων από τις παραπάνω PCR κυμαίνεται μεταξύ 2959-3472 bp, στην περίπτωση επιτυχούς ομόλογου ανασυνδυασμού, ανάλογα με το συνδυασμό των εκκινητών που χρησιμοποιείται κάθε φορά. Στην περίπτωση του αγρίου τύπου αλληλόμορφου δεν παράγεται κανένα προϊόν αφού όλοι οι reverse εκκινητές βρίσκονται εκτός της ενδογενούς αλληλουχίας. Με την παραπάνω διαδικασία ταυτοποιήθηκαν 9 διαφορετικοί κλώνοι (# 3, 9, 12, 14, 16, 17, 19, 49, 242) στους οποίους φαίνεται να έχει γίνει ομόλογος ανασυνδυασμός (Εικ. 15). Τα προϊόντα που προέκυψαν από τις παραπάνω PCR επώαστηκαν και με το περιοριστικό ένζυμο XhoI, το οποίο κόβοντας δίνει δυο διακριτές ζώνες: 2394 και 880 bp (Εικ. 15).



Εικόνα 14. Έλεγχος για την παρουσία ομόλογου ανασυνδυασμού με PCR στο 5' άκρο. Σχηματική αναπαράσταση του αγρίου τύπου αλληλόμορφου, της κατασκευής στόχου και της ενσωμάτωσης της κασέτας που περιέχει στο γονίδιο *Frem3*. Σημειώνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο με PCR και τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων. Ακόμα, επισημαίνεται το ένζυμο XhoI που χρησιμοποιήθηκε για τις πέψεις των PCR προϊόντων. Με κουτάκια και αρίθμηση E1-7 σημειώνονται τα εξόνια του *Frem3*.



Εικόνα 15. PCR με εκκινητές Pr22/Pr20, από τους κλώνους 6, 12, 14, 16 και 19. Οι κλώνοι 12, 14, 16, 19 δίνουν το αναμενόμενο προϊόν των 2.9 kb που δηλώνει το στοχευμένο αλληλόμορφο. Αντίθετα, ο κλώνος 6 φαίνεται να είναι αγρίου τύπου και άρα δεν παράγεται προϊόν. (M: λStyI marker). Πέψεις με XhoI των προϊόντων από τις PCR Pr22/Pr21, από τους κλώνους 12 και 19. Οι ζώνες που προκύπτουν είναι 2394 και 880 bp. (φωτογραφία αριστερά).

Στη συνέχεια, με σκοπό την ταυτοποίηση του αγρίου τύπου αλληλόμορφου, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι συνδυασμοί εκκινητών: 1) Pr22/Pr25 (ο Pr25 συμπεριλαμβάνεται στις αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή-στόχο στο 3' άκρο). Με το συνδυασμό αυτό παίρνουμε δυο προϊόντα: 6.5kb στην περίπτωση του ομόλογου ανασυνδυασμού και 5.6kb για το αγρίου τύπου αλληλόμορφο. Βέβαια, λόγω του ότι ο εκκινητής Pr25 βρίσκεται σε περιοχή που έχει συμπεριληφθεί στην κατασκευή στόχο, κάθε αντίδραση με ανασυνδυασμένο DNA θα δίνει ταυτόχρονα και την αγρίου τύπου ζώνη (Εικ. 10). 2) Pr23 / Pr25. Οι δύο αυτοί εκκινητές βρίσκονται πάνω σε αλληλουχίες του *Frem3* οι οποίες έχουν συμπεριληφθεί στην κατασκευή στόχο, ο Pr23 στην 5' μεριά και ο Pr25 στην 3', ενώ μεταξύ τους παρεμβάλλεται η κασέτα νεομυκίνης. Και σε αυτή την περίπτωση οι PCR αντιδράσεις δίνουν δυο διακριτές ζώνες: στην περίπτωση του αγρίου τύπου αλληλόμορφου 3.1kb, ενώ στη περίπτωση του στοχευμένου αλληλόμορφου 4.1kb καθώς παρεμβάλλεται η κασέτα νεομυκίνης (Εικ. 10). Τα παραπάνω προϊόντα επώαστηκαν στη συνέχεια με το περιοριστικό ένζυμο XbaI για επιπλέον ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων. Το ένζυμο XbaI κόβει στη θέση 158542 bp του *Frem3* και στον πολυσυνδέτη του φορέα pbluescript loxp-neo^f-loxp αμέσως μετά το τέλος της κασέτας νεομυκίνης. Από την παραπάνω πέψη προέκυψαν οι ακόλουθες ζώνες: 3104, 3080, 2117 και 1896 bp (η ζώνη των 3080 bp δηλώνει το αγρίου τύπου αλληλόμορφο).

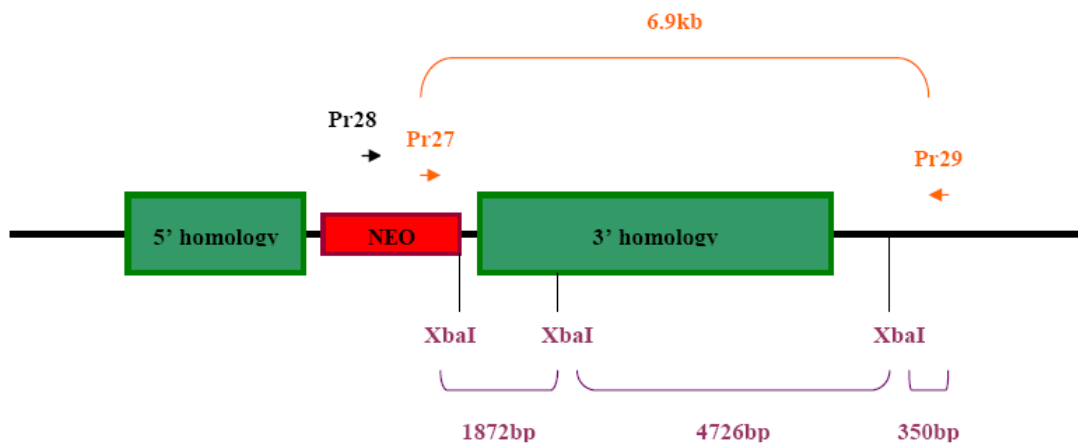
iv) Κατασκευή 3ⁿ για τη στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου Frem3- Έλεγχος για την παρουσία ομόλογου ανασυνδυασμού με ανάλυση PCR στο 3' άκρο

Για την ανάλυση με PCR στο 3' άκρο, σχεδιάστηκαν αρχικά οι εκκινητές:

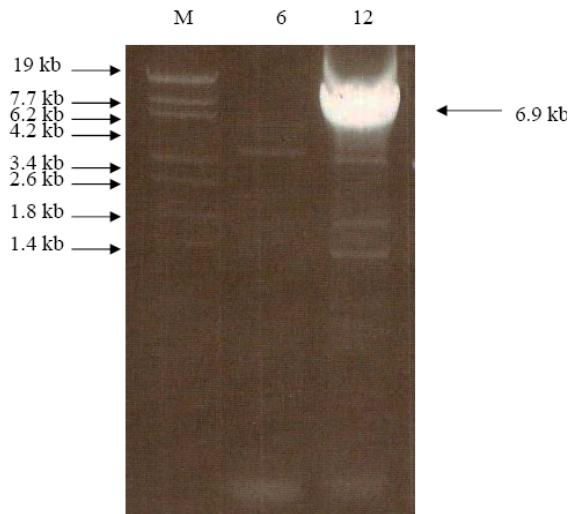
- 1) Pr27/Pr28 οι οποίοι βρίσκονται στην περιοχή 1807 και 1702 bp, σε αλληλουχίες του PGK terminator (Εικ. 16),

- 2) Pr29 ο οποίος εντοπίζεται σε αλληλουχίες του *Frem3*, μετά το 2^ο εξόνιο του γονιδίου και κατά συνέπεια έκτος των αλληλουχιών που χρησιμοποιήσαμε για την κατασκευή-στόχο (Εικ. 16).

Με τους συνδυασμούς Pr27-Pr29 και Pr28-Pr29, γίνεται ο έλεγχος για την ταυτοποίηση του στοχευμένου αλληλομόρφου του *Frem3*. Το μέγεθος των παραγόμενων προϊόντων από τις παραπάνω PCR είναι 6.9 kb, στην περίπτωση επιτυχούς ομόλογου ανασυνδυασμού. Στην περίπτωση του αγρίου τύπου αλληλόμορφου δεν παράγεται κανένα προϊόν αφού όλοι οι forward εκκινητές βρίσκονται πάνω στην κασέτα νεομυκίνης. Με την παραπάνω διαδικασία ταυτοποιήθηκαν ξανά οι ίδιοι 9 κλώνοι (# 3, 9, 12, 14, 16, 17, 19, 49, 242) στους οποίους φαίνεται να έχει γίνει ομόλογος ανασυνδυασμός (Εικ. 17).



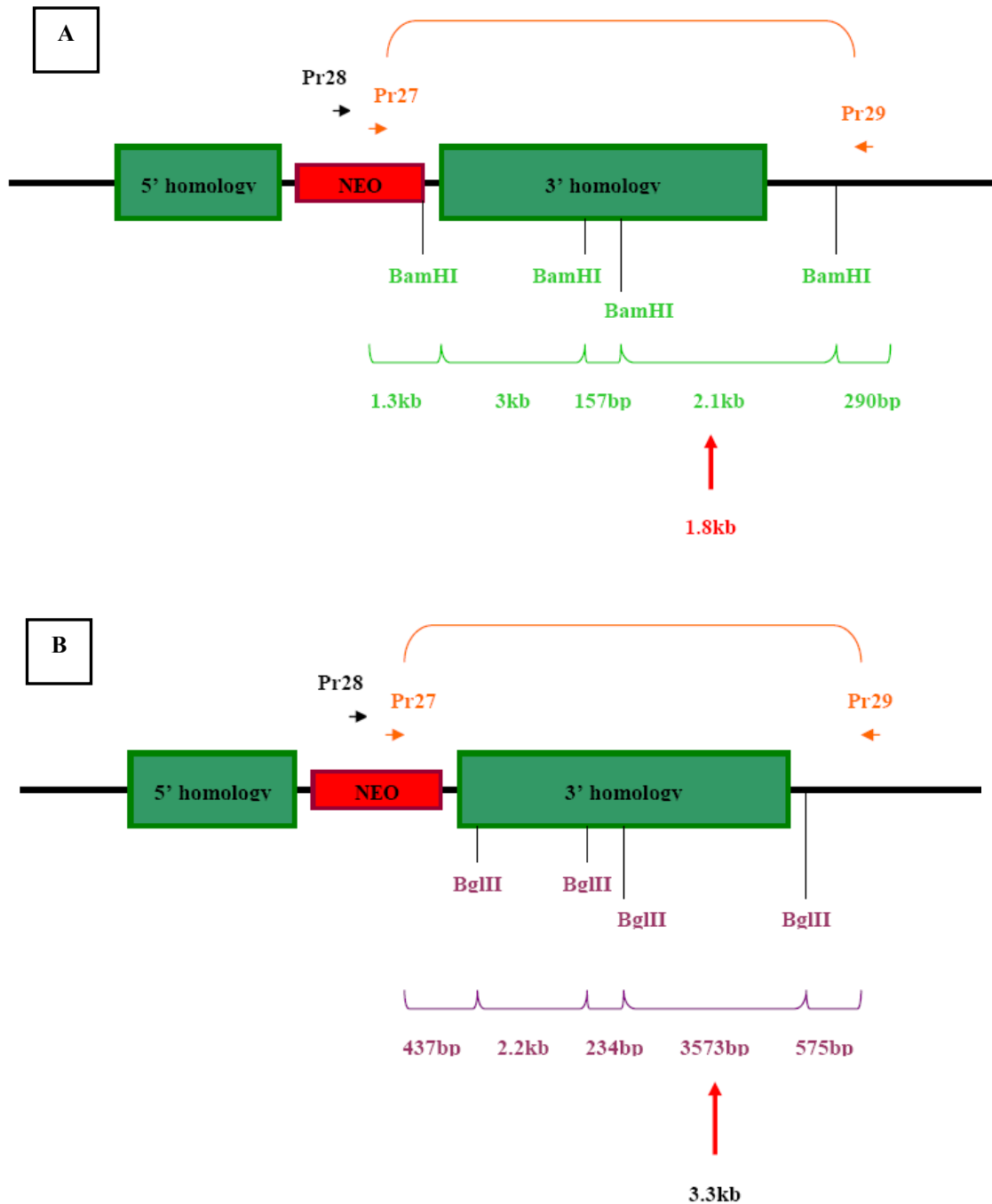
Εικόνα 16. Έλεγχος για την παρουσία ομόλογου ανασυνδυασμού με PCR στο 3' άκρο. Σχηματική αναπαράσταση του στοχευμένου αλληλόμορφου. Σημειώνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο με PCR και τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων. Ακόμα, επισημαίνεται το ένζυμο XbaI που χρησιμοποιήθηκε για τις πέψεις των PCR προϊόντων.



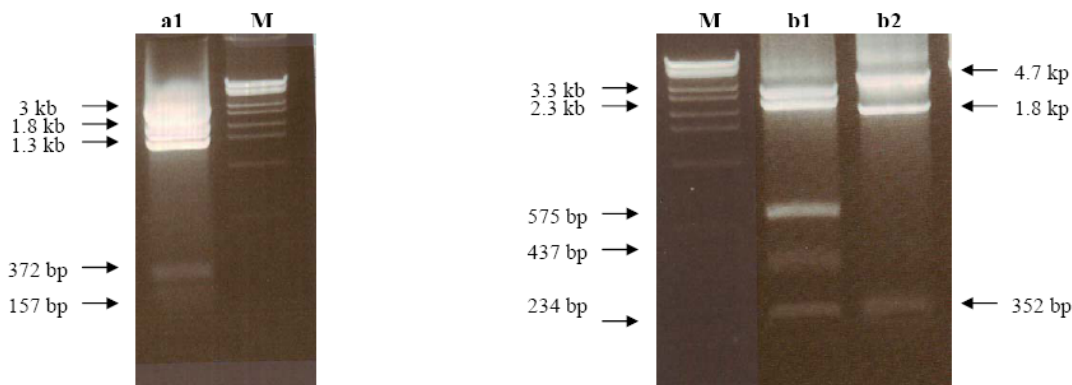
Εικόνα 17. PCR με εκκινητές Pr27/Pr29, από τους κλώνους 6 και 12. Όπως φαίνεται και στην εικόνα μόνο ο 12 δίνει το αναμενόμενο προϊόν των 6.9 kb (στοχευμένο αλληλόμορφο), ενώ ο 6 είναι αγρίου τύπου. Ακόμα, οι κλώνοι 3, 9, 14, 16, 17, 19, 49 και 242, παρουσίασαν το ίδιο προϊόν με τον κλώνο 12, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα και από τις PCR στο 5' άκρο. (M: λStyI marker).

Τα προϊόντα που προέκυψαν από τις παραπάνω PCR επωάστηκαν και με τα περιοριστικά ένζυμα BglII, XbaI και BamHI (Εικ. 16 & 18) με σκοπό την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Οι θέσεις στις οποίες κόβουν τα ένζυμα καθώς και οι ζώνες που προκύπτουν, φαίνονται στον πίνακα 1 και 2 αντίστοιχα. Ενώ η πέψη με την XbaI φαίνεται να δίνει ζώνες με τα αναμενόμενα μεγέθη (Εικ. 19), παρόλα αυτά οι πέψεις με τις BglII και BamHI (Εικ. 19) παρουσιάζουν κάποιες ιδιομορφίες. Στην πέψη με το ένζυμο BglII η μάντα των 3.5 kb, δηλαδή η ζώνη που προκύπτει από τις δυο τελευταίες BglII θέσεις φαίνεται να είναι λίγο μικρότερη (Εικ. 19). Το ίδιο γεγονός επιβεβαιώνεται και με την πέψη με BamHI (Εικ. 19), όπου η αναμενόμενη ζώνη των 2.1 kb, που προκύπτει από τις δυο τελευταίες BamHI θέσεις, είναι στην πραγματικότητα μικρότερη (περίπου 1.8 kb).

Όπως προκύπτει με βάση τα παραπάνω, φαίνεται να υπάρχει μια έλλειψη στο κομμάτι μεταξύ που βρίσκεται στο τέλος της περιοχής που έχει χρησιμοποιηθεί στην κατασκευή στόχο. Συχνά η αντικατάσταση του ενδογενούς τμήματος μιας γενωμικής περιοχής από μια κατασκευή στόχο, όπως συμβαίνει στον ομόλογο ανασυνδυασμό, είναι πιθανόν σε ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων ES να συνοδεύεται από ταυτόχρονες διαταραχές (π.χ. ελλείψεις) στις περιοχές των άκρων του DNA που ανασυνδυάζονται.



Εικόνα 18. Πένεις με *Bam*HI και *Bgl*III του προϊόντος Pr27-Pr29 στο 3' άκρο. Σχηματική αναπαράσταση του στοχευμένου αλληλόμορφου. Σημειώνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο με PCR και τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων. Ακόμα, επισημαίνονται τα ένζυμα *Bam*HI (εικόνα **A**) και *Bgl*III (εικόνα **B**) που χρησιμοποιήθηκαν για τις πένεις των PCR προϊόντων καθώς και οι αναμενόμενες μπάντες. Με κόκκινο βέλος σημειώνονται οι ζώνες που προέκυψαν και οι οποίες διαφέρουν από τους αναμενόμενους υπολογισμούς.



Εικόνα 19. Πέψεις με *Bam*HI (a1), *Bgl*II (b1), *Xba*I (b2) των προϊόντων από τις PCR Pr27/Pr29, από τον κλώνο 12. Οι αναμενόμενες ζώνες φαίνονται στον Πίνακα 2, ενώ οι ζώνες που πραγματικά προέκυψαν σημειώνονται δίπλα από τις εικόνες. (M: λStyI marker)

Πίνακας 1. Θέσεις περιορισμού των ενζύμων *Xba*I, *Bgl*II & *Bam*HI στο *Frem3*

<i>Xba</i> I	158541 bp	163291 bp	(1889 bp-PGK terminator)	
<i>Bgl</i> II	157031 bp	159494 bp	159260 bp	163067 bp
<i>Bam</i> HI	159678 bp	161016 bp	161166 bp	163270 bp

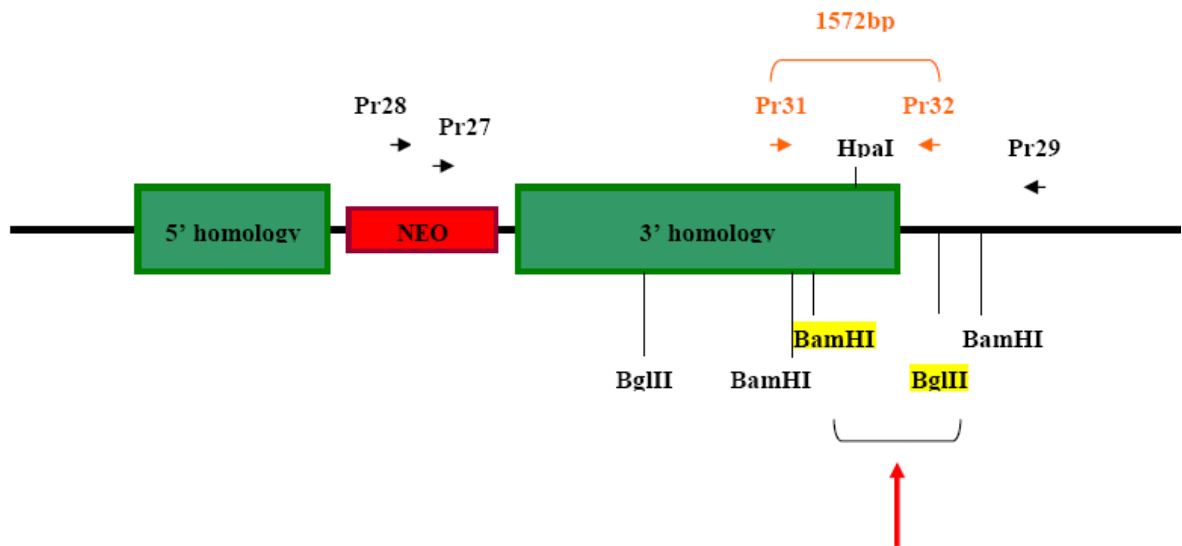
Πίνακας 2. Ζώνες που προκύπτουν από την πέψη του προϊόντος της PCR Pr27/Pr29

<i>Xba</i> I	4726 bp	1872 bp	351 bp		
<i>Bgl</i> II	3573 bp	2259 bp	575 bp	437 bp	234 bp
<i>Bam</i> HI	3038 bp	2104 bp	1309 bp	291 bp	150 bp

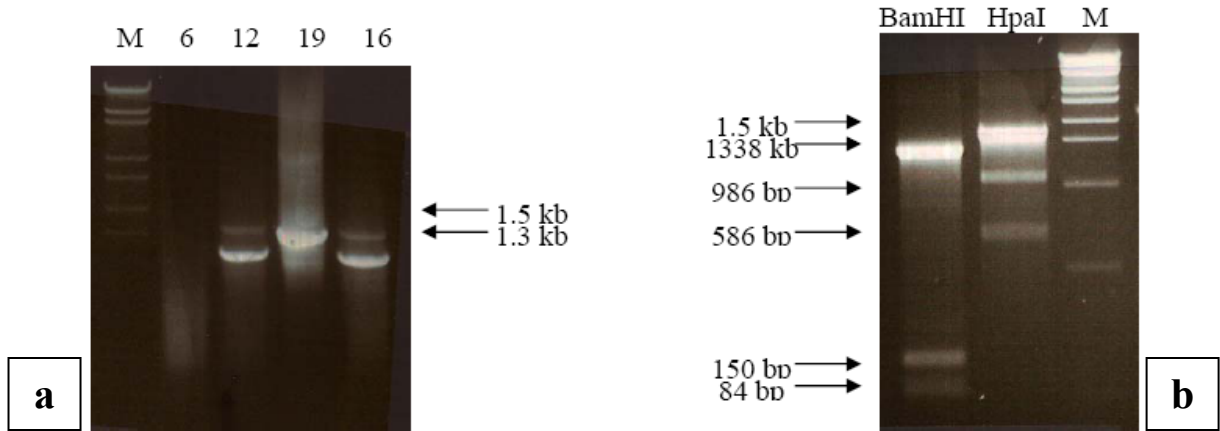
Με σκοπό τη διαλεύκανση του παραπάνω αποτελέσματος, σχεδιάστηκαν δύο νέοι εκκινητές Pr31/Pr32 (Εικ. 205). Ο εκκινητής Pr31 βρίσκεται στη θέση 160933 bp, εντός της αλληλουχίας που χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή στόχο, 233bp πριν από την πρότελευταία *Bam*HI (161166 bp). Ο Pr32 βρίσκεται στη θέση 162483 bp, σε αλληλουχίες του *Frem3* που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στην κατασκευή στόχο, μεταξύ των δύο τελευταίων *Bam*HI θέσεων. Πραγματοποιώντας τη συγκεκριμένη PCR αντίδραση με ES DNA από κλώνους που βρέθηκαν θετικοί, θα παράγεται και το αγρίου

τύπου κομμάτι της τάξης των 1572 bp, αλλά και το στοχευμένο αλληλόμορφο μικρότερου μεγέθους, αν υπάρχει πραγματικά μια έλλειψη σε εκείνη την περιοχή.

Όπως φαίνεται και στην Εικ. 21a οι αντιδράσεις με τους κλώνους 12 και 16 φαίνεται να παράγουν ένα μικρότερο προϊόν σε μεγάλη ποσότητα, παράλληλα με το αγρίου τύπου, ενώ ο κλώνος 19 δίνει μια μόνο ζώνη 1.5 kb, όσο δηλαδή είναι το αναμενόμενο αγρίου τύπου κομμάτι, χωρίς να φαίνεται πουθενά το στοχευμένο αλληλόμορφο (αν είναι πραγματικά μικρότερο). Με στόχο την περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκαν πέψεις των προϊόντων με τα ένζυμα BamHI (161039 bp και 161189 bp) και HpaI (161941 bp). Τα κομμάτια που προκύπτουν από τις παραπάνω πέψεις είναι: 84, 150, 1334 bp (BamHI) και 586, 986 bp (HpaI). Από τα αποτελέσματα (Εικ. 21b), δεν φαίνεται να υπάρχει κανένα κομμάτι μικρότερου μεγέθους από τα αναμενόμενα, ώστε να επιβεβαιώνει τις αρχικές ενδείξεις, ότι δηλαδή υπάρχει κάποια έλλειψη στο στοχευμένο αλληλόμορφο με αποτέλεσμα να είναι μικρότερο από το αγρίου τύπου.



Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση της PCR με εκκινήτες Pr31/Pr32. Στο σχήμα σημειώνονται και τα ένζυμα BamHI και HpaI που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του προϊόντος. Ακόμα, με κόκκινο βέλος επισημαίνεται η περιοχή που προσδιορίστηκε ότι υπάρχει μια έλλειψη, μεταξύ δυο BamHI και BglII θέσεων.

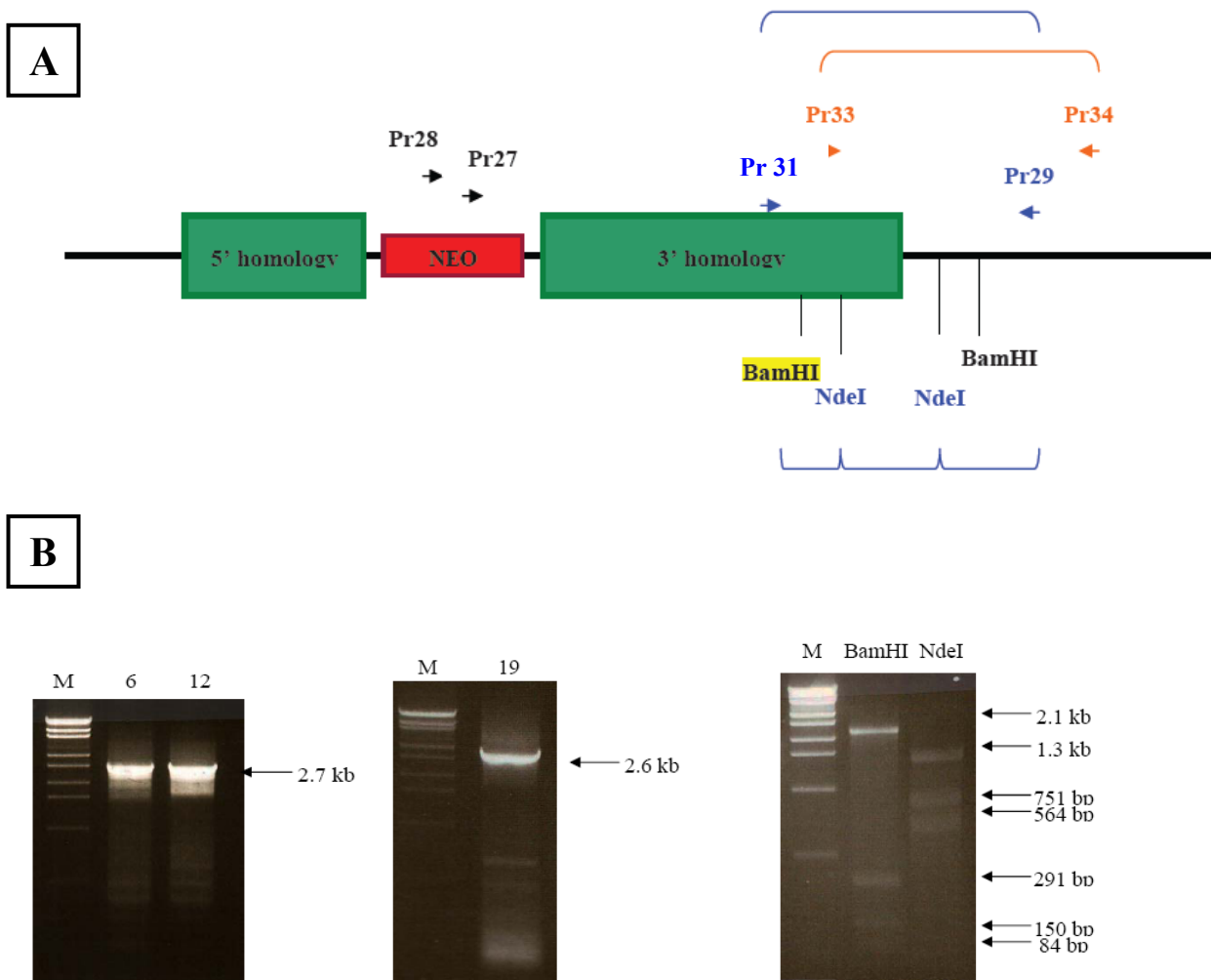


Εικόνα 21. PCR με εκκινητές Pr31/Pr32, από τους κλώνους 6, 12, 16, 19. Οι κλώνοι 12, 16 φαίνεται να παράγουν ένα μικρότερο προϊόν σε μεγάλη ποσότητα, παράλληλα με το αγρίου τύπου, ενώ ο κλώνος 19 δίνει μια μόνο ζώνη 1.5 kb, όσο δηλαδή είναι το αναμενόμενο αγρίου τύπου κομμάτι (a). Πέψεις του κλώνου 19 με BamHI και HpaI. Και στις δυο περιπτώσεις φαίνονται οι αναμενόμενες αγρίου τύπου ζώνες (b). (M: λStyI marker) (Σημείωση: η ζώνη των 1.5 kb που επισημαίνεται με την πέψη HpaI, είναι προϊόν PCR που παρέμεινε άκοπο)

Στη συνέχεια, με σκοπό την ταυτοποίηση του αγρίου τύπου αλληλόμορφου, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι συνδυασμοί εκκινητών:

- 1) Pr33 / Pr34 (ο Pr34 δεν συμπεριλαμβάνεται στις αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή-στόχο) (Εικ. 22A). Με το συνδυασμό αυτό παράγεται ένα προϊόν 2.7 kb για το αγρίου τύπου αλληλόμορφο, ενώ αν ισχύει η ένδειξη για την παρουσία κάποιας έλλειψης στο 3' άκρο, θα εμφανίζεται άλλο ένα προϊόν λίγο μικρότερο κατά περίπου 1 kb, υποδεικνύοντας το στοχευμένο αλληλόμορφο. Όπως φαίνεται και στη Εικ. 22B, υπάρχει μόνο ένα κύριο προϊόν 2.7 kb, τόσο στον control αγρίου τύπου κλώνο #6, όσο και στον θετικό κλώνο #12, με αποτέλεσμα να μην εξάγεται κάποιο συμπέρασμα σε σχέση με το στοχευμένο αλληλόμορφο.
- 2) Pr31 / Pr29. Ο εκκινητής Pr31 βρίσκεται σε αλληλουχίες του *Frem3* που έχουν συμπεριληφθεί στην κατασκευή στόχο, ενώ ο Pr29 είναι εκτός της κατασκευής, μετά το 2^ο εξόνιο του γονιδίου (Εικ. 22A). Όπως φαίνεται και στην Εικ. 20B η PCR δίνει το αναμενόμενο προϊόν 2.7 kb. Το προϊόν αυτό επωάστηκε με τα

περιοριστικά ένζυμα BamHI και NdeI για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων (οι θέσεις περιορισμού καθώς και τα αναμενόμενα προϊόντα βρίσκονται στον Πίνακα 3)



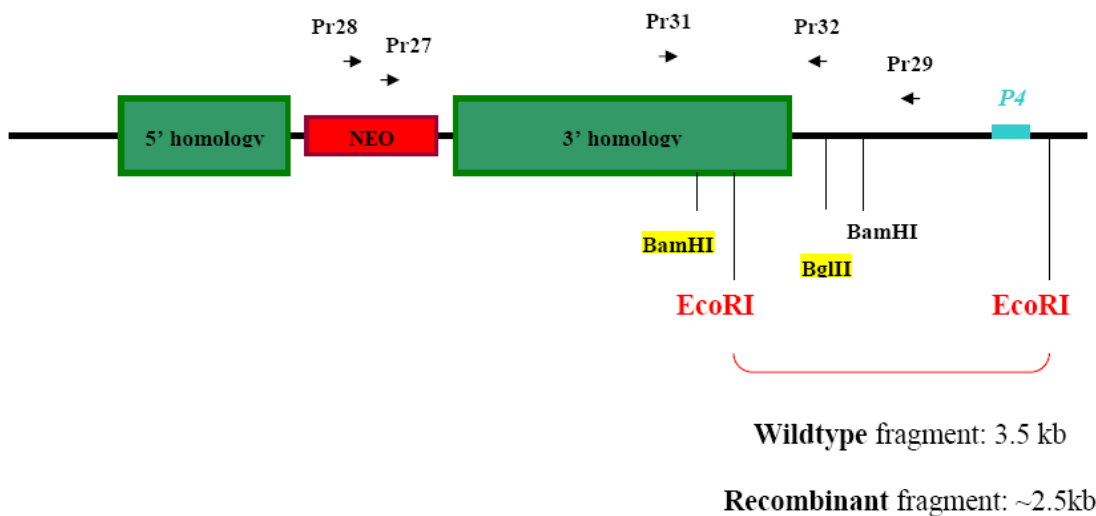
Εικόνα 22. (A) Σχηματική αναπαράσταση των PCR με εκκινητές Pr33/Pr34 και Pr31/Pr29. Στο σχήμα σημειώνονται και τα ένζυμα BamHI και NdeI που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του προϊόντος Pr31/Pr29. (B) PCR με εκκινητές Pr33/Pr34 από τους κλώνους 6 και 12. Και στις δυο περιπτώσεις παράγεται το αγρίου τύπου προϊόν των 2.7 kb (1° gel). PCR με εκκινητές Pr31/Pr29 από τον κλώνο 19 (2° gel). Πέψεις του προϊόντος της PCR Pr31/Pr29, με BamHI και NdeI. Και στις δυο περιπτώσεις προκύπτουν τα αναμενόμενα μεγέθη (3° gel). (M: λStyI marker).

Πίνακας 3. Προϊόντα που προκύπτουν πέψη της PCR Pr31/Pr29

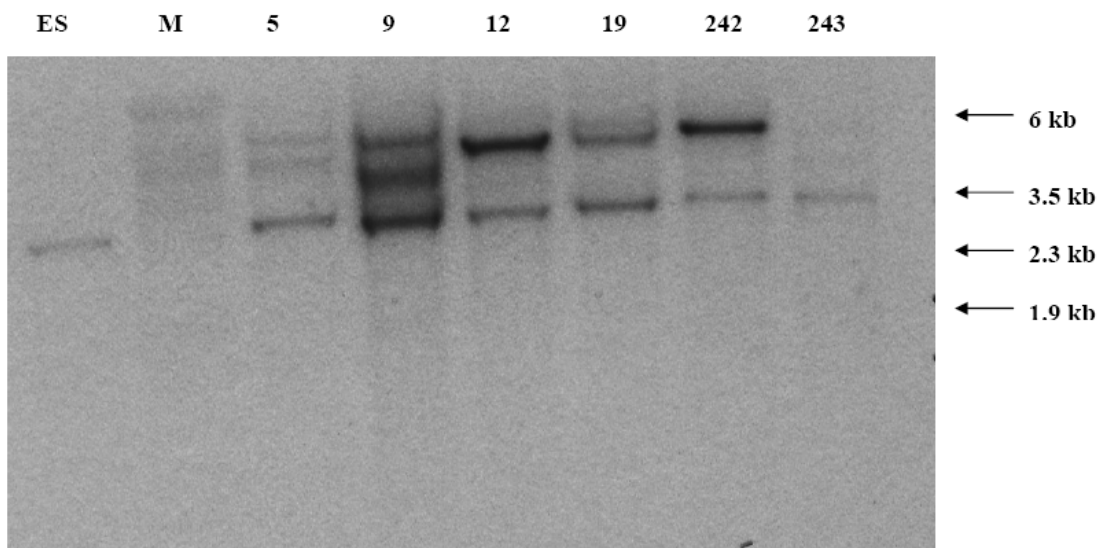
BamHI				NdeI			Θέσεις περιορισμού (bp)
161039	161182	163293		161706	163020		
84	150	291	2104	564	751	1314	
							Προϊόντα (bp)

ν) Κατασκευή 3^η για τη στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3*- Έλεγχος για την παρουσία ομόλογου ανασυνδυασμού με ανάλυση κατά Southern στο 3' άκρο

Το γενωμικό DNA από τους 250 θετικούς κλώνους επωάστηκε με EcoRI και στη συνέχεια υβριδοποιήθηκε με τον ανιχνευτή *P4* (Εικ. 23). Το ένζυμο αυτό επιλέχθηκε γιατί σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τον έλεγχο με PCR καθώς και από τις πέψεις των προϊόντων, φαίνεται να υπάρχει μια έλλειψη στο στοχευμένο αλληλόμορφο. Αν ισχύει αυτό, τότε στο Southern blot η ζώνη που θα αντιστοιχεί στο αγρίου τύπου αλληλόμορφου θα είναι κατά περίπου 1000 bp μεγαλύτερη από τη ζώνη του μεταλλαγμένου. Η EcoRI βρίσκεται στις θέσεις 161354 και 164882 bp του *Frem3*, (Εικ. 13). Ο ανιχνευτής *P4* περιλαμβάνει το κομμάτι 164117-164544 bp στο 3' άκρο του *Frem3*, 1790 bp μετά από την περιοχή ομολογίας που χρησιμοποιήσαμε στην κατασκευή-στόχο (Εικ. 23). Στην περίπτωση επιτυχούς ανασυνδυασμού περιμένουμε μια μπάντα 2.5 kb, που προκύπτει όταν η κασέτα “PGK promoter-Neo^r-PGK terminator” εισάγεται με ομόλογο ανασυνδυασμό στο *Frem3* και με την προϋπόθεση ότι κατά τον ανασυνδυασμό προκαλείται μια έλλειψη. Στην περίπτωση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου γονιδίου *Frem3*, παράγεται μια ζώνη 3.5 kb (Εικ. 23).



Εικόνα 23. Ανάλυση κατά Southern στο 3' άκρο του γονιδίου *Frem3*. Σχηματική αναπαράσταση του στοχευμένου αλληλόμορφου του γονιδίου *Frem3*. Σημειώνονται: οι θέσεις περιορισμού *EcoRI* καθώς και ο ανιχνευτής *P4* που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ομόλογου ανασυνδυασμού και της ακεραιότητας του 3' της στοχευμένης περιοχής. Η εν λόγω ανάλυση έχει νόημα μόνο παίρνοντας ως δεδομένο ότι στο στοχευμένο αλληλόμορφο υπάρχει μια έλλειψη της τάξης του 1kb περίπου, με αποτέλεσμα η πέψη με *EcoRI* να δίνει μια ζώνη 2.5 kb και όχι 3.5 kb όπως συμβαίνει στο αγρίου τύπου.



Εικόνα 24. Ανάλυση κατά Southern, γενωμικού DNA για τον έλεγχο παρουσίας ομόλογου ανασυνδυασμού. Η υβριδοποίηση έγινε με τον ανιχνευτή *P4*, ενώ το DNA επώαστηκε με το ένζυμο *EcoRI*. Οι αγρίου τύπου κλώνοι (5, 9, 243) καθώς και το γενωμικό DNA από ES κύτταρα, δίνουν μόνο την ζώνη των 3.5 kb. Αντίθετα οι κλώνοι που είχαν προηγουμένως πιστοποιηθεί ως στοχευμένοι παρουσιάζουν μια επιπλέον ζώνη 6 kb. (M: marker λBstEII, ES: αγρίου τύπου).

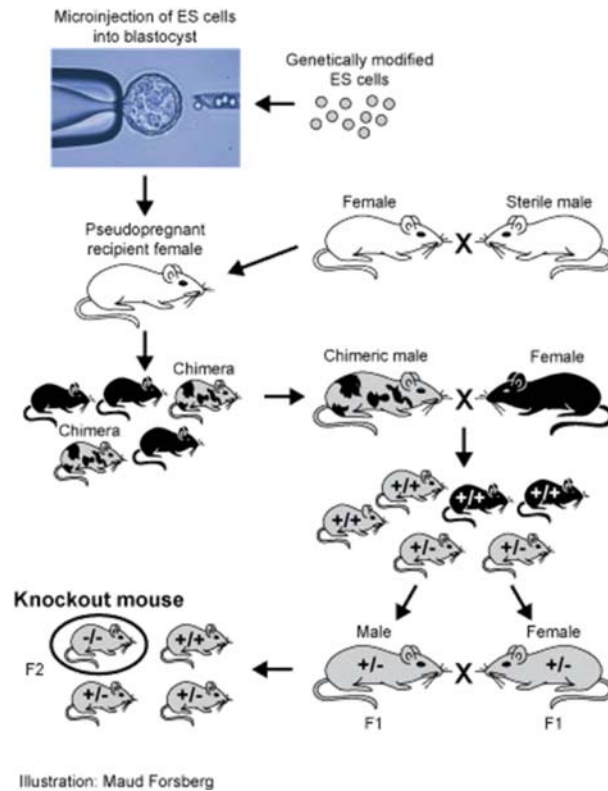
Όπως φαίνεται και στην Εικ. 24, οι αγρίου τύπου κλώνοι δίνουν την αναμενόμενη ζώνη των 3.5 kb. Αντίθετα όμως με τα προβλεπόμενα, οι στοχευμένοι κλώνοι δίνουν μια επιπλέον ζώνη στα 6 kb και όχι 2.5 kb. Επομένως θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι κατά τον ομόλογο ανασυνδυασμό, αντί για μία έλλειψη κάπου μεταξύ 161166-163270 bp, προκλήθηκε ενδεχομένως κάποιος διπλασιασμός.

3.5 Παραγωγή χιμαιρικών ζώων

Για τη δημιουργία χιμαιρικών ποντικών, επιλέξαμε δυο διαφορετικούς ES κλώνους, τους 12 και 19, με βάση τη διαφορετική συμπεριφορά που παρουσίαζαν κατά τη διάρκεια των ελέγχων για ομόλογο ανασυνδυασμό. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν στο Max Planck, Goettingen σε συνεργασία με τον Dr Kamal Chowdhury. Για την παραγωγή των χιμαιρικών ζώων (Εικ. 25), οι δυο διαφορετικοί κλώνοι, το υπόβαθρο των οποίων ήταν 129/Sv με γκρι τρίχωμα και μαύρο χρώμα ματιών, αφέθηκαν να αναπτυχθούν μέχρι το στάδιο των 16 κυττάρων. Στη συνέχεια, συντήχθηκαν με έμβρυα στο στάδιο του μοριδίου, τα οποία προέρχονταν από ποντίκια στελέχους CD1 albino με λευκό τρίχωμα και κόκκινο χρώμα ματιών. Την επομένη, τα έμβρυα εκείνα τα οποία είχαν φτάσει στο στάδιο της βλαστοκύστης (αναπτυξιακή μέρα 2) επιλέχθηκαν για τη μεταφορά σε ωαγωγούς ψευδοέγκυων ποντικών για τη δημιουργία χιμαιρικών απογόνων.

Ο βαθμός χιμαιρισμού στα ποντίκια που προέκυψαν ελέγχθηκε εύκολα με βάση το χρώμα τριχώματος. Με άλλα λόγια, όσο πιο μεγάλο είναι το ποσοστό του γκρι χρώματος, τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα το χιμαιρικό ποντίκι να φέρει το διαγονίδιο στα γαμετικά του κύτταρα και άρα να το μεταφέρει στους απογόνους του. Επιπλέον, ο έλεγχος γίνεται και με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που βρίσκονται πάνω στην κασέτα νεομυκίνης, που χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή στόχο. Τελικά, από τον κλώνο 12 προέκυψαν δύο ποντίκια (ένα θηλυκό και ένα αρσενικό) τα οποία έφεραν το διαγονίδιο, ενώ από τον κλώνο 19 προέκυψαν 5 θηλυκά και 4 αρσενικά. Τα ποντίκια αυτά, είναι ετερόζυγοι απόγονοι των χιμαιρικών ζώων, για το

απενεργοποιημένο αλληλόμορφο του *Frem3* και αποτέλεσαν τα πρώτα ποντίκια της αποικίας.



Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας παραγωγής knockout ζώων, από το στάδιο της μικροένεσης των ES κυττάρων σε βλαστοκύστες και την παραγωγή χμαιρικών ποντικών, μέχρι τις διασταυρώσεις των ετερόζυγων και την απόκτηση ομόζυγων μεταλλαγμάτων.

Η μελέτη των αποτελεσμάτων της απενεργοποίησης ενός γονιδίου στον ποντικό πραγματοποιείται σε περισσότερα από ένα στελέχη, δεδομένου ότι το διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο με τους ξεχωριστούς γενετικούς τροποποιητές (modifiers) επηρεάζει την εκφραστικότητα του μεταλλαγμένου γονιδίου και συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας του. Για το λόγο αυτό πραγματοποιούνται διασταυρώσεις των ετερόζυγων απογόνων των χμαιρικών ζώων με ποντίκια αγρίου τύπου στα οποία αποφασίζεται να γίνει η ανάλυση του φαινοτύπου (F1 γενιά). Επιπρόσθετα η φαινοτυπική ανάλυση διεξάγεται σε κάθε στέλεχος, ύστερα από ένα σημαντικό αριθμό γενεών, έτσι ώστε σταδιακά να έχει εξαλειφθεί από τους απογόνους το μεγαλύτερο μέρος

του γενετικού υπόβαθρου του στελέχους 129/Sv, από το οποίο προέρχονται τα πρόδρομα προγονικά κύτταρα στα οποία πραγματοποιείται ο ομόλογος ανασυνδυασμός.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, με στόχο το στήσιμό της αποικίας, πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες διασταυρώσεις: 1) ετερόζυγα ποντίκια μεταξύ τους, 2) ετερόζυγα ποντίκια με αγρίου τύπου του στελέχους NMRI, 3) ετερόζυγα ποντίκια με αγρίου τύπου του στελέχους BL10. Από τη γονοτυπική ανάλυση των απογόνων από διασταυρώσεις μεταξύ ετεροζυγοτών, δεν προέκυψαν καθόλου ομοζυγώτες.

3.5 Φαινοτυπική ανάλυση

(Τα ποσοστά των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που αναφέρονται παρακάτω, αφορούν ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε 60 ετερόζυγα *Frem3* ποντίκια)

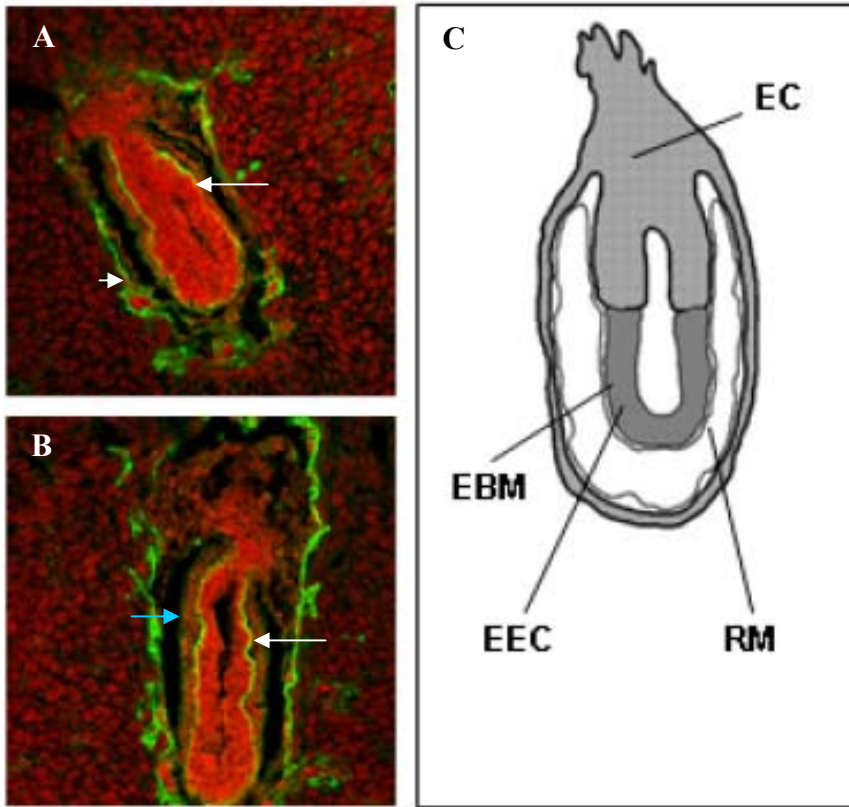
i) Τα ομόζυγα *Frem3*^{-/-} μεταλλαγμένα ποντίκια πεθαίνουν πριν την εμβρυϊκή μέρα 5.5

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι διασταυρώσεις μεταξύ των ετερόζυγων ποντικών, για το τροποποιημένο αλληλόμορφο του γονιδίου *Frem3*, παράγουν μόνο αγρίου τύπου και ετερόζυγους απογόνους, υποδηλώνοντας την εμβρυϊκή θνησιμότητα των *Frem3*^{-/-}. Η παρατήρηση αυτή ισχύει τόσο για τους απογόνους του κλώνου 12 όσο και για τους απογόνους του κλώνου 19. Προκειμένου να εξακριβωθεί το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο πεθαίνουν τα ομόζυγα μεταλλαγμένα έμβρυα, αποφασίσαμε να εξετάσουμε τον εντοπισμό της πρωτεΐνης *Frem3* αρχικά σε έμβρυα E11.5. Το συγκεκριμένο στάδιο επιλέχθηκε με βάση μια παρατήρηση που αφορά την απενεργοποίηση των άλλων γονιδίων της οικογένειας *Fras1/Frem*, καθώς τα ομόζυγα στο στέλεχος C57BL/10 πεθαίνουν μεταξύ των εμβρυϊκών ημερών 14.5-16.5, ενώ η έναρξη του εμβρυϊκού φαινοτύπου τοποθετείται την E12.5. Υποθέσαμε λοιπόν ότι είναι ένα λογικό στάδιο για να ξεκινήσουμε τη μελέτη, παρόλα αυτά η ανοσοϊστοχημική ανάλυση των εμβρύων με τα αντισώματα *Frem3*-N1 και *Frem3*-N2, ήταν θετική σε όλα

τα έμβρυα, καταδεικνύοντας ότι πρόκειται είτε για ετερόζυγα, είτε για αγρίου τύπου ποντίκια.

Όπως ήταν αναμενόμενο, εξετάσαμε και μικρότερα αναπτυξιακά στάδια (E8.5), όπου και σε αυτή την περίπτωση, εντοπίσαμε την Frem3 πρωτεΐνη σε όλα τα έμβρυα, καταλήγοντας πάλι στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για αγρίου τύπου και ετερόζυγα άτομα.

Στη συνέχεια εξετάστηκε το στάδιο E5.5. Στο στάδιο αυτό δεν έχει δημιουργηθεί ακόμα ο πλακούντας, όμως η εμφύτευση του εμβρύου έχει μόλις πραγματοποιηθεί και το έμβρυο φαίνεται να είναι προσκολλημένο στο τοίχωμα της μήτρας (Εικ.26). Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση στο συγκεκριμένο στάδιο, έδειξε και πάλι εντοπισμό της Frem3 πρωτεΐνης, με το αντίσωμα N2 σε όλα τα έμβρυα. Στην Εικ.26 φαίνονται ενδεικτικά δύο διαφορετικές μήτρες με έμβρυα E5.5, από τον κλώνο 19. Αξίζει να σημειωθεί ακόμα ότι ένα από τα έμβρυα ήταν απορροφημένο. Αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι σε όλα τα υπόλοιπα έμβρυα εντοπίστηκε η πρωτεΐνη Frem3, δηλώνει την πιθανότητα τα έμβρυα είτε να πεθαίνουν κατά την εμφύτευση, ή ακόμα και σε προ-εμφυτευτικό στάδιο.



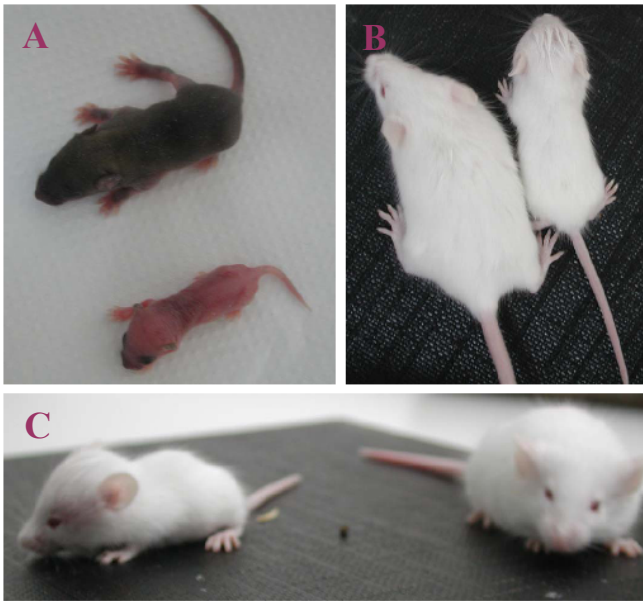
Εικόνα 26. (A-B) Ανοσοφθορισμός της πρωτεΐνης Frem3 σε δυο διαφορετικά έμβρυα E5.5 από τον κλώνο 19. Η πρωτεΐνη Frem3 φαίνεται να εντοπίζεται με το αντίσωμα N2, στην εμβρυϊκή βασική μεμβράνη (άσπρα βέλη) αλλά όχι στην πιο εξωτερική μεμβράνη του Reichert (γαλάζιο βέλος), καθώς και στο ενδομήτριο (μικρό βέλος). **(C)** Σχηματική αναπαράσταση μήτρας ποντικού με έμβρυο E5.5. (EC: Ectoplacental cone, EBM: Embryonic Basement Membrane, EEC: Embryonic Ectoderm Cells, RM: Reichert's Membrane).

ii) *Frem3*^{+/-} ποντίκια εμφανίζουν καχεξία, νανισμό και πρόωρη θνησιμότητα

Ένα κοινό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό τόσο των απογόνων του κλώνου 12 όσο και του 19, είναι ότι ένα μικρό ποσοστό (περίπου 5%) των ετερόζυγων νεογέννητων παρουσιάζει μικροσωμία ενώ πολύ γρήγορα εξελίσσεται σε καχεκτικό. Αυτό είναι εμφανές ήδη από τη δεύτερη μέρα μετά τη γέννηση (P2) ενώ μέχρι την 6^η - 7^η μέρα το νεογέννητο έχει πάρει ελάχιστο σωματικό βάρος σε σχέση με τα αδέρφια του και τελικά πεθαίνει. Στην Εικ.27 φαίνονται δυο νεογέννητα από την ίδια γέννα ηλικίας 7 ημερών. Μέχρι τώρα δεν έχει παρατηρηθεί πρόβλημα στο θηλασμό, οπότε ενδεχομένως γίνεται κακή απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών με αποτέλεσμα να οδηγούνται στην καχεξία.

Επιπλέον, ένα παρόμοιο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό, το οποίο όμως έχει παρατηρηθεί μόνο σε ένα μικρό ποσοστό (περίπου 5%) των απογόνων του κλώνου 12,

είναι ο νανισμός. Τα ποντίκια αυτά παρουσιάζουν καθυστερημένη ανάπτυξη, κρανιοπροσωπικές ανωμαλίες, μικροσωμία και υποτονικότητα, παρόλα αυτά δεν καθυστερεί η ανάπτυξη του τριχώματος, αλλά ούτε και το άνοιγμα των ματιών (Εικ.27). Ο φαινότυπος γίνεται εμφανής από την 5^η - 6^η μέρα μετά τη γέννηση κυρίως λόγω της μικροσωμίας αλλά και του διαφορετικού σχήματος του κρανίου. Τα ποντίκια αυτά πεθαίνουν από άγνωστους μέχρι τώρα λόγους, πριν φτάσουν στη σεξουαλική ωριμότητα. Παρόμοια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά έχουν περιγραφεί σε διάφορες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα και για ποντίκια στα οποία έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο της μεταλλοπρωτεϊνάσης 14 (MMP-14), όπου όμως τα ομόζυγα και όχι τα ετερόζυγα (όπως συμβαίνει στη δική μας περίπτωση) μεταλλάγματα παρουσιάζουν νανισμό (Somerville *et al.*, 2003).



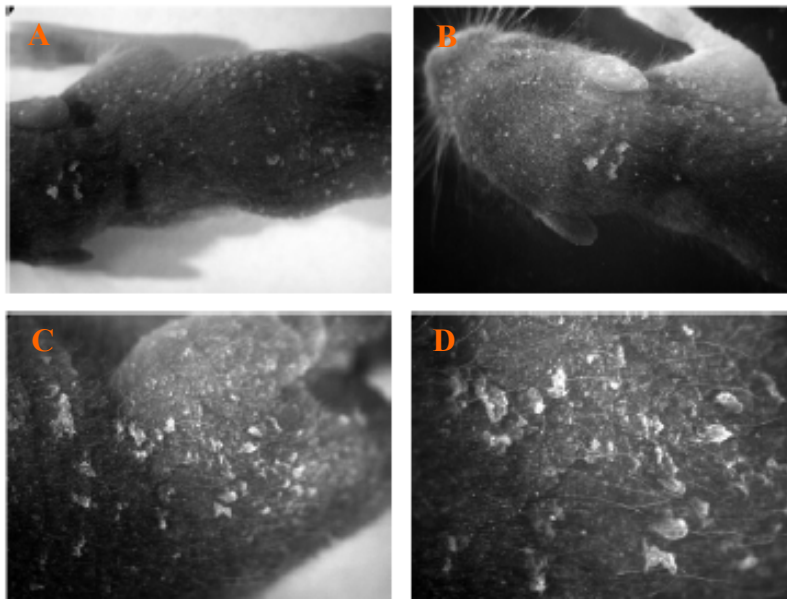
Εικόνα 27. Καχεξία και νανισμός στα $Frem3^{+/-}$ ποντίκια. (A) Νεογέννητα ετερόζυγα από τον κλώνο 19 ηλικίας P7. Ενώ έχουν την ίδια ακριβώς ηλικία το ένα φαίνεται να είναι αρκετά μικρότερο από το άλλο. Το συγκεκριμένο καχεκτικό ποντίκι πέθανε την 8^η μέρα μετά τη γέννηση. (B-C) Νανάκι, ετερόζυγο, ηλικίας P24 που έχει προκύψει από τον κλώνο 12 μαζί με ίδιας ηλικίας ποντίκι. Στην εικόνα B είναι εμφανής η καθυστέρηση στην ανάπτυξη, ενώ στην εικόνα C (αριστερά) φαίνεται το διαφορετικό σχήμα του κρανίου (κρανιοπροσωπική ανωμαλία).

iii) $Frem3^{+/-}$ νεογέννητα ποντίκια εμφανίζουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ιχθύωσης

Η ιχθύωση (ichthyosis) είναι κληρονομική νόσος με κύριο χαρακτηριστικό το ξηρό και λεπιδώδες δέρμα. Διακρίνεται ανάλογα με τον τύπο κληρονομικότητάς της στην κοινή ιχθύωση και στη φυλοσύνδετη υπολειπόμενη κοινή ιχθύωση, με μοναδική διαφορά

την αποκλειστική προσβολή των αρρένων στη δεύτερη περίπτωση. Στην κοινή ιχθύωση, ελλείψει ορισμένων παραγόντων, οι ασθενείς παρουσιάζουν ποικίλα κλινικά συμπτώματα, όπως η παρουσία πύκνωσης του δέρματος, η οποία μπορεί να είναι παροδική ή χρόνια, η οποία μπορεί να είναι παροδική ή χρόνια, η οποία μπορεί να είναι παροδική ή χρόνια, η οποία μπορεί να είναι παροδική ή χρόνια, η οποία μπορεί να είναι παροδική ή χρόνια. Κλινικά η ιχθύωση χαρακτηρίζεται από έντονη ξηρότητα δέρματος σε συνδυασμό με λέπια μικρά, λεπτά, αλευρώδη ή μεγάλα, παχιά και φυλλώδη. Ανάμεσα στα λέπια το δέρμα είναι λεπτό και πτυχωτό. Η έκκριση των ιδρωτοποιών και σμηγματογόνων αδένων είναι ελαττωμένη με αποτέλεσμα τη δυσανεξία στις θερμές και υγρές μέρες. Το εξάνθημα μπορεί να είναι γενικευμένο και συνήθως είναι συμμετρικό καταλαμβάνοντας κυρίως τον κορμό και τις εκτατές επιφάνειες των άκρων (Okulicz JF and Schwartz RA, 2003).

Ένα ποσοστό (περίπου 5%) των ετερόζυγων *Frem3* μεταλλαγμάτων, τόσο από τον κλώνο 12 όσο και από τον κλώνο 19, παρουσιάζει φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ιχθύωσης, εμφανή ήδη από την 2^η-3^η μέρα μετά τη γέννηση. Τα ποντίκια αυτά εμφανίζουν λέπια σε όλο τους το σώμα, ενώ στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι και πιο μικρόσωμα από τα αδέρφια τους. Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται πρόωρη θνησιμότητα, 7-10 μέρες μετά τη γέννηση (P7-P10) (Εικ. 27).



Εικόνα 27. Ιχθύωση σε νεογέννητο *Frem3^{+/-}* ποντίκι (A-D). Λέπια και ξηρότητα του δέρματος σαν αποτέλεσμα της εμφάνισης ιχθύωσης σε απόγονο του κλώνου 12, ηλικίας P6. Τα λέπια φαίνεται να έχουν καλύψει ολόκληρο το σώμα, ενώ πολύ έντονα είναι στην περιοχή της κεφαλής και της ράχης.

iv) *Frem3^{+/-}* ποντίκια εμφανίζουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά δερματίτιδας και αλωπεκίας

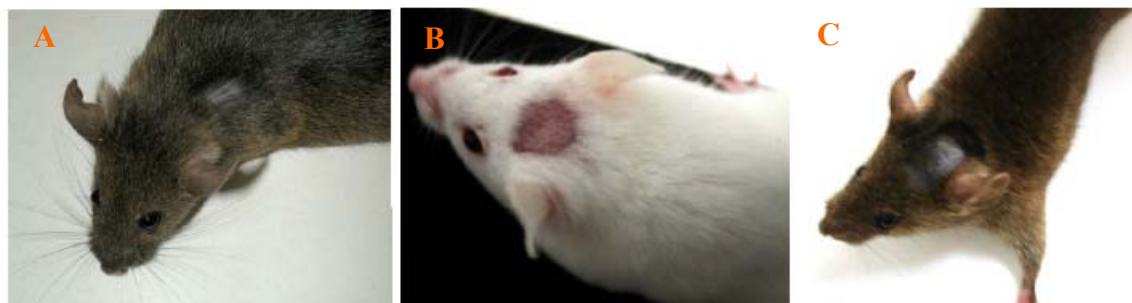
Η δερματίτιδα είναι ένας ευρύς όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει συνολικά φλεγμονές της επιδερμίδας, ανεξάρτητα από την αιτία. Υπάρχουν πολλά είδη δερματίτιδας ανάλογα με την αιτία, οι πιο συχνές όμως είναι: 1) η εξ επαφής (contact dermatitis), μια οξεία μορφή δερματίτιδας λόγω άμεσης επαφής με κάποια ουσία προς την οποία υπάρχει ευαισθησία, 2) η απολεπιστική (exfoliative dermatitis) κατά την οποία εμφανίζεται σχεδόν καθολικό ερύθημα, απολέπιση, κνησμός του δέρματος και απώλεια τριχών, 3) η εκζεματοειδής (eczematoid dermatitis) η οποία χαρακτηρίζεται από φλυκταινώδη εκζεματοειδή εξανθήματα, φυσαλίδες ή πομφόλυγες και 4) η ατοπική (atopic dermatitis) κατά την οποία εμφανίζεται κνησμώδες εξάνθημα αγνώστου αιτιολογίας, ενώ φαίνεται ότι συμμετέχουν αλλεργικοί, κληρονομικοί και ψυχογενείς παράγοντες (Lipozencić J and Wolf R, 2007, Bonness S and Bieber T, 2007). Στην τελευταία περίπτωση, η πρωταρχική βλάβη έχει να κάνει με κατάρρευση του φραγμού που δημιουργεί το δέρμα, με το εξωτερικό περιβάλλον και οδηγεί σε κνησμό του δέρματος. Η βλάβη οξύνεται έπειτα από μηχανικό τραύμα επιτρέποντας την είσοδο αντιγόνων μέσω του κατεστραμμένου δέρματος και κατά συνέπεια οδηγώντας σε ανοσολογική απόκριση (Bonness S and Bieber T, 2007, Oyoshi MK *et al.*, 2009).

Ένα μέρος του φαινοτύπου το οποίο μέχρι τώρα εκδηλώνεται αποκλειστικά σε ετερόζυγους απογόνους του κλώνου 19, παρουσιάζει ομοιότητα με χαρακτηριστικά της δερματίτιδας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, σε ένα μεγάλο ποσοστό (περίπου 20%) ετερόζυγων ποντικών ηλικίας μεγαλύτερης των 4 μηνών παρατηρήθηκε αρχικά απώλεια τριχών και ακολούθως εμφάνιση φλεγμονής σε κάποιο σημείο του δέρματος, στην περιοχή της ράχης. Η φλεγμονή εξελισσόταν σταδιακά ενώ παράλληλα το δέρμα στο σημείο της φλεγμονής άρχισε να διαχωρίζεται, μέχρι την πλήρη αποκόλλησή του (Εικ. 28).



Εικόνα 28. Δερματίτιδα σε ετερόζυγα αρσενικά ποντίκια από τον κλώνο 19. (A-B) Αρσενικό ποντίκι ηλικίας 6 μηνών με εκτεταμένη φλεγμονή στο πίσω μέρος του σώματος έπειτα από πλήρη αποκόλληση τμήματος του δέρματος. **(C)** Το τμήμα του αποκολλημένου δέρματος του ποντικού των εικόνων A-B όπως φαίνεται από την πλευρά που έγινε η αποκόλληση. **(D)** Αρσενικό ποντίκι ηλικίας 4 μηνών στο οποίο έχει αποκολληθεί ένα μικρό τμήμα ραχιαίου δέρματος. Στο σημείο της αποκόλλησης φαίνονται η απώλεια τριχών και η έναρξη οίδηματος.

Πέρα όμως από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της δερματίτιδας, ένα άλλο ποσοστό των ετερόζυγων *Frem3^{+/-}* ποντικών (περίπου 30%), εμφανίζει είτε αραιό τρίχωμα σε διάφορα σημεία του σώματος ή ακόμα και πλήρη απώλεια τριχώματος (αλωπεκία) σε ορισμένες περιοχές, χωρίς όμως να εμφανίζεται φλεγμονή ή οίδημα (Εικ. 29). Η γυροειδής αλωπεκία (alopecia areata), από την οποία πιθανώς πάσχουν τα εν λόγω *Frem3^{+/-}* ποντίκια, είναι μια μη ουλωτική απώλεια τριχών, που μπορεί να προσβάλλει οποιαδήποτε έντριχη περιοχή, εντοπίζεται όμως κυρίως στο κεφάλι (Kos L and Conlon J 2009). Η ακριβής παθογένεια είναι ακόμα άγνωστη, εντούτοις πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι πρόκειται για αυτοάνοσο νόσημα με μεσολάβηση των Τ-λεμφοκυττάρων, καθώς ένα από τα συχνότερα ιστολογικά ευρήματα αποτελεί η περιθυλακική ή ενδοθυλακική διήθηση από μονοπύρρηνα κύτταρα κατά των τριχοθυλακίων (Gilhar A and Kalish RS 2006). Η νόσος είναι συχνά αναστρέψιμη, όμως κάποιες φορές μπορεί να οδηγήσει και σε συνολική απώλεια του τριχώματος σε ολόκληρη την περιοχή όπου έχει εκδηλωθεί ή ακόμα και σε άλλα σημεία του σώματος (Gilhar A and Kalish RS 2006, Kos L and Conlon J 2009).



Εικόνα 29. Εμφάνιση χαρακτηριστικών γυρεοειδούς αλωπεκίας (alopecia areata) σε θηλυκά *Frem3*^{+/-} ποντίκια ηλικίας, 7 μηνών (Α), και 2 μηνών (Β-Σ). Σε όλες τις περιπτώσεις εμφανίζεται πλήρης απώλεια τριχών σε τμήμα της κεφαλής. Η αλωπεκία δεν εξελίσσεται περισσότερο αλλά ούτε και επουλώνεται με την πάροδο του χρόνου, γεγονός που υποδεικνύει ότι έχει συμβεί μια μόνιμη βλάβη.

iv) Κρυπορχία και στειρότητα στο 90% των αρσενικών ετερόζυγων απογόνων του κλώνου 19

Ένα ακόμα σημαντικό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό, το οποίο και πάλι αφορά αποκλειστικά τους απογόνους του κλώνου 19, και το οποίο παρατηρήθηκε από πολύ νωρίς, έχει να κάνει με το φαινόμενο της γενικευμένης στειρότητας στα αρσενικά ποντίκια. Ήδη από τις πρώτες διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν, παρατηρήθηκε ότι όλα τα αρσενικά ετερόζυγα ήταν στείρα σε αντίθεση με τα θηλυκά τα οποία διασταυρώνονταν φυσιολογικά με αγρίου τύπου αρσενικά και έδιναν απογόνους.

Καθώς η στειρότητα μπορεί να οφείλεται σε μια πληθώρα ποικίλων παραγόντων, από φλεγμονές των όρχεων και της επιδιδυμίδας (ορχίτιδες, επιδιδυμίτιδες), μέχρι ανατομικές ανωμαλίες, κρυπορχία, μειωμένη κινητικότητα του σπέρματος, ασπερμία κ.α., πραγματοποιήσαμε αρχικά σε ανατομική ανάλυση των ετερόζυγων αρσενικών. Η ανατομική ανάλυση μας δείχνει αν υπάρχουν εμφανής ανωμαλίες σε κάποιο μέρος του γεννητικού συστήματος, όπως για παράδειγμα η κρυπορχία η οποία αποτελεί πολύ συχνά αιτία στειρότητας. Ως κρυπορχία ορίζεται η παθολογική εκείνη κατάσταση κατά την οποία ο ένας ή και οι δύο όρχεις, δεν έχουν κατέβει στη φυσιολογική τους θέση, το όσχεο, από την κοιλιακή χώρα του εμβρύου όπου βρίσκονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Αυτό έχει εξαιρετική σημασία για την παραγωγή των σπερματοζωαρίων, καθώς η υψηλή θερμοκρασία στο εσωτερικό του σώματος δεν επιτρέπει τη σωστή σπερματογένεση. Στον άνθρωπο, η κρυπορχία εμφανίζεται σε ποσοστό 1%, ενώ στο 75% το περιπτώσεων είναι ετερόπλευρη (Maronpot RR 1999)

Από την ανατομική ανάλυση προέκυψε ότι ένα ποσοστό των (Εικ.30) στείρων *Frem3*^{+/-} αρσενικών έπασχε από μονόπλευρη ή αμφίπλευρη κρυπορχία, κάτι το οποίο θα

μπορούσε να εξηγήσει την εμφάνιση στειρότητας. Παρόλα αυτά, η πλειονότητα των στειρών αρσενικών δεν εμφάνιζε κρυφορχία, με αποτέλεσμα να κρίνουμε απαραίτητη την περαιτέρω ιστολογική ανάλυση των επιμέρους τμημάτων του γεννητικού συστήματος. Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ιστοχημικές και ανοσοιστοχημικές τεχνικές, με τα αντισώματα Frem3-N2 και Laminin-β1 καθώς και από πειράματα ιστολογικών χρώσεων.

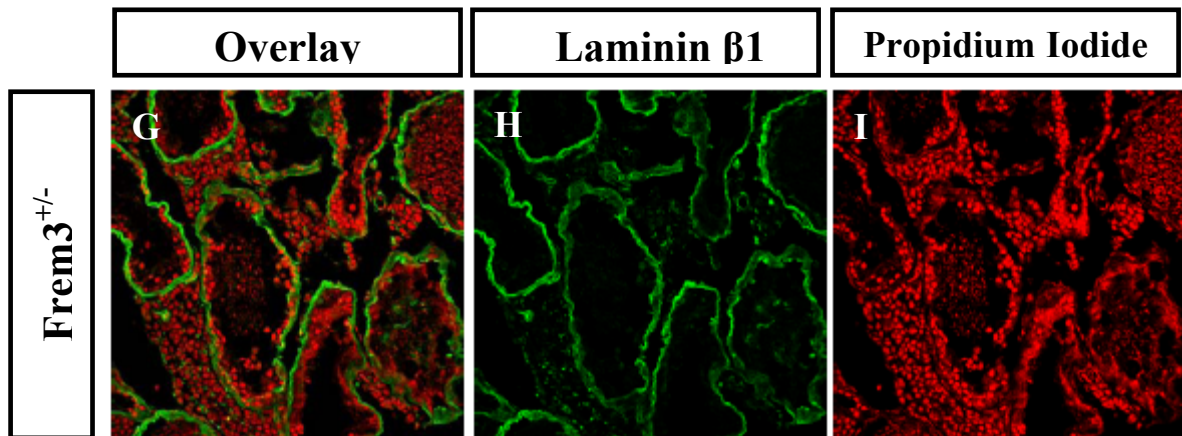
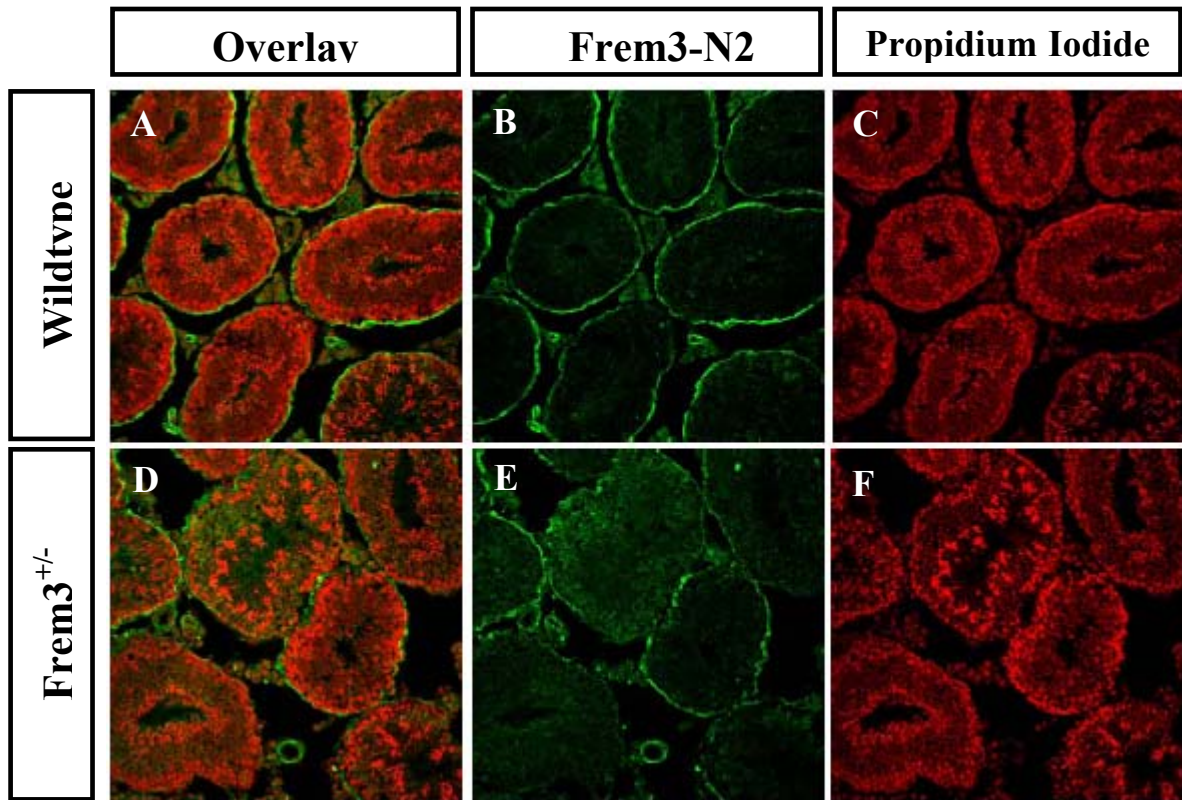


Εικόνα 30. Ανατομία ετερόζυγου Frem3 ποντικού ηλικίας 5 μηνών με μονόπλευρη κρυφορχία. Ο αριστερός όρχις βρίσκεται ακόμα στην κοιλιακή χώρα σε αντίθεση με τον δεξιό που έχει κατέβει στην περιοχή του όσχεου.

Οι όρχις είναι υπεύθυνοι για σπερματογένεση και την έκκριση ανδρογόνων. Κάθε όρχις καλύπτεται από έναν ινώδη χιτώνα (tunica albuginea) συνδετικού ιστού, ο οποίος εισχωρεί στον όρχι, διαιρώντας το ορχικό παρέγχυμα σε μια πληθώρα ορχικών λοβίων (testicular lobes). Κάθε λοβίο περιλαμβάνει 1-4 σπερματικά σωληνάκια (seminiferous tubules) στο πολύστιβο επιθήλιο των οποίων εξελίσσεται η σπερματογένεση που οδηγεί στο σχηματισμό των σπερματοζωαρίων. Το σπερματικό επιθήλιο αποτελείται από τα επιμηκυμένα, πυραμιδοειδή κύτταρα του Sertoli και από τα κύτταρα του σπερματογόνου (σπερματογόνια) ή σπερματικής σειράς. Τα κύτταρα Sertoli προσφέρουν στήριξη και θρέψη στα κύτταρα της σπερματικής σειράς, τα οποία βρίσκονται διατεταγμένα ενδιάμεσα σε αυτά, σε 4-8 στρώματα αντιπροσωπεύοντας διάφορα στάδια στη συνεχή διαδικασία της διαφοροποίησης, από τα αρχέγονα γεννητικά

κύτταρα μέχρι τα σπερματοζωάρια. Παράλληλα, ενδιάμεσα στα ορχικά σωληνάρια βρίσκονται τα κύτταρα του Leydig ή διάμεσα κύτταρα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των ανδρογόνων (Εικ. 31) (Stevens A and Lowe J 2007).

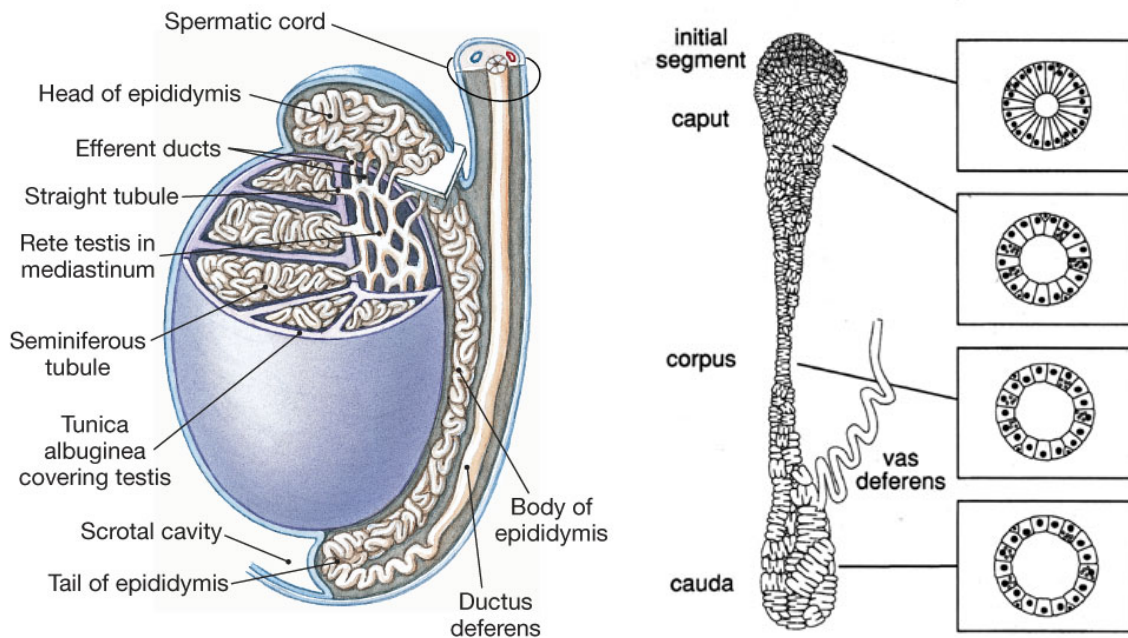
Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανοσοφθορισμού φαίνεται ότι τόσο η *Frem3*, με το αντίσωμα *Frem3-N2* όσο και η λαμινίνη $\beta 1$, εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη των σπερματικών σωληναρίων τόσο στα αγρίου τύπου ποντίκια όσο και στα *Frem3^{+/-}*. Τα σωληνάρια στον αγρίου τύπου όρχι φαίνεται να είναι γεμάτα ανώριμα σπερματοζωάρια, όπως συμβαίνει φυσιολογικά. Παρόλα αυτά, στους όρχις των *Frem3^{+/-}*, ενώ κάποια σωληνάρια φαίνονται γεμάτα με σπερματοζωάρια (Εικ. 31D-F), ωστόσο κάποια άλλα φαίνονται είτε εντελώς άδεια (Εικ. 31G-I), είτε κατελημμένα από έναν ανομοιογενή πληθυσμό κυττάρων, άγνωστης έως τώρα ταυτότητας. Επιπλέον, από την ιστοχημική ανάλυση με Cresyl violet, προκύπτει ότι το επιθήλιο πολλών σπερματικών σωληναρίων των *Frem3^{+/-}* ποντικών, είναι διαταραγμένο ή ακόμα και σχεδόν ανύπαρκτο, με αποτέλεσμα τα ίδια τα σωληνάρια σε πολλές περιπτώσεις να έχουν υποστεί ρήξη (Εικ. 31G-I). Όλα τα παραπάνω αποτελούν ενδείξεις εκφυλισμού των σπερματικών σωληναρίων (seminiferous tubule degeneration), πάθηση κατά την οποία, τα επιθηλιακά κύτταρα των σπερματικών σωληναρίων αρχικά εκφυλίζονται και χάνουν την χαρακτηριστική κατανομή τους στο χώρο με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένας “σφαιρικός” σχηματισμός (nodule) από αποδιοργανωμένα κύτταρα Sertoli, τα οποία περιβάλλονται από βασική μεμβράνη. Στη συνέχεια, τα κύτταρα Sertoli καταστρέφονται, αφήνοντας πίσω έναν άδειο σχηματισμό ο οποίος περιβάλλεται από βασική μεμβράνη, ενδεχομένως αυξημένου πάχους (Amat P., *et al*; 1985). (Σημείωση: Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε όρχις 7 διαφορετικών στεριών ετερόζυγων ποντικών και τα αποτελέσματα που περιγράφονται παρακάτω ήταν όμοια σε όλα τα ποντίκια που εξετάστηκαν).



Εικόνα 31. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση όρχεων *Frem3^{+/-}* ποντικών με τα αντισώματα Frem3-N2 (A-F) και Laminin β1 (G-I). Ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις (D-F) δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες διαταραχές στο επιθήλιο των σωληναρίων, ωστόσο σε άλλες περιπτώσεις το επιθήλιο φαίνεται τελείως εκφυλισμένο (G-I).

Ακολουθώς, μελετήσαμε την επιδιδυμίδα, με τη χρήση ιστοχημικών και ανοσοϊστοχημικών μεθόδων. Η επιδιδυμίδα (Εικ. 32) είναι ένα σωληνοειδές όργανο στον πόρο του οποίου μεταφέρονται, μέσω των απαγωγών σωληναρίων (efferent ducts), τα σπερματοζώαρια που παράγονται στους όρχεις. Η επιδιδυμίδα διαχωρίζεται σε τρία βασικά τμήματα, την κεφαλή (head ή caput), το σώμα (body ή corpus) και την ουρά (tail

ή cauda). Η κεφαλή είναι το κομμάτι εκείνο το οποίο επικοινωνεί άμεσα με τον όρχι και διαχωρίζεται σε τρία επιμέρους τμήματα: το αρχικό, το μέσο και το ακραίο. Ακολουθεί το σώμα και τέλος η ουρά η οποία συνδέεται με τον σπερματικό πόρο.

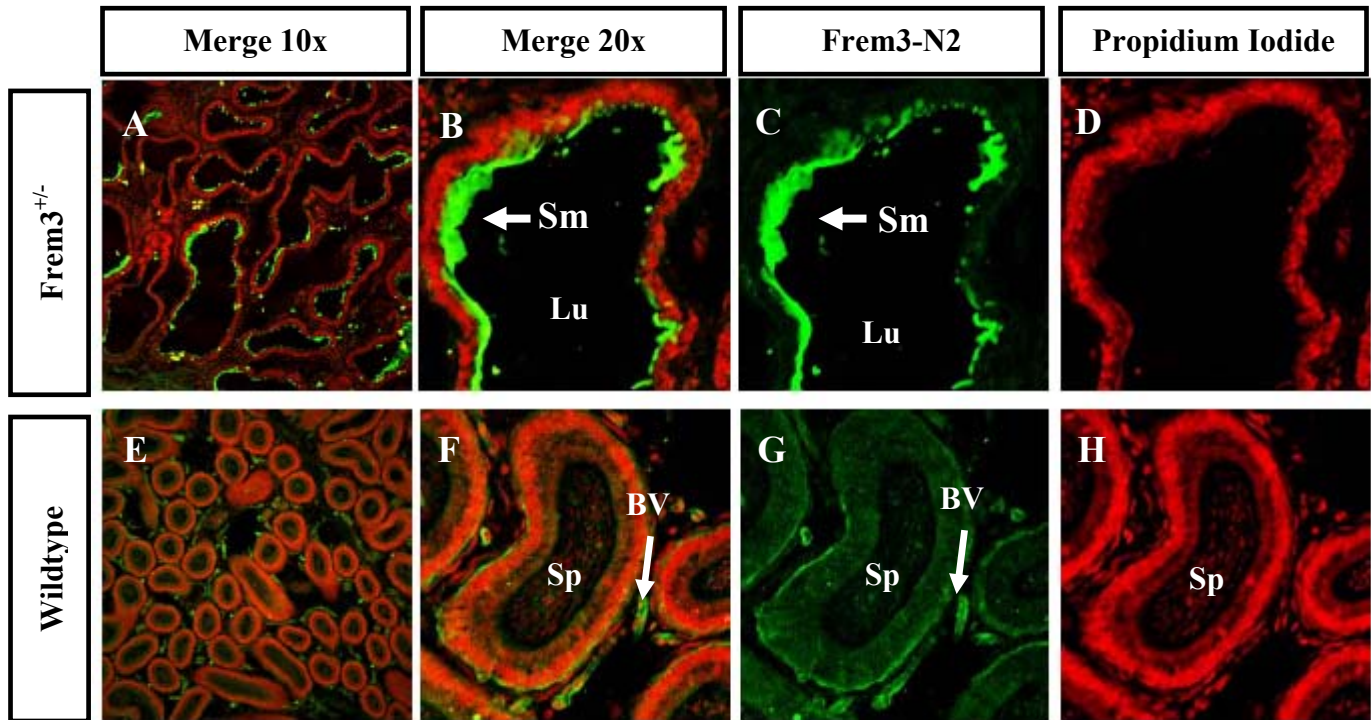


Εικόνα 32. Σχηματική αναπαράσταση όρχεως και επιδιδυμίδας. Στην εικόνα αριστερά φαίνονται η ανατομία του όρχι και της επιδιδυμίδας. Στον όρχι διακρίνεται ο ινώδης χιτώνας (tunica albuginea) που εισχωρεί εσωτερικά και τον διαμερισματοποιεί σε πολυάριθμα ορχικά λόβια. Μέσα σε κάθε ορχικό λόβιο υπάρχει ένα δίκτυο από σπειροειδή σπερματικά σωληνάκια (seminiferous tubules). Τα τελικά τμήματα των σπερματικών σωληναρίων συγκλίνουν στα αλληλοσυνδεδεμένα σωληνάκια του ορχικού δικτύου (rete testis), που με τη σειρά τους οδηγούν στα εκφορητικά σωληνάκια (efferent ducts) του όρχεως. Τα εκφορητικά σωληνάκια συγκλίνουν στον μακρύ και ελικοειδή πόρο της επιδιδυμίδας (epididymis), ο οποίος τελικά μεταπίπτει στον σπερματικό πόρο (ductus deferens). Στη δεξιά εικόνα διακρίνονται σχηματικά τα διαφορετικά τμήματα της επιδιδυμίδας: (initial segment), (caput/head), (corpus/body), (cauda/tail). Ακόμα φαίνεται σε εγκάρσια διατομή, ο πόρος της επιδιδυμίδας σε κάθε τμήμα του οργάνου. Μετακινούμενοι από το αρχικό τμήμα προς το ουραίο, παρατηρούμε πως αυξάνεται η διάμετρος του πόρου, ενώ παράλληλα το ύψος των κυττάρων μειώνεται.

Κάθε κομμάτι της επιδιδυμίδας διαδραματίζει διαφορετικό ρόλο, με την κεφαλή και το σώμα να συμβάλλουν στην ωρίμανση των σπερματοζωαρίων και την ουρά να παίζει ουσιαστικά ρόλο στην αποθήκευσή τους. Η επιδιδυμίδα των ενήλικων αρσενικών αποτελείται από ψευδοπολύστιβο, κυλινδρικό, κροσσωτό επιθήλιο το οποίο απαρτίζουν μια πληθώρα διαφορετικών κυτταρικών τύπων (βασικά κύτταρα, κορυφαία κύτταρα, διαυγή κύτταρα κ.α.). Παρόλα αυτά, το 80% των κυττάρων του επιθηλίου είναι τα βασικά (principal ή basal) τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή και έκκριση της μεγαλύτερης ποσότητας των γλυκοπρωτεϊνών, σακχάρων και ηλεκτρολυτών, από τα οποία αποτελείται το επιδιδυμικό υγρό (epididymal fluid) και μέσα στο οποίο ωριμάζουν τα σπερματοζωάρια (Cornwall GA, 2009).

Η αναλυτική μελέτη των διαφόρων τμημάτων της επιδιδυμίδας των *Frem3*^{+/-} αρσενικών, για τη διαλεύκανση της αιτίας της εκτεταμένης στειρότητας, πραγματοποιήθηκε με πειράματα ανοσοϊστοχημείας και ιστοχημείας σε οβελιαίες κρυοτομές, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα Frem3-N2. Διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αγρίου τύπου ιστών και των *Frem3*^{+/-}, και οι οποίες συνοψίζονται ακολούθως. (Σημείωση: Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε επιδιδυμίδες 7 διαφορετικών στείρων ετερόζυγων ποντικών και τα αποτελέσματα που περιγράφονται παρακάτω ήταν όμοια σε όλα αυτά τα ποντίκια). Ξεκινώντας από το αρχικό τμήμα της επιδιδυμίδας, την κεφαλή (Εικ. 33), παρατηρήσαμε καταρχήν ότι στους αγρίου τύπου ιστούς, η Frem3 εντοπίζεται, με το αντίσωμα Frem3-N2, στη βασική μεμβράνη του πόρου της επιδιδυμίδας καθώς και στα αγγεία που βρίσκονται στους ενδιάμεσους χώρους. Αντίθετα, στην επιδιδυμίδα των *Frem3*^{+/-} αρσενικών, δεν υπάρχει καθόλου εντοπισμός της Frem3, με ελάχιστες εξαιρέσεις. Μια δεύτερη παρατήρηση, είναι ότι ενώ φυσιολογικά η επιδιδυμίδα περιέχει σπερματοζωάρια τα οποία διασχίζουν αυτό το σωληνώδες σύστημα για να ωριμάσουν και να αποκτήσουν λειτουργικότητα, στα *Frem3*^{+/-} υπάρχει πλήρης έλλειψη αυτών. Παράλληλα στον αυλό του επιδιδυμικού πόρου παρατηρούνται ιζηματώδη υπολείμματα, ενδεχομένως από συσσωρευμένο επιδιδυμικό υγρό. Η τρίτη παρατήρηση αφορά τον ίδιο τον πόρο ο οποίος φαίνεται αρκετά παραμορφωμένος, με ασύμμετρη δομή, και ευρύτερη διάμετρο στο μεγαλύτερο μήκος του, στα *Frem3* ετερόζυγα. Το επιθήλιο του πόρου, δεν φαίνεται να είναι

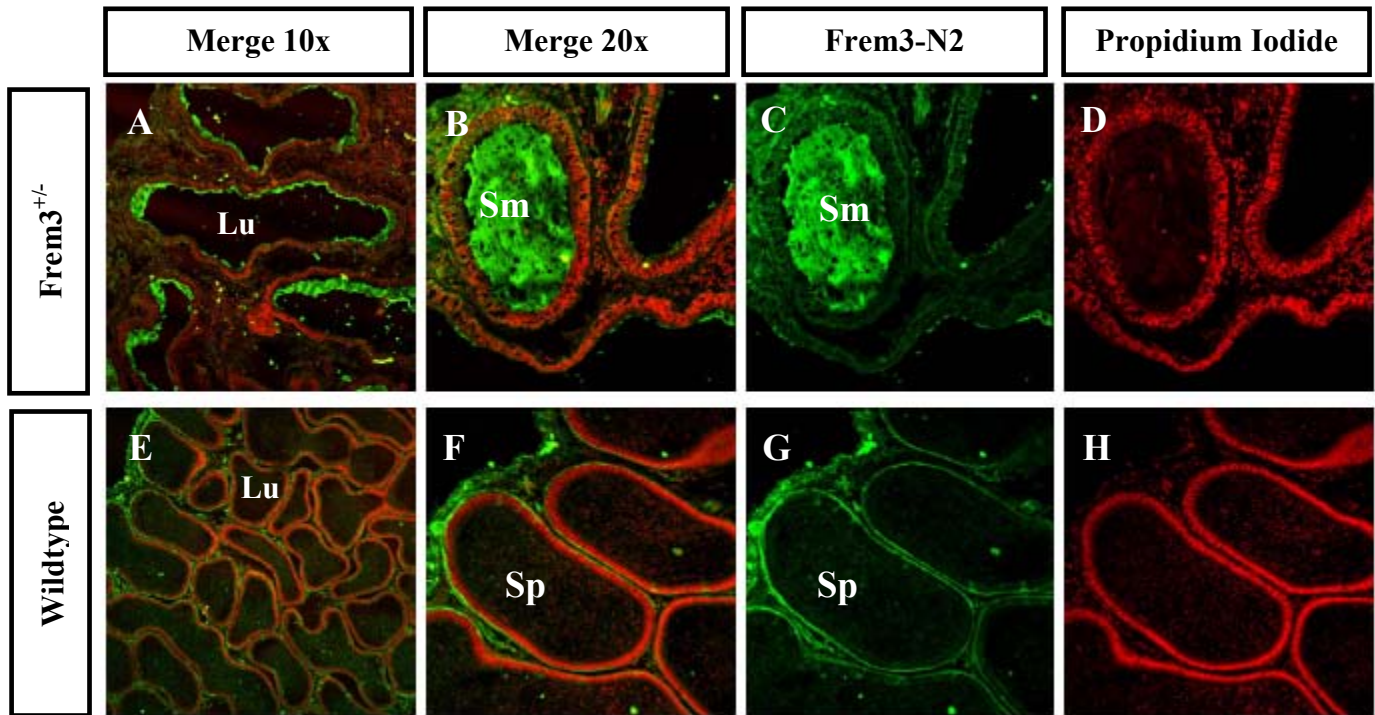
ψευδοπολύστιβο κροσσωτό, όπως συμβαίνει στα αγρίου τύπου ζώα, αντίθετα μοιάζει περισσότερο με δίστιβο ή πολύστιβο με εναλλαγές ακόμα και στη ίδια διατομή.



Εικόνα 33. Ανοσοφθορισμός σε κρυτομές από την κεφαλή της επιδιδυμίδας (caput epididymis) με το αντίσωμα Frem3-N2. (A-D) *Frem3*^{+/-} επιδιδυμίδα. Φαίνεται η πλήρης απουσία της Frem3 από τη βασική μεμβράνη του πόρου της επιδιδυμίδας. Ο πόρος έχει ακανόνιστη μορφολογία και αρκετά ευρέα διάμετρο, ενώ το επιθήλιο φαίνεται παραμορφωμένο. Μέσα στον αυλό του επιδιδυμικού πόρου (Lu) παρατηρείται η συσσώρευση ιζήματος, ενδεχομένως από επιδιδυμικό υγρό (Sm), ενώ δεν υπάρχουν καθόλου σπερματοζώαρια. (E-H) Τμήμα από την κεφαλή επιδιδυμίδας αγρίου τύπου. Η Frem3 πρωτεΐνη φαίνεται να εντοπίζεται τόσο στη βασική μεμβράνη του επιδιδυμικού πόρου, όσο και στη βασική μεμβράνη των αιμοφόρων αγγείων (BV). Το επιθήλιο του πόρου είναι του τύπου ψευδοπολύστιβο, κυλινδρικό, κροσσωτό και μέσα στον αυλό παρατηρούνται σπερματοζώαρια (Sp) τα οποία περνούν μέσα από την επιδιδυμίδα για να ωριμάσουν. Θα πρέπει ακόμα να σημειωθεί ότι στην αγρίου τύπου επιδιδυμίδα δεν διακρίνονται ιζήματα από επιδιδυμικό υγρό.

Η ίδια εικόνα παρατηρείται και στο σώμα της επιδιδυμίδας, με τον πόρο να φαίνεται παραμορφωμένος, το επιθήλιο να είναι, σε αρκετές περιπτώσεις πολύστιβο και τον αυλό να είναι άδειος από σπερματοζώαρια και να περιέχει μεγάλες ποσότητες συσσωρευμένου ιζήματος. Σε αυτό το τμήμα της επιδιδυμίδας ειδικότερα, υπήρχαν τμήματα του πόρου τα οποία ήταν εντελώς γεμάτα από ιζήματα, όπως φαίνεται και στην Εικ. 34. Επιπλέον, όπως και στην κεφαλή της επιδιδυμίδας έτσι κι εδώ, δεν υπάρχει

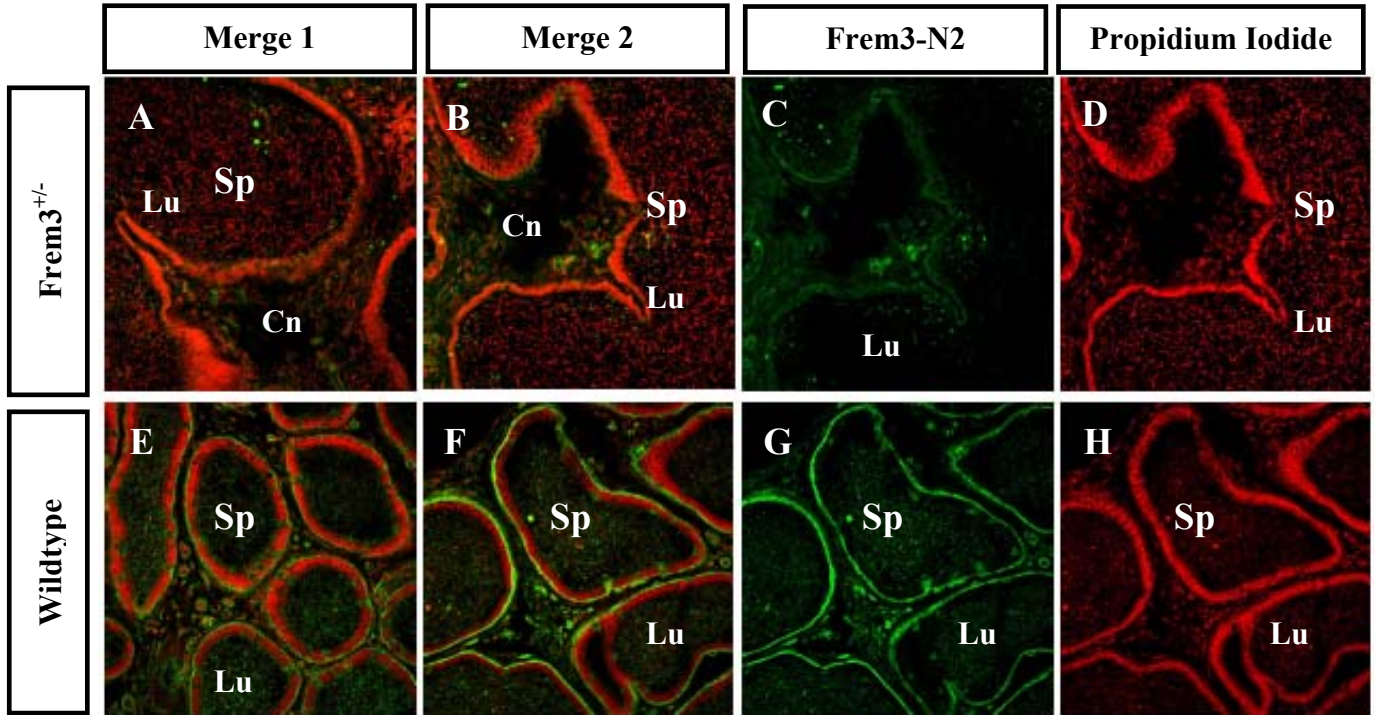
εντοπισμός της Frem3 στη βασική μεμβράνη του επιθηλίου του πόρου, στα *Frem3^{+/-}* ποντίκια, πέρα από ελάχιστες εξαιρέσεις.



Εικόνα 34. Ανοσοφθορισμός σε κρυτομές από το σώμα της επιδιδυμίδας (corpus epididymis) με το αντίσωμα Frem3-N2. (A-D) *Frem3^{+/-}* επιδιδυμίδα στην οποία φαίνεται η πλήρης απουσία της Frem3 από τη βασική μεμβράνη του πόρου. Και σε αυτή την περίπτωση, όπως και στην κεφαλή της επιδιδυμίδας, ο πόρος έχει μεγαλύτερη διάμετρο και το επιθήλιο είναι παραμορφωμένο με ακανόνιστο σχήμα. Ο αυλός (Lu) περιέχει μεγάλες ποσότητες από συσσωρευμένο ίζημα (Sm), ενώ φαίνεται να κυκλοφορούν καθόλου σπερματοζώαρια. (E-H) Τμήμα από το σώμα επιδιδυμίδας αγρίου τύπου. Η Frem3 πρωτεΐνη φαίνεται να εντοπίζεται τόσο στη βασική μεμβράνη του επιδιδυμικού πόρου, όσο και στη βασική μεμβράνη των αιμοφόρων αγγείων που βρίσκονται στους ενδιάμεσους χώρους. Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στην επιδιδυμίδα των *Frem3^{+/-}*, εδώ ο πόρος είναι γεμάτος με σπερματοζώαρια (Sp).

Στο πιο ακραίο κομμάτι της επιδιδυμίδας, στην ουρά, όπου και αποθηκεύονται τα σπέρματα πριν από την έξοδό τους προς τον σπερματικό πόρο, οι βλάβες είναι ακόμα πιο δραματικές. Η πρώτη παρατήρηση αφορά τον εντοπισμό της πρωτεΐνης Frem3 όπου όπως συμβαίνει και σε όλο το μήκος της επιδιδυμίδας, έτσι κι εδώ, δεν παρατηρείται καθόλου εντοπισμός της ούτε στα αγγεία, αλλά ούτε και στον πόρο. Η δεύτερη παρατήρηση αφορά στο μέγεθος του πόρου. Παρόλο που το συνολικό μέγεθος της επιδιδυμίδας των *Frem3^{+/-}* δεν παρουσίαζε αξιοσημείωτη διαφορά σε σύγκριση με την αγρίου τύπου, ωστόσο ο πόρος στο ουραίο τμήμα της φαίνεται να είναι αρκετές φορές

μεγαλύτερος σε εύρος, το επιθήλιο είναι ανομοιομόρφο όντας από μονόστιβο μέχρι πολύστιβο σε ορισμένα τμήματα, ενώ και ο συνδετικός ιστός στους ενδιάμεσους χώρους παρουσιάζεται ιδιαίτερα αυξημένος (Εικ. 35).



Εικόνα 35. Ανοσοφθορισμός σε κρυστομές από την ουρά της επιδιδυμίδας (cauda epididymis) με το αντίσωμα Frem3-N2. (A-D) *Frem3*^{+/-} επιδιδυμίδα στην οποία φαίνεται η πλήρης απουσία της Frem3 από τη βασική μεμβράνη του πόρου. Σε αυτό το τμήμα της επιδιδυμίδας, ο φαινότυπος είναι εξαιρετικά δραματικός. Ο επιδιδυμικός πόρος παρουσιάζεται ιδιαίτερα διευρυμένος με πολύ ακανόνιστο σχήμα, ενώ και ο συνδετικός ιστός (Cn) στους ενδιάμεσους χώρους είναι αρκετά αυξημένος. Το επιθήλιο του πόρου παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια, όντας από μονόστιβο σε ορισμένα τμήματα, μέχρι πολύστιβο και ψευδοπολύστιβο. Παρόλα αυτά, ο αυλός (Lu) φαίνεται να είναι γεμάτος με σπερματοζώαρια (Sp), σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στα υπόλοιπα τμήματα της επιδιδυμίδας. (E-H) Τμήμα από την ουρά της επιδιδυμίδας αγρίου τύπου. Η Frem3 πρωτεΐνη φαίνεται να εντοπίζεται τόσο στη βασική μεμβράνη του επιδιδυμικού πόρου, όσο και στη βασική μεμβράνη των αιμοφόρων αγγείων που βρίσκονται στους ενδιάμεσους χώρους.

Με στόχο την πιο εκτεταμένη μελέτη της επιδιδυμίδας, πραγματοποιήσαμε ιστοχημικές αναλύσεις με χρώση Cresyl Violet, στις ίδιες τομές που μελετήθηκαν και ανοσοϊστοχημικά. Όπως φαίνεται και στις Εικ. 36-37, τέσσερα βασικά συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν, πέρα από τη γενική διαταραχή του επιθηλίου του πόρου, που ήταν αρκετά εμφανής και από τα πειράματα ανοσοφθορισμού. Στην Εικ. 36A παρουσιάζεται το επιθήλιο (πράσινο βέλος) του πόρου της *Frem3*^{+/-} επιδιδυμίδας από το οποίο τα λεία μυϊκά κύτταρα (μαύρο βέλος) φαίνεται να βρίσκονται σε απομακρυσμένα. Φυσιολογικά (Εικ. 36D) γύρω από το επιθήλιο υπάρχει σε στενή επαφή, μια εξωτερική στιβάδα από

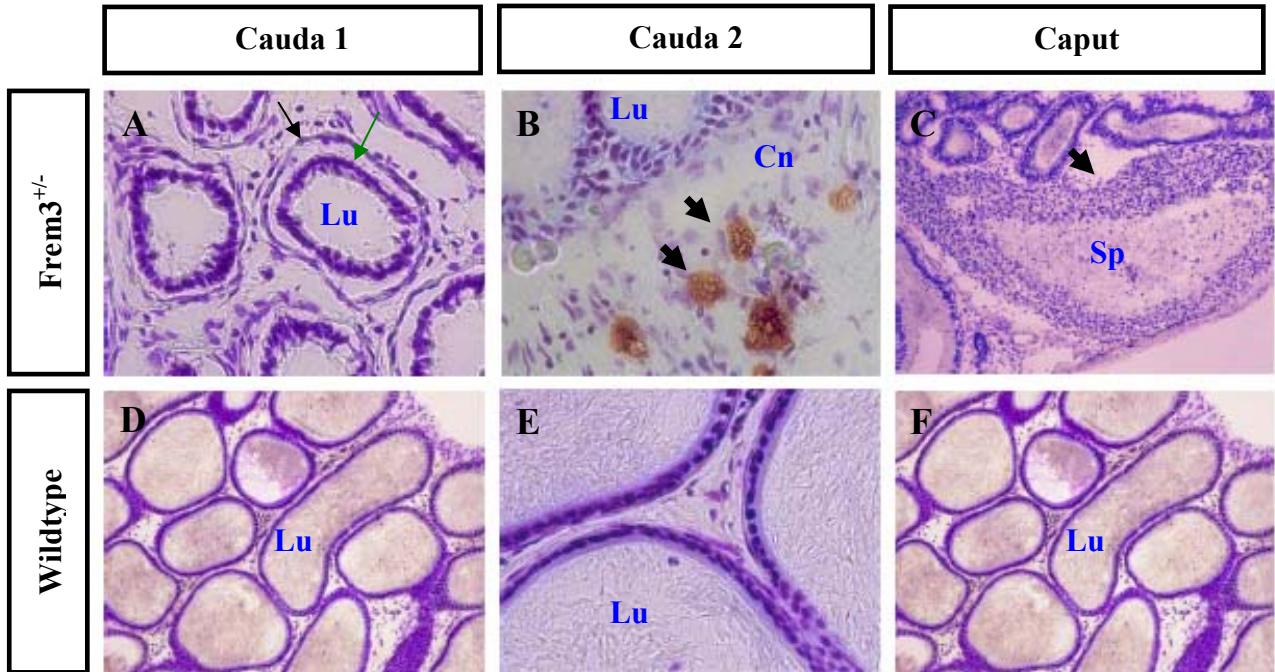
χαλαρό συνδετικό ιστό και κυκλικές μυϊκές ίνες. Μεταξύ επιθηλίου και μυϊκών ινών βρίσκεται η βασική μεμβράνη.

Μια άλλη πολύ ενδιαφέρουσα παρατήρηση αφορά την παρουσία κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος με χαρακτηριστική κοκκιώδη εμφάνιση, μέσα στον αυξημένο συνδετικό ιστό της *Frem3^{+/-}* επιδιδυμίδας (Εικ. 36B). Σε κάποια σημεία παρατηρήθηκαν τέτοιου είδους κύτταρα και μέσα στον αυλό του πόρου, γεγονός που σημαίνει ότι το επιθήλιο έχει διαταραχτεί σε τέτοιο βαθμό ώστε να επιτρέπεται η πιο ελεύθερη διέλευση μορίων και κυττάρων μέσα και έξω από τον πόρο. Φυσιολογικά, η ύπαρξη του “αιματο-επιδιδυμικού” φραγμού, ο οποίος δημιουργείται από τις στενές συνδέσεις των βασικών κυττάρων (principal cells) του επιθηλίου της επιδιδυμίδας, δεν επιτρέπει τη διέλευση ουσιών ή κυττάρων, μέσα και έξω από τον πόρο, δημιουργώντας έτσι ένα περιβάλλον προστατευμένο από επιθέσεις του ανοσοποιητικού, στο οποίο μπορούν να ωριμάσουν ανενόχλητα τα σπερματοζωάρια (Cornwall GA, 2009). Η παρουσία κυττάρων του ανοσοποιητικού στον συνδετικό ιστό αποτελεί ένδειξη φλεγμονής, η πρόκληση της οποίας θα μπορούσε να εξηγηθεί ενδεχομένως από φαινόμενα αυτοανοσίας, εάν τα σπερματοζωάρια διαφύγουν από τον πόρο της επιδιδυμίδας, ή αν κύτταρα του ανοσοποιητικού εισχωρήσουν μέσα στον πόρο, λόγω του κατεστραμμένου επιθηλίου και στις δυο περιπτώσεις.

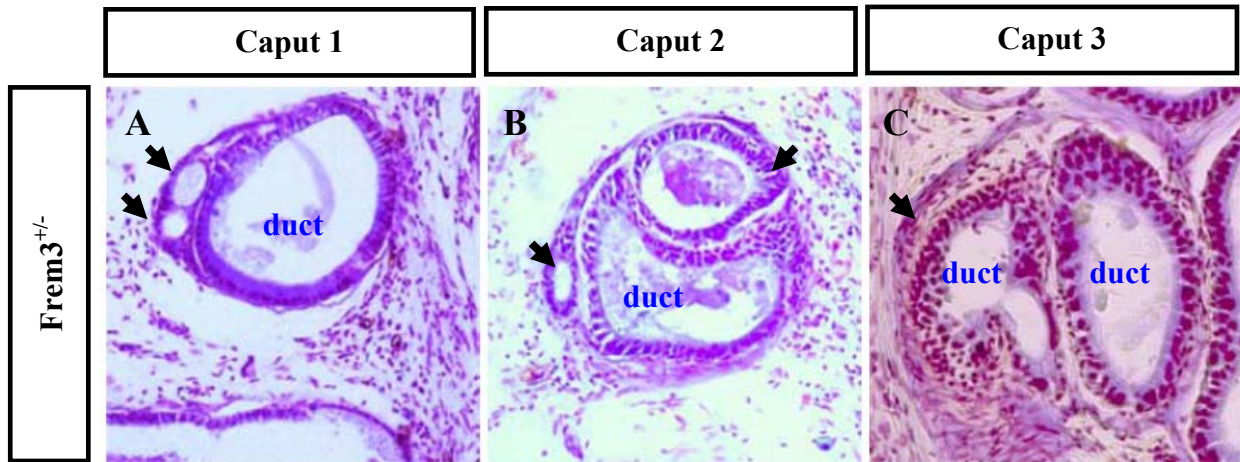
Η τρίτη παρατήρηση αφορά στη συσσώρευση μεγάλης ποσότητας σπερματοζωαρίων στην κεφαλή της *Frem3^{+/-}* επιδιδυμίδας, μέσα σε περιοχές του συνδετικού ιστού, όπου κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν θα έπρεπε να υπάρχουν (Εικ. 36C). Επιπλέον, τα σπερματοζωάρια φαίνεται να περιβάλλονται από ένα πυκνό συνονθύλευμα μη ταυτοποιημένων μέχρι τώρα κυττάρων, τα οποία ενδεχομένως είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού, που αποτελούν ένδειξη οιδήματος.

Η τέταρτη παρατήρηση μέσα από τα πειράματα ιστοχημείας, αφορά τα επιθήλια. Ο πόρος της επιδιδυμίδας είναι ένας λεπτός μυώδης σωλήνας το πάχος του οποίου αυξάνεται προχωρώντας από την κεφαλή προς την ουρά. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε μια οποιαδήποτε διατομή της επιδιδυμίδας, τα τμήματα του πόρου φαίνονται συμμετρικά τόσο σε σχήμα όσο και σε μέγεθος. Αντίθετα στα *Frem3^{+/-}*, όπως φαίνεται και στην Εικ. 37 παρατηρείται πολύ συχνά το φαινόμενο να υπάρχει ένα μεγάλο τμήμα του πόρου και δίπλα σε πολύ στενή επαφή να βρίσκονται 2-3 αρκετά μικρότερα σωληνάρια (Εικ. 37A-

B), ή να υπάρχουν δυο τμήματα του πόρου τα οποία φαίνονται σαν ξεχωριστά επιθήλια και τα οποία όμως περιβάλλονται από ένα κοινό στρώμα λείων μυϊκών ινών (Εικ. 37C).



Εικόνα 36. Ιστοχημική χρώση με Cresyl Violet σε κρυτομές από επιδιδυμίδα *Frem3*^{+/-} και αγρίου τύπου. (A) Στο συγκεκριμένο τμήμα της *Frem3*^{+/-} επιδιδυμίδας, είναι εμφανής η αποδιοργάνωση του επιθηλίου του πόρου, καθώς επίσης και η απομάκρυνση των λείων μυϊκών ινών (μαύρο βέλος) από το επιθήλιο (πράσινο βέλος). Ο αυλός του πόρου φαίνεται να είναι άδειος από σπερματοζωάρια. **(B)** Στη εικόνα αυτή, από την ουρά της επιδιδυμίδας φαίνονται μεγάλα κοκκιώδη κύτταρα (μαύρα βέλη) μέσα στο συνδετικό ιστό (Cn). Από τη μορφολογία τους φαίνεται ότι είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ενδεχομένως μακροφάγα, η παρουσία των οποίων δηλώνει την ύπαρξη φλεγμονής. **(C)** Σε κάποιες περιοχές της επιδιδυμίδας (εδώ caput epididymis) παρουσιάζεται μεγάλη συσσώρευση σπερματοζωαρίων μέσα στο συνδετικό ιστό, με τα σπερματοζωάρια να περιβάλλονται από έναν ανομοιογενή πληθυσμό κυττάρων, άγνωστης μέχρι τώρα προέλευσης. **(D-F)** Αγρίου τύπου τομές από αντίστοιχες περιοχές της επιδιδυμίδας με τις A-C. Γενικά, υπό φυσιολογικές συνθήκες, το επιθήλιο του πόρου φαίνεται συμμετρικό, με τα λεία μυϊκά κύτταρα σε στενή επαφή με τη βασική μεμβράνη.



Εικόνα 37. Ιστοχημική χρώση με Cresyl Violet σε κρυστομές από επιδιδομίδα *Frem3*^{+/-} ποντικών. Στις εικόνες (A-B) φαίνεται το επιθήλιο του πόρου (duct) κεντρικά, και σε στενή επαφή δυο ξεχωριστά μικρότερα επιθήλια (βέλη). Στην εικόνα (C) φαίνονται δύο ξεχωριστά επιθήλια τα οποία όμως περιβάλλονται από την ίδια στιβάδα λείων μυϊκών ινών (βέλος).

3.6 Ο ρόλος της *Fras1* στο κεντρικό νευρικό σύστημα

Στα ευρύτερα πλαίσια της λειτουργικής μελέτης των πρωτεϊνών *Fras1/Frem*, αναζητήσαμε περιοχές πιθανούς λειτουργίας των επιμέρους πρωτεϊνών, διαφορετικές από την βασική μεμβράνη των επιθηλίων. Όπως συζητήθηκε και παραπάνω προχωρήσαμε στην απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3* για να διερευνήσουμε το βιολογικό του ρόλο στη βασική μεμβράνη των αιμοφόρων αγγείων, στα περιφερικά νεύρα αλλά και στα επιθήλια εμβρύων και ενηλίκων ποντικών. Σε όλες αυτές τις δομές διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας σχετικά με το πρότυπο εντοπισμού. Παρόμοια ήταν και τα κίνητρα να μελετήσουμε το φαινότυπο των *Fras1*^{-/-} ποντικών στον εγκέφαλο, έχοντας ως δεδομένα την έκφραση του *Fras1* σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με μαθησιακές διεργασίες.

Από πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του mRNA του γονιδίου *Fras1*, σε ιστολογικές τομές εγκεφάλων από έμβρυα και ενήλικα ποντίκια, είχε διαπιστωθεί το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Γ. Χαλεπάκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Πιο συγκεκριμένα κατά τον πρώτο μήνα ζωής των ποντικών, η έκφραση του *Fras1* στον εγκέφαλο, εντοπίστηκε στον ιππόκαμπο, στο νεοφλοιό, στο βασικό αμυγδαλοειδή πυρήνα, στην παρεγκεφαλίδα και στο χοριοειδές πλέγμα. Σε αναπτυξιακά στάδια η έκφραση του γονιδίου περιορίζεται κυρίως στο χοριοειδές πλέγμα και τη χοριοειδή μήνιγγα, ενώ το πρότυπο έκφρασης διατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής. Το ενδιαφέρον με την έκφραση του γονιδίου *Fras1* βρίσκεται ακριβώς στις περιοχές στις οποίες εντοπίζεται και στον ρόλο που

διαδραματίζουν στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης. Για την κατανόηση των αποτελεσμάτων παρατίθεται η ακόλουθη ενότητα, στην οποία περιγράφεται περιληπτικά η διαδικασία της μνήμης-μάθησης και ο ρόλος της αμυγδαλής

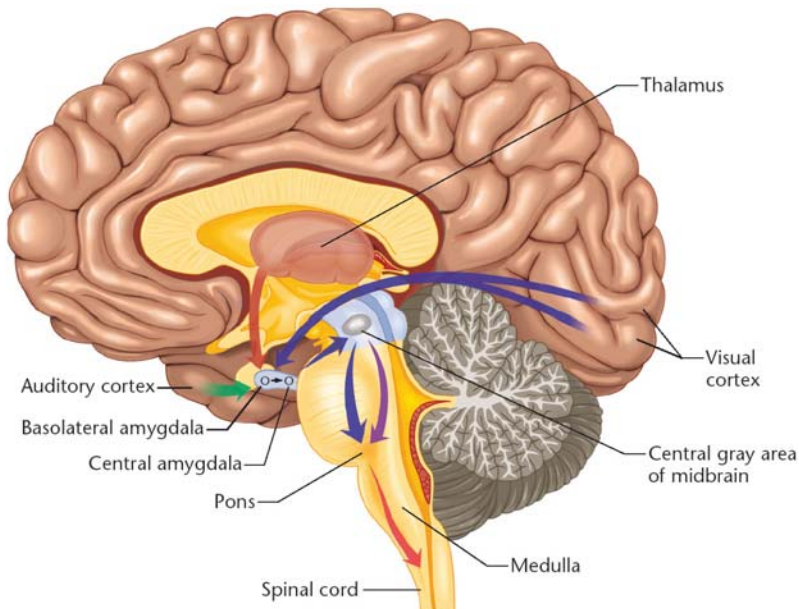
i) Εγκέφαλος-Μάθηση και μνήμη

Ο εγκέφαλος του ανθρώπου έχει συχνά χαρακτηριστεί σαν ένα “μαύρο κουτί”, που δέχεται ερεθίσματα από το περιβάλλον και προκαλεί απαντήσεις, με τη μορφή των διαφόρων συμπεριφορών. Η παραγωγή όμως των απαντήσεων δεν είναι μια παθητική διαδικασία αλλά επηρεάζεται τόσο από την εμπειρία, με τη μορφή της μάθησης και της μνήμης, όσο και από διάφορες εσωτερικές ενορμήσεις (π.χ. συναισθηματικές καταστάσεις).

Τα διάφορα ερεθίσματα (οπτικά, ακουστικά, απτικά, οσφρητικά και γευστικά) εισέρχονται στον εγκέφαλο μέσω των εξειδικευμένων αισθητικών συστημάτων του εγκεφαλικού φλοιού. Τα οπτικά ερεθίσματα, για παράδειγμα, κατευθύνονται από τον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού στο πίσω μέρος του ινιακού φλοιού του εγκεφάλου, ενώ τα ακουστικά ερεθίσματα κατευθύνονται από τα αυτιά στο άνω μέρος του κροταφικού φλοιού. Οι απαντήσεις, με τη μορφή των κινητικών απαντήσεων, εκπορεύονται από μια περιοχή του οπίσθιου μετωπιαίου λοβού (σωματοκινητική περιοχή), τα κύτταρα της οποίας, μέσω του νωτιαίου μυελού, διεγείρουν τα κινητικά νεύρα που κινούν τους μύες του σώματος. Ανάμεσα στις ειδικές αισθητικές περιοχές και τη σωματοαισθητική περιοχή παρεμβάλλονται διάφορες περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού που ονομάζονται συνειρμικές. Μάθηση είναι η διαδικασία με την οποία ο άνθρωπος και τα ζώα αποκτούν γνώσεις για τον κόσμο. Μνήμη είναι η συγκράτηση και η αποθήκευση αυτών των γνώσεων. Στον άνθρωπο, στον οποίο αυτές οι ικανότητες είναι εξαιρετικά ανεπτυγμένες, σχεδόν όλες οι συμπεριφορές περιλαμβάνουν κάποια μορφή μάθησης (Kandel et al., 2000, Le Doux, 2002).

Η διέγερση, η συναισθηματική μάθηση, ο κοινωνικός προσανατολισμός και η αναγνώριση της συναισθηματικής σημασίας ελέγχονται από την αμυγδαλή. Η αμυγδαλή (Εικ. 38) είναι μια περίπλοκη μικρή νευρική δομή με αμυγδαλοειδές σχήμα που

βρίσκεται στο στεφανιαίο σύστημα, μέσα στον διάμεσο κροταφικό λοβό ο οποίος είναι σημαντικός για το συναισθηματικό περιεχόμενο των νέων μνημών. Αποτελείται από περίπου δώδεκα υποπεριοχές-πυρήνες και στον εγκέφαλο υπάρχουν δύο αμυγδαλές, στην αριστερή και δεξιά πλευρά αντίστοιχα.



Εικόνα 38. Σχηματική αναπαράσταση του εγκεφάλου. Thalamus: Θάλαμος, Auditory cortex: ακουστικός φλοιός, Pons: γέφυρα, Medulla: προμήκης μυελός, Central amygdala: κεντρικός αμυγδαλοειδής πυρήνας, Basolateral amygdala: βασικοπλευρικός πυρήνας, Spinal cord: νωτιαίος μυελός (http://sveglia.files.wordpress.com/2007/05/jk379fig1213amygdala_con.jpg).

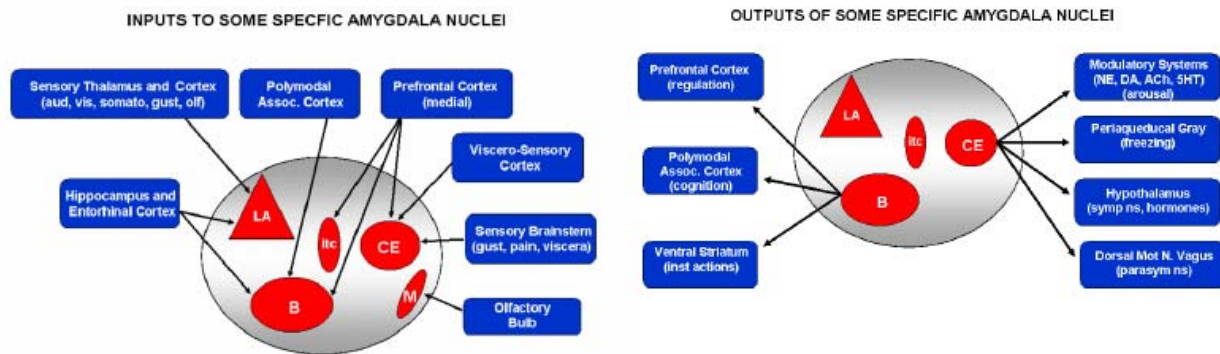
Ο αρχικός ρόλος αυτής της αρχαίας εξελικτικής δομής ήταν η προστασία των οργανισμών από επιβλαβείς χημικές ουσίες του περιβάλλοντος. Από την εξελικτική σκοπιά, ο φόβος είναι ένα νευρικό κύκλωμα που έχει σχεδιαστεί για να διατηρεί τον οργανισμό ζωντανό στις επικίνδυνες καταστάσεις (Le Doux, 2002). Η συμπεριφορά που υποκινείται από το φόβο είναι μια σημαντική προσαρμοστική ικανότητα που παρέχει στα ζώα τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν και να συμπεριφέρονται κατάλληλα όταν εκτίθεται στον κίνδυνο. (Mc Gaugh, 2000, Rodrigues SM 2004). Η εξέλιξη εντούτοις έχει επιτρέψει σ' αυτή τη δομή να διαφοροποιήσει τη λειτουργία της έτσι ώστε να διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην έκφραση των συγκινήσεων, στην εκμάθηση νέων συναισθηματικών απαντήσεων και στην ανάπτυξη της μνήμης (Baxter και Murray, 2002). Η αμυγδαλή είναι ουσιαστική για την αποκωδικοποίηση των συγκινήσεων και των ιδιαίτερων ερεθισμάτων που απειλούν τον οργανισμό. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις συγκινήσεις και στα συναισθήματα. Τα συναισθήματα είναι "παραπλανητικά", προϊόντα του συνειδητού νου, ετικέτες που δίνονται στις ασυνείδητες

συγκινήσεις ενώ οι συγκινήσεις είναι ευδιάκριτες δομές των συμπεριφορών των νευρώνων. Οι συγκινήσεις μπορούν να υπάρξουν από συνειδητές εμπειρίες καθώς επίσης από φυσιολογικές και νευρολογικές αντιδράσεις εκούσιων και ακούσιων συμπεριφορών. Αλλά τα συστατικά του φόβου υπερβαίνουν τα συναισθήματα και τις συγκινήσεις. Η αμυγδαλή όμως πέρα από την αποκωδικοποίηση των συγκινήσεων ενεργεί και ως αποθήκη για τη συναισθηματική μνήμη (Baxter και Murray, 2002).

Πολλές είναι οι αισθητήριες είσοδοι που συγκλίνουν στην αμυγδαλή για να την ενημερώσουν για τους πιθανούς κινδύνους από το περιβάλλον. Αυτές οι αισθητήριες πληροφορίες έρχονται στην αμυγδαλή είτε άμεσα από τον αισθητήριο θάλαμο είτε από τους διάφορους αισθητήριους φλοιούς. Ο πλευρικός πυρήνας της αμυγδαλής είναι η πύλη μέσα στη δομή, που επιτρέπει να παραληφθούν οι πληροφορίες από το εξωτερικό περιβάλλον. Παρόλα αυτά υπάρχουν διάφορες άλλες περιοχές του εγκεφάλου που προβάλλουν τους νευρίτες τους στην αμυγδαλή, όπως ο υποθάλαμος, το διάφραγμα και ο δικτυωτός σχηματισμός του στελέχους του εγκεφάλου (Baxter και Murray, 2002).

Οι αμυγδαλοειδείς πυρήνες ρυθμίζονται και από τις πολυάριθμες συνδέσεις που λαμβάνουν από τον ιππόκαμπο. Από αυτές τις συνδέσεις μπορεί να εκπορεύονται οι ισχυρές συγκινήσεις που πυροδοτούνται από κάποιες ιδιαίτερες μνήμες, διότι ο ιππόκαμπος εμπλέκεται στην αποθήκευση και την ανάκτηση των έκδηλων μνημών. Ο ιππόκαμπος, είναι μια μάζα εγκεφαλικού ιστού που βρίσκεται μέσα στον κροταφικό λοβό, ο οποίος αποτελεί παροδικό μόνο χώρο αποθήκευσης της μακρόχρονης μνήμης και μεταβιβάζει τις πληροφορίες που αποκτήθηκαν στον εγκεφαλικό φλοιό για μόνιμη αποθήκευση (Mc Gaugh, 2000, Rodrigues SM 2004). Επεξεργάζεται τις πληροφορίες που εισέρχονται από τα αισθητικά συστήματα του εγκεφάλου για μια περίοδο εβδομάδων ή μηνών και τις μεταφέρει σε συγκεκριμένες περιοχές του φλοιού. Σημαντικές συνδέσεις με την αμυγδαλή προέρχονται επίσης από τον διάμεσο προμετωπιαίο φλοιό. Αυτές οι συνδέσεις εμπλέκονται στη διαδικασία της απόσβεσης, με την οποία ένα ερέθισμα που προκαλεί έναν εξαρτημένο-προγραμματισμένο φόβο χάνει βαθμιαία αυτήν την επίδραση. Η εκμάθηση και η απάντηση σε ερεθίσματα που προειδοποιούν για κίνδυνο περιλαμβάνουν νευρικές οδούς που στέλνουν πληροφορίες για τον εξωτερικό κόσμο στην αμυγδαλή, η οποία στη συνέχεια, καθορίζει τη σημασία του ερεθίσματος και προκαλεί συναισθηματικές απαντήσεις όπως το πάγωμα ή τη φυγή καθώς επίσης και

αλλαγές στις εσωτερικές εργασίες των οργάνων του σώματος και των αδένων (Mc Gaugh, 2000, Rodrigues SM 2004).

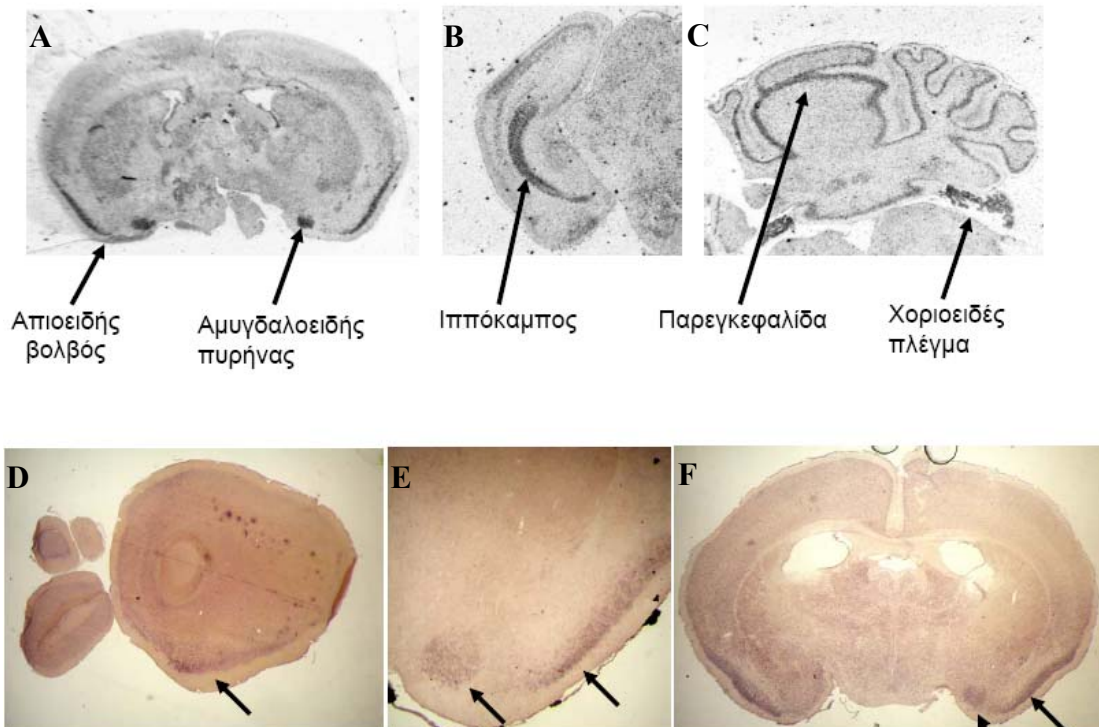


Εικόνα 39. Σχηματική αναπαράσταση των βασικότερων συνδέσεων της αμυγδαλής. Στο σχήμα αριστερά φαίνονται οι περιοχές από τις οποίες δέχεται ερεθίσματα ενώ στο σχέδιο δεξιά, οι περιοχές στις οποίες στέλνει μηνύματα. [B: basal nucleus, Ce: central nucleus, itc: intercalated cells, LA: lateral nucleus, M: medial nucleus, aud: auditory, vis: visual, somato: somatosensory, gust: gustatory (taste), olf: olfactory, NE: norepinephrine, DA: dopamine, Ach: acetylcholine, 5HT: serotonin] (<http://www.scholarpedia.org/article/Amygdala>).

ii) Η έκφραση του *Fras1* στον εγκέφαλο ενήλικων ποντικών, υποδηλώνει τη σχέση του γονιδίου με τις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης.

Ήδη από τα πρωταρχικά πειράματα mRNA *in situ* υβριδοποίησης, (Γ. Χαλεπάκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα), έγινε γνωστό ότι η έκφραση του *Fras1* στον εγκέφαλο των ενήλικων ποντικών περιορίζεται κυρίως σε περιοχές που σχετίζονται με τη μνήμη και τη μάθηση, όπως η αμυγδαλή και ο ιππόκαμπος (Εικ. 40Α-С). Με στόχο την επιβεβαίωση των προηγούμενων αποτελεσμάτων, αλλά και την συστηματική ανάλυση της έκφρασης του *Fras1* στον εγκέφαλο του ποντικού, κατασκευάστηκαν νέοι ανιχνευτές οι οποίοι σημάνθηκαν με διγοξυγενίνη (digoxigenin). Οι ανιχνευτές αυτοί αντιστοιχούν σε διαφορετικές περιοχές του cDNA του *Fras1* που κωδικοποιούν τμήματα της πρωτεΐνης που παρουσιάζουν ομολογία με τις πρωτεάσες της οικογένειας των φουρινών, την περιοχή ομολογίας με την NG2 προτεογλυκάνη θεικής χονδροϊτίνης και την περιοχή ομολογίας με την περιοχή C του παράγοντα Von Willebrand. Η περιγραφή της δημιουργίας των ανιχνευτών βρίσκεται στην ενότητα “Υλικά και μέθοδοι”.

Για τη χαρτογράφηση των περιοχών έκφρασης του *Fras1*, εξετάστηκαν εγκεφαλοι από διάφορα στάδια, ξεκινώντας από μία μέρα μετά τη γέννηση μέχρι και 8 μηνών. Σε κάθε περίπτωση τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τα προηγούμενα και όπως φαίνεται ενδεικτικά και στην Εικ. 40D-F, το γονίδιο *Fras1*, εκφράζεται πράγματι από περιοχές του εγκεφάλου που συμμετέχουν στη μνήμη και τη μάθηση, με ιδιαίτερα έντονο πρότυπο, στους αμυγδαλοειδής πυρήνες.



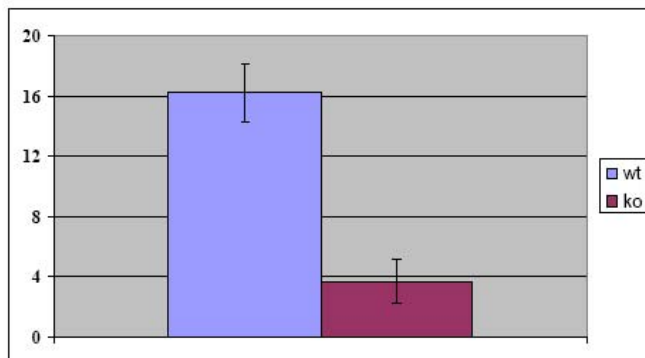
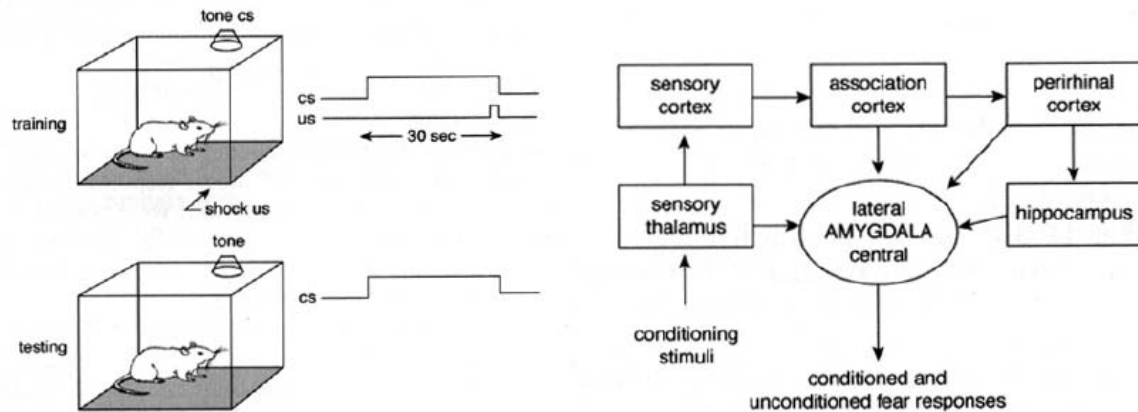
Εικόνα 40. *Fras1* mRNA *in situ* υβριδοποίηση σε τομές εγκεφάλων, ενήλικων (P60) ποντικών αγρίου τύπου. (A-C) Πειράματα mRNA *in situ* με τη χρήση ραδιοσημασμένου *Fras1* ανιχνευτή, (Γ. Χαλεπάκης, αδημοσίευτα). Στις εικόνες φαίνεται η έκφραση του *Fras1* στον απιοειδή λοβό, στην αμυγδαλή, στον ιππόκαμπο, στην παρεγκεφαλίδα και στο χοριοειδές πλέγμα. **(D-G)** mRNA *in situ* υβριδοποίηση με τη χρήση ανιχνευτή σημασμένου με διγοξυγενίνη (digoxigenin), όπου και εδώ φαίνεται η έκφραση στον απιοειδή λοβό και στην αμυγδαλή.

iii) Τα *Fras1*^{-/-} ποντίκια παρουσιάζουν ελλιπή μνήμη του φόβου

Με βάση το πρότυπο έκφρασης του *Fras1*, σε περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με τη μνήμη, όπως η αμυγδαλή, προχωρήσαμε σε πειράματα συμπεριφοράς στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια. Τα πειράματα αυτά υλοποιήθηκαν στη Νοσηλευτική σχολή του

Πανεπιστημίου Αθηνών, σε συνεργασία με την Καθ. Φ. Στυλιανοπούλου και τον Επίκουρο Καθ. Α. Σταματάκη.

Ένα από τα πρώτα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, ήταν και αυτό της εξαρτημένης αντίδρασης φόβου (fear conditioning). Η εν λόγω μέθοδος (Εικ. 41), η οποία αφορά την εκμάθηση φόβου νέων ερεθισμάτων, δεν είναι τίποτα άλλο από μια μορφή μάθησης κατά την οποία ο φόβος συνδέεται με δυο διαδοχικά ερεθίσματα. Ένα ουδέτερο ερέθισμα, π.χ. έναν ήχο, ο οποίος ακολουθείται από ένα δεύτερο ερέθισμα, επώδυνο αυτή τη φορά, π.χ. ηλεκτροσόκ. Με την επανάληψη, τα φυσιολογικά ποντίκια μαθαίνουν τελικά να συσχετίζουν το ουδέτερο ερέθισμα με το επώδυνο, με αποτέλεσμα ο ήχος και μόνο να τους προκαλεί φόβο. Η απόκριση του ποντικού σε τέτοιου είδους καταστάσεις είναι το πάγωμα (freezing), κατά το οποίο το ζώο μετά το άκουσμα του ήχου και καθώς θυμάται τι θα επακολουθήσει (ηλεκτροσόκ), φοβάται και παραμένει ακίνητο για ένα σύντομο χρονικό διάστημα (LeDoux, 1996).

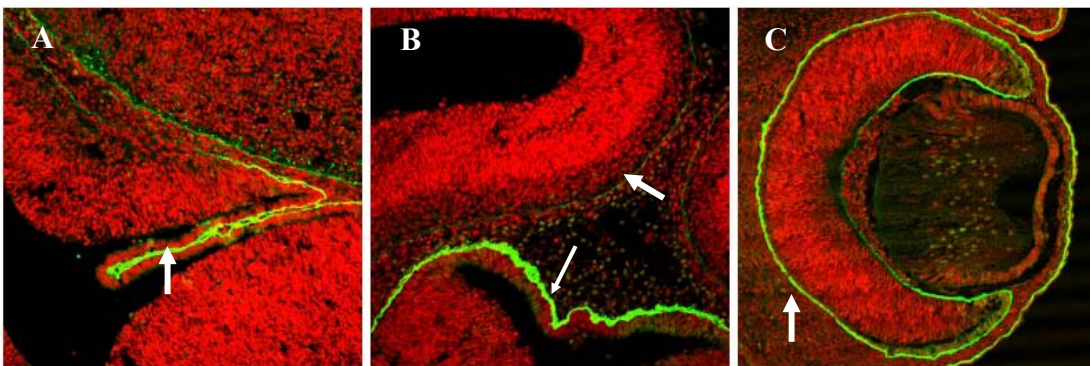


Εικόνα 41. Στην εικόνα πάνω αριστερά, παρουσιάζεται σχηματικά το στήσιμο μιας δοκιμασίας εξαρτημένου φόβου. Στην εικόνα πάνω δεξιά, φαίνεται σε σχηματική αναπαράσταση το κύκλωμα του εξαρτημένου φόβου. Στο σχεδιάγραμμα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα εξαρτημένου φόβου, όπου όπως φαίνεται, ο μέσος χρόνος παγώματος των *Fras1^{-/-}* ποντικών είναι κάτω από 4 δευτερόλεπτα, σε αντίθεση με τα αγρίου τύπου που ακινητοποιούνται κατά μέσο όρο για 16 δευτερόλεπτα.

Τα αποτελέσματα από τα πειράματα εξαρτημένου φόβου, καταδεικνύουν ότι τα *Fras1*^{-/-} ποντίκια δεν θυμούνται το επώδυνο ερέθισμα, με αποτέλεσμα μετά το άκουσμα του ήχου, να μην φοβούνται και άρα είτε να μην παγώνουν, είτε να παγώνουν αλλά για ελάχιστο χρονικό διάστημα (Εικ. 41).

iv) Η πρωτεΐνη *Fras1* δεν εντοπίζεται στον εγκέφαλο ενηλίκων ποντικών

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, αποφασίσαμε να μελετήσουμε εκτενέστερα το ρόλο της *Fras1* πρωτεΐνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα, με αφετηρία την χαρτογράφηση του εντοπισμού της, σε εγκεφάλους τόσο εμβρύων όσο και ενηλίκων ποντικών. Ξεκινώντας από αναπτυξιακά στάδια, καταφέραμε να εντοπίσουμε την πρωτεΐνη *Fras1* στη χοριοειδή μήνιγγα του εγκεφάλου, με εξαιρετικά έντονο πρότυπο στην περιοχή του διεγκεφάλου, στο χοριοειδές πλέγμα και στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού, ο οποίος ουσιαστικά αποτελεί προέκταση της χοριοειδούς μήνιγγας (Εικ. 42)

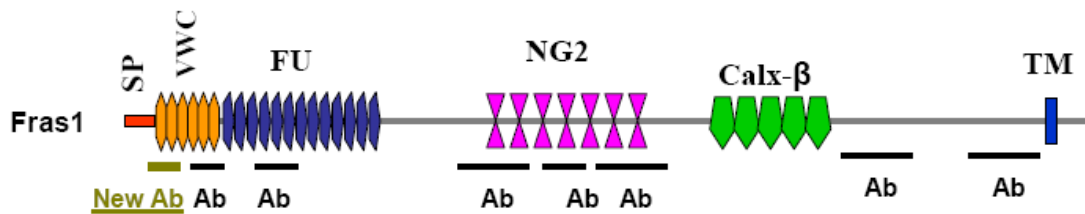


Εικόνα 42. Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης *Fras1* στον εγκέφαλο εμβρύων ποντικού E14.5. Η *Fras1* φαίνεται να εντοπίζεται στο χοριοειδές πλέγμα του εγκεφάλου (A), στη χοριοειδή μήνιγγα (B μεγάλο βέλος) και ιδιαίτερα στην περιοχή του διεγκεφάλου (B μικρό βέλος) και στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού (C).

Στη συνέχεια και έχοντας στη διάθεσή μας 8 διαφορετικά αντισώματα (Εικ. 43) που αναγνωρίζουν ειδικά διαφορετικές περιοχές της *Fras1* (ένα από αυτά περιγράφεται στην ενότητα “Υλικά και μέθοδοι”) προχωρήσαμε σε πειράματα ανοσοεντοπισμού της πρωτεΐνης με κάθε ένα από αυτά τα αντισώματα. Παρόλη την προσπάθεια και

δοκιμάζοντας ποικίλα πρωτόκολλα και διαφορετικές συνθήκες η *Fras1* δεν εντοπίστηκε στον εγκέφαλο ενηλίκων ποντικών, ανεξαρτήτου ηλικίας.

Από τα παραπάνω μπορούν να γίνουν διάφορες υποθέσεις όσον αφορά την αιτία μη εντοπισμού της *Fras1*, όπως: 1) έλλειψη ιδανικών πειραματικών συνθηκών, 2) η διαμόρφωση της πρωτεΐνης μπορεί να είναι τέτοια στον εγκεφαλικό ιστό, ώστε οι επίτοποι να είναι καλυμμένοι και άρα να μην εντοπίζεται, 3) η πρωτεΐνη μπορεί να εκκρίνεται από τα κύτταρα και να διαχέεται με αποτέλεσμα να είναι εξαιρετικά δύσκολο να εντοπιστεί, 4) το *Fras1* στον εγκέφαλο θα μπορούσε να δρα μονάχα ως mRNA, 5) η πρωτεΐνη να παράγεται παροδικά και μόνο μετά από συγκεκριμένα ερεθίσματα.



Εικόνα 43. Σχηματική αναπαράσταση της δομής πρωτεΐνης *Fras1*. Σημειώνονται οι διαφορετικές περιοχές που προκύπτουν από την πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης (SP: signal peptide, VWC: von Willebrandt factor-like motifs, FU: furin-like domain, NG2: chondroitin sulphate proteoglycan-like motifs, Calx-β: motifs similar to those found in Na-Ca exchangers, TM: transmembrane domain). Ακόμα σημειώνονται τα αντισώματα ενάντια σε διαφορετικές περιοχές της *Fras1* καθώς και οι σχετικές θέσεις τους πάνω στην πρωτεΐνη. Το New Ab, είναι το τελευταίο αντίσωμα που δημιουργήσαμε και το οποίο αφορά τη αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης.

ν) Μοριακή – ιστολογική ανάλυση του φαινοτύπου με τη χρήση διαφόρων δεικτών

Από προηγούμενα πειράματα ιστοχημικών χρώσεων με Cresyl Violet, που πραγματοποιήθηκαν από τον Δρ. Α. Σταματάκη, παρατηρήθηκε ότι οι περιοχές της αμυγδαλής καθώς και του προμετωπιαίου φλοιού του εγκεφάλου *Fras1*^{-/-} ποντικών, ήταν αρκετά αποδιοργανωμένες όσον αφορά το κυτταρικό τους περιεχόμενο. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν κατηγορίες κυττάρων, μη ταυτοποιημένων μέχρι τώρα, οι οποίες στα μεταλλαγμένα ποντίκια παρουσιάζουν αισθητή μείωση. Λαμβάνοντας υπόψη αυτό καθώς και την έλλειψη φόβου των *Fras1*^{-/-} ποντικών, προχωρήσαμε στην μοριακή-

ιστολογική ανάλυση του φαινοτύπου κάνοντας χρήση διαφόρων δεικτών, με στόχο να εντοπιστούν μοριακές αλλοιώσεις σε συγκεκριμένες περιοχές ή κυτταρικούς πληθυσμούς. Ξεκινήσαμε από πειράματα ανοσοφθορισμού σε ποντίκια ηλικίας E18.5-P7, χρησιμοποιώντας τα αντισώματα anti-GFAP (Glial fibrillary acidic protein), anti-MBP (Myelin basic protein), anti-MAP (microtubule associated protein), anti-Neurofilament. Τα δυο πρώτα αντισώματα αναγνωρίζουν πρωτεΐνες κυττάρων γλοιακής προέλευσης, ενώ τα δυο τελευταία αφορούν νευρικά κύτταρα. Ο εγκέφαλος, όπως και ο νωτιαίος μυελός, συγκροτείται από δυο μεγάλες κατηγορίες κυττάρων: τα νευρικά κύτταρα ή νευρώνες και τα γλοιακά κύτταρα. Για να γίνει κατανοητός ο παραπάνω διαχωρισμός, παρατίθενται οι ακόλουθες πληροφορίες.

Ο όρος γλοία, πρωτοχρησιμοποιήθηκε το 1846 από τον Πρώσο γιατρό Karl Virchow, για να περιγράψει κυτταρικούς τύπους που η μόνη χρησιμότητά τους ήταν να “δένουν” τα νευρικά κύτταρα μεταξύ τους στον εγκέφαλο (Somjen GG, 1988). Αυτή η εντύπωση ότι τα κύτταρα γλοίας δεν έπαιζαν παρά τον δευτερεύοντα και παθητικό ρόλο της υποστήριξης των νευρώνων παρέμεινε στο συλλογικό επιστημονικό υποσυνείδητο για αρκετές δεκαετίες, μέχρις ότου κατάφεραν να αξιοποιηθούν νέες τεχνικές παρατήρησης του κεντρικού νευρικού συστήματος (Κ.Ν.Σ.). Σήμερα ο όρος “κύτταρα γλοίας” περιγράφει ξεχωριστούς κυτταρικούς τύπους στο νευρικό σύστημα και περιλαμβάνει όλες τις κατηγορίες των στηρικτικών κυττάρων. Τα νευρογλοιακά κύτταρα σχηματίζουν το ήμισυ της συνολικής μάζας του Κ.Ν.Σ., και καταλαμβάνουν με τις διακλαδώσεις τους το διάστημα μεταξύ των νευρώνων, στους οποίους προσφέρουν βασικά μηχανική αλλά και μεταβολική υποστήριξη. Ιστολογικά, διακρίνονται τέσσερις κατηγορίες κυττάρων της γλοίας: η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα κύτταρα Schwann και τα ολιγοδενδροκύτταρα, στο περιφερικό και στο κεντρικό νευρικό σύστημα αντίστοιχα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της μυελίνης. Τα κύτταρα αυτά περιελίσσονται γύρω από τους νευράξονες προσφέροντας μόνωση και στήριξη ενώ ταυτόχρονα διευκολύνουν και τη μετάδοση των δυναμικών ενέργειας σε μεγάλες αποστάσεις. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τα αστροκύτταρα, τα οποία ενώ δεν προσφέρουν στήριξη στους νευρώνες όπως τα ολιγοδενδροκύτταρα, παρόλα αυτά έχουν ουσιαστικό ρόλο στην υποστήριξη της νευρικής λειτουργίας και όχι μόνο (Pankaj S and Nitin K, 2008). Η τρίτη κατηγορία αποτελείται από τα επενδυματικά κύτταρα. Τα

κύτταρα αυτά “επενδύουν” τις εγκεφαλικές κοιλίες και τον κεντρικό σωλήνα του ωτιαίου μυελού. Είναι επιθηλιακού τύπου, με κυβοειδές ή κυλινδρικό σχήμα, είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους και φέρουν κροσσούς στην προσαύλια επιφάνειά τους. Η παρουσία των κροσσών φαίνεται ότι διευκολύνει τη διακίνηση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού μέσα στις κοιλίες. Αντίθετα από ότι θα περίμενε κανείς με βάση την επιθηλιακή τους φύση, τα επενδυματικά κύτταρα δεν στηρίζονται σε βασική μεμβράνη, διαθέτουν όμως αποφυάδες που συγχωνεύονται με τις αποφυάδες των υποκείμενων αστροκυττάρων. Τέλος η τέταρτη κατηγορία απαρτίζεται από τα μικρογλοιακά κύτταρα τα οποία είναι εξειδικευμένα ανοσοκύτταρα του ΚΝΣ (μακροφάγα) και θεωρούνται δενδριτικά αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα με χαμηλό επίπεδο φαγοκυτταρικής δραστηριότητας (Pankaj S and Nitin K, 2008).

Έχοντας ως στόχο τη μοριακή ανάλυση του φαινοτύπου των *Fras1^{-/-}* ποντικών στον εγκέφαλο, πραγματοποιήσαμε ανοσοϊστοχημικές μελέτες, χρησιμοποιώντας δείκτες τόσο για κύτταρα γλοίας όσο και για νευρώνες. Η ανάλυση αυτή είχε σαν στόχο, την ανίχνευση συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών που έχουν διαταραχτεί, σε εγκεφάλους *Fras1^{-/-}* ποντικών συγκριτικά με εγκεφάλους φυσιολογικών ποντικών. Αρχικά εστιαστήκαμε σε περιοχές όπου παρατηρήθηκε έκφραση του *Fras1*, όπως φάνηκε από τα πειράματα mRNA *in situ* υβριδοποίησης, και στη συνέχεια επεκταθήκαμε και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Η ανάλυση ξεκίνησε από το εμβρυϊκό στάδιο E18.5 και προχώρησε μέχρι και ενήλικα στάδια, ωστόσο οι πιο ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις ως τώρα, αφορούν τα στάδια E18.5-P7 και κατά συνέπεια αυτά παρουσιάζονται αναλυτικότερα ακολούθως. Τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας με τους δείκτες GFAP, MBP και MAP, πραγματοποιήθηκαν σε 7 ποντίκια για κάθε αναπτυξιακό στάδιο που μελετήθηκε.

vi) Ο εγκέφαλος των *Fras1^{-/-}* ποντικών παρουσιάζει αυξημένο αριθμό GFAP-θετικών κυττάρων

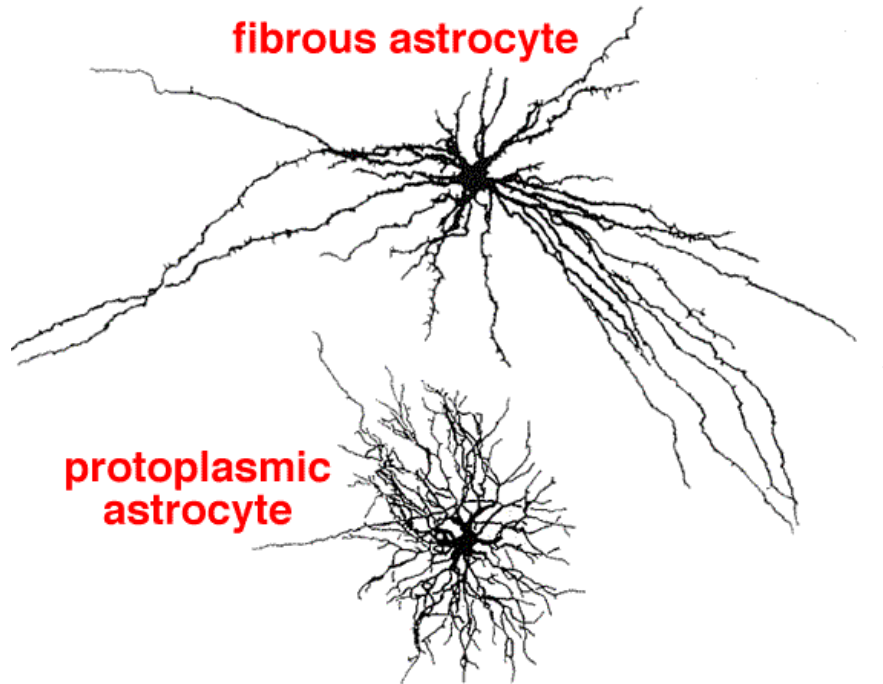
Σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε εγκεφάλους ποντικού ηλικίας E18.5-P7, με τη χρήση του αστροκυτταρικού δείκτη anti-GFAP, οι περιοχές που παρουσίασαν μεγαλύτερο ενδιαφέρον ήταν ο φλοιός (cortex), το τηλώδες σώμα (corpus callosum):

δομή λευκής ουσίας του εγκεφάλου των θηλαστικών που συμμετέχει στην επικοινωνία των εγκεφαλικών ημισφαιρίων) και ο απιοειδής λοβός (συμμετέχει στην διαδικασία της όσφρησης και συνδέεται με το δίκτυο ιπποκάμπου-αμυγδαλής).

Τα αστροκύτταρα (ή αστρογλοία) αποτελούν μια ξεχωριστή κατηγορία γλοιακών κυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα, με χαρακτηριστικό αστεροειδές σχήμα (Wang DD and Bordey A, 2008, Pankaj S and Nitin K, 2008). Άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά τους πέρα από τη μορφολογία, αποτελούν και οι αποφυάδες που εκτείνουν περιβάλλοντας γειτονικά νευρικά κύτταρα και αγγεία καθώς και η ύπαρξη σε αυτά μιας μοναδικής κατηγορίας ενδιάμεσων ινιδίων, τα glial fibrils (Wang DD and Bordey A, 2008). Παρόλο όμως που τα αστροκύτταρα παραδοσιακά κατηγοριοποιούνται με βάση τη μορφολογία τους και την έκφραση της πρωτεΐνης GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein, πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων τους) (Kimmelberg HK, 2004), ωστόσο ο χαρακτηρισμός ενός κυττάρου ως αστροκύτταρο φαίνεται να είναι αρκετά πιο πολύπλοκος, καθώς όχι μόνο δεν αποτελούν ένα ομοιογενή πληθυσμό κυττάρων αλλά είναι υπεύθυνα και για πολλές και διαφορετικές λειτουργίες (Wang DD and Bordey A, 2008, Pankaj S and Nitin K, 2008).

Τα αστροκύτταρα παρουσιάζουν μια αρκετά πολύπλοκη και ετερογενή μορφολογία, γενικά όμως όλα τα διαφοροποιημένα, φέρουν χαρακτηριστικές αποφυάδες, έχουν αστεροειδές σχήμα και δεν έχουν δενδρίτες ή άξονες. Η μορφολογική ετερογένεια που παρουσιάζουν εντοπίζεται στους διαφορετικούς πληθυσμούς αστροκυττάρων ανάλογα με την περιοχή στην οποία βρίσκονται στο νευρικό σύστημα (Goldman JE, 2007). Γενικά, με βάση την ποικιλομορφία που παρουσιάζουν αλλά και την χωροταξική τους κατανομή, διαχωρίζονται σε δυο υποπληθυσμούς: 1) τα ινώδη αστροκύτταρα στην λευκή ουσία, που φέρουν μακριές, λεπτές αποφυάδες οι οποίες δεν διακλαδίζονται, και των οποίων τα τελικά πόδια καταλήγουν σε μη συναπτικές περιοχές των νευρώνων, (Wang DD and Bordey A, 2008) και 2) τα πρωτοπλασματικά αστροκύτταρα στη φαιά ουσία τα οποία παρουσιάζουν πολλαπλές διακλαδικές κυτταρικές αποφυάδες, καταλαμβάνοντας τον περισσότερο χώρο μεταξύ των νευρώνων (Wang DD and Bordey A, 2008). Οι αποφυάδες αυτές μπορεί να καταλήγουν στη βασική μεμβράνη των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων, σχηματίζοντας τα τελικά αγγειακά πόδια (terminal endfeet), τα οποία μαζί με το σχεδόν αδιαπέραστο ενδοθήλιο των αγγείων σχηματίζουν

τον αιματεγκεφαλικό φραγμό. Ακόμα κάποιες αποφυάδες μπορεί να περιβάλλουν συνάψεις ή να καταλήγουν στη βασική μεμβράνη μεταξύ του Κ.Ν.Σ. και της χοριοειδούς μήνιγγας, σχηματίζοντας έναν σχετικά αδιαπέραστο φραγμό που ονομάζεται αφοριστική γλοία (Wang DD and Bordey A, 2008).

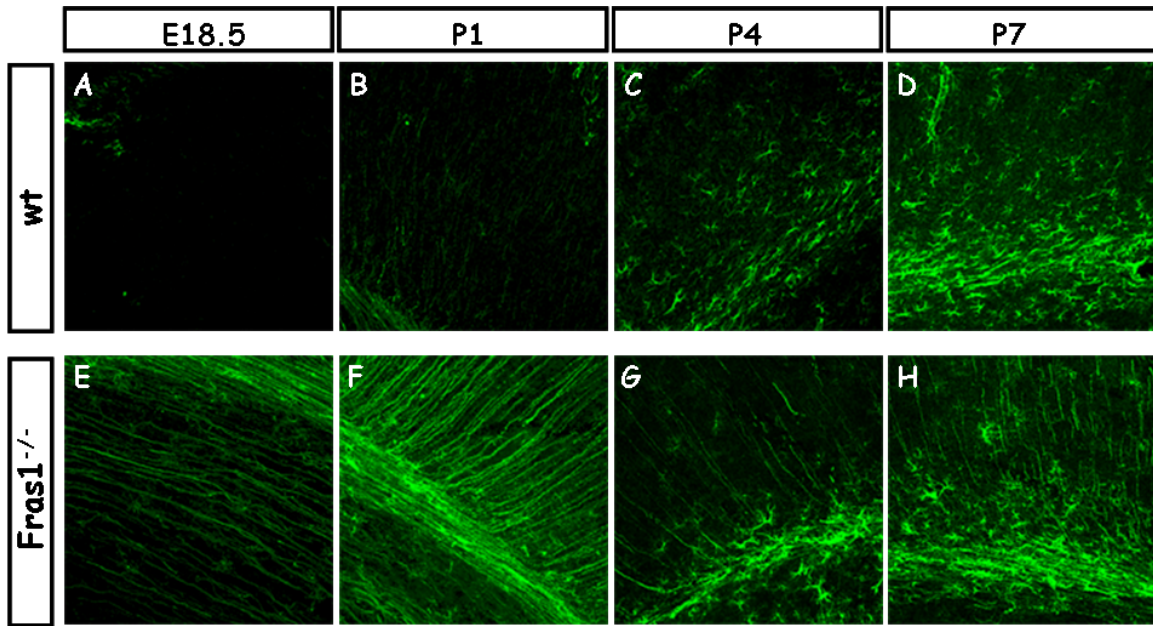


Εικόνα 43. Σχηματική απεικόνιση ινώδους (fibrous) και πρωτοπλασματικού αστροκύτταρου, όπου φαίνεται η διαφορά στη μορφολογία τους (<http://vanat.cvm.umn.edu/neurHistAtls/pages/glia1.html>).

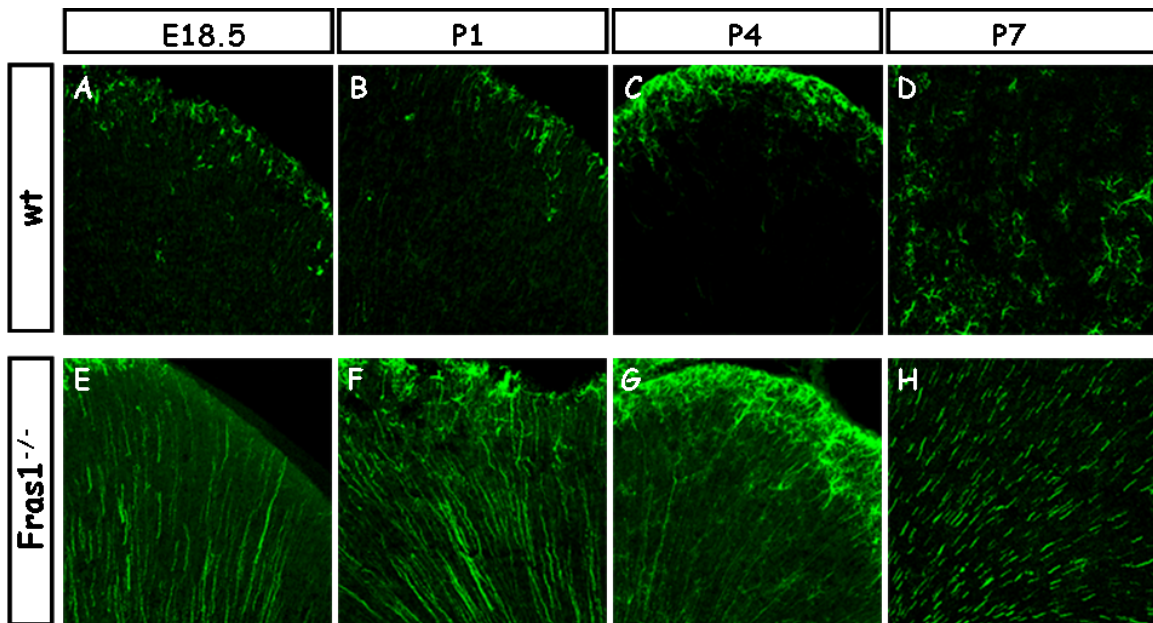
Όσον αφορά τη διαφοροποίηση των γλοιακών κυττάρων, στα θηλαστικά, στον φλοιό του εγκεφάλου, τόσο τα γλοιακά κύτταρα όσο και τα νευρικά, προέρχονται από νευροεπιθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται στην κοιλιακή (VZ) και υποκοιλιακή ζώνη (SVZ) του τελεγκεφάλου σε πολύ πρώιμα αναπτυξιακά στάδια. (Doetsch F, *et al.*, 1997). Η SVZ για παράδειγμα, αποτελεί ένα μωσαϊκό τόσο από πολυδύναμα προγονικά κύτταρα όσο και από πρόδρομα κύτταρα τα οποία θα διαφοροποιηθούν σε πολύ συγκεκριμένους πληθυσμούς κυττάρων (lineage restricted progenitors). Η SVZ του πρόσθιου εγκεφάλου, ο οποίος υποδιαιρείται στον τελεγκέφαλο και στον διεγκέφαλο, σχηματίζεται κατά το τελευταίο τρίτο της εμβρυϊκής ανάπτυξης στον ποντικό (Doetsch F, *et al.*, 1997). Κατά την διάρκεια της εκτεταμένης γλοιογένεσης μεταξύ P5-P20, η SVZ αυξάνει σε μέγεθος και στη συνέχεια συρρικνώνεται αλλά παρόλα αυτά διατηρείται καθ’

όλη την ενήλικη ζωή. Μέσα σε αυτή την περιοχή η πλειονότητα των πρόδρομων κυττάρων έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν είτε σε αστροκύτταρα είτε σε ολιγοδενδροκύτταρα, ένας μικρός πληθυσμός δύναται να διαφοροποιηθεί και στους δύο τύπους κυττάρων, ενώ ένα ακόμα μικρότερο ποσοστό μπορεί να διαφοροποιηθεί τόσο σε νευρικά όσο και σε γλοιακά κύτταρα (Baumann N and Pham-Dinh D, 2001). Όσον αφορά τη διαφοροποίηση των αστροκυττάρων συγκεκριμένα, αυτά προκύπτουν αρχικά από τα ακτινωτά κύτταρα γλοίας (RGCs: Radial Glia Cells) που βρίσκονται στην κοιλιακή ζώνη (VZ: Ventricular Zone).

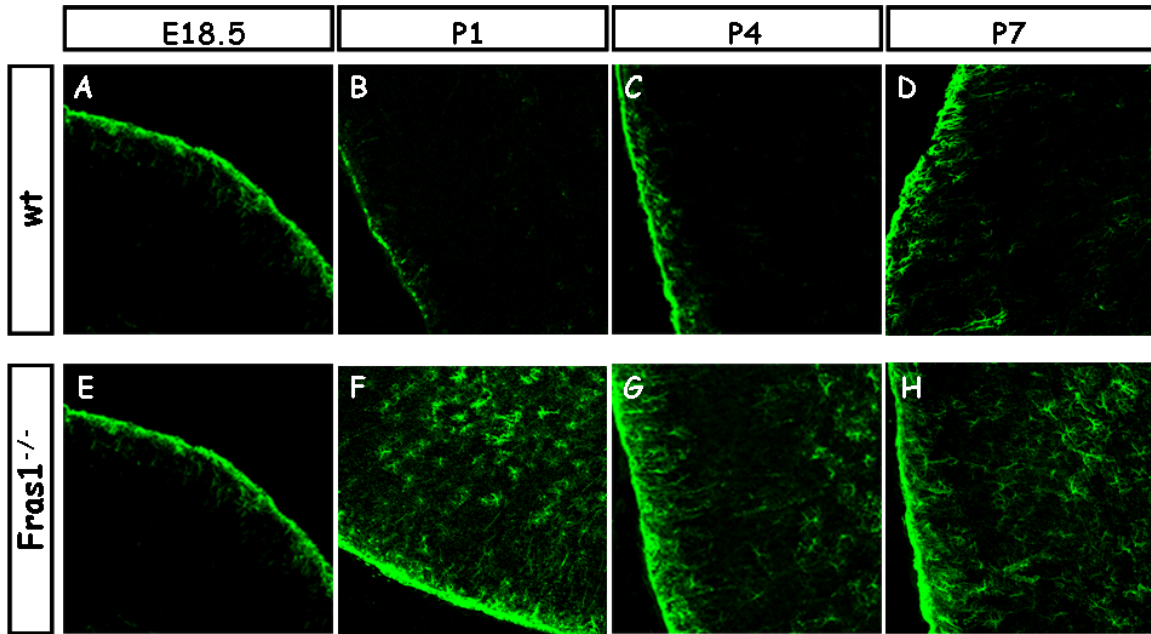
Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας προέκυψε η εξής αρκετά ενδιαφέρουσα παρατήρηση: τα *Fras1*^{-/-} ποντίκια, παρουσιάζουν ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα GFAP-θετικών κυττάρων, ακόμα και σε ηλικιακά στάδια ή περιοχές όπου φυσιολογικά δεν θα έπρεπε να είναι τόσο πολυπληθή. Όπως φαίνεται και στις Εικ. 44E-F στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια στα στάδια E18.5-P1, εντοπίζεται ένα πυκνό δίκτυο από GFAP-θετικά κύτταρα, σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο φλοιός, το τηλώδες σώμα (corpus callosum) και ο απιοειδής λοβός (piriform). Σε αυτά τα στάδια η γλιογέννεση κατά την οποία δημιουργούνται τόσο τα αστροκύτταρα, όσο και τα ολιγοδενδροκύτταρα, έχει μόλις ξεκινήσει. Παρόλα αυτά, στους εγκεφάλους των αγρίου τύπου ποντικών, όχι μόνο δεν είναι τόσο πολυάριθμα όσο στα *Fras1*^{-/-}, αλλά επιπλέον δεν είναι ούτε τόσο ινώδη, έχοντας ήδη αποκτήσει τη χαρακτηριστική αστεροειδή μορφή τους. Στα μετέπειτα στάδια P4-P7 (Εικ. 44G-H) τα GFAP-θετικά κύτταρα, ενώ εξακολουθούν να είναι ινώδη και να υπερτερούν αριθμητικά στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια, ωστόσο πλέον υπάρχει και ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων με χαρακτηριστική αστεροειδή μορφή. Το τελευταίο είναι ιδιαίτερα εμφανές στην πιο εξωτερική στιβάδα του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων (Εικ. 45) καθώς και στη μοριακή στιβάδα του απιοειδούς λοβού (Εικ. 46), ενώ βαθύτερα στο εγκέφαλο, προς την περιοχή του τηλώδους σώματος (corpus callosum) (Εικ. 44) και της κοιλιακής ζώνης (Ventricular Zone), εξακολουθούν να έχουν ινώδη μορφή. Το φαινόμενο της πληθώρας των αστροκυττάρων υφίσταται και στα ενήλικα στάδια, με τη διαφορά ότι εκεί, τα αστροκύτταρα πλέον φαίνεται να έχουν αποκτήσει το χαρακτηριστικό σχήμα με τις πολλαπλές διακλαδικές κυτταρικές αποφυάδες. Το ερώτημα που προκύπτει είναι κατά πόσο τα ινώδη αυτά κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα πρόδρομα κύτταρα



Εικόνα 44. Ανοσοεντοπισμός της αστρογλοιακής πρωτεΐνης GFAP σε εγκεφάλους ποντικών *Fras1^{-/-}* και αγρίου τύπου, στην περιοχή του τηλώδους σώματος (*corpus callosum*). Στα *Fras1^{-/-}* ποντίκια, παρουσιάζονται πολυπληθή GFAP-θετικά κύτταρα τα οποία φέρουν μεγάλες ίνες που διατρέχουν ολόκληρη την περιοχή του *corpus callosum* και εκτείνονται μέχρι τον φλοιό. Αυτό είναι ιδιαίτερα έντονο στα στάδια E18.5-P1 (E-F), όπου οι αντίστοιχες περιοχές στα αγρίου τύπου ποντίκια, φαίνεται να έχουν ελάχιστα GFAP-θετικά κύτταρα (A-B). Στα στάδια P4-P7, στη συγκεκριμένη περιοχή εξακολουθούν να υπάρχουν περισσότερα GFAP-θετικά κύτταρα στα *Fras1^{-/-}*, όμως φαίνεται αρκετά από αυτά να έχουν το χαρακτηριστικό αστεροειδές σχήμα με τις πολλαπλές διακλαδικές κυτταρικές αποφυάδες.



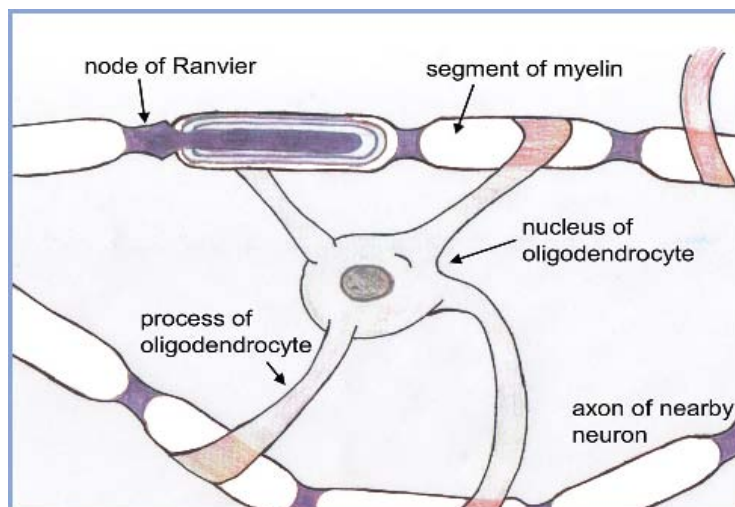
Εικόνα 45. Ανοσοεντοπισμός της αστρογλοιακής πρωτεΐνης GFAP σε εγκεφάλους ποντικών *Fras1^{-/-}* και αγρίου τύπου, στην περιοχή του φλοιού. Στα *Fras1^{-/-}* ποντίκια, φαίνονται πολυπληθή GFAP-θετικά κύτταρα τα οποία φέρουν μεγάλες ίνες που διατρέχουν ολόκληρη την περιοχή του φλοιού. Αντίθετα, στους εγκεφάλους των αγρίου τύπου ποντικών, φαίνονται μόνο διαφοροποιημένα αστροκύτταρα.



Εικόνα 46. Ανοσοεντοπισμός της αστρογλοιακής πρωτεΐνης GFAP σε εγκεφάλους ποντικών *Fras1^{-/-}* και αγρίου τύπου, στην περιοχή του φλοιού (A-H) και του απιοειδούς λοβού (I-P). Στο φλοιό των *Fras1^{-/-}* ποντικών, φαίνονται οι μεγάλες GFAP-θετικές ίνες, οι οποίες από το corpus callosum καταλήγουν στα ανώτερα στρώματα του φλοιού και συναντούν μια πληθώρα διαφοροποιημένων αστροκυττάρων. Στους αγρίου τύπου εγκεφάλους, διακρίνονται μόνο τα διαφοροποιημένα αστροκύτταρα στην εξωτερικότερη στιβάδα του φλοιού. Στον απιοειδή λοβό των *Fras1^{-/-}* εγκεφάλων, δεν φαίνεται να υπάρχουν καθόλου ινώδη GFAP-θετικά κύτταρα, παρόλα αυτά ο αριθμός των διαφοροποιημένων αστροκυττάρων είναι και πάλι αυξημένος σε σύγκριση με τους εγκεφάλους αγρίου τύπου.

vii) Τα *Fras1^{-/-}* ποντίκια έχουν μειωμένο αριθμό ολιγοδενδροκυττάρων

Καθώς τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα έχουν κοινή προέλευση, προέκυψε το ερώτημα αν είναι και αυτά αυξημένα στους εγκεφάλους των μεταλλαγμένων ποντικών. Τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι τα κύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της μυελίνης στο Κ.Ν.Σ. και αποτελούν τον πιο πολυάριθμο τύπο γλοιακού κυττάρου της λευκής ουσίας. Στη φαιά ουσία, αναγνωρίζονται πολύ κοντά στα σώματα των νευρώνων και ονομάζονται δορυφορικά ολιγοδενδροκύτταρα, τα οποία δεν είναι άμεσα συνδεδεμένα με το έλυτρο μυελίνης και θεωρείται ότι παίζουν ρόλο στη ρύθμιση του μικροπεριβάλλοντος των νευρικών κυττάρων (Baumann N and Pham-Dinh D, 2001).

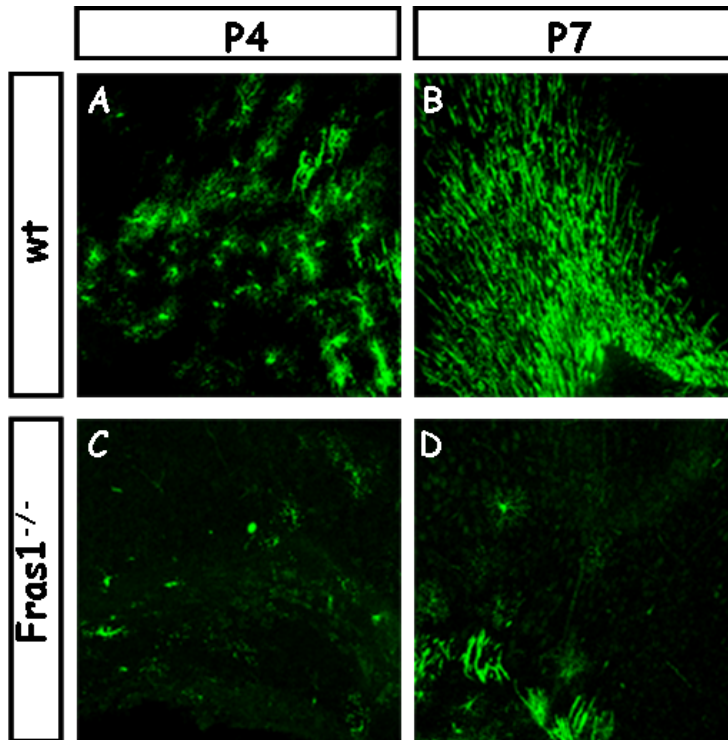


Εικόνα 47. Σχηματική αναπαράσταση ολιγοδενδροκυττάρου που περιέλλισσεται σε γειτονικούς νευράξονες (www.acceleratedcure.org/msresources/neuroanatomy/).

Υπάρχει μια σειρά από χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των ολιγοδενδροκυττάρων από τα αστροκύτταρα (Baumann N and Pham-Dinh D, 2001). Τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι μικρότερα σε μέγεθος, δεν έχουν ενδιάμεσα ινίδια (fibrils) και παρουσιάζουν πληθώρα μικροσωληνίσκων. Ένα ολιγοδενδροκύτταρο μπορεί να παράγει μυελίνη για μέχρι 50 νευράξονες και οι διακλαδώσεις των αποφυάδων του ουσιαστικά αποτελούν λεπτές γέφυρες που ενώνουν το κυτταρικό σώμα με τα έλυτρα μυελίνης. Τα ολιγοδενδροκύτταρα διακρίνονται σε 4 κατηγορίες με βάση τον αριθμό των αποφυάδων τους και το μέγεθος και την πυκνότητα των ελύτρων μυελίνης που σχηματίζουν (Bunge MB, *et al.*, 1961, Butt AM, *et al.*, 1995). Έτσι, τα ολιγοδενδροκύτταρα τύπου I είναι τα μικρότερα σε μέγεθος, σχηματίζουν λεπτά έλυτρα μυελίνης και καθένα περιβάλλει 15-20 μικρούς σε διάμετρο νευράξονες. Τα ολιγοδενδροκύτταρα τύπου II και III είναι τα ενδιάμεσα, ενώ τα ολιγοδενδροκύτταρα τύπου IV είναι τα μεγαλύτερα και με τα έλυτρα μυελίνης καλύπτουν 1-3 νευράξονες μεγάλης διαμέτρου (Butt AM, *et al.*, 1995).

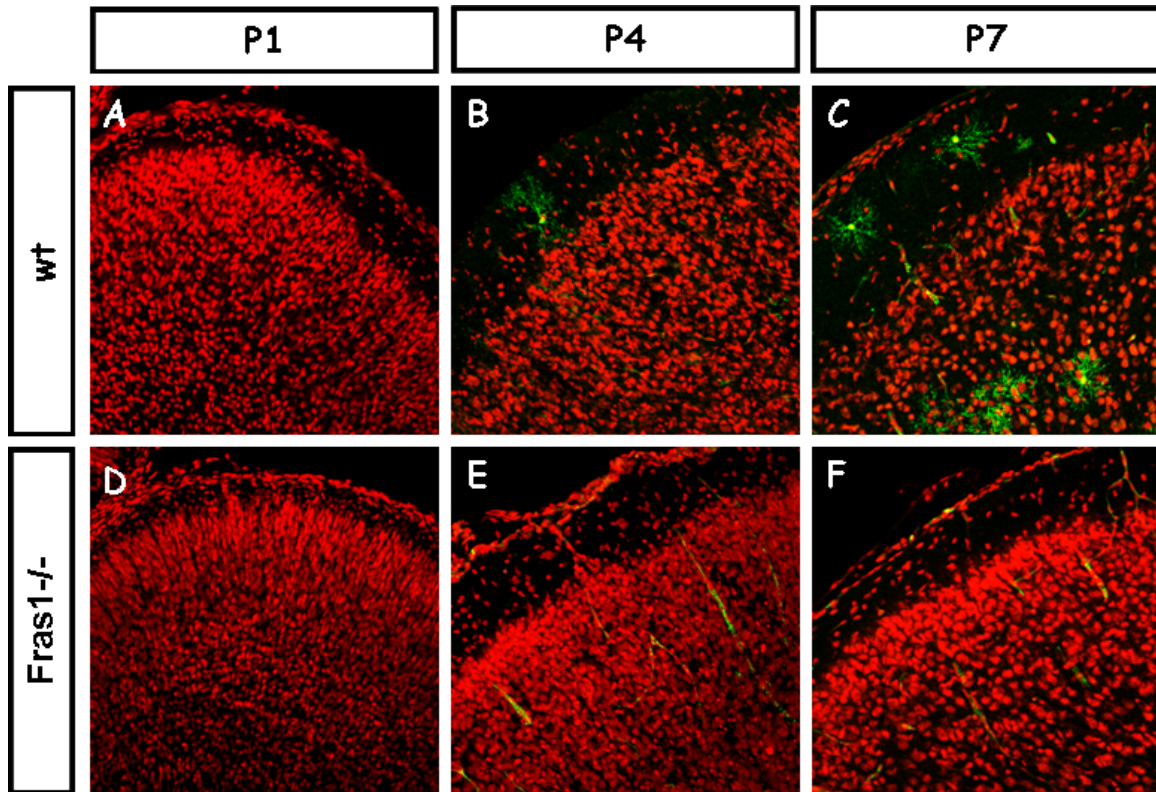
Τα πειράματα ανοσοφθορισμού που πραγματοποιήθηκαν, ακολούθησαν το ίδιο μοτίβο με τα προηγούμενα, δηλαδή εξετάστηκαν στάδια από E18.5 έως ενήλικα. Εστιαστήκαμε και πάλι στα στάδια E18.5-P7, καθώς σε αυτά τα στάδια γίνεται εκτεταμένη γλοιογέννεση και οι μελέτες έγιναν με τα αντισώματα anti-MBP (anti-Myelin Basic Protein) και CNP (2', 3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase). Η

έναρξη έκφρασης της πρωτεΐνης MBP, σηματοδοτεί την ύπαρξη ώριμων ολιγοδενδροκυττάρων ενώ η πρωτεΐνη CNP εκφράζεται κυρίως από πρώιμα ολιγοδενδροκύτταρα. Από τα αποτελέσματα με το πρώτο αντίσωμα (anti-MBP) φαίνεται ότι τα ολιγοδενδροκύτταρα στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια είναι δραματικά μειωμένα, τις πρώτες μέρες μετά τη γέννηση. Όπως φαίνεται και στην Εικ. 48, η κοιλιακή ζώνη (VZ) του αγρίου τύπου εγκεφάλου και η ευρύτερη περιοχή του corpus callosum, είναι γεμάτη από MBP-θετικά κύτταρα, στα στάδια P4-P7, όπου γίνεται υπάρχει εκτεταμένη γλαιογένεση. Αντίθετα, στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια, εντοπίζονται ελάχιστα κύτταρα να εκφράζουν MBP. Σε πιο πρώιμα στάδια (E18.5-P1) δεν φαίνεται να υπάρχουν σχεδόν καθόλου MBP-θετικά κύτταρα ούτε στα αγρίου τύπου, αλλά ούτε και στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια, κάτι το οποίο είναι λογικό, καθώς σε αυτά τα στάδια, η γλαιογένεση έχει μόλις ξεκινήσει και άρα δεν υπάρχουν ακόμα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα.



Εικόνα 48. Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης MBP των ολιγοδενδροκυττάρων σε εγκεφάλους ποντικών *Fras1*^{-/-} και αγρίου τύπου, στην περιοχή του corpus callosum. Στις εικόνες από του αγρίου τύπου εγκεφάλους φαίνονται οι πληθυσμοί των ολιγοδενδροκυττάρων (**A-B**) στην περιοχή του corpus callosum και γενικότερα στην ευρύτερη κοιλιακή περιοχή VZ. Στα στάδια E18.5-P1 δεν εντοπίζονται ακόμα ολιγοδενδροκύτταρα που να εκφράζουν MBP. Στους εγκεφάλους των *Fras1*^{-/-} ποντικών, στα στάδια P4-P7, παρόλο που υπάρχουν κάποια MBP-θετικά ολιγοδενδροκύτταρα, ωστόσο αυτά είναι σημαντικά λιγότερα σε σύγκριση με τους αγρίου τύπου εγκεφάλους.

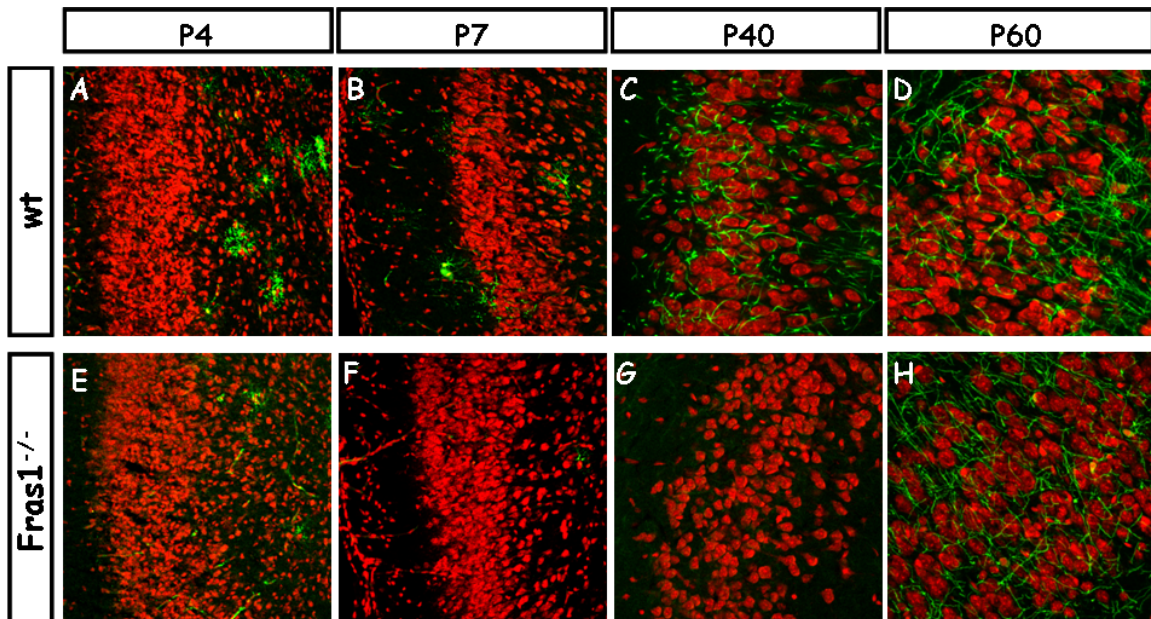
Σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου των φυσιολογικών ποντικών, όπως για παράδειγμα ο φλοιός, εντοπίζονται ελάχιστα ολιγοδενδροκύτταρα (Εικ. 49). Αυτό γενικά είναι αναμενόμενο καθώς τις πρώτες μέρες μετά τη γέννηση, στα πρώιμα στάδια της γλοιογένεσης, τα ολιγοδενδροκύτταρα δεν έχουν ακόμα μεταναστεύσει στις τελικές τους θέσεις. Παρόλα αυτά, από τους εγκεφάλους των *Fras1*^{-/-} ποντικών, φαίνεται ότι απουσιάζουν ακόμα και αυτά τα λίγα ολιγοδενδροκύτταρα από τον φλοιό (Εικ. 49).



Εικόνα 49. Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης MAP των ολιγοδενδροκυττάρων σε εγκεφάλους ποντικών *Fras1*^{-/-} και αγρίου τύπου, στην περιοχή του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Στις εικόνες από του αγρίου τύπου εγκεφάλους ελάχιστα ολιγοδενδροκύτταρα (C-D) στην περιοχή του φλοιού. Στα στάδια E18.5-P1 (A-B) δεν εντοπίζονται ακόμα ολιγοδενδροκύτταρα που να εκφράζουν MBP στον φλοιό, κάτι το οποίο είναι λογικό καθώς δεν είναι ακόμα ώριμα για να μεταναστεύσουν, και η γλοιογένεση έχει μόλις ξεκινήσει. Στους εγκεφάλους των *Fras1*^{-/-} ποντικών, στα στάδια P4-P7 (E-F), δεν φαίνεται να εντοπίζονται καθόλου MBP-θετικά ολιγοδενδροκύτταρα.

Συνοψίζοντας τα μέχρι τώρα αποτελέσματα, φαίνεται ότι τα *Fras1*^{-/-} έχουν αυξημένο αριθμό αστροκυττάρων και μειωμένο αριθμό ολιγοδενδροκυττάρων. Καθώς αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα έχουν κοινή προέλευση, η παραπάνω αντίθεση

μας δείχνει ότι μάλλον δεν υπάρχει κάποια διαταραχή στη διαδικασία τη γλοιογέννεσης αλλά ενδεχομένως με στη διαδικασία της διαφοροποίησης προς την κατεύθυνση των ολιγοδενδροκυττάρων. Σε πειράματα ανοσοφθορισμού με την πρωτεΐνη MBP, σε ενήλικα στάδια, όπως φαίνεται ενδεικτικά και στη Εικ. 50 από την περιοχή του απιοειδούς λοβού, διαπιστώσαμε ότι: 1) παρόλο που το φαινοτυπικό χαρακτηριστικό του μειωμένου αριθμού των ολιγοδενδροκυττάρων είναι σταθερό και εμφανίζεται σε όσα ζώα εξετάσαμε, στα στάδια E18.5-P7, ωστόσο σε ένα ποσοστό μεταλλαγμένων ποντικών, το φαινόμενο εξισορροπείται στην ενήλικη ζωή. Με άλλα λόγια, σε ορισμένα ενήλικα *Fras1*^{-/-} ποντίκια, παρατηρήθηκαν φυσιολογικοί αριθμοί ολιγοδενδροκυττάρων. 2) Σε ένα άλλο ποσοστό ενήλικων ποντικών όμως, παρατηρήσαμε αισθητά μειωμένους πληθυσμούς ολιγοδενδροκυττάρων ή ακόμα και πλήρη απουσία τους σε ορισμένες περιοχές. Όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν όχι μόνο την ποικιλομορφία των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των *Fras1*^{-/-} ποντικών, αλλά και την πλαστικότητα, καθώς απ' ότι φαίνεται κάποιου είδους βλάβες οι οποίες συντελέστηκαν αρκετά νωρίς, ίσως και πριν από τη γέννηση, αποκαθίστανται με την πάροδο του χρόνου.



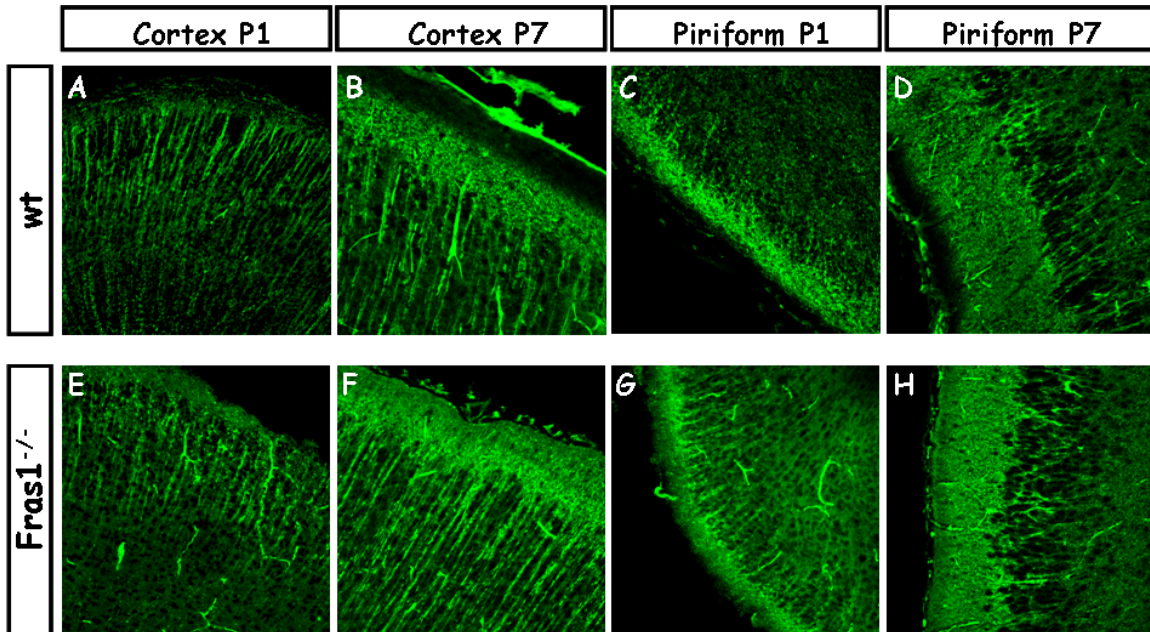
Εικόνα 50. Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης MBP των ολιγοδενδροκυττάρων σε εγκεφάλους ποντικών *Fras1*^{-/-} και αγρίου τύπου, στην περιοχή του απιοειδούς λοβού. Στους ενήλικους εγκεφάλους η εικόνα που παρατηρούμε στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια ποικίλλει. Παρόλα αυτά ο φαινότυπος της έλλειψης-μείωσης των ολιγοδενδροκυττάρων στα πρώιμα στάδια μετά τη γέννηση, φαίνεται ότι είναι μάλλον γενικός και ισχύει για την πλειονότητα των *Fras1*^{-/-} ποντικών (E-F).

viii) Στην Εξωτερική στιβάδα του φλοιού και του απιοειδούς λοβού, παρουσιάζονται αυξημένα νευρικά κύτταρα στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια

Από όλα τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψαν δυο ερωτήματα. Το ένα ερώτημα αφορά τη νευρογένεση και πιο συγκεκριμένα κατά πόσο ο αυξημένος αριθμός αστροκυττάρων θα μπορούσε να σημαίνει μειωμένο αριθμό νευρικών κυττάρων σε συγκεκριμένες περιοχές. Το δεύτερο ερώτημα, αφορά αποκλειστικά τα ιώδη GFAP-θετικά κύτταρα που παρατηρήσαμε στα πρώιμα στάδια μετά τη γέννηση. Καθώς τα αστροκύτταρα προκύπτουν αρχικά από τα ακτινωτά κύτταρα γλοίας (RGCs: Radial Glia Cells) που βρίσκονται στην κοιλιακή ζώνη, κατά την ανάπτυξη, το ερώτημα που τίθεται είναι αν αυτά τα ιώδη GFAP-θετικά κύτταρα που παρατηρήσαμε είναι ακτινωτά κύτταρα γλοίας και άρα κατά πόσο αυτό υποδεικνύει μια καθυστέρηση στη τελική διαφοροποίηση των αστροκυττάρων. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί και πάλι ότι ο εν λόγω φαινότυπος των αυξημένων ιωδών GFAP-θετικών κυττάρων εμφανίζεται τις πρώτες μέρες μετά τη γέννηση, ενώ στα ενήλικα στάδια παρατηρούνται αυξημένα, τελικώς διαφοροποιημένα αστροκύτταρα.

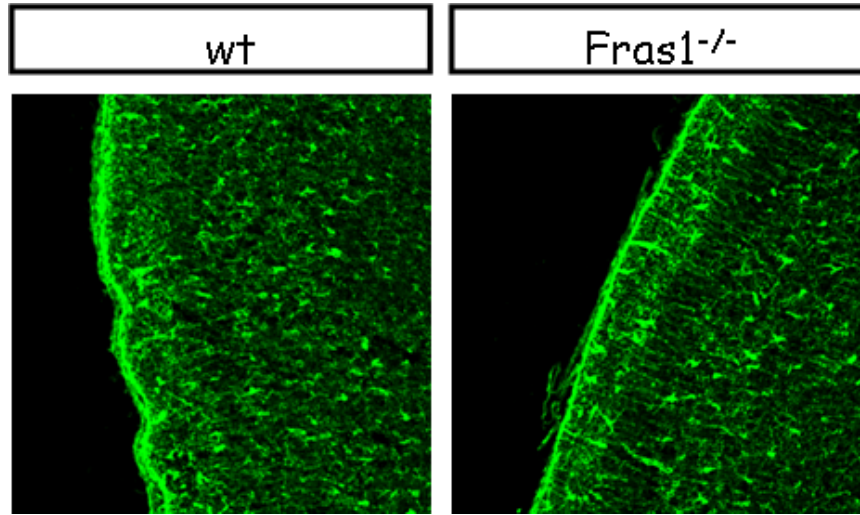
Για να εξετάσουμε το πρώτο ερώτημα, το αν δηλαδή η αύξηση των αστροκυττάρων σημαίνει ταυτόχρονα και τη μείωση των νευρικών κυττάρων, πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοφθορισμού σε κρυοτομές εγκεφάλων *Fras1*^{-/-} και αγρίου τύπου, χρησιμοποιώντας αντισώματα ενάντια σε πρωτεΐνες νευρικών κυττάρων, όπως το anti-neurofilament (αντίσωμα ενάντια σε πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων των νευρικών κυττάρων) και το anti-MAP (anti-Microtubule Associated Protein, ενάντια σε πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων). Όπως φαίνεται ενδεικτικά και στην Εικ. 51 στα πειράματα ανοσοφθορισμού με το anti-MAP, σε γενικές γραμμές δεν παρατηρήσαμε ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου εγκεφάλων στις περισσότερες περιοχές που εξετάστηκαν. Παρόλα αυτά, οι περιοχές εκείνες οι οποίες παρουσίασαν τη μεγαλύτερη διαφορά, ήταν η εξωτερικότερη στιβάδα του φλοιού και η μοριακή στιβάδα του απιοειδούς λοβού, όπου και στις δυο περιπτώσεις στα αγρίου τύπου ποντίκια δεν φαίνεται να υπάρχει εντοπισμός της MAP σε αντίθεση με τα *Fras1*^{-/-}. Ο παραπάνω φαινότυπος, η βιολογική σημασία του οποίου δεν έχει ακόμα ερευνηθεί,

φαίνεται να εμφανίζεται από την έβδομη μέρα μετά τη γέννηση και να διατηρείται και στα ενήλικα στάδια (τα αποτελέσματα αυτά δεν παρουσιάζονται).



Εικόνα 51. Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης MAP σε εγκεφάλους ποντικών *Fras1^{-/-}* και αγρίου τύπου, στην περιοχή του φλοιού και του απιοειδούς λοβού. Στα αγρίου τύπου ποντίκια παρατηρούμε ότι η MAP δεν εντοπίζεται στην εξωτερικότερη ζώνη του φλοιού (B) και στην μοριακή στιβάδα του απιοειδούς λοβού (D), όπως συμβαίνει στα μεταλλαγμένα ποντίκια (F, H).

Όσον αφορά το δεύτερο ερώτημα που αναφέρθηκε παραπάνω, το αν δηλαδή τα ινώδη GFAP-θετικά κύτταρα που εντοπίσαμε στα *Fras1^{-/-}* είναι ακτινωτά κύτταρα γλοίας που δεν έχουν διαφοροποιηθεί ακόμα σε αστροκύτταρα ή νευρικά κύτταρα, αυτό προσεγγίστηκε με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-BLBP (anti-Brain Lipid Binding Protein). Η πρωτεΐνη BLBP ανήκει σε μια οικογένεια πολύ καλά συντηρημένων, μικρών, κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών οι οποίες παράγονται κατά την ανάπτυξη από τα ακτινωτά κύτταρα γλοίας, μέσα από την ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch (Anthony TE, *et al.*, 2005). Όπως φαίνεται και στην Εικ. 52 ενδεικτικά από την περιοχή του απιοειδούς λοβού, δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων εγκεφάλων, στα πρώιμα στάδια μετά τη γέννηση (εδώ P1), ενώ το ίδιο φαίνεται να ισχύει και στον υπόλοιπο εγκέφαλο.

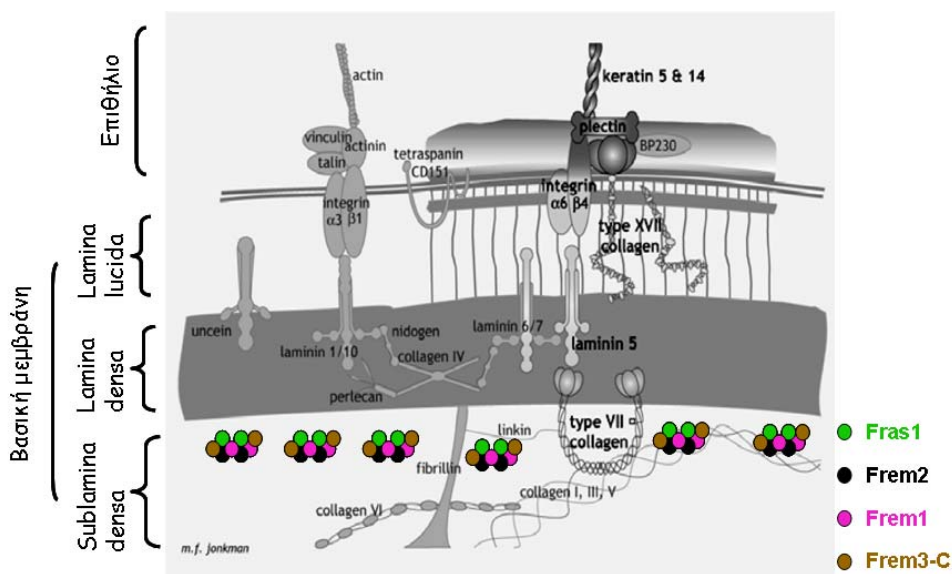


Εικόνα 52. Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης BLBP σε εγκεφάλους ποντικών *Fras1^{-/-}* και αγρίου τύπου, στην περιοχή του του απιοειδούς λοβού. Γενικά δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων ποντικών, στον εντοπισμό της BLBP, και άρα στον αριθμό των ακτινωτών κυττάρων γλοίας.

4. Συζήτηση

Στη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής, ολοκληρώθηκε η διαδικασία απενεργοποίησης του γονιδίου *Frem3* στον ποντικό με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού και ξεκίνησε η μελέτη του φαινοτύπου. Η πρωτεΐνη *Frem3* ανήκει στη οικογένεια των εξωκυττάρων πρωτεϊνών *Fras1/Frem* της βασικής μεμβράνης, η οποία περιλαμβάνει 3 ακόμα μέλη, τις *Fras1*, *Frem1* και *Frem2*. Όλες οι πρωτεΐνες, εκτός από την αλληλουχία οδηγό περιέχουν και μια περιοχή ομόλογη με αυτή των επαναλαμβανόμενων μοτίβων της NG2 πρωτεογλυκάνης θεϊκής χονδροϊτίνης και ένα έως πέντε μοτίβα πρόσδεσης ασβεστίου τύπου Calx-β. Οι *Fras1* και *Frem2*, οι οποίες έχουν ταυτιστεί με το σύνδρομο Fraser, περιέχουν μια διαμεμβρανική αλληλουχία στο καρβοξυτελικό τους άκρο, και επιπλέον η *Fras1* περιλαμβάνει δύο περιοχές με χαρακτηριστικά μοτίβα κυστεϊνών, ενώ η *Frem3* περιέχει μια περιοχή λεκτίνης τύπου C.

Οι πρωτεΐνες *Fras1/Frem* εντοπίζονται στη βασική μεμβράνη όλων των εμβρυϊκών επιθηλίων του ποντικού που έχουν μελετηθεί, από τα αναπτυξιακά στάδια E9.5 έως και E16.5. Σε πειράματα ανοσοεντοπισμού με τη χρήση και χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας βρέθηκε ότι όλες οι *Fras1/Frem* εντοπίζονται στην περιοχή της *sublamina densa* της βασικής μεμβράνης, όπου και διαδραματίζουν το ρόλο τους Εικ. 1.



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της βασικής μεμβράνης. Διακρίνονται το επιθήλιο και οι ζώνες lamina lucida, lamina densa, και sublamina densa, καθώς και η τοπολογία των διαφόρων συστατικών της βασικής μεμβράνης. Με βάση τις παρατηρήσεις από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, οι πρωτεΐνες *Fras1/Frem* βρίσκονται στο επίπεδο της sublamina densa.

Σε βιοχημικά περάματα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων δείχτηκε ότι οι Fras1, Frem1 και Frem2 σχηματίζουν ένα αλληλοσυνδεδεμένο πρωτεϊνικό σύμπλοκο στη sublamina densa της βασικής μεμβράνης. Η λειτουργικότητα αυτού του συμπλόκου επιβεβαιώνεται μέσα από τη μελέτη των αντίστοιχων μεταλλαγμάτων ποντικού, όπου απώλεια της μίας των πρωτεϊνών από τη βασική μεμβράνη, οδηγεί στην αποσταθεροποίηση του συμπλόκου και κατά συνέπεια στον μη εντοπισμό και των άλλων πρωτεϊνών της οικογένειας.

4.1 Μελέτη του προτύπου εντοπισμού της πρωτεΐνης Frem3

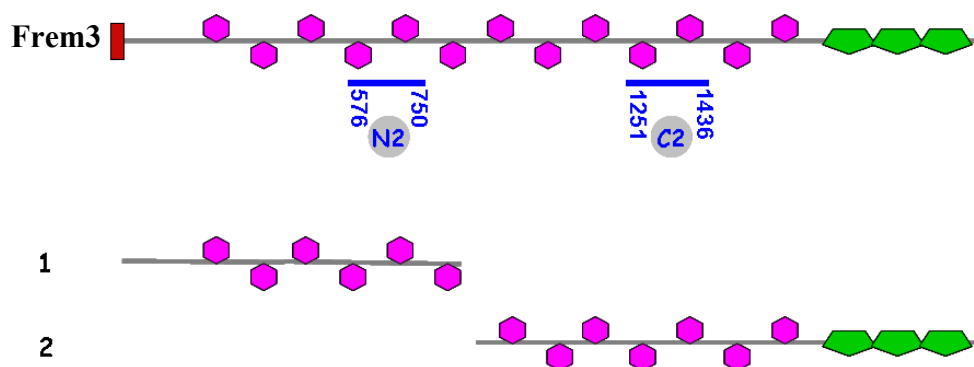
Το τέταρτο μέλος της οικογένειας των Fras1/Frem, η πρωτεΐνη Frem3 εντοπίζεται και αυτή όπως και οι άλλες στη sublamina densa της βασικής μεμβράνης. Πειράματα που έχουν γίνει με το αντίσωμα Frem3-C2 που αναγνωρίζει μια κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης (Εικ. 2), έδειξαν ότι το πρότυπο εντοπισμού της Frem3 δεν διαφέρει από αυτό των άλλων πρωτεϊνών της οικογένειας στη βασική μεμβράνη των εμβρυικών επιθηλίων. Παρόλα αυτά, με τη χρήση του αντισώματος Frem3-N2 το οποίο αναγνωρίζει μια περιοχή στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, παρατηρήθηκαν οι ακόλουθες διαφοροποιήσεις στον εντοπισμό της:

1) Με το αντίσωμα Frem3-N2, η Frem3 εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη *Fras1*^{-/-} μεταλλαγμάτων, ακόμα και όταν οι υπόλοιπες Fras1/Frem πρωτεΐνες απουσιάζουν. Χαρακτηριστικά ήταν τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας που πραγματοποιήθηκαν στην περιοχή της φυσαλίδας *Fras1*^{-/-} ποντικών, όπου σε αντίθεση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας, η Frem3, με το αντίσωμα Frem3-N2, φαίνεται να εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη που ακολουθεί το αποσχισμένο επιθήλιο.

2) Η Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2 εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη όλων των επιθηλίων σε όργανα ενηλίκων ποντικών, όταν οι άλλες Fras1/Frem απουσιάζουν. Πράγματι, παρόλο που η Frem3 συνεντοπίζεται με τις πρωτεΐνες Fras1, Frem1 και Frem2 σε ορισμένες περιοχές του δέρματος ενηλίκων, όπως αυτί, άκρα και ουρά, όπου κατά την ανάπτυξη υπάρχει αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ωστόσο σε οποιοδήποτε άλλο όργανο ή ιστό εξετάστηκε, εντοπίστηκε μόνο η Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2.

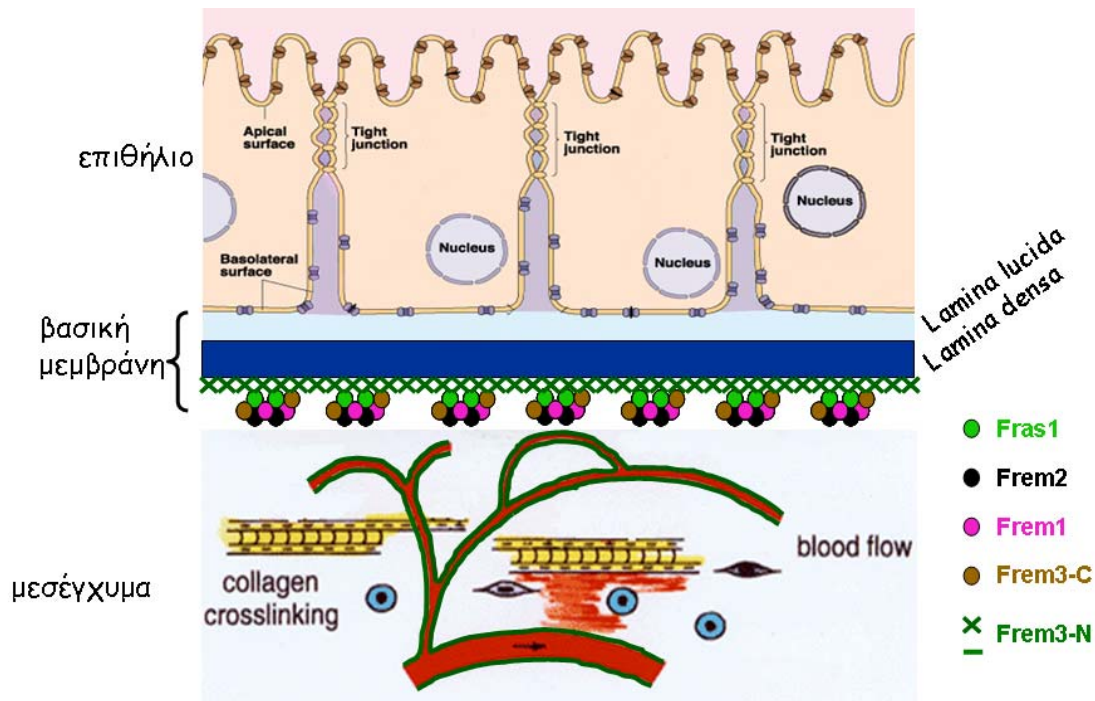
3) Η πρωτεΐνη Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2, είναι η μοναδική από τις πρωτεΐνες της οικογένειας που εντοπίζεται στα αιμοφόρα αγγεία. Επιπλέον, πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού με τα αντισώματα Frem3-N2, και PECAM, το οποίο αναγνωρίζει τη μεμβρανική πρωτεΐνη CD31 των ενδοθηλιακών κυττάρων, όχι μόνο επιβεβαίωσαν τον εντοπισμό της Frem3 στα αιμοφόρα αγγεία, αλλά παράλληλα έδειξαν ότι η χρώση της Frem3 περιβάλλει αυτήν της διαμεμβρανικής CD31 στον εξωκυττάριο χώρο. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η Frem3 πιθανόν να εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη των αιμοφόρων αγγείων. Μελλοντικά πειράματα με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης, θα βοηθήσουν στην ταυτοποίηση της ακριβούς θέσης της πρωτεΐνης Frem3 στον εξωκυττάριο χώρο των αγγείων. Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι η Frem3 πρωτεΐνη, τουλάχιστον σε ότι αφορά τον εντοπισμό της με το αντίσωμα Frem3-N2, έχει τη δυνατότητα να αγκυροβολεί στη βασική μεμβράνη ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες Fras1/Frem πρωτεΐνες.

Πέρα όμως από τις διαφοροποιήσεις που παρατηρήσαμε στον εντοπισμό της Frem3 με το αντίσωμα Frem3-N2, ο εκτενέστερος χαρακτηρισμός του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης με το αντίσωμα Frem3-C2 μας κατέδειξε δυο ακόμη διαφορές, τόσο σε σύγκριση με τις άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας, όσο και με την ίδια τη Frem3, όταν αυτή εντοπίζεται με το αντίσωμα Frem3-N2. Πιο συγκεκριμένα, πειράματα ανοσοιστοχημείας σε έμβρυα ποντικού με το αντίσωμα Frem3-C2, φανέρωσαν τον εντοπισμό της Frem3 σε περιφερικά νεύρα και κύτταρα του αίματος, όπου μέχρι τώρα δεν έχουν εντοπιστεί άλλες Fras1/Frem πρωτεΐνες, αλλά ούτε και η Frem3, με το αντίσωμα Frem3-N2. Από την ποικιλομορφία που παρουσιάζει το πρότυπο εντοπισμού της Frem3 με τα δυο διαφορετικά αντισώματα Frem3-N2 και Frem3-C2, προκύπτει η υπόθεση ότι πρωτεΐνη Frem3 υπάρχει σε τουλάχιστον 2 τμήματα, όπως φαίνονται και στην Εικ. 2



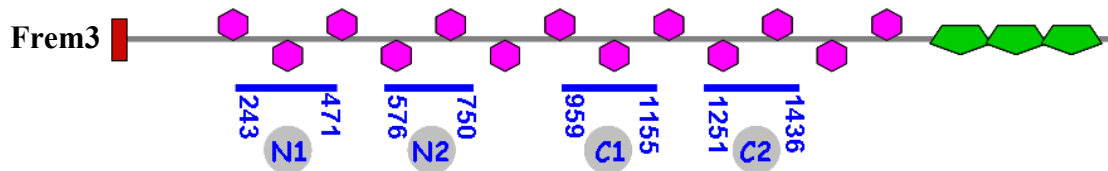
Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης Frem3 σε γραμμική μορφή. Διακρίνονται οι σχετικές θέσεις των πρωτεϊνικών τμημάτων για τα οποία παρήχθησαν τα αντίστοιχα αντισώματα Frem3-N2 και Frem3-C2.

Το ένα τμήμα, που αναγνωρίζεται από το αντίσωμα Frem3-C2, συμπεριφέρεται όπως οι άλλες Fras1/Frem πρωτεΐνες και αποτελεί μέρος του πρωτεϊνικού συμπλόκου που αυτές σχηματίζουν στο επίπεδο της βασικής μεμβράνης, ενώ επιπλέον εντοπίζεται και ανεξάρτητα, στα περιφερικά νεύρα και τα κύτταρα του αίματος. Το άλλο τμήμα που αναγνωρίζεται από το αμινοτελικό αντίσωμα Frem3-N2 μπορεί να προσδένεται στη βασική μεμβράνη ανεξάρτητα από την παρουσία των άλλων Fras1/Frem πρωτεϊνών (*Fras1*^{-/-} έμβρυα, ιστοί από ενήλικα ποντίκια, αιμοφόρα αγγεία). Επιπλέον, θα μπορούσε να γίνει και η υπόθεση ότι, το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης (Frem3-N), δημιουργεί ένα ικρίωμα πάνω στο οποίο στηρίζονται οι υπόλοιπες Fras1/Frem πρωτεΐνες και με αυτόν τον τρόπο συγκρατούνται στην βασική μεμβράνη. Έτσι σε *Fras1*^{-/-} ποντίκια, όπου απουσιάζει η πρωτεΐνη Fras1 το σύμπλοκο καταρρέει οπότε και δεν εντοπίζονται οι Frem1 και Frem2, ενώ ο εντοπισμός της Frem3-N δεν θα επηρεάζεται αφού θα βρίσκεται στην κορυφή του συμπλόκου. Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα, ο εντοπισμός των πρωτεϊνών Fras1/Frem στη βασική μεμβράνη συνοψίζεται στην Εικ.3



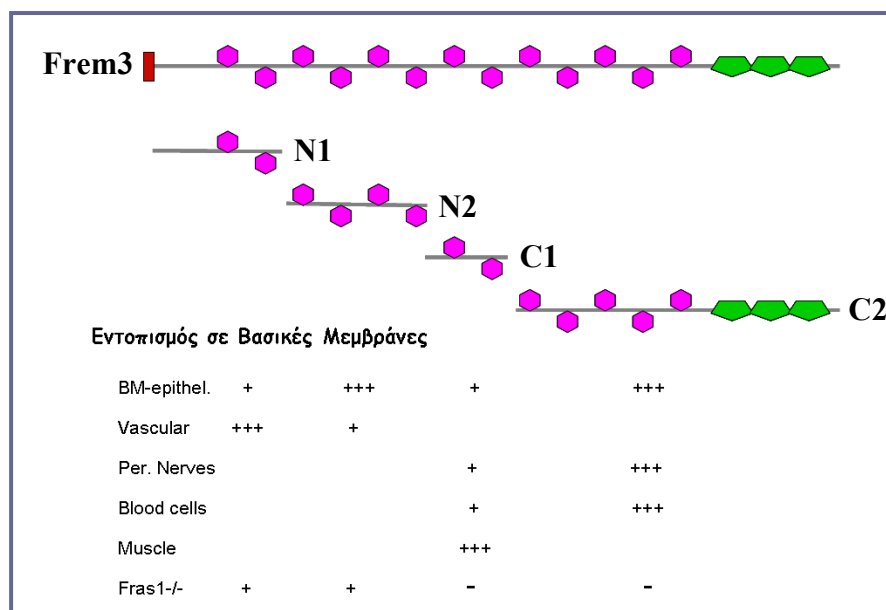
Εικόνα 3. Πρωτεϊνόμενη κατανομή των Fras1/Frem στον εξωκυττάριο χώρο των εμβρύων. Στην εικόνα διακρίνονται το επιθήλιο, η βασική μεμβράνη και ο υποκείμενος συνδετικός ιστός. Με βάση το πρότυπο εντοπισμού των πρωτεϊνών Fras1/Frem, φαίνεται η προτεινόμενη τοποθέτησή τους στον εξωκυττάριο χώρο, κάτω από τη βασική μεμβράνη.

Δεδομένου ότι δεν υπήρχαν ποντίκια στα οποία να έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο Frem3 και με στόχο την επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων, παρασκευάστηκαν δυο νέα αντισώματα (Frem3-N1 και Frem3-C1), για την πρωτεΐνη Frem3 σε περιοχές κοντά σε αυτές που αναγνωρίζουν τα ήδη υπάρχοντα αντισώματα Frem3-N2 και Frem3-C2 (Εικ. 4).



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης Frem3. Διακρίνονται οι σχετικές θέσεις των πρωτεϊνικών τμημάτων για τα οποία παρήχθησαν τα αντίστοιχα αντισώματα Frem3-N1/N2 και Frem3-C1/C2.

Με τη χρήση των νέων αντισωμάτων επιβεβαιώθηκαν τα προηγούμενα ευρήματα, με ελαφριές διαφοροποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, το αντίσωμα Frem3-N1 φαίνεται να έχει το ίδιο πρότυπο εντοπισμού με το αντίσωμα Frem3-N2, παρόλα αυτά ο εντοπισμός του στα αιμοφόρα αγγεία δίνει εντονότερη χρώση από ότι στη βασική μεμβράνη των επιθηλίων. Αντίστοιχα, το αντίσωμα Frem3-C1 παρουσιάζει την ίδια συμπεριφορά με το αντίσωμα Frem3-C2, όμως η χρώση του στα περιφερικά νεύρα και στα κύτταρα του αίματος είναι λιγότερο έντονη, ενώ επιπλέον εντοπίζεται και στους μύες. Με βάση τα τελευταία δεδομένα, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η πρωτεΐνη Frem3, διασπάται σε τουλάχιστον 4 τμήματα. Συνοπτικά όλα τα παραπάνω, παρουσιάζονται στην Εικ. 5.



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης Frem3 και των προτεινόμενων επιμέρους τμημάτων της. Ακόμα, στον πίνακα σημειώνονται οι διαφορές στον εντοπισμό της πρωτεΐνης με κάθε αντίσωμα. Με + συμβολίζεται η σχετική ένταση της χρώσης σε διάφορες δομές.

4.2 Απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3* ποντικό

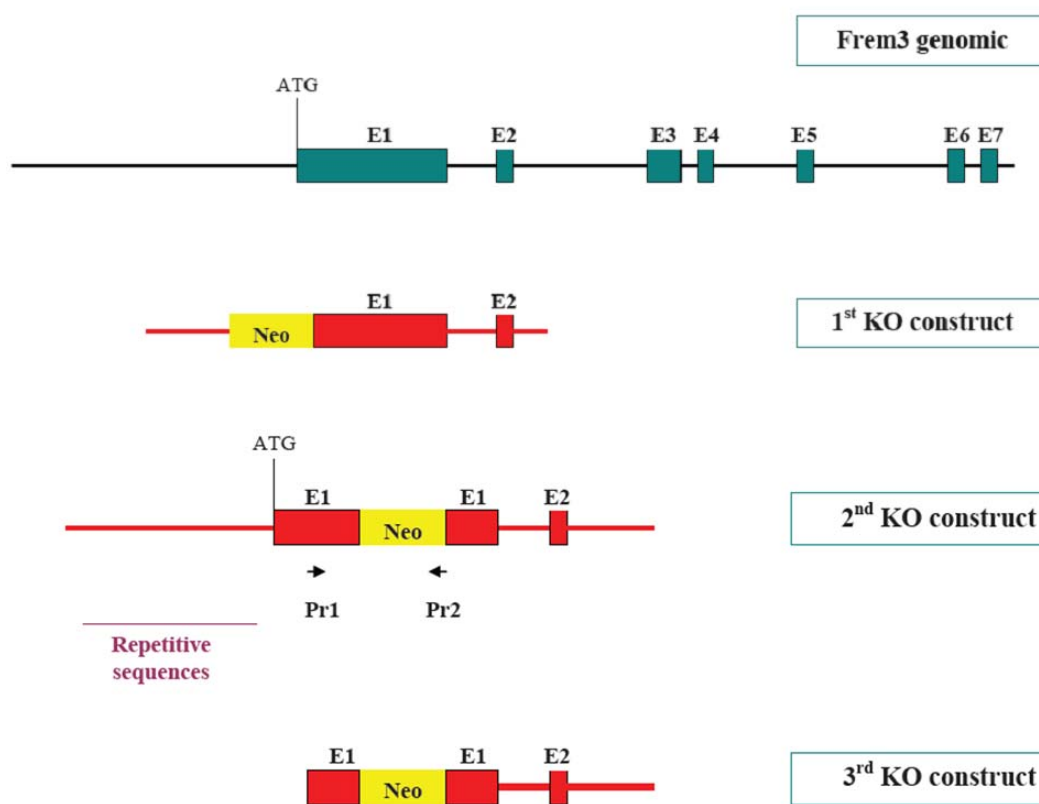
Το γεγονός ότι η *Frem3* μπορεί να συμπεριφέρεται και όπως οι υπόλοιπες *Fras1/Frem* αλλά και διαφορετικά, όπως φαίνεται συνοπτικά και στην Εικ. 6, καθώς και το γεγονός ότι ήταν η μόνη από τις *Fras1/Frem* για την έλλειψη της οποίας δεν υπήρχε μοντέλο στον ποντικό, αποτέλεσαν το έναυσμα για να προχωρήσουμε στην απενεργοποίηση του αντίστοιχου γονιδίου.

	embryo epithelium	embryo peripher. nerves	embryo blood cells	vascular	adults epithelium	<i>Fras1</i> ^{-/-}
<i>Fras1</i>	+					
<i>Frem2</i>	+					
<i>Frem1</i>	+					
<i>Frem3-N</i>	+			+	+	+
<i>Frem3-C</i>	+	+	+			

Εικόνα 6. Συγκεντρωτικός πίνακας του προτύπου εντοπισμού των πρωτεϊνών *Fras1/Frem* σε διάφορους ιστούς.

Για την απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3*, η οποία έγινε με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού, απαιτήθηκε η δημιουργία τριών κατασκευών-στόχων από τις οποίες η τελευταία ήταν και αυτή που έδωσε επιτυχή ομόλογο ανασυνδυασμό. Μεταξύ των κατασκευών, πραγματοποιήθηκαν ορισμένες βελτιώσεις με σκοπό να αυξηθούν τα ποσοστά επιτυχίας. Πιο συγκεκριμένα, στη δεύτερη κατασκευή, συμπεριλήφθησαν μεγαλύτερα τμήματα ομόλογων αλληλουχιών, εκατέρωθεν της κασέτας νεομυκίνης, κάτι το οποίο πιστεύεται ότι αυξάνει τα ποσοστά επιτυχούς ομόλογου ανασυνδυασμού. Παρόλα αυτά στη συγκεκριμένη περίπτωση συμπεριλήφθησαν και μεγάλες περιοχές αποτελούμενες από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, κάτι το οποίο ενδέχεται να έχει το αντίθετο αποτέλεσμα. Για το λόγο

αυτό, στην τρίτη κατασκευή αφαιρέθηκαν οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, μετακινώντας την κατασκευή μέσα στην κωδική περιοχή.



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση των 3 διαφορετικών κατασκευών-στόχων που δημιουργήθηκαν για την απενεργοποίηση του *Frem3* στον ποντικό.

4.3 Μελέτη του φαινοτύπου των *Frem3*^{+/-} ποντικών

Από την απενεργοποίηση του γονιδίου, προέκυψαν μεταλλαγμένα ποντίκια από δυο διαφορετικούς ES κλώνους. Ο φαινότυπος μελετάται στα *Frem3*^{+/-} ποντίκια, καθώς οι διασταυρώσεις μεταξύ ετερόζυγων ατόμων για το τροποποιημένο αλληλόμορφο του γονιδίου *Frem3*, παράγουν μόνο αγρίου τύπου και ετερόζυγους απογόνους. Το παραπάνω φανερώνει την εμβρυϊκή θνησιμότητα των *Frem3*^{-/-}, κάτι το οποίο φαίνεται και από πειράματα ανοσοϊστοχημείας, εμβρύων από διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Συγκεκριμένα, από την εμβρυϊκή μέρα 5.5 (E5.5) και έπειτα, δεν εντοπίζονται ομόζυγα μεταλλάγματα, υποδηλώνοντας ότι τα *Frem3*^{-/-} πεθαίνουν κατά την εμφύτευση ή ακόμα και σε κάποιο προ-εμφυτευτικό στάδιο.

Ένα 5% περίπου των νεογέννητων ετερόζυγων ποντικών παρουσιάζουν ποικιλόμορφα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως νανισμό, καχεξία και πρόωρη θνησιμότητα, τις πρώτες μέρες μετά τη γέννηση. Μεταξύ αυτών που πεθαίνουν είναι μερικά τα οποία εμφανίζουν συμπτώματα ιχθύωσης (Okulicz JF and Schwartz RA, 2003). Η ιχθύωση είναι μια ασθένεια κύριο χαρακτηριστικό της οποίας είναι η εμφάνιση ξηρού και λεπιδώδους δέρματος. Τα *Frem3^{+/-}* που εμφανίζουν το εν λόγω φαινοτυπικό χαρακτηριστικό, παρουσιάζουν λέπια σε όλο τους το σώμα, στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι πιο μικρόσωμα από τα φυσιολογικά και πεθαίνουν μέσα στις πρώτες 15 ημέρες μετά τη γέννηση. Παρόμοια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά καχεξίας και νανισμού, έχουν περιγραφεί και σε άλλες περιπτώσεις όπως για παράδειγμα, για ποντίκια στα οποία έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο της μεταλλοπρωτεϊνάσης 14 (MMP-14), όπου όμως τα ομόζυγα μεταλλάγματα παρουσιάζουν νανισμό, σε αντίθεση με τη δική μας περίπτωση (Somerville *et al.*, 2003).

Δερματικά προβλήματα, εμφανίζει όμως και ένα ποσοστό (περίπου 20%) ενήλικων ετερόζυγων ατόμων. Τα ποντίκια αυτά εμφανίζουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά δερματίτιδας ή αλωπεκίας. Στην πρώτη περίπτωση, που παρατηρείται μέχρι τώρα σε ποντίκια ηλικίας μεγαλύτερης των 4 μηνών, εμφανίζεται αρχικά απώλεια τριχώματος στη ραχιαία μεριά του δέρματος, και στη συνέχεια παρουσιάζεται φλεγμονή η οποία εξελίσσεται σταδιακά. Στην περιοχή της φλεγμονής το δέρμα ξεκινάει να διαχωρίζεται, μέχρι την πλήρη αποκόλλησή του λίγες μέρες αργότερα. Η δερματίτιδα γενικά ως όρος περιλαμβάνει όλες τις περιπτώσεις εμφάνισης οιδήματος στην επιδερμίδα. Η ατοπική δερματίτιδα (atopic dermatitis), κατά την οποία εμφανίζεται κνησμώδες εξάνθημα αγνώστου αιτιολογίας, φαίνεται να περιγράφει καλύτερα την περίπτωση των *Frem3^{+/-}* ποντικών. Σε αυτή την περίπτωση, η βλάβη πιστεύεται ότι έχει να κάνει με κατάρρευση, για άγνωστους μέχρι σήμερα λόγους, του φραγμού που δημιουργεί το δέρμα με το εξωτερικό περιβάλλον, την εμφάνιση κνησμού, την επακόλουθη όξυνση της ερεθισμένης περιοχής έπειτα από μηχανικές πιέσεις και τέλος την είσοδο αντιγόνων μέσα από το κατεστραμμένο δέρμα και την εμφάνιση οιδήματος (Bonness S and Bieber T, 2007).

Ένα μεγαλύτερο ποσοστό των ετερόζυγων ενήλικων ποντικών με δερματικά προβλήματα, εμφανίζουν ήδη από την ηλικία των 2 μηνών αραιό τρίχωμα ή ακόμα και πλήρη απώλεια τριχώματος σε ορισμένες περιοχές, χωρίς όμως να παρουσιάζεται οίδημα. Το συγκεκριμένο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό ομοιάζει με τη γυρεοειδή

αλωπεκία η οποία χαρακτηρίζεται ως μη ουλωτική απώλεια τριχών. Παρόλο που η ακριβής παθογένεια της συγκεκριμένης νόσου δεν είναι γνωστή, ωστόσο πιστεύεται ότι πρόκειται για αυτοάνοσο νόσημα καθώς ιστολογικά έχουν βρεθεί μονοπύρνα κύτταρα να διηθούν τα τριχοθηλάκια (Gilhar A and Kalish RS 2006, Kos L and Conlon J 2009).

Πέρα όμως από τα δερματικά προβλήματα που παρουσιάζουν τα ετερόζυγα *Frem3* ποντίκια, ένα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό το οποίο παρουσιάζεται σε περίπου 90% των ζώων και το οποίο έγινε εμφανές από τους 3-4 πρώτους μήνες της ζωής τους, είναι αυτό της στειρότητας των αρσενικών. Η ανατομική μελέτη των στείρων αρσενικών ποντικών, φανέρωσε την εμφάνιση μονόπλευρης ή αμφίπλευρης κρυσορχίας σε ένα μικρό ποσοστό των ζώων. Η κρυσορχία, μπορεί εν μέρει να εξηγήσει το πρόβλημα της στειρότητας, καθώς όταν οι όρχεις δεν έχουν κατέβει στο όσχεο από την κοιλιακή χώρα, κατά την ανάπτυξη, τότε η σπερματογένεση ζημιώνεται λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που υπάρχει στο εσωτερικό του σώματος. Ωστόσο, παραμένει το ερώτημα, γιατί κάποια *Frem3*^{+/-} ποντίκια είναι στείρα χωρίς να έχουν κρυσορχία. Για να απαντηθεί το παραπάνω ερώτημα, πραγματοποιήθηκαν ιστοχημικές μελέτες με Cresyl violet και ανοσοϊστοχημικά πειράματα με τα αντισώματα Frem3-N2 και laminin-β1 σε επιμέρους τμήματα του γεννητικού συστήματος των αρσενικών ποντικών. Από την ανάλυση που έγινε, παρατηρήθηκαν τα ακόλουθα:

1) Αποδιοργάνωση του επιθήλιου των σωληναρίων των όρχεων.

Σε ορισμένες περιπτώσεις ήταν εμφανής ο εκφυλισμός των σωληναρίων στο μεγαλύτερο μέρος του όρχι, με τα σπερματοκύτταρα να συσσωρεύονται στο κέντρο του αυλού, το επιθήλιο να είναι εκφυλισμένο και τελικά το σωληνάριο να αποτελείται από ένα λεπτό και αποδιοργανωμένο στρώμα πιθανώς στηρικτικών κυττάρων Sertoli. Το αποδιοργανωμένο επιθήλιο περιβάλλεται από βασική μεμβράνη η οποία φαίνεται πιο παχιά ενώ παρουσιάζει και ελικοειδής πτυχές. Ο εκφυλισμός των σπερματικών σωληναρίων (seminiferous tubule degeneration), αποτελεί συχνή αιτία στειρότητας σε άτομα τα οποία πάσχουν από κρυσορχία, ενώ εμφανίζεται συχνά και σε ηλικιωμένα άτομα, ως απόρροια της διαδικασίας της γήρανσης, χωρίς να έχει καθοριστεί ο ακριβής μηχανισμός (Amat P *et al.*, 1985). Παρόλα αυτά, στην περίπτωση των *Frem3*^{+/-} ποντικών δεν τίθεται θέμα γήρανσης, καθώς ο εκφυλισμός έχει παρατηρηθεί ακόμα και σε στείρα ποντίκια ηλικίας 6 μηνών. Αρκετές μελέτες συσχετίζουν τον

εκφυλισμό των σπερματικών σωληναρίων με την πάχυνση της βασικής μεμβράνης, υποθέτοντας ότι δυσχεραίνει την επικοινωνία μεταξύ επιθηλίου και μεσεγχύματος. Παρόλα αυτά δεν έχει βρεθεί ο λόγος για τον οποίο η βασική μεμβράνη αυξάνει σε μέγεθος, καθώς σε μελέτες ορισμένων από τα επιμέρους συστατικά της (π.χ. laminin-α, laminin-β1, laminin-β2, collagen IV, fibronectin) δεν παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης (Virtanen I *et al.*, 1997).

2) Έλλειψη ώριμων σπερματοζωαρίων στον πόρο της επιδιδυμίδας.

Το φαινόμενο της έλλειψης ωριμών σπερματοζωαρίων στον πόρο της επιδιδυμίδας, μπορεί εν μέρει να εξηγήσει το φαινοτυπικό χαρακτηριστικό της στειρότητας, καθώς τα σπερματοζωάρια για να ωριμάσουν, απαιτείται η μετακίνησή τους μέσα στον πόρο όπου εμποτίζονται από το πλούσιο σε συστατικά, επιδιδυμικό υγρό που εκκρίνουν τα επιθηλιακά κύτταρα.

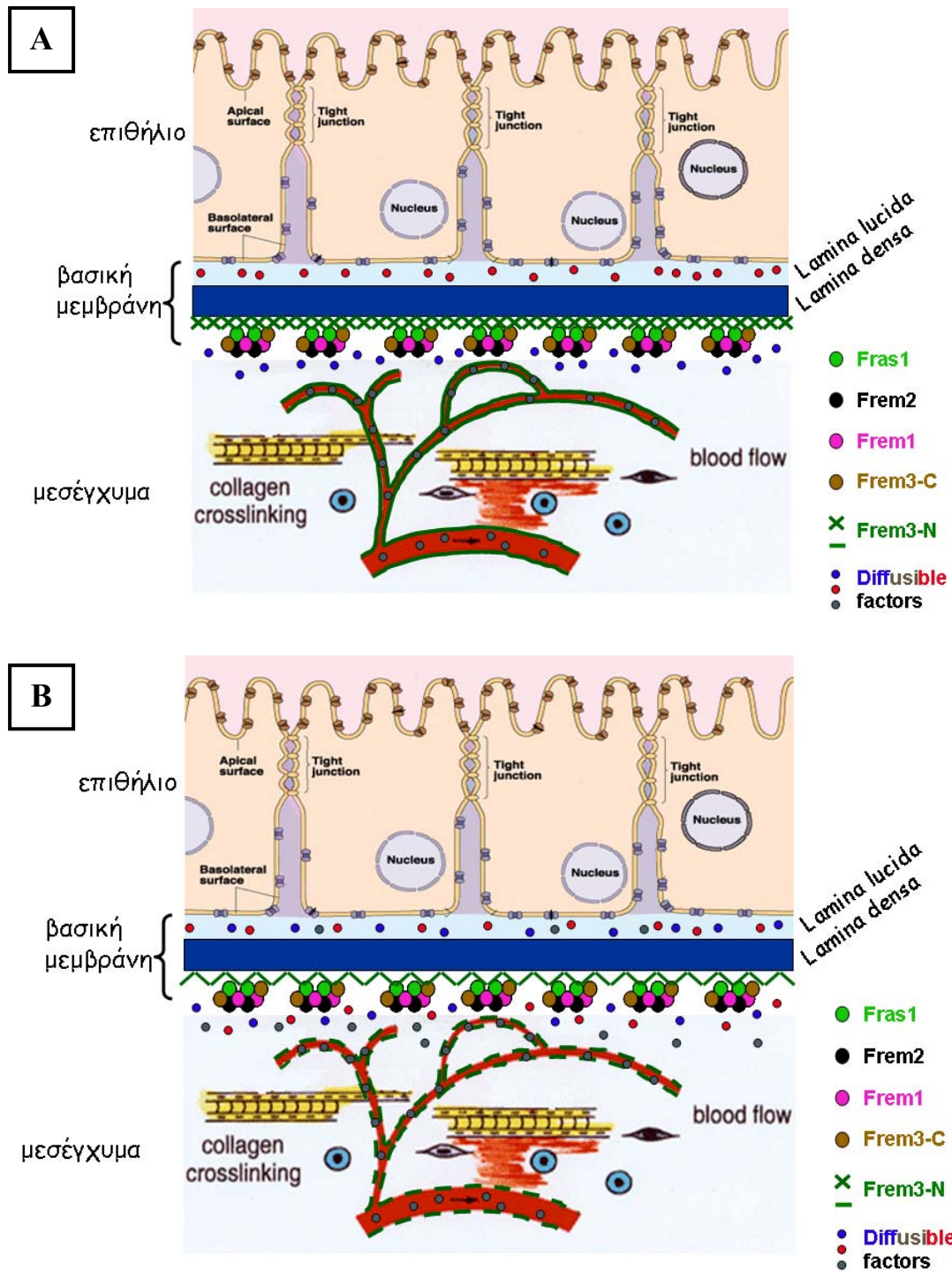
3) Εμφάνιση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος μέσα στο συνδετικό ιστό και συσσώρευση σπερματοζωαρίων έξω από τον πόρο της επιδιδυμίδας σε περιοχές που περιβάλλονται από μη ταυτοποιημένους, μέχρι τώρα, κυτταρικούς τύπους.

Σε κάποια τμήματα της επιδιδυμίδας παρατηρήθηκαν κοκκιώδη κύτταρα του ανοσοποιητικού και μέσα στον αυλό του πόρου, γεγονός που σημαίνει ότι το επιθήλιο έχει διαταραχτεί σε τέτοιο βαθμό ώστε να επιτρέπεται περισσότερο ανεξέλεγκτα η διέλευση μορίων και κυττάρων μέσα και έξω από τον πόρο. Φυσιολογικά, η ύπαρξη του “αιματο-επιδιδυμικού” φραγμού, ο οποίος δημιουργείται από τις στενές συνδέσεις των βασικών κυττάρων (principal cells) του επιθηλίου της επιδιδυμίδας, δεν επιτρέπει τη διέλευση ουσιών ή κυττάρων, μέσα και έξω από τον πόρο, δημιουργώντας έτσι ένα περιβάλλον προστατευμένο από επιθέσεις του ανοσοποιητικού, στο οποίο μπορούν να ωριμάσουν ανενόχλητα τα σπερματοζωάρια (Cornwall GA, 2009). Η παρουσία κυττάρων του ανοσοποιητικού στον συνδετικό ιστό αποτελεί ένδειξη φλεγμονής, η πρόκληση της οποίας θα μπορούσε να εξηγηθεί ενδεχομένως από φαινόμενα αυτοανοσίας, εάν τα σπερματοζωάρια διαφύγουν από τον πόρο της επιδιδυμίδας, ή αν κύτταρα του ανοσοποιητικού εισχωρήσουν μέσα στον πόρο, λόγω της διαταραγμένης συνοχής του επιθηλίου-μεσεγχύματος.

Η διατάραξη της συνοχής μεταξύ επιθηλίου και συνδετικού ιστού, φαινόμενο το οποίο εμφανίζεται κατά πάσα πιθανότητα και στα ποντίκια που παρουσιάζουν

δερματικά προβλήματα, θα μπορούσε να εξηγηθεί από την ελαττωμένη ποσότητα της Frem3 πρωτεΐνης στα *Frem3^{+/-}* ποντίκια, η οποία με αυτό τον τρόπο καθιστά τη βασική μεμβράνη πιο διαπερατή. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το τμήμα της πρωτεΐνης που αναγνωρίζεται από τα αμινοτελικά αντισώματα Frem3-N1 και Frem3-N2, αγκυροβολεί ανεξάρτητα από τις άλλες Fras1/Frem στη βασική μεμβράνη, ενδεχομένως δημιουργώντας ένα ικρίωμα πάνω στο οποίο στηρίζονται οι υπόλοιπες και με αυτόν τον τρόπο συγκρατούνται στην βασική μεμβράνη. Παράλληλα όμως το τμήμα αυτό της Frem3 βρίσκεται και στην επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων. Η ταυτόχρονη μείωση της ποσότητάς της στα *Frem3^{+/-}* ποντίκια, από τη βασική μεμβράνη του επιθηλίου αλλά και από τη βασική μεμβράνη των αγγείων, θα μπορούσε να έχει διπλή δράση, πρώτον διευκολύνοντας την εξαγγείωση διαφόρων παραγόντων που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος και δεύτερον, επιτρέποντάς τους την ευκολότερη διάχυση όχι μόνο στον εξωκυττάριο χώρο, αλλά και διαμέσου της πιο διαπερατής πια βασικής μεμβράνης να προσεγγίσουν το επιθήλιο και να ασκήσουν τη δράση τους (Εικ. 8).

Γενικά, η διείσδυση υπό φυσιολογικές συνθήκες ενός εξωκυττάριου χώρου από διάφορες ουσίες, είναι μια ελεγχόμενη διαδικασία η οποία ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες. Η διαδικασία αυτή συχνά επιτυγχάνεται από τη δράση κατάλληλων πρωτεασών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ρυθμιζόμενη ενεργοποίηση και δράση. Οι μεταλλοπρωτεάσες μήτρας (MMPs: Matrix Metalloproteases) για παράδειγμα, περιλαμβάνουν μια οικογένεια 20 ενζύμων, που δυνητικά είναι ικανά να προτεωλύουν όλα τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, παρουσιάζοντας όμως το κάθε ένα εξειδίκευση υποστρώματος. Η δράση των μεταλλοπρωτεασών δεν αφορά μόνο τη διάσπαση εξωκυττάριας πρωτεϊνικών παραγόντων, αλλά και την απελευθέρωση και ταυτόχρονη ενεργοποίηση διαμεμβρανικών μορίων ή μορίων συνδεδεμένων με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας (π.χ. αυξητικών παραγόντων), συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στη διαθεσιμότητά τους και σε πιο απομακρυσμένους ιστούς. Οι μεταλλοπρωτεάσες για παράδειγμα, έχουν τη δυνατότητα να απενεργοποιούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς, αποκόποντάς τους από την πλασματική μεμβράνη. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται αναστολή της μετάδοσης σήματος στο εσωτερικό των κυττάρων και απενεργοποίηση των αντίστοιχων ενδοκυτταρικών μονοπατιών (Parks C *et al.*, 2004, McCaw AP *et al.*, 2007).



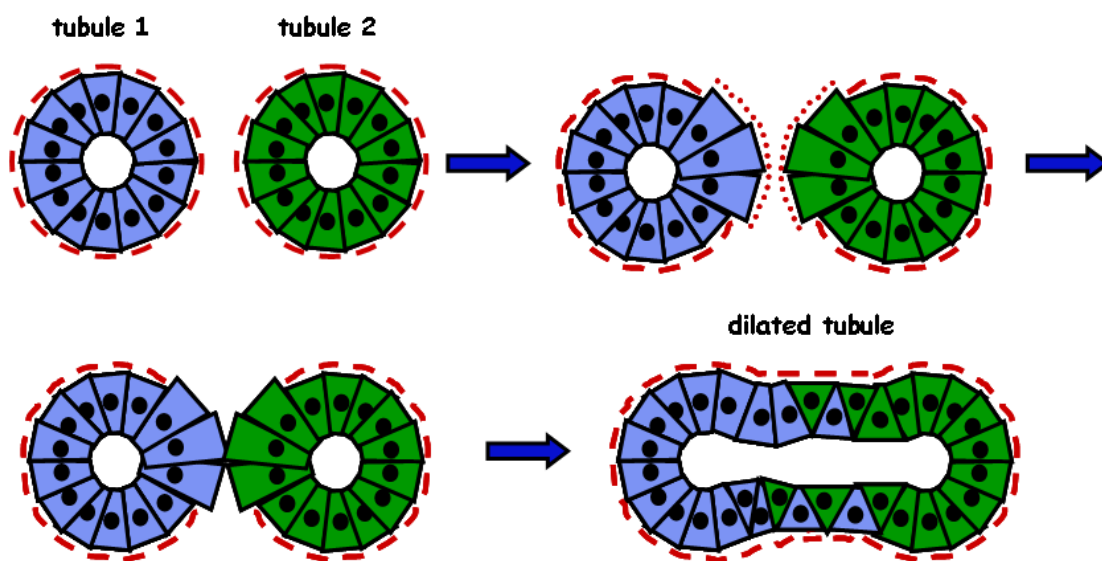
Εικόνα 8. Προτεινόμενη κατανομή των πρωτεϊνών Fras1/Frem στον εξωκυττάριο χώρο εμβρύων. (A) Η τοποθέτηση των πρωτεϊνών Fras1/Frem στον εξωκυττάριο χώρο, προτείνεται με βάση το πρότυπο εντοπισμού τους. Το τμήμα της πρωτεΐνης Frem3 που εντοπίζεται με τα αντισώματα Frem3-N1, Frem3-N2, τοποθετείται ακριβώς κάτω από τη lamina densa και πάνω στην επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων. Τα αγγεία που βρίσκονται μέσα στο συνδετικό ιστό συναντούν το φράγμα που δημιουργεί η βασική μεμβράνη με αποτέλεσμα να μην φτάνουν μέχρι το επιθήλιο. Η διάχυση διαφόρων παραγόντων που κυκλοφορούν στο αίμα και στον εξωκυττάριο χώρο, ρυθμίζεται και περιορίζεται από τη βασική μεμβράνη που λειτουργεί σαν φίλτρο. **(B)** Στην περίπτωση των *Frem3^{-/-}* ποντικών, όπου η ποσότητα της παραγόμενης Frem3 πρωτεΐνης είναι μειωμένη, η συνοχή της βασικής μεμβράνης διαταράσσεται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαπερατότητά της και να επιτρέπεται η πιο ανεξέλεγκτη διέλευση παραγόντων.

4) Εκφυλισμός του επιθηλίου του πόρου, καθώς και η αυξημένη διάμετρος στο μεγαλύτερο μήκος του, με ταυτόχρονη αύξηση και του συνδετικού ιστού της επιδιδυμίδας.

Ο πόρος της επιδιδυμίδας είναι ένας λεπτός μυώδης σωλήνας το πάχος του οποίου αυξάνεται προχωρώντας από την κεφαλή προς την ουρά. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε μια οποιαδήποτε διατομή της επιδιδυμίδας, τα τμήματα του πόρου φαίνονται συμμετρικά τόσο σε σχήμα όσο και σε μέγεθος. Παρόλα αυτά, σε πειράματα ιστοχημείας με Cresyl violet παρατηρήσαμε στα *Frem3^{+/-}*, να υπάρχει ένα μεγάλο τμήμα του πόρου και δίπλα σε πολύ στενή επαφή να βρίσκονται 2-3 αρκετά μικρότερα σωληνάκια ή να υπάρχουν δυο τμήματα του πόρου τα οποία φαίνονται σαν ξεχωριστά επιθήλια και τα οποία όμως περιβάλλονται από ένα κοινό στρώμα λείων μυϊκών ινών. Πραγματοποιώντας πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε σειριακές τομές από επιδιδυμίδα, παρατηρήσαμε ότι σε κάποια σημεία τα μικρότερα σωληνάκια ενώνονται δημιουργώντας ένα μεγάλο σωληνάριο, η διάμετρος του οποίου είναι αρκετά μεγαλύτερη σε σύγκριση με τον πόρο της επιδιδυμίδας φυσιολογικών ποντικών. Οι παραπάνω παρατηρήσεις, μας οδηγούν στην υπόθεση πως ίσως πρόκειται για σύντηξη τμημάτων του πόρου της επιδιδυμίδας. Οι αλλοιώσεις στη συνοχή της βασικής μεμβράνης, λόγω της μικρότερης ποσότητας *Frem3* στα ετερόζυγα άτομα και η ελεύθερη διακίνηση παραγόντων από τον εξωκυττάριο χώρο προς το επιθήλιο, θα μπορούσε να οδηγεί σε αναδιοργάνωση του επιθηλίου και τελικά σε επιθηλιακή σύντηξη (Εικ. 10).

Η σύμφυση μεταξύ συγκεκριμένων τμημάτων επιθηλιακών επιφανειών, είναι ένα συχνό γεγονός κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αυτός ο σημαντικός μορφογενετικός μηχανισμός, που ονομάζεται επιθηλιακή σύντηξη (*epithelial fusion*), έχει ως αποτέλεσμα την παροδική ή μόνιμη σύζευξη μεταξύ δομών οι οποίες αρχικά ήταν ξεχωριστές. Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για την αρχική σύμφυση των επιφανειών που έρχονται σε επαφή, καθώς και οι τροποποιήσεις στην κυτταρική μορφολογία ή στον κυτταρικό μεταβολισμό, έχουν μελετηθεί κατά την ανάπτυξη ανώτερων σπονδυλωτών, σε δομές όπως η υπερώα (*palate*), ο νευρικός σωλήνας και η καρδιά. Στην ουσία, όλες οι περιπτώσεις επιθηλιακής σύντηξης στο έμβρυο απαιτούν τη άσκηση κάποιων δυνάμεων που θα φέρουν σε επαφή τα δύο επιθήλια καθώς και έναν μηχανισμό που θα τα ενώσει και θα τα διατηρήσει ενωμένα. Είναι πιθανόν, η ακριβής στρατηγική της αρχικής επαφής των επιφανειών να διαφέρει από περίπτωση σε περίπτωση, όμως πιστεύεται ότι ο μηχανισμός της σύντηξης είναι συντηρημένος. Γενικά, πιθανοί μηχανισμοί που φέρνουν σε επαφή δυο επιθήλια

μπορεί να είναι: μυϊκή σύσπαση, υδροστατικές δυνάμεις, αναδιοργάνωση του μεσεγχύματος-βασικής μεμβράνης και αναδιοργάνωση του επιθηλίου. Σε μοριακό επίπεδο, από μελέτες που έχουν γίνει στη *Drosophila* και στον *C.elegans*, στην ανάπτυξη, κατά τη διαδικασία της ραχιαίας και κοιλιακής περιφραξης αντίστοιχα, φαίνεται ότι παράγοντες της οικογένειας TGF (Transforming Growth Fractor) παίζουν σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση του καθορισμού των αρχικών κυττάρων που θα συμμετάσχουν στη διαδικασία της επιθηλιακής σύντηξης, ενώ η σηματοδότηση μέσω JNK (c-Jun amino-terminal kinase) συμβάλλει στην κινητικότητα της δομής, αναγκάζοντας τα πιο πίσω κύτταρα είτε να τανύονται παθητικά, είτε να επιμηκύνονται ενεργητικά. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι, στη δική μας περίπτωση η σύντηξη γίνεται από τη μεριά της βασικής μεμβράνης και όχι από τη μεριά του επιθηλίου, ενώ δεν υπάρχουν άλλα γνωστά παραδείγματα που να περιγράφουν κάτι παρόμοιο (Jacinto A *et al.*, 2001, Martin P *et al.*, 2002).



Εικόνα 10. Προτεινόμενο μοντέλο του φαινομένου της επιθηλιακής σύντηξης μεταξύ σωληναρίων, από τη μεριά της βασικής μεμβράνης. Το παραπάνω μοντέλο θα μπορούσε να εξηγήσει την αυξημένη διάμετρο του πόρου της επιδιδυμίδας στα *Frem3^{+/-}* ποντίκια. Αρχικά, ξεκινάει η αναδιοργάνωση των επιθηλίων λόγω διαταραχών στη βασική μεμβράνη. Τα δύο επιθήλια στη συνέχεια πλησιάζουν το ένα το άλλο και τελικά συντήκονται δημιουργώντας ένα μεγαλύτερο επιθήλιο

4.4 Μελλοντικά πειράματα

Η υπόθεση ότι η πρωτεΐνη Frem3 υπάρχει σε τουλάχιστον 4 τμήματα, στηρίζεται σε παρατηρήσεις που αφορούν το διαφορετικό πρότυπο εντοπισμού της με 4 διαφορετικά αντισώματα, Frem3-N1, Frem3-N2, Frem3-C1 και Frem3-C2. Για να εξακριβωθεί αν ισχύει η παραπάνω παρατήρηση, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν πειράματα Western blot, με τη χρήση όλων των αντισωμάτων. Έχοντας αποδείξει την ύπαρξη της πρωτεΐνης σε διαφορετικά αυτόνομα τμήματα, ένα επόμενο ερώτημα που πρέπει να απαντηθεί αφορά τον τρόπο με τον οποίο προκύπτουν. Η πιθανότητα να προκύπτουν ως προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του *Frem3* mRNA, είναι μάλλον μικρή, καθώς η γενωμική οργάνωση του γονιδίου περιλαμβάνει ένα μεγάλο εξόνιο 5000 περίπου νουκελοτιδίων, το οποίο κωδικοποιεί τις περιοχές της πρωτεΐνης που εντοπίζονται και τα 4 διαφορετικά αντισώματα.

Έχοντας επιβεβαιώσει πλέον την ύπαρξη της Frem3 στον περιβάλλοντα χώρο των αιμοφόρων αγγείων, των περιφερικών νεύρων και των κυττάρων του αίματος, ένα ακόλουθο πείραμα περιλαμβάνει την πραγματοποίηση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης, ώστε να εξακριβωθεί η ακριβής θέση της πρωτεΐνης σε αυτά.

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί τόσο η συμμετοχή της Frem3 στο σύμπλοκο των υπολοίπων Fras1/Frem πρωτεϊνών, όσο και η πιθανότητα το αμινοτελικό της τμήμα να αποτελεί το ικρίωμα πάνω στο οποίο στηρίζονται οι άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν πειράματα συν-κατακρήμνισης. Παράλληλα, πειράματα με τη μέθοδο του διπλού υβριδίου, θα αναδείξουν και άλλες πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν τα διαφορετικά τμήματα της πρωτεΐνης Frem3.

Η ανεξάρτητη λειτουργία του αμινοτελικού κομματιού της πρωτεΐνης Frem3 αλλά και η συμβολή του στον φαινότυπο των *Frem3*^{+/-} ποντικών, θα μπορούσε να διερευνηθεί και με τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών. Για την παραγωγή των ποντικών αυτών θα δημιουργηθεί κατασκευή στην οποία το αμινοτελικό τμήμα της Frem3, που αναγνωρίζεται από τα αντισώματα Frem3-N1, Frem3-N2, θα βρίσκεται υπό το έλεγχο ενός υποκινητή ενεργού σε όλα τα κύτταρα, ώστε να εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Διασταυρώνοντας αυτά τα διαγονιδιακά ποντίκια με τα *Frem3*^{+/-} ετερόζυγα, θα διαπιστώσουμε κατά πόσο σώζεται ο φαινότυπος ή έστω ορισμένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά.

Η παρουσία δερματολογικών προβλημάτων με εμφάνιση φλεγμονών, τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τύπου αλωπεκίας καθώς και η εύρεση κυττάρων του ανοσοποιητικού στην επιδιδυμίδα των *Frem3*^{+/-} ποντικών, αποτελούν ενδείξεις καταστάσεων στις οποίες το ανοσοποιητικό σύστημα δραστηριοποιείται, για άγνωστες μέχρι τώρα αιτίες. Καθώς, τόσο η αλωπεκία και η δερματίτιδα, όσο και η εμφάνιση οιδήματος στην επιδιδυμίδα, μπορούν να έχουν αυτοάνοση αιτιολογία, μελλοντικά πειράματα θα πρέπει να εστιαστούν και προς αυτή την κατεύθυνση, για την αποσαφήνιση του μηχανισμού αυτοανοσίας. Παράλληλα, θα εξεταστούν και άλλα συστήματα οργάνων για την εξακρίβωση επιπλέον παθολογικών καταστάσεων.

4.5 Ο φαινότυπος των *Fras1*^{-/-} ποντικών στον εγκέφαλο

Στα ευρύτερα πλαίσια της λειτουργικής μελέτης των πρωτεϊνών *Fras1*/*Frem*, αναζητήσαμε περιοχές πιθανούς λειτουργίας των επιμέρους πρωτεϊνών, διαφορετικές από την βασική μεμβράνη των επιθηλίων. Όπως συζητήθηκε και παραπάνω προχωρήσαμε στην απενεργοποίηση του γονιδίου *Frem3* για να διερευνήσουμε το βιολογικό του ρόλο στη βασική μεμβράνη των αιμοφόρων αγγείων, στα περιφερικά νεύρα αλλά και στα επιθήλια εμβρύων και ενηλίκων ποντικών. Σε όλες αυτές τις δομές διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας σχετικά με το πρότυπο εντοπισμού. Παρόμοια ήταν και τα κίνητρα να μελετήσουμε το φαινότυπο των *Fras1*^{-/-} ποντικών στον εγκέφαλο, έχοντας ως δεδομένα την έκφραση του *Fras1* σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με μαθησιακές διεργασίες.

Αρχικά πειράματα *in situ* υβριδοποίησης του mRNA του γονιδίου *Fras1*, σε ιστολογικές τομές εγκεφάλων ενηλίκων ποντικών (Γ. Χαλεπάκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα), ανέδειξαν το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου το οποίο φαίνεται να περιορίζεται σε περιοχές που συμμετέχουν στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης (αμυγδαλή, ιππόκαμπος, απιοειδής λοβός). Η επανάληψη των πειραμάτων με τη δημιουργία νέων ανιχνευτών, επιβεβαίωσε τα προηγούμενα αποτελέσματα, αποτελώντας το έναυσμα για την αναλυτικότερη μελέτη του ρόλου της *Fras1* στον εγκέφαλο και στη διαδικασία της μνήμης-μάθησης.

Πράγματι, πειράματα εξαρτημένης αντίδρασης φόβου που πραγματοποιήθηκαν με *Fras1*^{-/-} ποντίκια, απέδειξαν ότι τα ποντίκια έχουν διαταραγμένη μνήμη του φόβου. Η αμυγδαλή παίζει ουσιαστικό ρόλο στη

συναισθηματική μάθηση, μέσα από την αποκωδικοποίηση των συγκινήσεων και των ιδιαίτερων ερεθισμάτων που λαμβάνει ο οργανισμός, και άρα εμπλέκεται ενεργά στο μονοπάτι που εγκαθιδρύει τη μνήμη του φόβου. Κατά συνέπεια ακολούθησαν πειράματα ιστοχημείας με Cresyl violet σε τομές εγκεφάλου από την περιοχή της αμυγδαλής, όπου έγινε φανερό ότι ήταν αρκετά αποδιοργανωμένες όσον αφορά το κυτταρικό τους περιεχόμενο.

Παρόλο που η έκφραση σε επίπεδο mRNA είναι αρκετά εμφανής, η πρωτεΐνη *Fras1* δεν ανιχνεύτηκε στον εγκέφαλο ενηλίκων ποντικών. Η αδυναμία εντοπισμού της πρωτεΐνης *Fras1* στον εγκέφαλο ενηλίκων ποντικών με οποιοδήποτε από τα οχτώ διαφορετικά αντισώματα που έχουμε στη διάθεσή μας, μας οδηγεί στις υποθέσεις ότι: α) η πρωτεΐνη μπορεί να εκκρίνεται από τα κύτταρα και να διαχέεται με αποτέλεσμα να είναι εξαιρετικά δύσκολο να εντοπιστεί, αυτό όμως είναι λιγότερο πιθανό γιατί οι μεσοκυττάριοι χώροι στον εγκέφαλο είναι αρκετά περιορισμένοι, β) το *Fras1* στον εγκέφαλο θα μπορούσε να δρα μονάχα στο επίπεδο του mRNA, γ) η πρωτεΐνη να παράγεται παροδικά και μόνο μετά από συγκεκριμένα ερεθίσματα. Παράλληλα, εξίσου πιθανό είναι και το γεγονός ότι μπορεί οι συνθήκες των πειραμάτων να μην είναι οι κατάλληλες για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης.

Με στόχο τον εντοπισμό μοριακών αλλοιώσεων σε συγκεκριμένες περιοχές ή κυτταρικούς πληθυσμούς των εγκεφάλων ενηλίκων ποντικών, πραγματοποιήθηκαν μελέτες με τη χρήση διαφόρων δεικτών.

Χρησιμοποιώντας τον δείκτη anti-GFAP για τον εντοπισμό αστροκυττάρων, σε εγκεφάλους ηλικίας E18.5-P7, παρατηρήσαμε αυξημένους αριθμούς GFAP-θετικών κυττάρων στους εγκεφάλους των *Fras1*^{-/-} ποντικών. Τα κύτταρα αυτά δεν είναι μόνο πολυπληθή σε περιοχές όπως το τηλώδες σώμα (*corpus callosum*), όπου αντίστοιχα στα αγρίου τύπου ποντίκια είναι πιο περιορισμένα αριθμητικά, αλλά επιπλέον παρουσιάζουν και ινώδη μορφολογία. Πιο συγκεκριμένα φαίνονται ως μεγάλες ίνες που διατρέχουν ολόκληρη την περιοχή του τηλώδους σώματος και εκτίνονται μέχρι και την εξωτερική στιβάδα του φλοιού. Το φαινόμενο αυτό είναι εντονότερο στα μικρότερα στάδια E18.5-P1, ενώ αργότερα εμφανίζονται επιπλέον και διαφοροποιημένα αστροκύτταρα, κυρίως στην εξωτερική στιβάδα του φλοιού καθώς και στον απιοειδή λοβό. Η ινώδης μορφολογία των GFAP-θετικών κυττάρων παραπέμπει σε ακτινωτά κύτταρα γλοίας, τα οποία αποτελούν πρόδρομα κύτταρα τόσο των γλοιακών όσο και των νευρικών κυττάρων. Παρόλα αυτά, από πειράματα με τη χρήση του δείκτη anti-BLBP που αναγνωρίζει μια κυταροπλασματική πρωτεΐνη

των ακτινωτών κυττάρων γλοίας, δεν προέκυψαν διαφορές μεταξύ των εγκεφάλων αγρίου τύπου και *Fras1*^{-/-} ποντικών.

Καθώς η προέλευση όλων των κυττάρων γλοίας (αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα, επενδυματικά κύτταρα, μικρογλοία) είναι κοινή, προέκυψε το ερώτημα αν και άλλες κατηγορίες γλοιακών κυττάρων παρουσιάζουν αύξηση, ή ακόμα και αν η γλοιγένεση είναι γενικά αυξημένη. Παρόλα αυτά, η ανάλυση των ολιγοδενδροκυττάρων με τους δείκτες anti-MBP και anti-CNP, ενάντια σε πρωτεΐνες ώριμης ή πρώιμης μυελίνης αντίστοιχα, είχε το αντίθετο αποτέλεσμα. Πιο συγκεκριμένα, τα ολιγοδενδροκύτταρα (στα στάδια E18.5-P7) είναι αριθμητικά λιγότερα στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια, που σε συνδυασμό με τον αυξημένο αριθμό αστροκυττάρων μας οδηγεί στη υπόθεση ότι μάλλον δεν διαταράσσεται η διαδικασία της γλοιογένεσης αλλά ενδεχομένως η διαδικασία της διαφοροποίησης προς την κατεύθυνση των ολιγοδενδροκυττάρων. Ωστόσο, σε μεγαλύτερα ηλικιακά στάδια P30-P60, παρατηρείται μια ποικιλομορφία, καθώς ένα ποσοτό των μεταλλαγμένων ζώων παρουσιάζουν φυσιολογικούς αριθμούς ολιγοδενδροκυττάρων, ενώ άλλα εξακολουθούν να έχουν μειωμένους αριθμούς ή ακόμα και πλήρη έλλειψη σε ορισμένες περιοχές (π.χ. απιοειδής λοβός, αμυγδαλή), υποδηλώνοντας την ποικιλομορφία του φαινοτύπου.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις σε σχέση με τον αυξημένο αριθμό των GFAP-θετικών κυττάρων, θα μπορούσαν να αποτελούν ένδειξη ότι τα νευρικά κύτταρα είναι μειωμένα. Παρόλα αυτά, με τη χρήση του δείκτη anti-MAP, ενάντια σε πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων, παρατηρήθηκε διαφορά στον εντοπισμό της MAP μόνο στις εξωτερικές στιβάδες του φλοιού και του απιοειδούς λοβού. Πιο αναλυτικά, στους εγκεφάλους των *Fras1*^{-/-} ποντικών, στις συγκεκριμένες περιοχές, παρατηρήθηκε έντονη χρώση της MAP, σε αντίθεση με τα αγρίου τύπου ποντίκια, γεγονός που δείχνει ότι μάλλον τα νευρικά κύτταρα είναι αυξημένα και όχι μειωμένα σε αριθμό.

Μελλοντικά πειράματα θα εστιαστούν στον εντοπισμό της *Fras1* πρωτεΐνης στον εγκέφαλο, έπειτα από επαγωγή ερεθίσματος (π.χ. μετά από πείραμα εξαρτημένης αντίδρασης φόβου). Σε περίπτωση που δεν καταφέρουμε να εντοπίσουμε την πρωτεΐνη ούτε και με αυτόν τον τρόπο, θα γίνουν πειράματα για να εξακριβωθεί αν το *Fras1* στον εγκέφαλο δρά μονάχα στο επίπεδο του mRNA.

5. Βιβλιογραφία

Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E, (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7:41-53.

Aguirre A and Gallo V, (2004). Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone. *J Neurosci.* 24:1 p following 10973.

Aguirre AA, Chittajallu R, Belachew S, Gallo V, (2004). NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus. *J Cell Biology* 165:575-589.

Amat P, Paniagua R, Montero J, (1985). Seminiferous tubule degeneration in human cryptorchid testes. *J Androl.* 6:1-9.

Anthony TE, Mason HA, Gridley T, Fishell G, Heintz N, (2005). "Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells". *Genes Dev.* 19:1028-1033.

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

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

Baumann N and Pham-Dinh D, (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews* 81:871-926.

Bonness S, Bieber T, (2007). Molecular basis of atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 7:382-386.

Boyd PA, Keeling JW, Lindenbaum RH, (1988). Fraser syndrome (cryptophthalmos-syndactyly syndrome): a review of eleven cases with postmortem findings. *American Journal of Medical Genetics* 31:159-168.

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.

Bunge MB, Bunge RP, Ris H, (1961). Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult cat spinal cord. *J Biophys Biochem Cytol.* 10:67-94.

Butt AM, Ibrahim M, Ruge FM, Berry M, (1995). Biochemical subtypes of oligodendrocyte in the anterior medullary velum of the rat as revealed by the monoclonal antibody Rip. *Glia.* 14:185-97.

- Cai J, Chen Y, Cai WH, Hurlock EC, Wu H, Kernie SG, Parada LF, Lu QR,** (2007). A crucial role for Olig2 in white matter astrocyte development. *Development* 134:1887-99.
- Carmen J, Magnus T, Cassiani-Ingoni R, Sherman L, Rao MS, Mattson MP,** (2007). Revisiting the astrocyte-oligodendrocyte relationship in the adult CNS. *Prog Neurobiol* 82:151-162.
- Chan LS,** (1997). Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases. *Front. Biosci.* 15:343-352.
- Cohen SN, Chang AC, Hsu L,** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 69: 2110-4.
- Cornwall GA,** (2009). New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 15:213-227.
- Darling S and Gossler AA,** (1994). A mouse model for Fraser syndrome? *Clin. Dysmorph.* 3: 91-95.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo GM and Alvarez-Buylla A,** (1997). Cellular composition and three dimensional organization of the sub-ventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 17: 5046-5061.
- Dower GE, Yakush A, NAZZAL SB, Jutzy RV, Ruiz CE,** (1988). Deriving the 12-lead electrocardiogram from four (EASI) electrodes. *Journal Electrocard.* 21:S182-187.
- Fraser GR,** (1962). Our genetical "load": a review of some aspects of genetical variation. *Annals of Human Genetics.* 25:387-415.
- Ganat YM, Silbereis J, Cave C, Ngu H, Anderson GM, Ohkubo Y, Ment LR, Vaccarino FM,** (2006). Early postnatal astroglial cells produce multilineage precursors and neural stem cells *in vivo*. *J. Neurosci.* 26:8609-8621.
- Gattuso J, Patton MA, Baraitser M,** (1987). The clinical spectrum of Fraser syndrome: report of three new cases and review. *Med. Genetics* 24:549-555.
- Gilhar A, Kalish RS,** (2006). Alopecia areata: a tissue specific autoimmune disease of the hair follicle. *Autoimmun Rev.* 5:64-9.
- Goldman JE,** (2007). Astrocyte lineage. In: Lazzarini, R.A. (Ed.) Myelin biology and disorders. *Elsevier Academic Press*, New York, pp. 311-328.
- Graham FL and Van der Eb AJ,** (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-467.

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

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

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

Jacinto A, Martinez-Arias A, Martin P, (2001). Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nature Cell Biology* 3:E117-E123.

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.

Kandel ER, Schwartz J, Jessell T, (2000). Principles of neural science, *McGraw-Hill Medical*, 4 edition.

Kimelberg HK, (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int*. 45:191-202

Kimelberg HK, (2007). Supportive or information-processing functions of the mature protoplasmic astrocyte in the mammalian CNS? A critical appraisal. *Neuron Glia Biol*. 3:181-189.

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.

Kos L, Conlon J, An update on alopecia areata. *Curr OpinPediatr*. 21:475-480.

Kuur S, Vuolteenaho R, Vainio S, (2000). Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech. Dev*. 15:31-45 (2000).

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

LeDoux JE, (2002). Emotion, Memory, and the Brain. *Sci Am* 12:62-71

Levison SW, Goldman JE, (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* 10:201-212.

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

Lipozencić J, Wolf R, (2007). Atopic dermatitis: an update and review of the literature. *Dermatol Clin* 25:605-612.

Liu X, Bolteus AJ, Balkin DM, Henschel O, Bordey A, (2006). GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. *Glia* 54:394-410.

Loo DT, Althoen MC, Cotman CW, (1995). Differentiation of serum-free mouse embryo cells into astrocytes is accompanied by induction of glutamine synthetase activity. *J Neurosci Res.* 42:184-191.

Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M, (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127:5253-5263.

Maronpot RR, (1999). Pathology of the mouse. *Cache river press* 1st edition.

Martin P and Wood W, (2002). Epithelial fusions in the embryo. *Current Opinion in Cell Biology* 14:569-574.

McCaw AP, Ewald AJ, Werb Z, (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Molecular Cell Biol.* 8:221-233.

McGaugh JL, (2000). Memory-a century of consolidation. *Science* 287:248-251.

Mc Gregor L, Makela V, Darling SM, Vrontou S, Chalepakis G, Roberts C, Smart N, Rutland P, Prescott N, Hopkins J, Bentley E, Shaw A, Roberts E, Mueller R, Jadeja S, Philip N, Nelson J, Francannet C, Perez Aytes A, Megarbane A, Kerr B, Wainwright, Woolf AS, Winter R, Scambler P, (2003). Fraser syndrome and mouse blebbed phenotype caused by mutations in FRAS1/Fras1 encoding a putative extracellular matrix protein. *Nature Genetics* 34:203-208.

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

Nishiyama A, Dahlin KJ, Price JT, Johnstone SR, Stallcup WB, (1991). The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan. *J. Cell Biol.* 114:359-371.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR, (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409:714-720.

Okulicz JF, Schwartz RA, (2003). Links Hereditary and acquired ichthyosis vulgaris. *Int J Dermatol.* 42:95-8.

Oyoshi MK, He R, Kumar L, Yoon J, Geha RS, (2009). Cellular and molecular mechanisms in atopic dermatitis. *Adv Immunol.* 102:135-226.

Pankaj S, Nitin K, (2008). Astrocyte, the star avatar: redefined. *J Biosci* 33:405-421.

Parks C, Wilson CL, López-Boado YS, (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* 4:617-629.

Privat A and Rataboul P, (2007). Fibrous and protoplasmic astrocytes. In: Federoff, S., Vernadakis, A. (Eds.), *Astrocytes. Development, morphology and regional specialization of astrocytes. Academic Press, Orlando, FL*, pp. 105-129.

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

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

Petrou P, Chiotaki R, Dalezios Y, Chalepakis G, (2007). Overlapping and divergent localization of Frem1 and Fras1 and its functional implications during mouse embryonic development. *Exp. Cell Res.* 313:910-920

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

Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE, (2004). Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron* 44:75-91.

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

Sambrook J, et al., (1989) *Molecular Cloning-a laboratory manual-second edition.*

Schmechel DE and Rakic P, (1979). A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat. Embryol (Berl.)* 156:115-152.

Schwarz EM and Benzer S, (1997). Calx, a Na-Ca exchanger gene in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:10249-10254.

Smyth I, Du X, Taylor MS, Justice MJ, Beutler B, Jackson IJ, (2004). The extracellular matrix gene *Frem1* is essential for the normal adhesion of the embryonic epidermis. *PNAS* 101:13560-13565.

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

Somerville RPT, Oblander SA, Apte SS, (2003). Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology* 4:216-222.

Somjen GG, (1988). Nervenkitz: Notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* 1: 2-9.

Southern EM, (1995). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98:503-517.

Steiner J, Bernstein HG, Bielau H, Berndt A, Brisch R, Mawrin C, Keilhoff G, Bogerts B, (2007). Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neurosci.* 2:2-10.

Stevens A and Lowe JS, (2004). Human Histology. *Mosby* 3rd edition.

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

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

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

Virtanen I, Lohi J, Tani T, Korhonen M, Burgeson ME, Lehto VP, Leivo I, (1997). Distinct changes in the laminin composition of basement membranes in human seminiferous tubules during development and degeneration *Am J Pathol* 150: 1421–1431.

Vrontou S, Petrou P, Meyer BI, Galanopoulos VK, Imai K, Yanagi M, Chowdhury K, Scambler PJ, Chalepakis G, (2003). *Fras1* deficiency results in

cryptophthalmos, renal agenesis and blebbed phenotype in mice. *Nature Genetics*. 34:209-214.

Wang DD, Bordey A, (2008). The astrocyte odyssey. *Progress in Neurobiology* 86:342-367.

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

Yurchenco PD, Patton BL, (2009). Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr Pharm Des*. 15:1277-94.

Zlokovic BV, (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57:178-201.

pH-dependent Antigen Unmasking in Paraformaldehyde-fixed Tissue Cryosections

Evangelos Pavlakis, MSc and Georges Chalepakis, PhD

Abstract: Fras1/Frem family of basement membrane proteins has been associated with the “bleb” phenotype in mouse and the Fraser syndrome in man. Fras1 and Frem2 proteins are known to be colocalized in all epithelial basement membranes during embryonic development. The functional significance of their colocalization has been demonstrated in the corresponding mouse mutants, where the absence of Fras1 results in complete depletion of Frem2 from epithelial basement membranes and vice versa. Nevertheless, under standard immunohistochemical procedures, we were able to detect Fras1, but not Frem2, in the basement membrane of adult mouse tail skin. After reevaluation of our protocol, we established 15-minute acidic buffer treatment to be of critical value upon Frem2 immunodetection, essentially operating as an antigen retrieval process. Testing more polyclonal antibodies revealed no negative effects, but rather reinforced the positive signal, rendering this technique suitable for incorporation to any standard immunohistochemical procedure.

Key Words: immunohistochemistry, antigen unmasking, cryosections, Frem2

(*Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008;16:503–506)

Immunohistochemistry enables the identification of cellular or tissue constituents, providing a very useful tool to distinguish the cellular or extracellular allocation of various antigens. Nevertheless, sometimes the procedures applied to prepare the tissues may have detrimental effects, making the antigen of interest hard or even unfeasible to detect. Formaldehyde alone or in combination with other agents (such as glutaraldehyde), constitute the most ordinarily used types of fixations.¹ Nevertheless, such a fixation frequently has deleterious effects, by means of affecting the reactivity of cellular proteins with antibodies.² On this basis, many antigen retrieval (AR) techniques have been developed through the years. A most commonly used unmasking procedure includes microwave heating of aldehyde-fixed, paraffin-embedded

tissue sections in water or buffer solutions with different pH values, ranging from 1.0 to 10.0.^{2,3} However, no efficient reports exist so far regarding pH-dependent AR techniques on cryosections. The question has been raised whether improved immunostaining can be obtained by treating cryostat tissue sections with particular pH value buffers, ranging from very acidic to neutral.

Fras1 and Frem2 proteins, which have been associated with the “bleb” phenotype in mouse and the Fraser syndrome in man, are known to be colocalized in all epithelial basement membranes during mouse embryonic development.⁴ Consistent with their colocalization, targeted inactivation of Fras1 results in depletion of Frem2 from all epithelial basement membranes in mouse embryos, whereas the same holds true for Fras1 in embryos lacking functional Frem2 protein.^{5,6} However, using standard immunohistochemical procedures to investigate their localization pattern in paraformaldehyde (PFA)-fixed, adult tail skin cryosections, we confirmed that only Fras1, but not Frem2, was present in the basement membrane. As Fras1 and Frem2 have been shown to be simultaneously present in all embryonic epithelial basement membranes, the detection of Fras1 and not Frem2 in adult tail skin could not be interpreted. Taking this into account, we began reconsidering our protocol and testing various conditions to investigate the localization profile of Frem2 in the basement membrane of adult tail skin in mouse. Although we encountered numerous reports dealing with AR on paraffin-embedded tissue sections, most of which included heat/boiling along with the use of a buffer, no studies exist so far concerning AR on tissue cryosections. As a control for the specificity of the Frem2 antibody, we used sections from *Fras1*^{-/-} mice that lack Frem2 in the basement membrane.⁶ We established that specific Frem2 staining in the basement membrane was detectable solely upon washings of the tissue cryosections for 15 minutes with an acidic pH buffer. This is also indicative of an AR process on PFA-fixed, frozen tissue sections, which involves no heating or boiling, and is irrelevant of the fixation time and also very much dependent on the pH of the unmasking buffer solution.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Embryos and Tissues

Mouse embryos of the NMRI strain (E14.5) and tail skin, and *Fras1*^{-/-} embryos and tail skin⁷ were dissected in cold phosphate-buffered saline (PBS), fixed 4% PFA in

Received for publication October 9, 2007; accepted November 26, 2007. From the Department of Biology, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece.

Supported by a grant from the Greek General Secretariat for Research and Technology (PENED 03EA779).

Reprints: Georges Chalepakis, PhD, Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion, Crete, Greece (e-mail: chalepak@imbb.forth.gr).

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

PBS for 1 to 6 hours, depending on the experiment and cryoprotected in 30% sucrose/PBS at 4°C overnight. After isopentane freezing, they were stored at -80°C until use.

Antibodies

The generation of Frem2-specific polyclonal antibody has been reported previously.⁴ The antigenic peptide used to generate the antibody corresponds to amino acids 231 to 400 of the Frem2 protein that encompasses 3160 aa.

Immunofluorescence and Microscopy

Ten-micrometer-thick cryosections (Leitz kryostat 1720 digital) were prepared for immunofluorescence staining. After 3 × 5 minutes washes with 0.05% Tween in Na₂HPO₄-citric acid buffer pH 2.2 to 7.0 (depending on the experiment) and 1 hour incubation with blocking serum (0.1 M of Tris/HCl, pH 7.5, 0.15 M of NaCl, 0.5% blocking reagent), sections were incubated overnight with primary anti-Frem2 rabbit antibody at 4°C. (Washes were also tested without 0.05% Tween with no differences on the result.) For immunofluorescence, an appropriate Alexa-488 (green) conjugated secondary antibody (Molecular Probes) was used and nuclei were counterstained with propidium iodide (red) after RNaseA treatment. Images were obtained on a Leica TCS-NT Laser Scanning microscope using the 20 × and 40 × objectives.

RESULTS AND DISCUSSION

Freshly prepared tissue sections from wild-type and *Fras1*^{-/-} mouse embryos (E14.5) and tails from adult mice (P30) were treated with acidic (Na₂HPO₄-citric acid buffer pH 4.0, 0.05% Tween) or neutral pH buffer (Na₂HPO₄-citric acid buffer pH 7.0, 0.05% Tween) to verify any differences in the protein detection. Although, Frem2 could be traced both under neutral (Fig. 1A) and acidic pH conditions (Fig. 1B) on E14.5 sections, the results obtained from the adult (P30) tails were distinctively different. Strong positive immunostaining in the basement membrane was obtained on the sections treated with Na₂HPO₄-citric acid buffer pH 4.0 (Fig. 1D), whereas when the neutral pH buffer was used, Frem2 was no longer detectable (Fig. 1C), thus providing evidence of an antigen unmasking procedure that is also a pH-dependent chemical process. Control *Fras1*^{-/-} embryos (Figs. 1E, F) and adult mouse tails (Figs. 1G, H) revealed no positive signal under any of the above circumstances, indicating that the detection of Frem2 on the wild-type tissue sections is specific. It is also worth mentioning that by using PBS pH 7.4 instead of Na₂HPO₄-citric acid buffer pH 7.0, we did not trace any differences (data not shown).

Previous studies performed on paraffin sections regarded AR as an “unfixation” process resulting from the relaxation or breaking of the intermolecular cross-linkages formed between proteins and aldehyde fixatives.^{3,8}

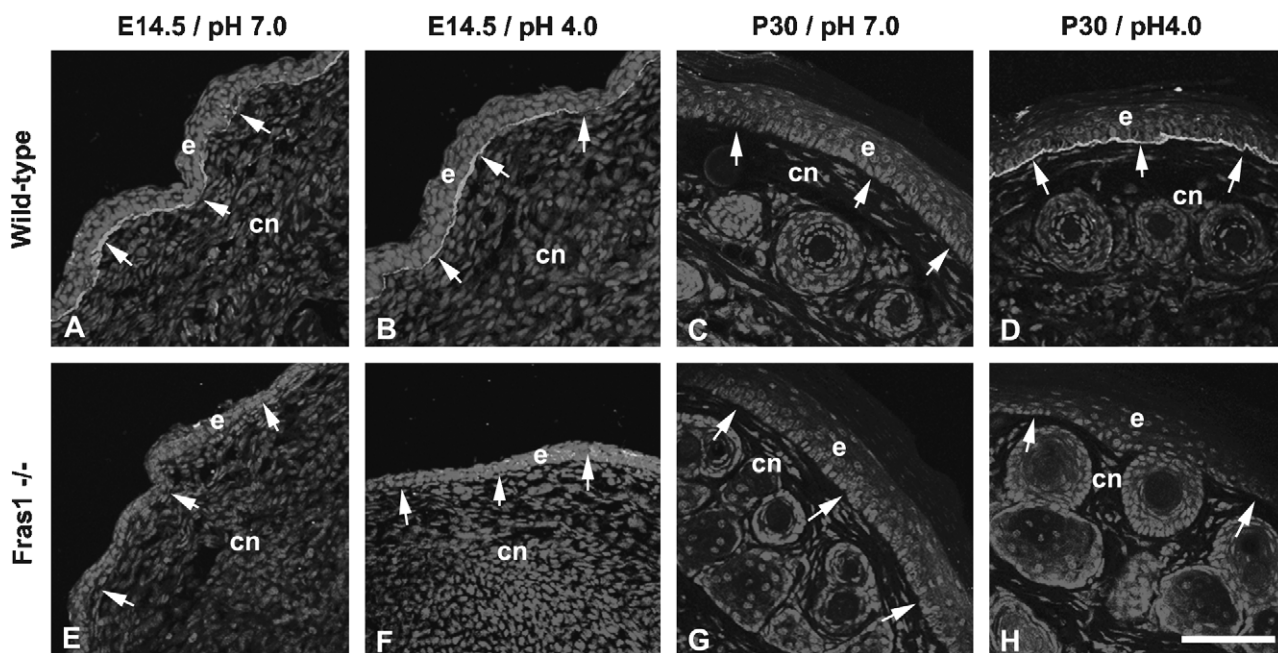


FIGURE 1. Comparative analysis of Frem2 protein localization in embryonic (E14.5) and adult (P30) mouse skin, under acidic and neutral pH conditions. In wild-type E14.5 embryos (A, B), Frem2 was detected in the basement membrane, both when the sections were treated with Na₂HPO₄-citric acid buffer pH 7.0 (A) and Na₂HPO₄-citric acid buffer pH 4.0 (B). In adult (P30) mouse tail skin (C, D), Frem2 was not detectable on the sections treated with the neutral pH buffer (C), as opposed to the skin treated with acidic buffer, where strong positive immunostaining was traced. The specificity of Frem2 antibody was verified by the lack of immunostaining in *Fras1*^{-/-} skin sections, both in E14.5 embryos (E, F) and adult tail skin (G, H), under any conditions applied (arrowheads point the basement membrane). cn indicates connective tissue; e, epithelium. Scale bar, 125 μm.

Essentially, this is proposed to constitute a reestablishment of the 3-dimensional protein structure that could be because of the hydrolysis of cross-links and is also pH-dependent.^{9,10} Another hypothesis gives credit to microwave heating, being a form of nonionizing radiation, which results in molecular kinetics and acceleration of chemical reactions.¹¹ Consequently, to validate whether our results are actually pH-dependent and thus arise exclusively under the unmasking process, or because of the fixation, we decided to perform a comparative study using adult tails that have been fixed for different amounts of time. Wild-type, P30, mouse tails were dissected and fixed in 4% PFA/PBS for 1, 2, 3, or 6 hours (Figs. 2A–H) and subsequently washed in PBS and cryoprotected in 30% sucrose/PBS. The tails were crosscut and the sections were treated with

either Na₂HPO₄-citric acid buffer pH 4.0, or Na₂HPO₄-citric acid buffer pH 7.0, following thereafter the same protocol as before. Our results exhibited no immunofluorescence for Frem2 on the sections washed with neutral pH buffer (Figs. 2A–D), whereas strong positive Frem2 signal was detected in all sections treated with the acidic buffer (Figs. 2E–H) independently of the duration of the fixation process. The above indicates that the treatment with Na₂HPO₄-citric acid buffer pH 4.0 is actually a vital step of the protocol, acting as an AR procedure, which is irrelevant of the fixation-unfixation process previously proposed.⁹

Finally, to establish the AR immunostaining patterns under the influence of a variety of pH values, we used once more, wild-type P30 mouse tail cross-sections. At this

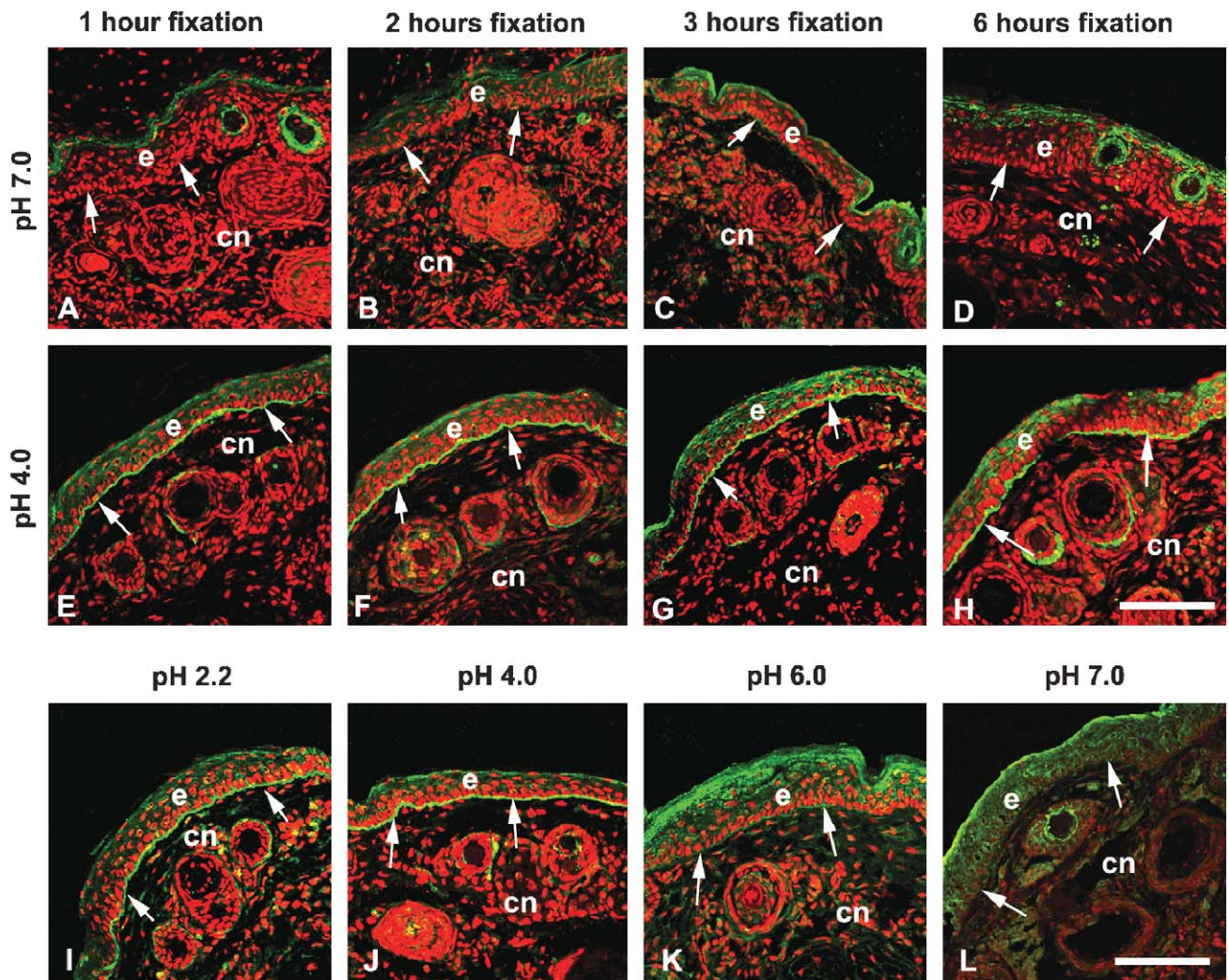


FIGURE 2. Evaluation of the relevance of fixation time and pH on the AR procedure in adult (P30), wild-type mouse tail skin. In general, Frem2 could not be traced on the basement membrane of skin treated with neutral pH buffer (A–D), whether the fixative was applied for 1, 2, 3, or 6 hours (A–D, respectively). In contrast to these results, Frem2 was detected solely under acidic conditions (E–H), again though independent of the fixation time. Moreover, Frem2 was detected in the basement membrane only when the skin was processed with Na₂HPO₄-citric acid buffer pH 2.2 (I) and 4.0 (J), whereas the skins treated with buffer pH 6.0 (K) or neutral (L) did not reveal any positive immunostaining (arrowheads point the basement membrane). cn, connective tissue; e, epithelium. Scale bar, 125 μM.

occasion, the tails were fixed in 4% PFA/PBS for 2 hours, cryoprotected routinely in 30% sucrose/PBS, and washed using Na_2HPO_4 -citric acid buffer with pH values ranging from 2.2 to 7.0 (Figs. 2I–L). The protocol employed from then on was the same as on the previous experiments. Our observations demonstrated strong positive immunofluorescent staining for Frem2 on the sections treated with buffers ranging from pH 2.2 to 4.0 (Figs. 2I, J), whereas the protein was no longer detectable under neutral or pH 6.0 conditions (Figs. 2K, L).

In conclusion, we report an AR method for the detection of the Frem2 protein on frozen tissue sections. This method indicates the critical influence of pH in the AR process and also reveals the insignificance of the fixation time. Treatment with acidic pH buffers did not reveal any negative effect on several antibodies tested so far (eg, Fras1, Frem1, Frem3, collagenVII, Laminin $\alpha 5$), but rather it assisted by increasing the specific signal. In other cases, such as Frem2, the results exhibited striking differences, providing very strong signal under acidic conditions and no signal detection at all under neutral treatment, appointing this step of the protocol fundamental to the whole process. On the whole, the procedure described is very rapid, lasting only for 15 minutes, which is essentially the duration of washing with any other buffer, and is also nondetrimental to the tissue sections or the antibody staining, thus appointing this step suitable for incorporation to the routine immunofluorescence protocol. This analysis furthermore provides an explanation for potential inconsistencies in routine immunofluorescent protocols where neutral pH conditions are achieved.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Rena Chiotaki and Apostolis Makrygiannis for the critical review of the manuscript.

REFERENCES

1. Bruno G, Martin Z, Jurgen R. Unconventional antigen retrieval for carbohydrate and protein antigens. *Histochem Cell Biol*. 2005;110:603–611.
2. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 1991;39:741–748.
3. Shi SR, Imam SA, Young L, et al. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem*. 1995;43:193–201.
4. Chiotaki R, Petrou P, Giakoumaki E, et al. Spatiotemporal distribution of Fras1/Frem proteins during mouse embryonic development. *Gene Expr Patterns*. 2007;7:381–388.
5. Kiyozumi D, Sugimoto N, Sekiguchi K. Breakdown of the reciprocal stabilization of QBRICK/Frem1, Fras1 and Frem2 at the basement membrane provokes Fraser syndrome-like defects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:11981–11986.
6. Petrou P, Pavlakis E, Dalezios Y, et al. Basement membrane localization of Frem3 is independent of the Fras1/Frem1/Frem2 protein complex within the sublamina densa. *Matrix Biol*. 2007;26:652–658.
7. Vrontou S, Petrou P, Meyer BI, et al. Fras1 deficiency results in cryptophthalmos, renal agenesis and blebbed phenotype in mice. *Nat Genet*. 2003;34:209–214.
8. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, et al. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem*. 1985;33:845–853.
9. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem*. 2001;48:931–937.
10. Emoto K, Yamashita S, Okada Y. Mechanisms of heat-induced antigen retrieval: does pH or ionic strength of the solution play a role for refolding antigens? *J Histochem Cytochem*. 2005;53:1311–1321.
11. Leong TY, Leong AS. How does antigen retrieval work? *Adv Anat Pathol*. 2007;14:129–131.

Differential localization profile of Fras1/Frem proteins in epithelial basement membranes of newborn and adult mice

E. Pavlakis · A. K. Makrygiannis ·
R. Chiotaki · G. Chalepakis

Accepted: 29 May 2008 / Published online: 18 June 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract The *Fras1/Frem* gene family encodes for structurally similar proteins of the extracellular matrix, functionally correlated with embryonic dermal–epidermal adhesion as deduced from the appearance of sub-epidermal blisters in mouse mutants compromising the function of Fras1, Frem1 and Frem2 proteins. Mutations in the human counterparts *FRAS1* and *FREM2* have been detected in patients suffering from Fraser syndrome. So far, Fras1/Frem proteins have been shown to be strictly colocalized in the sublamina densa of mouse epithelial basement membranes during development. Here, we focused on the characterization of the localization pattern of the aforementioned proteins, in various parts of the adult mouse skin as well as a range of organs and tissues. Frem3 was present in a broad range of epithelial basement membranes where Fras1, Frem1 and Frem2 were missing. The localization profile of Frem3 coincided with that of collagen VII in all skin basement membranes but differed in that Frem3 was additionally found in the basement membrane of several internal epithelia, where collagen VII was absent. Fras1 and Frem2 were colocalized with Frem3 in the basement membrane of certain skin parts, underlying the thin-layer, of rapidly proliferating keratinocytes, whereas Frem1 was detected only in the basement membrane of the tail. The localization pattern of Fras1 and Frem2 was indistinguishable, while both proteins along with Frem3 could be detected even in the absence of Frem1.

Keywords Fras1 · Frem1 · Frem2 · Frem3 ·
Mouse bleb mutants · Collagen VII

Introduction

Fras1, Frem1, Frem2 and Frem3 comprise the family of four extracellular matrix proteins which are similar in primary structure and localization and share common protein motifs and domains (Smyth and Scambler 2005; Short et al. 2007). Based on their amino acid sequence and beginning from the N-terminal end of the protein, a signal peptide is encountered first, followed, in Fras1 but not Frem1, Frem2 or Frem3, by six repeated cysteine-rich motifs similar to those found in the C-domain of von Willebrand factor (Sadler 1998) and 13 cysteine motifs typical for furin proteases (Roebroek et al. 1992). A region exhibiting significant sequence identity to the chondroitin sulfate proteoglycan core protein NG2 (Nishiyama et al. 1991; Staub et al. 2002) is succeeded and is common to all the proteins of the family. In Fras1 and Frem2, five tandem calcium binding motifs (Calx- β) (Schwarz and Benzer 1997) and a transmembrane domain close to the C-terminus are present. On the other hand, Frem1 and Frem3 proteins both lack the transmembrane domain, and Frem1 has only one calcium binding motif, whereas Frem3 has three. Frem1 also possesses a unique C-terminal lectin-type motif.

Recent comparative immunohistochemical studies reported the colocalization of the Fras1/Frem proteins in all epithelial basement membranes, throughout embryonic development (Chiotaki et al. 2007). Furthermore, utilization of transmission electron microscopy to investigate the exact location of these proteins, revealed their colocalization in the sublamina densa of various embryonic epithelial basement membranes (Kiyozumi et al. 2006; Petrou et al. 2007b). Interestingly, individual Fras1/Frem proteins were detected as large clusters of immunogold often extending from the sublamina densa as far as the connective tissue cells (Dalezios et al. 2007; Petrou et al. 2007b).

E. Pavlakis · A. K. Makrygiannis · R. Chiotaki · G. Chalepakis (✉)
Department of Biology, University of Crete,
71409 Heraklion, Crete, Greece
e-mail: chalepak@imbb.forth.gr

Consistent with the localization pattern, inactivation of *Fras1*, *Frem1* and *Frem2* gives rise to subepidermal blister formation as a result of dermal–epidermal detachment at the level below the lamina densa (Vrontou et al. 2003; Smyth et al. 2004; Timmer et al. 2005; Kiyozumi et al. 2006). Blisters occur at approximately E11.5–E12.5 of mouse embryogenesis, predominantly in the head region around the eyes and at the distal part of the limbs, while as development proceeds, blisters that are initially transparent may gradually become hemorrhagic, and most homozygous embryos die between E14.5 and E16.5. Additional defects include cryptophthalmos (covered eyes), syndactyly and renal agenesis or dysgenesis. The aforementioned phenotype has been ascribed to bleb mice, a group of five mouse mutants (Darling and Gossler 1994). Indeed, mutations in *Fras1* (McGregor et al. 2003; Vrontou et al. 2003) and *Frem2* (Timmer et al. 2005; Jadeja et al. 2005) genes, give rise to *blebbed (bl)* and *myelencephalic bleb (my)* mice, respectively. Moreover, mutations compromising the function of *Frem1* give rise to the *head blebs (heb)* phenotype (Smyth et al. 2004; Kiyozumi et al. 2006), while the *eye blebs (eb)* phenotype is derived from defects in the glutamate receptor interacting protein, Grip1 (Takamiya et al. 2004). Grip1, which is a PDZ-protein, is responsible for targeting the putative transmembrane proteins *Fras1* and *Frem2* to the basolateral surface of polarized epithelial cells. *Frem3* which encodes a structurally homologous protein to the rest *Fras1/Frem*, has not yet been correlated to any bleb phenotype.

Equivalent phenotypic deformities to the bleb mice have also been described for human Fraser syndrome patients (Slavotinek and Tift 2002). In fact, mutations in human counterparts have so far been discovered in the genes encoding the putative transmembrane proteins FRAS1 (McGregor et al. 2003) and FREM2 (Jadeja et al. 2005).

Since the localization profile of *Fras1/Frem* proteins has been extensively analyzed during embryogenesis, in the present study we investigated the immunostaining pattern of these proteins in adult stages. This would aid the understanding of the absence of phenotypic features in adults and also possible implications of the proteins in epigenetic or induced pathological conditions. Using collagen VII as a marker for the sublamina densa of the skin basement membrane, our results demonstrate the continuous colocalization with *Frem3* in various locations of the mouse skin, while additionally, *Frem3* was detected in several other epithelial basement membranes, where collagen VII was absent. At the same time, the detection profile of the two transmembrane proteins, *Fras1* and *Frem2*, is indistinguishable, while both proteins are being colocalized with *Frem3* in epidermal basement membranes underlying highly proliferating keratinocytes. On the other hand, *Frem1* was codetected with the rest of *Fras1/Frem* proteins only in the BM of the tail skin.

Materials and methods

Preparation of embryos and tissues

Mouse embryos of the NMRI strain (E14.5 and E18.5) and various tissues, as well as *Fras1*^{-/-} embryos and tissues (Vrontou et al. 2003) were dissected in cold PBS, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 2–12 h depending on the tissue, and cryoprotected in 30% sucrose/PBS at 4°C overnight. Following isopentane freezing, they were stored at -80°C, until use.

Immunofluorescence and microscopy

Ten-micrometer-thick cryosections (Leitz kryostat 1720 digital) were prepared for immunofluorescence staining. Following detergent washes (0.05% Tween, 0.1% Triton in PBS) and 1-h incubation with blocking serum (0.1 M Tris/HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5% blocking reagent), sections were incubated overnight with primary (anti-*Fras1*, anti-*Frem1*, anti-*Frem3*, anti-collagen VII) rabbit-anti mouse antibodies at 4°C. For the detection of the *Frem2* protein, antigen retrieval was performed by washing the sections three times for 5 min each, in 0.05% Tween in PBS pH 4.0 (Pavlakakis and Chalepakakis 2007), as opposed to the washings performed for the rest antibodies used, where the pH was neutral. For immunofluorescence, an appropriate Alexa-488 (green) conjugated secondary antibody (molecular probes) was used and nuclei were counterstained with propidium iodide (red) after RNase treatment. Images were obtained on a Leica TCS-NT Laser Scanning microscope using the 20× and 40× objectives.

Antibodies

In the present study, the following rabbit polyclonal antibodies were used: *Fras1* (Vrontou et al. 2003), *Frem1* (Petrou et al. 2007a), *Frem2* and *Frem3* (Chiotaki et al. 2007), collagen VII (kindly provided by Dr C. Sitaru; Sitaru et al. 2005).

Results

Fras1/Frem and collagen VII colocalize in the basement membrane of adult mouse tail skin

Recent ultrastructural immunohistochemical experiments have shown that *Fras1/Frem* proteins are located in the sublamina densa of embryonic epithelial basement membranes (Petrou et al. 2007b). The major structural hallmarks of the sublamina densa are the so-called anchoring fibrils and anchoring plaques which are mainly composed of collagen

VII (Tidman and Eady 1985; Keene et al. 1987). Fras1/Frem proteins in the epidermal basement membrane are visible from early mouse embryonic stages, whereas collagen VII is detectable at later stages starting at around E17.5 (Chiotaki et al. 2007). Therefore, we included in our studies collagen VII to investigate prenatal and adult stages and to compare it with the localization profile of Fras1/Frem proteins.

Using specific antibodies raised against distinct domains of Fras1/Frem proteins and collagen VII, we first examined their localization profile, in the skin of adult mouse tails. Biopsies from mouse tails, 15 (P15), 30 (P30) and 60 (P60) days after birth, were dissected, cross-cut and applied to immunohistochemical staining (Fig. 1). Fras1 (Fig. 1a–c), Frem2 (Fig. 1g–i), Frem3 (Fig. 1j–l) and collagen VII (Fig. 1m–o) were all detected in the basement membrane of the epidermal epithelium as well as the basement membrane of the hair follicles of all adult stages examined. In contrast, Frem1 (Fig. 1d–f), although it appeared to be deposited in the basement membrane, it also displayed an intracellular distribution in the basal keratinocytes. Apart from the latter variation, these results show that Fras1/Frem and collagen VII are colocalized at least in the basement membrane of adult mouse tail skin.

Fras1/Frem and collagen VII in *Fras1*^{-/-} P30 tail skin

Fras1, Frem1 and Frem2 proteins have been reported to form a ternary complex and mutually stabilize themselves in the basement membrane of embryonic skin (Kiyozumi et al. 2006). This finding was also supported by recent immunofluorescence studies on *Fras1*^{-/-} embryos, suggesting that abolishment of Fras1 from the basement membrane, also results in the elimination of Frem1 and Frem2 (Petrou et al. 2007b). Nevertheless, Frem3 is still detectable when all the rest proteins are absent (Petrou et al. 2007b). In order to evaluate whether this is also the fact during the adult mouse life, we proceeded by analyzing the protein localization pattern of Fras1/Frem and collagen VII, in P30 *Fras1*^{-/-} tail skin, by means of immunofluorescence. Fras1 (Fig. 2a) and Frem1 (Fig. 2b)/Frem2 (Fig. 2c) were unable to be detected, in contrast to Frem3 (Fig. 2d) and collagen VII (Fig. 2e) both of which were strongly colocalized in the basement membrane of the skin epidermis and the hair follicles. These results concur with the previous studies, indicating that Frem3 follows a relatively distinct pathway, being able to independently anchor in the basement membrane even when Fras1, Frem1 and Frem2 are omitted and is furthermore co-detected with collagen VII even during the adult stages.

Fras1/Frem proteins and collagen VII in dorsal skin

Given the above-mentioned findings, we proceeded by assessing the spatiotemporal allocation of Fras1/Frem and

collagen VII on dorsal mouse skin, beginning at E14.5 throughout P30. Fras1, Frem1, Frem2 and Frem3 (Fig. 3) were all detected in the basement membrane at E14.5 and E18.5, as expected. However, Frem1 appears to be evidently reduced at E18.5, while collagen VII, which is not detected at E14.5, is now being localized in the basement membrane. On the other hand, immunofluorescent staining of Fras1, Frem1 and Frem2 clearly attenuates after birth, and they are no longer detectable throughout the adult stages, whereas collagen VII and Frem3 continue to be localized in the basement membrane. Interestingly, our results indicate that Frem3 is essentially independent, in terms of anchoring to the basement membrane, of the Fras1/Frem1/Frem3 complex, at least with respect to the post gestational stages. However, it appears to have an identical distribution pattern to collagen VII, being colocalized in the basement membrane of the skin epithelium, as well as the hair follicles. Remarkably, similar results were obtained when we examined ventral skin (data not shown).

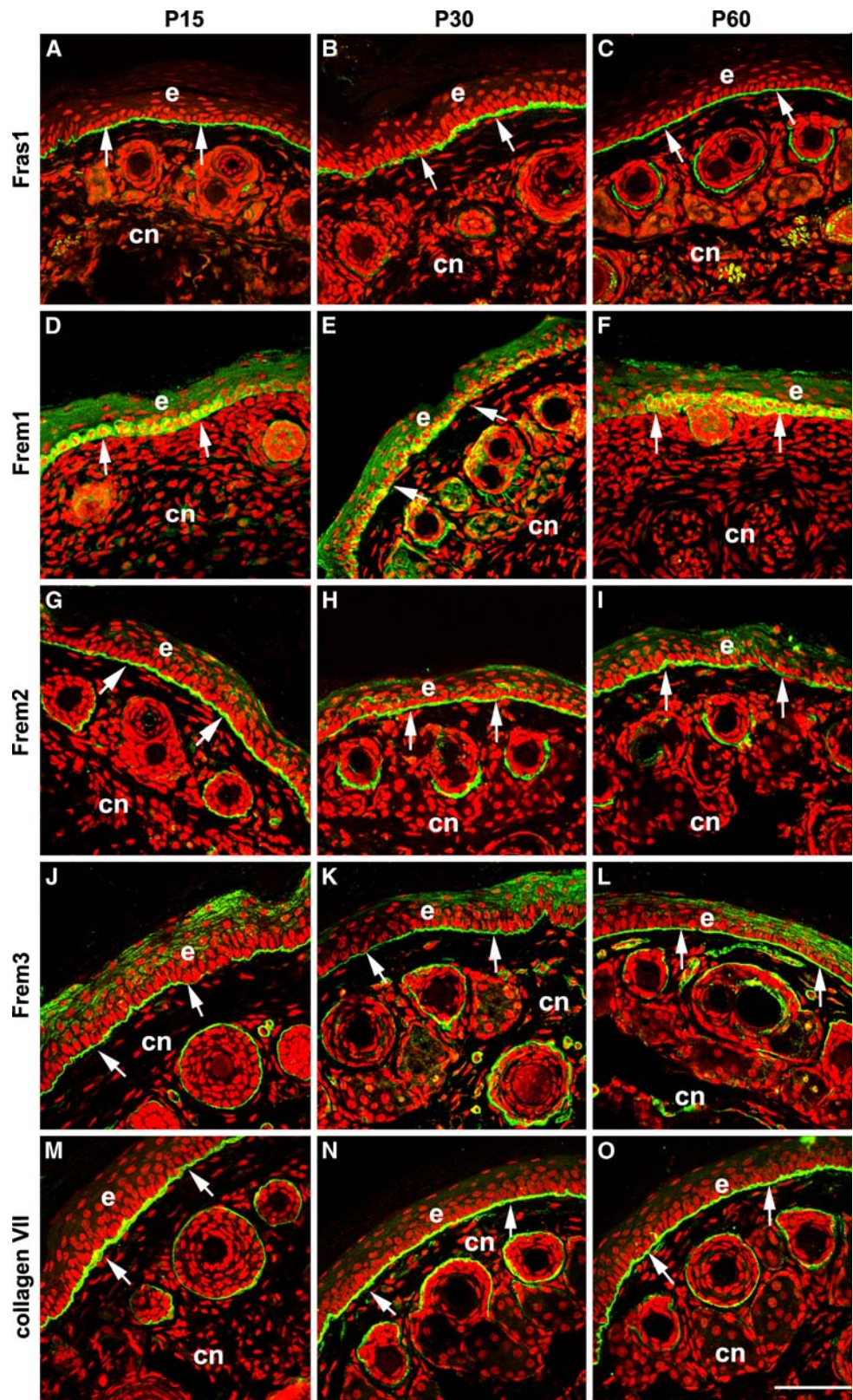
Fras1/Frem and collagen VII detection in various skin parts at P30

So far, Fras1/Frem and collagen VII are all colocalized in the basement membrane of the tail skin while they appear to have dissimilar patterns as far as the dorsal/ventral skin is concerned. In order to complete the picture of Fras1/Frem and collagen VII localization pattern in the adult mouse skin, we proceeded by evaluating their distribution in various skin parts to see whether their localization profiles are overlapping or divergent in various parts of the adult mouse skin (Fig. 4). More specifically, we examined the skin from the outer ear, the external male genitalia, the footpad and the muzzle, all dissected at 30 days post natal. Fras1, Frem2, Frem3 and collagen VII were present in the basement membrane of all the above-mentioned skin parts similar to the tail skin. However, Frem1 appeared to be absent from every spot examined. Thus, in contrast to the mouse embryonic epithelial basement membranes where all Fras1/Frem proteins are strictly colocalized, in the skin of newborns and adults, Fras1 and Frem2 remain detectable even in the absence of Frem1. This indicates strongly that Frem1 is not necessary for the stabilization of the Fras1/Frem2 complex in the basement membrane of adult mice.

Fras1/Frem in various tissues and organs

Thus far, we evaluated extensively the spatiotemporal relationship of all Fras1/Frem proteins and collagen VII in the adult mouse skin and we demonstrated the insignificance of Frem1 in the extracellular deposition of all the other proteins of the family. Previous studies have shown the localization patterns of Fras1/Frem proteins in various tissues

Fig. 1 Fras1/Frem2–3 and collagen VII colocalize in adult tail skin basement membranes. Images represent immunofluorescence labelling of Fras1/Frem proteins and collagen VII, on comparable sections from adult tail skin at P15 (*a, d, g, j, m*), P30 (*b, e, h, k, n*), P60 (*c, f, i, l, o*). Fras1 (*a–c*), Frem2 (*g–i*), Frem3 (*j–l*) and collagen VII (*m–o*), are evident in epithelial basement membranes (*arrows*) throughout the adult life. On the other hand, Frem1 (*d–f*) although it can be detected in the basement membrane, however, it also appears to be localized intracellularly at the level of basal keratinocyte layer. *e* epithelium, *cn* connective tissue. *Bar* = 120 μ m



and organs in a range of developmental stages (Chiotaki et al. 2007). Here, in order to complete the picture of their distribution during the adult stages as well, we performed

immunofluorescent studies on adult mouse kidneys (Fig. 5*a–e*), testes (Fig. 5*f–j*), guts (Fig. 5*k–o*), and esophaguses (Fig. 5*p–t*). Our data indicated that Frem3 was detect-

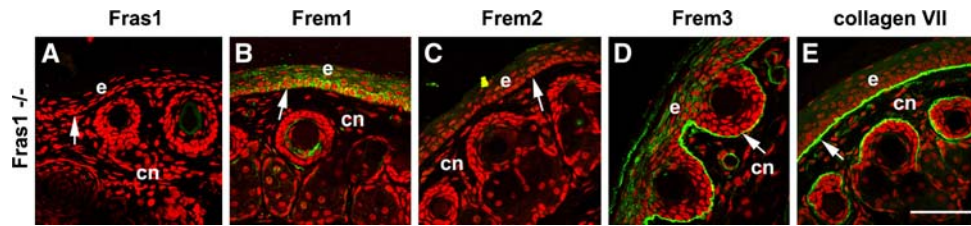
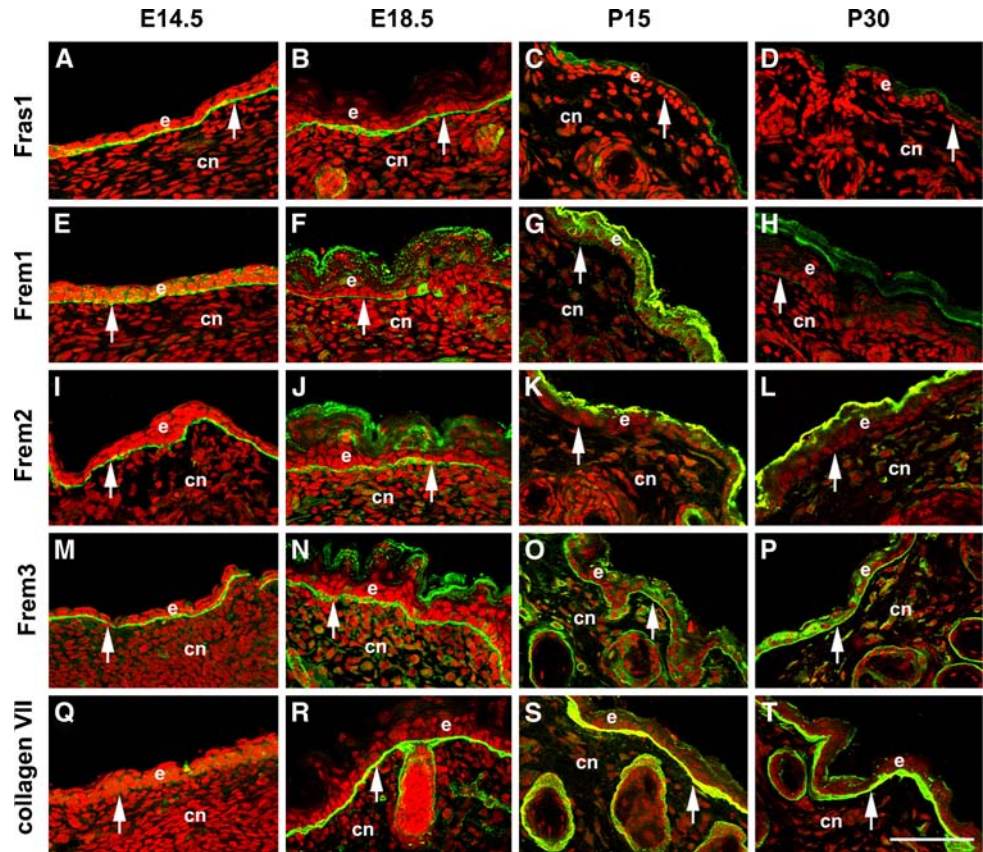


Fig. 2 Consequences of Fras1 depletion on the localization of Frem proteins and collagen VII, in adult (P30) mouse tail skin. Sections from *Fras1*^{-/-} tail biopsies were incubated with the indicated antibodies. Loss of Fras1 totally abolishes the basement membrane localization of Fras1 (a), Frem1 (b) and Frem2 (c) in the skin of *Fras1* homozygous

mutant mice. Nevertheless, Frem3 (d) and collagen VII (e) are both normally detected in the basement membranes (arrows) of epidermal epithelium and hair follicles. e epithelium, cn connective tissue. Bar = 120 μm

Fig. 3 Fras1/Frem and collagen VII protein detection in dorsal mouse skin. Fras1 (a–d) Frem1 (e–h) and Frem2 (i–l) were detected in dorsal skin basement membrane during the embryonic stages E14.5 (a, e, i) and E18.5 (b, f, j), while they are no longer detectable at P15 (c, g, k) or P30 (d, h, l) stages. Frem3 (m–p) on the other hand showed strong positive immunostaining in the basement membrane, throughout all stages examined. Collagen VII (q–t) signal detection was similar to Frem3, with the exception of E14.5 (q), where it is not yet evident. e epithelium, cn connective tissue. Bar = 120 μm



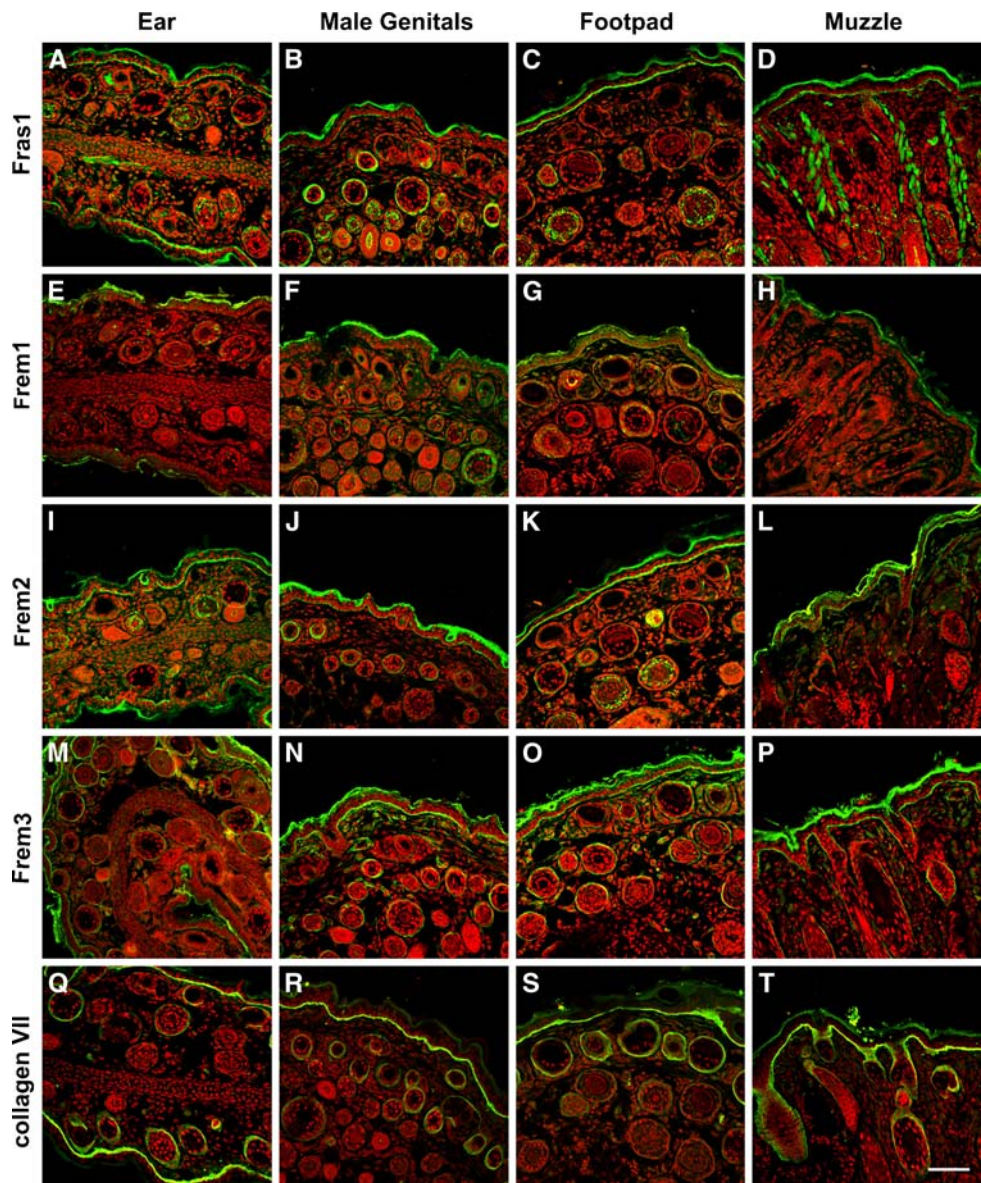
able in the basement membrane of all the aforesaid organs, including also the trachea and brain (data not shown). More specifically, we detected Frem3 in the basement membrane of kidney’s collecting tubules and renal corpuscles, gut’s villi, testis’s seminiferous tubules, and esophagus’s epithelium. Fras1 and Frem2 were only detected in the basement membrane of kidney (Fig. 5a, c, respectively), and trachea (data not shown), whereas collagen VII was localized solely in the basement membrane of esophagus (Fig 5t) and trachea (data not shown). On the other hand, we were unable to detect any positive immunostaining for Frem1 at any organ or tissue examined. Our results strongly indicate not only that Fras1, Frem2 and Frem3 can be anchored in the basement membrane without Frem1, but also that

Frem3 follows a distinct, independent, tissue distribution pattern. In essence, we were unable to locate a basement membrane where Fras1 is present but Frem2 is not or the opposite. Furthermore, although collagen VII appears to be at any basement membrane where Frem3 is distributed, Frem3 may also be localized in tissues where neither Fras1, Frem1, and Frem2, nor collagen VII are detected.

Discussion

Data presented in recent studies demonstrated that Fras1/Frem proteins are temporally and spatially strictly colocalized in the sublamina densa of murine embryonic epithelial

Fig. 4 Comparative immunodetection of Fras1/Frem and collagen VII proteins in various parts of the adult (P30) mouse skin. Fras1 (*a–d*), Frem2 (*i–l*), Frem3 (*m–p*) and collagen VII (*q–t*) are all evident in the basement membranes of all the adult skin parts examined (outer ear, male external genitalia, footpad and muzzle), opposite to Frem1 (*e–h*) which is totally absent. *e* epithelium, *cn* connective tissue. Bar = 120 μ m

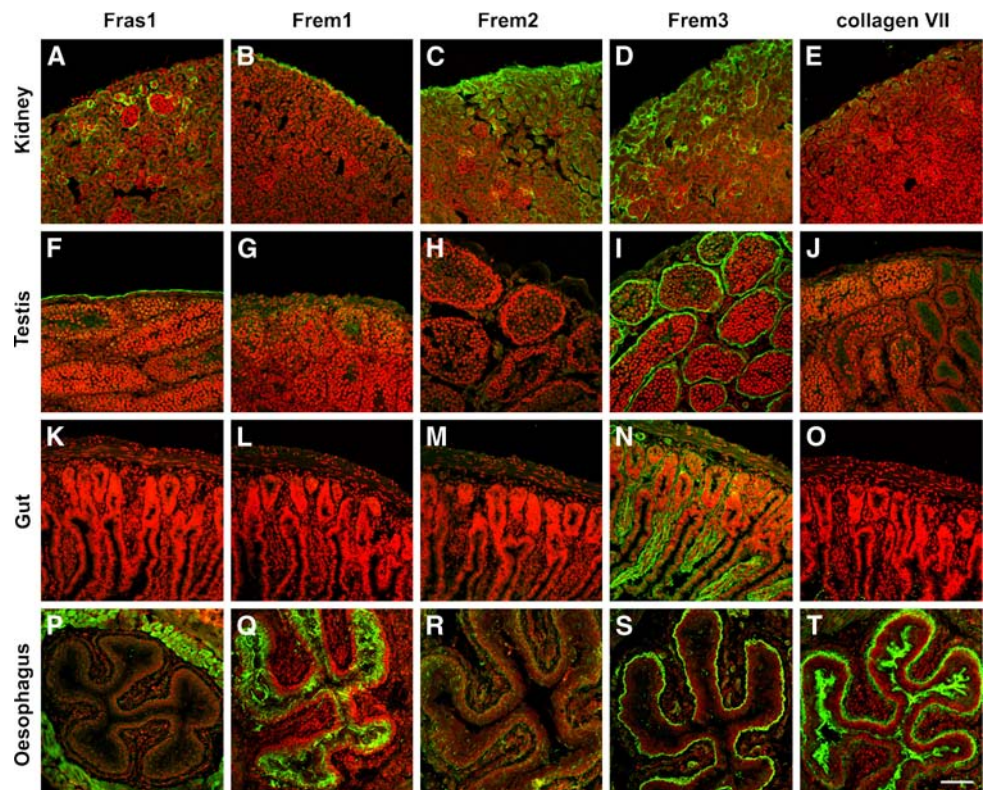


basement membranes such as skin, the epithelia of respiratory and gastrointestinal system, neural tube, brain and olfactory epithelium (Chiotaki et al. 2007). The detection profile of these proteins is in agreement with the finding that Fras1, Frem1 and Frem2 form an interdependent macromolecular protein complex which is stabilized by the simultaneous interaction of all the three proteins (Kiyozumi et al. 2006). Accordingly, absence of functional Fras1 or Frem2 in respective mouse mutants results in depletion of Frem1 and Frem2 or Fras1 and Frem1, respectively, from all embryonic epithelial basement membranes (Kiyozumi et al. 2007; Petrou et al. 2007b). Mutations in Frem1 strongly reduce the levels of Fras1 and Frem2 in the basement membranes (Kiyozumi et al. 2006). Since the major phenotypic feature of the aforementioned mouse mutants (bleb) is embryonic subepidermal skin blistering resulting

from dermal–epidermal detachment, these results suggest that Fras1/Frem1/Frem2 act synergistically through the same mechanism to confer dermal–epidermal cohesiveness during development. Interestingly, Frem3, for which so far no mouse mutants exist, is not affected by the disruption of the Fras1/Frem1/Frem2 complex, indicating that the stabilization of Frem3 in the basement membrane is independent of Fras1, Frem1 and Frem2.

In the present study, in order to move a step closer to the function and to the mechanisms connecting Fras1/Frem proteins, we focused on the characterization of their immunofluorescence localization profile in various tissues of the adult mouse. We also included type VII collagen, which is the major component of the anchoring fibrils, the attachment structures extending from the lower portion of the basement membrane to the underlying dermis (Tidman and

Fig. 5 Comparative distribution of Fras1/Frem proteins and Collagen VII in various epithelial basement membranes at P30. Frem3 (*d, i, n, s*) was evident in virtually all epithelial basement membranes examined. Fras1 (*a, f, k, p*) and Frem2 (*c, h, m, r*) could only be detected in renal epithelial basement membranes (*a, c*). Frem1 (*b, g, l, q*) was completely eliminated in all tissues inspected and collagen VII (*e, j, o, t*) appeared to be localized only in the basement membrane of esophagus (*t*). Bar = 120 μ m



Eady 1985; Keene et al. 1987; Bruckner-Tuderman et al. 1999) and whose targeted inactivation leads to a severe neonatal blistering phenotype, akin to the defects appearing in bleb mutant embryos (Heinonen et al. 1999).

Our results revealed the presence of all Fras1/Frem and collagen VII in adult tissues, however, in many cases with dissimilar detection patterns. While up to E16.5, Fras1/Frem proteins are still colocalized in all epithelial basement membranes, at E18.5 Frem1 is only barely detectable in basement membranes, mainly remaining intracellular. In contrast, collagen VII begins to be detected in the skin basement membrane when Frem1 declines and at E17.5 is nicely detectable. Although Frem1 is no longer localized in basement membranes from E18.5 and onwards, with the exception of adult tail skin where it was found to be deposited both in the basement membrane and intracellularly in basal keratinocytes, we were able to detect Fras1, Frem2, Frem3 in various epithelial basement membranes in adult mice.

Concerning the intracellular localization of Frem1, previous studies on mouse embryos also showed Frem1 to be localized, in distinct epidermal cell types, such as the peridermal layer, at around E16.5 (Petrou et al. 2007a). Since, periderm cells are known to participate in short-term epithelial fusions like embryonic eyelid closure, this distinct feature of Frem1 expression was correlated with “eyes open at birth phenotype”, a unique characteristic of Frem1 mouse mutants, which are born with open eyes (Petrou et al.

2007a). Regarding the intracellular localization of Frem1 in adult mouse tail skin at the site of basal keratinocytes, given that there is no obvious phenotype involving these cells it is difficult to contemplate upon a certain function. However, whether Frem1 is involved in the proliferation process of these cells remains to be determined.

The sites where Fras1, Frem2, Frem3 and collagen VII are colocalized include the basement membrane of tail, muzzle, male genitals, footpad and ear thought-out all the adult stages. Additionally, Frem3 and collagen VII are present in the basement membrane of dorsal and ventral skin, where Fras1 and Frem2 could not be detected. One very interesting common feature of the various aforementioned skin parts examined is that, the epidermal epithelium at these body sites is rather thin and also highly proliferative, as opposed to the dorsal or ventral skin. Importantly, the sole localization of Frem3 in skin parts where no other Fras1/Frem proteins are present is not surprising but rather confirms the findings of previous reports where it was shown that in *Fras1*^{-/-} embryos, only Frem3 is detectable in the epithelial basement membranes (Petrou et al. 2007b). The same holds true for collagen VII, which is not affected in bleb mouse mutants.

In contrast to the mouse embryonic epithelial basement membranes where all Fras1/Frem proteins are strictly colocalized, in certain parts of the skin of newborns and adults, Fras1 and Frem2, like Frem3, remain detectable even in the absence of visible amounts of Frem1. This indicates that

Frem1 is not necessary at least for a fundamental attachment of Fras1 and Frem2 in the basement membrane of adult mice. Nevertheless, whether this scrappy complex is stable and functional is not known and remains to be investigated. At this point, it is important to mention that according to previous studies, lack of functional Frem1 in embryos does not diminish Fras1 or Frem2 from the basement membrane, but rather results in a reduction of the protein levels. Thus, our results in adult tissues coincide with previous findings in embryos and it is not surprising that absence of Frem1 from the basement membrane of wild-type mice does not interfere with Fras1 and Frem2 deposition (Kiyozumi et al. 2006).

Furthermore, we proceeded to investigate the localization pattern of Fras1/Frem and collagen VII in various organs of the adult mouse. Again, Fras1 and Frem2 appeared to be colocalized solely in the basement membranes of renal tubules, while we were unable to trace positive Frem1 immunostaining in any of the tissues examined. Once more this provides indication of the independent basement membrane deposition of Fras1 and Frem2 from Frem1.

In contrast to the above, Frem3 was detected in every adult epithelial basement membrane studied, such as various parts of the skin, kidneys, testis, esophagus, gut and trachea (data not shown). Moreover, while collagen VII also seemed to colocalize with Frem3 in skin's and esophagus's basement membranes, however, their spatial localization seemed to be dissimilar in any other of the aforementioned basement membranes. Furthermore, although their detection pattern in skin is overlapping, nonetheless Frem3 begins to be localized very early during development while collagen VII much later. This indicates that at least in early stages, Frem3 functions independently from collagen VII and whether they function in concert at early post natal and adult stages remains to be established.

A point of interest emerging from the latter is that Frem3 is being detected in basement membranes where collagen VII is missing. Since Frem3 has not been linked to any bleb mutation yet, and the mouse knockout is not available, its biological function remains obscure. Yet, taking into account the similarities between Frem3 and collagen VII tissue distribution as well as the dissimilarities between Frem3 and Fras1, Frem1 and Frem2 in adult mice, we could assume that all these proteins may function in concert in similar pathways, but even more Frem3, is independent from all and is able to anchor in the basement membrane, possibly by being part of a different, independent protein complex. What's more, we were unable to detect Fras1, Frem2 or Frem1 at any basement membrane in the absence of Frem3 throughout developmental or adult stages.

Acknowledgments This work was supported by a grant from the Greek General Secretariat for Research and Technology (PENED 03EΔ779).

References

- Bruckner-Tuderman L, Hopfner B, Hammami-Hauasli N (1999) Biology of anchoring fibrils: lessons from dystrophic epidermolysis bullosa. *Matrix Biol* 18:43–54
- Chiotaki R, Petrou P, Giakoumaki E, Pavlakis E, Sitaru C, Chalepakis G (2007) Spatiotemporal distribution of Fras1/Frem proteins during mouse embryonic development. *Gene Expr Patterns* 7:381–388
- Dalezios Y, 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, Gossler A (1994) A mouse model for Fraser syndrome? *Clin Dysmorphol* 3:91–95
- Heinonen S, Mannikko M, Klement JF, Whitaker-Menezes D, Murphy GF, Uitto J (1999) Targeted inactivation of type VII collagen gene (Col7a1) I mice results in severe blistering phenotype: a model for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Cell Sci* 112:3641–3648
- Jadeja S, Smyth I, Pitera JE, Taylor MS, van Haelst M, Bentley E, McGregor L, Hopkins J, Chalepakis G, Philip N, Aytes AP, Watt FM, Darling SM, Jackson I, Woolf AS, Scambler PJ (2005) Identification of a new gene mutated in Fraser syndrome and mouse myelencephalic blebs. *Nat Genet* 37:520–525
- Keene DR, Sakai LY, Lunstrum GP, Morris NP, Burgeson RE (1987) Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol* 104:611–621
- Kiyozumi D, Sugimoto N, Sekiguchi K (2006) Breakdown of the reciprocal stabilization of QBRICK/Frem1, Fras1 and Frem2 at the basement membrane provokes Fraser syndrome-like defects. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:11981–11986
- Kiyozumi D, Sugimoto N, Nakano I, 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 Biol* 26:456–462
- McGregor 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 B, Woolf AS, Winter RM, Scambler PJ (2003) Fraser syndrome and mouse blebbed phenotype caused by mutations in FRAS1/Fras1 encoding a putative extracellular matrix protein. *Nat Genet* 34:203–208
- Nishiyama A, Dahlin KJ, Price JT, Johnstone SR, Stallcup WB (1991) The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan. *J Cell Biol* 114:359–371
- Pavlakis E, Chalepakis G (2007) pH-dependent antigen unmasking in paraformaldehyde-fixed tissue cryosections. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, in press
- Petrou P, Chiotaki R, Dalezios Y, Chalepakis G (2007a) Overlapping and divergent localization of Fras1 and Frem1 and its functional implications during embryonic development. *Exp Cell Res* 313:910–920
- Petrou P, Pavlakis P, Dalezios Y, Chalepakis G (2007b) Basement membrane localization of Frem3 is independent of the Fras1/Frem1/Frem2 protein complex within the sublamina densa. *Matrix Biol* 26:652–658

- Roebroek AJ, Creemers JW, Pauli IG, Kurzik-Dumke U, Rentrop M, Gateff EA, Leunissen JA, Van de Ven WJ (1992) Cloning and functional expression of Dfurin2, a Subtilisin-like proprotein processing enzyme of *Drosophila melanogaster* with multiple repeats of a cystein motif. *J Biol Chem* 267:17208–17215
- Sadler JE (1998) Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 67:395–424
- Schwarz EM, Benzer S (1997) Calx, a Na-Ca exchanger gene in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10249–10254
- Short K, Wiradjaja F, Smyth I (2007) Let's stick together: the role of the Fras1 and Frem proteins in epidermal adhesion. *IUBMB Life* 59:427–435
- Sitaru C, Mihai S, Otto C, Chiriac MT, Hausser I, Dotterweich B, Saito H, Rose C, Ishiko A, Zillikens D (2005) Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *J Clin Invest* 115:870–878
- Slavotinek AM, Tift 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, Scambler PJ (2005) The genetics of Fraser syndrome and the blebs mouse mutants. *Hum Mol Genet* 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 dermis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:13560–13565
- Staub E, Hinzmann B, Rosenthal A (2002) A novel repeat in the melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan defines a new protein family. *FEBS Lett* 527:114–118
- Takamiya K, Kostourou V, Adams S, Jadeja S, Chalepakis G, Scambler PJ, Haganir RL, Adams RH (2004) A direct functional link between the multi-PDZ domain protein GRIP1 and the Fraser syndrome protein Fras1. *Nat Genet* 36:172–177
- Tidman MJ, Eady RA (1985) Evaluation of anchoring fibrils and other components of the dermal-epidermal junction in dystrophic epidermolysis bullosa by a quantitative ultrastructural technique. *J Invest Dermatol* 84:374–377
- Timmer JR, Mak TW, Manova K, Anderson KV, Niswander L (2005) Tissue morphogenesis and vascular stability require the Frem2 protein, product of the mouse myelencephalic blebs gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11746–11750
- Vrontou S, Petrou P, Meyer BI, Galanopoulos VK, Imai K, Yanagi M, Chowdhury K, Scambler PJ, Chalepakis G (2003) Fras1 deficiency results in cryptophthalmos, renal agenesis and blebbed phenotype in mice. *Nat Genet* 34:209–214