

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΟΥ
ΠΑΠΑΣΩΖΟΜΕΝΟΥ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΥ

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ
ΥΠΕΡΔΟΜΙΚΗ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ
Fras1 ΣΤΟΝ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟ ΧΩΡΟ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΧΑΛΕΠΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΔΕΥΤΕΡΟΣ ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ
ΔΑΛΕΖΙΟΣ ΓΙΑΝΝΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2005

Στην μνήμη του αγαπημένου μου δασκάλου και
καθηγητή Βασίλη Γαλανόπουλου...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτερες ευχαριστίες μου στον αναπληρωτή καθηγητή Κυτταρικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης Γιώργο Χαλεπάκη καθώς και στον επίκουρο καθηγητή Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης Γιάννη Δαλέζιο, χωρίς την βοήθεια των οποίων δεν θα μπορούσα να ολοκληρώσω την διατριβή μου. Ο κύριος Χαλεπάκης ανέλαβε να με καθοδηγήσει ως επιστημονικός υπεύθυνος της διατριβής μου. Τον ευχαριστώ θερμά για όλες τις συμβουλές του και τις συζητήσεις που είχαμε σε θέματα Κυτταρικής Βιολογίας κατά την διάρκεια της διατριβής. Ευχαριστώ θερμά και τον κύριο Δαλέζιο για την πολύτιμη βοήθειά του στην εκτέλεση πρωτοκόλλων επεξεργασίας ιστών για ηλεκτρονική μικροσκοπία καθώς και στην παρατήρηση των δειγμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω επιπλέον ευχαριστίες στον κύριο Χαλεπάκη και στον κύριο Δαλέζιο για τις χρήσιμες και εύστοχες διορθώσεις που μου έκαναν ως οι δύο διορθωτές της διατριβής μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Παπαδογιωργάκη Εύα, που ως τεχνικός του εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης με βοήθησε στην πραγματοποίηση διαφόρων πρωτοκόλλων επεξεργασίας ιστών για ηλεκτρονική μικροσκοπία και στην εκμάθηση κοπής υπέρλεπτων τομών στην μικροτόμο. Θερμές ευχαριστίες και στην Σιάκουλη Σάντρα για την πολύτιμη βοήθειά της στην επεξεργασία των ηλεκτρονιογραφιών με τη χρήση του λογισμικού Adobe Photoshop. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Πέτρο Πέτρο για την παραχώρηση των εικόνων 6 και 7 καθώς και για την προσφορά όλων των ιστών που επεξεργάστηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας. Οι συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής ήταν πολύ σημαντικές.

Με την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, θα ήθελα να αφιερώσω τη δουλειά αυτή σε έναν εξαιρετικό καθηγητή, μα πάνω απ' όλα σε έναν υπέροχο άνθρωπο, που έφυγε τόσο νωρίς από τη ζωή, στον Βασίλη Γαλανόπουλο. Ως επίκουρος καθηγητής Κυτταρικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης,

υπήρξε ο αρχικά επιστημονικά υπεύθυνος της παρούσας διατριβής. Ο συμβουλευτικός του ρόλος και η καθοδήγησή του ως και τα μέσα της διατριβής υπήρξαν αναμφισβήτητα ανεκτίμητα. Η ηθική υποστήριξη, που αβίαστα μου παρείχε, σε ακαδημαϊκά και μη θέματα, θα με συντροφεύουν για μια ζωή...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--------------|---|
| SUMMARY..... | 8 |
|--------------|---|

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

| | |
|--|----|
| | 10 |
| 1.1. Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας | 10 |
| 1.1.1. Εξωκυττάρια ουσία | 10 |
| 1.1.2. Βασική μεμβράνη | 11 |
| 1.1.3. Η δομή της βασικής μεμβράνης του δέρματος | 13 |
| Ημιδεσμόσωμα | 13 |
| Lamina lucida | 14 |
| Lamina densa | 15 |
| Sub-lamina densa | 15 |
| 1.1.4. Ο ρόλος της βασικής μεμβράνης του δέρματος | 17 |
| 1.1.5. Πλάκες αγκυροβόλησης | 18 |
| 1.1.6. Ινίδια αγκυροβόλησης | 20 |
| 1.2. Στοιχεία για την Fras1 | 23 |
| 1.2.1 Προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία της Fras1 | 23 |
| 1.2.2. Περιγραφή του φαινοτύπου των <i>Fras1</i> ^{-/-} ποντικών..... | 24 |
| 1.2.3. Πειράματα εντοπισμού της Fras1 | 26 |
| 1.2.4. Σχέση της Fras1 με άλλες πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης | 28 |
| 1.2.5. «Bleb» μεταλλάξεις | 29 |
| Grip1 | 30 |
| Frem1 | 32 |
| Frem2 | 34 |
| 1.2.6. Συσχέτιση των «Bleb» μεταλλάξεων και της Fras1 με το σύνδρομο Fraser...35 | |
| Σύνδρομο Fraser | 36 |
| FRAS1 | 37 |
| FREM2 | 39 |
| 1.3. Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης | 40 |
| 1.4. Σκοπός της μελέτης | 43 |

| | |
|---|--------|
| ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 45 |
| 2.1. Ανοσοϊστοχημεία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου | 45 |
| 2.2. Είδη ανοσοϊστοχημικών τεχνικών ηλεκτρονικού μικροσκοπίου | 47 |
| 2.3. Ανοσοϊστοχημικές τεχνικές πριν την έγκλειση του ιστού | 47 |
| 2.4. Ανοσοϊστοχημικές τεχνικές μετά την έγκλειση του ιστού | 47 |
| 2.4.1. Ανοσοεντοπισμός σε τομές ιστού εγκλεισμένου σε εποξικές ρητίνες..... | 48 |
| 2.4.2. Μέθοδος βαθμιαίας μείωσης της θερμοκρασίας (μέθοδος PLT)..... | 48 |
| 2.4.3. Μέθοδος ψυκτοαντικατάστασης | 49 |
| 2.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την εφαρμογή της ανοσοϊστοχημείας στο ΗΜ...49 | |
| 2.5.1. Είδος μονιμοποιητικού μέσου (αλδεΰδες, τετροξείδιο του οσμίου)..... | 49 |
| 2.5.2. Θερμοκρασία μονιμοποίησης | 50 |
| 2.5.3. Είδη μέσων έγκλεισης (εποξικές και ακρυλικές ρητίνες) | 50 |
| 2.5.4. Χρονική διάρκεια μονιμοποίησης | 52 |
| 2.6. Pre-embedding πειράματα | 52 |
| 2.6.1. Ανοσοεντόπιση με τη μέθοδο του κολλοειδούς ανοσοχρυσού | 52 |
| 2.6.2. Τομές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας από το πείραμα του κολλοειδή ανοσοχρυσού | 54 |
| 2.7. Post-embedding πειράματα | 55 |
| 2.7.1. Διαδικασία έγκλεισης εμβρύων ποντικού (14.5 ημέρα) σε ρητίνη <i>LR- White</i> | 56 |
| 2.7.2. Διαδικασία έγκλεισης εμβρύων ποντικού (14.5 ημέρα) σε ρητίνη <i>Lowicryl HM20</i> με την PLT τεχνική | 57 |
| 2.7.3. Τομές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας | 61 |
| 2.7.4. Ανοσοϊστοχημεία ιστών εγκλεισμένων σε LR-White και Lowicryl HM20...61 | |
| 2.8. Φωτογραφίες - εμφάνιση φιλμ - επεξεργασία εικόνων | 62 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 64 |
| 3.1. Post-embedding | 64 |
| 3.2. Pre-embedding | 66 |
| 3.3. Εντοπισμός της <i>Fras1</i> με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης | 69 |
| 3.4. Σύνοψη αποτελεσμάτων | 75 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 76 |
| 4.1. Η <i>Fras1</i> εντοπίζεται στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa | 76 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2. Η Fras1 ως συστατικό της βασικής μεμβράνης διαφόρων εμβρυϊκών επιθηλίων | 78 |
| 4.3. Συσχέτιση ανάμεσα στη Fras1 και στις υπο-επιδερμικές φουσκάλες | 80 |
| 4.4. Η Fras1 ως πιθανό συστατικό του συμπλόκου αγκυροβόλησης | 81 |
| 4.5. Η πιθανή αλληλεπίδραση της Fras1 με άμορφες, ηλεκτρονικά πυκνά δομές | 84 |
| 4.6. Η πιθανή αλληλεπίδραση της Fras1 με τα ινίδια αγκυροβόλησης | 87 |
| 4.7. Μελλοντικά πειράματα | 89 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ | 92 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ. | 94 |

SUMMARY

Basement membranes are thin, sheet like arrangements of extracellular matrix proteins that serve a variety of functions including the physical separation of cell layers and tissues, molecular ultrafiltration and tissue morphogenesis. Electronmicroscopically, typical basement membranes display two distinct zones, the lamina lucida and lamina densa. The lamina lucida contains anchoring filaments that extend to the hemidesmosomes and mediate the attachment of the epithelial cells to the basement membrane. The anchoring of the basement membrane to the mesenchyme is ensured by anchoring fibrils that are associated with the lamina densa and transverse the underlying zone termed sub-lamina densa.

Fras1 gene, encodes a putative extracellular matrix multidomain protein (4010 amino acids) expressed from various epithelia of the developing embryo. *Fras1* is a putative extracellular matrix protein which has been implicated in the structural adhesion of embryonic epidermis to dermis. Moreover, mutations in *Fras1/FRAS1* have been associated with the mouse *blebbed* phenotype and the human rare genetic disorder Fraser syndrome, respectively. Loss of *Fras1* function results in the formation of subepidermal hemorrhagic blisters as well as unilateral or bilateral renal agenesis during mouse embryogenesis.

Previous reports demonstrated that dermal-epidermal separation upon blister formation in *Fras1*^{-/-} mutants occurs below the lamina densa, implying a role for *Fras1* at the level of basement membrane-mesenchymal adherence. In accordance with the previous, other reports indicate that *Fras1* is detected underneath the lamina densa of embryonic lung epithelia and exerts its function below the lamina densa. Yet, so far few data exist on the ultrastructural localization of *Fras1* within the extracellular space. We therefore performed immunogold labelling experiments in order to study the expression pattern of *Fras1* within extracellular space.

The aim of the present study was to investigate the ultrastructural immunolocalization of Fras1 within the basement membrane of the developing mouse skin epithelium and to compare with that of a different epithelium such as the esophagus. The epithelium of skin and esophagus that we studied is described as *stratified squamous*. We used a specific antibody against Fras1 in free floating sections of E14.5 mouse embryos. The protein was subsequently visualized on ultrathin sections as silver intensified gold particles. Ultrastructural immunogold labeling using antibodies raised against the central NG2-like domain of Fras1 detected the protein underneath the lamina densa of embryonic skin and esophagus. This finding is in accordance with the reported indications that Fras1 exerts its function below the lamina densa and is detected within sub-lamina densa of embryonic lung epithelia. Ultrastructural immunogold labeling experiments revealed identical expression pattern of Fras1 in both embryonic skin and esophagus. Notably, the deposition of the protein was also identical to the reported detection of Fras1 in embryonic lung epithelia. The above imply that Fras1 could be an indisputable component of embryonic basement membranes.

Fras1 detected in several ultra-thin sections to be anchored on amorphous electron dense structures located underneath lamina densa. The origin and molecular composition of these structures has to be studied in order to evaluate the importance of these finding. We propose that the Fras1 localization may be connected to a well studied component of basal membranes, anchoring fibrils. Recently, *Shimizu et al.* suggested that 90% of the anchoring fibrils originated and terminated in the lamina densa. Our data suggest that Fras1 is detected in the lower part of anchoring fibrils within sub-lamina densa. Whether there is a potential colocalization between Fras1 and Collagen VII which is the major structural component of the anchoring fibrils, remains to be determined. In conclusion, we demonstrate that Fras1 is an indisputable component of embryonic sub-lamina densa of basal membranes of stratified squamous epithelia.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας

1.1.1. Εξωκυττάρια ουσία

Η εξωκυττάρια ουσία (ΕΚΟ), παρουσιαζόταν πριν μερικά χρόνια ως στηρικτική δομή που βοηθάει στη συνοχή των κυττάρων και των ιστών μεταξύ τους. Σήμερα, πιστεύεται, ότι τα συστατικά της ΕΚΟ συμμετέχουν στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων, στην οργάνωση του κυτταρικού σκελετού και γενικά επιδρούν στην όλη δομή και λειτουργία των κυττάρων. Ο εξωκυττάριος χώρος στους ιστούς των σπονδυλωτών περιλαμβάνει κυρίως :

- Κολλαγόνο: το οποίο εμφανίζεται με περισσότερες από 18 διαφορετικές μορφές και αποτελεί την επικρατέστερη πρωτεΐνη στο συνδετικό ιστό, στο δέρμα, στον οστίτη ιστό, στις βασικές μεμβράνες κ.λ.π.
- Ελαστίνη: που αποτελεί ελαστικό συστατικό (πρωτεϊνικό) του συνδετικού ιστού.
- Γλυκοζαμινογλυκάνες ή βλεννοπολυσακχαρίτες: που αποτελούν μια μεγάλη ομάδα πολυσακχαριτών, όπως υαλουρονικό οξύ, θεική χονδροϊτίνη , ηπαράνη κ.ά.
- Πρωτεογλυκάνες: που αποτελούν σύμπλεγμα πρωτεΐνης με γλυκοζαμινογλυκάνες.
- Φιμπρονεκτίνη: που μεσολαβεί κατά τη σύνδεση της πλασματικής μεμβράνης με άλλα εξωκυττάρια μόρια.
- Ινωδογόνο: που συμμετέχει στην πήξη του αίματος.
- Λαμινίνη: που αποτελεί σημαντικό συστατικό των βασικών μεμβρανών.

Εξωκυττάρια δομές άλλων οργανισμών πλην των σπονδυλωτών είναι, το κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων, το επιδερμίδιο, το κέλυφος των

αυγών στα έντομα κ.ά. Ειδικότερα, το κυτταρικό τοίχωμα που περιβάλλει τα φυτικά κύτταρα είναι παχύτερο, περισσότερο αδιαπέραστο και δύσκαμπτο σε σχέση με την εξωκυττάρια ουσία των ζωικών κυττάρων. Οι ζωικοί οργανισμοί, περιέχουν πολλούς τύπους εξωκυττάριας ουσίας διαφορετικής μοριακής σύστασης, που ο καθένας εξειδικεύεται για μια συγκεκριμένη λειτουργία, όπως η μηχανική αντοχή, η διήθηση, η προσκόλληση κ.ά. Για παράδειγμα, τα λεία μυϊκά κύτταρα του τοιχώματος μιας αρτηρίας συνδέονται με ΕΚΟ που παρέχει ισχυρές αλλά εύκαμπτες συνδέσεις.

Οι ΕΚΟ, αποτελούνται από διαφορετικούς συνδυασμούς τύπων κολλαγόνου, οι οποίοι σχηματίζουν, είτε μακριές ίνες, είτε πορώδεις επιφάνειες μαζί με τον πολυσακχαρίτη υαλουρονικό οξύ και τις πρωτεογλυκάνες. Πρωτεΐνες πολλαπλής προσκόλλησης, είναι επίσης σημαντικά συστατικά της ΕΚΟ. Αυτές με τη σειρά τους, συνδέονται σε πρωτεΐνες υποδοχείς στις επιφάνειες των κυττάρων, καθώς και σε άλλα συστατικά της ΕΚΟ, προσδίδοντάς τους τις ιδιότητες που αναφέρθηκαν.

Ειδικά συστατικά της ΕΚΟ, είναι απαραίτητα για τη διαφοροποίηση των κυττάρων και χρειάζονται για να αποκτήσουν τις λειτουργίες ενός ειδικού κυτταρικού τύπου. Η μορφογένεση, το τελικό στάδιο της εμβρυϊκής ανάπτυξης κατά το οποίο επιτυγχάνεται η απόκτηση μορφής μέσω κυτταρικών μετακινήσεων και επαναδιευθετήσεων, εξαρτάται επίσης σημαντικά από τα μόρια ΕΚΟ. Σε αναπτυσσόμενους οργανισμούς, τα συστατικά της ΕΚΟ, συνεχώς ανανεώνονται, αποικοδομούνται και επανασυντίθενται τοπικά. Ακόμα και σε ενήλικες, παρατηρείται αποικοδόμηση και επανασύνθεση των συστατικών της ΕΚΟ σε περιοχές τραυματισμού (Μαργαρίτης, 2004).

1.1.2. Βασική μεμβράνη

Σε πολλούς ζωικούς ιστούς, όπως είναι η επιδερμίδα, υπάρχει μικρό μεσοκυττάριο διάστημα. Τα επιθήλια και οι άλλες οργανωμένες ομάδες κυττάρων (όπως ο μυς), επικάθονται πάνω και συνδέονται στενά με μια λεπτή ΕΚΟ που καλείται βασική μεμβράνη (BM). Η βασική μεμβράνη (basement membrane ή basal lamina), είναι ένα λεπτό στρώμα συστατικών

της εξωκυττάριας ουσίας που βρίσκεται στη βασική πλευρά των επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων το οποίο, είτε διαχωρίζει και ταυτόχρονα συνδέει τα επιθήλια με άλλους ιστούς, είτε περιβάλλει τα μυϊκά κύτταρα, τα λιποκύτταρα κ.λ.π. Συνήθως, έχει πάχος 40-120nm και συνδέει κύτταρα με τον υποκείμενο συνδετικό ιστό. Η ορολογία «membrane», δόθηκε πολύ πριν αποκαλυφθεί με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ότι δεν πρόκειται για λιπιδική διπλοστοιβάδα. Είναι σχεδόν βέβαιο, ότι τα κύτταρα προσκολλώνται στο σύμπλεγμα της βασικής μεμβράνης με τη βοήθεια μορίων ιντεγκρίνης και διστρογλυκάνης. Τα συστατικά της βασικής μεμβράνης συντίθενται, είτε από τα υποκείμενα κύτταρα του συνδετικού ιστού, είτε από τα επιθηλιακά κύτταρα.

Όλες οι βασικές μεμβράνες, περιέχουν ένα κοινό σύνολο πρωτεϊνών και γλυκοζαμινογλυκανών, όπως κολλαγόνο IV, πρωτεογλυκάνες θεικής ηπαράνης, περλεκάνης, εντακτινης ή νιδογόνου και λαμνίνης. Η βασική μεμβράνη καλείται συχνά ΕΚΟ τύπου IV, λόγω αφενός της σύστασής της σε κολλαγόνο τύπου IV και αφετέρου της ύπαρξης αυτής της πρωτεΐνης σε οποιαδήποτε βασική μεμβράνη. Το κολλαγόνο IV, σχηματίζει ένα δυσδιάστατο πλέγμα, ένα δίκτυο ως συρματόπλεγμα, που δίνει στη βασική μεμβράνη σχήμα και σταθερότητα. Τα συστατικά της βασικής μεμβράνης, είναι όλα απαραίτητα για τη σωστή λειτουργία ιστών και οργάνων. Οι άνθρωποι που πάσχουν από το σύνδρομο Alport, παρουσιάζουν μεταλλάξεις στα γονίδια των α-αλυσίδων του κολλαγόνου τύπου IV.

Οι βασικές μεμβράνες λειτουργούν ως μοριακά φίλτρα, συμμετέχουν στη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης, της μετανάστευσης των κυττάρων κ.α. Η βασική μεμβράνη εμποδίζει ακόμα τους ινοβλάστες του υποκείμενου συνδετικού ιστού να τη διαπεράσουν χωρίς όμως να αποτρέπει τη διέλευση άλλων κυττάρων, όπως μακροφάγων, λεμφοκυττάρων καθώς και νευρικών απολήξεων. Η μεγάλη λειτουργική σημασία της στοιβάδας αυτής καταδεικνύεται στις νευρομυϊκές συνάψεις, όπου περιβάλλει ολόκληρο το μυϊκό κύτταρο στην περιοχή της σύναψης, εξασφαλίζοντας τις απαραίτητες συνθήκες για τη γρήγορη διακίνηση των μορίων του νευροδιαβιβαστή αλλά και για την καθοδήγηση δημιουργίας νέας σύναψης στην ίδια θέση σε

περίπτωση καταστροφής και αντικατάστασης του μυϊκού κυττάρου. Η ανακύκλωση των συστατικών της BM είναι μάλλον πολύ αργή και σε ορισμένες περιπτώσεις φτάνει τις 100 μέρες (Μαργαρίτης, 2004).

1.1.3. Η δομή της βασικής μεμβράνης του δέρματος

Η βασική μεμβράνη του δέρματος (Basement-Membrane-Zone, BMZ), αναγνωρίζεται ιστολογικά ως μια κατασκευή πάχους 0.5-1.0μm, που εντοπίζεται μεταξύ του επιθηλίου και του υποκείμενου ιστού και η οποία σημαίνεται χρησιμοποιώντας την χρώση PAS (periodic acid-Schiff, Chan, 1997). Υπερμικροσκοπικές μελέτες αναγνώρισαν διακριτά δομικά συστατικά, όπως τα ημιδεσμοσώματα, τα νημάτια αγκυροβόλησης (anchoring filaments), τα ινίδια αγκυροβόλησης (anchoring fibrils), την lamina lucida (LL) και την lamina densa (LD). Περαιτέρω βιοχημικές και μοριακές μελέτες αποκάλυψαν τις ξεχωριστές πρωτεΐνες που δομούν τα συστατικά αυτά. Είναι ενδιαφέρον, ότι ορισμένες από τις πρωτεΐνες αυτές όπως το κολλαγόνο VII, η p105 και τα αντιγόνα *bullous pemphigoid*, αποτελούν στόχους αυτοάνοσων αντιδράσεων (Chan *et al.*, 1993). Έτσι, η μελέτη κάποιων αυτοάνοσων ασθενειών, πρόσφερε σημαντικά στην γνώση της δομής και λειτουργίας της BMZ. Μελετώντας την BMZ με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου μπορούμε να την χωρίσουμε σε τέσσερις διακριτές περιοχές οι οποίες από το επιθήλιο προς τον υποκείμενο συνδετικό ιστό είναι οι εξής :

1. hemidesmosome (ημιδεσμοσώμα) /upper lamina lucida
2. lower lamina lucida (LL)
3. lamina densa (LD)
4. sub-lamina densa

Ημιδεσμοσώμα

Το ημιδεσμοσώμα εντοπίζεται στην πλευρά της πλασματικής μεμβράνης κυττάρων που συνδέονται με την βασική μεμβράνη και περιλαμβάνει τη μισή δομή του δεσμοσώματος (δομή που παρατηρείται μεταξύ δύο γειτονικών κερατινοκυττάρων), δηλαδή μια μονή

ενδοκυτταροπλασματική πλάκα πάνω στην οποία προσδένονται τα τονοϊνίδια των βασικών κερατινοκυττάρων. Η πρωτεΐνη BP230 (BPAg1) εντοπίζεται στην ενδοκυτταρική πλευρά του ημιδεμοσώματος, ενώ η BP180 (BPAg2) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από μια ενδοκυτταρική περιοχή, ένα διαμεμβρανικό κομμάτι και μια εξωκυτταρική περιοχή η οποία προβάλλει στην LL (Giudice *et al.*, 1992). Η εξωκυτταρική περιοχή της BPAg2, περιλαμβάνει μια κολλαγονώδη περιοχή που διακόπτεται από 16 μη κολλαγονώδεις περιοχές. Η μεγαλύτερη από αυτές τις μη κολλαγονώδεις περιοχές, η NC16A, εντοπίζεται γειτονικά του διαμεμβρανικού τμήματος. Εκτός από την BPAg2, στην περιοχή αυτή, εντοπίζονται η ιντεγκρίνη $\alpha_6\beta_4$ (μέλος της οικογένειας των ιντεγκρινών) και η πλεκτίνη, μια πρωτεΐνη προσκόλλησης που σχετίζεται με τον κυτταροσκελετό (Liu *et al.*, 1996).

Lamina lucida

Εντοπίζεται μεταξύ του ημιδεμοσώματος και της LD και φαίνεται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ως μια ηλεκτρονικά διαυγής ζώνη. Παρόλα αυτά, σε αυτή την περιοχή μπορούμε να διακρίνουμε δομές ινιδίων που ονομάζονται νημάτια αγκυροβόλησης. Τα ινίδια αυτά, εκτείνονται από το ημιδεμοσώμα μέχρι την LD διασχίζοντας την LL. Ένα από τα συστατικά των ινιδίων αυτών, είναι μέλος της οικογένειας των λαμινών, η λαμινίνη-5 (Rousselle *et al.*, 1991; Marinkovich *et al.*, 1992). Η οικογένεια των λαμινινών, περιλαμβάνει ένα σύνολο ετεροτριμερών διαφόρων συνδυασμών τριών αλυσίδων α , β και γ που συντίθενται και εκκρίνονται από κερατινοκύτταρα (Timpl and Brown, 1994). Η λαμινίνη-6, παλαιότερα γνωστή ως k-λαμινίνη, είναι ένα ακόμη μέλος αυτής της οικογένειας και η παρουσία της εντοπίζεται αποκλειστικά σε βασικές μεμβράνες που περιέχουν νημάτια αγκυροβόλησης. Η λαμινίνη-6, (ετεροτριμερές $\alpha_3\beta_1\gamma_1$), εκκρίνεται από επιδερμικά κύτταρα και εμφανίζει δομικές και ανοσολογικές ομοιότητες με δύο άλλες λαμινίνες που εντοπίζονται στην LL, την λαμινίνη-1 (ετεροτριμερές $\alpha_1\beta_1\gamma_1$) και την λαμινίνη-5 (ετεροτριμερές $\alpha_3\beta_3\gamma_2$) (Marinkovich *et al.*, 1992). Επιπλέον, μια πρωτεΐνη 105kDa που

ονομάζεται p105 χαρακτηρίστηκε πρόσφατα ως αποτέλεσμα μελετών αυτοάνοσων ασθενειών. Περαιτέρω βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι διαφορετική από την γ_2 αλυσίδα της λαμινίνης-5 που έχει μέγεθος επίσης 105kDa (Chan *et al.*, 1996). Επίσης, σε αυτή την περιοχή, εντοπίζεται και μια άλλη γλυκοπρωτεΐνη, η εντακτίνη. (Tsao *et al.*, 1990).

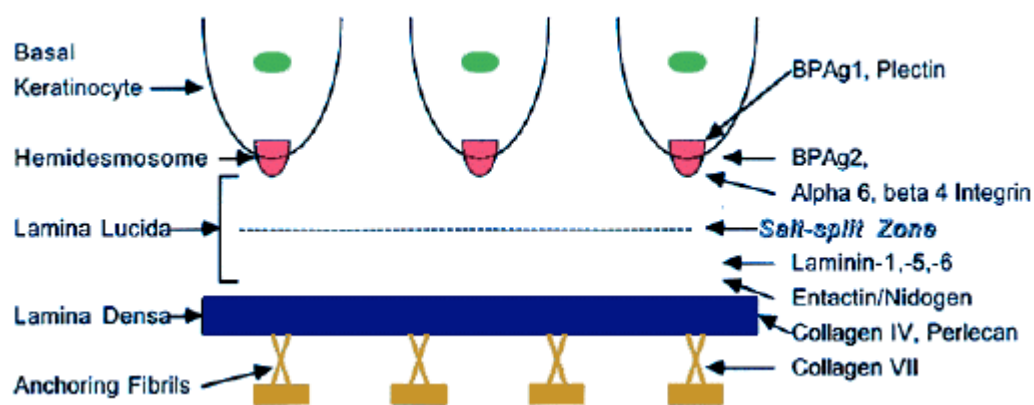
Lamina densa

Η LD ονομάστηκε έτσι εξαιτίας της ηλεκτρονικά πυκνής δομής που φαίνεται να έχει στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Πολλοί επιστήμονες θεωρούν την LD ως την πραγματική βασική μεμβράνη. Το πάχος της LD κυμαίνεται μεταξύ 35 και 45 nm. Το κολλαγόνο IV θεωρείται ως το κύριο συστατικό αυτής της περιοχής, ενώ άλλα συστατικά της βασικής μεμβράνης που εντοπίζονται σε αυτή την περιοχή είναι η περλεκάνη και πιθανώς η λαμινίνη-6 (Kuhn, 1994; Lozzo, 1994; Chan *et al.*, 1997).

Sub-lamina densa

Κάτω από την LD, υπάρχουν δομές ινιδίων που ενώνουν την LD με τις επονομαζόμενες πλάκες αγκυροβόλησης. Τα ινίδια αυτά, είναι γνωστά ως ινίδια αγκυροβόλησης και το βασικό συστατικό τους είναι το κολλαγόνο VII (Sakai *et al.*, 1986). Το κολλαγόνο VII, κωδικοποιείται από το γονίδιο COL7A1 στη χρωμοσωμική περιοχή 3p21 (Christiano *et al.*, 1994a). Το γονίδιο αυτό, μεγέθους 32kb περιέχει 118 εξόνια, που αποτελεί τον μεγαλύτερο αριθμό εξονίων οποιουδήποτε μέχρι σήμερα γνωστού γονιδίου. Το mRNA μετάγραφο, μεγέθους 8,9kb μεταφράζεται σε ένα προπεπτίδιο [proa1(VII)] αποτελούμενο από 2944 αμινοξέα (Christiano *et al.*, 1994b). Το κολλαγόνο VII, είναι μια πρωτεΐνη 290kDa που συντίθεται και εκκρίνεται τόσο από κερατινοκύτταρα όσο και από ινοβλάστες. Το ώριμο κολλαγόνο VII, όπως όλα τα μόρια κολλαγόνου, αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες [proa1(VII)]₃. Πιο συγκεκριμένα, το προκολλαγόνο VII είναι ομοτρίμερές και κάθε μονομερές αποτελείται από μια κεντρική μεγάλη κολλαγονώδη τριπλής έλικας περιοχή 145kDa, μια μη κολλαγονώδη

αμινοτελική περιοχή 145kDa NC1 (NC: non-collagenous) και μια μη κολλαγόνωδη καρβοξυτελική περιοχή 145kDa NC2 (Burgesson, 1993). Η κολλαγόνωδης περιοχή αποτελείται από επαναλήψεις GLY-X-Y που διπλώνουν σε μορφή τριπλής έλικας. Η έλικα αυτή διακόπτεται 19 φορές από μικρές μη κολλαγόνωδεις αλληλουχίες, που κυμαίνονται από 1-39 κατάλοιπα. Οι αλληλουχίες αυτές πιστεύεται ότι προσδίδουν ελαστικότητα στο μόριο του κολλαγόνου VII, χαρακτηριστικό απαραίτητο, για τις λειτουργίες που πιθανώς να επιτελεί ως βασικό δομικό συστατικό των ινιδίων αγκυροβόλησης. Φαίνεται, ότι είτε όλη, είτε ένα μέρος της περιοχής NC2 απομακρύνεται πρωτεολυτικά προτού εισέλθει στην BMZ. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός, ότι δεν υπάρχει σήμανση του αντισώματος ενάντια στην NC2 περιοχή στην BMZ (Bruckner-Tuderman *et al.*, 1995). Η περιοχή NC1 είναι αυτή που αλληλεπιδρά με άλλα μόρια. Εκτός από τα ινίδια αγκυροβόλησης, υπάρχουν και άλλα ινίδια που εντοπίζονται σε αυτήν την περιοχή όπως oxytalan, elaunin και ελαστικές ίνες.



Σχήμα 1. Σχηματικό διάγραμμα της βασικής μεμβράνης του δέρματος. Με τα βέλη υποδεικνύονται οι σχετικές θέσεις των συστατικών της BMZ. (BP=bullus pemphigoid, Ag=antigen). Η *salt-split zone* δείχνει περίπου, την περιοχή διαχωρισμού του δέρματος όταν σε αυτό επιδράσουν χημικά, όπως 1M NaCl, ή 20mM Na-EDTA. (Chan, 1997)

1.1.4. Ο ρόλος της βασικής μεμβράνης του δέρματος

Η κύρια λειτουργία της βασικής μεμβράνης του δέρματος (BMZ), είναι η σύνδεση και ταυτόχρονα ο διαχωρισμός της δερμίδας από την επιδερμίδα και κατ' επέκταση η διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του δέρματος. Οι αποδείξεις για το ρόλο αυτό της BMZ προέχονται από παρατηρήσεις διαφόρων κληρονομήσιμων ασθενειών του δέρματος που χαρακτηρίζονται από ελαττωματικές πρωτεΐνες της BMZ εξαιτίας μεταλλαγών που έγιναν στα αντίστοιχα γονίδια που τις κωδικοποιούν. Η δερματική ασθένεια Συνδετική Πομφολυγώδης Επιδερμόλυση (*Junctional Epidermolysis Bullosa*, JEB), η οποία χαρακτηρίζεται από ελαττωματική λαμινίνη-5, BP180 ή β₄ ιντεγκρίνη, εκδηλώνεται κλινικά με ευθραυστότητα του δέρματος και με τον υποδερμικό σχηματισμό πομφολύγων σε τραυματισμένες περιοχές του δέρματος (Vidal *et al.*, 1995). Παρόμοια κλινική εικόνα, εκδηλώνει και μια άλλη δερματική ασθένεια, η Δυστροφική Πομφολυγώδης Επιδερμόλυση (*Dystrophic Epidermolysis Bullosa*, DEB), η οποία χαρακτηρίζεται από ελαττωματική σύνθεση του κολλαγόνου VII εξαιτίας γενετικών μεταλλαγών (Dunnill, 1996).

Ο κύριος αυτός ρόλος της BMZ υποστηρίζεται και από εργαστηριακά στοιχεία. Η λαμινίνη-5 που αποτελεί βασικό συστατικό της LL, έχει δειχθεί ότι ενώνεται ισχυρά με τις ιντεγκρίνες α₃β₁ και α₆β₄ στην πλασματική μεμβράνη των βασικών επιθηλιακών κυττάρων (Carter *et al.*, 1991) (Niessen *et al.*, 1994). Παρόλα αυτά, έχει χαμηλή συγγένεια δέσμευσης με την εντακτίνη, που δρα ως συνεκτικό δίκτυο μεταξύ λαμινίνης-1 και κολλαγόνου VII (Brown *et al.*, 1994). Η υψηλή συγγένεια της λαμινίνης-1 προς την εντακτίνη, οφείλεται στο τέταρτο *EGF-like repeat domain III* της γ₁ αλυσίδας το οποίο απουσιάζει από την λαμινίνη-5 (Mayer *et al.*, 1993). Παρομοίως, υψηλή συγγένεια για την εντακτίνη εμφανίζουν τόσο η λαμινίνη-2 όσο και η λαμινίνη-4 που και οι δύο έχουν την γ₁ αλυσίδα (Brown *et al.*, 1994). Με δεδομένο, ότι και η λαμινίνη-6 έχει αυτή τη γ₁ αλυσίδα, πιθανώς να εμφανίζει και αυτή συγγένεια δέσμευσης με την εντακτίνη. Η NC1 περιοχή του κολλαγόνου VII, εμφανίζει μεγάλη ομολογία με την A περιοχή του αιμορραγικού παράγοντα von Willebrand καθώς και

με τις III-like επαναλήψεις της φιμπρονεκτίνης (Chen *et al.*, 1997). Μια ευκαρυωτικά εκφρασμένη ανασυνδυσασμένη πλήρους μήκους NC1 πρωτεΐνη δείχθηκε, ότι παρουσιάζει ειδικές αλληλεπιδράσεις με τα συστατικά της LL, το σύμπλοκο λαμινίνης -5/6 και με συστατικά της δερμίδας όπως φιμπρονεκτίνη και κολλαγόνο τύπου I (Chen *et al.*, 1997).

Οι αλληλεπιδράσεις των διαφόρων μορίων της BMZ μπορούν να παρουσιαστούν ως εξής:

- Οι ιντεγκρίνες $\alpha_3\beta_1$ και $\alpha_6\beta_4$ δρουν ως υποδοχείς για την λαμινίνη-5 και λαμινίνη-5/λαμινίνη-1 αντίστοιχα.
- Η λαμινίνη-5 σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την λαμινίνη-6
- Η λαμινίνη-1 και η λαμινίνη-6 αλληλεπιδρούν με την εντακτίνη, η οποία με τη σειρά της αλληλεπιδρά με το κολλαγόνο IV.
- Το κολλαγόνο IV αλληλεπιδρά με το κολλαγόνο VII το οποίο με τη σειρά του αλληλεπιδρά τόσο με το σύμπλοκο λαμινίνης-5/λαμινίνης-6 όσο και την φιμπρονεκτίνη και το κολλαγόνο τύπου I.

Με όλες αυτές τις αλληλεπιδράσεις των μορίων της BMZ, επιτυγχάνεται η σύνδεση δερμίδας-επιδερμίδας. Ο ρόλος αυτός ενισχύεται και από κλινικά δεδομένα αυτοάνοσων υποδερμικών παθήσεων, των οποίων η παθογενής αιτία σχετίζεται με διαταραχές των συστατικών της BMZ λόγω αυτοαντισωμάτων. Εκτός από τον κύριο ρόλο της, η BMZ επιτελεί και πολλές άλλες λειτουργίες μεταξύ των οποίων, συμβάλλει στην κυτταρική μετακίνηση και γενικότερα στον μεταβολισμό και στην ανάπτυξη των κυττάρων, δεσμεύει και αποθηκεύει αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες, στηρίζει τους ιστούς και τους συνδέει με το υποκείμενο ή περιβάλλον μεσέγγχυμα, εμποδίζει την παθητική διέλευση μακρομορίων, κυττάρων ή νευρικών απολήξεων κ.ά.

1.1.5. Πλάκες αγκυροβόλησης

Πρόκειται για άμορφες ηλεκτρονικά-πυκνές δομές που εντοπίζονται στην περιοχή της sub-lamina densa. Μελετώντας τις με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για ανεξάρτητες

«νησίδες» ηλεκτρονικά πυκνού υλικού, των οποίων η σύνδεση με την lamina densa επιτυγχάνεται μόνο διαμέσου των ινιδίων αγκυροβόλησης.

Με πειράματα ανοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και με τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στο καρβοξυτελικό άκρο των μορίων κολλαγόνου VII, διαπιστώθηκε ότι η σήμανση δεν περιοριζόταν μόνο στην ακριβώς υποκείμενη περιοχή της lamina densa (πράγμα λογικό από τη στιγμή που το κολλαγόνο VII αποτελεί βασικό δομικό συστατικό των ινιδίων αγκυροβόλησης που εντοπίζονται σε αυτήν τη περιοχή), αλλά επεκτεινόταν και στις πλάκες αγκυροβόλησης. Τα πειράματα αυτά έδειξαν, ότι η καρβοξυτελική περιοχή του κολλαγόνου VII εντοπίζεται τόσο στην lamina densa όσο και στις πλάκες αγκυροβόλησης (Keene *et al.*, 1987).

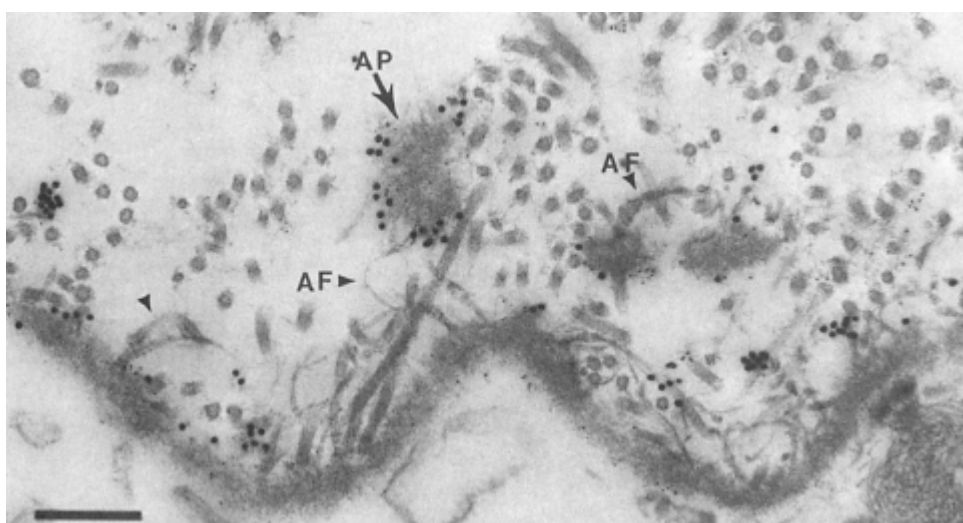
Από τη στιγμή, που υπερμικροσκοπικά, οι πλάκες αγκυροβόλησης μοιάζουν με την lamina densa, μελετήθηκε το κατά πόσο περιέχουν κολλαγόνο IV χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια στο συγκεκριμένο τύπο κολλαγόνου. Τα πειράματα έδειξαν την ίδια ακριβώς σήμανση με αυτή των προαναφερθέντων πειραμάτων για την καρβοξυτελική περιοχή του κολλαγόνου VII. Για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω, διενεργήθηκαν πειράματα διπλής σήμανσης για το κολλαγόνο IV και την καρβοξυτελική περιοχή του κολλαγόνου VII (σχήμα 1). Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων έδειξαν ξεκάθαρα τον συνεντοπισμό του κολλαγόνου IV και της καρβοξυτελικής περιοχής του κολλαγόνου VII τόσο στην lamina densa όσο και στις πλάκες αγκυροβόλησης (Keene *et al.*, 1987).

Η κατανομή των πλακών αγκυροβόλησης στο ανθρώπινο δέρμα, έχει μελετηθεί εκτενώς σε διάφορες ηλικίες και περιοχές του σώματος και τα αποτελέσματα υποδηλώνουν, ότι η μέση απόσταση αυτών από την lamina densa είναι 341nm (Keene *et al.*, 1987).

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, εντοπίστηκαν τόσο ινίδια αγκυροβόλησης, όσο και πλάκες αγκυροβόλησης, ενώ η αλληλεπίδραση των ινιδίων αγκυροβόλησης με τις πλάκες αγκυροβόλησης ήταν εμφανής σε όλες τις περιπτώσεις. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας δείχνουν ότι οι πλάκες αγκυροβόλησης, είναι ένα χαρακτηριστικό, που υπερμικροσκοπικά

συναντάται πάντα ανεξάρτητα από την προέλευση του δέρματος ενώ ο αριθμός αυτών δεν φαίνεται να διαφοροποιείται σημαντικά με βάση την ηλικία.

Όσον αφορά το δέρμα νεογέννητου ανθρώπου, η μέση απόσταση των πλακών αγκυροβόλησης από την lamina densa, υπολογίστηκε στα 341nm, ενώ μόνο 2.4% των πλακών αγκυροβόλησης απείχαν περισσότερο από τη lamina densa σε σχέση με το μέγιστο μήκος των ινιδίων αγκυροβόλησης (800nm).



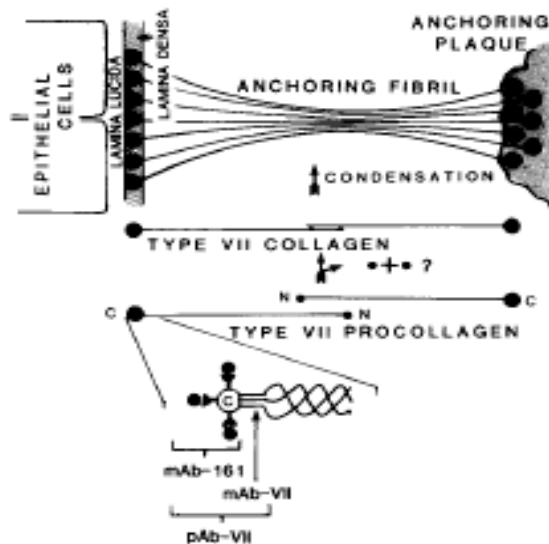
Εικόνα 1. Διπλός ανοσοεντοπισμός της καρβοξυτελικής περιοχής του κολλαγόνου VII και του κολλαγόνου IV στην περιοχή ένωσης δερμίδας-επιδερμίδας της ανθρώπινης ακροποσθίας. Το δεύτερο αντίσωμα για το κολλαγόνο VII είναι συζευγμένο με κόκκους χρυσού διαμέτρου 15nm και το δεύτερο αντίσωμα για το κολλαγόνο IV είναι συζευγμένο με κόκκους χρυσού διαμέτρου 5nm. AP: πλάκες αγκυροβόλησης, AF: ινίδια αγκυροβόλησης (Keene *et al.*, 1987)

1.1.6. Ινίδια αγκυροβόλησης

Τα ινίδια αγκυροβόλησης, ξεκινούν από την lamina densa (LD) και εκτείνονται στον υποκείμενο συνδετικό ιστό. Το μήκος των ινιδίων αυτών είναι περίπου 800nm και κάθε ένα, φαίνεται να ξεκινάει από την LD και

είτε να αγκυροβολεί στις πλάκες αγκυροβόλησης, είτε να ξαναγυρίζει στην LD. Συχνά, τα ινίδια αγκυροβόλησης παγιδεύουν ινίδια κολλαγόνου στην δερμίδα, ενισχύοντας έτσι, τη σύνδεση επιδερμίδας-δερμίδας. Τα ινίδια αγκυροβόλησης περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1987 (Keene *et al.*, 1987) και από τότε επικρατεί σύγχυση στην βιβλιογραφία σχετικά με τον προσανατολισμό αυτών των ινιδίων. Σύμφωνα με τον Shimizu και τους συνεργάτες του, το 90% των ινιδίων αγκυροβόλησης ξεκινούν και τερματίζουν στην LD (Shimizu *et al.*, 1997), ενώ πολλές φορές θεωρούνται ότι ενώνουν τις πλάκες αγκυροβόλησης μεταξύ τους (Keene *et al.*, 1987).

Το κύριο δομικό συστατικό των ινιδίων αγκυροβόλησης, είναι το κολλαγόνο VII. Κατά τη διάρκεια της ινιδογένεσης, μονομερή του κολλαγόνου VII, σχηματίζουν αντιπαράλληλα διμερή που ενώνονται ομοιοπολικά με δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα άκρα του προκολλαγόνου VII και κατ' επέκταση των ινιδίων αγκυροβόλησης αποτελούνται από μεγάλες και πολύπλοκες σφαιρικές περιοχές (Lunstrum *et al.*, 1986). Τα προκύπτοντα διμερή, αφού πρωτεολυθούν κατάλληλα (διάσπαση της περιοχής NC2), συναθροίζονται πλευρικώς κατά ομάδες δημιουργώντας έτσι τα ινίδια αγκυροβόλησης (Bruckner-Tuderman 1999, Σχήμα 2). Η υπερμικροσκοπική μελέτη των ινιδίων αγκυροβόλησης, δείχνει ότι, συνήθως δεν εμφανίζονται σε πλήρη επιμήκυνση, πράγμα που υποδηλώνει την ευλυγισία της τριπλής έλικας του κολλαγόνου VII. Παρόλα αυτά, τα ινίδια αγκυροβόλησης σε πλήρη επιμήκυνση πλησιάζουν το μήκος των μορίων κολλαγόνου VII.



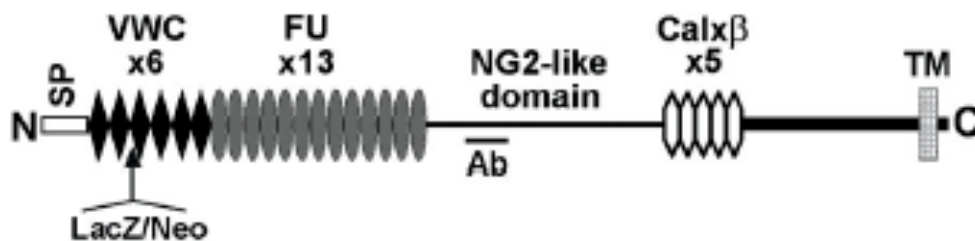
Σχήμα 2. Η υποθετική σχέση μεταξύ κολλαγόνου VII και ινιδίων αγκυροβόλησης (Keene *et al.*, 1987)

Μέχρι σήμερα, υπάρχουν αρκετά στοιχεία που να υποδηλώνουν ότι τα ινίδια αγκυροβόλησης περιέχουν και άλλες πρωτεΐνες εκτός από το κολλαγόνο VII. Για παράδειγμα, τα μονοκλωνικά αντισώματα AF1 και AF2, παρόλο που δεν αλληλεπιδρούν με το κολλαγόνο VII (Goldsmith and Briggaman, 1983), έχουν εντοπισθεί με πειράματα ανοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας στα ινίδια αγκυροβόλησης. Άλλο ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το GDA-J/F3, αναγνωρίζει μια μη κολλαγονώδη πρωτεΐνη 50kDa η οποία με πειράματα ανοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας εντοπίστηκε στο σημείο επαφής των ινιδίων αγκυροβόλησης με την LD. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη αυτή σχετίζεται με το κολλαγόνο VII και τα ινίδια αγκυροβόλησης από τη στιγμή που σε πολλούς ασθενείς που πάσχουν από DEB (με μεταλλαγμένο ή ανύπαρκτο κολλαγόνο VII), η πρωτεΐνη αυτή απουσιάζει (Gayraud *et al.*, 1997).

1.2. Στοιχεία για την *Fras1*

1.2.1 Προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία της *Fras1*

Το γονίδιο *Fras1* του ποντικού χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 5 κοντά στο *D5Mit20* και κωδικοποιεί πρωτεΐνη 4010 αμινοξέων. Η *Fras1* με βάση την προβλεπόμενη αμινοξική της αλληλουχία (SMART, Simple Modular Architecture Research Tool), διακρίνεται σε ξεχωριστές πρωτεϊνικές περιοχές, οι οποίες έχουν ταυτιστεί με συγκεκριμένες λειτουργίες και οι οποίες εντοπίζονται σε διαφορετικές πρωτεΐνες ποικίλων οργανισμών. Η διαφορά της *Fras1* με αυτές τις πρωτεΐνες είναι, ότι μόνο η *Fras1* περιλαμβάνει όλες αυτές τις περιοχές, καθώς οι άλλες πρωτεΐνες, περιλαμβάνουν μόνο μία τέτοια περιοχή η καθεμία. Πιο συγκεκριμένα, ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο της *Fras1* απαντώνται οι παρακάτω πρωτεϊνικές περιοχές (Σχήμα 3):



Σχήμα 3. Προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία του γονιδίου *Fras1*. Στο σχήμα απεικονίζονται με βάση το πρόγραμμα SMART πιθανές περιοχές της προβλεπόμενης αμινοξικής αλληλουχίας του γονιδίου *Fras1*. Ab: Η περιοχή της *Fras1* που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση των κουνελιών και την παραγωγή του πολυκλωνικού αντισώματος anti-*Fras1* (Vrontou *et al.*, 2003).

- Signal peptide (2-22 aa): Πρόκειται για ένα πιθανό πεπτίδιο σινιάλο, για την εισαγωγή της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και την ολοκλήρωση της σύνθεσής της.
- VWC (von Willebrand factor (vWF) type C domain) (27-417 aa): Πρόκειται για μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες, που περιέχει 6

επαναλαμβανόμενα μοτίβα, που συναντώνται στην περιοχή C του αιμορραγικού παράγοντα Von Willebrand.

- FU (Furin-like repeats) (418-1095 aa): Πρόκειται για μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες, που περιέχει 13 επαναλαμβανόμενα μοτίβα, που εντοπίζονται στις πρωτεάσες της οικογένειας των φουρινών και τα οποία δεν συμπίπτουν με το καταλυτικό κέντρο των πρωτεασών αυτών.
- Ομόλογη περιοχή με την NG2 (1104-2520 aa) Πρόκειται για μια περιοχή της τάξεως περίπου 1500 αμινοξέων, που παρουσιάζει ομολογία με την NG2 πρωτεογλυκάνη, η οποία εντοπίζεται στα θηλαστικά και προσδένει θεϊκή χονδροϊτίνη.
- Calx beta (Domains in Na-Ca exchangers and integrin-beta4) (2566-3130 aa): Πρόκειται για πέντε μοτίβα πρόδεσης ασβεστίου, που συναντώνται σε ιοντοανταλλάκτες Na^+ - Ca^{+2} .
- Transmembrane segment (3895-3924 aa): Πρόκειται για μια πιθανή διαμεμβρανική περιοχή.

1.2.2. Περιγραφή του φαινοτύπου των *Fras1*^{-/-} ποντικών

Τα αποτελέσματα της απενεργοποίησης του *Fras1* έχουν μελετηθεί σε δύο στελέχη ποντικού, στο NMRI (ετερομικτικό, outbred) και στο C57BL/10 (ομομικτικό, inbred), στην F5 γενεά. Τα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τα οποία εκδηλώνονται σε αυτά τα ποντίκια είναι τα εξής :

- ✓ Εμφάνιση αιμορραγικών πομφολύγων
- ✓ Εμφάνιση κρυπτοφθαλμίας και συνδακτυλίας
- ✓ Νεφρικές ανωμαλίες
- ✓ Σκελετικά προβλήματα
- ✓ Προβλήματα στους πνεύμονες

Οι διασταυρώσεις των ετερόζυγων ποντικών στο στέλεχος C57BL/10, δεν παράγουν ομόζυγους απογόνους για το τροποποιημένο αλληλόμορφο του γονιδίου *Fras1*, γεγονός που υποδηλώνει την εμβρυϊκή θνησιμότητα των απογόνων αυτών. Την ημέρα 11.5 της εμβρυογένεσης, τα έμβρυα απαντώνται στην αναμενόμενη μεντελική συχνότητα και δεν παρουσιάζουν

καμία φαινοτυπική ανωμαλία. Ωστόσο, τα έμβρυα την ημέρα 12.5 της εμβρυογένεσης, εμφανίζουν δερματικές φουσκάλες, που εντοπίζονται κυρίως στο κεφάλι και στην περιοχή των ματιών και συχνά στο ακραίο τμήμα των άκρων. Αρχικά, είναι γεμάτες από διάφανο υγρό, ενώ σταδιακά από διαφανείς γίνονται κόκκινες, γεγονός που μπορεί να ερμηνευτεί υποστηρίζοντας, ότι το διάφανο χρώμα στα πρώτα στάδια εξέλιξης της φουσκάλας μπορεί να είναι πλάσμα του αίματος, ενώ στην συνέχεια με την είσοδο ερυθρών αιμοσφαιρίων, οι φουσκάλες γίνονται αιμορραγικές. Τελικά, τα έμβρυα, πιθανώς λόγω επιπλοκών που προκύπτουν από την παρατηρούμενη αιμορραγία, πεθαίνουν μεταξύ της 14.5 και 16.5 ημέρας της εμβρυογένεσης.

Σε αντίθεση με τα ομόζυγα έμβρυα του στελέχους C57BL/10, το 50% των ομόζυγων εμβρύων του στελέχους NMRI επιβιώνουν και αναπτύσσονται φυσιολογικά. Σχεδόν τα μισά από τα νεογέννητα ομόζυγα άτομα, πεθαίνουν εντός του πρώτου μήνα της ζωής τους, ενώ αυτά που επιβιώνουν χρειάζονται τρεις μήνες για να αναρρώσουν πλήρως. Θα πρέπει να τονιστεί, ότι μεγάλες αιμορραγικές φουσκάλες, εμβρυϊκά προσχηματισμένες, δεν έχουν εντοπισθεί ποτέ σε ομόζυγα νεογέννητα στην περιοχή του κεφαλιού, γεγονός που υποδηλώνει, ότι πιθανόν οι φουσκάλες στην περιοχή αυτή να δρουν απαγορευτικά στην επιβίωση των εμβρύων.

Τα ενήλικα ομόζυγα άτομα του στελέχους NMRI εμφανίζουν κλειστά βλέφαρα, είτε και στα δύο μάτια (σε ποσοστό 20%), είτε στο ένα μάτι (σε ποσοστό 75%). Το υπόλοιπο 5%, παρουσιάζει μερικώς κλεισμένα βλέφαρα, που συνοδεύονται από περιορισμένο άνοιγμα των βλεφάρων. Ανατομία του δέρματος που καλύπτει την περιοχή των ματιών με κλειστά βλέφαρα, έδειξε τη μόνιμη σύνδεση των βλεφάρων (ύπαρξη κρυπτοφθαλμίας). Εκτός από τις συγχωνεύσεις των βλεφάρων, παρατηρούνται συγχωνεύσεις στο 90% των ομόζυγων *Fras1*^{-/-} ποντικών στα δάχτυλα των άκρων και ιδιαίτερα των πίσω.

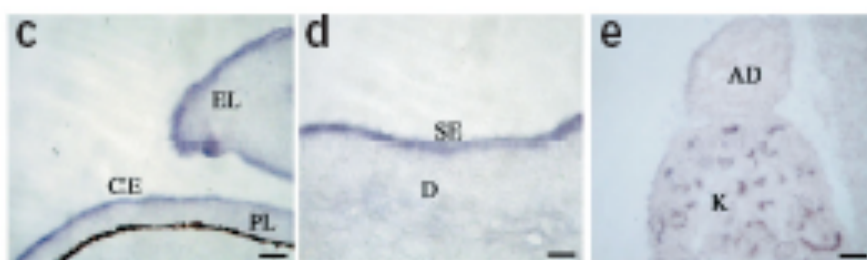
Ιστολογική ανάλυση διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων ομόζυγων εμβρύων τόσο του στελέχους C57BL/10 όσο και του στελέχους NMRI αποκάλυψε την μονόπλευρη αγενεσία (σε ποσοστό 30% των εμβρύων με νεφρικές ανωμαλίες) και την αμφίπλευρη αγενεσία (σε ποσοστό 50% των

εμβρύων με προβλήματα στα νεφρά). Πιο συγκεκριμένα, σε έμβρυα E15.5 εντοπίστηκε μονόπλευρη ή αμφίπλευρη νεφρική αγενεσία στο 50% όλων των περιπτώσεων. Η νεφρική αγενεσία εντοπίστηκε και στα ενήλικα ομόζυγα άτομα του στελέχους NMRI σε ποσοστό 50%.

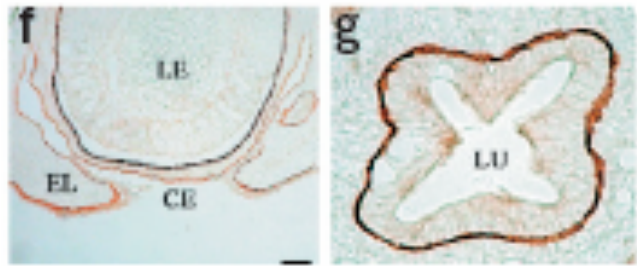
Σε αναλογία με τη συγχώνευση των βλεφάρων και των δακτύλων, διαπιστώθηκε συγχώνευση και των οστών στις αποφύσεις των δακτύλων. Πιο συγκεκριμένα, σε 40 ομόζυγα ποντίκια του στελέχους NMRI που μελετήθηκαν, διαπιστώθηκε η εμφάνιση διοχιδούς ξιφοειδούς απόφυσης του στέρνου τους και στο 5-10% αυτών συνοστέωση των ακανθωδών αποφύσεων των σπονδύλων και λείανση ή κολόβωση των δοντιών τους (Vrontou *et al.*, 2003)).

1.2.3. Πειράματα εντοπισμού της *Fras1*

Με πειράματα RNA *in situ* υβριδοποίησης εντοπίστηκαν τα μετάγραφα του γονιδίου *Fras1* στο επιθήλιο της επιδερμίδας (εικόνα 2), καθώς και στο επιθήλιο διαφόρων αναπτυσσόμενων οργάνων όπως εντέρου, στομάχου και σε εσωτερικά επιθήλια, όπως αυτό του μετανεφρού (εικόνα 3). Σε συμφωνία με την επιθηλιακή προέλευση του mRNA του *Fras1*, η *Fras1* εντοπίστηκε στην βασική πλευρά των επιθηλίων.

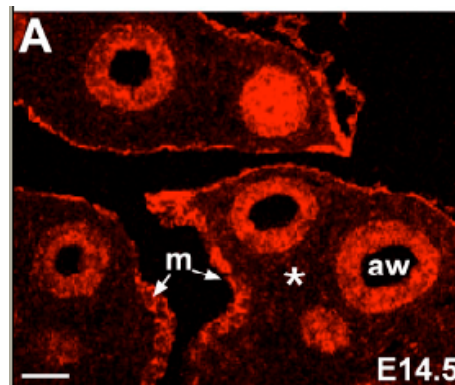


Εικόνα 2. RNA *in situ* υβριδοποίηση σε έμβρυα αγριού τύπου E14.5. Εντοπίστηκαν, τα *Fras1* μετάγραφα, στο επιθήλιο του κερατοειδή χιτώνα (CE) και του βλεφάρου (EL), στο επιθήλιο του δέρματος (SE) και στο εσωτερικό επιθήλιο του αναπτυσσόμενου νεφρού (K). AD: adrenal gland, D: dermis, PL: pigment layer of the retina (Vrontou *et al.*, 2003).

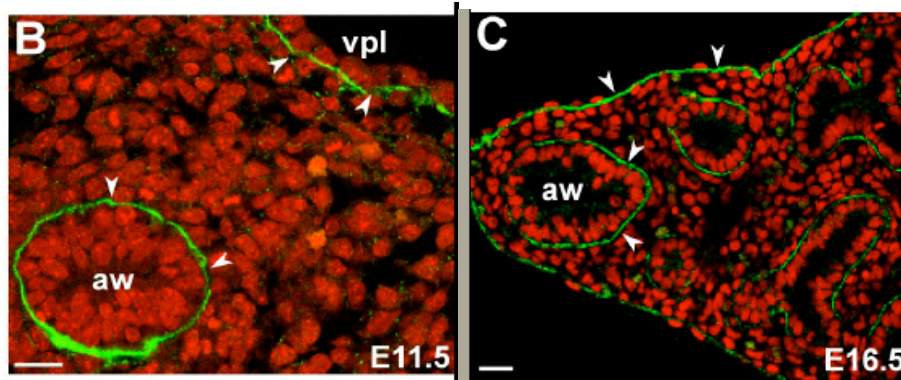


Εικόνα 3. Εντοπισμός της *Fras1* σε έμβρυα αγρίου τύπου E14.5. Η *Fras1* εντοπίστηκε, στη βασική επιφάνεια του επιθηλίου του κερατοειδή χιτώνα (CE), του επιθηλίου του βλεφάρου (EL) και του επιθηλίου του εντέρου. LU: lumen of the gut (Vrontou S., *et al.*, 2003).

Με μια σειρά πειραμάτων, μελετήθηκε η έκφραση του *Fras1*, στους πνεύμονες σε έμβρυα ποντικών *Fras1^{+/+}* E14.5 και διαπιστώθηκε ενδογενής έκφρασή του στο επιθήλιο των βρόγχων, αλλά όχι στο μεσέγχυμα (εικόνα 4). Επίσης, μελετήθηκε η έκφραση της *Fras1* σε έμβρυα ποντικού E11.5 και E16.5 και διαπιστώθηκε ο εντοπισμός της στο επιθήλιο των βρόγχων (εικόνα 5).



Εικόνα 4. Εντοπισμός του *Fras1* σε έμβρυα ποντικών *Fras1^{+/+}* E14.5. Το *Fras1* εντοπίστηκε στα μεσοθυλιακά κύτταρα (m: mesothelial cells) και στο επιθήλιο των βρόγχων (aw: conducting airways), αλλά όχι στο μεσέγχυμα (*, Petrou *et al.*, 2005).



Εικόνα 5. Εντοπισμός της Fras1 σε έμβρυα ποντικών E11.5 και E16.5. Η Fras1 εντοπίστηκε στο επιθήλιο των βρόγχων (aw: conducting airways) και στον υπεζωκότα (visceral pleura, vpl; Petrou, *et al.*, 2005)

1.2.4. Σχέση της Fras1 με άλλες πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης

Πειράματα ανοσοφθορισμού έδειξαν, πως το πρότυπο έκφρασης άλλων γνωστών πρωτεϊνών της βασικής μεμβράνης, όπως της λαμνίνης α5 και του κολλαγόνου VII, δεν αλλάζει στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια, σε σχέση με τα αγρίου τύπου. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει ότι η απουσία της *Fras1* δεν διαταράσσει, τουλάχιστον έντονα, τη δομή της βασικής μεμβράνης. Το κολλαγόνο VI σε αγρίου τύπου ζώα, εντοπίζεται στον συνδετικό ιστό καθώς και στην βασική μεμβράνη του δέρματος. Σε *Fras1*^{-/-} ποντίκια, εντοπίζεται μόνο στον συνδετικό ιστό που υπόκειται της βασικής μεμβράνης του δέρματος και όχι στην βασική μεμβράνη. Η μη συσσώρευση κολλαγόνου VI στην βασική μεμβράνη του δέρματος, μπορεί να εξηγηθεί, από την ενδεχόμενη, άμεση αλληλεπίδραση αυτής της πρωτεΐνης με την *Fras1*. Επειδή στα *Fras1*^{-/-} ποντίκια απουσιάζει η *Fras1*, αν όντως αλληλεπιδρούν αυτές οι πρωτεΐνες μεταξύ τους, τότε μπορεί να δικαιολογηθεί η απουσία του κολλαγόνου VI από την περιοχή της βασικής μεμβράνης. Ένα επιπλέον στοιχείο που στηρίζει την παραπάνω υπόθεση είναι, το γεγονός, ότι η κεντρική περιοχή της *Fras1*, σχετίζεται με την πρωτεογλυκάνη NG2, η οποία έχει δειχθεί ότι *in vitro* αλληλεπιδρά με τα κολλαγόνα τύπου V και VI (Tillet *et al.*, 1997).

1.2.5. «Bleb» μεταλλάξεις

Απενεργοποίηση του γονιδίου *Fras1* προκαλεί φαινότυπο όμοιο με αυτό των *blebbed (bl)* ποντικών, που μαζί με τα *eye blebs (eb)*, *myelencephalic blebs (my)*, *head blebs (heb)* και *fetal hematoma (fh)* αποτελούν την οικογένεια των «Bleb» μεταλλάξεων. Τα ποντίκια που φέρουν αυτές τις μεταλλάξεις χαρακτηρίζονται από τη δημιουργία υπό-επιδερμικών αιμορραγικών πομφολύγων κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, μονόπλευρη ή αμφίπλευρη νεφρική αγενεσία ή δυσγενεσία, συνδακτυλία και συνένωση βλεφάρων (Darling and Gossler, 1994). Τέσσερις από τις πέντε «Bleb» μεταλλάξεις (*bl*, *eb*, *my* και *heb*), έχουν ήδη χαρτογραφηθεί σε διαφορετικά χρωμοσώματα, ενώ η πέμπτη μετάλλαξη ακόμη δεν έχει χαρτογραφηθεί (Darling and Gossler, 1994). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τα πολύ όμοια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των «Bleb» ποντικών, υποδηλώνει, ότι τουλάχιστον τέσσερα από τα «Bleb» γονιδιακά προϊόντα, είτε δρουν συνεργατικά, είτε ανεξάρτητα, σε διακριτά συσχετιζόμενα όμως μεταξύ τους μονοπάτια.

Μελέτες αποκάλυψαν, ότι μετάλλαξη του γονιδίου *Fras1* προκαλεί τον φαινότυπο *blebbed (bl)* των ποντικών (McGregor *et al.*, 2003). Με τις «Bleb» μεταλλάξεις σχετίζονται, εκτός από το γονίδιο *Fras1*, τα γονίδια *Grip1*, *Frem1* και *Frem2*. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την *Grip1* (Glutamate receptor interacting protein), βρέθηκε μεταλλαγμένο στα *eye blebs* (Takamiya *et al.*, 2004) και το γονίδιο *Frem1* (*Fras1-related-extracellular-matrix-gene*), βρέθηκε μεταλλαγμένο στα *head blebs* (Smyth *et al.*, 2004). Επίσης, το γονίδιο *Frem2* βρέθηκε μεταλλαγμένο στα *myelencephalic blebs (my)*, (Jadeja *et al.*, 2005). Ενδιαφέρον είναι ότι τα προϊόντα των γονιδίων *Grip1* και *Frem1* είναι συσχετιζόμενα με την *Fras1*, είτε δομικά είτε λειτουργικά. Η *Grip1*, έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την καρβοξυτελική κυτταροπλασματική ουρά της *Fras1* και ότι ευθύνεται για την μεταφορά της *Fras1* στην βασική πλευρά πολωμένων επιθηλίων. Η *Frem1*, εμφανίζει πολλές κοινές δομικές περιοχές με την *Fras1* και για το λόγο αυτό θεωρείται ότι συσχετίζεται δομικά με την *Fras1*. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι τα γονίδια που είναι μεταλλαγμένα στις «Bleb»

μεταλλάξεις κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται, είτε δομικά, είτε λειτουργικά με την *Fras1*, που αποτελεί και το βασικό μέλος της οικογένειας αυτών των μεταλλάξεων (Petrou *et al.*, 2005).

Grip1

Η *Grip1*, (Glutamate receptor-interacting protein1) είναι μια πρωτεΐνη, που αποτελείται αποκλειστικά από PDZ περιοχές. Οι PDZ (Postsynaptic density-95/Discs large/Zona occludens-1) περιοχές, είναι τμήματα πρωτεϊνών, που ευθύνονται για τις πρωτεϊνικές τους αλληλεπιδράσεις. Αποτελούνται συνήθως από 80-100 αμινοξικά κατάλοιπα και εντοπίζονται σε πολλές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (Sheng and Sala, 2001). Συνήθως, αναγνωρίζουν και προσδένονται στο καρβοξυτελικό άκρο πρωτεϊνών, όπως διαμεμβρανικών υποδοχέων, μορίων συνάφειας και διαύλων ιόντων. Πιο συγκεκριμένα, αναγνωρίζουν ένα υδρόφοβο αμινοξύ στο καρβοξυτελικό άκρο και τουλάχιστον τα τρία αμινοξέα που προηγούνται αυτού του αμινοξέος. Διαφορετικές PDZ περιοχές, αναγνωρίζουν και προσδένονται σε διαφορετικές καρβοξυτελικές αλληλουχίες (Songyang *et al.*, 1997). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός, ότι οι PDZ περιοχές είναι σπάνιες στη ζύμη (yeast), αλλά άφθονες σε μετάζωα, υποδηλώνοντας ότι είναι χρήσιμες σε πιο πολύπλοκους οργανισμούς.

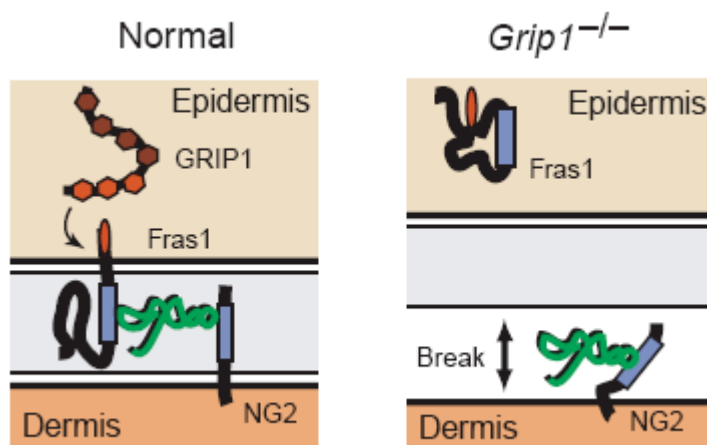
Η *Grip1* των θηλαστικών, αποτελείται από 7 PDZ περιοχές και αλληλεπιδρά διαμέσου των PDZ4 και PDZ5 με το καρβοξυτελικό-SVKI μοτίβο των υπομονάδων *GluR2* και *GluR3* των μετασυναπτικών υποδοχέων του γλουταμικού τύπου AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; Wyszynski *et al.*, 1999). Επιπλέον, η *Grip1* συμμετέχει στην τοποθέτηση και την συγκέντρωση των AMPA υποδοχέων. Στον ποντικό, η *Grip1* εκφράζεται από την ημέρα 10 της εμβρυογένεσης και προηγείται της έκφρασης των AMPA υποδοχέων. Σε αντίθεση με την *Grip1*, η *Grip2/ABP* (προϊόν συγγενούς γονιδίου με αυτό του *Grip1*), εκφράζεται παράλληλα με τους AMPA υποδοχείς και η έκφρασή της αυξάνεται μετά την γέννηση του ποντικού. Πιθανώς, η *Grip1* και η *Grip2* να έχουν ακόμη μεγαλύτερο ρόλο στη σηματοδότηση των συνάψεων, γιατί μπορούν να

ενώνονται μέσω της PDZ6 περιοχής τους στον υποδοχέα EphB2/EphA7 τυροσίνης κινάσης και στον ephrin-B1 ligand (Lin *et al.*, 1999).

Για την μελέτη του ρόλου των Grip1 και Grip2 *in vivo*, πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων σε ποντίκια (Takamiya *et al.*, 2004). Η απενεργοποίηση του γονιδίου *Grip1*, προκάλεσε αποκόλληση της επιδερμίδας στην στοματική και ρινική κοιλότητα και δημιούργησε μεγάλες υποεπιδερμικές αιμορραγικές φουσκάλες και θνησιμότητα στο μέσο της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Οι φουσκάλες δημιουργήθηκαν την ημέρα E11 κάτω από το επίπεδο της βασικής μεμβράνης στην επιδερμίδα του κεφαλιού, της ράχης και των άκρων και στην αρχή ήταν διαφανείς αλλά προοδευτικά έγιναν εξαιρετικά αιμορραγικές. Τα περισσότερα ομόζυγα *Grip1*^{-/-} ποντίκια πέθαναν την ημέρα 13.5 της εμβρυογένεσης, ενώ σε όλα απουσίαζαν οι νεφροί την ημέρα 13 της εμβρυογένεσης. Αντίθετα, η απενεργοποίηση του γονιδίου *Grip2* δεν προκάλεσε κάποιον φαινότυπο και δεν παρατηρήθηκε εμβρυϊκή θνησιμότητα.

Ο φαινότυπος που παρατηρήθηκε στα ομόζυγα *Grip1*^{-/-} ποντίκια, ήταν πολύ όμοιος με τον ήδη γνωστό φαινότυπο στα ομόζυγα *Fras1*^{-/-} ποντίκια. Έτσι προέκυψε το ερώτημα κατά πόσο σχετίζονται μεταξύ τους η Grip1 και η Fras1. Με πειράματα ανοσοφθορισμού, διαπιστώθηκε ότι το πρότυπο έκφρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών ήταν πολύ όμοιο σε πολλούς εμβρυϊκούς ιστούς, όπως δέρμα, στοματική και ρινική κοιλότητα, και γαστρεντερικό σύστημα. Επίσης, παρατηρήθηκε συνεντοπισμός των δύο πρωτεϊνών στην βασική πλευρά των κυττάρων της επιδερμίδας, στην περιοχή δηλαδή, ένωσης επιδερμίδας-δερμίδας. Με πειράματα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, αποδείχθηκε, ότι η Fras1 διαμέσου της καρβοξυτελικής κυτταροπλασματικής περιοχής της, αλληλεπιδρά με την PDZ1 περιοχή της Grip1 (Takamiya *et al.*, 2004). Μετάλλαξη σε αυτή την περιοχή της Fras1, καθιστά αδύνατη την αλληλεπίδραση Fras1 και Grip1. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από τα *in vivo* πειράματα ανοσοφθορισμού και τα πειράματα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, παρατηρήθηκε συνεντοπισμός των δύο

πρωτεϊνών σε κυτταροπλασματικές δομές κυστιδίων σε καλλιέργειες κερατινοκυττάρων.



Σχήμα 4. Μοντέλο αλληλεπίδρασης της Fras1 με την Grip1. Με πράσινο χρώμα συμβολίζονται οι πρωτεΐνες κολλαγόνο V και κολλαγόνο VI (Takamiya *et al.*, 2004)

Σύμφωνα με το ισχύον μοντέλο (σχήμα 4), η Grip1 είναι απαραίτητη για την μεταφορά της Fras1 εξωκυτταρικά. Ο παρόμοιος φαινότυπος σε ομόζυγα *Fras1^{-/-}* και *Grip1^{-/-}* άτομα εξηγείται εύκολα, με δεδομένο ότι στα *Fras1^{-/-}* άτομα απουσιάζει τελείως η Fras1 και στα *Grip1^{-/-}* άτομα, παρόλο που παράγεται κανονικά η Fras1, δεν μπορεί να βρεθεί εξωκυτταρικά λόγω έλλειψης της Grip1. Επίσης, στο προτεινόμενο μοντέλο (σχήμα 4), συμβολίζονται τα κολλαγόνα V και VI, τα οποία, με βάση τα μέχρι τώρα δεδομένα, φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την Fras1 και την NG2 (Takamiya K., *et al.*, 2004)

Frem1

Μία κατηγορία των «Bleb» μεταλλάξεων, είναι και η *heb* (*head blebs*), στην οποία ο φαινότυπος χαρακτηρίζεται από κρυπτοφθαλμία. Σε αυτά τα ζώα, το γονίδιο *Frem1* (*Fras1-related extracellular matrix gene*), έχει υποστεί μετάλλαξη. Το γονίδιο αυτό αποτελεί μέλος μιας οικογένειας γονιδίων των χορδωτών, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες εξελικτικά διακριτές από την Fras1.

Η προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία του *Frem1*, εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με αυτή του *Fras1*. Πιο συγκεκριμένα, ένα συντηρημένο πεπτίδιο σινιάλο, τα μοτίβα πρόσδεσης ασβεστίου και τα CSPG στοιχεία, που περιγράφηκαν για πρώτη φορά στην πρωτεογλυκάνη NG2 και στη συνέχεια σε άλλες πρωτεΐνες διαφόρων οργανισμών, αποτελούν κοινά στοιχεία των προβλεπόμενων αμινοξικών αλληλουχιών των γονιδίων *Frem1* και *Fras1*. Παρόλη την ομοιότητά τους, η *Frem1* δεν έχει τα μοτίβα των φουρινών και την C περιοχή του αιμορραγικού παράγοντα von Willebrand (που υπάρχουν στην *Fras1*), αλλά εμφανίζει επιπλέον μια καρβοξυτελική lectin type C περιοχή. Το γεγονός, ότι η *Frem1* στερείται τις περιοχές εκείνες της *Fras1* που φέρονται να αλληλεπιδρούν με την *Grip1*, υποδηλώνει, ότι η *Frem1* δεν αλληλεπιδρά κατά πάσα πιθανότητα άμεσα με την *Grip1*. Μελέτες έδειξαν, ότι το *Frem1* γονίδιο, αποτελείται από 36 εξόνια και ότι κωδικοποιεί πρωτεΐνη 2.191 αμινοξικών καταλοίπων. Με τη χρήση μοντέλου (*hidden Markov*), χαρακτηρίστηκαν δύο ομόλογα γονίδια, το *Frem2* και το *Frem3* καθώς και ορθόλογα γονίδια αυτών σε διάφορα άλλα είδη. Οι προβλεπόμενες αμινοξικές αλληλουχίες και των τριών αυτών γονιδίων φέρονται να έχουν CSPG περιοχές και πολλαπλές συντηρημένες θέσεις N-γλυκοζυλίωσης υποδεικνύοντας, ότι οι πρωτεΐνες αυτές επιδέχονται έντονη μεταμεταφραστική τροποποίηση.

Μελέτες κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης των ποντικών, αποκάλυψαν, ότι το *Frem1* εκφράζεται σε πολλές αναπτυσσόμενες επιδερμικές αποφύσεις (π.χ. βλεφαρίδες, μαστικό αδένες κ.α.). Επιπλέον πειράματα, έδειξαν ότι η έκφραση του *Frem1* είναι υψηλότερη σε κύτταρα του δέρματος και μάλιστα σε αυτά που υπόκεινται της επιδερμίδας του κεφαλιού, των βλεφάρων και των άκρων. Δύο διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου *Frem1* (*heb* και *bat*) προκαλούν παρόμοιο φαινότυπο. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της εμβρυϊκής επιδερμίδας αγρίου τύπου και *bat*, έδειξε ότι τα κολλαγόνα V και VI καθώς και η *Fras1* εντοπίζονται κανονικά. Με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης σε *bat* έμβρυα, διαπιστώθηκε ότι, όπως και στα μεταλλαγμένα για την *Fras1* ζώα, ο διαχωρισμός επιδερμίδας-δερμίδας προκαλείται κάτω από το επίπεδο της

lamina densa και ότι ο σχηματισμός των ημιδεσμοσωμάτων παραμένει φυσιολογικός. Στα *bat* ζώα, η επιδερμίδα διαχωρίζεται από την δερμίδα κάτω από το επίπεδο της lamina densa κατά τρόπο ανάλογο με αυτό που παρατηρείται σε ασθενείς που πάσχουν από DEB (στους οποίους έχει υποστεί μετάλλαξη το κολλαγόνο VII).

Το γονίδιο *Frem1*, εκφράζεται στην εμβρυϊκή επιδερμίδα του δέρματος και σε ένα μεγάλο αριθμό διαφοροποιούμενων επιδερμικών κατασκευών. Ένα πολύ σημαντικό στοιχείο είναι, ότι το *Frem1*, σε πολλά όργανα, συμπεριλαμβανομένου των βλεφάρων και του δέρματος, εκφράζεται αποκλειστικά στην δερμίδα σε αντίθεση με την *Fras1* και την *Grip1* οι οποίες εκφράζονται αποκλειστικά στην επιδερμίδα. Συγκεντρωτικά, μπορεί να υποστηριχθεί ότι για τη διατήρηση της ακεραιότητας των εμβρυϊκών επιθηλίων είναι απαραίτητα δύο συστατικά που προέρχονται από την επιδερμίδα (*Fras1*, *Grip1*) και ένα συστατικό που προέρχεται από την δερμίδα (*Frem1*; Smyth *et al*, 2004)

Frem2

Ένα άλλο γονίδιο, που σχετίζεται με τις «Bleb» μεταλλάξεις είναι το *Frem2*. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο αυτό είναι υπεύθυνο για τον φαινότυπο *myelencephalic bleb (my)*. Εκφράζεται ευρέως κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ακεραιότητας της δομής του επιθηλίου του δέρματος *in utero*, για την ανάπτυξη των νεφρών και για τη διατήρηση της δομής του επιθηλίου των νεφρών σε ενήλικα ποντίκια. Μελέτες έδειξαν ότι το γονίδιο *Frem2* αποτελείται από 28 εξόνια και ότι κωδικοποιεί πρωτεΐνη 3.160 αμινοξέων (Jadeja *et al.*, 2005). Η προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία του γονιδίου *Frem2* είναι πολύ όμοια με αυτή της ECM3 πρωτεΐνης του αχινού (Hodor *et al.*, 2000). Εκτός από το γεγονός της δομικής ομοιότητας της *Frem2* με την *Fras1* και την ECM3, η φυλογενετική ανάλυση υποδεικνύει ότι το γονίδιο *Frem2* μπορεί να θεωρηθεί ορθόλογο με το γονίδιο *ECM3*. Σε αντίθεση με την *Frem1* και την *Frem3*, η *Frem2* διατηρεί την διαμεμβρανική περιοχή καθώς και το συντηρημένο καρβοξυτελικό PDZ

μοτίβο πρόσδεσης, που όπως είναι ήδη γνωστό από *in vitro* πειράματα αλληλεπιδρά με την Grip1 (Takamiya *et al.*, 2004).

Η έκφραση του γονιδίου *Frem2*, ξεκινά στα ποντίκια την ημέρα 10.5 της εμβρυογένεσης, ενώ την ημέρα 12.5 και 13.5 εκφράζεται στην διαφοροποιούμενη επιδερμίδα, στο αναπτυσσόμενο αυτί και σε άλλα σημεία του σώματος. Σε αντίθεση με την *Frem1*, η οποία εκφράζεται κυρίως στην δερμίδα και το μεσέγχυμα (Smyth *et al.*, 2004), η *Frem2* εκφράζεται αποκλειστικά στα επιθήλια. Σε ομόζυγα έμβρυα (E14.5) *Frem2*^{-/-}, παρατηρήθηκαν αιμορραγικές φουσκάλες και νεφρικά προβλήματα όπως και στα *Fras1*^{-/-}, αλλά σε αντίθεση με τα τελευταία, στα *Frem2*^{-/-} δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην έκφραση των κολλαγόνων VI και IV. Επίσης, ανάλυση με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης έδειξε, ότι το σημείο αποκόλλησης της επιδερμίδας από τη δερμίδα στα έμβρυα *Frem2*^{-/-} ήταν κάτω από το επίπεδο της βασικής μεμβράνης και ορισμένες φορές μέσα στο μεσέγχυμα.

1.2.6. Συσχέτιση των «Bleb» μεταλλάξεων και της *Fras1* με το σύνδρομο Fraser.

Με βάση την ομοιότητα των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, τα ποντίκια που έφεραν «Bleb» μεταλλάξεις θεωρήθηκαν ως μοντέλα για τη μελέτη της ανθρώπινης κληρονομικής ασθένειας σύνδρομο Fraser (Winter, 1990). Το σύνδρομο Fraser χαρακτηρίζεται από κρυπτοφθαλμία, νεφρική αγενεσία και μια πληθώρα από άλλες αναπτυξιακές βλάβες, όπως ανωμαλίες στα γεννητικά όργανα, στην καρδιά και στους πνεύμονες (Slavotinek and Tiff, 2002). Ο συσχετισμός μεταξύ του «Bleb» φαινοτύπου και του συνδρόμου Fraser επιβεβαιώθηκε από τον χαρακτηρισμό μεταλλάξεων του γονιδίου *Fras1* και ομόλογου στον άνθρωπο γονιδίου *FRAS1* σε *blebbed* ποντίκια και ασθενείς με σύνδρομο Fraser αντίστοιχα (McGregor *et al.*, 2003). Μέχρι σήμερα, μεταλλάξεις σε ασθενείς με σύνδρομο Fraser έχουν βρεθεί μόνο στο *FRAS1* και στο *FREM2* (ομόλογο γονίδιο του *Frem2* στον άνθρωπο; Jadeja, *et al.*, 2005).

Σύνδρομο Fraser

Οφείλει το όνομά του, στον *George Fraser*, ο οποίος περιέγραψε δύο αδέρφια με φυσικά χαρακτηριστικά κρυπτοφθαλμίας, συνδακτυλία, ανωμαλίες στα γεννητικά όργανα, λαρυγγική στένωση, δυσμορφία αυτιών και νεφρικές ανωμαλίες.

| Κύρια χαρακτηριστικά | Δευτερεύοντα χαρακτηριστικά |
|-----------------------------------|------------------------------|
| 1. Κρυπτοφθαλμία | 1. Συγγενής ανωμαλία μύτης |
| 2. Συνδακτυλία | 2. Συγγενής ανωμαλία αυτιών |
| 3. Ανωμαλίες στα γεννητικά όργανα | 3. Συγγενής ανωμαλία λάρυγγα |
| | 4. Σκελετικές ανωμαλίες |
| | 5. Αγενεσία νεφρών |
| | 6. Διανοητικές διαταραχές |
| | 7. Ομφάλια κήλη |
| | 8. Υπερωϊοσχιστία |

Πίνακας 2. Διαγνωστικά κριτήρια του συνδρόμου Fraser (Thomas *et al.*, 1986)

Σύμφωνα με τους *Slavotinek και Tifft* (2002), σε 117 περιπτώσεις που μελέτησαν, τα χαρακτηριστικά του συνδρόμου Fraser είναι τα παρακάτω :

1. Κρυπτοφθαλμία (μονόπλευρη 27.4%, αμφίπλευρη 53%)
2. Επιπλοκές κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης
3. Άλλες οφθαλμικές ανωμαλίες
4. Ανωμαλίες στα γεννητικά όργανα
5. Συνδακτυλία
6. Δυσμορφία αυτιών
7. Δυσμορφία των πνευμόνων
8. Δυσμορφία της μύτης
9. Μυοσκελετικά προβλήματα
10. Γαστρεντερικά προβλήματα
11. Νεφρική δυσπλασία ή αγενεσία

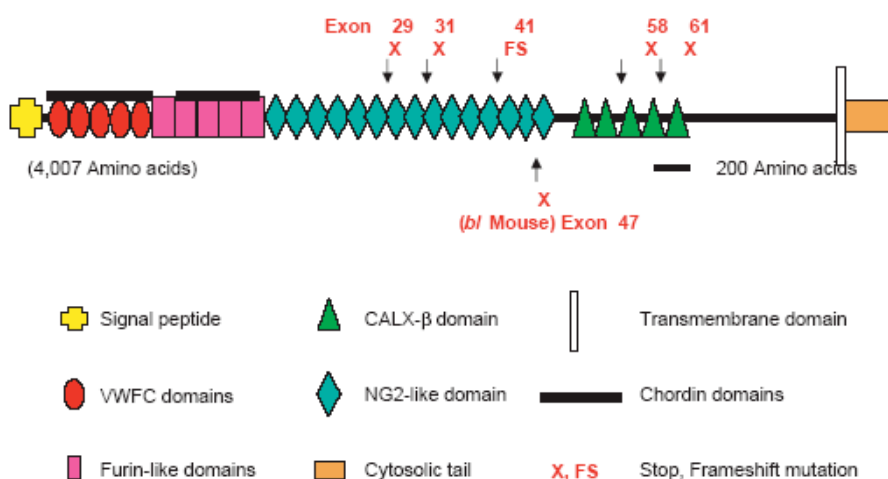
Η εξάπλωση αυτού του συνδρόμου, υπολογίζεται στις 11/100.000 γεννήσεις ζωντανών παιδιών. Η ασθένεια είναι κληρονομική και, πιο συγκεκριμένα, αυτοσωμική υπολειπόμενη. Ο φαινότυπος του συνδρόμου είναι πολύπλοκος και πλειοτροπικός και για τον λόγο αυτό πολλές φορές συγχέεται με άλλα σύνδρομα. Η κρυπτοφθαλμία θεωρείται ως το κυριότερο διαγνωστικό χαρακτηριστικό. Ωστόσο, το 12% των περιπτώσεων που μελέτησαν οι *Slavotinek* και *Tiffit* (2002) δεν εμφάνιζαν κρυπτοφθαλμία (αν και το 78.6% αυτών εμφάνιζαν άλλες οφθαλμικές ανωμαλίες). Θα πρέπει να τονιστεί ότι η ύπαρξη κρυπτοφθαλμίας δεν συνεπάγεται αυτόματα σύνδρομο Fraser, αν δεν συνοδεύεται και από άλλα κλινικά συμπτώματα και ότι η απουσία κρυπτοφθαλμίας δεν συνεπάγεται απουσία συνδρόμου Fraser, αν υπάρχουν άλλα κλινικά συμπτώματα. Μετά την κρυπτοφθαλμία, θεωρούνται ως κύρια χαρακτηριστικά γνωρίσματα του συνδρόμου η συνδακτυλία και η αγενεσία νεφρών, χωρίς να συνεπάγεται κάτι αυτόματα η μεμονωμένη παρουσία ή απουσία αυτών των γνωρισμάτων. Λιγότερη σημασία φαίνεται να έχουν στην ορθή διάγνωση του συνδρόμου η ομφάλια κήλη και οι διανοητικές διαταραχές.

Η θνησιμότητα του συνδρόμου Fraser είναι αρκετά μεγάλη. Σε ασθενείς που πέθαναν κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας ζωής, η κύριες αιτίες θανάτου ήταν η λαρυγγική στένωση, αναπνευστικά προβλήματα, αμφίπλευρη νεφρική αγενεσία ή συνδυασμός λαρυγγικών και νεφρικών ανωμαλιών. Σε ασθενείς άνω των δέκα ετών οι ανωμαλίες ήταν ηπιότερες και μόνο το 10% ικανοποιούσε τα κριτήρια του συνδρόμου Fraser. Σε γενικές γραμμές το σύνδρομο αυτό, εμφανίζει μεγάλη θνησιμότητα σε εμβρυϊκή και βρεφική ηλικία καθώς από τις 117 περιπτώσεις που μελέτησαν οι *Slavotinek* και *Tiffit* (2002), 47 άτομα (40%) απεβίωσαν, είτε προτού γεννηθούν, είτε κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας ζωής τους (*Slavotinek and Tiffit, 2002*).

FRAS1

Η πρωτεΐνη *Fras1* του ποντικού εμφανίζει ομολογία (identity) κατά 85% με την πρωτεΐνη *FRAS1* του ανθρώπου, η οποία και θεωρείται, ότι σχετίζεται με το σύνδρομο Fraser. Η *FRAS1*, εκφράζεται σε πολλούς ιστούς

ενηλίκων ατόμων, με υψηλότερη έκφραση στους νεφρούς, το πάγκρεας και στο θάλαμο του εγκεφάλου, ενώ εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά σε εμβρυϊκή ηλικία στους νεφρούς και στην καρδιά. Πιστεύεται ότι, πιθανότατα, η FRAS1 έχει μεγάλη σημασία στην διαφοροποίηση και επιβίωση των μετανεφρών (McGregor *et al.*, 2003). Παρόλα αυτά, δεν φαίνεται να συμμετέχει στο σχηματισμό του μετανεφρικού μεσεγχύματος ή στην αρχική ανάπτυξη του κάλυκα (McGregor *et al.*, 2003). Επίσης, θεωρείται ότι έμβρυα (5-10 εβδομάδων) με μετάλλαξη στο γονίδιο *FRAS1*, θα έχουν υποτυπώδεις δυσμορφικούς νεφρούς που θα υφίστανται απόπτωση (Winyard *et al.*, 1996). Το γονίδιο *FRAS1* χαρτογραφήθηκε στην χρωμοσωμική θέση 4q21 και κωδικοποιεί πρωτεΐνη 4007 αμινοξικών καταλοίπων.



Σχήμα 5. Η προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία της FRAS1 (McGregor *et al.*, 2003)

Συγκρίνοντας, την προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία της FRAS1 (σχήμα 5), με αυτή της *Fras1* (σχήμα 3), προκύπτει το συμπέρασμα ότι και οι δύο πρωτεΐνες έχουν:

1. ένα πεπτιδίο σινιάλο στο αμινοτελικό τους άκρο,
2. 6 επαναλαμβανόμενα μοτίβα που συναντώνται στην περιοχή C του αιμορραγικού παράγοντα Von Willebrand,

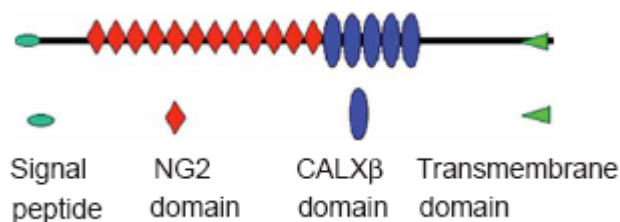
3. 13 επαναλαμβανόμενα μοτίβα που εντοπίζονται στις πρωτεΐνες της οικογένειας των Φουρινών και τα οποία δεν συμπίπτουν με το καταλυτικό κέντρο των πρωτεϊνών αυτών,
4. μια περιοχή της τάξεως περίπου 1500 αμινοξέων που παρουσιάζει ομολογία με την NG2 πρωτεογλυκάνη,
5. 5 μοτίβα πρόσδεσης ασβεστίου που συναντώνται σε ιοντοανταλλάκτες $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$ και
6. μία πιθανή διαμεμβρανική περιοχή στο καρβοξυτελικό τους άκρο.

Επίσης, η προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία της FRAS1, παρουσιάζει μεγάλη δομική ομοιότητα με την πρωτεΐνη ECM3 του αχινού, παρόλο που στην ECM3 απουσιάζουν περιοχές που εμφανίζονται στο αμινοτελικό άκρο της FRAS1 (VWC, FU). Μάλιστα, οι περιοχές αυτές της FRAS1, αλληλεπικαλύπτονται από *chordin-like* περιοχές (Matsui *et al.*, 2000). Στην FRAS1, όπως φαίνεται στο σχήμα 5, υπάρχουν 4 *nonsense* μεταλλάξεις στα εξόνια 29, 31, 58 και 61 και *frameshift* μετάλλαξη στο εξόνιο 41, ενώ συμβολίζεται και η αντίστοιχη θέση της *bl* μετάλλαξης της *Fras1* στον ποντικό. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός, ότι δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ της θέσης των μεταλλάξεων στην προβλεπόμενη αλληλουχία της FRAS1 και την εκδήλωση του συγκεκριμένου φαινοτύπου του συνδρόμου Fraser (McGregor *et al.*, 2003). Σε όλες τις μεταλλάξεις, το τελικό κομμάτι του γονιδίου *FRAS1* δεν κωδικοποιείται, με αποτέλεσμα να λείπουν, μεταξύ των άλλων, τα τελευταία 4 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου, που είναι απαραίτητα για να αναγνωριστεί το μόριο της FRAS1 από την Grip1 και να μεταφερθεί έτσι εξωκυτταρικά.

FREM2

Το γονίδιο *FREM2* αποτελεί την πιο πρόσφατη ανακάλυψη στην έρευνα που σχετίζεται με το σύνδρομο Fraser. Μαζί με το γονίδιο *FRAS1*, αποτελούν τα μοναδικά έως σήμερα γονίδια, η μετάλλαξη των οποίων προκαλεί φαινότυπο συνδρόμου Fraser (Jadeja *et al.*, 2005). Το *FREM2*,

γονίδιο ορθόλογο του *Frem2* του ποντικού, κωδικοποιεί πρωτεΐνη 3.098 αμινοξικών καταλοίπων.



Σχήμα 6. Προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία του *FREM2* (Jadeja *et al.*, 2005)

Η μετάλλαξη, που προκαλεί σύνδρομο Fraser, συμβαίνει στο δεύτερο (N→C) CALXβ μοτίβο και για το λόγο αυτό, πιστεύεται, ότι η πρόσδεση ασβεστίου είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του *FREM2*.

1.3. Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης

Ο περιορισμός στην επίτευξη μικρότερου διακριτικού ορίου από την τιμή 0,2μm (200nm) που αποτελεί το κατώτατο όριο για το οπτικό μικροσκόπιο, εκφράζεται με την παρακάτω εξίσωση

$$\delta = 0,61 * \lambda / n * \eta \mu \varphi / 2$$

Είναι προφανές από την παραπάνω εξίσωση πως, αν ελαττώσουμε το μήκος κύματος λ της ακτινοβολίας της οπτικής διάταξης, τότε θα ελαττωθεί και το δ . Έτσι πρώτα χρησιμοποιήθηκαν υπεριώδεις ακτίνες (υπεριώδης μικροσκοπία) με μικρή βελτίωση του δ . Μετά, έγινε προσπάθεια με ακτίνες X που δεν απέδωσε και τέλος χρησιμοποιήθηκαν τα ηλεκτρόνια, μετά τη δημοσίευση της θεωρίας του DeBroglie (1924) «περί της κυματικής ιδιότητας κινουμένων ηλεκτρονίων» και της πειραματικής απόδειξης από τον Henry Bush (1926) «περί της δυνατότητας εστίασης δέσμης κινουμένων ηλεκτρονίων με τη βοήθεια ηλεκτρομαγνητικού πεδίου». Η σχέση ανάμεσα στην κίνηση ενός ηλεκτρονίου και του μήκους κύματος που εκφράζει την κίνηση αυτή, δίνεται από την εξίσωση του DeBroglie :

$$\lambda = h / m \cdot v$$

όπου h : η σταθερά του Planck

m : η μάζα ηρεμίας του ηλεκτρονίου ($9,1085 \cdot 10^{-23}$ gr)

v : η ταχύτητα κίνησης του ηλεκτρονίου

Επειδή ένα ηλεκτρόνιο, ως φορτισμένο σωματίδιο, επιταχύνεται μόνο με την επίδραση ηλεκτροστατικού πεδίου, γι' αυτό η ταχύτητά του εξαρτάται από αυτό και μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση :

$$m \cdot v^2 / 2 = e \cdot V$$

όπου e : το φορτίο του ηλεκτρονίου ($1,602 \cdot 10^{-19}$ coulomb)

V : η διαφορά δυναμικού μέσα στην οποία επιταχύνεται το ηλεκτρόνιο.

Από τις παραπάνω σχέσεις μπορούμε να καταλήξουμε στην εξής σχέση :

$$\lambda = 12,3 / \sqrt{V}$$

όπου το λ εκφράζεται σε \AA και το V σε Volts

Από την τελευταία εξίσωση, μπορεί να υπολογιστεί ότι όταν ένα ηλεκτρόνιο κινείται σε μια διαφορά δυναμικού 100.000Volts, τότε το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που το χαρακτηρίζει είναι της τάξης των 0,004nm και η ταχύτητά του είναι το μισό της ταχύτητας του φωτός. Κατά συνέπεια μια οπτική διάταξη που χρησιμοποιεί ακτινοβολία τέτοιου μήκους κύματος έχει τη δυναμικότητα να δώσει πολύ χαμηλό διακριτικό όριο, που θεωρητικά θα έπρεπε να πλησιάζει την τιμή $\lambda/2$ δηλαδή 0,002nm. Με άλλα λόγια, ένα τέτοιο οπτικό όργανο που χρησιμοποιεί ηλεκτρόνια ως πηγή φωτός θα έπρεπε να έχει τη δυνατότητα παρατήρησης πυρήνων ατόμων (αφού η διάμετρος του μικρότερου στοιχείου, του υδρογόνου, είναι 1,08 \AA). Στην πράξη όμως, αυτό δεν είναι δυνατόν επειδή α) υπάρχουν σφάλματα στους ηλεκτρομαγνητικούς φακούς και β) τα ηλεκτρόνια εκτρέπονται της πορείας τους περνώντας από το ηλεκτρονικό νέφος των ατόμων. Έτσι τα σύγχρονα ηλεκτρονικά μικροσκόπια έχουν δυναμικότητα διακριτικού ορίου 1-2 \AA (πίνακες 3 και 4). Οι εικόνες που λαμβάνονται με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ονομάζονται ηλεκτρονιομικρογραφίες (electron

micrographs), ενώ εκείνες που λαμβάνονται με χρήση φωτονικού μικροσκοπίου, ονομάζονται φωτομικρογραφίες (light micrographs).

Ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Transmission Electron Microscope) αποτελείται από τρία τμήματα:

1. σύστημα αντλιών κενού (10^{-4} mm Hg ή καλύτερο)
2. ηλεκτρονικές διατάξεις σταθεροποιημένης υψηλής τάσης και σταθεροποιημένων ρευμάτων για τους ηλεκτρομαγνητικούς φακούς
3. σύστημα ηλεκτρομαγνητικών φακών που περιλαμβάνει χώρο παρασκευάσματος, φωτογραφική μηχανή και φθορίζουσα οθόνη παρατήρησης.

| Διακριτικό όριο (Resolution) | |
|---|---------------------------------|
| Οφθαλμού | 100-200 μ m |
| Οπτικού μικροσκοπίου | 0,2 μ m = 2000 \AA |
| Ηλεκτρονικού διέλευσης μικροσκοπίου | 1-3 \AA |
| Ηλεκτρονικού σάρωσης μικροσκοπίου | 7-35 \AA |

Πίνακας 3. Σύνοψη των διακριτικών ορίων (Μαργαρίτης, 2004)

| Διαστάσεις βιοσυστατικών | |
|---|----------------------|
| Τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο | 20-40 μ m |
| Ερυθροκύτταρο | 8*2 μ m |
| Πυρήνας κυττάρου | 1-10 μ m |
| Μιτοχόνδρια, λυσοσώματα, βακτήρια | 0,5 μ m |
| Χρωματίνη | 300 \AA |
| Νουκλεοσώματα | 100 \AA |
| DNA | 20 \AA |
| Ινίδια ακτίνης, ενδιάμεσα ινίδια, μικροσωληνίσκοι, ριβοσώματα, ιοί | 50-1000 \AA |

Πίνακας 4. Διαστάσεις τυπικών κυτταρικών συστατικών (Μαργαρίτης, 2004)

1.4. Σκοπός της μελέτης

Από όλα τα στοιχεία που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή, διαφαίνονται οι λόγοι για τους οποίους υφίσταται έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον για την πρωτεΐνη Fras1. Συνοπτικά, μπορούν να αναφερθούν τα εξής :

- Ο συσχετισμός της Fras1 με τις «Bleb» μεταλλάξεις στον ποντικό και την κληρονομική ασθένεια σύνδρομο Fraser στον άνθρωπο.
- Από τα μέχρι τώρα δεδομένα η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται να είναι αποκλειστικά εμβρυϊκή, σε αντίθεση με τις άλλες πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης, οι οποίες δεν εντοπίζονται μόνο εμβρυϊκά.
- Αποκόλληση της επιδερμίδας από το χόριο της δερμίδας κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, συμβαίνει μόνο στα *Fras1*^{-/-}, *Frem1*^{-/-} και *Frem2*^{-/-} έμβρυα.
- Η προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία της Fras1, περιλαμβάνει γνωστά μοτίβα άλλων πρωτεϊνών, τα οποία όμως σε καμιά μέχρι σήμερα γνωστή πρωτεΐνη δεν απαντώνται όλα μαζί κ.ά.

Η Fras1, μέχρι σήμερα, έχει μελετηθεί εκτενώς σε επίπεδο οπτικού μικροσκοπίου και υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τον εντοπισμό της πρωτεΐνης αυτής σε διάφορους ιστούς. Ωστόσο, τα δεδομένα για την Fras1 σε επίπεδο ηλεκτρονικό μικροσκοπίου είναι ελάχιστα. Έτσι, είναι γνωστό ότι, στις αιμορραγικές φουσκάλες πάνω από το μάτι των *Fras1*^{-/-} εμβρύων E15.5, η αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα γίνεται κάτω από το επίπεδο της lamina densa. (Vrontou *et al.*, 2003). Επίσης, είναι γνωστό, ότι σε έμβρυα αγρίου τύπου E14.5, η Fras1 εντοπίζεται με τη μέθοδο του κολλοειδούς ανοσοχρυσού στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa στην βασική μεμβράνη του επιθηλίου των βρόγχων (Petrou *et al.*, 2005).

Η δημιουργία υποεπιδερμικών πομφολύγων, αποτελεί ένα από τα αδιαμφισβήτητα κλινικά συμπτώματα, τόσο των ασθενών με σύνδρομο

Fraser όσο και των ποντικών με *bl* φαινότυπο. Σύμφωνα με τις μέχρι σήμερα αναφορές, η δημιουργία τους φαίνεται να οφείλεται στην αποκόλληση επιδερμίδας-δερμίδας. Παρόλα αυτά, δεν έχει προς το παρόν πραγματοποιηθεί κάποια μελέτη με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου στο επιθήλιο του δέρματος. Κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας, με σκοπό τον ακριβή εντοπισμό της Fras1 στη βασική μεμβράνη του επιθηλίου του δέρματος. Παράλληλα, εξετάστηκε συγκριτικά και η τοπολογία της Fras1 σε ένα άλλο επιθήλιο, αυτό του οισοφάγου, για να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές στον εντοπισμό της. Θα πρέπει να τονιστεί, ότι το επιθήλιο του δέρματος και του οισοφάγου επελέγησαν για τα πειράματα ως διαφορετικά επιθήλια από αυτό των βρόγχων (το μοναδικό επιθήλιο ως σήμερα όπου έχει εντοπιστεί η Fras1 υπερμικροσκοπικά).

Η μελέτη της κατανομής της Fras1 στο επιθήλιο του δέρματος, πιστεύουμε ότι θα προσφέρει νέα δεδομένα στην κατανόηση της δημιουργίας των υποεπιδερμικών πομφολύγων. Πιθανώς, να εξηγηθεί η δημιουργία του συγκεκριμένου φαινοτύπου ως συνέπεια της απουσίας της Fras1. Η τοπολογία της Fras1 στο επιθήλιο του οισοφάγου, θα βοηθήσει στην πιο ολοκληρωμένη γνώση μας γύρω από την πρωτεΐνη αυτή, αφού πλέον θα μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους τα αποτελέσματα εντοπισμού της Fras1 σε τρία εμβρυϊκά επιθήλια: των βρόγχων, του δέρματος και του οισοφάγου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Ανοσοϊστοχημεία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου

Σήμερα, έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές με σκοπό την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών ενός κυττάρου. Εκτός από τη γνώση για την ύπαρξη κάποιων πρωτεϊνών, είναι εξίσου σημαντικό να γνωρίζουμε την κατανομή τους μέσα σε ένα κύτταρο ή ιστό, για να είναι δυνατή η κατανόηση της λειτουργίας τους. Στην απόκτηση αυτής της γνώσης συμβάλλει ο *in situ* εντοπισμός μίας ή παραπάνω πρωτεϊνών σε τομή ιστοτεμαχίου ή παρασκευάσμα κυτταρικής καλλιέργειας με την εφαρμογή μεθόδων ανοσοϊστοχημείας και την παρατήρηση του παρασκευάσματος στο οπτικό ή ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (HM, Μαρμάρας, 1991).

Η εφαρμογή ανοσοϊστοχημικών μεθόδων στο επίπεδο του HM έδωσε μεγάλη ώθηση στο διαγνωστικό ρόλο αυτού του μικροσκοπίου στη χειρουργική παθολογία, αλλά και στη συμβολή του στη βασική έρευνα στην κυτταρική βιολογία (Herrera, 1992). Ο εντοπισμός της ανοσοαντίδρασης στο HM γίνεται με χρήση δεικτών, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μεγάλη ηλεκτρονική πυκνότητα, που επιτρέπει τη διαφορική σκέδαση της δέσμης των ηλεκτρονίων. Ιστορικά έχουν χρησιμοποιηθεί οι παρακάτω δείκτες:

Φερριτίνη : Πρόκειται για μια πρωτεΐνη πλούσια σε σίδηρο που προσδένεται με χημικό τρόπο στα αντισώματα (Singer, 1959). Παρόλο που είναι ο πρώτος δείκτης που χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτρονική μικροσκοπία, η χρήση του σήμερα περιορίζεται στην περίπτωση που υπάρχει ανάγκη διπλού εντοπισμού.

Υπεροξειδάση : Πρόκειται για ένα ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ευρέως στην ηλεκτρονική μικροσκοπία (Nakane and Pierce, 1966) γιατί ανιχνεύεται σχετικά εύκολα με πολλές μεθόδους. Η υπεροξειδάση γίνεται ορατή με το χρωμογόνο 3,3'-τετραϋδροχλωρική-διαμινοβενζιδίνη (DAB) παρουσία H_2O_2 διαμορφώνοντας ίζημα (Graham and Karnovsky, 1966). Η υπεροξειδάση έχει μικρότερο μέγεθος από άλλα ένζυμα γεγονός που διευκολύνει τη διείσδυσή της στον ιστό και το επίπεδο της ενδογενούς

υπεροξειδάσης στους περισσότερους ιστούς είναι σχετικά χαμηλό, με αποτέλεσμα να μη δίνεται ψευδής αντίδραση. Παρόλα τα πλεονεκτήματα που υπάρχουν, το χρωμογόνο (DAB) διαχέεται από την πραγματική θέση του αντιγόνου δίνοντας έτσι χαμηλή διακριτική ικανότητα, ενδέχεται να έχει καρκινογόνο ιδιότητα και πιθανώς να γίνεται κάλυψη του υποκείμενου ιστού από το ίζημα.

Κολλοειδής ανοσοχρυσός : Τον χρησιμοποίησαν πρώτοι ως ανοσοϊστοχημικό δείκτη στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο οι *Faulk* και *Taylor* (1971). Σήμερα, αποτελεί τον πιο καθιερωμένο και έγκυρο τρόπο ανοσοεντόπισης στο ΗΜ γιατί οδηγεί στην εντόπιση της αντιγονικής θέσης με μεγάλη ακρίβεια και υψηλή διακριτική ικανότητα. Η σύσταση των σωματιδίων του κολλοειδούς χρυσού αποτελείται κεντρικά από το στοιχείο του χρυσού, το οποίο περιβάλλεται από μία στοιβάδα αρνητικών φορτίων, λόγω της προσρόφησης ιόντων χλωριούχου χρυσού (AuCl_2^-) και στη συνέχεια από στοιβάδα θετικά φορτισμένων ιόντων υδρογόνου. Η μέθοδος του κολλοειδούς χρυσού εμφανίζει μια σειρά πλεονεκτημάτων έναντι της μεθόδου ανοσοεντοπισμού με το ένζυμο υπεροξειδάση. Πιο συγκεκριμένα, ο κολλοειδής χρυσός α) συνδέεται με προσρόφηση, με μη-ομοιοπολικούς δεσμούς, στις ανοσοσφαιρίνες (Faulk and Taylor, 1971) ή στην πρωτεΐνη-A (Roth *et al.*, 1978) και έτσι αποφεύγονται οι μέθοδοι χημικής σύνδεσης που μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στις φυσικές, χημικές και ανοσολογικές ιδιότητες των μορίων, β) παρατηρείται και ανιχνεύεται εύκολα στο ΗΜ, γ) παρασκευάζεται εύκολα σε διάφορα μεγέθη εύρους 1-150nm, κάνοντας εφικτό τον πολλαπλό ανοσοεντοπισμό με χρήση διαφορετικών μεγεθών κόκκων χρυσού, δ) διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα (τουλάχιστον ένα χρόνο) και ε) κάνει δυνατό τον εντοπισμό αντιγονικών θέσεων με μεγάλη ακρίβεια σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους ανοσοεντοπισμού στο ΗΜ, λόγω της υψηλής διακριτικής ικανότητας, γιατί η απόσταση μεταξύ του κέντρου του κόκκου του χρυσού και του επιτόπου που αναγνωρίζεται από το πρωτογενές αντίσωμα είναι πολύ μικρή (μερικά nm).

2.2. Είδη ανοσοϊστοχημικών τεχνικών ηλεκτρονικού μικροσκοπίου

Η διατήρηση της καλής μορφολογίας και της αντιγονικότητας του ιστού αποτελούν βασικές προϋποθέσεις για την ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό στην ηλεκτρονική μικροσκοπία. Οι τεχνικές μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες:

1. **Pre-embedding:** Τεχνικές στις οποίες το πρωτόκολλο του ανοσοεντοπισμού εφαρμόζεται πριν από την έγκλειση του ιστού σε ρητίνη.
2. **Post-embedding:** Τεχνικές στις οποίες το πρωτόκολλο του ανοσοεντοπισμού εφαρμόζεται σε λεπτές τομές του ιστού (70-90nm) μετά από την έγκλεισή του σε ρητίνη.

Οι παράγοντες που καθορίζουν το είδος της μεθόδου που θα επιλεγεί είναι πολλοί, μεταξύ των οποίων: η συγκέντρωση του αντιγόνου στον υπό μελέτη ιστό, η τοπογραφία του αντιγόνου και η ευαισθησία του αντιγόνου στη θερμοκρασία, στα χημικά μέσα, στους οργανικούς διαλύτες και στα μέσα έγκλεισης.

2.3. Ανοσοϊστοχημικές τεχνικές πριν την έγκλειση του ιστού

Στις τεχνικές αυτές, εφαρμόζεται η ανοσοϊστοχημεία μετά τη μονιμοποίηση του ιστού και πριν την αφυδάτωση και την έγκλεισή του σε ρητίνες. Καταφεύγουμε σ' αυτή τη μέθοδο όταν το υπό μελέτη αντιγόνο έχει χαμηλή συγκέντρωση στον ιστό ή είναι ασταθές και ευαίσθητο στο OSO_4 (τετροξείδιο του οσμίου) ή στη διαδικασία της αφυδάτωσης και της έγκλεισης σε εποξικές και ακρυλικές ρητίνες. Πιο συγκεκριμένα, ο ιστός μονιμοποιείται με αλδεύδες, στην συνέχεια κόβεται σε μικροτόμο παλλόμενης λεπίδας (vibratome) και στις τομές που λαμβάνονται γίνεται διαπερατοποίηση με γρήγορη ψύξη-απόψυξη ή με χαμηλής συγκέντρωσης απορρυπαντικά. Το βήμα της διαπερατοποίησης είναι απαραίτητο για να μπορούν τα αντισώματα να διεισδύσουν στις τομές. Ο εντοπισμός του

αντιγόνου μπορεί να γίνει ορατός με τη χρήση της αβιδίνης-βιοτινης-υπεροξειδάσης (ABC) ή με τη χρήση κολλοειδούς ανοσοχρυσού (μέγεθος κόκκων χρυσού 1-5nm). Μετά την ολοκλήρωση της ανοσοϊστοχημείας, οι τομές του ιστού μονιμοποιούνται με OSO_4 και επεξεργάζονται ως ιστοτεμάχια, σύμφωνα με την διαδικασία ρουτίνας για HM, δηλαδή αφυδατώνονται, εμποτίζονται και εγκλείονται σε εποξικές ρητίνες. Θα πρέπει να τονιστεί, ότι η ανοσοαντίδραση δεν είναι ομοιόμορφη σε όλο το βάθος του ιστού, καθώς όσο αυξάνεται το βάθος του ιστού, τόσο μειώνεται η διεισδυτικότητα του αντισώματος. Πιο συγκεκριμένα, στα επιφανειακά στρώματα του ιστού μπορεί να υπάρχει μη-ειδική ανοσοαντίδραση, ενώ σε βαθύτερα στρώματα μπορεί η υπερμικροσκοπική δομή του ιστού να είναι πολύ καλή, αλλά να μην παρατηρείται ανοσοαντίδραση. Υπάρχει ενδιάμεσα μία περιορισμένη περιοχή όπου, τόσο η ανοσοαντίδραση, όσο και η υπερμικροσκοπική δομή του ιστού είναι πολύ καλή και θα πρέπει να προσεγγίζεται κατά την κοπή στην υπερμικροτόμο με προσοχή, ώστε να μην αφαιρεθεί από λάθος (Valentijn *et al.*, 1989).

2.4. Ανοσοϊστοχημικές τεχνικές μετά την έγκλειση του ιστού

2.4.1 Ανοσοεντοπισμός σε τομές ιστού εγκλεισμένου σε εποξικές ρητίνες

Τη μέθοδο αυτή τη χρησιμοποιούμε όταν οι υπό μελέτη αντιγονικές θέσεις είναι ανθεκτικές στη διαδικασία της χημικής μονιμοποίησης, της αφυδάτωσης και της έγκλεισης σε υψηλή θερμοκρασία. Η επεξεργασία του ιστού περιλαμβάνει την μονιμοποίηση των ιστοτεμαχίων με χρήση αλδεϋδών και στη συνέχεια μπορεί να ακολουθήσει OSO_4 , αφυδάτωση με διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης, εμποτίση και έγκλειση σε εποξικές ρητίνες (Merighi, 1992).

2.4.2. Μέθοδος βαθμιαίας μείωσης της θερμοκρασίας (μέθοδος PLT)

Εφαρμόζεται όταν οι αντιγονικές θέσεις είναι ευαίσθητες στην αφυδάτωση και στον πολυμερισμό σε υψηλές θερμοκρασίες. Αρχικά, τα ιστοτεμάχια μονιμοποιούνται με αλδεΐδες (γλουταραλδεΐδη– παραφορμαλδεΐδη) και στη συνέχεια ακολουθεί αφυδάτωση σε διαλύματα οργανικού διαλύτη (συνήθως αιθυλική αλκοόλη) αυξανόμενης συγκέντρωσης (Skepper, 2000).

2.4.3. Μέθοδος ψυκτοαντικατάστασης

Εφαρμόζεται όταν οι αντιγονικές θέσεις είναι ευαίσθητες στη χημική μονιμοποίηση. Ο ιστός μονιμοποιείται ακαριαία (0.1-1 msec) με ψύξη σε ατμόσφαιρα υγρού αζώτου, ώστε να μη διαμορφωθούν κρύσταλλοι πάγου, οι οποίοι θα αλλοιώσουν την υπερμικροσκοπική δομή του. Ακολουθεί σταδιακή αντικατάσταση του παγωμένου νερού του ιστού από οργανικό διαλύτη, συνήθως άνυδρη ακετόνη. Η διαδικασία της ψυκτοαντικατάστασης γίνεται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (-80°C έως -90°C). Αφού ολοκληρωθεί η ψυκτοαντικατάσταση, ακολουθεί ελεγχόμενη και σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας, μέχρι του σημείου που θα γίνει η εμπότιση και τελικά η έγκλειση των ιστοτεμαχίων σε ακρυλικές ή εποξικές ρητίνες (Hobot, 1989).

2.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την εφαρμογή της ανοσοϊστοχημείας στο ΗΜ

2.5.1. Είδος μονιμοποιητικού μέσου (αλδεΐδες, τετροξειδίο του οσμίου)

Με τις αλδεΐδες μονιμοποιούνται κυρίως πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Η γλουταραλδεΐδη, αναπτύσσει ενδομοριακούς και διαμοριακούς δεσμούς στα πρωτεϊνικά μακρομόρια, διαδικασία η οποία δεν είναι αναστρέψιμη. Αντιδρά με ελεύθερες αμινομάδες των πρωτεϊνών, καθώς και με το αμινοτελικό άκρο των πεπτιδίων. Επίσης, αντιδρά με τα

φωσφολιπίδια, δημιουργώντας δεσμούς μεταξύ των λιπιδίων και των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Η φορμαλδεΰδη, που είναι μονομερές, διεισδύει πιο εύκολα από την γλουταραλδεΰδη, αλλά επειδή διαθέτει μια αλδεϋδομάδα, δημιουργεί λιγότερους δεσμούς με τα πρωτεϊνικά μόρια. Αντιδρά με τις ελεύθερες αμινομάδες των αμινοξέων και των πρωτεϊνών αλλά το βασικό μειονέκτημά της είναι ότι η αντίδραση αυτή είναι πλήρως ή μερικώς αναστρέψιμη (Hayat, 1986). Συμπερασματικά, η φορμαλδεΰδη λόγω του μικρού μεγέθους της, διεισδύει πιο γρήγορα στους ιστούς, αλλά συγχρόνως δημιουργεί ασταθείς δεσμούς με τα διάφορα μακρομόρια, ενώ η γλουταραλδεΰδη λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους της διεισδύει πιο αργά στους ιστούς, αλλά αναπτύσσει σταθερούς δεσμούς, προστατεύοντας καλύτερα την υπερμικροσκοπική δομή του ιστού.

Το OSO_4 είναι ακόρεστη ένωση που αντιδρά με τους διπλούς δεσμούς ακόρεστων λιπαρών οξέων σχηματίζοντας διεστέρες με σύνδεση γειτονικών λιπιδικών μορίων. Παράλληλα, το OSO_4 χρησιμεύει και ως χρωστική, γιατί λόγω του μεγάλου ατομικού βάρους του οομίου προκαλείται σημαντική αύξηση της ηλεκτρονικής πυκνότητας (Μαργαρίτης, 1989).

2.5.2. Θερμοκρασία μονιμοποίησης

Η διαδικασία της μονιμοποίησης γίνεται κατά κανόνα στους 40°C για να αποφευχθεί η διαλυτοποίηση των κυτταρικών συστατικών. Παρόλα αυτά, η μονιμοποίηση μπορεί να γίνει και σε θερμοκρασία δωματίου όταν η μονιμοποίηση γίνεται σε κυτταρικά συστατικά που καταστρέφονται σε χαμηλές θερμοκρασίες όπως οι μικροσωληνίσκοι.

2.5.3. Είδη μέσων έγκλεισης (εποξικές και ακρυλικές ρητίνες)

Οι εποξικές ρητίνες χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά ως μέσα έγκλεισης για την ηλεκτρονική μικροσκοπία από τους *Glauert και συνεργάτες του* (1956). Υπάρχουν τρεις τύποι εποξικών ρητινών που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτρονική μικροσκοπία:

- Η αρωματική εποξική ρητινή *Araldite*, η οποία προσδίδει στο τελικό πολυμερές των ρητινών αντοχή και σταθερότητα κάτω από τη δέσμη των ηλεκτρονίων.
- Η αλειφατική εποξική ρητινή *Epon812* και τα διάφορα είδη που την έχουν αντικαταστήσει και αναφέρονται ως ρητίνες *Epon*. Η ρητινή αυτή χαρακτηρίζεται από μικρότερη σταθερότητα κάτω από τη δέσμη των ηλεκτρονίων.
- Το διοξειδίο του βινυλικού κυκλοεξανίου, μια εποξική ρητινή που έχει καθιερωθεί ως τύπου *Spurr*, έχει μικρότερο ιξώδες σε σχέση με τους δύο προηγούμενους τύπους και θεωρείται ότι είναι καρκινογόνο αντιδραστήριο που απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή στον χειρισμό.

Η σκληρότητα των παρασκευασμάτων των εποξικών ρητινών διαμορφώνεται με την ανάμειξή τους με ανυδρίτες που ονομάζονται σκληρυντές, οι οποίοι αντιδρούν με τις εποξικές ομάδες των μορίων των ρητινών. Η αντίδραση των εποξικών ρητινών και του ανυδρίτη-σκληρυντή απαιτεί πολύ υψηλή θερμοκρασία. Για τον λόγο αυτό, στο μείγμα προστίθεται ο επιταχυντής, που μειώνει την θερμοκρασία σε επίπεδα κατάλληλα για να γίνει η έγκλειση. Ο συνδυασμός των εποξικών ρητινών *Araldite* και *Epon* για την παρασκευή μείγματος έχει σοβαρά πλεονεκτήματα, γιατί προσδίδει στο παρασκεύασμα ελαστικές ιδιότητες για εύκολο κόψιμο στην υπερμικροτόμο, καθώς και αυξημένη σταθερότητα των τομών στη δέσμη των ηλεκτρονίων κατά την παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Οι ακρυλικές ρητίνες αποτελούν μείγματα ακρυλικών και μεθακρυλικών εστέρων και πολυμερίζονται με τον μηχανισμό του αλυσιδωτού πολυμερισμού των ελευθέρων ριζών, κατά τον οποίο τα βιομόρια δεν εμπλέκονται στο δίκτυο του πολυμερούς των ρητινών και διατηρούν τις φυσικές τους ιδιότητες. Οι ρητίνες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι οι : *LR White*, *LR Gold*, *Lowicryl K4M*, *Lowicryl HM20*, *Lowicryl K11M* και *Lowicryl HM23*. Πιο συγκεκριμένα, οι *Lowicryl* ρητίνες κατασκευάστηκαν έτσι ώστε να έχουν χαμηλό ιξώδες και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα έγκλεισης σε πρωτόκολλα επεξεργασίας ιστών σε

θερμοκρασίες μικρότερες του μηδενός όπως στην μέθοδο *PLT* και στην μέθοδο της *ψυκτοαντικατάστασης*. Οι υδρόφιλες ρητίνες *Lowicryl K4M* και *K11M*, πολυμερίζονται στους -35°C και στους -60°C αντίστοιχα, ενώ οι υδρόφοβες ρητίνες *Lowicryl HM20* και *Lowicryl HM23*, πολυμερίζονται στους -50°C και στους -70°C αντίστοιχα. Σε αυτές τις θερμοκρασίες προστατεύονται θερμοευαίσθητα αντιγόνα και διατηρείται καλύτερα η υπερμικροσκοπική δομή του ιστού, γιατί μειώνεται η διάχυση των βιομορίων και η διαλυτοποίηση των λιπιδικών συστατικών στους οργανικούς διαλύτες κατά το στάδιο της αφυδάτωσης.

2.5.4. Χρονική διάρκεια μονιμοποίησης

Συνήθως, όταν πρόκειται για εφαρμογή ανοσοϊστοχημικής αντίδρασης, η μονιμοποίηση του ιστού είναι σύντομη (1-3 h), ώστε να αποφεύγεται η υπερμονιμοποίηση, που σημαίνει ανάπτυξη περισσότερων δεσμών μεταξύ των μακρομορίων του ιστού και πιθανώς κάλυψη και απενεργοποίηση των αντιγονικών θέσεων.

2.6. Pre-embedding πειράματα

Διενεργήθηκαν pre-embedding πειράματα καθώς το anti-Fras1 (πρόκειται για πολυκλωνικό αντίσωμα που παράχθηκε σε ανοσοποιημένα κουνέλια από βακτηριακά υπερεκφρασμένο πεπτίδιο που αντιστοιχούσε στα αμινοξέα 1212-1525 της Fras1, Vrontou *et al.*, 2003) αντίσωμα φαινόταν να μην ανταποκρίνεται πλήρως στις post-embedding τεχνικές. Κάτι τέτοιο συμβαίνει συχνά σε πειράματα ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας καθώς δεν δουλεύουν όλα τα αντισώματα με όλες τις τεχνικές. Ένας πιθανός λόγος για τον οποίο το αντίσωμα της Fras1 δεν λειτουργεί σε post-embedding τεχνικές είναι η μη αντοχή του σε ακρυλικές ρητίνες και γενικότερα στην όλη χημική διεργασία στην οποία υφίσταται. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε και αναλύεται στην επόμενη παράγραφο είναι αυτό του κολλοειδούς ανοσοχρυσού.

2.6.1. Ανοσοεντόπιση με τη μέθοδο του κολλοειδούς ανοσοχρυσού

- Τα έμβρυα ποντικού (E14.5) επώασθησαν κατά τη διάρκεια της νύχτας (overnight) με μονιμοποιητή 4% παραφορμαλδεΐδη, 0.05% γλουταραλδεΐδη και 15% πικρικό οξύ (βοηθάει στη διατήρηση της αντιγονικότητας) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.2.
- Ακολούθησαν 10 πεντάλεπτα πλυσίματα με 0,1M PB ώστε να ξεπλυθεί ο μονιμοποιητής
- Στην συνέχεια τα έμβρυα κόπηκαν σε τομές πάχους 70μm η καθεμία χρησιμοποιώντας μικροτόμο παλλόμενης λεπίδας (VT1000S Leica).
- Ακολούθησαν πολλαπλά πλυσίματα με PB ώστε να ξεπλυθεί ο μονιμοποιητής.
- Εν συνέχεια 2 δεκάλεπτα πλυσίματα με TBS
- Στην συνέχεια οι τομές επώασθησαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με 20% NGS (Normal Goat Serum) in TBS-buffer (50mM Tris, 0.9% NaCl, pH 7.4). Η χρησιμοποίηση 20% διαλύματος ορού αιγός γίνεται για την κάλυψη με αντισώματα των μη-ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια.
- Ακολούθησαν δύο πεντάλεπτα πλυσίματα με TBS.
- Στην συνέχεια οι τομές επώασθησαν με το πρώτο αντίσωμα για 50-60 ώρες στους 4°C. Η αραιώση στην οποία χρησιμοποιήθηκε το πρώτο αντίσωμα (anti-Fras1) ήταν 1:40 in 1%NGS in TBS buffer.
- Ακολούθησαν 3 δεκάλεπτα πλυσίματα με TBS.
- Στην συνέχεια οι τομές επώασθησαν με το δεύτερο αντίσωμα για 50-60 ώρες στους 4°C. Το δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:100 και ήταν goat anti-rabbit affinity purified Fab' fragment συζευγμένο με σφαιρίδια χρυσού διαμέτρου 1.4 nm (Nanoprobes Inc.).
- Ακολούθησαν 3 δεκάλεπτα πλυσίματα με TBS και 2 πεντάλεπτα με απεσταγμένο νερό.
- Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των τομών με κolloειδή άργυρο για 6 με 6.5 min (HQ Silver kit, Nanoprobes Inc). Πιο συγκεκριμένα, ο κolloειδής άργυρος αποτελείται από τρία συστατικά τα οποία είναι φωτοευαίσθητα και φυλάσσονται στην κατάψυξη (

Moderator: άσπρο, Initiator: κόκκινο, Activator: μπλε). Τον κολλοειδή άργυρο τον χρησιμοποιούμε για να ενισχύσουμε το σήμα του δεύτερου αντισώματος που φέρει χρυσό. Τα συσσωματώματα του χρυσού έχουν διάμετρο 1.4nm, ενώ του αργύρου 10nm. Ο άργυρος έχει συνάφεια με τα μόρια χρυσού οπότε χρησιμοποιώντας τον ενισχύεται το σήμα καθώς τα μόρια αργύρου κολλάνε στα μόρια χρυσού και στην ουσία αυτό που παρατηρείται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι τα μόρια αργύρου. Παρόλα αυτά, αντί για άργυρο θα μπορούσε θεωρητικά να χρησιμοποιηθούν μόρια χρυσού με μεγαλύτερη διάμετρο (π.χ. με διάμετρο 5 ή 10nm), αλλά αυτό πρακτικά δεν γίνεται γιατί όσο μεγαλώνει η διάμετρος των μορίων του χρυσού, τόσο ελαττώνεται η διεισδυτικότητα αυτών. Ο κολλοειδής άργυρος σχηματίζει ιζήματα όταν αναμειγνύεται με buffers και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται για την ανάμειξή του απεσταγμένο νερό. Για την παρασκευή του κολλοειδούς αργύρου αναμειγνύονται 500ml κόκκινου συστατικού με 500ml άσπρου. Ακολουθεί έντονη ανακίνηση. Στο μείγμα προστίθενται 500ml μπλε συστατικού και ακολουθεί έντονη ανακίνηση. Από τη στιγμή που παρασκευαστεί ο κολλοειδής άργυρος έχει χρόνο λειτουργικότητας περίπου 20 min, καθώς μετά το πέρας αυτού του χρόνου μαυρίζει και πλέον είναι άχρηστος.

- Ακολούθησαν πολλά στιγμιαία πλυσίματα με απεσταγμένο νερό και 2 δεκάλεπτα με 0.1M PB buffer.
- Στην συνέχεια οι τομές επώασθηκαν με 1% OSO_4 σε 0.1M PB για 40 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολούθησαν 2 στιγμιαία πλυσίματα με 0.1M PB καθώς και 2 σύντομα πλυσίματα με απεσταγμένο νερό.
- Στην συνέχεια οι τομές επώασθηκαν με υδατικό διάλυμα 1% οξικού ουρανίου για 40 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολούθησαν 2 σύντομα πλυσίματα με απεσταγμένο νερό και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε βαθμιαία αφυδάτωση των τομών με αλκοόλες (2 δεκάλεπτα η καθεμία) 50%, 70%, 90%, 95% και 100%.

- Ακολούθησαν 2 δεκάλεπτες επωάσεις των τομών με propylene oxide (ισχυρός διαλύτης της ρητίνης)
- Στην συνέχεια έγινε overnight εμπότιση των τομών με εποξική *Araldite* ρητίνη (Durcupan ACM, Fluca) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολούθησε μεταφορά των τομών σε αντικειμενοφόρες πλάκες οι οποίες και αφέθηκαν στον φούρνο overnight στους 60°C για να πολυμεριστεί η ρητίνη.

2.6.2. Τομές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας από το πείραμα του κολλοειδή ανοσοχρυσού

Οι τομές είχαν πάχος 70-110nm και τοποθετήθηκαν σε πλέγματα χαλκού διαμέτρου 1-2mm τα οποία ήταν καλυμμένα με μεμβράνη riodoform (1% riodoform σε χλωροφόρμιο). Οι λεπτές τομές ιστών που είχαν εγκλεισθεί στην εποξική ρητίνη Durcupan παρατηρούνταν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αφού προηγουμένως είχαν χρωματισθεί με διάλυμα κυτρικού μολύβδου.

Για την παρασκευή του διαλύματος κυτρικού μολύβδου απαιτούνται: 4.6 ml ultra pure water + 0.133g $Pb(II)NO_3$ + 0.176g Na_3 Citrate + 0.4ml 2N NaOH + filtration. Το NaOH αντιδρά με το CO_2 της ατμόσφαιρας και για το λόγο αυτό προστίθεται περίσσεια NaOH (πελέτες) ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία ιζημάτων. Η διαδικασία χρώσης που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

- Υγρό χαρτί τοποθετείται στην εσωτερική περιφέρεια ενός petri.
- Στο κέντρο του petri τοποθετείται parafilm και πάνω στο parafilm τοποθετούνται σταγόνες διαλύματος κυτρικού μολύβδου.
- Το κάθε πλέγμα επωάζεται για 3min με μία σταγόνα με την mat πλευρά αυτού να εφάπτεται της σταγόνας
- Ακολουθούν 3 στιγμιαία ξεπλύματα του κάθε πλέγματος με απεσταγμένο νερό.

- Στην συνέχεια το κάθε πλέγμα στεγνώνεται τόσο με ειδικό χαρτί (φίλτρο Whatman), όσο και με πιστολάκι.
- Τέλος, το κάθε πλέγμα φυλάσσεται σε ειδικό κουτάκι (grid box) και είναι έτοιμο για παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

2.7. Post-embedding πειράματα

Στην εφαρμογή της ανοσοϊστοχημείας στην ηλεκτρονική μικροσκοπία καθοριστικό ρόλο παίζουν το είδος του μονιμοποιητή, το μέσο έγκλεισης, η θερμοκρασία και η διάρκεια της μονιμοποίησης. Με βάση τα παραπάνω, κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα, όπου χρησιμοποιήθηκαν ως μονιμοποιητές η γλουταρλδεϋδη και η παραφορμαλδεϋδη σε διάφορες συγκεντρώσεις και δοκιμάσθηκαν επίσης δύο διαφορετικά μέσα έγκλεισης, πάντοτε όμως σε post-embedding πειράματα. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί μονιμοποιητές (**I**: 4%PFA + 0,25%GDA in PBS, **II** : 2%PFA + 0,5%GDA in PBS, **III**: 2,5% GDA in PBS) και δύο διαφορετικές ρητίνες (LR-White και Lowicryl HM20). Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν αναλύονται με λεπτομέρεια στις επόμενες παραγράφους.

2.7.1. Διαδικασία έγκλεισης εμβρύων ποντικού (14.5 ημέρα) σε ρητίνη *LR-White*

Η διάρκεια της μονιμοποίησης σε γενικές γραμμές εξαρτάται από τη φύση και το μέγεθος των δειγμάτων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ολόκληρα τα έμβρυα και για τους τρεις μονιμοποιητές αφέθηκαν να μονιμοποιηθούν overnight στους 4°C. Ακολούθησαν δύο πλυσίματα με PBS στους 4°C, αφυδατώσεις, έγκλειση σε ρητίνη LR-White και τέλος πολυμερισμός της ρητίνης. Αναλυτικότερα το πρωτόκολλο το οποίο εφαρμόστηκε είναι το εξής:

- Μονιμοποίηση : Σε τρεις διαφορετικούς μονιμοποιητές : **I** : 4% PFA + 0,25% GDA in PBS, **II** : 2%PFA + 0,5%GDA in PBS, **III**: 2,5% GDA in PBS
- Πλυσιματα : Με διάλυμα PBS (2 x 25 λεπτά) στους 4°C.
- Ανατομία ολόκληρων εμβρύων: Η ανατομία των εμβρύων πραγματοποιήθηκε κατά τέτοιο τρόπο ώστε να προκύψουν δύο ιστοτεμάχια από κάθε έμβρυο όσο το δυνατόν πανομοιότυπα (με οβελιαία τομή). Το καθένα από τα παραπάνω ιστοτεμάχια κόπηκε εκ νέου με οβελιαία τομή (χωρίς όμως να περιλαμβάνει εγκέφαλο). Τα ιστοτεμάχια που προέκυψαν από την ανατομία αφέθηκαν σε PBS στους 4°C για έξι ώρες.
- Αφυδάτωση: Αρχικά με αιθανόλη 50% (2 x 15 λεπτά) και στη συνέχεια με αιθανόλη 70% (2 x 30λεπτά). Οι αφυδατώσεις έγιναν στους 4°C.
- Έγκλειση: Αρχικά επώαστηκαν τα ιστοτεμάχια για 2 ώρες με διάλυμα αλκοόλης : ρητίνης (LR-White) = 1:2 σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση και στη συνέχεια με καθαρή ρητίνη overnight (14 ώρες) στους 4°C με ανάδευση. Μετά την overnight επώαση, τα δείγματα αφέθηκαν να αναδεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για έξι ώρες. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ειδικές κάψουλες οι οποίες είχαν μικρή ποσότητα ρητίνης. Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων στις κάψουλες, προστέθηκε ρητίνη σε αυτές έως ότου γεμίσουν.
- Πολυμερισμός ρητίνης: Οι κάψουλες αφέθηκαν για 24 ώρες στους 50°C ώστε να πολυμεριστεί η ρητίνη. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

Παρασκευή της αραιώσης ρητίνης (LR-White) : αιθανόλη (70%) = 2:1

Η ρητίνη LR-White είναι ρευστή και φυλάσσεται σε σκούρο μπουκάλι στους 4°C. Τοποθετείται ο επιθυμητός όγκος ρητίνης σε falcon tube. Η αιθανόλη (70%) προστίθεται με πιπέτα pasteur σταγόνα-στάγόνα και αναδεύεται έντονα ώστε να αναμειχθούν τα συστατικά. Όταν το

διάλυμα φτάσει στο σημείο κορεσμού σταματάει η προσθήκη της αιθανόλης. Αν ξεπεραστεί το σημείο κορεσμού τότε προστίθενται 2-3 σταγόνες ρητίνης, ώστε να διευκολυνθεί η ανάμειξη.

2.7.2. Διαδικασία έγκλεισης εμβρύων ποντικού (14.5 ημέρα) σε ρητίνη *Lowicryl HM20* με την *PLT* τεχνική

Το βασικό χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι η βαθμιαία μείωση της θερμοκρασίας καθώς αυξάνεται σταδιακά η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη βοηθώντας κατά τον τρόπο αυτό τη μείωση τόσο της διάχυσης λιπιδίων όσο και των αλλαγών στη δομή των πρωτεϊνών. Η μέγιστη μείωση της θερμοκρασίας (-50°C) εφαρμόζεται στο τελευταίο βήμα της αφυδάτωσης (100% συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη) και στην ίδια θερμοκρασία πραγματοποιείται η διαδικασία του εμποτισμού του ιστού και ο πολυμερισμός του μέσου έγκλεισης. Ως μέσα έγκλεισης χρησιμοποιούνται οι ακρυλικές ρητίνες *Lowicryl K4M* και *Lowicryl HM20*, οι οποίες πολυμερίζονται στους -35°C και -50°C αντίστοιχα, με ακτινοβολία UV. Το τετροξείδιο του οσμίου δεν χρησιμοποιείται σε αυτή την τεχνική ως δεύτερος μονιμοποιητής γιατί απορροφά πλήρως την υπεριώδη ακτινοβολία, με αποτέλεσμα τη μη ολοκλήρωση του πολυμερισμού. Η ανοσοϊστοχημική αντίδραση είναι βελτιωμένη σε σχέση με αυτή στις τομές εποξικών ρητινών δεδομένου της επεξεργασίας του ιστού σε χαμηλές θερμοκρασίες και της μη χρήσης τετροξείδιου του οσμίου. Παρακάτω παρατίθεται η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την επεξεργασία εμβρύων ποντικού E14.5 εφαρμόζοντας την *PLT* τεχνική.

- Ανατομία εμβρύων ποντικού E14.5 (Βλέπε πρωτόκολλο LR-White)
- Μονιμοποίηση με τρεις διαφορετικούς μονιμοποιητές : **I** : 4% PFA + 0,25% GDA in PBS, **II** : 2%PFA + 0,5%GDA in PBS, **III**: 2,5% GDA in PBS
- 2 εκπλύσεις των 20 min στους 4°C με 4% Sucrose in SCB 0.08M PH 7.4
- 30% αιθανόλη στους 0°C για 30 min
- 50% αιθανόλη στους -10°C για 30 min

- 70% αιθανόλη στους -25°C για 30 min
- 100% αιθανόλη στους -40°C για 30 min
- 100% αιθανόλη στους -50°C για 30 min
- Εμποτίση με ρητίνη Lowicryl HM20 1:3 αραιωμένης με αιθανόλη για 1 ώρα στους -50°C
- Εμποτίση με ρητίνη Lowicryl HM20 1:1 αραιωμένης με αιθανόλη για 1 ώρα στους -50°C
- Εμποτίση με ρητίνη Lowicryl HM20 3:1 αραιωμένης με αιθανόλη για 1 ώρα στους -50°C
- Εμποτίση με καθαρή ρητίνη Lowicryl HM20 για 1 ώρα στους -50°C
- Εμποτίση με καθαρή ρητίνη Lowicryl HM20 για 16 ώρες στους -50°C
- Σκλήνωση: Τα ιστοτεμάχια μεταφέρονται από τις πλαστικές κάψουλες (με το πλέγμα στον πυθμένα) σε κάψουλες Leica, έτσι ώστε κάθε μία να έχει ένα ιστοτεμάχιο. Προτού γίνει αυτή η μεταφορά, οι κάψουλες Leica έχουν ήδη τοποθετηθεί σε ειδικό μεταλλικό υποδοχέα με καθαρή ρητίνη Lowicryl HM20. Στη συνέχεια οι κάψουλες αυτές μεταφέρονται και εισάγονται με κατάλληλο εξάρτημα σε κάψουλες ζελατινής οι οποίες είναι ήδη γεμάτες με καθαρή ρητίνη. Η όλη διάταξη (κάψουλες ζελατινής και κάψουλες Leica) μεταφέρεται τελικά σε ειδικό δοχείο στήριξης το οποίο περιέχει 15ml αιθανόλης.
- Πολυμερισμός: Προσαρμόζεται πάνω στο θάλαμο εργασίας του μηχανήματος η συσκευή που φέρει τη λάμπα UV για να γίνει ο πολυμερισμός της ρητίνης. Η ισχύς της λάμπας είναι 6W και το μήκος κύματος αυτής είναι 350nm. Ο πολυμερισμός γίνεται αρχικά στους -50°C για 48 ώρες και ολοκληρώνεται στους 0°C για 24 ώρες. Ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας από τους -50°C στους 0°C είναι $5^{\circ}\text{C}/\text{ώρα}$.

Παρασκευή καθαρής ρητίνης Lowicryl HM20

Η συνιστώμενη ποσότητα για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν (με βάση τον αριθμό των ιστοτεμαχίων) είναι 60ml ρητίνης. Για να παρασκευαστεί η ποσότητα αυτή απαιτούνται τα εξής :

| | | |
|-------------|---|----------|
| Crosslinker | D | 8.94 gr |
| Monomer | E | 51,06 gr |
| Initiator | C | 0.3 gr |

Πίνακας 5. Συστατικά ρητίνης Lowicryl HM20

Θα πρέπει να τονιστεί, ότι αρχικά αναμειγνύονται τα δύο πρώτα υλικά (D + E) και στη συνέχεια προστίθεται το C. Σε κάθε περίπτωση γίνεται ήπια ανάδευση με τη γυάλινη ράβδο. Η ανάδευση γίνεται έως ότου δεν υπάρχουν εναιωρήματα. Αφού παρασκευαστεί η ρητίνη Lowicryl HM20 φυλάσσεται στο ψυγείο μέχρι και για 24 ώρες.

Προγραμματισμός μηχανήματος

| | | |
|----|----------|--------|
| T1 | 0 °C | 30 min |
| S1 | μετάβαση | 12 min |
| T2 | -10 °C | 30 min |
| S2 | μετάβαση | 18 min |
| T3 | -25 °C | 30 min |

Πίνακας 6. Πρόγραμμα 1 (στάδιο αφυδάτωσης)

| | | |
|----|------------|--------|
| T1 | -40 °C | 30 min |
| S1 | μετάβαση | 12 min |
| T2 | -50 °C | 30 min |
| S2 | αμετάβλητο | 0 min |
| T3 | -50 °C | 0 min |

Πίνακας 7. Πρόγραμμα 2 (στάδιο αφυδάτωσης, συνέχεια)

| | | |
|----|------------|--------|
| T1 | -50 °C | 3 ώρες |
| S1 | αμετάβλητο | 0 min |
| T2 | -50 °C | 1 ώρα |
| S2 | αμετάβλητο | 0 min |

| | | |
|----|--------|---------|
| T3 | -50 °C | 16 ώρες |
|----|--------|---------|

Πίνακας 8. Πρόγραμμα 3 (στάδιο εμπότισης)

| | | |
|----|------------|---------|
| T1 | -50 °C | 48 ώρες |
| S1 | μετάβαση | 10 ώρες |
| T2 | 0 °C | 24 ώρες |
| S2 | αμετάβλητο | 0 min |
| T3 | 0 °C | 0 min |

Πίνακας 9. Πρόγραμμα 4 (στάδιο πολυμερισμού)

2.7.3. Τομές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας

Χρησιμοποιήθηκε η υπερμικροτόμος LKB 2088 ULTRATOME. Οι τομές είχαν πάχος 75-90nm και τοποθετήθηκαν σε πλέγματα χαλκού διαμέτρου 3mm και άνοιγμα πλέγματος 200mesh. Οι λεπτές τομές ιστών που είχαν εγκλεισθεί τόσο στην ρητίνη LR-White όσο και στην ρητίνη Lowicryl HM20 παρατηρούνταν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αφού προηγουμένως είχαν χρωματισθεί με διάλυμα οξικού ουρανύλιου και διάλυμα κιτρικού μολύβδου. Η διαδικασία χρώσης που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

Οξικό ουρανύλιο

- Σε ένα κομμάτι κερί το οποίο έχει επικαλυφθεί με parafilm τοποθετούνται σταγόνες οξικού ουρανύλιου (η μεταφορά και η τοποθέτηση αυτών των σταγόνων θα πρέπει να γίνεται σε συνθήκες σκότους γιατί το οξικό ουρανύλιο αντιδρά με το φως και διασπάται, εκπέμποντας ακτινοβολία).
- Το κάθε πλέγμα τοποθετείται κατά τέτοιο τρόπο ώστε η πλευρά των τομών να εφάπτεται στη σταγόνα.
- Ο χρόνος επώασης του κάθε πλέγματος με τη σταγόνα οξικού ουρανύλιου είναι 15 min.

- Στην συνέχεια τα πλέγματα ξεπλένονται με λίγες σταγόνες απεσταγμένου νερού και στεγνώνονται σε ειδικό χαρτί (φίλτρο Whatman) με προσοχή ώστε να μην ακουμπήσουν οι τομές με το φίλτρο.

Κιτρικός μολυβδος

(βλέπε παράγραφο 2.6.2)

2.7.4. Ανοσοϊστοχημεία ιστών εγκλεισμένων σε LR-White και Lowicryl HM20

- Τα πλέγματα χαλκού που έφεραν υπέρλεπτες τομές επώασθηκαν για 30min σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα 1% BSA in PBS.
- Προσθήκη πρώτου αντισώματος και επώαση overnight στους 4^oC. Το πρώτο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν anti-Fras1. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές αραιώσεις του πρώτου αντισώματος : α) 1:10 in 0.2% BSA in PBS και β) 1:30 in 0.2% BSA in PBS.
- Ακολούθησαν 3 πλυσίματα για 20min με 1% BSA.
- Προσθήκη δεύτερου αντισώματος και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το δεύτερο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το E.M. GAR20 Goat Anti-Rabbit IgG : 20nm Gold. Η αραιώση στην οποία χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:40 in 0.2% BSA in PBS
- Ακολούθησαν 3 πλυσίματα για 20min με 1% BSA.
- Στην συνέχεια ακολούθησε πλύσιμο με απεσταγμένο νερό για 20 λεπτά.

2.8. Φωτογραφίες - εμφάνιση φιλμ - επεξεργασία εικόνων

Όλες οι φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου της παρούσας διατριβής ελήφθησαν από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης τύπου JEOL 100C στα 80kV. Οι μεγεθύνσεις των αρνητικών ήταν 13000-16000. Η εμφάνιση των αρνητικών των φωτογραφιών (αρνητικά φιλμς οξικής κυτταρίνης, 8x10cm) έγινε ως εξής:

- Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται στον σκοτεινό θάλαμο με κόκκινο φως, το οποίο επιτυγχάνεται με τοποθέτηση του κόκκινου φίλτρου Safelight filter No1 (Kodak).
- Τα φιλμ τοποθετούνται σε ειδικές θέσεις στήριξης (στατό)
- Εμφάνιση των φιλμ με εμβάπτισή τους σε διάλυμα εμφανιστή D19:απεσταγμένο νερό = 1:2 για 4 min.
- Ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό βρύσης
- Στερέωση των φιλμ με εμβάπτισή τους σε διάλυμα στερεωτή Sodium Fixer (δεν αραιώνεται) για 10 min.
- Ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 20 min.
- Στιγμαίο ξέπλυμα των φιλμ με εμβάπτισή τους σε απεσταγμένο νερό.
- Στέγνωμα των φιλμ στον ξηραντήρα.

Μετά την εμφάνιση των φιλμ ακολούθησε το «σκανάρισμά» τους με τον scanner CanoScan 9900F. Οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν ψηφιακά (brightness, contrast) με το λογισμικό Adobe Photoshop 7.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι ιστοί στους οποίους διενεργήθηκαν τα πειράματα είναι το δέρμα και ο οισοφάγος από έμβρυα ποντικού E14.5. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν post-embedding πειράματα για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης Fras1 στο επιθήλιο του δέρματος και στην συνέχεια pre-embedding πειράματα για την εύρεση του προτύπου κατανομής της Fras1 στο επιθήλιο του δέρματος, και του οισοφάγου. Πιο συγκεκριμένα, το πρώτο πείραμα που πραγματοποιήθηκε ήταν η έγκλειση εμβρύων ποντικού E14.5 σε ρητίνη LR-White και η παραπέρα ανοσοϊστοχημεία των ιστών αυτών για τον εντοπισμό της Fras1 στο επιθήλιο του δέρματος. Στην συνέχεια, διενεργήθηκε η έγκλειση εμβρύων ποντικού E14.5 σε ρητίνη Lowicryl HM20 με την τεχνική PLT και η επακόλουθη ανοσοϊστοχημεία των ιστών αυτών για τον εντοπισμό της Fras1 στο επιθήλιο του δέρματος. Μετά από τα παραπάνω post-embedding πειράματα, σειρά είχαν τα pre-embedding πειράματα και ειδικότερα αυτό του ανοσοεντοπισμού της Fras1 με τη μέθοδο του κολλοειδούς ανοσοχρυσού. Μάλιστα, στα πειράματα αυτά μελετήθηκαν και ιστοτεμάχια οισοφάγου παράλληλα με τα ιστοτεμάχια δέρματος, σε αντίθεση

με τα pre-embedding πειράματα στα οποία εξετάστηκαν μόνο ιστοτεμάχια δέρματος.

3.1. Post-embedding

Όλα τα post-embedding πειράματα που πραγματοποιήθηκαν τόσο με την έγκλειση των ιστοτεμαχίων σε ρητίνη LR-White όσο και σε ρητίνη Lowicryl HM20, δεν οδήγησαν σε θετικά αποτελέσματα.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της ρητίνης LR-White, δεν παρουσιάστηκαν εμφανή προβλήματα κατά τη διάρκεια εκτέλεσης του πρωτοκόλλου. Τα προβλήματα, έγιναν ορατά μόνο μετά την παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Πιο συγκεκριμένα, η εικόνα παρουσίαζε προβλήματα στην δομή του ιστού αλλά και στο ειδικό «σήμα» του αντισώματος anti-Fras1. Τα προβλήματα που παρουσιάστηκαν στην αντιγονικότητα του ιστού, ενδεχομένως να οφείλονται στην επιλογή της post-embedding τεχνικής σε συνδυασμό με το συγκεκριμένο αντίσωμα (anti-Fras1) που χρησιμοποιήθηκε. Είναι γνωστό, από πειράματα που διενεργήθηκαν στο εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του κυρίου Χαλεπάκη ότι το αντίσωμα (anti-Fras1), δεν αναγνωρίζει την πρωτεΐνη σε έγκλειση παραφίνης, οπότε κατά πάσα πιθανότητα είναι και θέμα του υλικού έγκλεισης. Επίσης, πολλά αντισώματα δεν ανταποκρίνονται σε post-embedding τεχνικές και απαιτείται για τα αντισώματα αυτά η εφαρμογή pre-embedding τεχνικών. Τα προβλήματα συνήθως σχετίζονται με την αδυναμία των αντιγόνων να ανταπεξέλθουν στην χημική διεργασία στην οποία υφίστανται σε post-embedding τεχνικές, όπως για παράδειγμα στη χρήση ακρυλικών ρητινών. Τα προβλήματα στη διατήρηση της δομής του ιστού, μπορούν να εξηγηθούν από τη λανθασμένη επιλογή του μονιμοποιητή. Όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδος», χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί μονιμοποιητές: (I: 4%PFA + 0,25%GDA in PBS, II : 2%PFA + 0,5%GDA in PBS, III: 2,5% GDA in PBS). Πιθανώς, για τη σωστή διατήρηση της δομής του ιστού να είναι κατάλληλοι μονιμοποιητές με διαφορετική σύσταση.

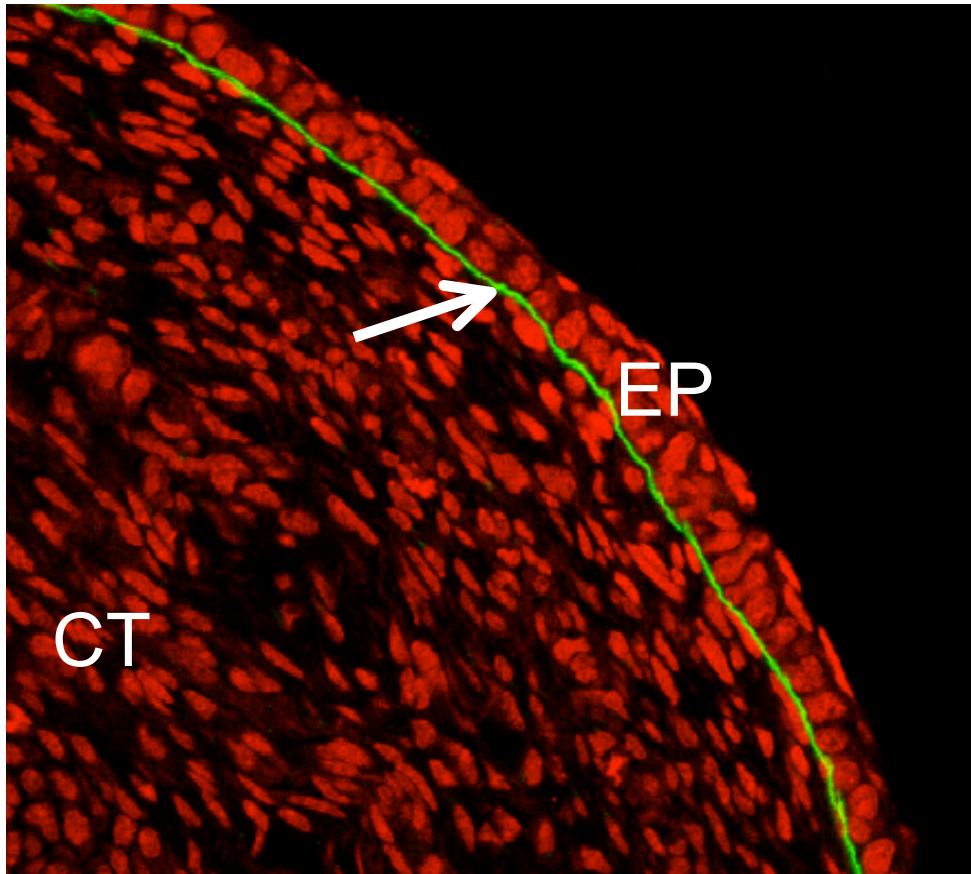
Στα πειράματα έγκλεισης των ιστών σε ρητίνη Lowicryl HM20 με την PLT τεχνική, οι ιστοί φάνηκαν να παγώνουν με αποτέλεσμα να καταστρέφεται η φυσιολογική τους δομή είτε κατά τη διάρκεια της βαθμιαίας αφυδάτωσης, είτε κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού της ρητίνης με τη χρήση UV. Πιθανή αιτία για την καταστροφή των ιστών από τον πάγο που δημιουργήθηκε στην PLT τεχνική μπορεί να αποτελεί η λάθος παρασκευή των διαλυμάτων αραιωμένων αλκοολών. Η ακρίβεια σε τέτοιου είδους πειράματα είναι πολύ σημαντική, καθώς σύμφωνα με τους κατασκευαστές του μηχανήματος στο οποίο εφαρμόζεται η PLT τεχνική, λάθος κατά 1% στην παρασκευή ενός διαλύματος αλκοόλης (π.χ. 69% αντί για 70%) είναι ικανό να προκαλέσει το πάγωμα των ιστών στην αντίστοιχη κάθε φορά χαμηλή θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η βαθμιαία αφυδάτωση. Η καταστροφή των ιστών από τον πάγο που δημιουργήθηκε κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού της ρητίνης ενδεχομένως να οφείλεται στην ανεπιτυχή εμπότιση των ιστών με ρητίνη. Οι λόγοι οι οποίοι θα μπορούσαν να προκαλέσουν κάτι τέτοιο είναι είτε η μη ορθή (χρονικά) έκθεση των ιστοτεμαχίων στη ρητίνη, είτε το υπερβολικά μεγάλο πάχος των ιστοτεμαχίων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, τα ιστοτεμάχια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κομμάτια εμβρύων ποντικού, ίσως αρκετά παχιά (περίπου 1 cm) ώστε να είναι αδύνατο για την ρητίνη να εμποτίσει εξολοκλήρου τον ιστό. Συνεπώς, η πιο πιθανή αιτία που οδήγησε στο πάγωμα των ιστών κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού της ρητίνης είναι το πάχος των ιστοτεμαχίων που χρησιμοποιήθηκαν.

3.2. Pre-embedding

Τα pre-embedding πειράματα, πραγματοποιήθηκαν με την τεχνική του ανοσοχρυσού και τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων ήταν αρκετά ικανοποιητικά. Οι ηλεκτρονιομικρογραφίες έδειξαν εξαιρετική διατήρηση της δομής του ιστού και παράλληλα ειδική δέσμευση του αντισώματος. Πιο συγκεκριμένα, σχεδόν σε όλες τις ηλεκτρονιομικρογραφίες παρατηρούνται γνωστά στοιχεία της βασικής μεμβράνης του επιθηλίου του δέρματος και του οισοφάγου όπως η lamina lucida, η lamina densa, οι ίνες κολλαγόνου

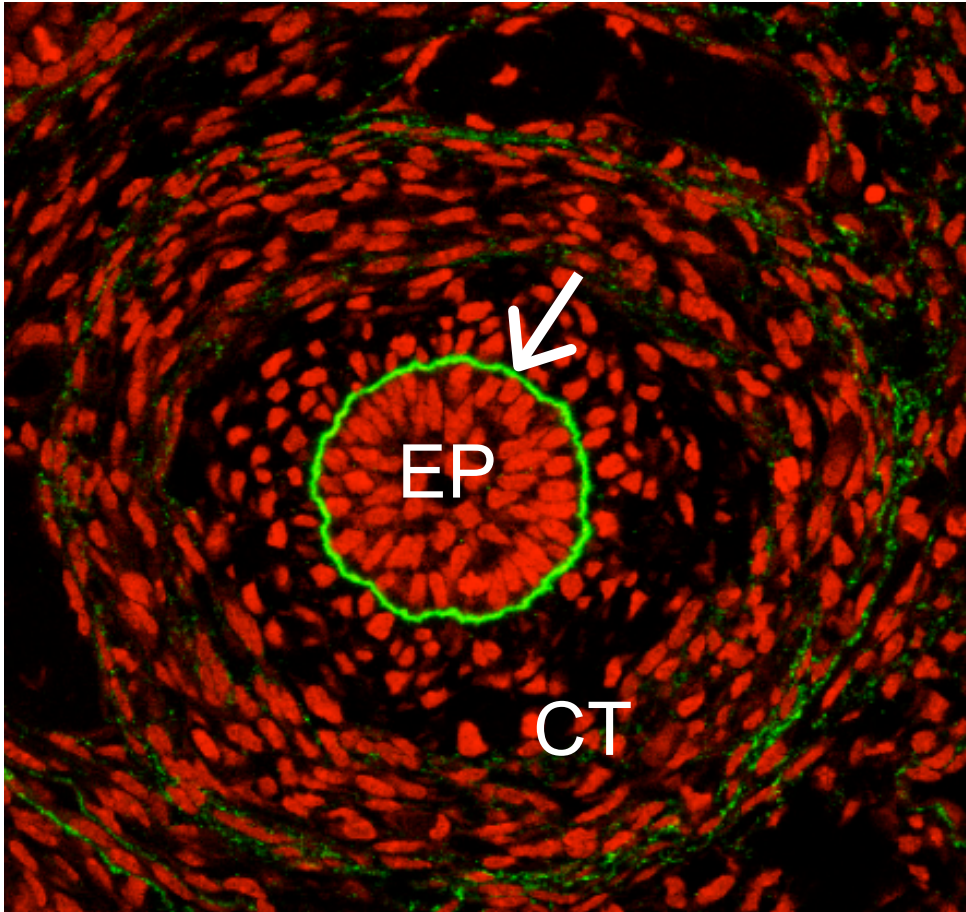
και πολλές φορές τα ινίδια αγκυροβόλησης. Ταυτόχρονα παρατηρούνται κάποιες άμορφες ηλεκτρονικά πυκνά δομές που με βάση την έως σήμερα βιβλιογραφία παραμένουν αγνώστου δομής, προέλευσης και λειτουργίας. Επίσης, παρατηρούνται δομές που προσομοιάζουν τα δεσμοσώματα και τα ημιδεσμοσώματα, πολλά μιτοχόνδρια στα βασικά κερατινοκύτταρα καθώς και η πλασματική μεμβράνη των κυττάρων αυτών. Παράλληλα, η Fras1 χαρτογραφείται υπερμικροσκοπικά στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa, δηλαδή στην sub-lamina densa.

Παρακάτω, παρατίθενται ηλεκτρονιομικρογραφίες που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας καθώς και φωτογραφίες από συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal). Οι φωτογραφίες του confocal αποτέλεσαν την αρχική ένδειξη για τον εντοπισμό της Fras1 στη βασική μεμβράνη, τόσο του δέρματος όσο και του οισοφάγου. Ωστόσο, με πειράματα ανοσοφθορισμού δεν είναι δυνατή η ακριβής χαρτογράφηση της Fras1 στον εξωκυττάριο χώρο. Την πληροφορία αυτή, προσέφεραν τα πειράματα ανοσοεντοπισμού με τη μέθοδο του κολλοειδούς ανοσοχρυσού και τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης.



Εικόνα 6. Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στη βασική μεμβράνη του δέρματος εμβρύου ποντικού E13.5 με ανοσοφθορισμό.

Απεικονίζεται το επιθήλιο του δέρματος (EP) και ο υποκείμενος συνδετικός ιστός (CT). Η έκφραση της Fras1 δείχνεται με πράσινο χρώμα (βέλος) και αντιστοιχεί στη βασική μεμβράνη του δέρματος. Οι πυρήνες των κυττάρων, φαίνονται κόκκινοι (η φωτογραφία ανήκει στον Δρ Πέτρο Πέτρου).

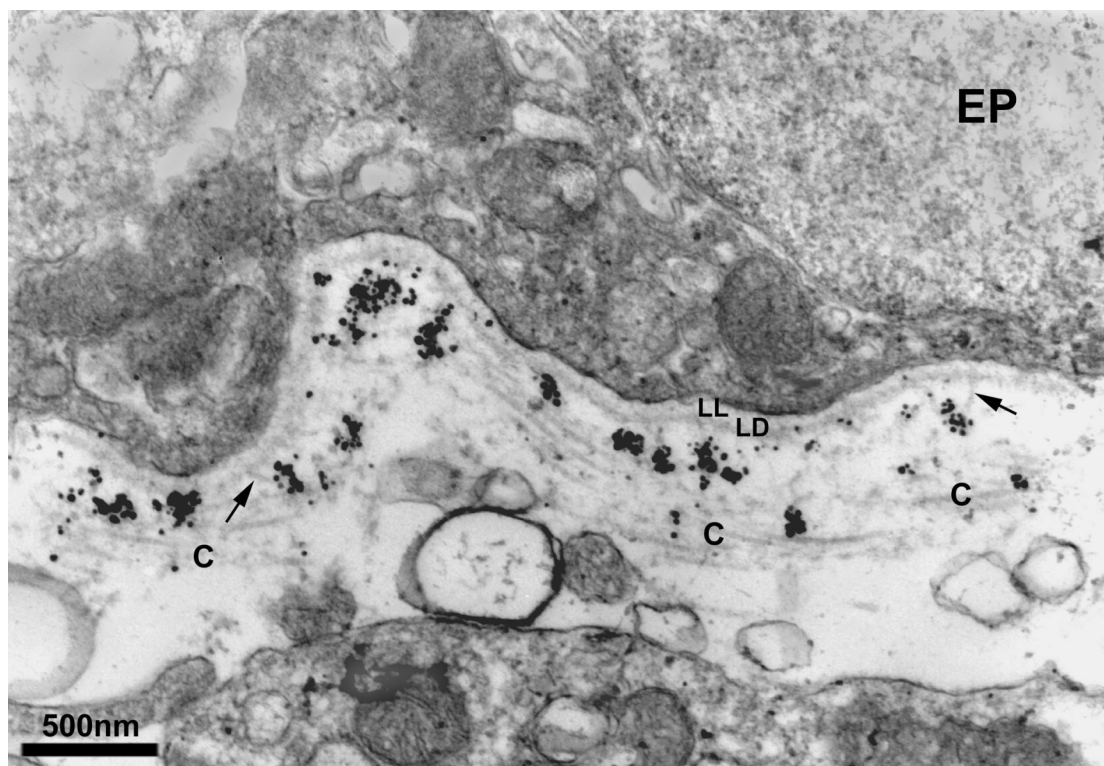


Εικόνα 7. Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στην βασική μεμβράνη του οισοφάγου εμβρύου ποντικού E13.5 με ανοσοφθορισμό.

Στο κέντρο της φωτογραφίας φαίνεται το εσωτερικό επιθήλιο του οισοφάγου (EP). Η έκφραση της Fras1 δείχνεται με πράσινο χρώμα (βέλος) και αντιστοιχεί στη βασική μεμβράνη του οισοφάγου. Εξωτερικά αυτών, βρίσκεται ο συνδετικός ιστός (CT). Οι πυρήνες των κυττάρων, φαίνονται κόκκινοι (η φωτογραφία ανήκει στον Δρ Πέτρο Πέτρου).

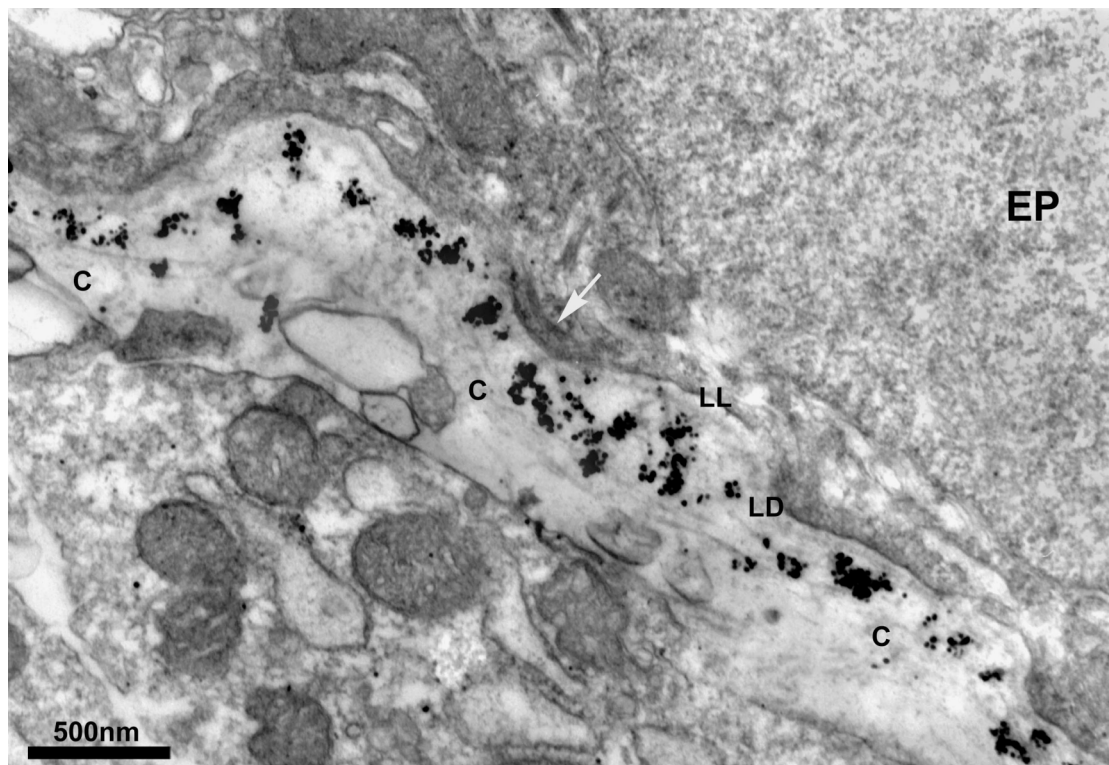
Από τις εικόνες 6 και 7 υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται εξωκυτταρικά και πιο συγκεκριμένα στην βασική μεμβράνη του επιθηλίου τόσο του δέρματος όσο και του οισοφάγου. Βέβαια, είναι αδύνατο να προσδιοριστεί η ακριβής θέση της Fras1 μέσα στη βασική μεμβράνη, δηλαδή το κατά πόσο βρίσκεται πάνω, μέσα ή κάτω από την lamina densa.

3.3. Εντοπισμός της Fras1 με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης



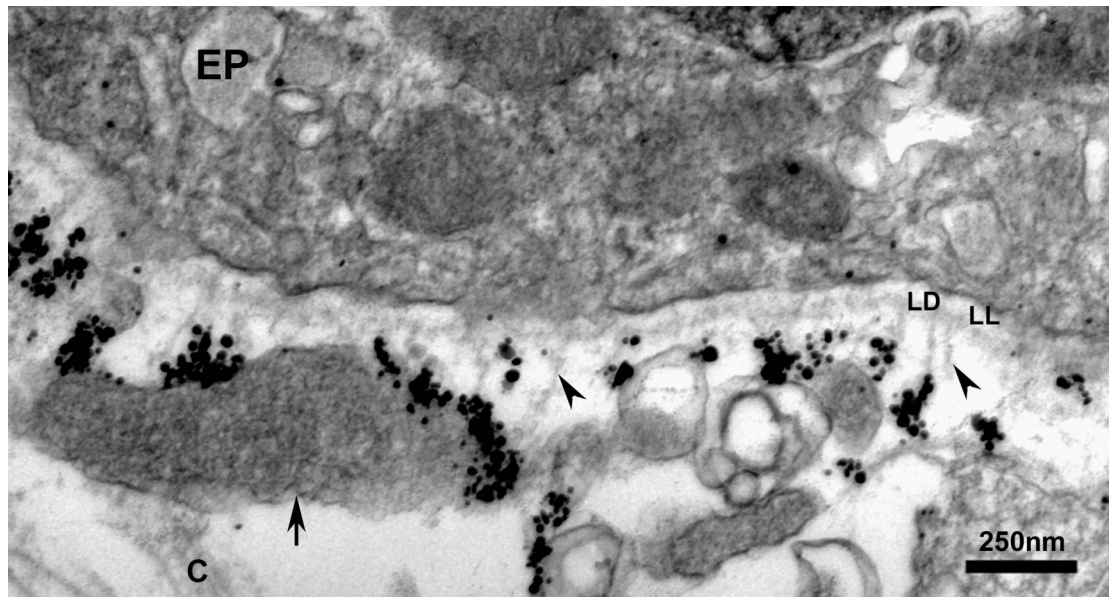
Εικόνα 8. Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στην βασική μεμβράνη του δέρματος εμβρύου ποντικού E14.5 με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού.

Η πρωτεΐνη Fras1, εντοπίζεται με τη μορφή συγκροτημάτων κόκκων χρυσού στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa. Επίσης, φαίνεται ένα βασικό κερατινοκύτταρο (EP) του επιθηλίου της επιδερμίδας καθώς και στοιχεία της βασικής μεμβράνης που υπόκειται αυτού του επιθηλίου όπως η lamina lucida (LL) και η lamina densa (LD. Στον χώρο που υπόκειται της lamina densa, φαίνονται πολλές ίνες κολλαγόνου (C) που ως γνωστό δομούνται κυρίως από κολλαγόνο τύπου I, καθώς και αρκετά ινίδια αγκυροβόλησης (βέλη). Μάλιστα, η Fras1, δεν φαίνεται να εντοπίζεται στο επίπεδο των ινών κολλαγόνου, αλλά μάλλον στην περιοχή ανάμεσα στην lamina densa και στις ίνες κολλαγόνου.



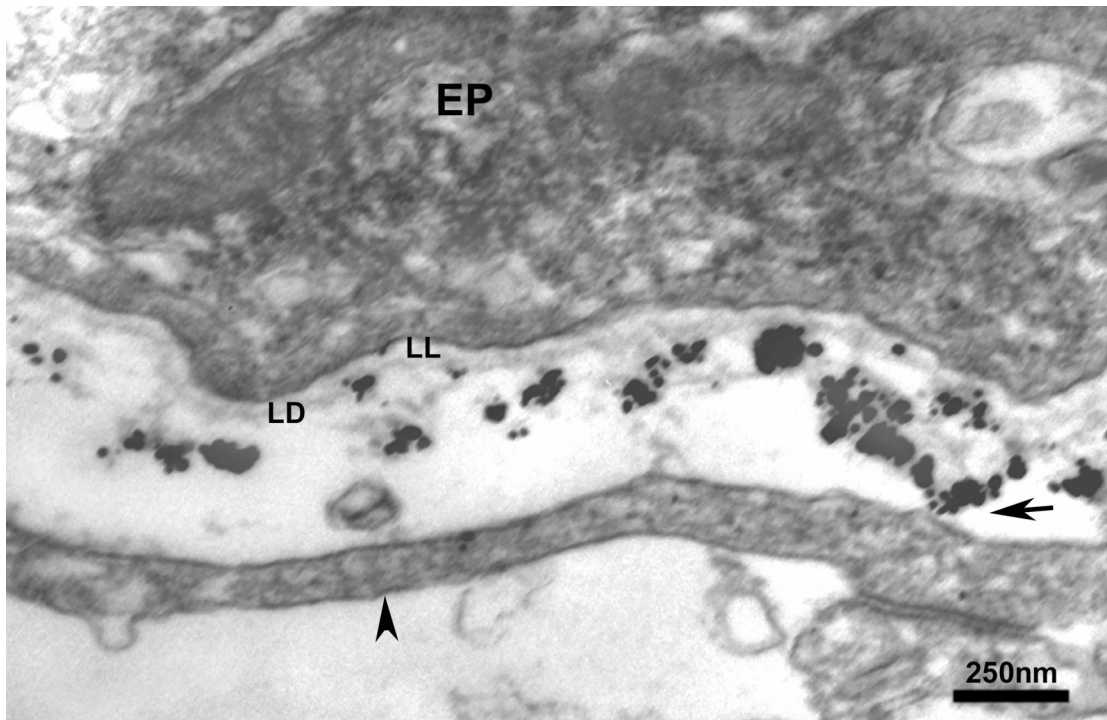
Εικόνα 9. Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στην βασική μεμβράνη του δέρματος εμβρύου ποντικού E14.5 με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού.

Σε αυτή την εικόνα, φαίνεται ο εξωκυττάριος χώρος του επιθηλίου του δέρματος (EP). Πιο συγκεκριμένα, διαγράφονται η lamina lucida (LL) και η lamina densa (LD), πολλές ίνες κολλαγόνου (C) και ο ανοσοεντοπισμός της Fras1 με τη μορφή συγκροτημάτων κόκκων χρυσού στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa. Το άσπρο βέλος καταδεικνύει την παρουσία ενός ημιδεσμοσώματος.



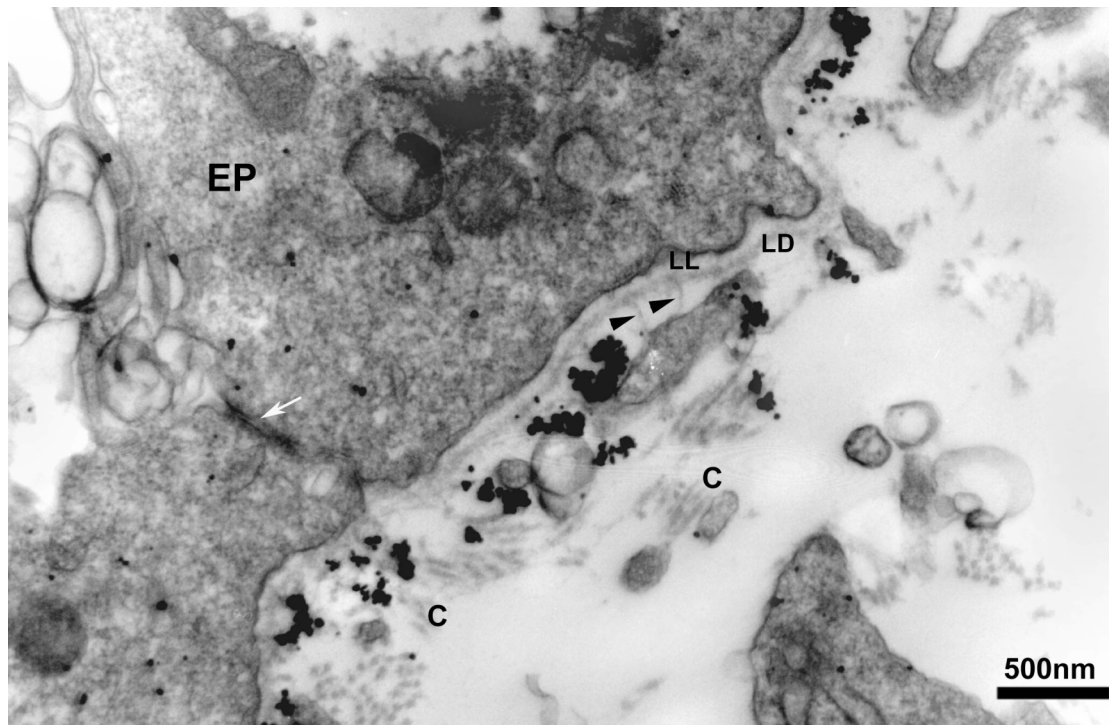
Εικόνα 10. Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στην βασική μεμβράνη του δέρματος εμβρύου ποντικού E14.5 με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού.

Στην εικόνα αυτή φαίνεται το επιθήλιο της επιδερμίδας (EP) και η βασική μεμβράνη αυτού. Διαγράφονται χαρακτηριστικά στοιχεία της βασικής μεμβράνης όπως η lamina lucida (LL) και η lamina densa (LD), ενώ παράλληλα φαίνονται και κάποιες ίνες κολλαγόνου (C). Επίσης, παρατηρούνται τα ινίδια αγκυροβολήσης (αιχμές) που ξεκινούν από τη lamina densa και προεκτείνονται στον υποκείμενο χώρο. Ενδιαφέρον είναι ότι η Fras1, παρόλο που εξακολουθεί γενικά να εντοπίζεται στον χώρο που υπόκειται της lamina densa, φαίνεται να συγκεντρώνεται περιφερικά άμορφων δομών (βέλος) και μάλιστα στην πλευρά αυτών που είναι πλησιέστερα στην lamina densa. Οι άμορφες, ηλεκτρονικά πυκνά αυτές δομές, είναι αγνώστου δομής προέλευσης και λειτουργίας.



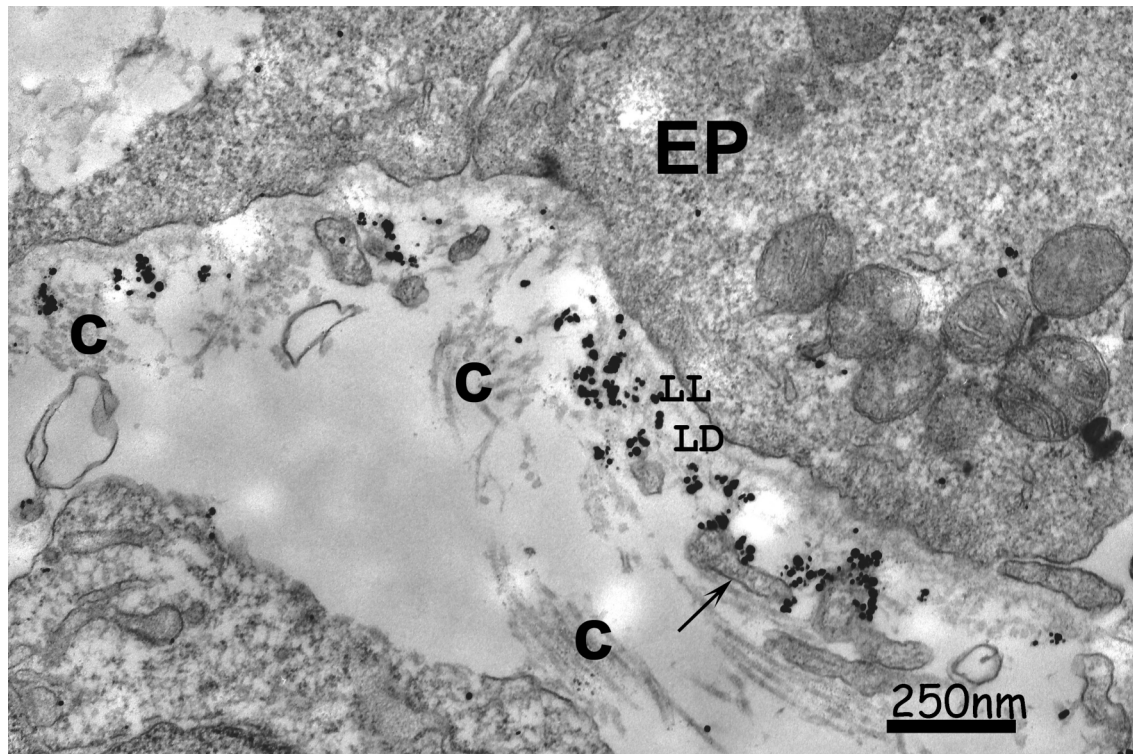
Εικόνα 11. Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στην βασική μεμβράνη του δέρματος εμβρύου ποντικού E14.5 με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού.

Απεικονίζονται, το επιθήλιο του δέρματος (EP), η υποκείμενη βασική μεμβράνη καθώς και τμήμα ενδοθηλιακού κυττάρου (αιχμή). Διαγράφονται επίσης η lamina lucida (LL) και η lamina densa (LD). Η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa με τη μορφή συγκροτημάτων κόκκων χρυσού. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός, ότι η Fras1 εντοπίζεται πολύ κοντά σε τμήμα ενδοθηλιακού κυττάρου (βέλος).



Εικόνα 12. Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στην βασική μεμβράνη του οισοφάγου εμβρύου ποντικού E14.5 με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού.

Η Fras1, εντοπίζεται με τη μορφή συγκροτημάτων κόκκων χρυσού στο χώρο που υπόκειται της lamina densa. Επίσης, απεικονίζονται το εσωτερικό επιθήλιο του οισοφάγου (EP) καθώς και η βασική μεμβράνη αυτού. Διαγράφονται στοιχεία της βασικής μεμβράνης όπως η lamina lucida (LL), η lamina densa (LD), ίνες κολλαγόνου (C) και ινίδια αγκυροβόλησης (αιχμές). Επίσης, εμφανίζεται ένα πιθανό δεσμόσωμα (βέλος), που ενώνει δύο επιθηλιακά κύτταρα μεταξύ τους.



Εικόνα 13. Εντοπισμός της πρωτεΐνης Fras1 στην βασική μεμβράνη του οισοφάγου εμβρύου ποντικού E14.5 με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού.

Στην εικόνα αυτή απεικονίζεται το εσωτερικό επιθήλιο (EP) του οισοφάγου και ο εξωκυττάριος χώρος αυτού. Η Fras1 εντοπίζεται με τη μορφή συγκροτημάτων κόκκων χρυσού στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa. Παρατηρούνται επίσης, η lamina lucida (LL), η lamina densa (LD) και ίνες κολλαγόνου (C). Το βέλος, δείχνει τις άμορφες, ηλεκτρονικά πυκνά δομές, που εντοπίζονται στον χώρο που υπόκειται της lamina densa. Όπως και στο δέρμα, η Fras1 εντοπίζεται περιφερικά των άμορφων δομών και πιο συγκεκριμένα, στην πλευρά αυτών που βρίσκεται πλησιέστερα στην lamina densa.

3.4. Σύνοψη αποτελεσμάτων

Με βάση τα αποτελέσματα των ηλεκτρονιογραφιών που παρατέθηκαν παραπάνω συνάγονται τα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Η Fras1 εντοπίζεται τόσο στο επιθήλιο του δέρματος, όσο και στο επιθήλιο του οισοφάγου, στην βασική μεμβράνη και πιο συγκεκριμένα, στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa, δηλαδή στην sub-lamina densa.
2. Η Fras1 εντοπίζεται με την μέθοδο του κολλοειδούς ανοσοχρυσού με τη μορφή συγκροτημάτων κόκκων χρυσού.
3. Στις περιπτώσεις που στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa υπάρχουν άμορφες, ηλεκτρονικά πυκνές δομές, η Fras1 εντοπίζεται περιφερικά των δομών αυτών και πιο συγκεκριμένα, στην πλευρά των δομών αυτών που βρίσκεται προς τη βασική μεμβράνη.
4. Στο επιθήλιο του δέρματος, διαπιστώθηκε ο εντοπισμός της Fras1 πολύ κοντά σε τμήμα ενδοθηλιακού κυττάρου.
5. Το πρότυπο έκφρασης της Fras1 παραμένει πανομοιότυπο σε δύο διαφορετικά εμβρυϊκά επιθήλια, δηλαδή του δέρματος και του οισοφάγου.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

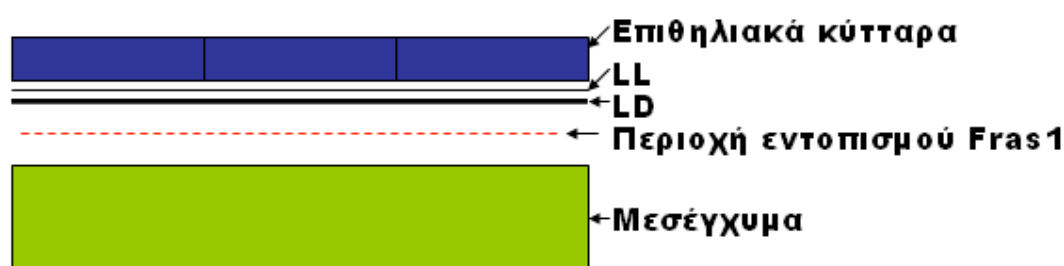
4.1. Η *Fras1* εντοπίζεται στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή, η εμφάνιση υποεπιδερμικών αιμορραγικών πομφολύγων αποτελεί κοινό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό των ομόζυγων *Fras1*^{-/-} ποντικών και των ασθενών με σύνδρομο Fraser. Οι φουσκάλες αυτές είναι αποτέλεσμα της διαταραχής της λειτουργικής και δομικής συνοχής της επιδερμίδας με το χόριον της δερμίδας. Συνεπώς οι παθολογικές αυτές καταστάσεις θα μπορούσαν να ενταχθούν στα πομφολυγώδη νοσήματα. Ενδιαφέρον είναι ότι, τόσο στον ποντικό όσο και στον άνθρωπο, οι φουσκάλες αυτές παρατηρούνται αποκλειστικά κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ηλικίας, γεγονός που δεν συμβαίνει σε καμία άλλη ασθένεια που προκαλεί φουσκάλες (Bruckner-Tuderman and Bruckner, 1998). Στα ομόζυγα *Fras1*^{-/-} ποντίκια, οι υποεπιδερμικές φουσκάλες, σχηματίζονται κυρίως στην περιοχή της κεφαλής και στα άκρα του σώματος. Καθώς προχωράει η ανάπτυξη του εμβρύου, οι φουσκάλες αυτές γίνονται προοδευτικά αιμορραγικές και τελικά επέρχεται ο θάνατος μεταξύ 14.5 και 16.5 ημέρα της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Καμία ένδειξη επιδερμικής ευθραυστότητας, όπως σχηματισμός νέων πομφολύγων, δεν έχει υπάρξει μετά τη γέννηση των ποντικών, υποδηλώνοντας, ότι ο σχηματισμός τους γίνεται αποκλειστικά κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ηλικίας (Vrontou *et al.*, 2003). Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η λειτουργικότητα της *Fras1* περιορίζεται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και ότι δεν εντοπίζεται στην επιδερμίδα μετά τη γέννηση των ποντικών.

Μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα με σκοπό τον χαρακτηρισμό και την περιγραφή της δομής και μοριακής σύστασης των υποεπιδερμικών πομφολύγων (Vrontou *et al.*, 2003). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν γνωστά συστατικά της βασικής μεμβράνης του δέρματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως σε *Fras1*^{-/-} έμβρυα αποκολλάται η επιδερμίδα

από την δερμίδα συμπαράσφροντας και την βασική μεμβράνη. Συστατικά της βασικής μεμβράνης, όπως η λαμινίνη α5, η αγρίνη και το νιδογόνο, εντοπίστηκαν στο επιθήλιο της οροφής των πομφολύγων. Με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, διαπιστώθηκε ότι το σημείο αποκόλλησης εντοπίζεται μεταξύ επιδερμίδας και δερμίδας και πιο συγκεκριμένα στον χώρο που υπόκειται της lamina densa. Μετά την αποκόλληση, εμφανίζεται καλοδιατηρημένη η lamina lucida και η lamina densa. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δημιούργησαν την υπόθεση ότι η λειτουργία της Fras1 πιθανώς να εντοπίζεται στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού, που έδειξαν ότι η Fras1 εντοπίζεται στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa στη βασική μεμβράνη του επιθηλίου των βρόγχων σε έμβρυα ποντικού αγρίου τύπου E14.5 (Petrou *et al.*, 2005).

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών, τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής δείχνουν ότι η Fras1 εντοπίζεται στο χώρο της βασικής μεμβράνης του δέρματος που υπόκειται της lamina densa. Αυτό το εύρημα ενισχύει την υπόθεση ότι η λειτουργία της Fras1 εντοπίζεται σε αυτή την περιοχή (σχήμα 7). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι η Fras1 είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 4010 αμινοξέα. Για την παρασκευή του anti-Fras1 αντισώματος, χρησιμοποιήθηκε η περιοχή της πρωτεΐνης (1212-1525aa) που εμφανίζει ομολογία με την πρωτεογλυκάνη NG2. Δεν θα πρέπει, λοιπόν, να αποκλείσουμε την περίπτωση ένα τμήμα της Fras1 να βρίσκεται και στην lamina densa.



Σχήμα 7. Σχηματική αναπαράσταση του εντοπισμού της Fras1 στο εμβρυϊκό επιθήλιο του δέρματος. LL: lamina lucida, LD: lamina densa

4.2. Η Fras1 ως συστατικό της βασικής μεμβράνης διαφόρων εμβρυϊκών επιθηλίων

Είναι γνωστό ότι τα διάφορα επιθήλια διακρίνονται περιγραφικά με βάση δύο παραμέτρους: α) τον αριθμό των κυτταρικών στοιβάδων που αποτελούνται και β) το σχήμα των κυττάρων αυτών. Κατά συνέπεια, η ονομασία κάθε επιθηλίου προέρχεται από δομικά και όχι λειτουργικά χαρακτηριστικά αυτού. Υπό το πρίσμα αυτό, τα διάφορα επιθήλια χαρακτηρίζονται ως «απλά» (simple) όταν είναι μονόστοιβα και «στρωματώδη» (stratified) όταν είναι πολύστοιβα. Τα κύτταρα που δομούν τις στοιβάδες αυτές, χαρακτηρίζονται ως «φολιδωτά» (squamous) όταν το πλάτος τους είναι μεγαλύτερο από το ύψος τους, «κυβοειδή» (cuboidal) όταν όλες οι διαστάσεις τους είναι περίπου συμμετρικές και «επιμήκη» (columnar) όταν το ύψος τους ξεπερνά το πλάτος τους. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί, ότι σε «στρωματώδη» επιθήλια, το ύψος και το σχήμα των κυττάρων διαφέρει από στοιβάδα σε στοιβάδα, αλλά για την κατάταξη του επιθηλίου λαμβάνεται υπόψη μόνο το σχήμα των κυττάρων της επιφανειακής του στοιβάδας.

Με πειράματα ανοσοϊστοχημείας (Vrontou *et al.*, 2003), έχει διαπιστωθεί, ότι η Fras1 ανιχνεύεται υπό τη μορφή ενός γραμμικού προτύπου, στον εξωκυττάριο χώρο που υπόκειται της βασικής πλευράς αρκετών εμβρυϊκών επιθηλίων (της επιδερμίδας, του κερατοειδή χιτώνα, των βλεφάρων, των άκρων, του εντέρου, του αναπτυσσόμενου ουρητήρα, του μεσονεφρικού σωλήνα, των νεφρών, των πνευμόνων, του χοριοειδούς πλέγματος, της στοματικής κοιλότητας, του αναπτυσσόμενου αναπνευστικού σωλήνα και του οισοφάγου). Τα δεδομένα αυτά, συμφωνούν με την προβλεπόμενη ύπαρξη ενός πεπτιδίου σινιάλου για εισαγωγή της Fras1 στο ενδοπλασματικό δίκτυο και ολοκλήρωση της σύνθεσής της, αλλά και με την παρουσία στην Fras1 διαφόρων πρωτεϊνικών περιοχών που απαντώνται σε εκκρινόμενους ή διαμεμβρανικούς παράγοντες. Επίσης, τα δεδομένα αυτά,

επιβεβαιώνουν, ότι η *Fras1*, αποτελεί ένα νέο εξωκυττάριο συστατικό (εκκρινόμενο ή διαμεμβρανικό). Με το οπτικό μικροσκόπιο, το γραμμικό πρότυπο έκφρασης της *Fras1* κάτω από το επιθήλιο είναι ανάλογο με το πρότυπο έκφρασης πρωτεϊνών της βασικής μεμβράνης. Ωστόσο, η άποψη ότι η *Fras1* αποτελεί συστατικό της βασικής μεμβράνης δε θα μπορούσε ποτέ να υποστηριχθεί με βεβαιότητα χωρίς δεδομένα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

Τα υπάρχοντα δεδομένα σε επίπεδο ηλεκτρονικής μικροσκοπίας για την *Fras1* δηλώνουν ότι εντοπίζεται στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa στη βασική μεμβράνη του επιθηλίου των βρόγχων σε έμβρυα ποντικού E14.5 (Petrou *et al.*, 2005). Κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής, τέθηκε ως στόχος η υπερμικροσκοπική χαρτογράφηση της *Fras1* σε επιθήλια που ανήκουν σε διαφορετική κατηγορία από αυτή των βρόγχων, με σκοπό την ευρύτερη μελέτη της τοπογραφίας αυτής της πρωτεΐνης στον εξωκυττάριο χώρο. Τα επιθήλια που επελέγησαν να μελετηθούν ήταν του δέρματος και του οισοφάγου σε έμβρυα ποντικού αγρίου τύπου E14.5. Και για τα δύο αυτά επιθήλια έχει αποδειχθεί με πειράματα ανοσοϊστοχημείας ότι η *Fras1* εμφανίζει γραμμικό πρότυπο έκφρασης στην περιοχή που υπόκειται της βασικής πλευράς αυτών των επιθηλίων (Vrontou *et al.*, 2003). Η επιλογή του επιθηλίου του δέρματος έγινε, γιατί ένα από τα συχνότερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά σε ασθενείς με σύνδρομο Fraser και σε ομόζυγα *Fras1*^{-/-} ποντίκια είναι η δημιουργία υποεπιδερμικών πομφολύγων. Τα δύο αυτά επιθήλια, ανήκουν στην ίδια κατηγορία επιθηλίων, που ονομάζεται «στρωματώδη πλακώδη». Βέβαια, θα πρέπει να τονιστεί ότι, τουλάχιστον στα ποντίκια, το επιθήλιο του δέρματος αρχικά κατά την εμβρυογένεση είναι μονόστιβο και προοδευτικά γίνεται πολύστιβο, ενώ το επιθήλιο του οισοφάγου είναι από την αρχή πολύστιβο. Πιο συγκεκριμένα, την ημέρα 11.5 της εμβρυογένεσης, η επιδερμίδα αποτελείται από ένα στρώμα βασικών κερατινοκυττάρων και ένα εξωτερικό στρώμα την περιδερμίδα και βαθμιαία αναπτύσσει αυξανόμενη στρωμάτωση, για να φθάσει στην ολοκλήρωσή της την εμβρυϊκή ημέρα 17.5 (Kreidberg, 1996).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής αποκάλυψαν ότι στα εμβρυϊκά (E14.5)

επιθήλια του δέρματος και του οισοφάγου, η Fras1 εντοπίζεται στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa. Είναι ενδιαφέρον το ότι το πρότυπο έκφρασης της Fras1 είναι πανομοιότυπο σε τρία εμβρυϊκά επιθήλια, δηλαδή του δέρματος, του οισοφάγου και των βρόγχων. Το γεγονός αυτό, μόνο τυχαίο δεν μπορεί να χαρακτηριστεί, καθώς και για τα τρία αυτά επιθήλια τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ήταν στις ίδιες τομές εμβρύου.

Με δεδομένη, λοιπόν, την ομοιότητα στο πρότυπο κατανομής της Fras1, σε επίπεδο ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και στα τρία εμβρυϊκά επιθήλια, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η Fras1 αποτελεί βασικό συστατικό της βασικής μεμβράνης διαφόρων εμβρυϊκών επιθηλίων.

4.3. Συσχέτιση ανάμεσα στη Fras1 και στις υποεπιδερμικές φουσκάλες

Διαταραχές σε αρκετά από τα συστατικά των βασικών μεμβρανών της επιδερμίδας, που οφείλονται, είτε σε μεταλλαγές των γονιδίων που τα κωδικοποιούν, είτε στη δημιουργία αυτο-αντισωμάτων, οδηγούν σε μια σειρά δερματικών ασθενειών στον άνθρωπο, όπως η Πομφολυγώδης Επιδερμόλυση (EB) και το σύνδρομο Alport (Chan, 1997). Το πρότυπο των δερματικών ασθενειών, που οφείλονται σε διαταραχές συστατικών της βασικής μεμβράνης της επιδερμίδας, αποτελεί η EB. Με τον όρο αυτό περιγράφεται μία ετερογενής κατηγορία κληρονομήσιμων ασθενειών (αυτοσωμικές υπολειπόμενες ή επικρατείς), οι οποίες χαρακτηρίζονται από αφύσικη ευθραυστότητα του δέρματος των ασθενών. Η EB διακρίνεται σε τέσσερις κατηγορίες με βάση το επίπεδο σχηματισμού της φουσκάλας στην περιοχή του δέρματος, δηλαδή σύμφωνα με το στρώμα στο οποίο πραγματοποιείται η αποκόλληση επιδερμίδας-δερμίδας. Μία κατηγορία της EB, αποτελεί η Δυστροφική Πομφολυγώδης Επιδερμόλυση (DEB), στην οποία παρατηρούνται διαταραχές στα ινίδια αγκυροβόλησης προκαλούμενες από μεταλλαγές στο γονίδιο του κολλαγόνου VII. Αποτέλεσμα αυτών των διαταραχών, είναι η αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα στο επίπεδο της sub-lamina densa (Pulkkinen and Uitto, 1998).

Ο παθολογικός φαινότυπος των *Fras1*^{-/-} εμβρύων, περιλαμβάνει τη δημιουργία υπο-επιδερμικών πομφολύγων, που προοδευτικά γίνονται αιμορραγικές. Επίσης, αποτελεί την μοναδική περίπτωση που δημιουργούνται φουσκάλες αποκλειστικά και μόνο στην εμβρυϊκή ηλικία, εντός της μήτρας (*in utero*), όπου οι τριβές είναι ελάχιστες, και, παράλληλα, ουδέποτε παρατηρήθηκαν φουσκάλες ή άλλου τύπου επιδερμικές διαταραχές στα ενήλικα *Fras1*^{-/-} ποντίκια. Με δεδομένο, ότι η *Fras1* εντοπίζεται υπερμικροσκοπικά σε έμβρυα αγρίου τύπου E14.5 στην sub-lamina densa, θα μπορούσε να γίνει η υπόθεση ότι, κατ' αντιστοιχία με την Δυστροφική Πομφολυγώδη Επιδερμόλυση, η δημιουργία πομφολύγων στους ασθενείς με σύνδρομο Fraser και στα μεταλλαγμένα *Fras1*^{-/-} ποντίκια οφείλεται σε διαταραχές συστατικών της βασικής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, θα μπορούσε να γίνει η υπόθεση ότι διαταραχές σε συστατικά της sub-lamina densa, όπως η *Fras1*, προκαλούν την αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα με επακόλουθο το σχηματισμό των υπο-επιδερμικών πομφολύγων. Την υπόθεση αυτή, ενισχύουν τα αποτελέσματα άλλων πειραμάτων, σύμφωνα με τα οποία, το επίπεδο αποκόλλησης επιδερμίδας-δερμίδας, με επακόλουθο τη δημιουργία πομφολύγων σε *Fras1*^{-/-} ποντίκια, εντοπίζεται κάτω από την lamina densa (Vrontou *et al.*, 2003). Αν στο μέλλον επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση, θα αποτελεί ένα ακόμη δεδομένο για την κατάταξη της *Fras1* ως βασικό συστατικό των βασικών μεμβρανών των εμβρυϊκών επιθηλίων.

4.4. Η *Fras1* ως πιθανό συστατικό του συμπλόκου αγκυροβόλησης

Μία από τις πρώτες διαπιστώσεις που έγιναν μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων της παρούσας διατριβής ήταν ότι οι κόκκοι χρυσού, που σημαίνουν την *Fras1*, παρουσιάζονταν σε κάθε περίπτωση σε νέφη. Για να κατανοήσουμε αυτή την κατανομή της *Fras1*, μπορούμε να βοηθηθούμε από τα δεδομένα για την κατανομή άλλων πρωτεϊνών που εντοπίζονται στον ευρύτερο χώρο της βασικής μεμβράνης του δέρματος. Με βάση την ισχύουσα βιβλιογραφία, υφίστανται δύο διαφορετικοί τύποι κολλαγόνου, το

κολλαγόνο VII και το κολλαγόνο XVIII, των οποίων ο εντοπισμός στη βασική μεμβράνη του δέρματος με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού εμφανίζεται σε νέφη κόκκων χρυσού, όπως και στην περίπτωση της Fras1.

Το κολλαγόνο XVIII εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη επιθηλίων και αγγειακού ενδοθηλίου (Saarela *et al.*, 1998). Εκφράζεται σε τρεις διαφορετικές μορφές, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους στο αμινοτελικό άκρο, αλλά όλες έχουν πολλαπλές περιοχές τριπλής-έλικας που διακόπτονται από περιοχές μη-τριπλής-έλικας (Halfter *et al.*, 1998). Ένα μέρος της καρβοξυτελικής περιοχής μη-τριπλής-έλικας (NC1) του κολλαγόνου XVIII, αποτελεί το *αντιαγγειογενετικό θραύσμα*, γνωστό ως ενδοστατίνη (O'Reilly *et al.*, 1997). Σε ποντίκια που απουσιάζει το κολλαγόνο XVIII και το προϊόν πρωτεόλυσης αυτού (ενδοστατίνη), παρατηρείται απουσία ή ανώμαλη αύξηση των αγγείων του αμφιβληστροειδή (Fukai *et al.*, 2002). Έχει προταθεί ότι το κολλαγόνο XVIII/ενδοστατίνη μπορεί να δρα ως ρυθμιστής της αγγειογένεσης σε διαδικασίες που έχουν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση καθεψινών και μεταλλοπρωτεασών (Felbor *et al.*, 2000). Επίσης, από τη στιγμή που το κολλαγόνο XVIII (όπως και τα κολλαγόνα II και VI), εκφράζεται στο μάτι τόσο κατά την εμβρυϊκή ηλικία όσο και μετά τη γέννηση, είναι πιθανό να αποτελεί μέρος ενός συμπλόκου απαραίτητου για τη διατήρηση της ομαλής λειτουργίας του αμφιβληστροειδή (Fukai *et al.*, 2002).

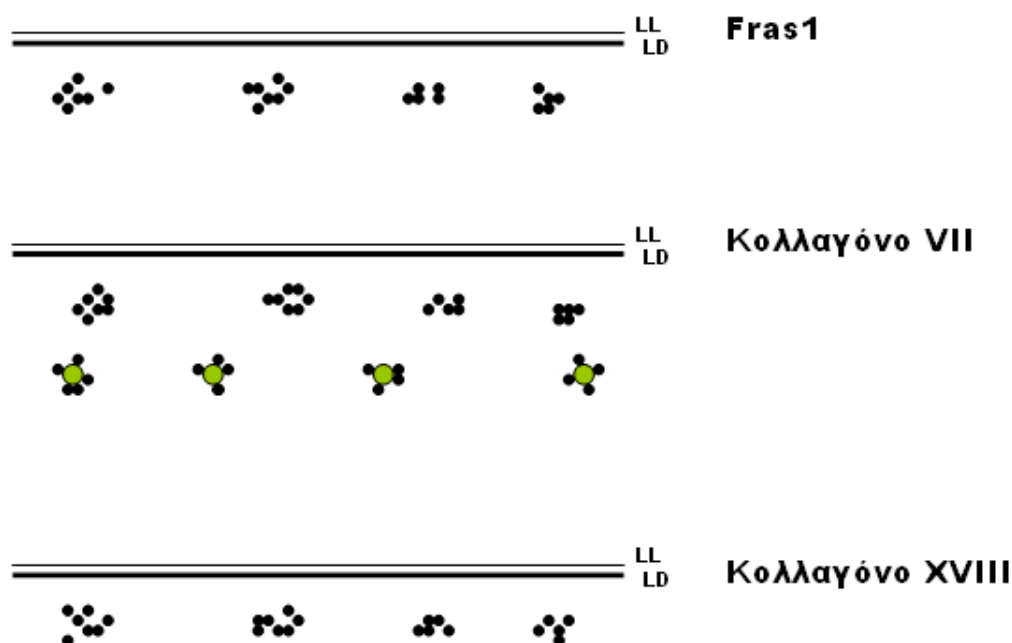
Ο εντοπισμός του κολλαγόνου XVIII στη βασική μεμβράνη του κερατοειδή χιτώνα του ματιού, επιβεβαιώθηκε με υπερ-μικροσκοπική μελέτη, με την τεχνική του ανοσοχρυσού (χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ενάντια στην περιοχή NC1). Επίσης, το κολλαγόνο XVIII εντοπίστηκε στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας. Πιο συγκεκριμένα, συνεντοπίστηκαν νέφη κόκκων χρυσού με ινώδεις δομές στη sub-lamina densa της βασικής μεμβράνης της επιδερμίδας, υποδεικνύοντας πιθανό ρόλο του κολλαγόνου XVIII στο σύμπλοκο αγκυροβόλησης. Σύμφωνα με την μέχρι τώρα θεωρία του συμπλόκου αγκυροβόλησης, τα ημιδεσμοσώματα που τοποθετούνται στη βασική πλευρά των βασικών κερατινοκυττάρων, συνδέονται με τα νημάτια αγκυροβόλησης, τα οποία διατρέχουν τη lamina lucida. Τα νημάτια

αγκυροβόλησης ενώνονται με τα ινίδια αγκυροβόλησης, που ξεκινούν από τη lamina densa και είτε καταλήγουν στις πλάκες αγκυροβόλησης, είτε ξανααγυρίζουν στη lamina densa. Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπισθεί τουλάχιστον 20 διαφορετικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη δημιουργία του συμπλόκου αγκυροβόλησης και με βάση τα παραπάνω δεδομένα το κολλαγόνο XVIII μπορεί να συγκαταλέγεται σε αυτές.

Ένας άλλος τύπος κολλαγόνου που με πειράματα ανοσοχρυσού εντοπίζεται σε νέφη κόκκων χρυσού είναι το κολλαγόνο VII. Το κολλαγόνο VII θεωρείται μία από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό του συμπλόκου αγκυροβόλησης. Πιο συγκεκριμένα, με πειράματα ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας και χρησιμοποιώντας αντισώματα ενάντια στο καρβοξυτελικό άκρο των μορίων κολλαγόνου VII, διαπιστώθηκε ότι η σήμανση δεν περιοριζόταν μόνο στην ακριβώς υποκείμενη περιοχή της lamina densa (πράγμα λογικό από τη στιγμή που το κολλαγόνο VII αποτελεί βασικό δομικό συστατικό των ινιδίων αγκυροβόλησης που εντοπίζονται σε αυτήν τη περιοχή), αλλά επεκτεινόταν και στις πλάκες αγκυροβόλησης. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η καρβοξυτελική περιοχή του κολλαγόνου VII εντοπίζεται τόσο στην lamina densa όσο και στις πλάκες αγκυροβόλησης (Keene *et al.*, 1987).

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, καθίσταται σαφές, ότι τρεις διαφορετικές πρωτεΐνες, η Fras1, το κολλαγόνο VII και το κολλαγόνο XVIII εντοπίζονται με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού σε νέφη (σχήμα 8). Αξιοσημείωτο είναι ότι το κολλαγόνο VII θεωρείται ως βέβαιο συστατικό του συμπλόκου αγκυροβόλησης και ότι το κολλαγόνο XVIII με τα μέχρι σήμερα δεδομένα είναι πολύ πιθανό να συγκαταλέγεται στις πρωτεΐνες που δομούν το σύμπλοκο αγκυροβόλησης. Η ομοιότητα που εμφανίζει η Fras1 σε σχέση με τους δύο αυτούς τύπου κολλαγόνου στον τρόπο (νέφη κόκκων χρυσού) αλλά και στην τοποθεσία (sub-lamina densa) που εντοπίζεται, καθιστά την Fras1 ως υποψήφιο μέλος των πρωτεϊνών που δομούν το σύμπλοκο αγκυροβόλησης. Θα πρέπει να τονιστεί το γεγονός, ότι δεν είναι σαφές αν ο κάθε κόκκος χρυσού αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό μόριο Fras1 ή όχι, με δεδομένο ότι το πρώτο αντίσωμα (anti-Fras1) είναι πολυκλωνικό. Έτσι, θα

μπορούσαν υποθετικά πολλά πρώτα αντισώματα να προσδένονται σε ένα μόριο Fras1 και η προκύπτουσα εικόνα να είναι νέφη κόκκων χρυσού.



Σχήμα 8. Εντοπισμός συστατικών της βασικής μεμβράνης του δέρματος σε νέφη κόκκων χρυσού. Σχηματική αναπαράσταση του εντοπισμού της Fras1, κολλαγόνου VII και κολλαγόνου XVIII στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας. Οι μαύρες σφαίρες συμβολίζουν τους κόκκους χρυσού και οι στρογγυλές πράσινες δομές τις πλάκες αγκυροβόλησης. LL: lamina lucida, LD: lamina densa

4.5. Η πιθανή αλληλεπίδραση της Fras1 με άμορφες, ηλεκτρονικά πυκνά δομές

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στα Αποτελέσματα, ο εντοπισμός της Fras1 σχετίζεται με άμορφες, ηλεκτρονικά πυκνές δομές. Η Fras1 φαίνεται να αγκυροβολεί σε αυτές τις δομές που εντοπίζονται στην sub-lamina densa της βασικής μεμβράνης τόσο του δέρματος όσο και του οισοφάγου (σχήμα 9). Είναι επίσης γνωστό ότι στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa, εντοπίζονται οι πλάκες αγκυροβόλησης.

Οι πλάκες αγκυροβόλησης είναι άμορφες ηλεκτρονικά πυκνές δομές, που εντοπίζονται στην περιοχή της sub-lamina densa της βασικής

μεμβράνης διαφόρων επιθηλίων. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για ανεξάρτητες «νησίδες», ηλεκτρονικά πυκνού υλικού, των οποίων η σύνδεση με την lamina densa επιτυγχάνεται μόνο διαμέσου των ινιδίων αγκυροβόλησης. Με πειράματα ανοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, διαπιστώθηκε ότι η καρβοξυτελική περιοχή του κολλαγόνου VII εντοπίζεται τόσο στην lamina densa όσο και στις πλάκες αγκυροβόλησης. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των δομών αυτών, είναι ότι υπερμικροσκοπικά μοιάζουν με τη lamina densa. Επιπλέον πειράματα, που διενεργήθηκαν με σκοπό τη διερεύνηση της μοριακής σύστασης των δομών αυτών, αποκάλυψαν ότι οι πλάκες αγκυροβόλησης αποτελούνται, εκτός από κολλαγόνο VII και από κολλαγόνο IV. Το γεγονός αυτό, εξηγεί την ομοιότητα μεταξύ των δομών αυτών και της lamina densa, από τη στιγμή που είναι γνωστό ότι η lamina densa αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο IV αλλά και από κολλαγόνο VII.

Παρόλο που η Fras1 φαίνεται να αγκυροβολεί σε άμορφες ηλεκτρονικά πυκνά δομές (όπως ακριβώς περιγράφονται από τη βιβλιογραφία οι πλάκες αγκυροβόλησης), εντούτοις, υπάρχουν αρκετές φαινομενικές διαφορές των δομών αυτών με τις γνωστές πλάκες αγκυροβόλησης. Η κυριότερη διαφορά τους είναι ότι, ενώ όπως έχει ήδη αναφερθεί οι πλάκες αγκυροβόλησης μοιάζουν λόγω της μοριακής τους σύστασης με τη lamina densa, αυτές οι άγνωστες σε μας δομές δεν φαίνεται να μοιάζουν με τη lamina densa. Μια ακόμη διαφορά, αποτελεί το γεγονός ότι οι πλάκες αγκυροβόλησης δεν φαίνεται να περιβάλλονται από κάποια μεμβράνη, σε αντίθεση με τις δομές στις οποίες αγκυροβολούν τα μόρια Fras1 και οι οποίες δείχνουν να περιβάλλονται από μεμβράνη. Θα μπορούσε γενικότερα να λεχθεί, ότι οι πλάκες αγκυροβόλησης μοιάζουν υπερμικροσκοπικά με τμήμα της lamina densa και οι άγνωστες δομές στις οποίες αγκυροβολεί η Fras1 με τμήμα κάποιου κυττάρου.

Από τα παραπάνω συνάγεται το συμπέρασμα πως οι δομές στις οποίες φαίνεται να αγκυροβολεί η Fras1 πιθανότατα δεν συμπίπτουν με τις γνωστές από τη βιβλιογραφία πλάκες αγκυροβόλησης. Βέβαια, θα πρέπει να διενεργηθούν πειράματα ανοσοϊστοχημείας προκειμένου να διαλευκανθεί η

μοριακή σύσταση των άγνωστων για εμάς αυτών δομών και, πιο συγκεκριμένα, πειράματα ανοσο-εντοπισμού των κολλαγόνων IV και VII, ώστε να αποκλειστεί ή να τεκμηριωθεί και μοριακά η πιθανότητα να αντιστοιχούν οι δομές αυτές στις πλάκες αγκυροβόλησης.

Η αναγκαιότητα πραγματοποίησης επιπλέον πειραμάτων για τη διαλεύκανση της μοριακής σύστασης αυτών των δομών, καταδεικνύεται και από άλλα στοιχεία. Ειδικότερα, οι δομές αυτές εντοπίζονται στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa της βασικής μεμβράνης του δέρματος και του οισοφάγου. Επίσης, πολλές φορές, καταλήγουν σε αυτές ινίδια αγκυροβόλησης που ξεκινούν από τη lamina densa, ενώ οι ίνες κολλαγόνου εντοπίζονται πάντοτε υποκείμενα των δομών αυτών. Ένα ακόμη ενδιαφέρον στοιχείο είναι, ότι η Fras1 φαίνεται να αγκυροβολεί περιφερικά αυτών των δομών και ποτέ στο εσωτερικό τους. Μάλιστα, ο εντοπισμός της Fras1, περιορίζεται τις περισσότερες φορές στην πλευρά των δομών αυτών που βρίσκεται πλησιέστερα προς τη lamina densa.

Συμπερασματικά, μπορεί να γίνει η υπόθεση, πως αυτές οι άμορφες και ηλεκτρονικά πυκνά δομές πιθανώς να σχετίζονται -με τρόπο άγνωστο προς το παρόν- με τον εντοπισμό της Fras1 στην sub-lamina densa της βασικής μεμβράνης του επιθηλίου του δέρματος και του οισοφάγου. Παραμένει άγνωστο το κατά πόσο η Fras1 αλληλεπιδρά ή όχι με τις δομές αυτές και, αν αλληλεπιδρά, το κατά πόσο αυτή η αλληλεπίδραση είναι άμεση (με κάποιο συστατικό των δομών αυτών) ή έμμεση (με κάποιο μόριο που δεσμεύεται περιφερικά των δομών αυτών). Με τα μέχρι σήμερα δεδομένα, το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης Fras1 φαίνεται να σχετίζεται με αυτές, χωρίς όμως να υπάρχουν αποδείξεις για την αναγκαιότητα τους. Μάλιστα, σε περιπτώσεις που απουσιάζουν, δε διακρίνεται κάποια αλλαγή στον τρόπο εντοπισμού της Fras1, παρόλο που παρατηρούνται εκτεταμένα νέφη κόκκων χρυσού στις περιοχές κοντά ή περιφερικά των δομών αυτών, όταν αυτές υπάρχουν.



Σχήμα 9. Εντοπισμός της Fras1 περιφερικά άγνωστων ηλεκτρονικά πυκνά άμορφων δομών. LL: lamina lucida, LD: lamina densa

4.6. Η πιθανή αλληλεπίδραση της Fras1 με τα ινίδια αγκυροβόλησης

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής ανέδειξαν μια πιθανή σχέση μεταξύ της Fras1 και των ινιδίων αγκυροβόλησης. Η Fras1 εντοπίζεται στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa της βασικής μεμβράνης του επιθηλίου του δέρματος και του οισοφάγου. Στην ίδια ακριβώς περιοχή εντοπίζονται και οι χαρακτηριστικές δομές της βασικής μεμβράνης που ονομάζονται ινίδια αγκυροβόλησης.

Τα ινίδια αγκυροβόλησης ξεκινούν από την lamina densa και εκτείνονται στον υποκείμενο συνδετικό ιστό. Το μήκος των ινιδίων αυτών είναι περίπου 800nm και κάθε ινίδιο φαίνεται να ξεκινάει από τη LD και είτε να αγκυροβολεί στις λεγόμενες πλάκες αγκυροβόλησης είτε να ξανααγυριζει στη LD. Σύμφωνα με τον Shimizu, το 90% των ινιδίων αγκυροβόλησης ξεκινούν και τερματίζουν στη LD (Shimizu *et al.*, 1997). Επίσης, έχει δειχθεί ότι τα ινίδια αγκυροβόλησης εντοπίζονται έντονα στις περιοχές που υπόκεινται των ημιδεσμοσωμάτων (Rousselle *et al.*, 1997). Το κύριο δομικό συστατικό των ινιδίων αγκυροβόλησης, είναι το κολλαγόνο VII, το οποίο συντίθεται ως πρόδρομο μόριο, το προκολλαγόνο VII (Bruckner- Tunderman *et al.*, 1995).

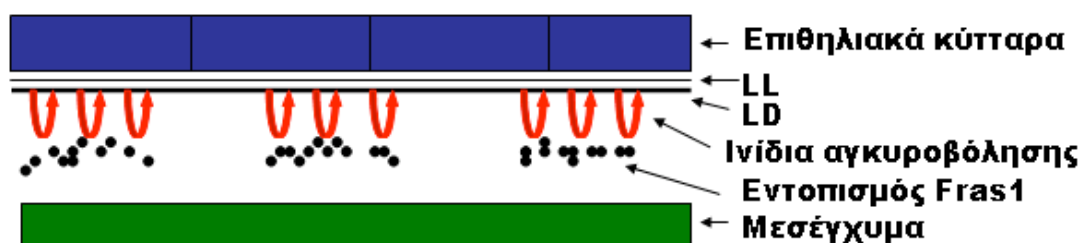
Όπως προκύπτει από τα πειράματα της παρούσας διατριβής, η Fras1 εντοπίζεται συνήθως κοντά στα ινίδια αγκυροβόλησης και, πιο

συγκεκριμένα, στα σημεία αυτών που απέχουν περισσότερο από την lamina densa (σχήμα 10). Με δεδομένο ότι στα δείγματα που μελετήθηκαν δεν διαπιστώθηκε η τεκμηριωμένη ύπαρξη πλακών αγκυροβόλησης, τα ινίδια αγκυροβόλησης που εντοπίστηκαν πιθανότατα ανήκουν στην κατηγορία αυτών που ξεκινούν από τη lamina densa, διαγράφουν μία μικρή καμπύλη τροχιά στον υποκείμενο ιστό και επιστρέφουν στη lamina densa. Επίσης, έχει δειχθεί, ότι τέτοιου είδους ινίδια αγκυροβόλησης συχνά παγιδεύουν ινίδια κολλαγόνου, προσφέροντας επιπλέον συνεκτικότητα στη σύνδεση δερμίδας-επιδερμίδας. Σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία, δεν διαπιστώθηκε αυξημένος εντοπισμός των ινιδίων αγκυροβόλησης σε περιοχές που υπόκεινται των ημιδεσμοσωμάτων (Rousselle *et al.*, 1997).

Το πρότυπο έκφρασης της *Fras1* φαίνεται να σχετίζεται με τα ινίδια αγκυροβόλησης. Το γεγονός του εντοπισμού της *Fras1* στο κατώτερο σημείο των ινιδίων αγκυροβόλησης μπορεί να είναι τυχαίο, πιο πιθανό όμως είναι να οφείλεται στην πιθανή μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Αν κάτι τέτοιο αποδειχθεί σωστό, τότε θα υπάρξουν επιπλέον λόγοι που να υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η λειτουργία της *Fras1* εντοπίζεται στην περιοχή που υπόκειται της lamina densa καθώς και νέα δεδομένα στα αίτια αποκόλλησης δερμίδας-επιδερμίδας με συνέπεια τη δημιουργία υπο-επιδερμικών πομφολύγων.

Για να ελεγχθεί το κατά πόσο αλληλεπιδρά η *Fras1* με τα ινίδια αγκυροβόλησης, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν πειράματα διπλής ανοσο-σήμανσης της *Fras1* με το κολλαγόνο VII, που αποτελεί και το κύριο δομικό συστατικό των ινιδίων αγκυροβόλησης. Παρόλα αυτά, πειράματα ανοσοφθορισμού έδειξαν, πως στα *Fras1^{-/-}* ποντίκια δεν αλλάζει σε σχέση με τα αγρίου τύπου το πρότυπο έκφρασης ορισμένων γνωστών πρωτεϊνών της βασικής μεμβράνης όπως της λαμινίνης α5 και του κολλαγόνου VII. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι πιθανώς η *Fras1* να μην αλληλεπιδρά με το κολλαγόνο VII ή ο εντοπισμός του κολλαγόνου VII να είναι ανεξάρτητος από αυτόν της *Fras1*. Βέβαια, θα πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι μπορεί το κολλαγόνο VII να είναι το κύριο δομικό συστατικό των ινιδίων αγκυροβόλησης αλλά υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες που αποδεδειγμένα

εντοπίζονται στα ινίδια αυτά. Κατά συνέπεια, ακόμη και αν αποδειχθεί η μη αλληλεπίδραση της Fras1 με το κολλαγόνο VII, είναι δυνατό η Fras1 να αλληλεπιδρά με τα ινίδια αγκυροβόλησης μέσω των άλλων πρωτεϊνών που εντοπίζονται σε αυτά.



Σχήμα 10. Σχηματική απεικόνιση του εντοπισμού της Fras1 σε σχέση με τη θέση των ινιδίων αγκυροβόλησης. Στο σχήμα απεικονίζονται επιθηλιακά κύτταρα, η lamina lucida (LL), η lamina densa (LD), τα ινίδια αγκυροβόλησης, νέφη κόκκων χρυσού που αντιστοιχούν σε μόρια Fras1 και το μεσέγχυμα.

4.7. Μελλοντικά πειράματα

Η Fras1 είναι μια πρωτεΐνη 4010 αμινοξέων, η οποία συσχετίζεται με τις «Bleb» μεταλλάξεις στον ποντικό και το σύνδρομο Fraser στον άνθρωπο. Από τα μέχρι τώρα δεδομένα, η πρωτεΐνη αυτή είναι αποκλειστικά εμβρυϊκή και η προβλεπόμενη αμινοξική της αλληλουχία περιλαμβάνει γνωστά μοτίβα άλλων πρωτεϊνών, τα οποία όμως σε καμιά μέχρι σήμερα γνωστή πρωτεΐνη δεν απαντώνται όλα μαζί. Ο εντοπισμός της στη βασική μεμβράνη τριών εμβρυϊκών επιθηλίων και η υπόθεση ότι η απουσία της στην εμβρυϊκή ηλικία ευθύνεται για τη δημιουργία υπο-επιδερμικών πομφολύγων παρέχει νέα δεδομένα σχετικά με τις πρωτεΐνες των βασικών μεμβρανών, παράλληλα όμως δημιουργεί και εύλογα ερωτηματικά.

Η πλήρης μοριακή σύσταση των ποικίλων βασικών μεμβρανών, ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η συγκρότηση των συστατικών τους, καθώς και ο τρόπος με το οποίο τα συστατικά αυτά επιτελούν τις λειτουργίες τους, δεν είναι ακόμα γνωστά. Ο τρόπος με τον οποίο

ρυθμίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών της βασικής μεμβράνης δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί. Επίσης, πιστεύεται ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης στα μετάζωα, δεν έχουν μόνο συντηρημένη νουκλεοτιδική αλληλουχία, αλλά παρουσιάζουν συντήρηση και στη λειτουργία τους. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε η δομή της περιοχής G2 του νιδογόνου που δεσμεύει περλεκάνη και πιθανότατα και το κολλαγόνο IV και διαπιστώθηκε ότι αυτή η περιοχή είναι συντηρημένη ακόμα και στα αρχικά μετάζωα (Hopf *et al.*, 2001).

Από τα παραπάνω, καθίσταται αντιληπτό ότι η γνώση σχετικά με τις πρωτεΐνες των βασικών μεμβρανών είναι προς το παρόν περιορισμένη. Ωστόσο γνωρίζουμε ότι οι πρωτεΐνες αυτές επιτελούν πολύ σημαντικές λειτουργίες, απαραίτητες για την επιβίωση των κυττάρων, ιστών και κατ' επέκταση των οργανισμών. Με την εμπλοκή της *Fras1* σε αυτή την κατηγορία των πρωτεϊνών, είναι βέβαιη η μελλοντική διενέργεια πειραμάτων για τη διαλεύκανση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της και τον εν γένει ρόλο της. Ένα από τα βασικά ερωτήματα που τίθενται σχετικά με την αποκλειστικά εμβρυϊκή αυτή πρωτεΐνη είναι το κατά πόσο ο ρόλος της στα ενήλικα άτομα είναι απαγορευτικός. Ακόμη πιο σημαντικό ερώτημα αποτελεί το κατά πόσο η έκτοπη έκφραση του γονιδίου *Fras1* σε ενήλικα άτομα θα μπορούσε να ενισχύσει δομικά το εξωκυττάριο πλέγμα και να επηρεάσει λειτουργίες και ιδιότητες όπως είναι η ελαστικότητα και η επούλωση πληγών μετά από τραύματα.

Η υπερμικροσκοπική χαρτογράφηση της *Fras1* στην sub-lamina densa στα εμβρυϊκά επιθήλια του δέρματος και του οισοφάγου παρέχει αδιαμφισβήτητα δεδομένα σχετικά με τον εντοπισμό της πρωτεΐνης σε έμβρυα αγρίου τύπου E14.5. Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με την υπάρχουσα γνώση για την *Fras1*, θα αποτελέσουν τη βάση στο σχεδιασμό νέων πειραμάτων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Πιο συγκεκριμένα, τα επόμενα πειράματα θα πρέπει να κινηθούν προς την κατεύθυνση του συνεντοπισμού της *Fras1* με άλλες πρωτεΐνες της sub-lamina densa όπως του κολλαγόνου VII. Εκ νέου πειράματα με ανοσοχρυσό σε μικρότερα και μεγαλύτερα αναπτυξιακά στάδια από αυτά που μελετήθηκαν (E14.5) θα

ενισχύσουν ή θα καταρρίψουν τις μέχρι σήμερα υποθέσεις. Επίσης, πολύ σημαντικά θα αποδειχθούν πειράματα ανοσοσήμανσης των Frem1, Frem2 και Frem3 καθώς θα αποκαλύψουν πιθανή συνεργατικότητα ή όχι μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών και της Fras1.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ABC = Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex

Anchoring fibrils = Ινίδια αγκυροβόλησης

Anchoring filaments = Νημάτια αγκυροβόλησης

Anchoring plaques = Πλάκες αγκυροβόλησης

BM = Basement Membrane

BMZ = Basement Membrane Zone

Columnar = Επιμήκης

Cuboidal = Κυβοειδής

DEB = Dystrophic Epidermolysis Bullosa (Δυστροφική Πομφολυγώδης
Επιδερμόλυση)

EB = Epidermolysis Bullosa (Πομφολυγώδης Επιδερμόλυση)

EKO = Εξωκυττάρια ουσία

Hemidesmosome = Ημιδεσμόσωμα

HM = Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

JEB = Junctional Epidermolysis Bullosa (Συνδετική Πομφολυγώδης
Επιδερμόλυση)

LD = Lamina Densa

LL = Lamina Lucida

NC = Non Collagenous

NGS = Normal Goat Serum

PLT = Progressive Lowering Temperature

Πομφολύγων = Φουσκαλών

SMART = Simple Architecture Research Tool

Squamous = Φολιδωτός

Stratified = Στρωματώδης

TEM = Transmission Electron Microscope

Vibratome = Μικροτόμος παλλόμενης λεπίδας

Visceral pleura = Υπεζωκότας

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Brown JC, Wiedemann H & Timpl R (1994). Protein binding and cell adhesion properties of two laminin isoforms (AmB1eB2e, AmB1sB2e) from human placenta. *J. Cell Sci.* 107: 329-338.

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

Bruckner-Tuderman L, Hopfner B, Hammami-Hauasli N (1999). Biology of anchoring fibrils: lessons from dystrophic epidermolysis bullosa. *Matrix Biology.* 18: 43-54.

Bruckner-Tuderman L, Nilssen O, Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT, Kalinke DU, Gedde-Dahl T & Winberg JO (1995). Immunohistochemical and mutation analyses demonstrate that procollagen VII is processed to collagen VII through removal of the NC-2 domain. *J. Cell Biol.* 131: 551-559.

Burgeson RE (1993). Type VII collagen, anchoring fibrils and epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* 101: 252-255.

Carter WG, Ryan MC & Gahr PJ (1991). Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin $\alpha 3\beta 1$ in epithelial basement membranes. *Cell.* 65: 599-610.

Chan LS (1997). Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases. *Front Biosci.* 2: 343-352.

Chan LS, Fine JD, Briggaman RA, Woodley DT, Hammerberg C, Drugge RJ & Cooper KD (1993). Identification and partial characterization of a novel 105-kDalton lower lamina lucida autoantigen associated with a novel immune-mediated subepidermal blistering disease. *J. Invest Dermatol.* 101: 262-267.

Chan LS, Majmudar AA, Tran HH, Meier F, Schaumburg-Lever G, Chen M, Anhalt G, Woodley DT & Marinkovich MP (1997). Laminin-6 and laminin-5 are recognized by autoantibodies in a subset of cicatricial pemphigoid. *J. Invest. Dermatol.* 108: 848-853.

Chan LS & Woodley DT (1996). The 105-kDa basement membrane autoantigen p105 is N-terminally homologous to a tumor-associated antigen. *J. Invest. Dermatol.* 107: 209-214.

Chen M, Marinkovich MP, Veis A, Cai X, Rao CN, O'Toole EA & Woodley DT (1997). Interactions of the amino-terminus noncollagenous (NC1) domain of type VII collagen with extracellular matrix components: a potential role in epidermal-dermal adherence in human skin. *J. Biol. Chem.* 272: 14516-14522.

Christiano AM, Greenspan DS, Seungbok L, Uitto J, (1994b). Cloning of human type VII collagen. Complete primary sequence of the $\alpha 1$ VII chain and identification of intragenic polymorphisms. *J. Biol. Chem.* 269: 20256-20262.

Christiano AM, Hoffman GG, Chung-Honet LC, Lee S, Cheng W, Uitto J & Greenspan DS (1994a). Structural organization of the human type VII collagen gene COL7A1, composed of more exons than any previously characterized gene. *Genomics.* 21: 169-179.

Darling S & Gossler A (1994). A mouse model for Fraser syndrome? *Clin. Dysmorphol.* 3: 91-95.

Dunnill MG, McGrath JA, Richards AJ, Christiano AM, Uitto J, Pope FM & Eady RA (1996). Clinicopathological correlations of compound heterozygous COL7A1 mutations in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* 107: 171-177.

Faulk WP & Taylor GM (1971). An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunocytochemistry*. 8: 1081-1083.

Felbor U, Dreier L, Bryant RA, Ploegh HL, Olsen BR & Mothes W (2000). Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J*. 19: 1187-1194.

Fukai N, Eklund L, Marneros AG, Oh SP, Keene DR, Tamarkin L, Niemela M, Ilves M, Li E, Pihlajaniemi T & Olsen BR (2002). Lack of collagen XVIII/endostatin results in eye abnormalities. *EMBO J*. 21: 1535-1544.

Gayraud B, Hopfner B, Jassim A, Aumailley M, Bruckner-Tuderman L (1997). Characterization of a 50 kD component of epithelial basement membranes using the GDA-JrF3 monoclonal antibody. *J. Biol. Chem*. 272: 9531-9538.

Giudice GJ, Emery DJ & Diaz LA (1992). Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J. Invest. Dermatol*. 99: 243-250.

Glauert AM, Rogers GE, Glauert RH (1956). A new embedding medium for electron microscopy. *Nature*. 178: 803.

Goldsmith LA, Briggaman RA (1983). Monoclonal antibodies to anchoring fibrils for the diagnosis of epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol*. 81: 464-466.

Graham RC & Karnovsky MJ (1966). The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem*. 14: 291-302.

Halfter W, Dong S, Schurer B & Cole GJ (1998). Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 273: 25404-25412.

Hayat MA (1986). Basic techniques for transmission electron microscopy. New York: *Academic Press, Inc.*

Herrera GA (1992). Ultrastructural immunolabeling: a general overview of techniques and applications. *Ultrastruct. Pathol.* 2: 37-45.

Hobot JA (1989). Lowicryls and low-temperature embedding for colloidal gold methods. In: Hayat MA, ed. *Colloidal gold: principles, methods and applications*, vol. 2. San Diego: Academic Press : 75-115.

Hodor PG, Illies MR, Broadley S & Etensohn CA (2000). Cell-substrate interactions during sea urchin gastrulation: migrating primary mesenchyme cells interact with and align extracellular matrix fibers that contain ECM3, a molecule with NG2-like and multiple calcium-binding domains. *Dev. Biol.* 222: 181-194.

Hopf M, Gohring W, Ries A, Timpl R & Hohenester E (2001). Crystal structure and mutational analysis of a perlecan-binding fragment of nidogen-1. *Nat. Struct. Biol.* 8: 634-640.

Jadeja S, Smyth I, Pitera JE, Taylor MS, Haelst M, Bentley E, McGregor L, Hopkins J, Chalepakis G, Philip N, Perez AA, 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.

Kreidberg JA (1996). Gene targeting in kidney development. *Med. Pediatr. Oncol.* 27: 445-452.

Kuhn K (1994). Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biol.* 14: 439-445

Lin D, Gish GD, Songyang Z & Pawson T (1999). The carboxyl terminus of B class ephrins constitutes a PDZ domain binding motif. *J. Biol. Chem.* 274: 3726-3733.

Liu CG, Maercker C, Gastanon MJ, Hauptmann R & Wiche G (1996). Human plectin: organization of the gene, sequence analysis, and chromosome localization (8q24). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 4278-4283.

Lozzo RV (1994). Perlecan: a gem of a proteoglycan. *Matrix Biol.* 14: 203-208.

Lunstrum GP, Sakai LY, Keene DR, Morris NP & Burgeson RE (1986). Large complex globular domains of type VII procollagen contribute to the structure of the anchoring fibrils. *J. Biol. Chem.* 261: 9042-9048.

Marinkovich MP, Lunstrum BP & Burgeson RE (1992). The anchoring filament protein kalinin is synthesized and secreted as a high molecular weight precursor. *J. Biol. Chem.* 267: 17900-17906.

Matsui M, Mizuseki K, Nakatani J, Nakanishi S & Sasai Y (2000). Xenopus kielin: A dorsalizing factor containing multiple chordin-type repeats secreted from the embryonic midline. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 5291-5296.

Mayer U, Nischt R, Poschl E, Mann K, Fukuda K, Gerl M, Yamada Y & Timpl R (1993). A single EGF-like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding. *EMBO J.* 12: 1879-1885.

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.

Merighi A (1992). Post-embedding electron microscopic immunocytochemistry. In: Polak JM, Priestley JV, eds. *Electron Microscopic Immunocytochemistry: Principles and Practice*. Oxford: Oxford University Press : 51-85.

Nakane PK & Pierce GB Jr (1966). Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 14: 929-931.

Niessen CM, Hogervorst F, Jaspars LH, De Melker AA, Delwel GO, Hulsman EHM, Kuikman I & Sonnenberg A (1994). The $\alpha 6\beta 4$ integrin is a receptor for both laminin and kalinin. *Exp. Cell Res.* 211: 360-367.

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR & Folkman J (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 88: 277-285.

Petrou P, Pavlakis E, Dalezios Y, Galanopoulos VK & Chalepakis G (2005). Basement membrane distortions impair lung lobation and capillary organization in the mouse model for fraser syndrome. *J. Biol. Chem.* 280: 10350-10356.

Pulkkinen L & Uitto J (1999). Mutation analysis and molecular genetics of epidermolysis bullosa. *Matrix Biol.* 18: 29-42.

Roth J, Bendayan M & Orci L (1978). Ultrastructural localization of intracellular antigen by the use of the protein A-gold complex. *J. Histochem. Cytochem.* 26: 1074-1081.

Rousselle P, Lunstrum GP, Keene DR & Burgeson RE (1991). Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J. Cell Biol.* 114: 567-576.

Saarela J, Rehn M, Oikarinen A, Autio-Harmanen H & Pihlajaniemi T (1998). The short and long forms of type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans. *Am. J. Pathol.* 153: 611-626.

Sakai LY, Keene DR, Morris NP & Burgeson RE (1986). Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J. Cell Biol.* 103: 1577-1586.

Sheng M & Sala C (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 1-29.

Shimizu H, Ishiko A, Masunaga T, Kurihara Y, Sato M, Bruckner-Tuderman L & Nishikawa T (1997). Most anchoring fibrils in human skin originate and terminate in the lamina densa. *Lab. Invest.* 76: 823-833.

Singer SJ (1959). Preparation of an electron-dense antibody conjugate. *Nature.* 183: 1523-1524.

Skepper JN (2000). Immunocytochemical strategies for electron microscopy: choice or compromise. *J. Microsc.* 199: 1-36.

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

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

Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM & Cantley LC (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science.* 275: 73-77.

Takamiya K, Kostourou V, Adams S, Jadeja S, Chalepakis G, Scambler PJ, Hagan 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.

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 & Brown JC (1994). The laminins. *Matrix Biol.* 14: 275-28.

Tsao T, Hsieh JC, Durkin ME, Wu C, Chakravarti S, Dong LJ, Lewis M & Chung AE (1990). Characterization of the basement membrane glycoprotein entactin synthesized in a Baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.* 265: 5188-5191.

Valentijn JA, Daal JH, Jenks BG & Abeelen JH (1989). A method permitting precise trimming of resin-embedded tissue for ultrathin sectioning in pre-embedding immunoelectron microscopy. *J. Neurosci. Methods.* 30: 55-58.

Vidal F, Aberdam D, Miquel C, Christiano AM, Pulkkinen L, Uitto J, Ortonne JP & Meneguzzi G (1995). Integrin beta 4 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Nature Genet.* 10: 229-234.

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.

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

Winyard PJ, Nauta J, Lirenman DS, Hardman P, Sams VR, Risdon RA & Woolf AS (1996). Deregulation of cell survival in cystic and dysplastic renal development. *Kidney Int.* 49: 135-146.

Wyszynski M, Valtschanoff JG, Naisbitt S, Dunah AW, Kim E, Standaert DG, Weinberg R & Sheng M (1999). Association of AMPA receptors with a subset of glutamate receptor-interacting protein in vivo. *J. Neurosci.* 19: 6528-6537.

Μαργαρίτης ΛΧ (1989). *Textbook Κυτταρικής Βιολογίας.*

Μαργαρίτης ΛΧ (2004). *Textbook Κυτταρικής Βιολογίας.*

Μαρμάρας Β & Λαμπροπούλου-Μαρμάρα Μ (1991). *Textbook Κυτταρικής Βιολογίας.*