

ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΣΩ RT-PCR ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ  
ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΝΤΕΚΟΡΙΝΗΣ ΣΕ ΥΠΟΞΙΚΟ-  
ΙΣΧΑΙΜΙΚΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΝΕΟΓΕΝΝΗΤΩΝ  
ΕΠΙΜΥΩΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ  
Ημερομ. .... 29/07/02  
Αριθ. Πρωτ. .... 2391

13

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΤΟΥ ΤΣΙΑΜΗΤΡΟΥ ΗΛΙΑ

Π.Σ.Ε. ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ  
ΛΑΡΙΣΑ , ΙΟΥΛΙΟΣ 2002

ΑΡ. ΕΙΣ. 13/2002



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 1522/1  
Ημερ. Εισ.: 3-2-2003  
Δωρεά:  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ  
2002  
ΤΣΙ

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πτυχιακή εργασία μου πραγματοποιήθηκε κατά το διάστημα Ιανουαρίου-Ιουλίου 2002 στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Αισθάνομαι εδώ έντονα την υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά όσους συνέβαλλαν στην πραγματοποίησή της:

- ☯ την κα. **Ολυμπία Γκίμπα-Τζιαμπίρη**, Καθηγήτρια Φυσιολογίας της Ιατρικής σχολής και αντιπρύτανη του Α.Π.Θ., η οποία ως διευθύντρια του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. ευχαρίστως με φιλοξένησε για όλο αυτό το διάστημα και έθεσε στη διάθεσή μου τον εξοπλισμό που ήταν απαραίτητος για τα πειράματα καθώς και τους χώρους και όλες τις εν γένει διευκολύνσεις που ένα οργανωμένο εργαστήριο μπορεί να προσφέρει σε έναν φοιτητή, βοηθώντας αποφασιστικά στην εκπαίδευσή μου και στην ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας.
- ☯ την κα. **Σοφία Μπονάνου-Τζεδάκη**, Αν. Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Πρόεδρο του Π.Σ.Ε. Ιατρική Βιοχημεία, για τη βοήθεια, τη συμπαράσταση και την εξααιρετική διδακτική της παρουσία όλα τα χρόνια των σπουδών μου στο Π.Σ.Ε. Ιατρική Βιοχημεία, καθώς και για τη συγκατάθεσή της για την πραγματοποίηση της εργασίας μου στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ.
- ☯ την κα. **Εύα Σπώνδου**, Λέκτορα του τμήματος Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. η οποία μας εισήγαγε στο πειραματικό μοντέλο υποξίας – ισχαιμίας επίμυων, συμβάλλοντας καθοριστικά στην πραγματοποίηση των πειραμάτων.
- ☯ την κα. **Παπακωνσταντίνου Ελένη**, Λέκτορα του τμήματος Φαρμακολογίας της Ιατρικής σχολής του Α.Π.Θ., για την βοήθειά της στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Χωρίς την ευγενική της συμβολή η εργασία αυτή θα ήταν πολύ φτωχότερη.



- ☯ την κα. **Χρυσάνθη Πεσιντζάκη** , τεχνικό εργαστηρίων του τμήματος Φαρμακολογίας, για την πολύτιμη βοήθειά της και την ουσιαστική της υποστήριξη σε εργαστηριακά ζητήματα.
- ☯ τον κ. **Γεώργιο Τζημαγιώργη**, Μοριακό Βιολόγο, επιστημονικό συνεργάτη του Π.Σ.Ε. Ιατρική Βιοχημεία για την βοήθειά του καθ'όλο το διάστημα της εκπόνησης αυτής της εργασίας και για τις χρήσιμες παρατηρήσεις του κατά τη συγγραφή της.
- ☯ τον κ. **Ηλία Βαλιάκο** , γραμματέα του Π.Σ.Ε. Ιατρική Βιοχημεία που ποτέ δεν κουράστηκε να μας δίνει τα φώτα του για διαδικαστικά θέματα που αφορούσαν αυτήν την εργασία.
- ☯ τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη στον κ. **Αριστείδη Κριτή** , Λέκτορα του τμήματος Φυσιολογίας της Ιατρικής σχολής του Α.Π.Θ. , κάτω από τη συνεχή καθοδήγηση και την ακούραστη υποστήριξη του οποίου εργάστηκα όλο αυτό το διάστημα. Τον ευχαριστώ θερμά που ανέχθηκε και διόρθωνε τα λάθη μου, που ακούραστα με συμβούλευε, καθοδηγούσε και κατηύθυνε αποτελεσματικά την εργασία μου. Χωρίς την καθοριστική του συμβολή δεν θα ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί αυτή η εργασία.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ABSTRACT</b> .....	σελ. 4
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	σελ. 5
Πρωτεογλυκάνες.....	σελ. 5
Μικρές, πλούσιες σε λυσίνη πρωτεογλυκάνες.....	σελ. 6
Η ντεκορίνη.....	σελ. 11
<b>ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΥΠΟΞΙΑ-ΙΣΧΑΙΜΙΑ</b>	
<b>ΜΟΝΤΕΛΟ ΝΕΟΓΕΝΝΗΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ</b> .....	σελ. 13
<b>ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	σελ. 15
Πρόκληση ισχαιμίας-υποξίας στα πειραματόζωα.....	σελ. 15
Απομόνωση RNA.....	σελ. 16
Ανάλυση RNA.....	σελ. 17
Αντίστροφη Μεταφραφή.....	σελ. 18
Εκκινητές για β-ακτίνη, ντεκορίνη.....	σελ. 21
Ανάλυση των δειγμάτων με PCR.....	σελ. 26
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	σελ. 28
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	σελ. 31
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	σελ. 37

## ABSTRACT

Under hypoxic-ischemic conditions, increased deposition of extracellular matrix proteins occurs in various tissues. The aim of this study is to investigate the effect of hypoxia-ischemia on the decorin gene expression in neonatal rat brain.

Seven day old wistar rat pups became ischemic by permanent ligation of the left common carotid. Hypoxia was induced by exposing the pups in a 8% oxygen – 92% nitrogen gas mixture for 60 minutes. At the end of this period and after 2 and 24 hours the animals were decapitated and each cerebral hemisphere was preserved.

Total RNA was extracted from cerebral cortex and hippocampus of both cerebral hemispheres. Ten µl of total RNA were subjected to reverse transcription using the M-MuLV reverse transcriptase. Five µl of the reverse transcription reaction mixture were subjected to competitive PCR amplification under standard conditions, including beta-actin as internal control for gene expression.

Decorin mRNA is expressed at comparable levels both in the cerebral cortex and the hippocampus of the neonatal rat brain. Decorin mRNA levels are of limited abundance compared to those of beta-actin. Decorin mRNA is expressed at comparable levels both in the right (hypoxic) and the left (hypoxic – ischemic ) cerebral hemispheres of the neonatal rat brain.

Our results suggest that hypoxia – ischemia slightly reduced the levels of decorin mRNA in both cerebral cortex and hippocampus of neonatal rat brain the first 2 hours after , but within 24 hours this effect seemed to be overturned.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### ΠΡΩΤΕΟΓΛΥΚΑΝΕΣ

Οι **Πρωτεογλυκάνες** είναι μια υπεροικογένεια πρωτεϊνών, με περισσότερα από 30 μέλη, που εξυπηρετούν μια ποικιλία από βιολογικές λειτουργίες. Οι πρωτεογλυκάνες παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην οργάνωση των ιστών, επηρεάζουν την ανάπτυξη των κυττάρων, και την ωρίμανση των ειδικών ιστών, λειτουργούν ως βιολογικά φίλτρα και ρυθμίζουν τη δράση αυξητικών παραγόντων (Growth Factors), ρυθμίζουν την παραγωγή κολλαγόνου και την ελαστικότητα του δέρματος, επηρεάζουν την αύξηση των καρκινικών κυττάρων, τη διαφάνεια του κερατοειδούς, και την έκφυση των νευριτών. Επιπλέον, όπως προκύπτει από μελέτες σε μεταλλαγμένα ζώα ορισμένες πρωτεογλυκάνες είναι απαραίτητες για τη ζωή, ενώ άλλες όχι (1).

Οι Πρωτεογλυκάνες της μεμβράνης μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες:

#### 1. Πρωτεογλυκάνες της βασικής Μεμβράνης

Περλεκάνη (Perlecan) (2) /Αγκρίνη (Agrin) (3) /Μπαμακάνη (Bamacan) (4).

#### 2. Υαλεκτάνες: Πρωτεογλυκάνες που αντιδρούν με το υαλουρονικό και λεκτίνες.

Βερσικάνη (Versican) / Αγγρικάνη (Aggrecan) / Νευρικάνη (Neurocan) / Μπρεβικάνη (Brevican) (1).

#### 3. Μικρές-πλούσιες σε Λευκίνη Πρωτεογλυκάνες (SLRPs).

ΤΑΞΗ I : Ντεκορίνη (Decorin)

Διγλυκάνη (Biglycan)

ΤΑΞΗ II: a. Φιμπρομοντουλίνη (Fibromodullin)

Λουμικάνη (Lumican)

b. Κερατοκάνη (Keratocan)

PRELP

ΤΑΞΗ III: Επιφυκάνη (Eriphycan)

Οστεογλυκίνη ( Osteoglycin) (1).

## ΜΙΚΡΕΣ, ΠΛΟΥΣΙΕΣ ΣΕ ΛΥΣΙΝΗ ΠΡΩΤΕΟΓΛΥΚΑΝΕΣ (SLRPs)

Η οικογένεια των SLRP περιλαμβάνει τουλάχιστον εννέα μέλη, τα οποία παρόλο που έχουν παρόμοια δομή, προήλθαν από διαφορετικά γονίδια, απέκτησαν μοναδικές λειτουργίες και υπέστησαν σημαντικό βαθμού δομική εκλέπτυνση. Μπορούν να συντεθούν είτε ως γλυκοπρωτεΐνες που περιέχουν N-συνδεδεμένους ολιγοσακχαρίτες είτε ως πρωτεογλυκάνες περιέχουσες θειϊκή χονδροϊτάνη ή θειϊκή δερματάνη ή θειϊκή κερατάνη με τη μορφή πλευρικών αλυσσεων. Επιπλέον, η αρχιτεκτονική του υποκινητή πολλών γονιδίων SLRPs είναι ιδιαίτερη, και αυτό συμβάλλει στην έκφρασή τους σε διαφορετικούς ιστούς (5).

Οι πρωτεογλυκάνες μπορούν να χωριστούν σε τρεις τάξεις I, II και III με βάση διάφορες παραμέτρους όπως η εξελικτική πρωτεϊνική συντήρησή τους, η παρουσία ενός διακριτού πλουσίου σε κυστεΐνη τμήματος στην αμινο-τελική περιοχή τους, ο αριθμός των πλουσίων σε λευκίνη επαναλήψεων (LRR) και η γενομική τους οργάνωση (6).

### ΤΑΞΗ I :

Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει τη ντεκορίνη (7) και την διγλυκάνη (8) οι οποίες και επιδεικνύουν ομολογία 57% κατά CLUSTAL W (την υψηλότερη μεταξύ των SLRPs). Είναι επίσης οι μοναδικές SLRPs που περιέχουν ένα προπεπτίδιο. Αυτό το προπεπτίδιο είναι εξαιρετικά συντηρημένο ανάμεσα στα ζωικά είδη και μπορεί να λειτουργεί ως ένα αναγνωριστικό σήμα για την ξυλοσυλτρανφεράση, το πρώτο ένζυμο που εμπλέκεται στη σύνθεση των αλυσίδων γλυκοζαμινογλυκάνης. Αυτές οι πρωτεογλυκάνες περιέχουν μια αμινο-τελική περιοχή που συνήθως αντικαθίσταται είτε με μία (στη ντεκορίνη) είτε με δύο (στην διγλυκάνη) πλευρικές αλυσίδες θειϊκής δερματάνης/χονδροϊτάνης (6).



## ΤΑΞΗ II :

Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει πέντε μέλη που μπορούν επιπλέον να χωριστούν σε τρεις διαριτές υποομάδες:

Η Ινοτροποποιητίνη (Fibromodulin) (9) και η Λουμικάνη (Lumican) (10,11) αποτελούν την πρώτη υποομάδα και παρουσιάζουν 48% ομολογία μεταξύ τους.

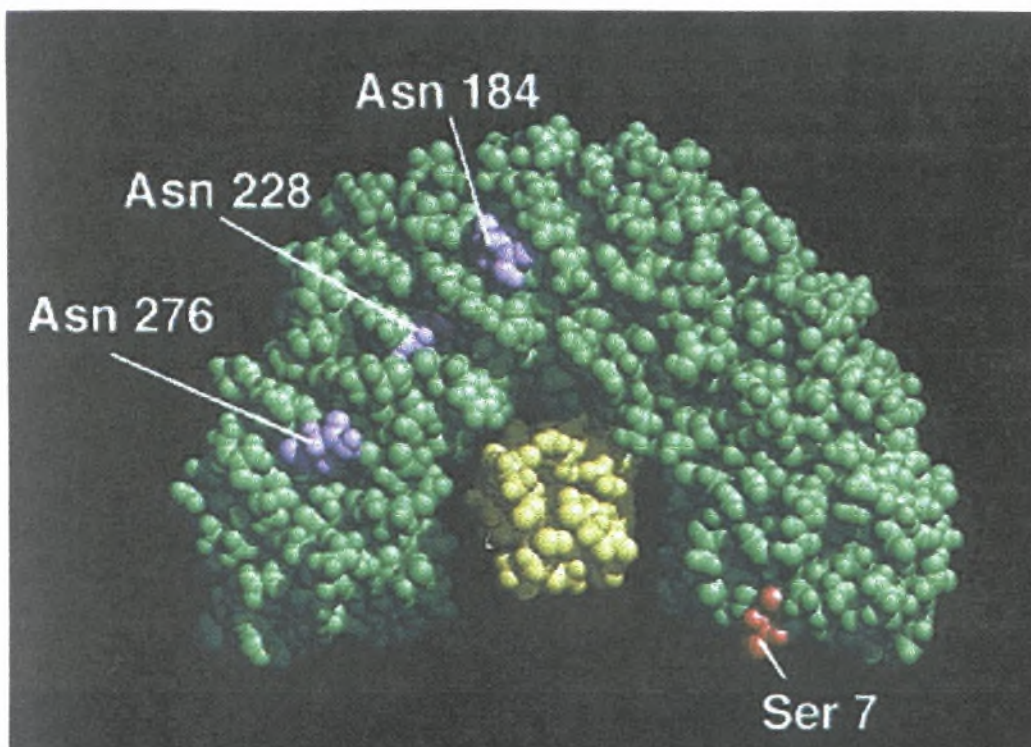
Η Κερατοκάνη (keratocan) (12) και η PRELP (13) αποτελούν τη δεύτερη υποομάδα με 55% περίπου ομολογία μεταξύ τους, ενώ η Οστεοαντερίνη (Osteoadherin) (14) αποτελεί μια τρίτη υποομάδα, με 37-42% ομολογία με τα άλλα μέλη της τάξης II.

## ΤΑΞΗ III :

Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει την Επιφυκάνη (Epirhycan/PGLb) (15-17) και την Μιμικάνη (mimecan/osteoglycin) (18) με μόλις ~40% ομολογία μεταξύ τους.

Η κοινή κεντρική περιοχή των SLRPs, που μπορεί να αποτελεί έως και το 80% του τμήματος της πρωτεΐνης, απαρτίζεται (με την εξαίρεση των πρωτεϊνών της ΤΑΞΗΣ III) από 10πλές επαναλήψεις ενός τμήματος 24 αμινοξέων πλούσιου σε λευκίνη (Leucine Rich Repeat-LRR) με κατάλοιπα Asn και Leu κατά προτίμηση σε συντηρημένες θέσεις. Το LRR είναι μια δομική μονάδα που χρησιμεύει στις διαδικασίες μοριακής αναγνώρισης με ποικίλους τρόπους, όπως την κυτταρική προσκόλληση, την μεταγωγή σήματος, την επιδιόρθωση του DNA και την παραγωγή του RNA (19).

Το μοριακό μοντέλο της ντεκορίνης (σχήμα 1) αποκάλυψε μια περισσότερο ανοικτή δομή απ'αυτήν του αναστολέα της ριβονουκλεάσης. Η ανοικτή διαμόρφωση της ντεκορίνης επιτρέπει μια εκτεταμένη περιοχή σύνδεσης και κατά συνέπεια το σχηματισμό ορισμένων ευνοϊκών σημείων σύνδεσης με βιολογικά υποστρώματα όπως η τριπλή έλικα του κολλαγόνου ή ο υποδοχέας του EGF (20).



**Σχήμα 1 :** Τρισδιάστατο μοντέλο της ντεκορίνης καθώς αντιδρά με μια τριπλή έλικα κολλαγόνου (κίτρινο). Η κοίλη επιφάνεια της ντεκορίνης σχηματίζεται με φορτισμένα κατάλοιπα αμινοξέων. Τα βασικά και όξινα κατάλοιπα εμφανίζονται με χρώμα μωβ και κόκκινο αντίστοιχα.

Στην πραγματικότητα, η οικογένεια των LRR πρωτεϊνών πρόσφατα διαιρέθηκε σε έξι υποοικογένειες που τυποποιούνται με βάση τα διαφορετικά μήκη (20-29 κατάλοιπα) των LRRs και έχουν κοινές ακολουθίες αμινοξέων (21). Ετσι, οι πρωτεΐνες με LRR παρέχουν μια μοναδική λύση όσον αφορά την πολυπλοκότητα των λειτουργικών χαρακτηριστικών τους και οι δομικές τους ιδιότητες μοιάζει να είναι ένας βασικός λόγος για την αποτελεσματικότητά τους ως μοτίβα σύνδεσης άλλων πρωτεϊνών (22,20).

**Η ρύθμιση της εξωκυττάριας ουσίας : βιολογικοί ρόλοι-κλειδιά στο δέρμα , τα οστά, τους τένοντες και τον κερατοειδή.**

Μερικές SLRPs προσδένουν ινίδια κολλαγόνου, περιλαμβανομένων των τύπων I, II, III, V, VI και XIV και αναστέλλουν την δημιουργία ινιδίων *in vitro*. Αν και είναι γνωστό από πειράματα επανασύστασης ινιδίων ότι η κυρίως πληροφορία για την κατασκευή κατά διαστήματα ινιδίων βρίσκεται στην ακολουθία αμινοξέων του κολλαγόνου εντούτοις ορισμένα μακρομόρια μπορούν να ρυθμίζουν αυτήν τη σύνθετη διεργασία (23). Τέτοια παραδείγματα έχουμε με διάφορους φαινότυπους σε πειραματόζωα απαλοιφής γονιδίων (knock-out), στα οποία ειδικά γονίδια για τάξης I και II SLRPs έχουν καταστραφεί με γονιδιακή στόχευση. Πειραματόζωα π.χ. χωρίς έκφραση ντεκορίνης παρουσιάζουν έναν ανώμαλο φαινότυπο εύθραυστου δέρματος που οφείλεται σε μειωμένη ελαστικότητα (24).

Κατευθυνόμενη καταστροφή του γονιδίου της διγλυκάνης οδηγεί σε ένα φαινότυπο παρόμοιο με της οστεοπόρωσης. Τα πειραματόζωα με απουσία διγλυκάνης παρουσιάζουν μειωμένη οστική μάζα που είναι ήδη ανιχνεύσιμη στην ηλικία των 3 μηνών (25).

Οι παθολογικές συνέπειες που εμφανίζουν τα πειραματόζωα με έλλειψη των παραπάνω αναφερόμενων γονιδίων , δείχνουν ότι :

1. ανθρώπινες ασθένειες που φέρουν ανωμαλίες στο γονιδίωμα, όπως απαλοιφές ή εισαγωγή προώρων κωδικονίων λήξης σε ένα από τα γονίδια SLRPs ή μεταλλάξεις στην περιοχή τους που προσδένουν το κολλαγόνο, μπορεί παρομοίως να υπάρχουν.
2. μεταλλάξεις στις περιοχές σύνδεσης γλυκοζαμινογλυκανών μπορεί επίσης να οδηγούν σε μερικούς από τους παθολογικούς φαινοτύπους.

### **Φυσικά αντίδοτα : TGF-β Blocker και αντι-ινώδεις παράγοντες**

Η σύνδεση των αυξητικών παραγόντων στις πρωτεογλυκάνες και η επακόλουθη ρύθμιση της δράσης τους, αποτελεί μια από τις κύριες περιοχές ερεύνης στο χώρο : είτε αυτή η σύνδεση είναι αποτέλεσμα της δράσης του κέντρου της πρωτεΐνης ή του καρβοξυτελικού τμήματός της , το τελικό αποτέλεσμα είναι μια διαταραχή ( θετική ή αρνητική ) της βιολογικής δράσης του αυξητικού παράγοντα με σοβαρές συνέπειες

στον πληθυσμό των επηρεαζόμενων κυττάρων. Επιπλέον, αυτή η βιολογική αλληλεπίδραση επιτρέπει μια μηχανιστική εξήγηση για την ικανότητα της εξωκυττάριας ουσίας να προάγει τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων.

Αυξημένη παραγωγή TGF- $\beta$  είναι ένδειξη μιας σειράς από ασθένειες του ινώδους που χαρακτηρίζονται από μεγάλη συσσώρευση συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Τουλάχιστον τέσσερα μέλη της SLRP οικογενείας, (η ντεκορίνη, η διγλυκάνη, η λουμικάνη και η ινοτροποποιητίνη) αντιδρούν με τον TGF- $\beta$ , και μετρήσεις συγγενείας δείχνουν ένα μοντέλο δύο σημείων σύνδεσης με kd τιμές 1-20 nM και 20-200nM για το υψηλής και χαμηλής συγγενείας σημείο σύνδεσης αντιστοίχως (26). Αυτές οι *in vitro* μελέτες σύνδεσης ταιριάζουν καλά με την παρατήρηση πως εκτοπική έκφραση ντεκορίνης οδηγεί σε αξιοσημείωτη καθυστέρηση ανάπτυξης και αλλάζει τη μορφολογία και τις ιδιότητες προσκόλλησης των TGF- $\beta$  εξαρτώμενων κυττάρων (27).

#### **Έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αντίδραση με υποδοχείς τυροσινικής κινάσης.**

Μια σημαντικότερη λειτουργία των SLRPs είναι η εγγενής τους ικανότητα να επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Για παράδειγμα, η εκτοπική έκφραση της ντεκορίνης καθυστερεί την ανάπτυξη σε μια μεγάλη ποικιλία από όγκους. Η αναστολή της ανάπτυξης που προάγεται από τη ντεκορίνη σχετίζεται με την επαγωγή του p21, ενός ισχυρού αναστολέα της δράσης της εξαρτώμενης από κυκλίνες κινάσης (28,33,29).

Εκτοπική έκφραση ντεκορίνης ή μια μεταλλαγμένη της μορφή από την οποία απουσιάζουν οι αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκάνης, προάγει την παύση της ανάπτυξης και αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να ρυθμιστεί με προσθήκη εξωγενούς ανασυνδυσμένης ντεκορίνης σε μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων. Η ομοιότητα της απάντησης στην ντεκορίνη σε διαφορετικά είδη κυττάρων, δείχνει πως ένα κοινό μονοπάτι μεταγωγής σήματος ή ένα κοινό σύστημα συν-υποδοχέων για αυξητικούς παράγοντες, ή ένας κοινός μετα-υποδοχιακός μηχανισμός χρησιμοποιείται γι' αυτόν

τον σκοπό από τα διάφορα κύτταρα. Το γεγονός ότι το p21 προάγεται από τη ντεκορίνη σε διαφορετικά είδη ζώων, δείχνει επιπλέον πως αυτός ο μηχανισμός είναι ένα καλά συντηρημένο σηματοδοτικό μονοπάτι λειτουργικό στα κύτταρα των θηλαστικών.

Εχει δειχθεί ότι η αντίδραση της ντεκορίνης με έναν επιφανειακό υποδοχέα, μπορεί να παίζει ένα βιολογικό ρόλο στην ρύθμιση των ενδογενών επιπέδων τουλάχιστον ενός αρνητικού ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου. Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώθηκαν από την ανακάλυψη πως η Ντεκορίνη αντιδρά εκλεκτικά με τον υποδοχέα του EGF και προκαλεί μια ισχυρή ενεργοποίησή του, που οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού μεταγωγής σήματος των MAP κινασών και τελικά σε μια αύξηση του ενδογενούς p21 και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου (30).

Η ανασυνδυσασμένη Ντεκορίνη προκαλεί μια ταχεία αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του  $Ca^{++}$  και αυτό το γεγονός συνεχίζεται και με απουσία εξωκυττάριου ασβεστίου (31).

## Η ΝΤΕΚΟΡΙΝΗ

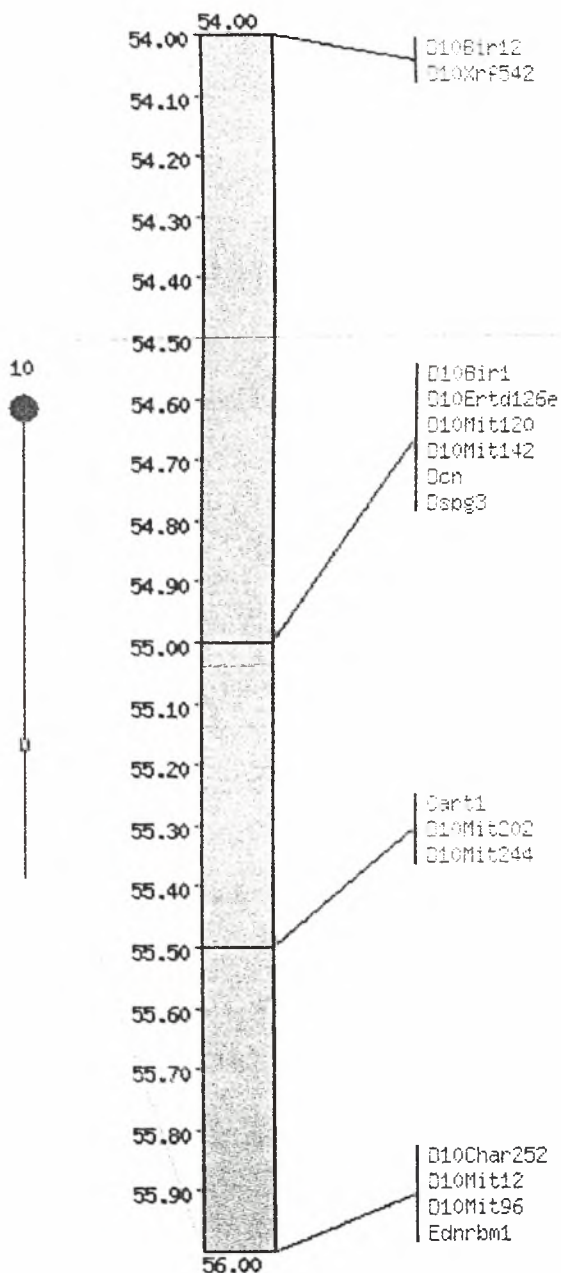
Η ντεκορίνη είναι μια μικρή πλούσια σε λευκίνη πρωτεογλυκάνη της βασικής μεμβράνης που εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς (7). Μπορεί να παίζει έναν σπουδαίο βιολογικό ρόλο στην αναστολή της αύξησης των όγκων, μέσα από την ικανότητά της να ρυθμίζει την σύνθεση της εξωκυττάριου ουσίας και την ενεργότητα αυξητικών παραγόντων (Growth Factors). Η υπερέκφραση της ντεκορίνης μειώνει την αύξηση των καρκινικών κυττάρων και αναστέλλει τον TGF- $\beta$  ο οποίος επάγει τον πολλαπλασιασμό τους (32,33).

### Το γονίδιο της ανθρώπινης ντεκορίνης

Το γονίδιο της ανθρώπινης ντεκορίνης καλύπτει πάνω από 38 kb συνεχούς DNA ακολουθίας και περιέχει οκτώ εξόνια και πολύ μεγάλα ιντρόνια, δύο από τα οποία είναι 5,4 kb το ένα και μεγαλύτερο από 13,2 kb το άλλο.

Ανακαλύφθηκαν δύο εναλλακτικά ματισμένα εξόνια επικεφαλής τα Ia και Ib στην 5' αμετάφραστη περιοχή. Χρησιμοποιώντας Northern Blotting ή RT-PCR ανιχνεύθηκαν αυτά τα επικεφαλής εξόνια σε μια ποικιλία mRNAs που απομονώθηκαν από σειρές κυττάρων ανθρώπου και ιστούς (34). Το γονίδιο της ντεκορίνης χαρτογραφήθηκε

αρχικά στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 12 (35). Αργότερα, με τη μέθοδο του *in situ* υβριδισμού, το γονίδιο της ντεκορίνης τοποθετήθηκε στο 12q21-q22 (36). Ένα χρόνο αργότερα, οι Danielson et al. (1993) χαρτογράφησαν το γονίδιο της ντεκορίνης στο 12q23 (34). Οι Ion et al. (2000) τέλος, σε μια μελέτη για το σύνδρομο Noonan επαναπροσδιόρισαν τη θέση του γονιδίου της ντεκορίνης στο 12q13.2 με την μέθοδο FISH (37). Επίσης, έχει χαρτογραφηθεί και το ομόλογο γονίδιο στον επίμυ στο χρωμόσωμα 10 (σχήμα 2) (38).



Σχήμα 2 : Ο χάρτης της περιοχής του γονιδίου της ντεκορίνης στο χρωμόσωμα 10 του επίμυ, όπου χαρτογραφήθηκε αυτό (Scholtzen et al.)

## ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΥΠΟΞΙΑ-ΙΣΧΑΙΜΙΑ : ΜΟΝΤΕΛΟ ΝΕΟΓΕΝΝΗΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ.

Η εγκεφαλική υποξία-ισχαιμία αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες πρόκλησης βλάβης του κεντρικού νευρικού συστήματος, η οποία οδηγεί τελικώς σε νευρολογική δυσλειτουργία που εμφανίζεται ως εγκεφαλική παράλυση, διανοητική καθυστέρηση και επιληψία (39).

Οι έρευνες σε πειραματόζωα (κυρίως νεογέννητους επίμυες) τα τελευταία χρόνια έχουν διευρύνει τις γνώσεις μας για τα κυτταρικά και μοριακά γεγονότα που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια μιας ισχαιμικής υποξικής βλάβης στον εγκέφαλο (40). Η γνώση αυτών των γεγονότων, άνοιξε καινούριους δρόμους δυνατικών θεραπειών για τα έμβρυα και τα νεογέννητα βρέφη που υπέστησαν εγκεφαλική υποξία – ισχαιμία ώστε να εμποδιστούν οι σοβαρές συνέπειες της περιγεννητικής εγκεφαλικής βλάβης (39).

Η περιγεννητική εγκεφαλική υποξία – ισχαιμία τυπικά ξεκινά με υποβαθμισμένη ανταλλαγή αερίων στους πνεύμονες ή στον πλακούντα, η οποία οδηγεί σε συστηματική υποξία/ ανοξία με ή άνευ ταυτόχρονη υπερκαπνία. Η υποξία αυξάνει την εγκεφαλική ροή αίματος (Cerebral Blood Flow-CBF) επαρκώς, ώστε να παραμείνει σταθερός ο μεταβολισμός του εγκεφάλου, ώσπου επέρχεται και η εγκεφαλική ισχαιμία λόγω της καρδιακής κόπωσης με δευτερογενή βραδυκαρδία και συστηματική υπόταση (41).

Η απάντηση του εγκεφάλου στην εγκεφαλική υποξία-ισχαιμία είναι μια ισορροπία μεταξύ της ενεργοποίησης ενδογενών νευροπροστατευτικών μηχανισμών και νευροκαταστρεπτικών διαταραχών, που αυξάνουν την πιθανότητα του κυτταρικού θανάτου. Απαραίτητη για την εφαρμογή αυτών των φαινομενικά αντίθετων διεργασιών φαίνεται πως είναι η ρύθμιση της έκφρασης κάποιων γονιδίων (42).

Σε διάφορες μελέτες, ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει το μοντέλο υποξίας-ισχαιμίας σε νεογέννητους επίμυες, για να μελετήσουν την έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών όπως: FGF2 (Fibroblast Growth Factor) (43), Bcl-2, Bax, Bcl-X (44), STEP (Striatal Enriched Tyrosine Phosphatase) (45), calpain (46), Hif-1a, Hif-1b (47).

Εχει αναφερθεί ότι η ντεκορίνη συνδέεται με τον TGF-β, αλλά εμπλέκεται και με τη συγκέντρωση ενδοκυτταρίου  $Ca^{++}$ (26,31), και δεσμεύει επίσης NGF (Nerve Growth Factor) (48).

Επίσης, από μελέτες σε εγκεφάλους επίμυων σε υποξία-ισχαιμία, σημειώνουμε τα εξής:

1. Η έκφραση του TGF-β1 βρέθηκε πως επάγεται από ένα ισχαιμικό-υποξικό επεισόδιο στον εγκέφαλο. Ο TGF-β1 μπορεί να εμπλέκεται σε μετα-ασφυκτικούς διορθωτικούς μηχανισμούς (49).
2. Φαίνεται πως οι εξαρτώμενοι από υποδοχείς διάυλοι είναι κυρίως υπεύθυνοι για την είσοδο  $Ca^{++}$  σε ορισμένα κύτταρα κατά τη διάρκεια υποξίας-ισχαιμίας. Αυτό το μονοπάτι μπορεί να είναι πρωτεύουσας σπουδαιότητας στον ιππόκαμπο και τον φλοιό, περιοχές του εγκεφάλου που είναι ιδιαίτερα ευπρόσβλητες στην στέρση  $O_2$  και στις οποίες εδρεύει μεγάλος αριθμός υποδοχέων των διεγερτικών αμινοξέων και όπου το γλουταμινικό οξύ αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους νευροδιαβιβαστές (50).

Επειδή λοιπόν, υπάρχουν πολλά ακόμη να διερευνηθούν για την βιολογία των SLRPs και ειδικά της ντεκορίνης και επειδή επίσης ερωτήματα που αφορούν την πλεονασματική τους παρουσία ή την έλλειψή τους μπαίνουν τώρα σε διάφορα πειραματικά μοντέλα, οδηγηθήκαμε στη σκέψη να διερευνήσουμε την έκφραση της ντεκορίνης σε εγκεφάλους νεογέννητων επίμυων σε κατάσταση υποξίας-ισχαιμίας και σχεδιάσαμε και πραγματοποιήσαμε γ'αυτόν τον σκοπό την πειραματική διαδικασία που θα εκθέσουμε παρακάτω.



## ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

### ΥΛΙΚΑ

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτά τα πείραματα ήταν της υψηλότερης δυνατής καθαρότητας και όπου ήταν εφικτό, ειδικά παρασκευασμένα για χρήση στην Μοριακή Βιολογία.

### ΜΕΘΟΔΟΙ

#### α) Πρόκληση ισχαιμίας-υποξίας στα πειραματόζωα.

Επίμυες της φυλής wistar ηλικίας 7 ημερών, υπέστησαν μόνιμη απολίνωση της αριστερής κοινής καρωτίδας. Για την εγχείρηση χρησιμοποιήθηκε αιθέρας ως αναισθητικό και κάθε επέμβαση δεν διήρκεσε περισσότερο από 4 λεπτά. Στη συνέχεια και μετά από ένα διάστημα 2-3 ωρών, τα πειραματόζωα εισήχθησαν σε ειδικά διαμορφωμένο θάλαμο και εκτέθηκαν σε υποξικό περιβάλλον (8% O<sub>2</sub> και 92% N<sub>2</sub>), για διάστημα 60'.

Κατόπιν, σε χρόνους 0, 2, και 24 ωρών από την έξοδό τους από τον θάλαμο, τα πειραματόζωα θανατώθηκαν και παραλήφθηκαν ξεχωριστά τα δύο ημισφαίρια του εγκεφάλου τους τα οποία και συντηρήθηκαν μέσα σε RNA-protect solution της Qiagen στους -20° C. Επίσης, κατά τις ίδιες χρονικές περιόδους, θανατώθηκαν και επίμυες της ίδιας ηλικίας (από την ίδια γέννα) που δεν είχαν υποστεί υποξία-ισχαιμία και παραλήφθηκαν οι εγκεφαλοί τους ομοίως συντηρημένοι, για να χρησιμεύσουν ως δείγματα ελέγχου (normal animals).

Συνολικά χρησιμοποιήσαμε νεογέννητους επίμυες από τέσσερις γέννες, τέσσερα ζώα από κάθε γέννα (1 normal, 1 0h, 1 2h, 1 24h), δηλαδή συνολικά 16 ζώα.

## **β) Λήψη ιστοτεμαχίων από υπόκαμπο και εγκεφαλικό φλοιό.**

Τμήματα από τον υπόκαμπο και τον εγκεφαλικό φλοιό ελήφθησαν απ'όλα τα δείγματα χρησιμοποιώντας στερεοσκόπιο και ειδικό νυστέρι, ενώ κάθε διαδικασία δεν διήρκεσε πάνω από 1'. Τα τμήματα αυτά παραλήφθηκαν σε χωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες των 2 ml, σε RNA-protect solution της Qiagen και αφού χαρακτηρίστηκαν αποθηκεύτηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **γ) Ομογενοποίηση των ιστών.**

Κάθε δείγμα ομογενοποιήθηκε ξεχωριστά, αφού αποχύθηκε μετά την απόψυξη το RNA-protect solution και εισήχθη στο σωλήνα eppendorf ένα μείγμα 600μl RLT Buffer (ισοθειοκυανική γουανιδίνη) +10μl μερκαπταιθανόλη το οποίο ταχύτατα απενεργοποιεί τυχόν RNάσες. Κατόπιν, ο ιστός ομογενοποιήθηκε μέσα σ'αυτό το διάλυμα χρησιμοποιώντας τον ομογενοποιητή ιστών της HEIDOLPH και ειδικά πλαστικά έμβολα μιας χρήσεως.

## **δ) Απομόνωση RNA**

Για την απομόνωση του RNA από τους ιστούς χρησιμοποιήθηκε το RNA-easy kit της Qiagen, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή :  
(Ποσότητα του ιστού πάντοτε μικρότερη των 30 mg.)

Η μέθοδος αυτή, συνδυάζει τις ιδιότητες της επιλεκτικής δέσμευσης μιας silica-gel μεμβράνης (διοξειδίου του πυριτίου) με την ταχύτητα της τεχνολογίας της μικροφυγοκέντρωσης. Ένα εξειδικευμένο σύστημα από διαλύματα (Buffers) υψηλής συγκέντρωσης σε άλατα, επιτρέπει μέσω διαφορικής εξαλάτωσης στα μόρια RNA με μέγεθος μεγαλύτερο των 200 νουκλεοτιδίων να δεσμευτούν στην μεμβράνη της στήλης και να παραληφθούν στο τέλος καθαρά. Με αυτήν την μέθοδο απομονώνονται μόρια RNA μεγαλύτερα των 200 νουκλεοτιδίων. Παίρνουμε λοιπόν κυρίως mRNAs αφού τα περισσότερα μόρια RNA μικρότερα των 200 βάσεων (όπως το 5.8S rRNA, το 5S rRNA και το tRNA που όλα μαζί αποτελούν το 15-20% του ολικού RNA) απομακρύνονται .

1. φυγοκεντρήσαμε τον ομογενοποιημένο ιστό για 3' σε μικροκεντρόφυγο στην υψηλότερη ταχύτητα. Χρησιμοποιήθηκε η μικροφυγόκεντρος της HETTICH EBA - 12. Προσεκτικά μεταφέρθηκε το υπερκείμενο σε άλλο σωλήνα erpendorf φυγοκέντρου με αυτόματη πιπέτα.
2. προσθέσαμε 600μl αιθανόλη 70% ανακατεύοντας με την πιπέτα. Η αιθανόλη βοηθά να επιτευχθούν κατάλληλες συνθήκες δέσμησης στην μεμβράνη.
3. τοποθετήσαμε 700μl περίπου από το δείγμα σε RNA –easy mini coloumn (στήλη που περιλαμβάνεται στο κιτ και όπου υπάρχει η μεμβράνη δέσμησης RNA) που τοποθετείται μέσα σε σωλήνα erpendorf 2ml (υπάρχουν στο κιτ). Φυγοκεντρήσαμε για 15'' σε 8.000g. Αποχύσαμε το υγρό που συλλέχθηκε στον σωλήνα. Επαναλάβαμε τη διαδικασία και για τον υπόλοιπο όγκο του δείγματος και αποχύσαμε πάλι το υγρό που συλλέχθηκε.
4. προσθέσαμε στη στήλη 700μl Buffer RW1. Φυγοκεντρήσαμε για 15'' σε 10.000g. Αποχύσαμε και πάλι το υγρό που συλλέχθηκε.
5. μεταφέραμε τη στήλη σε νέο σωλήνα erpendorf συλλογής και προσθέσαμε σ' αυτήν 500μl Buffer RPE (που είχαμε προετοιμάσει προηγουμένως προσθέτοντας αιθανόλη 100%). Φυγοκεντρήσαμε για 15'' σε 10.000g. Αποχύσαμε πάλι το υγρό που συλλέχθηκε.
6. προσθέσαμε πάλι 500μl Buffer RPE . Φυγοκεντρήσαμε για 2' σε 1.,000g.
7. μεταφέραμε τη στήλη σε καινούριο σωλήνα erpendorf 1,5 ml και προσθέσαμε στη στήλη 50μl νερό κατευθείαν στη μεμβράνη. Φυγοκεντρήσαμε για 1' σε 10.000g.

Παραλάβαμε στον σωλήνα erpendorf σε περίπου 50μl το RNA του ιστού και αφού τον χαρακτηρίσαμε τον αποθηκεύσαμε αμέσως στους  $-20^{\circ}$  C.

#### ε) Ανάλυση RNA

Το RNA που παραλήφθηκε με αυτήν την διαδικασία αναλύθηκε σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης 2% σε 1X TAE (10mM Tris-acetate pH 7, 1mM EDTA pH8). Το 1X TAE παρασκευάστηκε με αραιώση 1 : 50 από διάλυμα 50X TAE που παρασκευάστηκε με τη σειρά του με ανάμειξη 242g Tris base + 57.1 ml glacial acetic acid + 100 ml 0,5M EDTA + απιονισμένο νερό μέχρι τα 1000ml (51).

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή οριζοντίου ηλεκτροφόρησης HORIZON 11.14 της GIBCO-BRL. Χρησιμοποιήσαμε 5μl από το δείγμα το οποίο χρωματίστηκε με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφήθηκε με μηχανή kodak σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Μια τυπική τέτοια φωτογραφία βλέπουμε στην εικόνα 1.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του mRNA έγινε με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 260 nm και 280 nm. Η τιμή στα 260 nm επιτρέπει τον υπολογισμό της ποσότητας RNA, αφού μια απορρόφηση OD = 1 στα 260 nm ανταποκρίνεται με συγκέντρωση RNA ~ 40 μg/ml. Ο λόγος των τιμών απορρόφησης στα 260 και 280 nm ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) μας επιτρέπει να ελέγχουμε την καθαρότητα του RNA. Καθαρά δείγματα RNA έχουν τιμή  $OD_{260}/OD_{280} = 2$ . Αν υπάρχει επιμόλυνση με πρωτεΐνη ή DNA, τότε αυτός ο λόγος θα είναι σημαντικά μικρότερος αυτής της τιμής, και ακριβής ποσοτικοποίηση της ποσότητας του RNA στο δείγμα δεν είναι εφικτή (51).

#### **στ) Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription.)**

Είναι μια μέθοδος κατά την οποία μετατρέπεται το RNA σε cDNA μέσω ενός ενζύμου που εκτελεί χρέη RNA-εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης και ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase).

Το ίδιο ένζυμο έχει και δεύτερη δράση αυτήν της Hybrid-dependend exoribonuclease (RNase H) με την οποία διασπά και καταστρέφει το RNA μόνο από υβρίδια RNA-DNA αφήνοντας απείραχτο το DNA του υβριδίου και κάθε άλλο RNA στην αντίδραση (σχήμα 3) (Reverse Transcriptase Handbook by Qiagen).

Για την μετατροπή του RNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκε η M-MuLV reverse transcriptase της Invitrogen. Οι αντιδράσεις έγιναν σε 100μl όγκο. Δημιουργήθηκε πρώτα το διάλυμα εργασίας (MASTER MIX) για τις 16 αντιδράσεις (πίνακας 1), και στη συνέχεια προστέθηκαν 10 μl RNA καθώς και 2,5 μl του ενζύμου σε κάθε αντίδραση. Η τελική συγκέντρωση του ενζύμου σε κάθε αντίδραση ήταν 50 units. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε ήταν τυχαίοι και έτσι, μετατρέψαμε σε cDNA όλο το φάσμα του RNA που υπήρχε στα δείγματά μας. Οι 16 αντιδράσεις χαρακτηρίστηκαν από τον ιστό που προέρχονταν τα RNA ως εξής :

1,2,3,4 : **NORMAL** : BRH, BRCC, BLH, BLCC

5,6,7,8 : **0h** : BRH, BRCC, BLH, BLCC

9,10,11,12 : **2h** : BRH, BRCC, BLH, BLCC

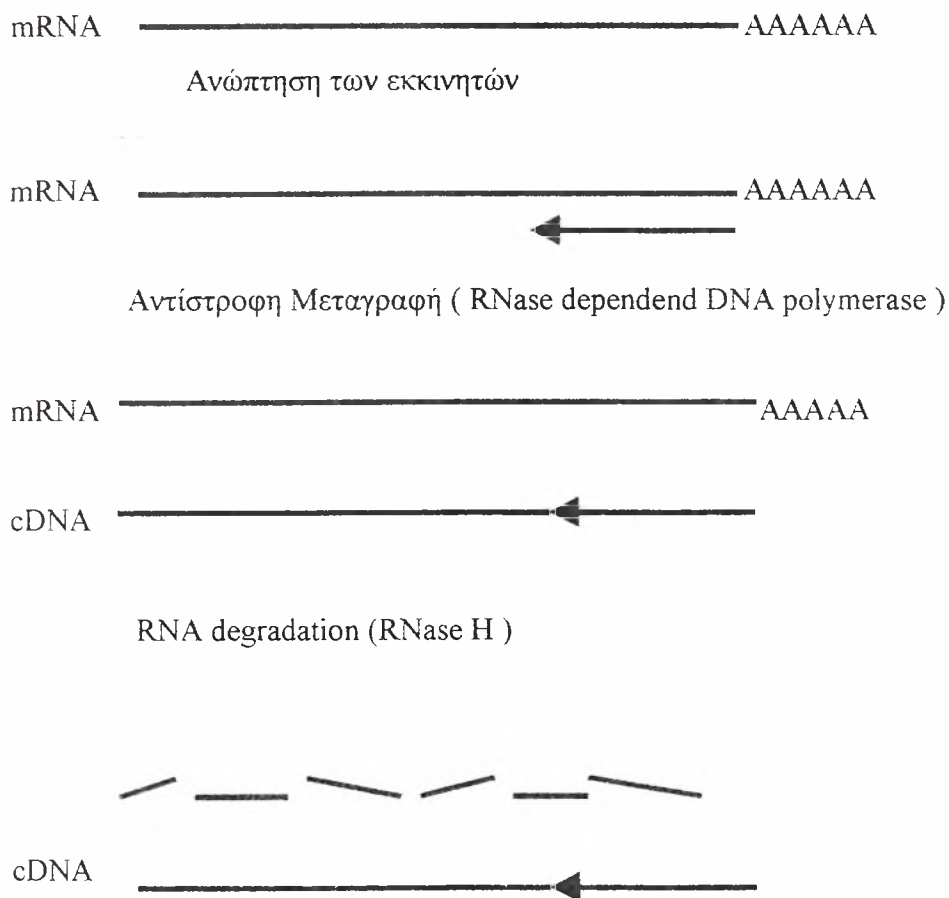
13,14,15,16 : **24h** : BRH, BRCC, BLH, BLCC

(όπου : BRH = Brain Right Hippocampus

BLH = Brain Left Hippocampus

BRCC = Brain Right Celebral Cortex

BLCC = Brain Left Celebral Cortex ).



**Σχήμα 3 :** Η δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης κατά την μεταγραφή ενός μορίου RNA σε cDNA.

αντιδραστήριο	όγκος/αντίδραση	συνολικός όγκος	τελικές συγκεντρώσεις
5X Buffer RT	20 $\mu$ l	320 $\mu$ l	1 X
Random primers 30ng/ml	5 $\mu$ l	80 $\mu$ l	1,5 ng/ml
dNTPs 10mM each	5 $\mu$ l	80 $\mu$ l	0,5mM
DTT 100mM	10 $\mu$ l	160 $\mu$ l	10mM
H <sub>2</sub> O	47,5 $\mu$ l	760 $\mu$ l	
<b>ΣΥΝΟΛΑ</b>	87,5 $\mu$ l	1400 $\mu$ l	

**Πίνακας 1 :** Παρασκευή διαλύματος εργασίας (MASTER MIX) για 16 αντιδράσεις RT όγκου 100  $\mu$ l η κάθε μία. Στην κάθε αντίδραση προστίθενται 87,5  $\mu$ l του MASTER MIX και στη συνέχεια 10 $\mu$ l RNA και 2,5  $\mu$ l ενζύμου.

Στην συνέχεια οι σωλήνες erpendorf με τις 16 αντιδράσεις τοποθετήθηκαν σε συσκευή PCR Eppendorf Mastercycler και έτρεξαν στο παρακάτω πρόγραμμα :

65° C : 5 min (αποδιάταξη του RNA)

25° C : 5 min annealing (ανώπτηση των εκκινητών)

37° C : 1 h .10 min (ενεργοποίηση της τρανσκριπτάσης). Στην αρχή αυτού του βήματος, έγινε και η προσθήκη του ενζύμου στις αντιδράσεις.

65° C : 10 min (αποδιάταξη του ενζύμου).

Μετά το τέλος του προγράμματος, παραλάβαμε τους σωλήνες erpendorf με το cDNA και τους αποθηκεύσαμε στους -20° C.

### ζ) Εκκινητές για β-ακτίνη , και Ντεκορίνη.

Για να συνεχίσουμε με την PCR για ντεκορίνη σχεδιάστηκαν και παραγγέλθηκαν εκκινητές για β-ακτίνη και ντεκορίνη στο Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας της Κρήτης στο Εργαστήριο Μικροχημείας. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο για τον έλεγχο της έκφρασης της ντεκορίνης.

Η επιλογή των εκκινητών έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα CLUSTAL W το οποίο κάνει πολλαπλή αντιστοίχιση ακολουθιών. Το πρόγραμμα αυτό τροφοδοτήθηκε με τις ακολουθίες των mRNAς των γονιδίων της ντεκορίνης του ανθρώπου και της ντεκορίνης του *R-rattus* και του *R-norvegicus*, όπως φαίνεται από τους πίνακες 2&3. Μ'αυτόν τον τρόπο πετύχαμε να εντοπίσουμε τις περιοχές που έχουν συντηρηθεί πλήρως μεταξύ του mRNA για τη ντεκορίνη ανθρώπου και επίμυος. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν από αυτές τις περιοχές ώστε να είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν τόσο σε mRNA από ανθρώπινους ιστούς, όσο και σε mRNA από επίμυ. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για το mRNA της β-ακτίνης .

## HUMAN

gtggcaaatt cccggattaa aaggttccct ggttgtgaaa atacatgaga taatcatga aggccactat catctcctt ctgctgcac aagtttctg  
 ggctggaccg ttcaacaga gaggcttatt tgactttatg ctagaagatg aggcttctgg gataggcca gaagtctctg atgaccgca ctgagacc  
 tccctaggcc cagtggtccc ctccgctgt caatgccatc ttcgagtggt ccagtgctt gatttgggtc tggacaaagt gccaaaggat ctccccctg  
 acacaactct gctagacctg caaacaaca aataaccga aatcaaagat ggagacttta agaacctgaa gaaccttcac gcaitgatic ttgtcaaca  
 taaaattagc aaagitagtc ctggagcatt tacaccttg gtgaagtgg aacgacttta tctgtccaag aatcagctga aggaattgcc agaaaaatg  
 cccaaaactc ttcaggagct gcgtgccat gagaatgaga taccaaaagt gcgaaaagt acittcaatg gactgaacca gatgattgc  
 atagaactgg gaccaatcc gctgaagagc tcaggaattg aaaatggggc ttccagggga atgaagaagc tctctacat ccgattgct  
 gataccaata tcaccagcat tctcaaggct ctctcctt ccttaccga attacatct gatggcaaca aatcagcag agttgatga gctagcctga  
 aaggactgaa taatttggct aagtgggat tgagttaaa cagcatctct gctgtgaca atggctctt ggccaacag cctcatctga gggagctca  
 ctggacaac aacaagctta ccagagttacc tgggtggctg gcagagcata agtacctca ggtgtctac ctcataaca acaatactc tgtagtggg  
 tcaagtact tctgccacc tggacacaac accaaaaagg ctcttattc ggtgtgagt ctttcagca acccggcca gctctggag atacagccat  
 ccacttcag atgtgtctac gtgcgtctg ccattcaact cggaaactat aagtaattct caagaaagcc ctattttta taacctggca aaatctgtt  
 aatgctatt ctaaaaaata aataaaagt agatactgga aacctaactg caatgtggat gtttacca catgactat tatgcat

## RATTUS-RATTUS

cggtttttt ttttttcaa cctagtga gtcacagagc agcaccacc cctcctctt tccacacctg caaactctt tgcitgggt gcaactta gtgttaata  
 catgcagct ttgagggctc cgtggcaaaa taccggatt aaaaggtgtt gaaaacgc atgacaca lgaaggcaac tctctctta ttctctg  
 cgcaagctc ttgggtctga ccalltgagc agagaggatt atttgactc atgctagaag atgagggctc tggcataac cctacgacc ctgacaatcc  
 cctgatatct atgtgccct acogatgcca atgccatc cgagtggtgc agtgtctga tctgggtctg gacaaaglac cctgggagt tccacctgac  
 acaacattgc tagacctga aacaacaaa ataacagaga tcaagaggg ggccttaag aacctgaagg actgcatc ctgatctt gtaacaaca  
 agatcagcaa gatcagcca gaggcatta aacctctagt gaagtggaa aggccttalc tctcaagaa ccacctaaag gagctgccc aaaaattgac  
 caaaacactc caggagctc gactccagca caatgagatc accaaactga agaaatctgt gttcaatgga ctgaaccgta tgaattgat agaactggg  
 ggcaaccac tgaaaaactc tgggattgaa aatggagcct tgcagggaaat gaaggtctc ggatacatcc gcatctaga cccaacata actgctatc  
 ctcaaggtct gccactct atcagtgaac tgcactgga tggcaacaag atgccaaaag ttgatgcagc cagcctgaaa ggaatgcta attgtctaa  
 gctgggttg agcttaata gcatccctg tgggaaaat ggcagctgg ctaatgtcc tcatctgagg gagctccact tggacaaca caaactcctc  
 agagtgcctg ctgggctgc acagcataaa tatgtccagg tctctacct tcaatacaac aacatctccg aagtgggca gcatgactc tgcctcctt  
 cataccagac taggaagact tctactctg ccgtgagct tlatagcaac cctgtccgtt atggcaaat tcaaccacac acctcagat gttctctgg  
 gcgctctacc atcaactg ggaactaca gtaactcca aacagcctca ttttataat cgggaacaaa aaaaccaatc tgtcaatatt attgctaaaa a

## RATUS NORVEGICUS

gcacaagttt cctgggctgg accatttgag cacagaggat tattgactt catgctaga gatgaggcct ctggcataat ccctacgac cctgacaatc  
 ccctgatac tatgtcccc taccgatgcc aatgccatc ccgagtggtg cagtgctct atctgggtct ggacaaagta ccctgggaat tccacctga  
 cacaacattg ctgacctgc aaaaacaaa aataacagag atcaagagg gggcctttaa gaacctgaag gactgcata ccttgatctt  
 tgtcaacaac aagatcagca agatcagccc agaggcatt aaacctctag tgaagtggg aaggctttat ctgtctaa accacctaaa  
 ggagctgcc gaaaaattgc caaaaact ccaggagctt cactccagc acaatgagat caccaactg aagaatctg tgtcaatgg  
 actgaaccgt atgattgca tagaactggg cggcaacca ctgaaaaact ctgggattga aatggagcc ttgcagggaa tgaagggtct  
 cgatacatc cgcactcag acaccaaat aactgctatt cctcaaggct tggccactc tatcagtga ctgcatctg atggcaaca gatagcaaa  
 gttgatcag ccagcctgaa agaatgtct aattgtcta agctgggtt gagcttcaat agcatcacc ttgtgaaaa tggcagctg gctaatgtc  
 ctcatctgag ggagctccac ttggacaaca aaaaactcct cagagtgcct gctgggctgg cacagcataa atagtccag gctgctacc  
 ttcataaca caacatctc gaagtgggc agcatgact ctgcctcct tcaaccaga ctaggagac tctactact gccgtgact tlatagca  
 ccctgtccgg tattggcaaa tcaaccaca cacttcaga tgtctctg ggcgctctac cattcaactt gggaactaca agtaactccc aaacgcctc  
 attttataa tgggaacaa aaaaaccaat ctgtcaatat tattgctaaa aagaaaaaa tattttgaaa aagaagaat gctagattct ggaaatcaa  
 gtatagcgcg gatgccttc ccgatgact talcatgat caagccaaat atacagattg aataatcacc tacaataaa atattttatc tgiatc  
 agaactact taaaaattt ctgtatgt gaactgaggt atcgaagtct gatgataca tagatgcaa catttaata agctaaaagg aacagaatac  
 aaagtctct gtaattcata gagctaaat gactctttg acataaagc aatgtaga ctctagcaat gtattaatc ccttattat tggtaagtc  
 ttattgaa atctaagtc aactgggct atgaaaaat tcaactgca tactgaaaa caataaatt taaaaatgc attcaaaaa aaaaaa//

**πίνακας 2 :** Οι αλληλουχίες του mRNA του γονιδίου της ανθρώπινης της rattus-rattus και της rattus norvegicus ντεκορίνης.





Clustalw Your results

Use JalView:

Pairwise Scores

CLUSTAL W (1.82) Multiple Sequence Alignments

Sequence format is Pearson

Sequence 1: Human 1267 bp

Sequence 2: Rrattus 1311 bp

Sequence 3: Rnorveg 1547 bp

Start of Pairwise alignments

Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 73

Sequences (1:3) Aligned. Score: 73

Sequences (2:3) Aligned. Score: 83

Guide tree file created: [/ebi/extserv/old-work/863597.750012-19672.dnd]

Start of Multiple Alignment

There are 2 groups

Aligning...

Group 1: Sequences: 2 Score:20881

Group 2: Sequences: 3 Score:18351

Alignment Score 20172

CLUSTAL-Alignment file created [/ebi/extserv/old-work/863597.750012-19672.aln]

Your Multiple Sequence Alignment

863597.750012-19672.aln

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

Rrattus      CGGTTTTTTTTTTTTTTTCAACCTAGTGACAGTCACAGAGCAGCACCACCCCTCCTCCTT 60
Rnorveg     -----
Human       -----

Rrattus      TCCACACCTGCAAACCTCTCTTGCTTGGGCTGCATTACTTAGTGTTAATTACATCGCAGCT 120
Rnorveg     -----
Human       -----

Rrattus      TTGAGGGCTCCGGTGGCAAATACCCGGATTAAAAGGTGGTGAAAACGCATGAGACAA-CC 179
Rnorveg     -----
Human       ----GTGGCAAATCCCGGATTAAAAGGTTCCCTGGTTGTGAAAATACATGAGATAAAATC 56

Rrattus      ATGAAGGCAACTCTCGTCTTATTCCTTCTGGCGCAAGTCTCTTGGGCTGGACCATTGAG 239
Rnorveg     -----GCACAAGTTTCTGGGCTGGACCATTGAG 30
Human       ATGAAGGCCACTATCATCCTCCTTCTGCTTGCACAAGTTTCTGGGCTGGACCGTTTCAA 116
                ** ***** ** ***** ** *

Rrattus      CAGAGAGGATTATTTGACTTCATGCTAGAAAGATGAGGCCTCTGGCATAATCCCTTACGAC 299
Rnorveg     CAGAGAGGATTATTTGACTTCATGCTAGAAAGATGAGGCCTCTGGCATAATCCCTTACGAC 90
Human       CAGAGAGGCTTATTTGACTTTATGCTAGAAAGATGAGGCCTCTGGGATAGGCCAGAAAGTT 176
                ***** ***** ***** ***** ***** ** *

```

Rrattus CCTGACAATC-----CCCTGATATCTATGTGCCCTACCGATGCCAATGC 344  
 Rnorveg CCTGACAATC-----CCCTGATATCTATGTGCCCTACCGATGCCAATGC 135  
 Human CCTGATGACCGGACTTCGAGCCCTCCCTAGGCCAGTGTGCCCTTCCGCTGTCAATGC 236  
 \*\*\*\*\* \* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\*

Rrattus CATCTCCGAGTGGTGCAGTGTTCGATCTGGGTCTGGACAAAGTACCCTGGGAGTTTCCA 404  
 Rnorveg CATCTCCGAGTGGTGCAGTGTTCGATCTGGGTCTGGACAAAGTACCCTGGGAGTTTCCA 195  
 Human CATCTTCGAGTGGTCCAGTGTTCGATTTGGGTCTGGACAAAGTGCCAAAGGATCTTCCC 296  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*

Rrattus CCTGACACAACATTGCTAGACCTGCAAAACAACAAAATAACAGAGATCAAAGAGGGGGCC 464  
 Rnorveg CCTGACACAACATTGCTAGACCTGCAAAACAACAAAATAACAGAGATCAAAGAGGGGGCC 255  
 Human CCTGACACAACCTCTGCTAGACCTGCAAAACAACAAAATAACCGAAATCAAAGATGGAGAC 356  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*

Rrattus TTTAAGAACCTGAAGGACTTGCATACCTTGATCCTTGTCAACAACAAGATCAGCAAGATC 524  
 Rnorveg TTTAAGAACCTGAAGGACTTGCATACCTTGATCCTTGTCAACAACAAGATCAGCAAGATC 315  
 Human TTTAAGAACCTGAAGAACCTTACGCATTGATCTTGTCAACAATAAAATTAGCAAAGTT 416  
 \*\*\*\*\* \*\* \* \* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*

Rrattus AGCCCAGAGGCATTAAACCTCTAGTGAAGTTGGAAAGCCTTTATCTGTCTAAGAACCAC 584  
 Rnorveg AGCCCAGAGGCATTAAACCTCTAGTGAAGTTGGAAAGCCTTTATCTGTCTAAGAACCAC 375  
 Human AGTCTCGGAGCATTACACCTTTGGTGAAGTTGGAACGACTTTATCTGTCCAAGAATCAG 476  
 \*\* \* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*

Rrattus CTAAGGAGCTGCCCGAAAAATTGCCCAAACACTCCAGGAGCTTCGACTCCACGACAAT 644  
 Rnorveg CTAAGGAGCTGCCCGAAAAATTGCCCAAACACTCCAGGAGCTTCGACTCCACGACAAT 435  
 Human CTGAAGGAATTGCCAGAAAAATGCCCAAACCTTTCAGGAGCTGCGTGCCCATGAGAAT 536  
 \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*

Rrattus GAGATCACCAAACCTGAAGAAATCTGTGTTCAATGGACTGAACCGTATGATTGTCATAGAA 704  
 Rnorveg GAGATCACCAAACCTGAAGAAATCTGTGTTCAATGGACTGAACCGTATGATTGTCATAGAA 495  
 Human GAGATCACCAAAGTGCAGAAAGTTACTTTCAATGGACTGAACCGATGATTGTCATAGAA 596  
 \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

Rrattus CTGGGCGGCAACCCACTGAAAACTCTGGGATTGAAAATGGAGCCTTGCAGGGAATGAAG 764  
 Rnorveg CTGGGCGGCAACCCACTGAAAACTCTGGGATTGAAAATGGAGCCTTGCAGGGAATGAAG 555  
 Human CTGGGCGGCAACCCACTGAAAACTCTGGGATTGAAAATGGAGCCTTGCAGGGAATGAAG 656  
 \*\*\*\*\* \*\* \* \* \* \*\*\*\*\* \* \* \* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\*

Rrattus GGTCTCGGATACATCCGCATCTCAGACACCAACATAACTGCTATTCCTCAAGGTCTGCC 824  
 Rnorveg GGTCTCGGATACATCCGCATCTCAGACACCAACATAACTGCTATTCCTCAAGGTCTGCC 615  
 Human AAGCTCTCCTACATCCGCATTCGTGATACCAATATCACCAGCATTCCTCAAGGTCTTCCT 716  
 \*\*\* \*\*\*\*\* \* \* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*

Rrattus ACTTCTATCAGTGAAGTGCATCTGGATGGCAACAAGATCGCCAAAGTTGATGCAGCCAGC 884  
 Rnorveg ACTTCTATCAGTGAAGTGCATCTGGATGGCAACAAGATAGCCAAAGTTGATGCAGCCAGC 675  
 Human CCTTCCCTTACGGAATTACATCTTGATGGCAACAAAATCAGCAGAGTTGATGCAGCTAGC 776  
 \*\*\*\* \* \* \* \* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

Rrattus CTGAAAGGAATGTCTAATTTGTCTAAGCTGGGTTTGAGCTTCAATAGCATCACCGTTGTG 944  
 Rnorveg CTGAAAGGAATGTCTAATTTGTCTAAGCTGGGTTTGAGCTTCAATAGCATCACCGTTGTG 735  
 Human CTGAAAGGACTGAATAATTTGGCTAAGTTGGGATTGAGTTTCAACAGCATCTCTGCTGTT 836  
 \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*

Rrattus GAAAATGGCAGTCTGGCTAATGTTCTCATCTGAGGGAGCTCCACTTGGACAACAACAAA 1004  
 Rnorveg GAAAATGGCAGTCTGGCTAATGTTCTCATCTGAGGGAGCTCCACTTGGACAACAACAAA 795  
 Human GACAATGGCTCTCTGGCCAACACCGCTCATCTGAGGGAGCTTCACTTGGACAACAACAA 896  
 \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

Rrattus CTCCTCAGAGTGCTGCTGGGCTGGCACAGCATAAATATGTCCAGGTCGTCTACCTTCAT 1064  
 Rnorveg CTCCTCAGAGTGCTGCTGGGCTGGCACAGCATAAATATGTCCAGGTCGTCTACCTTCAT 855  
 Human CTTACCAGAGTACCTGGTGGGCTGGCAGAGCATAAGTACATCCAGGTTGTCTACCTTCAT 956  
 \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

Rrattus AACACAACATCTCCGAAGTTGGGCAGCATGACTTCTGCCTCCCTTCATACCAGACTAGG 1124  
 Rnorveg AACACAACATCTCCGAAGTTGGGCAGCATGACTTCTGCCTCCCTTCATACCAGACTAGG 915  
 Human AACACAATATCTCTGTAGTTGGATCAAGTACTTCTGCCACCTGGACACAACACAAA 1016

```
*****  *  *****      *****      * *  * *  * * * *  
  
Rrattus      AAGACTTCCTACACTGCCGTGAGTCTTTATAGCAACCCTGTCCGGTATTGGCAAATTCAC 1184  
Rnorveg      AAGACTTCCTACACTGCCGTGAGTCTTTATAGCAACCCTGTCCGGTATTGGCAAATTCAC 975  
Human      AAGGCTTCTTATTCGGGTGTGAGTCTTTTCAGCAACCCTCCAGTACTGGGAGATACAG 1076  
***  **** *  *  *****      *****      ***  **  **  *  **  **  
  
Rrattus      CCACACACCTTCAGATGTGTCTTCGGGCGCTCTACCATTCAACTTGGAACACAAAGTAA 1244  
Rnorveg      CCACACACCTTCAGATGTGTCTTCGGGCGCTCTACCATTCAACTTGGAACACAAAGTAA 1035  
Human      CCATCCACCTTCAGATGTGTCTACGTGCGCTCTGCCATTCAACTCGGAACTATAAGTAA 1136  
***  *****      **  *****      *****      **  *****      *****  
  
Rrattus      CTCCCAAACAG--CCTCATTTTTATAATCGGGAACAAAAAACCAATCTGTCAATATTAT 1302  
Rnorveg      CTCCCAAACAG--CCTCATTTTTATAATCGGGAACAAAAAACCAATCTGTCAATATTAT 1093  
Human      TTCTCAAGAAAGCCCTCATTTTTATAACCTGGCA----AAATC---TTGTTAATGTCAT 1188  
*  **  *  *****      **  *      **  *      **  **  *  **  
  
Rrattus      TGCTAAAAA----- 1311  
Rnorveg      TGCTAAAAAGAAAAAATATTTTGAAGAAAGAAAGTCTAGATTCTGGAAATTCAGTA 1153  
Human      TGCTAAAAATAAATAAAA-----GCTAGATACTGGAAACCTAACTG 1230  
*****  
  
Rrattus      -----  
Rnorveg      TAGCGCGGATGCCTTCCCGTATGACTTATCATGCATCAAGCCAAATATACAGATTGAAT 1213  
Human      CAATGTGGATGTTTTACCCACATGACTTATTATGCAT----- 1267  
  
Rrattus      -----  
Rnorveg      AATTACCTACAATAAAAAATATTTTATCTGTAGTATTAGAAATCACTTTAAAAATTTCTG 1273  
Human      -----  
  
Rrattus      -----  
Rnorveg      TAGATGTGAACTGAGGTATCGAAGTCTGATGTAATCATAGATGTCAACATTTAATAAAGC 1333  
Human      -----  
  
Rrattus      -----  
Rnorveg      TAAAAGGAACAGAATACAAAGTCTTCTGTAATTCATAGAGCTAAATTGACTCTTTTGACA 1393  
Human      -----  
  
Rrattus      -----  
Rnorveg      TAAAGTCAAATGTAGAACTCTAGCAATGTATTAATCTCCTTTATTATTGGTAAAGTCTTA 1453  
Human      -----  
  
Rrattus      -----  
Rnorveg      TTTGAAATATCTAAGTCAACATGGGCTATGTAAAAATTTCACTGTCACTGAAAAACAA 1513  
Human      -----  
  
Rrattus      -----  
Rnorveg      TAAAAATTAAAAATGCATTCAAAAAAAAAAAAA 1547  
Human      -----
```

Πίνακας 3 : Η πολλαπλή αντιστοίχιση ακολουθιών με το πρόγραμμα CLUSTAL-W για τα mRNAs της νετοκορίνης του ανθρώπου, του R. Rattus και του R - Norvegicus, έδωσε το παραπάνω αποτέλεσμα .Ετσι, επιλέχτηκαν οι εκκινητές της νετοκορίνης (O UP με κόκκινο και ο DOWN με μπλέ στον πίνακα).

### η) Ανάλυση των δειγμάτων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανταγωνιστικής ημιποσοτικής PCR με εσωτερικό μάρτυρα εκκινητές για το cDNA της β-ακτίνης. Στον ίδιο σωλήνα PCR χρησιμοποιήθηκαν δύο σέτ εκκινητών, ένα για τη ντεκορίνη και ένα για την β-ακτίνη. Οι τελικές συγκεντρώσεις των εκκινητών καθορίστηκαν πειραματικά, λόγω της διαφορετικής αντιπροσώπευσης των μηνυμάτων των δύο γονιδίων. Ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης καθορίστηκε κι αυτός πειραματικά με στόχο να επιτύχουμε η ενίσχυση να βρίσκεται στη γραμμική περιοχή της αντίδρασης.

Οι αντιδράσεις μας έτρεξαν σε τελικό όγκο 25μl. Χρησιμοποιήθηκε η HotStarTaq DNA Polymerase της Qiagen.

Παρασκευάστηκε το διάλυμα εργασίας (MASTER MIX) (πίνακας 4) και αφού μοιράστηκε στους 16 PCR σωλήνες erpendorf, κατόπιν προσετέθη και ποσότητα 5μl των δειγμάτων cDNA.

αντιδραστήριο	όγκος/αντίδραση	συνολικός όγκος	τελική συγκέντρωση
10X PCR Buffer	2,5μl	40μl	1 X
25mM MgCl <sub>2</sub>	2μl	32μl	2mM
dNTPs 10mM of each	2,5μl	40μl	1mM
Primers Decorin 25pmoles each	1μl	16μl	25 pmoles each / αντίδραση
Primers Actin-b 1,25 pmoles each	1μl	16μl	1,25 pmoles each /αντίδραση
HotStarTaq DNA Polymerase	0,25μl	4μl	5units / αντίδραση
H <sub>2</sub> O	10,75μl	172μl	
<b>ΣΥΝΟΛΑ</b>	20μl	320μl	

**Πίνακας 4 :** Παρασκευή διαλύματος εργασίας (MASTER MIX) για 16 PCR αντιδράσεις όγκου 25 μl η κάθε μία. Στην κάθε αντίδραση προστίθενται 20 μl του διαλύματος εργασίας, και στην συνέχεια 5μl του cDNA από κάθε δείγμα.

Στην συνέχεια οι 16 αντιδράσεις τοποθετήθηκαν στην συσκευή PCR (Eppendorf Mastercycler) και έτρεξαν το παρακάτω πρόγραμμα :

**95° C: 15 min** ( αρχικός χρόνος ενεργοποίησης της HotStarTaq DNA Polymerase)

94° C: 1 min ( αποδιάταξη)

57° C: 1 min ( ανώπτηση εκκινητών)

72° C: 1 min ( πολυμερισμός)

**Αριθμός κύκλων : 30**

**72° C: 10 min** (τελικός πολυμερισμός)

Αποθήκευση στους 4° C .

#### **θ) Ανάλυση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).**

Ακολούθησε ανάλυση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης 1,5% σε 1X TAE. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακών βαρών η κλίμακα 50 ζευγών βάσεων (50bp ladder) από την Invitrogen. Η πηκτή χρωματίστηκε με βρωμιούχο αιθίδιο και κατόπιν φωτογραφήθηκε σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) με μηχανή kodak. Μια τυπική φωτογραφία ανάλυσης των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης φαίνεται στην εικόνα 2. Η ποσοτικοποίηση έγινε με το πρόγραμμα Kodak Digital Science 1D™ και τα αποτελέσματα ύστερα υπέστησαν επεξεργασία στο Microsoft Excel με την μορφή πινάκων και γραφημάτων. (πίνακας 5 / σχήμα 4 / πίνακας 6).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### I. Απομόνωση RNA

Στην **εικόνα 1** φαίνεται μια τυπική εμφάνιση ανάλυσης RNA σε πηκτή αγαρόζης 2%. Εμφανίζονται δύο διακριτές ζώνες που είναι αυτές των θραυσμάτων 28S και 18S. Γενικώς παραλάβαμε RNA σε συγκρίσιμες ποσότητες από όλα τα δείγματα. Σε κάθε σειρά δειγμάτων εμφανίστηκαν τυχαίες αυξομειώσεις (π.χ. διαδρομές 16,17 κλάσμα 18S της εικόνας 1) πιθανώς λόγω πειραματικών σφαλμάτων, αλλά η γενική εικόνα ήταν πως απομονώσαμε RNA από όλα τα δείγματα σε παρόμοιες ποσότητες.

Θεωρητικά, αναμέναμε να απομονώσουμε περίπου 8μg RNA ανά 10 mg ιστού (RNeasy Mini Handbook by Qiagen). Η συνολική ποσότητα του ιστού που επεξεργαστήκαμε για κάθε δείγμα ήταν περίπου 30 mg, άρα ανεμένετο περίπου ποσότητα RNA 25μg σε κάθε δείγμα. Παραλάβαμε το RNA σε 50 μl τελικό διάλυμα άρα η θεωρητική συγκέντρωσή του ήταν 0,5μg/μl.

Με την φωτομέτρηση τυχαίων δειγμάτων στα 260 nm (5 μl δείγματος / ml) επιβεβαιώσαμε πως η ποσότητα του RNA που απομονώσαμε ήταν περίπου η θεωρητικώς αναμενόμενη. Η τιμή της απορρόφησης ήταν σταθερά κοντά στο 0,06 (52).

### II. Ανάστροφη μεταγραφή

Η διαδικασία αυτή δεν ελέγχθηκε τελικώς με οποιονδήποτε τρόπο. Ο λόγος είναι πως η διαδικασία αυτή θα μπορούσε να ελεγχθεί με ειδική μεθοδολογία, δηλ. χρησιμοποιώντας ραδιενεργό νουκλεοτίδιο dCTP ή dATP και με το πέρας της αντίδρασης μετρώντας την ενσωμάτωσή του σε νεοσυντεθημένο DNA, αφού απομακρυνθεί με κατακρήμνηση από την υπόλοιπη ραδιενεργή αντίδραση. Δουλέψαμε όμως χωρίς ραδιενέργεια και εκτιμήθηκε πως δεν ήταν απαραίτητος ο έλεγχος σε αυτήν την φάση των πειραμάτων σε τέτοιο βαθμό ώστε να μας υποχρεώνει να εισάγουμε ραδιενεργούς δείκτες στο πρωτόκολλό μας.

### III. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ( PCR ).

Εδώ αναφέρουμε ότι ανιχνεύσαμε προϊόντα ενίσχυσης για τη ντεκορίνη στον υπόκαμπο και στον φλοιό του εγκεφάλου υποξικών-ισχαιμικών νεογέννητων επίμυων σε συγκρίσιμα ποσά (ζώνη 383 bp). Στην **εικόνα 2** βλέπουμε μια τυπική εμφάνιση ανάλυσης των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης 1,5 %.<sup>1</sup> Στις διαδρομές 1 & 14 τρέχει ο μάρτυρας (κλίμακα 50 ζευγών βάσεων – 50 bp ladder by Invitrogen).

2 : normal BRH

3 : normal BRCC

4 : normal BLH

5 : normal BLCC

6 : 0h BRH

7 : 0h BRCC

8 : 0h BLH

9 : 0h BLCC

10 : 2h BRH

11 : 2h BRCC

12 : 2h BLH

13 : 2h BLCC

15 : 24h BRH

16 : 24h BRCC

17 : 24h BLH

18 : 24h BLCC

Η ακεραιότητα της πειραματικής διαδικασίας ελέγχθηκε με την ενίσχυση του cDNA για την β-ακτίνη η οποία ήταν ποσοτικά όμοια σε όλα τα δείγματα (ζώνη 621 bp) .

Στην συνέχεια έγινε σάρωση του gel με σύστημα της kodak και μέτρηση των φωτεινοτήτων των ζωνών με το πρόγραμμα kodak digital science 1D™. Τα αποτελέσματα τα επεξεργαστήκαμε κατόπιν στο Microsoft Excel και τα αποθηκεύσαμε με την μορφή πινάκων και γραφημάτων.

Ενας τυπικός τέτοιος πίνακας είναι ο πίνακας 5 που αφορά τέσσερα πειραματόζωα (από την τελευταία γέννα) από τα δεκαέξι που συνολικά θυσιάστηκαν σ' αυτήν την εργασία, δηλ. οι τιμές του δεν είναι μέσες τιμές αλλά τυπικές τιμές .

Όπως φαίνεται εκεί, μετρήθηκαν πρώτα οι απόλυτες φωτεινότητες της ντεκορίνης και της β-ακτίνης για όλα τα δείγματα. Κατόπιν, πήραμε τον λόγο απόλυτη φωτεινότητα ντεκορίνης / απόλυτη φωτεινότητα β-ακτίνης. Στη συνέχεια θεωρώντας ως 100% τις τιμές του λόγου των normal ζώων για κάθε είδος ιστού, ποσοτικοποιήσαμε τον λόγο αυτό και για τα υπόλοιπα ζώα και για καθέναν ιστό αντίστοιχα.

Αυτές τις τιμές κατόπιν, τις οργανώσαμε με την μορφή του πίνακα 6 και τις εμφανίσαμε τέλος με την μορφή του διαγράμματος του σχήματος 4.

Από αυτό το διάγραμμα που είναι τυπικό αυτής της σειράς των πειραμάτων είναι εμφανές πως από τις 0 ώρες έχουμε μια μείωση του μηνύματος της ντεκορίνης και στα δύο ημισφαίρια και στον ιππόκαμπο και στον εγκεφαλικό φλοιό σε υποξικό-ισχαιμικό εγκέφαλο νεογέννητων επίμυων (βυσσινί χρώμα). Αυτή η μείωση είναι πιο έντονη στις 2 ώρες μετά την υποξία-ισχαιμία (κίτρινο χρώμα) , ενώ δείχνει το μήνυμα να επανακάμπτει στις 24 ώρες μετά την υποξία-ισχαιμία (πράσινο χρώμα).



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην εργασία αυτή διερευνήθηκε η έκφραση του mRNA του γονιδίου της Ντεκορίνης σε εγκέφαλο νεογέννητων επίμυων κάτω από συνθήκες υποξίας-ισχαιμίας. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ημιποσοτική ανταγωνιστική αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης μετά από ανάστροφη μεταγραφή (RT-PCR) και σαν γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε αυτό της β-ακτίνης.

Τα αποτελέσματα μας επιβεβαιώνουν εργασίες τρίτων (52,53) που αναφέρουν για την έκφραση της ντεκορίνης στο εγκεφαλικό ιστό επίμυων τόσο στον υπόκαμπο όσο και στο φλοιό του εγκεφάλου και μάλιστα σε συγκρίσιμα ποσοστά.

Η πειραματική προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν σχεδιασμένη για την ανίχνευση των άμεσων μοριακών γεγονότων μετά την υποξία-ισχαιμία. Έτσι σύμφωνα με το πρωτόκολλο μας παρατηρούμε μια σχετικά μικρή μείωση της έκφρασης του μηνύματος για το γονίδιο της ντεκορίνης αμέσως μετά το πέρας της υποξίας-ισχαιμίας με σαφή τάση για ανάκαμψη μετά από 24 ώρες. Η μείωση αυτή της έκφρασης της ντεκορίνης μπορεί να συσχετισθεί με τις λειτουργίες που της αποδίδονται και σαν διαμορφωτή του εξωκυττάριου χώρου αλλά και σαν ρυθμιστή της ενεργότητας αυξητικών παραγόντων (54,1).

Η καλά καθορισμένη σχέση της ντεκορίνης με τον μετασχηματικό αυξητικό παράγοντα-β (TGF-β) (48,27) μας επιτρέπει να προτείνουμε μια σειρά γεγονότων (με κίνδυνο υπεραπλούστευσης) που διέπουν την έκφραση του γονιδίου της ντεκορίνης κάτω από συνθήκες υποξίας-ισχαιμίας στον εγκέφαλο του νεογέννητου επίμυος. Είναι γνωστό ότι η ντεκορίνη δεσμεύει TGF-β και μάλιστα έχει προταθεί (1) ότι δρα ως εξωκυττάρια αποθήκη για τον παράγοντα αυτό. Η ελαφριά μείωση στην έκφραση του mRNA για την ντεκορίνη μπορεί να αντικατοπτρίζει μια λειτουργική κατάσταση κατά την οποία κινητοποιούνται αποθέματα του TGF-β ώστε να λειτουργήσουν προστατευτικά απέναντι στην υποξία-ισχαιμία. Αναφέρεται ότι σε υποξικές-ισχαιμικές καταστάσεις η έκφραση του γονιδίου για τον TGF-β αυξάνεται με αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης TGF-β στον εξωκυττάριο χώρο

(55,56,57,58) και την ενορχηστρωμένη επαγωγή ή καταστολή διαφόρων γονιδίων (59,60,61,62). Έχοντας υπόψη ότι και η έκφραση του γονιδίου της ντεκορίνης επηρεάζεται θετικά από τους προφλεγμονώδης παράγοντες IL-1 και IL-4 (63,64,65) και αρνητικά από τον TNF- $\alpha$  (66) και πιθανώς τον ίδιο τον TGF- $\beta$  (67) και ότι ο TGF- $\beta$  με τη σειρά του κινητοποιεί τις κυτοκίνες αυτές (62,68) μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η υποξία-ισχαιμία δημιουργεί μια σειρά από μοριακά γεγονότα στα οποία συμπεριλαμβάνονται η έκφραση των προφλεγμονωδών παραγόντων, που πιθανώς άμεσα καταστέλουν την έκφραση του γονιδίου της ντεκορίνης. Η υπερέκφραση του γονιδίου του TGF- $\beta$  που συνεπικουρείται από την μείωση της ντεκορίνης στον εξωκυττάριο χώρο αναιρεί την καταστολή αυτή επιτρέποντας πάλι τα επίπεδα του μυνήματος της ντεκορίνης να αποκατασταθούν μετά από 24 ώρες υποξίας-ισχαιμίας. Η υπόθεση αυτή συμβαδίζει με αναφορές υπερέκφρασης του γονιδίου της ντεκορίνης μετά από τραυματισμό εγκεφάλου ενήλικα επίμυος (52). Η επαγωγή του γονιδίου της ντεκορίνης μπορεί στη φάση αυτή να συντελεί στην ρύθμιση πλέον της ενεργότητας του TGF- $\beta$  δεσμεύοντας τον και απομακρύνοντάς τον από τους υποδοχείς στόχους του ή μπορεί και από μόνη της να ενέχεται σε διαδικασίες επιδιόρθωσης ή νευροεκφυλισμού, χωρίς ακόμη να είναι σαφής η δράση της στην υποξική-ισχαιμική βλάβη. Είναι γνωστό ότι η ντεκορίνη αλληλεπιδρά με το νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF) (48) και ότι αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) (30,32). Η τελευταία αλληλεπίδραση κινητοποιεί το μεταβολικό μονοπάτι των MAP κινασών με τελικό στόχο την ενδογενή αύξηση της p21 ενός ισχυρού αναστολέα των εξαρτωμένων από κυκλίνες κινασών, με αποτέλεσμα το σταμάτημα της κυτταρικής ανάπτυξης και τελικώς τον κυτταρικό θάνατο (30,32).

Για να επιβεβαιωθούν οι παραπάνω υποθέσεις αξίζει μέσα στους μελλοντικούς μας στόχους να συμπεριλάβουμε τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της ντεκορίνης μετά από υποξία-ισχαιμία σε εγκεφάλους επίμυων και σε μεγαλύτερα διαστήματα από 24 ώρες. Η μελέτη αυτή θα μας δώσει πληροφορίες όσον αφορά στην χρονική πορεία έκφρασης του γονιδίου της ντεκορίνης στις συγκεκριμένες συνθήκες και πιθανόν να είναι δυνατόν ο συσχετισμός συγκεκριμένων εγκεφαλικών βλαβών και επιπέδων έκφρασης του γονιδίου. Επιπρόσθετα πειράματα που θα έχουν στόχο την απενεργοποίηση του δρόμου των MAP κινασών σε συνθήκες υποξίας-ισχαιμίας θα είναι αποφασιστικής σημασίας για την εμπλοκή της ντεκορίνης στη διαδικασία πρόκλησης εγκεφαλικών βλαβών κάτω από συνθήκες υποξίας-ισχαιμίας.

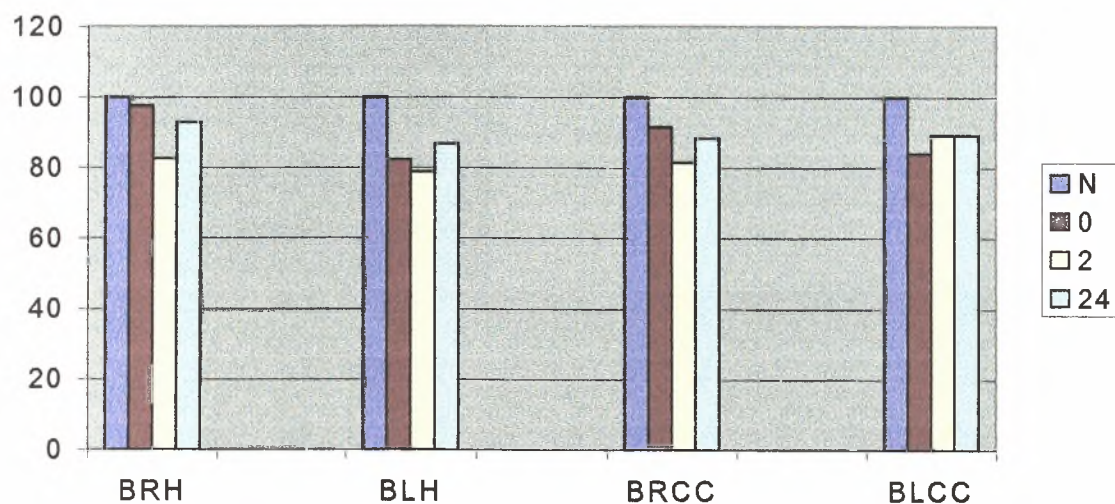
είδος ιστού		NORMAL BRH	NORMAL BRCC	NORMAL BLH	NORMAL BLCC
απόλυτη φωτεινότητα της β-ακτίνης	Γ	6385,83	8822,29	4236	4462,44
απόλυτη φωτεινότητα της ντεκορίνης	Δ	9278,28	14152,01	6893	7070,17
λόγος Δ/Γ		1,452948	1,60412	1,627243	1,584373
% του NORMAL		100	100	100	100

είδος ιστού		0BRH	0BRCC	0BLH	0BLCC
απόλυτη φωτεινότητα της β-ακτίνης	Γ	6084	6140,84	7138,55	5677,56
απόλυτη φωτεινότητα της ντεκορίνης	Δ	8624,15	9006,69	9556,08	7559,47
λόγος Δ/Γ		1,417513	1,466687	1,338658	1,331465
% του NORMAL		97,56116	91,43251	82,26544	84,03731

είδος ιστού		2BRH	2BRCC	2BLH	2BLCC
απόλυτη φωτεινότητα της β-ακτίνης	Γ	5829,38	5501,3	6243,4	6561,28
απόλυτη φωτεινότητα της ντεκορίνης	Δ	6991,95	7191,81	8006,99	9265,47
λόγος Δ/Γ		1,199433	1,307293	1,282473	1,412144
% του NORMAL		82,55166	81,49596	78,81263	89,12949

είδος ιστού		24BRH	24BRCC	24BLH	24BLCC
απόλυτη φωτεινότητα της β-ακτίνης	Γ	6092,03	5383,1	2883,64	4059,7
απόλυτη φωτεινότητα της ντεκορίνης	Δ	8211,99	7624,83	4066,8	5733,12
λόγος Δ/Γ		1,347989	1,416438	1,410301	1,412203
% του NORMAL		92,77613	88,30004	86,66813	89,13323

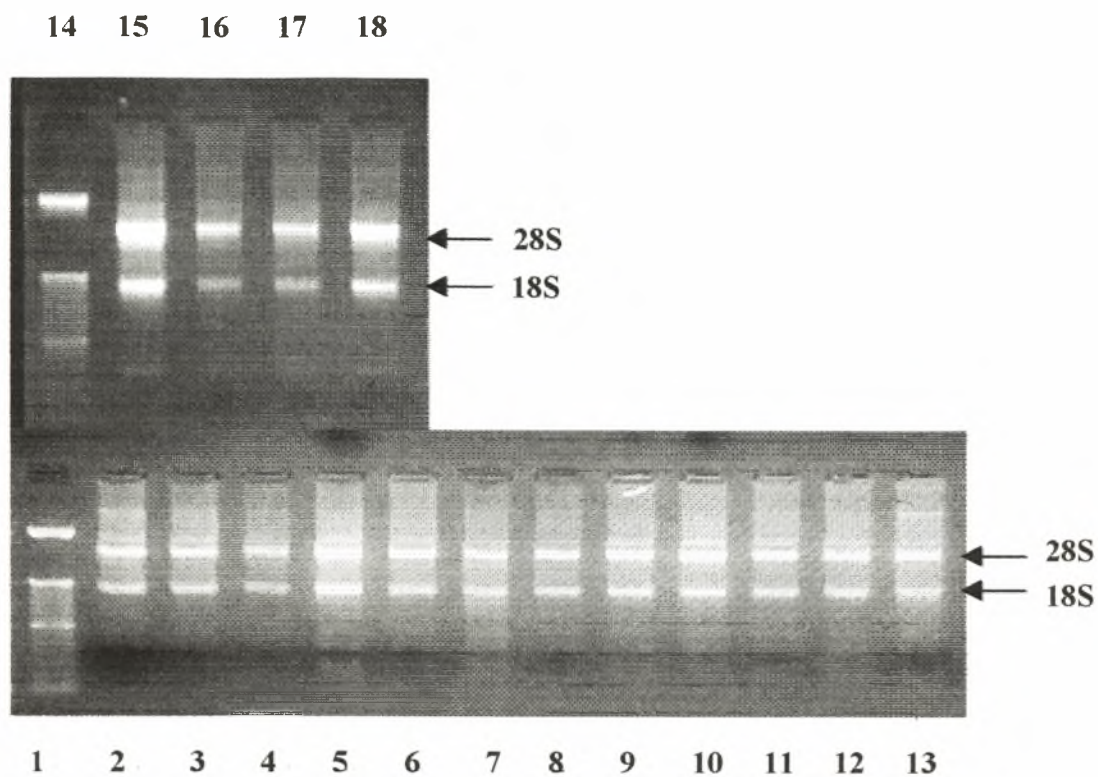
Πίνακας 5 : Τυπικό αποτέλεσμα ποσοτικής ανάλυσης των προϊόντων της PCR.



**Σχήμα 4 :** Τυπικό γράφημα ανάλυσης των προϊόντων της PCR, όπως προκύπτει από τα επεξεργασμένα αποτελέσματα του πίνακα 6. Με μώβ φαίνεται η τιμή για τα normal ζώα, με βισσινί η τιμή των 0h , με κίτρινο η τιμή των 2h , ενώ με πράσινο η τιμή των 24h.

	N	0	2	24
BRH	100	97,56116	82,55166	92,77613
BLH	100	82,26544	78,81263	86,66813
BRCC	100	91,43251	81,49596	88,30004
BLCC	100	84,03731	89,12949	89,13323

**Πίνακας 6 :** Οι τιμές του γραφήματος του σχήματος 4.



**Εικόνα 1 :** Τυπική εμφάνιση ανάλυσης RNA σε πηκτή αγαρόζης 2% σε 1XTAE.

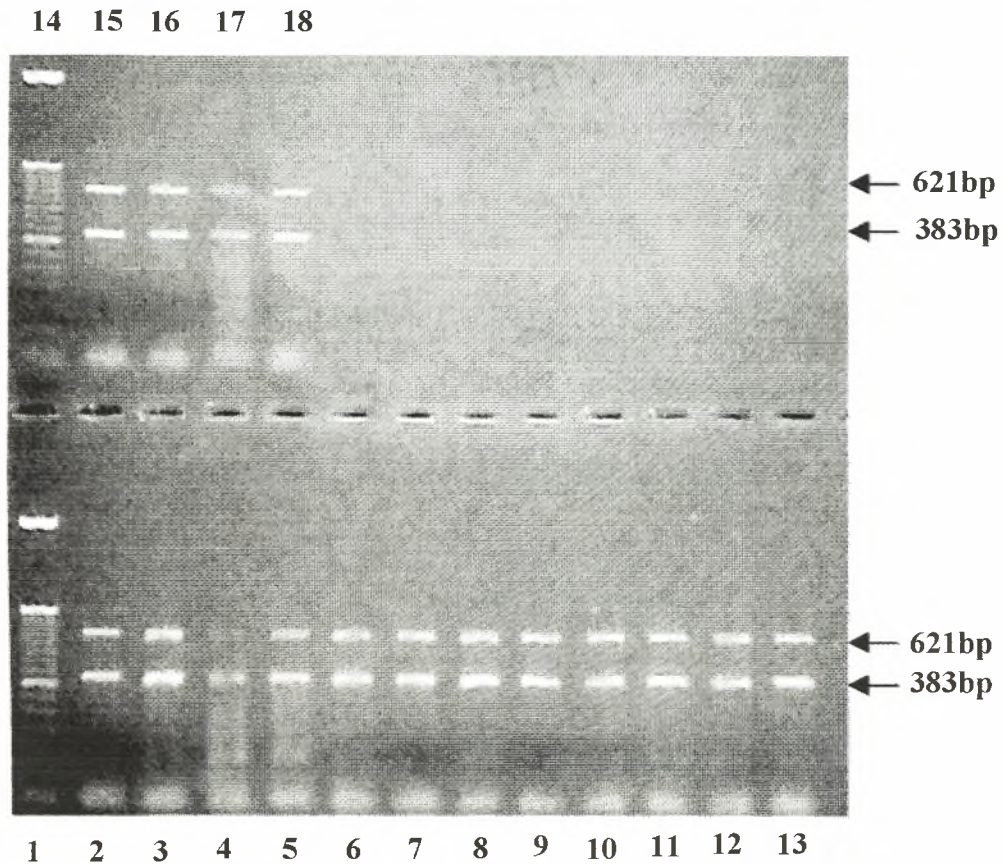
Στις διαδρομές 1&14 τρέχει ο μάρτυρας. Στις υπόλοιπες διαδρομές τρέχουν :

στις 2,3,4,5 : 2h : BRH/BLH/BRCC/BLCC

στις 6,7,8,9 : 24h : BRH/BLH/BRCC/BLCC

στις 10,11,12,13 : normal : BRH/BLH/BRCC/BLCC

στις 15,16,17,18 : 0h : BRH/BLH/BRCC/BLCC



**Εικόνα 2 :** Τυπική εμφάνιση ανάλυσης των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης 1,5% σε 1XTAE. Στις διαδρομές 1 & 14 τρέχει ο μάρτυρας. Στις υπόλοιπες διαδρομές τρέχουν :

στις 2,3,4,5 : normal : BRH/BRCC/BLH/BLCC  
 στις 6,7,8,9 : 0h : BRH/BRCC/BLH/BLCC  
 στις 10,11,12,13 : 2h : BRH/BRCC/BLH/BLCC  
 στις 15,16,17,18 : 24h : BRH/BRCC/BLH/BLCC

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Iozzo RV**. *Annu Rev Biochem* 1998;67:609-52. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. Department of Pathology, Anatomy and Cell Biology, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107-6799, USA. [iozzo@lac.jci.tju.edu](mailto:iozzo@lac.jci.tju.edu)
2. **Noonan DM, Fulle A, Valente P, Cai S, Horigan E, Sasaki M, Yamada Y, Hassell JR**. *J Biol Chem* 1991 Dec 5;266(34):22939-47. The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova, Italy.
3. **Tsen G, Halfter W, Kroger S, Cole GJ**, *J Biol Chem* 1995 Feb 17;270(7):3392-9. Agrin is a heparan sulfate proteoglycan. Neurobiotechnology Center, Ohio State University, Columbus 43210.
4. **Wu RR, Couchman JR**. *J Cell Biol* 1997 Jan 27;136(2):433-44. cDNA cloning of the basement membrane chondroitin sulfate proteoglycan core protein, bamacan: a five domain structure including coiled-coil motifs. Department of Cell Biology, University of Alabama at Birmingham, 35294-0019. USA.
5. **Iozzo RV, Danielson KG**, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1999;62:19-53. Transcriptional and posttranscriptional regulation of proteoglycan gene expression, Department of Pathology, Anatomy, and Cell Biology, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107. USA.
6. **Iozzo RV**, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1997;32(2):141-74 The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth, Department of Pathology, Anatomy and Cell Biology, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA 19107. USA.
7. **Krusius T, Ruoslahti E**, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Oct;83(20):7683-7. Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA.
8. **Fisher LW, Termine JD, Young MF**, *J Biol Chem* 1989 Mar 15;264(8):4571-6. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. Bone Research Branch, National Institute of Dental Research, Bethesda, Maryland 20892.
9. **Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegard D**, *EMBO J* 1989 Sep;8(9):2601-4. A collagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin), Department of Medical and Physiological Chemistry, Lund University, Sweden.
10. **Blochberger TC, Vergnes JP, Hempel J, Hassell JR**, *J Biol Chem* 1992 Jan 5;267(1):347-52. cDNA to chick lumican (corneal keratan sulfate proteoglycan) reveals homology to the small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine. Department of Ophthalmology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pennsylvania 15213.
11. **Funderburgh JL, Funderburgh ML, Brown SJ, Vergnes JP, Hassell JR, Mann MM, Conrad GW**, *J Biol Chem* 1993 Jun 5;268(16):11874-80. Sequence and structural implications of a bovine corneal keratan sulfate proteoglycan core protein. Protein 37B represents bovine lumican and proteins 37A and 25 are unique. Division of Biology, Kansas State University, Manhattan 66506.
12. **Corpuz LM, Funderburgh JL, Funderburgh ML, Bottomley GS, Prakash S, Conrad GW**, *J Biol Chem* 1996 Apr 19;271(16):9759-63. Molecular cloning and tissue distribution of keratan. Bovine corneal keratan sulfate proteoglycan 37A, Division of Biology, Kansas State University, Manhattan 66506-4901, USA.

13. **Bengtsson E, Neame PJ, Heinegard D, Sommarin Y.** *J Biol Chem* 1995 Oct 27;270(43):25639-44. The primary structure of a basic leucine-rich repeat protein, PRELP, found in connective tissues. Department of Cellular and Molecular Biology, Lund University, Sweden.
14. **Sommarin Y, Wendel M, Shen Z, Hellman U, Heinegard D.** *J Biol Chem* 1998 Jul 3;273(27):16723-9. Osteoadherin, a cell-binding keratan sulfate proteoglycan in bone, belongs to the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix, Department of Cellular and Molecular Biology, Section for Connective Tissue Biology, Lund University, S-221 00 Lund, Sweden. yngve.sommarin@medkem.lu.se
15. **Shinomura T, Kimata K.** *J Biol Chem* 1992 Jan 15;267(2):1265-70. Proteoglycan-Lb, a small dermatan sulfate proteoglycan expressed in embryonic chick epiphyseal cartilage, is structurally related to osteoinductive factor, Institute for Molecular Science of Medicine, Aichi Medical University, Japan.
16. **Kurita K, Shinomura T, Ujita M, Zako M, Kida D, Iwata H, Kimata K.** *Biochem J* 1996 Sep 15;318 ( Pt 3):909-14. Occurrence of PG-Lb, a leucine-rich small chondroitin/dermatan sulphate proteoglycan in mammalian epiphyseal cartilage: molecular cloning and sequence analysis of the mouse cDNA. Institute for Molecular Science of Medicine, Aichi Medical University, Japan.
17. **Johnson HJ, Rosenberg L, Choi HU, Garza S, Hook M, Neame PJ, Albert B.** *J Biol Chem* 1997 Jul 25;272(30):18709-17. Characterization of epiphycan, a small proteoglycan with a leucine-rich repeat core protein. Center for Extracellular Matrix Biology, Alkek Institute of Biosciences and Technology and the Department of Biochemistry and Biophysics, Texas A & M University, Houston, Texas 77030, USA.
18. **Funderburgh JL, Corpuz LM, Roth MR, Funderburgh ML, Tasheva ES, Conrad GW.** *J Biol Chem* 1997 Oct 31;272(44):28089-95. Mimecan, the 25-kDa corneal keratan sulfate proteoglycan, is a product of the gene producing osteoglycin. Division of Biology, Kansas State University, Manhattan, Kansas 66506-4901, USA.
19. **Kobe B, Deisenhofer J, Howard Hughes.** *Nature* 1993 Dec 23-30;366(6457):751-6. Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats, Medical Institute, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas 75235-9050.
20. **Weber IT, Harrison RW, Iozzo RV.** *J Biol Chem* 1996 Dec 13;271(50):31767-70. Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107, USA. Iozzo@lac.jci.tju.edu
21. **Kajava AV.** *J Mol Biol* 1998 Apr 3;277(3):519-27. Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. Swiss Institute for Experimental Cancer Research, Ch. des Boveresses 155, s/Lausanne, Epalinges, CH-1066, Switzerland. akajava@isrec-sun1.unil.ch
22. **Neame, P.J., and Kay C.J.** (1999) in *Proteoglycans : Structure, Biology and Molecular Interactions*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
23. **Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA.** *Biochem J* 1996 May 15;316 ( Pt 1):1-11. Collagen fibril formation, Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, School of Biological Sciences, University of Manchester, U.K.
24. **Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV.** *J Cell Biol* 1997 Feb 10;136(3):729-43. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility, Department of Pathology, Anatomy, and Cell Biology, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107, USA.





25. **Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, Bonadio J, Boskey A, Heegaard AM, Sommer B, Satomura K, Dominguez P, Zhao C, Kulkarni AB, Robey PG, Young MF.** *Nat Genet* 1998 Sep;20(1):78-82. Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. Craniofacial and Skeletal Diseases Branch, National Institute of Dental Research, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA.
26. **Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E.** *Biochem J* 1994 Sep 1;302 ( Pt 2):527-34. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. Cancer Research Center, La Jolla Cancer Research Foundation, CA 92037.
27. **Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E.** *Nature* 1990 Jul 19;346(6281):281-4. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. Cancer Research Center, La Jolla Cancer Research Foundation, California 92037.
28. **Santra M, Skorski T, Calabretta B, Lattime EC, Iozzo RV.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Jul 18;92(15):7016-20. De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells. Department of Pathology, Anatomy, and Cell Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA 19107, USA.
29. **De Luca A, Santra M, Baldi A, Giordano A, Iozzo RV.** *J Biol Chem* 1996 Aug 2;271(31):18961-5. Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. Kimmel Cancer Center, Department of Microbiology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107, USA.
30. **Iozzo RV, Moscatello DK, McQuillan DJ, Eichstetter I.** *J Biol Chem* 1999 Feb 19;274(8):4489-92. Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. Department of Pathology, Anatomy, and Cell Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107, USA. [iozzo@lac.jci.tju.edu](mailto:iozzo@lac.jci.tju.edu)
31. **Patel S, Santra M, McQuillan DJ, Iozzo RV, Thomas AP.** *J Biol Chem* 1998 Feb 6;273(6):3121-4. Decorin activates the epidermal growth factor receptor and elevates cytosolic Ca<sup>2+</sup> in A431 carcinoma cells. Department of Pathology, Anatomy and Cell Biology, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107, USA.
32. **Moscatello DK, Santra M, Mann DM, McQuillan DJ, Wong AJ, Iozzo RV.** *J Clin Invest* 1998 Jan 15;101(2):406-12. Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. Department of Microbiology and Immunology, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107, USA.
33. **Santra M, Mann DM, Mercer EW, Skorski T, Calabretta B, Iozzo RV.** *J Clin Invest* 1997 Jul 1;100(1):149-57. Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. Department of Pathology, Anatomy and Cell Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107, USA.
34. **Danielson KG, Fazio A, Cohen I, Cannizzaro LA, Eichstetter I, Iozzo RV.** *Genomics* 1993 Jan;15(1):146-60. The human decorin gene: intron-exon organization, discovery of two alternatively spliced exons in the 5' untranslated region, and mapping of the gene to chromosome 12q23. Department of Pathology and Cell Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107.
35. **McBride, O. W., Fisher, L. W., Young, M. F.** *Genomics* 6: 219-255, 1990. PubMed ID : 1968422, Localization of PGI (biglycan, BGN) and PGII (decorin, DCN, PG-40) genes on human chromosomes Xq13-qter and 12q, respectively.
36. **Pulkkinen, L.; Alitalo, T.; Krusius, T.; Peltonen, L.** *Cytogenet. Cell Genet.* 60: 107-111, 1992. PubMed ID : 1611907, Expression of decorin in human tissues and cell lines and defined chromosomal assignment of the gene locus (DCN).

37. **Ion, A.; Crosby, A. H.; Kremer, H.; Kenmochi, N.; Van Reen, M.; Fenske, C.; Van Der Burgt, I.; Brunner, H. G.; Montgomery, K. J.** *Med. Genet.* 37: 884-886, 2000. PubMed ID : 11185075  
Detailed mapping, mutation analysis, and intragenic polymorphism identification in candidate Noonansyndrome genes MYL2, DCN, EPS8, and RPL6.
38. **Scholzen, T.; Solorsh, M.; Suzuki, S.; Reiter, R.; Morgan, J. L.; Buchberg, A. M.; Siracusa, L. D.; Iozzo, R. V.** : The murine decorin: complete cDNA cloning, genomic organization, chromosomal assignment, and expression during organogenesis and tissue differentiation. *J. Biol. Chem.* 269: 28270-28281, 1994.
39. **Vannucci RC. Division of Pediatric Neurology, Milton S. Hershey,** *Pediatr Res* 1990 Apr;27 (4 Pt 1):317-26. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. Medical Center, Pennsylvania State University, Hershey 17033.
40. **Painter MJ.** *Semin Pediatr Neurol* 1995 Mar;2(1):37-56. Animal models of perinatal asphyxia: contributions, contradictions, clinical relevance, Division of Child Neurology, Children's Hospital of Pittsburgh, PA 15213, USA.
41. **Vannucci RC.,** *Pediatr Ann* 1978 Dec;7(12):15-31, Neurologic aspects of perinatal asphyxia.
42. **Walton M, Connor B, Lawlor P, Young D, Sirimanne E, Gluckman P, Cole G, Dragunow M** *Brain Res Brain Res Rev* 1999 Apr;29(2-3):137-68 Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Science, University of Auckland, Auckland, New Zealand.
43. **Ganat Y, Soni S, Chacon M, Schwartz ML, Vaccarino FM,** *Neuroscience* 2002;112(4):977-91 Chronic hypoxia up-regulates fibroblast growth factor ligands in the perinatal brain and induces fibroblast growth factor-responsive radial glial cells in the sub-ependymal zone. Child Study Center, Yale University, 230 South Frontage Road, 06520, New Haven, CT, USA
44. **Ferrer I, Pozas E, Lopez E, Ballabriga J.** *Acta Neuropathol (Berl)* 1997 Dec;94(6):583-9. Bcl-2, Bax and Bcl-x expression following hypoxia-ischemia in the infant rat brain, Department de Biologia Cel·lular i Anatomia Patologica, Universitat de Barcelona, Spain.
45. **Gurd JW, Bissoon N, Nguyen TH, Lombroso PJ, Rider CC, Beesley PW, Vannucci SJ** *J Neurochem* 1999 Nov;73(5):1990-4 Hypoxia-ischemia in perinatal rat brain induces the formation of a low molecular weight isoform of striatal enriched tyrosine phosphatase (STEP), Division of Life Sciences, University of Toronto at Scarborough, Ontario, Canada.
46. **Yamakawa H, Banno Y, Nakashima S, Yoshimura S, Sawada M, Nishimura Y, Nozawa Y, Sakai N.** *Neurol Res* 2001 Jul;23(5):522-30. Crucial role of calpain in hypoxic PC12 cell death: calpain, but not caspases, mediates degradation of cytoskeletal proteins and protein kinase C- $\alpha$  and  $\delta$ . Department of Neurosurgery, Gifu University School of Medicine, Tsukasamachi-40, Gifu 500-8705, Japan. haraki-y@cc.gifu-u.ac.jp
47. **Sharp FR, Bergeron M, Bernaudin M.** *Adv Exp Med Biol* 2001;502:273-91. Hypoxia-inducible factor in brain, Department of Neurology, University of Cincinnati, OH, USA.
48. **Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E,** *Biochem J* 1994 Sep 1;302 ( Pt 2):527-34, Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta, Cancer Research Center, La Jolla Cancer Research Foundation, CA 92037.
49. **Klempt ND, Sirimanne E, Gunn AJ, Klempt M, Singh K, Williams C, Gluckman PD,** *Brain Res Mol Brain Res* 1992 Mar;13(1-2):93-101, Hypoxia-ischemia induces transforming growth factor beta 1 mRNA in the infant rat brain, Department of Paediatrics, University of Auckland, New Zealand.
50. **Silver IA, Erecinska M.J,** *Gen Physiol* 1990 May;95(5):837-66, Intracellular and extracellular changes of [Ca<sup>2+</sup>] in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo, Department of Pathology, University of Bristol, U.K.

51. **Sambrook, Fritsch, Maniatis** : Molecular cloning, a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
52. **Stichel CC, Kappler J, Junghans U, Koops A, Kresse H, Muller HW**. Brain Res 1995 Dec 18;704(2):263-74. Differential expression of the small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans decorin and biglycan after injury of the adult rat brain. Department of Neurology, University of Dusseldorf, Germany.
53. **Kappler J, Stichel CC, Gleichmann M, Gillen C, Junghans U, Kresse H, Muller HW**, Brain Res 1998 May 18;793(1-2):328-32 Developmental regulation of decorin expression in postnatal rat brain. Labor fur molekulare Neurobiologie, Neurologische Klinik der Heinrich-Heine-Universitat Dusseldorf, Moorenstrasse 5. D-40225 Dusseldorf, Germany.
54. **Iozzo RV**, J Biol Chem 1999 Jul 2;274(27):18843-6. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. Department of Pathology, Anatomy, and Cell Biology and the Kimmel Cancer Center. Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107, USA. [iozzo@lac.jci.tju.edu](mailto:iozzo@lac.jci.tju.edu)
55. **da Cunha A, Jefferson JA, Jackson RW, Vitkovic L.**, J Neuroimmunol 1993 Jan;42(1):71-85 Glial cell-specific mechanisms of TGF-beta 1 induction by IL-1 in cerebral cortex. Laboratory of Immunoregulation, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD.
56. **O'Brien MF, Lenke LG, Lou J, Bridwell KH, Joyce ME**, Spine 1994 Oct 15;19(20):2321-9: discussion 2330 Astrocyte response and transforming growth factor-beta localization in acute spinal cord injury. Department of Orthopaedic Surgery, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri.
57. **da Cunha A, Jefferson JJ, Tyor WR, Glass JD, Jannotta FS, Vitkovic L**, Brain Res 1993 Dec 17;631(1):39-45. Control of astrogliosis by interleukin-1 and transforming growth factor-beta in human brain. Laboratory of Immunoregulation, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (NIH). Bethesda, MD 20892.
58. **Knuckey NW, Finch P, Palm DE, Primiano MJ, Johanson CE, Flanders KC, Thompson NL**. Brain Res Mol Brain Res 1996 Aug;40(1):1-14. Differential neuronal and astrocytic expression of transforming growth factor-beta isoforms in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. Department of Neurosurgery, Sir Charles Gairdner Hospital, Perth, W.A., Australia.
59. **Laping NJ, Morgan TE, Nichols NR, Rozovsky I, Young-Chan CS, Zarow C, Finch CE** Neuroscience 1994 Feb;58(3):563-72 Transforming growth factor-beta 1 induces neuronal and astrocyte genes: tubulin alpha 1, glial fibrillary acidic protein and clusterin, Andrus Gerontology Center, University of Southern California. Los Angeles 90089-0191.
60. **Morgan TE, Laping NJ, Rozovsky I, Oda T, Hogan TH, Finch CE, Pasinetti GM** J Neuroimmunol 1995 Apr;58(1):101-10. Clusterin expression by astrocytes is influenced by transforming growth factor-beta 1 and heterotypic cell interactions. Andrus Gerontology Center, University of Southern California. Los Angeles 90089-0191, USA.
61. **Lindholm D, Hengerer B, Zafra F, Thoenen H**, Neuroreport 1990 Sep;1(1):9-12 Transforming growth factor-beta 1 stimulates expression of nerve growth factor in the rat CNS. Department of Neurochemistry, Max-Planck-Institute for Psychiatry, Planegg-Martinsried, FRG.
62. **Benveniste EN, Kwon J, Chung WJ, Sampson J, Pandya K, Tang LP**, J Immunol 1994 Dec 1;153(11):5210-21, Erratum in: J Immunol 1995 Feb 1;154(3):1521, Differential modulation of astrocyte cytokine gene expression by TGF-beta. Department of Cell Biology, University of Alabama at Birmingham 35294.

63. **Mauviel A, Korang K, Santra M, Tewari D, Uitto J, Iozzo RV**, *J Biol Chem* 1996 Oct 4;271(40):24824-9, Identification of a bimodal regulatory element encompassing a canonical AP-1 binding site in the proximal promoter region of the human decorin gene. Department of Dermatology and Cutaneous Biology, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107, USA.
64. **Heino J, Kahari VM, Mauviel A, Krusius T**, *Biochem J* 1988 May 15;252(1):309-12 Human recombinant interleukin-1 regulates cellular mRNA levels of dermatansulphate proteoglycan core protein. Department of Medical Biochemistry, University of Turku, Finland.
65. **Iozzo RV, Cohen I**, *Experientia* 1993 May 15;49(5):447-55, Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma. Department of Pathology and Cell Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107.
66. **Wegrowski Y, Paltot V, Gillery P, Kalis B, Randoux A, Maquart FX**, *Biochem J* 1995 May 1;307 ( Pt 3):673-8 Stimulation of sulphated glycosaminoglycan and decorin production in adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin-4. Laboratoire de Biochimie (CNRS ER 084), Faculte de Medecine. France.
67. **Mauviel A, Santra M, Chen YQ, Uitto J, Iozzo RV**, *J Biol Chem* 1995 May 12;270(19):11692-700 Transcriptional regulation of decorin gene expression. Induction by quiescence and repression by tumor necrosis factor-alpha. Department of Dermatology, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107, USA.
68. **Benveniste EN, Tang LP, Law RM**, *Int J Dev Neurosci* 1995 Jun-Jul;13(3-4):341-9. Differential regulation of astrocyte TNF-alpha expression by the cytokines TGF-beta, IL-6 and IL-10. Department of Cell Biology, University of Alabama at Birmingham 35294-0005, USA.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Τηλ.: 74.760-61 ΛΑΡΙΣΑ

2410-565077  
565078



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057242