

**εγκέφαλος: από τα κύτταρα στη συμπεριφορά**

**Θεσσαλονίκη**

**30 Νοεμβρίου-1 Δεκεμβρίου 2007**

**Διοργάνωση:**

*Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*

*Ελληνική Εταιρεία για τις Νευροεπιστήμες*

## **ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Γ.Χ. Παπαδόπουλος, καθηγητής (πρόεδρος)

Μ. Αλμπάνη, αν. καθηγήτρια

Ι. Αντωνόπουλος, αν. καθηγητής

Ι. Δωρή, επ. καθηγήτρια

Γ. Θεοφυλλίδης, καθηγητής

Δ. Καπουκρανίδου, λέκτορας

Α. Καράβατος, καθηγητής

Μ. Κοσμίδου, επ. καθηγήτρια

Ε. Μιχαλούδη, αν. καθηγήτρια

Λ. Τριάρχου, καθηγητής

Κ. Τσαπκίνη, λέκτορας

Α. Τσινγκοτζίδου, λέκτορας

Α. Τσιφτσόγλου, καθηγητής

## **ORGANIZING COMMITTEE**

G.C. Papadopoulos, professor (chairman)

M. Albani, assoc. professor

I. Antonopoulos, assoc. professor

I. Dori, assist. professor

D. Kapoukranidou, lecturer

A. Karavatos, professor

M. Kosmidis, assist. professor

H. Michaloudi, assoc. professor

G. Theophilidis, professor

L. Triatchou, professor

K. Tsapkini, lecturer

A. Tsiftoglou, professor

A. Tsingotjidou, lecturer

*«Χειρὶς χειρὸς ἡ ἀίγλη, χειρὶς χειρὸς ὁ οὐρανός».*

Μιχάλης Γιαννάς



## **καλωσόρισμα**

Αγαπητοί συνάδελφοι,

Τα μέλη της οργανωτικής επιτροπής σας υποδέχονται στη Θεσσαλονίκη με τη βάσιμη ελπίδα ότι θα ανταποκριθούμε στην ευκαιρία ενός δημιουργικού διαλόγου.

Από τη θέση αυτή είμαι υποχρεωμένος να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στην οργάνωση του συνεδρίου, αλλά ιδιαίτερα του νέους Έλληνες νευροεπιστήμονες, το πιο δυναμικό κομμάτι της ελπίδας μας, για την εντυπωσιακή συμμετοχή τους στο πρόγραμμα του συνεδρίου.

Καθηγητής Γ. Χ. Παπαδόπουλος

## **welcome**

Dear colleagues,

The members of the organizing committee welcome you in Thessaloniki with the sound hope that we will meet the challenge of a creative dialogue.

It is my pleasure to thank those who have contributed to the organization of the meeting, but especially the young Greek neuroscientists, the most dynamic part of our hope, for their impressive participation in the program of the meeting.

Professor G. C. Papadopoulos



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ – CONTENTS

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΟΜΙΛΙΩΝ-LECTURE ABSTRACTS</b> .....	27
<b>THE ROLE OF NEURAL PRECURSOR CELLS IN CNS AUTOIMMUNITY AND DEGENERATION</b> .....	28
<i>N. Grigoriadis</i>	
<b>Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ</b> .....	29
<i>N. Γρηγοριάδης</i>	
<b>THE POTENTIAL USE OF STEM CELLS IN NEUROSCIENCE</b> .....	30
<i>D. Karussis</i>	
<b>Η ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΙΣ ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΕΣ</b> .....	31
<i>Δ. Καρούσης</i>	
<b>THE ROLE OF THE EXTRACELLULAR MATRIX IN THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF THE SUBVENTRICULAR ZONE NEUROGENIC NICHE OF THE ADULT MOUSE BRAIN. THE EXAMPLE OF TENASCIN-C</b> .....	32
<i>I. Kazanis, A. Belhadi, A. Faissner and C. ffrench-Constant</i>	
<b>Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΞΟΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΥΠΟΚΟΙΛΙΑΚΗΣ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΣΤΟΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΤΟΥ ΕΝΗΛΙΚΟΥ ΜΥΟΣ. ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΗΣ TENASCIN-C</b> .....	33
<i>H. Καζάνης, A. Belhadi, A. Faissner και C. ffrench-Constant</i>	
<b>PROTEOLYSIS INHIBITION AS MEANS OF NEURONAL CELL SURVIVAL IN DIFFERENT STRESSFUL CONDITIONS SUCH AS HYPOXIA AND CHEMICALLY INDUCED EXCITOTOXICITY</b> .....	34
<i>A. Kritis</i>	
<b>Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ ΩΣ ΜΕΣΟ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΤΡΕΣΣΟΓΟΝΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΟΠΩΣ ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΑ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΔΙΕΓΕΡΙΣΜΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ</b> .....	35
<i>A. Κριτής</i>	



ELUCIDATING THE STRUCTURE AND FUNCTION OF G-PROTEIN COUPLED RECEPTORS .....	36
<i>G. Liapakis</i>	
ΔΙΑΣΑΦΗΝΙΖΟΝΤΑΣ ΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΠΟΥ ΣΥΖΕΥΓΝΥΝΤΑΙ ΜΕ ΤΙΣ G-ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ .....	37
<i>Γ. Διαπάκης</i>	
NEUROIMAGING AND THE QUEST FOR BRAIN SIGNS OF CONSCIOUSNESS .....	38
<i>A. C. Paranicolaou</i>	
FUNCTIONAL ORGANIZATION OF THE PREFRONTAL CORTEX FOR MNEMONIC PROCESSING .....	39
<i>M. Petrides</i>	
TOWARD A VISUAL PROSTHESIS BASED ON THALAMIC MICROSTIMULATION .....	40
<i>J. S. Pezaris</i>	
MENTAL SIMULATION OF ACTION IN THE SERVICE OF ACTION PERCEPTION .....	42
<i>V. Raos</i>	
Η ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΜΙΑΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΠΡΑΞΗΣ ΒΑΣΙΖΕΤΑΙ ΣΤΗ ΝΟΕΡΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΤΗΣ .....	43
<i>B. Ράος</i>	
GENERATION AND MAINTENANCE OF MESODIENCEPHALIC DOPAMINERGIC NEURONS .....	44
<i>M. P. Smidt</i>	
DISTINCT ROLES OF RGS9 AND RGS4 IN OPIATE ACTIONS .....	45
<i>D. Terzi, M. M. Papahatzaki, K. Psifogeorgou, Z.Rahman, R. Ring, M. H. Han, E. J. Nestler and V. Zachariou</i>	
MECHANISMS OF AXONAL ELONGATION DURING REGENERATION OF ADULT RETINAL AXONS .....	46
<i>S. Thanos</i>	
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ – POSTER ABSTRACTS .....</b>	<b>47</b>
DECOMPOSITION OF RECORDED COMPOUND ACTION POTENTIAL: AXON DIAMETER AND CONDUCTION VELOCITY DISTRIBUTION .....	48
<i>D. A. Adamos, A. Kagiava, E. K. Kosmidis and G. Theophilidis</i>	
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΘΕΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΔΡΑΣΗΣ: ΚΑΤΑΝΟΜΕΣ ΔΙΑΜΕΤΡΩΝ ΚΑΙ ΤΑΧΥΤΗΤΩΝ ΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ ΑΞΟΝΩΝ .....	49
<i>Δ. Α. Αδάμος, Α. Καγιαβά, Ε. Κ. Κοσμίδης και Γ. Θεοφιλίδης</i>	

A NOVEL APPROACH TO SEMI-AUTOMATED SPIKE-SORTING BASED ON ISOMAP TECHNIQUE .....	50
<i>D. A. Adamos, E. K. Kosmidis, G. Theophilidis and N. Laskaris</i>	
ΜΙΑ ΝΕΑ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΗΜΙ-ΑΥΤΟΜΑΤΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ SPIKE-SORTING, ΒΑΣΙΣΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ISOMAP .....	51
<i>Δ. Α. Αδάμος, Ε. Κ. Κοσμίδης, Γ. Θεοφιλίδης και Ν. Λάσκαρης</i>	
HYPOTHYROIDISM-INDUCED PROGRAMMED CELL DEATH IN FOREBRAIN STRUCTURES OF THE ADULT RAT .....	52
<i>A. A. Ahmed, T. Zacharaki, C. Constantinou, M. Margarity, I. Dori, A. Dinopoulos and J. Antonopoulos</i>	
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ ΣΕ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΘΙΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ ΜΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΣ ΠΡΟΚΛΗΘΕΝΤΑ ΥΠΟΘΥΡΕΟΕΙΔΙΣΜΟ .....	53
<i>A. A. Ahmed, Θ. Ζαχαράκη, Κ. Κωνσταντίνου, Μ. Μαργαρίτη, Ι. Δωρή, Α. Ντινόπουλος και Ι. Αντωνόπουλος</i>	
QUANTITATIVE MAPPING OF ALPHA-2A AND BETA-2 ADRENOCEPTORS IN THE ADULT ZEBRAFISH BRAIN .....	54
<i>K. Ampatzis, M. Kentouri, and C.R. Dermon</i>	
ΠΡΟΤΥΠΟ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΩΝ $\alpha_{2A}$ ΚΑΙ $\beta_2$ ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟΝ ΕΝΗΛΙΚΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΤΟΥ ZEBRAFISH .....	55
<i>Κ. Αμπατζής, Μ. Κεντούρη, and Κ.Ρ. Δερμών</i>	
ROLE OF 5-HT <sub>2A</sub> AND 5-HT <sub>2C</sub> RECEPTORS ON REWARD .....	56
<i>K. Aratzoglou and G. Panagis</i>	
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ 5-HT <sub>2A</sub> ΚΑΙ 5-HT <sub>2C</sub> ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΤΑΜΟΙΒΗ .....	57
<i>Κ. Απαζόγλου και Γ. Παναγή</i>	
IN VIVO ASSESSMENT OF THE ACTIVITY OF THE NICOTINIC INSECTICIDE IMIDACLOPRID ON RESPIRATORY RHYTHM OF THE RAT .....	58
<i>H. Arabatzi, C. Vasileiou, E. Kosmidis, C. Papaefthimiou and G. Theophilidis</i>	
IN VIVO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΝΙΚΟΤΙΝΙΚΟΥ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟΥ IMIDACLOPRID ΣΤΟΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΡΥΘΜΟ ΤΟΥ ΕΠΙΜΥΩΣ .....	59
<i>Η. Αραμπατζή, Χ. Βασιλείου, Χ. Κοσμίδης, Χ. Παπαευθυμίου και Γ. Θεοφιλίδης</i>	
CB1 CANNABINOID RECEPTOR AGONISTS INDUCE CB1 RECEPTOR ENRICHMENT IN LIPID RAFTS AND TRANSACTIVATION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR EGFR .....	60
<i>O. Asimaki, N. Sakellaridis and D. Mangoura</i>	

ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ CB1 ΕΠΑΓΟΥΝ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ CB1R ΣΕ ΛΙΠΙΔΙΚΕΣ ΠΛΑΤΦΟΡΜΕΣ (RAFTS) ΚΑΙ ΤΗΝ ΔΙΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (EGFR) .....	61
<i>O. Ασημάκη, N. Σακελλαρίδης και Δ. Μάγκουρα</i>	
PREVENTION OF OXALIPLATIN – RELATED NEUROTOXICITY BY GRAPE SEED EXTRACT: AN EXPERIMENTAL STUDY IN RATS .....	62
<i>C. Bekiari, D. Kouretas, C.E. Emmanouilide , C.J Emmanouilides , L. Skaltsounis and A. Tsingotjidou</i>	
ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΟΞΑΛΙΠΛΑΤΙΝΑ ΑΠΟ ΕΝΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΣΠΟΡΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ .....	63
<i>X. Μπεκιάρη, Δ. Κουρέτας, X. E. Εμμανουηλίδης, X.Ι. Εμμανουηλίδης, Α. Σκαλτσούνης και Α. Τσιγκοτζίδου</i>	
STIMULATION OF A2A ADENOSINE RECEPTORS ELICITS <i>IN VIVO</i> PHOSPHORYLATION OF DARPP-32 BUT NOT OF ERK 1/2 IN "WEAVER" MICE, A GENETIC MODEL OF DOPAMINE DEFICIENCY .....	64
<i>K. Botsakis, O. Pavlou, P. Poulou, N. Matsokis and F. Angelatou</i>	
ΔΙΕΡΓΕΣΗ ΤΩΝ A2A ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΑΔΕΝΟΣΙΝΗΣ ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΤΗΝ <i>IN VIVO</i> ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ DARPP-32 ΑΛΛΑ ΟΧΙ ΤΗΣ ERK 1/2 ΣΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΗΣ ΑΠΟΝΕΥΡΩΣΗΣ ΜΥ "WEAVER" .....	65
<i>K. Μποτσάκης, O. Παύλου, Π. Πούλου, N. Ματσώκης και Φ. Αγγελάτου</i>	
THE ROLE OF CAFFEIC ACIDE PHENETHYL ESTER (CAPE) APPLICATIONS IN THE TREATMENT OF COMPLICATIONS OF THE DIABETES IN RAT BRAIN .....	66
<i>S. Celik and S. Erdogan</i>	
DETECTION OF L-DOPA DECARBOXYLASE IN ADENOCARCINOMA CELL LINES. EFFECT OF CARBIDOPA ON CELL PROLIFERATION .....	68
<i>I. Chalatsa and D. Vassilacopoulou</i>	
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ L-DOPA ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CARBIDOPA ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ .....	69
<i>I. Χαλατσά και Δ. Βασιλακοπούλου</i>	
HIGH VERSUS LOW RESPONSE TO NOVELTY DIFFERENTIATES THE EFFECTS OF CANNABINOIDS .....	70
<i>O. Chouliara, M. Dosi, A. Polissidis, A. Galanopoulos, E.Tzavara, M. Marselos, Z. Papadopoulou-Daifoti, C. Spyraiki and K. Antoniou</i>	
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΔΥΟ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥΣ ΕΠΙΜΥΩΝ .....	71
<i>O. Χουλιάρρα, M. Δόση, A. Πολυσίδα, A. Γαλανόπουλος, E. Τζαβάρα, M. Μαρσέλος, Z. Παπαδοπούλου – Νταϊφώτη, X. Σπυράκη και K. Αντωνίου</i>	

NEONATAL NOVELTY EXPOSURE CAN MODULATE ADULT BEHAVIOR AND BASAL CORTICOSTERONE SECRETION IN RATS .....	72
<i>N. Daskalakis, S. Bezati, M. Kaperon, K. Anastasopoulos, D. Jezova and E. Kitraki</i>	
ΝΕΟΓΝΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ ΕΠΙΜΥΩΝ ΣΕ ΝΕΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙ ΤΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥΣ ΚΑΙ ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΝΗΛΙΚΟ ΖΩΗ .....	73
<i>N. Δασκαλάκης, Σ. Μπεζάτη, Μ. Καπερώνη, Κ. Αναστασόπουλος, D. Jezova και E. Κιτράκη</i>	
FRANÇOIS-VINCENT RASPAIL (1794–1878): REVOLUTIONARY IN FRENCH POLITICS AND FATHER OF HISTOCHEMISTRY .....	74
<i>M. del Cerro and L.C. Triarhou</i>	
FRANÇOIS-VINCENT RASPAIL (1794–1878): ΕΠΑΝΑΣΤΑΤΗΣ ΤΗΣ ΓΑΛΛΙΚΗΣ ΠΟΛΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΠΑΤΕΡΑΣ ΤΗΣ ΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ .....	75
<i>M. del Cerro και Α. Τριάρχου</i>	
AREAS OF THE RAT BRAIN ACTIVATED FOLLOWING LEARNING OF A T-MAZE USING THE MOTHER AS A REINFORCING OR A FRUSTRATIVE STIMULUS .....	76
<i>A. Diamantopoulou, A. Stamatakis, T. Panagiotaropoulos, E. Karantoni and F. Stylianopoulou</i>	
ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΝΕΟΓΝΙΚΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΤΟΥ ΕΠΙΜΥ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΜΑΘΗΣΗ ΕΝΟΣ ΛΑΒΥΡΙΝΘΟΥ Τ ΜΕ ΤΗ ΜΗΤΕΡΑ ΩΣ ΑΝΤΑΜΟΙΒΗ Ή ΜΑΤΑΙΩΣΗ .....	77
<i>Α. Διαμαντοπούλου, Α. Σταματάκης, Θ. Παναγιωταρόπουλος, Ε. Καραντώνη και Φ. Στυλιανοπούλου</i>	
MICRORNA-21 PROMOTES NEURITE OUTGROWTH OF HIPPOCAMPAL NEURONS AND NGF-SUPPORTED PC12 CELLS .....	78
<i>E. Doxakis, G. Vallianatos and D. Mangoura</i>	
ΤΟ MICRORNA-21 ΠΡΟΩΘΕΙ ΤΗ ΝΕΥΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΕ ΝΕΥΡΩΝΕΣ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΚΑΙ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ PC12 .....	79
<i>Ε. Δοζάκης, Γ. Βαλλιανάτος και Δ. Μάγκουρα</i>	
EFFECTS OF SECRETED $\alpha$ -SYNUCLEIN SPECIES ON NEURONAL CELL VIABILITY .....	80
<i>E. Emmanouilidou, L. Stefanis and K. Vekrellis</i>	
ΟΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ $\alpha$ -ΣΥΝΟΥΚΛΕΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	81
<i>Ε. Εμμανουηλίδου, Α. Στεφανής και Κ. Βεκρέλλης</i>	
ROLE OF WILD TYPE PKC-E IN NEURONAL INDUCTION OF EMBRYONIC STEM CELLS AND EMBRYONIC HIPPOCAMPAL NEURONS .....	82
<i>A. Florakis, N. Sakellaridis and D. Mangoura</i>	

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ PKC-Ε ΣΤΗ ΝΕΥΡΟΝΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ .....	83
<i>A. Φλωράκης, Ν. Σακελλαρίδης, και Δ. Μάγκουρα</i>	
ANALYSIS OF THE ACTIVITY OF THE NEUROGENIC PROTEIN NEURALIZED IN LONG TERM MEMORY FORMATION .....	84
<i>M.I. Franco, M.Anezaki and E.X. Skoulakis</i>	
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ NEURALIZED ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΗΣ ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑΣ ΜΝΗΜΗΣ .....	85
<i>M.I. Franco, M. Ανεζάκη και Ε. Χ. Σκουλάκης</i>	
LOCOMOTOR BEHAVIOR OF DROSOPHILA MELANOGASTER DURING AGING .....	86
<i>A. Gaitanidis, H. Hala and C. Consoulas</i>	
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΤΗΣ DROSOPHILA MELANOGASTER ΚΑΤΑ ΤΗ ΓΗΡΑΝΣΗ .....	87
<i>A. Γαϊτανίδης, Χ. Χάλα και Χ. Κόνσουλας</i>	
AGE-DEPENDENT CHANGES IN THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF TWO MOTOR CIRCUITS IN DROSOPHILA .....	88
<i>A. Gaitanidis and C. Consoulas</i>	
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΔΥΟ ΝΕΥΡΩΝΙΚΩΝ ΚΥΚΛΩΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ DROSOPHILA MELANOGASTER ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΓΗΡΑΝΣΗ .....	89
<i>A. Γαϊτανίδης και Χ. Κόνσουλας</i>	
EFFECTS OF VISUAL DEPRIVATION ON NMDAR2B RECEPTOR SUBUNIT PHOSPHORYLATION IN THE RAT VISUAL CORTEX .....	90
<i>S. Galtsidis, P. Zeitouyan, E. D. Kouvelas, P. Giompres and A. Mitsacos</i>	
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΑΠΟΣΤΕΡΗΣΗΣ ΣΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ NR2B ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ NMDA ΣΤΟΝ ΟΠΤΙΚΟ ΦΛΟΙΟ ΕΠΙΜΥΟΣ .....	91
<i>Σ. Γαλτσιδής, Π. Ζεϊτουγιάν, Η. Κούβελας, Π. Γιομπρές και Α. Μητσάκου</i>	
TYROSINE HYDROXYLASE IN NEUROSECRETORY NEURONS IN THE HUMAN NEONATE: THE EFFECT OF PERINATAL HYPOXIA .....	92
<i>V. Ganou, M. Pagida, A. Konstantinidou, E. Tsekoura, D. Kontostavlaki, E. Patsouris and M. Panayotacopoulou</i>	
ΥΔΡΟΞΥΛΑΣΗ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ ΣΤΑ ΝΕΥΡΟΕΚΡΙΤΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΝΕΟΓΝΟΥ: Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ .....	93
<i>B. Γάνου, Μ. Παγίδα, Α. Κωνσταντινίδου, Ε. Τσεκούρα, Δ. Κοντοσταυλάκη, Ε. Πατσούρης και Μ. Παναγιωτακοπούλου</i>	

PLASTICITY OF ADULT RAT BASAL GANGLIA NEURONS MODULATED BY ADENOASSOCIATED VIRAL GENE DELIVERY OF NGF AND TRKA .....	94
<i>D. Giannakopoulou, V. Daguin-Nerriere, P. Brachet, E.D. Kouvelas, A. Mitsacos, P. Giompres</i>	
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΩΡΙΜΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΩΝ ΒΑΣΙΚΩΝ ΓΑΓΓΛΙΩΝ ΕΠΙΜΥΟΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ TRKA ΚΑΙ NGF ΜΕΣΩ ΑΔΕΝΟΙΩΝ .....	95
<i>Δ. Γιαννακοπούλου, V. Daguin-Nerriere, P. Brachet, Η.Δ. Κούβελας, Α. Μητσάκου, Π. Γιομπρές</i>	
COMPREHENSION OF SARCASM, METAPHOR AND HINTING IN SCHIZOPHRENIA .....	96
<i>M. Giannakou, M.H. Kosmidis, V.P. Bozikas, G. Garyfallos and K. Fokas</i>	
ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΗΣ ΕΙΡΩΝΕΙΑΣ, ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΠΑΙΝΙΓΜΩΝ ΣΤΗ ΣΧΙΖΟΦΡΕΝΕΙΑ .....	97
<i>Μ. Γιαννακού, Μ.Ε. Κοσμίδου, Β.Π. Μποζίκας, Γ. Γαρυφαλλός και Κ. Φωκάς</i>	
L-DOPA DECARBOXYLASE (DDC) INTERACTION WITH AMYLOID PRECURSOR PROTEIN (APP) AND Αβ PEPTIDE .....	98
<i>P. Gkogkosi, A. Vassiliou and D. Vassilacopoulou</i>	
Η L- DOPA ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗ (DDC) ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΔΡΟΜΟ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ (APP) ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ Αβ .....	99
<i>Π. Γκογκόση, Α. Βασιλείου, Δ. Βασιλακοπούλου</i>	
THREE CYSTEINE RESIDUES IN THE MEMBRANE-SPANNING DOMAINS OF TYPE 1 CORTICOTROPIN RELEASING FACTOR RECEPTOR ARE EXPOSED IN THE BINDING-SITE CREVICE OF RECEPTOR .....	100
<i>K. Gkountelias, G. Kokologianakis, M. Papadokostaki and G. Liapakis</i>	
ΤΡΕΙΣ ΚΥΣΤΕΙΝΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ 1 ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ ΕΚΛΥΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ ΕΝΤΟΠΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΗΣ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΙΣ ΘΕΣΕΙΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ .....	101
<i>Κ. Γκουντέλιας, Γ. Κοκολογιαννάκης, Μ. Παπαδοκωστάκη και Γ. Λιαπάκης</i>	
ALANINE SCANNING MUTAGENESIS OF THE SECOND EXTRACELLULAR LOOP OF TYPE 1 CORTICOTROPIN RELEASING FACTOR RECEPTOR REVEALED RESIDUES THAT ARE CRITICAL FOR PEPTIDE BINDING .....	102
<i>K. Gkountelias, J. Koltsaki, M. Papadokostaki and G. Liapakis</i>	
ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΒΡΟΓΧΟΥ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ 1 ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ ΕΚΛΥΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΕΙ ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΜΕ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ ΡΟΛΟ ΣΤΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ .....	103

*K. Γκουντέλιας, I. Κολτσάκη, M. Παπαδοκωστάκη και Γ. Λιαπάκης*

THE ROLE OF CaMKII MUTATIONS IN THE FUNCTION OF THE  
GIANT FIBER SYSTEM .....104

*D. Kadas, A. Tzortzopoulos, E. M. C. Skoulakis and C. Consoulas*

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ CaMKII ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ  
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΓΙΓΑΝΤΙΑΙΩΝ ΝΕΥΡΑΞΟΝΩΝ .....105

*Δ. Καδάς, Α. Τζορτζόπουλος, Ε. Σκουλάκης και Χ. Κόνσουλας*

MATURATION OF ESCAPE-REFLEX (GIANT FIBER SYSTEM) AND  
FLIGHT CENTRAL PATTERN GENERATOR  
CIRCUITS IN DROSOPHILA .....106

*D. Kadas and C. Consoulas*

ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΚΥΚΛΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΑΝΤΑΝΑΚΛΑΣΤΙΚΟΥ  
ΔΙΑΦΥΓΗΣ (ΣΥΣΤΗΜΑ ΓΙΓΑΝΤΙΑΙΩΝ ΝΕΥΡΑΞΟΝΩΝ) ΚΑΙ ΤΟΥ  
ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΡΥΘΜΙΚΗΣ ΝΕΥΡΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ  
ΠΤΗΣΗΣ ΣΤΗ DROSOPHILA .....107

*Δ. Καδάς και Χ. Κόνσουλας*

OXALIPLATIN: AN ANTICANCER DRUG INDUCING SEVERE  
NEUROPATHY BY AFFECTING THE VOLTAGE-GATED  
POTASSIUM CHANNELS IN THE NERVE FIBERS OF  
THE PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM .....108

*A. Kagiava, A. Tsingotjidou, C. Emmanouilides and G. Theophilidis*

ΘΞΑΛΙΠΛΑΤΙΝΑ: ΕΝΑ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙ  
ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑ ΕΠΙΔΡΩΝΤΑΣ ΣΤΑ ΚΑΝΑΛΙΑ ΚΑΛΙΟΥ ΤΩΝ  
ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΙΝΩΝ ΤΟΥ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ .....109

*Α. Καγιαβά, Α. Τσιγκοτζίδου, Χ. Εμμανουηλίδης και Γ. Θεοφιλίδης*

MODELLING COGNITIVE AND ACTIVITY DEFICITS OF FRAGILE  
X SYNDROME IN DROSOPHILA .....110

*A. K. Kanellououlos and E. M. C. Skoulakis*

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΝΩΣΙΑΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ  
ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΕΥΘΡΑΥΣΤΟΥ  
X ΣΤΗΝ ΔΡΟΣΟΦΙΛΑ .....111

*Α.Κ. Κανελλόπουλος και Ε.Μ. Σκουλάκης*

LEARNING UNDER THE INFLUENCE OF ETHANOL .....112

*A. K. Kanellououlos, E Sideri and E. M. C. Skoulakis*

ΜΑΘΗΣΗ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ .....113

*A. K. Κανελλόπουλος, Ε. Σιδέρη και Ε. Μ. Σκουλάκης*

FIBER TYPE I MAPPING IN 21 DAYS OLD RAT TIBIALIS  
ANTERIOR MUSCLE .....114

*D. Karoukranidou, I. P. Kalpidis and M. Albani*

ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΩΝ ΤΥΠΟΥ Ι ΜΥΙΚΩΝ ΙΝΩΝ ΠΡΟΣΘΙΟΥ ΚΝΗΜΙΑΙΟΥ ΜΥΟΣ ΕΠΙΜΥΟΣ ΗΛΙΚΙΑΣ 21 ΗΜΕΡΩΝ .....	115
<i>Δ. Καπουκρανίδου, Ι.Π. Καλπίδης και Μ. Αλμπάνη</i>	
CHARACTERIZATION OF RIG-6, A MEMBER OF THE CONTACTIN SUBFAMILY OF THE IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY IN <i>C. ELEGANS</i> .....	116
<i>Μ. Katidou, Ν. Tavernarakis and Δ. Karagozeos</i>	
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RIG-6, ΜΟΝΑΔΙΚΟΥ ΜΕΛΟΥΣ ΤΗΣ ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ CONTACTIN ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ ΣΤΟ <i>C.ELEGANS</i> .....	117
<i>Μ. Κατίδου, Ν. Ταβερναράκης και Δ. Καραγωγέως</i>	
FUNCTIONAL NEUROIMAGING EVIDENCE REGARDING THE ROLE OF THE RIGHT HEMISPHERE IN LANGUAGE PROCESSING .....	118
<i>Ε. Κλερουνσιότου, V.L. Gracco and G.B. Pike</i>	
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΝΕΥΡΟΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΔΕΞΙΟΥ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΟΥ ΣΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ .....	119
<i>Ε. Κλεπουσινιώτου, V.L. Gracco and G.B. Pike</i>	
K-COMPLEXES MODIFY SPINDLES DURING THE SECOND STAGE OF NON-REM HUMAN SLEEP .....	120
<i>V. Kokkinos, Α. Koupparis, Μ. Stavrinou, Ι. Ioannides and Γ. Kostopoulos</i>	
ΤΑ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΑΣ-Κ ΔΙΑΜΟΡΦΩΝΟΥΝ ΤΙΣ ΑΤΡΑΚΤΟΥΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΤΟΥ ΜΗ-REM ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΥΠΝΟΥ .....	121
<i>Β. Κόκκινος, Α. Κουππάρης, Μ. Σταυρίνου, Α. Ιωαννίδης και Γ. Κωστόπουλος</i>	
THE ROLE OF DOPAMINERGIC NEUROTRANSMISSION AND HYPOTHALAMIC OXYTOCIN LEVELS IN RELATION TO THE FUNCTION OF THE REWARD SYSTEM IN THE RAT .....	122
<i>Α.Μ. Κολλία, Α. Stamatakis and Φ. Stylianopoulou</i>	
ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΥΠΟΘΑΛΑΜΙΚΗΣ ΩΚΥΤΟΚΙΝΗΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΑΝΤΑΜΟΙΒΗΣ ΣΤΟΝ ΕΠΙΜΥ .....	123
<i>Α.Μ. Κόλλια, Α. Σταματάκης και Φ. Στυλιανοπούλου</i>	
DEVELOPMENTAL STAGE AND GENDER INFLUENCE THE VULNERABILITY OF THE NEURONAL CYTOSKELETON TO ARA-C .....	124
<i>С. Koros, Δ. Karandrea, Δ. Anastasopoulos and Ε. Kitraki</i>	
ΤΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΚΑΙ ΤΟ ΦΥΛΟ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ ΤΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ARA-C .....	125
<i>Χ. Κορός, Δ. Καρανδρέα, Δ. Αναστασόπουλος και Ε. Κιτράκη</i>	



MODELLING RELAY STATIONS OF THE MILK-EJECTION REFLEX IN THE SHEEP .....	126
<i>E. K. Kosmidis, A. S. Tsingotjidou, C. Batzios, L. Iliadis and G. C. Papadopoulos</i>	
ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ ΣΤΑΘΜΩΝ ΤΗΣ ΝΕΥΡΙΚΗΣ ΟΔΟΥ ΤΟΥ ΑΝΤΑΝΑΚΛΑΣΤΙΚΟΥ ΤΗΣ ΚΑΘΟΔΟΥ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ .....	127
<i>E. K. Κοσμίδης, Α. Σ. Τσιγκοτζίδου, Χ. Μπάτζιος, Α. Ηλιάδης και Γ. Χ. Παπαδόπουλος</i>	
MEMBRANE POTENTIAL NOISE IS NOT THAT NOISY .....	128
<i>E.K. Kosmidis, Y.F. Contoyiannis, C. Papatheodoropoulos, F.K. Diakonos and G. Theophilidis</i>	
ΟΙ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΕΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΕΙΣ ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΘΟΡΥΒΟΣ .....	129
<i>E.K. Κοσμίδης, Γ.Φ. Κοντογιάννης, Κ. Παπαθεοδωρόπουλος, Φ.Κ. Διάκονος και Γ. Θεοφιλίδης</i>	
BONE MARROW STROMAL CELLS AS A CELL-REPLACEMENT THERAPY IN EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS .....	130
<i>K. Kotta, R. Lagoudaki, E. Polyzoidou, O. Touloumi, A. Gianakopoulou, A. Lourbopoulos, C. Simeonidou, E. Spandou, D. Karussis, N. Taskos, I. Milonas and N. Grigoriadis</i>	
ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΩΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΗΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΛΛΕΡΓΙΚΗ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ .....	131
<i>Κ. Κώττα, Ρ. Λαγουδάκη, Ε. Πολυζοίδου, Ο. Τουλούμη, Α. Γιαννακοπούλου, Α. Λουρμπούλου, Κ. Συμεωνίδου, Ε. Σπάνδου, Δ. Καρούσης, Ν. Τάσκος, Ι. Μυλωνάς και Ν. Γρηγοριάδης</i>	
INVESTIGATIONS INTO THE LINGUISTIC BREAKDOWN IN GREEK APHASIC PATIENTS: THE EFFECT OF DIFFERENT VERB CLASSES ON GRAMMATICAL FEATURES .....	132
<i>V. KoukoulIoti, S. Stavrakaki and M. Kambanaros</i>	
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΓΛΩΣΣΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΟΦΩΝΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΦΑΣΙΑ: Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΡΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΤΗΓΟΡΙΩΝ ΣΤΑ ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ .....	133
<i>Β. Κουκουλιώτη, Σ. Σταυρακάκη και Μ. Καμπανάρου</i>	
IN VIVO FENTANYL TREATMENT REDUCES GABA IMMUNOREACTIVITY IN THE CA1 AREA OF THE RAT HIPPOCAMPUS .....	134
<i>E. Kouvaras, T. Kilindris, A. Vasilaki and E.K. Asproдини</i>	
Η IN VIVO ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΦΕΝΤΑΝΥΛΗΣ ΕΛΑΤΤΩΝΕΙ ΤΗΝ ΑΝΟΣΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ γ-ΑΜΙΝΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΗΝ CA1 ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ .....	135
<i>Ε. Κουβαράς, Θ. Κυλινδρής, Α Βασιλάκη και Ε.Κ. Ασπροδίνη</i>	

EFFECT OF THE <i>IN VIVO</i> FENTANYL TREATMENT ON EXCITATORY AND INHIBITORY SYNAPTIC TRANSMISSION WITHIN THE CA1 AREA OF THE RAT HIPPOCAMPUS .....	136
<i>E. Kouvaras, E.K. Asproдини, I. Asouchidou, A. Vasilaki, D. Michaloudis, C. Papatheodoropoulos and G. Kostopoulos</i>	
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ <i>IN VIVO</i> ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΦΕΝΤΑΝΥΛΗΣ ΣΤΗΝ ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΣΥΝΑΠΤΙΚΗ ΔΙΑΒΙΒΑΣΗ ΤΗΣ CA1 ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ .....	137
<i>E. Κουβαράς, E.K. Ασπροδίνη, E. Ασουχίδου, A. Βασιλάκη, Δ. Μιχαλούδης, Κ. Παπαθεοδωρόπουλος και Γ. Κωστόπουλος</i>	
A NOVEL FUNCTION OF A UCH-L1 POLYMORPHIC VARIANT AS A POTENT ANTIOXIDANT: IMPLICATIONS IN PARKINSON'S DISEASE .....	138
<i>E. Kyratzi, M. Pavlaki and L. Stefanis</i>	
Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ S18Y ΠΡΟΣΔΙΔΕΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΥΔΡΟΛΑΣΗ UCH-L1: ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ .....	139
<i>E. Κυρατζή, M. Παυλάκη και Α. Στεφανής</i>	
THE TUMOR SUPPRESSOR RAS-GAP NEUROFIBROMIN LOCALIZES IN THE NUCLEUS AND INTERACTS WITH THE MAP KINASE ERK .....	140
<i>G. Leondaritis, S. Karouzaki and D. Mangoura</i>	
Η ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗ RAS-GAP ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΝΕΥΡΟΦΙΜΠΡΟΜΙΝΗ ΕΝΤΟΠΙΖΕΤΑΙ ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑ ΜΕ ΤΗΝ ΜΑΡ ΚΙΝΑΣΗ ERK .....	141
<i>Γ. Λεονταρίτης, Σ. Καρουζάκη και Δ. Μάγκουρα</i>	
INVESTIGATION OF THE ROLE OF 14-3-3ζ IN OLFACTORY LEARNING IN <i>Drosophila melanogaster</i> .....	142
<i>F. S. Leptourgidou and E. M. C. Skoulakis</i>	
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ 14-3-3ζ ΣΤΗΝ ΟΣΦΡΗΤΙΚΗ ΜΑΘΗΣΗ ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ <i>Drosophila melanogaster</i> .....	143
<i>Φ. Λεπτουργίδου και Ε. Σκουλάκης</i>	
EVALUATION OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF ADULT MICE BRAIN REGIONS AFTER CONSUMPTION OF TEA OF <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>Peloponnesiaca</i> .....	144
<i>Z. Linardaki, F.N. Lamari, M.A. Papandreou, G. Iatrou, M.I. Klapa and M. Margarity</i>	
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΜΥΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΣΑΓΙΟΥ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ <i>Sideritis clandestina</i> subsp. <i>Peloponnesiaca</i> .....	145
<i>Z. Λιναρδάκη, Φ.Ν. Λάμαρη, Μ.Α. Παπανδρέου, Γ. Ιατρού, Μ.Ι. Κλάπα και Μ. Μαργαρίτη</i>	

INTRAVENTRICULAR TRANSPLANTATION OF BONE MARROW STROMAL CELLS IN A MODIFIED MODEL OF MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION IN THE RAT .....	146
<i>A. Lourbopoulos, N. Grigoriadis, O. Touloumi, K. Kotta, D. Karacostas, N. Artemis, I. Milonas and N. Tascos</i>	
ΕΝΔΟΚΟΙΛΙΑΚΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΣΤΙΑΚΗΣ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΕΠΙΜΥΟΣ .....	147
<i>A. Λουρμπόπουλος, Ν. Γρηγοριάδης, Ο. Τουλούμη, Κ. Κώττα, Δ. Καρακώστας, Ν. Αρτέμης, Ι. Μυλωνάς και Ν. Τάσκος</i>	
OVEREXPRESSION OF WILD TYPE $\alpha$ -SYNUCLEIN DOWNREGULATES EXPRESSION OF NURR1 IN AN IN VITRO MODEL .....	148
<i>M. Manousaki, E. Sotiriou, A. Droggiti, K. Vekrellis, D.K. Vassilatis and L. Stefanis</i>	
Η ΑΥΞΗΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ $\alpha$ -ΣΥΝΟΥΚΛΕΙΝΗΣ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ NURR1 ΣΕ ‘‘IN VITRO’’ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ .....	149
<i>Μ. Μανουσάκη, Ε. Σωτηρίου, Α. Δρογγίτη, Κ. Βεκρέλλης, Δ.Κ. Βασιλάτης και Α. Στεφανής</i>	
PERCEPTION ACTION INTERACTION: PERCEPTUAL SYSTEMATIC ERRORS IN THE EVOLVING TRAJECTORY OF ARM POINTING MOVEMENTS .....	150
<i>A. Mantas, I. Evdokimidis and N. Smyrnis</i>	
ΑΝΤΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΚΙΝΗΣΗ: ΑΝΤΙΛΗΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΑ ΣΦΑΛΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΣΤΟ ΧΡΟΝΟ ΤΗΣ ΚΙΝΗΣΗΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΩ ΑΚΡΟΥ .....	151
<i>Α. Μαντάς, Ι. Ευδοκιμίδης και Ν. Σμυρνής</i>	
IMPACT OF GENETIC AND ENVIRONMENTAL FACTORS ON NEUROMODULATORS OF ENERGY AND GLUCOSE HOMEOSTASIS .....	152
<i>E.M. Markaki, C. Rouch, S. Banas, K. Apazoglou, D. Bailbe and K. Gerozissis</i>	
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΕ ΝΕΥΡΟΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΙΣΟΖΥΓΙΟΥ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΖΗΣ .....	153
<i>E.M. Markaki, C. Rouch, S. Banas, K. Apazoglou, D. Bailbe and K. Gerozissis</i>	
REGULATION OF APP METABOLISM BY BRI2 AND ITS MUTATIONS. THE IMPACT OF BRI2 ON BACE ENZYME ACTIVITY .....	154
<i>E. Marouli, A. Fotinopoulou and S. Efthimiopoulos</i>	
ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ APP ΑΠΟ ΤΗΝ BRI2 ΚΑΙ ΤΙΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ BRI2 ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ BACE .....	155
<i>Ε. Μαρούλη, Α. Φωτεινοπούλου και Σ. Ευθυμιόπουλος</i>	

CHANGES IN INTRACRANIAL SELF-STIMULATION THRESHOLD AND LOCOMOTOR ACTIVITY IN RATS WITH REPEATED ADMINISTRATION OF THE CANNABINOID RECEPTOR AGONIST WIN55,212-2 .....	156
<i>M. Mavrikaki, E. Markaki, G. G. Nomikos and G. Panagis</i>	
ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟΝ ΟΥΔΟ ΕΝΔΟΚΡΑΝΙΑΚΟΥ ΑΥΤΟΕΡΕΘΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΥΘΟΡΜΗΤΗ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΧΡΟΝΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΟΥ ΑΓΩΝΙΣΤΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ WIN55,212-2 .....	157
<i>M. Μαυρικάκη, E. Μαρκάκη, Γ.Γ. Νομικός και Γ. Παναγής</i>	
ENDOGENOUS ACh CONTRIBUTION TO EPILEPTIFORM DISCHARGES ALONG THE LONGITUDINAL HIPPOCAMPAL AXIS, IN MALE AND FEMALE RATS .....	158
<i>A. Mikroulis, R. Liasko and C. Psarropoulou</i>	
ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗ ΚΑΙ ΕΠΙΛΗΠΤΟΕΙΔΕΙΣ ΕΚΦΟΡΤΙΣΕΙΣ ΚΑΤΑ ΜΗΚΟΣ ΤΟΥ ΕΠΙΜΗΚΗ ΑΞΟΝΑ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΣΕ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥΣ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΟΥΣ ΕΠΙΜΥΕΣ .....	159
<i>A. Μικρούλης, P. Λιάσκο και K. Ψαρροπούλου</i>	
NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF IGF-I FOLLOWING KAINIC ACID INDUCED HIPPOCAMPAL DEGENERATION IN THE RAT .....	160
<i>P. Miltiados, A. Stamatakis and F. Stylianopoulou</i>	
Ο IGF-I ΩΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΚΑΪΝΙΚΟ ΟΞΥ .....	161
<i>Π. Μιλτιάδους, A. Σταματάκης και Φ. Στυλιανοπούλου</i>	
A MICROARRAY STUDY OF GENE AND PROTEIN REGULATION IN HUMAN AND RAT BRAIN FOLLOWING MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION: IDENTIFICATION OF NOVEL NEURO-MODULATORS .....	162
<i>N. Mitsios, R. Pennucci, J. Krupinski, P. Kumar, S. Kumar and M. Slevin</i>	
ΜΙΑ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΣΕ ΜΥΑΛΑ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΚΑΙ ΠΟΝΤΙΚΙΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΙΣΧΑΙΜΙΚΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΥ ΕΠΕΙΣΟΔΙΟΥ .....	163
<i>N. Μητσιός, R. Pennucci, J. Krupinski, P. Kumar, S. Kumar και M. Slevin</i>	
SMALL GTPASE-DEPENDENT SIGNALLING IN OLFACTORY LEARNING AND MEMORY IN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> .....	164
<i>A.C. Moressis and E.M.C. Skoulakis</i>	
ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΙ ΑΠΟ ΜΙΚΡΕΣ ΓΤΡΑΣΕΣ ΣΤΗΝ ΟΣΦΡΗΤΙΚΗ ΜΑΘΗΣΗ ΚΑΙ ΜΝΗΜΗ ΤΗΣ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> .....	165
<i>A. Μωρέσης και E. Σκουλάκης</i>	

THE NMDA-INDEPENDENT LONG-TERM POTENTIATION OF THE MOSSY FIBER-CA3 SYNAPSES IS GREATER IN DORSAL THAN IN VENTRAL HIPPOCAMPUS .....	166
<i>C. Moschovos and C. Papatheodoropoulos</i>	
Η ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΗ ΕΝΔΥΝΑΜΩΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΑΨΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΒΡΥΩΔΩΝ ΙΝΩΝ ΚΑΙ CA3 ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΕΙΝΑΙ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΣΤΟΝ ΔΙΑΦΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟΝ ΚΡΟΤΑΦΙΚΟ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟ .....	167
<i>Χ. Μόσχοβος και Κ. Παπαθεοδωρόπουλος</i>	
THE EFFECT OF PERINATAL HYPOXIA ON THE DOPAMINERGIC SYSTEMS OF THE MESENCEPHALON IN THE HUMAN BRAIN .....	168
<i>M. Pagida, A. Konstantinidou, E. Tsekoura, D. Kontostavlaki, E. Patsouris and M. Panayotacopoulou</i>	
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ ΣΤΑ ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΕΣΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ .....	169
<i>Μ. Παγίδα, Α. Κωνσταντινίδου, Ε. Τσεκούρα, Δ. Κοντοσταυλάκη, Ε. Πατσούρης και Μ. Παναγιωτακοπούλου</i>	
DEVELOPMENT OF ANGIOGENESIS AFTER CHRONIC ADMINISTRATION OF HUMAN RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN (rHuEPO) IN INTACT MOUSE BRAIN .....	170
<i>O. Ragonopoulou, A. Efthimiadou, M. Lambropoulou and N. Nikolettos</i>	
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΤΟΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΥΓΙΩΝ ΜΥΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΡΟΝΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ .....	171
<i>O. Παγωνοπούλου, Α. Ευθυμιάδου, Μ. Λαμπροπούλου και Ν. Κ. Νικολέττος</i>	
ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECT OF SOMATOSTATIN USING THE FORCED SWIM TEST DEPRESSION MODEL .....	172
<i>E. Pallis, K. Antoniou, Z. Papadopoulou-Daifoti, K. Thermos and C. Spyraiki</i>	
ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΤΗΣ ΕΞΑΝΑΓΚΑΣΜΕΝΗΣ ΚΟΛΥΜΒΗΣΗΣ .....	173
<i>Ε. Πάλλης, Κ. Αντωνίου, Ζ. Παπαδοπούλου-Νταϊφώτη, Κ. Θερμού και Χ. Σπυράκη</i>	
NEUROLIGIN (NLGN3/NLGN4) CONTRIBUTION REGARDING AUTISTIC BEHAVIOUR .....	174
<i>A. Rampanos , K. Volaki, O. Papadaki-Papandreou , L. Thomaidou, S. Giouroukos , E. Kanavakis and S. Kitsiou-Tzeli</i>	
ΣΥΜΒΟΛΗ ΝΕΥΡΟΛΙΓΙΝΩΝ (NLGN3/NLGN4) ΣΤΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΑΥΤΙΣΤΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ .....	175
<i>Α. Πάμπανος , Κ. Βολάκη , Ο. Παπαδάκη- Παπανδρέου, Α. Θωμαΐδου , Σ. Γιουρούκος, Ε. Καναβάκης και Σ. Κίτσιου-Τζέλη</i>	

BEHAVIORAL AND NEUROBIOLOGICAL ALTERATIONS IN ADULTHOOD ASSOCIATED WITH EARLY LIFE SEIZURES .....	176
<i>E. Papalexi, M. Dosi, O. Chouliara, R. Liasko, M. Marselos, C. Psarropoulou and K. Antoniou</i>	
ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΕΣ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗΝ ΕΝΗΛΙΚΗ ΖΩΗ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΕΠΙΛΗΠΤΙΚΕΣ ΚΡΙΣΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΗΛΙΚΙΑ .....	177
<i>E. Παπαλέξη, Μ. Δόση, Ο. Χουλιάρα, Ρ. Λιάσκο, Μ. Μαρσέλος, Κ. Ψαρροπούλου και Κ. Αντωνίου</i>	
BEHAVIORAL CHANGES IN ADULT FEMALE RATS AFTER CHRONIC MODERATE DOSES OF ETHANOL .....	178
<i>E. Papalexi, S. Zisi, M. Plioroulou, I. Kardari, V. Kloukina, C. Komini, S. Malandraki and C. Psarropoulou</i>	
ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΗΝ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΘΗΛΥΚΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΡΟΝΙΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΜΕΤΡΙΑΣ ΔΟΣΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ .....	179
<i>E. Παπαλέξη, Σ. Ζήση, Μ. Ηλιοπούλου, Ι. Κάρδαρη, Β. Κλουκίνα, Χ. Κομίνη, Σ. Μαλανδράκη και Κ. Ψαρροπούλου</i>	
IN VIVO EFFECTS OF CROCUS SATIVUS IN MICE BRAIN : ANTI-ACETYLCHOLINESTERASE, ANTI-OXIDANT AND MEMORY ENHANCING ACTIVITIES .....	180
<i>M.A. Papandreou, F.N. Lamari, P. Cordopatis and M. Margarity</i>	
IN VIVO ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ CROCUS SATIVUS ΣΤΟΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΜΥΩΝ: ANTI-ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΙΚΗ, ANTI-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΗ ΣΤΗ ΜΝΗΜΗ ΔΡΑΣΗ .....	181
<i>Μ.Α. Παπανδρέου, Φ.Ν Λάμαρη, Π. Κορδοπάτης και Μ. Μαργαρίτη</i>	
CHANGES IN AMPA AND NMDA RECEPTOR SUBUNITS IN THE RETINA OF DARK REARED RATS .....	182
<i>E. Paranikolaou, M. Giannakopoulos, P. Zeitouyian, E. D. Kouvelas and A. Mitsacos</i>	
ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΙΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ ΤΩΝ AMPA ΚΑΙ NMDA ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ ΟΠΤΙΚΑ ΑΠΟΣΤΕΡΗΜΕΝΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ .....	183
<i>Ε. Παπανικολάου, Μ. Γιαννακόπουλος, Π. Ζεϊτουγιάν, Η. Κούβελας, και Α. Μητσάκου</i>	
THE ROLE OF CELLULAR AND SYNAPTIC MECHANISMS DURING PERSISTENT ACTIVITY IN A MODEL NEURON .....	184
<i>A. Papoutsis, K. Sidiropoulou and P. Poirazi</i>	
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΑΠΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΜΕΝΟΥΣΑ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ .....	185
<i>Α. Παπουτσή, Κ. Σιδηροπούλου και Π. Ποϊράζη</i>	

MEMANTINE AND RECOGNITION MEMORY: POSSIBLE FACILITATION OF ITS BEHAVIORAL EFFECTS BY THE NITRIC OXIDE DONOR MOLSIDOMINE .....	186
<i>N. Pitsikas and N. Sakellaris</i>	
Η ΜΕΜΑΝΤΙΝΗ ΚΑΙ Η ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΤΙΚΗ ΜΝΗΜΗ: ΠΙΘΑΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙ ΤΗΣ ΜΝΗΜΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΔΟΤΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΜΟΛΣΙΔΟΜΙΝΗ .....	187
<i>N. Πιτσίκας και N. Σακελλαρίδης</i>	
VOLTAGE-ACTIVATED CALCIUM CURRENTS IN OCTOPUS CELLS OF THE MOUSE COCHLEAR NUCLEUS .....	188
<i>B. Ramazan and O. Donata</i>	
REGULATORY ROLE OF EARLY MATERNAL DEPRIVATION STRESS IN BEHAVIORAL AND NEUROBIOLOGICAL PARAMETERS IN THE ADULTHOOD .....	190
<i>G. Rentesi, K. Antoniou, M. Marselos, M. Syrrou, Z. Papadopoulou-Daifoti, M.A. Lang and M. Konstandi</i>	
Ο ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΗΣ ΜΗΤΡΙΚΗΣ ΑΠΟΣΤΕΡΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΚΑΙ ΤΟ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΝΗΛΙΚΙΩΣΗ .....	191
<i>Γ. Ρέντεση, Κ. Αντωνίου, Μ. Μαρσέλος, Μ. Σύρρου, Ζ. Παπαδοπούλου – Νταϊφότη, Μ.Α. Lang και Μ. Κωνσταντή</i>	
THE PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF GABA <sub>A</sub> / BENZODIAZEPINE RECEPTOR COMPLEX DIFFER IN DORSAL COMPARED TO VENTRAL RAT HIPPOCAMPUS .....	192
<i>K. Sarantis, E. Sotiriou, C. Papatheodoropoulos, N. Matsokis and F. Angelatou</i>	
ΟΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ γ-ΑΜΙΝΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ / BENZODIAZEPINΩΝ ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΔΙΑΦΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΡΟΤΑΦΙΚΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΕΠΙΜΥΟΣ .....	193
<i>Κ. Σαράντης, Ε. Σωτηρίου, Κ. Παπαθεοδωρόπουλος, Ν. Ματσώκης και Φ. Αγγελάτου</i>	
THE IMMUNOGLOBULIN DOMAINS OF THE IgSF MEMBER TAG-1/CNTN-2 ARE NECESSARY AND SUFFICIENT FOR ITS PHYSICAL INTERACTION WITH CASPR2 AND POTASSIUM CHANNELS .....	194
<i>M. Savvaki, A. Tzimourakas, S. Giasemi, M. Mouratidou and D. Karagozeos</i>	
ΟΙ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ TAG-1/CNTN-2 ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΦΥΣΙΚΗ ΤΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ CASPR2 ΚΑΙ ΤΑ ΚΑΝΑΛΙΑ ΚΑΛΙΟΥ .....	195
<i>Μ. Σαββάκη, Α. Τζιμουράκας, Σ. Γιασεμή, Μ. Μουρατίδου και Δ. Καραγωγέως</i>	

TRANSGENIC EXPRESSION OF MUTANT ALPHA-SYNUCLEIN IN MICE IMPACTS THE NORADRENERGIC, BUT NOT THE DOPAMINERGIC SYSTEM .....	196
<i>E. Sotiriou, K.D. Vassilatis and L. Stefanis</i>	
ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΗΣ α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΙΝΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΣΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥΣ ΕΠΙΜΥΕΣ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΟ ΝΟΡΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ, ΑΛΛΑ ΟΧΙ ΤΟ ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ .....	197
<i>E. Σωτηρίου, Κ.Δ. Βασιλάτης και Α. Στεφανής</i>	
GEMININ AND CDT1 DELINEATE NEURAL PROGENITORS IN A CELL CYCLE PHASE-SPECIFIC MANNER .....	198
<i>M. Spella, Z. Lygerou and S. Taraviras</i>	
ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ GEMININ ΚΑΙ CDT1 ΚΑΘΟΡΙΖΟΥΝ ΤΑ ΠΡΟΔΡΟΜΑ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟ ΑΠΟ ΤΗ ΦΑΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ .....	199
<i>M. Σπέλλα, Ζ. Λυγερού και Σ. Ταραβήρας</i>	
BRAIN CONNECTIVITY METHODS FOR AN ACTUAL AND IMAGINERY FINGER TAPPING TASK .....	200
<i>M. L. Stavrinou, L. Cimponeriu, L. Moraru, V. Kokkinos, P. Pelekouda and A. Bezerianos</i>	
ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΜΙΑΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΙΑΣ ΦΑΝΤΑΣΤΙΚΗΣ ΚΙΝΗΣΗΣ ΔΑΚΤΥΛΟΥ .....	201
<i>M.L. Stavrinou, L. Cimponeriu, L. Moraru, V. Kokkinos, P. Pelekouda and A. Bezerianos</i>	
FUNCTIONAL HEMISPHERIC PLASTICITY AND EMERGING CONCEPTS IN NEUROEDUCATION, NEURODIDACTICS, NEUROPEDAGOGY, AND PEDAGOGICAL NEUROSCIENCE .....	202
<i>Z. Theodoridou, D. Koniari and L.C. Triarhou</i>	
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΚΗ ΕΥΠΛΑΣΤΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΣΤΗ ΝΕΥΡΟΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ, ΤΗ ΝΕΥΡΟΔΙΔΑΚΤΙΚΗ, ΤΗ ΝΕΥΡΟΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΗ ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΗ .....	203
<i>Z. Θεοδωρίδου, Δ. Κόνιαρη και Α. Τριάρχου</i>	
THE CULMINATION OF CORTICAL CYTOARCHITECTONICS BY TWO HELLENES IN VIENNA: THE ECONOMO-KOSKINAS NOMENCLATURE FOR THE HUMAN CEREBRAL CORTEX AND ADVANTAGE OVER BRODMANN .....	204
<i>L.C. Triarhou</i>	



Η ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ ΑΠΟ ΔΥΟ ΕΛΛΗΝΕΣ ΣΤΗ ΒΙΕΝΝΗ: Η ΟΡΟΛΟΓΙΑ ΕΚΟΝΟΜΟ–ΚΟΣΚΙΝΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΚΑΙ ΤΑ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ BRODMANN .....	205
<i>Α. Τριάρχου</i>	
BRI2 PROTEIN HOMODIMERIZES VIA DISULFIDE BOND FORMATION .....	206
<i>Μ. Tsachaki, Κ. Melachrinou, V. Kyrargyri, Α. Rostagno, J. Ghiso and S. Efthimiopoulos</i>	
Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ BRI2 ΟΜΟΔΙΜΕΡΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΩΝ ΔΕΣΜΩΝ .....	207
<i>Μ. Τσαχάκη, Κ. Μελαχροινού, Β. Κυραργύρη, Α. Rostagno, J. Ghiso και Σ. Ευθυμίουπουλος</i>	
THE DEFFERENTIAL DIAGNOSIS OF SEMANTIC DEMENTIA AND DEMENTIA OF ALZHEIMER'S DISEASE .....	208
<i>Ε. Tsantali, D. Economides, N. Karatzas, P. Papapostolou and N. Paraskeuaidis</i>	
ΔΙΑΦΟΡΟΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΗΜΑΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΟΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΟΙΑΣ ΤΥΠΟΥ ALZHEIMER .....	209
<i>Ε. Τσάνταλη, Δ. Οικονομίδης, Ν. Καρατζάς, Π. Παπαποστόλου και Ν. Παρασκευαΐδης</i>	
THE 1906 PARIS DEBATE ON APHASIA: TWO LITTLE KNOWN TIMELY CONTRIBUTIONS FROM BUENOS AIRES .....	210
<i>Κ. Tsapkini, Α.Β. Vivas and L.C. Triarhou</i>	
Η ΠΑΡΙΣΙΑΝΗ ΔΙΑΜΑΧΗ ΤΟΥ 1906 ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΦΑΣΙΑ: ΔΥΟ ΕΓΚΑΙΡΕΣ ΑΓΝΩΣΤΕΣ ΣΥΜΒΟΛΕΣ ΑΠΟ ΤΟ BUENOS AIRES .....	211
<i>Κ. Τσαπκίνη, Α.Β. Vivas και Α. Τριάρχου</i>	
A METHODOLOGY FOR KNOWLEDGE EXTRACTION FROM MULTI-SUBJECT ENCEPHALOGRAPHIC RECORDINGS WITH APPLICATION TO A MEG STUDY OF OCULOMOTOR SYSTEM .....	212
<i>Α. Tsirouki, Α. Tzelepi and Ν. Laskaris</i>	
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΑΓΩΓΗ ΓΝΩΣΗΣ ΑΠΟ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΜΕΓ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΟΠΤΙΚΟΚΙΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ .....	213
<i>Α. Τσιρούκη, Α. Τζελέπη και Ν. Λάσκαρης</i>	
EFFECT OF NEONATAL REINFORCEMENT OR FRUSTATIVE NON-REWARD ON ADULT COGNITIVE PERFORMANCE AND EMOTIONALITY IN RATS .....	214
<i>Σ. Tzanoulinou, Α. Diamantopoulou, Α. Stamatakis and F. Stylianopoulou</i>	

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΝΕΟΓΝΙΚΗΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ Ή ΤΗΣ ΜΑΤΑΙΩΤΙΚΗΣ ΜΗ ΑΝΤΑΜΟΙΒΗΣ ΣΤΙΣ ΓΝΩΣΙΑΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΣΥΝΑΙΣΘΗΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΜΥΣ .....	215
<i>Σ. Τζανουλίνου, Α. Διαμαντοπούλου, Α. Σταματάκης και Φ. Στυλιανοπούλου</i>	
MAMMALIAN BM88 IS FUNCTIONAL IN DROSOPHILA DURING EMBRYONIC NEUROGENESIS AND INTERFERES WITH CELL CYCLE PROGRESSION OF THE NEURONAL PRECURSOR CELLS .....	216
<i>A. Tzortzopoulos, D. Thomaidou, R. Matsas and E. Skoulakis</i>	
Η ΘΗΛΑΣΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ BM88 ΕΙΝΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΣΤΗ ΔΡΟΣΟΦΙΛΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑ ΣΤΗΝ ΟΜΑΛΗ ΠΡΟΟΔΟ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	217
<i>Α. Τζωρτζόπουλος, Δ. Θωμαΐδου, Ρ. Μάτσα και Ε. Σκουλάκης</i>	
A STUDY OF ADULT HYPOTHYROID MICE BEHAVIOUR BASED ON T HE ELEVATED PLUS-MAZE TEST .....	218
<i>K. Vasilopoulou, D. Giannakopoulou, M.A. Papandreou, P. Giompres, M.I. Klapa and M. Margarity</i>	
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΕΝΗΛΙΚΩΝ, ΥΠΟΘΥΡΟΕΙΔΙΚΩΝ ΜΥΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ELEVATED PLUS-MAZE TEST .....	219
<i>Κ. Βασιλοπούλου, Δ. Γιαννακοπούλου, Μ. Α. Παπανδρέου, Π. Γιομπρές, Μ. Ι. Κλάπα και Μ. Μαργαρίτη</i>	
A MODEL INDUCIBLE SYSTEM TO EXAMINE THE TOXIC EFFECTS OF ALPHA-SYNUCLEIN ON HUMAN NEURONAL CELLS .....	220
<i>K. Vekrellis, M. Pavlaki, E. Emmanouilidou, M. Xylouri and L. Stefanis</i>	
ΕΝΑ ΠΡΟΤΥΠΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΠΑΓΩΜΕΝΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΦΑ-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΝΕΥΡΩΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ .....	221
<i>Κ. Βεκρέλλης, Μ. Παυλάκη, Ε. Εμμανουηλίδου, Μ. Ξυλούρη και Λ. Στεφανής</i>	
ART AND THE BRAIN: CAJAL'S SPECULATIONS ON THE ROMANCE OF POETRY .....	222
<i>A.B. Vivas and L.C. Triarhou</i>	
ΤΕΧΝΗ ΚΑΙ ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ: ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ ΤΟΥ CAJAL ΓΙΑ ΤΗ ΦΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΗΣΗΣ .....	223
<i>A.B. Vivas και Λ. Τριάρχου</i>	
INHIBITION OF NMDA-INDUCED APOPTOSIS BY STEROID ANALOGUES IN P19-N NEURONS .....	224
<i>M. Xilouri, N. Avlonitis, T. Calogeropoulou and P. Papazafiri</i>	

ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ NMDA ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΑΠΟ ΑΝΑΛΟΓΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΣΕ P19 ΝΕΥΡΩΝΕΣ .....	225
<i>M. Ξυλούρη, N. Αυλωνίτης, Θ. Καλογεροπούλου και Π. Παπαζαφείρη</i>	
ALPHA-SYNUCLEIN AND LYSOSOMAL DEGRADATION PATHWAYS IN RAT CORTICAL NEURONS .....	226
<i>M. Xilouri, T. Vogiatzi, K. Vekrellis and L. Stefanis</i>	
α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗ ΚΑΙ ΛΥΣΣΟΣΩΜΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΦΛΟΪΚΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ .....	227
<i>M. Ξυλούρη, T. Βογιατζή, K. Βεκρέλλης και Λ. Στεφανής</i>	
ASSESSING EMOTION PERCEPTION IN FRONTOTEMPORAL DEMENTIA: PERCEPTUAL PROBLEMS OR INEFFECTIVE STRATEGY? .....	228
<i>E. Aretouli, M.H. Kosmidis, P. Ioannidis and N. Taskos</i>	
ΑΞΙΟΛΟΓΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΑΝΤΙΛΗΨΗ ΣΥΝΑΙΣΘΗΜΑΤΩΝ ΣΤΗ ΜΕΤΩΠΟΚΡΟΤΑΦΙΚΗ ΑΝΟΙΑ: ΑΝΤΙΛΗΠΤΙΚΕΣ ΜΕΙΟΝΕΞΙΕΣ Η ΑΝΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΗ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ; .....	229
<i>E. Αρετούλη, Μ.-Ε. Κοσμίδου, Π. Ιωαννίδης και Ν. Τάσκος</i>	
<b>Sponsors – Χορηγίες .....</b>	<b>231</b>

**ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΟΜΙΛΙΩΝ**  
**LECTURE ABSTRACTS**

# THE ROLE OF NEURAL PRECURSOR CELLS IN CNS AUTOIMMUNITY AND DEGENERATION

*N. Grigoriadis*

*B' Dept of Neurology and Laboratory of Neuroimmunology  
AHEPA University Hospital  
Aristotle University of Thessaloniki*

Neurodegeneration and inflammation are the key points in various central nervous system (CNS) disorders. Multiple sclerosis (MS) is a representative disorder where both factors are present. Widespread demyelination and axonal loss are the pathological hallmarks of the disease. In a number of studies, syngenic adult neural stem cells (NSC) are injected into an animal model of MS, the experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in the mouse--either intravenously (IV) or intracerebroventricularly (IC). In both cases, significant numbers of donor cells entered into demyelinating areas of the central nervous system and differentiated into mature brain cells. Within these areas, oligodendrocyte progenitors markedly increased, with many of them being of donor origin and actively remyelinating axons. Furthermore, a marked decrease in the extent of demyelination and axonal loss were observed in transplanted animals. The functional impairment caused by EAE was almost abolished in transplanted mice, both clinically and pathologically.

Although stem cell therapy was introduced initially for cell replacement, the possibility that neural precursor cells (NPCs) possess immunomodulatory effects, has also been examined. IV NPC therapy decreased significantly CNS inflammation and tissue injury and attenuated the clinical severity of EAE. IV-injected NPCs were detected in lymphoid organs. Co-culture experiments showed that NPCs inhibited the activation and proliferation of lymph node-derived T cells in response to CNS-derived antigens and to nonspecific polyclonal stimuli. These findings suggest a profound bystander inhibitory effect of NPCs on T-cell activation and proliferation in the lymph nodes, leading to amelioration of EAE.

However, transplantation of embryonic stem cells or NPCs alone to acute spinal cord injuries has not resulted in robust axon regeneration beyond the sites of injury. This may be due to progenitors differentiating to cell types that support axon growth poorly and/or their inability to modify the inhibitory environment of adult CNS injuries. However, transplantation of astrocytes derived from embryonic glial-restricted precursors (GRPs) promoted robust axon growth and restoration of locomotor function after acute transection injuries of the adult rat spinal cord. Pre-differentiation of glial precursors into GRP-derived astrocytes before transplantation into spinal cord injuries leads to significantly improved outcomes over NPCs transplantation, providing both a novel strategy and a highly effective new cell type for repairing CNS injuries.

In conclusion, current reports on the use of NPCs as cell therapies in CNS disorders indicate that before envisaging any potential human applications of such therapies we need to confront with some preliminary and still unsolved questions: (i) the ideal stem cell source for transplantation, (ii) the route of cell administration, (iii) the differentiation and persistence of stem cells into the targeted tissue and, last but not least, (iv) the functional and long-lasting integration of transplanted cells into the host tissue.

## Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

*N. Γρηγοριάδης  
B' Νευρολογική κλινική  
ΓΠΝΘ ΑΧΕΠΑ  
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*

Η νευροεκφύλιση και η φλεγμονή είναι δύο σημαντικά στοιχεία της παθολογίας διαφόρων νόσων του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Η πολλαπλή σκλήρυνση (ΠΣ) είναι αντιπροσωπευτική νόσος όπου τα δύο αυτά στοιχεία συνυπάρχουν. Η διάχυτη απομυελίνωση και η απώλεια των νευραξόνων είναι τα κυρίαρχα στοιχεία της παθολογίας της νόσου. Σε ικανό αριθμό αναφορών δημοσιεύθηκαν μελέτες που αφορούν στη χορήγηση προγονικών κυττάρων (ΠΝΚ) του νευρικού συστήματος στο πειραματικό μοντέλο της νόσου, την πειραματική αλλεργική εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ) τόσο ενδοφλεβίως (ΕΦ) όσο και μέσα στις πλάγιες κοιλίες του εγκεφάλου (ΕΚ). Και στις δύο περιπτώσεις διαπιστώθηκαν μεταμοσχευμένα κύτταρα να έχουν μεταναστεύσει σε περιοχές απομυελίνωσης μέσα στο ΚΝΣ. Στις περιοχές αυτές παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού προγονικών κυττάρων των ολιγοδενδροκυττάρων πολλά από τα οποία προερχόταν από τα μεταμοσχευμένα κύτταρα με παράλληλη επαναμυελίνωση των αξόνων, μείωση της απομυελίνωσης και της απώλειας των νευραξόνων. Η αποκατάσταση των πειραματοζώων με ΠΑΕ ήταν σημαντική τόσο κλινικά όσο και ιστοπαθολογικά.

Αν και αρχικά η θεραπεία με προγονικά κύτταρα είχε στόχο την αντικατάσταση των κατεστραμμένων κυττάρων του ΚΝΣ, εξετάστηκε επίσης το ενδεχόμενο τα ίδια αυτά κύτταρα να έχουν και ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες. Η ΕΦ χορήγησή τους μείωσε σημαντικά τη φλεγμονή στο ΚΝΣ όπως επίσης και τις συμπαρομαρτούσες βλάβες. Τα κύτταρα αυτά εντοπίστηκαν στους λεμφαδένες του δέκτη. Σε πειράματα συνκαλλιέργειας ΠΝΚ με λεμφοκύτταρα φάνηκε ότι ΠΝΚ ανέστειλαν τη δραστηριοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων έναντι αντιγόνων της μυελίνης T-λεμφοκυττάρων, παρουσία τόσο των ειδικών αντιγόνων όσο και μη ειδικών μιτογόνων. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενδεικτικά ότι τα ΠΝΚ μπορούν να δρουν στο περιβάλλον των λεμφαδένων.

Η μεταμόσχευση ωστόσο εμβρυϊκών προγονικών κυττάρων ή ΠΝΚ σε καταστάσεις όπως η τραυματική βλάβη του νωτιαίου μυελού, δεν συνεισέφερε στην αποκατάσταση των νευραξόνων πέρα από τη θέση του τραύματος. Το εύρημα αυτό αποδόθηκε στο ενδεχόμενο τα μεταμοσχευμένα κύτταρα να μη διαφοροποιούνται σε κατάλληλα για την αποκατάσταση της βλάβης ώριμα κύτταρα ή ακόμη και στην αδυναμία τους να ανταπεξέλθουν στις συνθήκες ενός ανασταλτικού για την αποκατάσταση περιβάλλοντος στην τραυματισμένη περιοχή. Ωστόσο, η μεταμόσχευση προ-διαφοροποιημένων προς αστροκύτταρα εμβρυϊκών κυττάρων που προορίζονται αυστηρά στο να δώσουν κύτταρα γλοίας, επέφερε σημαντική αποκατάσταση των νευραξόνων και της κινητικότητας των πειραματοζώων μετά τον τραυματισμό. Συμπερασματικά, η τρέχουσα βιβλιογραφία αναφορικά με το ρόλο και τη χρήση των ΠΝΚ σε παθήσεις του ΚΝΣ συνιστά ότι πριν προχωρήσουμε σε κλινικές εφαρμογές σε ασθενείς, υπάρχουν ερωτήματα τα οποία μένουν να απαντηθούν, όπως: 1) Η ιδανική πηγή και το είδος των ΠΝΚ για μεταμόσχευση, 2) η οδός χορήγησης, 3) η διαφοροποίηση και παραμονή των μεταμοσχευμένων κυττάρων μέσα στο ΚΝΣ, 4) η λειτουργικότητα σε μακροχρόνια βάση των κυττάρων αυτών.

## THE POTENTIAL USE OF STEM CELLS IN NEUROSCIENCE

*Karussis D*

*Department of Neurology, The Agnes Ginges Center for Human Neurogenetics, Hadassah- Hebrew University Hospital, Jerusalem, Israel*

The recently reported evidence of neurodegeneration in multiple sclerosis may explain the lack of efficacy of the currently used immunomodulating modalities and the irreversible axonal damage, which results in accumulating disability. Therefore, for MS, the use of stem cells may provide a logical solution, since these cells can migrate locally into the areas of white matter lesions (plaques) and have the potential to support local neurogenesis and rebuilding of the affected myelin. This is achieved both by support of the resident CNS stem cells repertoire and by differentiation of the transplanted cells into neurons and myelin-producing cells (oligodendrocytes). Several types of stem cells (embryonic and adult) have been described and extensively studied in animal models of CNS diseases and the various models of MS (EAE). Adult bone marrow presents an attractive source for adult stem cells. It hosts two major types of stem cells: the hematopoietic stem cells (HSC) which are responsible for the production of all types of blood cells, including the whole immune system, and the mesenchymal stromal cells (MSC) which have a supportive role in hematopoiesis and can give rise of cells of the mesodermal lineage. During the recent years, additional roles have been described for both these two types of stem cells in the bone marrow: a. plasticity and transdifferentiation ability and, b. strong immunomodulatory properties. These bone marrow derived stem cells are therefore ideal candidates for the use in diseases like MS, for rebuilding the affected myelin, support and repair of the damaged axons (neuroprotection), and downregulation of the inflammatory process in situ. We, and others have described the potential of these cells, (especially of the MSC) in the treatment of the animal models of EAE and of humans with MS.

The experimental protocol used in our studies, included injection/transplantation of BM-derived MSC into EAE induced mice (intravenously or intraventricularly). The migration of transplanted cells was tracked by the tagged GFP (GFP transgenic mice were used as donors of the MSC).

EAE-animals treated with MSC had a less severe disease course compared to untreated animals. Viable GFP<sup>+</sup> cells were observed in the areas of EAE lesions in the brain tissue in animals treated with MSC both IV and ICV. Histopathological evaluation revealed much less axonal damage in the treated mice. Co-culture of MSC and lymph node cells (LNC) showed that MSC attenuated significantly the proliferation of T-cells in response to myelin antigens or mitogens. The differentiation potential of the MSC was evidenced in vitro (by positive staining for Nestin, Tubulin beta-III, GFAP and O4) and in vivo (by positive staining for NG2, GFAP and GalC).

Our results indicate that Bone marrow can provide a source of stem cells with a potential to migrate into the inflamed CNS tissue in chronic EAE, downregulate the clinical and histopathological features of the paralytic disease and induce significant neuroprotective effects (preservation of the axons). Clinical studies (in patients with MS and ALS) with MSC transplantation have been initiated in our center, with promising indications.

## Η ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΙΣ ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΕΣ

*Καρούσης Δ.*

*Department of Neurology, The Agnes Ginges Center for Human Neurogenetics, Hadassah- Hebrew University Hospital, Jerusalem, Israel*

Η πρόσφατα δημοσιευμένη ένδειξη για την ύπαρξη νευροεκφύλισης στην πολλαπλή σκλήρυνση (ΠΣ) θεωρείται ως η πιθανότερη αιτία για την περιορισμένη αποτελεσματικότητα των εφαρμοζόμενων ανοσοτροποποιητικών θεραπειών και την μη αντιστρεπτή εκφύλιση των νευραξόνων, γεγονός που οδηγεί σε προοδευτική αναπηρία. Η χρήση στελεχιαίων προγονικών κυττάρων (ΣτΠΚ) στη θεραπεία της νόσου είναι μια λογική τακτική από τη στιγμή που όπως έχει διαπιστωθεί, τα κύτταρα αυτά μεταναστεύουν στις περιοχές των βλαβών (πλάκες) μέσα στη λευκή ουσία και στηρίζουν τη νευρογένεση και την επαναδόμηση της μυελίνης. Ο στόχος αυτός επιτυγχάνεται τόσο με τη δραστηριοποίηση των περιοχικών ενδογενών στελεχιαίων προγονικών κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), όσο και με τη διαφοροποίηση παρόμοιων μεταμοσχευμένων κυττάρων προς νευρώνες και ολιγοδενδροκύτταρα. Διάφοροι τύποι ΣτΠΚ έχουν περιγραφεί και έχουν εκτεταμένα μελετηθεί σε διάφορα πειραματικά μοντέλα νόσων του ΚΝΣ και της ΠΣ ιδιαίτερα (πειραματική αλλεργική εγκεφαλομυελίτιδα, ΠΑΕ). Ο μυελός των οστών του ενήλικα μπορεί να είναι μία σημαντική πηγή ΣτΠΚ. Στο μυελό των οστών ανευρίσκονται δύο κυρίως τύποι τέτοιων κυττάρων: τα αιμοποιητικά (HSC), στα οποία συμπεριλαμβάνονται και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και τα μεσεγχοματικά στρωματικά κύτταρα (MSC) τα οποία έχουν ρόλο στηρικτικών προς τα αιμοποιητικά κυττάρων και δίνουν κυτταρικές σειρές του μεσοδέρματος. Τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί επιπρόσθετες ιδιότητες αυτών των δύο τύπων ΣτΠΚ του μυελού των οστών: α) Η πλαστικότητα και η ικανότητά τους να διαφοροποιούνται προς κύτταρα άλλων ιστών και β) η ισχυρή ανοσοτροποποίηση που μπορούν να παρέχουν. Αυτά λοιπόν τα κύτταρα μοιάζουν να είναι ιδανικά προς χρήση σε νόσους όπως η πολλαπλή σκλήρυνση, για την αναδόμηση της μυελίνης, τη στήριξη και αποκατάσταση των εκφυλισμένων νευραξόνων (παροχή νευροπροστασίας) και την καταστολή της φλεγμονώδους διαδικασίας *in situ*.

Η δική μας ερευνητική ομάδα ακολουθεί πειραματικό πρωτόκολλο με χορήγηση (ενδοφλεβίως ή εντός των πλαγίων κοιλιών του εγκεφάλου) MSC σε πειραματόζωα με ΠΑΕ. Η μετανάστευση των κυττάρων αυτών είναι δυνατή καθώς προέρχονται από δότες - διαγονιδιακά ζώα τα οποία εκφράζουν Green Fluorescence Protein (GFP) στα κύτταρά τους.

Τα πειραματόζωα με ΠΑΕ στα οποία χορηγούνται τα MSC εμφανίζουν πίο ήπια νόσο σε σχέση με τους μάρτυρες. Βιώσιμα MSC κύτταρα εντοπίζονται σε περιοχές με βλάβες λόγω της ΠΑΕ τόσο μετά την ενδοφλέβια όσο και μετά την ενδοκοιλιακή χορήγηση των κυττάρων β. Η ιστοπαθολογική αξιολόγηση κατέδειξε μικρότερου βαθμού εκφύλιση νευραξόνων σε σχέση με τους μάρτυρες. Η συνκαλλιέργεια των MSC με κύτταρα από τους λεμφαδένες των πειραματοζώων με ΠΑΕ έδειξε ότι τα MSC κατετέλλουν τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων παρουσία αντιγόνων μυελίνης και μιτογόνων. Η ικανότητα των MSC να διαφοροποιούνται προς κύτταρα του ΚΝΣ φάνηκε τόσο *in vitro* (κύτταρα θετικά για τους δείκτες Nestin, Tubulin beta-III, GFAP και O4) όσο και *in vivo* (κύτταρα θετικά για τους δείκτες NG2, GFAP και GalC). Κλινικές μελέτες με μεταμόσχευση MSC σε ασθενείς με ΠΣ και Πλαγία Μυατροφική Σκλήρυνση βρίσκονται ήδη σε εξέλιξη στο κέντρο μας με πολλά υποσχόμενες ενδείξεις.



**THE ROLE OF THE EXTRACELLULAR MATRIX IN THE THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF THE SUBVENTRICULAR ZONE NEUROGENIC NICHE OF THE ADULT MOUSE BRAIN. THE EXAMPLE OF TENASCIN-C**

*I. Kazanis<sup>1</sup>, A. Belhadi<sup>1</sup>, A. Faissner<sup>2</sup>, C. ffrench-Constant<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Department of Pathology, University of Cambridge, Cambridge CB2 1QP, United Kingdom*

*<sup>2</sup>Department of Cell Morphology and Molecular Neurobiology, Ruhr-University, D-44780 Bochum, Germany.*

The subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles (LV) of the adult mouse brain is a small and highly specialized area that hosts neurogenesis within the mature nervous tissue (neurogenic niche). It is characterized by a specific cyto-architecture of the neural stem cells (NSCs) and the neural progenitors as well as by a specific ECM structure and composition. Collagen, fibronectin and laminins are some of the ECM molecules that constitute the extracellular environment in which the adult NSCs divide in order to produce neurons and glia. Tenascin-C (TnC) is a large ECM glycoprotein that has been shown to affect proliferation and migration of early post-natal neural precursors and embryonic NSC behavior. Here we show that TnC is produced by SVZ type-B astrocytes and forms a layer that borders the SVZ to the striatum. We also provide evidence, using a combination of approaches, that in the absence of TnC the structure of the LV area as well as the homeostasis of the neurogenic niche is disturbed. On the other hand, the numbers and properties of the NSCs and their progeny remained unaffected in the TnC deficient animals and the SVZ regenerated normally after its depletion with AraC treatment, revealing the remarkable ability of the adult brain neurogenic areas to retain their proper function even after the removal of major ECM molecules.

## Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΥΠΟΚΟΙΛΙΑΚΗΣ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΣΤΟΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΤΟΥ ΕΝΗΛΙΚΟΥ ΜΥΟΣ. ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΗΣ TENASCIN-C

*H. Καζάνης<sup>1</sup>, A. Belhadi<sup>1</sup>, A. Faissner<sup>2</sup>, C. ffrench-Constant<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Department of Pathology, University of Cambridge, Cambridge CB2 1QP, United Kingdom*

<sup>2</sup>*Department of Cell Morphology and Molecular Neurobiology, Ruhr-University, D-44780 Bochum, Germany*

Η υποκοιλιακή ζώνη των πλαγίων κοιλιών του εγκεφάλου του ενήλικου μυός αποτελεί μία μικρή και εξειδικευμένη περιοχή, περιβαλλόμενη από ώριμο διαφοροποιημένο ιστό, στην οποία εντοπίζεται νευρογένεση (νευρογενετική φωλιά). Χαρακτηρίζεται από την ιδιαίτερη κυτταρο-αρχιτεκτονική των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NBK) και των νευρικών προδρόμων κυττάρων καθώς και από ιδιαίτερη σύνθεση της εξωκυττάριας ουσίας. Το κολλαγόνο, η φαϊμπρονεκτίνη και οι λαμινίνες αποτελούν κύρια συστατικά του εξωκυττάριου περιβάλλοντος μέσα στο οποίο τα ενήλικα NBK διαιρούνται ώστε να παραγάγουν νευρικά και γλοιακά κύτταρα. Η Tenascin-C (TnC) είναι μία μεγάλου μεγέθους γλυκοπρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας η οποία έχει δειχθεί να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και την κινητικότητα νευρικών προδρόμων κυττάρων κατά την πρόιμη μεταγεννητική περίοδο καθώς και την συμπεριφορά εμβρυικών NBK. Η μελέτη μας αποκάλυψε πως στην περιοχή των πλαγίων κοιλιών, η TnC παράγεται από τα εξειδικευμένα αστρογλοιακά κύτταρα τύπου Β και πως σχηματίζει μια ζώνη η οποία αφορίζει την υποκοιλιακή νευρογενετική περιοχή από τον διαφοροποιημένο νευρικό ιστό. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις, αποδεικνύεται πως η έλλειψη της TnC προκαλεί αλλοιώσεις στη δομή της περικοιλιακής περιοχής και διαταράσσει την ομοιοστατική συμπεριφορά της νευρογενετικής φωλιάς. Από την άλλη μεριά, η αναστολή της έκφρασης της TnC δεν επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό και τη συμπεριφορά των NBK και των επιγόνων τους και η υποκοιλιακή περιοχή αναγεννάται επιτυχώς μετά την αποδόμησή της με τη χρήση του αντιμιτοτικού φαρμάκου AraC. Τα αποτελέσματά μας συνεπώς υπογραμμίζουν τη δυνατότητα της υποκοιλιακής νευρογενετικής περιοχής του ενήλικου εγκεφάλου να προσαρμόζεται στην έλλειψη ενός από τα κύρια δομικά συστατικά της.

**PROTEOLYSIS INHIBITION AS MEANS OF NEURONAL CELL SURVIVAL IN  
DIFFERENT STRESSFUL CONDITIONS SUCH AS HYPOXIA AND CHEMICALLY  
INDUCED EXITOTOXICITY**

*Aristidis Kritis*

*Laboratory of Physiology, Dep. of Physiology and Pharmacology, Medical School 54124, Aristotle  
University of Thessaloniki*

The investigation of neuronal cell response in different pathological situations such as axonal loss or hypoxia regarding their survival is of intense research interest. The scientific community for long dealt with the analysis of the exitotoxicity phenomenon and for some time now evidence are presented indicating that after all it is a hierarchical procedure of cell death. The intense investigation of apoptosis as a process of controlled cell death lead to the establishment of apoptotic mechanisms that activate specific proteases that finally will effect cell death. Similarly cell death by necrosis, that until recently was described as a chaotic process due to cellular energy depletion, is apparently an ordered process with less profound characteristics but clearly involves activation of specific proteases to effect cell death. In this talk we will present you with data dealing with inhibition of two big classes of proteases, caspases and aspartyl proteases in two different situations leading to cell death such as hypoxia and chemically induced exitotoxicity and their effects regarding cell survival.

## **Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ ΩΣ ΜΕΣΟ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΤΡΕΣΣΟΓΟΝΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΟΠΩΣ ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΑ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΔΙΕΓΕΡΙΣΜΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ**

*Αριστείδης Κριτής*

*Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας-Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή 54124, Αριστοτέλειο  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*

Η διερεύνηση της απάντησης των νευρώνων σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις δηλαδή μετά από τραυματισμό, αξονοτόμηση, ή υποξία όσον αφορά στη επιβίωση τους είναι θέμα έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος. Επί μακρόν η επιστημονική κοινότητα ασχολήθηκε με την ανάλυση του φαινομένου της διεγερσιμοτοξικότητας και εδώ και καιρό παρουσιάζονται στοιχεία μετά οποία φαίνεται ότι τελικά πρόκειται για μια ιεραρχημένη διαδικασία κυτταρικού θανάτου. Η πάρα πολύ εντατική μελέτη της απόπτωσης ως διαδικασίας ελεγχόμενου κυτταρικού θανάτου οδήγησε στην αποσαφήνιση αποπτωτικών μηχανισμών που ενεργοποιούν συγκεκριμένες πρωτεάσες ώστε τελικά να επιτευχτεί ο κυτταρικός θάνατος. Όμοια η κυτταρική νέκρωση, που μέχρι προ τίνος περιγραφόταν ως χαοτική διαδικασία κυτταρικού θανάτου λόγω εξάντλησης ενεργειακών αποθεμάτων του κυττάρου, φαίνεται ότι τελικά είναι και αυτή μια ιεραρχημένη διεργασία με λιγότερο εμφανή χαρακτηριστικά αλλά σαφή ενεργοποίηση συγκεκριμένων πρωτεασών με τελικό στόχο τον κυτταρικό θάνατο. Στην ομιλία αυτή θα παρουσιαστούν στοιχεία που έχουν να κάνουν με την αναστολή δύο μεγάλων τάξεων πρωτεασών των κασπασών και των ασπαρτύλ πρωτεασών σε δύο διαφορετικές καταστάσεις που επάγουν κυτταρικό θάνατο δηλαδή υποξία και χημικά επαγόμενη διεγερσιμοτοξικότητα και η επίδρασή τους όσον αφορά στην κυτταρική επιβίωση.

## ELUCIDATING THE STRUCTURE AND FUNCTION OF G-PROTEIN COUPLED RECEPTORS

*G. Liapakis*

*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Crete, Crete, Greece*

Many physiological functions in our body are mediated by the interaction of a large number of chemically divergent endogenous ligands, such as biogenic amines, peptides, glycoproteins, lipids and nucleotides, with the G-protein-coupled receptors (GPCRs). The G-protein-coupled receptors (GPCRs) comprise the largest superfamily of proteins in the body and playing a fundamental role in cellular function are estimated to be the target for more than 50% of the currently available drugs. The GPCRs are remarkably diverse at the sequence level and fall into six subfamilies. The subfamily A includes, among others, the receptors related to the “light receptor” rhodopsin, the dopamine and the adrenergic receptors, whereas the subfamily B includes, among others, the receptors for the secretin, and the corticotropin releasing factor (CRF) receptors. The GPCRs are plasma membrane proteins, which share a common structural motif of seven membrane-spanning domains (TMs) (heptahelical motif), connected with three extracellular (EL) and three intracellular (IL) loops. Agonist binding to extracellular loops and/or to amino acids of the membrane-spanning domains of GPCRs promotes receptor activation-associated conformational changes that are propagated through their membrane-spanning domains to the intracellular portion of receptors. Such conformational alterations in the cytoplasmic portion of GPCRs promote their interaction with and subsequent activation of heterotrimeric G-proteins. Activated G-proteins modulate several cellular signaling pathways, thus resulting in a cellular response. Given that the term efficacy of a drug is associated with the degree of activation of its receptor by this drug, determination of receptor activation-associated structural changes will uncover the molecular mechanism that underlies efficacy, and thus advancing the design of drugs with predetermined efficacy, Using as prototype the beta2-adrenergic receptor and a variety of techniques we determined activation-associated structural changes of GPCRs, such as movements of membrane-spanning domains and their cytoplasmic ends. In parallel, we started obtaining information for the structure of subfamily B GPCRs, using as prototype the receptors for the CRF. In contrast to subfamily A GPCRs, little is known about the structure of CRF receptors, as well as for all other receptors belonging to subfamily B GPCRs. In addition, we determined the role of several amino acids of CRF receptor in the binding of CRF and CRF-like peptides. These studies will provide information about the structure of CRF receptors and will identify the structural determinants of CRF receptor/peptide interactions, thus putting the basis for the design of CRF receptor selective ligands.

## ΔΙΑΣΑΦΗΝΙΖΟΝΤΑΣ ΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΠΟΥ ΣΥΖΕΥΓΝΥΝΤΑΙ ΜΕ ΤΙΣ G-ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

*Γ. Λιαπάκης*

*Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Κρήτη*

Οι περισσότερες φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού μας επιτελούνται μέσω της αλληλεπίδρασης ενός μεγάλου αριθμού χημικά διαφορετικών ενδογενών ουσιών, όπως οι βιογενείς αμίνες, τα πεπτίδια, οι γλυκοπρωτεΐνες τα λιπίδια και τα νουκλεοτίδια, με τους υποδοχείς που συζεύγνυνται με τις G-πρωτεΐνες (G-protein-coupled receptors, ή GPCRs). Οι GPCRs αποτελούν τη μεγαλύτερη υπεροικογένεια πρωτεϊνών του οργανισμού μας και παίζοντας κύριο ρόλο στις κυτταρικές λειτουργίες υπολογίζεται ότι αποτελούν το στόχο περισσότερων από το 50% των φαρμάκων που κυκλοφορούν σήμερα στο εμπόριο. Οι GPCRs διαφέρουν μεταξύ τους σε επίπεδο αλληλουχίας αμινοξέων και κατατάσσονται σε έξι υποοικογένειες. Η υποοικογένεια A περιλαμβάνει μεταξύ των άλλων και τους υποδοχείς της ροδοψίνης και της ντοπαμίνης, καθώς και τους αδρενεργικούς υποδοχείς, ενώ η υποοικογένεια B περιλαμβάνει μεταξύ των άλλων και τη σεκρετίνη, καθώς και τους υποδοχείς του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF). Οι GPCRs είναι πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου που έχουν σαν κοινό δομικό χαρακτηριστικό την ύπαρξη επτά διαμεμβρανικών περιοχών, που ενώνονται με τρεις εξωκυττάριους και τρεις ενδοκυττάριους βρόγχους. Η δέσμευση των αγωνιστών στις εξωκυττάριες περιοχές των υποδοχέων ή/και στις διαμεμβρανικές περιοχές τους προκαλεί δομικές αλλαγές που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των υποδοχέων και οι οποίες μέσω των διαμεμβρανικών περιοχών μεταφέρονται στις ενδοκυττάριες περιοχές τους. Τέτοιες δομικές αλλαγές στις ενδοκυττάριες περιοχές των υποδοχέων είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση των υποδοχέων με τις G-πρωτεΐνες και την επακόλουθη ενεργοποίηση των τελευταίων. Οι ενεργοποιημένες G-πρωτεΐνες στη συνέχεια τροποποιούν την κυτταρική σηματοδότηση με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση βιολογικού αποτελέσματος. Δεδομένου ότι ο όρος αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου σχετίζεται άμεσα με το βαθμό ενεργοποίησης του υποδοχέα από το εν λόγω φάρμακο, ο προσδιορισμός των σχετιζόμενων με την ενεργοποίηση δομικών αλλαγών του θα αποκαλύψει τον μοριακό μηχανισμό που είναι υπεύθυνος για την εμφάνιση αποτελεσματικότητας. Οι μελέτες αυτές θα θέσουν τις βάσεις για το σχεδιασμό φαρμάκων με προκαθορισμένη αποτελεσματικότητα. Έτσι λοιπόν, χρησιμοποιώντας σαν πρότυπο τον β2-αδρενεργικό υποδοχέα, και μια σειρά τεχνικών, προσδιορίσαμε τις σχετιζόμενες με την ενεργοποίηση των GPCRs δομικές αλλαγές τους, όπως τις μετακινήσεις των διαμεμβρανικών περιοχών και των κυτταροπλασματικών άκρων τους. Παράλληλα, ξεκινήσαμε να λαμβάνουμε πληροφορίες σχετικά με τη δομή των υποδοχέων που ανήκουν στην υποοικογένεια B των GPCRs, χρησιμοποιώντας σαν πρότυπο τους υποδοχείς του CRF. Σε αντίθεση με τους υποδοχείς της υποοικογένειας A των GPCRs, η γνώση για τη δομή των υποδοχέων του CRF, καθώς και για τους υπόλοιπους άλλους υποδοχείς της υποοικογένειας B των GPCRs, είναι περιορισμένη. Επιπρόσθετα, προσδιορίσαμε το ρόλο ορισμένων αμινοξέων του CRF υποδοχέα στη δέσμευση του CRF και των πεπτιδικών αναλόγων του CRF. Οι μελέτες αυτές τελικά θα δώσουν πληροφορίες για τη δομή των CRF υποδοχέων και θα προσδορίσουν όλα τα αμινοξέα του υποδοχέα που αλληλεπιδρούν με το CRF, θέτοντας έτσι τις βάσεις για το σχεδιασμό φαρμάκων εκλεκτικών για τον υποδοχέα του of CRF.

## NEUROIMAGING AND THE QUEST FOR BRAIN SIGNS OF CONSCIOUSNESS

Andrew C. Papanicolaou

Center for Clinical Neurosciences, The University of Texas Medical School, 1333 Moursund street,  
Suite H 114, Houston, TX 77030, USA

What aspects of conscious experience can be revealed through functional neuroimaging? To address this issue the following propositions must and will be considered:

- 1) A person's discriminant behavioral responses (typically verbal reports and responses to suitable queries) constitute the basis for deciding whether a person is or is not conscious.
  - 2) Consciousness is not a substance (whether material or mental) nor a unitary cognitive function. Rather, it is a category name for conscious experiences, each of which is the result of the operation of several cognitive functions such as attention, perception, memory, language.
  - 3) Each cognitive function is mediated by a brain mechanism, that is, by the coordinated pattern of activation of one or several brain structures.
  - 4) The result of such activation is not always a conscious experience (i.e., sometimes perception can be subliminal).
  - 5) Yet to each experience (and to each non-conscious event that results from the operation of any functions) corresponds a pattern of activation that accounts exclusively for that and for no other experience (or for that and for no other event).
  - 6) Each and all experiences that constitute the "stream of conciseness" are unique and unrepeatable; therefore the patterns of brain activation that correspond to them are also unique and unrepeatable.
- These propositions along with several others of technical nature that will be also described, lead to the following four main conclusions:

- 1) No activation pattern corresponding to any unique experience has been thus far obtained. Moreover, no such pattern will ever be obtained, even with ideal neuroimaging devices that may become available in the future. That is, we will never be able to identify any unique experience on the basis of its functional image.
- 2) No activation pattern has been thus far obtained that corresponds to particular types or kinds of experiences, that is, to those invariant and repeatable features that allow us to classify each unique experience as a specific case of this or that percept or concept. In other words, there are no functional images that by looking at them the expert can exclaim: "This is the pattern corresponding to the perceptual experience of *tables*", say, or "this pattern corresponds to the concept *justice*". Nevertheless, it is possible that some such patterns may eventually be derived and such identification may become possible in the future.
- 3) It is today possible to record and recognize some parts of the brain mechanisms of some functions with sufficient certainty to use that information in clinical practice. And, is eminently reasonable to expect rapid progress in this direction in the future.
- 4) But no functional image, present or future, may be informative, in the absence of other discriminant responses, as to whether the result of cognitive operations is or is not a conscious experience, though it is possible to infer from such images whether or not several brain mechanisms are or are not operative.

# FUNCTIONAL ORGANIZATION OF THE PREFRONTAL CORTEX FOR MNEMONIC PROCESSING

*M. Petrides*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Cognitive Neuroscience Unit, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal Quebec H3A 2B4, Canada*

<sup>2</sup>*Department of Psychology, McGill University, Montreal Quebec H3A 2B4, Canada*

Although it is generally agreed that the lateral prefrontal cortex of the human and the nonhuman primate brain plays an important role in memory, a precise characterization of the role of the different prefrontal regions in memory has proven elusive. Earlier studies on macaque monkeys had shown that lesions of the mid-portion of the dorsolateral prefrontal cortex (architectonic areas 46 and 9/46) give rise to severe impairments on spatial and nonspatial working memory tasks that require monitoring of information in working memory. Consistent with these findings from lesion studies, functional neuroimaging work on normal human subjects has shown specific increases of activity in the human mid-dorsolateral prefrontal cortex in relation to the tracking of events in working memory. By contrast, recent experiments indicate that the mid-ventrolateral prefrontal cortex (architectonic areas 45 and 47/12) is selectively involved in the active controlled retrieval of information from posterior cortical association areas. Active controlled retrieval is required when stimuli in memory do not bear stable relations to each other and, therefore, retrieval cannot be automatically driven by strong, stable and unambiguous stimulus-stimulus or stimulus-context relations. No changes in activity in the mid-dorsolateral region of the prefrontal cortex are observed in memory retrieval experiments when the requirement for monitoring of information is minimized. Finally, if the subject is actively attempting to encode information in memory in a situation where monitoring requirements are minimized, specific activity increases within the orbitofrontal cortex can be demonstrated and these activity changes co-occur with similar activity within the limbic medial temporal lobe region that is known to be critical for the establishment of new memories. These results are consistent with the known massive and preferential anatomical connections that the orbitofrontal cortex maintains with the medial temporal lobe region. Thus, there appears to be a dorsal versus ventral distinction in the organization of the mid-lateral prefrontal cortical region, with the ventral component regulating memory retrieval and the dorsal component monitoring information in working memory. In sharp contrast, the orbitofrontal region is more directly involved in the establishment of new memories in concert with the limbic region of the medial temporal lobe.

*Petrides, M. Lateral prefrontal cortex: Architectonic and functional organization. Philosophical Transactions of the Royal Society, B, 2005, 360, 781-795.*



**TOWARD A VISUAL PROSTHESIS  
BASED ON  
THALAMIC MICROSTIMULATION**

*John S. Pezaris, Ph.D.  
Department of Neurosurgery  
Massachusetts General Hospital  
Boston, MA 02114, USA*

The field of visual prostheses has concentrated on two targets for development of an artificial device for restoration of sight, the retina and the primary visual cortex. The lateral geniculate nucleus of the thalamus (LGN), the relay station between these two areas, has been ignored largely because of the difficulty of surgical approach. The recent development of deep brain stimulation techniques for addressing pathologies of the midbrain has opened surgical access to the thalamus, and motivates a reconsideration of targets for a visual prosthesis.

With this background, we have performed a series of experiments in an animal model to demonstrate proof of concept for a visual prosthesis based on thalamic microstimulation. To assess the characteristics of electrically-evoked percepts, we performed a study of LGN electrical microstimulation in awake behaving macaques, using a behavioral report to assess percept size and location. We used a simple center-out visually guided saccade paradigm where animals were required to foveate a central point and then saccade to briefly presented target stimuli.

While most targets (and all fixation points) were presented on a computer screen, some targets were presented via electrical stimulation applied to fine wire bundle electrodes placed in the LGN. Trials where the target appeared on the screen were used as a baseline and compared against trials where the target was presented through electrical stimulation.

Data were collected from three hemispheres of two macaques. After being trained on screen targets alone, each animal immediately generalized to the electrical targets in the task, consistently saccading to a point in space which corresponded to the location of the previously mapped receptive field of cells at the electrode tip. Saccade latencies and accuracies to electrical targets were consistent with those to screen targets, suggestive of a perceptual rather than motor effect. This was verified through a small number of double-saccade experiments.

We conclude that the LGN presents a target for a visual prosthesis with substantial potential for additional investigation and present a line of inquiry for developing such a device.



## MENTAL SIMULATION OF ACTION IN THE SERVICE OF ACTION PERCEPTION

*Vassilis Raos*

*Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete and Computational Neuroscience Group, Institute of Applied and Computational Mathematics, Foundation for Research and Technology Hellas*

We used the quantitative  $^{14}\text{C}$ -deoxyglucose method to map the activity pattern throughout the cerebral cortex of Rhesus monkeys, which either grasped a 3D-object or observed the same grasping movements executed by a human. We found that virtually the same frontal cortical networks were recruited for the generation and the perception of action. We suggest that the activation of execution-related areas during observation of action (in the absence of overt movement and muscle activity) reflects the mental simulation of this action by the observer. In other words, to ascribe meaning to an action performed by another agent we practically simulate the act, we mentally rehearse it.

We also found that the intensity and lateralization of activations differed in the two conditions (execution, observation). For example, the premotor activations were stronger for action observation in contrast to the primary somatosensory-motor ones which were stronger for action execution. Moreover, the activations induced by observation were bilateral whereas those induced by execution were contralateral to the moving forelimb. We suggest that these differences in intensity and lateralization of activations between the executive and the perceptual networks help attribute the action to the correct agent, i.e. to the ‘self’ during action execution and to the ‘other’ during action observation.

## Η ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΜΙΑΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΠΡΑΞΗΣ ΒΑΣΙΖΕΤΑΙ ΣΤΗ ΝΟΕΡΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΤΗΣ

*Βασίλης Ράος*

*Τομέας Βασικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης και Ομάδα Υπολογιστικών*

*Μαθηματικών, Ινστιτούτο Υπολογιστικών Μαθηματικών, Ιδρυμα Τεχνολογίας Έρευνας*

Χαρτογραφήσαμε τη λειτουργική δραστηριότητα εγκεφάλου πιθήκων οι οποίοι είτε εκτελούσαν κινήσεις σύλληψης τρισδιάστατων αντικειμένων με την άκρα χείρα, είτε παρατηρούσαν τον πειραματιστή να εκτελεί τις ίδιες κινήσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σχεδόν οι ίδιες περιοχές του φλοιού των ημισφαιρίων ενεργοποιούνται τόσο κατά την εκτέλεση όσο και κατά την παρατήρηση. Προτείνουμε ότι η ενεργοποίηση κινητικών και σωματισθητικών περιοχών κατά την παρατήρηση μιας κινητικής πράξης (απουσία κίνησης και μυϊκής δραστηριότητας) αντικατοπτρίζει την προσομοίωση αυτής της πράξης από τον παρατηρητή. Με άλλα λόγια, για να κατανοήσουμε μια πράξη που εκτελείται από κάποιο άλλο υποκείμενο—προσομοιάζουμε αυτή την πράξη, επαναλαμβάνοντας την νοερά.

Παρατηρήθηκε επίσης ότι τόσο η ένταση όσο και πλαγίωση των ενεργοποιήσεων διέφερε στις δύο συνθήκες (εκτέλεση, παρατήρηση). Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση του προκινητικού φλοιού είναι υψηλότερη κατά την παρατήρηση παρά κατά την εκτέλεση μιας κίνησης ενώ αντίθετα η ενεργοποίηση του πρωτοταγή κινητικού και πρωτοταγή σωματισθητικού φλοιού είναι υψηλότερη κατά την εκτέλεση. Επιπλέον, οι ενεργοποιήσεις κατά την παρατήρηση είναι αμφίπλευρες, ενώ οι ενεργοποιήσεις κατά την εκτέλεση είναι μονόπλευρες (ετερόπλευρα του κινούμενου άκρου). Προτείνουμε ότι οι διαφορές που παρατηρούνται στην ένταση και στην πλαγίωση των ενεργοποιήσεων στις περιοχές που απαρτίζουν το κύκλωμα εκτέλεσης/παρατήρησης βοηθούν να αποδοθεί η πράξη στο σωστό υποκείμενο (στον «εαυτό» κατά την εκτέλεση, στον «άλλο» κατά την παρατήρηση).

## **GENERATION AND MAINTENANCE OF MESODIENCEPHALIC DOPAMINERGIC NEURONS**

*Marten P. Smidt*

*Rudolf Magnus Institute of Neuroscience, Department of Pharmacology and Anatomy, University Medical Center Utrecht, Universiteitsweg 100, 3584 CG Utrecht, The Netherlands.*

Dopaminergic neurons located in the ventral mesodiencephalon are essential for the control of voluntary movement and the regulation of emotion, and are severely affected in neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease. Recent advances in molecular biology and mouse genetics have helped to unravel the mechanisms involved in the development of mesodiencephalic dopaminergic (mdDA) neurons, including their specification, migration and differentiation, as well as the processes that govern axonal pathfinding and their specific patterns of connectivity and maintenance. Here, we follow the developmental path of these neurons with special emphasis on the role of subset specification and the role of Pitx3 in the generation and maintenance of mdDA neurons with the goal of generating a molecular code that could be exploited in cell-replacement strategies to treat diseases such as Parkinson's disease.

## DISTINCT ROLES OF RGS9 AND RGS4 IN OPIATE ACTIONS

*Dimitra Terzi<sup>1</sup>, Maria M. Papahatzaki<sup>1</sup>, Kassi Psifogeorgou<sup>1</sup>, Zia Rahman<sup>3</sup>, Robert Ring<sup>3</sup>, Ming Hu Han<sup>2</sup>, Eric J. Nestler<sup>2</sup> and Venetia Zachariou<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Department of Basic Sciences, Univeristy of Crete, Greece.*

*<sup>2</sup>Department of Psychiatry. UT Souwestrern Medical Center, Dallas TX,*

*<sup>3</sup>Neuroscience Discovery Research, Wyeth Research, Princeton, NJ*

RGS proteins are important modulators of signalling termination by G protein-coupled receptors. The mechanism via which RGSs inhibit G protein signalling involves binding to activated Ga subunits and accelerating GAP activity, but also by effector antagonism, as they bind to the same site of Ga subunit necessary to activate effector molecules. Earlier studies from our group, highlighted RGS9-2 as a major determinant of sensitivity to drugs of abuse in striatum. RGS4 is a smaller RGS, with simpler structure but wider distribution than RGS9-2. In contrast to the striatal enriched RGS9-2, RGS4 is moderately expressed in striatum, locus coeruleus, and the dorsal horn of the spinal cord, and is highly abundant in cerebral cortex. To understand the role of each of these RGS proteins in opiate actions we used mouse models for conditional deletion or overexpression of RGS4 or RGS9 in the nucleus accumbens in several addiction and analgesia paradigms. Local knockout of RGS4 was achieved following bilateral infection of the nucleus accumbens of floxed RGS4 mice with an AAV-Cre recombinase expressing construct. RGS4 knockout in the nucleus accumbens results to higher sensitivity to the rewarding actions of morphine, but does not affect other morphine actions. RGS4 or RGS9 overexpression was achieved via bilateral infection of the nucleus accumbens with an AAV (adeno associated virus) construct. Overexpression of either RGS9 or RGS4 in striatum prevents drug reward. On the other hand, RGS9 but not RGS4 modulates morphine analgesia and tolerance. This effect results from direct binding of RGS9 to the Mu opioid receptor, and leads to formation of complexes that promote signalling termination and delay receptor endocytosis. Interestingly, studies using a neuropathic pain model reveal that RGS9 has a prominent role in modulation of analgesic responses of opiate agonists acting via kappa or delta opioid receptors, and point to RGS9 as a new target for chronic pain treatment.

## **MECHANISMS OF AXONAL ELONGATION DURING REGENERATION OF ADULT RETINAL AXONS**

*Solon Thanos*

*University Eye Hospital, Dept. of Experimental Ophthalmology, Domagkstraße 15, 48149 Münster*

Adult retinal ganglion cells (RGCs) exhibit only a limited and transient regenerative sprouting after injury, and they fail to extend axons within the inhospitable interior of the optic nerve. The failure to regenerate axons is attributed to inhibitory proteins associated with myelin and/or the glial scar formed immediately after injuries. Under certain experimental conditions axonal regeneration is possible, and has been examined to understand the mechanisms of regenerative growth. Such conditions include replacement of the distal segment of the cut optic nerve with a peripheral nerve segment injury to the optic lens and growth of axons within their own distal environment and *in vitro* culture models. Expanding on these models, the mutual mechanisms which trigger *de lesio* formation of growth cones and support elongation of axons will be discussed. In particular, use of proteomic methods will be first presented to document that axonal regrowth is associated with regulation of certain proteins. A proteomic-genomic correlation will be then presented to link protein-regulation to transcriptomic changes. Identified proteins which seem to play a role in axonal growth have been cloned and used for transfection experiments in order to stimulate growth of axons. The presentation will sum up with novel proteins with a high potential to promote neurite growth and promise its use to manage acute neurodegenerative diseases.

**ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ**  
**POSTER ABSTRACTS**



## DECOMPOSITION OF RECORDED COMPOUND ACTION POTENTIAL: AXON DIAMETER AND CONDUCTION VELOCITY DISTRIBUTION

*Dimitrios A. Adamos, Alexia Kagiava, Efstratios K. Kosmidis and George Theophilidis*

*Lab. of Animal Physiology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki*

The evoked CAP reflects the summation of the external currents generated by each activated nerve axon in the nerve. It is widely used in neurotoxicity studies where the effects of a chemical compound on the amplitude, rise-time, duration, and curve area of the CAP signal are considered. However, the CAP contains additional information concerning the number of fibers, their conduction velocities and their diameter distribution as in control cases velocity is directly proportional to fiber diameter.

In a previous study (1), the decomposition of the CAP using CAP modeling theory (2) was introduced. An estimation of the conduction velocity distribution was presented in the statistical evaluation of neurotoxicity to take advantage of the full range of information “hidden” in the CAP. This estimation presumes an a priori mathematical description of the Single Fiber Action Potential (SFAP) for the deconvolution of single-site recorded CAP waveforms in order to estimate the CVD. Our approach is able to consider either mathematical models of the SFAP waveform or extracellular recordings. In this study we present a comparative decomposition of the CAP in these two cases, using recorded SFAPs from the sciatic nerve of the frog in vitro for the latter. We also present the estimation of the diameter distribution in the case of the section of certain sciatic nerve branches. We successfully demonstrate that the observed effects are better described than with conventional techniques of CAP analysis. Finally we present a MATLAB tool for the implementation of the described decomposition.

The importance of the CVD estimation and its comparative study is based on the fact that quantitative changes in the distribution may reflect loss of specific diameter-group fibers, myelin defects or action potential propagation failure. Therefore, it is a valuable tool not only in assessing neurotoxicity but also in the clinical routine for the study of neuromuscular disorders.

*1. Adamos D.A., Kagiava A., Kosmidis E.K. and Theophilidis G., “Conduction velocity distribution estimation from recorded compound action potentials”, 20th Annual Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience, Heraclion, Greece, Oct 2006.*

*2. Schoonhoven R. and Stegeman D.F., “Models and Analysis of Compound Nerve Action Potential”, Critical Reviews in Biomedical Engineering, 19:47-111, 1991.*

*This work is supported by PYTHAGORAS II (EPEAEK), a research program funded by the Greek Ministry of National Education and Religious Affairs and the European Union.*

## ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΘΕΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΔΡΑΣΗΣ: ΚΑΤΑΝΟΜΕΣ ΔΙΑΜΕΤΡΩΝ ΚΑΙ ΤΑΧΥΤΗΤΩΝ ΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ ΑΞΟΝΩΝ

*Δημήτριος Α. Αδάμος, Αλεξία Καγιαβά, Ευστράτιος Κ. Κοσμίδης και Γεώργιος Θεοφιλίδης*

*Εργ. Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*

Το προκλητό σύνθετο δυναμικό δράσης απεικονίζει το άθροισμα των ρευμάτων που παράγονται από κάθε ενεργοποιημένο άξονα σε ένα νεύρο. Χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες νευροτοξικότητας, όπου εξετάζονται τα αποτελέσματα της εφαρμογής μιας χημικής ουσίας στο πλάτος, το χρόνο ανόδου, τη διάρκεια, και την επιφάνεια της καμπύλης που διαγράφει. Εντούτοις, το σύνθετο δυναμικό δράσης περιέχει και πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό αξόνων, των ταχυτήτων αγωγής τους αλλά και την κατανομή των διαμέτρων τους.

Σε προηγούμενη μελέτη (1), παρουσιάστηκε η ανάλυση του σύνθετου δυναμικού δράσης σύμφωνα με την αντίστοιχη θεωρία μοντελοποίησης του (2). Εκεί παρουσιάστηκε ο υπολογισμός της κατανομής ταχυτήτων αγωγής των αξόνων για την στατιστική αξιολόγηση της νευροτοξικότητας χημικών ουσιών. Για την εκτίμηση αυτή χρησιμοποιήθηκε η μαθηματική μοντελοποίηση του απλού δυναμικού δράσης ενός άξονα για την αποσυνέλιξη του σύνθετου δυναμικού δράσης.

Αντίστοιχα, η παρούσα προσέγγιση είναι σε θέση να χρησιμοποιήσει είτε την προαναφερθείσα μοντελοποίηση, είτε απλά δυναμικά δράσης ενός άξονα από πειραματικές καταγραφές. Έτσι παρουσιάζουμε τη συγκριτική ανάλυση του σύνθετου δυναμικού δράσης στις δύο περιπτώσεις, χρησιμοποιώντας πειραματικές καταγραφές από το ισχυακό νεύρο βατράχου. Παράλληλα παρουσιάζουμε τον υπολογισμό της κατανομής διαμέτρων στην περίπτωση της αποκοπής συγκεκριμένων κλάδων του ισχυακού νεύρου. Τέλος παρουσιάζουμε ένα αντίστοιχο εργαλείο σε MATLAB για την υλοποίηση της παρούσας ανάλυσης.

Η σημασία του υπολογισμού της κατανομής ταχυτήτων αγωγής των αξόνων και η συγκριτική τους μελέτη βασίζεται στο γεγονός ότι ποσοτικές αλλαγές στην κατανομή μπορεί να απεικονίζουν αντίστοιχες απώλειες συγκεκριμένων ομάδων ινών, να καταδεικνύουν προβλήματα στην παρουσία μυελίνης ή ακόμα και αδυναμία στη διάδοση του δυναμικού δράσης. Συνεπώς, αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο όχι μόνο στην αποτίμηση της νευροτοξικότητας αλλά και στον κλινικό έλεγχο νευρομυϊκών διαταραχών.

*1. Αδάμος Δ.Α., Καγιαβά Α., Κοσμίδης Ε.Κ. και Θεοφιλίδης Γ., “Κατανομή ταχυτήτων αγωγής σύνθετου δυναμικού δράσης”, 20ή Ετήσιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας για τις Νευροεπιστήμες, Ηράκλειο Κρήτης, Οκτώβριος 2006.*

*2. Schoonhoven R. and Stegeman D.F., “Models and Analysis of Compound Nerve Action Potential”, Critical Reviews in Biomedical Engineering, 19:47-111, 1991.*

*Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II (ΕΠΕΑΕΚ), ένα χρηματοδοτούμενο ερευνητικό πρόγραμμα από το Ελληνικό Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων.*

## A NOVEL APPROACH TO SEMI-AUTOMATED SPIKE-SORTING BASED ON ISOMAP TECHNIQUE

*Dimitrios A Adamos<sup>1</sup>, Efstratios K. Kosmidis<sup>1</sup>, George Theophilidis<sup>1</sup> and Nikos Laskaris<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Lab. of Animal Physiology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki*

<sup>2</sup> *AIIA lab., Dept of Informatics, Aristotle University of Thessaloniki*

Typical spike sorting procedures are based on the assumption that the action potential traces of a neuron have the same size and shape as they depend mainly on the neuron's geometry and its distance to the electrode. When employed manually, the experimentalist has to identify the number of neurons from the recorded trace and classify each action potential (AP) into separate spike trains in an often time consuming procedure. The quality of spike sorting then depends on the researcher's experience and his objective judgment.

In terms of automated computer processing, the corresponding spikes are extracted initially from the continuously extracellular recorded signal and the classification of detected spikes into multiple groups of neurons is based on spike shape characterization. In order to reduce the dimensionality of the data, linear techniques like Principal Component Analysis (PCA) are employed to automatically select features of the shape and use them to represent the most prominent features of spike waveforms. A reduced subspace formed by some of the initial principal vectors is then used to explore possible clustering tendencies that would indicate different signal sources and to further isolate the contributions from the individual neurons.

Common problems in spike sorting are the presence of noise and spike overlaps. Biological and instrumental noise may introduce problems in spike detection and in spike classification, since similar APs belonging to different neurons may appear as identical or APs coming from the same neuron may appear different. The performance of linear projection techniques, like PCA, is very level dependent in the presence of noise while degrades significantly in the presence of overlaps.

In this work, we attempted to resolve the previous issues using a non-linear dimensionality reduction approach that is known to reveal the intrinsic data-structure and therefore was expected to be insensitive to random variations and able of decoupling the coactivation of recorded neurons. Isometric feature mapping technique (ISOMAP) (1), which uses local metric information to characterize the underlying global geometry of a given data set, was applied to previously detected AP-waveforms. We exploited the method's trend to discover nonlinear degrees of freedom and showed an improved performance in the classification of noisy spikes, while, on the same time, it could address the problem of overlaps by indicating the corresponding origins. Extensive experimentation using simulated and actual experimental data verified the validity of our approach. Among the main advantages is the requirement for minimum engagement from the user and only at a point in which the number of underlying neurons has to be identified via visual inspection.

*1. Laskaris N.A. and Ioannides A.A., "Semantic geodesic maps: a unifying geometrical approach for studying the structure and dynamics of single trial evoked responses", Clinical Neurophysiology 113:1209–1226, 2002*

## ΜΙΑ ΝΕΑ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΗΜΙ-ΑΥΤΟΜΑΤΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ SPIKE-SORTING, ΒΑΣΙΣΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ISOMAP

Δημήτριος Α Αδάμος<sup>1</sup>, Ευστράτιος Κ. Κοσμίδης<sup>1</sup>, Γεώργιος Θεοφιλίδης<sup>1</sup> και Νίκος Λάσκαρης<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Εργ. Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

<sup>2</sup> AIA lab., Τμήμα Πληροφορικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Η τυπική προσέγγιση της μεθόδου spike sorting βασίζεται στην υπόθεση ότι τα πιθανά ίχνη των δυναμικών ενέργειας (ΔΕ) ενός νευρώνα έχουν το ίδιο μέγεθος και μορφή, αφού εξαρτώνται κυρίως από τη γεωμετρία του νευρώνα και την απόστασή του από το ηλεκτρόδιο καταγραφής. Κατά τη μη αυτόματη εφαρμογή της μεθόδου, ο εξειδικευμένος ερευνητής πρέπει να προσδιορίσει τον αριθμό των νευρώνων από το ίχνος καταγραφής και να ταξινομήσει τα ΔΕ σε χωριστές ακολουθίες ιχνών σε μια συχνά χρονοβόρα διαδικασία. Σ' αυτήν την περίπτωση, η ποιότητα της ταξινόμησης εξαρτάται κυρίως από την εμπειρία του ερευνητή και την αντικειμενική του κρίση.

Κατά την αυτοματοποιημένη εφαρμογή της μεθόδου, τα αντίστοιχα ίχνη απομονώνονται αρχικά από τη συνεχή εξωκυτταρική καταγραφή και η ταξινόμηση των ιχνών στις διάφορες ομάδες γίνεται με βάση το χαρακτηρισμό της μορφής τους. Για την ελαχιστοποίηση των διαστάσεων των δεδομένων υιοθετούνται γραμμικές τεχνικές όπως η ανάλυση σε πρωτεύοντα στοιχεία (PCA). Ο ελαχιστοποιημένος χώρος που δημιουργείται από τα βασικά πρωτεύοντα διανύσματα χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τη διερεύνηση πιθανών τάσεων ομαδοποίησης των δεδομένων. Συνήθη προβλήματα τα οποία απαντώνται στην εφαρμογή της μεθοδολογίας spike sorting είναι η παρουσία θορύβου και οι επικαλύψεις των ιχνών των δυναμικών ενέργειας. Η απόδοση των γραμμικών τεχνικών μετασχηματισμού, όπως η PCA, είναι σαφώς εξαρτώμενη από τους δύο αυτούς παράγοντες.

Σε αυτήν την εργασία, προσπαθήσαμε να επιλύσουμε τα προηγούμενα ζητήματα χρησιμοποιώντας μια μη γραμμική προσέγγιση μείωσης διαστατικότητας που είναι γνωστή για την αποκάλυψη εγγενών δομών των δεδομένων. Εφαρμόσαμε την τεχνική ISOMAP (1), η οποία προσπαθεί να αποτυπώσει την ελλοχεύουσα γεωμετρία του συνόλου των δεδομένων.

Εκμεταλλευτήκαμε την τάση της μεθόδου να αποκαλύψει τους μη γραμμικούς βαθμούς ελευθερίας, παρουσιάζοντας έτσι βελτιωμένη απόδοση στην ταξινόμηση των ιχνών των ΔΕ παρουσία θορύβου. Παράλληλα η μέθοδος μπόρεσε να χειριστεί το πρόβλημα της πιθανής επικάλυψης των ιχνών αυτών, καταδεικνύοντας την πιθανή προέλευσή τους. Τέλος, εφαρμόζοντας εκτενώς τη μέθοδο, τόσο σε δεδομένα προσομοιώσεων όσο και σε δεδομένα πραγματικών καταγραφών, επιβεβαιώσαμε την αξιοπιστία της προσέγγισης.

1. Laskaris N.A. and Ioannides A.A., "Semantic geodesic maps: a unifying geometrical approach for studying the structure and dynamics of single trial evoked responses", *Clinical Neurophysiology* 113:1209–1226, 2002

## HYPOTHYROIDISM-INDUCED PROGRAMMED CELL DEATH IN FOREBRAIN STRUCTURES OF THE ADULT RAT

A. Awaad Ahmed<sup>1</sup>, T. Zacharaki<sup>1</sup>, C. Constantinou<sup>2</sup>, M. Margarity<sup>3</sup>, I. Dori<sup>1</sup>,  
A. Dinopoulos<sup>1</sup> and J. Antonopoulos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle  
University of Thessaloniki, 541 24 Thessaloniki, Greece

<sup>2</sup>Foundation for Research and Technology-Hellas, Institute of Chemical Engineering and High  
Temperature Chemical Processes, Metabolic Engineering and Systems Biology Laboratory, 265 04  
Patras, Greece

<sup>3</sup>Laboratory of Human and Animal Physiology, Department of Biology, University of Patras, 265 04  
Patras, Greece.

Thyroid hormones are known to play a pivotal role in neuron production and maturation during the critical period of brain development. Insufficiency of these hormones during development results in severe mental retardation and neurological defects. Furthermore, adult thyroid dysfunction is also associated with both neurological and behavioral abnormalities. However, the mechanisms of action of thyroid hormones in the adult central nervous system are poorly understood. Recent studies relate hypothyroidism with programmed cell death during development. This study aimed to evaluate the effect of hypothyroidism on programmed cell death in the adult rat forebrain, using the TUNEL method for the *in situ* end labeling of DNA fragmentation. Two experimental models of pharmacologically-induced hypothyroidism in the adult rat were used. In the first model, hypothyroidism was induced by adding methimazole (0.025% w/v) in the drinking water of rats from embryonic day 9 until postnatal day 61. In the second model, methimazole was added in the drinking water at postnatal day 35, for 4.5 weeks (1).

Our results in both models showed that TUNEL+ cells were present in almost every structure of the rat forebrain such as: anterior cingulate cortex (sparse cells), motor and somatosensory areas of the frontoparietal cortex (sparse cells), primary olfactory cortex, corpus callosum, caudate-putamen, nucleus accumbens, dorsal, intermediate and ventral parts of the lateral septal nucleus, vertical and horizontal limbs of the diagonal band of Broca and islands of Calleja. The density of TUNEL+ cells was higher in methimazole-treated rats throughout life, from gestation to adult. In contrast, our data from normal adult animals demonstrate the absence of TUNEL+ cells in the above mentioned areas.

We conclude that thyroid hormones play a crucial role in the survival of forebrain neurons and that congenital, rather than acquired, hypothyroidism has more serious effects on neuron survival.

1. Constantinou C, Margarity M, Valcana Th (2005) Region-specific effects of hypothyroidism on the relative expression of thyroid hormone receptors in adult rat brain. *Mol Cell Biochem* 278: 93-100.

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ ΣΕ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΘΙΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ ΜΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΣ ΠΡΟΚΛΗΘΕΝΤΑ ΥΠΟΘΥΡΕΟΕΙΔΙΣΜΟ**

A. Awaad Ahmed<sup>1</sup>, Θ. Ζαχαράκη<sup>1</sup>, Κ. Κωνσταντίνου<sup>2</sup>, Μ. Μαργαρίτη<sup>3</sup>, Ι. Δωρή<sup>1</sup>,  
Α. Ντινόπουλος<sup>1</sup> και Ι. Αντωνόπουλος<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Ανατομικής, Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Κτηνιατρική Σχολή,  
ΑΠΘ, 541 24 Θεσσαλονίκη

<sup>2</sup>Εργαστήριο Μεταβολικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας, ΕΙΧΗΜΥΘ, Ίδρυμα Τεχνολογίας  
και Έρευνας (ΙΤΕ), 265 04 Πάτρα

<sup>3</sup>Εργαστήριο Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 265 04  
Πάτρα

Οι ορμόνες του θυρεοειδούς παίζουν σημαντικό ρόλο στη γέννηση και την ωρίμαση των νευρώνων κατά την κρίσιμη περίοδο της ανάπτυξης του εγκεφάλου. Ανεπάρκεια των ορμονών αυτών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης έχει ως αποτέλεσμα σοβαρή διανοητική καθυστέρηση και νευρολογικά προβλήματα. Επιπλέον, η δυσλειτουργία του θυρεοειδούς στον ενήλικο οργανισμό συνοδεύεται από νευρολογικές και συμπεριφοριστικές δυσλειτουργίες. Εν τούτοις, οι μηχανισμοί δράσης των θυρεοειδικών ορμονών στο κεντρικό νευρικό σύστημα του ενήλικου δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Πρόσφατες μελέτες συσχετίζουν υποθυρεοειδισμό με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο κατά την ανάπτυξη. Η μελέτη αυτή προσπαθεί να αποκαλύψει τη σχέση υποθυρεοειδισμού και προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στον πρόσθιο εγκέφαλο του ενήλικου επίμυος, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο TUNEL για την *in situ* ανίχνευση των θραυσμάτων του DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο μοντέλα πειραματοζώων με φαρμακολογικώς προκληθέντα υποθυρεοειδισμό. Στο πρώτο, ο υποθυρεοειδισμός προκαλείται με την προσθήκη μεθιμαζόλης (methimazole, 0,025% w/v) στο πόσιμο νερό των επιμύων από την 9<sup>η</sup> εμβρυϊκή ημέρα μέχρι την 61<sup>η</sup> μεταγεννητική ημέρα. Στο δεύτερο μοντέλο η μεθιμαζόλη προτίθεται με την ίδια αναλογία στο πόσιμο νερό σε πειραματοζώα ηλικίας 35 ημερών για 4,5 εβδομάδες (1). Τα αποτελέσματά μας και στα δύο μοντέλα πειραματοζώων έδειξαν ότι TUNEL+ κύτταρα αναγνωρίστηκαν σε όλες σχεδόν τις περιοχές του πρόσθιου εγκεφάλου: στον φλοιό της πρόσθιας μοίρας του προσαγωγίου (διάσπαρτα κύτταρα), στην κινητική και στη σωματοαισθητική περιοχή του μετωπιοβρεγματικού φλοιού (διάσπαρτα κύτταρα), στον πρωτοταγή σφρηητικό φλοιό, στο μεσολόβιο, στον κερκοφόρο πυρήνα και στο κέλυφος του φακοειδούς πυρήνα, στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος, στο ραχιαίο, στο διάμεσο και στο κοιλιακό τμήμα του έξω πυρήνα του διαφράγματος, στο κάθετο και στο οριζόντιο σκέλος της διαγώνιας ταινίας Broca και στα νησίδια Calleja. Η πυκνότητα των TUNEL+ κυττάρων ήταν υψηλότερη στους επίμυες που λάμβαναν μεθιμαζόλη σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους, από την εμβρυϊκή ηλικία μέχρι την ενηλικίωση. Αντιθέτως, τα αποτελέσματά μας από φυσιολογικά ενήλικα πειραματοζώα έδειξαν απουσία TUNEL+ κυττάρων στις παραπάνω περιοχές του πρόσθιου εγκεφάλου.

Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι ορμόνες του θυρεοειδούς παίζουν καθοριστικό ρόλο στην επιβίωση των νευρώνων του πρόσθιου εγκεφάλου και ότι ο εκ γενετής υποθυρεοειδισμός έχει σοβαρότερες επιπτώσεις στην επιβίωση των νευρώνων, σε σύγκριση με τον επίκτητο.

1. Constantinou C, Margarity M, Valcana Th (2005) Region-specific effects of hypothyroidism on the relative expression of thyroid hormone receptors in adult rat brain. *Mol Cell Biochem* 278: 93-100.

## QUANTITATIVE MAPPING OF ALPHA-2A AND BETA-2 ADRENOCEPTORS IN THE ADULT ZEBRAFISH BRAIN.

*K. Ampatzis<sup>1</sup>, M. Kentouri<sup>1</sup>, and C.R. Dermon<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Department of Biology, University of Crete, Heraklion 714 07, Greece*

<sup>2</sup> *Department of Biology, University of Patras, Rion 26500, Greece*

The  $\alpha_{2A}$  and  $\beta_2$  adrenoceptor (AR) subtypes are G-protein-coupled receptors that mediate many physiological effects of noradrenaline and adrenaline. The present study aimed to determine the anatomical distribution of  $\alpha_{2A}$ -AR and  $\beta_2$ -AR subtypes in adult zebrafish (*Danio rerio*) brain, by means *in vitro* quantitative autoradiography, using the [<sup>3</sup>H]RX821002 and [<sup>3</sup>H]CGP12177 selective radioligands. In addition, the cellular localization of the AR subtypes was determined by single and double labeling immunohistochemistry.

High levels of both adrenoceptors were found in periventricular ventral telencephalon, in hypothalamic areas, such as dorsal hypothalamic nucleus (Hd), in locus coeruleus (LC) and in many other rhombencephalic areas such as, MaON, MON, reticular formation nuclei, and oculomotor nucleus. In agreement with the autoradiographic studies, cerebellar Purkinje cell somata showed both  $\alpha_{2A}$ -AR and  $\beta_2$ -AR immunoreactivity, while their dendrites were characteristically labeled only by  $\beta_2$ -ARs. It is of great interest that the majority of  $\alpha_{2A}$  immunoreactivity showed a punctuate labeling, found in terminal axons and both neuronal and glial cell somata and fibers, possibly indicating their presynaptic localization. In contrast,  $\beta_2$  immunoreactivity showed a diffuse labeling in cell bodies and proximal dendrites. The observed wide distribution pattern of both  $\alpha_{2A}$  and  $\beta_2$  adrenoceptors in neurons and fibers suggests that the adrenoceptors play an important role in the physiology of the zebrafish brain. Moreover, it further supports that the functional neuroanatomy of noradrenergic transmission is conserved in vertebrate brain evolution.

**ΠΡΟΤΥΠΟ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΩΝ  $\alpha_{2A}$  ΚΑΙ  $\beta_2$  ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟΝ  
ΕΝΗΛΙΚΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΤΟΥ ZEBRAFISH**

Κ. Αμπατζής<sup>1</sup>, Μ. Κεντούρη<sup>1</sup>, and Κ.Ρ. Δερμών<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο 714 07, Ελλάδα.

<sup>2</sup>Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίον 265 00, Ελλάδα.

Οι  $\alpha_{2A}$  και  $\beta_2$  υπότυποι των αδρενεργικών υποδοχέων ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων που είναι συνδεδεμένοι με G πρωτεΐνες και συμμετέχουν σε πολλές δράσεις της νορ-αδρεναλίνης και της αδρεναλίνης. Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο της τον καθορισμό της ανατομικής κατανομής των  $\alpha_{2A}$  και  $\beta_2$  υπότυπων των αδρενεργικών υποδοχέων στον ενήλικο εγκέφαλο του zebrafish (*Danio rerio*) με την μέθοδο της *in vitro* ποσοτικής αυτοραδιογραφίας, κάνοντας χρήση των [<sup>3</sup>H]RX821002 και [<sup>3</sup>H]CGP12177 ως επιλεκτικών ραδιοσημασμένων δεσμευτών. Επιπρόσθετα, η κυτταρική κατανομή των αδρενεργικών υποδοχέων ανιχνεύτηκε με την μέθοδο της απλής και της διπλής ανοσοϊστοχημικής σήμανσης.

Υψηλά επίπεδα και των δύο υποτυπων των αδρενεργικών υποδοχέων εντοπίστηκαν στον περικοιλιακό κοιλιακό τελεγκέφαλο, στις υποθαλαμικές περιοχές, όπως αυτή του ραχιαίου κοιλιακού υποθαλάμου (Hd), στον υπομέλανα τόπο (LC), καθώς και σε διάφορες άλλες περιοχές του ρομβοεγκεφάλου, όπως αυτή του MaON, του MON, των πυρήνων του δικτυωτού σχηματισμού, και του πυρήνα του οφθαλμοκινητικού νεύρου. Σε συμφωνία με τις αυτοραδιογραφικές μελέτες, τα σώματα των κυττάρων του Purkinje της παρεγκεφαλίδας εκφράζουν και τους δύο υπότυπους  $\alpha_{2A}$  και  $\beta_2$  των αδρενεργικών υποδοχέων, ενώ οι δένδριτες των κυττάρων αυτών εμφανίστηκαν να εκφράζουν μόνο το αντίσωμα κατά των  $\beta_2$  αδρενεργικών υποδοχέων. Μεγάλο ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός ότι η πλειονότητα της  $\alpha_{2A}$  ανοσοσήμανσης είναι στικτή, και εντοπίζεται στα κυτταρικά σώματα και τις ίνες τόσο των νευρικών όσο και των γλοιακών κυττάρων καθώς και στους νευράξονες, προτείνοντας την πιθανή προσυναπτική τους τοποθέτηση. Αντίθετα, η ανοσοσήμανση των  $\beta_2$  αδρενεργικών υποδοχέων είναι διάχυτη στα κυτταρικά σώματα και στους εγγύς δένδριτες. Η ευρεία κατανομή των  $\alpha_{2A}$  και  $\beta_2$  αδρενεργικών υποδοχέων στους νευρώνες και στις ίνες προτείνουν τον σημαντικό ρόλο τους στην φυσιολογία του εγκεφάλου στο zebrafish. Επιπλέον, τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν ότι η λειτουργική νευροανατομία της νοραδρενεργικής διαβίβασης είναι καλά συντηρημένη στην εξέλιξη του εγκεφάλου των σπονδυλωτών.



## ROLE OF 5-HT<sub>2A</sub> AND 5-HT<sub>2C</sub> RECEPTORS ON REWARD

*K. Apazoglou and G. Panagis*

*University of Crete, Department of Psychology, Laboratory of Behavioral Neuroscience, 74100 Rethymno, Crete, Greece*

Serotonergic neurotransmission is hypothesized to be involved in motivational processes and reward function. Nevertheless, the exact role of serotonin (5-HT) on reward function remains unclear. Specifically, increases or decreases in serotonin produced inconsistent results, as either increase or decrease reward processes. The purpose of the present study was to systematically examine the role of serotonin, and more specifically the 5-HT<sub>2A</sub> and the 5-HT<sub>2C</sub> receptors on brain reward. High to moderate levels of 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors have been observed in several structures of the mesocorticolimbic dopamine system, which has a long association with reward function. It has been hypothesized that 5-HT acts through these receptors to modulate dopaminergic neurotransmission and accordingly reward function.

In the present study the effects of graded doses of selective ligands for the 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors were investigated on brain reward using the rate-frequency psychophysical method of intracranial self-stimulation paradigm. Male Sprague-Dawley rats were implanted with a monopolar stimulating electrode into the medial forebrain bundle (MFB) at the level of the lateral hypothalamus. Rate-frequency functions were determined by logarithmically decreasing the number of cathodal pulses in a stimulation train from a value that sustained maximal responding to one that did not sustain responding. After brain reward threshold stabilized rats received treatments with the selective 5-HT<sub>2A</sub> agonist TCB-2 (graded doses 0, 0.03, 0.1 και 0.3 mg/kg, ip), the selective 5-HT<sub>2A</sub> antagonist R-96544 (graded doses 0, 0.1, 0.3 και 1 mg/kg, sc), the selective 5-HT<sub>2C</sub> agonist WAY-161503 (graded doses 0, 0.1, 0.3 και 1 mg/kg, sc) and the selective 5-HT<sub>2C</sub> antagonist RS-102221 (graded doses 0, 2.5, 5 και 10 mg/kg, ip).

Systemic injections of the 5-HT<sub>2A</sub> agonist TCB-2 and the 5-HT<sub>2C</sub> agonist WAY-161503 induced a dose-dependent increase in reward threshold. To the contrary, both the 5-HT<sub>2A</sub> antagonist R-96544 TCB-2 and the 5-HT<sub>2C</sub> antagonist RS-102221 failed to alter reward at any of the doses tested. The results of the present study suggest a reward decreasing effect following activation of 5-HT<sub>2A</sub> or 5-HT<sub>2C</sub> receptors, as systemic administration of the 5-HT<sub>2A</sub> agonist TCB-2 and the 5-HT<sub>2C</sub> agonist WAY-161503 decreased the reinforcing efficacy of brain stimulation. The present data support the hypothesis that serotonin exerts an inhibitory influence on reward processes. The results could be interpreted in terms of inhibition exerted by 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptor stimulation on the dopaminergic system. An attempt to reproduce these results will be made using intracranial microinjections of these drugs in the brain areas of the mesocorticolimbic dopaminergic system expressing 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors.

## Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ 5-HT<sub>2A</sub> ΚΑΙ 5-HT<sub>2C</sub> ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΤΑΜΟΙΒΗ

*Κ. Απαζόγλου και Γ. Παναγής*

*Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ψυχολογίας, Εργαστήριο Νευροεπιστημών & Συμπεριφοράς, 74100 Ρέθυμνο, Κρήτη*

Η σεροτονινεργική νευροδιαβίβαση θεωρείται ότι εμπλέκεται σε διεργασίες κινητοποίησης και στη λειτουργία της ανταμοιβής. Εν τούτοις, ο ακριβής ρόλος της σεροτονίνης (5-HT) στη λειτουργία της ανταμοιβής παραμένει ασαφής. Συγκεκριμένα, υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα καθώς αύξηση ή μείωση της σεροτονίνης είτε αυξάνει είτε μειώνει την ανταμοιβή. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί συστηματικά ο ρόλος της σεροτονίνης, και πιο συγκεκριμένα των 5-HT<sub>2A</sub> και των 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχέων στην ανταμοιβή. Μέτρια έως υψηλά επίπεδα 5-HT<sub>2A</sub> και 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχέων έχουν βρεθεί σε διάφορες περιοχές του μεσομεταιχμιακού-μεσοφλοιικού ντοπαμινεργικού συστήματος, το οποίο έχει εδώ και αρκετά χρόνια σχετιστεί με τη λειτουργία της ανταμοιβής. Έχει υποστηριχθεί ότι η σεροτονίνη δρα μέσω αυτών των υποδοχέων ρυθμίζοντας την ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση και κατ' επέκταση τη λειτουργία της ανταμοιβής.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι δράσεις αυξανόμενων δόσεων εκλεκτικών προσδεμάτων για τους 5-HT<sub>2A</sub> και 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχείς στην ανταμοιβή χρησιμοποιώντας το πρότυπο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού παράλληλα με την ψυχοφυσική μέθοδο μετατόπισης της καμπύλης. Σε αρσενικούς επίμυες Sprague-Dawley εμφυτεύθηκε ένα μονοπολικό διεγερτικό ηλεκτρόδιο στην έσω τηλεγκεφαλική δεσμίδα στο επίπεδο του έξω υποθαλάμου. Ελήφθησαν καμπύλες αντιδράσεων-συχνότητας ερεθισμού μειώνοντας λογαριθμικά τον αριθμό των καθοδικών παλμών στην παλμοσειρά ερεθισμού από μία τιμή που προκαλούσε το μέγιστο ποσοστό αντιδράσεων στο πειραματόζωο σε μία τιμή όπου το πειραματόζωο δεν αντιδρούσε. Μετά τη σταθεροποίηση του ουδού ανταμοιβής τα πειραματόζωα έλαβαν αυξανόμενες δόσεις του εκλεκτικού αγωνιστή των 5-HT<sub>2A</sub> υποδοχέων TCB-2 (0, 0.03, 0.1 και 0.3 mg/kg, ip), του εκλεκτικού ανταγωνιστή των 5-HT<sub>2A</sub> υποδοχέων R-96544 (0, 0.1, 0.3 και 1 mg/kg, sc), του εκλεκτικού αγωνιστή των 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχέων WAY-161503 (0, 0.1, 0.3 και 1 mg/kg, sc) και του εκλεκτικού ανταγωνιστή των 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχέων RS-102221 (0, 2.5, 5 και 10 mg/kg, ip).

Οι συστηματικές χορηγήσεις του αγωνιστή των 5-HT<sub>2A</sub> υποδοχέων TCB-2 και του αγωνιστή των 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχέων WAY-161503 προκάλεσαν μια δοσοεξαρτώμενη αύξηση στον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού. Αντιθέτως, τόσο ο ανταγωνιστής των 5-HT<sub>2A</sub> υποδοχέων R-96544 όσο και ο ανταγωνιστής των 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχέων RS-102221 δεν επηρέασαν την ανταμοιβή σε κάποια από τις δόσεις που μελετήθηκαν. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι η διέγερση των 5-HT<sub>2A</sub> ή 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχέων μειώνει την ανταμοιβή, καθώς η συστηματική χορήγηση των αγωνιστών αυτών των υποδοχέων TCB-2 και WAY-161503 μείωσε την αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης του εγκεφαλικού ερεθισμού. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η σεροτονίνη ασκεί ανασταλτική δράση στις διεργασίες ανταμοιβής. Τα ευρήματα αυτά μπορούν να ερμηνευτούν μέσω της αναστολής που προκαλεί στο ντοπαμινεργικό σύστημα η διέγερση των 5-HT<sub>2A</sub> και 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχέων. Ενδιαφέρουσα θα είναι η επιβεβαίωση των συγκεκριμένων ευρημάτων μέσα από μελέτες ενδοεγκεφαλικών μικροεγχύσεων των εκλεκτικών αυτών φαρμάκων σε περιοχές του μεσομεταιχμιακού-μεσοφλοιικού ντοπαμινεργικού συστήματος όπου παρατηρείται έκφραση των 5-HT<sub>2A</sub> και 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχέων.

## IN VIVO ASSESSMENT OF THE ACTIVITY OF THE NICOTINIC INSECTICIDE IMIDACLOPRID ON RESPIRATORY RHYTHM OF THE RAT\*

Arabatzi H<sup>1</sup>., Vasileiou C<sup>1</sup>., Kosmidis E., Papaefthimiou C. and Theophilidis G.

*Laboratory of Animal Physiology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki*

The neonicotinoid insecticide imidacloprid (IMI) acts on centre nervous system, like nicotine, mainly as a co-agonist of acetylcholine on metasynaptic receptors of cholinergic synapses. The high toxicity of IMI on insects is caused by the high affinity of IMI with the subunits of nicotinic receptors. Because little is known on the toxicity of IMI on mammals, the purpose of the present work is to investigate the effects of IMI on the respiratory rhythm of the rat. The methodology used includes anaesthesia with chloral hydrate, anatomy for the exposure of carotid arteries, constant recording of Electrocardiogram (ECG), whereas in order to record the respiratory rhythm, a transducer was used in the thorax of the anaesthetised rat. The recordings were made constantly for 80 minutes after the infusion of IMI into the carotid artery. The concentrations of IMI in blood plasma are  $7.5 \times 10^{-5}$  M and  $22.5 \times 10^{-5}$  M. In a plasma concentration of  $7.5 \times 10^{-5}$  M, IMI caused a non-significant ( $p > 0.05$ ) increase in total duration of the respiratory rhythm by  $15 \pm 5\%$  ( $n=4$ ) compared with control values, 80 minutes after the infusion. At the same period a non-significant decrease was noticed in the respiratory frequency, while the rise time of inhalation increased up to  $30 \pm 10\%$  ( $p < 0.05$ ). In plasma concentration of  $22.5 \times 10^{-5}$  M the total duration increased by  $20 \pm 7\%$ . A significant decrease in frequency by  $20 \pm 5\%$  and an increase in rise time by  $40 \pm 8\%$  were also noticed. In contrast to respiratory activity, no significant changes were observed on ECG, an indication that other basic functions of the animal remained unaffected. The results point out the effect of IMI on the respiratory control centre, where there are neuronal networks with cholinergic (nicotinic) synapses. The abundance of muscarinic cholinergic receptors in cardiac myocytes probably accounts for the lack of activity of IMI in heart rate.

<sup>1</sup> *The first two authors contributed equally to the work*

*\*The research was financed from Ministry of National Education and Religious Affairs and European Union in the frame of Pythagoras Project II*

## IN VIVO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΝΙΚΟΤΙΝΙΚΟΥ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟΥ IMIDACLOPRID ΣΤΟΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΡΥΘΜΟ ΤΟΥ ΕΠΙΜΥΟΣ\*

*Αραμπατζή Η.<sup>1</sup>, Βασιλείου Χ<sup>1</sup>, Κοσμίδης Ε., Παπαευθυμίου Χ. και Θεοφιλίδης Γ.*

*Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας,  
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*

Το νικοτινικό εντομοκτόνο Imidacloprid (IMI) ενεργεί, όπως και η νικοτίνη, στο νευρικό σύστημα, δρώντας ως συναγωνιστής της ακετυλοχολίνης στους μετασυναπτικούς υποδοχείς των χολινεργικών συνάψεων. Στα έντομα η μεγάλη συγγένεια του IMI με τις υπομονάδες των νικοτινικών υποδοχέων τους, εξηγεί την υψηλή τοξικότητά του. Οι μελέτες της δράσης του imidacloprid στα θηλαστικά είναι ανύπαρκτες. Σκοπός της εργασίας είναι η αξιολόγηση της δράσης του IMI στον αναπνευστικό ρυθμό του επίμυος. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει, αναισθησία με ένδρη χλωράλη, ανατομία για την έκθεση των καρωτιδικών αρτηριών, συνεχή καταγραφή του ηλεκτροκαρδιογραφήματος (ΗΚΓ), ενώ για τον αναπνευστικό ρυθμό χρησιμοποιήθηκε μεταγωγέας τάσης που εφαρμόστηκε στο θώρακα του αναισθητοποιημένου επίμυος. Οι καταγραφές γίνονται για 80 λεπτά μετά την έγχυση του IMI στην καρωτιδική αρτηρία όπου οι τελικές συγκεντρώσεις στο πλάσμα του αίματος είναι  $7.5 \times 10^{-5}$  M και  $22.5 \times 10^{-5}$  M. Το IMI σε συγκέντρωση πλάσματος  $7.5 \times 10^{-5}$  M αυξάνει τη συνολική διάρκεια του αναπνευστικού ρυθμού κατά  $15 \pm 5\%$  (n=4), στατιστικά μη σημαντική μεταβολή ( $p > 0.05$ ), σε σχέση με τον μάρτυρα 80 λεπτά μετά την έγχυση. Στο ίδιο χρονικό διάστημα παρατηρείται μία στατιστικά μη σημαντική μείωση στη συχνότητα της αναπνοής ενώ, ο χρόνος ανόδου της εισπνοής σημειώνει αύξηση κατά  $30 \pm 10\%$  ( $p < 0.05$ ). Σε συγκέντρωση πλάσματος  $22.5 \times 10^{-5}$  M, η συνολική διάρκεια αυξάνεται κατά  $20 \pm 7\%$ , παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση στη συχνότητα κατά  $20 \pm 5\%$  και αύξηση στο χρόνο ανόδου κατά  $40 \pm 8\%$ . Στον καρδιακό ρυθμό δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές αλλαγές, ένδειξη ότι οι άλλες βασικές λειτουργίες παραμένουν ανεπηρέαστες. Τα αποτελέσματα καθιστούν σαφή την επίδραση του IMI στο κέντρο του αναπνευστικού ρυθμού, όπου υπάρχουν νευρωνικά δίκτυα με χολινεργικές (νικοτινικές) συνάψεις. Η ύπαρξη κυρίως μουσκαρινικού τύπου υποδοχέων στην καρδιά πιθανόν να εξηγεί την έλλειψη δράσης του IMI στην καρδιακή λειτουργία.

<sup>1</sup> *Ισοδύναμη συμμετοχή των συγγραφέων*

*\*Η έρευνα χρηματοδοτήθηκε από το Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων και την Ευρωπαϊκή Ένωση στα πλαίσια του προγράμματος Πυθαγόρας II*

## CB1 CANNABINOID RECEPTOR AGONISTS INDUCE CB1 RECEPTOR ENRICHMENT IN LIPID RAFTS AND TRANSACTIVATION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR EGFR

*Olga Asimaki<sup>1</sup>, Nikolaos Sakellaridis<sup>2</sup> and Dimitra Mangoura<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Basic Neurosciences Division*

<sup>2</sup> *Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Thessaly, Larissa, Greece*

Cannabinoids are the active ingredients in cannabis and their pharmacological effects in the CNS have been shown to be mediated after binding to the CB1 cannabinoid receptor (CB1R). CB1Rs are coupled to  $G_{i/o}$  proteins which once activated by the binding of ligand agonist, initiate various changes in intracellular signalling pathways. The discovery of the endogenous ligands has suggested that the cannabinoid neuromodulatory system plays important roles in many physiological processes, such as learning and memory. The CB1 receptor exerts its effects through several signalling events, which include the activation of the extracellular signal-regulated kinase. The mechanism, however, by which this G-protein coupled receptor triggers ERK activation is not well understood. To investigate the molecular events coupling CB1 activation to ERK activation, we first generated clonal SHSY-5Y neuroblastoma cell lines which stably overexpress EGFP-CB1R (SH-SY5Y-CB1 cells) and assessed whether this coupling could be mediated via transactivation of growth factor receptors with intrinsic tyrosine kinase activity. Indeed, we have found that the CB1R agonist Methanandamide specifically stimulated, in a time-dependent manner, tyrosine phosphorylation of several cellular proteins, including phosphorylation of the EGF receptor (EGFR), Src kinase and ERK1/2, and that these effects were abolished by the specific CB1 antagonist AM251 as well as the EGFR kinase inhibitor AG1478. In a new line of experiments EGFR transactivation by cannabinoid agonist was further supported by measurements of Ras activity. Ras assay revealed elevated Ras activity after Methanandamide treatment, which was abolished by AG1478. In analyzing this mechanism, we investigated whether lipid rafts, which are low density plasma membrane microdomains where EGFR and other GPCR reside, play a role. Therefore, we specifically investigated the subcellular distribution of the CB1R in basal conditions in SH-SY5Y-CB1 cells and its trafficking in response to agonist stimulation, as well as the distribution of phosphorylated EGFR in the same conditions. We found that under basal conditions, CB1R is mainly distributed in fractions 5-9 (contain plasma-membrane, mitochondria, ER membranes, caveolin-rich domains), whereas after treatment with CB1 agonist Methanandamide we observed redistribution of the receptor into the lighter fractions which mainly contain lipid rafts. Moreover, we found that phosphorylated (activated) species of EGFR appeared in the same fractions after Methanandamide treatment. Most importantly, this effect was completely abolished by AG1478. These data provide a first evidence that in a neuronal cellular background, the CB1R intracellular signaling engages the specific transactivation of the tyrosine kinase EGF receptor after intramolecular interactions in the lipid rafts to regulate ERK activation and downstream transcriptional events. (*supported by 03EA778 Grant from the Greek Ministry of Research and Technology*)

**ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ CB1 ΕΠΑΓΟΥΝ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ CB1R ΣΕ ΛΙΠΙΔΙΚΕΣ ΠΛΑΤΦΟΡΜΕΣ (RAFTS) ΚΑΙ ΤΗΝ ΔΙΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (EGFR)**

*Όλγα Ασημάκη<sup>1</sup>, Νικόλαος Σακελλαρίδης<sup>2</sup>, Δήμητρα Μάγκουρα<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup> Κέντρο Νευροεπιστημών, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών*

*<sup>2</sup> Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα*

Τα κανναβινοειδή είναι τα ενεργά συστατικά της κάνναβης και τα φαρμακολογικά τους αποτελέσματα στο ΚΝΣ λαμβάνουν χώρα έπειτα από δέσμευσή τους στον κανναβινοειδή υποδοχέα CB1, CB1R. Η πρόσφατη ταυτοποίηση του ενδογενούς συστήματος των κανναβινοειδών στον εγκέφαλο, συγκεκριμένα η υψηλή έκφραση του CB1 υποδοχέα στο κεντρικό νευρικό σύστημα και η ανακάλυψη των ενδογενών αγωνιστών, έχουν υποδείξει πως το νευροτροποποιητικό σύστημα των κανναβινοειδών παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλούς φυσιολογικούς μηχανισμούς, όπως η μνήμη και η μάθηση. Οι CB1 υποδοχείς που ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνες G, μετά την ενεργοποίησή τους μπορούν να εγείρουν διάφορες αλλαγές στις ενδοκυττάρειες σηματοδοτικές οδούς. Η ενδοκυττάρια σηματοδότηση από αυτόν τον διαμεμβρανικό υποδοχέα περιλαμβάνει ενεργοποίηση της ρυθμιζόμενης από εξωκυτταρικά μηνύματα πρωτεϊνικής κινάσης ERK, αλλά ο μηχανισμός δεν είναι ακόμα κατανοητός. Προκειμένου, συνεπώς, να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί που συνδέουν την ενεργοποίηση του CB1 υποδοχέα με την ενεργοποίηση της ERK, και συγκεκριμένα το εάν μεσολαβεί διενεργοποίηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) όπως έχει περιγραφεί για άλλους GPCRs, δημιουργήσαμε κλώνους της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y νευροβλαστώματος που υπερεκφράζουν σταθερά τον EGFP-CB1R (SH-SY5Y-CB1). Πράγματι τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο αγωνιστής του CB1R Μεθανανδαμίδιο (methanandamide) [9μM] προκάλεσε τη φωσφορυλίωση πολλών πρωτεϊνών, και ειδικότερα του ίδιου του EGFR, της τυροσινικής κινάσης SRC και της ERK1/2, δράση η οποία αναστράφηκε τόσο από ειδικούς CB1R ανταγωνιστές (AM251) όσο και από αναστολείς της δραστηριότητας του EGFR (AG1478). Σε μια νέα σειρά πειραμάτων η διενεργοποίηση του EGFR από τον αγωνιστή των κανναβινοειδών υποστηρίχθηκε επιπλέον μετά από προσδιορισμό της δραστηριότητας του Ras. Ο προσδιορισμός αυτός έδειξε αυξημένη δραστηριότητα του Ras έπειτα από επίδραση Μεθανανδαμιδίου, που αναστράφηκε από τον AG1478. Προκειμένου να διερευνησουμε περαιτέρω την διενεργοποίηση του EGFR από τον CB1 εξετάσαμε την περίπτωση οι πλατφόρμες λιπιδίων, μικροπεριβάλλοντα που περιέχουν μεγάλο αριθμό σηματοδοτικών μορίων, να είναι οι μοριακές πλατφόρμες στις οποίες συμβαίνει η αλληλεπίδραση CB1R και EGFR. Για το λόγο αυτό, αναλύσαμε την υποκυτταρική κατανομή του CB1R απουσία και παρουσία του αγωνιστή του CB1R, καθώς και την κατανομή του φωσφορυλιωμένου EGFR στις ίδιες συνθήκες. Βρήκαμε ότι ο CB1R είναι ως επί το πλείστον κατανεμημένος στα κλάσματα 5-9 που περιέχουν κυρίως πλασματική μεμβράνη, μιτοχόνδρια, και μεμβράνες ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ μετά την επίδραση του Μεθανανδαμιδίου παρατηρήσαμε ανακατανομή του υποδοχέα στα κλάσματα 1-5, που περιέχουν κυρίως rafts. Επιπρόσθετα, διαπιστώσαμε ότι φωσφορυλιωμένες μορφές του EGFR εμφα-νίστηκαν στα ίδια κλάσματα με το CB1 μετά από την επίδραση του Μεθανανδαμιδίου. Πιο σημαντικά, η δράση αυτή αναστράφηκε από τον AG1478. Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύουν την υπόθεση ότι ο μηχανισμός ενεργοποίησης της ERK από τον CB1R σε νευρωνικά κύτταρα επιτυγχάνεται μέσω της διενεργοποίησης του EGFR μετά από μοριακές αλληλεπιδράσεις στις πλατφόρμες λιπιδίων. (χρηματοδότηση από το 03ΕΔ778 έργο του ΠΙΝΕΔ 2003 της ΓΓΕΤ).

## PREVENTION OF OXALIPLATIN – RELATED NEUROTOXICITY BY GRAPE SEED EXTRACT: AN EXPERIMENTAL STUDY IN RATS

*Bekiari C.*<sup>1</sup>, *Kouretas D.*<sup>2</sup>, *Emmanouilides C.E.*<sup>3</sup>, *Emmanouilides C.J.*<sup>4</sup>, *Skaltsounis L.*<sup>5</sup>,  
*Tsingotjidou A.*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Lab. of Anatomy and Histology, School of Veterinary Medicine,*

<sup>4</sup>*Department of Economic Sciences, School of Law, Economics, and Political Science, Aristotle University of Thessaloniki,* <sup>2</sup>*Laboratory of Animal Physiology, School of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa,* <sup>3</sup>*Interbalkan Medical Center, Department of Oncology, 57001, Thessaloniki* <sup>5</sup>*Division of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Athens, Athens, Greece*

Oxaliplatin is a highly active, platinum based, chemotherapeutic agent with broad applications in therapeutic oncology. In addition to an acute neurotoxicity, oxaliplatin administration is also associated with a sensory polyneuropathy. In this study we evaluated the efficacy of grape seed extract (GSE) for prevention of oxaliplatin associated peripheral neuropathy in rats. GSE is proven to have antioxidant activity, mainly due to its proanthocyanidin (oligomers and monomeric polyphenols) content, which may protect the dorsal root ganglia (DRG) neuronal cells, primary drug targets, from the oxidative stress caused by oxaliplatin.

A total of 30 young adult female Wistar rats were used in this study, which were assigned to one of four groups, A, B, C or D. Group A animals (n=5) were used as dextrose control group while group B, C and D animals received oxaliplatin treatment at a dose of 3 mg/kg biweekly for eight weeks. Groups C and D were provided with GSE in water at a level of 75 mg per day per animal for eleven weeks (Group C; n=10; GSE pre-treatment was administered for an additional 3-week period before oxaliplatin treatment) or eight weeks (Group D; n=10; GSE and oxaliplatin treatment started simultaneously). Clinical and behavioral studies; Functional Observational Battery tests, gait control measurements and other sensory tests, including touch response test, were performed at baseline, mid- treatment, end of treatment and at two weeks post- treatment, in order to monitor impairments in peripheral nerves due to neurotoxicity caused by oxaliplatin. The fifth lumbar (L5) DRG was dissected out from all animals and examined histologically for neuronal morphological and populational alterations. Counts were estimated using the Image analysis Pro-Plus program. Statistical analysis was performed using the SPSS program to assess differences between groups.

In a preliminary statistical analysis there is documentation of ataxia in certain parameters evaluated which was induced by oxaliplatin. The administration of GSE showed a trend towards amelioration of these impairments, especially of the touch response test which verifies possible sensory neuropathy: the oxaliplatin treated group showed a statistical significant delayed touch response, which did not occur in the treatment groups C and D. This result is indicative of the prophylactic effect of GSE in neuropathy associated with oxaliplatin. Further statistical analysis of the results is in progress along with the histologic analysis of the tissue mainly affected by oxaliplatin.

**ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ  
ΟΞΑΛΙΠΛΑΤΙΝΑ ΑΠΟ ΕΝΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΣΠΟΡΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ**

*Μπεκιάρη Χ.<sup>1</sup>, Κουρέτας Δ.<sup>2</sup>, Εμμανουηλίδης Χ. Ε.<sup>3</sup>, Εμμανουηλίδης Χ. Ι.<sup>4</sup>, Σκαλτσούνης Α.<sup>5</sup>,  
Τσιγκοτζίδου Α.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Εργαστήριο Ανατομικής και Ιστολογίας, Κτηνιατρική Σχολή, <sup>4</sup>Τμήμα Οικονομικών Επιστημών, Σχολή Νομικών, Οικονομικών και Πολιτικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, <sup>2</sup>Σχολή Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 41221, Λάρισα, <sup>3</sup>Διαβαλκανικό Ιατρικό Κέντρο, Ογκολογικό Τμήμα, 57001, Θεσσαλονίκη <sup>5</sup>Φαρμακευτική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Η οξαλιπλατίνη είναι ένας χημειοθεραπευτικός παράγοντας που χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπευτική ογκολογία. Η χορήγησή της σχετίζεται με μία ελεγχόμενη οξεία νευροτοξικότητα, και μία δοσοεξαρτώμενη χρόνια αισθητική πολυνευροπάθεια. Στην εργασία αυτή αξιολογήσαμε την ικανότητα ενός εκχυλίσματος σπόρων σταφυλιού (GSE) ως προς την πρόληψη της προκαλούμενης από την οξαλιπλατίνη περιφερικής νευροπάθειας στους αρουραίους. Το GSE έχει αποδειχθεί πως παρουσιάζει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, που κυρίως οφείλονται στις προανθοκυανιδίνες (ολιγομερείς και μονομερείς πολυφαινόλες) που αυτό περιέχει. Πιθανώς το εκχύλισμα αυτό να προστατεύει τους νευρώνες των νωτιαίων γαγγλίων, που είναι ο κύριος στόχος της οξαλιπλατίνης, από το οξειδωτικό στρες που αυτή προκαλεί.

Τριάντα ενήλικοι θηλυκοί επίμυες φυλής Wistar χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία, και ταξινομήθηκαν σε μία από τις τέσσερις ομάδες, Α, Β, Γ και Δ. Τα ζώα της ομάδας Α (5 ζώα) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, λαμβάνοντας μόνο δεξτρόζη, ενώ στα ζώα των ομάδων Β, Γ και Δ χορηγήθηκε οξαλιπλατίνη στη δοσολογία των 3mg/kg σωματικού βάρους δύο φορές την εβδομάδα για οχτώ εβδομάδες. Τα ζώα των ομάδων Γ και Δ κατανάλωναν καθημερινά μέσα στο πόσιμο νερό GSE στη δοσολογία των 75 mg/ζώο/ημέρα. Στα ζώα της ομάδας Γ (10 ζώα) η χορήγηση του GSE ξεκίνησε τρεις εβδομάδες νωρίτερα από την πρώτη έγχυση της οξαλιπλατίνης, ενώ στα ζώα της ομάδας Δ (10 ζώα) η χορήγηση του εκχυλίσματος και της οξαλιπλατίνης ξεκίνησε ταυτόχρονα. Η κλινική μελέτη της συμπεριφοράς των ζώων αξιολογήθηκε με βάση τη μέθοδο FOB (=Functional Observational Battery), με αναλύσεις του βαδίσματος, και με άλλους ελέγχους αισθητικότητας, όπως ο έλεγχος της αντίδρασης στο άγγιγμα με βελόνα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την περίοδο πριν τη χορήγηση οποιασδήποτε ουσίας, στη μέση της περιόδου χορηγήσεων, μετά και την τελευταία χορήγηση και τέλος μετά από μια περίοδο ανάρρωσης δύο εβδομάδων, με στόχο να εντοπιστούν οι λειτουργικές βλάβες των περιφερικών νευρών που προκλήθηκαν από τη χορήγηση της οξαλιπλατίνης. Το πέμπτο οσφυϊκό νωτιαίο γάγγλιο κάθε ζώου εξετάστηκε ιστολογικά με σκοπό την ανεύρεση μορφολογικών και πληθυσμιακών μεταβολών των νευρώνων του.

Η αταξία που προκλήθηκε από την οξαλιπλατίνη καταγράφηκε με διάφορες παραμέτρους, που αξιολογήθηκαν με στατιστική ανάλυση. Η χορήγηση του GSE έδειξε μία τάση για άμβλυνση των βλαβών που προκάλεσε η οξαλιπλατίνη, ειδικά στον έλεγχο της αντίδρασης στο άγγιγμα με βελόνα που υποδηλώνει αισθητική νευροπάθεια: Η ομάδα των ζώων που τους χορηγήθηκε οξαλιπλατίνη έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση της αντίδρασης στο άγγιγμα με βελόνα, που δε παρατηρήθηκε στην ομάδα Γ και Δ. Αυτό το αποτέλεσμα είναι ενδεικτικό της προστασίας που παρέχει το GSE στην νευροπάθεια που σχετίζεται με την οξαλιπλατίνη. Περισσότερη στατιστική ανάλυση όλων των διαφορετικών χρονικών στιγμών καθώς και ιστολογικός έλεγχος των ιστών που επηρεάζονται περισσότερο από την οξαλιπλατίνη βρίσκονται σε εξέλιξη.



**STIMULATION OF A<sub>2A</sub> ADENOSINE RECEPTORS ELICITS *IN VIVO* PHOSPHORYLATION OF DARPP-32 BUT NOT OF ERK 1/2 IN "WEAVER" MICE, A GENETIC MODEL OF DOPAMINE DEFICIENCY**

*K. Botsakis<sup>1</sup>, O. Pavlou<sup>2</sup>, P. Poulou<sup>3</sup>, N. Matsokis<sup>1</sup>, F. Angelatou<sup>3</sup>.*

*1. Lab of Human and Animal Physiology, Dept. of Biology, University of Patras, Greece.*

*2. Dept. of Materials Science, School of Natural Sciences, University of Patras, Greece.*

*3. Dept. of Physiology, Medical School, University of Patras, Greece.*

Adenosine, a major neuromodulator in the CNS, exerts its effects in basal ganglia by acting through its A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> adenosine receptors. The A<sub>2A</sub> receptors are co-localized and interact functionally with D<sub>2</sub> receptors, on the medium sized spiny neurons of the "indirect" pathway in striatum, exerting opposing actions on neurotransmitter release, gene expression, and motor behavior. A recent study from our laboratory (Ekonomou et al, 2004) has shown that *in vivo* activation of adenosine A<sub>2A</sub> receptors, by an acute administration of CGS21680 (an A<sub>2A</sub> receptor agonist), elicits a strong expression of the immediate early gene (IEG) zif/268 mRNA in striatum and motor cortex of "weaver", but not of the control mice. In the present study, we set out to investigate the signal transduction pathway via which the expression of zif/268 is induced. Therefore we studied the *in vivo* phosphorylation of DARPP-32 at Th<sup>34</sup> after stimulation of A<sub>2A</sub> receptors. The p-DARPP-32 Th<sup>34</sup> is a central molecule in the signal transduction pathway of A<sub>2A</sub> receptors in medium the spiny neurons and a potent inhibitor of protein-phosphatase-1 (PP-1). Towards this end, we examined the possible activation of the Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) pathway with the detection of p-ERK1/2. The experimental approach utilized western-blot analysis and specific antibodies against p-DARPP32 at Th<sup>34</sup> and p-ERK1/2.

The results showed that the basic levels of p-DARPP-32 Th<sup>34</sup> in "weaver" animals are significantly increased compared to the controls. The *in vivo* stimulation of A<sub>2A</sub> using CGS 21680 led to further increased levels of phosphorylated DARPP-32. Consistently, the A<sub>2A</sub> antagonist MSX-3 decreased considerably the basic levels of phosphorylation. The basic levels of p-ERK1/2 in the "weaver" animals were also found elevated compared to the controls. Interestingly, the *in vivo* stimulation of A<sub>2A</sub> with CGS 21680 caused significant reduction of the phosphorylation states of p-ERK1/2 while the antagonist MSX-3 led to further increase of the phosphorylation.

In conclusion, our results a) indicate that the increased endogenous levels of p-DARPP-32 Th<sup>34</sup> in the "weaver" mice probably rely on the hypersensitivity of A<sub>2A</sub> receptors appearing under dopamine deficiency and b) they indicate an enhanced function of the A<sub>2A</sub>/c-AMP/PKA/p-DARPP-32/CREB/ZIF-268 signalling, which by further stimulation of A<sub>2A</sub> receptors leads to the expression of zif/268 in the "weaver" but not in the control mice. On the contrary, the induction zif/268 in "weaver" mice via the A<sub>2A</sub> receptors does not appear to involve the MAPK signalling. Finally, the mechanism accounting for the increased levels of endogenous p-ERK1/2 in "weaver" mice as well as the suppressive effect of A<sub>2A</sub> receptors agonists should be further investigated.

\* *Ekonomou et al, Neuroscience 123 (2004) 1025-1036*

**ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΩΝ A<sub>2A</sub> ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΑΔΕΝΟΣΙΝΗΣ ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΤΗΝ *IN VIVO* ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ DARPP-32 ΑΛΛΑ ΟΧΙ ΤΗΣ ERK 1/2 ΣΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΗΣ ΑΠΟΝΕΥΡΩΣΗΣ ΜΥ "WEAVER"**

*Κ. Μποτσάκης<sup>1</sup>, Ο. Παύλου<sup>2</sup>, Π. Πούλου<sup>3</sup>, Ν. Ματσώκης<sup>1</sup>, Φ. Αγγελάτου<sup>3</sup>.*

*1.Εργαστήριο Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Παν/μιο Πατρών.*

*2.Τμήμα Επιστήμης των Υλικών, Σχολή Θετικών Επιστημών Παν/μιο Πατρών.*

*3.Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική σχολή, Παν/μιο Πατρών.*

Η αδενοσίνη ρυθμίζει την λειτουργία των βασικών γαγγλίων μέσω των A<sub>1</sub> και A<sub>2A</sub> υποδοχέων της. Οι A<sub>2A</sub> υποδοχείς συνεδράζουν και αλληλεπιδρούν ανταγωνιστικά με τους D<sub>2</sub> υποδοχείς ντοπαμίνης στους νευρώνες της έμμεσης οδού των βασικών γαγγλίων, στο επίπεδο της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών της έκφρασης γονιδίων και της κινητικής συμπεριφοράς.

Προηγούμενα αποτελέσματα μας (Ekonomou *et al* 2004)\* έδειξαν ότι *in vivo* διέγερση των A<sub>2A</sub> υποδοχέων αδενοσίνης με τον αγωνιστή CGS 21680, επάγει την έντονη έκφραση του mRNA του μεταγραφικού παράγοντα zif/268 στο ραβδωτό σώμα και στον εγκεφαλικό φλοιό στο μυ "weaver" αλλά όχι στο φυσιολογικό. Στη παρούσα εργασία θέλοντας να διερευνήσουμε το μονοπάτι της μεταγωγής σήματος μέσω του οποίου επάγεται η έκφραση του zif/268 μελετήσαμε μετά από διέγερση των A<sub>2A</sub> υποδοχέων, την *in vivo* φωσφορυλίωση της DARPP-32 στη θέση Th<sup>34</sup>. Η p-DARPP-32 Th<sup>34</sup> αποτελεί το κεντρικό μόριο στην μεταγωγή σήματος των A<sub>2A</sub> υποδοχέων και είναι αναστολέας της protein-phosphatase-1 (PP-1). Επιπλέον μελετήθηκε η εμπλοκή της Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) με την ανίχνευση της p-ERK1/2. Ο προσδιορισμός έγινε με western-blotting και χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι της p-DARPP-32 Th<sup>34</sup> και της p-ERK1/2.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα βασικά επίπεδα της p-DARPP-32 Th<sup>34</sup> στο "weaver" μυ είναι σημαντικά αυξημένα ως προς τα φυσιολογικά ζώα. Επιπλέον η *in vivo* διέγερση των A<sub>2A</sub> με χορήγηση CGS 21680 οδήγησε σε περαιτέρω αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της DARPP-32. Αντίθετα η χορήγηση του ανταγωνιστή των A<sub>2A</sub>, MSX-3, μείωσε σημαντικά τα βασικά επίπεδα φωσφορυλίωσης. Επίσης αυξημένα βρέθηκαν και τα βασικά επίπεδα της p-ERK1/2 στα "weaver" ζώα σε σχέση με τα φυσιολογικά. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η *in vivo* διέγερση των A<sub>2A</sub> με CGS 21680 προκάλεσε σημαντική μείωση των επιπέδων της p-ERK1/2 ενώ ο ανταγωνιστής MSX-3 οδήγησε σε περαιτέρω αύξηση της φωσφορυλίωσης.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα α) υποδεικνύουν ότι τα αυξημένα ενδογενή επίπεδα της p-DARPP-32 Th<sup>34</sup> στα "weaver" ζώα, οφείλονται στην υπερευαισθησία των A<sub>2A</sub> υποδοχέων που εμφανίζεται στην ντοπαμινεργική απονεύρωση και β) υποδεικνύουν μια ενισχυμένη λειτουργία στο μονοπάτι A<sub>2A</sub>/c-AMP/PKA/p-DARPP-32/CREB/ZIF-268 το οποίο όταν διεγερθεί περαιτέρω με ενεργοποίηση των A<sub>2A</sub> υποδοχέων οδηγεί στην έκφραση του zif/268 στα "weaver" αλλά όχι στα φυσιολογικά ζώα. Αντίθετα η επαγωγή του zif/268 στο μυ "weaver" μέσω των A<sub>2A</sub> υποδοχέων δεν φαίνεται να εμπλέκει το μονοπάτι των MAP κινασών. Τέλος, ο μηχανισμός στον οποίο οφείλονται τα αυξημένα επίπεδα της ενδογενούς p-ERK1/2 στο "weaver" μυ καθώς και η κατασταλτική δράση των A<sub>2A</sub> υποδοχέων πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

\*Ekonomou *et al*, *Neuroscience* 123 (2004) 1025-1036

## THE ROLE OF CAFFEIC ACIDE PHENETHYL ESTER (CAPE) APPLICATIONS IN THE TREATMENT OF COMPLICATIONS OF THE DIABETES IN RAT BRAIN

*Sefa Celik, Suat Erdogan*

Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Mustafa Kemal University, Tayfur Somken Campus 31040 Antakya Hatay-Turkey

The aim of this study was to investigate the effect of CAPE, an active component of honey bee propolis extracts, on STZ-induced diabetes complications in rat brain. One of the significant side effects of diabetes is neuropathy in the brain. For this purpose, oxidative stress, inflammation and lipid peroxidation in brain tissue and glucose and glycosylated hemoglobin (HbA1c) levels in blood samples were investigated.

CAPE administration significantly decreased nitric oxide (NO) and malondialdehyde levels induced by diabetes. The activities of catalase, glutathione peroxidase, and xanthine oxidase in brain homogenates were also decreased by CAPE treatments. Intracellular antioxidant glutathione concentration was elevated by the agent treatments. The transcriptions of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ) and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), and NO producing enzyme inducible nitric oxide synthase (*i*NOS) were remarkably enhanced by the disease in brain. However, CAPE treatments significantly suppressed inflammatory cytokine transcriptions induced by diabetes (~70% for TNF- $\alpha$ , 26% for IFN- $\gamma$ ) and *i*NOS (~100%). Diabetes induced blood glucose levels were significantly decreased by CAPE administration in diabetic rats. However, HbA1c levels were not affected by the treatment.

It is concluded that, diabetes induces oxidative stress and inflammation in the brain, and these may be contributory mechanisms involved in the disorder. CAPE treatment may reverse elevated levels of blood glucose and diabetes-induced oxidative stress in the brain. Moreover, CAPE administrations reduce diabetes stimulated proinflammatory cytokine productions such as TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in the central nervous system. It was suggested that CAPE applications may be considered for the treatment of the complications of diabetes-induced neuronal damage.



**DETECTION OF L-DOPA DECARBOXYLASE IN ADENOCARCINOMA CELL LINES.  
EFFECT OF CARBIDOPA ON CELL PROLIFERATION**

*I. Chalatsa and D. Vassilacopoulou*

*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimioupolis 15701, Athens, Greece*

L-Dopa Decarboxylase (DDC) is a pyridoxal requiring enzyme that catalyses the decarboxylation of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) to dopamine (DA). There has been a long-standing belief that DDC was a rather unregulated enzyme. In recent years, however, accumulating evidence have shown that DDC activity can be modulated by a variety of factors.

L-Dopa Decarboxylase (DDC) expression levels have been implicated in the pathogenesis of neoplastic disorders (1, 2, 3, 4). According to recent work HeLa cells (human cervical adenocarcinoma) were not found to express DDC (5). The work presented here, however, demonstrates the detection of high expression DDC levels in these types of cells. Incubation of HeLa and MCF7 (human breast adenocarcinoma) cells with the DDC inhibitor carbidopa ( $\alpha$ -methyl-dopahydrazine) was found to be cytotoxic to both types of cells (6). On the other hand, the DDC inhibitor NSD-1015 (3-hydroxybenzyl-hydrazine) had no cytotoxicity or proliferation effect on the same cell lines. The mechanism of the observed carbidopa induced cytotoxicity effects, as well as the involvement of DDC regulation in these phenomena are currently under investigation.

1. Davis, Z., Moertel, C. G., McIlrath, D. C. *The malignant carcinoid syndrome. Surg. Gynecol. Obstet.*, 137: 637-644, 1973.
2. Brown, H. *Serotonin-producing tumors. Serotonin in health and disease*, 4: 393-423, 1977.
3. Nagatsu, T., Ichinose, H., Kojima, K., Kameya, T., Shimase, J., Kodama, T., and Shimosato, Y. *Aromatic L-amino decarboxylase activities in human lung tissues: comparison between normal lung and lung carcinomas. Biochem. Med.*, 34: 52-59, 1985.
4. Gilbert, J. A., Bates, L. A., and Ames, M. M. *Elevated aromatic L-amino acid decarboxylase in human carcinoid tumors. Biochem. Pharmacol.*, 50: 845-850, 1995.
5. Sumi-Ichinose C., Hasegava S., Ohtsuki M., Nomura H., Nomura T., Hagino Y., Fugita K., Nagatsu T. *Analysis of an alternative promoter that regulates tissue-specific expression of the human aromatic L-amino acid decarboxylase gene in cultured cell lines. J Neural Transm.* 1996;103(1-2):1-15.
6. Judith A. Gilbert, Linda M. Frederick and Matthew M. Ames. *The Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase inhibitor carbidopa is selectively cytotoxic to human pulmonary carcinoid and small cell lung carcinoma cells. Clin Cancer Res.* 2000 Nov;6(11):4365-72.

## ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ L-DOPA ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CARBIDOPA ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ

*I. Χαλατσά και Δ. Βασιλακοπούλου*

*Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη 15701, Αθήνα, Ελλάδα*

Η L-Dopa Αποκαρβοξυλάση (DDC) είναι το ένζυμο που καταλύει την αποκαρβοξυλίωση της L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) σε ντοπαμίνη (DA), χρησιμοποιώντας ως συμπράγοντα την 5-φωσφορική πυριδοξάλη. Για μεγάλο χρονικό διάστημα είχε επικρατήσει η αντίληψη ότι η DDC δεν αποτελεί ρυθμιζόμενο ένζυμο. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια μέσω πολυάριθμων ερευνητικών δεδομένων δείχθηκε ότι τα επίπεδα ενεργότητας του ενζύμου μπορούν να επηρεαστούν από πληθώρα παραγόντων.

Είναι γνωστό ότι τα επίπεδα έκφρασης της DDC ενέχονται στην παθογένεση νεοπλασματικών ασθενειών (1, 2, 3, 4). Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη υποστηρίχθηκε η άποψη ότι τα κύτταρα HeLa (αδενοκαρκίνωμα τραχήλου μήτρας ανθρώπου) δεν εκφράζουν το ένζυμο DDC (5). Ωστόσο, στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η ανίχνευση υψηλών επιπέδων έκφρασης της DDC στους συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Επιπρόσθετα, επώαση των κυττάρων HeLa και MCF7 (αδενοκαρκίνωμα μαστού ανθρώπου) με τον αναστολέα της DDC carbidopa ( $\alpha$ -methyl-dopahydrazine) είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή φαινομένων κυτταροτοξικότητας και στους δύο τύπους κυττάρων (6). Αντίθετα, η προσθήκη του αναστολέα της DDC, NSD-1015 (3-hydroxybenzyl-hydrazine) δεν έδειξε καμία κυτταροτοξική επίδραση ή αναστολή στον πολλαπλασιασμό των συγκεκριμένων κυτταρικών σειρών. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, σήμερα είναι υπό διερεύνηση τόσο ο μηχανισμός της κυτταροτοξικότητας όσο και η εμπλοκή της ρύθμισης της DDC στα φαινόμενα αυτά.

1. Davis, Z., Moertel, C. G., McIlrath, D. C. *The malignant carcinoid syndrome. Surg. Gynecol. Obstet.*, 137: 637-644, 1973.
2. Brown, H. *Serotonin-producing tumors. Serotonin in health and disease*, 4: 393-423, 1977.
3. Nagatsu, T., Ichinose, H., Kojima, K., Kameya, T., Shimase, J., Kodama, T., and Shimosato, Y. *Aromatic L-amino decarboxylase activities in human lung tissues: comparison between normal lung and lung carcinomas. Biochem. Med.*, 34: 52-59, 1985.
4. Gilbert, J. A., Bates, L. A., and Ames, M. M. *Elevated aromatic L-amino acid decarboxylase in human carcinoid tumors. Biochem. Pharmacol.*, 50: 845-850, 1995.
5. Sumi-Ichinose C., Hasegava S., Ohtsuki M., Nomura H., Nomura T., Hagino Y., Fugita K., Nagatsu T. *Analysis of an alternative promoter that regulates tissue-specific expression of the human aromatic L-amino acid decarboxylase gene in cultured cell lines. J Neural Transm.* 1996;103(1-2):1-15.
6. Judith A. Gilbert, Linda M. Frederick and Matthew M. Ames. *The Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase inhibitor carbidopa is selectively cytotoxic to human pulmonary carcinoid and small cell lung carcinoma cells. Clin Cancer Res.* 2000 Nov;6(11):4365-72.

## HIGH VERSUS LOW RESPONSE TO NOVELTY DIFFERENTIATES THE EFFECTS OF CANNABINOIDS.

*O. Chouliara<sup>1</sup>, M. Dosi<sup>1</sup>, A. Polissidis<sup>2</sup>, A. Galanopoulos<sup>2</sup>, E. Tzavara<sup>3</sup>, M. Marselos<sup>1</sup>, Z. Papadopoulou-Daifoti<sup>2</sup>, C. Spyraiki<sup>†</sup> and K. Antoniou<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup> *Department of Pharmacology, Medical School, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece*

<sup>2</sup> *Department of Pharmacology, Medical School, University of Athens, 11527 Athens, Greece*

<sup>3</sup> *INSERM U-513, Neurobiology and Psychiatry, Faculty of Medicine, 8, rue du Général Sarrail, 94010, Creteil, France*

Experimental animals can be differentiated on the basis of their horizontal or vertical activity as high responders (HR) and low responders (LR) upon exposure to a novel environment. These individual differences have been associated with behavioral and neurobiological differences observed in response to psychostimulants.

In the present study, we examined the behavioral profile of HR and LR rats in response to the natural and synthetic (respectively) cannabinoid agonists  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) and WIN 55,212-2 (WIN) administration. Additionally, we investigated the effects of cannabinoids on phosphorylation of the dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa (DARPP-32) in the striatum of both phenotypes of rats, since changes in DARPP-32 phosphorylation are implicated in the actions of psychostimulants.

Male Sprague–Dawley rats (n=155 rats) were categorized as HR and LR based on their spontaneous motor activity and specifically their vertical activity. 20 days later a subset of these rats received  $\Delta^9$ -THC and WIN and motor activity was registered (n=8-10 rats per drug dose for HR and LR rats) in an open field apparatus. Another subset of these rats was used for estimation of the striatal levels of DARPP-32 phosphorylation (n=4-5 rats per drug dose for HR and LR rats).

HR displayed increased ambulatory and vertical activity as compared to LR rats. At the lower doses of  $\Delta^9$ -THC and WIN (0.75mg/kg and 0.1 mg/kg, respectively) an increase in motor activity was observed in HR but not in LR rats. On the other hand, the higher doses of both cannabinoids decreased motor activity in the two phenotypes of rats. Moreover, the observed changes in striatal levels of DARPP-32 paralleled the aforementioned effects induced by cannabinoids.

Therefore, it could be suggested that individual responses in novelty behavior may reflect a different sensitivity to cannabinoid administration as seen with classical psychostimulants.

\* *This research project is co-financed by E.U.-European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%). PENED (O3EΔ768)*

## ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΔΥΟ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥΣ ΕΠΙΜΥΩΝ

*Ο. Χουλιάρα<sup>1</sup>, Μ. Δόση<sup>1</sup>, Α. Πολυσίδη<sup>2</sup>, Α. Γαλανόπουλος<sup>2</sup>, Ε. Τζαβάρα<sup>3</sup>,  
Μ. Μαρσέλος<sup>1</sup>, Ζ. Παπαδοπούλου – Νταϊφώτη<sup>2</sup>, Χ. Σπυράκη<sup>†</sup> και Κ. Αντωνίου<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup> *Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα, Ελλάδα*

<sup>2</sup> *Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 11527 Αθήνα, Ελλάδα*

<sup>3</sup> *INSERM U-513, Neurobiology and Psychiatry, Faculty of Medicine, 8, rue du Général Sarrail, 94010, Creteil, France*

Τα πειραματόζωα και ειδικότερα οι επίμυες χωρίζονται ανάλογα με την ένταση της κινητικής τους συμπεριφοράς σε μη οικείο περιβάλλον σε δύο φαινότυπους, τους χαμηλά και τους υψηλά ανταποκρινόμενους (Low Responders [LR] και High Responders [HR], αντίστοιχα). Οι δυο φαινότυποι παρουσιάζουν τόσο συμπεριφορικές, όσο και νευροβιολογικές διαφορές ως προς την απάντησή τους σε ψυχοδιεγερτικές ουσίες.

Η παρούσα μελέτη σκοπεύει να εξετάσει το φαρμακολογικό αποτέλεσμα της Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλης (Δ<sup>9</sup>-THC) και του WIN 55,212-2 (WIN), ενός φυσικού και ενός συνθετικού αγωνιστή των υποδοχέων των κανναβινοειδών αντίστοιχα, στην κινητικότητα ήδη διαφοροποιημένων επιμύων με βάση την εξερευνητικότητα τους σε μη οικείο περιβάλλον. Επιπρόσθετα, διερευνήθηκαν οι επιδράσεις της χορήγησης των κανναβινοειδών στην φωσφορυλίωση της DARPP-32 (dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa) στο ραβδωτό σώμα και των δυο φαινότυπων, δεδομένου ότι οι αλλαγές στην φωσφορυλίωση της παραπάνω πρωτεΐνης εμπλέκονται στις δράσεις των ψυχοδιεγερτικών ουσιών.

Αρσενικοί επίμυες Sprague–Dawley (n=155) διαχωρίστηκαν σε δύο πληθυσμούς (HR/LR) με κριτήριο την αυθόρμητη κινητικότητά τους και πιο συγκεκριμένα την κατακόρυφη δραστηριότητα. Στη συνέχεια σε μια ομάδα πειραματοζώων χορηγήθηκαν Δ<sup>9</sup>-THC (0, 0.75, 3 mg/kg i.p.) και WIN (0, 0.1, 1 mg/kg, i.p., n=8-10 επίμυες για κάθε δοσολογική ομάδα HR και LR επιμύων) και εκτιμήθηκε η κινητικότητά τους σε ανοικτό πεδίο. Αντίστοιχες ομάδες πειραματοζώων χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των επιπέδων της DARPP-32 στο ραβδωτό σώμα (n=4-5 επίμυες για κάθε δοσολογική ομάδα HR και LR επιμύων).

Οι HR επίμυες επέδειξαν αυξημένη οριζόντια και κατακόρυφη δραστηριότητα σε σχέση με τους LR. Μετά από τη χορήγηση των χαμηλών δόσεων των Δ<sup>9</sup>-THC και WIN (0.75mg/kg και 0.1 mg/kg αντίστοιχα) παρατηρήθηκε αύξηση της κινητικότητας των HR αλλά όχι των LR. Αντίθετα, οι υψηλές δόσεις και των δύο κανναβινοειδών προκάλεσαν μείωση της κινητικότητας και στους δυο φαινότυπους των επιμύων. Όσον αφορά στη DARPP-32 η χορήγηση των κανναβινοειδών προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα της πρωτεΐνης στο ραβδωτό σώμα.

Συμπερασματικά, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι οι δύο φαινότυποι πειραματοζώων παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία στη χορήγηση κανναβινοειδών.

*Συγχρηματοδότηση Ε.Ε.- Ε.Κ.Τ.(75%) και ΥΠΙΑΝ (25%). ΠΕΝΕΔ (Ο3ΕΔ768)*



## NEONATAL NOVELTY EXPOSURE CAN MODULATE ADULT BEHAVIOR AND BASAL CORTICOSTERONE SECRETION IN RATS

Daskalakis N<sup>1,2</sup>, Bezati S<sup>1</sup>, Kaperoni M<sup>1</sup>, Anastasopoulos K<sup>1</sup>, Jezova D<sup>3</sup>, Kitraki E<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab of Histology & Embryology, Athens University Medical School, Greece

<sup>2</sup>Div Medical Pharmacology, Leiden/Amsterdam Center for Drug Res., the Netherlands

<sup>3</sup>Lab. of Pharmacological Neuroendocrinology, Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

Exposure of rodents to early life experiences can permanently affect adult brain functions concerning emotionality, stress response and synaptic plasticity. We have applied a “novelty exposure” protocol in rats of both sexes, from postnatal day 2 to 21, to investigate effects on their exploratory behavior, spatial memory and hypothalamic- pituitary- adrenal axis activity. The protocol used in this study differs from the widely used models of early handling or maternal separation, in that the only additional stimulus experienced by the pups is the environment of a novel cage: Pups in each litter were assigned both in ‘Home’ and ‘Novel’ groups (split-litter design). During the daily treatment, both groups were deprived of their mother and gently handled, but ‘Home’ pups stayed in their home cage, while ‘Novel’ pups were transferred into a new cage. In adulthood, animals were behaviorally tested in a Y-maze task and 1 week later they were blood sampled and killed under basal conditions. The Y-maze task consisted of a 15min-acquisition trial where only 2 arms were accessible and a 5min-retrieval trial, 4h later, where all 3 arms were accessible. In terms of general locomotion activity and motivation for exploration, female rats exposed to novelty made more entries in the accessible Y-maze arms compared to all other groups, when first exposed to the maze. In the retrieval trial, general locomotion was similar among all groups. Novelty exposure improved spatial memory and novel arm discrimination in both sexes, in a sexually dimorphic manner. On one hand, ‘Novel’ males visited the novel arm more often in the beginning of the second trial, but then split their entries in known and start arms as well. On the other hand, ‘Novel’ females started trial 2 with a preference for novel arm combined with often visits to the known arm and ended it with a clear preference for the novel arm. By the end of the retrieval, all animal groups progressively lost their interest for exploration, entering more the start arm. Novelty exposure increased basal corticosterone levels in adult females, but not males, but did not affect adrenal weight or histology in either sex. The number of immunopositive cells for glucocorticoid (GR) and mineralocorticoid (MR) receptors in the hippocampus under basal conditions was not significantly modified by the neonatal novelty exposure.

*Supported by the grant 70/3/8372 (GREECE – SLOVAKIA, JOINT RESEARCH AND TECHNOLOGY PROGRAMMES) of the Greek General Secretariat of Research and Technology, co-funded by the EU and National funds.*

**ΝΕΟΓΝΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ ΕΠΙΜΥΩΝ ΣΕ ΝΕΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙ ΤΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥΣ ΚΑΙ ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΝΗΛΙΚΟ ΖΩΗ**

*Δασκαλάκης Ν<sup>1,2</sup>, Μπεζάτη Σ<sup>1</sup>, Καπερώνη Μ<sup>1</sup>, Αναστασόπουλος Κ<sup>1</sup>, Jezova D<sup>3</sup>, Κιτράκη Ε<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Εργ. Ιστολογίας – Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών*

<sup>2</sup>*Div Medical Pharmacology, Leiden/Amsterdam Center for Drug Res., the Netherlands*

<sup>3</sup>*Lab. of Pharmacological Neuroendocrinology, Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia*

Έκθεση επιμύων σε πρώιμες εμπειρίες μπορεί να τροποποιήσει μόνιμα τη λειτουργικότητα του εγκεφάλου τους σε παραμέτρους όπως η απάντηση στο στρες και η συναπτική πλαστικότητα. Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο έκθεσης σε νέο περιβάλλον σε νεογέννητους επίμυες και των δύο φύλων από την 2<sup>η</sup> μέχρι και την 21<sup>η</sup> ημέρα μετά τη γέννηση και εξετάστηκαν οι επιπτώσεις του στην εξερευνητική συμπεριφορά, στην ικανότητα χωρικής μάθησης και μνήμης και στην ενεργότητα του υποθαλαμο-υποφυσιακού επινεφριδικού άξονα των επιμύων μετά την ενηλικίωση. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη διαφέρει από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα μοντέλα πρώιμου χειρισμού ή μητρικής αποστέρησης στο ότι το μόνο ερέθισμα που διαφοροποιούσε τις δύο πειραματικές ομάδες ήταν η έκθεση στο περιβάλλον ενός νέου κλουβιού: τα νεογνά μέσα σε κάθε γέννα κατανεμήθηκαν σε ομάδες ‘Home’ και ‘Novel’ . Κατά τη διάρκεια του ημερήσιου χειρισμού και οι δύο ομάδες υφίσταντο μητρική αποστέρηση και ήπιο χειρισμό, αλλά τα μεν ‘Home’ ζώα παρέμεναν στο δικό τους κλουβί, ενώ τα ‘Novel’ ζώα τοποθετούντο σε ένα νέο κλουβί κάθε φορά. Κατά την ενηλικίωση, τα πειραματόζωα ελέγχθηκαν συμπεριφορικά σε ένα λαβύρινθο σχήματος Υ και μια εβδομάδα αργότερα θυσιασθηκαν σε συνθήκες ηρεμίας. Η διαδικασία του λαβύρινθου Υ περιελάμβανε 15min εξερεύνηση προσαρμογής, όπου μόνο οι δύο από τους 3 βραχίονες του λαβυρίνθου ήταν προσβάσιμοι και μετά από 4 ώρες μια δοκιμασία εξερεύνησης και στους 3 βραχίονες. Κατά την πρώτη δοκιμασία εξερεύνησης προσαρμογής, τα θηλυκά πειραματόζωα που εκτέθηκαν στο νέο περιβάλλον εξερευνούσαν περισσότερο τους διαθέσιμους βραχίονες σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες, γεγονός που σημαίνει αυξημένη γενική κινητικότητα και κινητοποίηση για εξερεύνηση του νέου περιβάλλοντος. Κατά τη δεύτερη δοκιμασία εξερεύνησης (ανάκληση) η γενική κινητική δραστηριότητα δε διέφερε μεταξύ των ομάδων. Ωστόσο, η νεογνική έκθεση σε νέο περιβάλλον βελτίωσε την ικανότητα των ζώων για στοχευμένη προς τον νέο βραχίονα εξερεύνηση και τη συνακόλουθη χωρική μνήμη με ένα φυλετικά διμορφικό τρόπο: Τα αρσενικά που είχαν εκτεθεί σε νέο περιβάλλον επισκέπτονταν περισσότερο τον νέο βραχίονα στην αρχή της δεύτερης δοκιμασίας εξερεύνησης, ενώ αργότερα η προτίμησή τους διαμοιράστηκε και στους άλλους δύο βραχίονες. Τα θηλυκά που είχαν εκτεθεί σε νέο περιβάλλον, άρχισαν την δεύτερη δοκιμασία εξερεύνησης με τον νέο βραχίονα και η προτίμησή τους αυτή αυξήθηκε συν τω χρόνω. Η έκθεση σε νέο περιβάλλον αύξησε τα βασικά επίπεδα κορτικοστερόνης στο πλάσμα των θηλυκών, αλλά όχι των αρσενικών πειραματοζώων. Το βάρος και η ιστολογία των επινεφριδίων δεν επηρεάστηκε σε κανένα από τα δύο φύλα. Παρόμοια, η νεογνική έκθεση σε νέο περιβάλλον δεν μετέβαλε τον αριθμό των ανοσοθετικών νευρώνων στον ιππόκαμπο για τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (GR) και αλατοκορτικοειδών (MR) . *Supported by the grant 70/3/8372 (GREECE – SLOVAKIA, JOINT RESEARCH AND TECHNOLOGY PROGRAMMES) of the Greek General Secretariat of Research and Technology, co-funded by the EU and National funds.*

**FRANÇOIS-VINCENT RASPAIL (1794–1878): REVOLUTIONARY IN FRENCH  
POLITICS AND FATHER OF HISTOCHEMISTRY**

*M. del Cerro<sup>1</sup> and L.C. Triarhou<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>University of Rochester, N.Y., U.S.A. and <sup>2</sup>University of Macedonia, Thessaloniki*

The aim of this article is to present modern day neuroscientists with an overview of the work of François-Vincent Raspail (1794–1878), a man universally recognized as the father of histochemistry. It is not our intent to present a biography of Raspail here, as several biographies of him have already been published. Furthermore, it is well recognized that his immensely varied work covered fields as diverse as agriculture, geology, meteorology, and medicine. We are reviewing his microscopical work, offering a certain biographical background to help put his life and work in perspective. More specifically, we go over the microscope he designed, and his roles as public health practitioner, revolutionary in French politics, deputy of the National Assembly, and Presidential candidate. Finally, we are noticing how Raspail's pioneering work has developed into the modern histochemistry, a branch of science that is revolutionizing biomedical research.

**FRANÇOIS-VINCENT RASPAIL (1794–1878): ΕΠΑΝΑΣΤΑΤΗΣ ΤΗΣ  
ΓΑΛΛΙΚΗΣ ΠΟΛΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΠΑΤΕΡΑΣ ΤΗΣ ΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ**

*M. del Cerro<sup>1</sup> και Α. Τριάρχου<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>University of Rochester, N.Y., U.S.A. και <sup>2</sup>Πανεπιστήμιο Μακεδονίας, Θεσσαλονίκη*

Στόχος του άρθρου είναι να παρουσιάσουμε στο νευροεπιστημονικό κοινό μια ανασκόπηση του έργου του François-Vincent Raspail (1794–1878), ο οποίος αναγνωρίζεται διεθνώς ως ο πατέρας της ιστοχημείας. Δεν είναι πρόθεσή μας να παρουσιάσουμε βιογραφικές λεπτομέρειες για τον Raspail, δεδομένου ότι αρκετές βιογραφίες του έχουν ήδη δημοσιευθεί. Επιπλέον, διεθνώς παραδεκτό είναι το στοιχείο ότι το πολυδιάστατο έργο του κάλυψε τομείς τόσο ποικίλους όπως η γεωργία, η γεωλογία, η μετεωρολογία και η ιατρική. Ανατρέχουμε στο έργο του στην επιστήμη του μικροσκοπίου, προσφέροντας συγκεκριμένα βιογραφικά στοιχεία χρήσιμα ώστε να τοποθετηθεί η ζωή και το έργο του στη σωστή προοπτική. Συγκεκριμένα, καλύπτουμε, πέρα από το μικροσκόπιο που σχεδίασε, τους ρόλους του στην άσκηση της δημόσιας υγείας, του επαναστάτη στη Γαλλική πολιτική, του μέλους της Εθνοσυνέλευσης και του υποψηφίου για την Προεδρία της Δημοκρατίας της Γαλλίας. Τέλος, επισημαίνουμε πώς το πρωτοποριακό έργο του Raspail εξελίχθηκε στη σύγχρονη ιστοχημεία, ένα κλάδο της επιστήμης που επιφέρει επανάσταση στη βιοϊατρική έρευνα.

**AREAS OF THE RAT BRAIN ACTIVATED FOLLOWING LEARNING OF A T-MAZE  
USING THE MOTHER AS A REINFORCING OR A FRUSTRATIVE STIMULUS**

*Diamantopoulou A, Stamatakis A, Panagiotaropoulos T, Karantoni E, Stylianopoulou F*

*Laboratory of Biology-Biochemistry, Faculty of Nursing, University of Athens,  
Papdiamantopoulou 123, 11527, Athens, Greece*

Previous results from our laboratory using mother contact as a positive or negative reinforcer in a T-maze have shown that both frustrated (pups denied contact with the mother) and non-frustrated (rewarded by unrestricted contact) rats showed improved performance over training during postnatal days 10-13. The aim of the present study was to assess the brain areas involved in learning under frustrative conditions versus reward, using Fos immunoreactivity for functional mapping. Increased number of Fos immunopositive cells were found in every area studied for both frustrated and non-frustrated rats compared to controls (naive animals). Frustration resulted in increased number of Fos immunopositive cells in the prefrontal cortex and the hippocampus, while in the striatum the number of Fos immunopositive cells was higher in the pups receiving continuous reward. These results indicate that non-frustrated rats receiving continuous reward develop a procedural-type learning process, as revealed by activation of the basal ganglia. On the other hand, frustrative non-reward leads to a behavioural state of increased vigilance and appraisal of environmental stimuli with concomitant activation of the prefrontal cortex and the hippocampus. It is known that the prefrontal cortex is responsible for decoding the reward (and punishment) value of primary reinforcers and for what is called stimulus–reinforcement association learning; Moreover, it represents the components responsible for triggering the error-detection neurons that respond during frustrative non-reward. The hippocampus, which is also more activated in the frustrated than the non-frustrated animals, plays a role in information processing decoding contextual changes and conflict between inherent drives and environmental stimuli.

*This work has been supported by the Special Account for Research Grants-University of Athens.*

**ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΝΕΟΓΝΙΚΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΤΟΥ ΕΠΙΜΥ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ  
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΜΑΘΗΣΗ ΕΝΟΣ ΛΑΒΥΡΙΝΘΟΥ Τ ΜΕ ΤΗ ΜΗΤΕΡΑ ΩΣ ΑΝΤΑΜΟΙΒΗ Ή  
ΜΑΤΑΙΩΣΗ**

*Διαμαντοπούλου Α, Σταματάκης Α, Παναγιωταρόπουλος Θ, Καραντώνη Ε, Στυλιανοπούλου Φ*

*Εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας, Τμήμα Νοσηλευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Παπαδιαμαντοπούλου 123, 11527, Αθήνα.*

Αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες από το εργαστήριό μας, χρησιμοποιώντας τη μητέρα ως ερέθισμα ανταμοιβής (ενίσχυση) ή μη ανταμοιβής (ματαιώση) σε έναν λαβύρινθο σχήματος Τ έδειξαν ότι τόσο τα νεογνά, στα οποία έχει εμποδιστεί η επαφή με τη μητέρα, όσο και αυτά που ανταμείβονται μέσω ανεμπόδιστης επαφής με αυτή, εμφανίζουν βελτιωμένη επίδοση από τη μια μέρα της εκπαίδευσης στην άλλη, κατά τις μεταγεννητικές μέρες 10-13. Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανεύρεση των εγκεφαλικών περιοχών που εμπλέκονται στη μάθηση υπό συνθήκες ματαιώσης έναντι συνθηκών ανταμοιβής, με χρήση της ανοσοδραστικότητας για την πρωτεΐνη Fos ως δείκτη λειτουργικής χαρτογράφησης. Σε όλες τις περιοχές που εξετάστηκαν βρέθηκε αυξημένος αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων και στις δύο πειραματικές ομάδες σε σχέση με ζώα ελέγχου, τα οποία δεν είχαν υποβληθεί σε κανενός είδους δοκιμασία. Η ματαιωτική μη ανταμοιβή οδήγησε σε αυξημένο αριθμό Fos ανοσοθετικών κυττάρων στον προμετωπιαίο φλοιό και τον ιππόκαμπο, ενώ στο ραβδωτό ο αριθμός των Fos ανοσοθετικών κυττάρων ήταν μεγαλύτερος στα νεογνά που λάμβαναν συνεχή ανταμοιβή. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι ζώα υπό συνεχή ανταμοιβή κατά την εκπαίδευση αναπτύσσουν μια διαδικασία μάθησης διαδικαστικού τύπου, όπως αποκαλύπτεται από την ενεργοποίηση των βασικών γαγγλίων. Αντίθετα, η ματαιωτική μη ανταμοιβή οδηγεί σε μια κατάσταση αυξημένης ερήγησης και επεξεργασίας ερεθισμάτων από το περιβάλλον με συνεπακόλουθη ενεργοποίηση του προμετωπιαίου φλοιού και του ιπποκάμπου. Είναι γνωστό ότι ο προμετωπιαίος φλοιός είναι υπεύθυνος για την αποκωδικοποίηση της αξίας της ανταμοιβής (ή της τιμωρίας) για πρωτογενή ερεθίσματα ενίσχυσης και για τη λειτουργία που αποκαλείται μάθηση συσχέτισης ερεθίσματος-ενίσχυσης. Επιπλέον, διαμεσολαβεί διεργασίες που οδηγούν στην ενεργοποίηση των νευρώνων που ανιχνεύουν λάθη, οι οποίοι αποκρίνονται κατά τη ματαιωτική μη ανταμοιβή. Ο ιππόκαμπος, επίσης περισσότερο ενεργοποιημένος στα ματαιωμένα ζώα, παίζει ρόλο στην επεξεργασία της πληροφορίας που αφορά την αποκωδικοποίηση τόσο αλλαγών στο χώρο όσο και της σύγκρουσης μεταξύ έμφυτων κινήτρων και ερεθισμάτων του περιβάλλοντος.

*Η παρούσα εργασία χρηματοδοτήθηκε από τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του Πανεπιστημίου Αθηνών*

## MICRORNA-21 PROMOTES NEURITE OUTGROWTH OF HIPPOCAMPAL NEURONS AND NGF-SUPPORTED PC12 CELLS

*Epaminondas Doxakis, Giorgos Vallianatos and Dimitra Mangoura*

*Basic Neurosciences Division, Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Soranou Efessiou 4, Athens 11527, Greece*

MicroRNAs (miRNAs) are an evolutionary conserved, endogenous class of short non-coding RNAs whose function as modulators of gene expression is crucial for the proper control of cell growth and differentiation. Although the profile of miRNA expression has been broadly defined for most healthy and many disease tissues, the regulatory networks in which they are involved remain elusive. Here, we identify an important role for one of the most highly expressed ubiquitous microRNAs (mir-21) in regulating neurite outgrowth in hippocampal neurons and pheochromocytoma cells. We show that mir-21 increases the length, but not branching, of embryonic hippocampal neurites. Further, it substantially increases both the size and complexity of the neurite arbors of PC12 cells cultured with nerve growth factor (NGF) while have no effect on its absence. Both NGF and retinoic acid induce expression of endogenous mir-21 implicating it in neuronal differentiation. Using *in silico* analysis, we have identified 176 putative mRNA targets. Cluster analysis shows that the KEGGS pathways that are preferentially targeted by mir-21 include the JAK-STAT signalling pathway, regulation of actin cytoskeleton and apoptosis pathways.

## ΤΟ MICRORNA-21 ΠΡΟΩΘΕΙ ΤΗ ΝΕΥΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΕ ΝΕΥΡΩΝΕΣ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΚΑΙ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ PC12

*Επαμεινώνδας Δοζάκης, Γιώργος Βαλλιανάτος και Δήμητρα Μάγκουρα*

*Τομέας Βασικών Νευροεπιστημών, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημία Αθηνών, Σωρανού Εφεσίου 4, 11527 Αθήνα, Ελλάδα*

Τα microRNA (miRNAs) αποτελούν μια συντηρημένη εξελικτικά κατηγορία μορίων RNA με μικρό μήκος, των οποίων η λειτουργία ως ρυθμιστών της γονιδιακής έκφρασης είναι κρίσιμη για τον φυσιολογικό έλεγχο του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων. Αν και το προφίλ της έκφρασης των microRNAs έχει προσδιορισθεί για τους περισσότερους υγιείς ιστούς αλλά και για ιστούς προερχόμενους από ασθενείς, τα ρυθμιστικά δίκτυα στα οποία εμπλέκονται παραμένουν ακόμα άγνωστα. Σε αυτή την έρευνα, αποκαλύπτουμε ένα σημαντικό ρόλο του miR-21 στη ρύθμιση της νευριτικής ανάπτυξης σε νευρώνες ιπποκάμπου και στη κυτταρική σειρά PC12. Το miR-21 ανήκει στη κατηγορία των microRNAs που εκφράζονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και τα επίπεδα έκφρασης του είναι από τα υψηλότερα της κατηγορίας του. Αποδεικνύουμε ότι το miR-21 αυξάνει το μήκος αλλά όχι και το πλήθος των νευριτών σε νευρώνες που απομονώθηκαν από εμβρυικούς μύες. Επιπλέον, αυξάνει σημαντικά το μήκος αλλά και τη πολυπλοκότητα των νευριτών σε κύτταρα PC12 υπό την επίδραση NGF ενώ δεν παρατηρείται κάτι ανάλογο σε απουσία του NGF. Ο NGF και το ρετινοϊκό οξύ επάγουν την έκφραση του ενδογενούς miR-21 κάνοντας πολύ πιθανή τη συμμετοχή του συγκεκριμένου microRNA στη νευρωνική διαφοροποίηση. Χρησιμοποιώντας ανάλυση *in silico*, έχουμε εντοπίσει 176 πιθανούς στόχους του miR-21. Εφαρμόζοντας τη μέθοδο ανάλυσης συστάδων (Cluster analysis) στη βάση δεδομένων KEGGS, διαπιστώσαμε ότι το miR-21 στοχεύει πρωτείνες που απαντώνται στους οδούς σηματοδότησης JAK-STAT καθώς και τις οδούς που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό ακτίνης και την απόπτωση.



## EFFECTS OF SECRETED $\alpha$ -SYNUCLEIN SPECIES ON NEURONAL CELL VIABILITY

*Emmanouilidou Evangelia, Stefanis Leonidas, and Vekrellis Kostas*

*Division of Basic Neurosciences, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens,  
Athens, Greece*

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative disorders. Pathological examination shows selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and presence of fibrillar cytoplasmic inclusions called Lewy bodies (LBs). Aggregates of  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ S), a 140-aa natively unfolded protein of unknown function, constitute a major component of LBs [1]. Aggregates are formed by the oligomerization of monomeric  $\alpha$ S and it has been proposed that soluble  $\alpha$ S oligomers may be toxic to the cell [2, 3]. Multiplications of the locus encoding for  $\alpha$ S as well as point mutations (A53T, A30P, E46K) are linked to early onset PD, again suggesting an important role of  $\alpha$ S in the pathogenesis of the disease [4, 5].  $\alpha$ S is predominantly localized within presynaptic terminals in the CNS. Since it lacks any signal sequence, it has been considered exclusively a cytosolic protein [6]. This notion was recently challenged by the findings that monomeric  $\alpha$ S can be detected in the plasma and CSF of human subjects with or without PD, and that it could be secreted into the extracellular medium of cultured neuronal cells [7]. In another study, part of cellular  $\alpha$ S is present in secretory vesicle lumen and is rapidly secreted from cells via unconventional, ER/Golgi-independent exocytosis [8]. Finally, secreted  $\alpha$ S from SK-N-BE cells reduced the viability of these cells [9]. To investigate the effect of different intracellular or secreted  $\alpha$ S species on cell homeostasis, we have generated WT or A53T  $\alpha$ S and  $\beta$ -galactosidase-inducible SHSY5Y cell lines using the Tet-off regulatory system. Size exclusion chromatography of cell extracts demonstrated that  $\alpha$ S overexpression led to the production of three distinct intracellular species; high MW (HMW) oligomers, dimer, and monomer. Application of these species on recipient SHSY5Y cells resulted in cell death. This deleterious effect was found to be both species- and concentration-dependent with the HMW oligomers being the most toxic species. More importantly, oligomeric and monomeric  $\alpha$ S was found to be secreted in the medium (CM) of these cells. Secretion of  $\alpha$ S was not an artifact of mere protein overexpression because no  $\beta$ GAL was detected in the CM of  $\beta$ GAL-expressing cells. In addition, no actin was detected in the CM of all cells suggesting that  $\alpha$ S secretion was not a result of membrane leakage. Application of CM containing secreted  $\alpha$ S on recipient SHSY5Y cells caused proteasomal dysfunction and decreased cell viability. We are currently trying to identify which secreted  $\alpha$ S species are responsible for cell toxicity as well as the mechanism underlying this effect.

- [1] Vekrellis K. et al, *Molecular Neurobiology*, 30, 1, 2004.
- [2] Volles M.J. and Lansbury P.T. Jr, *Biochemistry*, 42, 7871, 2003.
- [3] Lindersson E. et al, *Journal of Biological Chemistry*, 279, 12924, 2004.
- [4] Polymeropoulos M.H. et al, *Science*, 276, 2045, 1997.
- [5] Conway K.A. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 571, 2000.
- [6] H-J Lee et al, 2002
- [7] El-Agnaf O.M. et al, *FASEB Journal*, 17, 1945, 2003.
- [8] Lee H-J. et al, *Journal of Neuroscience*, 25, 6016, 2005.
- [9] Sung J.Y. et al, *Journal of Biological Chemistry*, 280, 25216, 2005.

## ΟΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ $\alpha$ -ΣΥΝΟΥΚΛΕΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

*Εμμανουηλίδου Ευαγγελία, Στεφανής Λεωνίδα, και Βεκρέλλης Κώστας*

*Τμήμα Βασικών Νευροεπιστημών, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα*

Η νόσος του Πάρκινσον (ΝΠ) είναι μία από τις πλέον συνηθισμένες νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Η παθολογία της νόσου συμπεριλαμβάνει την επιλεκτική καταστροφή των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην περιοχή της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου και την παρουσία έγκλειστων πρωτεϊνικών αποθέσεων (Lewy bodies, LBs). Κύριο συστατικό των αποθέσεων αυτών αποτελούν τα συσσωματώματα της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης ( $\alpha$ S), μιας αυθόρμητα μη αναδιπλωμένης πρωτεΐνης μεγέθους 140 αμινοξέων [1]. Κατά την άποψη αρκετών ερευνητών, τα συσσωματώματα, τα οποία προκύπτουν μέσω πολυμερισμού της μονομερούς  $\alpha$ S, είναι η μορφή που δρα τοξικά για το κύτταρο [2, 3]. Επιπλέον, σημειακές μεταλλάξεις (A53T, A30P, E46K) στο γονίδιο της  $\alpha$ S έχουν συνδεθεί με τις σπάνιες περιπτώσεις οικογενούς νόσου [4, 5]. Η  $\alpha$ S βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στα προσυναπτικά άκρα ενώ λόγω έλλειψης αλληλουχίας σηματοδότησης, θεωρείται πρωτεΐνη καθαρά κυτταροπλασματική [6]. Η παραδοχή αυτή αμφισβητήθηκε λόγω πρόσφατων μελετών στα οποία η  $\alpha$ S εντοπίστηκε στο πλάσμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό υγιών ατόμων και ατόμων με ΝΠ, αλλά και στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας νευρικών κυττάρων [7]. Σε μια άλλη εργασία, η  $\alpha$ S βρέθηκε να εκκρίνεται μέσω ενός μη συμβατικού μηχανισμού που δεν σχετίζεται με το ενδοπλασματικό δίκτυο ή το σύστημα Golgi [8]. Τέλος, η  $\alpha$ S που εκκρίνεται από SK-N-BE κύτταρα μείωσε την βιωσιμότητα των κυττάρων αυτών [9]. Στην παρούσα μελέτη, οι επιδράσεις των διαφόρων μορφών της  $\alpha$ S, εσωκυττάρων ή εκκρινόμενων, στην βιωσιμότητα των κυττάρων μελετήθηκε σε νευροβλαστικά κύτταρα SHSY5Y στα οποία η έκφραση της φυσιολογικής ή της μεταλλαγμένης μορφής της  $\alpha$ S επάγεται από την απουσία ή μη της τετρακυκλίνης. Ανάλυση των κλασμάτων που απομονώθηκαν μέσω χρωματογραφίας διήθησης πηκτής από ομογενοποίηση των κυττάρων αυτών έδειξε ότι η υπερέκφραση της  $\alpha$ S οδηγεί σε παραγωγή τριών εσωκυττάρων μορφών: ολιγομερή μεγάλου μοριακού βάρους, διμερές, και μονομερές. Επώαση SHSY5Y κυττάρων με κάθε μία από τις μορφές αυτές είχε ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Η επαγωγή κυτταροτοξικότητας ήταν περισσότερο έκδηλη παρουσία της ολιγομερούς μορφής της  $\alpha$ S. Επιπλέον, η  $\alpha$ S, στην ολιγομερή ή τη μονομερή μορφή της, βρέθηκε να εκκρίνεται από τα κύτταρα αυτά. Η έκκριση της  $\alpha$ S ήταν ειδική για την πρωτεΐνη αυτή και όχι αποτέλεσμα λύσης της κυτταρικής μεμβράνης. Επώαση SHSY5Y κυττάρων με θρεπτικό μέσο που περιείχε  $\alpha$ S οδήγησε σε δυσλειτουργία του πρωτεασώματος και κυτταροτοξικότητα. Τη στιγμή αυτή προσπαθούμε να χαρακτηρίσουμε τη συγκεκριμένη μορφή που ευθύνεται για την κυτταροτοξική δράση της  $\alpha$ S και να αποσαφηνίσουμε τον μηχανισμό μέσω του οποίου επιφέρει τη δράση αυτή.

[1] Vekrellis K. et al, *Molecular Neurobiology*, 30, 1, 2004.

[2] Volles M.J. and Lansbury P.T. Jr, *Biochemistry*, 42, 7871, 2003.

[3] Lindersson E. et al, *Journal of Biological Chemistry*, 279, 12924, 2004.

[4] Polymeropoulos M.H. et al, *Science*, 276, 2045, 1997.

[5] Conway K.A. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 571, 2000.

[6] H-J Lee et al, 2002

[7] El-Agnaf O.M. et al, *FASEB Journal*, 17, 1945, 2003.

[8] Lee H-J. et al, *Journal of Neuroscience*, 25, 6016, 2005.

[9] Sung J.Y. et al, *Journal of Biological Chemistry*, 280, 25216, 2005.

## ROLE OF WILD TYPE PKC-E IN NEURONAL INDUCTION OF EMBRYONIC STEM CELLS AND EMBRYONIC HIPPOCAMPAL NEURONS

A. Florakis<sup>1</sup>, N. Sakellaris<sup>2</sup>, and D. Mangoura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Basic Neurosciences Division, Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Soranou Efessiou 4, 11527 Athens*

<sup>2</sup>*Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Thessaly, Larissa*

Neuronal cell polarity is pivotal to the asymmetric distribution of signaling complexes during development. This spatial control of signaling plays an important role in the final regulation of gene transcription, which actually guides neurons through divisions, differentiation, and neuroprotection. Previous work by and others has shown that PKC-ε may regulate interactions of signalosomes with the cytoskeleton and transcription. Using the E14/T Embryonic Stem Cell (ESC) line and RT-PCR, we found that while no PKC-ε expression was detected in ESCs or embryoid bodies, PKC-ε message was first detected after induction of neuronal differentiation with retinoic acid and reached a significant 100-fold increase when stem cells had fully differentiated into neurons. This exponential increase was confirmed by immunoblotting and immunocytochemistry with PKC-ε-specific antibodies. Deconvolution imaging showed that the subcellular localization of PKC-ε was developmentally regulated and in particular that it was polarized towards the major area of the outgrowth of the major neuronal process. We obtained similar patterns in embryonic (E16) rat hippocampal neurons in culture. We then examined whether PKC-ε affected development in these neurons early in culture, using nucleofection of PKC-ε variants, tubulin (TUJ1) immunocytochemistry, and imaging. We found that both the wild type PKC-ε and constitutively active PKC-ε significantly induced neuritic length and arborization. Importantly, the dominant negative, kinase-dead form of PKC-ε, increased only the number of bifurcations, suggesting a different role for the kinase and the protein as a scaffold. Taken together these data indicate that PKC-ε may play a crucial role in the expression of the neuron-specific gene program (*support Pened 03ED778*).

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ PKC-Ε ΣΤΗ ΝΕΥΡΟΝΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΙΚΩΝ  
ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ  
ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ**

*Α. Φλωράκης<sup>1</sup>, Ν. Σακελλαρίδης<sup>2</sup>, και Δ. Μάγκουρα<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Κέντρο Νευροεπιστημών, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών*

<sup>2</sup> *Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα*

Η κυτταρική ασυμμετρία προσδίδει μία πολικότητα στους νευρώνες, η οποία είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ασύμμετρη κατανομή των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων σηματοδότησης. Ο έλεγχος της χωρικής κατανομής των μηνυτόρων σηματοδότησης είναι σημαντικός για τη ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής, η οποία οδηγεί στη μετατροπή των νευροβλαστών σε νευρώνες μέσω διαιρέσεων και στη συνέχεια μηχανισμών διαφοροποίησης και νευροπροστασίας. Έρευνες από εμάς και άλλους έχουν δείξει ότι η PKC-ε είναι πιθανό να ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις των μηνυτόρων σηματοδότησης με τον κυτταροσκελετό και ως παρεπόμενο αυτού και την μεταγραφή. Για να μελετήσουμε τον μηχανισμό αυτό, διαφοροποιήσαμε τα E14/T Εμβρυϊκά Βλαστικά Κύτταρα σε νευρώνες χρησιμοποιώντας ρετινοϊκό οξύ και ελέγξαμε τα επίπεδα του mRNA της PKC-ε, με ημιποσοτικό RT-PCR. Διαπιστώσαμε ότι η έκφραση της PKC-ε κυμαίνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα Εμβρυϊκά Βλαστικά Κύτταρα και στα Εμβρυοειδή Σώματα και ότι αυξάνεται έως 100 φορές όταν έχει ολοκληρωθεί η διαφοροποίηση σε νευρώνες. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε και με τις τεχνικές της ανοσοϊστοχημείας και της ανοσοαποτύπωσης, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων για την PKC-ε. Η μικροσκοπική ανάλυση με την τεχνική της αποπεριέλιξης ανάδειξε ότι η ενδοκυττάρια κατανομή της PKC-ε εξαρτάται από της φάση της διαφοροποίησης των κυττάρων και ότι στους νευρώνες κατανέμεται στην περιοχή από την οποία εκπορεύεται ο μεγαλύτερος νευρίτης. Το ίδιο πρότυπο κατανομής παρατηρούμε και σε καλλιέργειες νευρώνων που προέρχονται από τον ιππόκαμπο αρουραίων ηλικίας 16 ημερών. Έπειτα εξετάσαμε την πιθανότητα η PKC-ε να επηρεάζει τη διαφοροποίηση των νευρώνων χρησιμοποιώντας τεχνικές διαμόλυνσης με μεταλλαγμένες και μη, μορφές της πρωτεΐνης, ανοσοϊστοχημεία με το αντίσωμα για την βήτα-τουμπουλίνη τάξης III, και μικροσκοπική παρατήρηση. Διαπιστώσαμε ότι τόσο η αμετάλλακτη μορφή της πρωτεΐνης όσο και η ιδιοσύστατα ενεργή μορφή της (μετά από σχετική γενετική τροποποίηση) αυξάνουν με στατιστικά σημαντικό τρόπο το συνολικό μήκος των νευριτών και των αριθμό των διακλαδώσεων. Επιπλέον η αρνητική επικρατής μορφή της PKC-ε, που στερείται καταλυτική δράση, αυξάνει μόνο τον αριθμό των διακλαδώσεων, οδηγώντας στην υπόθεση ότι η πρωτεΐνη έχει δράση τόσο σαν ως ένζυμο όσο και σαν ικρίωμα. Τα δεδομένα αυτά αναδεικνύουν μέρος του μηχανισμού για το σημαντικό ρόλο της PKC-ε στην έκφραση γονιδίων που εκφράζονται κατά την νευρωνική διαφοροποίηση (*Χρημαδότηση από το ΠΕΝΕΔ 03ΕΔ778*).

## ANALYSIS OF THE ACTIVITY OF THE NEUROGENIC PROTEIN NEURALIZED IN LONG TERM MEMORY FORMATION

*Franco M.I.<sup>1</sup>, Anezaki M.<sup>1</sup> and Skoulakis E.X.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Institute of Molecular Biology and Genetics, BSRC "Alexander Fleming", 16672 Vari, Greece*

The protein Neuralized (Neur) is highly conserved from invertebrates to mammals and functions in cell fate decisions during *Drosophila* development where it is essential for endocytosis of the Notch (N) ligand Delta (Dl). Neur expression must be tightly regulated in order to establish the correct spatio-temporal pattern of Dl trafficking. Multiple mechanisms regulate N signaling because of the range of developmental decisions it mediates and their sensitivity to small variations in its activity. Although N is involved in transcription-dependent Long Term Memory (LTM) formation, molecules and mechanisms that could regulate N activity in mature neurons have not been described.

Neur accumulates in a strikingly specific pattern within particular neurons in the  $\alpha$  and  $\beta$  lobes of adult Mushroom Bodies (MB). We present a novel function of Neur in mushroom body-dependent Long Term olfactory memory (LTM) formation and discuss its potential involvement in regulation of N-mediated signaling in these post-developmental neurons.

We have carried out Microarray analysis of fly heads overexpressing Neur mRNA in two different set of neurons (one of the overexpression produces enhanced LTM and the other shows no effect in LTM), in order to elucidate the mechanisms involved in the memory enhancement observed. Because LTM is known to be dependent on "de novo" transcription of new mRNAs, we are focusing the validation of the array experiment on those Transcription Factors with differential expression.

## ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ NEURALIZED ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΗΣ ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑΣ ΜΝΗΜΗΣ

Franco M.I.<sup>1</sup>, Ανεζάκη Μ.<sup>1</sup> και Σκουλάκης Ε. Χ.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλ.Φλέμινγκ»  
16672, Βάρη Ελλάδα

Το γονίδιο *neuralized* (*Neur*) στη *Drosophila melanogaster* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη, η οποία παρουσιάζει υψηλό βαθμό συντήρησης από τα ασπόνδυλα έως τα θηλαστικά. Ο βασικός τρόπος δράσης της είναι στο σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα *Notch* (N), όπου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την ενδοκύτωση του προσδέτη *Delta* (DI). Μέσω αυτής της λειτουργίας συμμετέχει στον καθορισμό της κυτταρικής τύχης κατά την ανάπτυξη της *Drosophila*. Η έκφραση του *Neur* ρυθμίζεται αυστηρά ώστε να εγκαθιδρύεται το σωστό χωροχρονικό πρότυπο ενδοκυτταρικής μεταφοράς του DI. Η σηματοδότηση από την πρωτεΐνη N υπόκειται σε πολλαπλούς μηχανισμούς ρύθμισης, λόγω της πληθώρας των αναπτυξιακών αποφάσεων που συμμετέχει και της ευαισθησίας αυτών ακόμα και σε μικρές τροποποιήσεις της δράσης της. Προηγούμενες εργασίες έχουν συνδέσει τη δράση της N με τη δημιουργία της, μεταγραφικά εξαρτώμενης, μακρόχρονης μνήμης. Εντούτοις, δεν έχουν ακόμα περιγραφεί συγκεκριμένα μόρια και μηχανισμοί που θα μπορούσαν να ελέγχουν τη δράση της σε ώριμους νευρώνες.

Η πρωτεΐνη *Neur* συσσωρεύεται σε συγκεκριμένους νευρώνες στους α και β λοβούς των μανιταροειδών σωματίων, που θεωρούνται το κέντρο της οσφρητικής μάθησης και μνήμης στα έντομα. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται μια νέα λειτουργία της *Neur* στην, εξαρτώμενη από τα μανιταροειδή σωματίδια, μακροχρόνια μνήμη. Επίσης, μελετάμε την πιθανή εμπλοκή της στη ρύθμιση της σηματοδότησης N σε αυτούς τους μετα-αναπτυξιακούς νευρώνες.

Πραγματοποιήσαμε ανάλυση μικροσυστοιχιών (microarrays) σε κεφάλια μυγών όπου υπερέκφραζόταν το *Neur*. Η υπερέκφραση γινόταν σε δύο διαφορετικές ομάδες νευρώνων, μία όπου η υπερέκφραση του *Neur* οδηγεί στην ενίσχυση της μακρόχρονης μνήμης και μία όπου η υπερέκφραση δεν παρουσιάζει φαινότυπο. Η ανάλυση αυτή είχε σαν στόχο την διαλεύκανση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην ενίσχυση της μνήμης. Επειδή, όπως είναι γνωστό, η μακρόχρονη μνήμη εξαρτάται από την εκ νέου μεταγραφή νέων αγγελιοφόρων RNA (mRNA), εστιάζουμε στην επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης που αφορούν σε μεταγραφικούς παράγοντες με διαφορική έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων νευρώνων.

## LOCOMOTOR BEHAVIOR OF DROSOPHILA MELANOGASTER DURING AGING

*A. Gaitanidis, H. Hala and C. Consoulas*

*Laboratory of Experimental Physiology, Medical School, University of Athens, Athens 11527,  
Greece*

One of the most obvious characteristics of *Drosophila melanogaster* is its negative geotaxis, the trend to move against the gravity direction. However at the lifespan of the fly this behaviour presents progressive reduction. Furthermore in order to avoid the source of the stimulus, the fly moves spontaneously against it.

From previous studies, it is known that the required time for the climbing of a certain distance as a response to a mild stimulus is increased during aging and the percentage of flies that complete the climbing assay is reduced (1, 2). However, these experiments had been performed with a minor number of stimulus and of specific intensity. Hence, it is unknown whether an aged fly fails to climb due to kinetic deficits (it can not climb), or/and due to a reduced response at the level of CNS (it does not want to climb). As well, it never has been any quantification of the animal response to different kinds of stimulus and its alteration during lifespan.

In our experiments, we used a greater number of stimuli of a higher intensity in order to test if there is any change in the response of the animal during aging. We also studied the spontaneous activity of the fly and the response to mild stimuli.

Our results show that the increment of age a) does not cause any rise of the required climbing time, b) causes a reduction in the spontaneous locomotion due to the decreased motivation to complete the assay and c) leads to a decreased response to a mild or a strong stimulus. Finally during the entire lifespan of the fly, there is no amplification or suppression of the response in repeated stimuli.

Therefore, in contrast to many other species, including mammals, the motor system (neuromuscular) responsible for walking/climbing in *drosophila*, does not exhibit any functional decay during aging, while the motivation to perform the escape behavior is dramatically reduced.

1. *Le Bourg (1987). Exp. Gerontology 22 :359-369*

2. *Gargano J.W. (2005). Exp. Gerontology 40 (5) :386-395*

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΤΗΣ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ΚΑΤΑ ΤΗ ΓΗΡΑΝΣΗ

*A. Γαϊτανίδης, X. Χάλα, και X. Κόνσουλας*

*Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Αθήνα 11527*

Ένα χαρακτηριστικό του είδους *Drosophila melanogaster* είναι ο αρνητικός γεωτακτισμός της, δηλαδή η τάση που παρουσιάζει να κατευθύνεται αυθόρμητα προς τα πάνω, δηλαδή σε αντίθετη κατεύθυνση από αυτή της βαρύτητας. Κατά την διάρκεια της ζωής της μύγας όμως αυτή η συμπεριφορά εμφανίζει σταδιακή μείωση. Επίσης, φυσική αντίδραση αποφυγής κινδύνου της μύγας μετά από κάποιο μηχανικό ερέθισμα είναι να κατευθυνθεί προς τα πάνω, προσπαθώντας να αποφύγει την πηγή ερεθισμού.

Από προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι ο χρόνος που απαιτείται για την αναρρίχηση μιας μύγας σε συγκεκριμένο ύψος ως απόκριση σε ένα συγκεκριμένο ήπιο ερέθισμα, αυξάνεται με την ηλικία καθώς επίσης και ότι μειώνεται το ποσοστό των μυγών που καταφέρνουν να ολοκληρώσουν την δοκιμασία αναρρίχησης (1, 2). Τα παραπάνω πειράματα όμως έχουν γίνει με ένα πολύ μικρό αριθμό ερεθισμάτων και συγκεκριμένης έντασης. Κατά συνέπεια είναι άγνωστο το κατά πόσο ο γηρασμένος οργανισμός αποτυγχάνει στη δοκιμασία αναρρίχησης λόγω κινητικής έκπτωσης (δεν μπορεί να αναρριχηθεί) ή/και λόγω έκπτωσης της απόκρισης στο ερέθισμα στο επίπεδο του ΚΝΣ (δεν θέλει να αναρριχηθεί). Επίσης, δεν έχει ποσοτικοποιηθεί η αντίδραση του ζώου σε διαφορετικά μεγέθη ερεθισμάτων και το πόσο αυτή αλλάζει σε σχέση με την ηλικία.

Στον κύκλο των πειραμάτων μας, χρησιμοποιήσαμε μεγαλύτερο αριθμό ερεθισμάτων μεγαλύτερης έντασης προκειμένου να ελέγξουμε εάν και πόσο μεταβάλλεται η αντίδραση του ζώου σε τέτοιου είδους ερεθίσματα σε σχέση με την ηλικία. Επίσης μελετήσαμε την αυθόρμητη δραστηριότητα της μύγας αλλά και την συμπεριφορά της σε ήπια ερεθίσματα. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως η αύξηση της ηλικίας: α) δεν προκαλεί αύξηση του χρόνου αναρρίχησης, (β) προκαλεί ελάττωση της αυθόρμητης κινητικής συμπεριφοράς του ζώου που οφείλεται στη μείωση της διάθεσης του να ολοκληρώσει την δοκιμασία αναρρίχησης και (γ) προκαλεί μείωση του μεγέθους της αντίδρασης σε ήπιο ή ισχυρό ερέθισμα. Τέλος σε οποιαδήποτε ηλικία, δεν παρατηρείται ενίσχυση ή καταστολή της συμπεριφοράς σε επαναλαμβανόμενα ερεθίσματα αναρρίχησης.

Συμπερασματικά σε αντίθεση με πολλά άλλα είδη ζώων, συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών, το κινητικό σύστημα (νευρομυϊκό) υπεύθυνο για τη βάδιση/αναρρίχηση στη *Drosophila* δεν παρουσιάζει λειτουργική έκπτωση κατά τη γήρανση, ενώ η διάθεση του εντόμου να εκτελέσει αυτή τη συμπεριφορά μειώνεται δραματικά.

1. Le Bourg (1987). *Exp. Gerontology* 22 :359-369
2. Gargano J.W. (2005). *Exp. Gerontology* 40 (5) :386-395



## AGE-DEPENDENT CHANGES IN THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF TWO MOTOR CIRCUITS IN DROSOPHILA

*A. Gaitanidis and C. Consoulas*

*Laboratory of Experimental Physiology, Medical School, University of Athens, Athens 11527, Greece*

In *Drosophila melanogaster* the jump-and-flight escape response is mediated by a well-defined neural circuit, the giant fiber system (GFS) (1, 2). The goal of our study was to investigate for possible degenerative symptoms in this circuit, during aging. The function of the circuit in young and aged animals was tested for three parameters: 1) the fidelity of the circuit response to high frequency stimulation (Following Frequency 50% -FF<sub>50</sub>), 2) the refractory period of the circuit and, 3) the propagation time of the signal that is initiated in the giant fibers (GF) and recorded from the Dorsal Longitudinal flight muscles (DLM).

Our results suggest that the second and the third parameter remain essentially unchanged throughout lifespan but the fidelity of the circuit response to high frequency stimulation is slightly decreased (FF<sub>50</sub>=200±24,1Hz 11days old animals, FF<sub>50</sub>=178,6±27,1Hz >50days old animals)

Flight muscles exhibit a scissor-like activity when the central nervous system receives high voltage (over 50V) and frequency (~ 200Hz) stimulation for 2 secs. The repertoire consists of four elements: (1) an initial discharge (ID), (2) a response failure of the GFS, (3) a delayed discharge (DD) and (4) recovery from paralysis of the GFS.

The phase of the delayed discharge is owed to the function of the neuronal circuit underlying the flight behavior (Central Pattern Generator, CPG). Previous studies have shown an age-dependent reduction of the time the fly spends flying per day. The drop of flight activity may reflect a functional decay of the flight-CPG during aging. Therefore, we investigated the function of the flight CPG during the lifespan of wild type *drosophila*.

Our experiments indicate that all the components of the electroconvulsive repertoire can be evoked reliably and remain quantitatively unchanged at any point in adulthood, even at the late stages of life. This suggests that age-dependent reduction in flight behavior is not due to the degenerative alterations in the function of the flight-CPG. Thus, flight dysfunction may be localized at the level of flight muscles. It is likely, but remains to be shown, that aged flight muscles have reduced endurance for long-lasting flight.

1. King DG, Wyman RJ (1980) *Anatomy of the giant fiber pathway in Drosophila*  
I. Three thoracic components of the pathway. *J Neurocytol* 9:753-70
2. Tanouye M, Wyman R (1980) *Motor outputs of giant nerve fiber in Drosophila*. *J Neurophysiol* 44: 405-421

## ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΔΥΟ ΝΕΥΡΩΝΙΚΩΝ ΚΥΚΛΩΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ DROSOPHILA MELANOGASTER ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΓΗΡΑΝΣΗ.

*A. Γαϊτανίδης και X. Κόνσουλας*

*Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Αθήνα 11527*

Στη *Drosophila melanogaster*, το αντανακλαστικό διαφυγής, που εκδηλώνεται με το αρχικό άλμα και το επακόλουθο πέταγμα της μύγας μακριά, ελέγχεται από ένα απλό και πολύ καλά χαρακτηρισμένο νευρωνικό κύκλωμα, το Giant Fiber System (GFS) (1, 2). Ο στόχος της μελέτης αυτής ήταν να ελέγξουμε το κατά πόσο η λειτουργία αυτού κυκλώματος παρουσιάζει κάποια εκφυλιστικά συμπτώματα στα τελευταία στάδια ζωής του οργανισμού. Η μελέτη της λειτουργίας αυτού κυκλώματος σε ζώα μεγάλης ηλικίας και η σύγκριση με νεότερα άτομα έγινε για τις εξής τρεις παραμέτρους: 1) την πιστότητα απόκρισης του κυκλώματος σε υψηλές συχνότητες διέγερσης 2) την ανερέθιστη περίοδος του κυκλώματος, και 3) τον χρόνο μετάδοσης του σήματος από τους γιγαντιαίους νευράξονες (GF) στους πτητικούς μυς (DLM).

Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η 2<sup>η</sup> και η 3<sup>η</sup> παράμετρος παραμένουν σταθερές ακόμα και στα τελευταία στάδια της ζωής της μύγας ενώ όσο αναφορά την πιστότητα απόκρισης των DLM σε υψηλές συχνότητες διέγερσης υπάρχει μια μικρή πτώση ( $FF_{50}=200+24,1\text{Hz}$  σε μύγες 11 ημερών,  $FF_{50}=178,6+27,1\text{Hz}$  σε μύγες μεγαλύτερες των 50 ημερών)

Επίσης, από προηγούμενες εργασίες έχειδειχθεί πως στο αγρίου τύπου στέλεχος, όταν δοθεί ερέθισμα μέσω δύο ηλεκτροδίων μεγάλης συχνότητας (~ 200Hz) για χρονικό διάστημα περίπου 2 δευτερολέπτων και με ένταση μεγαλύτερη από 50V οι DLMs παρουσιάζουν επιληπτική συμπεριφορά η οποία περιλαμβάνει κατά χρονολογική σειρά τα εξής στάδια: I) Αρχική ριπή δυναμικών ενέργειας (ID), II) Παράλυση του GFS III) Καθυστερημένη ριπή δυναμικών ενέργειας (DD), IV) Επανάκτηση της λειτουργίας του GFS (επιτυχείς απαντήσεις του GFS σε ερεθίσματα συχνότητας 1Hz).

Η φάση της καθυστερημένης ριπής δυναμικών ενέργειας έχει σχετισθεί με την λειτουργία νευρωνικών κυκλωμάτων που είναι υπεύθυνα για την πτήση του ζώου (Central Pattern Generator, CPG). Θέλαμε λοιπόν να ελέγξουμε το κατά πόσο ο CPG για την πτήση παραμένει λειτουργικός κατά την διάρκεια ζωής του ζώου, αφού προηγούμενες εργασίες δείχνουν πως το ποσοστό του χρόνου που ξοδεύει μια μύγα σε μια μέρα πετώντας μειώνεται σε σχέση με την ηλικία.

Τα αποτελέσματα μας δείχνουν πως ακόμα και στα τελευταία στάδια της ζωής του εντόμου, εμφανίζεται η φάση της καθυστερημένης ριπής δυναμικών όπως και όλα τα άλλα χαρακτηριστικά της επιληπτικής συμπεριφοράς. Τα παραπάνω αποτελούν σαφή ένδειξη πως ο πτητικός CPG παραμένει λειτουργικά ενεργός, ενώ τα αίτια της μείωσης του χρόνου πτήσης σε γηρασμένα έντομα πρέπει να αναζητηθούν στο κατά πόσο τα μυϊκά κύτταρα των πτητικών μυών τους αντέχουν σε μακροχρόνιες παρατεταμένες συσπάσεις.

2. King DG, Wyman RJ (1980) Anatomy of the giant fiber pathway in *Drosophila*. I. Three thoracic components of the pathway. *J Neurocytol* 9:753-70
3. Tanouye M, Wyman R (1980) Motor outputs of giant nerve fiber in *Drosophila*. *J Neurophysiol* 44: 405-421

## EFFECTS OF VISUAL DEPRIVATION ON NMDAR2B RECEPTOR SUBUNIT PHOSPHORYLATION IN THE RAT VISUAL CORTEX

*S. Galtsidis<sup>1</sup>, P. Zeitouyan<sup>2</sup>, E. D. Kouvelas<sup>2</sup>, P. Giompres<sup>1</sup> and A. Mitsacos<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Laboratory of Human and Animal Physiology, Biology Department, University of Patras, Patras 26500, Greece.*

<sup>2</sup> *Department of Physiology, Medical School, University of Patras, Patras 26500, Greece.*

Visual deprivation such as dark rearing prolongs the critical period for ocular dominance plasticity in visual cortex. NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptors have been strongly implicated in plasticity in the visual cortex. Phosphorylation of NMDA receptors mediates synaptic plasticity through regulation of synaptic trafficking and surface expression of these receptors, in addition to the effect on channel function. Serine 1303 is the major site of CaM kinase II phosphorylation on NR2B subunit of the NMDA receptor. To test the role of receptor phosphorylation on visual cortex plasticity, we examined the effects of dark rearing on phosphorylation changes of the NR2B receptor subunit in rats that were dark reared from P0 to P21 and P0 to P30 (P: postnatal day). Receptor phosphorylation was examined by Western blotting in the visual cortex using phosphospecific antibodies against the NR2B phosphorylated site (Ser 1303).

In visual cortex of both P21 and P30 dark-reared rats the levels of phospho-NR2B were increased compared to rats of similar age reared in 12-h light/12-h dark. Our results show an experience-dependent regulation of phosphorylation of serine 1303 on NR2B subunit of the NMDA receptors in the visual cortex. These results suggest that NMDA receptor phosphorylation may contribute to changes in the delayed development of visual cortex that have been observed during visual deprivation.

*Supported by the European Social Fund, Operational Program for Educational and Vocational Training II (EPEAEK II), and the Program Pythagoras II.*

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΑΠΟΣΤΕΡΗΣΗΣ ΣΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ NR2B ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ NMDA ΣΤΟΝ ΟΠΤΙΚΟ ΦΛΟΙΟ ΕΠΙΜΥΟΣ**

*Σ. Γαλτσιδής<sup>1</sup>, Π. Ζεϊτουγιάν<sup>2</sup>, Η. Κούβελας<sup>2</sup>, Π. Γιομπρές<sup>1</sup> και Α. Μητσάκου<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Εργαστήριο Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα 26500, Ελλάδα*

<sup>2</sup> *Τομέας Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα 26500, Ελλάδα*

Η οπτική αποστέρηση, όπως η εκτροπή πειραματόζωων στο σκοτάδι, επιμηκύνει την κρίσιμη περίοδο πλαστικότητας του οπτικού φλοιού. Οι υποδοχείς NMDA (N-methyl-D-aspartate) έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται σημαντικά στην πλαστικότητα του οπτικού φλοιού. Η φωσφορυλίωση των υποδοχέων NMDA εμπλέκεται στη συναπτική πλαστικότητα μέσω της ρύθμισης της διακίνησης τους στην σύναψη και της έκφρασης τους στη επιφάνεια του κυττάρου, καθώς και μέσω της επίδρασης στην λειτουργία του διαύλου. Η σερίνη 1303 της υπομονάδας NR2B των υποδοχέων NMDA αποτελεί την κύρια περιοχή φωσφορυλίωσης από την CaM κινάση II. Για να εξετάσουμε τον ρόλο της φωσφορυλίωσης των υποδοχέων στην πλαστικότητα του οπτικού φλοιού, μελετήσαμε μεταβολές της φωσφορυλίωσης της υπομονάδας NR2B των υποδοχέων NMDA σε επίμυς μετά από οπτική αποστέρηση για την περίοδο P0-P21 και P0-P30 (P: postnatal day). Προκειμένου να πιστοποιηθεί η φωσφορυλίωση του καταλοίπου της σερίνης 1303 της υπομονάδας NR2B στον οπτικό φλοιό, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Στον οπτικό φλοιό παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλίωσης της NR2B υπομονάδας των υποδοχέων NMDA στα P21 και P30 πειραματόζωα που υπέστησαν οπτική αποστέρηση συγκριτικά με πειραματόζωα ίδιας ηλικίας των οποίων η εκτροπή πραγματοποιήθηκε σε ημερήσιο κύκλο 12 ώρες φως/12 ώρες σκοτάδι. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν μια εξαρτώμενη από την εμπειρία ρύθμιση της φωσφορυλίωσης του καταλοίπου της σερίνης 1303 της υπομονάδας NR2B των υποδοχέων NMDA. Τα παραπάνω πειράματα προτείνουν ότι η φωσφορυλίωση των υποδοχέων NMDA μπορεί να συμβάλλει σε αλλαγές, που συμβαίνουν κατά την παρατεταμένη ανάπτυξη του οπτικού φλοιού επίμυων που έχουν υποστεί οπτική αποστέρηση.

*Η παρούσα εργασία υποστηρίχθηκε από European Social Fund, Operational Program for Educational and Vocational Training II (EPEAEK II), and το πρόγραμμα Πυθαγόρας II.*

## TYROSINE HYDROXYLASE IN NEUROSECRETORY NEURONS IN THE HUMAN NEONATE: THE EFFECT OF PERINATAL HYPOXIA

*Ganou V<sup>1,2</sup>, Pagida M<sup>1,2</sup>, Konstantinidou A<sup>3</sup>, Tsekoura E<sup>4</sup>, Kontostavlaki D<sup>1,2</sup>, Patsouris E<sup>3</sup> and Panayotacopoulou M<sup>1,2</sup>*

*<sup>1</sup> Department of Psychiatry, <sup>2</sup> University Mental Health Research Institute, <sup>3</sup> Department of Pathology and <sup>4</sup> Children's Hospital, University of Athens, Greece*

Tyrosine hydroxylase (TH) -the first and limiting enzyme in catecholamine synthesis- is expressed in numerous magnocellular neurons of the paraventricular and supraoptic nuclei in full term neonates who died from perinatal hypoxia, while only in a few neurons in the premature ones. In the present study we investigated whether increased expression of TH represents a primary developmental phenomenon or reflects a secondary phenomenon related to the activation of vasopressin (AVP) systems during labor due to hypoxia. Retrospectively selected autopsy material consisted of hypothalami of twelve infants with total prenatal and postnatal age of at least 35 weeks. Autopsies were performed following informed written consent and revealed histopathological features of hypoxic/ischemic encephalopathy. The severity and duration of hypoxia was estimated according to clinical data and neuropathological brain lesions. Neonates without or with minimal clinical or neuropathological evidence of perinatal hypoxia were used as controls. Consecutive paraffin sections at three selected levels of the hypothalamus were stained immunohistochemically for TH, neurophysin (NP), AVP and oxytocin (OXY). Increased expression of TH within AVP neurons was found in neonates that suffered prolonged hypoxic/ischemic insult and showed severe neuropathological lesions. On the contrary, only limited expression of TH was evident in AVP neurons of neonates with severe but abrupt hypoxic injury and minimal neuropathologic lesions. The expression of TH was found to correlate with postnatal duration and severity of the hypoxic/ischemic insult. Increased TH expression therefore, should be considered as a secondary phenomenon related to the activation of AVP neurons during labor. Increased vasopressin secretion by the fetus during labor is considered an adaptive mechanism to redistribute cardiac output to vital organs. The possibility that TH expression in the neurosecretory nuclei could be of diagnostic value for the estimation of perinatal hypoxia in the human neonate will be further investigated.

## ΥΔΡΟΞΥΛΑΣΗ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ ΣΤΑ ΝΕΥΡΟΕΚΚΡΙΤΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΝΕΟΓΝΟΥ: Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ

Γάνου Β.<sup>1,2</sup>, Παγίδα Μ.<sup>1,2</sup>, Κωνσταντινίδου Α.<sup>3</sup>, Τσεκούρα Ε.<sup>4</sup>, Κοντοσταυλάκη Δ.<sup>1,2</sup>, Πατσούρης Ε.<sup>3</sup>  
και Παναγιωτακοπούλου Μ.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ψυχιατρική Κλινική, <sup>2</sup>Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Ινστιτούτο Ψυχικής Υγιεινής, <sup>3</sup>Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής και <sup>4</sup>3<sup>η</sup> Παιδιατρική Κλινική, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Η υδροξυλάση της τυροσίνης (ΤΗ) –το πρώτο και καθοριστικό ένζυμο στη βιοσύνθεση των κατεχολαμινών- εκφράζεται σε μεγάλο αριθμό μεγαλοκυτταρικών νευρώνων του παρακοιλιακού και υπεροπτικού πυρήνα στον υποθάλαμο τελειόμηνων νεογνών που κατέληξαν με διάγνωση περιγεννητικής υποξίας, ενώ μόνο σε λίγους νευρώνες στον υποθάλαμο πρόωρων νεογνών. Στη παρούσα εργασία διερευνήσαμε εάν η αυξημένη έκφραση της ΤΗ είναι ένα πρωτογενές αναπτυξιακό φαινόμενο ή εάν είναι ένα δευτερογενές φαινόμενο σχετιζόμενο με την ενεργοποίηση των βασοπρεσσινικών συστημάτων κατά τη διάρκεια του τοκετού λόγω υποξίας. Χρησιμοποιήθηκε επιλεγμένο νεκροτομικό υλικό από τον υποθάλαμο 12 νεογέννητων με συνολική προ- και μεταγεννητική ηλικία τουλάχιστον 35 εβδομάδων. Οι νεκροτομές έγιναν κατόπιν έγγραφης συγκατάθεσης των γονέων τους. Η νευροπαθολογική εξέταση έδειξε ιστοπαθολογικά ευρήματα υποξικής/ισχαιμικής εγκεφαλοπάθειας. Η βαρύτητα και η διάρκεια της υποξίας εκτιμήθηκε με βάση τα κλινικά στοιχεία και τις νευροπαθολογικές αλλοιώσεις του εγκεφάλου. Νεογνά χωρίς ή με ελάχιστα κλινικά ή νευροπαθολογικά ευρήματα περιγεννητικής υποξίας χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες. Συνεχόμενες τομές παραφίνης σε τρία επιλεγμένα επίπεδα του υποθαλάμου χρώστηκαν ανοσοϊστοχημικά για ΤΗ, νευροφυσίνη (NP), βασοπρεσσίνη (AVP) και ωκυτοκίνη (OXY). Παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της ΤΗ στους βασοπρεσσινικούς νευρώνες νεογέννητων που υπέστησαν παρατεταμένο υποξικό/ισχαιμικό επεισόδιο και έδειξαν σοβαρές νευροπαθολογικές αλλοιώσεις. Αντίθετα, μόνο περιορισμένη έκφραση της ΤΗ παρατηρήθηκε στους βασοπρεσσινικούς νευρώνες των νεογέννητων με βαριά, αλλά σύντομης διάρκειας υποξία και ελάχιστες νευροπαθολογικές αλλοιώσεις. Η έκφραση της ΤΗ βρέθηκε να σχετίζεται με τη μεταγεννητική διάρκεια και βαρύτητα του υποξικού/ισχαιμικού επεισοδίου. Συνεπώς, η έκφραση της ΤΗ πρέπει να θεωρηθεί σαν ένα δευτερογενές φαινόμενο σχετιζόμενο με την ενεργοποίηση των βασοπρεσσινικών νευρώνων λόγω περιγεννητικής υποξίας. Αυξημένη έκκριση AVP από το έμβρυο κατά τη διάρκεια του τοκετού θεωρείται ένας προσαρμοστικός μηχανισμός για την ανακατανομή του αίματος στα ζωτικά όργανα. Περαιτέρω αύξηση του υλικού απαιτείται προκειμένου να θεωρηθεί η έκφραση της ΤΗ στους νευροεκκριτικούς πυρήνες διαγνωστικός δείκτης για την εκτίμηση της περιγεννητικής υποξίας στα ανθρώπινα νεογνά.

## PLASTICITY OF ADULT RAT BASAL GANGLIA NEURONS MODULATED BY ADENOASSOCIATED VIRAL GENE DELIVERY OF NGF AND TRKA

Giannakopoulou D<sup>1</sup>, Daguin-Nerriere V<sup>3</sup>, Brachet P<sup>3</sup>, Kouvelas E.D<sup>2</sup>, Mitsacos A.<sup>2</sup>, Giompres P<sup>1</sup>

*1 Lab. of Human and Animal Physiology, Dept. of Biology, Univ. of Patras;*

*2 Dept. of Physiology, Medical School, Univ. of Patras, Patra, Greece;*

*3 INSERM 643, University of Nantes, France*

Neurotrophic factors are secreted proteins which promote neuronal survival, participate in axonal growth and influence axonal targeting to establish contacts during development. In adulthood, neurotrophic factors are required to maintain neuronal functions and specific neuronal phenotype. Nerve growth factor (NGF) is a neurotrophic factor belonging to the neurotrophin family. The neurotrophic effects of NGF are mediated by the high affinity receptor, TrkA, which is a membrane tyrosine-kinase. In the present study we investigated whether the ectopic synthesis of TrkA in substantia nigra cells and enhanced synthesis of NGF in striatal cells modulate the dopaminergic, glutamatergic and GABAergic system of adult basal ganglia. For this purpose, we used two recombinant adeno-associated viruses, rAAV-CMV-TrkA and rAAV-CBA-NGF (1). Stereotaxic injections of rAAV-TrkA in the substantia nigra and rAAV-NGF in the striatum of the right hemisphere were performed in 3-month old female Sprague-Dawley rats. Three separate experimental groups were used: rats injected with rAAV-TrkA in substantia nigra; rats injected with rAAV-NGF in striatum; rats injected with rAAV-TrkA in substantia nigra and rAAV-NGF in striatum.

The effects of TrkA and NGF gene delivery on locomotor activity were assessed using the open field and rotarod tests, four weeks after stereotaxic injections of viruses in the right hemisphere. TrkA and NGF immunoreactivities were detected in substantia nigra pars compacta and striatum, respectively, nine weeks after stereotaxic injections of viruses in the right hemisphere. Receptor binding autoradiography, in situ hybridization and immunohistochemistry were also performed. In striatum, we studied the dopamine transporter (DAT) by measuring binding levels of [<sup>3</sup>H]WIN35428 and DAT immunoreactivity. D1 dopamine receptors, D2 dopamine receptors, NMDA and GABA<sub>A</sub> receptors were studied by measuring binding levels of [<sup>3</sup>H]SCH23390, [<sup>3</sup>H]raclopride, [<sup>3</sup>H]MK801 and [<sup>3</sup>H]SR95531, respectively. In substantia nigra, the dopamine transporter was studied by measuring binding levels of [<sup>3</sup>H]WIN35428 and DAT mRNA expression. We also studied tyrosine hydroxylase (TH) and DAT immunoreactivity in substantia nigra.

Our results have shown selective neurochemical changes in the dopamine transporter and dopamine receptors, as well as in GABA<sub>A</sub> but no changes in NMDA receptors in the viral treated right hemisphere. Furthermore, an increased TH immunoreactivity in dopaminergic neurons of substantia nigra in the viral treated right hemisphere was observed. These data suggest that neuron-specific genetical modification of TrkA and NGF expression can induce plasticity to adult basal ganglia neurons.

*1. Melchior B. et al., Exp. Neurol. 183, 367-378, (2003).*

**ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΩΡΙΜΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΩΝ ΒΑΣΙΚΩΝ  
ΓΑΓΓΛΙΩΝ ΕΠΙΜΥΟΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ TRKA ΚΑΙ NGF  
ΜΕΣΩ ΑΔΕΝΟΙΩΝ**

*Δ. Γιαννακοπούλου<sup>1</sup>, V. Daguin-Nerriere<sup>3</sup>, P. Brachet<sup>3</sup>, Η.Δ. Κούβελας<sup>2</sup>, Α. Μητσάκου<sup>2</sup>, Π. Γιομπρές<sup>1</sup>*

*1 Εργ. Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων, Τμ. Βιολογίας, Παν. Πατρών*

*2 Εργ. Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Παν. Πατρών*

*3 INSERM 643, Παν. Νάντης, Γαλλία*

Οι νευροτροφικοί παράγοντες είναι εκκρινόμενες πρωτεΐνες που προάγουν την επιβίωση των νευρώνων και συμμετέχουν στην ανάπτυξη των νευραξόνων και τη δημιουργία συνάψεων κατά την ανάπτυξη. Στην ενήλικη ζωή, οι νευροτροφικοί παράγοντες απαιτούνται για τη διατήρηση των νευρωνικών συστημάτων και του νευρωνικού φαινοτύπου. Ο νευροτροφικός παράγοντας (NGF) ανήκει στην οικογένεια των νευροτροφινών. Οι νευροτροφικές δράσεις του διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα υψηλής συγγένειας, TrkA, που είναι μια μεμβρανική κινάση της τυροσίνης. Στόχος της παρούσας έρευνας είναι να μελετηθεί αν η εκτοπική σύνθεση του υποδοχέα TrkA στη μέλαινα ουσία και η αυξημένη σύνθεση του NGF στα κύτταρα του ραβδωτού σώματος δύνανται να τροποποιήσουν το ντοπαμινεργικό, γλουταμινεργικό και GABAεργικό σύστημα των βασικών γαγγλίων ώριμων επίμυων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οχήματα δύο ανασυνδυασμένων αδενοϊών, rAAV-CMV-TrkA και rAAV-CBA-NGF (1). Πραγματοποιήθηκαν στερεοταξικές εγχύσεις του rAAV-TrkA στη μέλαινα ουσία και του rAAV-NGF στο ραβδωτό σώμα του δεξιού ημισφαιρίου θηλυκών Sprague-Dawley αρουραίων ηλικίας 3 μηνών. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές πειραματικές ομάδες: στην πρώτη ομάδα έγινε έγχυση rAAV-TrkA στη μέλαινα ουσία, στη δεύτερη έγχυση rAAV-NGF στο ραβδωτό σώμα και στην τρίτη έγχυση rAAV-TrkA στη μέλαινα ουσία και rAAV-NGF στο ραβδωτό σώμα.

Η επίδραση της έκφρασης των γονιδίων του TrkA και του NGF στην κινητικότητα των πειραματόζωων μελετήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (open field test) και της περιστρεφόμενης ράβδου (rotarod test), τέσσερις εβδομάδες μετά τις στερεοταξικές εγχύσεις στο δεξιό ημισφαίριο. Επιπλέον, ελέγχθηκε η ανοσοδραστικότητα των TrkA και NGF στη μέλαινα ουσία και στο ραβδωτό σώμα, αντίστοιχα, εννιά εβδομάδες μετά τις στερεοταξικές εγχύσεις στο δεξιό ημισφαίριο. Οι αλλαγές των νευρωνικών συστημάτων μελετήθηκαν με τις τεχνικές της *in vitro* αυτοραδιογραφίας υποδοχέων, της *in situ* υβριδοποίησης και της ανοσοϊστοχημείας. Στο ραβδωτό σώμα ο μεταφορέας της ντοπαμίνης (DAT), οι ντοπαμινεργικοί υποδοχείς D1, D2, οι υποδοχείς NMDA και GABA<sub>A</sub> μελετήθηκαν με βάση τα επίπεδα δέσμευσης των [<sup>3</sup>H]WIN35428, [<sup>3</sup>H]SCH23390, [<sup>3</sup>H]raclopride, [<sup>3</sup>H]MK801 και [<sup>3</sup>H]SR95531, αντίστοιχα. Στη μέλαινα ουσία ο μεταφορέας της ντοπαμίνης (DAT) μελετήθηκε με βάση τα επίπεδα δέσμευσης του [<sup>3</sup>H]WIN35428 και της έκφρασης του mRNA του. Μελετήθηκε επίσης η ανοσοδραστικότητα της τυροσίνης υδροξυλάσης (TH) και του DAT.

Η μελέτη αυτή αποκάλυψε επιλεκτικές νευροχημικές αλλαγές στον μεταφορέα της ντοπαμίνης, στους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς, καθώς και στους υποδοχείς GABA<sub>A</sub>, ενώ καμία αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στους υποδοχείς NMDA στο δεξιό ημισφαίριο. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση της ανοσοδραστικότητας της TH στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας του δεξιού ημισφαιρίου. Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα προτείνουν ότι η τροποποίηση της έκφρασης των γονιδίων του TrkA και του NGF πιθανώς να επάγει πλαστικότητα στους νευρώνες των βασικών γαγγλίων ώριμων πειραματόζωων.

*I. Melchior B. et al., Exp. Neurol. 183, 367-378, (2003).*



## COMPREHENSION OF SARCASM, METAPHOR AND HINTING IN SCHIZOPHRENIA

*M. Giannakou<sup>1,2</sup>, M.H. Kosmidis<sup>1</sup>, V.P. Bozikas<sup>3</sup>, G. Garyfallos<sup>2</sup> and K. Fokas<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> *Neuropsychology Group, School of Psychology, Aristotle University of Thessaloniki, Greece*

<sup>2</sup> *2nd Department of Psychiatry, Aristotle University of Thessaloniki, Greece*

<sup>3</sup> *1st Department of Psychiatry, Aristotle University of Thessaloniki, Greece*

Communication difficulties are considered a core deficit in schizophrenia, and are listed among the diagnostic criteria for the disorder. Presumably, such difficulties may exacerbate interpersonal problems, leading patients to greater social isolation. Numerous studies have explored these communication and social problems by studying patients' impaired "theory of mind" (awareness of others' thoughts or emotional state as distinct from one's own). Related to this is what is called pragmatic comprehension, the ability to go beyond the literal meaning of a phrase and extract its figurative meaning. We undertook the present study in order to explore difficulties in understanding sarcasm, metaphors and hinting among patients with schizophrenia.

We examined 40 patients with schizophrenia in remission (32 males) and 30 healthy participants (24 males), matched on age, level of education and sex ratio. Our experiment comprised two conditions: 1) the Hinting Test (HT), consisting of six short stories involving two characters in each of which the scenario ended with one character dropping a very obvious hint. Participants were asked what the character really meant with what he or she said; 2) the Sarcasm & Metaphor Comprehension Test, consisting of 24 short stories involving one or two characters involved in a dialogue. Participants must judge if the final utterance in each scenario is suitable to the story and explain what the person meant by this utterance. The final utterance of these stories was meant to be interpreted sarcastically (six stories), metaphorically (six stories) or literally (six stories), while in the remaining stories, the final utterance had no meaning.

Patients with schizophrenia performed more poorly on the HT than healthy participants [ $F(1,69)=23.281$ ,  $p<.001$ ]. When including the Literal Comprehension score as a covariate (since patients also performed more poorly on this condition relative to controls), the group difference for Sarcasm Comprehension was the only one that remained significant ( $p=.019$ ).

Our findings suggest that patients' difficulties in everyday communication are predominantly related to second-order theory of mind (irony and hinting comprehension), but not first-order (metaphor comprehension), and stress the need for social skills learning courses emphasizing the pragmatic use of language.

## ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΗΣ ΕΙΡΩΝΕΙΑΣ, ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΠΑΙΝΙΓΜΩΝ ΣΤΗ ΣΧΙΖΟΦΡΕΝΕΙΑ

*Μ. Γιαννακού<sup>1,2</sup>, Μ.Ε. Κοσμίδου<sup>1</sup>, Β.Π. Μποζίκας<sup>3</sup>, Γ. Γαρύφαλλος<sup>2</sup> και Κ. Φωκάς<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> *Ομάδα Νευροψυχολογίας, Τμήμα Ψυχολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*

<sup>2</sup> *Β' Πανεπιστημιακή Ψυχιατρική Κλινική, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*

<sup>3</sup> *Α' Πανεπιστημιακή Ψυχιατρική Κλινική, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*

Οι δυσκολίες στην επικοινωνία θεωρούνται ένα από τα βασικά ελλείμματα της σχιζοφρένειας και κατατάσσονται στα διαγνωστικά κριτήρια αυτής της διαταραχής. Τέτοιες δυσκολίες είναι πιθανόν να επιδεινώνουν τα διαπροσωπικά προβλήματα των ασθενών και να τους οδηγούν σε μεγαλύτερη κοινωνική απομόνωση. Πολυάριθμες μελέτες έχουν ερευνήσει αυτές τις επικοινωνιακές και κοινωνικές δυσκολίες μελετώντας την ελλειμματική «θεωρία του νου» αυτών των ασθενών (δηλαδή την ενημερότητα για το ότι οι σκέψεις ή οι συναισθηματικές καταστάσεις των άλλων είναι διαφορετικές από τις δικές τους). Σχετική με το προηγούμενο είναι και η έννοια της πραγματολογικής ενημερότητας, δηλαδή της ικανότητας να υπερβαίνουμε την κυριολεκτική σημασία μιας έκφρασης και να εξάγουμε τη μεταφορική της σημασία. Διεξαγάγαμε την παρούσα μελέτη με σκοπό να διερευνήσουμε σε ασθενείς με σχιζοφρένεια πιθανές δυσκολίες στην κατανόηση της ειρωνείας, της μεταφοράς και των υπαινιγμών.

Εξετάσαμε 40 ασθενείς με σχιζοφρένεια σε φάση ύφεσης (32 άντρες) και 30 υγιείς συμμετέχοντες (24 άντρες) αντίστοιχης ηλικίας, εκπαίδευσης και φύλου. Η πειραματική συνθήκη αποτελούνταν από δύο επιμέρους συνθήκες: 1) τη Δοκιμασία Κατανόησης Υπαινιγμών (ΔΚΥ) η οποία αποτελείται από έξι σύντομες ιστορίες που περιγράφουν την αλληλεπίδραση δύο ατόμων· στο τέλος κάθε ιστορίας το ένα άτομο αφήνει έναν προφανή υπαινιγμό στο άλλο και ο εξεταζόμενος καλείται να εξηγήσει τι εννοούσε το πρώτο άτομο με αυτό που είπε. 2) τη Δοκιμασία Κατανόησης Ειρωνείας και Μεταφοράς που αποτελείται από 24 σύντομες ιστορίες που περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερα άτομα· ο εξεταζόμενος καλείται να αποφασίσει αν η τελευταία φράση της συνομιλίας είναι σχετική με την ιστορία και να εξηγήσει τι εννοούσε το άτομο με αυτό που είπε. Στις έξι ιστορίες αυτό που λέγεται έχει σχέση με την ιστορία μόνο αν ερμηνευτεί ειρωνικά, σε έξι μόνο αν ερμηνευτεί μεταφορικά, σε έξι αν ερμηνευτεί κυριολεκτικά, ενώ στις υπόλοιπες έξι αυτό που λέγεται δεν έχει κανένα νόημα.

Οι ασθενείς με σχιζοφρένεια είχαν χαμηλότερη επίδοση από τους υγιείς συμμετέχοντες στην ΔΚΥ [ $F(1,69)=23.281, p<.001$ ]. Όταν συμπεριλάβαμε την επίδοση στην Κυριολεκτική Κατανόηση ως συμμεταβλητή (εφόσον οι ασθενείς είχαν χαμηλότερη επίδοση από τους υγιείς σε αυτή τη συνθήκη), η επίδραση της ομάδας ήταν στατιστικά σημαντική μόνο για την Ειρωνική Κατανόηση ( $p=.019$ ).

Τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι οι δυσκολίες των ασθενών στην καθημερινή τους επικοινωνία σχετίζονται κυρίως με ελλείμματα στη θεωρία του νου δευτέρου επιπέδου (κατανόηση ειρωνείας και υπαινιγμών) και όχι με του πρώτου επιπέδου (κατανόηση μεταφοράς). Τονίζουν ακόμα την ανάγκη για τη διεξαγωγή προγραμμάτων εκμάθησης κοινωνικών δεξιοτήτων με έμφαση στην πραγματολογική χρήση της γλώσσας.

## L-DOPA DECARBOXYLASE (DDC) INTERACTION WITH AMYLOID PRECURSOR PROTEIN (APP) AND A $\beta$ PEPTIDE

*Panayiota Gkogkosi, Alice Vassiliou and Dido Vassilacopoulou*

*University of Athens, Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Panepistimioupolis 15701, Athens, Greece*

Alzheimer's (AD) and Parkinson's Disease (PD) are the most common neurodegenerative conditions in the aging population. Many AD patients develop PD symptoms and some AD patients exhibit dementia. Both conditions share pathological and biochemical similarities. Extracellular brain depositions of amyloid  $\beta$  peptide is a hallmark of AD. A $\beta$  is derived from the proteolytic processing of a family of proteins termed amyloid precursor proteins. Parkinson's disease is characterized by the formation of Lewy bodies in the brain.  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$  SYN) is a major component of the insoluble fibrils of Lewy bodies. Recent studies have shown that A $\beta$  peptide results in the stabilization of toxic  $\alpha$ -SYN protofibrils. Furthermore, Dopamine (DA) induces A $\beta$  toxicity which contributes to the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra. L-Dopa decarboxylase (DDC) is the enzyme which catalyses the biosynthesis of DA by decarboxylating L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenyl-alanine) to DA. Based on the above we sought to investigate the possible interactions between the DA producing enzyme and APP.

Human DDC as well as full length APP were expressed in CHO (Chinese Hamster Ovary) cells. Protein interactions were studied by immunoprecipitation under non-denaturing conditions. Our experiments revealed the interaction between DDC and full length APP as well as the A $\beta$  peptide. In addition we have observed that carbidopa (a-methyl-dopazazine), a DDC activity inhibitor, appears to reduce the interaction between DDC and full length APP, but does not seem to influence the interaction between DDC and A $\beta$ . Interestingly, the alternative DDC transcript (termed alt-DDC), lacking exons 10 to 15 but including an alternative exon 10, does not appear to interact with A $\beta$ . The obtained results require further investigation in order to study the functional significance of the observed interactions, aiming at the better understanding of the molecular mechanisms leading to neurodegeneration.

*This research project is funded by the "Pythagoras I" grant from the Greek Ministry of Education*

## Η L- DOPA ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗ (DDC) ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΔΡΟΜΟ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ (APP) ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ Αβ

*Παναγιώτα Γκογκόση, Αλίκη Βασιλείου, Διδώ Βασιλακοπούλου*

*Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη 15701, Αθήνα, Ελλάδα*

Η γήρανση είναι ένας σημαντικός παράγοντας επικινδυνότητας για την εκδήλωση νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως η ασθένεια του Alzheimer (AD) και η ασθένεια του Parkinson (PD). Πολλοί ασθενείς με AD αναπτύσσουν συμπτώματα PD και ασθενείς με PD εμφανίζουν άνοια. Και οι δύο ασθένειες συνδέονται με κοινά παθολογικά και βιοχημικά ευρήματα. Οι νόσοι του Alzheimer και του Parkinson χαρακτηρίζονται από την εξωκυττάρια συσσώρευση του πρωτεολυτικού παραγώγου της APP, του πεπτιδίου Αβ, και τη δημιουργία των σωματιδίων Lewy κύριο συστατικό των οποίων είναι η  $\alpha$ -synuclein αντίστοιχα. Έχει προταθεί ότι η μετατροπή της φυσιολογικής  $\alpha$ -synuclein σε τοξικά ινίδια επάγεται από το Αβ. Επιπλέον η ντοπαμίνη φαίνεται να αυξάνει την τοξικότητα του Αβ, ενώ η παρουσία της APP και των πρωτεολυτικών της παραγώγων επάγουν τον ντοπαμινεργικό νευροεκφυλισμό στον υπομέλανα τόπο. Η L-Dopa αποκαρβοξυλάση (DDC) είναι το ένζυμο το οποίο καταλύει τη βιοσύνθεση της ντοπαμίνης (DA) αποκαρβοξυλιώνοντας την L-Dopa (L-3,4 διυδροξυ-φαινυλ-αλανίνη) σε DA. Με βάση τα παραπάνω κρίθηκε σκόπιμη η διερεύνηση των πιθανών αλληλεπιδράσεων της DDC με την APP.

Σε κύτταρα CHO (Chinese Hamster Ovary), εκφράστηκε η ανθρώπινη DDC και η πλήρους μήκους APP. Η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης έγινε με ανοσοκατακρήμιση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας έδειξαν ότι η DDC αλληλεπιδρά τόσο με την πλήρους μήκους APP όσο και με το Αβ. Επιπλέον, ο αναστολέας της ενζυμικής ενεργότητας της DDC carbidopa (α-methyl-dopaydrazine) μειώνει την αλληλεπίδραση της DDC με την πλήρους μήκους APP ενώ φαίνεται να μην επηρεάζει την αλληλεπίδραση της με το Αβ. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι το εναλλακτικό μετάγραφο της DDC, το οποίο στερείται των εξωνίων 10 με 15 και φέρει ένα εναλλακτικό εξώνιο 10 (alt-DDC) δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με το πεπτιδίο Αβ. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της λειτουργικής σημασίας των παρατηρούμενων αλληλεπιδράσεων με σκοπό την διερεύνηση μοριακών μηχανισμών που οδηγούν σε νευροεκφυλισμό.

*Η παρούσα ερευνητική εργασία επιχορηγείται από το ερευνητικό πρόγραμμα ΥΠΕΠΘ.*

*“Πυθαγόρας Ι” του*

### THREE CYSTEINE RESIDUES IN THE MEMBRANE-SPANNING DOMAINS OF TYPE 1 CORTICOTROPIN RELEASING FACTOR RECEPTOR ARE EXPOSED IN THE BINDING-SITE CREVICE OF RECEPTOR

*K. Gkountelias, G. Kokologiannakis, M. Papadokostaki and G. Liapakis*

*Laboratory of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Crete, Crete, Greece*

The subfamily B of G-protein-coupled receptors (GPCRs) consists of receptors that bind peptides, such as secretin, vasoactive intestinal peptide, glucagon, corticotropin-releasing hormone (CRF), which play a fundamental role in body function. These receptors, like all GPCRs, are plasma membrane proteins sharing a common structural motif of seven membrane-spanning domains (TMs), which have been shown to bind small molecules, such as antalarmin, a non-peptide antagonist of the type 1 receptor for CRF (CRF<sub>1</sub>). This leads to the hypothesis that similar to family A, rhodopsin-like, GPCRs, the membrane-spanning domains of subfamily B GPCRs form a water-accessible crevice, the binding-site crevice, which extends from the extracellular surface of the receptor into the plane of the membrane. The surface of this crevice is formed not only by residues that can contact small molecules but also by residues that may play a structural role and affect binding indirectly. The lack of considerable structural information for the family B GPCRs however precludes the support of this hypothesis. To test this hypothesis we started obtaining information about the structure of subfamily B GPCRs, using as prototype the CRF<sub>1</sub> and testing its reaction with the positively charged sulfhydryl-specific methanethiosulfonate ethylammonium (MTSEA). The reaction of MTSEA with CRF<sub>1</sub> was tested by its ability to irreversibly inhibit [<sup>125</sup>I]-sauvagine binding to receptor. We found that MTSEA inhibited [<sup>125</sup>I]-sauvagine binding to CRF<sub>1</sub>, by decreasing the maximal number of binding sites, without significantly changing the binding affinity of sauvagine. These results suggest that the MTSEA reacted with the sulfhydryl of one or more cysteines of CRF<sub>1</sub>. To identify the susceptible cysteines, we mutated to serine, one at a time, the four cysteine residues located in the first, third, fourth and seventh membrane-spanning domains of CRF<sub>1</sub>. Mutations of Cys211, Cys233 and Cys364, to serine, decreased the susceptibility of sauvagine binding to irreversible inhibition by the MTSEA. Thus, Cys211, Cys233, and Cys364, located in the third, fourth and seventh membrane-spanning domains of CRF<sub>1</sub>, respectively, are exposed in the binding-site crevice of receptor. These studies will ultimately provide us with the required information for the structure of CRF<sub>1</sub> and will be used to construct a CRF<sub>1</sub> receptor molecular model. This model will be used as a prototype, for the understanding of the structure and function of all receptors belonging to the family B of GPCRs. This molecular model will also help us to determine the residues in the membrane-spanning domains that interact with small non-peptide ligands, thus putting the basis for the rational design of new small CRF<sub>1</sub> selective antagonists and agonists with different efficacies.

**ΤΡΕΙΣ ΚΥΣΤΕΙΝΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ 1  
ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ ΕΚΛΥΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ  
ΕΝΤΟΠΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΗΣ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΙΣ ΘΕΣΕΙΣ  
ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ**

*Κ. Γκουντέλιας, Γ. Κοκολογιαννάκης, Μ. Παπαδοκωστάκη και Γ. Λιαπάκης  
Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Κρήτη*

Η υποοικογένεια Β των υποδοχέων που συζεύγγονται με τις G-πρωτεΐνες (G-protein-coupled receptors, ή GPCRs) αποτελείται από υποδοχείς που δεσμεύουν πεπτίδια, όπως τη σεκρετίνη, το γλυκαγόνο, το αγγειοδραστικό διάμεσο πεπτίδιο (VIP) και τον εκλυτικό παράγοντα της κορτικοτροπίνης (corticotropin-releasing hormone, ή CRF), τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο στις λειτουργίες του οργανισμού μας. Οι υποδοχείς αυτοί, όπως όλοι οι GPCRs, είναι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου και διαπερνώντας αυτή επτά φορές σχηματίζουν επτά διαμεμβρανικές περιοχές. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι περιοχές αυτές που αποτελούν κοινό δομικό χαρακτηριστικό των GPCRs εμπλέκονται στη δέσμευση μικρών μορίων-φαρμάκων, όπως εκείνου της ανταλαρμίνης, ενός μη πεπτιδικού ανταγωνιστή του τύπου 1 υποδοχέα του CRF (CRF<sub>1</sub>). Αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι παρόμοια με τους υποδοχείς της υποοικογένειας Α των GPCRs, (που περιέχει τους υποδοχείς της ροδοψίνης, των κατεχολαμινών κ.α.) οι διαμεμβρανικές περιοχές των υποδοχέων της υποοικογένειας Β των GPCRs σχηματίζουν μια υδρόφιλη κοιλότητα (κοιλότητα-θέσεων δέσμευσης) που περιέχει τις θέσεις δέσμευσης διαφόρων φαρμάκων και η οποία, επικοινωνώντας με το εξωκυττάριο υγρό, επεκτείνεται μέσα στη λιπιδική διπλοστιβάδα της πλασματικής μεμβράνης. Η επιφάνεια της κοιλότητας-θέσεων δέσμευσης δε σχηματίζεται μόνο από αμινοξέα που αποτελούν θέσεις δέσμευσης, αλλά και από αμινοξέα τα οποία μπορούν να παίζουν δομικό ρόλο και να επηρεάζουν έτσι έμμεσα τη δέσμευση. Η έλλειψη όμως επαρκούς πληροφορίας σχετικά με τη δομή των υποδοχέων της υποοικογένειας Β των GPCRs αποκλείει την επαλήθευση της παραπάνω υπόθεσης. Με σκοπό να επαληθεύσουμε την υπόθεση αυτή, αρχίσαμε στην παρούσα μελέτη να λαμβάνουμε για πρώτη φορά πληροφορίες για τη δομή των υποδοχέων της υποοικογένειας Β των GPCRs, χρησιμοποιώντας σαν πρότυπο τον CRF<sub>1</sub> και εξετάζοντας την αντίδραση του με το θετικά φορτισμένο αντιδραστήριο, methanethiosulfonate ethylammonium (MTSEA), το οποίο επιλεκτικά αντιδρά με τις σουλφυδρυλικές ομάδες των κυστεϊνών του υποδοχέα. Η αντίδραση του MTSEA με τον CRF<sub>1</sub> προσδιορίστηκε με βάση την ικανότητά του να αναστέλλει μη αντιστρεπτά τη δέσμευση της [<sup>125</sup>I]-σοβαγίνης στον CRF<sub>1</sub>. Βρήκαμε ότι το MTSEA ελάττωσε τη δέσμευση της [<sup>125</sup>I]-σοβαγίνης στον CRF<sub>1</sub>, ελαττώνοντας τον μέγιστο αριθμό θέσεων δέσμευσης της, χωρίς όμως να επηρεάζει σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το MTSEA αντέδρασε με τη σουλφυδρυλική ομάδα ενός ή και περισσότερων κυστεϊνών του CRF<sub>1</sub>. Με σκοπό να προσδιορίσουμε τις κυστεΐνες αυτές που αντέδρασαν με το MTSEA, μεταλλάξαμε, μια την κάθε φορά, τις 4 κυστεΐνες που βρίσκονται στην πρώτη, τρίτη, τέταρτη και έβδομη διαμεμβρανική περιοχή του CRF<sub>1</sub>. Σε αντίθεση με την Cys128, οι μεταλλάξεις των Cys211, Cys233 και Cys364 σε σερίνη ελάττωσαν την ικανότητα του MTSEA να αναστέλλει μη αντιστρεπτά την δέσμευση της σοβαγίνης. Έτσι λοιπόν οι Cys211, Cys233 και Cys364, που βρίσκονται στην τρίτη, τέταρτη και έβδομη διαμεμβρανική περιοχή του CRF<sub>1</sub> αντίστοιχα, εντοπίζονται στην επιφάνεια της κοιλότητας-θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα με τις πλευρικές αλυσίδες τους προσανατολισμένες προς το εξωκυττάριο υγρό. Οι μελέτες αυτές τελικά θα μας δώσουν όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για τη δομή του CRF<sub>1</sub>, οι οποίες θα χρησιμεύσουν να κατασκευαστεί ένα μοριακό πρότυπο του υποδοχέα. Το μοριακό αυτό πρότυπο θα χρησιμεύσει για την κατανόηση της δομής και λειτουργίας όλων των υποδοχέων που ανήκουν στην υποοικογένεια Β των GPCRs. Το μοριακό αυτό πρότυπο επίσης θα συμβάλει καθοριστικά στον προσδιορισμό των αμινοξέων των διαμεμβρανικών περιοχών του CRF<sub>1</sub> που αλληλεπιδρούν με μικρά μη-πεπτιδικά μόρια, θέτοντας έτσι τις βάσεις για το σχεδιασμό νέων CRF<sub>1</sub>-εκλεκτικών μικρών φαρμάκων, ανταγωνιστών και αγωνιστών με καθορισμένη αποτελεσματικότητα και πρωτεολυτικά σταθερών.

**ALANINE SCANNING MUTAGENESIS OF THE SECOND EXTRACELLULAR LOOP OF TYPE 1 CORTICOTROPIN RELEASING FACTOR RECEPTOR REVEALED RESIDUES THAT ARE CRITICAL FOR PEPTIDE BINDING**

*K. Gkountelias, J. Koltsaki, M. Papadokostaki and G. Liapakis*

*Laboratory of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Crete, Crete, Greece*

The type 1 receptor (CRF<sub>1</sub>) for the corticotropin releasing factor (CRF) belongs to the subfamily B of G-protein coupled receptors (GPCRs) and like the other GPCRs consists of seven membrane-spanning segments, connected by alternating three intracellular and three extracellular loops. A cross-linking study has shown that the CRF<sub>1</sub>-bound sauvagine, which is a CRF-related peptide, lies in close proximity to Lys257 of the second extracellular loop (EL2) of the receptor [1]. This leads to the hypothesis that Lys257 and/or other EL2 residues interact with sauvagine. To test this hypothesis we determined the functional role of EL2 residues of CRF<sub>1</sub> from Leu251 to Val266 in an alanine-scanning mutagenesis study. We found that mutation to alanine of the residues from Leu251 to Lys257 and from Gly261 to Val266, did not significantly reduce the binding affinity of sauvagine, as well as, its potency to stimulate the adenylyl cyclase. Thus, Lys257 did not appear to interact with sauvagine, despite the fact that it is in close proximity to the receptor-bound peptide. Substitution of Trp259 and Phe260 by alanine, however, significantly reduced the binding affinity of sauvagine, as well as, its potency to stimulate the adenylyl cyclase. In contrast to sauvagine, mutations of Trp259 and Phe260 to alanine did not decrease the affinities of the antagonists, astressin and antalarmin, which have been shown, in previous studies, to interact with different, than the EL2, regions of CRF<sub>1</sub>. Thus, mutation of Trp259 or Phe260 to alanine did not appear to significantly alter the overall conformation of CRF<sub>1</sub>, consistent with that alanine mutation is a well-tolerated mutation that eliminates the side chain of a protein residue beyond the  $\beta$ -carbon, leaving a cavity, with little perturbation of the overall structure of protein [2]. The above results suggest that Trp259 and Phe260 play a critical role in sauvagine binding to CRF<sub>1</sub>, possibly, by interacting with this peptide. The possibility of such an interaction is further supported by that a) these residues, being in the EL2, are accessible to the extracellular milieu and thus to the dissolved in it peptides, and b) they are located only one residue away from Lys257, which, as mentioned above, is in close proximity to receptor-bound sauvagine. Additional studies are now in progress, aiming to verify the interaction of sauvagine with Trp259 and Phe260 of CRF<sub>1</sub>, and to determine its nature. These studies will ultimately elucidate the mode of interaction of CRF<sub>1</sub> with the peptides of CRF family, thus putting the basis for the design of CRF<sub>1</sub>-selective drugs.

1. *Assil-Kishawi, I. and A.B. Abou-Samra, Sauvagine cross-links to the second extracellular loop of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor. J Biol Chem, 2002. 277(36): p. 32558-61.*
2. *Cunningham, B.C. and J.A. Wells, High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. Science, 1989. 244(4908): p. 1081-5.*

**ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΒΡΟΓΧΟΥ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ 1 ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ ΕΚΛΥΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΕΙ ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΜΕ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ ΡΟΛΟ ΣΤΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ**

*Κ. Γκουντέλιας, Ι. Κολτσάκη, Μ. Παπαδοκωστάκη και Γ. Λιαπάκης*

*Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Κρήτη*

Ο τύπος 1 υποδοχέα (CRF<sub>1</sub>) του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF) ανήκει στην υποοικογένεια Β των υποδοχέων που συζεύγνυνται με τις G-πρωτεΐνες, (G-protein coupled receptors, GPCRs), και ο οποίος, όπως όλοι οι GPCRs, αποτελείται από επτά διαμεμβρανικές περιοχές που ενώνονται μεταξύ τους με τρεις εξωκυττάριους και τρεις ενδοκυττάριους βρόγχους. Προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι η σοβαγίνη, ένα συγγενές με το CRF πεπτίδιο, όταν είναι δεσμευμένη με τον CRF<sub>1</sub> βρίσκεται σε πολύ μικρή απόσταση από το αμινοξύ Lys257, του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου (EL2) του υποδοχέα [1]. Αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι η Lys257 ή/και άλλα αμινοξέα του EL2 του CRF<sub>1</sub> αλληλεπιδρούν με τη σοβαγίνη. Για να εξετάσουμε αυτήν την υπόθεση προσδιορίσαμε το λειτουργικό ρόλο των αμινοξέων του EL2 του CRF<sub>1</sub> που βρίσκονται μεταξύ της Leu251 και της Val266. Αυτό επιτεύχθηκε με την αφαίρεση της πλευρικής αλυσίδας των αμινοξέων αυτών με μετάλλαξη τους, ένα την κάθε φορά, σε αλανίνη και προσδιορισμό των συγγενειών με τις οποίες οι μεταλλαγμένοι υποδοχείς δεσμεύουν τη σοβαγίνη. Βρήκαμε ότι η μετάλλαξη σε αλανίνη των αμινοξέων από Leu251 έως Lys257 και από Gly261 έως Val266, δεν ελάττωσε σημαντικά τόσο τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης όσο και την ισχύ της να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η Lys257, αν και βρίσκεται σε πολύ μικρή απόσταση από τη, δεσμευμένη με τον CRF<sub>1</sub>, σοβαγίνη, εντούτοις δε φαίνεται να αλληλεπιδρά μαζί της. Αντίθετα, η μετάλλαξη της Trp259 και της Phe260 σε αλανίνη μείωσε σημαντικά τόσο τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης στον CRF<sub>1</sub>, όσο και την ισχύ της να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP. Σε αντίθεση με τη σοβαγίνη, οι μεταλλάξεις των Trp259 και Phe260 σε αλανίνη δε μείωσαν τη συγγένεια δέσμευσης για τους ανταγωνιστές αστρεσίνη και ανταλαρμίνη, οι οποίοι έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι αλληλεπιδρούν με άλλες περιοχές του CRF<sub>1</sub>, διαφορετικές εκείνων του EL2. Έτσι οι μεταλλάξεις σε αλανίνη των Trp259 και Phe260 φαίνεται ότι δεν αλλάζουν σημαντικά τη δομή του CRF<sub>1</sub>, γεγονός που συμφωνεί με το ότι η αντικατάσταση ενός αμινοξέος μιας πρωτεΐνης με αλανίνη είναι μια καλά ανεκτή μετάλλαξη που καταργεί την πλευρική αλυσίδα του αμινοξέος, αφήνοντας μια κοιλότητα, χωρίς να επηρεάζει σημαντικά την δομή της πρωτεΐνης [2]. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα αμινοξέα Trp259 και Phe260, παίζουν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση της σοβαγίνης, πιθανόν αλληλεπιδρώντας με το εν λόγω πεπτίδιο. Η πιθανότητα μιας τέτοιας αλληλεπίδρασης υποστηρίζεται περαιτέρω από το γεγονός ότι α) η Trp259 και η Phe260, εντοπιζόμενες στον EL2, είναι διαθέσιμες στο εξωκυττάριο υγρό και άρα στη διαλυμένη σε αυτό σοβαγίνη και β) τα αμινοξέα αυτά βρίσκονται μία μόνο θέση μακριά από το αμινοξύ Lys257, το οποίο όπως αναφέρεται παραπάνω, βρίσκεται σε πολύ μικρή απόσταση από τη, δεσμευμένη στον CRF<sub>1</sub>, σοβαγίνη. Μελέτες εν εξελίξει θα εξακριβώσουν την αλληλεπίδραση των Trp259 και Phe260 με τη σοβαγίνη και θα προσδιορίσουν τη φύση της. Οι μελέτες αυτές θα μας οδηγήσουν τελικά στη διευκρίνιση του τρόπου αλληλεπίδρασης του CRF<sub>1</sub> με τα πεπτίδια της οικογένειας του CRF, θέτοντας έτσι τη βάση για το σχεδιασμό φαρμάκων εκλεκτικών για τον CRF<sub>1</sub>.

1. *Assil-Kishawi, I. and A.B. Abou-Samra, Sauvagine cross-links to the second extracellular loop of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor. J Biol Chem, 2002. 277(36): p. 32558-61.*
2. *Cunningham, B.C. and J.A. Wells, High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. Science, 1989. 244(4908): p. 1081-5.*



## THE ROLE OF CaMKII MUTATIONS IN THE FUNCTION OF THE GIANT FIBER SYSTEM

D. Kadas<sup>1</sup>, A. Tzortzopoulos<sup>2</sup>, E. M. C. Skoulakis<sup>2</sup> and C. Consoulas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Experimental Physiology, Medical School, University of Athens, Athens, 11527 Greece

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics, Biomedical Sciences Research Centre ‘‘Alexander Fleming’’, Vari 16672, Greece

Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) is one of the most prominent protein kinases, present in essentially every tissue but most concentrated in brain. Neuronal CaMKII is involved in the regulation of neurotransmitter synthesis and release, synaptic plasticity, learning and memory and in many other crucial neuronal functions (1).

The multifunctional role of this protein was the impulse to study its effect on the function of the Giant Fiber System (GFS), the circuit that controls the jump-and-flight escape reflex in *Drosophila*. The GFS has been well characterized anatomically and physiologically, and therefore this simple circuit underlies a model system for cell biological, electrophysiological and genetic studies. Hence, it was possible to study the main physiological parameters of the GFS, such as short latency response, refractory period and following frequency 50% (2), in two types of CaMKII mutant flies. These CaMKII mutants were the result of point mutations, which produced either a Ca<sup>2+</sup>-independent (CaMKII-D) or a Ca<sup>2+</sup>-sensitive (CaMKII-A) mutant form protein. The expression of these mutations was effectuated specifically in the GFS neurons, by using the binary system (Gal4-UAS).

The main conclusion is that the CaMKII-D mutation, where the majority of the mutant flies manifest the infantile phenotype (the wings remain folded), affects all the physiological parameters of the GFS. The other mutation (CaMKII-A), such as the overexpression of the wild type protein, do not exhibit a perturbed GFS function. In this point, it is interesting to note that the infantile phenotype seems not to be correlated with the defective GFS function. Flies with normal wings, which express the Ca<sup>2+</sup>-independent mutant form protein (CaMKII-D), show an abnormal phenotype, regarding the three physiological parameters tested. The mode of action of CaMKII may be lying at the presynaptic axonal terminals of the interneuron or/and the postsynaptic dendrites of the motoneurons. Finally, similar physiological defects are presents when the CaMKII-D mutation is expressed under the control of a specific Gal4 driver (D42) for motoneurons (including the motoneurons of the GFS), suggesting that the site of the CaMKII action may be at either the postsynaptic dendrites or/and the presynaptic terminals of the motoneurons.

1. Yamauchi T (2005) Neuronal Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II-Discovery, Progress in a Quarter of a Century, and Perspective: Implication for Learning and Memory. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 1342-135

2. Engel JE, Wu CF (1992) Interactions of membrane excitability mutations affecting potassium and sodium currents in the flight and giant fiber escape system of *Drosophila*. *J Comp Physiol [A]* 171:93-104

## Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ CaMKII ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΓΙΓΑΝΤΙΑΙΩΝ ΝΕΥΡΑΞΟΝΩΝ

Δ. Καδάς<sup>1</sup>, Α. Τζορτζόπουλος<sup>2</sup>, Ε. Σκουλάκης<sup>2</sup> και Χ. Κόνσουλας<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 1152

<sup>2</sup>Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών “Αλέξανδρος Φλέμιγκ”, Βάρη 16672

Η Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) είναι μία από τις πιο αξιόλογες κινάσες, η οποία εντοπίζεται σε κάθε ιστό μα πιο συγκεκριμένα στον εγκέφαλο. Η νευρωνική CaMKII εμπλέκεται στη ρύθμιση της σύνθεσης και της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών, στη συναπτική ευπλαστότητα, στη μνήμη και μάθηση και γενικότερα σε πολλές άλλες νευρωνικές λειτουργίες (1).

Η σημαντικότητα αυτής της πρωτεΐνης έδωσε το έναυσμα για τη μελέτη του ρόλου της στη λειτουργία του συστήματος των γιγαντιαίων νευραξόνων (Giant Fiber System, GFS), του κυκλώματος δηλαδή που ρυθμίζει το αντανακλαστικό διαφυγής της *Drosophila*. Το GFS έχει χαρακτηριστεί ανατομικά και φυσιολογικά και γι' αυτό αποτελεί ένα πρότυπο σύστημα για ηλεκτροφυσιολογικές και γενετικές μελέτες. Συνεπώς, μελετήθηκαν οι κυριότεροι φυσιολογικοί παράμετροι του GFS, όπως ο χρόνος διάδοσης του σήματος, η ανερέθιστη περίοδος και η πιστότητα διάδοσης του σήματος σε υψηλές συχνότητες (2), σε δύο τύπους μεταλλαγμένων στελεχών της CaMKII. Αυτά τα δύο στελέχη της CaMKII προκύπτουν από σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες παράγουν είτε μία Ca<sup>2+</sup>-εξαρτώμενη (CaMKII-D) είτε μία Ca<sup>2+</sup>-ευαίσθητη (CaMKII-A) μεταλλαγμένη μορφή πρωτεΐνης. Η έκφραση αυτών των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε ειδικά στους νευρώνες του GFS, χρησιμοποιώντας το δυαδικό σύστημα (Gal4-UAS).

Το κυριότερο συμπέρασμα είναι ότι η μετάλλαξη CaMKII-D, όπου η πλειοψηφία των μεταλλαγμένων μυγών εκδηλώνει τον βρεφικό φαινότυπο (τα φτερά παραμένουν διπλωμένα), επηρεάζει τις φυσιολογικές παραμέτρους του GFS. Η άλλη μετάλλαξη (CaMKII-A), καθώς επίσης η υπερέκφραση της πρωτεΐνης αγρίου τύπου, δεν επιδρούν στη λειτουργία του GFS. Επιπλέον, ο βρεφικό φαινότυπος δεν φαίνεται να σχετίζεται με την ελαττωματική λειτουργία του GFS. Μύγες με φυσιολογικά φτερά, οι οποίες εκφράζουν την CaMKII-D, παρουσιάζουν μη φυσιολογικό φαινότυπο, όσον αφορά τις τρεις παραμέτρους του GFS. Η περιοχή δράσης της CaMKII θα μπορούσε να εντοπιστεί είτε στις προσυναπτικές αξονικές τελικές απολήξεις των ενδονευρώνων ή/και μετασυναπτικά, στους δενδρίτες των κινητικών νευρώνων. Τέλος, ένας παρόμοιος φαινότυπος εκδηλώνεται όταν η CaMKII-D εκφράζεται ειδικά στους κινητικούς νευρώνες (συμπεριλαμβανομένων των κινητικών νευρώνων του GFS), υποδηλώνοντας ότι το σημείο δράσης της CaMKII θα μπορούσε να είναι τόσο μετασυναπτικά, στους δενδρίτες, όσο προσυναπτικά, στις τελικές απολήξεις, των κινητικών νευρώνων.

1. Yamauchi T (2005) *Neuronal Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II-Discovery, Progress in a Quarter of a Century, and Perspective: Implication for Learning and Memory*. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 1342-1354

2. Engel JE, Wu CF (1992) *Interactions of membrane excitability mutations affecting potassium and sodium currents in the flight and giant fiber escape system of Drosophila*. *J Comp Physiol [A]* 171:93-104

## MATURATION OF ESCAPE-REFLEX (GIANT FIBER SYSTEM) AND FLIGHT CENTRAL PATTERN GENERATOR CIRCUITS IN DROSOPHILA

*D. Kadas and C. Consoulas*

*Laboratory of Experimental Physiology, Medical School, University of Athens, Athens, 11527,  
Greece*

Giant nerve fibers are a feature of the nervous system of many invertebrates and lower vertebrates and typically are associated with escape responses. The Giant Fiber System (GFS) of *Drosophila melanogaster* is one of the best studied neural circuits thanks to the flies that escape danger by jumping into the air and flying away. On the other hand, rhythmic behaviors, such as flight, are cyclic, repetitive sets of movements, generated by specialized circuits within the CNS. These circuits are known as central pattern generators (CPGs) and are able to operate without sensory inputs.

An important step in the study of neural circuits is to establish when during development these circuits become functionally mature and reliable. To verify that, the reliability of the GFS and the flight CPG was tested, by performing electrophysiological experiments, in newly eclosed (1hour post-eclosion) and in mature flies (1 day post eclosion).

The anatomy and the development of the GFS have been well characterized, and therefore this simple circuit underlies a model system for cell biological, electrophysiological and genetic studies. Hence, it was feasible to study the main physiological parameters of the GFS, such as short latency response, refractory period and following frequency 50% (1), in the two stages. The results show that the short latency response of GFS is reduced in 1 day flies, suggesting an increase in the conduction velocity of propagated action potentials in the axons of the GFS neurons or/and in the synaptic delay. Nevertheless, the study of the other two parameters indicates that the GFS is functional and reliable in the infant *Drosophila*.

The reliability of the flight CPG was tested by applying an electroconvulsive stimulation protocol. This high voltage-frequency stimulation induces an initial discharge (ID), a response failure (F) and finally a delay discharge (DD). The third component (DD) is believed to be driven by the flight CPG (2). The presence of the DD, even in newly eclosed flies, indicates the readiness and functionality of the flight CPG in insects that are not capable of flying.

1. Engel JE, Wu CF (1992) *Interactions of membrane excitability mutations affecting potassium and sodium currents in the flight and giant fiber escape system of Drosophila. J Comp Physiol [A] 171:93-104*
2. Lee J, Wu CF (2002) *Electroconvulsive seizure behavior in Drosophila: Analysis of the physiological repertoire underlying a stereotyped action pattern in bang-sensitive mutants. J Neurosci 22:11065-11079*

**ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΚΥΚΛΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΑΝΤΑΝΑΚΛΑΣΤΙΚΟΥ ΔΙΑΦΥΓΗΣ (ΣΥΣΤΗΜΑ ΓΙΓΑΝΤΙΑΙΩΝ ΝΕΥΡΑΞΟΝΩΝ) ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΡΥΘΜΙΚΗΣ ΝΕΥΡΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΠΤΗΣΗΣ ΣΤΗ DROSOPHILA**

*Δ. Καδάς και Χ. Κόνσουλας*

*Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 11527*

Οι γιγάντιοι νευράξονες αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα του νευρικού συστήματος πολλών ασπόνδυλων και κατώτερων σπονδυλωτών και σχετίζονται με αντανακλαστικές απαντήσεις. Το σύστημα των γιγαντιαίων νευραξόνων (Giant Fiber System, GFS) της *Drosophila melanogaster* είναι ένα απ' τα καλύτερα μελετημένα νευρωνικά κυκλώματα, χάρη στο οποίο, οι μύγες αποφεύγουν τον κίνδυνο αναπιδώντας στον αέρα και πετώντας μακριά. Απ' την άλλη μεριά, οι ρυθμικές συμπεριφορές, όπως η πτήση, είναι κυκλικές, επαναλαμβανόμενες κινήσεις, παραγόμενες από ειδικά κυκλώματα του ΚΝΣ. Αυτά τα κυκλώματα είναι γνωστά ως παραγωγόι ρυθμικής νευρικής δραστηριότητας (Central Pattern Generator, CPG) και είναι σε θέση να λειτουργήσουν απουσία αισθητικών σημάτων εισόδου.

Ένα σημαντικό βήμα στη μελέτη των νευρωνικών κυκλωμάτων, είναι να γίνει γνωστό, πότε αυτά τα κυκλώματα ωριμάζουν και λειτουργούν αξιόπιστα κατά την ανάπτυξη. Προκειμένου να εξακριβωθεί αυτό, η αξιοπιστία του GFS και του CPG πτήσης μελετήθηκε, πραγματοποιώντας ηλεκτροφυσιολογικά πειράματα, σε νεοεκδυσόμενες (1 ώρα μετά την έκδυση) και σε ώριμες (1 μέρα μετά την έκδυση) μύγες.

Η ανατομία και η ανάπτυξη του GFS έχουν χαρακτηριστεί, οπότε το απλό αυτό κύκλωμα θεωρείται πρότυπο σύστημα για ηλεκτροφυσιολογικές και γενετικές μελέτες. Συνεπώς, μελετήθηκαν οι κυριότεροι φυσιολογικοί παράμετροι του GFS, όπως ο χρόνος διάδοσης του σήματος, η ανερέθιστη περίοδος και η πιστότητα διάδοσης του σήματος σε υψηλές συχνότητες (1), στα δύο στάδια. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο χρόνος μετάδοσης του σήματος στο GFS είναι μειωμένος στις μύγες 1 μέρας, υποδηλώνοντας αύξηση της ταχύτητας αγωγής των διαδιδόμενων δυναμικών ενέργειας των νευρώνων του GFS ή/και της συναπτικής καθυστέρησης. Παρ' όλα αυτά, η μελέτη των δύο άλλων παραμέτρων δείχνει ότι το GFS είναι λειτουργικό και αξιόπιστο στην ενήλικη *Drosophila*.

Η αξιοπιστία του CPG πτήσης μελετήθηκε εφαρμόζοντας ένα πρωτόκολλο ηλεκτροσπασμογόνου διέγερσης. Η διέγερση υψηλής συχνότητας και δυναμικού προκαλεί (α) μία αρχική ριπή δυναμικών, (β) παράλυση του GFS και (γ) μία καθυστερημένη ριπή δυναμικών. Η τελευταία ριπή πιστεύεται ότι οφείλεται στην ενεργοποίηση του CPG πτήσης (2). Η παρουσία της ριπής αυτής σε νεοεκδυσόμενες μύγες, αποδεικνύει την λειτουργική ωριμότητα του CPG πτήσης σε μύγες που δεν έχουν ακόμη πετάξει.

1. Engel JE, Wu CF (1992) Interactions of membrane excitability mutations affecting potassium and sodium currents in the flight and giant fiber escape system of *Drosophila*. *J Comp Physiol [A]* 171:93-104

2. Lee J, Wu CF (2002) Electroconvulsive seizure behavior in *Drosophila*: Analysis of the physiological repertoire underlying a stereotyped action pattern in bang-sensitive mutants. *J Neurosci* 22:11065-11079

**OXALIPLATIN: AN ANTICANCER DRUG INDUCING SEVERE NEUROPATHY BY AFFECTING THE VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNELS IN THE NERVE FIBERS OF THE PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM \***

*Kagiava A.<sup>1</sup>, Tsingotjidou A.<sup>2</sup>, Emmanouilides C.<sup>3</sup>, Theophilidis G.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Lab. of Animal Physiology, Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, 54 124, Greece*

<sup>2</sup> *Lab. of Anatomy and Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, 54 124, Greece*

<sup>3</sup> *Interbalkan Medical Center, Department of Oncology, Thessaloniki, 57 001, Greece*

Oxaliplatin is a novel chemotherapeutic agent used for the treatment of colorectal and other cancers, but its use is limited by the development of peripheral neuropathy. Studies suggest that this adverse effect could result from a specific interaction of oxaliplatin with ion-channels located in the cellular membrane (Pasetto et al., 2006). Previous *in vivo* and *in vitro* studies have also suggested that the neurotoxic effect of oxaliplatin is associated with impairment of the voltage-gated sodium channels (VGNaCs). There is also indication of voltage-gated potassium channel (VGKC) involvement in oxaliplatin-induced and, the related cisplatin-induced neuropathy. The aim of the present study was to investigate *in vitro* the development of the oxaliplatin-induced acute neurotoxicity on the sciatic nerve fibres of the rat and the relative contribution of impairment of VGNaCs and VGKCs on acute neurotoxicity. For this purpose a model based on the isolated sciatic nerve of the rat was used. The nerve was placed into a three-chamber recording bath and was incubated in saline where oxaliplatin was diluted at clinically relevant concentrations. The nerve was electrically stimulated at the proximal part while the Compound Action Potential (CAP) was recorded from the distal part using an A.C. amplifier. The recording bath permits the monitoring of the evoked compound action potential (CAP) for over 24 hours. For comparison purposes, in addition to oxaliplatin, the isolated nerve was exposed to 10 mM of 4-aminopyridine (4-ap), a blocker of the VGKCs, and 1% lidocaine, a blocker of the VGNaCs. The results of this study showed that the effects of oxaliplatin, at a concentration range of 100 to 200  $\mu$ M on the nerve fibers are qualitatively much more similar to those caused by 4-ap, but more pronounced. In contrast, although oxaliplatin reportedly affect VGNaCs, in our experiments, its action had no similarities to that of lidocaine. The action potentials of the motor fibers increase in duration after oxaliplatin treatment while the sensory fibers respond with bursts of action potentials after a single stimulus. In conclusion, our experiments are suggestive of a direct effect of oxaliplatin to the VGKCs, which may have been previously overlooked and may help guide the development of neuroprotective therapies in the future.

*Pasetto LM, D'Andrea MR, Rossi E, Monfardini S. Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why? Crit Rev Oncol Hematol. 2006, 59(2):159-168.*

\*Supported by the program PYTHAGORAS II of the Greek Ministry of Education and Religion and the European Union

**ΟΞΑΛΙΠΛΑΤΙΝΑ: ΕΝΑ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙ  
ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑ ΕΠΙΔΡΩΝΤΑΣ ΣΤΑ ΚΑΝΑΛΙΑ ΚΑΛΙΟΥ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΙΝΩΝ ΤΟΥ  
ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ\***

*Καριαβά Α<sup>1</sup>., Τσιγκοτζίδου Α<sup>2</sup>., Εμμανουηλίδης Χ<sup>3</sup>., Θεοφιλίδης Γ<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup> *Εργ. Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας,  
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54 124,*

<sup>2</sup> *Εργ. Ανατομικής και Ιστολογίας, Κτηνιατρική Σχολή,  
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54 124,*

<sup>3</sup> *Διαβαλκανικό Ιατρικό Κέντρο, Τμήμα Ογκολογίας, 57 001 Θεσσαλονίκη*

Η οξαλιπλατίνα, ένα νέο, ευρέος φάσματος αντικαρκινικό φάρμακο, έχει σαν κύρια παρενέργεια την πρόκληση νευροπαθειών που αφορούν στις νευρικές ίνες του περιφερικού νευρικού συστήματος των ασθενών που χορηγείται. Οι υπάρχουσες μελέτες αποδεικνύουν πως τα συμπτώματα αυτά οφείλονται σε ειδική δράση της οξαλιπλατίνας με κανάλια ιόντων της κυτταρικής μεμβράνης (Pasetto et al., 2006). Αν και υπάρχουν μελέτες που σχετίζουν τη νευροτοξική δράση της οξαλιπλατίνας με τα τασεο-ελεγχόμενα κανάλια νατρίου (VGNaCs), υπάρχουν επίσης ενδείξεις συμμετοχής των τασεο-ελεγχόμενων καναλιών καλίου στην εμφάνιση της νευροπάθειας που σχετίζεται με την οξαλιπλατίνα. Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η *in vitro* μελέτη της νευροτοξικής δράσης της οξαλιπλατίνας στις νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου του επίμυος και την πιθανή σύνδεση αυτής της νευροτοξικότητας με τη δυσλειτουργία των τασεο-ελεγχόμενων καναλιών καλίου (VGKCs). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο βασισμένο στο απομονωμένο ισχιακό νεύρο του επίμυος. Το ισχιακό νεύρο τοποθετήθηκε σε ένα τρίχωρο θάλαμο καταγραφής και εμβαπτίστηκε σε φυσιολογικό ορό στον οποίο διαλύθηκε η οξαλιπλατίνα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν και που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ασθενών. Γινόταν διέγερση του νεύρου στο εγγύς κολόβωμα του νεύρου, ενώ γινόταν καταγραφή του Σύνθετου Δυναμικού Ενέργειας (ΣΔΕ), με τη βοήθεια ενός Α.Σ. ενισχυτή. Ο τρίχωρος θάλαμος καταγραφής επιτρέπει την καταγραφή του ΣΔΕ για περισσότερες από 24 ώρες. Το απομονωμένο ισχιακό νεύρο εκτέθηκε σε οξαλιπλατίνα σε συγκεντρώσεις 100 και 200  $\mu\text{M}$ , σε 10 mM 4-αμινοπυριδίνη (4-ap), αναστολέα των τασεο-ελεγχόμενων καναλιών καλίου, καθώς και σε λιδοκαΐνη, αναστολέα των τασεο-ελεγχόμενων καναλιών νατρίου. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι η δράση της οξαλιπλατίνας, στις συγκεντρώσεις των 100 και 200  $\mu\text{M}$ , στις νευρικές ίνες είναι ποιοτικά παραπλήσια αλλά δριμύτερη από αυτή της 4-ap. Αντιθέτως, αν και η οξαλιπλατίνα έχει προταθεί ότι επηρεάζει τα τασεο-ελεγχόμενα κανάλια νατρίου, η δράση της δεν παρουσίασε καμία ομοιότητα με αυτή της λιδοκαΐνης. Από τη μελέτη αυτή προκύπτει ότι τουλάχιστον σημαντικό μέρος της οξείας νευροτοξικότητας της οξαλιπλατίνας οφείλεται σε επίδραση των καναλιών καλίου.

*Pasetto LM, D'Andrea MR, Rossi E, Monfardini S. Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why? Crit Rev Oncol Hematol. 2006, 59(2):159-168.*

\* Η έρευνα χρηματοδοτήθηκε από το Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων και την Ευρωπαϊκή Ένωση στο πλαίσιο του προγράμματος Πυθαγόρας II.

## MODELLING COGNITIVE AND ACTIVITY DEFICITS OF FRAGILE X SYNDROME IN DROSOPHILA

*Alexandros K. Kanellopoulos, Efthimios M. C. Skoulakis*

*Laboratory of Neurobiology, Institute of Molecular Biology and Genetics, B.S.R.C. "Al. Fleming", Vari 16672-Greece*

Of the nearly 500 different genetic disorders that cause mental retardation, the most common form of inherited mental retardation is Fragile X syndrome (FXS). Individuals with the syndrome display a range of developmental and behavioural deficits with mild to severe mental retardation, attention deficit disorder, autistic behavior, sleep disorders, memory deficits and problems related to anxiety such as hyperactivity among others. FXS is caused by transcriptional silencing or loss of function of the *FMR1* gene product by CGG triplet expansion in the 5' untranslated region of the gene. The gene encodes an apparent RNA binding protein, which appears to be involved in mRNA export, localization and translational regulation, especially locally at particular synapses. In addition, FMR protein (FMRP), appears also to be involved in developmental decisions at the level of neurite extension, guidance and branching. However, the precise role of FMRP in these processes has not yet been defined with certainty.

A *Drosophila* model for Fragile X Syndrome has been developed that is based on loss-of-function mutants of *dfmr1*, the single homolog of the *FMR1* gene in the *Drosophila* genome. Studies of these mutants uncovered neuronal and behavioural phenotypes analogous to symptoms observed in Fragile X patients. These include alterations in circadian rhythms, synaptic branching and cytoskeletal dynamics in neurons and other tissues. In this study, we investigated the role of *dfmr1* in associative and non-associative learning in *Drosophila*. First, we determined whether *dfmr1* heterozygous mutants exhibit deficits in olfactory associative learning and memory and surprisingly, we uncovered a robust deficit. The deficit can be rescued by transgenes carrying the full length genomic fragment that harbours the entire wild type *dfmr1* gene (RES), but not by a frame-shift mutation in the coding region (FS). Furthermore, we investigated whether *dfmr1* heterozygous mutants are deficient in habituation both as a measure of non-associative learning and to probe whether we can model attention deficit, autism and schizophrenia experienced by human FXS patients in the fly. We found that mutant flies habituate slower than control animals, indicating a defect in non-associative learning. In addition, we treated the *dfmr1* mutants with mGluR antagonists, to restore both learning and habituation deficits. Also we examined the overall locomotor activity of mutants and clearly, total locomotor activity of *dfmr1* flies is significantly higher than that of controls. Hyperactivity is a characteristic common symptom of FXS and it may reflect anxiety.

These results demonstrate the utility of the *Drosophila* system both as a model of behavioural deficits exhibited by FXS patients, but also as a vehicle for discovery and validation of pharmaceuticals to ameliorate them.

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΝΩΣΙΑΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΕΥΘΡΑΥΣΤΟΥ Χ ΣΤΗΝ ΔΡΟΣΟΦΙΛΑ

Αλέξανδρος Κ. Κανελλόπουλος, Ευθύμιος Μ. Σκουλάκης

Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Ε.ΚΕ.ΒΕ «Αλ. Φλέμινγκ», Βάρη 16672 - Αττική

Το Σύνδρομο του Εύθραυστου Χ (Fragile X Syndrome, FXS) είναι η πιο κοινή αιτία κληρονομήσιμης πνευματικής καθυστέρησης και οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο *Fmr1* στο Χ χρωμόσωμα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το FXS προκαλείται από την επέκταση των τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων CGG στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου. Υπερμεθυλίωση των επαναλήψεων CGG συνήθως οδηγεί στην αποσιώπηση του γονιδίου. Ασθενείς με FXS, έχει παρατηρηθεί ότι παρουσιάζουν αναπτυξιακά και συμπεριφορικά προβλήματα, από ελαφριά μέχρι βαριά πνευματική καθυστέρηση, αυτιστικές συμπεριφορές, διαταραχές στον ύπνο, προβλήματα μνήμης, υπερενεργητικότητα καθώς και έντονη ανησυχία. Η Fragile X mental retardation protein (FMRP), η οποία κωδικεύεται από το γονίδιο *Fmr1*, είναι μέλος της οικογένειας των RNA-binding πρωτεϊνών, γνωστές ως ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (hnRNPs), που σχετίζονται με πολλές θεωρίες σχετικά με το μεταβολισμό και την βιολογία του mRNA. Πρόσφατα δείχθηκε ότι κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες, χρειάζονται για την εξαγωγή των mRNAs από τον πυρήνα και την υποκυτταρική τοποθέτησή τους στο κυτταρόπλασμα.

Το μοντέλο του FXS έχει αναπτυχθεί στην Δροσόφιλα, και βασίζεται στην ύπαρξη ενός ομολόγου γονιδίου του *Fmr1*, το *dfmr1*. Μεταλλαγές του γονιδίου οδηγούν στην αποσιώπηση του και μελέτες δείχνουν ότι οι μεταλλαγές αυτές προκαλούν νευρολογικά και συμπεριφορικά προβλήματα παρόμοια με τα ανθρώπινα συμπτώματα. Τα προβλήματα αυτά επικεντρώνονται κυρίως σε αλλαγές στον κερκάδιο κύκλο των μυγών, προβλήματα στις συναπτικές διακλαδώσεις και στον κυτταροσκελετό.

Στην εργασία αυτή, αναλύσαμε τον ρόλο του γονιδίου *dfmr1* στην συνειρμική και μη συνειρμική μάθηση στην Δροσόφιλα. Αρχικά εξετάσαμε το ρόλο του μεταλλαγμένου γονιδίου στην συνειρμική μάθηση και βρήκαμε ότι οι ετερόζυγες μεταλλαγμένες μύγες παρουσιάζουν σημαντικό πρόβλημα μάθησης. Προσπαθήσαμε να διασώσουμε τον φαινότυπο αυτόν, γενετικά καθώς επίσης και με την χρησιμοποίηση ανταγωνιστών των mGluRs. Επιπλέον μελετήσαμε τον ρόλο του μεταλλαγμένου γονιδίου στην μη συνειρμική μάθηση (εθισμό) και διαπιστώσαμε ότι οι ετερόζυγες μεταλλαγμένες μύγες καθυστερούν να εθιστούν σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Η μελέτη του εθισμού έγινε με σκοπό να μελετήσουμε αν υπάρχει κάποιο πρόβλημα στην μη συνειρμική μάθηση και για να διαπιστώσουμε αν μπορούμε να μοντελοποιήσουμε με το σύστημά μας, ασθένειες όπως ο αυτισμός, η σχιζοφρένεια, κ.α.. Επίσης εξετάσαμε την κινητική ικανότητα-ενεργότητα των ετερόζυγων μεταλλαγμένων μυγών και διαπιστώσαμε ότι είναι περισσότερο ενεργητικές σε σύγκριση με τους μάρτυρες, όπως συμβαίνει και στον άνθρωπο.

Τα αποτελέσματά μας, συνιστούν ότι η Δροσόφιλα αποτελεί ένα πολύ καλό γενετικό μοντέλο, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη του συνδρόμου Εύθραυστου Χ, με ικανοποιητικά αποτελέσματα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη και τον σχεδιασμό διαφόρων φαρμάκων.



## LEARNING UNDER THE INFLUENCE OF ETHANOL

*Alexandros K. Kanellopoulos\*, Eirini Sideri\*, Efthimios M. C. Skoulakis*

*Institute of Molecular Biology and Genetics, B.S.R.C. "Al. Fleming", Vari 16672 - Greece*

Exposure of animals to ethanol results in multiple acute and long term symptoms and deficits. High levels of ethanol during development result in a range of defects collectively known as Fetal Alcohol Syndrome (FAS) in humans. Prior work demonstrated that likewise, exposure to elevated ethanol during *Drosophila* development precipitates significant deficits in animals raised under these conditions, but exposed to ethanol post-developmentally. These effects include developmental delays, altered brain morphology and apparent neurodegeneration, changes neuronal protein accumulation and a range of behavioral deficits including deficient learning and memory.

Surprisingly, these deficits were not observed in animals mutant for components of cAMP signaling. Namely, *rutabaga* flies that lack Type I calcium/calmodulin-dependent adenylyl cyclase are resistant to the long term deficits resulting from ethanol exposure during development. Therefore, cAMP modulation is required for the developmental deficits. *Rut* animals have been demonstrated deficient in associative and non-associative learning and memory. Paradoxically however, *rut* animals exposed to ethanol during development exhibited much improved associative learning, nearly reverting their learning deficit. We will present results from our attempt to explore this phenomenon as well as the precise role of this particular Adenylyl Cyclase in associative and non-associative learning and memory, as well as stimulus perception and processing.

## ΜΑΘΗΣΗ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

*Αλέξανδρος Κ. Κανελλόπουλος\*, Ειρήνη Σιδέρη\*, Ευθύμιος Μ. Σκουλάκης*

*Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλ. Φλέμινγκ», Βάρη 16672 - Αττική*

Η έκθεση σε υψηλά επίπεδα αιθανόλης κατά την διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης μπορεί να προκαλέσει μία πληθώρα προβλημάτων, γνωστά ως Εμβρυικό Αλκοολικό Σύνδρομο (FAS) στον άνθρωπο. Σε προηγούμενη εργασία δείξαμε ότι η έκθεση σε διάφορα ποσοστά αιθανόλης κατά την εμβρυική ανάπτυξη των ατόμων της Δροσόφιλας μπορεί να προκαλέσει παρόμοια συμπτώματα. Η έκθεση σε αιθανόλη προκαλεί καθυστέρηση στην ανάπτυξη, αλλαγές στην μορφολογία του εγκεφάλου με πιθανό νευροεκφυλισμό, αλλαγές στα επίπεδα πρωτεϊνών του εγκεφάλου καθώς επίσης και πληθώρα συμπεριφορικών προβλημάτων όπως προβλήματα στην μάθηση και στην μνήμη.

Παραδόξως, τα συμπτώματα αυτά δεν παρατηρούνται σε άτομα μεταλλαγμένα για μόρια σηματοδότησης του cAMP μονοπατιού. Χρησιμοποιώντας τις μεταλλαγμένες μύγες *rutabaga* (το μεταλλαγμένο στέλεχος *rutabaga* φέρει μία μεταλλαγή που σχετίζεται με την ενεργότητα της αδενυλικής κυκλάσης τύπου I AC, με αποτέλεσμα να έχει μειωμένα επίπεδα cAMP και μπλοκάρεται έτσι η ικανότητα της συνειρμικής μάθησης) καταφέραμε να διασώσουμε ένα μέρος των παραπάνω φαινοτύπων και ανέλπιστα τον φαινότυπο της συνειρμικής μάθησης. Φαίνεται λοιπόν, πως η επίδραση της αιθανόλης κατά την ανάπτυξη απαιτεί ρύθμιση των επιπέδων του cAMP, αλλά παραμένει ανεξήγητο το γιατί οι *rut* ενήλικες με έκθεση στην αιθανόλη κατά την αναπτυξιακή τους περίοδο έχουν καλύτερη μάθηση.

Οι μύγες *rutabaga* έχουν μελετηθεί για τα προβλήματα που παρουσιάζουν τόσο στην συνειρμική όσο και στην μη-συνειρμική μάθηση και μνήμη και για το λόγο αυτό στην εργασία αυτή θα παρουσιάσουμε τα αποτελέσματα από την προσπάθειά μας να εξερευνήσουμε το παραπάνω φαινόμενο και τον ακριβή ρόλο της συγκεκριμένης Αδενυλικής Κυκλάσης στην συνειρμική και μη συνειρμική μάθηση και μνήμη.

## FIBER TYPE I MAPPING IN 21 DAYS OLD RAT TIBIALIS ANTERIOR MUSCLE

*D. Kapoukranidou , I. P. Kalpidis , M. Albani*

*Department of Physiology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki*

The depiction of fiber types inside the muscle constitutes an important approach to the knowledge of Neuromuscular system and its clinical applications..

The purpose of this study is to present the dispersion of fiber type I, in 21 days old rat tibialis anterior muscle fully orientated cross sections, as well as to define and compare the fiber type occupation surface per cross section and hind limb. Besides, based on points coordinates, we perform 3-D image of type I fibers dispersion in cross sections of both hind limbs, providing the ability to compare their density and position in each section level.

Pairs of tibialis anterior muscles were removed from six rats with a special device at their optimal length, paying attention to the orientation of muscles and their removed length. Following that they were frozen and cut into five 10  $\mu\text{m}$  thick orientated cross sections ( Z levels) per 2000 $\mu\text{m}$  and stained for ATPase ( pH 4.6). A Zeiss light microscope with a KS 300 imaging system release 3.0 was used to estimate the sections' surface, as well as the coordinates of muscle sections perimeter and their type I points. The MATLAB program language was used to delineate data in space and the SPSS statistic program to process them.

The results show a concentration of type I fibers near the bone and the coverage area increases from distal to the proximal part of muscle in both limbs ( mean surface 46% and 42% for right and left limb correspondingly). A statistically significant difference of type I fibers occupation surface was remarked at distal and proximal corresponding section levels ( Z1, Z5) among hind limbs. Generally, there is a type I fibers tendency concourse to the surface among hind limbs mainly those of mesial one third.

This mapping displays the dispersion image of type I fibers along tibialis anterior muscle in both hind limbs in 21 days old rat and the results shows a relative homogeneity of fiber dispersion at correspondingly cross section levels of hind limbs.

## ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΩΝ ΤΥΠΟΥ I ΜΥΙΚΩΝ ΙΝΩΝ ΠΡΟΣΘΙΟΥ ΚΝΗΜΙΑΙΟΥ ΜΥΟΣ ΕΠΙΜΥΟΣ ΗΛΙΚΙΑΣ 21 ΗΜΕΡΩΝ

*Δ. Καπουκρανίδου, Ι.Π. Καλπίδης, Μ. Αλμπάνη*

*Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη*

Η απεικόνιση των τύπων των μυϊκών ινών στο εσωτερικό του μυ αποτελεί σημαντικό στοιχείο προσέγγισης του νευρομυϊκού συστήματος και των κλινικών του εφαρμογών. Επιπρόσθετα συμπληρώνει τις μέχρι τώρα υπάρχουσες μελέτες και δίνει μία ακριβή εικόνα τοπογραφίας των μυϊκών ινών στο εσωτερικό του μυ.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η απεικόνιση της διασποράς των τύπου I μυϊκών ινών σε πλήρως προσανατολισμένες εγκάρσιες τομές πρόσθιου κνημιαίου μυ επίμυος ηλικίας 21 ημερών, καθώς και ο προσδιορισμός και η σύγκριση της επιφάνειας κάλυψης των ινών ανά επίπεδο τομής και σκέλος μελέτης. Παράλληλα, με βάση τις συντεταγμένες των σημείων, απεικονίζεται τρισδιάστατα η κατανομή των τύπου I μυϊκών ινών στις εγκάρσιες τομές του πρόσθιου κνημιαίου μυ στα δύο σκέλη του επίμυος, παρέχοντας τη δυνατότητα σύγκρισης του βαθμού πύκνωσης αλλά και της θέσης κάλυψης των ινών στα επίπεδα τομών.

Ζεύγη πρόσθιων κνημιαίων μυών από έξι πειραματόζωα εξήχθησαν με ειδική διάταξη στο φυσικό τους μήκος, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στον προσανατολισμό των μυών και το μήκος εκτομής των. Ακολούθως εψύχθησαν και ελήφθησαν πέντε προσανατολισμένες εγκάρσιες τομές (επίπεδα Z) πάχους 10μm ανά 2000μm. οι οποίες επεξεργάστηκαν ιστοχημικά με τη χρώση ATPάση (pH 4,6). Χρησιμοποιώντας το οπτικό μικροσκοπικό σύστημα Zeiss (2.5x, 10x) και το υπολογιστικό σύστημα ανάλυσης εικόνων KS 300 Release 3.0 υπολογίστηκαν οι επιφάνειες των τομών καθώς και οι συντεταγμένες της περιμέτρου των μυϊκών τομών καθώς και των αντίστοιχων σημείων των μυϊκών ινών τύπου I. Τα δεδομένα απεικονίστηκαν στο χώρο με τη χρήση της γλώσσας προγραμματισμού MATLAB και επεξεργάστηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS 14.0.

Τα αποτελέσματα έδειξαν συγκέντρωση των τύπου I μυϊκών ινών προς το οστόν και μάλιστα η επιφάνεια κάλυψης αυξάνει από το άπω προς το εγγύς τμήμα του μυ και για τα δύο σκέλη (μέση επιφάνεια κάλυψης 46% και 42% για το δεξί και αριστερό σκέλος αντίστοιχα) . Μεταξύ των σκελών παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά επιφάνειας κάλυψης των τύπου I μυϊκών ινών στο εγγύς και άπω επίπεδο τομής ( Z1, Z5). Γενικά υπάρχει μία τάση σύγκλισης των ινών προς την μεταξύ των σκελών επιφάνεια και κυρίως αυτών του μέσου τριτημορίου του μυ.

Η χαρτογράφηση αυτή δείχνει διασκορπισμό των τύπου I μυϊκών ινών κατά μήκος του πρόσθιου κνημιαίου μυ στα δύο σκέλη επίμυος ηλικίας 21 ημερών, τα αποτελέσματα δε παρουσιάζουν μία σχετική ομοιογένεια κατανομής των ινών στα αντίστοιχα εγκάρσια επίπεδα τομής των σκελών.

## CHARACTERIZATION OF RIG-6, A MEMBER OF THE CONTACTIN SUBFAMILY OF THE IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY IN *C. ELEGANS*

M. Katidou<sup>1,2</sup>, N. Tavernarakis<sup>1</sup>, D. Karagogeos<sup>1,2</sup>

1) IMBB, FORTH, Heraklion, Crete, Greece

2) University of Crete, Medical School Heraklion, Greece

The Immunoglobulin Superfamily (IgSF) represents one of the largest families of proteins evolutionary conserved from worm to man. Members of the IgSF have been known to regulate numerous processes during development, playing a leading part in cell-cell recognition and communication. The contactin subfamily of the IgSF consists of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored glycoproteins that contain 6 immunoglobulin domains and 4 fibronectin type III domains. The vertebrate counterparts of this subfamily are known to be involved in axon growth and guidance, neuronal migration, axon fasciculation and myelination, while the sole *Drosophila* representative (*D-cont*) is required for septate junction organization working nevertheless, in a conserved manner. To gain insight into the function of contactins, we are characterizing RIG-6 (C33F10.5), the only *C. elegans* member of the contactin subfamily. Aiming to determine the *rig-6* spatiotemporal expression pattern, we have generated a full-length, GFP reporter fusion encompassing both the promoter and the complete coding region of the gene. *rig-6* is expressed in head neurons, ventral cord motorneurons and in pharyngeal and intestinal tissue. To further investigate the role of RIG-6 we are using *rig-6* deletion mutants and RNAi knockdown to characterize effects on neuronal development and axonal migration.

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RIG-6, ΜΟΝΑΔΙΚΟΥ ΜΕΛΟΥΣ ΤΗΣ ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ CONTACTIN ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ ΣΤΟ *C.ELEGANS*

*M. Κατίδου*<sup>1,2</sup>, *N. Ταβερναράκης*<sup>1</sup>, *Δ. Καραγωγέως*<sup>1,2</sup>

1) *IMBB, ΙΤΕ, Ηράκλειο Κρήτης*

2) *Ιατρική σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

Τα μέλη της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών αντιπροσωπεύουν μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες πρωτεϊνών που συντηρούνται εξελικτικά από το νηματώδη ως τον άνθρωπο. Οι πρωτεΐνες αυτές ρυθμίζουν πολλές διαδικασίες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μέσω της ικανότητας τους να επάγουν τη δια-κυτταρική επικοινωνία και αναγνώριση. Στα σπονδυλωτά, η υποοικογένεια contactin της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών εμπλέκεται στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και πιο συγκεκριμένα στην καθοδήγηση και δεσμιδοποίηση νευραξόνων, στη μετανάστευση νευρώνων και στη μυελίνωση. Το ομόλογο μόριο D-cont στη *Drosophila*, απαιτείται για την οργάνωση του επιθηλίου, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών που συντηρείται στις παρακομβικές περιοχές των εμύελων ινών των θηλαστικών.

Στη παρούσα μελέτη γίνεται ο χαρακτηρισμός του γονιδίου *rig-6* μοναδικού μέλους της υποοικογένειας contactin στον νηματώδη *C.elegans*. Δημιουργώντας διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν την πρωτεΐνη RIG-6 σε σύντηξη με τη GFP αναλύουμε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου. Το *rig-6* εκφράζεται σε νευρώνες, στην υποδερμίδα, στο φάρυγγα και στην σπερματοθήκη. Στα πλαίσια της μελέτης της λειτουργίας του, χρησιμοποιούμε μεταλλαγμένα στελέχη για το *rig-6* καθώς και τη μέθοδο του RNAi για την καταστολή της έκφρασής του, με σκοπό την ανάλυση της συμβολής του στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος

## FUNCTIONAL NEUROIMAGING EVIDENCE REGARDING THE ROLE OF THE RIGHT HEMISPHERE IN LANGUAGE PROCESSING

*E. Klepousniotou<sup>1,2</sup>, V.L. Gracco<sup>2,3</sup> and G.B. Pike<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *McConnell Brain Imaging Centre, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Canada*

<sup>2</sup> *Centre for Research on Language, Mind and Brain, McGill University, Montreal, Canada*

<sup>3</sup> *School of Communication Sciences and Disorders, McGill University, Montreal, Canada*

Lexical ambiguity, where a single word has more than one meaning, is very common in natural language. With respect to lexical semantics in general, an increasing amount of evidence from lesion studies and divided visual field studies with young healthy individuals suggests that both the left and the right hemisphere contribute to the comprehension of semantic relations. A review of the literature on language abilities after right hemisphere damage reveals abnormalities in the interpretation of lexical items (as well as larger linguistic units) that have multiple meanings and an inability to revise initial interpretations. Thus, while the role of the right hemisphere in language processing and the neural substrates involved is not known, the evidence from lesion studies strongly suggests that the right hemisphere is involved in the appreciation of semantic relations including lexical ambiguity.

In the current study, an event-related fMRI design was used to examine activation related to the processing of words with multiple meanings within both the left and the right hemisphere. Young healthy control subjects were scanned while they performed a single-word priming semantic judgment task. In the experiment, ambiguous word primes (e.g., bank) were followed either by a target word related to their dominant meaning (e.g., money), a target word related to their subordinate meaning (e.g., river), or an unrelated control target word (e.g., flower). In the baseline control condition, crosses were presented instead of the prime and target words. Brain activity during the performance of language processing trials in which either dominant or subordinate meaning activation of ambiguous words was required was compared with brain activity during the baseline control condition.

The results of the study revealed that Brodmann's area 44 (i.e., Broca's area) as well as Brodmann's area 40 (i.e., inferior parietal lobule) both in the left and the right hemispheres are centrally involved in language processing, further specifying, thus, the relative contribution of these cortical areas to language processing.

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΝΕΥΡΟΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΔΕΞΙΟΥ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΟΥ  
ΣΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ**

*E. Κλεπουσινιώτου<sup>1,2</sup>, V.L. Gracco<sup>2,3</sup> and G.B. Pike<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *McConnell Brain Imaging Centre, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Canada*

<sup>2</sup> *Centre for Research on Language, Mind and Brain, McGill University, Montreal, Canada*

<sup>3</sup> *School of Communication Sciences and Disorders, McGill University, Montreal, Canada*

Η λεκτική αμφισημία, το φαινόμενο κατά το οποίο μία λέξη έχει περισσότερες από μία σημασίες, είναι πολύ συνηθισμένη στο λόγο. Όλο και περισσότερες έρευνες σε ασθενείς με εγκεφαλικές βλάβες όπως επίσης και μελέτες διαχωρισμένων οπτικών πεδίων με νέους, υγιείς συμμετέχοντες δείχνουν ότι και το αριστερό και το δεξιό ημισφαίριο του εγκεφάλου συμβάλλουν στην κατανόηση σημασιολογικών σχέσεων. Μία εξέταση της βιβλιογραφίας που αφορά την ικανότητα στον λόγο μετά από βλάβες στο δεξιό ημισφαίριο καταδεικνύει διαταραχές στην κατανόηση λέξεων και φράσεων που έχουν πολλαπλές σημασίες όπως επίσης και διαταραχές στην ικανότητα ανασκευασμού αρχικών ερμηνειών. Παρότι οι ακριβείς περιοχές στο δεξιό ημισφαίριο του εγκεφάλου που εμπλέκονται στην επεξεργασία του λόγου δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως, μελέτες ασθενών με εγκεφαλικές βλάβες δείχνουν ότι το δεξιό ημισφαίριο παίζει σημαντικό ρόλο στην κατανόηση σημασιολογικών σχέσεων συμπεριλαμβανομένης και της λεκτικής αμφισημίας.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της λειτουργικής μαγνητικής τομογραφίας για να εξετάσουμε την ενεργοποίηση συγκεκριμένων περιοχών του αριστερού και δεξιού ημισφαιρίου του εγκεφάλου κατά την επεξεργασία λέξεων με πολλαπλές σημασίες. Νέα, υγιή άτομα έλαβαν μέρος στο παρόν πείραμα. Η ενεργοποίηση του εγκεφάλου καταγραφόταν καθώς οι συμμετέχοντες έκριναν την σημασιολογική σχέση ανάμεσα σε δύο λέξεις που παρουσιάζονταν στην οθόνη. Για παράδειγμα, στην πειραματική συνθήκη, η αμφίσημη λέξη *bank* ακολουθείτο είτε από μία λέξη που δήλωνε την κύρια σημασία της, *money*, είτε από μία λέξη που δήλωνε την δευτερεύουσα σημασία της, *river*, είτε τέλος από μία λέξη ελέγχου με την οποία δεν σχετιζόταν σημασιολογικά, *flower*. Στη συνθήκη ελέγχου, ένας σταυρός παρουσιαζόταν στη θέση της κάθε λέξης.

Σύγκριση της ενεργοποίησης του εγκεφάλου κατά την διάρκεια κρίσεων των κυρίων ή των δευτερευουσών σημασιών των λέξεων με την ενεργοποίηση του εγκεφάλου κατά την διάρκεια της συνθήκης ελέγχου μας επέτρεψαν να εντοπίσουμε τις περιοχές που εμπλέκονται στην αξιολόγηση της λεκτικής αμφισημίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, και στο αριστερό και στο δεξιό ημισφαίριο του εγκεφάλου, το πεδίο 44 του Brodmann (περιοχή Broca) καθώς και το πεδίο 40 του Brodmann που βρίσκεται στο πρόσθιο τμήμα του κάτω βρεγματικού λοβίου έχουν κεντρικό ρόλο στην ερμηνεία αμφίσημων εννοιών.



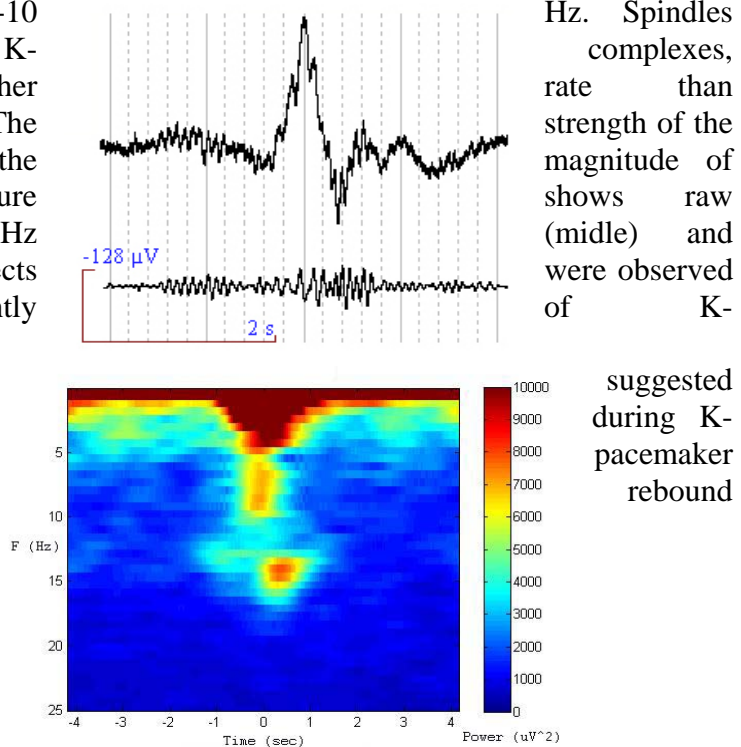
### K-COMPLEXES MODIFY SPINDLES DURING THE SECOND STAGE OF NON-REM HUMAN SLEEP

V. Kokkinos<sup>1</sup>, A. Koupparis<sup>1</sup>, M. Stavrinou<sup>1</sup>, I. Ioannides<sup>2</sup> and G. Kostopoulos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Medical School, University of Patras, Greece

<http://nucleus.med.upatras.gr/NU>, <sup>2</sup>HBDL, Brain Science In., RIKEN, Saitama, Japan

The 2<sup>nd</sup> stage of non-REM (NREM) or slow wave sleep is the most prominent one and is characterized by K-complexes (very large negative or negative-positive EEG waves of >500msec duration generalized but most prominent frontally) and spindles (generalized rhythmical small waves at 12-15Hz). The role of K-complexes is unknown, but they are postulated to be cortically generated anti-arousal responses against endo- or exogenous stimuli associated to transient autonomic responses and leading to deeper sleep. Spindles born out of a reverberation in thalamocortical circuits disable sensory perception during sleep, while at the same time induce plastic changes in cortex and thus play a role in memory consolidation. K-complexes and spindles often coincide but their mechanisms are suggested by several studies to be independent. We present evidence of clear interaction between the two. We recorded a whole night's sleep from four healthy adult subjects (3 females, one male, mean age 29y) with regular sleep habits and free of both alcohol and caffeine. 64 channel EEG was used along with standard EOG and EMG and hypnograms were drafted according to established standards. By visual inspection of several channels we marked the occurrence of K-complexes' negative peak and the middle negative peak of spindles and cut the EEG epochs several seconds before and after those peak times. We then selected those K-complexes which run coincidentally with spindles i.e. spindles were present before and continued after the K-complex. We superimposed and averaged the individual records and the spectrograms (time-frequency analysis using FFT as well as wavelet analysis) of all epochs. In all subjects we observed that spindles were interrupted during K-complexes. In their place, during the K-complex, we observed slower rhythms in the range of 6-10 Hz. Spindles resumed immediately after cessation of the K-complex, stronger in power and at an invariably higher rate than before the K-complex (by about 1 Hz). The rebound appeared to correlate to the positive phase of the K-complex. Figure 1 shows raw EEG (top), EEG high pass filtered at 7 Hz (middle) and average spectrogram (bottom). These effects were observed brain-wide. Spindles occurring independently of K-complexes did not exhibit any interruption or acceleration. It is suggested that strong synchronous cortical bursting complexes may deregulate the thalamic pacemaker of spindles, which right after shows a rebound effect.

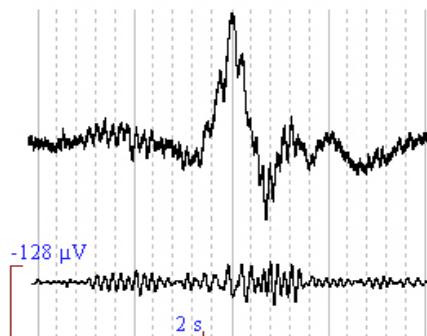


## ΤΑ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΑΣ-Κ ΔΙΑΜΟΡΦΩΝΟΥΝ ΤΙΣ ΑΤΡΑΚΤΟΥΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΤΟΥ ΜΗ-REM ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΥΠΝΟΥ

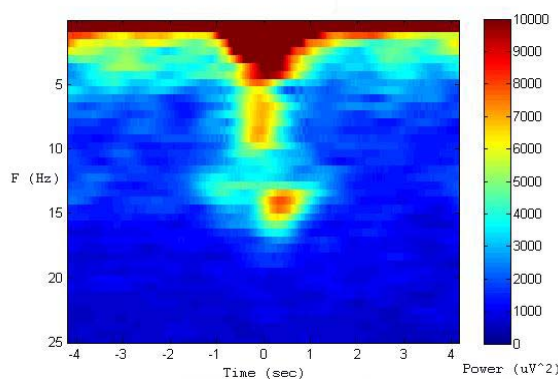
B.Κόκκινος<sup>1</sup>, Α.Κουμπάρης<sup>1</sup>, Μ.Σταυρίνου<sup>1</sup>, Α. Ιωαννίδης<sup>2</sup> και Γ.Κωστόπουλος<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών, Ελλάδα  
<http://nucleus.med.upatras.gr/NU>, <sup>2</sup>HBDL, Brain Science Institute, RIKEN, Saitama, Japan

Το 2<sup>ο</sup> στάδιο του ύπνου χωρίς ταχείες οφθαλμικές κινήσεις (NREM) είναι το πλέον κυρίαρχο σε διάρκεια και χαρακτηρίζεται από τα συμπλέγματα-«Κ» (ΣΚ) (τα μεγαλύτερα κύματα του φυσιολογικού ΗΕΓ, κύρια αρνητικά ή αρνητικά-θετικά με διάρκεια >500 msec με γενικευμένη αλλά κύρια μετωπιαία εντόπιση) και από τις ΗΕΓ ατράκτους (μικρά γενικευμένα ρυθμικά κύματα στα 12-15Hz). Ο ρόλος των ΣΚ είναι άγνωστος, αλλά θεωρούνται φλοιϊκής προέλευσης αποτυχημένες αντιδράσεις εγρήγορσης σε ενδογενή ή εξωγενή ερεθίσματα, συνοδευόμενες από παροδικές αντιδράσεις από το αυτόνομο νευρικό σύστημα, οι οποίες οδηγούν σε βαθύτερο ύπνο. Οι άτρακτοι δημιουργούνται σε θαλαμοφλοιϊκά κυκλώματα απενεργοποιούν την αισθητική αντίληψη του περιβάλλοντος κατά τον ύπνο, ενώ ταυτόχρονα προκαλούν πλαστικές αλλαγές στο φλοιό συμβάλλοντας στην παγίωση της μνήμης. Τα ΣΚ και οι άτρακτοι συχνά συμπίπτουν χρονικά αλλά οι μηχανισμοί τους έχουν δείχθει από πολλές μελέτες ότι είναι ανεξάρτητοι. Παρουσιάζουμε εδώ ενδείξεις σαφούς διάδρασης ανάμεσά τους. Μελετήσαμε πολυγραφικά ολονύκτιο ύπνο 4 υγιών ενηλίκων ατόμων (3 γυναίκες και ένας άντρας, μέση ηλικία 29 χρόνια) με κανονικές συνήθειες ύπνου που δεν είχαν καταναλώσει αλκοόλ και καφεΐνη. ΗΕΓ 64 διαύλων χρησιμοποιήθηκε μαζί με ΗΟΓ και ΗΜΓ για την εξαγωγή υπνογράμματος σύμφωνα με διεθνή κριτήρια. Κατόπιν επισκόπησης ΗΕΓ κύρια κεντρικών διαύλων επισημάνουμε στο ΗΕΓ του Cz τις αρνητικές κορυφές των ΣΚ και των μεσαίων αρνητικών κορυφών στο μέσο των ατράκτων και απομονώσαμε τα ΗΕΓ τμήματα αρκετά δευτερόλεπτα πριν και μετά τα παραπάνω επισημανθέντα χρονικά σημεία. Στη συνέχεια επιλέξαμε εκείνα τα ΗΕΓ που περιελάμβαναν ΣΚ σε συγκυρία με ατράκτους που άρχιζαν πριν και τελείωναν μετά το ΣΚ. Επισκοπήσαμε τα μοναδικά ΗΕΓ δεδομένα και την μεση τιμή τους. Χρησιμοποιώντας ταχεία μετατροπή Fourier και ανάλυση κυματιδίων των επιλεγμένων τμημάτων λάβαμε φασματογραφήματα της εξέλιξης των συχνοτήτων του ΗΕΓ στο χρόνο και τα μεσοποίησαμε. Η άνω εικόνα δείχνει σύμπτωση ενός ΣΚ και μιας ατράκτου. Στο μέσο είναι το ίδιο τμήμα ΗΕΓ μετά ιθμό υψηλοπερατό στα 6 Hz., ενώ κάτω παρουσιάζεται η μεσοποίηση 16 φασματογραφημάτων. Σε όλα τα άτομα παρατηρήθηκε ότι τα ΣΚ διακόπτουν τις ατράκτους για όλη τη διάρκεια του αρνητικού τους κύματος. Στη θέση τους εμφανίζεται ρυθμική δραστηριότητα ευρέως φάσματος ~7-10 Hz. Οι άτρακτοι επανακάμπτουν αμέσως μετά το ΣΚ με μεγαλύτερη ισχύ και συχνότητα (κατά 1 Hz). Η ισχύς της ανάκαμψης των ατράκτων φαίνεται να συσχετίζονται με το μέγεθος της θετικής φάσης του ΣΚ. Αυτά τα αποτελέσματα ήταν γενικευμένα στο εγκέφαλο. Άτρακτοι που παρατηρήθηκαν



ανεξάρτητα από τα ΣΚ δεν παρουσίαζαν διακοπή ή επιτάχυνση. Προτείνεται ότι οι ισχυρές, πολύ σύγχρονες φλοιϊκές ομαδικές εκφορτίσεις κατά τα ΣΚ μπορεί να απορυθμίζουν τον θαλαμικό βηματοδότη των ατράκτων, ο οποίος παρουσιάζει φαινόμενα ανάκαμψης (rebound) αμέσως μετά.



## THE ROLE OF DOPAMINERGIC NEUROTRANSMISSION AND HYPOTHALAMIC OXYTOCIN LEVELS IN RELATION TO THE FUNCTION OF THE REWARD SYSTEM IN THE RAT

*A.M. Kollia, A. Stamatakis, F. Stylianopoulou*

*Laboratory of Biology-Biochemistry, Faculty of Nursing, University of Athens, Papadimantopoulou 123, 11527 Athens, Greece.*

Early life experiences, particularly a perturbed mother-infant interaction, are known to affect neuroendocrine and neurobiological responses of the adult organism. In an effort to investigate the behavioral mechanisms underlying reinforcement or frustrating non-reward (denial) of maternal contact during neonatal life, we trained Wistar rat pups (postnatal days 10-13) in a T-maze with the mother as either a positive or a negative reinforcer. In these animals we examined the function of mesolimbic and mesocortical dopaminergic systems as well as the function of the hypothalamic oxytocinergic system, neuronal circuits involved in the reward system and in the formation of the mother-offspring bond. Rat pups (10-13 days of age) were exposed to either continued reward (non frustrated) or frustrative non- reward (frustrated) of maternal contact and dopamine and its metabolites were determined by HPLC in the prefrontal cortex and striatum of A) 13-day old pups 2 hours after the last training trial in the T- maze and B) adult animals, in order to identify long-term effects of the early experience on dopaminergic pathways of the brain. In addition, in non-frustrated and frustrated neonates hypothalamic cells containing oxytocin were determined immunohistochemically. Frustrated animals, both neonates and adults, showed an increase (compared to non- frustrated animals) in dopamine turnover (as indicated by a higher DOPAC/Dopamine ratio) in the prefrontal cortex. On the contrary, a decrease in dopamine turnover was observed in the striatum of adult male frustrated animals. Finally, in the hypothalamus of both frustrated and non-frustrated animals the number of oxytocin immunopositive cells was decreased compared to control animals, indicating that oxytocin release is increased in the projection areas of these hypothalamic neurons. Our results support the idea that neonatal learning under frustrating or non-frustrative conditions leads to alterations in mesolimbic and mesocortical dopaminergic as well as hypothalamic oxytocinergic function.

*This work has been supported by the Special Account for Research Grants- University of Athens.*

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ  
ΥΠΟΘΑΛΑΜΙΚΗΣ ΩΚΥΤΟΚΙΝΗΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΥ  
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΑΝΤΑΜΟΙΒΗΣ ΣΤΟΝ ΕΠΙΜΥ**

*A.M. Κόλλια, A. Σταματάκης, Φ. Στυλιανοπούλου*

*Εργαστήριο Βιολογίας- Βιοχημείας, Τμήμα Νοσηλευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Παπαδιαμαντοπούλου 123, 11527, Αθήνα.*

Πολυάριθμες μελέτες σε τρωκτικά υποστηρίζουν ότι ο ρόλος των πρώιμων εμπειριών, και ειδικά αυτών που παρεμβαίνουν στη σχέση μητέρας- νεογνού επηρεάζουν νευροενδοκρινείς και νευροβιολογικές αποκρίσεις. Στην προσπάθεια να διερευνηθούν οι συμπεριφορικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την ενίσχυση και την ματαιωτική μη ανταμοιβή της μητρικής επαφής κατά τη νεογνική ηλικία, χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί επίμυς ηλικίας 10-13 ημερών, στελέχους Wistar που εκπαιδεύτηκαν σε έναν λαβύρινθο σχήματος T (T maze). Στα ζώα αυτά μελετήθηκαν το μεσομεταιχμιακό και μεσοφλοιώδες ντοπαμινεργικό σύστημα καθώς και το υποθαλαμικό σύστημα ωκυτοκίνης, κυκλώματα που εμπλέκονται στο σύστημα ανταμοιβής και στη δημιουργία του δεσμού μητέρας- νεογνού. Από ζώα ηλικίας 13 ημερών που εκπαιδεύτηκαν είτε υπό συνθήκες ενίσχυσης είτε υπό συνθήκες ματαιωτικής μη ανταμοιβής απομονώθηκαν οι περιοχές του προμετωπιαίου φλοιού και του ραβδωτού και πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των επιπέδων της ντοπαμίνης και των μεταβολιτών της με χρήση της χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για ενήλικα ζώα που είχαν υποστεί την ίδια εκπαίδευση κατά τη νεογνική ηλικία, με σκοπό να εντοπιστούν μακροπρόθεσμες τροποποιήσεις στο μεσομεταιχμιακό και μεσοφλοιώδες ντοπαμινεργικό κύκλωμα. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός των κυττάρων του υποθαλάμου που ήταν θετικά για την ωκυτοκίνη. Η έκθεση των πειρατοζώων στην ματαιωτική μη ανταμοιβή οδήγησε σε αλλαγές στην ανακύκλωση της ντοπαμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό τόσο των νεογνών όσο και των ενήλικων επιμύων, όπως αυτή εκτιμήθηκε από τον αυξημένο λόγο DOPAC/Ντοπαμίνη. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μείωση του λόγου DOPAC/Ντοπαμίνη για την περιοχή του ραβδωτού στα ενήλικα αρσενικά ζώα που είχαν εκτεθεί στην εμπειρία της ματαιωτικής μη ανταμοιβής. Τέλος, όσον αφορά στο ωκυτοκινεργικό σύστημα, τα ζώα και των δύο κατηγοριών παρουσίασαν σαφώς μειωμένο αριθμό ανοσοθετικών κυττάρων για την ωκυτοκίνη στον υποθάλαμο σε σχέση με ζώα ελέγχου, υποδηλώνοντας αυξημένη απελευθέρωση ωκυτοκίνης στις θέσεις προβολής των νευρώνων αυτών. Συνοψίζοντας, τα παραπάνω αποτελέσματα στηρίζουν την υπόθεση ότι οι διαδικασίες νεογνικής μάθησης υπό συνθήκες ενίσχυσης ή ματαιωτικής μη ανταμοιβής οδηγούν σε αλλαγές στην ενεργοποίηση του μεσομεταιχμιακού και μεσοφλοιώδους ντοπαμινεργικού κυκλώματος και του ωκυτοκινεργικού συστήματος του υποθαλάμου.

*Η παρούσα εργασία χρηματοδοτήθηκε από τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του Πανεπιστημίου Αθηνών.*

## DEVELOPMENTAL STAGE AND GENDER INFLUENCE THE VULNERABILITY OF THE NEURONAL CYTOSKELETON TO ARA-C

C. Koros<sup>1</sup>, D. Karandrea<sup>1</sup>, D. Anastasopoulos<sup>2</sup>, E. Kitraki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Lab of Histology and Embryology, Medical School University of Athens*

<sup>2</sup>*Lab of Physiology, Nursing School University of Athens, Greece*

Cytosine arabinoside (AraC) an anticancer drug commonly used in leukemia treatment, has an impact on cerebellar function. In this study, AraC was administered to adult male Wistar rats in a scheme corresponding to a high therapeutic dose (i.p. 400mg/kg bw for 5 days) and its impact on the levels of cytoskeleton-related proteins was detected in the cerebellum by immunohistochemistry and western blotting. A significant reduction in the neurofilament (NF) immunopositive axons was observed in the molecular layer of the cerebellum. Western blotting revealed alterations in the proportion of the three NF isotypes (NF-H, NF-M, NF-L) and a significant decrease in NF-H of AraC-treated animals, compared to the controls. Moreover, calbindin D, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and heat shock protein 70 were significantly increased in the same area following AraC treatment, suggesting the existence of an intracellular cascade of events mediating cytoskeleton degradation and neuronal damage.

When AraC was administered to neonatal animals of both sexes (i.p. 200mg/kg bw for 3 days, during postnatal days 14-16 / the dose was adjusted for the blood brain barrier penetration at this age), a reduced vulnerability of cerebellar neurons was observed and the pattern of AraC-induced changes varied significantly between the sexes. More specifically, the ratio of the NF-H isoform the total NF content was also decreased in neonatal AraC - treated male rats vs. controls, though to a lesser extent than in adults. Interestingly, AraC-treated neonatal females exhibited an increase in all three NF isoforms . AraC-treated neonatal animals of both sexes demonstrated an altered glia response [reduced levels of Glial fibrillar acidic protein (GFAP)], as compared to the controls.

The above data suggest that the vulnerability of neurofilaments in the rat cerebellum to neurotoxic drugs depends on the developmental state and the gender of the animal.

## ΤΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΚΑΙ ΤΟ ΦΥΛΟ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ ΤΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ARA-C

*Χ. Κορός<sup>1</sup>, Δ. Καρανδρέα<sup>1</sup>, Δ. Αναστασόπουλος<sup>2</sup>, Ε. Κιτράκη<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική σχολή ΕΚΠΑ, Αθήνα, Ελλάδα*

*<sup>2</sup>Εργαστήριο Φυσιολογίας, Νοσηλευτική σχολή ΕΚΠΑ, Αθήνα, Ελλάδα*

Η κυτοσίνη αραβινοσίδη (AraC), ένας αντινεοπλασματικός παράγοντας που χρησιμοποιείται συχνά στη θεραπεία της λευχαιμίας, έχει βλαπτική επίδραση στη λειτουργία της παρεγκεφαλίδας. Για να διερευνήσουμε τη φύση της προκαλούμενης βλάβης από το AraC σε ένα πειραματικό μοντέλου σε ενήλικα ζώα, χορηγήσαμε ενδοπεριτοναϊκά AraC σε δόση 400mg/kg Σ.Β σε αρσενικούς ενήλικους επίμυες Wistar επί 5 ημέρες. Η παραπάνω δόση αντιστοιχεί σε μια υψηλή θεραπευτική δόση που χρησιμοποιείται κλινικά σε ασθενείς. Στην μοριώδη στοιβάδα της παρεγκεφαλίδας των πειραματόζωων που έλαβαν AraC διαπιστώθηκε ανοσοϊστοχημικά ελάττωση της έκφρασης των νευροϊνιδίων (NF). Η ανοσοστύπωση κατά Western αποκάλυψε μια μεταβολή στην αναλογία ανάμεσα στις τρεις ισομορφές των νευροϊνιδίων (NF-H, NF-M, NF-L) και μια στατιστικά σημαντική μείωση της NF-H σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων και άλλων πρωτεϊνών όπως της καλμπιντίνης D, της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης (GAPDH) και της πρωτεΐνης του θερμικού σοκ Hsp70, ως αντίδραση στο τοξικό ερέθισμα του AraC. Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν την ενεργοποίηση μιας ενδοκυττάριας αλληλουχίας γεγονότων τα οποία οδηγούν στην αποδόμηση του κυτταροσκελετού και στο νευρωνικό θάνατο.

Όταν το AraC χορηγήθηκε σε νεαρούς αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες (i.p. σε δόση 200mg/kg Σ.Β κατά τις ημέρες 14-16 από τη γέννηση / η δόση προσαρμόστηκε λόγω της δαιπερατότητας του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού σε αυτή την ηλικία) διαπιστώθηκε μειωμένη ευαισθησία των νευρώνων της παρεγκεφαλίδας συγκριτικά με τα ενήλικα ζώα καθώς και διαφορές ανάμεσα στα δυο φύλα. Ειδικότερα, η ανοσοστύπωση κατά Western αποκάλυψε μια στατιστικά σημαντική ελάττωση στην αναλογία της NF-H προς τις υπόλοιπες ισομορφές στα νεαρά αρσενικά ζώα υπό AraC, αν και η μεταβολή αυτή δεν ήταν τόσο έντονη όσο αυτή που παρατηρήθηκε στους ενήλικους επίμυες. Ένα ενδιαφέρον εύρημα ήταν η αύξηση και στις τρεις ισομορφές των νευροϊνιδίων στα νερά θηλυκά ζώα στα οποία χορηγήθηκε AraC. Τα νεαρά πειραματόζωα και των δυο φύλων στα οποία χορηγήθηκε AraC εμφάνιζαν ανοσοϊστοχημικά μείωση της όξινης γλοιακής ινιδιακής πρωτεΐνης (GFAP) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, γεγονός που υποδηλώνει επίδραση του AraC στη γλοία.

Τα ανωτέρω στοιχεία υποδεικνύουν ότι τόσο το στάδιο ανάπτυξης όσο και το φύλο διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ευαισθησία των νευροϊνιδιακών πρωτεϊνών ενάντια στην επίδραση τοξικών παραγόντων.

## MODELLING RELAY STATIONS OF THE MILK-EJECTION REFLEX IN THE SHEEP

*Efstratios K. Kosmidis<sup>1</sup>, Anastasia S. Tsingotjidou<sup>1</sup>, Christos Batzios<sup>2</sup>, Lazaros Iliadis<sup>3</sup> and Georgios C. Papadopoulos<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Lab. of Anatomy and Histology, <sup>2</sup>Lab. of Animal Production Economics,  
Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki,  
54 124 Thessaloniki, Greece*

<sup>3</sup>*Department of Forestry & Management of the Environment and Natural Resources, Democritus  
University of Thrace, 68 200 Orestiada, Greece*

Milk ejection reflex involves an ascending neuronal pathway from the nipples to the hypothalamus and a descending hormonal limb. Upon stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), oxytocin is released in the bloodstream from the neuroendocrine cells located in this nucleus. Oxytocin acts on the myoepithelial cells of the udder and consequently milk let-down occurs. Anatomical data, using tract-tracing and immunohistochemical techniques, reveal that in sheep, ascending neural information passes through the medial cuneate nucleus (CUM), or the lumbar spinal segments (LSS) and the lateral cervical nucleus (LCN) before reaching the PVN<sup>1,2,3</sup>. Physiological measurements suggest that although the nipples are periodically stimulated during suckling, the hypothalamic hormone oxytocin, is only released in the bloodstream once or twice.

In a first attempt to develop an artificial neural network that imitates the performance of the above pathway, we model a typical relay station, namely the CUM, LSS or the LCN, as a sparsely connected network consisting of excitatory and inhibitory populations of leaky-integrate-and-fire (LIF) neurons. The network is characterized by its connectivity, the average number of connections for each neuron, and a parameter  $\gamma$  determining the ratio of excitation versus inhibition. Excitatory connections have modulated synaptic weights; which strengthen upon neuronal firing and slowly decaying otherwise. The network responds to periodic stimulation with one or two bursts of highly synchronised neuronal activation and then enters a chaotic regime where natural synchronization disappears. Such a relay station could provide the appropriate input for oxytocin release.

*1. Tsingotjidou, A.S., and G. C. Papadopoulos, 1996; Brain Res. 741, 309-313.*

*2. Tsingotjidou, A.S., and G. C. Papadopoulos, 2003; J Comp Neurol., 460(1), 66-79.*

*3. Tsingotjidou, A.S., and G. C. Papadopoulos, 2007; Anat. Histol. Embryol., in press*

**ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ ΣΤΑΘΜΩΝ ΤΗΣ ΝΕΥΡΙΚΗΣ ΟΔΟΥ ΤΟΥ  
ΑΝΤΑΝΑΚΛΑΣΤΙΚΟΥ ΤΗΣ ΚΑΘΟΔΟΥ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ**

*Ευστράτιος Κ. Κοσμίδης<sup>1</sup>, Αναστασία Σ. Τσιγκοτζίδου<sup>1</sup>, Χρήστος Μπάτζιος<sup>2</sup>, Λάζαρος Ηλιάδης<sup>3</sup> και  
Γεώργιος Χ. Παπαδόπουλος<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Εργ. Ανατομικής και Ιστολογίας, <sup>2</sup>Εργ. Οικονομίας Ζωικής Παραγωγής,  
Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54 124, Θεσσαλονίκη,  
<sup>3</sup>Εργ. Δασολογίας και Διαχείρισης του Περιβάλλοντος και των Φυσικών Πόρων, Δημοκρίτειο  
Πανεπιστήμιο Θράκης, 68 200 Ορεστιάδα*

Το αντανακλαστικό της καθόδου του γάλακτος αποτελείται από δύο σκέλη, ένα νευρικό και ένα ορμονικό. Με το πρώτο σκέλος, η πληροφορία μεταφέρεται από τις θηλές του προβάτου στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθάλαμου. Με το δεύτερο σκέλος, η εκκρινόμενη από τα κύτταρα του παρακοιλιακού πυρήνα ωκυτοκίνη μεταφέρεται μέσω του αίματος στο μαστό, και προκαλεί σύσπαση των μυοπεπιθηλιακών του κυττάρων και, επομένως, κάθοδο του γάλακτος στον γαλακτοφόρο κόλπο προς διάθεση στο θηλάζον νεογέννητο ή στην αμελκτική μηχανή. Προηγούμενες μελέτες ιχνηθέτησης της παραπάνω νευρικής οδού<sup>1,2,3</sup> αποκάλυψαν πως η μεταφορά της πληροφορίας από τις θηλές στον υποθάλαμο γίνεται με δύο τουλάχιστον οδούς: μία που περιλαμβάνει έναν ενδιάμεσο σταθμό, στον έσω σφηνοειδή πυρήνα του προμήκη μυελού, και μία που εμφανίζει δύο ενδιάμεσους σταθμούς, στο έσω τμήμα των πετάλων I-III του ραχιαίου κέρατος του 3<sup>ου</sup> και 4<sup>ου</sup> οσφυϊκού νευροτομίου και στον έξω αυχενικό πυρήνα. Φυσιολογικές μελέτες του αντανακλαστικού, τέλος, αποδεικνύουν πως ενώ ο θηλασμός και η άμελξη προκαλούν συνεχή ερεθισμό των θηλών, η έκκριση της ωκυτοκίνης στο αίμα της προβατίνας πραγματοποιείται μόνο μία ή δύο φορές.

Σε μία προσπάθεια να αναπτυχθεί ένα τεχνητό νευρωνικό δίκτυο αντίστοιχο της παραπάνω νευρικής οδού, προσομοιώσαμε έναν από τους ενδιάμεσους σταθμούς του ανιόντος σκέλους του αντανακλαστικού (στον έσω σφηνοειδή πυρήνα, στα ραχιαία κέρατα των οσφυϊκών νευροτομιών ή στον έξω αυχενικό πυρήνα) ως ένα χαμηλής συνδεσιμότητας δίκτυο που αποτελείται από διεγερτικούς και ανασταλτικούς πληθυσμούς τεχνητών νευρώνων που λειτουργούν με το μοντέλο του διαρρέοντος ολοκληρωτή. Το δίκτυο χαρακτηρίζεται από τη συνδεσιμότητά του, τον μέσο αριθμό συνδέσεων του κάθε νευρώνα και από μία παράμετρο  $\gamma$  που καθορίζει την αναλογία των διεγερτικών προς τους ανασταλτικούς νευρώνες. Οι διεγερτικές συνδέσεις έχουν συναπτικά «βάρη» που ενδυναμώνονται με τον νευρικό ερεθισμό ενώ φθίνουν σταδιακά σε αντίθετη περίπτωση. Το δίκτυο, επίσης, αντιδρά σε περιοδική διέγερση με μία ή δύο ριπές υψηλής συχνότητας και μετά εισέρχεται σε μία χαοτική περιοχή που ο συγχρονισμός εξαφανίζεται. Το προτεινόμενο πρότυπο ενδιάμεσων σταθμών της οδού είναι δυνατόν να προσφέρει το κατάλληλο ερέθισμα στα κύτταρα του παρακοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου για την έκκριση της ωκυτοκίνης.

*1.Tsingotjidou, A.S., and G. C. Papadopoulos, 1996; Brain Res. 741, 309-313.*

*2.Tsingotjidou, A.S., and G. C. Papadopoulos, 2003; J Comp Neurol., 460(1), 66-79.*

*3.Tsingotjidou, A.S., and G. C. Papadopoulos, 2007; Anat. Histol. Embryol., in press*



### MEMBRANE POTENTIAL NOISE IS NOT THAT NOISY

*Kosmidis E.K.<sup>1</sup>, Contoyiannis Y.F.<sup>2</sup>, Papatheodoropoulos C.<sup>3</sup>, Diakonou F.K.<sup>2</sup>, Theophilidis G.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University, Thessaloniki, Greece.*

<sup>2</sup>*Department of Physics, University of Athens, Greece.* <sup>3</sup>*Department of Physiology, School of Medicine, University of Patras, Greece.*

It is generally assumed that neurons encode information in their spike trains. In this line of thinking, small amplitude, irregular fluctuations of the membrane potential are traditionally regarded as noise and usually removed by low-pass filtering. We have analyzed intracellular recordings data from hippocampal neurons and our analysis reveals that small fluctuations of the membrane potential display intermittent dynamics and thus should not be characterized as noise. Our analysis technique estimates two parameters namely the exponents describing the distribution of the laminar lengths in the recordings [1]. The first exponent,  $p_2$ , characterizes power law behavior and the second,  $p_3$ , is a measure of short range correlated activity expressed through an exponential decay. For values of  $p_2 \geq 1$  and  $p_3 \approx 0$  the system is in a state resembling a continuous phase transition, a situation known in physics as critical point. Our results suggest that hippocampal neurons operate near criticality, in the state of optimal information processing for complex systems. Power-law behavior usually disappears at hyperpolarized membrane potential levels, rendering the external stimulus amplitude the control parameter of the system. To ensure that the calculation of critical exponents in our analysis is not an artifact of some non biological high-frequency band, we have segregated signals displaying critical behavior into low- and high-pass components using cutoff frequencies between 40-100 Hz. We repeated our analysis on these components independently and none displayed critical dynamics. To check whether correlations in the high-pass signal were significant we shuffled the data and added them back to the low-pass component. In this case, both exponents were restored close to the values calculated for the raw signal. Additionally, we used a pseudorandom generator to create a Gaussian distributed time series using the  $\sigma$  calculated by the fit of the high-pass signal. Adding the artificially produced time series to the low-pass component gave similar results with the shuffled data. On the other hand, the signal recovered by shuffling the low-pass and adding it to the original high-pass component did not show any dynamics. It is evident from these manipulations that the high-frequency component does not carry information regarding the system dynamics. It is however essential to override the low-pass counterpart to reveal critical behavior. We also discuss the phenomenon of homeostasis in our system, where abrupt changes in the current step command are not followed by analogous changes in the dynamics as indicated by the calculation of the critical exponents. Power-law descriptions of the laminar length distribution are associated with time-scale invariance, an essential property for neurons to correctly respond to physiological stimuli of various durations and amplitudes. Also, the enormous range of available time scales allows characteristics of plasticity and adaptation to be evaluated. This work introduces biological systems in the large family of critical phenomena and provides physiological interpretation to the associated physical quantities.

[1] *Contoyiannis Y.F, Diakonou F.K. and Malakis A. Phys. Rev. Lett., 93: 098101, 2004.*

## ΟΙ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΕΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΕΙΣ ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΘΟΡΥΒΟΣ

Κοσμίδης Ε.Κ.<sup>1</sup>, Κοντογιάννης Γ.Φ.<sup>2</sup>, Παπαθεοδωρόπουλος Κ.<sup>3</sup>, Διάκωνος Φ.Κ.<sup>2</sup>, Θεοφιλίδης Γ.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, <sup>2</sup>Τμήμα Φυσικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, <sup>3</sup>Τομέας Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Είναι κοινώς αποδεκτό ότι οι νευρώνες κωδικοποιούν πληροφορία στις ριπές δυναμικών δράσης τους. Κατά συνέπεια, μικρές και ακανόνιστες διακυμάνσεις του μεμβρανικού δυναμικού θεωρούνται ως θόρυβος και συνήθως απομακρύνονται με τη χρήση φίλτρων υψηλών συχνοτήτων. Αναλύσαμε ενδοκυτταρικές καταγραφές από νευρώνες του ιπποκάμπου και αποκαλύπτουμε ότι οι μικρές διακυμάνσεις του μεμβρανικού δυναμικού δεν είναι θόρυβος αλλά χαρακτηρίζονται από δυναμική διαλειπτότητα. Η τεχνική ανάλυσης υπολογίζει τις τιμές δύο παραμέτρων, πιο συγκεκριμένα δύο εκθετών που χαρακτηρίζουν την κατανομή των διαστημάτων εφησυχασμού στις καταγραφές [1]. Ο πρώτος εκθέτης,  $p_2$ , χαρακτηρίζει τις συσχετίσεις μεγάλης εμβέλειας που περιγράφονται με νόμο δύναμης ενώ ο δεύτερος,  $p_3$ , είναι μέτρο των συσχετίσεων μικρής εμβέλειας που περιγράφονται με εκθετική κατανομή των διαστημάτων εφησυχασμού. Για τιμές του  $p_2 \geq 1$  και  $p_3 \approx 0$  το σύστημα βρίσκεται σε κατάσταση που αντιστοιχεί σε συνεχή αλλαγή φάσης, γνωστή ως κρίσιμο σημείο. Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι οι νευρώνες του ιπποκάμπου λειτουργούν σε κρισιμότητα που αποτελεί κατάσταση βέλτιστης επεξεργασίας της πληροφορίας για πολύπλοκα συστήματα. Ο νόμος δύναμης εξαφανίζεται σε υπερπωλωμένα δυναμικά, θέτοντας την εξωτερική διέγερση παράμετρο ελέγχου του συστήματος. Για να εξασφαλίσουμε ότι ο υπολογισμός των εκθετών δεν οφείλεται σε κάποιο υψίσυχο φαινόμενο μη βιολογικής προέλευσης, διαχωρίσαμε σήματα σε κρισιμότητα σε συστατικά χαμηλών και υψηλών συχνοτήτων με συχνότητες διαχωρισμού 40-100 Hz. Αναλύοντας τις επιμέρους χρονοσειρές που προέκυψαν διαπιστώσαμε ότι δεν παρουσιάζουν κρίσιμη συμπεριφορά. Για να ελέγξουμε αν συσχετίσεις στο συστατικό υψηλών συχνοτήτων είναι σημαντικές, ανακατέψαμε αυτό το συστατικό και το προσθέσαμε σ' αυτό των χαμηλών συχνοτήτων. Σ' αυτή την περίπτωση οι εκθέτες επανέκτησαν τις τιμές που είχαν στο αρχικό σήμα. Επιπρόσθετα χρησιμοποιήσαμε μια γεννήτρια ψευδοτυχαίων αριθμών για να δημιουργήσουμε μια χρονοσειρά με κατανομή Gaussian χρησιμοποιώντας τη διασπορά  $\sigma$  που υπολογίσαμε από το υψίσυχο συστατικό. Η προσθήκη της τεχνητής χρονοσειράς επίσης ανέδειξε την κρίσιμη συμπεριφορά. Αντιθέτως, το σήμα που ανακτήσαμε ανακατεύοντας το συστατικό χαμηλών συχνοτήτων και προσθέτοντάς το στο αρχικό υψίσυχο συστατικό δεν είχε δυναμική. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι το υψίσυχο συστατικό δεν περιέχει πληροφορία απαιτείται όμως η παρουσία του προκειμένου να αναδυθεί η κρισιμότητα. Περιγράφουμε επίσης το φαινόμενο της ομοιόστασης στο σύστημά μας όπου απότομες αλλαγές στην ένταση του διεγερτικού ρεύματος δεν ακολουθούνται από ανάλογες αλλαγές στις τιμές των εκθετών. Οι νόμοι δύναμης στην κατανομή των διαστημάτων εφησυχασμού σχετίζονται με την απουσία χρονικής κλίμακας, μια προϋπόθεση ώστε οι νευρώνες να απαντούν σωστά στα ερεθίσματα που δέχονται. Η εργασία αυτή εισάγει τα βιολογικά συστήματα σε μια μεγάλη οικογένεια φυσικών συστημάτων που περιγράφονται με όρους κρίσιμων φαινομένων και επιχειρεί να αποδώσει ερμηνεία φυσιολογίας σε φυσικές ποσότητες.

[1] Contoyiannis Y.F, Diakonos F.K. and Malakis A. *Phys. Rev. Lett.*, 93: 098101, 2004.

## BONE MARROW STROMAL CELLS AS A CELL-REPLACEMENT THERAPY IN EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS

*Konstantia Kotta<sup>1</sup>, Roza Lagoudaki<sup>1</sup>, Eleni Polyzoidou<sup>1</sup>, Olga Touloumi<sup>1</sup>, Aggeliki Gianakopoulou<sup>1</sup>,  
Athanasios Loubopoulos<sup>1</sup>, Constantina Simeonidou<sup>2</sup>, Evangelia Spandou<sup>2</sup>, Dimitrios Karussis<sup>3</sup>,  
Nikolaos Taskos<sup>1</sup>, Ioannis Milonas<sup>1</sup>, Nikolaos Grigoriadis<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*B' Department of Neurology, AHEPA University Hospital, <sup>2</sup>Department of Physiology, Faculty of  
Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, <sup>3</sup>Department of Neurology, Hadassah University  
Hospital, Jerusalem*

Bone marrow stromal cells (BMSCs) are non-haematopoietic multipotent stem cells, and also known as mesenchymal stem cells. They have common characteristics with other multipotent stem cells, as they have the ability to renew and differentiate. BMSCs can differentiate into bone-related cells like bone, cartilage and adipose tissue cells. Recent studies have shown their capacity to differentiate to other types of cells such as muscle cells, and even neurones and astrocytes *in vitro* and *in vivo*. Cell therapy with BMSCs may have an impact in the autoimmune demyelinating process, such as the one in multiple sclerosis (MS) and its experimental model experimental allergic encephalomyelitis (EAE). Among several issues that remain to be answered is whether BMSCs are able to survive in an inflammatory environment, such as the one present in the CNS during MS and EAE. In the present study, GFP transgenic mice-derived BMSCs were intra-ventricularly transplanted in EAE affected mice in order to assess their ability to improve the disease clinical course. As our results indicated, the transplanted animals were clinically improved compared to the control group. Under a confocal microscope BMSCs were detected in the periventricular areas and in the inflamed brain parenchyma. Immunohistochemistry showed that the cells had mainly differentiated into NG2 positive glial progenitor cells and GFAP positive mature astrocytes. The apoptotic marker Caspase-3 was also detected in the transplanted cells. Hence, it was attempted to define the effect of the inflamed environment on BMSCs *in vitro* and determine the apoptotic pathway that these cells follow. The survival of mouse-derived BMSCs in the presence of pro-(IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ ) and anti-inflammatory cytokine (TGF $\beta$ ) was measured, using the proliferation assay MTT, in concentrations ranging from 30 to 2000 units/ml. Immunocytochemistry and western blotting for the apoptotic proteins Bax, Bcl-2, Fas and Caspase 3 were performed. Real-time PCR was used to confirm the gene expression of the apoptotic proteins Bax, Bcl-2, Fas and LICE. The proinflammatory cytokines caused a significant reduction in cell proliferation and increased expression of the apoptotic proteins. TGF $\beta$  had the opposite effect increasing the proliferation of BMSCs and the expression of apoptotic proteins in levels similar to the control cells. Our results are very encouraging in regard to the survival of BMSCs in an inflamed environment, such as the one in MS affected CNS. Our data, both *in vivo* and *in vitro*, has shown that these cells have the potential as a cell-replacement therapy for an inflammatory condition.

## ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΩΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΗΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΛΛΕΡΓΙΚΗ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ

Κωνσταντία Κώττα<sup>1</sup>, Ρόζα Λαγουδάκη<sup>1</sup>, Έλενα Πολυζωίδου<sup>1</sup>, Όλγα Τουλούμη<sup>1</sup>, Αγγελική Γιαννακοπούλου<sup>1</sup>, Αθανάσιος Λουρμπόπουλος<sup>1</sup>, Κωνσταντίνα Συμεωνίδου<sup>2</sup>, Ευαγγελία Σπάνδου<sup>2</sup>, Δημήτριος Καρούσης<sup>3</sup>, Νικόλαος Τάσκος<sup>1</sup>, Ιωάννης Μυλωνάς<sup>1</sup>, Νικόλαος Γρηγοριάδης<sup>1</sup>

<sup>1</sup>B' Νευρολογική Κλινική, ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ, <sup>2</sup>Τμήμα Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, ΑΠΘ, <sup>3</sup>Department of Neurology, Hadassah University Hospital, Jerusalem

Τα στρωματικά κύτταρα μυελού των οστών (ΣΚΜΟ) είναι μη-αιμοτοποιητικά πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα και είναι επίσης γνωστά και ως μεσενχυματικά στελεχιαία κύτταρα. Έχουν κοινά χαρακτηριστικά με άλλα πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα, καθώς έχουν την ικανότητα να ανανεώνονται και να διαφοροποιούνται. Τα ΣΚΜΟ μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα ιστών των οστών, όπως ο οστίτης ιστός, ο χόνδρος και λιπώδης ιστός. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι έχουν την δυνατότητα να διαφοροποιηθούν και σε άλλου τύπου κύτταρα, όπως μυϊκά, ακόμα και σε νευρώνες και αστροκύτταρα *in vitro* και *in vivo*. Η κυτταρική θεραπεία με ΣΚΜΟ μπορεί να έχει σημαντική επιρροή στην αυτοάνοση απομυελίνωση, σαν αυτή που συναντάται στην Πολλαπλή Σκλήρυνση (ΠΣ) και το πειραματικό μοντέλο αυτής, την Πειραματική Αλλεργική Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ). Από τα αναπάντητα ερωτήματα στα οποία πρέπει να δοθούν απαντήσεις είναι και το αν τα ΣΚΜΟ μπορούν να επιβιώσουν σε φλεγμονώδες περιβάλλον, παρόμοιο με αυτό του ΚΝΣ στην ΠΣ και την ΠΑΕ. Στην παρούσα εργασία, ΣΚΜΟ από GFP διαγονιδιακούς μύες μεταμοσχεύτηκαν σε ζώα προσβεβλημένα από ΠΑΕ, προκειμένου να εξετασθεί η ικανότητά τους να βελτιώσουν την κλινική πορεία της νόσου. Όπως έδειξαν τα αποτελέσματά μας, τα μεταμοσχευμένα ζώα είχαν καλύτερη κλινική πορεία από τους μάρτυρες. Κάτω από συνεστιακό μικροσκόπιο, ΣΚΜΟ εντοπίστηκαν στην περικοιλιακή ζώνη και το φλεγμένον εγκεφαλικό παρέγχυμα. Η ανοσοιστοχημεία έδειξε ότι η πλειοψηφία των ΣΚΜΟ είχαν διαφοροποιηθεί προς NG2 θετικά πρόδρομα κύτταρα γλοίας και GFAP θετικά αστροκύτταρα. Εντοπίστηκε επίσης ο αποπτωτικός μάρτυρας Κασπάση 3 (Caspase-3) στα μεταμοσχευμένα κύτταρα. Για το λόγο αυτό έγινε προσπάθεια να διευκρινιστεί η επιρροή που έχει το φλεγμονώδες περιβάλλον στα ΣΚΜΟ *in vitro* και να καθοριστεί το αποπτωτικό μονοπάτι που ακολουθείται. Η επιβίωση των ΣΚΜΟ παρουσία προ- (IFN $\gamma$  και TNF $\alpha$ ) και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών (TGF $\beta$ ) μετρήθηκε με την μέθοδο MTT, σε συγκεντρώσεις από 30 έως 2000 units/ml. Ακολούθησε ανοσοκυτταροχημεία και western blotting για τις αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax, Bcl-2, Fas και Caspase 3. Real-time PCR χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της έκφρασης των Bax, Bcl-2, Fas και LICE. Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες είχαν ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και την αυξημένη έκφραση των αποπτωτικών πρωτεϊνών. Το αντίθετο αποτέλεσμα είχε ο TGF $\beta$  αυξάνοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και με έκφραση των αποπτωτικών πρωτεϊνών σε παρόμοια επίπεδα με τα κύτταρα μάρτυρες. Τα αποτελέσματά μας, *in vitro* και *in vivo*, είναι ενθαρρυντικά για την επιβίωση των ΣΚΜΟ σε φλεγμονώδες περιβάλλον, όπως αυτό στο ΚΝΣ με ΠΣ, και θα μπορούσαν τα κύτταρα να χρησιμοποιηθούν ως κυτταρική θεραπεία.

## INVESTIGATIONS INTO THE LINGUISTIC BREAKDOWN IN GREEK APHASIC PATIENTS: THE EFFECT OF DIFFERENT VERB CLASSES ON GRAMMATICAL FEATURES

*V. Koukoulioti<sup>1</sup>, S. Stavrakaki<sup>2</sup>, M. Kambanaros<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Department of Linguistics, School of Philology, Faculty of Philosophy, Aristotle University of Thessaloniki*

<sup>2</sup>*School of Italian Language and Literature, Faculty of Philosophy, Aristotle University of Thessaloniki*

<sup>3</sup>*Department of Speech and Language Therapy, School of Health and Welfare Professions, Technological Educational Institute of Patras*

Previous studies on aphasic language have shown that grammatical features are selectively impaired. Specifically in Greek, Tense and/or Aspect were found to be more impaired than Agreement (1, 2 among others). Additionally verb class has been found to affect verb production at the word and sentence level. Literature data have shown a hierarchy, with intransitive verbs being easier than transitive verbs. Moreover, within the class of intransitive verbs unaccusative ones were found to be more impaired than unergative ones. Unaccusative verbs take one subject argument which bears the thematic role of Theme, whereas unergative verbs have one subject argument which bears the more subject-typical role of Agent. So far little attention has been paid to the interaction of morphosyntactic feature marking with other levels of representation. E.g. in Dutch verb finiteness was found to interact with verb movement to V2 (3) and in Greek morphosyntactic feature marking was affected by structure complexity (1).

Aim of the present study was to test the influence of argument structure complexity on morphological marking. Accordingly, we tested tense and aspect marking on unergative, unaccusative and transitive verbs (6 items for each verb class). A forced choice completion task was administered to three aphasic patients [one non-fluent (N.F.), two fluent (F1, F2), mean age: 56.6 years].

With respect to the grammatical features, the results indicated that Aspect was more impaired than Tense for all patients. With respect to verb classes, no homogeneous pattern emerged. Although N.F. seemed to have a persistent problem with unaccusative verbs in both Tense and Aspect, her pattern of performance varied across the two conditions (unergative<unaccusative<transitive in Tense vs. unergative=transitive>unaccusative in Aspect). The two fluent patients performed much better in all conditions and again no consistent pattern regarding verb classes could be established. In sum, these data provide evidence for an aphasia-type effect (fluent vs. non-fluent) on both feature marking and processing of verb classes and some evidence for argument structure effect on morphosyntactic marking, although no clear or consistent pattern could be established.

1. *Stavrakaki S. & Kouvava S. (2003) Functional Categories in agrammatism: Evidence from Greek, Brain and Language, 86, 129-141*
2. *Varlokosta S., Valeonti N., Kakavoulia M., Lazaridou M., Economou A., Protopapas A. (2006) The breakdown of functional categories in Greek aphasia: Evidence from agreement, tense and aspect, Aphasiology, 20 (8), 723-743*
3. *Bastiaanse R. & van Zonneveld R. (1998) On the Relation between Verb Inflection and Verb Position in Dutch Agrammatic Aphasics, Brain and Language, 64, 165-181*

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΓΛΩΣΣΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΟΦΩΝΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΦΑΣΙΑ: Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΡΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΤΗΓΟΡΙΩΝ ΣΤΑ ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ**

*B. Κουκουλιώτη<sup>1</sup>, Σ. Σταυρακάκη<sup>2</sup>, Μ. Καμπανάρου<sup>3</sup>*

*<sup>1</sup>Τομέας Γλωσσολογίας, Τμήμα Φιλολογίας, Φιλοσοφική Σχολή, ΑΠΘ, <sup>2</sup>Τμήμα Ιταλικής Γλώσσας και Φιλολογίας, Φιλοσοφική Σχολή, ΑΠΘ, <sup>3</sup>Τμήμα Λογοθεραπείας, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας, Ανώτατο Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Πάτρας*

Έρευνες για την γλώσσα των ομιλητών με αφασία έδειξαν ότι η «απώλεια» των γραμματικών χαρακτηριστικών είναι επιλεκτική. Συγκεκριμένα στην Ελληνική, βρέθηκε ότι ο Χρόνος και/ή η Όψη είναι πιο διαταραγμένα από την Συμφωνία ρήματος-υποκειμένου (1, 2 μεταξύ άλλων). Επιπλέον, η κατηγορία στην οποία ανήκει το ρήμα έχει βρεθεί ότι επηρεάζει την παραγωγή ρημάτων σε επίπεδο λέξης και πρότασης. Η βιβλιογραφία δείχνει ότι υπάρχει μια ιεραρχία, στην οποία τα αμετάβατα ρήματα είναι πιο εύκολα από ότι τα μεταβατικά. Επίσης, μεταξύ των αμετάβατων ρημάτων, τα αναιτιατικά έχει βρεθεί ότι είναι πιο δύσκολα από τα ανεργαστικά. Τα αναιτιατικά ρήματα συντάσσονται με ένα όρισμα-υποκείμενο το οποίο φέρει το ρόλο του Θέματος, ενώ τα ανεργαστικά συντάσσονται με ένα όρισμα-υποκείμενο το οποίο όμως φέρει το ρόλο του Δράστη, ρόλο πιο τυπικό για υποκείμενα. Ως τώρα έχει μελετηθεί ελάχιστα η αλληλεπίδραση των μορφοσυντακτικών χαρακτηριστικών με άλλα επίπεδα αναπαράστασης. Π.χ. έχει βρεθεί ότι στην Ολλανδική η παρεμφατικότητα του ρήματος αλληλεπιδρά με την μετακίνησή του στη δεύτερη θέση (3) και ότι στην Ελληνική η παραγωγή των μορφοσυντακτικών χαρακτηριστικών επηρεάζεται από την πολυπλοκότητα της συντακτικής δομής (1).

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν να εξετάσουμε την επίδραση της πολυπλοκότητας της ορισματικής δομής στα μορφοσυντακτικά χαρακτηριστικά του ρήματος. Έτσι, εξετάσαμε το μαρκάρισμα του Χρόνου και της Όψης σε ανεργαστικά, αναιτιατικά και μεταβατικά ρήματα (6 από κάθε κατηγορία). Χορηγήθηκε ένα τεστ συμπλήρωσης προτάσεων με επιλογή από δεδομένους ρηματικούς τύπους. Συμμετείχαν 3 ασθενείς με αφασία [μία με μη ρέοντα λόγο (M.P.) και δύο με ρέοντα λόγο (P1, P2), μέσος όρος ηλικίας: 56,6 χρόνια].

Όσον αφορά στα γραμματικά χαρακτηριστικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η Όψη ήταν πιο διαταραγμένη από τον Χρόνο σε όλους τους ασθενείς. Σχετικά με τις ρηματικές κατηγορίες, δεν αναδείχτηκε κάποιο ομοιογενές σχήμα διαταραχής. Μολονότι η M.P. φάνηκε να αντιμετωπίζει πρόβλημα με τα αναιτιατικά ρήματα στο μαρκάρισμα του Χρόνου και της Όψης, το σχήμα επίδοσης της ήταν διαφορετικό στις δύο συνθήκες (ανεργαστικά<αναιτιατικά<μεταβατικά στο Χρόνο έναντι ανεργαστικά=μεταβατικά>αναιτιατικά στην Όψη). Οι P1 και P2 είχαν πολύ καλύτερη επίδοση σε όλες τις συνθήκες ενώ πάλι δεν προέκυψε κάποιο ομοιογενές σχήμα διαταραχής στις επιμέρους συντακτικές κατηγορίες. Συνοψίζοντας, τα δεδομένα παρέχουν ενδείξεις για επίδραση του τύπου της αφασίας (αφασία με ρέοντα λόγο έναντι αφασίας με μη ρέοντα λόγο) τόσο στο μαρκάρισμα του ρήματος όσο και στην επεξεργασία ρηματικών κατηγοριών και κάποιες ενδείξεις για επίδραση της πολυπλοκότητας της ορισματικής δομής στο μαρκάρισμα του ρήματος με μορφοσυντακτικά χαρακτηριστικά, μολονότι δεν προέκυψε κάποιο σαφές και ομοιογενές σχήμα διαταραχής.

1. *Stavrakaki S. & Kouvava S. (2003) Functional Categories in agrammatism: Evidence from Greek, Brain and Language, 86, 129-141*
2. *Varlokosta S., Valeonti N., Kakavoulia M., Lazaridou M., Economou A., Protopapas A. (2006) The breakdown of functional categories in Greek aphasia: Evidence from agreement, tense and aspect, Aphasiology, 20 (8), 723-743*
3. *Bastiaanse R. & van Zonneveld R. (1998) On the Relation between Verb Inflection and Verb Position in Dutch Agrammatic Aphasics, Brain and Language, 64, 165-181*

## **IN VIVO FENTANYL TREATMENT REDUCES GABA IMMUNOREACTIVITY IN THE CA1 AREA OF THE RAT HIPPOCAMPUS.**

*E. Kouvaras<sup>1</sup>, T. Kilindris<sup>2</sup>, A. Vasilaki<sup>1</sup>, E.K. Asprodini<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Laboratory of Pharmacology, School of Medicine, University of Thessaly, Greece.*

<sup>2</sup>*Laboratory of Medical Physics, School of Medicine, University of Thessaly, Greece.*

*In vitro* activation of opioid receptors in the hippocampus, located solely on interneurons, hyperpolarizes inhibitory interneurons and inhibits the release of GABA from interneuronal terminals. The aim of the present study was to examine the effect of *in vivo* administration of fentanyl on GABA immunoreactivity in the CA1 area of the hippocampus.

*Male Wistar rats* were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde, 24 hours after saline (n=4) or fentanyl (n=5) treatment. After fixation, brains were incubated in 30% sucrose for cryoprotection. Tissues were subsequently frozen in isopentane (-45°C, 1 min) and kept at -80°C. Slices, 10µm thick, were cut coronally with a cryostat at the level of hippocampus and stored at -20°C. The presence of GABAergic neurons in the tissue was assessed immunohistochemically using a polyclonal rabbit antibody against GABA.

Light microscopy images were obtained and quantitative analysis of 8-bit images, represented using unsigned integers in the range from 0 to 255, was performed utilizing the histogram feature of the public domain image analysis program ImageJ 1.37v. Fluorescence intensity measurement of the entire image was performed after mathematical subtraction of a threshold value set as background; the threshold value was set as the average of maximal fluorescence intensity measured in three separate areas (5 x 5µm) selected randomly on the basis of lack of detectable processes. Measurement of fluorescence intensity of processes was performed by random selection of a 25x30 µm area within strata oriens, pyramidale and radiatum, and of neuronal somata by selection of the cell body while excluding the nucleus. Fluorescence intensity measurements of both processes and neuronal somata were also accompanied by mathematical subtraction of the background.

GABA immunohistochemistry revealed that *in vivo* fentanyl treatment leads to lower GABA content in processes and somata, suggesting reduced GABA release onto pyramidal neurons. We conclude that a single *in vivo* exposure to fentanyl is sufficient to induce long-lasting reduction in GABA-mediated transmission. These findings are in line with the enhancement of excitatory transmission after *in vitro* fentanyl treatment and may provide evidence regarding the mechanisms involved in the early stages of tolerance development towards the analgesic effects of opioids.

*Acknowledgements: This work was supported by the Ministry of Education (Pythagoras II).*

## Η *IN VIVO* ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΦΕΝΤΑΝΥΛΗΣ ΕΛΑΤΤΩΝΕΙ ΤΗΝ ΑΝΟΣΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ $\gamma$ -ΑΜΙΝΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΗΝ CA1 ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ.

*E. Κουβαράς<sup>1</sup>, Θ. Κυλινδρής<sup>2</sup>, Α Βασιλάκη<sup>1</sup>, Ε.Κ. Ασπροδίνη<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα*

<sup>2</sup>*Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα*

Έχει βρεθεί ότι η *in vitro* ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων του ιπποκάμπου, που εντοπίζονται αποκλειστικά σε ενδονευρώνες, προκαλεί υπερπόλωση των ενδονευρώνων, καθώς και αναστολή της απελευθέρωσης  $\gamma$ -αμινοβουτυρικού οξέος από τις νευρικές τους απολήξεις. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της *in vivo* χορήγησης φεντανύλης στη ανοσοδραστικότητα του  $\gamma$ -αμινοβουτυρικού οξέος σε νευρώνες της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου.

Χρησιμοποιήθηκαν επίμυες Wistar στους οποίους χορηγήθηκε φαινοβαρβιτάλη (60 mg/kg, i.p.) και ακολούθησε ενδοκάρδια έγχυση παραφορμαλδεΰδης 4%, 24 ώρες μετά την τελευταία χορήγηση φυσιολογικού ορού (n=4) ή φεντανύλης (n=5). Μετά τη μονιμοποίηση τους οι εγκέφαλοι αφαιρέθηκαν, καταψύχθηκαν σε ισοπεντάνιο (-45°C, 1 min) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Με τη χρήση κρυοτόμου προέκυψαν τομές πάχους 10μm οι οποίες στη συνέχεια διατηρήθηκαν στους -20°C. Για την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση νευρώνων που εκφράζουν  $\gamma$ -αμινοβουτυρικού οξύ χρησιμοποιήθηκε ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι αυτού.

Ακολούθησε οπτικοποίηση των τομών καθώς και ποσοτική ανάλυση των εικόνων που προέκυψαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό ανάλυσης εικόνας ImageJ 1,37v. Για την ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν ασπρόμαυρες εικόνες 8-bit των οποίων το χρωματικό εύρος αναπαραστάθηκε σε κλίμακα μη προσημασμένων ακεραίων εύρους από 0 έως 250. Η μέτρηση της έντασης φθορισμού της κάθε εικόνας, συνολικά, πραγματοποιήθηκε μετά την μαθηματική αφαίρεση μίας ουδικής τιμής που ορίστηκε ώστε να αντιπροσωπεύει μηδενική ή και μη ειδική σήμανση. Η τιμή αυτή προέκυψε ως η μέση τιμή της μέγιστης έντασης φθορισμού τριών τυχαία επιλεγμένων περιοχών (5 x 5 μm) κάθε εικόνας, στις οποίες δεν ανιχνεύονταν καμία νευρική αποφυάδα. Για τη μέτρηση της έντασης φθορισμού αποφυάδων στην ακτινωτή, την πυραμιδική και τη στοιβάδα πολυμόρφων κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τυχαία επιλεγμένες περιοχές εμβαδού 25x30 μm, ενώ για τη μέτρηση στα σώματα των νευρώνων επιλέχθηκε ολόκληρο το κυτταρικό σώμα, αποκλείοντας ταυτόχρονα τον πυρήνα. Η μέτρηση της έντασης φθορισμού τόσο των αποφυάδων όσο και των κυτταρικών σωμάτων πραγματοποιήθηκε επίσης μετά από μαθηματική αφαίρεση της ουδικής τιμής.

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη για το  $\gamma$ -αμινοβουτυρικό οξύ κατέδειξε ελάττωση των επιπέδων τόσο στις αποφυάδες όσο και στα σώματα υποδηλώνοντας ελάττωση της απελευθέρωσης αυτού στους πυραμιδικούς νευρώνες. Συμπερασματικά, η οξεία *in vivo* χορήγηση φεντανύλης προκαλεί ελάττωση της νευρωνικής διαβίβασης  $\gamma$ -αμινοβουτυρικού οξέος που ανιχνεύεται 24 ώρες μετά. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την αύξηση της διεγερσιμότητας του ιπποκάμπου μετά από χορήγηση φεντανύλης και παρέχουν πληροφορίες όσον αφορά πιθανούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια ανάπτυξης ανοχής στα οπιοειδή.

*Η παρούσα μελέτη χρηματοδοτήθηκε από πρόγραμμα του Υπουργείου Παιδείας (Πυθαγόρας II).*



## EFFECT OF THE *IN VIVO* FENTANYL TREATMENT ON EXCITATORY AND INHIBITORY SYNAPTIC TRANSMISSION WITHIN THE CA1 AREA OF THE RAT HIPPOCAMPUS

E. Kouvaras<sup>1</sup>, E.K. Asproдини<sup>1</sup>, I. Asouchidou<sup>1</sup>, A. Vasilaki<sup>1</sup>, D. Michaloudis<sup>2</sup>, C. Papatheodoropoulos<sup>3</sup> and G. Kostopoulos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pharmacology, School of Medicine, University of Thessaly, Greece

<sup>2</sup>Clinic of Anesthesiology, School of Medicine, University of Thessaly, Greece

<sup>3</sup>Laboratory of Physiology, School of Medicine, University of Patras, Greece

*In vitro* activation of opioid receptors in the hippocampus, located solely on interneurons, hyperpolarizes inhibitory interneurons and inhibits the release of GABA from interneuronal terminals. Therefore, the net effect of *in vitro* opioid receptor activation is excitation of hippocampal pyramidal neurons. In the present study we examined the effect of *in vivo* administration of fentanyl on synaptic transmission of CA1 pyramidal neurons studied in an *in vitro* slice preparation.

Male Wistar rats were treated either with saline (s) or fentanyl (f) (4x80 µg/kg s.c. every 15min). Hippocampal slices, 500 µm thick, were prepared from s- and f-treated animals, 24 hours after fentanyl treatment. Intracellular recordings were obtained from CA1 pyramidal neurons. Synaptic responses were evoked by stimulation of Schaffer collaterals.

The peak amplitude of postsynaptic fast (f-) and slow (s-) inhibitory potentials (IPSPs) was smaller in neurons from fentanyl-treated animals. The peak amplitude and duration at half amplitude of isolated f-IPSPs, recorded in the presence of CNQX (10 µM), AP-5 (10 µM), and CGP 55845 (1 µM), were also significantly smaller in fentanyl-treated animals. Conversely, excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) evoked either in the absence or in the presence of CNQX (10 µM), bicuculline (10 µM), and CGP 55845 (1 µM) were similar in both groups of neurons. The stimulus intensities required to evoke threshold responses were lower in fentanyl-treated animals suggesting increased excitability of CA1 pyramidal neurons. No alteration of pyramidal neuron basic membrane properties or postsynaptic membrane excitability was observed.

In conclusion, acute *in vivo* fentanyl treatment, in doses relevant to the clinical use of fentanyl, reduces GABA-mediated inhibition that is persistent 24 hours after the exposure to the opioid. Moreover, the synaptic circuitry within the CA1 area exhibits increased excitability, whereas, the intrinsic membrane properties of pyramidal neurons remain unaltered.

*Acknowledgements: This work was supported by the Ministry of Education (Pythagoras II).*

## ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ *IN VIVO* ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΦΕΝΤΑΝΥΛΗΣ ΣΤΗΝ ΔΙΕΓΕΡΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΣΥΝΑΠΤΙΚΗ ΔΙΑΒΙΒΑΣΗ ΤΗΣ CA1 ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ

Ε. Κουβαράς<sup>1</sup>, Ε.Κ. Ασπροδίνη<sup>1</sup>, Ε. Ασουχίδου<sup>1</sup>, Α. Βασιλάκη<sup>1</sup>, Δ. Μιχαλούδης<sup>2</sup>, Κ. Παπαθεοδωρόπουλος<sup>3</sup> και Γ. Κωστόπουλος<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

<sup>2</sup>Αναισθησιολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

<sup>3</sup>Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα

Η *in vitro* ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων του ιπποκάμπου, που εντοπίζονται αποκλειστικά σε ενδονευρώνες, έχει βρεθεί ότι προκαλεί υπερπόλωση των ενδονευρώνων, καθώς και αναστολή της απελευθέρωσης γ-αμινοβουτυρικού οξέος από τις νευρικές απολήξεις. Ως εκ τούτου, η *in vitro* ενεργοποίηση οπιοειδών υποδοχέων έχει ως αποτέλεσμα την έμμεση διέγερση των πυραμιδικών κυττάρων του ιπποκάμπου. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της *in vivo* χορήγησης φεντανύλης στη συναπτική διαβίβαση των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου.

Χρησιμοποιήθηκαν επίμυες Wistar στους οποίους χορηγήθηκε είτε φυσιολογικός ορός είτε φεντανύλη (4x80 μg/kg, υποδόρια, κάθε 15 λεπτά). Ενδοκυττάρια καταγραφές πραγματοποιήθηκαν 24 ώρες αργότερα από εγκάρσιες τομές ιπποκάμπου πάχους 500 μm. Οι συναπτικές απαντήσεις προκλήθηκαν μετά από διέγερση των παράπλευρων ινών του Schaffer.

Το μέγιστο εύρος του γρήγορου και αργού ανασταλτικού μετασυναπτικού δυναμικού βρέθηκε μικρότερο σε νευρώνες επίμυων στους οποίους χορηγήθηκε φεντανύλη. Ομοίως μικρότερα βρέθηκαν τόσο το μέγιστο εύρος όσο και η διάρκεια στο ήμισυ της μέγιστης τιμής του γρήγορου ανασταλτικού μετασυναπτικού δυναμικού, το οποίο καταγράφηκε μετά από φαρμακολογική απομόνωση του με χορήγηση CNQX (10 μM), AP-5 (10 μM), και CGP 55845 (1 μM). Αντίθετα, τα διεγερτικά μετασυναπτικά δυναμικά που καταγράφηκαν παρουσία ή απουσία CNQX (10 μM), bicuculline (10 μM), και CGP 55845 (1 μM) ήταν παρόμοια και στις δύο ομάδες νευρώνων. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η απαιτούμενη ένταση ερεθίσματος για την πρόκληση ουδικών διεγερτικών μετασυναπτικών δυναμικών ήταν χαμηλότερη σε πειραματόζωα στα οποία είχε χορηγηθεί φεντανύλη γεγονός που συνιστά αυξημένη διεγερσιμότητα των νευρώνων της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου. Καμία μεταβολή δε παρατηρήθηκε στις βασικές μεμβρανικές ιδιότητες ή στη μετασυναπτική μεμβρανική διεγερσιμότητα.

Συμπερασματικά προκύπτει ότι η οξεία *in vivo* χορήγηση φεντανύλης σε δόσεις ανάλογες με αυτές που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη προκαλεί ελάττωση της αναστολής που οφείλεται σε γ-αμινοβουτυρικό οξύ και η οποία διατηρείται 24 ώρες μετά την χορήγηση του οπιοειδούς. Επιπλέον, ενώ οι βασικές μεμβρανικές ιδιότητες των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής παραμένουν αμετάβλητες το συναπτικό κύκλωμα της περιοχής παρουσιάζει αυξημένη διεγερσιμότητα.

Η παρούσα μελέτη χρηματοδοτήθηκε από πρόγραμμα του Υπουργείου Παιδείας (Πυθαγόρας II).

## A NOVEL FUNCTION OF A UCH-L1 POLYMORPHIC VARIANT AS A POTENT ANTIOXIDANT: IMPLICATIONS IN PARKINSON'S DISEASE

*Elli Kyratzi, Maria Pavlaki, Leonidas Stefanis*

*Division of Basic Neurosciences, Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Soranou Efessiou 4, 11527 Athens, Greece*

UCH-L1 is an abundant neuronal protein, a member of the Ubiquitin C-terminal Hydrolases (UCHs). It has been linked to Parkinson's disease (PD) since a missense mutation, I93M, was identified in a German family with a PD phenotype (1), but the pathogenicity of this mutant form remains controversial. In addition, a polymorphism within UCH-L1 gene, S18Y, has been found to be protective against the development of PD in many population studies (2). However, other studies, including a large meta-analysis, failed to show the above effect (3). Recent data support a relationship between UCH-L1 and ubiquitin (4) and the ubiquitin-proteasome system (UPS) and it has been proposed that UCH-L1 might be functionally linked to PD through this pathway. However, the role of UCH-L1 within the UPS has not been rigorously examined in mammalian systems. Its relationship to other pathophysiological processes potentially related to PD, such as mitochondrial impairment and oxidative stress, also remains unknown. It is still unclear whether the link of UCH-L1 to PD occurs through a loss or a gain of function.

To examine these issues, we overexpressed UCH-L1 or variants thereof in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Overexpressed UCH-L1 did not interact with the proteasome nor did it facilitate its function. However, we found that, consistent with a previous study (4), UCH-L1 functioned as a stabilizer of free ubiquitin. Surprisingly, S18Y UCH-L1 variant overexpression protected against MPP<sup>+</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity in SH-SY5Y cells. Specifically, it significantly reduced oxidative stress-induced death and DCF staining, a marker of reactive oxygen species (ROS) generation. Importantly, this was also reproducible in embryonic rat neuronal cortical cultures. S18Y UCH-L1 was not protective against other stimuli, such as proteasomal inhibition or DNA damage. These effects of the S18Y variant were not observed with the wild type (wt) form of UCH-L1. Furthermore, cortical cultures from gad mice, lacking UCH-L1, were not more vulnerable to oxidative stress stimuli. Therefore, the S18Y substitution confers a novel function to UCH-L1, not demonstrable for the wt protein. These data suggest a novel function of a potentially protective variant of UCH-L1 as a potent antioxidant and reveal new mechanisms through which UCH-L1 might be linked to PD pathogenesis.

1. Leroy E. et al. (1998) *The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. Nature* 395, 451-452
2. Maraganore DM et al. (2004) *UCH-L1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. Ann Neurol.* 55(4):512-21
3. Healy DG. et al. (2006) *UCHL-1 is not a Parkinson's disease susceptibility gene. Ann Neurol.* 59(4):627-33
4. Osaka H. et al. (2003) *Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. Hum Mol Genet* 12(16):1945-58

*This work was supported through grants by the Hellenic General Secretariat of Research and Technology (EK and LS) and the national Parkinson Foundation (MP and LS).*

## Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ S18Y ΠΡΟΣΔΙΔΕΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΥΔΡΟΛΑΣΗ UCH-L1: ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ

*Έλλη Κυρατζή, Μαρία Παυλάκη, Λεωνίδα Στεφανής*

*Τμήμα Βασικών Νευροεπιστημών, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, Σωρανού Εφεσίου 4, 11527 Αθήνα, Ελλάδα*

Η UCH-L1 είναι μία νευρωνική πρωτεΐνη που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα, μέλος της οικογένειας των υδρολασών ουμπικουΐτινης του καρβοξυ-τελικού άκρου (UCHs). Η πρωτεΐνη αυτή συσχετίστηκε με τη νόσο του Πάρκινσον όταν μία σημειακή μεταλλαγή, I93M, ταυτοποιήθηκε σε μία γερμανική οικογένεια με παρκινσονικό φαινότυπο (1), αλλά η παθογένεια αυτής της μεταλλαγμένης μορφής παραμένει αμφιλεγόμενη. Επιπρόσθετα, ένας πολυμορφισμός στο γονίδιο της UCH-L1, S18Y, έχει βρεθεί ότι προστατεύει έναντι της εκδήλωσης της νόσου του Πάρκινσον σε πολλές πληθυσμιακές μελέτες (2). Άλλες έρευνες, ωστόσο, συμπεριλαμβανομένης μιας μεγάλης μετα-ανάλυσης, δεν έχουν δείξει την παραπάνω δράση (3). Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν μία σχέση μεταξύ της UCH-L1 και της ουμπικουΐτινης (4) και του συστήματος ουμπικουΐτινης-πρωτεασώματος και έχει προταθεί ότι η UCH-L1 πιθανότατα συνδέεται λειτουργικά με τη νόσο μέσω αυτού του μονοπατιού. Παρ'όλ'αυτά, ο ρόλος της UCH-L1 στα πλαίσια του συστήματος ουμπικουΐτινης-πρωτεασώματος δεν έχει διερευνηθεί λεπτομερώς. Η συμμετοχή της σε άλλες διαδικασίες που ίσως σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της νόσου, όπως η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και το οξειδωτικό στρες, παραμένει επίσης άγνωστη. Δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί αν ο συσχετισμός της UCH-L1 με τη νόσο οφείλεται σε απώλεια ή απόκτηση νέας λειτουργίας.

Για να διερευνήσουμε τα παραπάνω ζητήματα, υπερεκφράσαμε τη UCH-L1 ή μορφές της με μεταλλαγές ή πολυμορφισμούς σε ανθρώπινα κύτταρα από νευροβλάστωμα SH-SY5Y. Η υπερεκφρασμένη UCH-L1 δε βρέθηκε να αλληλεπιδρά με το πρωτεάσωμα ή να ευοδώνει την ενζυμική του δραστηριότητα. Παρ'όλ'αυτά, βρήκαμε, σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες (4), ότι η UCH-L1 σταθεροποιεί τα επίπεδα της ελεύθερης ουμπικουΐτινης. Παραδόξως, η μορφή της UCH-L1 με τον πολυμορφισμό S18Y (S18Y UCH-L1) βρέθηκε να προστατεύει έναντι της τοξικότητας από το MPP<sup>+</sup> και το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> όταν υπερεκφράζεται σε SH-SY5Y κύτταρα. Συγκεκριμένα, μείωσε στατιστικώς σημαντικά το θάνατο που επάγεται από οξειδωτικό στρες και τη χρώση με DCF, δείκτη παραγωγής ενεργών παραπροϊόντων οξυγόνου (ROS). Αξιοσημείωτα, αυτό το εύρημα επαναλήφθηκε σε καλλιέργειες εμβρυονικών φλοιϊκών νευρώνων αρουραίου. Η S18Y UCH-L1 δεν προσέφερε προστασία έναντι άλλων ερεθισμάτων, όπως η αναστολή του πρωτεασώματος ή η βλάβη στο DNA. Αυτή η δράση της S18Y UCH-L1 δεν παρατηρήθηκε με τη UCH-L1 αγρίου τύπου. Επιπλέον, καλλιέργειες εμβρυονικών φλοιϊκών νευρώνων από ποντίκια *gad*, που δεν εκφράζουν UCH-L1, δεν ήταν πιο ευαίσθητες σε ερεθίσματα οξειδωτικού στρες. Συνεπώς, η αντικατάσταση στη θέση 18 προσδίδει μία νέα ιδιότητα στη UCH-L1 που απουσιάζει από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν μία νέα λειτουργία μιας προστατευτικής μορφής της UCH-L1 ως πιθανού αντιοξειδωτικού παράγοντα και αποκαλύπτουν νέους μηχανισμούς μέσω των οποίων η UCH-L1 μπορεί να συνδέεται με την παθογένεια της νόσου του Πάρκινσον.

5. Leroy E. et al. (1998) *The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. Nature* 395, 451-452
6. Maraganore DM et al. (2004) *UCH-L1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. Ann Neurol.* 55(4):512-21
7. Healy DG. et al. (2006) *UCHL-1 is not a Parkinson's disease susceptibility gene. Ann Neurol.* 59(4):627-33
8. Osaka H. et al. (2003) *Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. Hum Mol Genet* 12(16):1945-58

*Αυτή η μελέτη υποστηρίζεται από επιχορηγήσεις της Ελληνικής Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας και του εθνικού Ίδρύματος Νόσου Πάρκινσον.*

## THE TUMOR SUPPRESSOR RAS-GAP NEUROFIBROMIN LOCALIZES IN THE NUCLEUS AND INTERACTS WITH THE MAP KINASE ERK

*George Leondaritis, Sophia Karouzaki and Dimitra Mangoura*

*Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Basic Neurosciences Division,  
Soranou Efessiou 4, 11527 Athens*

Neurofibromatosis type 1 (NF-1), a common genetic disease, progressively affects the architecture and function of many tissues, including Central Nervous System. The function of its GAP-related domain as a RasGAP and therefore its impact on the Ras/Raf/MEK/ERK signal transduction pathway is well established. Given that Ras signalling is restricted in the cytoplasm, the question of how the resulting activated signalling complex, containing activated ERK, translocates to the nucleus to exert its effects on transcription remains to be elucidated. Neurofibromin has been reported to localize by immunocytochemistry studies to both cytoplasmic structures in continuum with the nucleus and in the nucleus, particularly in neural cells (1). In addition, neurofibromin splice variants containing a fully functional Nuclear Localization Signal in its C-terminal domain (CTD) are conserved in mammals, fish and chick but are not found in *Drosophila* or yeast. Interestingly, the  $\Delta E43$  splice variant of human neurofibromin that lacks NLS is expressed in tissues not implicated in NF1-pathology (2). Taken together these studies suggest that nuclear neurofibromin may serve a specific function in higher organisms, by participating in the trafficking of Ras-dependent signalosomes to the nucleus, or, by organizing as a scaffold protein nuclear kinases and transcription factors inside the nucleus.

In this report we have established that the neurofibromin C-terminal helical domain (CTD-C570, lacking the C-tail of neurofibromin) is localized in the nucleus of non-neuronal (COS-7 and HeLa) and neuronal (SH-SY5Y neuroblastoma and chick embryonic astrocytes) cells when expressed as a GFP-fusion protein. Overexpression of GFP-C570 does not ablate or modulate the ERK activation/nuclear localization induced by Epidermal Growth Factor (EGF) or phorbol ester (TPA). Moreover, co-transfection with HA-tagged PKC $\alpha$  or HA-tagged ERK2, does not result in substantial changes in GFP-C570 nuclear localization. In a second series of experiments, we sought to establish the nuclear localization of endogenous neurofibromin using immunofluorescence and specific nuclear fractionation protocols. Our results showed that neurofibromin was constitutively localized to the nucleus. Importantly, when nuclei were further fractionated, a significant amount of nuclear neurofibromin was recovered in TX-100/DNase I/high salt-resistant fraction, together with the nuclear protein lamin-A. This finding suggests a possible scaffolding or structural role of neurofibromin within the nuclear skeleton. Given that ERK, an important downstream effector of Ras via the Raf-MEK module, shuttles in and out of the nucleus upon activation we reasoned that the nuclear localization of neurofibromin may depend on ERK activation. Preliminary studies on putative neurofibromin-ERK interactions, using overexpression of HA-tagged ERK2 and co-immunoprecipitation assays, revealed that neurofibromin stably associates with ERK2. Activation of the Ras/Raf/MEK/ERK module by EGF or TPA results in increased association of neurofibromin and activated ERK2. These findings suggest the presence of a novel feedback mechanism that may be implicated in the overall regulation of the signaling strength of the neurofibromin/Ras/Raf/MEK/ERK pathway.

1. Li, C., Cheng, Y., Gutmann, D.H., and Mangoura, D. (2001) *Dev. Brain Res.* 130, 231-248

2. Vandenbroucke, I., VanOostveldt, P., Coene, E., De Paepe, A., and Messiaen, L. (2004) *FEBS Lett.* 560, 98-102

## Η ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΤΙΚΗ RAS-GAP ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΝΕΥΡΟΦΙΜΠΡΟΜΙΝΗ ΕΝΤΟΠΙΖΕΤΑΙ ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑ ΜΕ ΤΗΝ ΜΑΡ ΚΙΝΑΣΗ ERK

*Γιώργος Λεονταρίτης, Σοφία Καρουζάκη και Δήμητρα Μάγκουρα*

*Κέντρο Νευροεπιστημών, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών,  
Σωρανού Εφεσίου 4, 11527 Αθήνα*

Η νευρινωμάτωση τύπου I (NF-1) ή νόσος Von Recklinghausen, μια κληρονομική ασθένεια, προοδευτικά προσβάλλει πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Το γονίδιο NF-1 κωδικοποιεί την νευροφιμπρομίνη, μια πρωτεΐνη μεγέθους 2818 αμινοξέων με δραστηριότητα RasGAP. Υπεύθυνη για την δραστηριότητα αυτή είναι μια κεντρική περιοχή ομολογίας με πρωτεΐνες GAP (περιοχή GRD). Η λειτουργία της περιοχής GRD στη ρύθμιση του μονοπατιού μεταγωγής σήματος Ras/Raf/MEK/ERK είναι σχετικά καλά καθορισμένη. Ωστόσο, με δεδομένο ότι η σηματοδότηση μέσω της πρωτεΐνης Ras εντοπίζεται στο κυτόπλασμα, είναι σχετικά άγνωστο πως ακριβώς ρυθμίζεται η στόχευση των εξαρτώμενων από το Ras σηματοσωμάτων (signalosomes) της MAP κινάσης ERK στον πυρήνα. Πρόσφατες μελέτες χρησιμοποιώντας τεχνικές ανοσοϊστοχημείας έχουν δείξει τον εντοπισμό της νευροφιμπρομίνης στον πυρήνα νευρικών κυττάρων (1). Επιπλέον, η παρουσία μεταγράφων τα οποία περιέχουν μια λειτουργική αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS) στην C-τελική περιοχή της νευροφιμπρομίνης σε ανώτερους οργανισμούς, αλλά όχι στη *Drosophila* ή στο *S.cerevisiae*, υποδεικνύει έναν πιθανό πυρηνικό ρόλο της νευροφιμπρομίνης (2).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο πυρηνικός εντοπισμός της ενδογενούς νευροφιμπρομίνης καθώς και της απομονωμένης C-τελικής περιοχής της (περιοχή CTD-C570) σε νευρικά και μη-νευρικά κύτταρα. Η περιοχή C570 συζευγμένη με GFP εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων μετά από παροδική διαμόλυνση. Η υπερέκφραση της περιοχής αυτής δεν αναστέλλει την ενεργοποίηση ή τον πυρηνικό εντοπισμό της MAP κινάσης ERK μετά από επίδραση EGF ή του φορβολικού εστέρα TPA. Ο πυρηνικός εντοπισμός της ενδογενούς νευροφιμπρομίνης μελετήθηκε περαιτέρω με πειράματα ανοσοϊστοχημείας και υποκυτταρικής κλασμάτωσης. Βρέθηκε ότι ένα σημαντικό τμήμα της πυρηνικής νευροφιμπρομίνης είναι ανθεκτικό σε εκχύλιση με Triton X-100, επίδραση DNAσης I και εκχύλιση με υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και κλασμάτωναται μαζί με την πυρηνική πρωτεΐνη λαμίνη-A. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι η πυρηνική νευροφιμπρομίνη μπορεί να έχει ένα δομικό ρόλο ως πρωτεΐνη-ικρίωμα για την οργάνωση συμπλόκων που περιέχουν πυρηνικές κινάσες ή/και μεταγραφικούς παράγοντες στον υποπυρηνικό σκελετό. Με δεδομένο ότι η MAP κινάση ERK, ένας σημαντικός καθοδικός τελεστής του Ras, μέσω του συστήματος Raf/MEK, εντοπίζεται στον πυρήνα μετά από ενεργοποίηση, μελετήσαμε την υπόθεση ο πυρηνικός εντοπισμός της νευροφιμπρομίνης να καθορίζεται από την ERK. Προκαταρκτικά πειράματα, χρησιμοποιώντας παροδική διαμόλυνση κυττάρων με πλασμίδια κωδικοποιούντα την ERK2 συζευγμένη με τον επίτοπο HA και τεχνικές ανοσοκαταβύθισης, έδειξαν ότι η νευροφιμπρομίνη αλληλεπιδρά σταθερά με την ERK2. Επιπλέον, ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras/Raf/MEK/ERK από τον EGF ή το TPA αυξάνει την σύνδεση της νευροφιμπρομίνης με την ενεργοποιημένη ERK2. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την παρουσία ενός νέου μηχανισμού παλλίνδρομης ρύθμισης που μπορεί να καθορίζει την συνολική ένταση ή/και τον εντοπισμό της σηματοδότησης μέσω του μονοπατιού NF-1/Ras/Raf/MEK/ERK.

1. Li, C., Cheng, Y., Gutmann, D.H., and Mangoura, D. (2001) *Dev. Brain Res.* 130, 231-248

2. Vandenbroucke, I., VanOostveldt, P., Coene, E., De Paepe, A., and Messiaen, L. (2004) *FEBS Lett.* 560, 98-102

## INVESTIGATION OF THE ROLE OF 14-3-3 $\zeta$ IN OLFACTORY LEARNING IN *Drosophila melanogaster*

F. S. Leptourgidou<sup>1</sup> and E. M. C. Skoulakis<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular Biology and Genetics, Biomedical Sciences Research Center “Al.Fleming” 16672, Vari, Greece

The 14-3-3 protein family consists of small (Mw ~29-32 kDa), soluble, acidic, dimeric proteins expressed in all eukaryotic organisms examined to date. Nine isoforms have been found in mammals ( $\alpha/\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\delta/\zeta$ ,  $\epsilon$ ,  $\sigma$  and  $\theta$ ), whilst three isoforms have been identified in the fruitfly *Drosophila melanogaster* ( $\zeta$  or Leonardo I & II and  $\epsilon$ -epsilon). All 14-3-3s share high sequence and functional conservation both within and across species. 14-3-3 molecules form homo- and/or heterodimers that can interact with a wide variety of target proteins, via binding specific phosphoserine/phosphothreonine motifs. Binding of target proteins is thought to be the underlying mechanism by which this family of proteins controls many important cellular processes. 14-3-3s are abundantly expressed in most areas of the central nervous system. Therefore, they have been proposed to control many of its functions. In our model organism, *Drosophila melanogaster*, 14-3-3  $\zeta$  is preferentially expressed in the mushroom bodies, a pair of structures in the insect brain known to act as the center for olfactory learning and memory.

Our aim is to further investigate the role of 14-3-3 $\zeta$  of *Drosophila melanogaster* in olfactory learning. To this end, we have developed several genetic tools in order to achieve silencing of the 14-3-3 $\zeta$  gene in specific mushroom body substructures as well as other areas of the brain that are known to be involved in neurotransmission. In parallel to these studies, we are trying to more precisely map the function of 14-3-3 $\zeta$  to specific areas of the mushroom bodies where expression of the protein is essential for olfactory learning. Finally, we are investigating the possibility that the function of 14-3-3 $\zeta$  is linked to either the dopaminergic or the octopaminergic circuits, the two basic neurotransmission circuits involved in olfactory learning in the fly.

## ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ 14-3-3Σ ΣΤΗΝ ΟΣΦΡΗΤΙΚΗ ΜΑΘΗΣΗ ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ *Drosophila melanogaster*

Φ.Λεπτοργίδου<sup>1</sup> και Ε.Σκουλάκης<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλ.Φλέμινγκ»  
16672, Βάρη, Ελλάδα*

Την οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών συνιστούν μικρές σε μοριακό βάρος (29-32 kDa), διαλυτές, όξινες, διμερείς πρωτεΐνες που μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί σε όλους τους οργανισμούς που έχουν αποτελέσει πειραματικά μοντέλα. Στον άνθρωπο και γενικά στα θηλαστικά εντοπίζονται 9 διαφορετικές ισομορφές (α/β, γ, η, δ/ζ, ε, σ και θ), ενώ στη μύγα *Drosophila melanogaster*, έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα 3 ισομορφές (ζ ή Leonardo I & II και ε-epsilon). Οι τελευταίες παρουσιάζουν σημαντική ομολογία σε επίπεδο αλληλουχίας αλλά και σε επίπεδο λειτουργίας με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες των θηλαστικών. Ο γενικός τρόπος δράσης των 14-3-3 έγκειται στον σχηματισμό ομο- ή ετερο- διμερών τα οποία προσδένονται σε φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα άλλων πρωτεϊνών ρυθμίζοντας τον τρόπο δράσης τους. Κατ' αυτόν τον τρόπο ελέγχουν πολλές σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Οι περισσότερες πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής φαίνεται να εκφράζονται σε αφθονία στο κεντρικό νευρικό σύστημα των οργανισμών όπου εντοπίζονται, γεγονός που ενισχύει θεωρίες για τη σημασία τους σε πολλές λειτουργίες του. Ειδικότερα για τη μύγα, η 14-3-3 ζ, την οποία και μελετάμε, εκφράζεται σε μεγάλα ποσά στον εγκέφαλο και πιο ειδικά στην περιοχή τωνμανιταροειδών σωματίων που θεωρούνται το κέντρο της οσφρητικής μάθησης και μνήμης στα έντομα.

Θέλοντας να διερευνήσουμε περαιτέρω το ρόλο της 14-3-3ζ της *Drosophila melanogaster* στην οσφρητική μάθηση αναπτύξαμε γενετικά εργαλεία για την μερική αποσιώπηση του γονιδίου της σε συγκεκριμένες περιοχές τωνμανιταροειδών σωματίων και σε άλλα σημεία του εγκεφάλου που εμπλέκονται στη συναπτική διαβίβαση. Παράλληλα στόχος μας είναι η ακριβής χαρτογράφηση της δράσης της 14-3-3ζ, δηλαδή των σημείων όπου η έκφραση της πρωτεΐνης είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της οσφρητικής μάθησης. Τέλος, μελετάμε την πιθανότητα η δράση της 14-3-3ζ να σχετίζεται με ένα από τα βασικά συστήματα νευροδιαβιβαστών που έχουν δειχθεί να παίζουν ρόλο στην οσφρητική μάθηση στη μύγα, το σύστημα των ντοπαμινεργικών και οκτοπαμινεργικών νευρώνων.



**EVALUATION OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF ADULT MICE  
BRAIN REGIONS AFTER CONSUMPTION OF TEA OF *Sideritis  
clandestina* subsp. *peloponnesiaca***

Z. Linardaki<sup>1</sup>, F.N. Lamari<sup>2</sup>, M.A. Papandreou<sup>1</sup>, G. Iatrou<sup>3</sup>, M.I. Klapa<sup>4,5</sup>,  
Margarita M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. of Human and Animal Physiology, Dep. of Biology, Univ. of Patras, GR-26500  
Patras

<sup>2</sup>Lab. of Pharmacognosy & Chemistry of Natural Products, Dep. of Pharmacy, Univ.  
of Patras, GR-26500 Patras

<sup>3</sup>Division of Plant Biology, Dep. of Biology, Univ. of Patras, GR-26500 Patras

<sup>4</sup>Metabolic Engineering and Systems Biology Laboratory, Institute of Chemical Engineering and  
High-Temperature Chemical Processes, Foundation for Research  
and Technology-Hellas, Patras

<sup>5</sup>Metabolic Engineering and Systems Biology Laboratory, Department of Chemical  
Engineering, University of Maryland, MD 20742, USA.

The aim of the present study was to investigate the effect of drinking a herbal tea from *Sideritis clandestina* subsp. *peloponnesiaca* (4% w/v, for 40 days) on the antioxidant activity and metabolic profile (metabolomics) of the cerebral areas. The plant *Sideritis clandestina*, grown in different mountain regions of Peloponnese, was chosen after the evaluation, *in vitro*, of the polyphenolic content (using Folin-Ciocalteu method) and the antioxidant properties (using FRAP and DPPH assays), of water extracts (mountain tea), from several populations of the species. The results showed that consumption of the herbal tea elevated the antioxidant capacity of cerebellum and midbrain by 14% and 63% ( $p < 0.05$ ), respectively, whereas the antioxidant capacity of cerebral cortex remained unchanged. Moreover, a hierarchy was observed between the control brain regions according to their antioxidant properties (cerebral cortex > cerebellum > midbrain). Samples from cerebral cortex and cerebellum were further analyzed using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) metabolomics (1, 2). Metabolomics enables the measurement of the concentration of a large number of free metabolites allowing for a more detailed evaluation of the effect of tea treatment on the two brain regions. Initial qualitative analysis identified 31 metabolites, including many amino acids and neurotransmitters like GABA and glutamate. In addition metabolites involved in Krebs cycle and glucose consumption, both pathways directly involved in oxidative catabolism, were also identified. Qualitative analysis indicated no metabolites solely involved in one of the two brain regions or in the treated versus the untreated animals. However, the quantitative information to be obtained is expected to be quite insightful enable us to evaluate the effects of tea consumption on the activity of the respective metabolic pathways of the brain.

1. Klapa MI, Aon JC, Stephanopoulos G (2003). Systematic quantification of complex metabolic flux networks using stable isotopes and mass spectrometry. *Eur J Biochem.* 270: 17, 3525-42.
2. Kanani HH, Klapa MI (2007). Data correction strategy for metabolomics analysis using gas chromatography-mass spectrometry. *Metab Eng.* 9:1, 39-51.

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ  
ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΜΥΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΤΣΑΓΙΟΥ  
ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *Sideritis clandestina* subsp. *peloponnesiaca***

Z. Λιναρδάκη<sup>1</sup>, Φ.Ν. Λάμαρη<sup>2</sup>, Μ.Α. Παπανδρέου<sup>1</sup>, Γ. Ιατρού<sup>3</sup>, Μ.Ι Κλάπα<sup>4,5</sup>,  
Μ. Μαργαρίτη<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Φυσιολογίας Ανθρώπου & Ζώων, Τμ. Βιολογίας, Παν. Πατρών, Πάτρα <sup>2</sup>Εργαστήριο  
Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμ. Φαρμακευτικής,  
Παν. Πατρών, GR-26500 Πάτρα

<sup>3</sup>Τομέας Βιολογίας Φυτών, Τμ. Βιολογίας, Παν. Πατρών, GR-26500 Πάτρα

<sup>4</sup>Εργαστήριο Μεταβολικής Μηχανικής και Σύστημικής Βιολογίας, Ινστιτούτο Χημικής Μηχανικής και  
Χημικών Διεργασιών Υψηλής Θερμοκρασίας, Ιδρύματος Τεχνολογίας  
και Έρευνας (ΙΤΕ/ΕΙΧΗΜΥΘ), Πάτρα

<sup>5</sup>Τμήμα Χημικής Μηχανικής, Πανεπιστήμιο Maryland, MD 20742, USA

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της κατανάλωσης του αφεψημάτος του φυτού *Sideritis clandestina* subsp. *peloponnesiaca* (4% κ.ό., για 40 ημέρες), στην αντιοξειδωτική ικανότητα και το μεταβολικό προφίλ (Μεταβολομική) εγκεφαλικών περιοχών. Το φυτό *Sideritis clandestina*, που αναπτύσσεται σε διάφορες ορεινές περιοχές της Πελοποννήσου, επιλέχθηκε μετά από τον προσδιορισμό, *in vitro*, του πολυφαινολικού περιεχομένου (μέθοδος Folin-Ciocalteu) και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων (μέθοδοι FRAP και DPPH), των αφεψημάτων (τσάι του βουνού) από διαφορετικούς πληθυσμούς του. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κατανάλωση του τσαγιού από τους μύες αύξησε την αντιοξειδωτική ικανότητα της παρεγκεφαλίδας και του μεσεγκεφάλου κατά 14% και 63%, αντιστοίχως, ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα του εγκεφαλικού φλοιού παρέμεινε αμετάβλητη. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια ιεραρχία μεταξύ των εγκεφαλικών περιοχών των μυών-μαρτύρων (εγκεφαλικός φλοιός > παρεγκεφαλίδα > μεσεγκέφαλος) με βάση την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Δείγματα εγκεφαλικού φλοιού και παρεγκεφαλίδας αναλύθηκαν περαιτέρω εφαρμόζοντας μεταβολομική ανάλυση με χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (1, 2). Η Μεταβολομική επιτρέπει τη μέτρηση της συγκέντρωσης ενός μεγάλου αριθμού ελεύθερων μεταβολιτών, δίνοντας τη δυνατότητα για μια πιο λεπτομερή αξιολόγηση της επίδρασης της κατανάλωσης τσαγιού στις δύο εγκεφαλικές περιοχές. Αρχική ποιοτική ανάλυση οδήγησε στην ταυτοποίηση 31 μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων αρκετών αμινοξέων και νευροδιαβιβαστών όπως το GABA και το γλουταμινικό οξύ. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν μεταβολίτες που εμπλέκονται στον κύκλο του Krebs και στην κατανάλωση της γλυκόζης, δύο μονοπάτια που άμεσα σχετίζονται με οξειδωτικές καταβολικές διαδικασίες. Η ποιοτική ανάλυση έδειξε ότι κανένας μεταβολίτης δεν σχετίζεται αποκλειστικά με τη μια από τις δύο εγκεφαλικές περιοχές ή με τα πειραματικά ζώα έναντι των ζώων-μαρτύρων. Εντούτοις, η ποσοτική ανάλυση που πρόκειται να πραγματοποιηθεί, αναμένεται να είναι αρκετά σημαντική και θα μας επιτρέψει να αξιολογήσουμε τις επιδράσεις της κατανάλωσης “τσαγιού” στην ενεργότητα των αντίστοιχων μεταβολικών μονοπατιών του εγκεφάλου.

1. Klapa MI, Aon JC, Stephanopoulos G. *Eur J Biochem.* 2003, 270: 17, 3525-42

2. Kanani HH, Klapa MI. *Metab Eng.* 2007, 9: 1, 39-51

## INTRAVENTRICULAR TRANSPLANTATION OF BONE MARROW STROMAL CELLS IN A MODIFIED MODEL OF MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION IN THE RAT

*Lourbopoulos Athanasios, Grigoriadis Nikolaos, Touloumi Olga, Kotta Konstantia, Karacostas Dimitrios, Artemis Nikolaos, Milonas Ioannis, Tascos Nikolaos.*

*B' Department of Neurology, Laboratory of Experimental Neurology and Neuroimmunology, AHEPA University Hospital, Thessaloniki, Greece.*

Among the models used for experimental cerebral ischemia in rats, middle cerebral artery occlusion (MCAO) with the use of intraluminal suture is the most common. Depending on the suture used, the model itself can have low reproducibility rates and increased subarachnoid hemorrhage (SAH) as a complication of the operating procedure. In addition, bone marrow stromal cells, which are the non-hemopoietic cell line of the bone marrow, have recently been found to be capable of producing angiopoietic, anti-edematous and neurotrophic factors. Intra-arterial, intravenous and intrastriatal transplantation of these cells after temporary or permanent MCAO in the rodents induce significant clinical and histopathological benefits.

The present study focused on 3 main questions: 1) if the model of intraluminal suture could be improved to increase reproducibility and decrease SAH, 2) if we could successfully transplant BMSCs within the lateral ventricles after the MCAO and 3) what could be the possible benefits from such a BMSCs transplant at acute phase. We therefore used male Wistar rats of different age and weight randomly divided into the experimental groups. Animals were operated for a 2-hour MCAO followed by reperfusion and were examined prior to sacrifice with a modified Bederson's scale (mBS), a modified Neurological Stroke Scale (mNSS) and grid-walking test. For the 1<sup>st</sup> question two suture types were used -a Koizumi 5/0 suture (s-1) and an identical one additionally coated with poly-L-Lysine (s-2)- and animals were sacrificed at 24 hours. To answer the 2<sup>nd</sup> question we used TTC stained brain coronal slides of animals sacrificed at 6 hours post-MCAO, recalculated the coordinates for each ventricle and correlated them with the clinical scores of each animal. Then, for the 3<sup>rd</sup> question, BrdU-labeled BMSCs were injected into each lateral ventricle at 6 hours post MCAO and animals were sacrificed at 24 hours for paraffin sections.

Our modified Koizumi suture significantly increases reproducibility of MCAO infarction with an odds ratio of 24,87. No SAH was observed. Infarction volumes, edema volumes and clinical scores were significantly higher in s-2 group compared to s-1 ( $p < 0,05$ ). Edema significantly changes the stereotactic coordinates of the ipsilateral to the infarction lateral ventricle but not those of the contralateral. The new coordinates can be estimated by the mNSS score of the animal. Intraventricular transplantation of BMSCs significantly reduced the post-MCAO mortality ( $p < 0,05$ ), an effect probably attributed to the significant reduction of edema ( $p < 0,05$ ) and pressure effect phenomena in the skull of BMSCs transplanted animals compared to controls. No other clinical differences were observed at 24 hours. The infarction volumes were also not significantly different between the 2 groups.

In conclusion: 1) we successfully modified the known Koizumi suture to increase its already established advantages with no risk of SAH, 2) we propose a new stereotactic set of coordinates for lateral ventricle infusion after MCAO and 3) Intraventricular transplantation of BMSCs reduces edema and post-MCAO mortality possibly due to reduced pressure effect phenomena.

## ΕΝΔΟΚΟΙΛΙΑΚΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΣΤΙΑΚΗΣ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΕΠΙΜΥΟΣ

*Λουρμπόπουλος Αθανάσιος, Γρηγοριάδης Νικόλαος, Τουλούμη Όλγα, Κώττα Κωνσταντία, Καρακώστας Δημήτριος, Αρτέμης Νικόλαος, Μυλωνάς Ιωάννης, Τάσκος Νικόλαος.*

*Β' Νευρολογική Κλινική, Εργαστήριο Πειραματικής Νευρολογίας και Νευροανοσολογίας, Γ.Π.Ν.Θ. ΑΧΕΠΑ, Θεσσαλονίκη.*

Το μοντέλο του αποκλεισμού της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας (ΜΕΑ) με νήμα αποτελεί το συχνότερα χρησιμοποιούμενο για την πειραματική εστιακή εγκεφαλική ισχαιμία αλλά τα προκαλούμενα έμφρακτα μπορεί να έχουν μικρή επαναληψιμότητα και παράλληλα σχετικά υψηλά ποσοστά υπαραχνοειδούς αιμορραγίας (ΥΑΑ) ως επιπλοκή της μεθόδου. Παράλληλα, τα στρωματικά κυτταρα του μυελού των οστών (ΣΚΜΟ), τα οποία αποτελούν την μη-αιμοποιητική σειρά του μυελού, έχουν πρόσφατα βρεθεί ως ικανά να παράξουν αγγειοποιητικούς, αποιδηματικούς και νευροτροφικούς παράγοντες. Οι μέχρι σήμερα δοκιμασμένες οδοί μεταμόσχευσης των ΣΚΜΟ (ενδοαρτηριακά, ενδοφλέβια και ενδοραβδωτά) στους επίμυες έχουν σημαντικά κλινικά και ιστοπαθολογικά οφέλη. Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε σε 3 ερωτήματα: 1) στην πιθανή βελτίωση του μοντέλου αποκλεισμού της ΜΕΑ με νήμα, 2) στην επιτυχή μεταμόσχευση των ΣΚΜΟ στις πλάγιες κοιλίες του εγκεφάλου και 3) στα πιθανά οφέλη από μία τέτοια μεταμόσχευση. Χρησιμοποιήθηκαν άρρενες επίμυες Wistar, διαφορετικών ηλικιών και βαρών οι οποίοι υπέστησαν δίωρο αποκλεισμό της ΜΕΑ και ακόλουθη επαναιμάτωση. Όλα τα πειραματόζωα εξετάστηκαν κλινικά με τις τροποποιημένες κλίμακες Neurological Stroke Scale (mNSS) και Bederson's (mBS) καθώς και με τη δοκιμασία βάδισης σε πλέγμα. Για το πρώτο ερώτημα χρησιμοποιήθηκαν 2 ειδών νήματα -ένα νήμα 5/0 τύπου Koizumi (s-1) και ένα δεύτερο ίδιο επιπλέον καλυμμένο με πολυ-L-Λυσίνη (s-2)- και τα ζώα θυσιάστηκαν στις 24 ώρες. Το δεύτερο ερώτημα διερευνήθηκε με θυσία των πειραματόζωων στις 6 ώρες και χρώση στεφανιαίων τομών 1mm του εγκεφάλου με 2% TTC οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τον επαναπροσδιορισμό των συντεταγμένων των πλαγίων κοιλιών και συσχετισμούς με τα κλινικά δεδομένα. Στη συνέχεια, για το τρίτο ερώτημα, σημάνθηκαν ΣΚΜΟ με BrdU, ενέθηκαν στις 2 πλάγιες κοιλίες στις 6 ώρες μετά την έναρξη της ισχαιμίας και τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν στις 24 ώρες για τομές παραφίνης.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν αύξηση της επαναληψιμότητας για το s-2 νήμα με κλάσμα πιθανοτήτων 24,87. Δεν παρατηρήθηκε ΥΑΑ. Οι όγκοι εμφράκτου, οιδήματος και τα κλινικά αποτελέσματα ήταν μεγαλύτερα για την ομάδα του s-2 νήματος ( $p < 0,05$ ). Το οίδημα μετέβαλλε σημαντικά τις στερεοτακτικές συντεταγμένες της σύστοιχης με το έμφρακτο πλάγιας κοιλίας αλλά όχι της αντίστοιχης και αυτές μπορούν να εκτιμηθούν από την mNSS. Η ενδοκοιλιακή μεταμόσχευση των ΣΚΜΟ ελάττωσε σημαντικά την μετεμφρακτική θνησιμότητα ( $p < 0,05$ ), γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην σημαντική ( $p < 0,05$ ) ελάττωση του οιδήματος και της ενδοεγκεφαλικής πίεσης στα πειραματόζωα αυτά, χωρίς άλλες κλινικές διαφορές ή διαφορά στους όγκους εμφράκτων.

Συμπερασματικά, 1) τροποποιήσαμε με επιτυχία το νήμα Koizumi με αύξηση της επαναληψιμότητας και μηδενισμό της ΥΑΑ, 2) προτείνουμε νέες στερεοτακτικές συντεταγμένες για εγχύσεις στις πλάγιες κοιλίες του εγκεφάλου μετά από ισχαιμία και 3) η ενδοκοιλιακή μεταμόσχευση των ΣΚΜΟ ελαττώνει το οίδημα και την μετεμφρακτική θνησιμότητα λόγω φαινομένων ενδοκρανιακής πίεσης.

## OVEREXPRESSION OF WILD TYPE $\alpha$ -SYNUCLEIN DOWNREGULATES EXPRESSION OF NURR1 IN AN IN VITRO MODEL

*Manousaki M<sup>1</sup>, Sotiriou E<sup>1,2</sup>, Droggiti A<sup>1</sup>, Vekrellis K<sup>1</sup>, Vassilatis D.K<sup>2</sup>, Stefanis L<sup>1</sup>*

*Division of Basic Neurosciences<sup>1</sup> and Cell Biology<sup>2</sup>, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Athens, Greece*

The pathogenesis of Parkinson's disease (PD) is unknown but recent genetic, biochemical and neuropathological data suggest a central role for alpha-synuclein ( $\alpha$ -syn). Mutations that either alter the amino acid sequence or increase the copy number of the  $\alpha$ -syn gene result in PD. The ligand independent nuclear receptor Nurr1, on the other hand, is critical for the development and maintenance of the dopaminergic system and as such it may have a role in PD pathogenesis. Mutations in *Nurr1* that decrease the expression levels of the gene in the substantia nigra (SN) have been found in association with PD and other neurological disorders. Whether these two proteins,  $\alpha$ -syn and Nurr1, interact functionally has not been studied extensively, although in one report overexpression of  $\alpha$ -syn appeared to be associated with a reduction of Nurr1 expression. To examine this question, we utilized a novel in vitro model, in which human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) overexpress in an inducible fashion the wild type (wt) or the mutant A53T form of  $\alpha$ -syn. These cells utilise the tet-off (tetracycline- off) system, thus silencing gene expression in the presence of tetracycline and inducing gene expression in its absence. Overexpression of wt  $\alpha$ -syn in proliferating SH-SY5Y cells resulted in reduction of Nurr1 and Tyrosine Hydroxylase (TH) protein levels (about 30% for both proteins, as detected by Western immunoblotting and densitometric analysis) when compared with control cells in which  $\alpha$ -syn gene expression was silenced. In contrast, preliminary results suggest that overexpression of A53T  $\alpha$ -syn has little or no effect on the levels of Nurr1. These results suggest that overexpression of  $\alpha$ -syn may have as one of its untoward consequences the downregulation of Nurr1, and subsequently TH expression, thus impacting adversely the dopaminergic system.

Currently, we are investigating the effects of  $\alpha$ -syn (wt or A53T) overexpression on Nurr1 and TH protein expression at different time points during differentiation (3, 5 and 10 days) of SH-SY5Y cells. In addition we are analyzing the effects of  $\alpha$ -syn overexpression on the transcription levels of *Nurr1* as well as Nurr1 regulated genes such as *TH* and the dopamine transporter (*DAT*) at the different time points post-differentiation in SH-SY5Y cells. Finally, we aim to understand the signalling mechanisms through which  $\alpha$ -syn leads to Nurr1 downregulation.

*Supported by a grant from the Michael J. Fox Foundation and the General Secretariat of Research and Technology*

## Η ΑΥΞΗΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ $\alpha$ -ΣΥΝΟΥΚΛΕΙΝΗΣ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ NURR1 ΣΕ "IN VITRO" ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ

Μανουσάκη Μ<sup>1</sup>, Σωτηρίου Ε<sup>1,2</sup>, Δρογγίτη Α<sup>1</sup>, Βεκρέλλης Κ<sup>1</sup>, Βασιλάτης Δ.Κ<sup>2</sup>, Στεφανής Α<sup>1</sup>

Τομέας Βασικών Νευροεπιστημών<sup>1</sup> και Κυτταρικής Βιολογίας<sup>2</sup>, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημία Αθηνών

Οι αιτίες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την παθογένεση της νόσου του Parkinson (PD) είναι σχετικά άγνωστες, πρόσφατες μελέτες όμως αποδεικνύουν ότι η  $\alpha$ -συνουκλείνη ( $\alpha$ -συν) παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτό. Μεταλλάξεις οι οποίες είτε αλλάζουν την αλληλουχία των αμινοξέων είτε αυξάνουν τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου της  $\alpha$ -συν (διπλασιασμός-τριπλασιασμός) έχουν σαν αποτέλεσμα την νόσο του PD.

Από την άλλη πλευρά ο πυρηνικός υποδοχέας Nurr1 έχει κύριο ρόλο στην ανάπτυξη και την διατήρηση του ντοπαμινεργικού συστήματος και πιθανώς παίζει ρόλο και στην παθογένεση της PD. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *Nurr1* που προκαλούν αλλαγές στην έκφραση του στην περιοχή της μέλαινας ουσίας (SN) έχει βρεθεί να συσχετίζονται με την νόσο του Parkinson καθώς και με άλλες νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Η λειτουργική συσχέτιση των δυο πρωτεϊνών,  $\alpha$ -συν και Nurr1, δεν έχει εξεταστεί επισταμένως παρόλο που σε μία αναφορά η αύξηση της έκφρασης της  $\alpha$ -συν φαίνεται να συσχετίζεται με μείωση της έκφρασης του Nurr1.

Για να μελετήσουμε περαιτέρω αυτή την υπόθεση χρησιμοποιήσαμε ένα πρωτότυπο in vitro μοντέλο, στο οποίο κύτταρα ανθρωπίνου νευροβλαστώματος (SH-SY5Y) χημικά "προκαλούμενα" υπερεκφράζουν φυσιολογική (wt) ή μεταλλαγμένη (A53T)  $\alpha$ -συν. Στα κύτταρα αυτά χρησιμοποιούμε το τετρακυκλίνη-off σύστημα, χάρις το οποίο, παρουσία τετρακυκλίνης το γονίδιο της  $\alpha$ -συν δεν εκφράζεται ενώ το αντίθετο συμβαίνει εάν απομακρύνουμε την ουσία από την καλλιέργεια των κυττάρων. Η αύξηση της wt  $\alpha$ -συν, σε μη διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του Nurr1 καθώς και της υδροξυλάσης της τυροσίνης (TH) (περίπου 30% για κάθε μία, όπως φαίνεται μετά από πυκνομέτρηση στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western) όταν τα συγκρίνουμε με κύτταρα που δεν υπερεκφράζουν wt  $\alpha$ -συν. Από την άλλη πλευρά προκαταρκτικά πειράματα υποδεικνύουν ότι η αύξηση της A53T  $\alpha$ -συν έχει μικρή ή καθόλου επιρροή στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης του Nurr1. Η υπερέκφραση της  $\alpha$ -συν όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα μας μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του Nurr1 καθώς και της TH και κατά κάποιον τρόπο επηρεάζει αρνητικά το ντοπαμινεργικό σύστημα.

Παράλληλα θα μελετηθεί η επίδραση της υπερέκφρασης της  $\alpha$ -συν (wt και A53T) στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης και του mRNA του *Nurr1* καθώς και άλλων γονιδίων των οποίων η ρύθμιση ελέγχεται από το Nurr1 όπως της TH και της DAT (μεταφορέα της ντοπαμίνης) σε διαφορετικά χρονικά σημεία (3, 5 και 10 ημερών) κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης των SH-SY5Y κυττάρων. Επίσης θα προσπαθήσουμε να μελετήσουμε τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η  $\alpha$ -συν επηρεάζει την μείωση των επιπέδων έκφρασης του Nurr1.

Χρηματοδότηση από τον οργανισμό για τη νόσο του Parkinson (Michael J. Fox) και την Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας.

## PERCEPTION ACTION INTERACTION: PERCEPTUAL SYSTEMATIC ERRORS IN THE EVOLVING TRAJECTORY OF ARM POINTING MOVEMENTS

A. Mantas<sup>1</sup>, I. Evdokimidis<sup>1</sup> and N. Smyrnis<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Cognition and Action Group, Neurology Clinic, National and Kapodistrian University of Athens, Aegintion Hopsital, Athens 11528, Greece

<sup>2</sup> Psychiatry Clinic, National and Kapodistrian University of Athens, Aegintion Hopsital, Athens 11528, Greece

In previous studies we provided evidence for a directional distortion of the endpoints of movements to memorized target locations. This distortion was similar to a perceptual distortion in direction discrimination so we named it the “motor oblique effect”. In this report we analyzed the directional errors during the evolution of the movement trajectory in memory and visual pointing movements and compared them with directional errors in a perceptual experiment of arrow pointing. We observed that the motor oblique effect was present in the evolving trajectory of memory and visual reaching movements. In memory pointing the motor oblique effect did not change in magnitude during trajectory evolution. In visual pointing the motor oblique effect diminished with decreasing distance from the target and was smaller in magnitude compared to the perceptual oblique effect and the memory motor oblique effect early on in movement initiation. The results were used to test the two major hypotheses in perception action interaction: a dissociation of perception and action systems or a dissociation of movement planning and control processes. It is thus argued that the motor oblique effect can be a useful probe for the study of perception-action interaction.

1. Smyrnis N, Gourtzelidis P, and Evdokimidis I (2000) Systematic directional error in 2-D arm movements increases with increasing delay between visual target presentation and movement execution. *Exp Brain Res* 131: 111-120.

2. Gourtzelidis P, Smyrnis N, Evdokimidis I, and Balogh A (2001) Systematic errors of planar arm movements provide evidence for space categorization of multiple frames of reference. *Exp Brain Res* 139: 59-69, 2001.

3. Smyrnis N, Mantas A, and Evdokimidis I (2007) The “motor oblique effect”: perceptual direction discrimination and pointing to memorized visual targets share the same preference for cardinal orientations. *J Neurophysiol* 97: 1068-1077.

## ΑΝΤΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΚΙΝΗΣΗ: ΑΝΤΙΛΗΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΑ ΣΦΑΛΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΣΤΟ ΧΡΟΝΟ ΤΗΣ ΚΙΝΗΣΗΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΩ ΑΚΡΟΥ

A. Μαντάς<sup>1</sup>, I. Ευδοκιμίδης<sup>1</sup>, N. Σμυρνής<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Εργαστήριο Γνωσιακής Νευροφυσιολογίας, Νευρολογική Κλινική, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Αθήνα 11528.

<sup>2</sup> Ψυχιατρική Κλινική, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Αθήνα 11528.

Σε προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας προέκυψαν στοιχεία που δείχνουν συστηματική παρέκλιση των διευθύνσεων των τελικών σημείων των κινήσεων προς απομνημονευμένους στόχους. Αυτές οι παρεκλίσεις ήταν παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται σε αντιληπτικά πειράματα και ονομάσαμε το φαινόμενο «κινητικό φαινόμενο λοξής ευθείας». Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε τα σφάλματα διεύθυνσης κατά τη εξέλιξη της τροχιάς της κίνησης σε συνθήκες ορατού και απομνημονευμένου στόχου και τα συγκρίναμε με λάθη διεύθυνσης σε αντιληπτικό πείραμα κατάδειξης με βέλος. Παρατηρήσαμε ότι το «κινητικό φαινόμενο λοξής ευθείας» ήταν παρόν και στις δυο περιπτώσεις δηλαδή της κίνησης προς απομνημονευμένο και προς ορατό στόχο. Στην συνθήκη μνήμης το σφάλμα δεν μεταβαλλόταν σε μέγεθος κατά την εξέλιξη της κίνησης. Στην κίνηση προς ορατό στόχο αντίθετα το σφάλμα ελαττωνόταν όσο μειωνόταν η απόσταση από το στόχο και ήταν σημαντικά μικρότερο σε μέγεθος από το αντίστοιχο στο αντιληπτικό πείραμα καθώς και από το σφάλμα στη συνθήκη μνήμης, από την αρχή ακόμα της κίνησης. Τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για να ελέγξουν δυο επικρατούσες υποθέσεις σχετικά με την αλληλεπίδραση αντίληψης και κίνησης : της αποσύνδεσης αντιληπτικών και κινητικών συστημάτων και της αποσύνδεσης προγραμματισμού και ελέγχου της κίνησης. Συμπεραίνεται ότι το «κινητικό φαινόμενο λοξής ευθείας» μπορεί να είναι χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης αντίληψης και κίνησης.

1. Smyrnis N, Gourtzelidis P, and Evdokimidis I (2000) Systematic directional error in 2-D arm movements increases with increasing delay between visual target presentation and movement execution. *Exp Brain Res* 131: 111-120.

2. Gourtzelidis P, Smyrnis N, Evdokimidis I, and Balogh A (2001) Systematic errors of planar arm movements provide evidence for space categorization of multiple frames of reference. *Exp Brain Res* 139: 59-69, 2001.

3. Smyrnis N, Mantas A, and Evdokimidis I (2007) The “motor oblique effect”: perceptual direction discrimination and pointing to memorized visual targets share the same preference for cardinal orientations. *J Neurophysiol* 97: 1068-1077.



## IMPACT OF GENETIC AND ENVIRONMENTAL FACTORS ON NEUROMODULATORS OF ENERGY AND GLUCOSE HOMEOSTASIS

*EM. Markaki, C. Rouch, S. Banas, K. Apazoglou, D. Bailbe, K. Gerozissis*

*UMR 7059, CNRS, Paris, France*

The hypothalamus plays a decisive role in the control of food intake and energy homeostasis. Insulin and serotonin (5-HT) in interaction, contribute to the control of these functions<sup>1</sup>. This study focuses on the impact on the above regulators, of environmental and genetic factors known to disrupt these homeostatic mechanisms leading to severe metabolic pathologies, like obesity and type 2 diabetes (T2D).

**Models:** male Wistar (W) and Goto-Kakizaki (GK) rats, a model of T2D, that is not overweight. **Microdialysis:** in awake rats, one week after stereotaxic implantation of a guide in median hypothalamus (PVN-VMH), under anesthesia. **Measurement of extracellular hypothalamic 5-HT release:** in response to a laboratory chow meal (5% fat, 59% CHO) (LF), in rats aged 9-11 weeks, by electrochemical detection following HPLC<sup>2</sup>. **Hypothalamic mRNA** was assessed by real-time RT-PCR.

Basal 5-HT levels were identical in W and GK rats. The meal increased 5-HT release. Compared to W, the increase in GK rats, was significantly lower. Our previous studies in W rats fed a HF diet (40% fat mainly of animal origin, 17% CHO) have shown that the serotonergic increase to a meal, was attenuated after one week, compared to LF fed rats, and annihilated after six weeks. The modifications of the mechanisms involved in HF fed W, and in LF fed GK, seem to be dissimilar, since the effect of HF diet might be largely due to increased 5-HT metabolism (increased 5-HIAA), that is not the case in GK rats.

One week of HF diet, dramatically increased the hypothalamic gene expression of insulin receptor (IR) and IR substrates (IRS); six weeks HF diet increased insulin mRNA. Hypothalamic insulin mRNA was reduced in GK rats, compared to age matched W. The mRNA of the elements of insulin signaling remained stable.

In conclusion, an environmental factor, HF diet, and a genetic factor, diabetic predisposition, affect hypothalamic 5-HT and insulin, two major regulators of energy and glucose homeostasis. The effects are similar on 5-HT release, but opposite on insulin mRNA. Low 5-HT release favors energy intake and body weight (BW) gain in HF fed, W rats. The increased insulin mRNA in these rats, might be a compensatory adaptation mechanism tempting to counterbalance decreased serotonergic efficiency. Interestingly, the GK model shows a low 5-HT response and insulin mRNA, which are supposed to favor energy intake and BW, but this is not the case. Modification of additional neuroregulators, either orexigenic or anorexigenic, not studied here, could explain this point. The alterations shown in the GK model, might rather be related and contribute to an altered control of glucoregulation (1).

(1) Review: Gerozissis K, *Eur J Pharmacology*, in press, (2) Rouch et al., *Cell Mol Neurobiol*, 2005

## ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΕ ΝΕΥΡΟΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΙΣΟΖΥΓΙΟΥ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

*EM. Markaki, C. Rouch, S. Banas, K. Apazoglou, D. Bailbe, K. Gerozissis  
UMR 7059, CNRS, Paris, France e-mail : irene.markaki@etu.univ-paris7.fr*

Ο υποθάλαμος διαδραματίζει αποφασιστικό ρόλο στον έλεγχο της πρόσληψης τροφής και της ενεργειακής και γλυκοσιδιακής ομοιοστασίας. Η ινσουλίνη και η σεροτονίνη (5-HT) μέσω της αλληλεπίδρασης τους, συμβάλλουν στον έλεγχο των παραπάνω λειτουργιών<sup>1</sup>. Η μελέτη αυτή εστιάζει στην επίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων που είναι γνωστό ότι διαταράσσουν τους ομοιοστατικούς μηχανισμούς οδηγώντας σε σοβαρές μεταβολικές παθολογίες, παχυσαρκία και διαβήτη. Ζωικά μοντέλα : αρσενικοί Wistar (W) και Goto-Kakizaki (GK) επίμυες, ένα μοντέλο διαβήτη τύπου 2 που δεν είναι παχύσαρκο. Μικροδιάλυση: σε μη αναισθητοποιημένους επίμυες, μια εβδομάδα μετά από στερεοταξική εμφύτευση ενός οδηγού στον μέσο υποθάλαμο (PVN-VMH) υπό αναισθησία. Μέτρηση εξωκυτταρικής υποθαλαμικής απελευθέρωσης 5-HT : ως απόκριση σε ένα ισορροπημένο γεύμα (5% λίπος, 59% υδατάνθρακες) σε επίμυες ηλικίας 9-11 εβδομάδων, μέσω ηλεκτροχημικής ανίχνευσης μετά από HPLC<sup>2</sup>. Η μέτρηση mRNA στον υποθάλαμο έγινε μέσω real time PCR. Τα επίπεδα των τιμών αναφοράς για την 5-HT ήταν ταυτόσημα για τους W και τους GK επίμυες. Το γεύμα αύξησε την απελευθέρωση της 5-HT. Σε σύγκριση με τους W, η αύξηση στους επίμυες GK ήταν σημαντικά μικρότερη. Προηγούμενες μελέτες μας σε W επίμυες υπό υπερλιπιδική διαίτα (ΥΔ), (40% λίπος ζωικής προέλευσης, 17% υδατάνθρακες) έδειξαν ότι η αύξηση 5-HT ως απόκριση σε γεύμα, εξασθένησε μετά από μια βδομάδα, σε σύγκριση με τους επίμυες υπό ισορροπημένη διαίτα (ΙΔ). Οι μεταβολές των μηχανισμών που εμπλέκονται στους W επίμυες υπό ΥΔ αλλά και στους GK επίμυες υπό ΙΔ, δείχνουν να είναι διαφορετικές, μιας και η επίδραση της ΥΔ ίσως να οφείλεται κυρίως στον αυξημένο μεταβολισμό της 5-HT (αυξημένη συγκέντρωση του μεταβολίτη της- 5-HIAA), το οποίο δεν ισχύει για τους GK. Μια βδομάδα ΥΔ, αύξησε σημαντικά την υποθαλαμική γονιδιακή έκφραση του υποδοχέα ινσουλίνης (IR) και των πρωτεϊνών υποστρώματος της ινσουλίνης (IRS). ΥΔ 6 εβδομάδων προκάλεσε αύξηση του mRNA ινσουλίνης. Η συγκέντρωση mRNA ινσουλίνης μειώθηκε στους επίμυες GK σε σχέση με τους συνομήλικους τους W ενώ παρέμεινε αμετάβλητη στα υπόλοιπα μόρια της κυτταρικής σηματοδότησης ινσουλίνης.

Συμπερασματικά, περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες, ΥΔ και προδιάθεση για εκδήλωση διαβήτη επηρεάζουν την υποθαλαμική συγκέντρωση της 5-HT και της ινσουλίνης, δύο κύριους ρυθμιστές της ενεργειακής και γλυκοσιδιακής ομοιοστασίας. Οι επιδράσεις είναι παρόμοιες ως προς την απελευθέρωση 5-HT αλλά αντίθετες ως προς τη συγκέντρωση mRNA ινσουλίνης. Χαμηλή απελευθέρωση 5-HT ευνοεί την πρόσληψη ενέργειας και σωματικού βάρους σε επίμυες W υπό ΥΔ. Η αυξημένη συγκέντρωση mRNA ινσουλίνης σε αυτά τα ζώα, είναι πιθανόν, ένας προσαρμοστικός μηχανισμός αναπλήρωσης με σκοπό την εξισορρόπηση της μειωμένης αποτελεσματικότητας της σεροτονίνης. Το μοντέλο των επίμυων GK εμφανίζει χαμηλή απόκριση 5-HT και mRNA ινσουλίνης, τα οποία θεωρητικά προάγουν την αύξηση σωματικού βάρους, κάτι όμως που δεν παρατηρείται στους επίμυες GK. Βασιζόμενοι στην πρόσφατη διεθνή βιβλιογραφία προτείνουμε ότι οι γενετικές μεταβολές στην υποθαλαμική ινσουλίνη στα GK είναι μια από τις αιτίες της διαταραχής της ομοιοστασίας της γλυκόζης που παρατηρείται στο μοντέλο αυτό.

(1) Ανασκόπηση: Gerozissis K, *Eur J Pharmacology*, in press, (2) Rouch et al., *Cell Mol Neurobiol*, 2005

## **REGULATION OF APP METABOLISM BY BRI2 AND ITS MUTATIONS. THE IMPACT OF BRI2 ON BACE ENZYME ACTIVITY.**

*Marouli E., Fotinopoulou A., Efthimiopoulos S.*

*Department of Biology, Division of animal and Human Physiology, University of Athens,  
157 84 Panepistimiopolis, Ilisia, Greece*

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the presence of amyloid plaques, the main component of which is the amyloid beta peptide (A $\beta$ ) that derives from the proteolysis of APP protein. A $\beta$  deposition is believed to contribute to neuronal damage observed in AD. Accordingly, Familial British (FBD) and Familial Danish (FDD) dementias are neurodegenerative disorders associated with mutations of the BRI2 gene. They are characterized by accumulation of peptides derived from the mutated BRI2 protein in patients' brains. The presence of A $\beta$  in plaques from brains of FDD patients indicates that BRI2 interacts with proteins participating in APP proteolysis to produce A $\beta$ . After the interaction of BRI2 and APP was confirmed, the effect of the Danish and British mutations on APP metabolism was examined. It was found that both wild type and mutated BRI2 stabilize APP, with the BRI2 Danish mutation having a greater effect on APP metabolism. BRI2 was also found to interact with BACE1, an enzyme that acting on APP during the metabolic pathway of A $\beta$  production. The BRI2/BACE1 interaction resulted in destabilization of BACE1. To explore the mechanism of this effect we studied the catabolism of BACE1 in the presence of BRI2. For that purpose cells expressing BRI2 and BACE1 were incubated with cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis. It was found that expression of BRI2 resulted in increased catabolism of BACE1. In addition, using ammonium chloride, an inhibitor of the activity of lysosomal enzymes, it was observed that lysosome did not mediate BACE1 catabolism in the presence of BRI2. Currently, we are investigating further the mechanism by which expression of BRI2 induces BACE1 destabilization.

*This research was funded a Pythagoras II grant from the Ministry of Education.*

**ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ APP ΑΠΟ ΤΗΝ BRI2 ΚΑΙ ΤΙΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ BRI2 ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ BACE**

*Μαρούλη Ε., Φωτεινοπούλου Α., Ευθυμιόπουλος Σ.*

*Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 157 84  
Πανεπιστημιούπολη, Ιλίσια, Ελλάδα*

Η νόσος Alzheimer χαρακτηρίζεται από την παρουσία πλακών αμυλοειδούς, κύριο συστατικό των οποίων είναι το β-αμυλοειδές (Αβ). Το πεπτιδίο αυτό προέρχεται από την πρωτεόλυση της πρωτεΐνης APP. Αντίστοιχα, οι οικογενείς άνοιες τύπου Βρετανίας (FBD) και Δανίας (FDD) είναι νευροεκφυλιστικές ασθένειες που σχετίζονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεΐνης BRI2. Χαρακτηρίζονται από συσσώρευση πεπτιδίων που προέρχονται από την πρωτεόλυση της μεταλλαγμένης BRI2 σε εγκεφάλους ασθενών. Η εναπόθεση των αμυλοειδογενών πεπτιδίων στον εγκέφαλο θεωρείται ότι συνεισφέρει στη νευρωνική βλάβη που παρατηρείται στις παραπάνω άνοιες. Η παρουσία Αβ σε πλάκες εγκεφάλων ασθενών με FDD υποδεικνύει ότι πιθανά η BRI2 αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο πρωτεολυτικό μονοπάτι παραγωγής του Αβ. Αφού διαπιστώθηκε η αλληλεπίδραση της BRI2 με την APP, πρωτεΐνη-κλειδί στην παραγωγή του Αβ, μελετήθηκε και η επίδραση των μεταλλαγών της BRI2, Danish και British, στο μεταβολισμό της APP. Διαπιστώθηκε ότι η φυσικού τύπου και οι μεταλλαγμένες μορφές της BRI2 σταθεροποιούν την APP, με τη μεταλλαγή Danish να ασκεί τη μεγαλύτερη επίδραση. Επίσης, βρέθηκε ότι η BRI2 αλληλεπιδρά με τη BACE1, ένα ένζυμο που πρωτεολύει την APP προς παραγωγή Αβ. Κατά την αλληλεπίδραση αυτή η BRI2 φάνηκε να αποσταθεροποιεί τη BACE1 και έτσι θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί ο καταβολισμός της BACE παρουσία της BRI2. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της πρωτεϊνοσύνθεσης κυκλοεξιμίδιο και διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της BRI2 οδηγεί σε αυξημένο καταβολισμό της BACE1. Επίσης, με πειράματα που έγιναν με χλωριούχο αμμώνιο, έναν αναστολέα των λυσοσωμικών ενζύμων, βρέθηκε ότι τα λυσοσώματα δεν ευθύνονται για τον αυξημένο καταβολισμό της BACE1 παρουσία της BRI2. Επιπλέον πειράματα βρίσκονται σε εξέλιξη για να προσδιοριστεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου η έκφραση της BRI2 αποσταθεροποιεί την BACE1.

*Αυτή η Έρευνα χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα του Υπουργείου Παιδείας «Πυθαγόρας II».*

**CHANGES IN INTRACRANIAL SELF-STIMULATION THRESHOLD AND LOCOMOTOR ACTIVITY IN RATS WITH REPEATED ADMINISTRATION OF THE CANNABINOID RECEPTOR AGONIST WIN55,212-2**

*M. Mavrikaki<sup>1</sup>, E. Markaki<sup>1</sup>, G. G. Nomikos<sup>2</sup> and G. Panagis<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*University of Crete, Department of Psychology, Laboratory of Behavioral Neuroscience, 74100 Rethymno, Crete*

<sup>2</sup>*Neuroscience Cambridge Research Center, Amgen, Cambridge, MA 02139, U.S.A.*

Cannabinoids have been shown to exert complex effects on rewarding processes and psychomotor function. We have previously shown that acute administration of low doses of the CB1 receptor agonist WIN55,212-2 does not affect the reinforcing efficacy of brain stimulation or locomotion, whereas higher doses increase brain stimulation reward thresholds and produce hypomotility. The present study examined whether repeated administration of the CB1 receptor agonist WIN55,212-2 affected intracranial self-stimulation behavior and locomotion, and induced phenomena of tolerance or sensitization, similar to typical addictive drugs.

First, rats received a single injection of vehicle for 5 days, a WIN55,212-2 injection (1, 0.3 or 0.1 mg/kg, ip) for 20 consecutive days followed by vehicle injections for 5 additional days. Thresholds for ICSS were measured before and after each injection. The initial five injections of vehicle did not affect thresholds. WIN55,212-2 significantly increased ICSS threshold for 20 days. There was no change to this effect of WIN55,212-2 over days. However, during the last 5 days, where the highest dose of WIN55,212-2 was substituted with vehicle, rats demonstrated a conditioned increase in post-injection threshold, similar to that obtained in the preceding 20 days after WIN55,212-2 injection.

Second, rats were given daily injections of WIN55,212-2 (0, 0.1, 0.3 and 1 mg/kg, ip) for 20 days. Locomotor activity was measured in day 1, 10 and 20. Acutely, WIN55,212-2 produced hypolocomotion at the 1 and 0.3mg/kg dose, which was sustained for the next two measurements, compared to vehicle. In contrast, WIN55,212-2 at the 0.1mg/kg dose showed a tendency producing hyperlocomotion, which was sustained for the next two measurements, compared to vehicle.

These data suggest that repeated cannabinoid administration did not induce reinforcing properties neither phenomena of tolerance or sensitization, similar to typical addictive drugs. However, the present data demonstrate cannabinoid-predictive stimuli that may gain affective salience.

**ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟΝ ΟΥΔΟ ΕΝΔΟΚΡΑΝΙΑΚΟΥ ΑΥΤΟΕΡΕΘΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΣΤΗΝ  
ΑΥΘΟΡΜΗΤΗ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΧΡΟΝΙΑ  
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΟΥ ΑΓΩΝΙΣΤΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ  
WIN55,212-2**

*Μ. Μαυρικάκη<sup>1</sup>, Ε. Μαρκάκη<sup>1</sup>, Γ.Γ. Νομικός<sup>2</sup> και Γ. Παναγής<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ψυχολογίας, Εργαστήριο Νευροεπιστημών και Συμπεριφοράς, 74100, Ρέθυμνο, Κρήτη*

<sup>2</sup>*Ερευνητικό Κέντρο Νευροεπιστημών Cambridge, Amgen, Cambridge, MA 02139, Η.Π.Α.*

Έχει δειχθεί ότι τα κανναβινοειδή ασκούν πολύπλοκες δράσεις σε διεργασίες ανταμοιβής και στην ψυχοκινητική λειτουργία. Σε προηγούμενες μελέτες έχουμε δείξει ότι η οξεία χορήγηση χαμηλών δόσεων του αγωνιστή του CB<sub>1</sub> υποδοχέων WIN55,212-2 δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης του εγκεφαλικού ερεθισμού ούτε την κινητική δραστηριότητα, ενώ σε υψηλότερες δόσεις προκαλεί αύξηση στον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού και υποκινητικότητα. Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε αν η χρόνια χορήγηση του αγωνιστή των CB<sub>1</sub> υποδοχέων WIN55,212-2 επηρεάζει τη συμπεριφορά ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού και την κινητικότητα και αν προκαλεί φαινόμενα αντοχής ή ευαισθητοποίησης παρόμοια με αυτά που προκαλούν οι κλασικές εξαρτησιογόνοι ουσίες.

Στην πρώτη μελέτη, στους επίμυες χορηγήθηκε έκδοχο για 5 ημέρες, στη συνέχεια WIN55,212-2 (1, 0.3, 0.1mg/kg, ip) για 20 συνεχόμενες ημέρες και τέλος έκδοχο για 5 ημέρες. Ο ουδός ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού υπολογίστηκε πριν και μετά από κάθε χορήγηση. Οι πέντε αρχικές χορηγήσεις εκδόχου δεν επηρέασαν τον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού. Το WIN55,212-2 αύξησε σημαντικά τον ουδό κατά τις 20 ημέρες χορηγήσεων. Δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στη δράση του WIN55,212-2 κατά την περίοδο των 20 ημερών. Εν τούτοις, στην ομάδα που εχορηγείτο η υψηλότερη δόση του WIN55,212-2, κατά τις τελευταίες 5 ημέρες όταν αυτό υποκαταστάθηκε με έκδοχο οι επίμυες επέδειξαν μια εξαρτημένη αύξηση του ουδού μετά την χορήγηση του εκδόχου, παρόμοια με αυτή που είχε παρατηρηθεί στη διάρκεια των 20 ημερών μετά από τη χορήγηση WIN55,212-2.

Στη δεύτερη μελέτη, στους επίμυες χορηγήθηκε για 20 ημέρες WIN55,212-2 (1, 0.3, 0.1mg/kg, ip). Παράλληλα έγινε καταγραφή της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας κατά την 1<sup>η</sup>, τη 10<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> ημέρα. Η οξεία χορήγηση WIN55,212-2 στις δόσεις του 1 mg/kg και των 0.3 mg/kg προκάλεσε υποκινητικότητα, η οποία μάλιστα παρέμεινε σταθερή και στις επόμενες δύο μετρήσεις συγκριτικά με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε έκδοχο. Αντίθετα, το WIN55,212-2 στη δόση του 0.1 mg/kg παρουσίασε μια τάση για υπερκινητικότητα η οποία επίσης παρέμεινε σταθερή και στις επόμενες δύο μετρήσεις, συγκριτικά με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε έκδοχο.

Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η επαναλαμβανόμενη χορήγηση του αγωνιστή του CB<sub>1</sub> υποδοχέων WIN55,212-2 δεν έχει ενισχυτικές ιδιότητες και δεν προκαλεί φαινόμενα αντοχής ή ευαισθητοποίησης όπως συμβαίνει με τις κλασικές εξαρτησιογόνους ουσίες. Παρ' όλα αυτά, τα συγκεκριμένα ευρήματα καταδεικνύουν την ύπαρξη ερεθισμάτων συνδεδεμένα με τη χορήγηση κανναβινοειδών που πιθανώς να αποκτούν συναισθηματική βαρύτητα.

## ENDOGENOUS ACh CONTRIBUTION TO EPILEPTIFORM DISCHARGES ALONG THE LONGITUDINAL HIPPOCAMPAL AXIS, IN MALE AND FEMALE RATS

*A. Mikroulis, R. Liasko and C. Psarropoulou*

*Lab. of Animal & Human Physiology, Dept. Biological Applications and Technologies, Faculty of Science and Technology, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece.*

We have shown in our earlier work that a sustained generalized seizure (a model for Status Epilepticus) provoked by i.p. injection of pentylenetetrazole, a GABA<sub>A</sub> channel blocker, at the 20<sup>th</sup> postnatal day, causes a long term change in the development of CNS cholinergic (muscarinic) neurotransmission leading to an enhancement of excitability. In the present work, we investigated for potential differences in the cholinergic effects along the longitudinal (septotemporal) hippocampal axis, where excitability changes have been well documented by others, and in addition we differentiated between male (M) and (F) female Wistar rats. The final aim was to compare the findings from adult naive animals to those from animals having had a sustained convulsion during development.

Hippocampal slices prepared from the temporal and/or the septal hippocampal extremities were perfused with ACSF with no added Mg<sup>++</sup> leading to the generation of synchronous spontaneous interictal-like NMDA-dependent epileptiform discharges. Recordings were made in the CA3 area and discharge rate of recurrence (or frequency) was measured in Hz.

The discharge frequency was significantly higher in temporal compared to septal slices, from either M (p=0.0003) or F (p=0.03) animals, but very similar M vs F slices of the same anatomical origin. Addition of the anticholinesterase eserine (10 μM), that increases the availability of endogenous ACh by decreasing its catabolism, increased significantly the frequency of spontaneous discharges in all slices. In both M and F slices, the percent increase was more pronounced in septal vs temporal slices (M p=0.04; F p=0.03). Interestingly, the eserine-induced frequency increase was more pronounced in F compared to M slices, of either hippocampal extremity. Preliminary results from slices of control vs PTZ-treated M animals indicated similar spontaneous NMDA-dependent discharge frequencies, but a trend towards more pronounced eserine-induced increases in the PTZ-slices.

In conclusion, endogenous ACh increased the frequency of NMDA-dependent interictal-like discharges more in slices from the septal end, suggesting indirectly that the higher control (baseline) rates recorded in slices from the temporal end could be associated to a cholinergic effect acting in synergy to NMDA receptor activation. Also, endogenous ACh's excitatory effects were more pronounced in slices from PTZ-treated M animals compared to naive, and in slices from naive female animals compared to male. These findings suggest that an early seizure increases the excitatory synergy between these neurotransmitter systems (NMDA, ACh), but that such enhanced synergy occurs normally in female brain. They may therefore suggest new avenues of research in the investigation of long term effects of early seizures, as well as in gender dependent (e.g. catamenial) types of epilepsy.

*Supported by the Greek Ministry of Education – Pithagoras II.*

**ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗ ΚΑΙ ΕΠΙΛΗΠΤΟΕΙΔΕΙΣ ΕΚΦΟΡΤΙΣΕΙΣ ΚΑΤΑ ΜΗΚΟΣ ΤΟΥ ΕΠΙΜΗΚΗ ΑΞΟΝΑ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΣΕ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥΣ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΟΥΣ ΕΠΙΜΥΕΣ**

*A. Μικρούλης, P. Λιάσκο και K. Ψαρροπούλου*

*Εργ. Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Σχολή Επιστήμης και Τεχνολογίας, Παν/μιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 45110, Ελλάδα*

Σε προηγούμενη εργασία έχουμε δείξει ότι μία παρατεταμένη γενικευμένη κρίση (ως μοντέλο του Status Epilepticus), που έχει προκληθεί από ενδοπεριτοναϊκή ένεση πεντυλενετετραζόλης (έναν αναστολέα του καναλιού GABA<sub>A</sub>) την 20η ημέρα μετά την γέννηση, προκαλεί μια μακροπρόθεσμη μεταβολή στην ανάπτυξη της χολινεργικής νευροδιαβίβασης του ΚΝΣ, που οδηγεί σε ενίσχυση της διεγρεσιμότητας. Σε αυτήν την εργασία ερευνήσαμε πιθανές διαφορές των χολινεργικών δράσεων κατά μήκος του επιμήκη άξονα του ιπποκάμπου, όπου διαφορές έχουν επισταμένα αναφερθεί, καθώς και σε αρσενικούς (Α) και θηλυκούς (Θ) επίμυες Wistar. Ο τελικός στόχος ήταν να συγκρίνουμε τα ευρημάτα από ενήλικα ζώα-μάρτυρες με τα αντίστοιχα ζώων που υπέστησαν μία παρατεταμένη κρίση κατά την ανάπτυξη.

Τομές ιπποκάμπου από το κροταφικό και το διαφραγματικό άκρο τοποθετήθηκαν σε tENY χωρίς πρόσθετο Mg<sup>2+</sup> με αποτέλεσμα να παραχθούν συγχρονισμένες αυθόρμητες μεσοκρिटικού τύπου εκφορτίσεις, λόγω της ενεργοποίησης των NMDA υποδοχέων. Οι καταγραφές έγιναν από την περιοχή CA3 και ο ρυθμός επανεμφάνισης (συχνότητα) των εκφορτίσεων μετρήθηκε σε Hz.

Η συχνότητα εκφορτίσεων ήταν σημαντικά ψηλότερη στις κροταφικές τομές σε σύγκριση με τις διαφραγματικές, τόσο σε τομές από Α (p = 0.0003) όσο και από Θ (p = 0.03) ζώα, αλλά παρόμοια σε τομές Α έναντι Θ της ίδιας ανατομικής προέλευσης. Προσθήκη της αντιχολινεστεράσης εσερίνης (10 μM), που αυξάνει την διαθεσιμότητα ενδογενούς ακετυλοχολίνης μειώνοντας τον καταβολισμό της τελευταίας, αύξησε στατιστικά σημαντικά την συχνότητα αυθόρμητων εκφορτίσεων σε όλες τις τομές. Η εκατοστιαία αύξηση ήταν μεγαλύτερη στις διαφραγματικές έναντι των κροταφικών τομών και στις δύο ομάδες (Α p = 0.04 ; Θ p = 0.03). Επιπλέον, η αύξηση της συχνότητας από την εσερίνη ήταν μεγαλύτερη σε Θ έναντι Α τομών και των δύο άκρων. Προκαταρκτικά αποτελέσματα από τομές Α μαρτύρων έναντι, επίσης Α, ζώων που έλαβαν PTZ έδειξαν παρόμοιους ρυθμούς αυθόρμητων NMDAR-εξαρτημένων εκφορτίσεων, αλλά με μία τάση εντονότερων αυξήσεων από την εσερίνη σε PTZ-τομές.

Συμπερασματικά, η ενδογενής ACh αύξησε την συχνότητα των NMDAR-εξαρτημένων εκφορτίσεων περισσότερο σε τομές από το διαφραγματικό άκρο, προτείνοντας έμμεσα ότι οι ψηλότερες συχνότητες βάσης που είχαν καταγραφεί σε τομές από το κροταφικό άκρο θα μπορούσαν να οφείλονται σε συνέργεια μεταξύ των δύο νευροδιαβιβαστικών συστημάτων (NMDA, ACh). Επίσης, τα διεγερτικά αποτελέσματα της ενδογενούς ACh ήταν πίο έντονα σε τομές από Θ ζώα σε σύγκριση με Α, καθώς και σε τομές από Α ζώα στα οποία χορηγήθηκε PTZ σε σύγκριση με μάρτυρες, δείχνοντας ότι οι κρίσεις κατά την ανάπτυξη πιθανόν αυξάνουν την συνέργεια μεταξύ των δύο συστημάτων (NMDA, ACh), αλλά ότι τέτοια συνέργεια απαντάται φυσιολογικά στον εγκέφαλο θηλυκών ζώων.

*Χρηματοδοτήθηκε από το ΥΠΕΠΘ – Δράση Πυθαγόρας II.*



## NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF IGF-I FOLLOWING KAINIC ACID INDUCED HIPPOCAMPAL DEGENERATION IN THE RAT

*P. Miltiadous, A. Stamatakis, F. Stylianopoulou*

*Laboratory of Biology- Biochemistry, Faculty of Nursing, University of Athens,  
Papadiamantopoulou 123, 11527, Athens, Greece*

Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) is an important growth factor, which has been used as a therapeutic agent in a number of models of neurodegenerative diseases such as ischemia or trauma of the cortex or the spinal cord. There is substantial experimental evidence showing that IGF-I plays a role in the repair processes following brain trauma, in the control of injured peripheral nerve regeneration and that it can improve the clinical outcome in animal models of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). After brain trauma IGF-I has been shown to have mitogenic and trophic actions in a variety of cellular types. Interestingly, recent studies support a role for IGF-I in the control of adult neurogenesis in the adult rat hippocampus.

Kainic acid is widely used for the study of excitatory neurotoxicity. Administration of kainic acid to rats results in changes in behavior and EEG and leads to neuronal death in specific brain areas. Kainic acid administration has been used in animal models of various human neurodegenerative diseases, such as temporal lobe epilepsy, schizophrenia and Alzheimer's disease.

In the present study, we investigated the neuroprotective action of IGF-I following kainic acid-induced neurodegeneration. Kainic acid (2 $\mu$ g/3 $\mu$ l) or kainic acid together with IGF-I (10 $\mu$ g/3 $\mu$ l) was stereotactically injected into the CA3 hippocampal area (AP: -3.3 mm, ML: 3.0 mm, DV: 3.5 mm) of adult male rats. All animals developed seizures. They were sacrificed 8 days following drug administration and cell death markers were studied histologically in coronal paraffin sections of the brain.

Following kainic acid administration extended degeneration of the hippocampus was observed ipsilaterally to the injection site, as revealed following Cresyl violet staining. Hippocampal degeneration was also observed in the CA3 and CA4 hippocampal areas of the contralateral hemisphere. Furthermore, activated astrocytes which formed an astroglial scar, were detected in the ipsilateral hippocampus. In addition, Hsp70, an index of cellular stress, was induced in both the ipsilateral and the contralateral hemisphere. Finally, cell death was studied using FluoroJade B staining, which was clearly evident in both hemispheres. In the brain of rats receiving both kainic acid and IGF-I all the above markers of neurodegeneration were not observed in the contralateral hemisphere, while they were significantly reduced in the ipsilateral. Following administration of IGF-I only a few apoptotic or and Hsp70 immunopositive cells were observed and astrogliosis was clearly less pronounced. These results suggest that IGF-I has neuroprotective properties, decreasing both neuronal death as well as astroglial reaction. Based on the above, we can conclude that IGF-I is an important neuroprotective agent which could possibly be used therapeutically in the future.

This research project (PENED) is co-financed by E.U.-European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%).

## Ο IGF-I ΩΣ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΚΑΪΝΙΚΟ ΟΞΥ

*Π. Μιλτιάδους, Α. Σταματάκης, Φ. Στυλιανοπούλου*

*Εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας, Τμήμα Νοσηλευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Παπαδιαμαντοπούλου 123, 11528, Αθήνα*

Ο IGF-I είναι ένας σημαντικός αυξητικός παράγοντας που έχει χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά σε διάφορα πειραματικά μοντέλα νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως ισχαιμία, τραυματισμός του φλοιού ή του νωτιαίου μυελού. Ο IGF-I θεωρείται ότι σχετίζεται με τις διαδικασίες επούλωσης μετά από εγκεφαλική βλάβη, με τον έλεγχο της αναγέννησης τραυματισμένων περιφερικών νευρών και ότι βελτιώνει το κλινικό αποτέλεσμα σε μοντέλα της Αμυοτροφικής Πλάγιας Σκλήρυνσης. Μετά από τραυματισμό του ΚΝΣ, ο IGF-I ασκεί μιτογόνο και τροφική δράση σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων. Επίσης, είναι ενδιαφέρον ότι πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν πως ο IGF-I μπορεί να ρυθμίζει τη νευρογένεση στον ιππόκαμπο του ενήλικου επίμυ.

Το καϊνικό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως για την πειραματική πρόκληση νευροτοξικότητας και τη μελέτη των υποκείμενων μοριακών και κυτταρικών φαινομένων. Η χορήγηση καϊνικού σε επίμυ προκαλεί αλλαγές στη συμπεριφορά και την ηλεκτρο-εγκεφαλογραφική δραστηριότητα και οδηγεί στην καταστροφή νευρικών κυττάρων σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο διάφορων ασθενειών του ανθρώπου όπως η επιληψία του κροταφικού λοβού, η σχιζοφρένεια και η νόσος του Alzheimer.

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η νευροπροστατευτική δράση του IGF-I στην εκφύλιση νευρικών κυττάρων που προκαλεί το καϊνικό οξύ. Σε αρσενικούς επίμυ χορηγήθηκαν στερεοτακτικά *in vivo* είτε 2μg/3μl καϊνικό οξύ είτε η ίδια δόση καϊνικού οξέος μαζί με IGF-I (10μg/3μl), στην CA3 περιοχή του ιππόκαμπου (AP: -3.3 mm, ML: 3.0 mm και DV: 3.5 mm). Όλα τα ζώα παρουσίασαν στερεοτυπική συμπεριφορά επιληπτικών κρίσεων. Θυσιάστηκαν 8 μέρες μετά τη χορήγηση. Έγινε ιστολογική χρώση μετωπιαίων τομών και μελετήθηκε στον ιππόκαμπο η παρουσία δεικτών που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο.

Μετά τη χορήγηση καϊνικού οξέος παρατηρήθηκε στο ομόπλευρο ημισφαίριο εκτεταμένη καταστροφή του ιππόκαμπου που ορισμένες φορές έφτανε μέχρι ολικής εξαφάνισης του, όπως φάνηκε μετά τη χρώση των τομών με τη χρωστική Cresyl violet. Η καταστροφή αυτή, επεκτεινόταν και στις περιοχές CA3 και CA4 του ιππόκαμπου στο ετερόπλευρο ημισφαίριο. Επιπλέον, στο ομόπλευρο ημισφαίριο εντοπίστηκαν ενεργοποιημένα αστροκύτταρα τα οποία διαμόρφωναν αστρογλοιακή ουλή. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης της Hsp70 τόσο ομόπλευρα όσο και ετερόπλευρα της περιοχής έγχυσης. Τέλος, ανιχνεύθηκε με τη χρήση του Fluoro-Jade B εκτεταμένος κυτταρικός θάνατος και στα δύο ημισφαίρια. Στους επίμυ στους οποίους είχε χορηγηθεί μαζί με το καϊνικό και IGF-I, στο ετερόπλευρο ημισφαίριο δεν παρατηρήθηκαν νευροεκφυλιστικά φαινόμενα, ενώ στο ομόπλευρο είχαν μειωθεί σημαντικά. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα που βρίσκονταν σε απόπτωση ή ήταν ανοσοθετικά για την Hsp70 καθώς και τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα ήταν λίγα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως ο IGF-I έχει νευροπροστατευτικές ιδιότητες μειώνοντας τόσο τον νευρωνικό θάνατο, όσο και την αστρογλοιακή αντίδραση. Συνεπώς, ο IGF-I αναδεικνύεται ως ένας σημαντικός νευροπροστατευτικός παράγοντας ο οποίος μπορεί μελλοντικά να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό μέσο.

**A MICROARRAY STUDY OF GENE AND PROTEIN REGULATION IN HUMAN AND RAT BRAIN FOLLOWING MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION: IDENTIFICATION OF NOVEL NEURO-MODULATORS**

*N. Mitsios<sup>1</sup>, R. Pennucci<sup>1</sup>, J. Krupinski<sup>2</sup>, P. Kumar<sup>1</sup>, S. Kumar<sup>3</sup> and M. Slevin<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>School of Biology, Chemistry and Health Science & Research Institute of Health and Social Change, Manchester Metropolitan University, Manchester, United Kingdom*

*<sup>2</sup>Neurology Department, Stroke Unit, Bellvitge University Hospital, Barcelona, Spain*

*<sup>3</sup>Department of Pathology, University of Manchester, Manchester, United Kingdom*

Altered gene expression is an important feature of ischemic cerebral injury and affects proteins of many functional classes. Several experimental studies have examined alteration of gene expression in postischemic rat brain tissue using microarrays, while blood genomic profiling in human stroke has been investigated too. An analysis of gene expression profiles after stroke in humans and a comparison with those in animal models could identify gene expression changes previously not implicated in ischaemic pathophysiology and eventually allow an evaluation of the usefulness of animal models in stroke research.

Here, we have used microarrays to investigate the dynamic changes in gene expression at various times after ischaemia in human and rat brain tissue and aimed to determine any novel genes deregulated following stroke in humans or rats and whether any of those molecules were expressed more predominantly in any one of our two models. Our results demonstrated a significant difference in the number of genes affected and the time-course of expression between the two cases. The total number of deregulated genes in the rat was 335 versus 126 in the human, while, of 393 overlapping genes between the two array sets, 184 were changed only in the rat and 36 in the human with a total of 41 genes deregulated in both cases. Interestingly, the mean fold changes were much higher in the human stroke study.

The expression patterns of some of the genes not previously associated with ischemia were further analyzed by RT-PCR, western blotting and immunohistochemistry at various time points for the validation of the cDNA array results. These genes included cyclin-dependent kinase 5 (CDK5), prion protein precursor (PrP), matrix metalloproteinase 11 (MMP11) and leukaemia inhibitory factor (LIF). We further investigated whether the altered levels for this subset of deregulated molecules in the postischemic brain could be reproduced in an in vitro model of neuronal and endothelial cell culture under conditions of oxygen-glucose deprivation.

Our findings confirmed previous studies reporting that parallel screening of gene expression can detect both previously documented and novel transcriptional features of cerebral ischemia, leading to a better understanding of this complex process and identification of potential therapeutic targets. Moreover, our work highlights the importance of research using human stroke tissue in the search for novel therapeutic agents, which may be useful in the treatment of stroke.

**ΜΙΑ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ  
ΣΕ ΜΥΑΛΑ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΚΑΙ ΠΟΝΤΙΚΙΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗ  
ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΙΣΧΑΙΜΙΚΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΥ ΕΠΕΙΣΟΔΙΟΥ**

*N. Μητσιός<sup>1</sup>, R. Pennucci<sup>1</sup>, J. Krupinski<sup>2</sup>, P. Kumar<sup>1</sup>, S. Kumar<sup>3</sup> και M. Slevin<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Τμήμα Βιολογίας, Χημείας και Επιστημών Υγείας και Ερευνητικό Ινστιτούτο Υγείας και Κοινωνικής Αλλαγής, Πανεπιστήμιο Metropolitan, Μάντσεστερ, Ηνωμένο Βασίλειο*

<sup>2</sup>*Τμήμα Νευρολογίας, Μονάδα Εγκεφαλικών Επεισοδίων,*

*Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο του Bellvitge, Βαρκελώνη, Ισπανία*

<sup>3</sup>*Τμήμα Παθολογίας, Πανεπιστήμιο του Μάντσεστερ, Μάντσεστερ, Ηνωμένο Βασίλειο*

Οι αλλαγές στη γονιδιακή ρύθμιση αποτελούν αναπόσπαστο μέρος των ισχαιμικών εγκεφαλικών επεισοδίων και επηρεάζουν πρωτεΐνες διαφορετικών τάξεων. Προηγούμενες μελέτες έχουν εξετάσει τις αλλαγές στη γονιδιακή ρύθμιση στο μυαλό ποντικών μετά από ισχαιμικό επεισόδιο χρησιμοποιώντας microarrays. Το γονιδιακό προφίλ του αίματος σε ασθενείς εγκεφαλικών επεισοδίων έχει επίσης μελετηθεί. Η ανάλυση των γονιδιακών αλλαγών μετά τα εγκεφαλικά επεισόδια στους ανθρώπους και η σύγκριση με τις αντίστοιχες αλλαγές που παρατηρούνται στα πειραματόζωα θα μπορούσε να βρει γονίδια χωρίς προηγούμενη αναφορά σε σχέση με τα ισχαιμικά επεισόδια και εν τέλει να δώσει μια απάντηση όσον αφορά τη χρησιμότητα των πειραματόζωων στην έρευνα για την αντιμετώπιση των επεισοδίων. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήσαμε microarrays για να μελετήσουμε τις αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση σε διαφορετικούς χρόνους μετά το ισχαιμικό επεισόδιο σε ασθενείς και σε ποντίκια με σκοπό να βρούμε νέα γονίδια με διαφορετική έκφραση μετά τα επεισόδια καθώς και το αν κάποιο από αυτά τα γονίδια εκφραζόταν κυρίως σε κάποιον από τους δυο οργανισμούς. Στα αποτελέσματά μας διακρίνεται μια σημαντική διαφορά στον αριθμό των γονιδίων και στο χρονικό σημείο έκφρασης τους ανάμεσα στους δυο οργανισμούς. Συνολικά, μετά τα επεισόδια, 335 γονίδια είχαν διαφορετική έκφραση στα ποντίκια σε σχέση με τα 126 στους ανθρώπους, ενώ από τα 393 γονίδια που ήταν κοινά και στα δυο microarray set, 184 είχαν διαφορετική έκφραση μόνο στα ποντίκια, 36 μόνο στους ανθρώπους και μόνο 41 γονίδια είχαν διαφορετική έκφραση και στους δυο οργανισμούς. Αξιοπεριεργό είναι ότι συνολικά το μέγεθος των διαφορών στη γονιδιακή ρύθμιση ήταν πολύ μεγαλύτερο στους ασθενείς συγκριτικά με τα ποντίκια. Η έκφραση κάποιων από τα γονίδια εκείνα χωρίς προηγούμενη αναφορά σε σχέση με τα ισχαιμικά επεισόδια αποτέλεσε το αντικείμενο παραπέρα μελέτης με τεχνικές όπως RT-PCR, western blotting και immunohistochemistry σε διαφορετικά χρονικά σημεία για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τα microarrays. Στα γονίδια αυτά ανήκαν τα: cyclin-dependent kinase 5, prion protein precursor, matrix metalloproteinase 11 και leukaemia inhibitory factor. Κατόπιν ερευνήσαμε το εάν οι αλλαγές στη γονιδιακή ρύθμιση για αυτά τα συγκεκριμένα γονίδια στο ισχαιμικό μυαλό θα φαινόταν και σε καλλιέργειες νευρικών και ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από συνθήκες έλλειψης οξυγόνου και γλυκόζης. Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που ανέφεραν ότι πολλαπλή ανάλυση της γονιδιακής ρύθμισης μπορεί να φανερώσει γνωστά και άγνωστα στοιχεία σχετικά με τα εγκεφαλικά επεισόδια και να οδηγήσει σε μεγαλύτερη κατανόηση αυτής της πολύπλοκης διαδικασίας και πιθανόν σε ανακάλυψη μελλοντικών στόχων για θεραπεία. Επιπλέον οι μελέτες μας τονίζουν την αναγκαιότητα της χρησιμοποίησης υλικού προερχόμενο από θύματα εγκεφαλικών επεισοδίων στην έρευνα με απώτερο σκοπό την καλύτερη αντιμετώπιση τους.

## SMALL GTPASE-DEPENDENT SIGNALLING IN OLFACTORY LEARNING AND MEMORY IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

A.C. Moressis<sup>1,2</sup> and E.M.C. Skoulakis<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Basic Sciences, School of Nursing, National and Kapodistrian University of Athens, Athens 11527, Greece

<sup>2</sup> Institute of Molecular Biology and Genetics, B.S.R.C. "Alexander Fleming", 16672 Vari, Greece

Small GTP-binding proteins, are monomeric G proteins with Mw 20-40 kDa. They function as key regulators of cell proliferation and differentiation and their mutated forms have been implicated in malignancy. Nevertheless, their function in terminally differentiated cells, such as neurons, is yet unknown. Increasing evidence in both mammals and invertebrates implicate small GTPases of the Ras subfamily as well as members of the Ras/Raf/MAPK pathway in learning and memory, but so far direct evidence of this has been lacking.

Small GTPase signalling in *Drosophila* learning and memory is stringly suggested by the deficits in these processes exhibited by mutants in the DRK adaptor protein. The *drk* gene encodes an SH2/SH3 adaptor protein and so far has been shown to act upstream of RAS1 during developmental processes. Using a Pavlovian olfactory conditioning paradigm, we have shown that *drk* mutants exhibit both learning and memory deficits. The behavioural deficits are attributed to reduced DRK protein levels in the mushroom bodies (MBs), the neuroanatomical locus of olfactory learning and memory in insects. Furthermore, the learning deficit of *drk* mutants is rescued by conditional overexpression of a constitutively active form of RAF in the MBs, whereas the memory deficit persists. This implicates that additional, DRK-mediated pathways are involved in memory formation that are RAF independent.

To expand on these studies and address the implications of the *drk* mutant phenotypes, we are currently investigating whether its learning and memory deficits can also be rescued by overexpression of constitutively active forms of the Ras subfamily members, RAS1 and RAP1, in the MBs. We have shown that all three members of the Ras subfamily, namely RAS1, RAS2 and RAS3/RAP1, are expressed in the *Drosophila* brain. Moreover, preliminary evidence suggests that conditional overexpression of constitutively active or dominant negative forms of these transgenes compromises olfactory learning and memory. To our knowledge, this is the first direct evidence that Ras GTPases are required during adult invertebrate learning and memory processes.

## ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΙ ΑΠΟ ΜΙΚΡΕΣ ΓΤΡΑΣΕΣ ΣΤΗΝ ΟΣΦΡΗΤΙΚΗ ΜΑΘΗΣΗ ΚΑΙ ΜΝΗΜΗ ΤΗΣ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

A. Μωρέσης<sup>1,2</sup> και E. Σκουλάκης<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Τομέας Βασικών Επιστημών, Τμήμα Νοσηλευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 11527, Αθήνα

<sup>2</sup> Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμιγκ», 16672, Βάρη

Οι μικρές πρωτεΐνες δέσμευσης GTP, είναι μονομερείς G πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 20-40 kDa. Λειτουργούν ως κύριοι ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής διαφοροποίησης και οι μεταλλαγμένες τους μορφές έχουν εμπλακεί σε κακοήθειες. Παρ' όλα αυτά, η λειτουργία τους σε τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα, όπως οι νευρώνες, είναι έως τώρα άγνωστη. Δεδομένα από μελέτες τόσο σε θηλαστικά όσο και σε ασπόνδυλα, εμπλέκουν τις μικρές GTPάσες της υποοικογένειας Ras καθώς και μέλη του σηματοδοτικού μονοπατιού Ras/Raf/MAPK σε διαδικασίες μάθησης και μνήμης, αλλά μέχρι στιγμής απουσιάζει άμεση απόδειξη.

Η σηματοδότηση μέσω μικρών GTPασών κατά την μάθηση και μνήμη της Δροσόφιλας υποστηρίζεται ισχυρά από τον ελλειμματικό συμπεριφορικό φαινότυπο που παρουσιάζουν, μεταλλαγμένα στελέχη για το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη-προσαρμοστή DRK. Το γονίδιο *drk* κωδικοποιεί μία SH2/SH3 πρωτεΐνη προσαρμοστή και έχει δείχθει ότι δρα άνωθεν της GTPάσης Ras1 κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία της Παβλοβιανής οσφρητικής εξαρτημένης μάθησης, δείξαμε ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη *drk* παρουσιάζουν ελλείματα τόσο στην μάθηση όσο και στη μνήμη. Τα ελλείματα αυτά αποδίδονται στα μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης DRK στα μανιταροειδή σωμάτια (ΜΣ), το νευροανατομικό κέντρο της οσφρητικής μάθησης και μνήμης στα έντομα. Επιπροσθέτως, το μαθησιακό έλλειμα των μεταλλαγμένων στελεχών *drk*, αναστρέφεται με την υπερέκφραση μιας μόνιμα ενεργής μορφής της κινάσης RAF στα ΜΣ, ενώ το έλλειμα στην μνήμη παραμένει. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι επιπλέον σηματοδοτικά μονοπάτια εξαρτώμενα από την πρωτεΐνη DRK αλλά ανεξάρτητα της κινάσης RAF, εμπλέκονται στο σχηματισμό της οσφρητικής μνήμης.

Επεκτείνοντας τις ανωτέρω μελέτες και ερευνώντας τις συνέπειες του φαινοτύπου των *drk* μεταλλαγμένων στελεχών, ελέγξαμε εάν το έλλειμμα που παρουσιάζουν στην μάθηση και μνήμη μπορεί επίσης να αναστραφεί με την υπερέκφραση μόνιμα ενεργών μορφών των πρωτεϊνών Ras1 και Rap, μελών της υποοικογένειας Ras, στα ΜΣ. Έχουμε δείξει ότι και τα τρία κύρια μέλη της υποοικογένειας Ras, οι πρωτεΐνες Ras1, Ras2 και Ras3/Rap1, εντοπίζονται στον εγκέφαλο της Δροσόφιλα. Επιπλέον, προκαταρκτικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση μόνιμα ενεργών διαγονιδιακών μορφών των ανωτέρω πρωτεϊνών επηρεάζουν αρνητικά την οσφρητική μάθηση και μνήμη. Εξ' όσων γνωρίζουμε, τα ανωτέρω αποτελέσματα αποτελούν την πρώτη άμεση απόδειξη ότι οι Ras GTPάσες είναι απαραίτητες στα ενήλικα άτομα κατά τις διαδικασίες μάθησης και μνήμης.

**THE NMDA-INDEPENDENT LONG-TERM POTENTIATION  
OF THE MOSSY FIBER-CA3 SYNAPSES  
IS GREATER IN DORSAL THAN IN VENTRAL HIPPOCAMPUS**

*Christos Moschovos and Costas Papatheodoropoulos  
Physiology Dept., Medical School, University of Patras.*

Hippocampal functions are segregated along the dorso-ventral (septo-temporal) axis of the structure. Notably, dorsal and ventral hippocampus are differently involved in distinct kinds of memory. Furthermore, accumulating evidence show diversification between the different dorso-ventral hippocampal segments at the level of the local neuronal circuit, and examples include the greater NMDA-dependent long-term potentiation (LTP) of synaptic potentials in the dorsal CA1 field compared with its ventral counterpart.

In the present study using recordings of field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) from hippocampal slices we examined the relative ability of the dorsal and ventral mossy fiber-CA3 synaptic connections to produce NMDA-independent LTP. In order to induce LTP, the stimulation protocol of two trains of 1-second, 100 Hz, separated by 5 s, with stimulus intensity set at the level necessary for maximal response (slope of fEPSP) was used. Stimulation was delivered at the hilus and the slices were continuously perfused with medium containing the antagonist of NMDA receptors CPP (10  $\mu$ M). LTP was induced more reliably in DH (17/18, 94%) than in VH (15/20, 75%), although not significantly so. However, LTP was much more robust in DH than in VH. Specifically, fEPSP slope in DH increased by  $42.07 \pm 6.11\%$  ( $n=18$ ) whereas in VH only by  $21.41 \pm 4.51\%$  ( $n=20$ ), ( $P < 0.01$ ; independent t-test). In addition, the magnitude of post-tetanic potentiation was positively correlated with LTP magnitude only in DH ( $r = 0.55$ ,  $P < 0.05$ ). In the presence of the blocker of L-type voltage-dependent-calcium-channels (vdcc) nifedipine (40  $\mu$ M) tetanic stimulation failed to induce LTP in DH ( $n=6$ ) or in VH ( $n=3$ ).

In another set of experiments spontaneous synchronous discharges were induced in the CA3 field by perfusing slices with medium lacking magnesium ions. Application of nifedipine significantly increased the frequency of spontaneous discharges by  $88 \pm 24\%$  (from  $13.70 \pm 2/\text{min}$  to  $24.61 \pm 3/\text{min}$ ,  $n=6$ ;  $P < 0.01$ , paired t-test) and significantly reduced their area by  $74 \pm 6.27\%$  (from  $17.06 \pm 3.85$  to  $8.38 \pm 1.65$ ,  $P < 0.05$ ,  $n=6$ ; paired t-test) only in DH.

These findings show that mossy fiber-CA3 synapses in DH compared with VH display a significantly greater ability to produce NMDA-independent LTP. Furthermore, the participation of vdcc in the CA3 field appear to be higher in DH than in VH, explaining to some extent the different ability of the two poles to produce NMDA-independent LTP.

*Funded by the European Social Fund (ESF), Operational Program for Educational and Vocational Training II (EPEAEK II), and particularly the Program PYTHAGORAS II.*

## Η ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΗ ΕΝΔΥΝΑΜΩΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΑΨΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΒΡΥΩΔΩΝ ΙΝΩΝ ΚΑΙ CA3 ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΕΙΝΑΙ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΣΤΟΝ ΔΙΑΦΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟΝ ΚΡΟΤΑΦΙΚΟ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟ

*Χρήστος Μόσχοβος και Κώστας Παπαθεοδωρόπουλος  
Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών*

Τα διαφορετικά τμήματα του ιπποκάμπου κατά τον επιμήκη άξονά του εμπλέκονται με διαφορετικό τρόπο στις διάφορες λειτουργίες του. Επιπρόσθετα, αυξανόμενα πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι διαφοροποίηση υφίσταται επίσης στο επίπεδο του τοπικού νευρωνικού κυκλώματος, με παράδειγμα την ικανότητα πρόκλησης μακρόχρονης συναπτικής ενδυνάμωσης (ΜΣΕ) στην CA1 περιοχή, που εξαρτάται από τους NMDA υποδοχείς. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας καταγραφές πεδίου του διεγερτικού μετασυναπτικού δυναμικού (ΔΜΔ) από τομές ιπποκάμπου εξετάσαμε την ικανότητα των συνάψεων μεταξύ βρυωδών ινών και CA3 πυραμιδικών κυττάρων να παράγουν NMDA-ανεξάρτητη ΜΣΕ, συγκριτικά μεταξύ διαφραγματικού (ΔΙ) και κροταφικού (ΚΙ) ιπποκάμπου. Για την επαγωγή ΜΣΕ χρησιμοποιήθηκε ερεθισμός με ένταση που προκαλούσε μέγιστη συναπτική απάντηση και το πρωτόκολλο που συνίστατο σε δύο περιόδους ερεθισμού διάρκειας 1 s η καθεμιά με συχνότητα 100 Hz (εντός περιόδου) και διάστημα μεταξύ των δύο περιόδων 5 s. Ο ερεθισμός επιδίδονταν στην περιοχή της πύλης της οδοντωτής ταινίας και οι τομές διαβρέχονταν με διάλυμα που περιείχε τον αποκλειστή των υποδοχέων NMDA CPP (10 μM). Η ΜΣΕ επαγόταν με μεγαλύτερη επιτυχία στον ΔΙ σε σχέση με τον ΚΙ (17/18 ΡΤ και 15/20 ΚΤ) αλλά σε όχι στατιστικά σημαντικό βαθμό. Το μέγεθος της ΜΣΕ ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στον ΔΙ ( $42,07 \pm 6,11$  %  $n=18$ ) σε σχέση με τον ΚΙ ( $21,41 \pm 4,51$  %,  $n=20$ ,  $p=0,009$ , independent t-test). Παρουσιάστηκε θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του ποσού της μετατετανικής ενδυνάμωσης και του μεγέθους της ΜΣΕ μόνο στις ραχιαίες τομές (Pearson test,  $r = 0,55$  και  $p = 0,017$ ). Παρουσία του ανταγωνιστή των τασεοελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου (L-type) νιφεδιπίνη (40 μM) ο τετανικός ερεθισμός δεν οδηγούσε σε ΜΣΕ τόσο στις ραχιαίες ( $n = 6$ ) όσο και στις κοιλιακές τομές ( $n = 3$ ).

Σε μια άλλη σειρά πειραμάτων, αυθόρμητες σύγχρονες εκφορτίσεις προκλήθηκαν με διαβροχή των τομών με διάλυμα χωρίς ιόντα μαγνησίου. Η παρουσία της νιφεδιπίνης (40 μM) αύξησε τη συχνότητα των εκφορτίσεων στον ΔΙ κατά  $88 \pm 24$  % (από  $13,70 \pm 2/\text{min}$  σε  $24,61 \pm 3/\text{min}$ ,  $P<0,01$ , paired t-test,  $n = 6$ ) και μείωσε την επιφάνειά τους κατά  $48,74 \pm 6,27$ % (από  $17,06 \pm 3,85$  σε  $8,38 \pm 1,65$ ,  $P<0,05$ , paired t-test,  $n=6$ ). Το φάρμακο σε αυτή τη συγκέντρωση δεν εμφάνισε σημαντική επίδραση στις εκφορτίσεις του ΚΙ.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι συνάψεις μεταξύ των βρυωδών ινών και των CA3 πυραμιδικών κυττάρων παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα για ΜΣΕ που δεν εξαρτάται από τους NMDA υποδοχείς. Επιπρόσθετα, η συμμετοχή των τασεοελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου στην CA3 περιοχή του ιπποκάμπου φαίνεται να είναι ευρύτερη στν ΔΙ απότι στον ΚΙ, γεγονός που θα μπορούσε να ερμηνεύσει σε κάποιο βαθμό την διαφορά μεταξύ των δυο περιοχών για ΜΣΕ που επάγεται ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA.

*Η μελέτη αυτή χρηματοδοτήθηκε από the European Social Fund (ESF), Operational Program for Educational and Vocational Training II (EPEAEK II), and particularly the Program PYTHAGORAS II.*



## THE EFFECT OF PERINATAL HYPOXIA ON THE DOPAMINERGIC SYSTEMS OF THE MESENCEPHALON IN THE HUMAN BRAIN

*Pagida M.<sup>1,2</sup>, Konstantinidou A.<sup>3</sup>, Tsekoura E.<sup>4</sup>, Kontostavlaki D.<sup>1,2</sup>, Patsouris E.<sup>3</sup> and Panayotacopoulou M.<sup>1,2</sup>*

*<sup>1</sup>Department of Psychiatry, <sup>2</sup>University Mental Health Research Institute, <sup>3</sup>Department of Pathology and <sup>4</sup>3<sup>rd</sup> Children's Hospital, University of Athens, Greece*

Epidemiological studies implicated perinatal insults as etiological risk factors for schizophrenia and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Hypoxic conditions during the last trimester or during the intrapartum period could cause long-term damages to the central nervous system leading to behavioral deficits appearing later in development. Experimental models of perinatal hypoxia indicated selective long-standing changes not only in the hippocampus but also in the dopaminergic (DA) systems. They also showed that birth hypoxic insults might interact with stress to alter dopaminergic function in adulthood.

In the present study, we investigated the expression of tyrosine hydroxylase (TH, the first and limited enzyme of the catecholamine biosynthesis) in locus coeruleus, substantia nigra (SN) and ventral tegmental area (VTA) of neonates that died from perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Our material consisted of the brains of 10 full term neonates with total (pre- and postnatal) age of 37-47 weeks. Autopsies were performed following written consent of their parents. The evaluation of the severity and duration of the perinatal hypoxic insult was based on clinical data and the severity of neuropathological lesions. The brain tissues were embedded in paraffin, serially sectioned and stained immunohistochemically for TH in selected levels for morphometric analysis.

Our results showed interindividual differences between the newborns of our sample concerning both the number of TH-immunoreactive (IR) neurons, as well as the intensity of the immunohistochemical reaction. It was also observed that hypoxia does not affect all the catecholaminergic neurons of the brainstem in the same degree. SN and VTA were found to be especially vulnerable to perinatal hypoxia. In neonates who died after prolonged hypoxic insult, severe reduction in number and intensity of TH-IR neurons were observed. However, in neonates with short perinatal hypoxia, SN and VTA showed normal development and morphology similar to that observed in the adult. Based on literature indicating that the development of DA systems is completed from 22<sup>nd</sup> week of gestation onwards, we suggest that this selective reduction of TH in DA systems of the human neonate is due to prolonged perinatal hypoxia. Since SN and VTA innervate basal ganglia and prefrontal cortex respectively, our results could explain both the motor and cognitive disturbances observed in children who survived after prolonged perinatal hypoxic insult.

## ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ ΣΤΑ ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΕΣΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ

Παγίδα Μ.<sup>1,2</sup>, Κωνσταντινίδου Α.<sup>3</sup>, Τσεκούρα Ε.<sup>4</sup>, Κοντοσταυλάκη Δ.<sup>1,2</sup>, Πατσούρης Ε.<sup>3</sup> και Παναγιωτακοπούλου Μ.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ψυχιατρική Κλινική, <sup>2</sup>Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Ινστιτούτο Ψυχικής Υγιεινής, <sup>3</sup>Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής και <sup>4</sup>3<sup>η</sup> Παιδιατρική Κλινική, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Επιδημιολογικές μελέτες ενοχοποιούν τις μαιευτικές επιπλοκές σαν αιτιολογικούς παράγοντες κινδύνου για τη σχιζοφρένεια και τη διαταραχή ελαττωμένης προσοχής με υπερκινητικότητα (ADHD). Υποξικές συνθήκες κατά το τελευταίο τρίμηνο ή περί τον τοκετό μπορούν να προκαλέσουν μακράς διάρκειας αλλοιώσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα και να οδηγήσουν σε προβλήματα συμπεριφοράς που εμφανίζονται αργότερα στη μετέπειτα αναπτυξιακή πορεία του παιδιού. Πειραματικά μοντέλα περιγεννητικής υποξίας έδειξαν ειδικές –μακράς διάρκειας- αλλοιώσεις όχι μόνο στον ιππόκαμπο αλλά και στα ντοπαμινεργικά (DA) συστήματα του εγκεφάλου. Υποξικές βλάβες κατά τον τοκετό φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν με το στρες με αποτέλεσμα να τροποποιούν τη DA λειτουργία του εγκεφάλου στην ενήλικη ζωή.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την έκφραση της υδροξυλάσης της τυροσίνης (TH, πρώτο και καθοριστικό ένζυμο για τη σύνθεση των κατεχολαμινών) στον υπομέλανα τόπο, τη μέλαινα ουσία (SN) και την κοιλιακή καλυπτρική περιοχή (VTA) του εγκεφάλου νεογνών που κατέληξαν με διάγνωση υποξικής- ισχαιμικής εγκεφαλοπάθειας. Το υλικό μας απετέλεσαν εγκέφαλοι από 10 τελειόμηνα νεογνά συνολικής (προ- και μεταγεννητικής) ηλικίας 37-47 εβδομάδων. Το νεκροτομικό υλικό πάρθηκε κατόπιν γραπτής συγκατάθεσης των γονέων τους. Η εκτίμηση της διάρκειας και της έντασης της περιγεννητικής υποξίας έγινε με βάση την κλινική εικόνα και τη βαρύτητα των νευροπαθολογικών αλλοιώσεων. Οι ιστοί εγκλείστηκαν σε παραφίνη, κόπηκαν σε συνεχόμενες τομές και βάφτηκαν ανοσοϊστοχημικά για την TH σε προκαθορισμένα επίπεδα για μορφομετρική ανάλυση.

Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι μεταξύ των νεογνών του δείγματός μας υπάρχουν διαφορές τόσο στον αριθμό των ανοσοθετικών για την TH (TH-IR) νευρώνων όσο και στην ένταση της ανοσοϊστοχημικής αντίδρασης. Η υποξία δεν επιδρά με όμοιο τρόπο στις διαφορετικές κατεχολαμινικές περιοχές του στελέχους. Ιδιαίτερα ευάλωτες ήταν η SN και η VTA. Στα νεογνά που κατέληξαν με υποξία παρατεταμένης διάρκειας παρατηρήθηκε έντονη ελάττωση του αριθμού των TH-IR νευρώνων και της έντασης της ανοσοϊστοχημικής αντίδρασης. Αντίθετα, στα νεογνά με υποξία μικρής διάρκειας οι DA αυτές περιοχές εμφανίζουν κανονική ανάπτυξη και μορφολογία αντίστοιχη με εκείνη που παρατηρείται στον ενήλικα άνθρωπο. Με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η ανάπτυξη των DA συστημάτων έχει ολοκληρωθεί ήδη από την 22<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης θεωρούμε ότι η εκλεκτική αυτή μείωση της TH είναι αποτέλεσμα της επίδρασης της παρατεταμένης περιγεννητικής υποξίας στα DA συστήματα του μεσεγκεφάλου. Δεδομένου ότι οι SN και VTA προβάλλουν στα βασικά γάγγλια και τον προμετωπιαίο λοβό αντίστοιχα, τα ευρήματά μας συμβάλλουν στην κατανόηση τόσο των κινητικών όσο και των νοητικών δυσλειτουργιών που εμφανίζονται σε παιδιά που κατάφεραν να επιζήσουν μετά από περιγεννητική υποξία παρατεταμένης διάρκειας.

## DEVELOPMENT OF ANGIOGENESIS AFTER CHRONIC ADMINISTRATION OF HUMAN RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN (rHuEPO) IN INTACT MOUSE BRAIN

*Olga Pagonopoulou<sup>1</sup>, Anna Efthimiadou<sup>1</sup>, Maria Lambropoulou<sup>2</sup> and Nikos Nikolettos<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Laboratory of Physiology and <sup>2</sup>Laboratory of Histology and Embryology, Medical School, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, 68100, Greece*

Erythropoietin (EPO), a cytokine known mainly to regulate erythroid proliferation, has also been implicated in apoptosis and oxidative stress attenuation and promotion of angiogenesis. This angiogenic effect was shown to different tissues (1). Systemically administered EPO has been shown to exert beneficial effects in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage (2) and stroke (3). So far, all studies concerning the angiogenic effect of EPO were performed after an experimentally induced stroke or subarachnoid haemorrhage. In our study, we examined the possible angiogenic effect of chronic treatment with rHuEPO under physiological conditions in an attempt to clarify if a lesion or an oxygen deprivation condition is needed to initiate the angiogenic effect of EPO.

Balb C mice, weighing 20-25gr, 3 months old were used. Group A received no treatment, Group B received saline only and Group C received 7000 U rHuEPO per week for three weeks by intraperitoneal (i.p.) injection. Sagittal sections (2  $\mu$ m thick) of mouse brains were stained with conventional haematoxylin and eosin (H&E). Unstained slides were obtained for the detection of CD31 and CD34 monoclonal mouse anti-human lyophilised antibody which recognize the surface antigens CD31 and CD34, respectively, of endothelial cells. The number of CD31- and CD34-positive endothelial cells was assessed in mouse brain preparations under control conditions and after treatment with rHuEPO.

There was no difference between the mean numbers of CD31 and CD34 cells among the different groups. The mean number of vessels in Group A (no treatment) and Group B (saline treatment) was almost the same ( $18 \pm 2$  vessels p.o.f). The number of brain vessels in Group C (EPO treatment) was increased significantly by 44% compared to controls ( $26 \pm 4$  vessels p.o.f.,  $P < 0.05$ ).

These data indicate that no lesion or oxygen deprivation is needed to initiate the angiogenic effect of erythropoietin in brain vessels.

1. A. Efthimiadou, O. Pagonopoulou, M. Lambropoulou, N. Papadopoulos and NK Nikolettos. (2007) *Erythropoietin enhances angiogenesis in an experimental cyclosporine A-induced nephrotoxicity model in the rat. Clin Exp Pharm Physiol* 34: 866-869.
2. G. Grasso, M. Buemi, C. Alafaci et al. (2002) *Beneficial effects of systemic administration of rHuEPO in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage. PNAS* 99(8): 5627-5631.
3. L. Wang et al (2004) *Treatment of stroke with erythropoietin enhances angiogenesis and improves neurological function in rats. Stroke* 35: 1732-1737.

## ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΤΟΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΥΓΙΩΝ ΜΥΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΡΟΝΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ.

Όλγα Παγωνοπούλου<sup>1</sup>, Άννα Ευθυμιάδου<sup>1</sup>, Μαρία Λαμπροπούλου<sup>2</sup> και Νίκος Κ. Νικολέττος<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Φυσιολογίας και <sup>2</sup>Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Ιατρικό Τμήμα, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη, 68100

Η ερυθροποιητίνη, μία κυτοκίνη κυρίως γνωστή ως παράγοντας ρύθμισης της ερυθροποίησης, έχει επίσης αποδειχθεί ότι συμμετέχει στην βελτίωση των συμπτωμάτων απόπτωσης και οξειδωτικού στρες καθώς και στην προαγωγή της αγγειογένεσης. Ιδιαίτερα η αγγειογενετική δράση της έχει δείχθει σε διάφορους ιστούς (1). Συστηματική χορήγηση ανθρώπινης ανασυνδυασμένης ερυθροποιητίνης (rHuEPO) είχε ευεργετικά αποτελέσματα όταν χορηγήθηκε σε κουνέλια μετά από υπαραχνοειδή αιμορραγία (2) καθώς και μετά από εγκεφαλικό επεισόδιο (3). Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε την πιθανότητα αγγειογενετικής δράσης της rHuEPO σε υγιείς μύες, σε μία προσπάθεια να αποσαφηνισθεί εάν η κατάσταση υποξίας είναι απαραίτητη για την έναρξη της αγγειογενετικής δράσης της EPO.

Χρησιμοποιήθηκαν Bulb C ποντίκια, βάρους 20-25gr, ηλικίας 3 μηνών σε τρεις ομάδες: Η ομάδα Α χωρίς καμία αγωγή, η ομάδα Β έλαβε φυσιολογικό ορό ενδοπεριτοναϊκά και η ομάδα C έλαβε 7000UH<sub>u</sub>EPO/εβδομάδα για τρεις εβδομάδες ενδοπεριτοναϊκά. Σε κάποιες επιμήκεις τομές εγκεφάλου (πάχους 2μm) έγινε χρώση αιματοξυλίνης & εωσίνης ενώ σε αντίστοιχες τομές εφαρμόστηκε ανοσοϊστοχημική μέθοδος με χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31 και CD34 τα οποία αναγνωρίζουν τα επιφανειακά αντιγόνα CD31 και CD34 της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων αντίστοιχα. Ο αριθμός των CD31 και CD34 θετικών ενδοθηλιακών κυττάρων υπολογίστηκε με μικροσκοπηση.

Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του αριθμού των CD31 και CD34 θετικών ενδοθηλιακών κυττάρων σε όλες τις ομάδες. Επίσης η μέση τιμή των αγγείων στην ομάδα Α (χωρίς αγωγή) και στην ομάδα Β (αγωγή με φυσιολογικό ορό) ήταν παρόμοια. Στην ομάδα η οποία είχε λάβει την αγωγή με ερυθροποιητίνη, η μέση τιμή των αγγείων ανά οπτικό πεδίο ήταν σημαντικά αυξημένη κατά 44% σε σχέση με τους μάρτυρες της ομάδας Β (26±4 αγγεία ανά οπτικό πεδίο για την ομάδα C σε σχέση με 18±2 για την ομάδα Β, p<0.05).

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας υποδεικνύουν ότι η αγγειογενετική δράση της ερυθροποιητίνης δεν συνδυάζεται απαραίτητα με βλάβη του συστήματος αγγείων του εγκεφάλου ή κατάσταση υποξίας αλλά μπορεί να ενεργοποιηθεί και σε υγιή εγκέφαλο.

4. A. Efthimiadou, O. Pagonopoulou, M. Lambropoulou, N. Papadopoulos and NK Nikolettos. (2007) Erythropoietin enhances angiogenesis in an experimental cyclosporine A-induced nephrotoxicity model in the rat. *Clin Exp Pharm Physiol* 34: 866-869.
5. G. Grasso, M. Buemi, C. Alafaci et al. (2002) Beneficial effects of systemic administration of rHuEPO in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage. *PNAS* 99(8): 5627-5631.
6. L. Wang et al (2004) Treatment of stroke with erythropoietin enhances angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 35: 1732-1737.

## ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECT OF SOMATOSTATIN USING THE FORCED SWIM TEST DEPRESSION MODEL

*Eleftherios Pallis, Katerina Antoniou<sup>a</sup>, Zeta Papadopoulou-Daifoti, Kyriaki Thermos<sup>b</sup>, and Christina Spyraiki<sup>†</sup>*

*Laboratory of Pharmacology, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens,  
<sup>a</sup>University of Ioannina, <sup>b</sup>University of Crete, Greece.*

The neuropeptide somatostatin-14 mediates a variety of physiological and distinct behavioral actions by interacting with five somatostatin receptor subtypes (sstr<sub>1-5</sub>). It has been implicated in various CNS disorders, including depression. Previous studies from our laboratory have shown somatostatinergic changes after citalopram and DMI antidepressant administration in rats. The aim of the present study was to investigate directly the antidepressive potential of somatostatin using the forced swim test paradigm (FST), a behavioural despair animal model of depression. Male Sprague-Dawley rats (270-330 g) were used in all experiments and all procedures were performed in accordance with the EU guidelines for care and use of experimental animals. Different doses of somatostatin-14 or saline (control group) were administered bilaterally through stereotaxically implanted stainless-steel guide cannulae in the nucleus accumbens, a nucleus with established participation in affective disorders. Control group displayed the well known behavioural despair in the FST paradigm (floating duration was increased during test session compared with the pre-test session,  $p=0.05$ ). Somatostatin-14 injections at doses of 60, 120, 240, 360 and 480 ng/0.5  $\mu$ l/side (five min before test session) produced significant changes in the different responses of the FST as follows: 120 ng, decrease in floating duration ( $p<0.001$ ) and increase in swimming duration ( $p<0.001$ ), 240 ng, decrease in floating duration ( $p<0.001$ ) and increase in swimming duration ( $p<0.001$ ), 360 ng, decrease in floating duration ( $p<0.05$ ) and increase in swimming duration ( $p=0.001$ ), 480 ng decrease in floating duration ( $p<0.001$ ) and increase in swimming duration ( $p<0.001$ ). These data reaffirm the implication of the somatostatinergic system in the pathophysiology and therapeutics of depression and provide evidence for a putative antidepressant action of somatostatin-14.

## ΑΝΤΙΚΑΤΑΘΛΙΠΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΣΤΑΤΙΝΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΤΗΣ ΕΞΑΝΑΓΚΑΣΜΕΝΗΣ ΚΟΛΥΜΒΗΣΗΣ

Ελ. Πάλλης, Κ. Αντωνίου<sup>α</sup>, Ζ. Παπαδοπούλου-Νταϊφώτη, Κ. Θερμού<sup>β</sup>, Χ. Σπυράκη<sup>+</sup>

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,<sup>α</sup>  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,<sup>β</sup> Πανεπιστήμιο Κρήτης

Το νευροπεπτίδιο σωματοστατίνη-14 συμμετέχει σε μεγάλο αριθμό φυσιολογικών και συμπεριφορικών δράσεων μέσω επίδρασης σε πέντε υπότυπους υποδοχέα (sstr<sub>1-5</sub>). Η σωματοστατίνη εμπλέκεται σε διάφορες διαταραχές του ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένης και της καταθλιπτικής διαταραχής. Προηγούμενες μελέτες στο Εργαστήριο μας, παρουσιάζουν μεταβολές του σωματοστατινεργικού συστήματος μετά από χορήγηση των αντικαταθλιπτικών δεσιπραμίνη και σιταλοπράμη. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της άμεσης αντικαταθλιπτικής δράσης της σωματοστατίνης, με τη χρήση της εξαναγκασμένης κολύμβησης (forced swim test-FST), ενός πειραματικού μοντέλου κατάθλιψης που εκφράζει τη συμπεριφορική απελπισία. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί επίμυες Sprague-Dawley (270-330 g) και όλες οι πειραματικές διαδικασίες ήταν σύμφωνες με τις ευρωπαϊκές κατευθυντήριες οδηγίες για τη χρήση των πειραματοζώων. Με στεροταξική χειρουργική εμφυτεύθηκαν, αμφίπλευρα, ανοξείδωτοι οδηγοί σωληνίσκοι (guide cannulae) στον επικλινή πυρήνα, ο οποίος έχει τεκμηριωμένη συμμετοχή στις συναισθηματικές διαταραχές όπως η κατάθλιψη. Κατά την πειραματική διαδικασία (τη δεύτερη ημέρα της εξαναγκασμένης κολύμβησης και πέντε min προ της έναρξης της) έγινε, μέσω των οδηγών σωληνίσκων, έγχυση στον επικλινή πυρήνα πέντε δόσεων σωματοστατίνης ή φυσιολογικός ορός (ομάδα ελέγχου). Τα πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου παρουσίασαν την πειραματικά γνωστή συμπεριφορική απελπισία του μοντέλου της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST paradigm) αυξάνοντας τη διάρκεια επίπλευσης, ( $p=0.05$ ) κατά την πειραματική δοκιμασία (test session) συγκριτικά με την προ-πειραματική δοκιμασία (pre-test session). Η αμφίπλευρη έγχυση σωματοστατίνης-14 σε δόσεις των 60, 120, 240, 360 και 480 ng/0.5 μl, 5 min πριν την έναρξη της κολύμβησης, προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στις συμπεριφορικές αποκρίσεις του μοντέλου FST ως εξής: 120 ng, μείωση της διάρκειας επίπλευσης ( $p<0.001$ ) και αύξηση της διάρκειας κολύμβησης ( $p<0.001$ ), 240 ng, μείωση της διάρκειας επίπλευσης ( $p<0.001$ ) και αύξηση της διάρκειας κολύμβησης ( $p<0.001$ ), 360 ng, μείωση της διάρκειας επίπλευσης ( $p<0.05$ ) και αύξηση της διάρκειας κολύμβησης ( $p=0.001$ ), 480 ng μείωση της διάρκειας επίπλευσης ( $p<0.001$ ) και αύξηση της διάρκειας κολύμβησης ( $p<0.001$ ). Αυτά τα δεδομένα επαναβεβαιώνουν τη συμμετοχή του σωματοστατινεργικού συστήματος στην παθοφυσιολογία και τη θεραπευτική της κατάθλιψης και παρέχουν ενδείξεις για πιθανή αντικαταθλιπτική δράση της σωματοστατίνης-14.

## NEUROLIGIN (NLGN3/NLGN4) CONTRIBUTION REGARDING AUTISTIC BEHAVIOUR

*Pampanos A.<sup>1</sup>, Volaki K.<sup>1</sup>, Papadaki-Papandreou O.<sup>2</sup>, Thomaidou L.<sup>2</sup>, Giouroukos S.<sup>2</sup>, Kanavakis E.<sup>1</sup>, Kitsiou-Tzeli S.<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup> *Department of Medical Genetics, Medical School, Athens University, Aghia Sophia Children 's Hospital, Athens, Greece*

<sup>2</sup> *First Department of Pediatrics, Athens University, Aghia Sophia Children's Hospital, Athens, Greece*

Autism Spectrum Disorders (A.S.D.) belong to the group of neurodevelopmental disorders and are characterized by difficulty in social adaptation and interpersonal communication as well as stereotypical behaviours. Epidemiologic studies report an ASD prevalence of 5-10/10.000, with a male to female ratio of 3-4:1.

The contribution of neuroligins (NLGN3/NLGN4) towards the development of ASD concerns the scientific community. NLGN3, which lies at the X chromosome (Xq13), is a postsynaptic cell-adhesion protein. It is thought to play an important role in synaptogenesis and synapse remodelling in the neuronal circuitry of the brain. Its missense mutation R451C leads to reduced adhesion with the presynaptic protein neurexin due to defective neuroligin trafficking and retention of the protein to the endoplasmic reticulum, whereas the silent mutation Y74Y does not induce any change to the structure of the protein. Thus, it represents a good functional candidate for ASD as mutations have been found in individuals with the disorder (1, 2).

We present the results of our molecular study concerning the NLGN3 gene in ASD patients as well as their first-degree relatives when compared to a healthy control group. The population studied includes 367 individuals (169 children, 154 mothers, 33 fathers and 11 first-degree relatives (brothers/sisters)). All patients with autistic behaviour were evaluated by neurologists and psychiatrists according to the DSM-IV criteria. In addition, all patients were examined by clinical geneticists and chromosomal aberrations as well as Fragile X syndrome were excluded.

The mutations Y74Y and R451C of the NLGN3 gene were screened in our sample. In total, 367 samples were examined with ARMS PCR but none of them was positive for the mutation Y74Y. The dHPLC screen for the R451C mutation has so far been performed in 200 out of 367 samples. These samples did not prove positive for the existence of this mutation.

This is the first molecular study of individuals with ASD in Greece. In our sample, the research performed did not reveal the Y74Y or R451C mutations in the NLGN3 gene. The study will be completed and will extend to screen the NLGN4 gene, which is also a candidate for ASD (3). The final results will allow for a genotype-phenotype correlation in the Greek population.

1. *Ylisaukko-oja T, et al. Analysis of four neuroligin genes as candidates for autism. Eur J Hum Genet 2005; 13(12): 1285-1292.*
2. *Jamain S, et al. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. Nat Genet. 2003; 34(1): 27-9.*
3. *Laumonnier F, et al. X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. Am J hum Genet 2004; 74(3): 552.*

## ΣΥΜΒΟΛΗ ΝΕΥΡΟΛΙΓΙΝΩΝ (NLGN3/NLGN4) ΣΤΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΑΥΤΙΣΤΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ

Πάμπανος Α.<sup>1</sup>, Βολάκη Κ.<sup>1</sup>, Παπαδάκη- Παπανδρέου Ο.<sup>2</sup>, Θωμαΐδου Α.<sup>2</sup>, Γιουρούκος Σ.<sup>2</sup>, Καναβάκης Ε.<sup>1</sup>, Κίτσιου-Τζέλη Σ.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παιδών «Αγία Σοφία»

<sup>2</sup> Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παιδών «Αγία Σοφία»

Η αυτιστική συμπεριφορά ανήκει στις νευροαναπτυξιακές παθήσεις και χαρακτηρίζεται από δυσκολίες στην κοινωνική προσαρμογή και διαπροσωπική επικοινωνία καθώς και στερεότυπη συμπεριφορά. Η συχνότητα ατόμων με αυτιστική συμπεριφορά ποικίλης βαρύτητας είναι περίπου 5-10 ανά 10.000 (4), με αναλογία αρρένων/θηλέων 3-4:1.

Η συμβολή των νευρολιγινών (NLGN3/NLGN4) στη διαμόρφωση της αυτιστικής συμπεριφοράς απασχολεί τελευταίως την ιατρική κοινότητα τόσο σε ερευνητικό όσο και σε κλινικό επίπεδο. Το γονίδιο NLGN3 ανευρίσκεται στο χρωμόσωμα X (θέση Xq13) και κωδικοποιεί μία μετασυναπτική πρωτεΐνη κυτταρικής προσκόλλησης. Θεωρείται ότι προάγει τη συναπτογένεση και την ταξινόμηση των συνάψεων στο νευρικό σύστημα του εγκεφάλου. Η παρερμηνεύσιμη της μετάλλαξη R451C οδηγεί σε μειωμένη προσκόλληση με την προσυναπτική πρωτεΐνη νευρεξίνη λόγω ελαττωματικής κυτταροπλασματικής μεταφοράς και κατακράτησής της στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ η σιωπηρή μετάλλαξη Y74Y δεν προκαλεί αλλαγή στην πρωτεϊνική δομή (1, 2).

Παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της γονιδιακής μελέτης ασθενών με αυτιστική συμπεριφορά αλλά και συγγενών αυτών α' βαθμού στο γονίδιο της Νευρολιγίνης 3 (NLGN3), καθώς και η συσχέτιση των ευρημάτων με υγιή άτομα που αποτελούν την ομάδα ελέγχου.

Το δείγμα μας αποτελείται από 169 παιδιά, 154 μητέρες, 33 πατέρες και 11 συγγενείς α' βαθμού (αδέλφια). Όλοι οι ασθενείς με αυτιστική συμπεριφορά ελέγχθηκαν και αξιολογήθηκαν από νευρολόγους και ψυχιάτρους σύμφωνα με τα κριτήρια DSM-IV και εξετάστηκαν από κλινικούς γενετιστές ώστε να αποκλεισθούν όσοι από αυτούς έφεραν χρωμοσωμικές ανωμαλίες καθώς και το σύνδρομο του Ευθραύστου X.

Στο σύνολο των 367 δειγμάτων που ελεγχθήκαν με τη μέθοδο ARMS PCR, κανένα δεν έδωσε προϊόν για τη μετάλλαξη Y74Y. Όσον αφορά δε τη μετάλλαξη R451C, ο μέχρι στιγμής έλεγχος των 200 από τα 367 δείγματα με dHPLC δεν έχει δώσει θετικό αποτέλεσμα ως προς την παρουσία της συγκεκριμένης μετάλλαξης.

Δεδομένου ότι είναι η πρώτη μοριακή μελέτη ατόμων με αυτιστική συμπεριφορά στην Ελλάδα, ο μέχρι στιγμής έλεγχος δεν εντόπισε τις μεταλλάξεις που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Η έρευνα θα συνεχιστεί και θα επεκταθεί στις μεταλλάξεις: 1186insT και nt1253del(AG) του γονιδίου της Νευρολιγίνης 4 (NLGN4) (3). Τα τελικά αποτελέσματα θα συμβάλλουν στη συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου στον Ελληνικό πληθυσμό.

4. Ylisaukko-oja T, et al. Analysis of four neuroligin genes as candidates for autism. *Eur J Hum Genet* 2005; 13(12): 1285-1292.
5. Jamain S, et al. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet.* 2003; 34(1): 27-9.
6. Laumonnier F, et al. X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J hum Genet* 2004; 74(3): 552-7



## BEHAVIORAL AND NEUROBIOLOGICAL ALTERATIONS IN ADULTHOOD ASSOCIATED WITH EARLY LIFE SEIZURES

Papalexi E<sup>1,2</sup>, Dosi M<sup>1</sup>, Chouliara O<sup>1</sup>, Liasko R<sup>2</sup>, Marselos M<sup>1</sup>, Psarropoulou C<sup>2</sup> and Antoniou K<sup>1</sup>

(1) Dept. Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Ioannina, Ioannina, Greece (2) Lab. Physiology, Dept. Biological Applications and Technologies, Faculty of Science and Technology, University of Ioannina, Ioannina, Greece

Status epilepticus (SE) is more prevalent in children than in adults and is highly associated with cognitive deficits in adulthood. Although the high incidence of seizures during infancy reflects the susceptibility of the immature brain, there is limited evidence on the long-term behavioral and neurobiological consequences of early seizures. A variety of experimental animal models has been developed in order to clarify the impact of early life seizures in the CNS function. Pentylentetrazol (PTZ), a GABA<sub>A</sub> receptor antagonist causes convulsions that model primary generalized epilepsy. In the present study the long-term effects of PTZ administration (70mg/kg, i.p.), in early life of male (9 controls, 12 PTZ-treated) and female (19 controls, 15 PTZ-treated) rats (P18-20), were examined. Behavioral responses such as open field activity, novel object recognition and water maze performance were assessed in adult rats of both sexes. BDNF protein levels were also measured in the hippocampus. Adult Female, but not Male, PTZ-treated animals presented a reduced motor activity. An impaired ability to recognize a novel object was detected in Adult Male, but not Female, PTZ-treated animals. The same experimental group displayed learning but not memory impairment in the Morris water maze test. Moreover, BDNF hippocampal protein levels were significantly reduced in Male but not Female PTZ-treated animals. These findings suggest that a sustained early life convulsion induced sex dependent behavioral changes linked to reaction to novelty, spatial and non- spatial memory performance along with alterations in neurobiological parameters indicating neuroplasticity. These changes are important for animal survival, although not directly linked to adult life epilepsy manifestations.

*The research Project is co-funded by the European Union - European Social Fund (ESF) & National Sources, in the framework of the program "Pythagoras II".*

## ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΕΣ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗΝ ΕΝΗΛΙΚΗ ΖΩΗ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΕΠΙΛΗΠΤΙΚΕΣ ΚΡΙΣΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΗΛΙΚΙΑ

Παπαλέξη  $E^{1,2}$ , Δόση  $M^1$ , Χουλιάρη  $O^1$ , Λιάσκο  $P^2$ , Μαρσέλος  $M^1$ , Ψαρροπούλου  $K^2$  και Αντωνίου  $K^1$

(1) Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα, (2)

Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο

Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα

Το status epilepticus είναι περισσότερο διαδεδομένο στα παιδιά από ότι στους ενήλικες και σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με ελλείμματα γνωσιακού τύπου κατά την ενήλικη ζωή. Αν και η μεγάλη συχνότητα εμφάνισης των επιληπτικών κρίσεων κατά τη νηπιακή ηλικία αντανακλά την ευαισθησία του εγκεφάλου που δεν έχει ωριμάσει ακόμη, υπάρχουν περιορισμένες αποδείξεις για τις μακροπρόθεσμες συνέπειες των πρώιμων αυτών επιληπτικών κρίσεων σε συμπεριφορικές και νευροβιολογικές παραμέτρους. Ποικίλα πειραματικά ζωικά μοντέλα έχουν αναπτυχθεί για να αποσαφηνίσουν την επίδραση των πρώιμων επιληπτικών κρίσεων στη λειτουργία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Η πεντυλενετετραζόλη (PTZ), ένας ανταγωνιστής του  $GABA_A$  υποδοχέα προκαλεί επιληπτικούς σπασμούς προσομοιάζοντας το status epilepticus. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι μακροπρόθεσμες επιπτώσεις της χορήγησης PTZ (70mg/kg, ενδοπεριτοναικά) σε αρσενικούς (9 μάρτυρες, 12 PTZ) και θηλυκούς (19 μάρτυρες, 15 PTZ) νεαρούς (P18-20) επίμυες. Συμπεριφορικές παράμετροι όπως η δραστηριότητα σε ανοιχτό πεδίο, η αναγνώριση νέου αντικειμένου καθώς και οι επιδόσεις στον υδάτινο λαβύρινθο εκτιμήθηκαν σε ενήλικες επίμυες και των δυο φύλων. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης του BDNF μετρήθηκαν επίσης στον ιππόκαμπο. Οι ενήλικες θηλυκοί αλλά όχι και οι αρσενικοί επίμυες που τους είχε χορηγηθεί το PTZ παρουσίασαν μειωμένη κινητικότητα. Περιορισμένη ικανότητα αναγνώρισης ενός νέου αντικειμένου ανιχνεύθηκε στους ενήλικες αρσενικούς αλλά όχι στους θηλυκούς επίμυες. Η ίδια πειραματική ομάδα παρουσίασε μειωμένη απόδοση στη διαδικασία της μάθησης αλλά όχι στη μνημονική ανάκληση στον υδάτινο λαβύρινθο κατά Morris. Επιπλέον, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του BDNF στον ιππόκαμπο ήταν σημαντικά ελαττωμένα στους αρσενικούς αλλά όχι στους θηλυκούς PTZ επίμυες. Τα ευρήματα αυτά προτείνουν ότι οι συνεχόμενοι επιληπτικοί σπασμοί σε πρώιμη ηλικία προκάλεσαν διαφυλικές μεταβολές στη συμπεριφορά οι οποίες συνδέονται με την αντίδραση στο νέο περιβάλλον, τη χωρική και μη-χωρική μνήμη σε συνδυασμό με αλλαγές σε νευροβιολογικές παραμέτρους που υποδεικνύουν νευροπλαστικότητα. Οι μεταβολές αυτές είναι σημαντικές για την επιβίωση αν και δεν συνδέονται άμεσα με επιληπτικές εκδηλώσεις κατά την ενήλικη ζωή.

Το ερευνητικό πρόγραμμα συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση – Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και Εθνικές Πηγές, στα πλαίσια του προγράμματος «Πυθαγόρας II»

## BEHAVIORAL CHANGES IN ADULT FEMALE RATS AFTER CHRONIC MODERATE DOSES OF ETHANOL

*Papalexi E., Zisi S., Iliopoulou M., Kardari I., Kloukina V., Komini C., Malandraki S. and Psarropoulou C.*

*Lab. of Animal & Human Physiology, Dept. Biological Applications and Technologies, Faculty of Science and Technology, University of Ioannina, Ioannina, 45110, Greece*

Chronic alcohol consumption is known to affect the CNS function at different levels, causing neuronal damage and behavioral deficits in humans. A variety of behavioral tests conducted in laboratory animals has confirmed that chronic heavy alcohol consumption induces remarkable learning and memory disturbances. However, recent data suggest that moderate long term ethanol consumption may beneficially affect cognition in humans and experimental studies are being conducted to clarify the underlying mechanism. In this study, we compared the response of 8 adult female alcohol-treated (2,5% in water, ad libitum for 4 weeks) Wistar rats in standard behavioral tests such as the Open Field Test, Object Recognition Test, T-maze Test and Forced Swim Test, to this of 8 age-matched control female rats.

Alcohol treated rats showed no difference in the parameters measured during the Open Field Test, a test that assesses the reaction to novelty and the exploratory activity of the rat. In the Object recognition Test, which assesses the ability to discriminate a novel object, alcohol treated rats displayed an impaired ability to recognize a novel object and discriminate it from the familiar one, but both groups performed equally well when exploring two identical objects. In the T-maze test, that can assess the short-term spatial learning and memory, alcohol-treated rats did not appear to distinguish between the familiar and the novel arm. In particular, the first crossing of alcohol treated rats was towards the familiar arm in contrast to this of controls that was towards the novel arm. Depressive-like phenotype was assessed by the Forced Swim Test. In the first day of the test that assesses the initial reaction to stress, both experimental groups responded similarly. In the second day of the test that assesses depressive-like behavior, by measuring floating duration (passive response) versus climbing duration (active response), alcohol-treated rats showed significantly decreased duration of floating and increased duration of climbing, suggesting a decrease in depressive-like behavior.

These findings suggest that chronic moderate ethanol consumption impairs visual short term memory and attention and decreases the depression-like phenotype in adult female rats, but has no effect on either the response to stress or to novel environments. However, more behavioral tests and in both sexes should be performed in order to elucidate the probable beneficial effect that moderate alcohol consumption may have in humans.

## ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΗΝ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΘΗΛΥΚΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΡΟΝΙΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΜΕΤΡΙΑΣ ΔΟΣΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

*Παπαλέξη Ε, Ζήση Σ, Ηλιοπούλου Μ, Κάρδαρη Ι, Κλουκίνα Β, Κομίνη Χ, Μαλανδράκη Σ και Ψαρροπούλου Κ*

*Εργ. Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Σχολή Επιστήμης και Τεχνολογίας, Παν/μιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 45110, Ελλάδα*

Η χρόνια κατανάλωση αιθανόλης είναι γνωστό ότι επηρεάζει τη λειτουργία του ΚΝΣ σε διαφορετικά επίπεδα, προκαλώντας καταστροφή των νευρώνων και συμπεριφορικά ελλείμματα στους ανθρώπους. Πληθώρα συμπεριφορικών δοκιμασιών έχουν πραγματοποιηθεί σε πειραματόζωα και έχουν αποδείξει ότι η χρόνια κατανάλωση αλκοόλ σε υψηλές δόσεις προκαλεί διαταραχή στη μάθηση και τη μνήμη. Εντούτοις, πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η μακροπρόθεσμη κατανάλωση αιθανόλης σε μέτριες δόσεις μπορεί να επιδράσει ευεργετικά στη γνωσιακή λειτουργία στους ανθρώπους και πειραματικές μελέτες πραγματοποιούνται για να διευκρινίσουν τον ελλοχεύοντα μηχανισμό. Στην παρούσα μελέτη συγκρίναμε την ανταπόκριση 8 ενήλικων θηλυκών επίμυων, που τους είχε χορηγηθεί αλκοόλ (2,5% σε νερό, για 4 βδομάδες), σε συγκεκριμένες συμπεριφορικές δοκιμασίες όπως: η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, η δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου, η δοκιμασία Τ-λαβυρίνθου και η δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης.

Οι επίμυες οι οποίοι κατανάλωσαν αλκοόλ δεν παρουσίασαν καμία διαφορά στις παραμέτρους που μετρήθηκαν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ανοιχτού πεδίου, το οποίο αξιολογεί την απόκριση στο καινούριο περιβάλλον και την εξερευνητική δραστηριότητα. Η δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου που αξιολογεί τη δυνατότητα διάκρισης νέου αντικείμενου, έδειξε ότι οι επίμυες που κατανάλωναν αλκοόλ, παρουσίασαν μειωμένη ικανότητα αναγνώρισης το νέου αντικείμενου και διάκρισης από το παλιό, ενώ και οι δύο ομάδες ανταποκρίθηκαν εξίσου καλά όταν εξερενούσαν τα δύο πανομοιότυπα αντικείμενα. Στη δοκιμασία του Τ-λαβυρίνθου που αξιολογεί παραμέτρους της χωρικής μάθησης και μνήμης, οι επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε αλκοόλ δεν διέκριναν το νέο βραχίονα. Συγκεκριμένα, το πρώτο πέρασμα των επίμυων με χορήγηση αιθανόλης, έγινε προς τον γνωστό βραχίονα, σε αντίθεση με τους επίμυες-μάρτυρες που κατευθύνθηκαν προς τον καινούριο βραχίονα. Ο φαινότυπος που ομοιάζει στην κατάθλιψη αξιολογήθηκε με την δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης. Την πρώτη ημέρα της δοκιμασίας που αξιολογήθηκε η αρχική αντίδραση στο στρες, διαπιστώσαμε ότι και οι δυο πειραματικές ομάδες ανταποκρίθηκαν το ίδιο. Τη δεύτερη ημέρα της δοκιμασίας, οπου αξιολογήθηκε η συμπεριφορά που ομοιάζει στην κατάθλιψη μετρώντας το χρόνο που επέπλεαν (παθητική απόκριση) σε αντίθεση με το χρόνο που σκαρφάλωναν (ενεργητική απόκριση), οι επίμυες οι οποίοι κατανάλωναν αλκοόλ παρουσίασαν μειωμένη διάρκεια επίπλευσης και αυξημένη διάρκεια αναρρίχησης.

Τα ανωτέρω συμπεράσματα προτείνουν ότι η μέτρια δόση της αιθανόλης μετά από χρόνια κατανάλωση εξασθενεί την οπτική βραχυπρόθεσμη μνήμη και την προσοχή και περιορίζει τον φαινότυπο που προσομοιάζει την κατάθλιψη στους ενήλικους θηλυκούς επίμυες, αλλά δεν έχει καμία επίδραση ούτε στην απόκριση στο στρες ούτε στο καινούριο περιβάλλον. Παρόλα αυτά, περισσότερες συμπεριφορικές δοκιμασίες και στα δυο φύλα θα έπρεπε να πραγματοποιηθούν ώστε να διευκρινιστούν οι πιθανές θετικές επιδράσεις αιθανόλης τις οποίες μπορεί να προκαλέσει η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ στους ανθρώπους.

**IN VIVO EFFECTS OF CROCUS SATIVUS IN MICE BRAIN :  
ANTI-ACETYLCHOLINESTERASE, ANTI-OXIDANT AND MEMORY  
ENHANCING ACTIVITIES\***

*M.A. Papandreou<sup>1</sup>, F.N. Lamari<sup>2</sup>, P. Cordopatis<sup>2</sup>, M. Margarity<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Laboratory of Human & Animal Physiology, Department of Biology, University of Patras*

<sup>2</sup>*Laboratory of Pharmacognosy & Chemistry of Natural Products, Department of Pharmacy,  
University of Patras*

Our previous *in vitro* studies have shown that the crude extract of *C. sativus* styles (saffron) and its constituents have powerful antioxidant and anti-amyloid properties [1]. In the present study, the antioxidant, anti-acetylcholinesterase and memory enhancing activities of the aqueous extract of *C. sativus* styles (CSE) were studied in adult male *Balb-c* mice. The CSE was administered intraperitoneally (30 and 60 mg/kg), daily to mice (n=9/group) for 7 days. On day 6, mice were subjected to a double trial step-through test, where step-through latency time (STL) was a criterion of learning. Evaluation of the brain acetylcholinesterase (AChE) activity was accomplished by Ellman's colorimetric assay, while the antioxidant effect was studied on whole brain homogenates by determining ferrous reducing antioxidant power (FRAP), ascorbic acid concentration and malondialdehyde (MDA) levels. Results showed that only the CSE (60 mg/kg)-treated mice showed an improvement in learning and memory. However, in both CSE-treated groups, CSE administration resulted in a significant decrease of AChE activity compared to controls, up-regulated the brain antioxidant defense mechanism by attenuating lipid peroxidation product (MDA) and by increasing FRAP values and ascorbic acid levels. Further *in vitro* studies showed that although CSE could only moderately inhibit AChE activity (up to 30%) directly, crocetin (the main metabolite of crocins in the living organism) and safranal inhibited AChE in a dose-dependent way; IC<sub>50</sub> values were within the low micromolar range and safranal was the most potent one. These findings show for the first time that CSE possesses significant antioxidant, anti-acetylcholinesterase and memory enhancing properties. These findings may be of use for the development of therapeutic agents for a variety of neurological diseases which involve a diminution of cholinergic activity.

[1] Papandreou MA, Kanakis CD, Polissiou MG, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Margarity M, Lamari FN (2006). Inhibitory activity on amyloid-beta aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8762-8.

\* Co-financed by European Union-European Social Fund ( 75%), the Greek Ministry of Development GSRT ( 25% ), PENED 2003/ and by GlaxoSmithKline S.A.

**IN VIVO ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ *CROCUS SATIVUS* ΣΤΟΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΜΥΩΝ:  
ΑΝΤΙ-ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΙΚΗ, ΑΝΤΙ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΙ  
ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΗ ΣΤΗ ΜΝΗΜΗ ΔΡΑΣΗ\***

Μ.Α. Παπανδρέου<sup>1</sup>, Φ.Ν Λάμαρη<sup>2</sup>, Π. Κορδοπάτης<sup>2</sup>, Μ. Μαργαρίτη<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργ. Φυσιολογίας Ανθρώπου & Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Παν/μιο Πατρών

<sup>2</sup>Εργ. Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής,  
Παν/μιο Πατρών

Προηγούμενη *in vitro* εργασία μας έδειξε ότι το ολικό εκχύλισμα των στύλων του *C. sativus* (κρόκος Κοζάνης) έχει ισχυρές αντι-οξειδωτικές και αντι-αμυλοειδικές ιδιότητες [1]. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν οι αντι-οξειδωτικές, αντι-ακετυλοχολινεστερασικές και ευεργετικές για τη μνήμη ιδιότητες υδατικού εκχυλίσματος κρόκου (CSE) σε ενήλικους, αρσενικούς *Balb-c* μυς. Το εκχύλισμα χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά (30 και 60 mg/kg), σε καθημερινή βάση, σε διαφορετικές ομάδες μυών (n=9/ομάδα), για 7 ημέρες. Την έκτη ημέρα, η συμπεριφορά των μυών ελέγχθηκε με τη χρήση του step through test, όπου η αύξηση της λανθάνουσας περιόδου (STL) υποδηλώνει αυξημένη ικανότητα μνήμης και μάθησης. Η μελέτη της επίδρασης στην ακετυλοχολινεστεράση (AChE) πραγματοποιήθηκε σε ολικό εγκεφαλικό ομογενοποίηση με τη χρωματομετρική μέθοδο του Ellman, ενώ η αντι-οξειδωτική δράση εκτιμήθηκε υπολογίζοντας την ικανότητα αναγωγής του σιδήρου (FRAP), των συγκεντρώσεων του ασκορβικού οξέος και της μηλονικής διαλδεύδης (MDA). Τα αποτελεσματα μας έδειξαν ότι με τη χορήγηση του κρόκου η μνήμη και η μάθηση των πειραματοζώων βελτιώθηκε σημαντικά μόνο μετά τη χορήγηση της υψηλής συγκέντρωσης κρόκου (60 mg/kg). Όμως και στις δύο ομάδες παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της δραστηριότητας της AChE και αύξηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού μέσω μείωσης της υπεροξειδωσης λιπιδίων (MDA), αύξησης στις τιμές FRAP και του ασκορβικού οξέος μετά τη χορήγηση κρόκου. Οι *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι αν και το εκχύλισμα κρόκου, προκάλεσε μόνο μερική άμεση αναστολή της ενεργότητας της AChE ( $\leq 30\%$ ), η κροκετίνη (κύριος μεταβολίτης των κροκινών *in vivo*) και η σαφρανάλη ανέστειλαν την AChE με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Οι τιμές IC50 κυμαίνονταν στην τάξη των  $\mu\text{M}$  και η σαφρανάλη ήταν η πιο ισχυρή. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν, για πρώτη φορά, ότι το εκχύλισμα του κρόκου επιδεικνύει σημαντική αντι-οξειδωτική, αντι-ακετυλοχολινεστερασική ικανότητα, καθώς και ικανότητα ενίσχυσης της μνήμης. Τα ανωτέρω ευρήματα ίσως αποδειχθούν χρήσιμα για την ανάπτυξη θεραπευτικών σκευασμάτων για μια πληθώρα νευρολογικών διαταραχών, που εμπλέκουν την μείωση της χολινεργικής δραστηριότητας.

[1] Papandreou MA, Kanakis CD, Polissiou MG, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Margarity M, Lamari FN (2006). Inhibitory activity on amyloid-beta aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8762-8.

\* Συγχρηματοδοτούμενο κατά 75% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση - Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο, κατά 25% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο - Υπουργείο Ανάπτυξης - ΓΓΕΤ και από τον Ιδιωτικό Τομέα (GlaxoSmithKline A.E.) στο πλαίσιο του Μέτρου 8.3 του Επιχειρησιακού Προγράμματος "Ανταγωνιστικότητα"- Γ' Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης, ΠΕΝΕΔ 2003.

## CHANGES IN AMPA AND NMDA RECEPTOR SUBUNITS IN THE RETINA OF DARK REARED RATS.

*E.Papanikolaou, M.Giannakopoulos, P. Zeitouyian, E. D. Kouvelas, and A. Mitsacos*

*Department of Physiology, Medical School, University of Patras, Patras 26500, Greece.*

Visual deprivation such as dark rearing regulates the development of retina circuitry and prolongs the critical period of plasticity in both the retina and the visual cortex. NMDA (N-methyl-D-aspartate) as well as AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) receptors have been strongly implicated in plasticity in the visual cortex and retina. Recent studies have shown that the expression of AMPA receptor subunits, especially GluR1, the major functional subunit of the AMPA receptor is regulated developmentally at regional, cellular, and synaptic levels. The expression of NR1 and the composition of the NR2 subunits are also developmentally regulated. Dynamic and environmentally driven changes in the NMDA receptor expression have been shown in the visual cortex and LGN where the expression is altered by visual activity. The major sites of CaM kinase II phosphorylation are Ser 831 and Ser 1303 on GluR1 and NR2B subunits, respectively, and this phosphorylation is required for receptor trafficking and activation and by doing so is the major key to plasticity.

In the present study, rat retinas from two groups of albino rats raised under physiological light/dark cycle and light deprived conditions were examined to test differences in GluR1 and NR2B receptor subunits phosphorylation between control and dark reared 26 and 30 days-old rats. Protein levels of the two receptor subunits were estimated with the Western Blotting technique, using antibodies specific to GluR1 and NR2B. These levels were compared to those of the phosphorylated forms using antibodies specific to Ser831 for pGluR1 and Ser1303 for pNR2B. Our findings indicate that there are changes in receptor phosphorylation in the retinas of dark reared compared to control animals. This is more apparent at the age of 26 days compared to the age of 30 days. Our findings suggest that AMPA and NMDA receptor phosphorylation may contribute to the modulation of synaptic transmission and synaptic plasticity in the retina.

*Supported by the European Social Fund, Operational Program for Educational and Vocational Training II (EPEAEK II), and the Program Pythagoras II.*

## ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΙΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ ΤΩΝ AMPA ΚΑΙ NMDA ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ ΟΠΤΙΚΑ ΑΠΟΣΤΕΡΗΜΕΝΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ

*Ε.Παπανικολάου, Μ.Γιαννακόπουλος, Π. Ζεϊτουγιάν, Η. Κούβελας, και Α. Μητσάκου*

*Τομέας Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα 26500, Ελλάδα*

Η οπτική αποστέρηση, όπως η εκτροπή πειραματόζων στο σκοτάδι, επιμηκύνει την κρίσιμη περίοδο πλαστικότητας του οπτικού φλοιού. Οι υποδοχείς NMDA (N-methyl-D-aspartate) έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται σημαντικά στην πλαστικότητα του οπτικού φλοιού και του αμφιβληστροειδή. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση των υπομονάδων του AMPA υποδοχέα, ειδικά του GluR1 που είναι η κύρια λειτουργική υπομονάδα του, υπόκεινται σε αναπτυξιακή ρύθμιση τόσο στο κυτταρικό όσο και στο συναπτικό επίπεδο. Η έκφραση του NR1 υποδοχέα καθώς και η σύνθεση των υπομονάδων των NR2 υποδοχέων επίσης ρυθμίζονται αναπτυξιακά. Δυναμικά και περιβαλλοντικά ωθούμενες μεταβολές στην έκφραση του NMDA υποδοχέα έχουν δείχθει στον οπτικό φλοιό και τον LGN, όπου η έκφραση μεταβάλλεται από την οπτική δραστηριότητα. Οι κύριες περιοχές φωσφορυλίωσης από την CaM κίνηση II είναι η σερίνη 1303 της υπομονάδας NR2B των υποδοχέων NMDA και η σερίνη 831 για την υπομονάδα GluR1 των AMPA υποδοχέων και η φωσφορυλίωση τους είναι απαραίτητη για την κυκλοφορία και την ενεργοποίηση των υπομονάδων αυτών έχοντας έτσι κυρίαρχο ρόλο στο φαινόμενο της πλαστικότητας.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν αμφιβληστροειδείς επίμυων από δύο ομάδες που είχαν εκτραφεί η μία σε φυσιολογικό σε ημερήσιο κύκλο 12ώρες φως/12 ώρες σκοτάδι και η άλλη σε συνθήκες οπτικής αποστέρησης με σκοπό την σύγκριση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των υπομονάδων GluR1 and NR2B μεταξύ των δύο ομάδων σε επίμυες ηλικίας 26 και 30 ημερών. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατα Western με αντισώματα ειδικά έναντι των υποδοχέων GluR1 και NR2B καθώς και των φωσφορυλιωμένων υπομονάδων. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν μεταβολές στην φωσφορυλίωση των υπομονάδων, των ζώων που είχαν εκτραφεί σε συνθήκες οπτικής αποστέρησης σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Η μεταβολή αυτή ενισχύεται στην ηλικία των 26 ημερών σε σύγκριση με αυτή των 30 ημερών. Κατά συνέπεια, δεδομένου του ρόλου της φωσφορυλίωσης των παραπάνω υπομονάδων, είναι πιθανό η παραπάνω μεταβολή να εκφράζει μηχανισμούς ρύθμισης της συναπτικής διαβίβασης και πλαστικότητας στον αμφιβληστροειδή.

*Η παρούσα εργασία υποστηρίχθηκε από European Social Fund, Operational Program for Educational and Vocational Training II (EPEAEK II), και το πρόγραμμα Πυθαγόρας I.*



## THE ROLE OF CELLULAR AND SYNAPTIC MECHANISMS DURING PERSISTENT ACTIVITY IN A MODEL NEURON

*Athanasia Papoutsi<sup>1,2</sup>, Sidiropoulou Kyriaki<sup>2</sup> and Poirazi Panayiota<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Interdepartmental Graduate Programme in the BRAIN and MIND sciences, Greece*

<sup>2</sup> *Institute of Molecular Biology and Biotechnology (IMBB), Foundation for Research and Technology-Hellas (FORTH), Vassilika Vouton P.O. Box 1583, Heraklion, Crete, GR 711 10 Greece*

The prefrontal cortex (PFC) is the brain region correlated with working memory, the process of information in real time. Activity of a subset of prefrontal pyramidal neurons seems to provide the necessary neural processing to establish the behavioral continuity over time, by increasing their rate of firing when a cue is presented and continuing to fire throughout the delay period, when the cue is no longer available. The aim of this study is to examine the underlying intrinsic cellular and synaptic mechanisms related to this persistent activity.

We use a compartmental model, implemented in the NEURON simulation environment. The model is morphologically simplified, consisting of a soma, a basal, a proximal and a distal dendritic compartment and includes modeling equations for 15 types of ionic mechanisms, known to be present in the prefrontal cortical neurons, as well as modeling equations for the regulation of intracellular calcium and potassium concentration. Among these, a phenomenological model of IP<sub>3</sub> receptor –induced calcium release and a model for the calcium activated non-selective cation (CAN) current is included. These mechanisms were selectively activated to simulate the experimentally induced G<sub>q</sub>-couple receptor activation in PFC pyramidal neurons and the presence of a slow afterdepolarization (sADP). Simulation results showed that the neuron model can reproduce the experimentally observed sADP, induced by current clamp injection (5 spikes at 20 Hz frequency). Ongoing simulations using excitatory synaptic stimulation, investigate the hypothesis that both the NMDA and the CAN conductance contribute to the emergence and maintenance of persistent activity.

In addition to the single-cell simulations, the compartmental model is used to build a biophysically-based microcircuit of the prefrontal cortex. Both the ability of subthreshold activity after a stimulating event (sADP) at the single cell level and the role of the synaptic reverberation in a recurrent circuit in sustaining the persistent activity are being investigated. Our ultimate goal is to characterize the specific rules that underlie the interplay between single-cell bistability and neural processes at the network level for the stabilization of the persistent mnemonic activity in the prefrontal cortex.

## Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΑΠΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΜΕΝΟΥΣΑ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

*Αθανασία Παπουτσή<sup>1,2</sup>, Σιδηροπούλου Κυριακή<sup>2</sup>, και Ποϊράζη Παναγιώτα<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών Εγκέφαλος και Νους

<sup>2</sup> Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB), Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ), Βασιλικά Βουτών, τ.θ. 1583, Ηράκλειο, Κρήτη, τ.κ. 711 10 Ελλάδα

Ο προμετωπιαίος φλοιός είναι η περιοχή του εγκεφάλου που σχετίζεται με την ενεργό μνήμη, την επεξεργασία της πληροφορίας σε πραγματικό χρόνο. Ορισμένοι πυραμιδικοί νευρώνες της προμετωπιαίας περιοχής επιτελούν τη νευρική επεξεργασία των συναπτικών ερεθισμάτων που απαιτείται για την καθοδήγηση μίας μελλοντικής δράσης, αυξάνοντας τον ρυθμό εκπόλωσης κατά την παρουσία ενός σήματος αλλά και σε όλη την περίοδο καθυστέρησης, όταν δεν υπάρχει πλέον το σήμα στο περιβάλλον. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η διερεύνηση των ενδογενών κυτταρικών και συναπτικών μηχανισμών που σχετίζονται με την εμφάνιση της παραμένουσας δραστηριότητας.

Χρησιμοποιήσαμε ένα διαμερισματοποιημένο μοντέλο νευρώνα, βασισμένο στο λειτουργικό περιβάλλον προσομοίωσης NEURON. Το μοντέλο είναι μορφολογικά απλοποιημένο και αποτελείται από τέσσερα διαμερίσματα, ένα σώματος, ένα βασικού δενδρίτη, ένα μεσαίου και ένα ακραίου δενδρίτη. Επίσης, το μοντέλο αυτό περιλαμβάνει εξισώσεις μοντελοποίησης για 15 τύπους ιοντικών μηχανισμών που είναι γνωστό ότι υπάρχουν στους νευρώνες του προμετωπιαίου φλοιού, καθώς και εξισώσεις μοντελοποίησης για τη ρύθμιση των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου και καλίου. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται ένα φαινομενολογικό μοντέλο της επαγόμενης από τον υποδοχέα IP3 απελευθέρωσης ασβεστίου και ένα μοντέλο για το επαγόμενο από το ασβέστιο, μη ειδικό ρεύμα κατιόντων (calcium activated non-selective cation current – ICAN), που ενεργοποιούνται επιλεκτικά για να προσομοιώσουν την πειραματικά παρατηρούμενη ενεργοποίηση ενός υποδοχέα συζευγμένου με Gq πρωτεΐνη στους πυραμιδικούς νευρώνες του προμετωπιαίου φλοιού και την εμφάνιση της αργής μετεκπόλωσης (sADP). Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης έδειξαν ότι το μοντέλο μπορεί να αναπαράγει την πειραματικά παρατηρούμενη αργή μετεκπόλωση μετά από εισαγωγή ρεύματος. Προσομοιώσεις που βρίσκονται σε εξέλιξη και περιλαμβάνουν συναπτικά ερεθίσματα διερευνούν την υπόθεση ότι τόσο η εισροή ιόντων μέσω των υποδοχέων NMDA όσο και του ρεύματος CAN συνεισφέρουν στην έναρξη και διατήρηση της παραμένουσας δραστηριότητας.

Εκτός από μονοκύτταρες προσομοιώσεις, το διαμερισματικό μοντέλο χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ενός βιοφυσικού μικροκυκλώματος του προμετωπιαίου φλοιού. Ο ρόλος τόσο της αργής μετεκπόλωσης (sADP) όσο και της συναπτικής δραστηριότητας ερευνάται. Στόχος μας αποτελεί ο χαρακτηρισμός των συγκεκριμένων κανόνων που διέπουν το ρόλο των κυτταρικών βιοφυσικών χαρακτηριστικών και της νευρικής επεξεργασίας στα πλαίσια ενός κυκλώματος, για τη σταθεροποίηση της παραμένουσας μνημονικής δραστηριότητας

**MEMANTINE AND RECOGNITION MEMORY: POSSIBLE FACILITATION OF ITS BEHAVIORAL EFFECTS BY THE NITRIC OXIDE DONOR MOLSIDOMINE**

*N. Pitsikas, N. Sakellaridis*

*Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Thessaly, 412-22 Larissa, Greece*

The effects of the non-competitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine on recognition memory were investigated in the rat by using the object recognition task. In addition, a possible interaction between memantine and the nitric oxide (NO) donor molsidomine in antagonizing extinction of recognition memory was also evaluated utilizing the same behavioral procedure. In a first dose-response study, post-training administration of memantine (10 and 20, but not 3 mg/kg) antagonized recognition memory deficits in the rat, suggesting that memantine modulates storage and/or retrieval of information. In a subsequent study, combination of sub-threshold doses of memantine (3 mg/kg) and the NO donor molsidomine (1 mg/kg) counteracted delay-dependent impairments in the same task. Neither memantine (3 mg/kg) nor molsidomine (1 mg/kg) alone reduced object recognition performance deficits.

The present findings indicate a) that memantine is involved in recognition memory and b) support a functional interaction between memantine and molsidomine on recognition memory mechanisms.

## Η ΜΕΜΑΝΤΙΝΗ ΚΑΙ Η ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΤΙΚΗ ΜΝΗΜΗ: ΠΙΘΑΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙ ΤΗΣ ΜΝΗΜΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΔΟΤΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΜΟΛΙΒΔΟΜΙΝΗ

*N. Πιτσίκας, N. Σακελλαρίδης*

*Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 412-22 Λάρισα*

Η δράση επί της μνήμης του μη συναγωνιστικού ανταγωνιστή του NMDA υποδοχέα μεμαντίνη αξιολογήθηκε στον επίμυ μέσω της πειραματικής διαδικασίας της αναγνώρισης των αντικειμένων. Επιπροσθέτως, διερευνήθηκε η πιθανή εμπλοκή του νιτρεργικού συστήματος στη δράση της μεμαντίνης χρησιμοποιώντας την ίδια συμπεριφορική τεχνική. Σε μία πρώτη μελέτη δόσης-απάντησης, χορήγηση της μεμαντίνης (10 και 20, αλλά όχι 3 mg/kg) αμέσως μετά το πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, ανταγωνίστηκε με επιτυχία τα ελλείμματα επίδοσης των ζώων στο δεύτερο στάδιο της δοκιμασίας αυτής προτείνοντας ότι ρυθμίζει τους μηχανισμούς αποθήκευσης η/και ανάκλησης πληροφοριών. Σε μία δεύτερη μελέτη, ο συνδυασμός ανενεργών δόσεων της μεμαντίνης (3 mg/kg) και του δότη του μονοξειδίου του αζώτου (NO) μολσιδομίνης (1 mg/kg), εξάλειψε τα χρονοεξαρτώμενα ελλείμματα μνήμης στον επίμυ στη συγκεκριμένη δοκιμασία.

Τα παρόντα ευρήματα καταδεικνύουν ότι: α) η μεμαντίνη εμπλέκεται στην αναγνωριστική μνήμη και β) τη λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ μεμαντίνης και μολσιδομίνης στους μηχανισμούς που διέπουν την αναγνωριστική μνήμη.

## VOLTAGE-ACTIVATED CALCIUM CURRENTS IN OCTOPUS CELLS OF THE MOUSE COCHLEAR NUCLEUS\*

*Ramazan Bal<sup>1</sup> and Donata Oertel<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Department of Biophysics, Faculty of Medicine, Firat University, 23119 Elazig, Turkey*

<sup>2</sup>*Department of Physiology, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA*

Octopus cells, neurons in the most posterior and dorsal part of the mammalian ventral cochlear nucleus (VCN), convey the timing of synchronous firing of auditory nerve fibers to targets in the contralateral superior paraolivary nucleus (SPN) and ventral nucleus of the lateral lemniscus (VNLL). Octopus cells detect the coincidence of synchronous firing in populations of auditory nerve fibers and convey the timing of that coincidence with great temporal precision. Octopus cells fire conventional, Na<sup>+</sup> action potentials but a voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> conductance was also detected. Coronal slices of the ventral cochlear nucleus (VCN) were prepared from mice (ICR strain) of between 17 and 19 postnatal days. The animals were decapitated and the head was immersed in normal physiological saline. Following the removal of the brain from the skull, slices of 180  $\mu\text{m}$  thickness were cut using an oscillating tissue slicer. Calcium current was studied under voltage clamp condition. Currents, carried by Ca<sup>2+</sup> or Ba<sup>2+</sup> and blocked by 0.4 mM Cd<sup>2+</sup>, were activated by depolarizations positive to  $-50$  mV and peaked at  $-23$  mV. At  $-23$  mV they reached  $1.1 \pm 0.1$  nA in the presence of 5 mM Ca<sup>2+</sup> and  $1.6 \pm 0.1$  nA in 5 mM Ba<sup>2+</sup>. 10  $\mu\text{M}$  BAY K 8644, an agonist of high-voltage-activated L-type channels, enhanced  $I_{\text{Ba}}$  by  $63 \pm 11\%$  (n=8) and 150  $\mu\text{M}$  nifedipine, an antagonist of L-type channels, reduced the  $I_{\text{Ba}}$  by  $65 \pm 5\%$  (n=5). 0.5  $\mu\text{M}$   $\omega$ -Agatoxin IVA, an antagonist of P/Q-type channels, or 1  $\mu\text{M}$   $\omega$ -conotoxin GVIA, an antagonist of N-type channels suppressed  $I_{\text{Ba}}$  by  $15 \pm 4\%$  (n=5) and  $9 \pm 4\%$  (n=5) respectively. On average 16% of the current remained in the presence of the cocktail of blockers, indicative of the presence of R-type channels. Together these experiments show that octopus cells have a depolarization-sensitive  $g_{\text{Ca}}$  that is largely formed from L-type Ca<sup>2+</sup> channels and that P/Q, N and R type channels are expressed at lower levels in octopus cells.

*\* This work was supported by a grant from NIH DC00176.*



## REGULATORY ROLE OF EARLY MATERNAL DEPRIVATION STRESS IN BEHAVIORAL AND NEUROBIOLOGICAL PARAMETERS IN THE ADULTHOOD

*Rentesi G<sup>1</sup>, Antoniou K<sup>1</sup>, Marselos M<sup>1</sup>, Syrrou M<sup>2</sup>, Papadopoulou-Daifoti Z<sup>3</sup>, Lang MA<sup>4</sup> and Konstandi M<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Department of Pharmacology and*

<sup>2</sup>*Department of Biology, School of Medicine, University of Ioannina, GR-45110 Ioannina, Greece*

<sup>3</sup>*Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Athens, GR-11527 Athens, Greece*

<sup>4</sup>*Division of Biochemistry, Faculty of Pharmacology, University Uppsala, box 578517523, Uppsala, Sweden*

Early maternal deprivation (MD) has been considered as an animal model of early life stress. A single 24 hour period of MD in rats has been associated with a number of abnormalities in brain and behavior in adulthood. These alterations seem to be relevant to the neurobiological substrate of depression or schizophrenia.

The present study investigated specific behavioral and neurobiological parameters in MD rats, related to dopaminergic function. Behavioral responses, such as the spontaneous activity in the open field, the habituation to learning, the response to d-amphetamine (d-amp; 0.5 and 1.5 mg/kg) and the susceptibility to apomorphine (1.5 mg/kg), were evaluated in MD rats. In addition, the differentiation in the expression of DARPP-32 in the striatum and n. accumbens of MD and control rats was assessed.

The findings showed that MD rats exhibited a marginal increase in spontaneous motor activity and an exaggerated motor activity following a low dose of d-amp, compared to controls. Similar increase was also observed in MD rats following the high dose of d-amp but it did not reach statistical significance. The apomorphine-induced gnawing was markedly elevated in MD rats compared to controls. MD rats also exhibited an impaired habituation to learning in comparison to controls. Plasma corticosterone levels and the expression of striatal DARPP-32 were higher in MD rats than in controls.

These findings clearly indicate that early maternal deprivation stress may induce long term alterations in distinct behavioral and neurobiological parameters related to the dopaminergic function and the integrity of hypothalamous-pituitary-adrenal axis. These alterations may lead to modifications in the motor activity and cognitive functions of MD exposed individuals.

### *References*

[\*Ellenbroek BA, Derks N, Park HJ, Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats, Stress. 2005 Dec;8\(4\):247-57.\*](#)

[\*Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Greengard P, DARPP-32: an integrator of neurotransmission. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2004;44:269-96. Review\*](#)

This research project is co-financed by E.U.-European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%).

## Ο ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΗΣ ΜΗΤΡΙΚΗΣ ΑΠΟΣΤΕΡΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΚΑΙ ΤΟ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΝΗΛΙΚΙΩΣΗ

Ρέντεση Γ<sup>1</sup>, Αντωνίου Κ<sup>1</sup>, Μαρσέλος Μ<sup>1</sup>, Σύρρου Μ<sup>2</sup>, Παπαδοπούλου – Νταϊφώτη<sup>3</sup> Ζ, Lang MA<sup>3</sup> και Κωνσταντή Μ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα, Ελλάδα

<sup>2</sup> Εργαστήριο Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα, Ελλάδα

<sup>3</sup> Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 11527 Αθήνα, Ελλάδα

<sup>4</sup> Division of Biochemistry, Faculty of Pharmacology, University Uppsala, box 578517523, Uppsala, Sweden

Το μοντέλο της μητρικής αποστέρησης (maternal deprivation, MD) αποτελεί ένα ενδιαφέρον αναπτυξιακό μοντέλο πρώιμης έκθεσης σε stress το οποίο έχει συσχετισθεί με έναν αριθμό διαταραχών στη συμπεριφορά κατά την ενηλικίωση.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης του στρες MD σε συμπεριφορικούς και νευροβιολογικούς παράγοντες κατά την ενηλικίωση. Συγκεκριμένα οι επίμυες, οι οποίοι κατά την αναπτυξιακή τους φάση (postnatal day 9) υποβλήθηκαν σε μητρική αποστέρηση και οι μάρτυρες, κατά την ενηλικίωση τους υποβλήθηκαν στις ακόλουθες πειραματικές δοκιμασίες συμπεριφοράς: 1) καταγραφή της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας κατά την έκθεση τους σε νέο περιβάλλον, 2) εξοικείωση σε επαναλαμβανόμενες εκθέσεις στον ίδιο χώρο, 3) συμπεριφορική απάντηση στην d-amphetamine (d-amp 0.5 and 1.5 mg/kg βάρους σώματος) και 4) αξιολόγηση της δεκτικότητας τους στην απομορφίνη (apo, 1.5 mg/kg β.σ.). Επιπρόσθετα μετρήθηκαν, τα επίπεδα της ολικής κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης DARPP-32 και της φωσφορυλιωμένης μορφής της στον κερκοφόρο και επικλινή πυρήνα καθώς και τα επίπεδα της κορτικοστερόνης και της ACTH στο πλάσμα. Οι MD επίμυες εμφάνισαν αυξημένη κινητικότητα στον οριζόντιο και τον κατακόρυφο άξονα σε σχέση με τους μάρτυρες. Μετά από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις στον ίδιο χώρο, οι MD επίμυες παρουσίασαν μειωμένη ικανότητα εξοικείωσης συγκριτικά με τους μάρτυρες. Μετά από χορήγηση d-amp 0.5 mg/kg παρατηρήθηκε αύξηση της κινητικότητας στους MD επίμυες σε σύγκριση με τους μάρτυρες, ενώ μετά από χορήγηση 1,5 mg/kg d-amp η αύξηση δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Επιπλέον οι MD επίμυες παρουσίασαν αυξημένη δεκτικότητα στην απομορφίνη σε σχέση με τους μάρτυρες. Επίσης εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της DARPP-32, ολικής και φωσφορυλιωμένης, στον κερκοφόρο και επικλινή πυρήνα καθώς και αυξημένα επίπεδα κορτικοστερόνης και ACTH στο πλάσμα. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι το MD stress μπορεί να προκαλέσει μακροπρόθεσμες επιπτώσεις σε συμπεριφορικές και νευροβιολογικές παραμέτρους, ιδίως σε επίπεδο ντοπαμινεργικής λειτουργίας, οι οποίες σχετίζονται με την κινητική δραστηριότητα και τις γνωστικές λειτουργίες.

[Ellenbroek BA, Derks N, Park HJ](#), Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats, *Stress*. 2005 Dec;8(4):247-57.

[Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Greengard P](#), DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:269-96. Review

Συγχρηματοδότηση ΕΕ- ΕΚΤ (75%) και ΥΠΙΑΝ (25%) ΠΕΝΕΔ ΚΩΔ.957



**THE PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF GABA<sub>A</sub> / BENZODIAZEPINE RECEPTOR COMPLEX DIFFER IN DORSAL COMPARED TO VENTRAL RAT HIPPOCAMPUS**

*K. Sarantis<sup>1</sup>, E. Sotiriou<sup>1</sup>, C. Papatheodoropoulos<sup>1</sup>, N. Matsokis<sup>2</sup> and F. Angelatou<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Department of Physiology, School of Medicine,  
University of Patras, Greece.*

<sup>2</sup>*Lab. of Human and Animal Physiology, Department of Biology,  
University of Patras, Greece.*

An anatomical and a functional segregation has been documented between dorsal (DH) and ventral (VH) rat hippocampus. Pharmacological and behavioural studies have shown that the  $\alpha_1$ -GABA<sub>A</sub> receptor subtype is associated with the sedative and hypnotic effects of benzodiazepines (BZs), whereas the  $\alpha_2$ -subtype is associated with the anxiolytic effects of BZs. A recent study indicates the differential distribution of  $\alpha_1\beta_2$ - and  $\alpha_2\beta_1$ -GABA<sub>A</sub> receptor subtypes between the two hippocampal poles, with the  $\alpha_1\beta_2$ -GABA<sub>A</sub> receptor subtype dominating in the DH and the  $\alpha_2\beta_1$ -subtype prevailing in the VH.

We therefore study possible differences in the pharmacological properties and receptor binding parameters of the GABA<sub>A</sub> receptor subtypes between DH and VH, by examining: 1a) the specific binding of [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam (BZ sites agonist), by using quantitative autoradiography, b) the kinetic parameters of [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam specific binding, by using the “wipe off” technique and 2) the competitive displacement of [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam binding by using zolpidem (a specific agonist of  $\alpha_1$ -subtype) and L-655,708 (a specific inverse agonist of  $\alpha_5$ -subtype) and the enhancement of [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam binding by using etomidate (a selective positive modulator of  $\beta_2$ -subunit), in an autoradiographical saturation kinetic study.

Our results showed in VH compared to the DH: A) lower level of [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam binding in CA1, CA3 and DG regions, B) higher K<sub>D</sub> value for [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam specific binding in CA1 region and no differences in the B<sub>max</sub> value, C) higher IC<sub>50</sub> value for zolpidem, D) higher EC<sub>50</sub> value for etomidate and E) lower IC<sub>50</sub> value for L-655,708.

In conclusion, the lower binding for zolpidem and etomidate and the higher binding for L-655,708 observed in VH support the evidence that the  $\alpha_1\beta_2$ -GABA<sub>A</sub> receptor subtype dominates in DH and the  $\alpha_5$ -subtype prevails in VH. Further, our results suggest differential pharmacological effects of the benzodiazepines in DH compared to VH, which could be of clinical relevance for the design of more effective drugs.

**ΟΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ  
 γ-ΑΜΙΝΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ / ΒΕΝΖΟΔΙΑΖΕΠΙΝΩΝ ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ  
 ΔΙΑΦΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΡΟΤΑΦΙΚΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΕΠΙΜΥΟΣ**

*Κ. Σαράντης<sup>1</sup>, Ε. Σωτηρίου<sup>1</sup>, Κ. Παπαθεοδωρόπουλος<sup>1</sup>, Ν. Ματσώκης<sup>2</sup>, Φ. Αγγελάτου<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών*

<sup>2</sup>*Εργαστήριο Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων, Τομέας Βιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας,  
 Πανεπιστήμιο Πατρών*

Βιβλιογραφικά δεδομένα έχουν δείξει ανατομική και λειτουργική διαφοροποίηση του διαφραγματικού (ΔΙ) σε σχέση με το κροταφικό ιππόκαμπο (ΚΙ) του επίμυος. Φαρμακολογικές και συμπεριφορικές μελέτες έδειξαν ότι ο  $\alpha_1$ -υπότυπος του GABA<sub>A</sub> υποδοχέα, σχετίζεται με τη ηρεμιστική και υπνωτική δράση των βενζοδιαζεπινών, ενώ ο  $\alpha_2$ -υπότυπος σχετίζεται με τις αγχολυτικές δράσεις των βενζοδιαζεπινών. Πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου μας υποδεικνύει την διαφορετική κατανομή των  $\alpha_1\beta_2$ - και  $\alpha_2\beta_1$ -υποτύπων του GABA<sub>A</sub> υποδοχέα στους δύο πόλους του ιππόκαμπου, με τον  $\alpha_1$ -υπότυπο να κυριαρχεί στο ΔΙ και τον  $\alpha_2$ -υπότυπο να κυριαρχεί στον ΚΙ.

Με βάση τα παραπάνω εξετάσαμε πιθανές διαφορές στις φαρμακολογικές ιδιότητες των υποτύπων του GABA<sub>A</sub> υποδοχέα μεταξύ του ΔΙ και του ΚΙ, μελετώντας: 1α) την ειδική δέσμευση της [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam (αγωνιστής των θέσεων δέσμευσης των βενζοδιαζεπινών), χρησιμοποιώντας την μέθοδο της ποσοτικής αυτοραδιογραφίας, β) τις κινητικές παραμέτρους δέσμευσης της [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam, χρησιμοποιώντας την τεχνική “wipe off”, και 2) τον φαρμακολογικό ανταγωνισμό της δέσμευσης της [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam από το zolpidem (ειδικός αγωνιστής του  $\alpha_1$ -υπότυπου) και το L-655,708 (ειδικός αντίστροφος αγωνιστής του  $\alpha_5$ -υπότυπου), καθώς και της ενίσχυσης της δέσμευσης της [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam από το etomidate (ειδικός θετικός αλλοστερικός ρυθμιστής του  $\beta_2$ -υπότυπου), χρησιμοποιώντας αυτοραδιογραφική κινητική μελέτη κορεσμού.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι ο ΚΙ συγκρινόμενος με τον ΔΙ παρουσίαζε: Α) μειωμένη δέσμευση της [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam στις CA1, CA3 και DG περιοχές, Β) μικρότερη χημική συγγένεια της δέσμευσης της [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam στη CA1 περιοχή και καμία διαφορά στον αριθμό των θέσεων δέσμευσης, Γ) μεγαλύτερες τιμές IC<sub>50</sub> του zolpidem, Δ) μεγαλύτερες τιμές EC<sub>50</sub> του etomidate και Ε) μικρότερες τιμές IC<sub>50</sub> του L-655,708.

Συμπερασματικά, η χαμηλότερη δέσμευση του zolpidem και του etomidate, καθώς και η υψηλότερη δέσμευση του L-655,708 που παρατηρείται στον ΚΙ συγκρινόμενη με τον ΔΙ, υποστηρίζουν τη διαφορετική κατανομή των υποτύπων του GABA<sub>A</sub> υποδοχέα στους δύο πόλους του ιππόκαμπου, με τον  $\alpha_1\beta_2$ -υπότυπο να κυριαρχεί στο ΔΙ και τον  $\alpha_5$ -υπότυπο να κυριαρχεί στον ΚΙ. Επιπλέον, τα αποτελέσματα μας υποδηλώνουν διαφορετικές φαρμακολογικές δράσεις των βενζοδιαζεπινών στο ΔΙ σε σχέση με τον ΚΙ του ιπποκάμπου, οι οποίες πιθανόν να τυγχάνουν κλινικής αξίας για τον πιο αποτελεσματικό σχεδιασμό φαρμάκων.

**THE IMMUNOGLOBULIN DOMAINS OF THE IgSF MEMBER TAG-1/CNTN-2 ARE NECESSARY AND SUFFICIENT FOR ITS PHYSICAL INTERACTION WITH CASPR2 AND POTASSIUM CHANNELS.**

*Maria Savvaki<sup>1,2\*</sup>, Alexandros Tzimourakas<sup>1\*</sup>, Sevasti Giasemi<sup>1</sup>, Maria Mouratidou<sup>1</sup> and Domna Karagogeos<sup>1,2</sup>*

*1. Department of Basic Science, Graduate Programs in Neuroscience and Clinical Investigation, University of Crete Medical School*

*2. Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Heraklion 711 10, Crete, Greece*

*\* Equal contribution*

Axons and myelinating glia, oligodendrocytes in the central (CNS) and Schwann cells in the peripheral (PNS) nervous systems, reciprocally influence each other's development and trophism. These interactions are critical for the formation of distinct axonal domains in myelinated fibers that ensure the rapid propagation of action potentials. Macromolecular complexes mediating axo-glial interactions in these domains have been identified, consisting of members of the immunoglobulin superfamily (IgSF) of adhesion molecules and the neurexin superfamily as well as other proteins. We have investigated the molecular details of axo-glial interactions in the juxtaparanodal region of myelinated fibers by utilizing domain-specific GFP constructs and immunoprecipitation assays on transfected cells. We provide evidence that TAG-1, Caspr2 and Kv form a specific juxtaparanodal complex where the three proteins directly interact via the Ig domains of TAG-1. In addition to providing information about functional domains in this juxtaparanodal complex, this is the first report of a direct interaction of TAG-1 and potassium channels. This tripartite complex apparently is independent of other juxtaparanodal proteins such as Connexin29. TAG-1 plays a major role in organizing the juxtaparanodal components since it is the only protein identified so far that directly interacts with both Caspr2 and potassium channels. The tripartite TAG-1/Caspr2/Kv complex is required for the correct positioning of potassium channels in the area.

**ΟΙ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ TAG-1/CNTN-2 ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΦΥΣΙΚΗ ΤΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ CASPR2 ΚΑΙ ΤΑ ΚΑΝΑΛΙΑ ΚΑΛΙΟΥ**

*Μαρία Σαββάκη<sup>1,2\*</sup>, Αλέξανδρος Τζιμουράκας<sup>1\*</sup>, Σεβαστή Γιασεμή<sup>1</sup>, Μαρία Μουρατίδου<sup>1</sup>, Δόμνα Καραγωγέως<sup>1,2</sup>*

1. *Εργαστήριο βασικών νευροεπιστημών, μεταπτυχιακά προγράμματα Νευροεπιστημών και Μοριακής Ιατρικής, Ιατρική σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης*
  2. *Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ηράκλειο 71110, Κρήτη*
- \* ίση συμμετοχή*

Κύτταρα γλοίας του κεντρικού (ολιγοδενδροκύτταρα) και του περιφερικού νευρικού συστήματος (κύτταρα Schwann) αλληλεπιδρούν με το νευράξονα των εμμύελων ινών. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές επηρεάζουν την ανάπτυξη τόσο του νευρικού κυττάρου όσο και των κυττάρων γλοίας. Επίσης, είναι κρίσιμες για τη δημιουργία διακριτών περιοχών στις εμμύελες ίνες, που εξυπηρετούν την ταχεία μεταγωγή του δυναμικού ενεργείας κατά μήκος του νευράξονα. Σε αυτές τις περιοχές, μακρομοριακά σύμπλοκα, τα οποία αποτελούνται από μόρια κυτταρικής συνάφειας της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών, της υπεροικογένειας των neurexins και άλλων, συμμετέχουν σε αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις. Μελετήσαμε, αυτές τις αλληλεπιδράσεις στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές χρησιμοποιώντας GFP πλασμιδιακές κατασκευές και πραγματοποιώντας πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε διαμολυσμένα κύτταρα. Διαπιστώσαμε, πως η πρωτεΐνη TAG-1 (μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών) αλληλεπιδρά άμεσα με τα κανάλια καλίου (Kv channels) και την πρωτεΐνη Caspr2 ( μέλος της υπεροικογένειας των neurexins), στο επίπεδο του άξονα, στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές. Το τμήμα της πρωτεΐνης που είναι υπεύθυνο για αυτήν την αλληλεπίδραση αποτελείται από τις περιοχές που ομοιάζουν στις ανοσοσφαιρίνες (ανοσοσφαιρινικές περιοχές). Ο σχηματισμός του συμπλόκου TAG-1/Caspr2/Kv είναι απαραίτητος για την σωστή τοποθέτηση και διατήρηση των καναλιών καλίου στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές.

## TRANSGENIC EXPRESSION OF MUTANT ALPHA-SYNUCLEIN IN MICE IMPACTS THE NORADRENERGIC, BUT NOT THE DOPAMINERGIC SYSTEM

*Sotiriou Evangelos<sup>1,2</sup>, Vassilatis K. Demetris<sup>2</sup> and Stefanis Leonidas<sup>1</sup>*

*Division of Basic Neurosciences<sup>1</sup> and Cell Biology<sup>2</sup>, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Athens, Greece*

The pathogenesis of Parkinson's disease (PD) is unknown but recent genetic, biochemical and neuropathological data suggest that a central role appears to be played by alpha-synuclein ( $\alpha$ -syn). The classical pathological signs include loss of dopaminergic neurons (DA) in the substantia nigra (SN). Furthermore, cell loss has been observed in other catecholaminergic structures, as in the locus coeruleus (LC), the major noradrenaline (NE) nucleus in the brain. Moreover, LC neurons display significant  $\alpha$ -syn accumulation in earlier disease stages compared to SN neurons.

We have used 18 months old transgenic mouse model of mutant A53T  $\alpha$ -syn expressed under the Prion promoter to examine the effects of aberrant  $\alpha$ -syn on catecholaminergic systems. In this model, there is a high density of  $\alpha$ -syn inclusions in the spinal cord and throughout the brainstem, but the effects on the catecholaminergic systems have not been characterized. We therefore compared the levels of DA and NE and the expression of Tyrosine Hydroxylase (TH, catecholaminergic marker) between transgenic and control littermate animals.

Our preliminary HPLC results have shown a reduction in NE, but not in DA, levels in the spinal cord, olfactory bulb and striatum of the A53T Tg mice compared to control mice. Furthermore, a significant decrease of TH levels was detected in the spinal cord and olfactory bulb of Tg compared to control mice by Western immunoblotting. No difference between the two strains was detected in other brain regions. In order to test further the effects of aberrant  $\alpha$ -syn on the DA and NE systems, it is essential that we obtain unbiased counts of the number of catecholamine neurons (TH-neurons) in the SN and LC neurons. These preliminary observations suggest that in this model  $\alpha$ -syn might adversely impact the NE, but not the DAergic system, consistent with what is found in stage 2 of idiopathic PD.

The above-mentioned results suggest that aberrant  $\alpha$ -syn causes a selective degeneration of NE neurons or of their terminals, whereas its effects on the DA system are minimal. Alternatively, the results may be in line with the hypothesis that  $\alpha$ -syn alters storage and metabolism of NE. These observations suggest that the NE system may be more vulnerable than the DA system to the toxic effects of aberrant alpha-synuclein, and are in line with the major damage to the NE system that occurs in patients with Parkinson's disease.

*Supported by a grant from the Michael J. Fox Foundation*

**ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΗΣ α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΙΝΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΣΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥΣ ΕΠΙΜΥΕΣ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΟ ΝΟΡΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ, ΑΛΛΑ ΟΧΙ ΤΟ ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ**

*Σωτηρίου Ευάγγελος<sup>1,2</sup>, Βασιλάτης Κ. Δημήτριος<sup>2</sup>, Στεφανής Λεωνίδας<sup>1</sup>*

*Τομέας Βασικών Νευροεπιστημών<sup>1</sup> και Κυτταρικής Βιολογίας<sup>2</sup>, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημία Αθηνών*

Η παθογένεια της νόσου του Parkinson (PD) μέχρι σήμερα δεν είναι απολύτως γνωστή, πρόσφατες όμως γενετικές μελέτες αποδίδουν σημαντικό ρόλο στην α-συνουκλείνη (α-συν). Σε ασθενείς με τη νόσο του Parkinson κύρια νευροπαθολογικά ευρήματα είναι η νευροεκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην περιοχή μέλαινας ουσίας καθώς και σε άλλες περιοχές όπως ο υπομέλανας τόπος, κύριος αδρενεργικός πυρήνας στον εγκέφαλο. Επιπλέον οι νευρώνες του υπομέλανα τόπου παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη συσσώρευση της α-συν στα πρώιμα στάδια της ασθένειας συγκρινόμενη με τους νευρώνες της μέλαινας ουσίας.

Για την μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε ώριμους επίμυες (18 μηνών) οι οποίοι εκφράζουν, κάτω από την επιρροή ενός γενικού υποκινητή για τον εγκέφαλο, την μεταλλαγμένη μορφή (A53T) της α-συν. Οι επίμυες αυτοί παρουσιάζουν υψηλή συγκέντρωση της A53T στην περιοχή του νωτιαίου μυελού καθώς και στην ευρύτερη περιοχή των βασικών γαγγλίων χωρίς όμως να έχει μέχρι σήμερα διευκρινιστεί εάν επηρεάζεται το κατεχολαμινεργικό τους σύστημα. Για το λόγο αυτό συγκρίνουμε τα επίπεδα της ντοπαμίνης (DA) και της νοραδρεναλίνης (NE) καθώς και τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης της υδροξυλάσης της τυροσίνης (TH), (κατεχολαμινεργικός μάρτυρας) μεταξύ φυσιολογικών και διαγονιδιακών επίμυων.

Προκαταρκτικά πειράματα με την μέθοδο υψηλής ευκρίνειας υγρής χρωματογραφίας (HPLC) έδειξαν ότι τα επίπεδα της νοραδρεναλίνης αλλά όχι της ντοπαμίνης ήταν μειωμένα στις περιοχές του ραβδωτού, του νωτιαίου μυελού και του οσφρητικού βολβού των διαγονιδιακών σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς επίμυες. Στατιστικά σημαντικά μειωμένα ήταν τα επίπεδα της TH στις περιοχές του νωτιαίου μυελού και του οσφρητικού βολβού στους διαγονιδιακούς σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς επίμυες όπως προσδιορίστηκαν με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά western. Δεν διαπιστώθηκαν αλλαγές για άλλες εγκεφαλικές περιοχές. Για να διευκρινίσουμε περισσότερο την επίδραση αυτή θα μετρηθεί και ο αριθμός των κατεχολαμινεργικών νευρώνων (TH-νευρώνες) στην περιοχή της μέλαινας ουσίας και του υπομέλανα τόπου. Τα παραπάνω πειραματικά ευρήματα υποδεικνύουν ότι σε αυτό το μοντέλο η α-συν επιδρά με το NE αλλά όχι και με το DA σύστημα, το οποίο είναι σε συμφωνία με νευροπαθολογικά ευρήματα του σταδίου 2 σε ιδιοπαθείς ασθενείς με τη νόσο του Parkinson.

Συμπερασματικά για το μοντέλο μας η έκφραση της μεταλλαγμένης α-συνουκλείνης προκαλεί μια επιλεκτική νευροεκφύλιση των νοραδρενεργικών νευρώνων ή των απολήξεων τους, ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζει το ντοπαμινεργικό σύστημα. Τα παραπάνω συμφωνούν και με την υπόθεση ότι η α-συνουκλείνη επηρεάζει την αποθήκευση και τον μεταβολισμό της νοραδρεναλίνης. Πιθανώς το νοραδρενεργικό σύστημα να είναι πιο ευάλωτο σε σύγκριση με το ντοπαμινεργικό στις τοξικές επιδράσεις της α-συνουκλείνης, και έτσι να εξηγήτε ότι οι βλάβες του νοραδρενεργικού συστήματος προηγούνται των βλαβών του ντοπαμινεργικού συστήματος σε ασθενείς με τη νόσο του Parkinson.

*Χρηματοδότηση από τον οργανισμό για τη νόσο του Parkinson (Michael J. Fox).*

## GEMININ AND CDT1 DELINEATE NEURAL PROGENITORS IN A CELL CYCLE PHASE-SPECIFIC MANNER

*M. Spella<sup>1</sup>, Z. Lygerou<sup>2</sup> and S. Taraviras<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Patras*

<sup>2</sup> *Department of General Biology, School of Medicine, University of Patras*

During telencephalic development neural progenitor cells become progressively committed by the expression of proneural proteins involved in coordinating progenitor cell maturation and neuronal fate specification events. During this process the coordination between proliferation and differentiation is an essential step for normal cortex development. Geminin, a novel cell cycle regulator, is a candidate molecule linking these two processes. We have shown that Geminin and its binding partner Cdt1 are expressed in neural progenitor cells during early neurogenesis, while their expression declines at late developmental stages and become undetectable upon differentiation. Geminin and Cdt1 immunostaining revealed extensive co-localization with the neural progenitor cell marker Sox2, while no overlap is detected with cells expressing markers of a differentiated neuronal phenotype. Radial glial cells, the major neural progenitor cell type, expressing RC2 and Pax6 are also immunoreactive for Geminin and Cdt1. The majority of the Geminin and Cdt1 expressing cells are distinct from those expressing fate restricted markers Mash1 or Neurogenin2, suggesting that upon initiation of fate determination programs Geminin becomes downregulated. BrdU uptake experiments reveal a cell cycle phase specific expression in neural progenitor cells. The presence of Geminin and Cdt1 in neural progenitor cells of the CNS persists into adulthood.

In order to understand whether the expression of Geminin can participate in regulating the balance between proliferating progenitors and more committed cell types we have overexpressed Geminin in an E14.5 mouse cortex using ex vivo electroporation following microinjection of DNA in the lateral ventricles.

## ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ GEMININ ΚΑΙ CDT1 ΚΑΘΟΡΙΖΟΥΝ ΤΑ ΠΡΟΔΡΟΜΑ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟ ΑΠΟ ΤΗ ΦΑΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Μ. Σπέλλα<sup>1</sup>, Ζ. Αυγερού<sup>2</sup> και Σ. Ταραβήρας<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών

<sup>2</sup> Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών

Κατά την ανάπτυξη του τελεγκεφάλου του μυός, τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα σταδιακά αποκτούν καθορισμένη αναπτυξιακή μοίρα λόγω της έκφρασης σε αυτά προνευρικών πρωτεϊνών οι οποίες συντονίζουν τις λειτουργίες της ωρίμανσης και του νευρικού καθορισμού των πρόδρομων κυττάρων. Βασικό βήμα για τη φυσιολογική ανάπτυξη του φλοιού αποτελεί ο συντονισμός μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταρικής διαφοροποίησης. Η πρωτεΐνη Geminin, ένας νέος ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου, είναι ένα υποψήφιο μόριο που συνδέει τις δύο παραπάνω διαδικασίες. Έχουμε δείξει ότι η Geminin και ο παράγοντας Cdt1, με τον οποίο αλληλεπιδρά η Geminin, εκφράζονται στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα κατά τα αρχικά στάδια της νευρογένεσης, ενώ τα επίπεδα της έκφρασής τους μειώνονται στα τελικά στάδια και γίνονται μη ανιχνεύσιμα κατά τη διαφοροποίηση. Τα κύτταρα που εκφράζουν τις Geminin και Cdt1 είναι επίσης θετικά ως προς το δείκτη των πρόδρομων νευρικών κυττάρων Sox2, ενώ καμία αλληλεπικάλυψη δεν παρατηρείται με τα κύτταρα που εκφράζουν δείκτες διαφοροποιημένων νευρώνων. Στα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας, που αποτελούν τη βασική κατηγορία πρόδρομων κυττάρων στο φλοιό και εκφράζουν τις πρωτεΐνες RC2 και Pax6, οι Geminin και Cdt1 είναι επίσης ανιχνεύσιμες. Τα επίπεδα έκφρασης των Geminin και Cdt1 φαίνεται να απαλείφονται στα κύτταρα που έχουν ενεργοποιήσει τα προγράμματα καθορισμού της αναπτυξιακής τους μοίρας: τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από την έκφραση προνευρικών πρωτεϊνών όπως οι Mash1 και Neurogenin2 και είναι διακριτά από τα κύτταρα που εκφράζουν τις Geminin και Cdt1. Πειράματα ενσωμάτωσης βρώμο-δέοξυ-ουριδίνης (BrdU) αποκάλυψαν ότι οι δύο υπό μελέτη πρωτεΐνες εκφράζονται στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα κατά τρόπο που εξαρτάται από τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Η παρουσία των Geminin και Cdt1 ανιχνεύεται και στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα του ενήλικου μυός.

Για να διερευνήσουμε την πιθανότητα η Geminin να συμμετέχει στη ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ των διαιρούμενων πρόδρομων κυττάρων και των πιο καθορισμένων πρόδρομων κυτταρικών τύπων, υπερ-εκφράσαμε την Geminin στο φλοιό εμβρύων μυός ηλικίας E14.5 χρησιμοποιώντας *ex vivo* electroporation μετά από μικρο-ένεση του DNA στις πλευρικές κοιλίες.



## BRAIN CONNECTIVITY METHODS FOR AN ACTUAL AND IMAGINERY FINGER TAPPING TASK

*M. L. Stavrinou<sup>1</sup>, L. Cimponeriu<sup>2</sup>, L. Moraru<sup>1</sup>, V.Kokkinos<sup>3</sup>, P. Pelekouda<sup>3</sup> and A.Bezerianos<sup>1</sup>.*

*<sup>1</sup>Department of Medical Physics, School of Medicine, University of Patras, Greece*

*<sup>2</sup>Institute of Physics, University of Potsdam, Am Neuen Palais, Potsdam, Germany,*

*<sup>3</sup>Department of Physiology, Medical School, University of Patras, Greece*

A Brain – Computer Interface provides an alternative communication channel between the human brain and the computer by using signal processing methods to convert brain signals into computer commands. In the aim of restoring communication between a disabled person and its environment, one of its focus is to detect the intention of movement. This approach is based on the fact that movement causes changes in the oscillatory EEG activity of sensorimotor neural populations. Similarities have been found to exist in the brain oscillatory activity between a real movement and the imagery of it. There is evidence however that in addition also there exists a common neural substrate exists between imagined and real movements.

In our protocol we recorded electroencephalographic (EEG) activity during a finger tapping task but also during the imagination of it, on healthy volunteers, with an auditory stimulation giving the pace. A sequence of 120 auditory stimuli were recorded for both the real and imagined condition, with a constant interstimulus interval of 1,5 sec. The experiments have been conducted in the Neurophysiology Unit, of Patras Medical School with a 64 channel Neuroscan system.

The analysis consisted of visualization of the Event-Related Synchronization and Desynchronization in the time-frequency space, where the dominant frequencies were detected for each subject. In this work we focused on the beta band. The Directed Transfer Function (DTF) and Partial Directed Coherence (PDC) methods, based on autoregressive modelling, were used in comparison with a phase analysis approach that calculates synchronization of the phases (Phase Modelling, PDM) in order to extract information on the connectivity and the direction of information flow. Theoretically this approach is found to describe better the weakly coupled oscillators.

When comparing the imagery and actual finger tapping task, similar connectivity patterns were shown to exist with all three methods analyzed for the contralateral hemisphere. We found that the DTF PDC and PDM methods result in with similar connectivity patterns, however the directionality of information flow is different between them. The differences count for the different quantities they measure. Our results indicate that connectivity can be used as an extra feature of a BCI system in order to code movement intention.

## ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΜΙΑΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΙΑΣ ΦΑΝΤΑΣΤΙΚΗΣ ΚΙΝΗΣΗΣ ΔΑΚΤΥΛΟΥ

*M. L. Stavrinou<sup>1</sup>, L. Cimponeriu<sup>2</sup>, L. Moraru<sup>1</sup>, V. Kokkinos<sup>3</sup>, P. Pelekouda<sup>3</sup> and A. Bezerianos<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών, Ελλάδα*

<sup>2</sup>*Institute of Physics, University of Potsdam, Am Neuen Palais, Potsdam, Germany*

<sup>3</sup>*Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών, Ελλάδα*

Ένα σύστημα επικοινωνίας Εγκεφάλου – Ηλεκτρονικού Υπολογιστή (E-HY) παρέχει έναν εναλλακτικό δίαυλο επικοινωνίας μεταξύ του ανθρώπινου εγκεφάλου και του υπολογιστή χρησιμοποιώντας μεθόδους επεξεργασίας σήματος για να μετατρέψει σήματα του εγκεφάλου σε εντολές ενός υπολογιστή. Στην προσπάθεια για την αποκατάσταση της επικοινωνίας μεταξύ ενός κινητικά ανάπηρου ασθενή και του περιβάλλοντός του ένας στόχος είναι η ανίχνευση της πρόθεσης της κίνησης. Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι η κίνηση μεταβάλλει την ταλαντωτική συμπεριφορά ομάδων νευρώνων του σωματοαισθητικού φλοιού όπως αυτό καταγράφεται στο Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα. Έχουν βρεθεί ομοιότητες μεταξύ της ταλαντωτικής δραστηριότητας του εγκεφάλου κατά την διάρκεια της κίνησης και της φαντασίας της κίνησης. Υπάρχουν ενδείξεις εντούτοις ότι υπάρχει και ένα κοινό δίκτυο μεταξύ τους.

Στο πρωτόκολλο μας καταγράψαμε ΗΕΓ δραστηριότητα κατά τη διάρκεια κίνησης του δείκτη του δεξιού δακτύλου υγιών εθελοντών μετά από ακουστικό ερέθισμα, πιέζοντας ένα πλήκτρο αλλά και κατά τη διάρκεια φαντασίας της ίδιας κίνησης. Μια σειρά από 120 μοναδιαίες καταγραφές και για τις δύο καταστάσεις συλλέχτηκαν όλες με διάστημα μεταξύ των ερεθισμάτων 1.5 δευτερόλεπτα. Τα πειράματα εκτελέστηκαν στην μονάδα Νευροφυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Πατρών με ένα σύστημα Neuroscan 64 καναλιών.

Ξεκινήσαμε την ανάλυση με εμφάνιση του συγχρονισμού / αποσυγχρονισμού σχετικού με το ερέθισμα όπου στον χώρο του χρόνου – συχνότητων, όπου και σημειώθηκαν οι κύριες συχνότητες ταλάντωσης για κάθε εθελοντή. Σε αυτή την εργασία εστίασαμε στο βήτα ρυθμό. Στη συνέχεια συγκρίναμε δύο μεθόδους που βασίζονται σε autoregressive modeling (Directed Transfer Function, Partial Directed Coherence) με μία μέθοδο που βασίζεται στην περιγραφή του συγχρονισμού της φάσης (Phase Dynamics Modelling, PDM) προκειμένου να εξάγουμε πληροφορία για την συνδετικότητα των διαφόρων περιοχών αλλά και την κατεύθυνση της ροής από τη μία περιοχή στην άλλη. Η τελευταία μέθοδος έχει αποδειχτεί θεωρητικά ότι περιγράφει καλλίτερα συστήματα ασθενώς συζευγμένων ταλαντωτών.

Συγκρίνοντας την κατάσταση της κίνησης και της φαντασίας της κίνησης, τα αποτελέσματά μας μας έδειξαν ότι υπάρχουν ομοιότητες στα δίκτυα που αναπαραστάθηκαν με τις προηγούμενες μεθόδους. Η ανάλυση έγινε για το αντίπλευρο της κίνησης ημισφαίριο. Επίσης η σύγκριση των μεθόδων DTF PDC και PDM μας δείχνει ότι για την συνδετικότητα μας δίνουν παρόμοια αποτελέσματα ενώ διαφορές υπάρχουν για την κατεύθυνση της ροής της πληροφορίας. Οι διαφορές οφείλονται στο ότι η κάθε μέθοδος βασίζεται σε διαφορετικούς υπολογισμούς. Τα αποτελέσματά μας αποτελούν σαφή ένδειξη ότι η συνδετικότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα επιπλέον κριτήριο για ένα σύστημα (E-HY) προκειμένου να κωδικοποιήσει την πρόθεση της κίνησης.

**FUNCTIONAL HEMISPHERIC PLASTICITY AND EMERGING CONCEPTS IN  
NEUROEDUCATION, NEURODIDACTICS, NEUROPEDAGOGY, AND PEDAGOGICAL  
NEUROSCIENCE**

*Z. Theodoridou, D. Koniari and L.C. Triarhou*

*University of Macedonia, Thessaloniki*

This presentation focuses on the potential of the right cerebral hemisphere of the human brain to functionally compensate language functions. It reviews left hemispherectomy operations performed in cases of intractable epilepsy. Psycholinguistic and neuroanatomical data are meta-analyzed to address the question as to what extent can the right hemisphere produce and understand language, as well as what are the underlying neuroimaging denominators of functions normally carried out by homologous cortical areas of the left cerebral hemisphere. It appears that a homologous network ensues, not only in patients subjected to hemispherectomy, but in cases of other forms of brain damage as well, including gliomas, stroke, early brain damage, arteriovenous malformations, and hydranencephaly. The ability of the right cerebral hemisphere to take over language functions strengthens the meaning of plasticity in the central nervous system; at the same time, certain questions are raised regarding the potentially excessive importance that has been attributed to specialization and the localization of neurocognitive functions. The clinical study and educational follow-up of neuropathological conditions has played a crucial role in the emergence of the new fields of neuroeducation, neurodidactics, neuropedagogy, and pedagogical neuroscience at the cross-road of neurobiology and the humanities.

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΚΗ ΕΥΠΛΑΣΤΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ  
ΣΤΗ ΝΕΥΡΟΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ, ΤΗ ΝΕΥΡΟΔΙΔΑΚΤΙΚΗ, ΤΗ ΝΕΥΡΟΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ  
ΤΗΝ ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΗ ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΗ**

*Ζ. Θεοδωρίδου, Δ. Κόνιαρη και Α. Τριάρχου*

*Πανεπιστήμιο Μακεδονίας, Θεσσαλονίκη*

Η παρουσίαση αυτή επικεντρώνεται στη δυνατότητα του δεξιού ημισφαιρίου του ανθρώπινου εγκεφάλου να αντισταθμίζει απωλεσθείσες γλωσσικές λειτουργίες. Ανασκοπεί περιπτώσεις επεμβάσεων αριστερής ημισφαιρικής εκτομής σε ανθεκτική επιληψία. Η μετα-ανάλυση ψυχογλωσσολογικών και νευροανατομικών δεδομένων παρέχει κάποιες ενδείξεις για το βαθμό στον οποίο το δεξιό ημισφαίριο μπορεί να παράγει και να κατανοεί λόγο. Επιπλέον, διερευνώνται οι νευροαπεικονιστικοί παρονομαστές που διέπουν λειτουργίες που κανονικά επιτελούνται από περιοχές του αριστερού ημισφαιρίου. Ένα ομόλογο δίκτυο προκύπτει όχι μόνο σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ημισφαιρική εκτομή, αλλά και σε άλλες νευροπαθολογικές καταστάσεις, όπως γλοιώματα, πρόιμη εγκεφαλική βλάβη, αποπληξία, αρτηριοφλεβώδεις δυσπλασίες και υδρανεγκεφαλία. Η δυνατότητα του δεξιού ημισφαιρίου να αναλαμβάνει και να επιτελεί γλωσσικές λειτουργίες διευρύνει το φάσμα της ευπλαστότητας του κεντρικού νευρικού συστήματος. Παράλληλα, θέτει σε αμφισβήτηση τη βαρύτητα που έχει αποδοθεί στην εγκεφαλική εξειδίκευση και τον εντοπισμό των νευρογνωστικών λειτουργιών. Παραπέρα, η κλινική και η εκπαιδευτική μελέτη νευροπαθολογικών περιπτώσεων έχει συνδράμει στην καθιέρωση των νέων επιστημονικών πεδίων της «νευροεκπαίδευσης», της «νευροδιδακτικής», της «νευροπαιδαγωγικής» και της «παιδαγωγικής νευροεπιστήμης», στο σταυροδρόμι της νευροβιολογίας και των ανθρωπιστικών επιστημών.

**THE CULMINATION OF CORTICAL CYTOARCHITECTONICS  
BY TWO HELLENES IN VIENNA: THE ECONOMO–KOSKINAS NOMENCLATURE  
FOR THE HUMAN CEREBRAL CORTEX  
AND ADVANTAGE OVER BRODMANN**

*L.C. Triarhou*

*University of Macedonia, Thessaloniki*

The birth of cortical cytoarchitectonics is credited to Viennese psychiatrist Theodor Meynert (1833–1892). That field came to a zenith through the monumental *Atlas of Cytoarchitectonics of the Adult Human Cerebral Cortex* of Constantin von Economo (1876–1931) and Georg N. Koskinas (1885–1975), also working at the prestigious University of Vienna in the 1920s (1). The Economo–Koskinas (EK) *Atlas* represents a gigantic intellectual and technical effort by the two foremost neuroanatomists of Hellenic origin (Macedonia and the Peloponnese, respectively). The EK nomenclature of cerebral cortical areas comprises a roman capital (lobe initial), followed by a calligraphic capital (gyrus sequence within a lobe) and a Latin or Greek subscript (cytological features). Economo and Koskinas distinguished five structural types of cortex and described 54 ground, 76 variant, and 107 modification areas (plus an additional 17 intermediate ‘transition’ areas). Topographically, their 107 modifications are distributed as 35 frontal, 18 parietal, 14 temporal, 7 occipital, 6 insular, 13 superior limbic, and 14 hippocampal (inferior limbic). The detailed cytoarchitectonic criteria of Economo and Koskinas confer a clear advantage over Brodmann’s widely used scheme, owing to the evident greater detail of histological varieties, and to the virtual unfolding of the cortex resulting from their unique perpendicular method of sectioning, as opposed to the erroneous two-dimensional projection of gyri associated with the usage of Brodmann numbers. Accordingly, it is meaningful for basic and clinical neuroscientists to adopt the EK system, especially in regard with the modern studies on functional localization.

*1. Economo C von, Koskinas GN (2008) Atlas of Cytoarchitectonics of the Adult Human Cerebral Cortex (translated, edited and revised by L.C. Triarhou). Karger, Basel.*

**Η ΑΠΟΚΟΡΥΦΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ ΑΠΟ ΔΥΟ  
ΕΛΛΗΝΕΣ ΣΤΗ ΒΙΕΝΝΗ: Η ΟΡΟΛΟΓΙΑ ΕΚΟΝΟΜΟ–ΚΟΣΚΙΝΑ ΓΙΑ ΤΟΝ  
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΚΑΙ ΤΑ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ  
ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ BRODMANN**

*Α. Τριάρχου*

*Πανεπιστήμιο Μακεδονίας, Θεσσαλονίκη*

Η γένεση του ερευνητικού πεδίου της κυτταρικής αρχιτεκτονικής του φλοιού αποδίδεται στο Βιεννέζο ψυχίατρο Theodor Meynert (1833–1892). Το πεδίο αυτό έφθασε στην αποκορύφωσή του με το μνημειώδη *Άτλαντα της Κυτταροαρχιτεκτονικής του Φλοιού των Εγκεφαλικών Ημισφαιρίων του Ενήλικος Ανθρώπου* των Κωνσταντίνου φον Οικονόμου (1876–1931) και Γεωργίου Ν. Κοσκινά (1885–1975), ερευνητών που επίσης εργάζονταν στο ξακουστό Πανεπιστήμιο της Βιέννης τη δεκαετία του 1920 (1). Ο Άτλας των Economo–Κοσκινά (ΕΚ) αποτελεί μια γιγαντιαία νοητική και τεχνική προσπάθεια των δύο διαπρεπών νευροανατόμων Ελληνικής καταγωγής (από τη Μακεδονία και την Πελοπόννησο, αντίστοιχα). Η ορολογία ΕΚ των περιοχών του φλοιού περιλαμβάνει ένα όρθιο λατινικό κεφαλαίο στοιχείο (αρχικό λοβού), ένα καλλιγραφικό κεφαλαίο στοιχείο (ακολουθία της έλικας στο λοβό) και ένα λατινικό ή ελληνικό δείκτη (κυτταρικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα). Οι Economo και Κοσκινάς διέκριναν πέντε δομικούς τύπους φλοιού και περιέγραψαν 54 θεμελιώδεις περιοχές, 76 παραλλαγές και 107 τροποποιήσεις (συν 17 ενδιάμεσες «μεταβατικές» μορφές). Τοπογραφικά, οι 107 τροποποιήσεις κατανέμονται ως 35 μετωπιαίες, 18 βρεγματικές, 14 κροταφικές, 7 ινιακές, 6 στη νήσο, 13 άνω επιχείλιες και 14 ιπποκάμπειες (κάτω επιχείλιες). Τα λεπτομερή κυτταροαρχιτεκτονικά κριτήρια των Economo και Κοσκινά έχουν σαφή πλεονεκτήματα έναντι του ευρέως χρησιμοποιούμενου σχήματος του Brodmann, λόγω και της εμφανώς μεγαλύτερης λεπτομέρειας σε ιστολογική «ευκρίνεια», και της ουσιαστικής εκτύλιξης του φλοιού, αποτέλεσμα της μοναδικής μεθόδου καθέτων τομών προς την επιφάνεια σε όλες τις έλικες, σε αντιδιαστολή με την εσφαλμένη δυσδιάστατη προβολή ελίκων που προκύπτει από τη χρήση των περιοχών Brodmann. Συνεπώς, έχει νόημα και στις βασικές και στις κλινικές νευροεπιστήμονες η υιοθέτηση του συστήματος ΕΚ, ιδιαίτερα σε σχέση με τις σύγχρονες μελέτες λειτουργικής νευροαπεικόνισης.

*1. Economo C von, Koskinas GN (2008) Atlas of Cytoarchitectonics of the Adult Human Cerebral Cortex (translated, edited and revised by L.C. Triarhou). Karger, Basel.*

**BRI2 PROTEIN HOMODIMERIZES VIA DISULFIDE BOND FORMATION**

*Maria Tsachaki<sup>1</sup>, Katerina Melachrinou, Vassiliki Kyrargyri, Agueda Rostagno<sup>2</sup>, Jorge Ghiso<sup>2</sup>, Spiros Efthimiopoulos<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Department of Biology, Division of Animal and Human Physiology, University of Athens, 157 84 Panepistimiopolis, Ilisia, Greece*

<sup>2</sup>*Departments of Pathology and Psychiatry, New York University School of Medicine, 550 First Avenue, TH-432, New York, NY 10016, USA*

Familial British Dementia (FBD) and Familial Danish Dementia (FDD) are two rare dominantly inherited neurodegenerative diseases that present striking similarities with Alzheimer's disease. The genetic defect underlying those dementias is two different mutations in the gene that encodes for BRI2 protein. Cleavage of mutated BRI2 proteins by furin releases the amyloidogenic peptides ABri and ADan in FBD and FDD respectively, which accumulate as amyloid or preamyloid plaques in the brains of patients. Concerning the physiological role of BRI2 there is limited information. In an attempt to unravel novel aspects of BRI2 biological properties, we explored the possibility that it forms dimers, based on two significant structural elements of the protein. First, BRI2 contains within its transmembrane domain the GXXXG motif that has been shown to mediate homotypic protein interactions in many occasions. Second, BRI2 contains an odd number (9) of cysteine residues, which suggests that at least one of them is free and can be involved in the formation of an intermolecular disulfide bond with another BRI2 molecule. In the current study, using differently tagged proteins we showed that BRI2 forms dimers in a cellular system. Mutation of the glycines of the GXXXG motif to leucines did not seem to have an effect on dimerization. To investigate if intermolecular disulfide bridges participate in dimer formation, we analyzed cell extracts that expressed BRI2 under reducing and non reducing conditions. Under non reducing conditions, we detected BRI2 dimers and monomers, whereas under reducing conditions we only detected BRI2 monomers. To identify the responsible residue for the disulfide bond formation, we focused on cysteine 89 that seems to be the only one available in the oxidizing environment of the extracellular space. Mutation of cysteine 89 to alanine greatly inhibited the formation of disulfide-linked dimers, which implies that this cysteine is involved in the formation of dimers. We also showed that BRI2 dimers are formed in the ER and are subsequently transferred at the cell surface. In addition, BRI2 dimers are found to exist *in vivo*, based on the analysis of mouse brain extracts. The two mutated forms of BRI2 in British (ABriPP) and Danish (ADanPP) dementia retain the ability to form dimers, which appear normally at the cell surface. Whether those dimers are functional remains to be elucidated. We conclude that BRI2 forms disulfide-linked dimers in cells and in mouse brain and that cysteine 89 is involved in dimer formation. BRI2 dimers are formed in the ER and then appear at the cell surface. Our study contributes in the understanding of the biological properties of BRI2 that may prove important for exerting its function(s). Revealing the physiological functions of BRI2 is a critical step in the elucidation of the deviations that lead to neurodegeneration.

*This research was funded by the Pythagoras I grant from the Ministry of Education.*

## Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ BRI2 ΟΜΟΔΙΜΕΡΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΩΝ ΔΕΣΜΩΝ

Μαρία Τσαχάκη<sup>1</sup>, Κατερίνα Μελαχροινού<sup>1</sup>, Βασιλική Κυραργύρη<sup>1</sup>, Agueda Rostagno<sup>2</sup>, Jorge Ghiso<sup>2</sup>,  
Σπύρος Ευθυμίου<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 157 84  
Πανεπιστημιόπολη, Ιλίσια

<sup>2</sup>Departments of Pathology and Psychiatry, New York University School of Medicine, 550 First  
Avenue, TH-432, New York, NY 10016, USA

Η οικογενής άνοια τύπου Βρετανίας (Familial British Dementia, FBD) και η οικογενής άνοια τύπου Δανίας (Familial Danish Dementia, FDD) είναι δύο σπάνιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες με σημαντικές ομοιότητες με την νόσο Alzheimer. Οι γενετικές μεταλλάξεις που συνδέονται με την εμφάνιση των δύο αυτών ανοιών εντοπίζονται στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη BRI2. Πρωτεόλυση των μεταλλαγμένων BRI2 πρωτεϊνών από την φουρίνη απελευθερώνει τα αμυλοειδογενικά πεπτίδια ABri και ADan στις FBD και FDD αντίστοιχα, τα οποία συσσωρεύονται ως αμυλοειδικές πλάκες στους εγκεφάλους των ασθενών. Όσον αφορά τη φυσιολογική λειτουργία της BRI2 δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα. Σε μια προσπάθεια να ανακαλυφθούν οι βιολογικές ιδιότητες της BRI2, διερευνήσαμε την πιθανότητα να σχηματίζει ομοδιμερή βασιζόμενοι σε δύο δομικά στοιχεία της πρωτεΐνης. Πρώτον, την ύπαρξη του διαμεμβρανικού μοτίβου GXXXG το οποίο έχει δειχθεί σε πολλές περιπτώσεις να είναι απαραίτητο για ομοτυπικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και δεύτερον, στην ύπαρξη περιττού αριθμού (9) κυστεϊνικών καταλοίπων γεγονός που υποδηλώνει ότι τουλάχιστον ένα από αυτά είναι ελεύθερο και μπορεί να συμμετέχει στο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών με άλλο μόριο BRI2. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας διαφορετικά επιτοπικά σημασμένες πρωτεΐνες, δείξαμε ότι η BRI2 σχηματίζει ομοδιμερή. Μετάλλαξη των γλυκινών του μοτίβου GXXXG σε λευκίνες δεν επηρέασε τον ομοδιμερισμό. Για να διερευνήσουμε κατά πόσο δισουλφιδικοί δεσμοί συμμετέχουν στον σχηματισμό διμερών, αναλύσαμε εκχυλίσματα κυττάρων που εκφράζουν BRI2 σε αναγωγικές και μη αναγωγικές συνθήκες. Σε μη αναγωγικές συνθήκες, ανιχνεύσαμε μονομερή και διμερή της BRI2 ενώ σε αναγωγικές συνθήκες μόνο μονομερή. Για να εντοπίσουμε το κυστεϊνικό κατάλοιπο που είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό του δισουλφιδικού δεσμού, εστίασαμε στην κυστεΐνη 89 που φαίνεται να είναι η μόνη διαθέσιμη στο οξειδωτικό εξωκυτταρικό περιβάλλον. Μετάλλαξη της κυστεΐνης 89 σε αλανίνη ανέστειλε σημαντικά το σχηματισμό ομοδιμερών της BRI2, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτή η κυστεΐνη εμπλέκεται στο σχηματισμό των διμερών. Τα διμερή σχηματίζονται στο ER και στην συνέχεια μεταφέρονται στην κυτταρική επιφάνεια. Επιπλέον, τα διμερή της BRI2 ανιχνεύθηκαν και σε εκχυλίσματα εγκεφάλου ποντικών. Οι δύο μεταλλαγμένες μορφές της BRI2 διατηρούν την ικανότητα να σχηματίζουν διμερή τα οποία επίσης εμφανίζονται στην κυτταρική επιφάνεια. Κατά πόσο αυτά τα διμερή είναι λειτουργικά δεν είναι γνωστό. Συμπερασματικά, βρέθηκε ότι η BRI2 σχηματίζει ομοδιμερή που συγκρατώνται με δισουλφιδικούς δεσμούς, σχηματίζονται στο ER και εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια. Η μελέτη μας συνεισφέρει στην κατανόηση των βιολογικών ιδιοτήτων της BRI2 που μπορεί να είναι σημαντικές για την εκδήλωση της λειτουργίας της. Η αποκάλυψη της φυσιολογικής λειτουργίας της BRI2 είναι σημαντική για την διελεύκανση του ρόλου της στον νευροεκφυλισμό.

*Αυτή η Έρευνα χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα του Υπουργείου Παιδείας «Πυθαγόρας Ι».*



## **THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF SEMANTIC DEMENTIA AND DEMENTIA OF ALZHEIMER'S DISEASE**

*Tsantali E,<sup>1</sup> Economides D,<sup>1</sup> Karatzas N,<sup>2</sup> Papapostolou P<sup>3</sup>, Paraskeuaidis N<sup>4</sup>*

<sup>1</sup> *Geriatric Unit, 2<sup>nd</sup> Dept. Internal Medicine, Aristotle University of Thessaloniki Hippocraton Hospital, Thessaloniki, , Greece*

<sup>2</sup> *Laboratory of Nuclear Physic and Imaging, Aristotle University of Thessaloniki, Papageorgiou, General Regional Hospital, Thessaloniki, Greece*

<sup>3</sup> *Radiological Laboratory, Papageorgiou Genaral Regional Hospital, Thessaloniki, Greece*

<sup>4</sup> *School of Psychology, Aristotle University of Thessaloniki, Greece*

The Semantic dementia and the dementia of Alzheimer's disease are two types of neurodegenerative dementia with many common clinical characteristics. This causes difficulties in differential diagnosis particularly in the first stages of the diseases without interdisciplinary approach. We present two case studies step by step in order to indicate significant differences according to clinical, laboratory, neuroimaging (MRI, SPECT) and neuropsychological findings. The heterogenesis between the two types of dementia makes more difficult the differential diagnosis. We present the metaanalysis results in all the above mentioned criteria for the two types of dementia and our findings showing that the detail neuropsychological assessment gives more detail information and helps better the differential diagnosis in accordance with the rest of previous mentioned criteria. According to the neuroimaging data the hypometabolism (SPECT) in dementia of Alzheimer's type involves temporal, parietal and frontal cortical areas and predominantly temporal areas in the semantic dementia. However, our findings also showed extended amyloid plaque deposition in close regional association to the hypometabolic changes, though similar metabolic changes observed in MRI. Our neuropsychological findings are in accordance with the literature that in the first stages of Alzheimer's disease the episodic memory is the most impaired, though in semantic dementia the naming ability, the verbal fluency ability, the semantic memory and the executive function. Additionally there more behavioral changes and less episodic memory impairment.

## ΔΙΑΦΟΡΟΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΗΜΑΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΟΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΟΙΑΣ ΤΥΠΟΥ ALZHEIMER

*Τσάνταλη Ε.,<sup>1</sup> Οικονομίδης Δ.,<sup>1</sup> Καρατζάς Ν.,<sup>2</sup> Παπαποστόλου Π.,<sup>3</sup> & Παρασκευαΐδης Ν.<sup>4</sup>*

<sup>1</sup> *Γηριατρική Μονάδα, Β΄Π Κλινικής Α.Π.Θ, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης*

<sup>2</sup> *Εργαστήριο Πυρηνικής Φυσικής Α.Π.Θ, Νοσοκομείο Παπαγεωργίου*

<sup>3</sup> *Ακτινολογικό Εργαστήριο, Γενικό Περιφερειακό Νοσοκομείο Παπαγεωργίου*

<sup>4</sup> *Τμήμα Ψυχολογίας, Α.Π.Θ*

Η Σημασιολογική Άνοια και η Άνοια τύπου Alzheimer (ΑΤΑ) είναι δυο τύποι εκφυλιστικής άνοιας με πολλά κοινά χαρακτηριστικά στην κλινική τους εικόνα που κάνουν δύσκολη τη διαφοροδιάγνωσή τους στα αρχικά τους στάδια, αν δεν υπάρξει διεπιστημονική προσέγγισή τους. Μέσα από τη βήμα προς βήμα παρουσίαση δυο περιστατικών παρουσιάζουμε λεπτές διαφοροποιήσεις ως προς τα κλινικά, εργαστηριακά, νευροαπεικονιστικά (MRI, SPECT) και νευροψυχολογικά ευρήματα. Η ετερογένεια μεταξύ των δυο τύπων ανοιών καθιστά ακόμη πιο δύσκολη τη διαφοροδιάγνωση. Παρουσιάζουμε αποτελέσματα μεταανάλυσης σε όλα τα παραπάνω κριτήρια για τους δυο τύπους άνοιας και τα δικά μας ευρήματα δείχνοντας ότι ο διεξοδικός νευροψυχολογικός έλεγχος δίνει αναλυτικότερες πληροφορίες και βοηθάει καλύτερα στη διαφοροδιάγνωση σε σχέση με τα υπόλοιπα κριτήρια. Με βάση τα νευροαπεικονιστικά ευρήματα ο υπομεταβολισμός (SPECT) στην ΑΤΑ περιλαμβάνει τις κροταφικές, βρεγματικές και μετωπιαίες περιοχές του φλοιού, ενώ στη σημασιολογική άνοια κυρίως τις μετωπιαίες περιοχές. Τα ευρήματά μας έδειξαν εκτεταμένες αμυλοϊδικές πλάκες στις περιοχές που παρουσίασαν υπομεταβολικές αλλαγές (SPECT) στην ΑΤΑ, ενώ ανάλογες μεταβολικές αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν και στη μαγνητική τομογραφία (MRI). Τα νευροψυχολογικά ευρήματά μας συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας ότι στην ΑΤΑ στα πρώτα στάδια της νόσου βλάπεται περισσότερο η επεισοδιακή μνήμη, ενώ στη σημασιολογική άνοια η κατονομασία, η λεκτική ευχέρεια, η σημασιολογική μνήμη και οι εκτελεστικές λειτουργίες. Επιπρόσθετα εντονότερες είναι οι συμπεριφορικές αλλαγές, ενώ η βλάβη της επεισοδιακής μνήμης είναι ηπιότερη.

**THE 1906 PARIS DEBATE ON APHASIA: TWO LITTLE KNOWN  
TIMELY CONTRIBUTIONS FROM BUENOS AIRES**

*K. Tsapkini<sup>1</sup>, A.B. Vivas<sup>2</sup> and L.C. Triarhou<sup>3</sup>*

**<sup>1</sup>Department of Psychology, Aristotelian University, Thessaloniki**

*<sup>2</sup>City Liberal Studies, Affiliated Institution of University of Sheffield, Thessaloniki*

*<sup>3</sup>University of Macedonia, Thessaloniki*

In 1906, Pierre Marie triggered a heated controversy and an exchange of articles with Jules Déjerine over the localization of language functions in the human brain. The renowned holistic-localizationist debate between the two French neurologists spread internationally. One of the timeliest responses, that appeared in print one month after Marie's first paper, came from Christofredo Jakob, a Bavarian-born neuropathologist and protagonist researcher of the cerebral cortex, working in Buenos Aires. Jakob published two relevant articles during that same year, respectively entitle 'Does a center of Broca exist or not?' and 'Anatomo-biological considerations on the centers of language'. The two articles address neuropsychological and developmental aspects of language functions in normality and pathology with regard to the brain areas that subserve them. The present study analyzes and discusses Jakob's ideas on the function and development of language areas. Jakob's views, after more than a century, still shed light on our understanding of brain-language relationships, particularly as such issues remain at the core of scientific controversy with the advent of the newer neuropsychological and neuroimaging methods.

**Η ΠΑΡΙΣΙΑΝΗ ΔΙΑΜΑΧΗ ΤΟΥ 1906 ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΦΑΣΙΑ:  
ΔΥΟ ΕΓΚΑΙΡΕΣ ΑΓΝΩΣΤΕΣ ΣΥΜΒΟΛΕΣ ΑΠΟ ΤΟ BUENOS AIRES**

*Κ. Τσαπκίνη<sup>1</sup>, Α.Β. Vivas<sup>2</sup> και Α. Τριάρχου<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Τμήμα Ψυχολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*

<sup>2</sup>*City Liberal Studies, Affiliated Institution of University of Sheffield, Θεσσαλονίκη*

<sup>3</sup>*Πανεπιστήμιο Μακεδονίας, Θεσσαλονίκη*

Το 1906, ο Pierre Marie προκάλεσε μια έντονη αντιπαράθεση και ανταλλαγή άρθρων με τον Jules Déjerine σχετικά με τον εντοπισμό γλωσσικών λειτουργιών στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Ο γνωστός διάλογος ολισμού-εντοπισμού ανάμεσα στους δύο Γάλλους νευρολόγους επεκτάθηκε διεθνώς. Μια από τις εγκαίριστερες αποκρίσεις, που δημοσιεύθηκε μόλις ένα μήνα μετά το πρώτο άρθρο του Marie, προήλθε από τον Christofredo Jakob, Βαυαρό νευροπαθολόγο και πρωταγωνιστή της έρευνας του φλοιού, που εργαζόταν στο Buenos Aires. Ο Jakob δημοσίευσε δύο σχετικά άρθρα το 1906, με τίτλο, αντίστοιχα, «Υπάρχει ή όχι η περιοχή Broca» και «Ανατομο-βιολογικές θεωρήσεις για τα κέντρα του λόγου». Τα δύο άρθρα εξετάζουν νευροψυχολογικές και αναπτυξιακές πτυχές των γλωσσικών λειτουργιών φυσιολογικά και σε παθολογικές καταστάσεις σε σχέση με τις περιοχές εγκεφάλου που τις υποβοηθούν. Η παρούσα μελέτη αναλύει τις ιδέες του Jakob για τη λειτουργία και την ανάπτυξη των γλωσσικών περιοχών. Οι απόψεις του Jakob, ακόμη και μετά από έναν αιώνα, δια φωτίζουν την κατανόηση της σχέσης εγκεφάλου και γλώσσας, καθότι τέτοια ζητήματα παραμένουν στο επίκεντρο της επιστημονικής διαμάχης ιδιαίτερα με την έλευση των νεωτέρων νευροψυχολογικών και νευροαπεικονιστικών μεθόδων.

**A METHODOLOGY FOR KNOWLEDGE EXTRACTION  
FROM MULTI-SUBJECT ENCEPHALOGRAPHIC RECORDINGS  
WITH APPLICATION TO A MEG STUDY OF OCULOMOTOR SYSTEM**

*Anthi Tsirouki<sup>1</sup>, Areti Tzelepi<sup>2,3</sup>, Nikos Laskaris<sup>1</sup>*

*1 Artificial Intelligence & Information Analysis Laboratory, Dept of Informatics, Aristotle  
University of Thessaloniki, Greece*

*2 LPPA, CNRS-Collège de France, Paris, France*

*3 ICCS, National Technical University of Athens, Greece*

When estimated cortical activity related to encephalographic responses needs to be compared across multiple subjects, the problem of high inter-subject variability often arises [1]. This can obscure the detection of important events, the definition of their timing and their precise localization. The usual practice of grand averaging and traditional statistics can be misleading, especially when small-sized data are available and deviations from normality are severe.

We suggest a pattern-analytic approach for studying the response dynamics reflected in the extracted regional activations. Dominant-mode clustering is first used to detect the commonalities across subjects and then followed by a data-mining technique to summarize the results in a visual manner. When different experimental conditions are encountered, the pairwise contrast of regional responses can be achieved readily via appropriate statistics and further systematized through a resampling approach.

The suggested methodology is demonstrated using reconstructed cortical activity from an MEG experiment targeting the function of oculomotor system during voluntary saccadic movements. The subjects performed a modified memory-delay task, in which a triangle first denoted the direction of eye-movement and, after a certain delay, the subject had to perform a saccade to that direction. The whole experiment was performed twice with the distance from the screen denoting a separate recording condition.

Timecourses of response activity from 46 different brain regions from each subject were the input to the suggested methodology. The output was an ordered list of prototypical responses, an associated intelligible display of the activity distribution and a spatial map of significantly differential activation for the contrasted conditions. Robustness to outliers and increased Signal-to-Noise ratio were verified experimentally.

*1. Mohamed L. Seghier, Karl J. Friston, Cathy J. Price (2007) Detecting subject-specific activations using fuzzy clustering. Neuroimage 36: 594-605.*

**ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΑΓΩΓΗ ΓΝΩΣΗΣ ΑΠΟ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ  
ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΜΕΓ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ  
ΟΠΤΙΚΟΚΙΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

*Ανθή Τσιρούκη<sup>1</sup>, Αρετή Τζελέπη<sup>2,3</sup>, Νίκος Λάσκαρης<sup>1</sup>*

*1 Εργαστήριο Α Ι Ι Α, Τμήμα Πληροφορικής, Α. Π. Θ., Ελλάδα*

*2 LPPA, CNRS-Collège de France, Paris, France*

*3 ICCS, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Αθήνα, Ελλάδα*

Όταν η εγκεφαλική δραστηριότητα, που αντιστοιχεί στις προκλητές ή βιοματικές αποκρίσεις, πρέπει να συνεκτιμηθεί από καταγραφές σε διαφορετικούς πειραματάνθρωπους, το πρόβλημα της υψηλής διακύμανσης μεταξύ των επιμέρους καταγραφών ανακύπτει [1]. Αυτό μπορεί να συγκαλύψει την ανίχνευση σημαντικών γεγονότων, τον καθορισμό του χρονισμού τους και την ακριβή θέση τους. Η κλασσική εφαρμογή του συμψηφισμού και η παραδοσιακή στατιστική μπορεί να οδηγήσει σε σφάλματα ειδικά όταν έχουμε να κάνουμε με δείγματα από μικρό πλήθος (~10-20) εξεταζομένων και οι αποκλίσεις από την κανονικότητα είναι μεγάλη.

Προτείνουμε μια προσέγγιση με βάση την ανάλυση προτύπων για τη μελέτη της δυναμικής της απόκρισης όπως αυτή αντικατοπτρίζεται στις εξαγόμενες χρονοσειρές πολλαπλών περιοχών. Αρχικά εφαρμόζεται, σε κάθε περιοχή ξεχωριστά, μια μέθοδος ομαδοποίησης με βάση την επικρατούσα χρονοσειρά με σκοπό την ανίχνευση ομοιοτήτων μεταξύ της δραστηριότητας στους διαφορετικούς εθελοντές. Στη συνέχεια μια data-mining τεχνική ολοκληρώνει τα επιμέρους αποτελέσματα σε ένα συνολικό μοντάζ που επιτρέπει την άμεση εποπτική σύγκριση μεταξύ της δραστηριότητας στις διαφορετικές περιοχές. Στην περίπτωση διαφορετικών πειραματικών συνθηκών, τα προηγούμενα εφαρμόζονται σε χρονοσειρές που ποσοτικοποιούν τη διαφορετικότητα στην εγκεφαλική δραστηριότητα μέσα από διαδικασίες επαναδειγματοληψίας.

Η προτεινόμενη μεθοδολογία παρουσιάζεται και επιδεικνύεται χρησιμοποιώντας ανακατασκευασμένη εγκεφαλική δραστηριότητα από δεδομένα μαγνητοεγκεφαλογραφήματος και συγκεκριμένο πείραμα που αναφερόταν στη λειτουργία του οπτικοκινητικού συστήματος και κυρίως στις εθελοντικές σακκαδικές κινήσεις. Οι εθελοντές πέρασαν από μια τροποποιημένη δοκιμασία καθυστέρησης-μνήμης, στην οποία ένα τρίγωνο αρχικά δήλωνε την κατεύθυνση κίνησης του ματιού και μετά από ορισμένο χρόνο ο κάθε εθελοντής έπρεπε να εκτελέσει σακκαδική προς αυτή τη κατεύθυνση. Όλη η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές με την αλλαγή της απόστασης από την οθόνη να καθορίζει δύο διαφορετικές πειραματικές συνθήκες.

Η χρονική καταγραφή των ενεργοποιήσεων 46 διαφορετικών περιοχών του εγκεφάλου από κάθε εθελοντή αποτέλεσε τα δεδομένα εισόδου στην προτεινόμενη μεθοδολογία. Τα αποτελέσματα που πήραμε ήταν μια διατεταγμένη λίστα από αντιπροσωπευτικές αντιδράσεις, μια οπτικά κατανοητή κατανομή των δραστηριοποιήσεων και ένας χωρικός χάρτης σημαντικών διαφορών στην ενεργοποίηση για τις συγκρινόμενες καταστάσεις. Η ανθεκτικότητα στις μη τυπικές μετρήσεις και η αυξημένη αναλογία σήματος-θορύβου πιστοποιήθηκαν πειραματικά.

*1. Mohamed L. Seghier, Karl J. Friston, Cathy J. Price (2007) Detecting subject-specific activations using fuzzy clustering. Neuroimage 36: 594-605.*

## **EFFECT OF NEONATAL REINFORCEMENT OR FRUSTATIVE NON-REWARD ON ADULT COGNITIVE PERFORMANCE AND EMOTIONALITY IN RATS**

*S. Tzanoulinou, A. Diamantopoulou, A. Stamatakis, F. Stylianopoulou*

*Laboratory of Biology-Biochemistry, Department of Nursing, University of Athens*

*Papadiamantopoulou 123, 11527, Athens, Greece*

Early experiences have been demonstrated to shape both physiological and cognitive functions of the organism. In our laboratory a novel paradigm of neonatal learning has been developed, in which mother contact is used as either a positive or negative reinforcer. Rat pups, both those denied contact with the mother (frustrated) as well as those allowed contact as continuous reward (non-frustrated) can learn a T-maze after four days of training (postnatal days 10-13). Furthermore it was shown that animals subjected as neonates to frustrative non-reward exhibit improved performance in the memory probe trial of the Morris Water Maze, a hippocampal dependent task. The goal of the present work was to investigate whether the neonatal experience of training under either continuous reinforcement or frustrative non-reward affected, in adulthood, other forms of learning and memory, which are not hippocampal dependent. More specifically, we subjected adult rats exposed as neonates to either reinforcement or frustrative non-reward to two different behavioral tasks, the Novel Object Recognition task and the Fear Conditioning. The Novel Object Recognition task is dependent on the rhinal cortex and is used to test short-term memory in rodents, based on their innate exploratory behavior. No statistically significant differences were found between the two experimental groups in their performance in this task. In the Fear Conditioning task, we exposed animals to two different versions: Contextual, which is dependent on both the amygdala and the hippocampus, and Cued, which is mainly amygdala-dependent. Whereas there were no differences among the two groups in the contextual version, rats subjected to frustrative non-reward as neonates showed enhanced memory, i.e. increased freezing, in the Cued version. In addition, in all behavioral tasks, animals reinforced as neonates showed increased level of defecation, an index of higher emotional reactivity (anxiety). The results of the present study provide further support to the view that differences in early experiences may lead to further differences in cognitive behavior and emotional reactivity in adult life.

*This work has been supported by the Special Account for Research Grants-University of Athens.*

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΝΕΟΓΝΙΚΗΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ Ή ΤΗΣ ΜΑΤΑΙΩΤΙΚΗΣ ΜΗ  
ΑΝΤΑΜΟΙΒΗΣ ΣΤΙΣ ΓΝΩΣΙΑΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΣΥΝΑΙΣΘΗΜΑΤΙΚΕΣ  
ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΜΥΣ**

*Τζανουλίνου Σ., Διαμαντοπούλου Α., Σταματάκης Α., Στυλιανοπούλου Φ.*

*Εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας, Τμήμα Νοσηλευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών,*

*Παπαδιαμαντοπούλου 123, 11527, Αθήνα*

Έχειδειχθεί ότι οι πρώιμες εμπειρίες διαμορφώνουν τις γνωσιακές καθώς και τις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Στο εργαστήριό μας έχει αναπτυχθεί ένα νέο μοντέλο νεογνικής μάθησης στο οποίο η μητρική επαφή χρησιμοποιείται είτε ως θετική είτε ως αρνητική μορφή ενίσχυσης. Τα νεογνά των επίμυων, τόσο αυτά που στερούνται την επαφή με τη μητέρα τους (frustrated), όσο και αυτά στα οποία η επαφή με τη μητέρα τους επιτρέπεται ως μία συνεχής ανταμοιβή (non-frustrated), μπορούν να μάθουν έναν λαβύρινθο σχήματος T μετά από τέσσερις ημέρες εκπαίδευσης (μεταγεννητικές ημέρες 10-13). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι ενήλικα ζώα τα οποία είχαν υποβληθεί σε ματαιωτική μη ανταμοιβή ως νεογνά, έχουν βελτιωμένες επιδόσεις κατά τον έλεγχο μνήμης στη δοκιμασία του Υδάτινου Λαβυρίνθου κατά Morris, η οποία εξαρτάται από τον υπόκαμπο. Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί το κατά πόσον η νεογνική εμπειρία της εκπαίδευσης κάτω από είτε συνεχή ενίσχυση είτε ματαιωτική μη ανταμοιβή, επιδρά στην ενήλικη ζωή σε άλλες μορφές μάθησης και μνήμης, οι οποίες δεν εξαρτώνται από τον υπόκαμπο. Ειδικότερα, ενήλικοι επίμυς οι οποίοι εκπαιδεύθηκαν ως νεογνά είτε υπό ενίσχυση είτε υπό ματαιωτική μη ανταμοιβή, υποβλήθηκαν σε δύο διαφορετικές συμπεριφορικές δοκιμασίες, στη δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου και στη δοκιμασία Εξαρτημένης Μάθησης Φόβου. Η δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου εξαρτάται από τον ρινικό φλοιό και χρησιμοποιείται για να ελέγξει τη βραχυπρόθεσμη μνήμη σε τρωκτικά, βασιζόμενη στην ενδογενή εξερευνητική συμπεριφορά τους. Σε αυτή τη δοκιμασία δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της επίδοσης των δύο πειραματικών ομάδων. Στη δοκιμασία Εξαρτημένης Μάθησης Φόβου, υποβάλαμε τα ζώα σε δύο διαφορετικά πρωτόκολλα: τη δοκιμασία Πλαισίου (Contextual) που εξαρτάται τόσο από την αμυγδαλή όσο και από τον υπόκαμπο και τη δοκιμασία Ένδειξης (Cued), η οποία είναι εξαρτώμενη κυρίως από την αμυγδαλή. Ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων στη δοκιμασία Πλαισίου, οι επίμυς που είχαν υποβληθεί ως νεογνά σε ματαιωτική μη ανταμοιβή, επέδειξαν βελτιωμένη μνήμη, δηλαδή αυξημένη ακινησία (freezing) στη δοκιμασία Ένδειξης. Επιπλέον, σε όλες τις συμπεριφορικές δοκιμασίες τα ζώα που είχαν λάβει ενίσχυση ως νεογνά έδειξαν αυξημένα επίπεδα αφόδευσης, η οποία είναι ένας δείκτης εντονότερης συναισθηματικής απαντητικότητας («άγχος»). Τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη παρέχουν επιπλέον στήριξη στην άποψη ότι οι διαφορές στις πρώιμες εμπειρίες μπορεί να οδηγήσουν σε περαιτέρω διαφορές στις γνωσιακές ικανότητες και την αντίδραση στο στρες κατά την ενήλικη ζωή.

*Η παρούσα εργασία χρηματοδοτήθηκε από τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του Πανεπιστημίου Αθηνών*



## MAMMALIAN BM88 IS FUNCTIONAL IN DROSOPHILA DURING EMBRYONIC NEUROGENESIS AND INTERFERES WITH CELL CYCLE PROGRESSION OF THE NEURONAL PRECURSOR CELLS

Athanasios Tzortzopoulos<sup>1</sup>, Dimitra Thomaidou<sup>2</sup>, Rebecca Matsas<sup>2</sup> & Efthimios Skoulakis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics, BSRC "Alexander Fleming", Fleming 34-36, Vari, Greece, 16672

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Neurobiology, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vasilissis Sofias Avenue, 115 21 Athens, Greece

*Drosophila melanogaster* provides an excellent model system to study and analyze gene function *in vivo*. We utilized the bipartite UAS-GAL4 system to express porcine and mouse BM88 in a temporal and tissue-specific pattern in order to investigate its functional effects on *Drosophila* embryonic neurogenesis. BM88/Cend1 is a neuron-specific protein whose function is implicated in triggering exit from the cell cycle allowing cells to differentiate towards a neuronal phenotype [1]. Transgenic animals expressing either porcine or mouse BM88 under the control of *elav*- and *achaete*-GAL4 drivers showed developmental arrest at embryonic stages which was contributed to severe neuronal phenotypes with variable expressivity observed at various stages of embryonic development. *elav*-GAL4 drives expression of the UAS transgenes weakly in the neuroectoderm and GMCs (Ganglion Mother Cells) but strongly in post-mitotic neurons. Conversely *achaete*-GAL4 expresses in the neuroectoderm and later in the *achaete*-expressing neuroblasts [2]. In early/mid stages of neurogenesis (stages 10-11), expression of BM88 using either GAL4 driver induced an increase in the neural-specific antigenicity of the neuroectoderm which was evident by anti-HRP staining. This effect was at the expense of precursor cells (neuroblasts and GMCs) since their number was reduced compared to the wild-type controls. At late stages of nervous system development (embryonic stages 12-15), BM88 expression induced gross morphological defects primarily in the CNS. Staining with three distinct neuron-specific antibodies (anti- HRP, *elav* and BP104) revealed the abnormal morphology of the developing nervous system in BM88-expressing embryos. These defects included thinning of the ventral nerve cord, loss of neuromeric parts, commissural disruption and in some severe cases, total absence of the ventral nerve cord. Staining with anti-prospero which marks all precursor cells (neuroblasts and GMCs), showed a marked reduction of prospero-positive cells around the regions where mature neurons had failed to form. Neuroblast-specific anti-worniu staining revealed a defect in the formation of parental neuroblasts but the effect was not as severe as it was demonstrated by anti-prospero staining, further indicating that the predominant functional effect of BM88 accumulation is during GMC formation. Monitoring the formation and the differentiation of the MP2 precursor cells which strongly express BM88 under the *achaete*-GAL4 driver, we discovered that the pair of MP2 cells formed in a single metamere of the ventral neuroectoderm *i*) did not stain positive for worniu, and *ii*) had moved prematurely into close proximity and were abnormally fused. Furthermore, the ventral neuroectodermal cells of embryos expressing BM88 failed to carry out proper cell cycle progression revealed by the disorganized expression patterns of the cell cycle markers anti- cyclin A and phosphohistone 3. Our findings show that mammalian BM88 is functional in *Drosophila* revealing a role of BM88 in the coordination of proper cell cycle progression of and generation of the neuronal precursor cells during embryonic neurogenesis.

[1] Georgopoulou N, Hurel C, Politis PK, Gaitanou M, Matsas R and Thomaidou D (2004) *J. Biol. Chem.*, **281**, 33606-33610.

[2] Tzortzopoulos A and Skoulakis CE (2007) *Genesis*, *in press*.

## Η ΘΗΛΑΣΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ BM88 ΕΙΝΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΣΤΗ ΔΡΟΣΟΦΙΛΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑ ΣΤΗΝ ΟΜΑΛΗ ΠΡΟΟΔΟ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Αθανάσιος Τζωρτζόπουλος<sup>1</sup>, Δήμητρα Θωμαΐδου<sup>2</sup>, Ρεβέκκα Μάτσα<sup>2</sup> & Ευθύμιος Σκουλάκης<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, ΕΚΕΒΕ «Αλέξανδρος Φλέμιγκ», Φλέμιγκ 34-36, Βάρη Αττικής, 16672

<sup>2</sup>Εργαστήριο Μοριακής Νευροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Βασιλίσσης Σοφίας 127, 115 21 Αθήνα

Η *Drosophila melanogaster* αποτελεί ένα άριστο σύστημα-μοντέλο για τη μελέτη και ανάλυση της λειτουργίας γονιδίων *in vivo*. Χρησιμοποιήσαμε το διμερές σύστημα UAS/GAL4 για να εκφράσουμε BM88 πρωτεΐνη από χοίρο και ποντίκι σε χρονικά περιορισμένο και ιστο-ειδικό πρότυπο, έχοντας ως στόχο να μελετήσουμε την λειτουργική της επίδραση στην εμβρυϊκή νευρογένεση της Δροσόφιλας. BM88/Cend1 είναι ένα νευροειδικό μόριο του οποίου η λειτουργία σχετίζεται με το έναυσμα της εξόδου των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο επιτρέποντας σε αυτά να διαφοροποιηθούν δίνοντας ένα νευροειδικό φαινότυπο [1]. Διαγονιδιακά ζώα τα οποία εκφράζουν πρωτεΐνη BM88 είτε από χοίρο ή ποντίκι υπό τον έλεγχο των υποκινητών *elav*- ή *achaete*-GAL4 έδειξαν αναπτυξιακή παύση στα εμβρυϊκά στάδια η οποία οφείλεται σε φαινότυπο του νευρικού συστήματος με διαβαθμισμένη εκφραστικότητα στα διάφορα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Ο υποκινητής *elav*-GAL4 κατευθύνει την έκφραση των UAS-διαγονιδίων σε αρκετά χαμηλά επίπεδα στο νευροεκτόδερμα και πολύ δυνατά στα ώριμα μετά-μιτωτικά νευρικά κύτταρα. Αντίθετα ο υποκινητής *achaete*-GAL4 κατευθύνει τα διαγονίδια στο νευροεκτόδερμα και αργότερα στους νευροβλάστες που εκφράζουν το γονίδιο *achaete* [2]. Στα αρχικά ή ενδιάμεσα στάδια της νευρογένεσης (εμβρυϊκά στάδια 10-11), η έκφραση της BM88 οδήγησε σε μια αύξηση της αντιγονικότητας του νευροεκτοδέρματος η οποία ανιχνεύτηκε με το μεμβρανικό ανιχνευτή νευρικού ιστού anti-HRP. Αυτή η επίπτωση είχε ως κόστος τη μείωση του αριθμού των νευρικών πρόδρομων κυττάρων (νευροβλαστών και μητρικών γαγγλιακών κυττάρων GMCs). Σε αργότερα στάδια της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος (εμβρυϊκά στάδια 12-15), έκφραση της BM88 επέφερε σημαντικά μορφολογικά ελαττώματα κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Χρώση με τρεις διαφορετικούς ανιχνευτές του νευρικού συστήματος (anti- HRP, *elav* και BP104) αποκάλυψαν μορφολογικές ελλείψεις οι οποίες συμπεριλαμβάνουν ατροφία του κεντρικού νευρικού σωλήνα, έλλειψη τμημάτων του νευρικού σωλήνα, ρήξη των συνδέσμων και σε ορισμένες βαριές περιπτώσεις απώλεια ολόκληρου του νευρικού σωλήνα. Χρώση των νευρικών πρόδρομων κυττάρων με anti-prospereo έδειξε μια σημαντική μείωση των κυττάρων που εκφράζουν *prospereo* στις περιοχές όπου ο σχηματισμός ώριμων νευρικών κυττάρων είχε αποτύχει. Ειδική χρώση των γονικών νευροβλαστών με anti-worniu φανέρωσε ατέλειες στο πρότυπο έκφρασης των γονικών νευροβλαστών οι οποίες ήταν πιο ήπιες σε σχέση με το πρότυπο έκφρασης του *prospereo*, υποδεικνύοντας ότι η λειτουργία της BM88 είναι πιο δραστική κατά τη γένεση των μητρικών γαγγλιακών κυττάρων GMCs. Παρακολουθώντας το σχηματισμό και τη διαφοροποίηση των MP2 πρόδρομων κυττάρων τα οποία εκφράζουν έντονα BM88 με τον *achaete*-GAL4 υποκινητή, ανακαλύψαμε ότι ζεύγη των πρόδρομων MP2 κυττάρων σε διάφορα μεταμερή του κοιλιακού νευροεκτοδέρματος *i)* παρουσίασαν μηδενική έκφραση της πρωτεΐνης *worniu*, και *ii)* είχαν πρόιμα μεταναστεύσει το ένα κοντά στο άλλο και είχαν συγχωνευθεί αντικανονικά. Επιπλέον, τα κοιλιακά νευροεκτοδερμικά κύτταρα αυτών των εμβρύων που εκφράζουν BM88 έδειξαν αφύσικα πρότυπα έκφρασης δεικτών του κυτταρικού κύκλου (anti- cyclin A και phosphohistone 3), υποδηλώνοντας τη μη ομαλή πρόοδο του κυτταρικού τους κύκλου. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η πρωτεΐνη BM88 είναι λειτουργικά ενεργή στη Δροσόφιλα φανερώνοντας ένα σημαντικό ρόλο στο συντονισμό της ομαλής προόδου του κυτταρικού κύκλου με το σχηματισμό των πρόδρομων νευρικών κυττάρων κατά την εμβρυϊκή νευρογένεση.

[1] Georgopoulou N, Hurel C, Politis PK, Gaitanou M, Matsas R and Thomaidou D (2004) *J. Biol. Chem.*, **281**, 33606-33610.

[2] Tzortzopoulos A and Skoulakis CE (2007) *Genesis*, in press.

## A STUDY OF ADULT HYPOTHYROID MICE BEHAVIOUR BASED ON THE ELEVATED PLUS-MAZE TEST

K. Vasilopoulou<sup>1</sup>, D. Giannakopoulou<sup>1</sup>, M.A. Papandreou<sup>1</sup>, P. Giompres,  
M.I. Klapa<sup>2,3</sup> and M. Margarity<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. of Human and Animal Physiology, Dep. of Biology, Univ. of Patras

<sup>2</sup>Metabolic Engineering and Systems Biology Laboratory, Institute of Chemical Engineering and High-Temperature Chemical Processes, Foundation for Research and Technology-Hellas, Patras

<sup>3</sup>Metabolic Engineering and Systems Biology Laboratory, Department of Chemical Engineering, University of Maryland, MD 20742, USA

It has been described that two-thirds of patients with thyroid disease suffer from psychiatric disorders. A small number of studies have used adult animal models to investigate the relation of hypothyroidism to anxiolytic or anxiogenic patterns and their results have been proved to be contradictory (1). In this context, the aim of the present study was to examine the behavioural structure of adult hypothyroid mice based on a plus maze test. Chronic hypothyroidism was induced by oral administration of 1% KClO<sub>4</sub> to 3 months year old female *Balb-c* mice for a period of 8 weeks. The elevated plus maze test is based on the exploration of an unfamiliar open environment. The following measurements were taken under consideration: a) the number of entries and the time spent in the close and open arms of the apparatus, b) the number (total, open arms, close arms) of naturalistic behaviours including: sniffing, rearing, grooming, immobility and head dipping. Our results indicated anxiogenic behaviour in the hypothyroid animals, according to the increases we observed in the number of entries and the time spent in the closed section of the apparatus. Behaviour changes were also observed in some of the other parameters tested. In this study, we also carried out multivariate statistical analysis to identify the most significant behavioural parameters among the measured that could characterize the difference between control and hypothyroid mice.

1. Sala-Roca J, Martí-Carbonell M. A, Garau A, Darbra S, Balada F (2002). Effects of dysthyroidism in plus maze and social interaction tests. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* 72: [3](#), 643-650.

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΕΝΗΛΙΚΩΝ, ΥΠΟΘΥΡΟΕΙΔΙΚΩΝ ΜΥΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ELEVATED PLUS-MAZE TEST

Κ. Βασιλοπούλου<sup>1</sup>, Δ. Γιαννακοπούλου<sup>1</sup>, Μ. Α. Παπανδρέου<sup>1</sup>, Π. Γιομπρές<sup>1</sup>,  
Μ. Ι. Κλάπα<sup>2,3</sup>, Μ. Μαργαρίτη<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Φυσιολογίας Ανθρώπου & Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Παν/μιο Πατρών

<sup>2</sup>Εργαστήριο Μεταβολικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας, Ινστιτούτο Χημικής Μηχανικής και Χημικών Διεργασιών Υψηλής Θερμοκρασίας, Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ/ΕΙΧΗΜΥΘ), Πάτρα

<sup>3</sup>Τμήμα Χημικής Μηχανικής, Πανεπιστήμιο Maryland, MD 20742, USA

Τα 2/3 περίπου των ασθενών με υποθυρεοειδισμό πάσχουν από ψυχιατρικές ασθένειες. Ένα μικρό ποσοστό μελετών έχουν πραγματοποιηθεί σε ενήλικα πειραματόζωα προκειμένου να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ υποθυρεοειδισμού και αγχολυτικών ή αγχογενών παραμέτρων, ενώ κάποια από τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών έχουν αποδειχθεί αντιφατικά (1). Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο έλεγχος της συμπεριφοράς ενήλικων υποθυρεοειδικών μυών με χρήση του elevated plus-maze test. Η κατάσταση του χρόνιου υποθυρεοειδισμού προκλήθηκε σε τριών μηνών θηλυκούς *Balb-c* μύες με πόση διαλύματος 1%  $KClO_4$ , για περίοδο 8 εβδομάδων. Το elevated plus-maze test βασίζεται στην εξερεύνηση ενός ανοιχτού, μη-γνώριμου περιβάλλοντος. Ελήφθησαν υπόψη οι κάτωθι μετρήσεις: (α) αριθμός εισόδων και χρόνος παραμονής στα ανοιχτά ή κλειστά μέρη της συσκευής, (β) το ποσοστό (συνολικό, ανοικτά/κλειστά μέρη) των φυσιολογικών παραμέτρων της συμπεριφοράς, συμπεριλαμβανομένου της όσφρησης του εξωτερικού περιβάλλοντος (sniffing), της ανύψωσης (rearing), της αυτοπεριποίησης (grooming), της ακινησίας (immobility) και της βύθισης της κεφαλής (head dipping). Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν αγχογενή συμπεριφορά των υποθυρεοειδικών μυών, καθώς στα ανωτέρω παρατηρήθηκε αύξηση τόσο στον αριθμό εισόδων τους στα κλειστά τμήματα της συσκευής όσο και του χρόνου παραμονής τους σε αυτά. Αλλαγές παρατηρήθηκαν και σε μερικές άλλες από τις παραμέτρους συμπεριφοράς που μελετήθηκαν. Επίσης πραγματοποιήθηκαν πολυπαραγοντικές στατιστικές αναλύσεις προκειμένου να προσδιορισθούν οι πιο σημαντικές παράμετροι που χαρακτηρίζουν την συμπεριφορά των υποθυρεοειδικών μυών σε σχέση με τους μάρτυρες.

1. Sala-Roca J, Martí-Carbonell M. A, Garau A, Darbra S, Balada F (2002). *Effects of dysthyroidism in plus maze and social interaction tests.* [Pharmacology, Biochemistry and Behaviour](#) **72**: 3, 643-650.

## A MODEL INDUCIBLE SYSTEM TO EXAMINE THE TOXIC EFFECTS OF ALPHA-SYNUCLEIN ON HUMAN NEURONAL CELLS

*K. Vekrellis, M. Pavlaki, E. Emmanouilidou, M. Xylouri, L. Stefanis*

*Division of Basic Neurosciences, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Athens, Greece*

Genetic and biochemical evidence suggests that  $\alpha$ -synuclein (asyn) is central in Parkinson's disease (PD) pathogenesis. Although the aberrant function of asyn that is responsible for PD is not understood, there is evidence that accumulation of either normal or mutant asyn species of abnormal conformation may have a causative role.

We have generated a neuronal cell-system model of slowly progressive neurodegeneration based on excessive accumulation of asyn. This model consists of tightly controlled tetracycline-regulated (TET-OFF) human neuroblastoma SH-SY5Y cell lines expressing wild type asyn, mutant asyn or  $\beta$ -galactosidase, as a control. Five to seven days following concurrent induction of wild type asyn expression and neuronal differentiation with retinoic acid, we have observed marked morphological abnormalities, including neurite retraction and vacuolization. Interestingly, these phenomena coincide with the appearance of soluble oligomeric asyn species. Cell death occurred at a relatively low level, but was continuous over the period of seven to ten days. In contrast, no such phenotype or death was observed in cells expressing  $\beta$ -galactosidase or in cells in which asyn was maintained in an uninduced state-due to the continuous presence of doxycycline.

Abnormally folded or aggregated proteins such as  $\alpha$ -synuclein may cause impairment of the degradation of these forms as well as of the turnover of normal proteins. Dysfunction of intracellular degradation pathways was therefore investigated. When death becomes evident asyn-overexpressing cells show macroautophagy induction, whereas total lysosomal degradation is impaired as judged by LC3 western blot and long-lived protein degradation respectively. Proteasomal degradation was also inhibited up to 30% as well. In addition, preliminary results in the asyn-expressing cells have shown upregulation of BiP, a component of the activation of unfolded protein response, characteristic of ER stress.

Inhibition of autophagosome formation with 3-MA or enhancement of macroautophagy induction with rapamycin did not alter the rate of death, suggesting that, although macroautophagy is induced, it does not play a positive or negative role in cell death in this model.

Features of apoptotic type of death such as caspase 3 activation, DNA laddering and phosphatidyl serine exposure were not evident as confirmed by western immunoblotting, DNA gel electrophoresis and FACS analysis respectively.

Collectively our results suggest that alpha-synuclein can lead to degeneration of human neuronally differentiated cells in a manner that involves impairment of normal protein degradation. The type of death is not typically apoptotic nor, at least exclusively, autophagic since there is no response when autophagy is inhibited. Further studies will examine the molecular and biochemical underpinnings of neuronal degeneration in this model.

## ΕΝΑ ΠΡΟΤΥΠΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΠΑΓΩΜΕΝΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΦΑ-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΝΕΥΡΩΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

*Κ. Βεκρέλλης, Μ. Παυλάκη, Ε. Εμμανουηλίδου, Μ. Ξυλούρη, Α. Στεφανής  
Τομέας Βασικών Νευροεπιστημών, Ιδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, Αθήνα*

Γενετικά και βιοχημικά βιβλιογραφικά δεδομένα, υποστηρίζουν ότι η άλφα-συνουκλεΐνη εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου του Πάρκινσον. Συγκλίνουν δε στην άποψη ότι η συσσωμάτωση φυσιολογικής ή μεταλλαγμένων μορφών άλφα-συνουκλεΐνης σε ανώμαλη διαμόρφωση παίζουν αιτιατό ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου. Δημιουργήσαμε ένα πρότυπο σύστημα νευρωνικών κυττάρων αργά αναπτυσσόμενου νευροεκφυλισμού που προκύπτει από μαζική συσσωμάτωση άλφα-συνουκλεΐνης. Στο σύστημα αυτό η έκφραση φυσιολογικής ή μεταλλαγμένων μορφών άλφα-συνουκλεΐνης ή βήτα γαλακτοσιδάσης ως κοντρόλ είναι επαγόμενη σε κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος SH-SY5Y, απουσία δοξκυκλίνης (TET-OFF). Πέντε με επτά ημέρες μετά την ταυτόχρονη επαγωγή έκφρασης της άλφα-συνουκλεΐνης και την νευρωνική διαφοροποίηση με ρετινοϊκό οξύ, παρατηρήθηκαν σημαντικές μορφολογικές ανωμαλίες, συγκεκριμένα απόσυρση νευριτών και σχηματισμός κυστιδίων στα κύτταρα. Τα παραπάνω φαινόμενα συνέπιπταν με την παρουσία διαλυτών ολιγομερών μορφών της άλφα-συνουκλεΐνης. Κυτταρικός θάνατος παρατηρήθηκε σε σχετικά χαμηλό ποσοστό, αλλά αποτελούσε ένα σταθερό φαινόμενο κατά την διάρκεια επτά έως δέκα ημερών υπερέκφρασης. Σε αντίθεση αντίστοιχα φαινόμενα εκφυλισμού δεν παρατηρήθηκαν σε κύτταρα που εξέφραζαν βήτα-γαλακτοσιδάση ή σε κύτταρα υπό καταστολή όσον αφορά την υπερέκφραση άλφα-συνουκλεΐνης λόγω της συνεχούς παρουσίας δοξκυκλίνης.

Η παρουσία ανώμαλα αναδιπλωμένων μορίων ή συσσωματωμένων πρωτεϊνών του τύπου της άλφα-συνουκλεΐνης πιθανά οδηγεί στην ελαττωμένη αποδόμηση ανώμαλων μορφών καθώς και φυσιολογικών πρωτεϊνών. Διερευνήθηκε η πιθανή δυσλειτουργία των ενδοκυττάρων μονοπατιών αποδόμησης. Βρέθηκε ότι τα κύτταρα που υπερεκφράζουν άλφα-συνουκλεΐνη, εμφανίζουν μακροαυτοφαγία, παρόλο που η συνολική λυσοσωματιακή αποδόμηση είναι μειωμένη. Επιπλέον μετρήθηκε μείωση της πρωτεοσωμικής δραστηριότητας κατά 30%. Προκαταρκτικά αποτελέσματα έδειξαν επίσης υπερέκφραση της πρωτεΐνης BiP, η οποία επάγεται σε καταστάσεις στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress). Αναστολή ή ενίσχυση της αυτοφαγίας με 3-MA ή ραπαμυκίνη αντίστοιχα, δεν άλλαξε το ρυθμό του θανάτου συνηγορώντας έτσι στην άποψη ότι η μακροαυτοφαγία δεν έχει προστατευτικό ρόλο. Φαινόμενα ενδεικτικά του αποπτωτικού τύπου θανάτου όπως ενεργοποίηση της κασπάσης 3, κατάτμηση του DNA και έκθεση ομάδων φωσφατιδυλσερίνης στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής επιφάνειας, δεν παρατηρήθηκαν.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα μας συνηγορούν στο ότι η άλφα-συνουκλεΐνη μπορεί να οδηγήσει σε εκφυλισμό ανθρωπίνων νευρωνικά διαφοροποιημένων κυττάρων μέσω μείωσης της φυσιολογικής αποδόμησης των πρωτεϊνών. Ο θάνατος δεν είναι τυπικά αποπτωτικού τύπου, ούτε, τουλάχιστον αποκλειστικά, αυτοφαγικού τύπου αφού δεν αναστέλλεται με αναστολή της αυτοφαγίας. Περαιτέρω μελέτες θα βοηθήσουν στη διερεύνηση μοριακών και βιοχημικών θεμελιακών μονοπατιών που οδηγούν στον νευροεκφυλισμό στο παρόν μοντέλλο.

**ART AND THE BRAIN:  
CAJAL'S SPECULATIONS ON THE ROMANCE OF POETRY**

*A.B. Vivas<sup>1</sup> and L.C. Triarhou<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*City Liberal Studies, Affiliated Institution of University of Sheffield, Thessaloniki*

<sup>2</sup>*University of Macedonia, Thessaloniki*

In 1902, Santiago Ramón y Cajal (1852–1934), the giant of modern neuroscience and 1906 Nobel Prize laureate, contributed the preface to a book of poetry written by his fellow countryman, Spanish poet and dramatist Marcos Zapata (1844–1914). In that rare essay, Cajal unfolds his subjective ideas on the literary genres of drama and comedy in relation to the workings of the human mind and human sentiments. The same text was reissued almost half a century later in Spain and in Argentina under the title ‘The psychology of the artists’. We herein present Cajal’s article in its entirety. It occupies a distinct fleche in the thematic board of neuroscience history and art. Of potential interest as much to the poetical literati as to the neurological cognoscenti, the essay remains an element of the celebrated neuroanatomist’s style in his lifelong attempt at understanding the workings of the human brain.

**ΤΕΧΝΗ ΚΑΙ ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ:  
ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ ΤΟΥ CAJAL ΓΙΑ ΤΗ ΦΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΗΣΗΣ**

*A.B. Vivas<sup>1</sup> και Α. Τριάρχου<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*City Liberal Studies, Affiliated Institution of University of Sheffield, Θεσσαλονίκη*

<sup>2</sup>*Πανεπιστήμιο Μακεδονίας, Θεσσαλονίκη*

Το 1902, ο γίγας της σύγχρονης νευροεπιστήμης Santiago Ramón y Cajal (1852–1934), ο οποίος το 1906 τιμήθηκε με το Βραβείο Νομπέλ Ιατρικής, συνεισέφερε τον πρόλογο σε ένα βιβλίο ποιημάτων του συμπατριώτη του, Ισπανού ποιητή και δραματουργού Marcos Zapata (1844–1914). Στο σπάνιο αυτό δοκίμιο, ο Cajal εκτυλίσσει υποκειμενικές του ιδέες πάνω στα λογοτεχνικά ύφη του δράματος και της κωμωδίας σε συνάφεια με τις λειτουργίες της ανθρώπινης νόησης και των συναισθημάτων. Το ίδιο κείμενο επανεκδόθηκε σχεδόν μισό αιώνα αργότερα στην Ισπανία και στην Αργεντινή με τίτλο «Η ψυχολογία των καλλιτεχνών». Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζουμε το άρθρο του Cajal στην ολότητά του. Αυτό καταλαμβάνει μια ξεχωριστή θέση στο θεματικό πινάκιο της ιστορίας της νευρολογίας και της τέχνης. Δυνητικού ενδιαφέροντος τόσο για τους λόγιους της ποίησης όσο και για τους ειδήμονες της νευρολογίας, το δοκίμιο παραμένει ένα στοιχείο του ύφους του επιφανούς νευροανατόμου στις προσπάθειές του μιας ζωής να κατανοήσει τη λειτουργία του ανθρώπινου εγκεφάλου.



## INHIBITION OF NMDA-INDUCED APOPTOSIS BY STEROID ANALOGUES IN P19-N NEURONS

*Xilouri M., Avlonitis\* N., Calogeropoulou\* T. and Papazafiri P.*

*Department of Animal and Human Physiology, School of Biology, Faculty of Sciences, National and Kapodistrian University of Athens*

*\* Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, National Hellenic Research Foundation*

Naturally occurring neurosteroids are potent allosteric modulators of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor and through stimulation of receptor function, can protect neuronal cells against N-methyl-D-aspartate receptor over-activation, ischemia and traumatic brain injury. In this study, mouse P19 cells were induced to differentiate into post mitotic neurons and were subjected to excitotoxicity in the presence of N-methyl-D-aspartate. Novel synthetic analogues of the endogenous neurosteroids allopregnanolone and dehydroepiandrostrone, inhibited excitotoxic cell death of P19-N neurons, by directly maintaining the activation of PKB/Akt kinase and interfering with the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway, preserving cytochrome *c* in the mitochondria and Bax in the cytoplasm. The efficiency and the potency of these neurosteroids were similar to those of allopregnanolone and dehydroepiandrostrone. Their effects were  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor mediated, since they were abolished in the presence of bicuculline, an antagonist of receptor's function. These results suggest that synthetic neurosteroids may serve as potent, membrane acting, neuroprotectants against N-methyl-D-aspartate receptor neurotoxicity on neuronal cells.

*This work is funded by the General Secretariat of Research and Technology, Athens, Greece (PENED, 2001)*

**ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ NMDA ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΑΠΟ ΑΝΑΛΟΓΑ  
ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΣΕ P19 ΝΕΥΡΩΝΕΣ**

*Ξυλούρη Μ., Αυλωνίτης\* Ν., Καλογεροπούλου\* Θ. και Παπαζαφείρη Π.*

*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών*

*\*Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών*

Τα ενδογενή νευροστεροειδή είναι ισχυροί αλλοστερικοί τροποποιητές του υποδοχέα GABA<sub>A</sub> και μέσω ενίσχυσης της λειτουργίας του υποδοχέα, μπορούν να προστατεύσουν τα νευρικά κύτταρα έναντι της αυξημένης ενεργοποίησης του υποδοχέα NMDA, της ισχαιμίας και της τραυματικής εγκεφαλικής βλάβης. Στην παρούσα μελέτη, P19 πολυδύναμα εμβρυϊκά καρκινικά κύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε μετα-μιτωτικούς νευρώνες (P19-N) και υποβλήθηκαν σε υπερδιεγερσιμότητα, παρουσία του διεγερτικού αμινοξέος: Ν μέθυλο-D-ασπαρτικό οξύ. Συνθετικά ανάλογα των ενδογενών νευροστεροειδών, αλλοπρεγνανολόνη και δεϋδροεπιανδροστερόνη, ανέστειλαν το διεγερτικό κυτταρικό θάνατο των P19-N νευρώνων, μέσω α) άμεσης ενεργοποίησης της κινάσης PKB/Akt που προάγει την κυτταρική επιβίωση και β) παρέμβασης στο ενδογενές μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι, διατηρώντας το κυτόχρωμα *c* στα μιτοχόνδρια και την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax στο κυτταρόπλασμα. Η αποτελεσματικότητα και η δραστηριότητα αυτών των αναλόγων ήταν αντίστοιχες των ενδογενών νευροστεροειδών αλλοπρεγνανολόνη και δεϋδροεπιανδροστερόνη. Διαπιστώθηκε επίσης ότι οι παραπάνω δράσεις εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση των νευροστεροειδών με το σύμπλοκο του υποδοχέα GABA<sub>A</sub>, αφού αναστέλλονταν παρουσία του ειδικού ανταγωνιστή της λειτουργίας του υποδοχέα, μπικουκουλίνη. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι συνθετικά νευροστεροειδή δρώντας στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί νευροπροστατευτικοί παράγοντες έναντι της τοξικότητας που προκαλεί η αυξημένη ενεργοποίηση του υποδοχέα NMDA.

*Η εργασία αυτή χρηματοδοτείται από την Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΠΕΝΕΔ 2001)*

## ALPHA-SYNUCLEIN AND LYSOSOMAL DEGRADATION PATHWAYS IN RAT CORTICAL NEURONS

*Xilouri M., Vogiatzi T., Vekrellis K. and Stefanis L.*

*Division of Basic Neurosciences, Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Soranou Efessiou 4, 11527 Athens, Greece*

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder pathologically characterized by selective loss of dopaminergic neurons and accumulation of cytoplasmic inclusions termed Lewy bodies, which mainly contain alpha-synuclein (ASYN) and ubiquitin. The cause of PD is unknown but recent genetic, biochemical and neuropathological studies show that ASYN plays a central role in PD pathogenesis. Missense point mutations in the gene encoding for ASYN have been identified in affected individuals in families with autosomal dominant PD. Duplications and triplications of the locus encoding for ASYN lead to PD and the phenotype is dependent on a gene-dosage effect. Previously reported data have shown that expression of mutant ASYNs can impair both the ubiquitin proteasome (UPS) and the lysosomal degradation pathways in model neuronal cell culture systems. In particular, the effect of ASYN on the lysosomal system may be related to its degradation in lysosomes via chaperone mediated autophagy (CMA). CMA is the only autophagic pathway that is selective. In this process, cytosolic proteins which contain the loose pentapeptide motif KFERQ are recognized in the cytosol by the chaperone Hsc70 and transferred to the lysosomal membrane, where they bind to the receptor of this pathway, Lamp 2a. Lamp 2a appears to be the rate-limiting step in this pathway, as its levels correlate with CMA. Little is known about the pathways by which ASYN is normally degraded in primary neurons and whether these cells utilize CMA to any extent for protein degradation. In the present study we investigated the contribution of lysosomal degradation pathways –and in particular macroautophagy and CMA- on ASYN levels using E18 rat cortical neuronal cultures. Our data show that ASYN and Lamp 2a levels increase during the *in vitro* maturation of cortical neurons. Analysis of long-lived protein degradation (using <sup>3</sup>H leucine) revealed, for the first time, that both macroautophagy and CMA are utilized in primary neurons. Immunoprecipitation experiments display that ASYN interacts with Lamp 2a in rat cortical neurons as well as in wt and mutant ASYN transgenic mice. Lentiviral delivery of Lamp 2a siRNA results in a substantial increase in endogenous ASYN steady state levels and a significant decrease in total long lived protein degradation in cortical neuronal cultures. Additionally, pharmacological inhibition of macroautophagy leads to an increase of ASYN levels, but to a lesser extent than with Lamp 2a silencing. Our results strongly suggest that CMA operates in primary rat cortical neurons and is (at least in part) responsible for ASYN degradation.

This work is funded by NIH/NINDS grant 5R21NS055693.

**α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗ ΚΑΙ ΛΥΣΣΟΣΩΜΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΦΛΟΪΚΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ**

*Ξυλούρη Μ., Βογιατζή Τ., Βεκρέλλης Κ. και Στεφανής Α.*

*Κέντρο Βασικών Νευροεπιστημών, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, Σωρανού Εφεσίου 4, 11527 Αθήνα, Ελλάδα*

Η νόσος του Πάρκινσον είναι μια νευροεκφυλιστική νόσος με κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά την επιλεκτική απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων και τη συσσώρευση κυτταροπλασματικών έγκλειστων που ονομάζονται σωμάτια Lewy, τα οποία περιέχουν κυρίως α-συνουκλεΐνη (ASYN) και ουμπικουΐτινη. Τα αίτια της νόσου δεν είναι γνωστά αλλά πρόσφατες γενετικές μελέτες αποκαλύπτουν ότι η ASYN διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Έχουν αναγνωριστεί αντι-νοσηματικές σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου της ASYN σε ασθενείς οικογενειών με αυτοσωμική επικρατή μορφή της νόσου. Διπλασιασμοί και τριπλασιασμοί του γενετικού τόπου της ASYN οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου και ο φαινότυπος εξαρτάται από την ποσότητα του γονιδίου που εκφράζεται. Προηγούμενα δεδομένα αποδεικνύουν ότι η έκφραση μεταλλαγμένων μορφών της ASYN μπορεί να επηρεάσει τόσο το πρωτεασωματικό όσο και το λυσοσωμικό πρωτεολυτικό μονοπάτι, σε κυτταρικά συστήματα-μοντέλα νευρικών κυττάρων. Ειδικότερα, η επίδραση της ASYN στο λυσοσωμικό σύστημα πιθανόν να σχετίζεται με την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης στα λυσοσώματα, μέσω της αυτοφαγίας που διαμεσολαβείται από μόρια συνοδούς (chaperone mediated autophagy, CMA). Το CMA είναι το μοναδικό αυτοφαγικό μονοπάτι που είναι επιλεκτικό. Σε αυτήν τη διαδικασία, κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που περιέχουν το πενταπεπτιδίο KFERQ αναγνωρίζονται στο κυτταρόπλασμα από την πρωτεΐνη-συνοδό Hsc 70 και μεταφέρονται στη λυσοσωμική μεμβράνη, όπου και προσδένονται στον υποδοχέα του μονοπατιού, Lamp 2a. Ο υποδοχέας Lamp 2a φαίνεται ότι αποτελεί το ρυθμοκαθοριστικό στάδιο του μονοπατιού, καθώς τα επίπεδά του σχετίζονται άμεσα με το CMA. Λίγα είναι τα δεδομένα για τα μονοπάτια τα οποία συμβάλλουν στην αποικοδόμηση της ASYN, καθώς και για την ύπαρξη του CMA, σε πρωτογενείς νευρώνες. Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε τη συμμετοχή των λυσοσωμικών πρωτεολυτικών μονοπατιών –και ειδικότερα της μακροαυτοφαγίας και του CMA– στη ρύθμιση των επιπέδων της α-συνουκλεΐνης σε εμβρυϊκές (E18) καλλιέργειες νευρώνων φλοιού αρουραίου. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα επίπεδα της ASYN και του υποδοχέα Lamp 2a αυξάνουν κατά τη διάρκεια της *in vitro* ωρίμανσης των νευρώνων. Ανάλυση της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών με μεγάλο χρόνο ημιζωής (με τη χρήση <sup>3</sup>H λευκίνης) αποκάλυψαν, για πρώτη φορά, ότι οι πρωτογενείς νευρώνες χρησιμοποιούν και τη μακροαυτοφαγία και το CMA. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης φανέρωσαν ότι η ASYN και ο υποδοχέας Lamp 2a αλληλεπιδρούν, τόσο στις πρωτογενείς καλλιέργειες, όσο και σε ποντίκια που εκφράζουν τη φυσικού, αλλά και τη μεταλλαγμένου τύπου, μορφή της ASYN. Σίγηση, με τη χρήση της τεχνολογίας siRNA μέσω ιών Lenti, του γονιδίου του υποδοχέα Lamp 2a, οδηγεί σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της ενδογενούς ASYN με ταυτόχρονη μείωση του συνολικού ρυθμού αποικοδόμησης πρωτεϊνών με μεγάλο χρόνο ημιζωής. Επιπρόσθετα, φαρμακολογική αναστολή της μακροαυτοφαγίας οδηγεί επίσης σε αύξηση των επιπέδων της ASYN, αλλά σε μικρότερο βαθμό από αυτόν που προκαλεί η μείωση της έκφρασης του υποδοχέα Lamp 2a. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν ότι το CMA λειτουργεί σε πρωτογενείς νευρικές καλλιέργειες και είναι υπεύθυνο (τουλάχιστον σε κάποιο βαθμό) για την αποικοδόμηση της ενδογενούς α-συνουκλεΐνης.

*Η εργασία αυτή χρηματοδοτείται από το NIH/NINDS 5R21NS055693.*

## ASSESSING EMOTION PERCEPTION IN FRONTOTEMPORAL DEMENTIA: PERCEPTUAL PROBLEMS OR INEFFECTIVE STRATEGY?

*E. Aretouli<sup>1</sup>, M.H. Kosmidis<sup>1</sup>, P. Ioannidis<sup>2</sup> and N. Taskos<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*School of Psychology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 54124, Greece*

<sup>2</sup>*2<sup>nd</sup> Neurology Department, Aristotle University of Thessaloniki, General Hospital AHEPA, Thessaloniki, 54124 Greece*

Frontal variant frontotemporal dementia (fv-FTD) is a neurodegenerative disease characterized predominately by behavioural disorders such as apathy, affective flattening, and loss of empathy, suggesting abnormalities of emotional processing. Impairment in the perception of static emotional stimuli, such as photographs of faces expressing an emotion, is one of the signs encountered early in the disease course. To our knowledge, however, no studies to date have ruled out the possibility that poor performance on emotion perception in photographs of faces is due to the more generalized perceptual problems sometimes observed in FTD.

We examined the perception of facial expressions of emotion in 15 individuals with fv-FTD and ten age- and education-matched healthy controls. Our test comprised two parts: a) Identity Matching (matching the target photograph with one of a selection of three photographs of faces based on the identity of the person, disregarding extraneous features, such as eyeglasses or a cap), and b) Emotion Matching (matching the target photograph with one of a selection of three photographs of faces expressing one of the six basic emotions).

Patients with fv-FTD performed more poorly than the healthy control group on both tasks. When we reanalyzed the emotion matching data entering the identity matching score as a covariate, however, the group difference on affect matching barely missed the customary level of significance ( $p=.06$ ), suggesting that a large part of the group difference on affect matching may be explained by patients' difficulty perceiving faces more generally. A similar group comparison of performance on a commonly used test of visuo-perceptual ability (Hooper Visual Organization Test; HVOT) indicated poorer performance in the patient group; yet when this score was entered as a covariate into a group comparison of emotion matching, there was no effect for HVOT ( $p=.9$ ). Qualitative analysis of the patients' actual responses on the identity matching task support our quantitative findings, and suggest that patients used ineffective strategies in responding, such as matching based on extraneous features (i.e., "Both are wearing glasses, therefore they are the same person").

As expected, patients with frontotemporal dementia exhibited overall impaired emotion perception in comparison to healthy adults. This performance deficit appears to be related to perceptual difficulties, which are circumscribed to faces, and not to their more generalized visuo-perceptual deficit. More specifically, impaired emotion perception in fv-FTD appears to reflect the patients' use of ineffective strategies in responding rather than a perceptual deficit *per se*. This pattern is consistent with their frontal dysfunction. Future studies of emotion perception in fv-FTD should consider the factors underlying patients' poor performance in order to propose a sound theory of the cognitive mechanisms involved in their everyday difficulties.

**ΑΞΙΟΛΟΓΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΑΝΤΙΛΗΨΗ ΣΥΝΑΙΣΘΗΜΑΤΩΝ ΣΤΗ  
ΜΕΤΩΠΟΚΡΟΤΑΦΙΚΗ ΑΝΟΙΑ: ΑΝΤΙΛΗΠΤΙΚΕΣ ΜΕΙΟΝΕΙΕΣ Η΄  
ΑΝΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΗ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ;**

*Ε. Αρετούλη<sup>1</sup>, Μ.-Ε. Κοσμίδου<sup>1</sup>, Π. Ιωαννίδης<sup>2</sup> και Ν. Τάσκος<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Τμήμα Ψυχολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124 Θεσσαλονίκη, Ελλάδα*

<sup>2</sup>*2<sup>η</sup> Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Γενικό Νοσοκομείο  
ΑΧΕΠΑ, 54124 Θεσσαλονίκη, Ελλάδα*

Η μετωπιαία μορφή της μετωποκροταφικής άνοιας (μμ-ΜΚΑ) είναι μια νευροεκφυλιστική νόσος που χαρακτηρίζεται από συμπεριφορικές διαταραχές όπως απάθεια, επίπεδο συναίσθημα και απώλεια της ενσυναίσθησης που υποδηλώνουν διαταραχές στην επεξεργασία του συναίσθηματος. Η εξασθένηση στην αντίληψη συναισθημάτων σε δοκιμασίες με φωτογραφίες προσώπων είναι ένα από τα πρώιμα συμπτώματα της νόσου. Μέχρι σήμερα, ωστόσο, καμιά δημοσιευμένη μελέτη δεν έχει αποκλείσει την πιθανότητα η χαμηλή επίδοση στην αντίληψη συναισθημάτων στις φωτογραφίες προσώπων να οφείλεται στη γενικευμένη αντιληπτική εξασθένηση που παρατηρείται κάποιες φορές στη μμ-ΜΚΑ

Εξετάσαμε την αντίληψη των συναισθημάτων στις εκφράσεις προσώπου σε 15 ασθενείς με διάγνωση μμ-ΜΚΑς και δέκα υγιείς ενήλικους. Η δοκιμασία μας αποτελείται από δύο μέρη: α) Ταύτιση Προσώπων (ΤΠ) (ταύτιση της φωτογραφίας-στόχου με μία από 3 επιλεγμένες φωτογραφίες ως προς την ταυτότητα του εικονιζόμενου) και β) Ταύτιση Συναισθημάτων (ΤΣ) (ταύτιση της φωτογραφίας-στόχου με μία από 3 επιλεγμένες φωτογραφίες που εκφράζουν ένα από τα έξι βασικά συναισθήματα με κριτήριο τη συναισθηματική κατάσταση του εικονιζόμενου).

Οι ασθενείς με μμ-ΜΚΑ είχαν πιο χαμηλές επιδόσεις και στις δύο δοκιμασίες. Επαναλάβαμε τη σύγκριση των δύο ομάδων ως προς τη δοκιμασία ΤΣ εισάγοντας ως συμμεταβλητή την επίδοση στη δοκιμασία ΤΠ. Η διαφορά των δύο ομάδων ως προς τη ΤΣ δεν άγγιξε τη στατιστική σημαντικότητα ( $p=.06$ ), αποκαλύπτοντας ότι η διαφορά που παρατηρήθηκε αρχικά θα μπορούσε να εξηγηθεί από μια γενικότερη δυσκολία των ασθενών να αντιληφθούν τα πρόσωπα. Μια παρόμοια σύγκριση της επίδοσης των δύο ομάδων σε μια δοκιμασία οπτικοχωρικής ικανότητας, ανέδειξε χαμηλότερες επιδόσεις στην ομάδα των ασθενών. Ωστόσο, όταν η βαθμολογία αυτή εισήχθη ως συμμεταβλητή στη σύγκριση των ομάδων ως προς την αντιστοίχιση συναισθημάτων δεν προέκυψε σημαντική επίδραση του παράγοντα αυτού ( $p=.9$ ). Οι ποιοτικές αναλύσεις των απαντήσεων των ασθενών στη δοκιμασία ΤΠ υποστηρίζουν τα ποσοτικά ευρήματά μας. Επιπλέον, υποδηλώνουν ότι οι ασθενείς χρησιμοποιούν αναποτελεσματικές στρατηγικές όπως την αντιστοίχιση με βάση εξωτερικά χαρακτηριστικά (π.χ., “Και οι δύο φοράνε γυαλιά, άρα είναι το ίδιο άτομο.”).

Σύμφωνα με τις υποθέσεις μας, οι ασθενείς με μμ-ΜΚΑ παρουσίασαν γενικευμένη έκπτωση στην αντίληψη των συναισθημάτων, η οποία εξηγείται από αντιληπτική εξασθένηση που είναι περιορισμένη στα πρόσωπα, και όχι σε γενική αντιληπτική εξασθένηση. Συγκεκριμένα, η εξασθένηση στην αντίληψη των συναισθημάτων στη μμ-ΜΚΑ, φαίνεται να αντανάκλα τη χρήση αναποτελεσματικών στρατηγικών κατά την απόκριση, παρά μια αυτούσια αντιληπτική εξασθένηση. Αυτό το πρότυπο απαντήσεων είναι σύμφωνο με τη μετωπιαία δυσλειτουργία τους. Μελλοντικές μελέτες της αντίληψης συναισθημάτων στη μμ-ΜΚΑ πρέπει να λάβουν υπόψιν τους παράγοντες που συμβάλλουν στη χαμηλή επίδοση προκειμένου να προτείνουν μια έγκυρη θεωρία των γνωστικών μηχανισμών που εμπλέκονται στις καθημερινές τους δυσκολίες.



## Χορηγίες

### Sponsors

Ακαδημία Αθηνών  
Academy of Athens

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης  
Aristotle University of Thessaloniki

Νομαρχία Θεσσαλονίκης  
Prefecture of Thessaloniki

Επιτροπή Ερευνών Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης  
Research Committee of the Aristotle University of Thessaloniki

### LAB SUPPLIES

ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.  
PARISIANOU A.E.

PFIZER

SANOFI AVENTIS HELLAS

NOVARTIS

METROLAB

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ Α.Ε.  
ANALYTICAL INSTRUMENTS A.E.

Αφοι Σελίδη  
Selidis Bros S.A.