

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
HELLENIC SOCIETY FOR BIOLOGICAL SCIENCES

28^ο ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ
28th SCIENTIFIC CONFERENCE

**ΠΡΑΚΤΙΚΑ
PROCEEDINGS**

18ⁿ - 20ⁿ Μαΐου 2006
18th - 20th May, 2006

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ
IOANNINA - GREECE**

ΕΚΔΟΤΗΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Πρόεδρος: Καθηγητής Θ. Παταργιάς

Γραμματεία: Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών

Τηλ. 210-7274136, 7274637, Fax: 210-7274635

E-mails: tpatarg@biol.uoa.gr; cqaitan@biol.uoa.gr

lmargar@biol.uoa.gr; smanol@biol.uoa.gr

Ιστοσελίδες: <http://multimedia.biol.uoa.gr/>

<http://kyttariki.biol.uoa.gr/>

ISBN: 960-87324-4-1

ISSN: 1109-4885

© Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, 2006

Εκτυπώθηκε στο Εκτυπωτικό Κέντρο του
Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΧΟΡΗΓΟΙ - SPONSORS

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΔΙΟΡΗΑΡ Α.Ε.

MULTI TRADING

BIOSURE - R & T Cell Co.

Γ. Κορδοπάτης ΕΠΕ

TechnoBioChem Ltd

CHEMILAB Ε.π.ε.

NATIONAL GEOGRAPHIC

(Ελληνική έκδοση)

MAGENTA Ε.Π.Ε.

ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.

ΕΚΔΟΣΕΙΣ *Αεί*

Διοικητικό Συμβούλιο Ε.Ε.Β.Ε. (2006-2008)
Hellenic Society for Biological Sciences Board (2006-2008)

Πρόεδρος	Καθηγητής Θ. Παταργιάς
Αντιπρόεδρος	Καθηγήτρια Αντιγόνη Λάζου
Γενική Γραμματέας	Αναπλ. Καθηγήτρια Αικατερίνη Γαϊτανάκη
Ειδική Γραμματέας	Επικ. Καθηγήτρια Ισιδώρα Παπασιδέρη
Ταμίας	Επικ. Καθηγητής Σωτήρης Κ. Μανώλης
Μέλη	Καθηγητής Λουκάς Χ. Μαργαρίτης Καθηγητής Βασίλης Μαρμάρας

Οργανωτική Επιτροπή
Organizing Committee

Επικ. Καθηγητής Χ. Αγγελίδης
Επικ. Καθηγήτρια Π. Βεζυράκη
Επικ. Καθηγητής Σ.Κ. Μανώλης
Καθηγητής Λ.Χ. Μαργαρίτης
Καθηγητής Ι.Δ. Μπέης

- Η Οργανωτική Επιτροπή δεν φέρει ευθύνη για το περιεχόμενο των περιλήψεων που δημοσιεύονται στον τόμο αυτό.
- The Organizing Committee has no responsibility for the content of the abstracts published in this volume.

- Οι εργασίες έχουν ταξινομηθεί αλφαβητικά με βάση το όνομα του πρώτου συγγραφέως γραμμένο στην ελληνική γλώσσα.
- Papers have been arranged alphabetically according to the Hellenic-written name of the first author.

Επιμέλεια Έκδοσης Πρακτικών

Επικ. Καθηγητής Σωτήρης Κ. Μανώλης

Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μια μικρή ιστορική αποτίμηση
του Προέδρου της Ε.Ε.Β.Ε. Καθηγητή Θ. Παταργιά και του Καθηγητή Ι.
Μπέη (εκ μέρους της Οργανωτικής Επιτροπής του 28^{ου} Συνεδρίου)

Αγαπητοί Σύεδροι,

Το 28^ο ετήσιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών διοργανώνεται φέτος στα Ιωάννινα από 18-20 Μαΐου 2006.

Η επιλογή των Ιωαννίνων, όπου εδρεύει το ομώνυμο Πανεπιστήμιο, ως τόπου διεξαγωγής του Συνεδρίου, ήταν επιβεβλημένη αφού εκτός της Ιατρικής Σχολής υπάρχει και ένα νέο τμήμα εξειδικευμένης βιολογικής κατεύθυνσης.

Είναι σημαντικό ότι το Συνέδριο αποτελεί χώρο συνάντησης φοιτητών (προ- και μεταπτυχιακών) από όλα τα βιολογικά αλλά και συναφή γνωστικά αντικείμενα. Και φαίνεται ότι πραγματικά υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον των φοιτητών γιατί κάθε χρόνο ο αριθμός των συμμετεχόντων (με ερευνητική δουλειά ή όχι) συνεχώς αυξάνεται.

Οι φετινές συμμετοχές προφορικών και πόστερς έχουν φτάσει τον αριθμό 226, ο οποίος υπολείπεται ελάχιστα του παραγωγικότερου συνεδρίου του 1997 (που έγινε στην Θεσσαλονίκη όταν ήταν Πολιτιστική Πρωτεύουσα της Ευρώπης)

Η μικρή αποτίμηση των όσων έχει πετύχει η ΕΕΒΕ, με τα συνέδρια που έχει διοργανώσει μέχρι σήμερα, αποδεικνύει την αλματώδη πρόοδο των Βιολογικών Επιστημών στη χώρα μας.

Τη δεκαετία του '70 η ΕΕΒΕ διοργάνωσε ένα μόνο συνέδριο (1979) στο οποίο παρουσιάστηκαν μόλις 41 εργασίες. Στην επόμενη δεκαετία (1980-1989) ο αριθμός των εργασιών που παρουσιάστηκαν ήταν περίπου 630, με ένα μέσο όρο 70 εργασίες/έτος.

Τη δεκαετία του '90 (1990-1999) στα δέκα συνέδρια παρουσιάστηκαν 1400 εργασίες, δηλαδή ο μέσος όρος διπλασιάστηκε και έφτασε τις 140 εργασίες/έτος. Τέλος στη δεκαετία που διανύουμε, στα 6 συνέδρια που έχουν διοργανωθεί (2000-2006), παρουσιάστηκαν περίπου 1300 εργασίες (συμπεριλαμβανομένων και των 226 φετινών που θα παρουσιαστούν στα Ιωάννινα), ήτοι ο μέσος όρος ξεπέρασε τις 185 εργασίες/έτος και η προοπτική είναι με τα επόμενα 3 συνέδρια (2007-2009) να φτάσει τις 200 εργασίες/έτος.

Έτσι είμαστε υποχρεωμένοι να διατηρήσουμε αμείωτο το ενδιαφέρον συμμετοχής και είναι σίγουρο πως το νέο Δ.Σ. της ΕΕΒΕ θα προσπαθήσει με όλες του τις δυνάμεις για το καλλίτερο δυνατό.

Το συνέδριο, ως συνήθως, διακρίνεται σε δύο ενότητες, τις προφορικές παρουσιάσεις (12 κύριες ομιλίες και 14 σύντομες ανακοινώσεις) και τις αναρτώμενες εκθέσεις (posters) που ανέρχονται σε 200 (!).

Στο περυσινό Συνέδριο του Ναυπλίου, με πρωτοβουλία του Υπεύθυνου κατάρτισης του προγράμματος Καθηγητή Ι. Μπέη, εγκαινιάστηκε μια νέα διαδικασία ως προς την υποστήριξη των Posters, που ήταν ένα πάγιο αίτημα των συμμετεχόντων από τα πρώτα συνέδρια. Δηλαδή, να μην υπάρχει «απλή ανάρτηση» αλλά «πραγματική παρουσίαση» όπως άλλωστε αρμόζει σε αυτή την κατηγορία ανακοινώσεων που λόγω έλλειψης χρόνου, σε κάθε συνέδριο, δεν μπορούν να είναι προφορικές.

Έτσι, τα **200 Posters** έχουν ομαδοποιηθεί σε **10 ενότητες**. Η κάθε ενότητα θα παρουσιάζεται σε συγκεκριμένο χρόνο ανάλογα με τον αριθμό των Posters. Σε κάθε ενότητα ηγείται ειδικός συντονιστής που έχει επιλεγεί από την Ο.Ε. Κάθε poster θα παρουσιαστεί προφορικά από τον συγγραφέα που έχει την ευθύνη της ανακοίνωσης, για τρία λεπτά, χρησιμοποιώντας τέσσερις διαφάνειες PowerPoint. Ο Συντονιστής θα διευθύνει τη συζήτηση και στο τέλος όποιος επιθυμεί θα μπορεί να παρατηρεί το poster από κοντά και να έχει συζήτηση με τους συγγραφείς του.

Σας ευχόμαστε καλή διαμονή στα Ιωάννινα και καλή επιτυχία σε όλους όσοι θα παρουσιάσουν τη δουλειά τους.

ΑΘΗΝΑ 14 ΑΠΡΙΛΙΟΥ 2006

Καθηγητής Θ. Παταργιάς
Καθηγητής Ι. Μπέης



TECHNOBIOCHEM Ltd

Chemicals, biochemicals & scientific Instruments

80 Karaiskou str. Piraeus - Greece

Tel.: +30210 41.70.629, 4172225

Fax : +30210 41.72.225

e-mail: kyrhel@otenet.gr

**Χημικά, Βιοχημικά & Επιστημονικά Όργανα
Ηρώων Πολυτεχνείου 49, 185 35 Πειραιάς**

Τηλ: 210 4170629, 210 4220360

Fax: 210 4172225

E-mail: kyrhel@otenet.gr

CHEMBIOTIN Ltd

Χημικά – Βιοχημικά – Εργαστηριακός Εξοπλισμός

Όργανα Χημείου

Tel.: 0030 210 96 200 10, 0030 210 96 13 479

Fax: 0030 210 96 200 10 E-mail: chembiot@otenet.gr



Η εταιρεία μας CHEMILAB Ε.π.ε. είναι αποκλειστικός προμηθευτής των εταιρειών:



**Αντισώματα, αντιδραστήρια
Western blot.**



**Μεμβράνες
αποτυπώσης
Nytran,
Protran, Westran**



Χαρτί 3mm, ηθμοί,



Genmedika Biotechnology Corp.
9F-8, No.736 Chungcheng Road,
Chungho, Taipei County 235, Taiwan
TEL: +886 2 82262199
FAX: +886 2 82262196
Website: www.gmb.com.tw

**Plasmid purification kits, Gel extraction kits, Pcr clean up kits,
genomic DNA, total RNA extraction kits**

**Διευθυνση: ΙΘΩΜΗΣ 26, 15231, Χαλανδρί
Τηλ: 210-6775363, Email: info@chemilqab.gr**

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΣΗΜΑΤΩΝ Για Μελέτες σε Ανθρώπους και Ζώα

Ανακαλύψτε σήμερα αυτό που ήδη γνωρίζουν χιλιάδες
ικανοποιημένοι χρήστες...



Επιστημονικά Πεδία

- Φυσιολογία
- Βιολογία
- Νευρολογία
- Βιοτεχνολογία
- Ψυχοφυσιολογία
- Εργοφυσιολογία
- Βιοϊατρική Μηχανική
- Φαρμακολογία & Τοξικολογία
- Κτηνιατρική



Τα συστήματα BIOPAC είναι η ολοκληρωμένη λύση για καταγραφή, ανάλυση και επεξεργασία βιοϊατρικών, φυσιολογικών παραμετρών. Η μεγάλη ποικιλία μορφοτροπέων υψηλής ποιότητας, οι νέες ισχυρές μονάδες καταγραφής, το δυναμικό λογισμικό και η εξελιγμένη βιβλιογραφία είναι μερικά από τα πλεονεκτήματα που καθιστούν τα συστήματα BIOPAC την ιδανική λύση για το εργαστήριό σας. Ρίξτε μια ματιά στον [κατάλογο των πελατών μας](#).

Τα συστήματα BIOPAC διατίθενται σε δύο εκδόσεις με διαφορετικό προσανατολισμό:

BIOPAC STUDENT LAB —————> εκπαιδευτικές εφαρμογές
MP100 και MP150 —————> ερευνητικές εφαρμογές

MP150 ΚΑΙ MP100

Σύγχρονα συστήματα για έρευνα

Μελέτες Αναπνευστικών Λειτουργιών	EKG	Συνεχής μη Επεμβατική
Καρδιοαγγειακές Αμοδυναμικές Μελέτες	EMG	μέτρηση πίεσης αίματος
In-vitro Φαρμακολογία	EKG Κινήσεις Οφθαλμών	Εργοφυσιολογία
Ηλεκτρική Βιοαγωγιμότητα	Προκλητά Δυναμικά	Βιο-μηχανική
(ενδείξεις καρδιακής λειτουργίας)	Ψυχοφυσιολογία	Τηλεδιαβίβαση σημάτων
Καταγραφές Μικρο-ηλεκτροδίων	Laser Doppler Flow	Αυτόνομοι εναχτές
Ηλεκτρογαστρογράφημα	Πληθυσμογραφία	Θάλαμοι ντέρων
EEG	Μελέτες Υπνου	Tissue baths

biopac student lab

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΩΝ

Αποκλειστικός εισαγωγέας: ΕΤ.ΤΣΙΜΠΟΣ ΕΠΕ

Κωνσταντινουπόλεως 946 Παρρών 54642 Θεσσαλονίκη
www.tsimpos.gr tsimpos@tsimpos.gr ΤΗΛ.2310-888630

I.M. ΚΥΡΙΑΚΙΔΗΣ Α.Ε.

Επιστημονικά όργανα – Χημικά αντιδραστήρια

Life Science Research

CENTRIFUGATION
 GEQ.8000 Gene Expression System
 GEQ.8850 Gene Expression System

CENTRIFUGATION
 Ultracentrifuges
 High Performance Centrifuges
 General Centrifuges

AUTOMATED SOLUTIONS
 AS 1000
 AS 1000 L
 AS 1000 S

SPACE-MICROCAPILLARY ELECTROPHORESIS SYSTEMS
 Proteomics
 Primary Immunoglobulin
 Genetic Analysis

GENE BIOPROCESSING
 Biot Cell Culture
 HIV
 PHAGE

I.M. ΚΥΡΙΑΚΙΔΗΣ Α.Ε.
 ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ – ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Biomedical Research Solutions

BECKMAN COULTER

PROTEOMELAB
 FROM TISSUES TO TARGETS

Identify

Isolate

Fractionate

Characterize

Evaluate

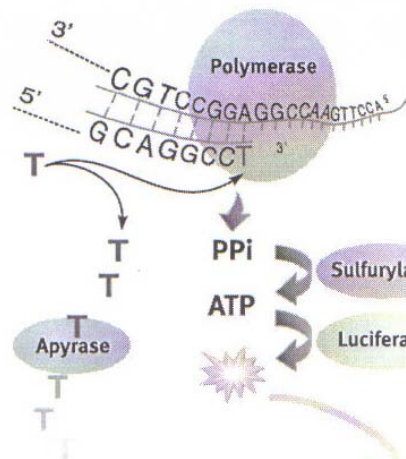
Diagnose

The pathway to protein discovery begins here

- Flow cytometry
- Automated fluorescence microscopy
- Mass spectrometry
- On-line analysis
- General purpose centrifugation
- High performance centrifugation
- Ultracentrifugation
- Centrifugal filtration
- Automated liquid handling
- High performance centrifugation
- Ultracentrifugation
- Liquid chromatography
- Capillary electrophoresis / Mass spectrometry
- Spectrophotometry
- Protein concentration in solution
- Automated protein crystallization
- Mass spectrometry
- Software solutions
- Automated immunoassay
- Flow cytometry
- Electrophoresis
- Immunohistochemistry
- Immunoprecipitation

Γ. ΚΟΡΔΟΠΑΤΗΣ ΕΠΕ

PYROSEQUENCING™ - ONE HOUR TO EXPLICIT SEQUENCE DATA



- No separation
- No tags or probes - No gels
- Fast - 1 SNP/ 6 sec
- Quantitative peak heights
- Parallel capability - microtiter plate format
- Flexible - in throughput
 - in assay design
 - in type of applications



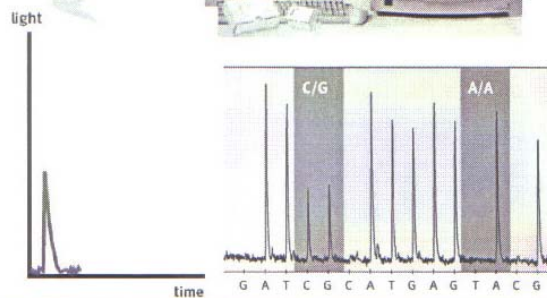
Real time sequencing detection
(Sequence by synthesis)

Detect incorporation of
nucleotides

Monitor run as it is proceeding

Detection of pyrophosphate
release upon nucleotide
incorporation

Fast and accurate



Pyrosequencing™ is an established genetic analysis method based on the principle of sequencing by synthesis. It is the only genetic analysis method capable of delivering explicit sequence information within minutes. Pyrosequencing is an ideal choice for genetic analysis in clinical research. The output data from Pyrosequencing is the gold standard of genetic information: real sequence data. This is the best possible assurance of a correct genetic test.

Γ. ΚΟΡΔΟΠΑΤΗΣ ΕΠΕ - Κ. Χρονά 18, Ν. Ψυχικό - Τηλ.: 210 67 74 160 - Fax: 210 67 55 469
e-mail: g.kordopatis@hellasnet.gr

**ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ JNKs ΚΑΙ p38-MAPK/MSK1 ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ
ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΗΣ ΟΞΥΓΕΝΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΙΜΗΣ
(HOX-1) ΣΕ H9c2 ΚΥΤΤΑΡΑ**

Αγγελή Ι.Κ., Γαϊτανάκη Αικ. και Ι. Μπέης

*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Ε. & Κ. Πανεπιστήμιο
Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη Ιλίσσια, 157 84 Αθήνα*

Ένα από τα σημαντικότερα στρεσογόνα ερεθίσματα στα οποία εκτίθενται τα καρδιακά κύτταρα είναι η επίδραση ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) π.χ. στην ισχαιμία. Η οξυγενάση της αίμης (HOX-1) έχει βρεθεί ότι προστατεύει τα κύτταρα έναντι του οξειδωτικού στρες οπότε μελετήθηκαν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2. Παρατηρήθηκε παρατεταμένη αύξηση των επιπέδων mRNA της HOX-1 (έως και 24 ώρες) μετά από επίδραση 200μM H₂O₂ που μεγιστοποιήθηκε στις 6 ώρες. Παρουσία αναστολέων των JNKs (SP600125), p38-MAPK (SB203580) και MSK1 (H89), διαπιστώθηκε αναστολή της παραπάνω απόκρισης. Παράλληλα, βρέθηκε μέγιστη φωσφορυλίωση και των τριών υποοικογενειών των MAPKs στα 5-15 λεπτά επίδρασης με H₂O₂. Μέγιστη ενεργοποίηση της MSK1 παρατηρήθηκε επίσης στα 15 λεπτά, η οποία παρουσία του SB203580 ανεστάλει πλήρως. Εξετάζοντας πιθανά υποστρώματα της MSK1, ανιχνεύθηκε μέγιστη φωσφορυλίωση των ATF2 και cJun στα 30 και 60 λεπτά αντίστοιχα, απόκριση στην οποία εμπλέκονται οι JNKs και MSK1. Ανιχνεύθηκε επίσης σύμπλοκο της φωσφορυλιωμένης MSK1 με τις φωσφορυλιωμένες μορφές των ATF2 και cJun. Καθώς ATF2 και cJun συνιστούν μέλη του AP1 και με δεδομένη την παρουσία θέσης πρόσδεσης του AP1 στον υποκινητή της HOX-1, μελετήθηκε (EMSA) η δραστηριότητα του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα. Μέγιστη προσδετική ικανότητα του AP1 παρατηρήθηκε στα 60 λεπτά, η οποία και ανεστάλει παρουσία των SP600125 και H89. Τα αποτελέσματά μας καταδεικνύουν για πρώτη φορά την εμπλοκή των JNKs και p38-MAPK/MSK1 στη μεταγωγή του σήματος του οξειδωτικού στρες στη HOX-1, προάγοντας πιθανά την κυτταρική επιβίωση και διασφαλίζοντας την ομοιόσταση.

Η παρούσα έρευνα χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ

**INVOLVEMENT OF JNKS AND P38-MAPK / MSK1 PATHWAYS
IN H₂O₂-INDUCED UPREGULATION OF HEME OXYGENASE-1
mRNA IN H9c2 CELLS****Aggeli I.K., Gaitanaki C., and I. Beis***Dept. of Animal and Human Physiology, School of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis Ilissia, 157 84 Athens*

One of the most important challenges that cardiomyocytes experience is an increase in the levels of ROS i.e. during ischemia and in the failing myocardium. HOX-1 has been found to protect cells against oxidative damage, therefore we decided to study the signaling cascades involved in its transcriptional regulation. HOX-1 mRNA levels were maximally induced after 6h treatment of H9c2 cells with 200 μ M H₂O₂ and remained elevated for at least 24h. Inhibition of JNKs (SP600125), p38-MAPK (SB203580) and MSK1 (H89) pathways reduced HOX-1 mRNA levels. In parallel, we observed that all 3 subfamilies of the MAPKs attained their maximal phosphorylation levels at 5-15min of H₂O₂ treatment, with MSK1 also being maximally phosphorylated at 15min. H₂O₂-induced MSK1 phosphorylation was completely abrogated in the presence of SB203580. In an effort to define possible substrates of MSK1 we found that ATF2 as well as cJun phosphorylation were equally induced after 30min and 60min, respectively, a response inhibited by SP600125 and H89, indicating the involvement of JNKs and MSK1 in the observed response. We also detected a potential signaling complex composed of either p-MSK1 and p-cJun or p-MSK1 and p-ATF2. ATF2 and cJun are known AP1 components. Given the presence of an AP-1 site in HOX-1 promoter region, the activity of AP1 transcription factor was examined. EMSA assays performed, showed a maximal upregulation of AP1 binding activity after 60min of H₂O₂ treatment which was significantly inhibited by SP600125 and H89. Our results show for the first time the potential role of JNKs, p38-MAPK, and MSK1 in the mechanism of transducing the oxidative stress-signal to HOX-1, possibly promoting cell survival and preserving homeostasis.

This work was funded by PYTHAGORAS I grant (70/3/7399).

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ
ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΤΙΚΗΣ ΙΣΤΟΝΗΣ Η1 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ
ΚΑΙ ΑΠΟΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ
ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΤΟΟΡΜΟΝΩΝ**

Αλατζιάς Α. και Α. Φουντούλη

*Εργαστήριο Βιολογίας Ανάπτυξης, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας,
Τμήμα Βιολογίας Α.Π.Θ.*

Μελετήθηκαν οι ισομορφές της συνδετικής ιστόνης Η1 στις τρεις αναπτυξιακές ζώνες (μεριστωματική ζώνη, ζώνη επιμήκυνσης και ζώνη διαφοροποίησης) της ρίζας του φυτού *Zea mays*. Απομονώθηκαν ιστόνες από κάθε αναπτυξιακή ζώνη ξεχωριστά, διαχωρίστηκαν με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση AUT/AUC-PAGE και έγινε ανοσοανήχνευση της ολικής Η1, των κύριων ισομορφών Η1Α και Η1Β και της ισομορφής Η1⁰. Παράλληλα, αναλύθηκαν με τον ίδιο τρόπο ιστόνες που απομονώθηκαν από φυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία αυξίνης και γιββεριλίνης καθώς και ιστόνες που απομονώθηκαν από καλλιέργειες κάλλων, οι οποίοι είχαν αναπτυχθεί από τμήματα της ρίζας που αντιπροσώπευαν τις τρεις αναπτυξιακές ζώνες. Η ανάλυση των πηκτών έγινε με τη βοήθεια Η/Υ και υπολογίστηκε η ποσοστιαία συμμετοχή της κάθε ισομορφής στην τάξη των συνδετικών ιστονών. Τέλος, έγινε ανοσοϊστοχημική ανήχνευση των ισομορφών της Η1 σε τομές της ρίζας για να προσδιορισθούν οι ιστοί όπου εντοπίζεται η κάθε μια από αυτές. Η ανάλυση των πηκτών έδειξε ότι η ποσοστιαία συμμετοχή της ισομορφής Η1⁰ αυξάνεται στη ζώνη διαφοροποίησης, ενώ κατά την αποδιαφοροποίηση των κυττάρων σε καλλιέργειες κάλλων, η ποσοστιαία συμμετοχή των ισομορφών είναι παρόμοια με αυτή της μεριστωματικής ζώνης. Το πρότυπο κατανομής των ισομορφών της Η1 μεταβάλλεται ριζικά κατά την επίδραση αυξίνης, όπου παρατηρείται σημαντική αύξηση της ποσοστιαίας συμμετοχής της Η1⁰ και στις τρεις αναπτυξιακές ζώνες και λιγότερο κατά την επίδραση γιββεριλίνης, όπου μεταβάλλεται η σχετική αναλογία μεταξύ των κύριων ισομορφών της Η1. Οι παρατηρούμενες μεταβολές στη συμμετοχή των διαφόρων ισομορφών της ιστόνης Η1 πιθανόν να οφείλονται στη διαφορετική φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων κάθε αναπτυξιακής ζώνης, τόσο στους μάρτυρες, όσο και κατά την επίδραση φυτοορμονών. Η αυξημένη ποσοστιαία συμμετοχή της ισομορφής Η1⁰ στη ζώνη διαφοροποίησης καθώς και κατά την επίδραση αυξίνης, η οποία επάγει στη ρίζα φαινόμενα διαφοροποίησης, υποδηλώνει τη σχέση της παραπάνω ισομορφής με τη διαφοροποίηση των κυττάρων, μία σχέση που έχει ήδη αποδειχθεί και σε άλλα βιολογικά συστήματα. Αντίθετα, στα κύτταρα των κάλλων, η φυσιολογική κατάσταση των οποίων είναι παρόμοια με αυτή των μεριστωματικών κυττάρων, το πρότυπο κατανομής των ισομορφών της συνδετικής ιστόνης είναι παρόμοιο με αυτό της μεριστωματικής ζώνης.

**DISTRIBUTION OF LINKER HISTONE H1 VARIANTS DURING
PLANT CELL DIFFERENTIATION, DEDIFFERENTIATION AND
PLANT HORMONE TREATMENT**

Alatzas A., and A. Foundouli

*Laboratory of Developmental Biology, Department of Genetics, Development & Molecular
Biology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki*

The developmental zones in the root of *Zea mays* (meristematic zone, elongation zone and differentiation zone) can be easily identified and isolated. Histones from each zone were isolated, separated by two-dimensional AUT/AUC-PAGE and linker histones were immunodetected. Additionally, histones were isolated from roots treated either with auxin or gibberillin and from callus cultures, propagated from root segments of the three developmental zones and analyzed as mentioned above. Gels were scanned and analyzed by means of computer and each variant ratio was estimated within the linker histone class. Finally, immunohistochemical detection of H1 variants in root sections was used in order to determine the tissues containing each variant. According to gel analysis, the ratio of linker histone variant H1⁰ is increased in samples derived from the differentiation zone, while in samples derived from callus cultures the linker histone variants distribution is similar to meristematic zone. The H1 variants distribution is altered dramatically in roots treated with auxin, where H1⁰ ratio is increased in samples derived from any of the three developmental zones, and in lesser extent in roots treated with gibberillin, where the main variants ratios are altered. The alterations of linker histone variants distribution which are observed in the developmental zones of maize root maybe correlated to the different physiological state of the plant cells. Increased ratio of H1⁰ in differentiation zone and also in roots treated with auxin, which is known to promote root differentiation, may be associated with cell differentiation, a correlation that already has been established in various organisms. In callus culture, where cells behave like meristematic cells, linker histone variants distribution is similar to meristematic zone.

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *SPOROTRICHUM THERMOPHILE* ΣΕ ΣΤΕΡΕΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΔΙΦΑΣΙΚΟΥ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ

Ανασοντζής Γ.Ε., Ταλαμάγκας Α., Καραγκούνη Α., Χατζηνικολάου Δ.Γ.

*Ομάδα Μικροβιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθήνας,
Πανεπιστημιούπολη, 157 81 Ζωγράφου, Αττική E-mail: xatzdim@biol.uoa.gr*

Τα απόβλητα της ελαιοπαραγωγικής διαδικασίας αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα για τις μεσογειακές χώρες. Με τα νέα συστήματα εξαγωγής ελαιολάδου (διφασικά), βρισκόμαστε αντιμέτωποι με ένα νέο είδος αποβλήτου, το ξηρό απόβλητο υψηλής υγρασίας (ΞΑΥΥ), για το οποίο οι υπάρχουσες μέθοδοι επεξεργασίας είναι ακατάλληλες ή ανεπαρκείς. Οι καλλιέργειες στερεάς κατάστασης προβάλλουν ως μια πολλά υποσχόμενη λύση τόσο για την ελάττωση του ρυπαντικού φορτίου όσο και για την αξιοποίηση των ΞΑΥΥ των διφασικών ελαιουργείων. Παρατηρήσαμε ότι ο θερμοφίλος ασκομύκητας *Sporotrichum thermophile*, και συγκεκριμένα το στέλεχος ATCC 28811, καθώς και ο μεσόφιλος μύκητας *Penicillium chrysogenum*, έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται με ιδιαίτερα ικανοποιητικό βαθμό σε στερεές καλλιέργειες ΞΑΥΥ, γεγονός που τους καθιστά υποψήφιους για την περαιτέρω επεξεργασία και αξιοποίηση των εν λόγω αποβλήτων. Η ικανότητα δε του πρώτου να παράγει θερμοσταθερά ένζυμα τον κάνει ιδιαίτερα ελκυστικό από βιοτεχνολογική άποψη. Στην εργασία αυτή, παρουσιάζονται τα πρώτα αποτελέσματα της έρευνάς μας σχετικά με την αριστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης του *S. thermophile* σε στερεές καλλιέργειες ΞΑΥΥ. Ως παράμετρος εκτίμησης της αύξησης του μικροοργανισμού, επιλέχθηκε η μέτρηση της ενεργότητας των παραγόμενων εξωκυτταρικών υδρολυτικών ενζύμων. Καταβλήθηκε προσπάθεια ανίχνευσης ενός σημαντικού αριθμού επιλεγμένων ενζυμικών ενεργοτήτων στα εκχυλίσματα στερεών καλλιεργειών. Ανιχνεύτηκαν σημαντικά επίπεδα ενδοξυλανάσης, ενδογλυκανάσης και αμυλάσης τα οποία συσχετίζονται με το ρυθμό αύξησης του μύκητα. Με βάση τα παραπάνω, μελετήθηκε η επίδραση του pH, της θερμοκρασίας και της προσθήκης αλάτων στην αύξηση.

**GROWTH STUDIES OF THE THERMOPHILIC FUNGUS
SPOROTRICHUM THERMOPHILE IN SOLID STATE
CULTURES OF BIPHASIC OLIVE-MILL WASTES**

Anasontzis G.E., Talamagas A., Karagouni A.D., Hatzinikolaou D.G.

*Microbiology Group, Sector of Botany, Department of Biology, University of Athens,
University Campus, 157 81 Zografou, Greece E-mail: (xatzdim@biol.uoa.gr)*

The waste disposal from olive oil extraction processes has recently started to puzzle olive oil producing countries. Probably the most difficult to deal form of olive-mill wastes are the liquid ones. However, as new extraction processes are being developed, we have to cope with a totally new form of waste, the two-phase olive mill waste of high humidity (TPOMW) for which very few treatment processes have been developed and thoroughly evaluated. Within this framework, solid state fermentations appear to be a promising solution for the reduction of the polluting load as well for the biotechnological exploitation of TPOMW. We observed that the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*, and specifically the strain ATCC 28811, as well as a strain of the mesophilic fungus *Penicillium chrysogenum*, have the ability to grow at satisfactory levels on solid state cultures of TPOMW, a fact that renders both strains very promising candidates for the treatment and utilization of this waste type. However, the ability of *S. thermophile* to additionally produce thermostable enzymes makes this microorganism a more attractive choice from a biotechnological viewpoint. In this study, we are presenting our initial experimental results concerning growth optimization studies in solid state cultures of *S. thermophile* on TPOMW. For the evaluation of microorganism's growth we chose the determination of certain extracellular hydrolytic enzyme activities. We tried to detect a significant number of selected enzyme activities in the aqueous extracts of the above cultures. Significant levels of endoglucanase, endoxylanase and amylase were detected which were correlated with the microorganism's growth rate. Based on these results, we studied the effects of culture temperature and initial pH as well as the effect of certain inorganic salts addition on the growth of the fungus.

ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ HSP90 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

Αναστασίου Δ.¹, Πρατσίνης Χ.¹, Λιβαδάς Κ.², Αλιβιζάτος Γ.²,
Κλέτσας Δ.¹ και Γ. Βουτσινάς¹

¹Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», ²Β' Ουρολογική Κλινική Παν. Αθηνών, Νοσ. Σισμανόγλειο, Αθήνα

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι η πέμπτη συχνότερη κακοήθεια στους δυτικούς πληθυσμούς. Ένα σημαντικό ζήτημα στην διαχείριση του καρκινώματος του μεταβατικού επιθηλίου είναι η χαμηλή ευαισθησία στη χημειοθεραπεία και τα υψηλά ποσοστά υποτροπής μετά την διουρηθρική εκτομή. Επομένως, η μελέτη των μοριακών μηχανισμών της ανθεκτικότητας στη χημειοθεραπεία είναι ιδιαίτερης σημασίας. Είναι γνωστό ότι η μοριακή συνοδός Hsp90 παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αυτό της PI3K-Akt, το οποίο εμπλέκεται στην έναρξη και πρόοδο του καρκίνου. Η λειτουργικότητα της Hsp90 είναι αποφασιστικής σημασίας για την σταθεροποίηση και τη λειτουργικότητα της Akt, μιας κινάσης σερίνης/ θρεονίνης που μεσολαβεί σε μια πληθώρα βιολογικών διαδικασιών που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Η geldanamycin (GA) είναι ένας ειδικός αναστολέας της Hsp90. Στην εργασία αυτή, μελετήθηκε η επίδραση της αναστολής αυτής της Hsp90 στην κυτταρική επιβίωση στις καρκινικές σειρές της ουροδόχου κύστης RT4, RT112 (βαθμός διαφοροποίησης I) και T24 (βαθ. διαφ. III). Η επέμβαση με GA είχε ως αποτέλεσμα τον δόσοεξαρτώμενο κυτταρικό θάνατο σε όλες τις κυτταρικές σειρές, ενώ η επιπλέον προσθήκη IGF-I δεν είχε καμία επίδραση, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι ο στόχος της αναστολής μέσω Hsp90 βρίσκεται καθοδικά του IGF-I. Ακολούθως, μελετήθηκε η επίδραση της αναστολής της Hsp90 στην έκφραση προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών μορίων σε επίπεδο mRNA. Επέμβαση με GA στις ίδιες κυτταρικές σειρές έδειξε ελάττωση της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών μορίων survivin, XIAP και c-IAP1, ενώ δεν είχε καμία επίδραση στο αντι-αποπτωτικό μόριο FLIP ή στα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογενείας των κασπασών, κασπάση-8, -9 και -10. Τα νέα στοιχεία αυτά ενδέχεται να οδηγήσουν σε καλύτερη κατανόηση της ανθεκτικότητας στη χημειοθεραπεία και σε εναλλακτικά πρωτόκολλα για την θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

INHIBITION OF HSP90 IN BLADDER CANCER**Anastasiou D.¹, Pratsinis H.¹, Livadas K.², Alivizatos G.², Kletsas D.¹,
and G. Voutsinas¹***¹Institute of Biology, NCSR "Demokritos", ²2nd Department of Urology, Medical School,
University of Athens, Sismanoglio Hospital, Athens, Greece*

Bladder cancer is the fifth most prevalent malignancy in the western population. A major issue in the management of transitional cell carcinoma of the bladder is low sensitivity to chemotherapy and high percentage of recurrence after transurethral resection. Therefore, the study of molecular mechanisms of drug resistance is of major importance for this cancer type. Molecular chaperone Hsp90 is known to play an important role in the regulation of signal transduction pathways, such as the PI3K-Akt pathway, which is involved in cancer initiation and progression. Hsp90 functionality is crucial for stabilization and function of Akt, a serine/threonine kinase known to mediate a multitude of biological actions involved in cell proliferation and apoptosis. Geldanamycin (GA) is a specific inhibitor of Hsp90, known to interfere with Akt signaling. In this work, we have studied the effects of Hsp90 inhibition by GA on cell survival, using RT4 (grade I), RT112 (grade I) and T24 (grade III) bladder cancer cell lines. Treatment with GA resulted in dose-dependent cell death in all the cell lines used, whereas treatment with GA accompanied by an induction of the PI3K-Akt pathway by addition of IGF-I had no influence on the dose-dependent percentage of cell death in all the cell lines used, indicating that the target of Hsp90 inhibition is found downstream of IGF-I. Then, we have studied the effects of Hsp90 inhibition on the mRNA expression of specific pro-apoptotic and anti-apoptotic molecules. Treatment of the same bladder cancer cell lines by GA has shown a decreased expression of the anti-apoptotic molecules survivin, XIAP and c-IAP1 at the mRNA level, while it had no effect on the anti-apoptotic molecule FLIP or the pro-apoptotic members of the caspase family, caspase-8, caspase-9 and caspase-10. These results give further edges for investigation in this research area, which may lead to a better understanding of drug resistance as well as to new alternatives in the treatment of bladder cancer.

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΩΤΕΡΩΝ ΟΡΙΩΝ ΑΝΟΧΗΣ ΣΤΗ
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΔΙΘΥΡΟ *MYTILUS
GALLOPROVINCIALIS*. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ
ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ**

Ανέστης Α., Λάζου Α. και Β. Μιχαηλίδης

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

Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος επηρεάζει λειτουργίες σε κάθε επίπεδο βιολογικής οργάνωσης, όπως τη γονιδιακή έκφραση, τον τύπο του μεταβολισμού και ακόμα την ηθολογία και τη γεωγραφική κατανομή των οργανισμών. Μία από τις κύριες αποκρίσεις των κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες είναι η επιλεκτική ενίσχυση της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού πλήγματος (heat shock proteins, hsps). Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός των ανώτερων ορίων ανοχής στη θερμοκρασία, πέρα από τα οποία επηρεάζεται αρνητικά η ικανότητα αερόβιας οξείδωσης του *Mytilus galloprovincialis*. Άτομα του είδους *M. galloprovincialis* εγκλιματίστηκαν σε ενυδρεία με θαλασσινό νερό όπου η θερμοκρασία είχε ρυθμιστεί στους 20° C, 24° C, 26° C, 28° C και 30° C αντίστοιχα για 30 ημέρες. Κάθε 5 ημέρες γινόταν λήψη των ιστών για τον προσδιορισμό της έκφρασης των hsps 70 και 90 kDa, της ενεργοποίησης των p38 MAPK και JNKs και της μέγιστης δραστηριότητας των γλυκολυτικών ενζύμων κινάση του πυροσταφυλικού οξέος, αλδολάση και εξοκινάση σύμφωνα με γνωστές μεθόδους. Τα αποτελέσματα δείχνουν μια διαφοροποίηση στην έκφραση των hsps και στην ικανότητα της αερόβιας παραγωγής του ATP σε σχέση με την θερμοκρασία εγκλιματισμού. Συγκεκριμένα, οι hsps εκφράζονται ισχυρά μετά τους 26°C, ενώ η μείωση της αερόβιας οξείδωσης και η έναρξη της αναερόβιας παραγωγής ATP αρχίζει ήδη μετά τους 22°C. Η έκφραση των hsps σχετίζεται με σηματοδοτικά μονοπάτια, στα οποία μπορεί να εμπλέκονται κινάσες της υπεροικογένειας των MAP κινασών. Φαίνεται ότι οι ανώτερες θερμοκρασίες, μετά τις οποίες παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές στην φυσιολογία των θαλάσσιων δίθυρων, μπορούν να προσδιορισθούν όχι μόνο από την έκφραση των hsps, αλλά και από τις μεταβολές στο πρότυπο του μεταβολισμού.

**DETERMINATION OF THE UPPER THERMAL LIMITS IN THE
MARINE BIVALVE *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*.
BIOCHEMICAL AND METABOLIC RESPONSES****Anestis A., Lazou A., and B. Michaelidis***Laboratory of Animal Physiology, Department of Zoology, School of Biology, Faculty of
Science, Aristotle University of Thessaloniki*

Environmental temperature has a strong effect on ectothermic animals and affects functions at every level of biological organization, from gene expression and metabolic type to ethology and geographical distribution. One of the main cell responses to high temperatures is the differential induction of heat shock proteins (hsps). The aim of the present work was to determine the upper thermal limits, over which the aerobic capacity of marine bivalves is downregulated. Specifically, mussels were divided into five groups and they acclimated at aquariums at 20°C, 24°C, 26°C, 28°C and 30°C respectively for 30 days. Every 5 days, mussels were drawn out, tissues were dissected and the levels of hsp70 and hsp90, the activation of p38 MAPK and JNKs and the maximal activity of glycolytic enzymes Pyruvate Kinase, Aldolase and Hexokinase were determined according to known methods. Our results show a variation in the expression of hsps and aerobic ATP production in terms of acclimation temperature. Especially, hsps are strongly induced over 26°C, while the reduction of aerobic capacity and the increase of anaerobic ATP production starts already over 22°C. The expression of hsps is possibly associated to signal transduction pathways that implicate MAPKs. It seems that upper thermal limits, over which we can observe significant changes in the physiology of marine bivalves, can be determined not only by the expression of hsps but also by changes in the type of metabolism.

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΣΤΟ ΒΕΝΘΙΚΟ ΔΙΘΥΡΟ *MODIOLUS BARBATUS*. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΩΤΕΡΩΝ ΟΡΙΩΝ ΑΝΟΧΗΣ ΣΤΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Ανέστης Α., Λάζου Α. και Β. Μιχαηλίδης

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

Είναι γνωστό ότι η θερμοκρασία του περιβάλλοντος επηρεάζει λειτουργίες σε κάθε επίπεδο βιολογικής οργάνωσης, από τη γονιδιακή έκφραση και τον τύπο του μεταβολισμού, έως την ηθολογία των οργανισμών και τη γεωγραφική κατανομή τους. Μία από τις κύριες αποκρίσεις των κυττάρων στο στρες υψηλής θερμοκρασίας είναι η επιλεκτική ενίσχυση της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού πλήγματος (heat shock proteins, hsps) καθώς και άλλων πρωτεϊνών που σχετίζονται με την έκφρασή τους, όπως είναι οι MAP κινάσες. Άτομα με διαφορετική γεωγραφική κατανομή ενδεχομένως διαφοροποιούνται όσον αφορά στις ελάχιστες θερμοκρασίες έκφρασης των hsps. Στην εργασία αυτή προσδιορίστηκαν τα ανώτερα όρια της θερμοκρασίας, πέρα από τα οποία επάγεται η έκφραση των hsps στο βενθικό είδος. Συγκεκριμένα, άτομα του είδους *Modiolus barbatus* εγκλιματίστηκαν σε ενυδρεία, όπου η θερμοκρασία είχε ρυθμιστεί στους 20° C, 24° C, 26° C, 28° C και 30° C αντίστοιχα για 30 ημέρες. Κάθε 5 ημέρες γινόταν λήψη των ιστών για τον προσδιορισμό της έκφρασης των hsps 70 και 90 kDa και της ενεργοποίησης των p38 MAPK και JNKs. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, φαίνεται ότι η έκφραση των hsps και ιδιαίτερα αυτών της οικογένειας hsp70 στους ιστούς του *M. barbatus* αρχίζει μετά τους 20°C. Αντίθετα σε δίθυρα, όπως το *Mytilus galloprovincialis* που ζουν στην μεσοπαραλιακή ζώνη, όπου επικρατούν υψηλότερες θερμοκρασίες, η έκφραση των hsp70 αρχίζει μετά τους 26°C. Η διαφορετική αυτή έκφραση των hsps σε θαλάσσια είδη δίθυρων με διαφορετική κατακόρυφη κατανομή είναι αποτέλεσμα της γενετικής τους σύστασης και της εξελικτικής τους ιστορίας και αποκαλύπτει διαφορές μεταξύ των θαλάσσιων δίθυρων όσον αφορά τα ανώτερα όρια ανοχής στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Στα πλαίσια της αύξησης της μέσης παγκόσμιας θερμοκρασίας αυτό σημαίνει ότι είδη με χαμηλότερα όρια ανοχής στη θερμοκρασία θα επηρεασθούν γρηγορότερα.

**BIOCHEMICAL RESPONSES IN THE SUBLITTORAL BIVALVE
MODIOLUS BARBATUS. DETERMINATION OF THE UPPER
THERMAL LIMITS****Anestis A., Lazou A., and B. Michaelidis***Laboratory of Animal Physiology, Department of Zoology, School of Biology, Faculty of
Science, Aristotle University of Thessaloniki*

Environmental temperature has a strong effect on ectothermic animals and affects functions at every level of biological organization, from gene expression and metabolic type to ethology and geographical distribution. One of the main cell responses to high temperatures is the differential induction of heat shock proteins (hsps), which is possibly associated to signal transduction pathways that implicate MAPKs. The aim of the present work was to determine the upper thermal limits, over which hsps are induced in the sublittoral bivalve *Modiolus barbatus*. Specifically, mussels were divided into five groups and they acclimated at aquariums at 20°C, 24°C, 26°C, 28°C and 30°C respectively for 30 days. Every 5 days, mussels were drawn out, tissues were dissected and the levels of hsp70 and hsp90 and the activation of p38 MAPK were determined according to known methods. According to our results, it seems that the expression of hsps and especially of hsp70 in tissues of *M. barbatus* starts over 20°C. On the contrary, in bivalves of the intertidal zone, like *Mytilus galloprovincialis*, which face higher temperatures, the expression of hsps starts over 26°C. The different expression of hsps in marine bivalves with different vertical distribution has a genetic basis and reveals differences in the upper thermal limits of these species. In terms of the increasing universal temperature, it can be predicted that species with lower thermal tolerance limits will be affected earlier than the others.

ΑΠΡΟΣΔΟΚΗΤΗ ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥ ΓΛΗΝΙΟΥ, *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758) ΜΕΤΑ ΤΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΤΣΕΧΙΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Αντωνοπούλου Ε.¹, Τσίκληρας Α.¹, Τσουμάνη Μ.², Λεονάρδος Ι.²

¹Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θ 134, 541 24, Θεσσαλονίκη, Email: εantono@bio.auth.gr

²Εργαστήριο Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45 110, Ιωάννινα

Το γλίνι, *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758), είναι ψάρι του γλυκού νερού που ζει στις λίμνες και τα ποτάμια της Ευρώπης και σε πολλές κεντροευρωπαϊκές χώρες καλλιεργείται εντατικά. Στην Ελλάδα η εξάπλωσή του τα τελευταία χρόνια είναι περιορισμένη. Στην εργασία αυτή ερευνήθηκε η αύξηση των νεαρών ατόμων του γλινιού στα ελληνικά νερά μετά τη μεταφορά τους από μονάδα καλλιεργειών του Πανεπιστημίου του Vodnany της Τσεχίας. Τα άτομα εκκολάφθηκαν τον Ιούνιο 2003 και μεταφέρθηκαν στην Ελλάδα τον Ιούνιο 2005, σε ηλικία 2 ετών. Πριν την εγκατάστασή τους σε χωμάτινες δεξαμενές της Δημοτικής Επιχείρησης Λίμνης Ιωαννίνων που τροφοδοτούνται από τη λίμνη Παμβώτιδα, το μέσο βάρος των γλινιών ήταν 64.21 ± 0.18 g και το μέσο ολικό μήκος τους 10.03 ± 0.03 cm. Η μέτρηση της αύξησης έδειξε ότι, παρά τη μεγάλη ενδοπληθυσμιακή ποικιλομορφία στο μέγεθος, το γλίνι στη λίμνη Παμβώτιδα επιτυγχάνει εμπορεύσιμο μέγεθος (ολικό μήκος: 23.2 ± 0.41 cm) και βάρος (ολικό βάρος: 173.1 ± 9.5 g) μέσα σε 6 μήνες. Το γλίνι στην Τσεχία υπολογίζεται ότι χρειάζεται περίπου δυο ακόμη έτη για να φτάσει σε εμπορεύσιμο μέγεθος. Οι παράμετροι σίτισης διατηρήθηκαν σταθερές και παρόμοιες με αυτές πριν τη μεταφορά. Έτσι, η μεγάλη αυτή διαφορά στην αύξηση, που έχει μεγάλες οικονομικές προεκτάσεις, πιθανώς οφείλεται στην υψηλότερη μέση μηνιαία θερμοκρασία των ελληνικών νερών (εύρος 3.1-25.95 °C) σε σύγκριση με τα νερά της Τσεχίας που παραμένουν παγωμένα για 4-5 μήνες το χρόνο. Κατά τη διάρκεια της έρευνας, η θερμοκρασία, που παίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση των ποικιλόθερμων οργανισμών, παρουσίασε πτώση από 24.88 °C (μέση τιμή Ιουνίου) σε 10.90 °C (μέση τιμή Νοεμβρίου).

UNEXPECTED GROWTH PERFORMANCE OF TENCH, *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758) FOLLOWING ITS TRANSPORTATION FROM CZECH REPUBLIC TO GREECE**Antonopoulou E.¹, Tsikliras A.¹, Tsoumani M.², Leonardos I.²**¹*Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, UP Box 134, 541 24, Thessaloniki Email: eantono@bio.auth.gr*²*Laboratory of Zoology, Department of Biological Applications and Technologies, University of Ioannina, 45 110, Ioannina*

The tench, *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758), is a freshwater fish species inhabiting the European lakes and rivers. In several central European countries tench is intensively cultured. Nowadays, its distribution in Greek freshwaters is limited to western Greece. In the present work, we studied the growth of juvenile tench that were transported to Greece from the hatchery of the University of Vodnany (Czech Republic). Juveniles were hatched in May 2003 and were transported to Greece in June 2005 at an age of 2 years. Prior to their establishment in a natural pond of DELI that receives water from Pamvotis Lake, the mean weight of the fish (\pm SE) was 64.21 ± 0.08 g and the mean total length 10.03 ± 0.03 cm. Growth analysis showed that, despite the high inter-population variability in size, the tench in Pamvotis lake achieves its commercial size (total length: 23.2 ± 0.41 cm) and weight (total weight: 173.1 ± 9.5 g) within 6 months (June-November). In contrast, in Czech Republic, tench requires two more years to attain its commercial size. The feeding conditions were kept identical before and after the transportation. Hence, the high difference in growth, which has important financial implications, is probably attributed to the higher mean temperature prevailing in the Greek freshwater systems (range: 3.1 and 25.95 °C) compared to those in the Czech Republic that remain frozen for 4-5 months per year. Along the course of the present work the temperature, which is an important regulator of the growth of poikilothermic animals, decreased from 24.88 °C (mean temperature in June) to 10.90 °C (mean temperature in November).

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ
ΤΗΣ ΑΝΑΣΚΑΦΗΣ ΙΔΙΟΚΗΣΙΑΣ ΤΣΑΛΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ
ΤΗΣ ΘΗΒΑΣ**

**Αρβανιτάκη Ζ., Δημόπουλος Εμ.Γ., Φουντουλάκης Γ.Ε., Κουντούρη Ε.*
και Σ.Κ. Μανώλης**

*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστήμιο Αθηνών
Πανεπιστημιούπολη 157 84 Αθήνα. E-Mail: smanol@biol.uoa.gr*

**Θ' Εφορεία Προϊστορικών & Κλασικών Αρχαιοτήτων, Αρχαιολογικό Μουσείο Θήβας*

Η παλαιοδημογραφική και παθολογική σκελετική ανάλυση ενός πληθυσμού σε συνάρτηση με τα αρχαιολογικά ευρήματα προσφέρει μια ολοκληρωμένη εικόνα του επιπέδου διαβίωσης αυτού. Δίνει απαντήσεις για την σύσταση του πληθυσμού, για το παλαιοδημογραφικό του προφίλ και συσχετίζει την παρουσία ή όχι παθολογικών καταστάσεων με τη γενικότερη υγεία και συμπεριφορά του. Στη συγκεκριμένη μελέτη, το πληθυσμιακό δείγμα αποτελείται από άτομα των δύο φύλων και όλων των ηλικιακών ομάδων. Ο προσδιορισμός αυτός δεν κατέστη σε κάθε περίπτωση δυνατός, διότι η κακή κατάσταση του σκελετικού υλικού δυσχέρανε τον προσδιορισμό του φύλου και την εκτίμηση της ηλικίας θανάτου στις περιπτώσεις των ενηλίκων ατόμων. Από τις εκφυλιστικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στο σκελετικό υλικό πιο συχνές ήταν αυτές της σπονδυλικής στήλης, υπό την μορφή οστεοφύτων και εκτεταμένης συνοστέωσης σπονδύλων. Επίσης εντοπίστηκε μια περίπτωση αναιμίας καθώς επίσης και αρκετά τραύματα, όπως για παράδειγμα κατάγματα. Το συγκεκριμένο νεκροταφείο αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα ταφής σε πίθους. Επίσης, στην περιοχή βρέθηκαν ίχνη καύσης καθώς και πολυάριθμα ζωικά οστά.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το Πρόγραμμα «Καποδίστριας» του Ειδικού Λογαριασμού Κονδυλίων Έρευνας (Επιτροπή Ερευνών, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών)

**BIOARCHAEOLOGICAL ANALYSIS OF THE HUMAN
SKELETAL REMAINS FROM THE EXCAVATION OF
TSALAS PROPERTY AT THEBES, BOEOTIA**

**Arvanitaki Z., Dimopoulos E.G., Fountoulakis G.E., Kountouri E.*,
and S.K. Manolis**

*Department of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, National & Kapodistrian
University of Athens, Panepistimiopolis 157 84 Athens, Greece*

** 9th Ephorate of Prehistoric & Classical Antiquities, Archaeological Museum
of Thebes, Boeotia, Greece*

The paleodemographic and pathological skeletal analysis of a population, combined with the archaeological findings, concludes to a more sufficient aspect of its social structure and health status. This study provides a paleodemographic reconstruction as well as a complete estimation of population's profile. In this skeletal collection, both sexes and all age groups are present. Assessment of sex and age-at-death was not achieved for every single individual due to bad condition of the population sample. Extensive skeletal lesions are common in ancient populations. Similarly to our case, numerous forms of trauma were observed such as osteophytosis, fracture and a severe case of anemia. This population represents a typical example of burials in pythoids. Animal bones and indications of fire on bones as well as at the burial site were found.

*This work is funded by the Programme "Kapodistrias" of the Special Research Account
(National & Kapodistrian University of Athens)*

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΛΑΧΙΣΤΟΥ
ΕΠΙΤΡΕΠΟΜΕΝΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΓΙΑ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΕΙΔΗ ΨΑΡΙΩΝ
ΑΝΑ ΑΛΙΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ΣΤΟ ΙΟΝΙΟ ΠΕΛΑΓΟΣ**

Αρμένης Γ.¹, Μουτόπουλος Δ.Κ.², Στεργίου Κ.Ι.²

¹Τμήμα Αλιείας Ζακύνθου, Κ. Λομβάρδου 29100, Ζάκυνθος. E-mail: elmarot@otenet.gr

²Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Ζωολογίας,
Εργαστήριο Ιχθυολογίας, Θ. 134, 541 24 Θεσσαλονίκη

Στην εργασία αυτή υπολογίστηκε το ποσοστό των ατόμων με μήκος μικρότερο από το Ελάχιστο Επιτρεπόμενο Μέγεθος (ΕΕΜ) και το μήκος της πρώτης γεννητικής τους ωρίμανσης (Lm) για 13 είδη εμπορικών ψαριών που αλιεύτηκαν με διαφορετικά αλιευτικά εργαλεία. Οι δειγματοληψίες έγιναν σε εποχική βάση (Ιούλιος 2004 - Ιούλιος 2005) με μηχανότρατα, γρι-γρι, πεζότρατα, μανωμένα δίχτυα και παραγάδια στη θαλάσσια περιοχή της Ζακύνθου. Καταγράφηκε το ολικό μήκος σώματος (σε cm) περισσότερων από 22000 ατόμων. Τα στοιχεία του ΕΕΜ για κάθε είδος ψαριού πάρθηκαν από τον κανονισμό EU 1626/1994, ενώ οι τιμές Lm από έρευνες στις Ελληνικές Θάλασσες και τη FishBase (www.fishbase.org). Από την ανάλυση των κατά μήκος συνθέσεων φαίνεται ότι γενικά σε 12 είδη η πεζότρατα είχε το μεγαλύτερο ποσοστό ατόμων με μέγεθος μικρότερο από το ΕΕΜ και το Lm, που κυμάνθηκε από 3,9% (*Spondyliosma cantharus*) έως 99,4% (*Diplodus annularis*), για το ΕΕΜ και από 72,5% (*Serranus cabrilla*) έως 100% σε τέσσερα είδη για το Lm. Αντίθετα, τα παραγάδια ήταν τα εργαλεία με τα μικρότερα ποσοστά ατόμων με μέγεθος μικρότερο από το ΕΕΜ, όπου με εξαίρεση το *D. annularis* (93,5%), όλα τα υπόλοιπα είδη είχαν ποσοστά μικρότερα από 10,0%. Παρόλα αυτά το ποσοστό των ατόμων με μέγεθος μικρότερο από το Lm ήταν σε όλα τα εργαλεία πολύ μεγαλύτερο από ότι το ΕΕΜ, με τη μικρότερη τιμή (*Serranus cabrilla*: 18,4%) να εμφανίζεται στα παραγάδια. Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό ότι τα ισχύοντα μέτρα δεν είναι αποδοτικά και πρέπει να αναπροσαρμοστούν ή/και να συμπληρωθούν με νέα μέτρα, όπως είναι η μετάβαση στα οικοσυστημικά διαχειριστικά μοντέλα.

**EFFECTIVENESS OF THE MINIMUM LANDING SIZE FOR
COMMERCIAL FISH SPECIES CAUGHT WITH VARIOUS
FISHING GEARS IN THE IONIAN SEA****Armenis G.¹, Moutopoulos D.K.², Stergiou K.I.²**¹*Zakinthos Dept of Fisheries, K. Lombardou 29100, Zakynthos. E-mail: elmarot@otenet.gr*²*Aristotle University of Thessaloniki, School of Biology, Department of Zoology,
Laboratory of Ichthyology, Box 134, 541 24 Thessaloniki*

In this study we estimated the percentage of individuals with length smaller than the Minimum Landing Size (MLS) and the length at first maturity (Lm) for 13 commercial fish species. Sampling took place seasonally (July 2004 to July 2005) using different gears (trawls, purse-seines, beach-seines, trammel nets and longlines) in the coastal waters off Zakynthos Island. We overall measured the total length (in cm) of more than 22000 individuals. The MLS values were taken from the EU Regulation 1626/1994 and Lm values were extracted either from previous studies in Greek waters or from FishBase (www.fishbase.org). Our results showed that for all species beach-seines generally caught individuals with sizes smaller than MLS and Lm, with percentages ranging from 3.9% (*Spondyliosma cantharus*) to 99.4% (*Diplodus annularis*), and from 72.5% (*Serranus cabrilla*) to 100%, respectively. In addition, with the exception of *D. annularis* (93.5%), the percentage of individuals caught with sizes smaller than MLS, in longlines, ranged between 0-10%. However, the percentages of individuals with sizes smaller than Lm were for all gears higher than MLS, with the smallest percentage (*Serranus cabrilla*: 18,4%) corresponding to longlines. This indicates that the existing technical measures are inadequate for the sustainable use and fisheries management must be reconsidered under an ecosystem perspective. To that end, the National Marine Park of Zakynthos, together with the present findings, could be the main alternative in rebuilding highly pressured stocks.

**ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΜΟΛΟΓΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
rnfE ΚΑΙ rnfG ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ Ι ΤΟΥ
ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *ZYMOMONAS MOBILIS* ΣΕ *ESCHERICHIA COLI***

**Βανδέρα Ε.¹, Ρέντεση Γ.², Βαρσάκη Α.¹, Stoian G.³, Δραΐνας Κ.¹,
Περυσινάκης Α.¹**

¹Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα

²Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110
Ιωάννινα

³Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Βουκουρεστίου, Ρουμανία

Στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων εντοπίζεται μια αντλία πρωτονίων, το σύστημα της NADH : ουβικινόνης οξειδοϋδροκτάσης, το οποίο καλείται και αναπνευστικό σύμπλοκο Ι. Λόγω πολυπλοκότητας των ανώτερων οργανισμών, σε αυτή την εργασία χρησιμοποιείται ως μοντέλο για τη μελέτη του αναπνευστικού συμπλόκου Ι το α-πρωτεοβακτήριο *Zyotomonas mobilis*. Στην παρούσα εργασία επικεντρώσαμε την προσοχή μας στην ανίχνευση της δραστηριότητας NAD(P)H-οξειδάσης του βακτηρίου και στην κλωνοποίηση των ομολόγων γονιδίων του συστήματος. Τα βακτηριακά κύτταρα του *Z.mobilis* παρουσίασαν δραστηριότητα NAD(P)H-οξειδάσης τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης. Η δραστηριότητα NADH-οξειδάσης δεν παρουσιάζει διαφορά κάτω από οποιεσδήποτε συνθήκες, ενώ η NADPH-οξειδάση εμφανίζει μεγαλύτερη δραστηριότητα σε αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης. Από την ανάλυση του γονιδιώματος του *Z. mobilis* προβλέπεται ότι το αναπνευστικό σύμπλοκο Ι διαθέτει έξι υπομονάδες σε αντίθεση με αυτά άλλων βακτηρίων που περιέχουν 14 υπομονάδες. Τα ομόλογα γονίδια rnfE και rnfG που κωδικοποιούν τη σύνθεση των δραστικών υπομονάδων για NAD(P)H-οξειδάση του συμπλόκου Ι, ενισχύθηκαν με αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης, υποκλωνοποιήθηκαν και τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια μετασχηματίστηκαν σε κύτταρα *E.coli* DH5a για να μελετηθεί η δραστηριότητα NAD(P)H-οξειδάσης. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιέχουν τα ομόλογα γονίδια rnfE και rnfG μετασχηματισμένα σε *E.coli* DH5a, εμφάνισαν μεγαλύτερη δραστηριότητα NAD(P)H-οξειδάσης, ιδιαίτερα μετά την επίδραση χαοτροπικού αντιδραστηρίου.

Πρόγραμμα Ελληνορουμανικής συνεργασίας 2003 (No.1416/04-02-2003).

**EXPRESSION OF THE RESPIRATORY COMPLEX I GENES *rnfG*
AND *rnfE* OF *ZYMOMONAS MOBILIS* IN *ESCHERICHIA COLI*****Vandera E.¹, Rendesi G.², Varsaki A.¹, Stoian G.³, Drainas C.¹,
Perysinakis A.¹**¹ *Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110 Ioannina*² *Dept of Biological Applications and Technologies, 45110 Ioannina*³ *Faculty of Biology, University of Bucharest, Bucharest, Romania*

The inner membrane of mitochondria and the cytoplasmic membrane of bacteria, contain a proton-pumping NADH : ubiquinone oxidoreductase, which is also called respiratory complex I. Complex I is a multisubunit complex catalyzing the electron transfer from NADH to quinone. Many human mitochondrial diseases involve structural and functional defects at the level of this enzyme complex, such as Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) and the drug-induced Parkinsonism in rodents and humans. The Gram-negative α -proteobacterium *Zymomonas mobilis* can be used as an ideal model for the study of complex I, because of its extended similarities with mitochondria. This work focused on the detection of NAD(P)H-oxidase activity in *Z. mobilis* and cloning of the corresponding genes. The NADH-activity showed no differences under any conditions, whereas the NADPH-oxidase appeared more active in cells growing anaerobically. The genome of *Z. mobilis* apparently contains only six putative genes, as compared to the 14 components of complex I in other bacteria. Two of them encoding products with NAD(P)H-oxidase activity were amplified, cloned and expressed in *E. coli*. It appeared that the recombinant NADH-oxidase, encoded by the *rnfE* homologue, is more active as a single component as compared to the NADPH-oxidase. On the other hand, the product of the *rnfG* homologue appears to solubilize after treatment with a chaotropic reagent, indicating its tighter association with membranes.

Greek-Romanian bilateral collaboration Program 2003 (No. 1416/04-02-2003).

**ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΥΟ ΦΥΛΩΝ ΣΤΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ
ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΣΥΓΧΡΟΝΟΥ
ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΘΗΝΑ**

Βάννα Β.Γ.¹, Μανώλης Σ.Κ.²

¹*Institute of Archaeology, University College London (UCL), 31-34 Gordon Square, WC1H
0PY, London, UK, Email: v.vanna@ucl.ac.uk*

²*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη 157 84 Αθήνα, E-mail: smanol@biol.uoa.gr*

Τα κατάγματα συναντώνται πολύ συχνά σε σκελετικό υλικό και παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη συμπεριφορά του πληθυσμού, τον τρόπο ζωής, το φυσικό περιβάλλον, την κοινωνική πολυπλοκότητα, τη διαπροσωπική βία, κλπ. Κάνοντας συγκρίσεις μεταξύ των φύλων, τα αρσενικά άτομα θα περιμέναμε να παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά καταγμάτων, επειδή έχουν την τάση να εμπλέκονται σε πιο απαιτητικές, σωματικά, και ριψοκίνδυνες δραστηριότητες από τα θηλυκά άτομα. Η παρούσα μελέτη εστιάζει στις διαφορές μεταξύ των φύλων στη συχνότητα και την κατανομή των καταγμάτων στον σκελετό, όπως αυτές διαφαίνονται στα στοιχεία που εξήχθησαν από τη μελέτη ενός δείγματος από σύγχρονο σκελετικό πληθυσμό από την Αθήνα του 19^{ου}-20^{ου} αιώνα. Τα ποσοστά που παρουσιάζονται εδώ αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των οστών με κάταγμα σε σχέση με τον συνολικό αριθμό οστών που υπήρχαν στο δείγμα. Τα τεστ ANOVA και Kruskal-Wallis εφαρμόστηκαν για να προσδιοριστούν οι στατιστικά σημαντικές διακυμάνσεις στην παρουσία των καταγμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το συνολικό ποσοστό καταγμάτων ήταν μεγαλύτερο στα θηλυκά άτομα, αλλά αυτό είναι κάπως παραπλανητικό. Αυτό που κάνει τα αρσενικά άτομα να φαίνονται λιγότερο επιρρεπή στα κατάγματα είναι η υψηλή συχνότητα παθολογικών καταγμάτων των σπονδύλων στις γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας. Στην πραγματικότητα, οι άντρες φαίνεται ότι είχαν μεγαλύτερο αριθμό καταγμάτων στα περισσότερα σημεία του σκελετού από τις γυναίκες. Η σπονδυλική στήλη ήταν το πιο σύνθηες σημείο κακώσεων για τις γυναίκες και οι κλείδες για τους άντρες.

**SEX-RELATED DIFFERENCES IN THE PREVALENCE AND
DISTRIBUTION OF FRACTURES IN A MODERN GREEK
SKELETAL POPULATION SAMPLE FROM ATHENS****Vanna V.G.¹, Manolis S.K.²**

¹*Institute of Archaeology, University College London (UCL), 31-34 Gordon Square, WC1H
0PY, London, UK, E-mail: v.vanna@ucl.ac.uk*

²*Department of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, School of Sciences,
University of Athens, Panepistimiopolis 157 84 Athens, Greece,
E-mail: smanol@biol.uoa.gr*

Fractures are very regularly reported in skeletal material and provide information on a variety of aspects of population behaviour, lifestyle, activity, physical environment, social complexity, interpersonal violence, etc. Comparing the sexes, male individuals are expected to exhibit higher overall frequencies of trauma because they tend to get involved in more physically demanding and risky activity than women. The present study focuses on the differences in the prevalence and the skeletal pattern of fractures between the sexes, as revealed by data drawn from an osteological population sample from 19th – 20th century Athens. The results presented here are preliminary and are based on the data drawn from the recording of 100 skeletons that come from a total sample of 208 adults. The frequencies reflect the number of elements that display the fracture over the total number of the same element present and observable in the sample. ANOVA parametric and Kruskal-Wallis non-parametric tests were employed to determine statistically significant variations in the presence of fractures. The results showed that the overall frequency of fractures was higher for the female individuals, but this might be misleading; what makes the males appear less prone to fractures is the high frequency of pathological vertebral fractures in the older female group. In fact, males seem to have suffered more fractures in most parts of the skeleton than females. The vertebrae were the most common site of injury for the females and the clavicles for males. The most frequently affected population subgroup were the older females, followed by the older male individuals.

ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΕΛΛΗΝΙΣΤΙΚΟΥ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΑΠΟ ΤΗ ΘΕΣΣΑΛΙΑ

Βάννα Β.Γ.¹, Μανώλης Σ.Κ.²

¹*Institute of Archaeology, University College London (UCL), 31-34 Gordon Square, WC1H
0PY, London, UK, Email: v.vanna@ucl.ac.uk*

²*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη 157 84 Αθήνα, E-mail: smanol@biol.uoa.gr*

Η οστεοαρθρίτιδα είναι η πιο συχνή μορφή μετακρανιακής παθολογίας που συναντάται σε σκελετικό υλικό και συνδέεται με την ηλικία, τη γενετική προδιάθεση, την παχυσαρκία, τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, τις δραστηριότητες και το επάγγελμα. Είναι επομένως ένας σημαντικός δείκτης του επιπέδου υγείας και παρέχει πληροφορίες σχετικές με τον τρόπο ζωής, τον υλικό πολιτισμό, το περιβάλλον, την οικονομία και το κοινωνικό επίπεδο ενός πληθυσμού. Στην παρούσα μελέτη, η συχνότητα της οστεοαρθρίτιδας και στις αρθρικές διαρθρώσεις και στη σπονδυλική στήλη, υπολογίστηκε σε ένα δείγμα πληθυσμού από την Ελληνιστική (3^{ος}-1^{ος} αι. π.Χ.) Δημητριάδα, στη Θεσσαλία, και η κατανομή της στον πληθυσμό αλλά και στον σκελετό παρατηρήθηκε και σημειώθηκε. Πιο συγκεκριμένα, η κάθε αρθρική επιφάνεια καταγράφηκε ως παρούσα ή απύουσα και ύστερα ως παθολογική ή μη-παθολογική. Για να αντιμετωπίσουμε το πρόβλημα της έλλειψης κάποιων επιφανειών, η συχνότητα της ασθένειας στον πληθυσμό υπολογίστηκε από το σύνολο των παθολογικών περιοχών σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των αρθρικών περιοχών που υπήρχαν στο δείγμα. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ είναι προκαταρκτικά και βασίζονται στα στοιχεία που εξήχθησαν από τη μελέτη 100 σκελετών από ένα συνολικό δείγμα περίπου 400 ατόμων. Εφαρμόστηκαν οι έλεγχοι ANOVA και Kruskal-Wallis για να προσδιοριστούν οι στατιστικά σημαντικές διακυμάνσεις στη παρουσία της οστεοαρθρίτιδας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συχνότητα της πάθησης και στη σπονδυλική στήλη και στις υπόλοιπες αρθρώσεις, αυξανόταν σημαντικά με την ηλικία και ότι ήταν πιο συχνή στους άντρες, οι οποίοι, είναι πιο πιθανόν, να εμπλέκονταν σε πιο έντονη δραστηριότητα και σε ανύψωση βαρών. Στις μικρότερες ηλικίες (20-35χρονών), μόνο ένα μικρό ποσοστό σπονδύλων είχε προσβληθεί από οστεοαρθρίτιδα, ενώ σε μεγαλύτερες ηλικίες (35+ χρονών), οι πιο συχνά προσβαλλόμενες αρθρώσεις ήταν η στερνοκλειδική και η ακρωμιοκλειδική, ακολουθούμενες από αυτές μεταξύ των φαλαγγών των δακτύλων των χεριών.

**PREVALENCE AND DISTRIBUTION OF OSTEOARTHRITIS IN
A HELLENISTIC SKELETAL POPULATION SAMPLE FROM
THESSALY****Vanna V.G.¹, Manolis S.K.²**

¹*Institute of Archaeology, University College London (UCL), 31-34 Gordon Square, WC1H 0PY, London, UK, E-mail: v.vanna@ucl.ac.uk*

²*Department of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, School of Sciences, University of Athens, Panepistimiopolis 157 84 Athens, Greece. E-mail: smanol@biol.uoa.gr*

Osteoarthritis is the most frequent type of postcranial pathology to be found in skeletal material and is associated with age, genetic predisposition, obesity, environmental factors, activity and occupation. It is therefore a significant health indicator and can provide information on the lifestyle, material culture, environment, economy and social status of a population. In the present study, the prevalence of both synovial-joint and vertebral osteoarthritis was measured in a population sample from Hellenistic Demetrias, Thessaly, and its distribution in the population studied as a whole and the pattern in the skeleton were noted. More specifically, each joint surface in each skeleton was recorded as being present or absent and then pathological or non-pathological and, in order to control the problem of differential preservation, the prevalence of the disease in the population was calculated by measuring the pathological surfaces out of the total number of the joint surfaces represented in the osteological assemblage. The results presented here are preliminary and are based on the data drawn from the recording of 100 skeletons that come from a total sample of approximately 400 individuals. ANOVA parametric and Kruskal-Wallis non-parametric tests were employed to determine statistically significant variations in the presence of osteoarthritis. The result showed that osteoarthritis, both in the spine and the rest of the joints, increased with age and was more frequent in males, who, it is more likely to have been involved in heavy workload and strenuous activity than females. In the younger ages (20-35yrs), only the vertebrae were affected by the condition, whereas in the older ages (35+yrs), the sternoclavicular and acromioclavicular, followed by the hand phalanges, were the most frequently affected joints.

**ΜΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ 4VNTR ΚΑΙ GLU298ASP
ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗΣ ΣΥΝΘΕΤΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΜΕ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΓΙΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗ
ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ**

**Βασιλάκου Μ.¹, Τσαλίκη Ε.¹, Στεφανάκης Ν.¹, Βοττέας Β.²,
Κασπαριάν Χ.², Νάστος Π.², Νικολάκης Δ.², Λάμνησου Κ.¹**

¹ Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
² Καρδιολογική Κλινική, Λαϊκό Νοσοκομείο Αθηνών

Γενετικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (ENOS) έχουν θεωρηθεί ως προδιαθεσικοί παράγοντες για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου (CAD) σε διάφορους πληθυσμούς. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τους πολυμορφισμούς 4VNTR και Glu298Asp του γονιδίου ENOS σε σχέση με την εμφάνιση πρόωρης στεφανιαίας νόσου και την ύπαρξη επεισοδίων εμφράγματος του μυοκαρδίου στον Ελληνικό πληθυσμό. Συνολικά μελετήθηκαν 370 άτομα, 209 CAD ασθενείς, ηλικίας έως 58 ετών, και 161 υγιή άτομα του γενικού πληθυσμού. Οι συχνότητες για τους γονοτύπους bb, ab, aa του πολυμορφισμού 4VNTR ήταν 0.67, 0.29, 0.04, αντίστοιχα, για τους ασθενείς και 0.73, 0.24, 0.03, αντίστοιχα, για την ομάδα ελέγχου. Οι συχνότητες για τους γονοτύπους GG (Glu/Glu), GT (Glu/Asp), TT (Asp/Asp) του πολυμορφισμού Glu298Asp ήταν 0.52, 0.41, 0.07, αντίστοιχα, για τους ασθενείς και 0.47, 0.46, 0.07, για την ομάδα ελέγχου. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι και για τους δύο πολυμορφισμούς δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των συχνοτήτων που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς και στους υγιείς. Επίσης, η ταυτόχρονη ανάλυση των δύο πολυμορφισμών έδειξε ότι δεν υπάρχει συνεργιστική δράση των αλληλομόρφων a και T των δύο πολυμορφισμών για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Αντίθετα από άλλα αποτελέσματα, τα δικά μας δεν υποστηρίζουν συσχέτιση των πολυμορφισμών 4VNTR και Glu298Asp με εμφάνιση στεφανιαίας νόσου στον Ελληνικό πληθυσμό.

Η παρούσα εργασία χρηματοδοτήθηκε από τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του ΕΚΠΑ.

LACK OF ASSOCIATION BETWEEN ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE GENE POLYMORPHISMS AND RISK OF PREMATURE CORONARY ARTERY DISEASE IN THE GREEK POPULATION**Vasilakou M.¹, Tsalliki E.¹, Stefanakis N.¹, Votteas V.², Kasparian C.², Nastos P.², Nikolakis D.², Lamnissou K.¹**¹*Division of Genetics, Dept of Biology, University of Athens, Greece*²*Department of Cardiology, "Laiko" Hospital, Athens, Greece*

Genetic polymorphisms in the gene for endothelial nitric oxide synthase (ENOS) have been considered as potential risk factors for the development of coronary artery disease (CAD) in some populations. We studied two polymorphisms of the ENOS gene, the 4VNTR and the Glu298Asp, in relation to the existence of premature coronary artery disease (CAD) and the occurrence of myocardial infarction (MI) in a total number of 370 individuals of the Greek population. The patient group consisted of 209 subjects, aged less than 58 years. The frequencies for bb, ab and aa genotypes of 4VNTR polymorphism were 0.67, 0.29, 0.04, respectively, for the patient group and 0.73, 0.24, 0.03 for the control group. The frequencies for GG (Glu/Glu), GT (Glu/Asp), TT (Asp/Asp) of the Glu298Asp polymorphism were 0.52, 0.41, 0.07, respectively, in patients compared to 0.47, 0.46, 0.07, in controls. The statistical analysis indicated that there are no significant differences in the frequencies of the genotypes between patients and controls for both polymorphisms. In addition, the combined analysis of the two polymorphisms indicated no synergistic effect of the a and T alleles to CAD disease. Thus, in contrast to some earlier findings, we have found no evidence for association between the 4VNTR polymorphism or the Glu298Asp polymorphism and the risk for premature CAD.

This work was supported by the Special Account for Research Grants of Athens University

ΑΡΡΕΝ ΨΕΥΔΟΕΡΜΑΦΡΟΔΙΤΙΣΜΟΣ: ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΥΟ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ

Βασιλείου Γ.¹, Σεκερλή Ε.¹, Δημοπούλου Α.¹, Τοπαλίδης Α.¹,
Σφαιρόπουλος Ν.², Σύρρου Μ.³, Ρούσσο Ι.¹, Βογιατζής Ν.¹

¹Εργ. Κυτταρογενετικής Β' Παιδιατρικής Κλινικής Α.Π.Θ., Νοσ. Α.Χ.Ε.Π.Α., Θεσ/νίκη

²Ορθοπαιδική Κλινική Γ.Ν.Θ. "Γ.Γεννηματάς", Θεσσαλονίκη

³Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ο άρρεν ψευδοερμαφροδιτισμός χαρακτηρίζεται από φαινότυπο θήλεος και καρυτότυπο άρρενος (46,XY). Οι άρρενες ψευδοερμαφρόδοτοι φέρουν πάντοτε όρχεις ή υπολείμματα αυτών, ενώ τόσο τα εξωτερικά όσο και τα εσωτερικά γεννητικά όργανα εμφανίζουν ποικίλου βαθμού θηλεοποίηση. Στην εργασία αυτή παρουσιάζουμε δύο παραλλαγές του άρρενος ψευδοερμαφροδιτισμού. Η πρώτη περίπτωση αφορά ασθενή με φαινότυπο θήλεος, ηλικίας 80 ετών, η οποία ελέγχθηκε κυτταρογενετικά διότι εμφάνιζε υπετροφική κλειτορίδα και τυφλό υποπλαστικό κόλπο. Στο ιστορικό της αναφέρεται αμφοτερόπλευρη ορχεκτομή σε νεαρή ηλικία. Η δεύτερη περίπτωση αφορά γυναίκα ασθενή, ηλικίας 34 ετών, που παραπέμφθηκε στο εργαστήριο κυτταρογενετικής για πρωτοπαθή αμμηνόρροια. Έφερε έξω γεννητικά όργανα θήλεος, ενώ υπερηχο-γραφικά διαπιστώθηκαν υπολείμματα όρχεων. Η μελέτη των χρωματοσωμάτων με την τεχνική των ταινιών GTG έδειξε ότι ο καρυτότυπος και στις δύο ασθενείς ήταν 46,XY. Ακολούθησε μοριακή ανάλυση, η οποία επιβεβαίωσε την ύπαρξη του Y χρωμοσώματος. Η περαιτέρω διερεύνηση των παραπάνω περιστατικών οδήγησε στα εξής συμπεράσματα: Η πρώτη ασθενής εμφάνιζε πλήρη αντίσταση στα ανδρογόνα, κατάσταση που αναφέρεται ως σύνδρομο CAIS (complete androgen insensitivity syndrome), γνωστό παλαιότερα ως πλήρης θηλεοποίηση των όρχεων (complete testicular feminization). Το σύνδρομο παρουσιάζει συχνότητα 1:13158-40800 γεννήσεις ζώντων νεογνών. Συμβαίνει νωρίς κατά την ανάπτυξη του XY εμβρύου, όταν οι υποδοχείς των ανδρογόνων αποτυγχάνουν να λειτουργήσουν, συντελώντας με αυτόν τον τρόπο στη γέννηση φαινοτυπικά θήλεος ατόμου. Η δεύτερη ασθενής έπασχε από το σύνδρομο Swyer, το οποίο οφείλεται σε καταστροφή των όρχεων κατά τις πρώτες 8 εβδομάδες της εμβρυικής ζωής.

MALE PSEUDOHERMAFRODISM: REPORT OF TWO CASES

**Vassiliou G.¹, Sekerli E.¹, Dimopoulou A.¹, Topalidis A.¹,
Sferopoulos N.², Sirrou M.³, Rousso I.¹, Voyiatzis N.¹**

¹*Cytogenetics Lab., 2nd Dept. Pediatrics of Aristotle University, AHEPA Hospital, Thessaloniki*

²*Department of Orthopedics, "G. Gennimatas" Hospital, Thessaloniki*

³*Laboratory of General Biology, University of Ioannina*

Male pseudohermafrodisism is characterized by female phenotype and 46,XY karyotype. Male pseudohermafroditites have gonads that are testes but the external and internal genitalia are not completely masculinised. Here we report two cases of male pseudohermafrodisism. The first case refers to a 80-year-old female patient, who presented clitoromegaly and short blind-ending vagina. The testes have been bilaterally surgically removed. The second case refers to a woman, 34 years old, who was sent to the cytogenetics laboratory because she presented primary amenorrhea. She presented female external genitalia and testicular remnants according to the ultrasonography. Chromosomes were studied using the GTG technique. In both cases the karyotype was 46,XY. The result was confirmed by molecular analysis of the Y chromosome. We concluded that the first patient suffered from complete androgen insensitivity syndrome (CAIS), which was known as complete testicular feminization. The estimated incidence of this condition is 1/13158-40800 livebirths. CAIS occurs early in XY fetal development when the androgen receptors completely fail to function, leading to the birth of a female infant. The second case suffered from Swyer syndrome, which results from the loss of testicular tissue in the first 8 weeks of fetal life.

**ΣΤΑΔΙΟΕΙΔΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟΥ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ
ΩΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟ ΔΙΠΤΕΡΟ ΕΝΤΟΜΟ *Ceratitis capitata***

**Βελέντζας Α.Δ., Νέζης Ι.Π., Στραβοπόδης Δ.Ι., Παπασιδέρη Ι.Σ.
και Λ.Χ. Μαργαρίτης**

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρων και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Πανεπιστημιόπολη,
Ζωγράφου 15784, Αθήνα.*

Στην παρούσα εργασία περιγράφονται τα χαρακτηριστικά του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των τροφοκυττάρων στα ωθυλάκια της μεσογειακής μύγας *Ceratitis capitata* κατά τη διάρκεια της μέσης και της όψιμης ωογένεσης. Στη μέση ωογένεση τα σποραδικά εκφυλισμένα ωθυλάκια παρουσιάζουν τα τυπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης, δηλαδή, αποδιοργανωμένο κυτταροσκελετό ακτίνης, όπως φαίνεται μετά από ανοσοεντόπιση με αντίσωμα ειδικό για τη φρακτίνη και θρυμματισμένο DNA το οποίο είναι δυνατό να παρατηρηθεί με τη δοκιμασία TUNEL. Τα ατρησικά ωθυλάκια παρουσιάζουν υψηλή ενεργότητα κασπάσης όπως φαίνεται μετά από *in vitro* δοκιμασία για ανίχνευση ενεργής κασπάσης και περιέχουν αυτοφαγικά σωμάτια τα οποία είναι δυνατό να ανιχνευθούν μετά από χρώση με MDC (monodansylcadaverine) και μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης. Στο τέλος της ωογένεσης, απόπτωση και αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος συνυπάρχουν, παρουσιάζοντας τα προαναφερθέντα μορφολογικά χαρακτηριστικά, καθώς επίσης και την παρουσία μιας τροποποιημένης μορφής του κυτοχρώματος *c* στο κυτταρόπλασμα των τροφοκυττάρων. Συμπερασματικά προτείνουμε ότι κατά τη διάρκεια της ωογένεσης στη μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata*, η απόπτωση και ο αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος δρουν συνεργατικά με σκοπό την πιο γρήγορη και απότελεσματική απορρόφηση και εκκαθάριση των εκφυλισμένων τροφοκυττάρων.

*Η παρούσα μελέτη χρηματοδοτήθηκε από Ερευνητικό Πρόγραμμα «Ηράκλειτος» του
ΥΠΕΠΘ (προς τους Α.Χ.Μ και Α.Δ.Β.).*

STAGE - SPECIFIC REGULATION OF PROGRAMMED CELL DEATH DURING OOGENESIS IN THE MEDFLY *Ceratitis capitata***Velentzas A.D., Nezis I.P., Stravopodis D.J., Papassideri I.S.,
and L.H. Margaritis***Faculty of Biology, Department of Cell Biology and Biophysics, University of Athens,
Panepistimiopolis, 157 81 Athens, Greece*

In the present study, we describe novel features of the developing egg chambers programmed cell death occurring during mid- and late-oogenesis of the medfly *Ceratitis capitata*. During mid-oogenesis, the spontaneously degenerated egg chambers exhibit typical characteristics of apoptotic cell death. Their nurse cells contain fragmented DNA and fragmented actin cytoskeleton, as it is clearly revealed by a TUNEL assay and an (anti-fractin) immunolabelling approach, respectively. *In vitro* (Red-VAD-FMK) caspase activity assays and (CM1) immunostaining reactions demonstrate that the atretic egg chambers acquire high levels of caspase activity. Distinct features of autophagic cell death are also observed during *C. capitata* mid-oogenesis, as it is clearly divulged by the MDC staining approach and thorough ultrastructural examination performed through the usage of transmission electron microscopy. At the late stages of *C. capitata* oogenesis, apoptosis and autophagy function together, in a stage-specific fashion, manifesting miscellaneous cell death features that are identical to the ones mentioned above, being also chaperoned by the involvement of a significantly altered cytochrome *c* conformational display, or unmasking. We propose that apoptosis and autophagy operate synergistically during *C. capitata* oogenesis for a more efficient elimination and detoxification of the degenerated nurse cells and abnormal (atretic) egg chambers.

This research was supported by "HRAKLEITOS" Research Grant to L.H.M. and A.D.V.

**Η ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΡΟΛΩΝ ΣΤΗ ΔΙΠΛΗ ΜΟΝΟΓΟΝΕΪΚΗ
ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ (ΔΜΚ): ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ mtDNA ΤΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ
ΤΟΥ *Mytilus galloprovincialis***

Βενέτης Κ.¹, Ζούρος Ε.² και Γ.Κ. Ροδάκης¹

¹Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 157 01 Αθήνα, ²Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 714 09 Ηράκλειο, Κρήτη

Το φαινόμενο της διπλής μονογονεϊκής κληρονομικότητας συνίσταται στην παρουσία ενός μητρικά κληρονομούμενου (F) και ενός πατρικά κληρονομούμενου (M) mtDNA. Με τον όρο “αντιστροφή ρόλων” εννοούμε τη θεωρητική πιθανότητα ένα μόριο τύπου F να μπορεί να μεταπηδήσει από τη μητρική στην πατρική γραμμή κληρονομησης. Για τη διερεύνηση τέτοιων πιθανών περιπτώσεων “αρρενοποίησης” ενός μητρικού μορίου αναπτύξαμε και εφαρμόσαμε μεθόδους παραλαβής σπερματοζωαρίων οι οποίες μηδενίζουν την πιθανότητα προσμίξεων από κύτταρα άλλων ιστών. Σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες, η δυνατότητα εξέτασης καθαρού σπέρματος μας επέτρεψε να διαπιστώσουμε ότι η σπερματική γραμμή περιέχει μόνο το πατρικό (M) μόριο. Στο σπέρμα ενός από τα 36 αρσενικά άτομα που εξετάσαμε η αλληλουχία του mtDNA έμοιαζε περισσότερο με το F παρά με το M μόριο. Εντούτοις, η σύγκρισή του με το mtDNA των σωματικών ιστών του ατόμου αυτού έδειξε ότι το mtDNA του σπέρματος είχε πατρική προέλευση. Ο προσδιορισμός της πλήρους πρωτοδιάταξης αυτού του μορίου αποκάλυψε ότι η κύρια ρυθμιστική περιοχή του (control region, CR) αποτελείται από μια συστοιχία επαναλαμβανόμενων ρυθμιστικών περιοχών τύπου M, η οποία έχει παρεμβληθεί σε ρυθμιστική περιοχή τύπου F. Προτείνεται ένας πιθανός μηχανισμός δημιουργίας των ανακατατάξεων στην περιοχή αυτή και εξετάζεται η πιθανότητα ύπαρξης ειδικών αλληλουχιών του μιτοχονδριακού γονιδιώματος που να προσδίδουν στο μόριο τη δυνατότητα μεταβίβασης μέσω του σπέρματος.

*Το βιολογικό υλικό παρέιχε η εταιρία «Ποσειδών Ο.Ε. – Μύδια Νέας Περάμου».
Η έρευνα αυτή χρηματοδοτείται από τη Γ.Γ.Ε.Τ. (ΠΕΝΕΑ 01ΕΛ42).*

ROLE REVERSAL IN DOUBLY UNIPARENTAL INHERITANCE (DUI): ANALYZING THE mtDNA CONTENT OF THE GERM LINE OF *Mytilus galloprovincialis***Venetis C.¹, Zouros E.², and G.C. Rodakis¹**

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Athens, 157 01 Athens, ²Department of Biology, University of Crete, 714 09, Heraklion, Crete

The hypothesis of “Role reversal” in DUI suggests that an mtDNA molecule that is normally transmitted through the egg (an F type genome) may become sperm-transmitted, thus assuming the role of the paternal (M) genome. The detection of F genomes in male gonads in many previous studies implies that such events of “masculinization” may be common. We applied a method of sperm purification and found that when the possibility of sperm contamination by somatic cells is minimized, only the M genome can be detected in the sperm. Thus, the maternal genome does not enter the sperm. In one of the 36 males we examined, the sperm contained an mtDNA genome whose sequence was similar to the F genome. Examination of the mtDNA of the somatic tissues of that male showed that the F type-genome in the sperm was this male’s paternal genome. This genome was fully sequenced and found to contain a compound control region (CR), which contained tandem repeats of M-type CR inserted within an F-type CR. We propose a possible mechanism for the creation of this complex CR. Moreover we examine the possibility that there might be specific mtDNA sequences, which are responsible for the sperm-transmission mode of inheritance of the mitochondrial genome.

*The biological material has been provided by «Poseidon co. – Mussels of New Peramos»
This research is funded by G.S.R.T. (PENED 01ED42)*

**ΕΥΡΕΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΑΝΑΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ
ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ pCP4.2 ΤΟΥ ΑΙΘΑΝΟ-
ΛΟΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *Zymomonas mobilis***

Βίλλιας Γ. και Κ.Μ. Παππά

*Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη 15701, Αθήνα*

Το πλασμίδιο pCP4.2 (32,5 kb) του αιθανολοπαραγωγού α-πρωτεοβακτηρίου *Zymomonas mobilis*, βιομηχανικού στελέχους CP4, είναι μέλος μιας οικογένειας πέντε διακριτών και παρόμοιων σε μέγεθος, κρυπτικών πλασμιδίων του οργανισμού. Η εύρεση της ολικής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των 32.456 bp του πλασμιδίου pCP4.2 και η ανάλυση αυτής και των προβλεπόμενων ORFs με χρήση προγραμμάτων ανάλυσης αλληλουχιών, οδήγησε στον εντοπισμό πιθανών γονιδίων και διαγονδιακών περιοχών που σχετίζονται με λειτουργίες πλασμιδιακού αναδιπλασιασμού (*rep*, replication) και σταθεροποίησης (*par*, partitioning). Το κύριο πιθανό γονίδιο αναδιπλασιασμού του πλασμιδίου pCP4.2, όπως χαρακτηρίστηκε μέσω ομολογιών σε επίπεδο υβριδισμών και πρωτοταγούς αλληλουχίας με βακτηριακές ρεπλικάσες, ονομάστηκε *repA*, κωδικοποιεί για πιθανή πρωτεΐνη 519 aa (58,5 kDa) σχετικά ομόλογη με RepA πρωτεΐνες μεγαλομοριακών πλασμιδίων των *A. tumefaciens* και *B. subtilis*, και φέρει διακριτό μοτίβο H-T-H πρόσδεσης στο DNA. Ολόκληρο το πλασμίδιο pCP4.2 επί πλέον επιδεικνύει τρεις περιοχές με υψηλή απόκλιση σε A/T, που είναι υποψήφιες για σημεία έναρξης αναδιπλασιασμού (*oriRs*, origins of replication). Η πιθανή περιοχή σταθεροποίησης του pCP4.2 είναι σύνθετη και περιλαμβάνει σε μια έκταση ~2,2 kb: α) γονίδια ενεργού πλασμιδιακού καταμερισμού (*parA* και *parB*), πιθανά οργανωμένα σε συνεργώμα, που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες 22,6 kDa (ParA) και 8,1 kDa (ParB) ομόλογες με αντίστοιχες πρωτεΐνες πλήθους βακτηριακών πλασμιδίων και χρωμοσωμάτων, και φέρουσες χαρακτηριστικά μοτίβα Walker-τύπου υδρόλυσης ATP (ParA) και μοτίβο πρόσδεσης στο DNA (ParB), β) μία πρωτότυπη περιοχή πιθανού πλασμιδιακού κεντρομερίδιου (*parS*) καθοδικά των γονιδίων *parAB*, που περιλαμβάνει 7 ευθείες, συνεχόμενες επαναλήψεις 13 βάσεων με εσωτερικές δυαδικές συμμετρίες, και τέλος, γ) γονίδιο συστήματος πλασμιδιακού εθισμού σε ζεύγος τοξίνης/αντιτοξίνης (*doc*, death-on-curing), που κωδικοποιεί για πιθανή τοξίνη 14,4 kDa. Από τα παραπάνω *rep* και *par* γονίδια του πλασμιδίου pCP4.2, το γονίδιο *repA*, ιχνηθετημένο, επέδειξε σε υβριδισμούς κατά Southern ομολογίες με περιοχές τριών από τα τέσσερα άλλα πλασμίδια του στελέχους CP4, ενώ ιχνηθέτης βασιζόμενος στα γονίδια *parAB* δεν υβρίδισε με τα υπόλοιπα πλασμίδια του CP4.

IDENTIFICATION OF PUTATIVE REPLICATION AND PARTITIONING REGIONS ON THE 32.5 kb PLASMID pCP4.2 OF THE ETHANOL-PRODUCING BACTERIUM *Zymomonas mobilis***Villias G., and K.M. Pappas***Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 15701, Greece*

The 32.5 kb plasmid pCP4.2 of the ethanol-producing α -proteobacterium *Zymomonas mobilis*, industrial strain CP4, belongs to a family of five distinct and similar in size, cryptic plasmids, residing in the organism. Sequencing of the total 32,456 bp nucleotide content of plasmid pCP4.2, and analysis of both the derived sequence and probable extrapolated ORFs, led to the identification of genes and intergenic regions potentially involved in plasmid replication (*rep*) and partitioning (*par*). The most probable replicase-type gene of plasmid pCP4.2, denoted *repA*, was characterized as such via hybridization and sequence homologies with bacterial replicases, and codes for a putative 519 aa (58.5 kDa) protein mostly homologous to characterized RepA proteins from high molecular weight plasmids of *A. tumefaciens* and *B. subtilis*. The putative pCP4.2 replicase harbors a well-defined H-T-H DNA-binding motif. Base-skew analysis of the total nucleotide sequence of plasmid pCP4.2 additionally led to the detection of three A/T-rich regions that might serve as putative origins of replication (*oriRs*). The most probable stabilization region of plasmid pCP4.2 encompasses in a ~2.2 kb region both active partitioning and plasmid addiction elements: i) active partitioning *parA*- and a *parB*-like genes, most likely transcriptionally linked, coding for putative 22,6 kDa (ParA) and 8,1 kDa (ParB) protein products highly homologous to Par proteins of various bacterial plasmids and chromosomes, and harboring distinct Walker-type ATPase motifs (ParA) and DNA binding motifs (ParB), ii) a centromere-like region (*parS*) immediately downstream of the *parAB* locus, comprised of seven 13-bp repeats with internal dyad symmetries, and lastly, iii) a plasmid addiction-type gene (*doc*, death-on-curing), highly homologous to genes of plasmid toxin/antitoxin systems, coding for a putative toxin of 14.4 kDa. When genes of the *rep* and *par* regions of plasmid pCP4.2 were used as probes in Southern hybridizations against the total CP4 plasmid content, the *repA* gene proved homologous to particular regions belonging to three of the remaining four plasmids of CP4, whereas the *parAB* genes did not hybridize with the rest of the CP4 plasmids.

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΣΥΝ-ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΩΝ
ADA2b ΚΑΙ GCN5 ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ ΚΑΙ ΤΗ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ PS II ΤΟΥ *Arabidopsis thaliana* ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ**

Βλαχονάσιος Κ.Ε., Νικολούδη Α., Πολυδώρου Χ. και Μ. Μουστάκας

*Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124
Θεσσαλονίκη*

Η πρωτεΐνη ADA2 είναι ένας μεταγραφικός συν-ενεργοποιητής, ο οποίος συνδέεται και λειτουργεί με την ακετυλοτρανσφεράση των ιστονών GCN5 στην ζύμη καθώς και σε πρότυπα ζωικά συστήματα (Brown *et al.*, 2000). Στο *Arabidopsis thaliana*, υπάρχει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την GCN5 και δύο γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που μοιάζουν με την ADA2 της ζύμης και έχουν περίπου 50% ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων τους. T-DNA ενθέσεις στα γονίδια *GCN5* και *ADA2b* προκαλούν σοβαρότατες επιδράσεις στην αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών καθώς και στην έκφραση των γονιδίων όπως ελέχθηκαν χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεο-τιδίων. Τα *gcn5* και *ada2b* μεταλλάγματα εκδήλωσαν παρόμοιους αλλά και διαφορετικούς φαινότυπους, υποδηλώνοντας ότι αυτοί οι συν-εργοποιητές έχουν ταυτόχρονα κοινούς και διαφορετικούς βιολογικούς ρόλους και παρουσιάζουν διαφορετική ανθεκτικότητα σε θερμοκρασίες μικρότερες του 0°C από τα φυτά άγριου τύπου (Vlachonasios *et al.*, 2003). Στην εργασία αυτή μελετήθηκε ο ρόλος των γονιδίων *ADA2b* και *GCN5* στην αύξηση των ριζών και τη λειτουργία του PS II σε συνθήκες αλατότητας. Στα πειράματα ανθεκτικότητας στην αλατότητα (0, 50, 75 και 100mM NaCl), και τα δύο μεταλλάγματα παρουσίασαν μειωμένη αύξηση της ρίζας σε σχέση με τα φυτά άγριου τύπου. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες ADA2b και GCN5 μπορεί να λειτουργούν ως θετικοί ρυθμιστές της αύξησης της ρίζας στην αλατότητα. Σε πειράματα μέτρησης του φθορισμού της χλωροφύλλης μετά από έκθεση των φυτών σε 100mM NaCl για δύο μέρες και τα δύο μεταλλάγματα έδειξαν σημαντική μείωση στη μη-φωτοχημική απόσβεση (NPQ), ενώ παρουσίασαν μεγαλύτερη ροή ηλεκτρονίων (ETR) και μεγαλύτερη απόδοση φωτονίων στη μεταφορά ηλεκτρονίων του PSII (ΦPSII) σε σχέση με τα φυτά άγριου τύπου.

**THE ROLE OF TRANSCRIPTIONAL COACTIVATORS ADA2b
AND GCN5 IN ROOT GROWTH AND PSII FUNCTION OF
Arabidopsis thaliana UNDER SALINITY**

Vlachonasios KE., Nikoloudi A., Polidorou C., and M. Moustakas

*Department of Botany, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, 54124
Thessaloniki*

ADA2 is a transcriptional coactivator that has been shown to associate and function with the histone acetyltransferase GCN5 in budding yeast as well as in model animal systems (Brown et al. 2000). In *Arabidopsis*, there is one gene encoding GCN5 and two genes encoding proteins that resemble yeast ADA2 and share approximately 50% amino acid sequence identity. T-DNA disruption of *GCN5* or *ADA2b* resulted in severe effects on plant growth and development and on gene expression as monitored using DNA microarrays. The *gcn5* and *ada2b* mutant plants display both similar and different phenotypes as well as respond different to freezing tolerance than wild-type plants, suggesting that these proteins have both common and distinct biological functions (Vlachonasios et al., 2003). In the present study we explore the role of *ADA2b* and *GCN5* genes on root growth and PSII function under salinity. In the salt tolerance experiments (0, 50, 75, 100mM NaCl) both mutants display reduced root growth in comparison to the wild type plants. This result suggests that ADA2b and GCN5 proteins may function as positive regulators of root growth under salt conditions. In the chlorophyll fluorescence measurements, after two days exposure to 100mM NaCl both mutants showed a significant reduction in the non-photochemical quenching (NPQ) formation whereas the electron transport rate (ETR) and the quantum yield of PSII electron transport (Φ PSII) increased compared to wild type plants.

References

- Brown CE, Lechner T, Howe L and Workman JL (2000). The many HATs of transcription coactivators. Trends Biochem. Sci. 25, 15–19.
- Vlachonasios KE, Thomashow MF and Triezenberg ST (2003). Disruption mutations of ADA2b and GCN5 transcriptional adaptor genes dramatically affect Arabidopsis growth, development, and gene expression. Plant Cell 15: 626-638.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΔΟΥΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΜΜΟ ΑΚΤΩΝ ΚΟΛΥΜΒΗΣΗΣ

Βουρνάζου Β.¹, Ευστρατίου Μ.Α.¹, Βελεγράκη Α.² και Θ. Ζαρκάδας¹

¹Τμήμα Επιστημών της Θάλασσας, Πανεπιστήμιο Αιγαίου και ²Ειδικό Εργαστήριο Μυκητολογίας, Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δείγματα άμμου συλλέχθηκαν από τρεις αμμώδεις παραλίες κολύμβησης της ανατολικής ακτής της νήσου Λέσβου κατά την κολυμβητική περίοδο του 2004 και εξετάστηκαν για ολικά και κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (TC, FC), κοπρανώδεις στρεπτοκόκκους (FS) και εντεροκόκκους (Ent) καθώς και μύκητες. Η άμμος, αδρομερής και μέσου μεγέθους, από μακροσκοπική παρατήρηση εκτιμήθηκε ότι αποτελείται από ασβεστίτη, μαρμαρυγία, σερπεντίνη και χαλαζία.

Υπαρξη βακτηρίων κοπρανώδους προέλευσης διαπιστώθηκε σε όλες τις παραλίες. Οι αριθμοί των TC και FC ήταν γενικά χαμηλοί και απομονώθηκαν από το 15% των δειγμάτων. Στο 85% των περιπτώσεων δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία τους. Σε αντίθεση, η παρουσία FS και εντεροκόκκων ήταν σημαντική τόσο σε ποσοστό θετικών δειγμάτων όσο και αριθμητικά. FS απομονώθηκαν από το 93% των δειγμάτων που εξετάστηκαν, εντερόκοκκοι από το 88% των δειγμάτων. Άφθονη ήταν, όπως αναμενόταν, η παρουσία μυκήτων στην άμμο. Τα είδη που ταυτοποιήθηκαν άνηκαν στα εξής γένη: *Absidia*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Emericella*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Trichosporon*, *Verticillium*. Πολλά από αυτά είναι ευκαιριακά παθογόνα για τον άνθρωπο.

Ο μύκητας *Candida albicans* είναι από τους πλέον σοβαρούς ευκαιριακά παθογόνους μύκητες και είναι ο συχνότερα εμφανιζόμενος μύκητας σε ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. Μεταδίδεται και με επαφή, ως εκ τούτου η παρουσία του στην άμμο ενέχει κίνδυνο για την υγεία των λουομένων. Από τη μελέτη δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση της παρουσίας του στην άμμο με αυξημένους αριθμούς βακτηρίων κοπρανώδους προέλευσης.

DETECTION OF YEASTS AND FAECAL BACTERIA IN THE SAND OF BATHING BEACHES**Vournazou V.¹, Efstratiou M.A.¹, Velegraki A.², and T. Zarkadas¹**¹*Department of Marine Sciences, University of the Aegean, and* ²*Mycology Laboratory, Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Greece*

Sand samples were collected from three bathing beaches on the eastern coast of the island of Lesbos, Greece, during the 2004 bathing season. The samples were examined for total coliforms (TC), faecal coliforms (FC), faecal streptococci (FS), enterococci (Ent) as well as yeasts and molds. Sand, coarse and medium sized, was macroscopically characterized a mixture of limestone, serpentine, mica and quartz. Faecal bacteria were isolated from all three beaches. Total and faecal coliforms as a rule were very low in numbers, and were only isolated from 15% of the samples. In 85% of the samples they were not detected at all. In contrast, faecal streptococci and enterococci were isolated in considerable numbers, faecal streptococci from 93% of the samples, enterococci from 88% of samples. The presence of yeasts and molds was abundant in the sand, as expected. The isolates belonged to the following genera: *Absidia*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Emericella*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Trichosporon*, *Verticillium*. Many of these are opportunistic pathogens. *Candida albicans* is one of the most important opportunistic yeasts, the most frequently isolated in nosocomial infections. It can be transmitted by contact hence its presence in the sand indicates possibility of bathers' infection. This project established no correlation between *C.albicans*'s presence in the sand and faecal pollution indicator bacteria.

ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ 5S ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΙΚΟΥ RNA

Γερμανάς Γ.Β., Ντίνος Γ. και Δ.Α. Καλπαζής

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Στα βακτήρια, η μεγάλη ριβοσωματική υπομονάδα αποτελείται από δύο είδη RNA, το 23S και το 5S rRNA, καθώς και 33 πρωτεΐνες. Ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού και η απελευθέρωση της πεπτιδικής αλυσίδας επιτελούνται στη μεγάλη υπομονάδα, όπου εδράζεται το καταλυτικό κέντρο της πεπτιδυλοτρανσφεράσης (PTase). Εκτός αυτού, η μεγάλη υπομονάδα περιλαμβάνει το κέντρο προσδέσεως των μεταφραστικών παραγόντων, το οποίο πυροδοτεί τη GTPase δραστηριότητα των G-πρωτεϊνικών παραγόντων, που εμπλέκονται στη μετατόπιση των υποστρωμάτων και άλλες ριβοσωματικές λειτουργίες. Έχει υποτεθεί ότι το 5S rRNA παίζει ουσιώδη ρόλο στη συγκρότηση του κέντρου της PTase και στη μετάδοση σημάτων μεταξύ του καταλυτικού κέντρου και των ριβοσωματικών συστατικών που διεκπεραιώνουν την μετατόπιση των υποστρωμάτων. Το ιοντικό περιβάλλον φαίνεται να επηρεάζει καθοριστικά τη διαμόρφωση του 5S rRNA. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι οι πολυαμίνες δεσμεύονται εκλεκτικά στο 5S rRNA και επηρεάζουν τη δραστηριότητά του έναντι του διμεθυλο-θειικού, ενός αντιδραστηρίου-ιχνηθέτη της τριτοταγούς δομής του RNA. Με σκοπό να ελέγξουμε αν η πρόσδεση των πολυαμινών επηρεάζει τη λειτουργία του 5S rRNA, 70S ριβοσώματα προγραμματισμένα με πολυ-ουριδυλικό σχηματίστηκαν από 50S υπομονάδες, ολικά ή εκλεκτικά φωτοσημασμένες με ένα φωτοδραστικό ανάλογο της σπερμίνης, και από 30S ακατέργαστες υπομονάδες. Αυτά τα ριβοσώματα είχαν την ικανότητα να δεσμεύουν AcPhe-tRNA εξ ίσου ισχυρά, όπως ριβοσώματα συγκροτημένα από φυσικά συστατικά, μη περιέχοντα πολυαμίνες. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η πρόσδεση πολυαμινών στο 5S rRNA δεν επηρεάζει τη λειτουργία του παράγοντα επιμήκυνσης-Tu. Συζευγμένα, όμως, τα εν λόγω ριβοσώματα με tRNA^{Phe} στην E-θέση και AcPhe-tRNA στην P-θέση, επέδειξαν ισχυρότερη καταλυτική δραστηριότητα και αυξημένη ικανότητα για μετατόπιση των υποστρωμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά εισηγούνται σημαντική εμπλοκή των πολυαμινών στο λειτουργικό ρόλο του 5S rRNA κατά την κατάλυση και μετατόπιση των υποστρωμάτων.

ROLE OF POLYAMINES IN THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL INTEGRITY OF 5S RIBOSOMAL RNA**Gerbanas G.V., Dinos G., and D.L. Kalpaxis***Laboratory of Biochemistry, School of Medicine, University of Patras*

In bacteria, the large ribosomal subunit comprises two RNA species, 23S and 5S rRNA, and 33 proteins. Peptide bond formation and peptide release are catalysed by the large subunit, where the peptidyltransferase (PTase) center is located. In addition to this center, the large subunit includes a factor-binding center, which triggers the GTPase activities of G-protein factors involved in translocation and other ribosomal functions. It has been hypothesized that 5S rRNA plays essential role in assembling the PTase center and mediating signal transmissions between this center and the translocation machinery. Furthermore, the ionic environment seems to affect the conformation of 5S rRNA. For instance, polyamines have been found to bind specifically to 5S rRNA and influence the 5S rRNA reactivity towards dimethyl sulphate (DMS), a chemical probe of RNA tertiary structure. To test whether the binding of polyamines influence the function of 5S rRNA, poly(U)-programmed 70S ribosomes were reconstituted from 50S subunits, totally or specifically photolabeled in their 5S rRNA with a photoreactive analogue of spermine, and native 30S subunits. These ribosomes were found to enzymatically bind AcPhe-tRNA in a similar fashion to ribosomes reconstituted from native components. This means, that furnishing 5S rRNA with spermine does not influence the elongation factor-Tu function. However, equipped with tRNA^{Phe} at the E-site and AcPhe-tRNA at the P-site, these ribosomes exhibited higher catalytic activity and enhanced tRNA-translocation efficiency. These results suggest an essential impact of polyamines on the functional role of 5S rRNA in catalysis and translocation of translation substrates.

**IN VITRO ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ NK ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ
ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ &
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ IN VIVO**

**Γεωργάκη Σ.¹, Σκοπελίτη Μ.¹, Τσιατάς Μ.², Βουτσάς Ι.¹, Διαπούλη Φ.¹,
Κατσίδα Θ.¹, Κατσούλας Χ.¹, Voelter W.³, Μπάμιας Α.², Τσιτσιλώνη Ο.¹**

¹Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
²Θεραπευτική Κλινική, Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα», Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
³Τμήμα Φυσιολογικής Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Tuebingen, Γερμανία

Ενεργοποιημένα Φυσικά Φονικά κύτταρα (NK cells) χρησιμοποιούνται ευρέως σε αντικαρκινικά ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα. Κυτταροκίνες και συνδυασμοί τους εγείρουν την κυτταροτοξική τους δράση *in vitro* και *in vivo*. Ενεργοποιήσαμε για σύντομο διάστημα ανθρώπινα NK-92 κύτταρα ή απομονωμένα NK κύτταρα από σπλήνα ποντικών με υπερκείμενο καλλιέργειας μονοπυρήνων που συλλέχθηκε ύστερα από τριήμερη επώαση ανθρώπινων μονοπυρήνων ή ποντικίσια σπληνοκυττάρων παρουσία ακινητοποιημένου anti-CD3 και ονομάστηκε αντίστοιχα hMN-CM και mSC-CM. Ελέγξαμε την αντικαρκινική δράση, αυτών των ενεργοποιημένων NK κυττάρων, σε τρία *in vivo* μοντέλα όγκου (α) σε ποντίκια Balb/C ενοφθαλμισμένα υποδορίως (s.c.) με συγγενικά καρκινικά κύτταρα της σειράς CT-26 (καρκίνος εντέρου) (β) σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια SCID ενοφθαλμισμένα s.c. με κύτταρα της ανθρώπινης σειράς FM3 (μελάνωμα) και (γ) σε SCID ποντίκια ενοφθαλμισμένα s.c. με κύτταρα της ανθρώπινης σειράς MCF-7 (καρκίνος μαστού). Τα ενεργοποιημένα ποντικίσια NK ή NK-92 κύτταρα χορηγήθηκαν 0, 4 και 11 μέρες μετά καρκινικά. Σε όλα τα μοντέλα, τα ποντίκια που δέχτηκαν τα ενεργοποιημένα NK κύτταρα παρουσίασαν καθυστερημένη ανάπτυξη όγκου και αυξημένη συνολική επιβίωση, συγκρινόμενα με τα ποντίκια μάρτυρες. Συνολικά, τα προκαταρκτικά αποτελέσματά μας δείχνουν ότι σύντομη *in vitro* ευαισθητοποίηση με υπερκείμενα, όπως το mSC-CM και hMN-CM, αντίστοιχα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επαρκή ενεργοποίηση NK κυττάρων ώστε, τα τελευταία, να φανούν χρήσιμα στην αντιμετώπιση διαφόρων τύπων καρκίνου *in vivo*.

Χρηματοδότηση: ΚΕΣΥ

**IN VITRO ACTIVATION OF NK CELLS BY MONONUCLEAR
CULTURE SUPERNATANTS & EVALUATION OF THEIR
ANTITUMOR ACTIVITY IN VIVO****Georgaki S.¹, Skopeliti M.¹, Tsiatas M.², Voutsas J.F.¹, Diapouli F.¹,
Katsila T.¹, Katsoulas H.¹, Voelter W.³, Bamias A.², Tsitsilonis O.E.¹**

¹Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, University of Athens,
²Department of Clinical Therapeutics, "Alexandra" Hospital, School of Medicine,
University of Athens, ³Department of Physiological Biochemistry, University of Tuebingen

Natural killer (NK) cells are extensively used, when appropriately activated, in cancer immunotherapeutic protocols. Cytokines or cytokine combinations have been reported to augment NK cell cytotoxic activity both *in vitro* and *in vivo*. NK cell activation was performed upon short-term exposure of human NK-92 or spleen-derived mouse NK cells to cytokine-rich, conditioned media. The latter were prepared by stimulating human peripheral blood mononuclear cells or murine spleen cells in flasks pre-coated with anti-CD3 monoclonal antibody for 3-days and were accordingly termed human mononuclear cell-conditioned medium (hMN-CM) and murine spleen cell-conditioned medium (mSC-CM), respectively. The antitumor activity of thus activated NK cells was tested in three distinct murine tumor models: (a) in Balb/C mice, subcutaneously (s.c.) inoculated with syngeneic CT-26 colon carcinoma cells; (b) in severe combined immunodeficient (SCID) mice, s.c. inoculated with human FM3 melanoma cells, and (c) in SCID mice s.c. inoculated with human MCF-7 breast cancer cells. Mice received activated murine NK or NK-92 cells on days 0, 4 and 11 after cancer cell administration, and tumor mass was recorded every other day. In all models, animals treated with activated NK cells exhibited delayed development of their solid tumors and prolonged overall survival, compared to control animals. Overall, our preliminary results show that short-term *in vitro* stimulation of murine and human NK cells with conditioned media, such as mSC-CM and hMN-CM, respectively, is an efficient approach for the induction of sufficient NK cell activation that may be proven useful in eliciting antitumor immune responses against various types of cancer *in vivo*.

Funded: KESY

ΤΟ ΜΟΤΙΒΟ «ΥΠΟΓΡΑΦΗ» ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ NAT/NCS2 ΣΤΗΝ ΠΕΡΜΕΑΣΗ ΥΓΦΟ ΤΗΣ *E. COLI*: Ι. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ ΚΥΣΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΑΡΩΣΗΣ

Γεωργοπούλου Α., Καρατζά Π., Πάνος Π. και Ε. Φριλίγγος

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Ιατρική Σχολή, Ιωάννινα 45110

Το μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας NAT/NCS2 (NAT signature motif) είναι μία εξαιρετικά συντηρημένη αλληλουχία 10 καταλοίπων των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων – ασκορβικού (NAT), που έχει εμπλακεί στον καθορισμό της εξειδίκευσης υποστρωμάτων και της λειτουργίας της διόδου μεταφοράς πουρινών βάσει πειραμάτων με τον μεταφορέα UapA του ασκομύκητα *A. nidulans*. Για να αναλύσουμε συστηματικότερα το μοτίβο αυτό, εφαρμόσαμε μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης του ομόλογου μεταφορέα YgfO της *E. coli*, ο οποίος είναι ειδικός και υψηλής συγγένειας συμμεταφορέας ξανθίνης:H⁺. Χρησιμοποιώντας μία πλήρως λειτουργική παραλλαγή του YgfO όπου οι 5 εγγενείς Cys είχαν αντικατασταθεί σε Ser (C-less), κατασκευάσαμε μία σειρά μεταλλαγμάτων μονής κυστεϊνής (single-Cys) στην αλληλουχία ³¹⁵GSIPITTFQNNGVIQMTGVASRYVG³⁴⁰ που περιέχει το μοτίβο NAT (κατάλοιπα 324-333). Από τα 26 μεταλλάγματα μονής Cys, 16 έχουν υψηλή ενεργότητα μεταφοράς ξανθίνης, T320C, T321C, I329C και T332C παρουσιάζουν χαμηλή ενεργότητα (10-25% αυτής του C-less), F322C, N325C και N326C είναι οριακώς ενεργά (5-8% του C-less), ενώ P318C, Q324C και G340C είναι πλήρως ανενεργά. Όταν μεταφερθούν στο φυσικού τύπου υπόστρωμα, F322C(wt) και N326C(wt) εμφανίζουν υψηλή ενεργότητα, ενώ P318G(wt), Q324C(wt), N325C(wt) και G340C(wt) παραμένουν ανενεργά. Επιπροσθέτως, τα Q324N(wt) και N325Q(wt) έχουν πολύ χαμηλή ενεργότητα (25% του wt), ενώ το N326Q(wt) εμφανίζει πολύ υψηλή ενεργότητα και το G340A(wt) συσσωρεύει ξανθίνη σε επίπεδα έως 50% αυτών του wt. Η χαμηλή έως αμελητέα ενεργότητα των μεταλλαγμάτων στις θέσεις Pro318 ή Gly340 συσχετίζεται με χαμηλά έως αμελητέα επίπεδα έκφρασης στη μεμβράνη, ενώ στις άλλες θέσεις δεν επηρεάζεται σημαντικά η έκφραση. Πειράματα αναστολής με *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (NEM) δείχνουν ότι η ενεργότητα στις θέσεις 315-322 δεν επηρεάζεται από το NEM (IC₅₀s ≥0.4 mM), ενώ η ενεργότητα στις θέσεις 323-329 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη (IC₅₀s 15-80 μM), και οι θέσεις 330-340 ακολουθούν μία περιοδικότητα εναλλασσόμενης ευαισθησίας στο NEM που υποδεικνύει διαμόρφωση α-έλικας. Από πειράματα αλκυλίωσης, οι θέσεις της περιοχής 330-340 φαίνεται ότι είναι προσβάσιμες και αντιδρούν με το NEM. Επομένως, η επιλεκτική ευαισθησία της μίας πλευράς α-έλικας σε απενεργοποίηση, όπως παρατηρήσαμε, φαίνεται να οφείλεται σε εμπλοκή του μηλεϊμιδικού προσδέματος, στις θέσεις αυτές, με παρεμπόδιση του μηχανισμού της μεταφοράς ξανθίνης.

Η έρευνα αυτή χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα «Ηράκλειτος» του Υπουργείου Εθνικής Παιδείας μέσω του 3^{ου} Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

**THE NAT/NCS2 SIGNATURE MOTIF IN THE YGFO PERMEASE
OF *E. COLI*: I. CYSTEINE-SCANNING MUTAGENESIS****Georgopoulou E., Karatza P., Panos P., and S. Frillingos***Lab. of Biological Chemistry, Medical School, University of Ioannina Ioannina 45110*

The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif is a conserved sequence motif of the ubiquitous NAT/NCS2 family, that has been implicated in defining the function and selectivity of purine translocation pathway in the fungal homologue UapA. To analyze the role of NAT motif more systematically, we have employed Cys-scanning mutagenesis of the *E. coli* purine-specific homologue YgfO. Using a functional mutant devoid of Cys residues (C-less), each amino acid residue in sequence ³¹⁵GSIPITTFAQNGVIQMTGVASRYVG³⁴⁰ including the NAT motif (key residues in underlined boldface) was replaced individually with Cys. Of the 26 single-Cys mutants, 16 accumulate xanthine to >50% of the steady state observed with C-less, T320C, T321C, I329C and T332C exhibit low levels of accumulation (10-25% of C-less), F322C, N325C and N326C accumulate marginally (5-8% of C-less), while P318C, Q324C and G340C are completely inactive. When transferred to wild-type, F322C(wt) and N326C(wt) are highly active, but P318G(wt), Q324C(wt), N325C(wt) and G340C(wt) are inactive. In addition, Q324N(wt) and N325Q(wt) accumulate to strikingly low levels (25% of wild-type), while N326Q(wt) displays very high activity and G340A(wt) accumulates to 50% of wild-type. Immunoblot analysis shows that low or negligible activity of mutants at Pro318 and Gly340 is due to low or negligible expression in the membrane. All other mutants are expressed to high or moderate levels. Inhibition analysis with *N*-ethylmaleimide (NEM) shows that the single-Cys mutants fall to three regions: single-Cys positions 315-322 are insensitive to NEM, with IC₅₀s ≥0.4 mM, positions 323-329 are highly sensitive, with IC₅₀s of 15-80 μM, and positions 330-340 follow a pattern indicative of an alpha-helical conformation, with mutants sensitive to alkylation clustering on one face of an alpha-helix. Sulfhydryl alkylation analysis of the single-Cys mutants using an engineered carboxyl-terminal His₁₀ tag and Ni²⁺-IDA affinity chromatography reveals that most of the single-Cys mutants of region 330-340 are accessible to NEM and selective inactivation at the inhibition-sensitive positions should be attributed to severe blocking effects of the maleimidyl adduct that is associated with the conformational changes of turnover.

This research was co-funded by the European Union in the framework of the program "Heraklitos" of the "Operational Program for Education and Initial Vocational Training" of the 3rd Community Support Framework of the Hellenic Ministry of Education, funded by 25% from national sources and by 75% from the European Social Fund (ESF).

**TRNA-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ
ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* -
ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ**

**Γιαννούλη Σ., Κυρίτσης Α., Διοκμετζίδου Α., Ζάττας Δ.
και Κ. Σταθόπουλος**

*Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Πλούτωνος 26, 412 21
Λάρισα*

Τα μόρια tRNA, εκτός από το να μεταφέρουν αμινοξέα κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης, συμμετέχουν και σε εναλλακτικές κυτταρικές διαδικασίες, όπως η βιοσύνθεση αμινοξέων και άλλων ενδιάμεσων μορίων του μεταβολισμού. Το κυτταρικό τοίχωμα του *S. aureus* αποτελείται κατά 50% από ένα πολυμερές N-ακετυλογλυκοζαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με πενταπεπίδια γλυκίνης. Η γλυκίνη ενσωματώνεται μέσω της δράσης των μη ριβοσωμικών πεπτιδυλτρανσφερασών FemX, FemA και FemB, και με δότη γλυκίνης τα Gly-tRNA^{Gly} μόρια. Έχουν ανιχνευτεί τουλάχιστον 4 ισοδεκτικά μόρια tRNA^{Gly} που εκτός από την πρωτεϊνοσύνθεση, εμπλέκονται και στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Τα tRNA αυτά αμινοακυλιώνονται από την ίδια αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της γλυκίνης (GlyRS), αλλά ακολουθούν διαφορετικές πορείες ανάλογα με τις κυτταρικές ανάγκες. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη παραγόντων που εμπλέκονται στην tRNA-εξαρτώμενη μεταφορά και ενσωμάτωση γλυκίνης στο κυτταρικό τοίχωμα και την αποσαφήνιση των σταδίων του μηχανισμού αυτού. Η κλωνοποίηση της GlyRS, του FemX και των μορίων tRNA^{Gly} του *S. aureus* αποσκοπεί στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων τόσο μεταξύ τους όσο και με πιθανούς παράγοντες που μεσολαβούν στη μεταφορά γλυκίνης στο κυτταρικό τοίχωμα. Δεδομένης της μολυσματικότητας του *S. aureus* καθώς και του γεγονότος ότι η ανθεκτικότητά του σε αντιβιοτικά εξαρτάται άμεσα από την ακεραιότητα των γεφυρών γλυκίνης, η ανίχνευση των παραγόντων που εμπλέκονται στην μεταφορά και ενσωμάτωση της γλυκίνης, θα αποκαλύψει σημαντικούς μοριακούς στόχους νέων αντιβιοτικών φαρμάκων.

**TRNA-DEPENDENT SYNTHESIS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
CELL WALL – PRELIMINARY STUDIES****Giannouli S., Kiritsis A., Diokmetzidou A., Zattas D.,
and C. Stathopoulos***Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly,
26 Ploutonos str., 412 21 Larissa*

tRNA molecules, besides transferring amino acids during the protein synthesis, participate also in alternative cell processes, such as the biosynthesis of various amino acids and other metabolites. The *S. aureus* cell wall consists up to 50% of N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid. These two macromolecules are cross-linked via characteristic pentaglycine bridges. Glycine is incorporated by the non-ribosomal peptidyltransferases FemX, FemA και FemB, and Gly-tRNA^{Gly} molecules serve as glycine donors. At least four isoacceptor tRNA^{Gly} molecules have been identified and, besides protein synthesis, they participate also in cell wall synthesis. All tRNA^{Gly} molecules are aminoacylated by a single glycyl-tRNA synthetase (GlyRS), but they follow different pathways depending on cell necessities. Aim of the present project is to study mediator factors involved in the tRNA-dependent transfer and incorporation of glycine residues in the cell wall and the clarification of this mechanism. Cloning of the GlyRS, FemX and tRNA^{Gly} encoding genes from *S. aureus* will provide the substrates in order to elucidate possible interactions between these molecules and other potential factors involved in the glycine transfer to the cell wall. Given the pathogenicity of *S. aureus* and its resistance to several antibiotics, which relies on the pentaglycine bridges integrity, the identification of factors participating in glycine transfer and incorporation will reveal significant molecular targets for new antibiotics.

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ RAPDs ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΗΣ ΑΓΡΙΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ (*Salmo trutta* L.)

Γκέλια Δ. και Α.Π. Αποστολίδης

Εργαστήριο Ιχθυοκομίας & Αλιείας, Τομέας Ζωικής Παραγωγής, Γεωπονική Σχολή, ΑΠΘ

Πολυάριθμες έρευνες της γενετικής ποικιλότητας της άγριας πέστροφας (*Salmo trutta* L.) αποκάλυψαν την ύπαρξη εκτεταμένης γενετικής διαφοροποίησης ανάμεσα στους πληθυσμούς του είδους, καθώς και τη 'μοναδικότητα' αρκετών από τους πληθυσμούς αυτούς. Οι έρευνες αυτές πραγματοποιήθηκαν κυρίως με τη βοήθεια της ισοενζυμικής ανάλυσης, των μικροδορυφορικών δεικτών και της ανάλυσης του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA). Ιδιαίτερα, η ανάλυση του mtDNA σε δείγματα από όλη την έκταση κατανομής του είδους αποκάλυψε την ύπαρξη πέντε κύριων φυλογενετικών ομάδων ενώ αξιοσημείωτο είναι ότι οι τέσσερις από αυτές τις ομάδες απαντώνται και στον Ελλαδικό χώρο. Στην εργασία αυτή εφαρμόστηκε η ανάλυση του τυχαίως ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (μέθοδος RAPD), σε δείγματα πέστροφας που προέρχονταν και από τις πέντε φυλογενετικές ομάδες, με στόχο τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου αυτής στην αποκάλυψη της διαπληθυσμιακής και ενδο-πληθυσμιακής γενετικής ποικιλότητας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 24 τυχαίοι εκκινητές οι οποίοι αξιολογήθηκαν με βάση την ένταση, την επαναληψιμότητα και την ανάλυση των ζωνών (δεικτών) τους που πολλαπλασιάστηκαν με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Τα πρώτα αποτελέσματα προτείνουν την ικανότητα των RAPDs στη διάκριση των πέντε φυλογενετικών ομάδων, καθότι βρέθηκαν διαγνωστικοί για την κάθε ομάδα δείκτες. Επιπλέον, διαγνωστικοί δείκτες βρέθηκαν και ανάμεσα σε διαφορετικούς πληθυσμούς της ίδιας φυλογενετικής ομάδας.

**APPLICATION OF RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA
(RAPD) MARKERS IN THE ANALYSIS OF BROWN TROUT
(*Salmo trutta* L.) POPULATIONS**

Gkelia D., and A.P. Apostolidis

*Laboratory of Ichthyology and Fisheries, Department of Animal Production, Faculty of
Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki*

Genetic variation in brown trout (*Salmo trutta* L.) populations from throughout Europe has been extensively studied. Collectively, these studies were based mainly on isozyme, microsatellite and mitochondrial DNA (mtDNA) analyses and revealed that brown trout is one of the most substructure fish species. Particularly, mtDNA analyses revealed the presence of five major evolutionary lineages that were identified throughout the distribution range of the species, whereas it is noticeable that four of them were found in Greece. In the present study the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique was applied to samples of brown trout that came from all five major lineages. The aim of the study was the evaluation of the efficiency of the RAPDS in detecting genetic variation among and within brown trout populations. For this purpose, 24 randomly chosen primers were used. Primers were evaluated on the basis of intensity or resolution of bands, repeatability of markers and consistency within individuals. The first results showed that RAPDs are able to discriminate the five major lineages, as there were found diagnostic banding patterns for each lineage. Moreover, diagnostic banding patterns were also observed and among different populations of the same lineage.

ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ *Beauveria bassiana* ΚΑΙ *Beauveria brongniartii*: ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Γκίκας Δ.Β., Κουβέλης Β.Ν. και Μ.Α. Τύπας

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Η ανάγνωση της πρωτοταγούς αλληλουχίας περιοριστικών τμημάτων από απομονωμένο mtDNA σε κλίση γλωριούχου καισίου και προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) επέτρεψε τη κυκλική χαρτογράφηση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος της *Beauveria bassiana* (32,2 Kb) και της *Beauveria brongniartii* (33,9 Kb). Η διαφορά στο μέγεθος οφείλεται στην ποικιλομορφία των διαγονιδιακών τους περιοχών και στο διαφορετικό αριθμό εσωνίων που εδράζονται σε αρκετά γονίδια (*rnl*, *cob*, *cox1*, *nad1* και *cox2*). Συνολικά, προσδιορίστηκαν δεκατέσσερα γονίδια που εμπλέκονται στην αναπνευστική αλυσίδα και την παραγωγή ATP, δύο rRNA και είκοσι πέντε tRNA γονίδια.. Συγκριτική μελέτη της γονιδιακής σειράς όλων των γνωστών μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων στην τάξη Hygrocreales, έδειξε ταυτόσημη διάταξη. Εκτεταμένες περιοχές συντηκότητας αποκαλύφθηκαν όταν η ανάλυση επεκτάθηκε στα Pezizomycotina, προσφέροντας πολύτιμες πληροφορίες για την ανασύσταση της προγονικής μορφής. Η μελέτη των φυλογενετικών τους σχέσεων με άλλους Ασκομύκητες, χρησιμοποιώντας τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ως μία μονάδα, αποκάλυψε με ισχυρή υποστήριξη την εξελικτική πορεία των Sordariomycetes και ανέδειξε το πλεονέκτημα της μελέτης μικρών γονιδιωμάτων έναντι μεμονωμένων γονιδίων. *In silico* ανάλυση, υπέδειξε πιθανές περιοχές με ρόλο υποκινητών στη μεταγραφή, καθώς και τα ενδεχόμενα παράγωγα πολυσιστρονικά μετάγραφα.. Υβριδισμοί κατά Northern και αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR) επιβεβαίωσαν το λειτουργικό χάρτη, ενώ πειράματα επέκτασης εναρκτήριου ολιγονουκλεοτιδίου (primer extension) έδωσαν σαφείς ενδείξεις για το καθορισμό του 5' άκρου των μετάγραφων για τα γονίδια *cob* και *cox1*.

Μέρος της έρευνας χρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα QLK1-CT-2001-01391 (RAFBCA).

THE COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOMES OF *Beauveria bassiana* AND *Beauveria brongniartii*: GENE ORDER CONSERVATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS**Ghikas D.V., Kouvelis V.N. and M.A. Typas***Department of Genetics & Biotechnology, Faculty of Biology, NKUA*

Sequence analysis of restriction fragments from CsCl pure mtDNA and PCR-obtained amplicons allowed the isolation of the complete mt genomes of *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Both mt genomes map circularly and have very similar sizes (32.2 Kb and 33.9 Kb respectively). The differences observed are attributed to the variation of intergenic regions and the different number of introns present in several genes (*rnl*, *cob*, *cox1*, *nad1* and *cox2*). The mt genomes contained 14 protein coding-genes related to oxidative phosphorylation and ATP production, two rRNA and a set of 25 tRNA genes. Genome comparisons within the order of Hypocreales showed identical gene order and revealed long units of synteny when all complete mt genomes of Pezizomycotina were included, offering valuable information about a possible common ancestor. A phylogenetic study where all mitochondrial essential protein-coding genes were regarded as one unit strongly supported the common evolutionary course of Sordariomycetes and highlighted the advantages of analyzing small genomes (mtDNA) over single genes. *In silico* analysis revealed putative promoter regions and possible polycistronic transcripts. Reverse Transcriptase - PCR (RT-PCR) and Northern hybridizations confirmed the functional map, while the 5' end of the transcripts for genes *cox1* and *cob* were determined with primer extension experiments.

Part of this project was funded by EU Research Program QLK1-CT-2001-01391 (RAFBCA).

**ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΘΑΛΑΣΣΙΑΣ ΑΝΕΜΩΝΗΣ *Anemonia viridis*
(FORSKAL, 1775) ΣΤΗ ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ (Β. ΑΙΓΑΙΟ)**

Γλαρόπουλος Α., Μαργαρίτης Μ., Αντωνιάδου Χ., Χιντήρογλου Χ.

Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Gr-54124,
Θεσσαλονίκη, e-mail: aglaropo@bio.auth.gr

Η θαλάσσια ανεμώνη *Anemonia viridis* θεωρείται από τα πιο κοινά είδη του σκληρού υποστρώματος της υποπαριακικής ζώνης στη Μεσόγειο και ενδεχομένως έναν καλό βιοτικό δείκτη της ποιότητας των παράκτιων υδάτων. Ωστόσο, η ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας έδειξε πως οι πληροφορίες για την κατανομή των πληθυσμών της στην ευρύτερη περιοχή του Β. Αιγαίου είναι πολύ περιορισμένες. Η εργασία αυτή έχει ως στόχο τη διερεύνηση της κατανομής της αφθονίας των πληθυσμών του είδους αυτού στις ακτές της Χαλκιδικής. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες σε 24 τυχαίους σταθμούς στην χερσόνησο της Χαλκιδικής, εκτός του Αγ. Όρους, με κατάδυση το χρονικό διάστημα 07/05 – 12/05. Σε κάθε σταθμό εκτιμήθηκε η πληθυσμιακή πυκνότητα του *Anemonia viridis* βάσει κλίμακας σχετικής αφθονίας (1 = 1-50 άτομα, 2 = 50-100 άτομα, 3 = περισσότερα από 100 άτομα). Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι οι πληθυσμοί του *Anemonia viridis* εμφανίζουν σημαντική διαφοροποίηση στην κατανομή της αφθονίας τους στη Χαλκιδική. Οι διαφοροποιήσεις αυτές φαίνεται να σχετίζονται με τη φυσιογνωμία του υποστρώματος (π.χ. έκταση και συγκρότηση βραχώδους υποστρώματος) και την έκθεση των σταθμών στην κυματική δράση. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα άλλων διερευνήσεων στη Δυτική Μεσόγειο.

**DISTRIBUTION OF THE SEA ANEMONE *Anemonia viridis*
(FORSKAL 1775) IN CHALKIDIKI (N. AEGEAN)****Glaropoulos A., Margaritis M., Antoniadou Chr., Chintiroglou Ch.**

*Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, Gr-4124,
Thessaloniki e-mail: aglaropo@bio.auth.gr*

The sea anemone *Anemonia viridis* is among the most common species in sublittoral hard substratum throughout the Mediterranean and possibly a good biotic indicator. Nevertheless, the review of the contemporary bibliography has shown that the information on the distribution of this species' populations in the North Aegean Sea is limited. Therefore, this study aims to provide information on the distribution of *A. viridis* populations in Chalkidiki peninsula. Sampling was carried out at 24 randomly selected stations along the coastline of Chalkidiki, except of Mount Athos, by diving, from July 2005 to December 2005. The population density of *Anemonia viridis* was estimated according to an index of relative abundance (1 = 1-50 individuals, 2 = 50-100 individuals, 3 = over 100 individuals). Data analyses showed that the abundance of *Anemonia viridis* populations was differently distributed along the coastline of Chalkidiki peninsula. These differences were related to the physiognomic aspect of the substratum (spreading out and type of rocky bottom) and the degree of exposure. These results are in accordance with several reports from the Western Mediterranean.

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΔΙΕΠΟΥΝ ΤΗΝ 6-ΦΩΣΦΟ-
ΓΛΥΚΟΝΙΚΗ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ (6PGD) ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ
ΠΡΩΤΟΤΑΓΗ ΚΑΙ ΤΡΙΤΟΤΑΓΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ**

**Γουλιέλμος Γ.¹, Κοσμίδης Ν.², Λουκάς Μ.², Ζούρος Ε.³
και Η. Ηλιόπουλος²**

¹Εργαστήριο Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Βούτες, 715 00 Ηράκλειο

²Εργαστήριο Γενετικής, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο
Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 118 55 Αθήνα

³Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Βούτες, 714 09 Ηράκλειο

Ο κύκλος των φωσφορικών πεντοζών θεωρείται ως μία κύρια πηγή NADPH και πεντόζης που απαιτούνται για την βιοσύνθεση πυρηνικών οξέων. Η 6-φωσφογλυκονική αφυδρογονάση (6PGD), ένα ένζυμο που συμμετέχει στον βιοσυνθετικό κύκλο, καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση της 6PGD σε 5-φωσφορική ριβουλόζη με την σύγχρονη απελευθέρωση CO₂ και την αναγωγή του NADP. Οι γονιδιωματικές αλληλουχίες της 6PGD για δυο είδη εντόμων, *B. oleae* (Δάκος της ελιάς) και *C. capitata* (Μυίγα της Μεσογείου) προσδιορίστηκαν πειραματικά και στη συνέχεια κατασκευάστηκαν τρισ-διάστατα πρότυπα, βασισμένα στην ομόλογη γνωστή δομή του της 6PGD του προβάτου. Σε μια συγκριτική μελέτη αμινοξικών ακολουθιών από 37 είδη, όλες οι συντηρημένες και οι μεταβλητές περιοχές του ενζύμου αναλύθηκαν, και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι περιοχές υψηλής λειτουργικής σπουδαιότητας, οι οποίες σχετίζονται και με το ρόλο που παίζει το ένζυμο σε ανθρώπινες ασθένειες. Πολλά αμινοξέα που σχετίζονται με την εξειδίκευση του συνενζύμου βρέθηκαν να εμφανίζουν υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ των ειδών που μελετήθηκαν. Η μεγαλύτερη ποικιλομορφία παρουσιάζεται σε δύο απομακρυσμένες από την περιοχή του ενεργού κέντρου δομικές ενότητες. Οι περιοχές αυτές, υψηλής μεταλλακτικότητας, προβλέπονται αντιγονικές. Τα ένζυμα των δύο εντόμων που μελετήθηκαν έχουν υψηλή ομολογία και περαιτέρω εξέταση των μεταβλητών περιοχών, σε συνδυασμό με το υψηλής συντήρησης ενεργό κέντρο, αποκάλυψε επιφανειακές περιοχές που σχετίζονται με τον διμερισμό του ενζύμου, την λειτουργική εξειδίκευση και την αντιγονικότητα. Ο εντοπισμός των διαφορών στο τρισδιάστατο μοντέλο ανέδειξε πιθανές περιοχές που σχετίζονται με τον αλλοενζυμικό πολυμορφισμό του ενζύμου (F,I,S) των δύο ειδών.

**FUNCTIONAL CONSTRAINTS OF 6-PHOSPHOGLUCONATE
DEHYDROGENASE (6-PGD) BASED ON SEQUENCE AND
STRUCTURAL INFORMATION****Goulielmos G.N.¹, Kosmidis N.², Loukas M.², Zouros E.³
and E. Eliopoulos²**¹*Department of Internal Medicine, School of Health Sciences, University of Crete, Voutes,
715 00 Heraklion.*²*Department of Genetics, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Votanikos,
11855 Athens.*³*Department of Biology, University of Crete, Vasilika Vouton, 714 09 Heraklion*

The pentose phosphate cycle is considered as a major source of NADPH and pentose needed for nucleic acid biosynthesis. 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), an enzyme participating in this cycle, catalyzes the oxidative decarboxylation of 6PGD to ribulose 5-phosphate with the subsequent release of CO₂ and the reduction of NADP. We have determined the genomic sequences of 6PGD of two species of Tephritidae, the medfly *Ceratitis capitata* and olive fruit fly *Bactrocera oleae*, and constructed three-dimensional models of 6PGD of both *Bactrocera oleae* and *C. capitata* based on the homologous known sheep structure. In a comparative study of 6PGD sequences from 37 species, all the conserved and variable sites of the enzyme were analyzed and the regions of functional importance were localized, an attempt promoted also by the direct involvement of the enzyme in various human diseases. The comparison revealed that all regions important for the catalytic activity, such as those forming the substrate and coenzyme binding sites, are highly conserved in all species examined. Moreover, several amino acid residues responsible for substrate and coenzyme specificity were also found to be identical in all species examined. The higher percentage of protein divergence is observed at two regions that accumulate mutations, located at the distant parts of the two domains of the enzyme with respect to their interface. These peripheral regions of non-functional importance are highly variable and are predicted as antigenic, thus reflecting possible regions for antibody recognition. The enzymes between the two species of Tephritidae have a very high homology and further examination of the variable positions with respect to the highly conserved binding site residues enabled their grouping in three distinct categories, with possible association to dimer formation, functional specificity, and antigenicity. Moreover, placement of sequence differences on the 3-D model suggests probable sites accommodating variations appearing at the allozymic variants (fast, intermediate, and slow) of both species.

**ΕΠΟΧΙΑΚΕΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΕΙΣ ΣΤΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ
ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΟ ΘΕΡΜΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ
*Mytilus galloprovincialis***

Γουργού Ε., Γαϊτανάκη Αικ., Μπέης Ι.

*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών*

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έχει δειχθεί η ενεργοποίηση των MAPKs στο *M. galloprovincialis* υπό διάφορες συνθήκες στρες, μεταξύ των οποίων και το θερμικό. Στην παρούσα εργασία διερευνάται η πιθανή διακύμανση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της p38-MAPK στα βράγχια σε σχέση με τις εποχιακές μεταβολές της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος, καθώς έχει αναφερθεί ετήσια διακύμανση της θερμοκρασίας του θαλασσινού νερού έως και 10°C. Επίδραση υπερθερμίας (30°C) και υποθερμίας (4°C), σε διαφορετικές εποχές (φθινόπωρο και άνοιξη), έδειξε ότι τα φθινοπωρινά ζώα εμφανίζουν 5,5 φορές (σε σχέση με το μάρτυρα) αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλίωσης της p38-MAPK κατά την υπερθερμία και 14 φορές κατά την υποθερμία, ενώ τα ανοιξιάτικα εμφανίζουν 6,3 φορές αύξηση κατά την υπερθερμία και 2,5 φορές κατά την υποθερμία. Ταυτόχρονα, υπάρχει συνεργιστική δράση χαλκού και θερμοκρασίας, εντονότερη στην υπερθερμία (7,5 φορές σε σχέση με το μάρτυρα), σε σχέση με την υποθερμία (2,6 φορές). Η συσχέτιση των μονοπατιών της p38-MAPK και της HSP70 έχει ήδη δειχθεί, με τη χρήση του ειδικού αναστολέα της p38-MAPK, SB203580. Στην παρούσα μελέτη, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της HSP70 σε σχέση με το μάρτυρα, τόσο το φθινόπωρο, όσο και την άνοιξη. Και στις δύο εποχές, η χαμηλή θερμοκρασία φαίνεται να προκαλεί μεγαλύτερη αύξηση της HSP70 σε σχέση με την υπερθερμία. Η συνδυασμένη επίδραση θερμικού στρες και χαλκού έχει συνεργιστικό αποτέλεσμα στην επαγωγή της HSP70 την άνοιξη, με εντονότερες τις συνέπειες κατά την υποθερμία (19 φορές, έναντι 4,8 για την υπερθερμία). Επομένως, φαίνεται ότι η απόκριση στο θερμικό στρες μέσω p38-MAPK και HSP70 υπόκειται σε εποχιακές μεταβολές, σύμφωνα με το πρόσφατο θερμικό παρελθόν του οργανισμού.

*Το έργο συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και Εθνικούς Πόρους
(ΕΠΕΑΕΚ II) ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II.*

**SEASONAL THERMAL STRESS AFFECTING SIGNAL
TRANSDUCTION PATHWAYS IN *Mytilus galloprovincialis*****Gourgou E., Gaitanaki C., Beis I.***Department of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, National & Kapodistrian
University of Athens, Panepistimiopolis 157 84 Athens*

In previous studies of our laboratory it has been shown that thermal stress affects MAPK activation in *Mytilus galloprovincialis*. In this study, we are investigating the possible variation of the phosphorylation levels of p38-MAPK in gills, referring to the seasonal fluctuation of the environmental temperature, since a variation of about 10°C in the temperature of sea water during the year has been reported. Hyperthermia (30°C) and hypothermia (4°C), during two different seasons (autumn and spring), showed that in the autumn animals a stronger activation of p38-MAPK is observed during hypothermia (14 fold relative to control) than during hyperthermia (5.5 fold), while in the spring animals stronger p38-MAPK activation is observed during hyperthermia (6.3 fold) than in hypothermia (2.5 fold). At the same time, there is a synergistic effect of copper and thermal stress, greater being the effect of hyperthermia together with copper (7.5 fold) than hypothermia and copper (2.6 fold). The connection between the pathways of p38-MAPK and HSP70 has been shown, by the use of the specific p38-MAPK inhibitor SB203580. Under these circumstances, an increase in HSP70 levels is observed, relative to control, in autumn as well as in spring. During both seasons, lower temperature seems to cause greater induction of HSP70 compared to hyperthermia. Combination of thermal stress and copper seems to have a synergistic effect on the HSP70 induction during spring, being stronger at hypothermia (19 fold compared to 4.8 fold at hyperthermia). Therefore, it seems that an increase in the phosphorylation levels of p38-MAPK is escorted by increase in the HSP70 levels and this response is subdued to seasonal variations, in accordance to the recent thermal past of the organism.

The project is co-funded by the European Social Fund and National Resources (EPEAEK II) PYTHAGORAS II.

**ΑΝΑΖΗΤΩΝΤΑΣ ΤΟ ΡΟΛΟ ΕΝΟΣ ΟΜΟΛΟΓΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ
ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΣΤΗ *DROSOPHILA***

**Γουρνάς Χ., Βλαντή Α., Πιτσούλη Χ., Αμίλλης Σ., Δελιδάκης Χ.
και Γ. Διαλλινάς**

*Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη 15781,
Αθήνα*

Η οικογένεια μεταφορέων νουκλεοβάσεων-ασκορβικού, (NAT/NCS2) περιλαμβάνει μέλη υπεύθυνα για την πρόσληψη ουρακίλης, ξανθίνης ή ουρικού οξέος (μικρόβια και φυτά), ή βιταμίνης C (θηλαστικά). Η *D. melanogaster* διαθέτει ένα μοναδικό γονίδιο (CG6293) που κωδικοποιεί για μια υποθετική NAT πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται κυρίως στα αυγά και τα ώριμα θηλυκά άτομα. Το στέλεχος CG6293^{EP3731}, το οποίο φέρει ένθεση μεταθετού στοιχείου, εμφανίζει θνησιμότητα στο στάδιο της πούπας σε ομόζυγη κατάσταση, ενώ σε ετερόζυγη, μειωμένη γονιμότητα και αυξημένη ανθεκτικότητα στην αλλοπουρινόλη. Μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένων πουρινών / ασκορβικού σε κύτταρα S2 έδειξαν ότι η *D. melanogaster* διαθέτει έναν μεταφορέα ουρικού-ξανθίνης-αλλοπουρινόλης, που πιθανώς αντιστοιχεί στο CG6293. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *A. nidulans* ως πρότυπο σύστημα για την έκφραση του CG6293-cDNA. Στελέχη μετασηματισμένα με CG6293 ή CG6293-*sgfp* δεν εμφάνισαν ικανότητα μεταφοράς πουρινών ή ασκορβικού. Σε μικροσκόπιο φθορισμού παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη CG6293-GFP παραμένει εγκλωβισμένη στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο και σε άλλα τμήματα του εκκριτικού μονοπατιού. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν κατασκευές χμιαϊκών πρωτεϊνών από τμήματα των CG6293 και UapA (NAT μεταφορέας ουρικού-ξανθίνης του *Aspergillus*), οι οποίες εμφάνιζαν επίσης ελαττωματική τοπογένεση. Εν συνεχεία, χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι κλασσικής και αντίστροφης (high-copy) γενετικής καταστολής της ελαττωματικής τοπογένεσης της CG6293, προκειμένου να απομονωθούν μεταλλαγές που θα επέτρεπαν την έκφραση της στη μεμβράνη του *Aspergillus*. Στόχο αποτελεί μια πιο λεπτομερής ανάλυση της επίδρασης του CG6293 knock-out αλληλίου. Τέλος, θα επιχειρηθεί απενεργοποίηση μέσω RNAi και βιοχημική ανάλυση του CG6293 σε κύτταρα S2.

**A *DROSOPHILA* NUCLEOBASE-ASCORBATE TRANSPORTER
HOMOLOGUE: IN SEARCH OF A ROLE****Gournas C., Vlanti A., Pitsouli C., Amillis S., Delidakis C.,
and G. Diallinas***Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimioupolis 15781,
Athens*

The Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT/NCS2) family includes carriers for the cellular uptake of uracil, xanthine or uric acid (microbes and plants) or vitamin C (mammals). *D. melanogaster* has a single gene (CG6293) encoding a putative NAT protein. The protein is mostly abundant in eggs and female adults. Initial analysis of CG6293^{EP3731}, a transposon-generated knock-out mutation, shows pupal lethality when homozygous, and reduced fertility and allopurinol resistance when heterozygous. Preliminary evidence from uptake measurements in S2 cell cultures also showed that *D. melanogaster* has a uric acid-xanthine-allopurinol transporter that might correspond to CG6293. In parallel, we used *A. nidulans* as a system to express a full-length CG6293-cDNA. Single-copy and multiple-copy, stable, transformants expressing, from an appropriate promoter, the CG6293 *orf*, either by itself or fused with *gfp*, were selected and analysed. None of these transformants displayed purine or ascorbate transport activity. Epifluorescence microscopy showed that the CG6293-GFP chimeric protein was retained in the ER and other secretory compartments. Several chimeras constructed using CG6293 and parts of UapA, an *Aspergillus* NAT uric acid-xanthine transporter, were also defective in their topogenesis. Classical and reverse (high-copy) genetic suppression of the defective topogenesis of CG6293 was employed to isolate mutations that will permit expression of the *Drosophila* transporter in the plasma membrane of *Aspergillus*. On going results from this analysis will be discussed. Future plans include a detailed study of a CG6293 knock-out allele in relation to purine metabolism, life span, oxidative stress, possible genetic interactions with *ry*, and expression profile by RT-PCR analysis. We will also look for characterisation of precise and imprecise excision of the CG6293^{EP3731} element. A kinetic analysis will be performed *ex vivo* in S2 cells and S2 in which the CG6293 will be knocked-out by RNAi or transfection.

ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΕΡΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Ε-ΚΑΔΕΡΙΝΗΣ (CDH1) ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΤΗ ΧΡΩΜΟ-ΣΩΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΣΤΟΝ ΣΠΟΡΑΔΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Γρίβας Δ., Γκιγκέλου Φ., Σαέττα Α., Μιχαλόπουλος Ν., Σταματέλλη Α., Πατσούρης Ε.

Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 11527, Ελλάδα.

Η διερεύνηση του ρόλου της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της Ε-καδερίνης (CDH1) στα δυο μονοπάτια καρκινογένεσης του παχέος εντέρου, της μικροδορυφορικής (MSI) και της χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN). Για το σκοπό αυτό έγινε μελέτη των επιγενετικών αλλαγών του υποκινητή του γονιδίου της Ε-καδερίνης καθώς και της έκφρασης του και συσχέτιση με τις μεταλλάξεις του γονιδίου B-raf, την μικροδορυφορική αστάθεια (MSI), τις επιγενετικές αλλαγές του γονιδίου hMLH1, καθώς και μεταλλάξεις στα γονίδια APC, K-ras και p53 που εμπλέκονται στα δυο παραπάνω μονοπάτια, αντίστοιχα. Επίσης έγινε συσχέτιση των αποτελεσμάτων με τα κλινικο-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Μελετήθηκαν 50 δείγματα Ελλήνων ασθενών με σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου. Για την ανίχνευση της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή των γονιδίων Ε-καδερίνης και hMLH1 εφαρμόστηκε η μέθοδος MS-PCR και για την ανίχνευση των μεταλλάξεων των γονιδίων APC, B-raf, p53 και K-ras, οι μέθοδοι PCR-SSCP και ανάλυση της πρωτοδιάταξης του DNA. Η έκφραση της Ε-καδερίνης προσδιορίστηκε ανοσοϊστοχημικά. Για την εύρεση της μικροδορυφορικής αστάθειας χρησιμοποιήθηκε ο μονονουκλεοτιδικός δείκτης BAT26. Υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου της Ε-καδερίνης διαπιστώθηκε σε ποσοστό 22% των δειγμάτων, σε 2 από τα 12 με MSI και 8 από τα 33 MSS δείγματα. Στις περιπτώσεις αυτές δεν παρατηρήθηκε έκφραση της Ε-καδερίνης. Στα δείγματα με επιγενετικές αλλαγές της Ε-καδερίνης παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο B-raf (exon 15) σε 2 περιπτώσεις από τις 11, υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου hMLH1 σε μια, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις του γονιδίου APC σε αντίθεση με το γονίδιο K-ras που ήταν μεταλλαγμένο μόνο σε μια περίπτωση. Δεν ανιχνεύθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ υπερμεθυλίωσης του γονιδίου της Ε-καδερίνης και των κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των όγκων. Η υπερμεθυλίωση του γονιδίου της Ε-καδερίνης εμπλέκεται στη διαδικασία της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου αλλά αποτελεί ένα γεγονός που εμφανίζεται με μέση συχνότητα και στα δυο μονοπάτια τόσο της MSI όσο και της CIN. Ο σχετικά περιορισμένος αριθμός δειγμάτων με MSI που μελετήθηκαν δεν διασφαλίζει την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών συμπερασμάτων.

Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από τον Ε.Α.Κ.Ε. του Ε.Κ.Π.Α. στην Σ.Α.

HYPERMETHYLATION OF THE PROMOTER OF E-CADHERIN GENE (CDH1) IN ASSOCIATION WITH MICROSATELLITE AND CHROMOSOMAL INSTABILITY IN SPORADIC COLORECTAL CANCER**Grivas D., Gigelou F., Saetta A., Michalopoulos N., Stamatelli A., Patsouris E.***Dept of Pathology, Medical School, N. & K. University of Athens, Athens 11527, Greece*

To investigate the role of promoter hypermethylation of E-cadherin gene (CDH1) in two pathways of sporadic colorectal carcinogenesis, the microsatellite (MSI) and the chromosomal instability (CIN) one. We examined the epigenetic changes in the promoter of E-cadherin gene as well as its expression, in association with mutations in B-raf gene, microsatellite instability (MSI), epigenetic changes in the promoter of hMLH1 gene, as well as mutations in APC, K-ras and p53 genes which are involved in the two pathways respectively. The results were correlated with clinicopathological features of the patients. 50 specimens from Greek patients with sporadic colorectal cancer were studied. We applied Methylation Specific-PCR for the detection of promoter hypermethylation of E-cadherin and hMLH1 genes and PCR-SSCP and sequencing analysis for the detection of mutations of APC, B-raf, p53 and K-ras genes. The expression of E-cadherin was determined immunohistochemically and the MSI status was defined using the mononucleotide marker BAT26. In 2 out of 12 cases with MSI and 8 out of 33 MSS samples promoter hypermethylation of E-cadherin gene was detected (22% of the specimens). In these cases E-cadherin expression was absent. In the samples with epigenetic changes of E-cadherin promoter we observed mutations of B-raf gene (exon 15) in 2/11 cases, hypermethylation of the promoter of hMLH1 gene in one sample, while mutations of APC gene were not detected in contrast to K-ras gene which was mutant in only one case. No statistical correlation was found between E-cadherin hypermethylation and the clinicopathological features of the tumors. Aberrant methylation of E-cadherin promoter is involved in sporadic colorectal carcinogenesis as it observed at an intermediate frequency in both MSI and CIN pathways. Due to the relatively limited numbers of cases with MSI examined strict statistical conclusions cannot be drawn.

The study was supported by the Special Account of Research Grants of the N.K.U.A. to S.A.

ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ X ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΕΧΕΙΣ ΑΥΤΟΜΑΤΕΣ ΑΠΟΒΟΛΕΣ

Δασούλα Α.¹, Καλανταρίδου Σ.², Σωτηριάδης Α.², Παύλου Μ.², Σύρρου Μ.¹

¹Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

²Τμήμα Αναπαραγωγικής Ενδοκρινολογίας, Τομέας Γυναικολογίας και Μαιευτικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Οι συνεχείς αυτόματες αποβολές (ΣΑΑ) αφορούν στο (1-2)% των ζευγαριών που προσπαθούν να τεκνοποιήσουν. Σε ποσοστό έως και 50% των περιπτώσεων δεν έχει αναφερθεί συγκεκριμένη αιτιολογία (ιδιοπαθείς ΣΑΑ). Εκλεκτική αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος ονομάζεται η διαδικασία εκείνη κατά την οποία αδρανοποιείται μόνο το ένα από τα δύο X χρωμοσώματα (μητρικό ή πατρικό). Τα τελευταία χρόνια η εκλεκτική αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος έχει συσχετισθεί με τις «ιδιοπαθείς» ΣΑΑ. Μελετήσαμε το πρότυπο αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος σε 68 Ελληνίδες γυναίκες με «ιδιοπαθείς» ΣΑΑ και 82 γυναίκες- μάρτυρες από την Ήπειρο. Οι γυναίκες- μάρτυρες έχουν δύο ή περισσότερες επιτυχείς κυήσεις. Η επιλογή των πληροφοριακών γυναικών έγινε αφού εξετάσαμε πρώτα ποιες από αυτές είναι ετεροζυγώτες για την περιοχή του υποδοχέα ανδρογόνων (Human Androgen Receptor locus). Η μέθοδος που ακολουθήσαμε στηρίζεται στην χρήση του ευαίσθητου στη μεθυλίωση περιοριστικού ενζύμου HpaII. Το ποσοστό ετεροζυγωτίας για τις γυναίκες με ΣΑΑ βρέθηκε 76% (52/68), ενώ για τις γυναίκες- μάρτυρες 69% (57/82). Από τις 52 πληροφοριακές γυναίκες με ΣΑΑ 6 (12%) έδειξαν πλήρη εκλεκτική αδρανοποίηση του ενός X χρωμοσώματος (>90%) και 4 (8%) ήπια αδρανοποίηση (μεταξύ 70 και 90%). Από τις 56 πληροφοριακές γυναίκες- μάρτυρες 2 (4%) έδειξαν πλήρη εκλεκτική αδρανοποίηση του ενός X χρωμοσώματος και 4 (7%) ήπια αδρανοποίηση. Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των ιδιοπαθών ΣΑΑ και της εκλεκτικής αδρανοποίησης του X χρωμοσώματος στο δείγμα μας.

Συγχρηματοδοτήθηκε από την Ε.Ε. στα πλαίσια του προγράμματος «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ» του ΕΠΕΑΕΚ II του 3^{ου} ΚΠΣ του ΥΠ.Ε.Π.Θ., με χρηματοδότηση από εθνικούς πόρους και το ΕΚΤ.

X INACTIVATION SKEWING AND RECURRENT SPONTANEOUS ABORTIONS IN A GREEK POPULATION**Dasoula A.¹, Kalantaridou S.², Sotiriadis A.², Pavlou M.², Syrrou M.¹**

¹Genetics Unit, Laboratory of General Biology, Medical School, University of Ioannina, Greece ²Division of Reproductive Endocrinology, Department of Obstetrics and Gynecology, Medical School, University of Ioannina, Greece

Recurrent spontaneous abortion (RSA) affects (1-2) % of couples. In up to 50% of the cases no etiology is identified (idiopathic RSA). Skewed X-chromosome inactivation (XCI) is the preferential inactivation of the one (maternal or paternal) allele. Skewed XCI has been correlated with “idiopathic” RSA. We have studied 68 Greek women with idiopathic RSA and 82 controls for their X-chromosome inactivation pattern. Control women have two or more successful pregnancies. Firstly, selection of informative women (heterozygosity of HUMARA locus) was performed. Then, a methylation sensitive assay (HpaII digestion) was followed. The ratio of heterozygotes was 76% (52/68) in women with RSA and 69% (57/82) in control group. Of the 52 informative women with RSA, 6 (12%) showed extreme skewed XCI (> 90%) and 4(8%) moderate skewed XCI (between 70% and 90%). Of the 57 heterozygous controls, 2 (4%) showed extreme skewed XCI and 4 (7%) moderate skewed X inactivation. Frequency of extreme skewed X-inactivation between RSA women and controls was not significantly different (p=0.147). There is association between idiopathic RSA and skewed XCI.

This research was co-funded by the EU in the framework of the program “HERAKLITOS” of the “Operational Program for Education and Initial Vocational Training” of the 3rd Community Support Framework of the Hellenic Ministry of Education, funded by national sources and the ESF.

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΚΑΘΕΨΙΝΗΣ Β ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ

Δεβετζή Μ.¹, Γιώτη Ι.¹, Τσιάμπας Ε.², Βιλαράς Γ.², Ταλιέρη Μ.¹

¹Κέντρο Ογκολογικής Έρευνας «Γ. Παπανικολάου», Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας», Αθήνα

²Τμήμα Παθολογικής Ανατομικής, Νοσοκομείο Ν.Ι.Μ.Τ.Σ., Αθήνα.

Ο καρκίνος του ενδομητρίου αποτελεί μια από τις συχνότερες μορφές κακοήθειας του γεννητικού συστήματος των γυναικών, έτσι κρίνεται απαραίτητη η καθιέρωση νέων βιολογικών δεικτών για τη διάγνωση του καρκίνου αυτού. Η λυσοσωμική κυστεϊνική πρωτεάση Καθεψίνη Β εμπλέκεται στην ανάπτυξη διαφόρων ανθρώπινων καρκίνων, όπως ο καρκίνος του μαστού, των ωοθηκών και του παχέος εντέρου. Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν 61 δείγματα καρκινικού ιστού ενδομητρίου. Εφαρμόστηκε η μέθοδος της έμμεσης ανοσοϊστοχημείας για τη μελέτη της έκφρασης της Καθεψίνης Β σε τομές παραφίνης. Τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Υψηλή έκφραση της Καθεψίνης Β βρέθηκε σε 25/61 (41%) των περιπτώσεων. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η υπερέκφραση της Καθεψίνης Β ήταν συχνότερη σε όγκους αρνητικούς για τους ορμονικούς υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης ($p=0.02$ και $p=0.006$ αντίστοιχα), όπως επίσης και σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου ($p=0.015$). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η Καθεψίνη Β εμπλέκεται στην ανάπτυξη του καρκίνου του ενδομητρίου και μπορεί να αποτελέσει ένα νέο δείκτη δυσμενούς πρόγνωσης για αυτόν τον καρκίνο.

**IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF CATHEPSIN B IN
ENDOMETRIAL CANCER****Devetzi M.¹, Yotis J.¹, Tsiambas E.², Vilaras G.², Talieri M.¹**

¹*“G. Papanikolaou” Research Center of Oncology, “Saint Savas” Hospital, Athens, Greece;* ²*Department of Pathology, N.I.M.T.S. Hospital, Athens, Greece.*

New biological markers are needed for diagnosis of endometrial cancer. The lysosomal cysteine proteinase Cathepsin B has been implicated in the progression of various human tumors including breast, ovarian, brain and colorectal cancer. In this study 61 patients operated for endometrial carcinoma were included. The immunohistochemistry method was adopted for the detection of Cathepsin B using paraffin embedded specimens. Results were compared to clinicopathological data. Cathepsin B was highly expressed in 25/61 (41%) endometrial cancer tissues. Statistical analysis showed that Cathepsin B overexpression was more frequent in estrogen and progesterone receptor negative tumors ($p=0.02$ and $p=0.006$ respectively), as well as in patients of advanced stage ($p=0.015$). Our results suggest that Cathepsin B, is involved in cancer progression and may be characterised as a new marker of unfavourable prognosis for endometrial carcinoma.

**ΙΣΟΖΥΓΙΣΜΕΝΗ ΜΕΤΑΘΕΣΗ ΣΕ ΑΓΟΡΙ ΜΕ ΥΠΟΤΟΝΙΑ,
ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ ΛΟΓΟΥ, ΝΟΗΤΙΚΗ ΥΣΤΕΡΗΣΗ ΚΑΙ
ΣΙΕΛΟΡΡΟΙΑ**

**Δημητριάδου Ε.¹, Λάλου Η.¹, Νάκου Ι.², Τζούφη Μ.², Μέρτζιου Θ.²,
Σύρρου Μ.¹**

¹Μονάδα Γενετικής, Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων, Ελλάδα ²Τομέας Παιδιατρικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,
Ελλάδα

Παρουσιάζουμε ένα αγόρι 3,5 ετών με *de novo* ισοζυγισμένη μετάθεση στην οποία εμπλέκεται ο κοντός βραχίονας του χρωμοσώματος 5 και υποτονία, καθυστέρηση λόγου, νοητική υστέρηση και σιελόρροια. Ο καρυότυπος με ζώνες G αποκάλυψε μία μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 5 και 7, καρυότυπος 46XY, t(5;7) (p14;q35). Οι μεταθέσεις προκύπτουν όταν λαμβάνει χώρα μία αμφίδρομη ανταλλαγή υλικού μεταξύ δύο μη ομόλογων χρωμοσωμάτων. Μία θραύση πραγματοποιείται στον ένα βραχίονα κάθε χρωμοσώματος και το υλικό που βρίσκεται πέρα των σημείων θραύσης ανταλλάσσει θέσεις. Φθορίζουσα *in situ* υβριδοποίηση (FISH) πραγματο-ποιήθηκε προκειμένου να επιτευχθεί μία πιο ακριβής εκτίμηση της μετάθεσης, χρησιμοποιώντας δύο ανιχνευτές. Έναν σημασμένο paint ανιχνευτή που αναγνωρίζει ολόκληρο το χρωμόσωμα 5 και τον ειδικό για την κρίσιμη περιοχή του συνδρόμου cri-du-chat (cri-du-chat (5p15.2) / 5q15.31 (D5S89)) (Qbiogene). Και οι δύο ανιχνευτές επιβεβαίωσαν την ύπαρξη της t(5;7) και επιπλέον ότι η περιοχή 5q15.2 (κρίσιμη περιοχή για το cri-du-chat) μετατέθηκε στο χρωμόσωμα 7. Ισοζυγισμένες μεταθέσεις μπορεί, μερικές φορές, να οδηγήσουν σε μη φυσιολογικούς φαινοτύπους λόγω της θραύσης μέσα σε κάποιο γονίδιο. Εξετάσεις FISH δείχνουν επίσης ότι πολλά ελλείμματα συνδυάζονται με μικρούς διπλασιασμούς.

**APPARENTLY BALANCED TRANSLOCATION IN A BOY
WITH HYPOTONIA, SPEECH DELAY, MENTAL
RETARDATION AND SIALORRHEA**

Dimitriadou E.¹, Lalou I.¹, Nakou I.², Tzoufi M.², Mertzou Th.², Syrrou M.¹

¹Genetics Unit, Laboratory of General Biology, Medical School, University of Ioannina, Greece ²Division of Pediatrics, Medical School, University of Ioannina, Greece

We present a 3.5 year old boy with an apparently balanced *de novo* chromosomal translocation involving the short arm of chromosome 5 and hypotonia, speech delay, mental retardation and sialorrhea. G-banding karyotype revealed a translocation between chromosome 5 and 7, karyotype 46, XY, t(5;7) (p14;q35). Translocations arise when a two-way exchange of material takes place between two non homologous chromosomes. A break occurs in one arm of each chromosome, and the chromosome material distal to the break points switch positions. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was performed for a more accurate assessment of the translocation, using two probes. A fluorescein labeled total chromosome 5 paint probe and the specific for the critical region of cri-du-chat syndrome probe (cri-du-chat (5p15.2) / 5p15.31 (D5S89)) (Qbiogene). Both probes confirmed the existence of a t (5;7) and, moreover, that the 5p15.2 region (cri-du-chat critical region) has been translocated to chromosome 7. Apparently balanced translocations may sometimes result in abnormal phenotype, due to gene disruption. FISH examinations also show that many deletions are combined with minimal duplications.

**WEAVER-LIKE ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΜΕ ΚΑΡΥΟΤΥΠΟ 46,XX
t(1;4)(q22;p16): ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ**

**Δημοπούλου Α., Σεκερλή Ε., Βασιλείου Γ., Τοπαλίδης Α., Παύλου Ε.,
Βογιατζής Ν.**

*Εργ. Κυτταρογενετικής Β' Παιδιατρικής Κλινικής Α.Π.Θ., Νοσοκομείο Α.Χ.Ε.Π.Α.,
Θεσσαλονίκη*

Το σύνδρομο Weaver περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Weaver το 1974 και χαρακτηρίζεται από ταχεία σωματική ανάπτυξη και προχωρημένη οστική ηλικία. Επίσης το σύνδρομο παρουσιάζει μακροσωμία, κλινοδακτυλία, ιδιάζων προσωπείο, καμπτοδακτυλία, μακροκεφαλία. Πρόκειται για ένα σπάνιο σύνδρομο, η πλειονότητα δε των περιπτώσεων που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία είναι σποραδικές. Ωστόσο, σε μικρό ποσοστό περιγράφηκε οικογενής εμφάνιση του συνδρόμου, παρατήρηση η οποία οδήγησε στη σκέψη ότι κληρονομείται. Ο τρόπος μεταβίβασής του είναι ο υπερέχων αυτοσωμικός, ενώ επιπλέον έρευνες έδειξαν ότι η υπεύθυνη μετάλλαξη εντοπίζεται στο γονίδιο NSD1 που εδράζει στα μακρά σκέλη του χρωμοσώματος 5 (5q35.2-q35.3).

Το 1992 ο Cole και συν. δημοσίευσαν ένα φαινοτυπικά παρόμοιο σύνδρομο που παρουσίαζε και υποτονία και το ονόμασαν Weaver-like σύνδρομο. Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται η περίπτωση ενός κοριτσιού 5 ετών με πολλαπλές σκελετικές ανωμαλίες όπως καμπτοδακτυλία άνω άκρων με ωλένια απόκλιση δείκτου και μέσου δακτύλου αριστερής άκρας χειρός και του δείκτου της δεξιάς άκρας χείρας, κερκιδική απόκλιση παράμεσου και μικρού δακτύλου δεξιάς άκρας χειρός, πρόσθια κάμψη μέσου δακτύλου δεξιάς άκρας χειρός, εφίπτευση μεγάλων δακτύλων άκρων ποδιών επί των δευτέρων και γενικευμένη υποτονία. Έγινε μελέτη των χρωμοσωμάτων με την τεχνική των ταινιών GTG και ο καρυότυπος της ασθενούς ήταν 46,XX t(1;4)(q22;p16).. Η χρωμοσωμική αυτή ανωμαλία δε σχετίζεται με το σύνδρομο, θεωρείται δε τυχαίο εύρημα. Ο καρυότυπος των γονέων της βρέθηκε φυσιολογικός. Δεν κατέστη δυνατή η μοριακή ανάλυση του γονιδίου NSD1 που θεωρείται κατά ένα ποσοστό υπεύθυνο για το σύνδρομο. Επειδή ο φαινότυπος των γονέων και της μεγαλύτερης αδερφής ήταν φυσιολογικός θεωρούμε ότι η περίπτωσή μας έχει σποραδική εμφάνιση. Λόγω δε και της συνυπάρχουσας υποτονίας, η ασθενής μας θα μπορούσε να καταταγεί στις περιπτώσεις του Weaver-like συνδρόμου. Φέρνουμε στη δημοσιότητα την περίπτωση αυτή αφενός μεν λόγω της σπανιότητάς της αφετέρου δε λόγω της παρουσίας της αμοιβαίας μετάθεσης μεταξύ των χρωμοσωμάτων 1;4.

**WEAVER-LIKE SYNDROME WITH 46,XX t(1;4)(q22;p16)
KARYOTYPE: A CASE REPORT****Dimopoulou E, Sekerli E, Vassiliou G, Topalidis A, Pavlou E, Voyiatzis N.***Cytogenetics Laboratory of the 2nd Dept. Pediatrics of Aristotle University, AHEPA
Hospital, Thessaloniki*

The weaver syndrome (WS) was described by Weaver in 1974 as a syndrome of accelerated growth and advanced skeletal maturation. The syndrome is associated with macrosomy, clinodactily, unusual craniofacial appearance, camptodactily and macrocephaly. The overall frequency of the syndrome is low. The majority of published cases of WS to date appear to have been sporadic, but there have been references about familial occurrence. In these cases it appears to be inherited in an autosomal dominant fashion. NSD1 mutations have been described in some patients diagnosed as (WS). In this study we report a case of a 5-year old girl with multiple skeletal malformations such as camptodactily of the upper limbs, ulnar deviation of left index and middle finger, ulnar deviation of right index, radial deviation of right ring and little finger and flexion of the right ring finger. Both big toes of lower limbs override the second toes. There is also marked generalized hypotonia. Chromosomes were studied using the GTG – banding technique and the patient's karyotype was 46,XX t(1;4)(q22;p16). The parents' karyotype was normal. The molecular analysis of NSD1 gene was not possible. Our case is considered to be sporadic because the rest of the family had normal phenotype. Due to the coexistent hypotonia, our patient is diagnosed as Weaver-like syndrome.

**ΤΟ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ P10, ΟΛΙΓΟΠΕΠΤΙΔΙΟ ΤΟΥ
ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HARP, ΕΧΕΙ ΠΙΘΑΝΗ
ΑΝΤΙΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ**

**Διαμαντοπούλου Ζ.¹, Πολυκράτης Α.¹, Μπίρμπας Χ.¹, Courty J.²
και Π. Κατσώρης¹**

¹Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Βιολογίας, ²University Paris 12, Dept. of Biology, Paris, France

Η HARP (Heparin Affin Regulator Peptide) είναι ένας αυξητικός παράγοντας με 136 αμινοξέα και μοριακό βάρος 18 kDa (1). Ανιχνεύεται σε ποικιλία ιστών και οργάνων τόσο σε φυσιολογικές, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (2). Εμφανίζει ποικιλία βιολογικών δράσεων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η κυτταρική μετανάστευση και η *in vivo* επαγωγή της αγγειογένεσης, υποδηλώνοντας την πιθανή συμμετοχή στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων. Πρόσφατα χαρακτηρίσαμε πεπτίδια της HARP που προκύπτουν από πρωτεόλυσή της και εμφανίζουν *in vivo* και *in vitro* παρεμφερείς ή και αντίθετες βιολογικές δράσεις (3). Στη συγκεκριμένη εργασία, μελετήσαμε τη βιολογική δράση του P10, ενός συνθετικού πεπτιδίου που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 122-133 του καρβοξυτελικού άκρου της HARP, καθώς και του πεπτιδίου AAD που έχει την ίδια πρωτοδιάταξη με το P10 και έχει συντεθεί με D-αμινοξέα. Από τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι *in vitro*, το P10 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, την προσκόλληση και τη μετανάστευση των κυττάρων PC3 και DU-145, κυτταρικών σειρών που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου προστάτη. Αναφορικά με τον τρόπο δράσης του P10, γνωρίζουμε ότι δεσμεύεται στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς ALK και RPTPβ/ζ και με χρήση ανοσοστυπωμάτων βρέθηκε ότι οι κινάσες SRC, AKT και ERK1/2, καθώς και η φωσφατάση PTEN εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος από το P10. Τέλος, το P10 έχει αντιαγγειογενετική δράση στο *in vivo* σύστημα της χοριοαλλαντοϊδικής μεμβράνης εμβρύου όρνιθας. Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι το P10 εμφανίζει βιολογικές δράσεις που το καθιστούν υποψήφιο μόριο για αντινεοπλασματική χρήση.

**P10, A HARP DERIVED PEPTIDE THAT EXHIBITS ANTI
TUMOR BIOLOGICAL ACTIONS****Diamantopoulou Z.¹, Polykratis A.¹, Mbirmbas Ch.¹, Courty J.²
and P. Katsoris¹**¹University of Patras, Dept. of Biology, Patras, Greece²University Paris 12, Dept. of Biology, Paris, France

HARP (Heparin Affin Regulator Peptide) is an 18 kDa growth factor (1) detected in various tissues and cell lines (2). HARP displays several biological actions, such as induction of cellular proliferation, migration and angiogenesis, indicating its possible involvement in carcinogenesis and tumor progression. Recently, we have identified and characterized several HARP's proteolysis fragments with either similar or opposite HARP's biological activities (3).

In the present work, we investigated the biological activity of P10, a synthetic peptide that corresponds to the carboxyl terminal of the HARP (residues 122-131) and AAD which has identical sequence, but is synthesized with D-amino acids.

Our results suggest that P10 inhibits the *in vitro* proliferation, adhesion, migration and anchorage independent cell growth of human prostatic tumor cells like PC3 and DU145 cells. Using Western blot analysis, we showed that SRC, AKT, ERK1/2 kinases and PTEN phosphatase are activated following a treatment with P10. In addition; studies of the mechanism of action indicated that P10 interfered with the binding of the receptor of HARP including ALK and RPTP β/ζ . Furthermore, we have shown that P10 inhibited *in vivo* angiogenesis on the chicken embryo CAM assay. Taken together these results indicated that P10 could constitute an interesting tool for tumor therapy strategy.

References

1. Rauvala, H. (1989) *EMBO J.* 8, 2933-2941.
2. Wellstein A., Fang W., Khatri A., Lu Y., Swain S., Dickson B., Sasse J., Riegel A., Lippman E. (1992). *J. Biol. Chem.* 267:2582-87.
3. Polykratis A., Delbe J., Papadimitriou E., Katsoris P., (2004) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:1954-1966.
4. Polykratis A., Katsoris P., Courty J., Papadimitriou E., (2005) *J. Biol. Chem.* 280:22454-61.

**ΕΠΟΧΙΑΚΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ
ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΤΟΥ
CALAMINTHA NEPETA (L) SAVI SUBSP. *NEPETA* ΣΤΗΝ
ΠΕΡΙΟΧΗ ΛΟΥΤΡΩΝ ΑΡΙΔΑΙΑΣ, ΝΟΜΟΥ ΠΕΛΛΑΣ**

Διβριώτη Ι.¹, Κοκκίνη Σ.¹, Λαναράς Θ.¹ και Κ.Μ. Κουκ²

¹Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τ.Θ. 109,
54124 Θεσσαλονίκη

²Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας (ΕΘΙΑΓΕ) Κέντρο Αγροτικής Έρευνας Μακεδονίας
Θράκης, Τ.Θ. 60458, 570 01 Θέρμη, E-mail: cook@nagref.gr

Μελετήθηκε η κατανομή υπέργειας φυτικής βιομάζας σε φύλλα, άνθη και βλαστούς και η περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο αυτοφυών φυτών *Calamintha nepeta* (L) Savi subsp. *nepeta* που συλλέχθηκαν από την περιοχή των Λουτρών Αριδαίας του Νομού Πέλλας. Η χρονική περίοδος των εργασιών πεδίου ήταν 3/10/2004-21/11/2005. Τα φυτά είχαν υπέργεια τμήματα από τον μήνα Μάρτιο μέχρι τον Νοέμβριο. Στα δείγματα που συλλέχθηκαν (υπέργεια τμήματα) μετρήθηκε το μήκος του βλαστού και ο αριθμός καλύκων ανά βλαστό. Το αποξηραμένο υλικό διαχωρίστηκε σε ταξιανθίες (άνθη και κάλυκες), φύλλα και βλαστούς. Ο μέγιστος μηνιαίος μέσος όρος του μήκους βλαστού καταγράφηκε το μήνα Αύγουστο (38,4 cm). Υπήρχε διακύμανση της αναλογίας βιομάζας των διαφόρων ιστών. Η αρχή της ανθοφορίας παρατηρήθηκε στις αρχές του Ιουλίου. Η βιομάζα των βλαστών (65,6 %) και ο αριθμός των καλύκων ανά μονάδα μήκους βλαστού (0,67 άνθη ανά cm) παρουσίασαν μέγιστες τιμές στις αρχές Νοεμβρίου. Η συμμετοχή των φύλλων (64,8 %) και των ανθέων (6,53 %) στη συνολική βιομάζα του κάθε δείγματος ήταν μέγιστη το Μάρτιο και το Σεπτέμβριο, αντίστοιχα. Η εκατοστιαία περιεκτικότητα (%) των διαφορετικών υπέργειων τμημάτων σε αιθέριο έλαιο προσδιορίστηκε με υδροαπόσταξη σε συσκευή τύπου Clevenger για 2 ώρες και εκφράστηκε ως ml 100 g⁻¹ ξηρού βάρους. Παρατηρήθηκαν εποχιακές διακυμάνσεις στην περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο τόσο στα φυτικά όργανα όσο και στο κάθε δείγμα. Η μεγαλύτερη τιμή περιεκτικότητας αιθερίου ελαίου σε επίπεδο ατόμου (0,94 %) παρατηρήθηκε τον μήνα Ιούνιο. Η περιεκτικότητα αιθερίου ελαίου ήταν για τα άνθη 0,5-1,78 %, για τα φύλλα 0,5-1,7 % και για τους βλαστούς 0,1-0,16 % με τις μέγιστες τιμές στα φύλλα και τα άνθη το μήνα Σεπτέμβριο και στους βλαστούς το μήνα Μάρτιο.

**SEASONAL VARIATION IN BIOMASS ALLOCATION AND
ESSENTIAL OIL YIELD OF *CALAMINTHA NEPETA* (L) SAVI
SUBSP. *NEPETA* PLANTS FROM THE AREA OF LOUTRA
ARIDAIA, PELLA**

Divrioti I.¹, Kokkini S.¹, Lanaras T.¹, and C.M.Cook²

¹Department of Botany, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, P. O. Box 109, GR-541 24, Thessaloniki, Greece

²National Agricultural Research Foundation (NAGREF), Agricultural Research Centre of Macedonia-Thrace, P.O. Box 60458, GR-570 01 Thermi, Greece E-mail: cook@nagref.gr

Some morphological characteristics and the essential oil yield of *Calamintha nepeta* (L) Savi subsp. *nepeta* (Labiatae) plants from Loutra Aridaia, Prefecture of Pella were studied. Wild *C. nepeta* plant samples were collected during the period from 3/10/2004 to 21/11/2005. Above ground parts of plants were observed from March to November. Aerial parts of plants were cut at ground level and air-dried in the dark at room temperature. Stem height and the number of calyces per stem were measured. The dried plant material was separated according to plant organ: inflorescences (flowers and calyces), leaves and stems, weighed and the relative biomass ratio was determined. The maximum mean monthly stem height occurred in August (38.4 cm). There was a variation in the biomass ratio of the plant organs between months, with the initiation of flowering in early July. The stem biomass (65.6 %) and the number of calyces per cm stem (0.67) were highest in early November. The contribution of the leaves (64.8 %) and inflorescences (6.53 %) to the total biomass was highest in March and September, respectively. The essential oil yield (%) of each plant organ was determined by hydrodistillation separately in a Clevenger-type apparatus for 2 h and was expressed as ml 100 g⁻¹ DW. Seasonal variations in oil yield were observed both for plant organs and the whole plant. The highest oil yield (0.94 %) on a whole plant basis was observed in June. The oil yield ranged from 0.5-1.78 % for inflorescences, from 0.5-1.7 % for the leaves and from <0.1-0.16 % for the stems, with maximum yields occurring in September for the inflorescences and leaves and in March for the stems.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ IRP1 ΚΑΙ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΗΝ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΒΛΑΒΩΝ ΣΤΟ ΠΥΡΗΝΙΚΟ DNA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ H₂O₂

Δούλιας Π.-Θ.¹, Τενοπούλου Μ.¹, Γαλάρης Δ.¹ και Π. Καναβάρος²

¹Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, ²Εργαστήριο Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη IRP1 (iron regulatory protein 1) αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή των επιπέδων του ενδοκυττάριου σιδήρου. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα (H1299) και του μαστού (MCF-7) τα οποία είχαν διαμολυνθεί με κατάλληλα πλασμίδια και κάτω από ορισμένες συνθήκες (καλλιέργεια απουσία ή παρουσία τετρακυκλίνης) μπορούσαν να υπερεκφράζουν ή να μην υπερεκφράζουν μία μεταλλαγμένη μη λειτουργική IPR-1 (IRP1_{C437S}). Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα που υπερέκφραζαν την IRP1_{C437S} ήταν πιο ευαίσθητα στο H₂O₂, ενώ ταυτόχρονα στα ίδια κύτταρα ανιχνεύτηκαν αυξημένα επίπεδα οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου. Προεπάωση των κυττάρων με τον σιδηροδεσμευτικό παράγοντα δεσφεριοξαμίνη πριν από την έκθεση τους σε H₂O₂ μείωσε τη βλάβη του DNA στα ίδια επίπεδα ανεξάρτητα της παρουσίας ή της απουσίας της IRP1_{C437S}. Πρόσφατα πειράματά μας, έχουν δείξει ότι η δεσφεριοξαμίνη προσλαμβάνεται από τα κύτταρα με ενδοκύτωση «υγρής φάσης» και συσσωρεύεται στα λυσοσωμάτια όπου δεσμεύει τα ιόντα σιδήρου (1, 2). Τα πειράματα αυτά υποδηλώνουν ότι η υπερέκφραση της μη λειτουργικής IRP1_{C437S} διαταράσσει την ενδοκυττάρια ομοιοστασία των ιόντων σιδήρου και ως εκ τούτου κάνει τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες και ειδικότερα στο H₂O₂.

Βιβλιογραφία

1. Doulias *et al*, Free Radic. Biol. Med., 2003
2. Tenopoulou *et al*, Biochem. J., 2005

Η εργασία αυτή συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και από το Ελληνικό Υπουργείο Παιδείας στα πλαίσια του προγράμματος «Πυθαγόρας II», κωδικός υποέργου 1894.

**THE ROLE OF IRP1 PROTEIN AND IRON IONS IN THE
INDUCTION OF NUCLEAR DNA DAMAGE IN CELLS EXPOSED
TO H₂O₂****Doulias P.-T.¹, Tenopoulou M.¹, Galaris D.¹, and P. Kanavaros²**

¹Laboratory of Biological Chemistry, ²Laboratory of Anatomy-Histology-Embryology,
Medical School, University of Ioannina

It is well known that iron regulatory protein 1 (IRP1) is implicated in the regulation of intracellular iron levels. In the present study, lung (H1299) and breast (MCF-7) cancer cells were transfected with the proper plasmids in order to conditionally overexpress a single point mutated and non functional IRP1 protein (IRP1_{C437S}). It was observed that cells overexpressing IRP1_{C437S} were more sensitive to H₂O₂ and also exhibited higher levels of redox active iron. Treatment of the cells with the iron chelator desferioxamine before the exposure to H₂O₂, reduced DNA damage to the same levels independently of the presence or absence of IRP1_{C437S}. Previous experiments in our laboratory have shown that desferioxamine is taken up by fluid phase endocytosis and accumulates into lysosomes where it chelates iron ions (1, 2). The results of this study indicate that overexpression of the non functional IRP1_{C437S} disturbs iron homeostasis and sensitizes cells against H₂O₂-mediated DNA damage.

References:

1. Doulias et al, Free Radic. Biol. Chem., 2003
2. Tenopoulou et al, Biochem. J., 2005

This work was co-funded by the European Union and the Hellenic Ministry of Education in the framework of the program "Pythagoras II", code number #1894#.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΩΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ G ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ελευσινιώτη Α.Α., Μπάγκος Π.Γ. και Σ.Ι. Χαμόδρακας

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Αθήνα 157 01*

Οι G πρωτεΐνες είναι ετεροτριμερή αποτελούμενα από τις α, β και γ υπομονάδες. Λειτουργούν ως «διακόπτες» για τη μεταγωγή μηνυμάτων από τον εξωκυττάριο χώρο στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τους αντίστοιχους υποδοχείς (GPCRs). Το PRED-GPROT είναι μια μέθοδος ικανή να προβλέπει μέσω της χρήσης profile HMMs (pHMMs) σε ποιά οικογένεια ανήκει μία G πρωτεΐνη αλλά και τη συμπεριφορά της όσον αφορά την αλληλεπίδραση με τους GPCRs. Συγκεκριμένα, οι G πρωτεΐνες ταξινομούνται σε τέσσερις οικογένειες βάσει της α υπομονάδας τους: Gs, Gi/o, Gq/11 και G12/13. Τα μέλη κάθε οικογένειας ταξινομούνται σε συγκεκριμένες ομάδες οι οποίες σχετίζονται με τον τύπο αλληλεπίδρασης με τους GPCRs. Για τη δημιουργία των pHMMs χρησιμοποιήθηκαν καλά σχολιασμένες Ga υπομονάδες ευκαρυωτικών ειδών από τη βάση δεδομένων UNIPROT. Το πρόγραμμα PSI-PRED χρησιμοποιήθηκε για προβλέψεις δευτεροταγούς δομής, ενώ για την πολλαπλή στοίχιση χρησιμοποιήθηκε το ClustalX. Εφόσον στόχος του PRED-GPROT είναι και η πρόβλεψη της ειδικότητας αλληλεπίδρασης των G πρωτεϊνών με τους GPCRs, για τη δημιουργία των pHMMs χρησιμοποιήθηκαν οι περιοχές των Ga υπομονάδων που θεωρούνται υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με τους GPCRs. Δημιουργήθηκε τελικά μια βιβλιοθήκη pHMMs που διαθέτει τρία pHMMs για κάθε μία από τις τέσσερις οικογένειες. Τα ποσοστά επιτυχίας στην περίπτωση των πρωτεϊνών του συνόλου ελέγχου για σωστή πρόβλεψη των οικογενειών στην οποία ανήκουν είναι: 100% για την Gi/o οικογένεια, 84.2% για Gq/11, 100% για Gs και 100% για G12/13. Τα ποσοστά επιτυχίας στην περίπτωση πρόγνωσης των ομάδων αλληλεπίδρασης είναι 100% για την αλληλεπίδραση Gi/o/Gz, 100% για Gt, 100% για Gq/11, 66.7% για G14 ή 15/16, 100% για Gs/Golf και 100% για G12/13. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι με το PRED-GPROT και τη χρήση συγκεκριμένων περιοχών της ακολουθίας μπορούν να προβλεφθούν με επιτυχία η οικογένεια και η ομάδα αλληλεπίδρασης μιας δεδομένης Ga υπομονάδας.

**A METHOD FOR PREDICTING THE FAMILY AND THE
COUPLING SPECIFICITY OF G PROTEINS****Elefsinioti A.L., Bagos P.G., and S.J. Hamodrakas***Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Athens 157 01*

G proteins are heterotrimers composed of α , β and γ subunits, which act as switches for signal transduction from the extracellular space into the cell via their interaction with GPCRs. The PRED-GPROT algorithm aims at predicting the family and the coupling specificity of G proteins by using profile HMMs (pHMMs). In particular, G proteins are grouped in four families on the basis of their α subunit: Gs, Gi/o, Gq/11 and G12/13. The members of each family are subdivided in specific groups concerning the type of interaction with GPCRs. For the construction of pHMMs we used well-annotated G α subunits from eukaryotic species derived from the UNIPROT database. PSI-PRED was used for secondary structure prediction, while for constructing multiple alignments of the members of the same family we used ClustalX. Provided that the aim of PRED-GPROT is not only the prediction of the family in which the query sequence belongs, but also the prediction of the coupling specificity with GPCRs, we used for the construction of pHMMs the regions of G α proteins that are considered responsible for the interaction with GPCRs. This resulted to the construction of a library of pHMMs with three pHMMs for each of the four G protein families. For the proteins of the test set the prediction accuracy for the family classification is: 100% for Gio family, 84.2% for Gq/11, 100% for Gs and 100% for G12/13. The accuracy in the case of coupling specificity prediction is: 100% for the Gio/Gz coupling specificity group, 100%, for Gt, 100% for Gq/11, 66.7% for G14 or 15/16, 100% for Gs/Golf and 100% for G12/13. These results indicate that certain segments of the sequence are responsible for coupling to GPCRs as well as the capability of PRED-GPROT to successfully predict the family and the coupling specificity of a given G protein.

**ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ
ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΑ ΜΥΔΙΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΈΚΘΕΣΗ ΤΟΥΣ ΣΕ
ΡΥΠΑΝΤΕΣ**

**Ζάννου Α.¹, Χρυσικοπούλου Ε.¹, Hamidi Alambari D.², Κολιάκος Γ.²,
Δημητριάδης Β.³, Καλογιάννη Μ.¹**

¹Εργ. Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών,
Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη 54124

²Τομέας Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Α.Π.Θ.

³Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ.,
Θεσσαλονίκη 54124

Η βιοπαρακολούθηση αφορά με την ανάπτυξη τεχνικών μέτρησης της συγκέντρωσης των οργανικών και ανόργανων ρυπαντών σε ιστούς ζωντανών οργανισμών, αλλά και τεχνικών με τις οποίες εκτιμώνται και καταγράφονται οι βιολογικές επιπτώσεις των ρυπαντών στους οργανισμούς. Στην παρούσα εργασία προτείνεται η μέτρηση της οξειδωσης των πρωτεϊνών ως βιομάρτυρας, σε μελέτες βιοπαρακολούθησης. Για το σκοπό αυτό, μύδια *Mytilus galloprovincialis* εκτέθηκαν για δώδεκα ημέρες σε βαρέα μέταλλα ή οργανοχλωριωμένες ή οργανοφωσφορικές ενώσεις. Η επαγωγή της οξειδωσης των πρωτεϊνών μετρήθηκε με τη χρήση του αντισώματος anti-DNPH και προσδιορίστηκε ο αριθμός των καρβονυλικών ομάδων (-CO-) που σχηματίζονται στα μόρια των πρωτεϊνών στα αιμοκύτταρα των ζώων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ύστερα από έκθεση των οργανισμών για δώδεκα ημέρες σε ένα απαραίτητο μέταλλο, το ψευδάργυρο (Zn) συγκεντρώσεων 1, 10 και 100 µgr/lit και σε ένα μη απαραίτητο τοξικό μέταλλο, το κάδμιο (Cd) συγκεντρώσεων 1, 10 και 100 µgr/lit επάγεται σημαντικά ο σχηματισμός των καρβονυλικών ομάδων στα μόρια των πρωτεϊνών στα αιμοκύτταρα. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή οξειδωμένων πρωτεϊνών αυξάνεται σημαντικά ύστερα από έκθεση των μυδιών για τον ίδιο χρόνο σε λινδάνιο συγκέντρωσης 0,03 mg/lit και σε μίγμα οργανοφωσφορικών συγκέντρωσης 0,3 mg/lit (ανθρακένιο, φαινανθρένιο και ναφθαλένιο, αναλογία 1:1:1). Από τα αποτελέσματα συνάγεται το συμπέρασμα ότι τόσο τα βαρέα μέταλλα όσο και το λινδάνιο και οι οργανοφωσφορικές ενώσεις επάγουν την οξειδωση των πρωτεϊνών στα αιμοκύτταρα των μυδιών *Mytilus galloprovincialis*.

**INDUCTION OF SYNTHESIS OF OXIDIZED PROTEINS IN
HEMOCYTES OF MUSSELS AFTER THEIR EXPOSURE TO
POLLUTANTS****Zannou A.¹, Chrisikopoulou E.¹, Hamidi Alambari D.², Koliakos G.²,
Dimitriadis V.³, Kaloyianni M.¹**¹Laboratory of Animal Physiology, Department of Zoology, School of Biology, Aristotle
University of Thessaloniki (AUTH), 54124²Department of Biological Chemistry, School of Medicine (AUTH)³Dept of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology (AUTH)

Biomonitoring concerns the development of techniques that estimate the organic and inorganic pollutants concentration in animal tissues as well as the development of techniques where the biological consequences of pollutants on the organisms are recorded. The present study suggests the induction of protein oxidation as a biomarker in biomonitoring studies. Mussels *Mytilus galloprovincialis* were exposed either to heavy metals or to organochlorinated or to organophosphoric compounds for twelve days. The oxidized proteins were measured by the use of an anti-DNPH antibody and the number of the carbonyl groups (-CO-) attached to the protein molecules was quantified. Our results showed that after the exposure of the whole organisms to an essential metal, zinc (Zn) at concentrations of 1, 10 and 100 µgr/lit and to a non-essential metal, cadmium (Cd) at concentrations of 1, 10 and 100 µgr/lit, the protein carbonyl content was significantly increased in hemocytes. Furthermore, our findings showed that the production of oxidized proteins was also significantly increased after exposure of mussels to lindane at concentration of 0.03 mgr/lit and to the mixture of organophosphoric compounds at concentration of 0.3 mgr/lit (anthracene, phenanthrene and naphthalene, 1:1:1) for the same period. From our results we could suggest that heavy metals as well as lindane and organophosphoric compounds induce synthesis of oxidized proteins in hemocytes of mussels *Mytilus galloprovincialis*.

**ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΔΙΟΧΕΤΕΥΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ
ΟΡΓΑΝΩΣΗ: ΕΝΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΔΥΟ**

Ζαχαριουδάκης Γ.

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Η παροδική επαφή δύο ενζύμων που επιτρέπει την μεταφορά ενός μεταβολίτη, προϊόντος του πρώτου και υποστρώματος του δεύτερου, σημαίνει και τον παροδικό σχηματισμό ενός ετερόλογου ολιγομερούς των δύο ενζύμων. Το ολιγομερές, ως ογκωδέστερο θα παρουσιάζει μειωμένη κινητικότητα, ιδιαιτέρως λόγω συνωστισμού στο ενδοκυτ-τάριο περιβάλλον. Η δημιουργία του συμπλόκου των δύο ενζύμων έχει αποδειχθεί σε αρκετές περιπτώσεις ότι συμβαίνει μόνο παρουσία του κοινού μεταβολίτη, οπότε και η δυναμική του σχηματισμού του θα καθορίζεται από την παρουσία του τελευταίου. Δεδομένου ότι οι διοχετευόμενοι μεταβολίτες είναι συνήθως ασταθή μόρια και δεν βρίσκονται σε ελεύθερα διαχεόμενη μορφή – τουλάχιστο σε μεγάλο ποσοστό-, η παρουσία τους θα εξαρτάται από την παρουσία του αρχικού υποστρώματος για το πρώτο ένζυμο. Κατά συνέπεια μια ανισότροπη εισαγωγή του αρχικού υποστρώματος στο χώρο θα επάγει και μια τοπική αλλοίωση της κινητικότητας των δύο ενζύμων. Το τελικό αποτέλεσμα θα είναι η ανισοκατανομή των ενζύμων στο χώρο, με αύξηση της συγκέντρωσής τους τοπικά, προς το σημείο εισαγωγής του αρχικού υποστρώματος. Αριθμητικές προσομοιώσεις, με βάση κινητικές σταθερές από τη βιβλιογραφία, δείχνουν ότι, ακολουθώντας το παραπάνω μοντέλο, είναι δυνατό να έχουμε ένα σημαντικό βαθμό δυναμικής οργάνωσης.

DYNAMIC SUBSTRATE CHANNELING AND SUBCELLULAR ORGANIZATION: A THEORETICAL MODEL LINKING THE TWO**Zacharioudakis G.***Laboratory of Molecular Biology, University of Ioannina*

The transient contact of two enzymes permitting the transfer of a metabolite, product of the former and substrate for the latter, implies the formation of a heterologous oligomer of the two enzymes. This oligomer, being bulkier, will show diminished mobility, especially due to crowding inside intracellular environments. The formation of the complex of the two enzymes has been shown in many cases to occur only in the presence of the common metabolite, so the dynamic of its formation will be dictated by the presence of the latter. Since channeled metabolites are usually unstable and are not found in free diffusing state - at least in important amounts-, their presence shall depend on the presence of the initial substrate of the first enzyme. Consequently, a non-homogeneous introduction of the initial substrate in space will induce local bias of the mobility for the two enzymes. The final result will be a non-homogeneous distribution of the enzymes in space, being more concentrated towards the point of introduction of the initial substrate. Numerical simulations, based on kinetic constants found in the literature, show that, following the aforementioned model, it is possible to have a significant degree of dynamic organization.

**ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΡΟΣΙΓΛΙΤΑΖΟΝΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΑΡΙΠΟΡΙΔΙΟΥ ΣΤΗΝ
ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ CD36 ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ, ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗ
ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ
ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Ζολότα Ζ.¹, Παλέτας Κ.², Μαμόπουλος Α.³, Κολιάκος Γ.⁴, Καλογιάννη Μ.¹

¹Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, ΑΠΘ. ²Β' Παθολογική Κλινική, Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης ³Γ' Γυναικολογική Κλινική, Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης ⁴Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη 54124

Τα μονοκύτταρα της κυκλοφορίας έχουν την ικανότητα να συνδέονται στο αγγειακό επιθήλιο, καθώς και σε μόρια της εξωκυττάριας ουσίας και να μεταναστεύουν προς τον υποενδοθηλιακό χώρο, με δέσμευση και αποδέσμευση των μονοκυττάρων στα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, όπως είναι η λαμινίνη. Στον υποενδοθηλιακό χώρο οι οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας, oxLDL, που προκύπτουν με οξείδωση των LDL, φαγοκυτταρώνονται από τα μονοκύτταρα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα, τα οποία σχηματίζουν το νεκρωτικό πυρήνα της αθηρωματικής βλάβης. Η έκθεση των μονοκυττάρων σε oxLDL ενεργοποιεί τη μεταγραφή των πυρηνικών υποδοχέων ενεργοποίησης των περοξυσωματίων τύπου γ (PPAR-γ), το σήμα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των οποίων αρχίζει με την αναγνώριση και τη δέσμευση των oxLDL από τους CD36 υποδοχείς των μονοκυττάρων/μακροφάγων και τη φαγοκυττάρωσή τους. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας έδειξαν ότι η ροσιγλιταζόνη έχει δράση παρόμοια με αυτή της γλυκόζης και της ινσουλίνης, επάγοντας την προσκόλληση και τη μετανάστευση των μονοκυττάρων στα υποστρώματα λαμινίνης και ενδοθηλιακών κυττάρων και σε μεγαλύτερο βαθμό την έκφραση των CD36 υποδοχέων. Η ταυτόχρονη χρήση καριποριδίου (αναστολέα του Na⁺-H⁺ ανταλλάκτη, NHE1) αναστέλλει την αθηρογόνο δράση της γλυκόζης, της ινσουλίνης και της ροσιγλιταζόνης και μειώνει την έκφραση των CD36 υποδοχέων, που υποδεικνύει τον σημαντικό ρόλο του NHE-1 στη διαδικασία σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας.

THE ROLE OF ROSIGLITAZONE AND CARIPORIDE IN THE MONOCYTE EXPRESSION OF CD36 RECEPTORS, ADHESION AND MIGRATION TO LAMININ AND ENDOTHELIAL CELL SUBSTRATES**Zolota Z.¹, Paletas K.², Mamopoulos A.³, Koliakos G.⁴, Kaloyianni M.¹**

¹Laboratory of Animal Physiology, Department of Zoology, Biology School, Aristotle University of Thessaloniki, ²2nd Pathological Clinic, Hippokrateion General Hospital of Thessaloniki, ³3rd Gynaecological Clinic, Hippokrateion General Hospital of Thessaloniki, ⁴Laboratory of Biological Chemistry, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 54124

Peripheral blood monocytes can bind to the vascular epithelium and to extracellular matrix molecules, like laminin and migrate to the subendothelium space. In the subendothelial space monocytes bind to oxidized low density lipoproteins (oxLDLs) and turn into foam cells by oxLDL phagocytosis. Foam cell formation is the first step towards atherosclerosis development. The monocyte exposure to oxLDL and oxLDL binding to CD36 scavenger receptors, activates Peroxisome Proliferator-Activated Receptors γ (PPAR- γ) transcription. Hormones related to diabetes, like insulin or glucose, activate atherosclerosis-related monocyte functions. Moreover, cariporide, a Na⁺/H⁺ exchanger (NHE-1) inhibitor, inhibits monocyte atherosclerosis-related functions. The results of our experiments showed that rosiglitazone, a PPAR- γ activator has similar action to glucose or insulin and activates monocyte adhesion and migration to laminin as well as to endothelial cells. Rosiglitazone also activates CD36 expression in monocytes. The use of cariporide inhibits the effects of glucose, insulin and rosiglitazone, thus indicating the important role of NHE-1 in atherosclerosis development.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΙΣΒΟΛΗΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΑΛΙΦΟΡΝΙΑ

Ζυγουρίδης Ν. και Κ. Ματθιόπουλος

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Ο δάκος της ελιάς αποτελεί το κυριότερο παράσιτο των ελαιοκαλλιιεργιών. Η εξάπλωση του εντόμου ακολουθεί στενά την έκταση της καλλιέργειας της ελιάς. Η διάδοση της ελιάς στην Καλιφόρνια άρχισε γύρω στα 1700 με τη μεταφορά φυτών από ιεραποστόλους από το Μεξικό στο βόρειο τμήμα της πολιτείας. Η καλλιέργεια της ελιάς αποτελεί ένα σημαντικό μέρος της αγροτικής οικονομίας σ' αυτή την πολιτεία των Η.Π.Α., με τάση μάλιστα περαιτέρω εξάπλωσής της. Η εισβολή του εντόμου στην περιοχή πρώτη φορά παρατηρήθηκε το 1998. Συνεπώς, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε τη διαδικασία εισβολής του. Για το λόγο αυτό χρειάζεται γενετική σύγκριση των πληθυσμών του δάκου της Καλιφόρνιας με τους πληθυσμούς περιοχών όπου ο δάκος ενδημεί. Η σύγκριση αυτή αποσκοπεί στην ανάδειξη ουδέτερων αλλά και σταθερών πολυμορφικών διαγνωστικών δεικτών. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης γίνεται ανάλυση της DNA αλληλουχίας διαφορετικών γενετικών τόπων του mtDNA καθώς επίσης και περιοχών του εσωτερικού μεταγραφόμενου διαστήματος του rRNA (ITS1 και ITS2) από δείγματα δάκων διαφορετικών περιοχών της Καλιφόρνιας. Οι αλληλουχίες αυτές θα συγκριθούν με τις αντίστοιχες αλληλουχίες από δείγματα δάκων της λεκάνης της Μεσογείου. Τα αποτελέσματα αυτά θα συγκριθούν επίσης και με εκείνα προϋπάρχουσας μελέτης των φυσικών πληθυσμών του δάκου της Μεσογείου βασισμένης σε μικροδορυφορικούς δείκτες. Μια τέτοιου είδους ανάλυση, αφενός θα συμβάλει στην επιπλέον ανάπτυξη της γνώσης της οικολογίας του εντόμου και αφετέρου στην κατανόηση της δυναμικής της εισβολής στην Καλιφόρνια η οποία έχει επέλθει είτε μέσω διεθνούς εμπορίου είτε μέσω τουριστικών μετακινήσεων.

ANALYSIS OF OLIVE FRUIT FLY INVASION IN CALIFORNIA**Zygouridis N., and K. Mathiopoulos***Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa*

Olive fruit fly constitutes the main parasite of olive cultivation. The spread of the insect follows closely the cultivation zone of the olive tree. Olive tree cultivation in California begun with plant transport by Catholic monks at about 1700 from Mexico. The olive tree cultivation represents an important part of the agricultural economy in this state of the U.S.A. with clear tendency to increase. Invasion of the olive fly was first observed in 1998. Therefore, it is very important to analyse the dynamics of this invasion. For this reason, we set out to perform genetic comparisons of Californian olive fly populations with populations where the insect is endemic. This kind of comparisons could possibly lead to the identification of stable and neutral polymorphic diagnostic markers. In the present study we analysed the DNA sequencing of different genetic loci of mtDNA as well as regions of the Internal Transcribed Spacers (ITS1 and ITS2) of rRNA from olive fly samples from different California counties. These DNA sequences are compared with the corresponding ones from olive fly samples of the Mediterranean. Results of this analysis will also be evaluated with respect to a previous analysis of olive fly populations of the Mediterranean basin that was based on microsatellite markers. This kind of analysis will on one hand shed light on the ecology of the insect and, on the other, will help in the understanding of the fly's invasion dynamics in California that is possibly due either to international commerce or to tourism.

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΟΡΘΟΛΟΓΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ PESCADILLO ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ *Arabidopsis thaliana*

Ζωγραφίδης Α.¹, Καπόλας Γ.¹, Μηλιώνη Δ.² και Κ. Χαραλαμπίδης¹

¹Εργαστήριο Μοριακής Φυσιολογίας Φυτών, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα

²Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, ΓΠΑ, Αθήνα.

Το γονίδιο pescadillo απομονώθηκε αρχικά ως μια εμβρυική μετάλλαξη του zebrafish. Στο ζυμομήκυτα το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο αναστέλλει την αύξηση ενώ στα θηλαστικά η απώλεια λειτουργίας του γονιδίου οδηγεί σε αναστολή της εμβρυικής ανάπτυξης. Ένας αριθμός εργασιών κατέδειξε ότι το pescadillo παίζει σημαντικό ρόλο στην βιογένεση των ριβοσωμάτων, στη νεοπλασία και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Στα φυτά η βιολογική λειτουργία του ορθόλογου γονιδίου PESCADILLO (*PES*) παραμένει άγνωστη. Κάνοντας χρήση της τεχνολογίας cDNA-AFLP στο πρότυπο σύστημα της *Zinnia*, ένα από τα πλέον ενδιαφέροντα cDNA βρέθηκε να κωδικοποιεί την ορθόλογη φυτική PESCADILLO πρωτεΐνη. Η παρούσα μελέτη περιλαμβάνει τον μοριακό και κυτταρικό χαρακτηρισμό του *AtPES*, καθώς επίσης και το ρόλο που διαδραματίζει κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των φυτών. Πειράματα ημιποσοτικού RT-PCR έδειξαν ότι το γονίδιο εκφράζεται κυρίως σε διαιρούμενα ή/και διαφοροποιούμενα κύτταρα. Η ανάλυση διαγονιδιακών φυτών *A. thaliana* που φέρουν την κατασκευή *PES*_{prom::GUS} έδειξε ότι η έκφραση του γονιδίου μάρτυρα περιορίζεται κυρίως στα ακραία μεριστώματα του βλαστού και της ρίζας, στις καταβολές των πλάγιων ριζών και σε αναπαραγωγικούς ιστούς και κύτταρα όπως οι σπερματικές βλάστες και οι γυρεόκοκκοι. Πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού σε σταθερά μετασηματισμένα με την κατασκευή *PES*_{prom::PES::YFP} φυτά αποκάλυψε, ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στον πυρηνίσκο και σε μικρότερη έκταση στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, η γενετική ανάλυση RNAi και T-DNA μεταλλαγμένων σειρών έδειξε ότι τα ολικής απώλειας λειτουργίας μεταλλάγματα είναι θνησιγόνα, ενώ τα μερικής απώλειας λειτουργίας φυτά εμφανίζουν φαινοτύπους νανισμού με αναπτυξιακές ανωμαλίες πρωτίστως στα ακραία μεριστώματα. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι στα μεταλλαγμένα αυτά στελέχη η μεταγραφή των 28S rRNA είναι σημαντικά μειωμένη. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι το γονίδιο *PES* εκφράζεται κυρίως σε αναπτυσσόμενους ιστούς, γεγονός που υποστηρίζει τη σχέση της πρωτεΐνης *PES* με θεμελιώδεις μηχανισμούς όπως η βιογένεση των ριβοσωμάτων, η κυτταρική διαίρεση και ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου.

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE PLANT
PESCADILLO ORTHOLOGUE FROM *Arabidopsis thaliana*****Zografidis A.¹, Kapolas G.¹, Milioni D.², and K. Haralampidis¹**¹*Molecular Plant Physiology Lab., Dept. of Botany, Faculty of Biology, UOA, Athens, Greece*²*Molecular Biology Laboratory, Dept. of Agricultural Biotechnology, AUA, Athens, Greece.*

Pescadillo was isolated as a mutation affecting embryonic development in zebrafish, and a mutant allele of the yeast gene results in growth arrest. In mammals disruption of its function leads to inhibition of embryonic growth. A number of reports show that pescadillo plays also a major role in ribosome biogenesis, oncogenic transformation and tumour progression, while interrupting its function results in cell cycle arrest. However, the biological function of the plant orthologue of pescadillo (*PESCADILLO*) is yet unknown. By exploiting the model system of *Zinnia* a previously contacted cDNA-AFLP screen identified more than 600 cDNA fragments that show altered transcription at specific times during the 48 hr of cell commitment and differentiation. One of the most interesting cDNAs, found to be differentially expressed at developmentally significant time points, encodes the plant orthologue of the zebrafish pescadillo protein (named *PESCADILLO*). Utilizing *Zinnia* and *Arabidopsis* as model systems we conducted a series of experiments in order to investigate the molecular, cellular and biological function of *PESCADILLO*. Semi quantitative RT-PCR experiments show that the gene is mainly expressed in dividing and/or differentiating cells. Promoter analysis using transgenic *Arabidopsis* plants show that expression is predominantly confined in the root and shoot apical meristems, the lateral root primordial and in reproductive tissues and cells such as pollen grains and ovules. Subcellular localization experiments using transgenic plants harbouring the chimerical *PESCADILLO*-YFP fusion protein show that protein is primarily localized in the nucleolus of the cells and at a less extent in the nucleus. Furthermore, the genetic analysis of the RNAi and T-DNA knock-out lines show that the plants display a dwarf-like phenotype with developmental defects primarily localized at the meristems, while SALK T-DNA mutants show reduced levels of the 28S ribosomal bands. Taken together, our results indicate that *PESCADILLO* is predominantly expressed in developing tissues and differentiating cells, providing a definite support for the correlation between the *PESCADILLO* protein and fundamental mechanisms like ribosome biogenesis, DNA replication and cell proliferation (cell cycle) control.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΤΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ

Ηλιάδου Α., Γαρμπής Σ.¹, Ευθυμιόπουλος Σ.

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 157 84
Πανεπιστημιούπολη, Ιλίσια.

¹Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Τδρμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών,
Σωράνου του Εφεσίου 4, 11527 Αθήνα.

Η νόσος Alzheimer χαρακτηρίζεται από την παρουσία αμυλοειδών πλακών στους εγκεφάλους των ασθενών. Κύριο συστατικό των πλακών αυτών είναι τα Αβ πεπτιδία μήκους 40 ή 42 αμινοξέων που προκύπτουν από την πρωτεολυτική επεξεργασία της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP) μέσω της συνδυασμένης δράσης της β- και της γ- εκκριτάσης. Παρόλο που η εμπλοκή της APP στην παθογένεση της νόσου Alzheimer είναι γνωστή εδώ και δεκαετίες, ο φυσιολογικός ρόλος της APP παραμένει σ'ένα μεγάλο βαθμό άγνωστος. Η μεγάλη συντηρητικότητα της APP κατά τη διάρκεια της εξέλιξης αλλά και ο μεγάλος βαθμός ομοιότητας της με τα άλλα δυο μέλη της υπερικογένειας της APP, την APLP-1 και APLP-2, υποδηλώνει τη σπουδαιότητα του φυσιολογικού της ρόλου. Η δομή της APP αλλά και η ομοιότητα της με τον υποδοχέα Notch όσον αφορά στη δομή, στην πρωτεολυτική διάσπαση και στη μεταγωγή σήματος στον πυρήνα, οδηγούν στην υπόθεση ότι η APP θα μπορούσε να λειτουργεί ως υποδοχέας, με τρόπο παρόμοιο με τον υποδοχέα Notch. Αν ισχύει αυτό, τότε η αναγνώριση πιθανών προδετών του εξωκυττάριου τμήματος της APP, όχι μόνο θα επιβεβαιώσει την παραπάνω υπόθεση, αλλά θα αποτελέσει και σημαντική προσέγγιση στην κατανόηση του φυσιολογικού ρόλου της πρωτεΐνης. Για το σκοπό αυτό, αρχικά υποκλωνοποιήθηκε το cDNA που κωδικοποιεί για το εξωκυττάριο τμήμα των ισομορφών APP751 και APP695 στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pcDNA4 myc/His A. Τα cDNAs της APP διαμιολύνθηκαν σε HEK293 κύτταρα με αποτέλεσμα την παραγωγή και έκκριση στο μέσο της καλλιέργειας των αντίστοιχων ισομορφών της APP που φέρουν στο καβόξυτελικό τους άκρο τους αντιγονικούς επίτοπους myc και sixHis. Με χρωματογραφία συγγενείας IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) από-μονώθηκε το εξωκυττάριο τμήμα της APP (APP_{ecd}) και επιβεβαιώθηκε η ορθότητα της αμινοξικής ακολουθίας με MALDI-TOF. Η APP_{ecd} χρησιμοποιήθηκε σε pull-down assays για την απομόνωση πιθανών προσδετών της APP_{ecd}. Τα δείγματα των πρωτεϊνών που κατακρατήθηκαν από την APP_{ecd} αναλύθηκαν μέσω ιονισμού με ηλεκτρονικασμό (ESI). Ανιχνεύθηκαν διάφορες πρωτεΐνες και η μελέτη συνεχίζεται για την ταυτοποίηση τους.

Αυτή η έρευνα χρηματοδοτήθηκε από τα προγράμματα του υπουργείου Παιδείας «Πυθαγόρας I & II», του Πανεπιστημίου Αθηνών «Καποδίστριας» και της Ευρωπαϊκής ένωσης «ΑΡΟΠIS».

**IDENTIFICATION OF LIGANDS OF THE AMYLOID PRECURSOR
PROTEIN USING MASS SPECTROMETRY****Eliades A., Garbis S.¹, Efthimiopoulos S.***Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, University of Athens,
15784 Panepistimioupolis, Ilisia.**¹Laboratory of Biotechnology, Foundation for Biomedical Research of the Academy of
Athens, 4 Soranou tou Efesiou str, 11527 Athens.*

Alzheimer's disease is characterized by the presence of amyloid plaques in the patients' brain. Plaques consist mainly of 40 to 42 aminoacid long amyloid β ($A\beta$) peptides that derive from the proteolysis of Amyloid Precursor Protein (APP) by β - and γ -secretase. The physiological role of APP is unknown. The high degree of conservation of APP during evolution and its high homology with the other two members of the APP superfamily, APLP-1 and APLP-2, underlies the significance of its physiological role. The APP structure and its similarity with Notch receptor in terms of structure, proteolytic processing and intracellular signaling in the nucleus, lead to the hypothesis that APP could also act as a receptor, in a manner similar to that of Notch. If this is true, then the identification of protein-ligands of the extracellular domain of APP will not just verify the above hypothesis, but it will also be a significant advancement for our understanding of the physiological role of this protein.

For this purpose, we first subcloned the cDNA coding for the extracellular domain of APP751 and APP695 isoforms in the pcDNA myc/His A plasmid vector. These cDNAs were transfected in HEK293 cells resulting in the production and secretion to the cell medium of the corresponding proteins carrying the myc and sixHis epitopes in the carboxyl-terminal domain. The APP extracellular domain (APPe_{cd}) was isolated using IMAC (Immobilized Metal Afinity Chromatography) and the aminoacid sequence was verified using MALDI-TOF. APPe_{cd} was then used in pull-down assays in order to isolate putative APP ligands. The protein samples that were retained by APPe_{cd} were analysed via Electrospray Ionisation (ESI). Various proteins were detected and research continues for their identification.

This research is funded by the Greek Ministry of Education grants "Pythagoras I & II", the University of Athens grant "Kapodistrias", European Grant APOPIS co-ordinated by the Verum foundation.

ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ G-ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΩΝ-ΕΚΤΕΛΕΣΤΩΝ

Θεοδωροπούλου Μ.Κ., Ελευσινιώτη Α.Α., Μπάγκος Π.Γ. και Σ.Ι. Χαμόδρακας

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 157 01

Οι G-πρωτεΐνες δρουν ως «διακόπτες» μεταγωγής σήματος από τον εξω-κυττάριο χώρο στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι G-πρωτεΐνες ενεργοποιούνται αρχικά από την αλληλεπίδρασή τους με τους αντίστοιχους υποδοχείς (GPCRs) και στη συνέχεια μεταφέρουν το μήνυμα σε μόρια-εκτελεστές. Οι G-πρωτεΐνες είναι ετεροτριμερείς και αποτελούνται από τις G α , G β και G γ υπομονάδες. Η ταξινόμηση των G-πρωτεϊνών σε τέσσερις ομάδες (G α s, G α i/o, G α q, G α 12) γίνεται βάση της α -υπομονάδας τους ενώ κάθε τύπος G-πρωτεϊνών αλληλεπιδρά με διαφορετικούς εκτελεστές. Πολλές πρωτεΐνες δρουν ως μόρια-εκτελεστές, όπως για παράδειγμα τουμπουλίνες, αδενυλικές κυκλάσες, κανάλια ιόντων, μικρές πρωτεΐνες που προσδένουν GTP και φωσφολιπάσες. Σε κάθε μονοπάτι μεταγωγής σήματος υπάρχουν και κάποιες άλλες σημαντικές ομάδες μορίων που παίρνουν μέρος, όπως οι ρυθμιστές σηματοδότησης μέσω G-πρωτεϊνών (RGSs) και οι scaffold πρωτεΐνες. Η ιδιαίτερη σημασία των GPCRs αντικατοπτρίζεται στο γεγονός ότι το 50% των σημερινών φαρμάκων έχουν ως στόχο τους συγκεκριμένους υποδοχείς. Η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ όλων των μορίων που λαμβάνουν μέρος στη μεταγωγή σήματος μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση τόσο της δράσης όσο και των παρενεργειών των φαρμάκων. Στη συγκεκριμένη μελέτη συγκεντρώνουμε στοιχεία για την αλληλεπίδραση μεταξύ G-πρωτεϊνών και μορίων εκτελεστών μέσα από εκτενή αναζήτηση στη βιβλιογραφία. Επίσης συγκεντρώνουμε πληροφορίες για τις πρωτεϊνικές ακολουθίες των μορίων-εκτελεστών από τη δημόσια βάση δεδομένων UNIPROT. Συγκεκριμένα ανασύρθηκαν 1791 πρωτεϊνικές ακολουθίες. Σκόπος μας είναι να χρησιμοποιήσουμε την πληροφορία για να επεκτείνουμε την ήδη υπάρχουσα βάση δεδομένων gpDB. Κατατάσσουμε τα μόρια-εκτελεστές σε οικογένειες, υποοικογένειες και τύπους με βάση τη λειτουργία τους, ενώ σκοπός μας είναι να συμπεριλάβουμε δεδομένα για την αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφόρων υποοικογενειών G-πρωτεϊνών και συγκεκριμένων τύπων μορίων-εκτελεστών. Τα δεδομένα αυτά, αναμένεται να είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στην προσπάθεια πρόγνωσης της αλληλεπίδρασης των G-πρωτεϊνών με τους αντίστοιχους εκτελεστές.

**STUDIES OF INTERACTIONS BETWEEN G-PROTEINS AND
THEIR EFFECTORS****Theodoropoulou M.C., Elefsinioti A.L., Bagos P.G.,
and S.J. Hamodrakas***Dept of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Athens 157 01*

G-proteins act as switches for signal transduction from extracellular space into the cell. G-proteins are initially activated by their interaction with the G-protein coupled receptors (GPCRs) and transmit the signal to a wide range of effectors. G-proteins form heterotrimers composed of $G\alpha$, $G\beta$ and $G\gamma$ subunits and, based on their α -subunit, are grouped in four types ($G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 12}$). Different types of G-proteins interact with different effectors. Many proteins act as effectors, such as tubulins, adenylate cyclases, ion channels, small GTP-binding proteins, phospholipases and many more. In each path of the signal transduction pathway there are some other important groups of molecules that take part, such as regulators of G-protein signaling (RGSs) and scaffold proteins. The great importance of GPCRs and the corresponding signal transduction pathways is indicated by the fact that almost 50% of the current prescription drugs target GPCRs. Understanding better the interactions between all the proteins that take part in signal transduction may help explain both actions and side effects of drugs. In this study we collect information about the interaction between G-proteins and their effectors by an extended literature search. We also collected sequence information concerning the effectors from the publicly available database UNIPROT. In particular 1791 sequences of effectors were retrieved from UNIPROT. We use this information to extend the already existing database gpDB. We also categorize the effectors into families, subfamilies and types based on their function. Our goal is to include data about the interaction between the different subfamilies of G-proteins and particular effector types. The data collected here, will also help us to design predictive algorithms concerning the interaction of G-proteins with their effectors.

**ΕΝΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΜΕ ΣΥΝΘΕΤΗ
ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΟΥ ΜΕΤΑΦΕΡΕΤΑΙ ΜΕΣΩ
ΘΗΛΥΚΩΝ ΚΑΙ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΓΑΜΕΤΩΝ ΣΤΟ ΜΥΔΙ *Mytilus
galloprovincialis***

Θεολογίδης Γ.¹, Ροδάκης Γ.Κ.² και Ε. Ζούρος¹

¹Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 714 09 Ηράκλειο Κρήτη,

²Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 15701 Αθήνα

Τα θηλυκά μύδια της οικογένειας Mytilidae μεταβιβάζουν το μιτοχονδριακό τους DNA (τύπος F) στους θηλυκούς και στους αρσενικούς απογόνους τους. Τα αρσενικά άτομα κληρονομούν έναν επιπλέον τύπο mtDNA από τον πατέρα τους (τύπος M), τον οποίο μεταβιβάζουν μόνο στους αρσενικούς απογόνους τους (ΔΜΚ: Διπλή Μονογονεϊκή Κληρονόμηση). Ορισμένα αρσενικά δεν περιέχουν γονιδίωμα τύπου M και χαρακτηρίζονται ως «μη-τυπικά». Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε διάφορα μη-τυπικά αρσενικά και διαπιστώσαμε ότι στη γονάδα τους απαντά ένα F-τύπου mtDNA, του οποίου η κύρια ρυθμιστική περιοχή (control region, CR) περιέχει επαναλαμβανόμενα στοιχεία M τύπου εντεθειμένα στην τυπική F αλληλουχία. Το μόριο αυτό το ονομάσαμε C (compound), σε αντιδιαστολή με το τυπικό F και το τυπικό M μόριο. Πέρα από τη ρυθμιστική περιοχή, το μόριο C διαφέρει από το F μόριο των σωματικών ιστών και στις πέντε κωδικές περιοχές που ελέγξαμε (Cytb, COIII, COI, ND5 and 16sRNA). Δεδομένου ότι το σωματικό mtDNA είναι μητρικής προέλευσης, η διαπίστωση ότι το C μόριο κυριαρχεί στη γονάδα ενώ στο σώμα κυριαρχεί το τυπικό F, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα μη-τυπικά αρσενικά κληρονομούν ένα τυπικό F μόριο από τη μητέρα τους και ένα C μόριο από τον πατέρα τους. Επανελέγχος ενός δείγματος ατόμων από πληθυσμούς της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας έδειξε ότι το μόριο C απαντάται και σε θηλυκά άτομα καθώς και στους σωματικούς ιστούς τυπικών αρσενικών (τα οποία φέρουν στη γονάδα τους το μόριο M), υποκαθιστώντας το μητρικής προέλευσης F μόριο. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι το γονιδίωμα C μεταβιβάζεται τόσο μέσω του σπέρματος, όσο και μέσω των αυγών.

Η παρούσα έρευνα χρηματοδοτήθηκε από τη Γ.Γ.Ε.Τ. (ΠΕΝΕΔ 01ΕΔ42) και το Marine Genomics Europe Network of Excellence.

A MITOCHONDRIAL GENOME WITH A COMPOUND CONTROL REGION THAT IS TRANSMITTED THROUGH FEMALE AND MALE GAMETES IN THE MUSSEL *Mytilus galloprovincialis***Theologidis I.¹, G. C. Rodakis² and E. Zouros¹**¹*Department of Biology, University of Crete, 714 09, Heraklion, Crete*²*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Athens, 175 01 Athens*

Female mussels of the family Mytilidae transmit their mitochondrial DNA (type F) to both male and female progeny. Males receive a second mtDNA type from their father (type M), which they transmit only to male progeny (DUI: Doubly Uniparental Inheritance). Some males appear to be “atypical” because they lack the M genome. In the present study, we examined several atypical males and found that in their gonad they contain an mtDNA molecule whose control region (CR) is made of tandemly repeated M-type elements inserted into the typical F sequence. We called this molecule C (compound) to distinguish it from the typical M and the typical F molecule. Apart from the control region, the C molecule differs from the somatic F molecule in all five coding regions examined (Cytb, COIII, COI, ND5 and 16sRNA). Given the maternal origin of the somatic mtDNA, the observation that the C molecule dominates the gonad, whereas the typical F dominates the somatic tissues, leads to the conclusion that the atypical males inherit one typical F molecule from their mother and one C molecule from their father. Reexamination of a sample of individuals from populations of the Mediterranean and the Black Sea reveals that the C genome is also found in females and in the somatic tissues of typical males (that contain the M genome in their gonads). These findings indicate that the C genome is transmitted both through the sperm and the eggs.

This research was funded by G.S.R.T. (PENED 01ED42) and the Marine Genomics Europe Network of Excellence.

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *BCL2L12*
ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ Η ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΜΕ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ**

Θωμαδάκη Ε., Φλώρος Κ. και Α. Σκορίλας

*Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, 15701 Αθήνα. Email: ascorilas@biol.uoa.gr*

Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι καρκινικές κυτταρικές σειρές υποβαλλόμενες στη δράση αντικαρκινικών φαρμάκων εμφανίζουν μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων, σχετιζόμενων με την πορεία απόπτωσης. Σχετικά πρόσφατα, ανακαλύφθηκε και κλωνοποιήθηκε το γονίδιο *BCL2L12* (Scorilas et al. *Genomics* 72: 217-221, 2001), που αποτελεί ένα νέο μέλος της *BCL2* οικογένειας των αποπτωτικών γονιδίων. Το *BCL2L12* χαρτογραφήθηκε στο γενετικό τόπο 19q13.3, πλησίον του ογκογονιδίου *RRAS*. Πρόσφατες μελέτες μας έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης του *BCL2L12* διαφέρουν στους διάφορους κυτταρικούς τύπους, ενώ το γονίδιο βρέθηκε να υπερεκφράζεται, σε επίπεδο mRNA, σε όγκους μαστού και ωοθήκης. Στόχο της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη έκφρασης, σε επίπεδο mRNA, του γονιδίου *BCL2L12* σε συνδυασμό με άλλα γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση (*BAX*, *BCL2*, *FAS*, Caspase-3), σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού, ωοθήκης και λευχαιμίας μετά από έκθεσή τους σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα όπως το etoposide, cisplatin, carboplatin και doxorubicin. Κυτταρικές σειρές προερχόμενες από διαφορετικούς τύπους καρκίνου αναπτύχθηκαν σε κατάλληλα καλλιεργητικά υλικά, παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων αντικαρκινικών φαρμάκων. Η διερεύνηση της ζωτικότητας των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο MTT και Trypan blue. Η φάση εκτέλεσης της αποπτωτικής διαδικασίας προσδιορίστηκε με την τεχνική ανίχνευσης της ενδονουκλεοσωμικής τμήσης του DNA (DNA laddering). Ολικό mRNA απομονώθηκε από τα κύτταρα και παρασκευάστηκε cDNA με την τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής (RT). Η έκφραση του *BCL2L12* καθώς και άλλων αποπτωτικών γονιδίων που μελετήθηκαν, σε επίπεδο mRNA, προσδιορίστηκε με συμβατική PCR χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές για το συγκεκριμένο γονίδιο, που είχαν σχεδιαστεί για το σκοπό αυτό. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-ακτίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικές μεταβολές, σε επίπεδο mRNA, του γονιδίου *BCL2L12*, ως απόκριση των διάφορων κυτταρικών σειρών σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα, οι οποίες ήταν εξαρτώμενες τόσο από το φάρμακο όσο και από το επαγόμενο αποπτωτικό μονοπάτι. Τα πειραματικά μας δεδομένα συνηγορούν στο ότι το γονίδιο *BCL2L12* μπορεί εν δυνάμει να χρησιμοποιηθεί ως νέος βιολογικός δείκτης ανταπόκρισης καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία.

Ευχαριστίες: Η παρούσα έρευνα χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα ΕΠΕΑΕΚ II στα πλαίσια του Έργου «Πυθαγόρας – Ενίσχυση ερευνητικών ομάδων στα Πανεπιστήμια» με χρηματοδότηση 75% από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και 25% από Εθνικούς Πόρους.

**EXPRESSION ANALYSIS AND STUDY OF *BCL2L12* GENE IN
CASES OF SENSITIVITY OR RESISTANCE OF CANCER CELLS
TO APOPTOSIS INDUCED BY ANTICANCER DRUGS****Thomadaki E., Floros C., and A. Scorilas**

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, 15701 Athens, Greece. E-mail: ascorilas@biol.uoa.gr

Experimental data have shown that cancer cell lines, after treatment with anticancer drugs, exhibit modulations in the mRNA expression levels of apoptosis-related genes. Recently, a new member of the *BCL2* family of the apoptosis related genes, *BCL2L12*, was discovered and cloned (Scorilas *et al. Genomics* 72: 217-221, 2001). It maps to chromosome 19q13.3 and is localized close to *RRAS* oncogene. Our preliminary studies have shown that the expression levels of the *BCL2L12* gene differ among different cell types. In addition it is overexpressed, at mRNA level, in breast and ovarian cancer tissues. The aim of the present study was to investigate the mRNA expression levels of *BCL2L12* in comparison with other apoptosis-related genes (*BAX*, *BCL2*, *FAS*, *Caspase-3*), in breast, ovarian and leukemic cancer cell lines after treatment with anticancer drugs, such as etoposide, cisplatin, carboplatin and doxorubicin. Cell lines derived from distinct cancer types were treated with specific anticancer drugs. The kinetics of cell toxicity were evaluated by the MTT and Trypan blue staining assays, whereas the execution phase of apoptosis induction was assessed by DNA laddering. Total RNA was extracted from cancer cells, two micrograms of which were reverse-transcribed into first-strand cDNA (RT). The expression levels of *BCL2L12* and other apoptosis-related genes, at mRNA level, were analysed by regular PCR, using gene specific primers. *β-Actin* was used as a reference gene. The results showed important modulations of *BCL2L12*, at the mRNA level, as a response of distinct cancer cell lines to chemotherapeutic drugs, which were dependent on both the drug used and the apoptosis pathway induced. Our experimental data show that *BCL2L12* may serve as a new potential molecular biomarker for predicting chemotherapy outcome in cancer.

Acknowledgements: The present research was supported by an "EPEAEK II" grant under the act "PYTHAGORAS – SUPPORT OF UNIVERSITY RESEARCH GROUPS", with co-funding of 75% from the European Social Fund and 25% from National Funds.

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΛΛΕΙΨΕΩΝ ΣΤΟ mtDNA ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ
ΥΠΟΓΟΝΙΜΩΝ ΑΝΔΡΩΝ: ΠΟΣΟ ΑΞΙΟΠΙΣΤΟ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ
ΕΡΓΑΛΕΙΟ ΕΙΝΑΙ Η ΜΕΘΟΔΟΣ PCR;**

Ιερεμιάδου Φ.¹, Μαργαρίτης Λ.Χ.¹, Ζούρος Ε.² και Γ.Κ. Ροδάκης¹

¹Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, ²Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μεταλλάξεις στο mtDNA σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις και πλήττουν κυρίως ιστούς με αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις. Η σχέση της μειωμένης κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, ένα από τα βασικότερα αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας, με ελλείψεις στο mtDNA, αποτελεί αντικείμενο έρευνας. Η παρούσα μελέτη επιδιώκει τον έλεγχο της παρουσίας μιας έλλειψης μεγέθους 4977 bp, με αυξημένη συχνότητα σε παθολογικές καταστάσεις και σε διάφορους ιστούς, στο σπέρμα υπογόνιμων και φυσιολογικών ανδρών. Η εφαρμογή της μεθόδου PCR με εκκινητές που σχεδιάστηκαν από εμάς αλλά και εκκινητές που αναφέρονται στις σχετικές μελέτες απέδειξε ότι: (α) τα ποσοστά ανίχνευσης της έλλειψης εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο ζεύγος εκκινητών, και (β) προϊόντα, που θα μπορούσε να εκληφθούν ως δείκτες παρουσίας ελλείψεων, είναι αποτέλεσμα μη ειδικής πρόσδεσης των εκκινητών σε πυρηνικές αλληλουχίες. Εφόσον οι διαφορές στα ποσοστά ανίχνευσης της έλλειψης δεν μπορούν να αποδοθούν σε πληθυσμιακούς παράγοντες, αλλά στο χρησιμοποιούμενο ζεύγος εκκινητών, υποθέτουμε ότι μπορεί να οφείλονται σε σφάλματα της PCR. Για τη διερεύνηση αυτής της υπόθεσης, κατασκευάσαμε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει την υπό μελέτη περιοχή ενός μορίου mtDNA χωρίς την έλλειψη. Η εφαρμογή σ' αυτό της διαγνωστικής PCR, οδήγησε στην ψευδή ανίχνευση ελλείψεων. Προτείνονται συγκεκριμένοι μοριακοί μηχανισμοί υπεύθυνοι για τη δημιουργία ελλείψεων *in vitro*. Η έρευνά μας αμφισβητεί την ορθότητα της διαγνωστικής PCR σε περιπτώσεις ελλείψεων mtDNA, με συνέπεια την ανάγκη αναθεώρησης, ορισμένων, τουλάχιστον, βιβλιογραφικών δεδομένων σχετικά με τη συχνότητα εμφάνισης ελλείψεων, όχι μόνο σε mtDNA σπέρματος αλλά γενικότερα σε περιπτώσεις παθολογικών καταστάσεων που αποδίδονται σ' αυτές.

*Ευχαριστούμε την εταιρία «Ιατρική έρευνα» για την εξασφάλιση βιολογικού υλικού.
Η έρευνα αυτή χρηματοδοτείται από τη Γ.Γ.Ε.Τ (ΠΕΝΕΔ 01ΕΔ42)*

DETECTION OF mtDNA DELETIONS IN SPERM OF SUB-FERTILE MEN: HOW ACCURATE DIAGNOSTIC PCR IS?**Ieremiadou F.¹, Margaritis L. H.¹, Zouros E.² και G.C. Rodakis¹***¹Faculty of Biology, University of Athens, ²Department of Biology, University of Crete*

Several mtDNA mutations, identified in the past few years, have proved to be associated with human diseases, including diminished fertility in men. In the present study we have investigated the presence of the “common” 4977 bp deletion in the sperm of 78 sub-fertile men using diagnostic PCR. The use of different primer sets (constructed by us or previously described in the literature) revealed (1) quantitative differences in the proportion of the “common” deletion and (2) the presence of by-products resulting from miss-annealing of the primers to nuclear DNA. Further more, the use of diagnostic PCR in an artificial plasmid DNA containing an undeleted 7 kb mtDNA sequence, resulted in the false detection of the “common” deletion. Our results raise questions about the accuracy of diagnostic PCR used for the detection of deletions in pathological conditions and highlights the need for revision of some literature data.

*The biological material has been provided by «Iatriki Erevna»
This research is funded by G.S.R.T. (PENED 01ED42)*

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΣΕ ΚΑΡΔΙΟΜΥΟΚΥΤΤΑΡΑ
ΕΝΗΛΙΚΟΥ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ**

**Ιορδανίδου Α.¹, Μαυροματίδης Β.¹, Αγγελίδου Ε.¹, Λάζου Α.²,
Χατζοπούλου-Κλαδαρά Μ.¹**

¹Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας και ²Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ.

Η θυρεοειδής ορμόνη (T3) έχει πολλαπλές επιδράσεις στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία της καρδιάς. Εκτός από την καλά χαρακτηρισμένη γενωμική δράση της, μέσω των πυρηνικών υποδοχέων, πρόσφατες ενδείξεις υποστηρίζουν την ύπαρξη μη γενωμικής δράσης, η οποία μπορεί να επιτυγχάνεται μέσω σηματοδοτικών οδών. Στη παρούσα εργασία διερευνάται αφενός η επίδραση της T3 σε σηματοδοτικές οδούς κινασών και αφετέρου η μεταγραφική δραστηριότητα των ισομορφών TRα1 και TRβ1 των θυρεοειδικών υποδοχέων παρουσία θυρεοειδικών αναλόγων με σκοπό την αναγνώριση ειδικών αναστολέων. Μετά από έκθεση καρδιομυοκυττάρων σε T3 σε διαφορετικούς χρόνους, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση των p38 MAPK, JNKs και PDK1 κινασών με μέγιστο στα 20' και των ERKs με μέγιστο στα 5'. Προσθήκη trisac και tetrac (10^{-7} M), παράγοντες που εμποδίζουν την είσοδο της T3 στα κύτταρα, ανέστειλε την παραπάνω ενεργοποίηση. Προτείνεται ότι η βραχυπρόθεσμη δράση της T3 σε καρδιομυοκύτταρα ενεργοποιεί διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια κινασών, πιθανόν μέσω ενός μη αναγνωρισμένου μεμβρανικού υποδοχέα. Παράλληλα, μελετήθηκε η μεταγραφική δραστηριότητα των ισομορφών TRα1 και TRβ1 των θυρεοειδικών υποδοχέων, μετά από παροδική επιμόλυνση σε κυτταρικές σειρές HeLa και CV-1 και ταυτόχρονη επίδραση με T3 και τα θυρεοειδικά ανάλογα δεσαιοθυλαμιοδαρόνη (DEA) και ντεμπουτυλδρονεδαρόνη (DBD). Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία της T3 προκαλεί αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας τόσο του TRα1, όσο και του TRβ1 υποδοχέων. Αντίθετα, παρουσία του DEA παρατηρείται μείωση της δράσης και των δυο TR υποδοχέων. Η παρουσία του DBD αναστέλλει επιλεκτικά τη δράση του TRα1, υποδεικνύοντας ότι δρα ως ειδικός αναστολέας.

Η έρευνα χρηματοδοτείται από το πρόγραμμα ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ

**STUDY OF GENOMIC AND NON-GENOMIC ACTION OF
THYROID HORMONE IN ADULT RAT CARDIOMYOCYTES****Iordanidou A.¹, Mavromatidis V.¹, Aggelidou E.¹, Lazou A.²,
Hadzopoulou-Cladaras M.¹***Department of Genetics, Development and Molecular Biology¹ and Department of
Zoology², School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki*

Thyroid hormone (T3) has multiple effects on physiology and pathophysiology of the heart. Apart of the well known genomic action of T3, mediated by nuclear receptors, recent evidence indicates that T3 can have a non-genomic action through the activation of signal transduction pathways. The aim of the study is to investigate the effect of T3 on kinase signaling cascades and on the other hand to examine the transcriptional activity of thyroid hormone receptors in the presence of thyroid hormone analogs, in order to recognize specific inhibitors. After exposure of cardiomyocytes to T3 at different time points, we observed activation of p38 MAPK, JNKs and PDK1 kinases with a peak at 20 min and activation of ERKs, with a peak at 5 min. Addition of triac and tetrac (10^{-7} M), agents that prevent T3 from entering the cells, blocked this activation. It is suggested that short-term action of T3 in cardiomyocytes activates different kinase cascades, possibly mediated through an unidentified membrane receptor. In parallel, we examined the transcriptional activity of TR α 1 and TR β 1 isoforms, after transient transfection in HeLa and CV-1 cell lines and treatment with T3 and its analogs desethylamiodarone (DEA) and debutyldronedarone (DBD). We observed that T3 causes an increase in transcriptional activity of both TR α 1 and TR β 1 receptors, whereas addition of DEA caused reduction. DBD selectively inhibits transcriptional activity of TR α 1, suggesting that this analog can be a specific inhibitor for this isoform.

The research is supported by PYTHAGORAS programme.

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΡΥΠΑΝΣΗΣ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
ΜΕ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΒΙΟΜΑΡΤΥΡΩΝ ΣΕ
ΙΣΤΟΥΣ ΤΟΥ ΣΑΛΙΓΚΑΡΙΟΥ *Eobania vermiculata***

Ττζιου Α., Ραφτοπούλου Ε., Δημητριάδης Β.Κ.

*Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο
Πανεπιστήμιο, 54124 Θεσσαλονίκη*

Με σκοπό τη διερεύνηση της εφαρμογής βιομαρτύρων ρύπανσης σε χερσαία οικοσυστήματα, εκτιμήθηκαν τα επίπεδα ρύπανσης στην περιοχή της Θεσσαλονίκης με τη χρήση συγκεκριμένων κυτταρικών παραμέτρων στον πεπτικό αδένα και την αιμόλεμφο του σαλιγκαριού *Eobania vermiculata*. Τα σαλιγκάρια συλλέχθηκαν από διαβαθμισμένες αποστάσεις από το εργοστάσιο φωσφορικών λιπασμάτων πλησίον του διυλιστηρίου ΕΚΟ Θεσσαλονίκης (20m, 700m) και από την οδική αρτηρία Αγίου Δημητρίου (5m, 20m, 150m), τον Οκτώβριο του 2005. Ως σταθμός ελέγχου επιλέχθηκε μία περιοχή της Έδεσσας στο νομό Πέλλης. Οι κυτταρικοί βιομαρτυρές που εξετάστηκαν ήταν α) η 'σταθερότητα της λυσοσωμικής μεμβράνης' (LMS) β) η 'μέθοδος κατακράτησης της χρωστικής neutral red' (NRR) γ) η 'συγκέντρωση των μεταλλοθειονινών' (MTs) δ) η 'δραστικότητα της ακετυλ-χολινεστεράσης' (AChE) και ε) η πυκνότητα όγκου (VDLP) και η αριθμητική πυκνότητα (NDLP) των ουδέτερων λιπιδίων. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν αυξημένα επίπεδα ρύπανσης στην οδική αρτηρία Αγίου Δημητρίου (με μέγιστο στα 5m), καθώς επίσης και στο εργοστάσιο φωσφορικών λιπασμάτων (με αυξημένα επίπεδα ρύπανσης και στους δύο σταθμούς δειγματοληψίας), σε σχέση με την περιοχή ελέγχου. Τα προηγούμενα αποτελέσματα εκφράστηκαν με στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των MTs και της VDLP, αναστολή της δραστικότητας της AChE, καθώς επίσης και μείωση των τιμών NRR και LMS. Τα αποτελέσματα της μελέτης, που πρέπει να θεωρηθούν ως προκαταρκτικά, δείχνουν ότι τόσο τα σαλιγκάρια όσο και οι παραπάνω βιομαρτυρές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία σε μελέτες βιοπαρακολούθησης της χερσαίας ρύπανσης.

**EVALUATION OF POLLUTION IN TERRESTRIAL ECOSYSTEMS
BY THE APPLICATION OF CELLULAR BIOMARKERS ON
TISSUES OF THE SNAIL *Eobania vermiculata*****Itziou A., Raftopoulou E., Dimitriadis V.K.***Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Aristotle University, 54124 Thessaloniki*

In order to investigate the application of pollution biomarkers in terrestrial ecosystems, the pollution levels of areas close to Thessaloniki city were estimated by examining certain cellular parameters in the digestive gland and the haemolymph of the snails *Eobania vermiculata*. The snails were collected from an industrial area (plant of phosphoric fertilizers near EKO) at distances 20m and 700m, as well as from an area close to a major road (Agiou Dimitriou) at distances 5m, 20m and 150m, in October 2005. Snails from Edessa (Northern Greece) were used as controls. The biomarkers applied were: a) the “lysosomal membrane stability test” (LMS) b) the “neutral red retention assay” (NRR) c) the content of metallothioneins (MTs) d) the activity of acetyl-cholinesterase (AChE) and e) the volume density (VDLP) and the numerical density (NDLP) of neutral lipids. The results showed increased pollution levels close to the road Agiou Dimitriou (maximum at 5m) and at the industrial area (increased pollution levels at both sampling stations), in contrast to the reference site. The increased pollution levels were expressed as statistically significant increase of MTs levels and VDLP, inhibition of AChE activity, as well as significant decrease of NRR and LMS. The results of the study, that should be considered preliminary, strengthen the use of snails, as well as the use of the previous biomarkers in biomonitoring studies of terrestrial pollution.

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΡΥΠΑΝΤΩΝ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΤΟΥ ΣΑΛΙΓΚΑΡΙΟΥ *Eobania vermiculata*, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΒΙΟΜΑΡΤΥΡΩΝ ΡΥΠΑΝΣΗΣ

Ττζιου Α., Ραφτοπούλου Ε., Δημητριάδης Β.Κ.

Τομέας Γενετικής Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 54124 Θεσσαλονίκη

Με σκοπό τη διερεύνηση της εφαρμογής βιομαρτύρων ρύπανσης σε χερσαία οικοσυστήματα, σαλιγκάρια *Eobania vermiculata* μελετήθηκαν στο εργαστήριο. Εξετάστηκε η απόκριση κυτταρικών βιομαρτύρων ρύπανσης (MTs: μεταλλοθειονίνες, AChE: ακετυλχολινεστεράση, NRR: κατακράτηση της χρωστικής neutral red, VDLP: πυκνότητα όγκου των ουδέτερων λιπιδίων, NDLP: αριθμητική πυκνότητα των ουδέτερων λιπιδίων) στον πεπτικό αδένα και την αιμόλεμφο των σαλιγκαριών μετά από έκθεση των ζώων στα βαρέα μέταλλα Cd ή Pb, αλλά και σε μίγμα οργανικών ρυπαντών (ανθρακενίου, ναφθαλενίου και φαινανθρενίου). Τα αποτελέσματα από τη μελέτη των ατόμων που εκτέθηκαν στους προηγούμενους τύπους ρυπαντών έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των MTs, κυρίως ύστερα από την επίδραση των βαρέων μετάλλων, αύξηση της VDLP και της NDLP, σημαντική αναστολή της δραστηριότητας της AChE, κυρίως ύστερα από την επίδραση του μίγματος οργανικών ρυπαντών, καθώς επίσης και σημαντική μείωση των τιμών NRR σε όλες τις περιπτώσεις. Τα προηγούμενα αποτελέσματα, τα οποία δείχνουν ότι οι βιομάρτυρες που εξετάστηκαν αποκρίθηκαν στην επίδραση των ρυπαντών στο εργαστήριο, ενισχύουν την προοπτική χρήσης των σαλιγκαριών σε προγράμματα βιοπαρακολούθησης της χερσαίας ρύπανσης.

EVALUATION OF THE EFFECT OF HEAVY METALS AND ORGANIC POLLUTANTS ON TISSUES OF THE SNAIL *EOBANIA VERMICULATA*, USING CELLULAR POLLUTION BIOMARKERS**Itziou A., Raftopoulou E., Dimitriadis V.K.***Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Aristotle University, 54124 Thessaloniki*

In order to investigate the use of pollution biomarkers in terrestrial ecosystems, snails *Eobania vermiculata* have been studied in the laboratory. The exposure of the snails to Cd or Pb, as well as to a mixture of organic pollutants (anthracene, naphthalin and phenanthrene) was examined by estimating cellular pollution biomarkers (MTs: metallothioneins; AChE: acetylcholinesterase; NRR: neutral red retention assay; VDLP: volume density of neutral lipids; NDLP: numerical density of neutral lipids) in the digestive gland and the haemolymph of the snails *Eobania vermiculata*. The results showed statistically significant increase of MTs levels, primarily after the exposure to heavy metals, increase of VDLP and NDLP, significant inhibition of AChE, mainly after the exposure to organic pollutants, as well as a decrease of NRR in all cases. The results reveal that the examined biomarkers responded to the influence of pollutants in laboratory studies and thus enhance the perspective of the use of snails in terrestrial pollution biomonitoring programmes.

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Arthrobacter* sp.**

**Καβακιώτης Κ., Καλλιμάνης Α., Περυσινάκης Α., Δραΐνας Κ.
και Α.Ε. Κούκκου**

*Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Χημικό Τμήμα Παν/μίου Ιωαννίνων, 45110
Ιωάννινα. E-mail: akukku@cc.uoi.gr*

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η απομόνωση μικροοργανισμών με την ικανότητα να αποδομούν PAHs, καθώς και η βιοχημική μελέτη ενζύμων της καταβολικής πορείας του φαινανθρενίου. Από περιοχή ρυπασμένη με κρεοζωτέλαιο, απομονώθηκε ένα νέο βακτηριακό στέλεχος, το Sphe3, με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, φαινανθρένιο. Το Sphe3 χαρακτηρίστηκε ως *Arthrobacter* sp. με βάση την ανάλυση του 16S rDNA, βιοχημικές δοκιμασίες, ποσοστό G+C % και λιπιδιακή ανάλυση. Η αποδόμηση του φαινανθρενίου προχωρά μέσω της πορείας του ο-φθαλικού. Με χρωματογραφικές μεθόδους έγινε μερικός καθαρισμός του ενζύμου της διοξυγονάσης του 1-υδροξυ-2-ναφθοϊκού οξέος (1-H-2-N). Το ένζυμο αυτό παρουσίασε *in vitro* εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, δεν απαιτούσε Fe (II) ή Fe(III) για την εμφάνιση δραστηριότητας και παρέμενε σταθερό (4 °C) για τουλάχιστον μία εβδομάδα. Οι κινητικές παράμετροι του ενζύμου ήταν: 1) βέλτιστη θερμοκρασία: 45 °C, 2) βέλτιστο pH: 9,0 και 3) K_M (mM): 0,35. Είναι σε εξέλιξη πειράματα απομόνωσης και καθαρισμού μέχρι ομοιογένειας του ενζύμου αυτού, με σκοπό την εύρεση της αμινοξικής του αλληλουχίας.

Η εργασία αυτή συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση, στα πλαίσια του προγράμματος με τίτλο «ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II», του προγράμματος ΕΠΕΑΕΚ II του 3^{ου} Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης του ΥΠ.Ε.Π.Θ., με χρηματοδότηση κατά 25% από εθνικούς πόρους και κατά 75% από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ).

**ISOLATION AND BIOCHEMICAL STUDIES OF A NEW
BACTERIAL STRAIN OF THE GENUS *Arthrobacter* sp.****Kavakiotis K., Kallimanis A., Perysinakis A., Drainas C., and A.I. Koukkou**

Section of Organic Chemistry and Biochemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110 Ioannina. E-mail: akukku@cc.uoi.gr

The aim of this research is the isolation of PAH degrading microorganisms and the biochemical studies of phenanthrene catabolic enzymes. A new PAH degrading bacterial strain Sphe3 was isolated from a creosote contaminated area using phenanthrene as sole source of carbon and energy. Sphe3 was characterised as *Arthrobacter* sp. based on 16S rDNA analysis, biochemical assays G+C % content and lipid analysis. Phenanthrene is degraded via o-phthalate. 1-hydroxy-2-naphthoate (1-H-2-N) dioxygenase was partially purified by chromatographic methods. It indicated in vitro specialization for the substrate, Fe(II) or Fe(III) was not required for its activity and it was stable (4 °C) for at least one week. The kinetic parameters of this enzyme were: 1) optimal temperature: 45 °C, 2) optimal pH: 9,0 and 3) K_M (mM): 0,35. Experiments for isolation and purification of this enzyme are in progress, in order to find its amino acid sequence.

This research was co-funded by European Union in the framework of the program "PYTHAGORAS II" of the :Operational Program for Education and Initial Vocational Training" of the 3rd Community Support Framework of the Hellenic Ministry of Education, funded by 25% from national sources and by 75% from the European Social Fund (ESF).

**ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΤΟΠΟΥ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟ-
ΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ
ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ *Bactrocera oleae***

Κακάνη Ε. και Κ. Ματθιόπουλος

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Παν/μιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, θεωρείται ένα από τα πιο καταστρεπτικά γεωργικά έντομα, δεδομένου ότι προκαλεί την πιο διαδεδομένη οικονομική ζημιά στην ελαιοπαραγωγή. Ο έλεγχος των πληθυσμών του δάκου στηρίζεται κυρίως στα χημικά εντομοκτόνα. Η επί δεκαετιών όμως αλόγιστη και συνεχής χρήση τους είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία και εξάπλωση της ανθεκτικότητας των εντόμων σε αυτά. Οι πιο σημαντικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας αφορούν κυρίως είτε την αυξημένη ικανότητα των εντόμων να αποικοδομούν τα εντομοκτόνα είτε τη δομική μεταβολή των στόχων όπου δρουν τα εντομοκτόνα μέσα στο έντομο. Ο περισσότερο μελετημένος μηχανισμός ανθεκτικότητας αφορά τη δομική μεταβολή του μορίου της ακετυλοχολινεστεράσης (AchE), η οποία αποτελεί στόχο δράσης της ομάδας των οργανοφωσφορικών. Η μεταβολή αυτή εκτιμάται ότι οφείλεται σε μεταλλάξεις που αλλάζουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Μέχρι στιγμής έχουν ανιχνευτεί δύο μεταλλάξεις που επηρεάζουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου στο δάκο. Οι μεταλλάξεις αυτές ανιχνεύονται σε όλους σχεδόν του φυσικούς πληθυσμούς του δάκου, ανεξάρτητα από τα επίπεδα ανθεκτικότητας που εμφανίζουν σε βιοδοκιμές. Το γεγονός αυτό προκαλεί την υποψία ύπαρξης και άλλων μεταλλάξεων είτε στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης είτε σε άλλους γονιδιακούς τόπους που ενέχονται στην ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Με τη βοήθεια δημοσιευμένων αλληλουχιών του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης απομονώσαμε μια σειρά φαγικών κλώνων γονιδιωματικής βιβλιοθήκης δάκου με σκοπό να διερευνήσουμε την οργάνωση του τόπου. Η μέχρι τώρα ανάλυση αποδεικνύει μια οργάνωση αντίστοιχη με εκείνη της *Drosophila melanogaster*, δηλαδή 10 εξόνια τα οποία παρεμβάλλονται από 9 ιντρόνια, με θέσεις ματίσματος και σχετικά μεγέθη ανάλογα στα δύο έντομα. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τη μεγάλη συντήρηση του γονιδιακού αυτού τόπου.

**ORGANIZATION OF THE ACETYLCHOLINESTERASE LOCUS
OF THE MOST IMPORTANT OLIVE FRUIT PEST, THE OLIVE
FLY *Bactrocera oleae*****Kakani E., and K. Mathiopoulos***Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa*

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is among the most important agricultural pests, since it causes the most serious economic damage in olive cultivation. Control of the insect is based mainly on chemical insecticides. The continuous and non-prudent use, however, has resulted in the development and spread of insecticide resistance. The most important resistance mechanisms involve either an increased capability of detoxification or the structural change of the insecticide target within the insect. The most well studied mechanism of resistance regards the structural change of acetylcholinesterase (AChE), which is the target of most organophosphate insecticides. This change is due to mutations that alter the active site of the enzyme. Till now, two such mutations have been identified in the olive fly. These mutations are detected in all natural populations, irrespective of their status of resistance, as this is measured by classical bioassays. This suggests either the presence of other mutations in the same locus or the involvement of a separate locus in the resistance. With the aid of published sequences of acetylcholinesterase we isolated a series of lambda phage clones from a genomic *B. oleae* library, in order to investigate the organization of this locus. The analysis to date has revealed an organization that is very similar to that of *Drosophila melanogaster*, that is, 10 exons that are intervened by 9 introns, with corresponding splicing sites and relative lengths in the two insects. This demonstrates the high degree of conservation of this genetic locus.

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ COUP-TF ΣΤΟ ΕΜΒΡΥΟ ΤΟΥ ΑΧΙΝΟΥ

**Καλαμπόκη Α., Παπαδημητρίου Σ., Πανουτσόπουλος Α.
και Κ. Φλυτζάνης**

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο 26500

Οι COUP-TFs (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factors) είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ανήκουν στην υπερικογένεια των υποδοχέων των στεροειδών/θυρεοειδών ορμονών. Μελέτες των COUP-TFs διαφόρων ειδών απέδειξαν ότι πρόκειται για εξαιρετικά συντηρημένα γονίδια που εκφράζονται κυρίως στο νευρικό σύστημα. Οι COUP-TFs παίζουν σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση της οργανογένεσης, της νευρογένεσης και της κυτταρικής διαφοροποίησης κατά την εμβρυική ανάπτυξη των οργανισμών. Για τη μελέτη της ρύθμισης του γονιδίου αυτού στον αχινό απομονώθηκε και αλληλουχήθηκε ανοδική περιοχή μεγέθους ~2000 bp. Ακολούθησε ο καθορισμός του σημείου έναρξης της μεταγραφής χρησιμοποιώντας 5' RACE. Προκειμένου να ελεγχθεί ο τρόπος ρύθμισης του γονιδίου COUP-TF, η ανοδική περιοχή κλωνοποιήθηκε σε φορέα που φέρει ως γονίδιο αναφοράς αυτό της GFP, που κωδικοποιεί την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, ανοδικά της οποίας υπάρχει ένας ασθενής υποκινητής ο Endo16 και ο οποίος από μόνος του δεν επηρεάζει την έκφραση της GFP. Ως εκ τούτου η έκφραση της GFP στα έμβρυα καθορίζεται από την παρουσία ιστοειδικών και χρονοειδικών ρυθμιστικών στοιχείων της ανοδικής περιοχής του COUP-TF. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν ελλείμματα της ανοδικής περιοχής που περιέχουν συνδυασμούς αλλά και απομονωμένα τμήματα τα οποία κλωνοποιήθηκαν επίσης ανοδικά του ασθενούς υποκινητή Endo16 και του γονιδίου αναφοράς GFP. Τα ελλείμματα αυτά εννούνται σε αυγά αχινού και η εκάστοτε έκφραση του γονιδίου αναφοράς GFP ανιχνεύεται σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης των διαγονιδιακών εμβρύων. Βάσει των αποτελεσμάτων κατασκευάσαμε ένα πρώτο μοντέλο ρύθμισης του γονιδίου COUP-TF. Η επάρκεια της ανοδικής αυτής περιοχής ελέγχεται με τη χρησιμοποίηση μεγαλύτερων ανοδικών τμημάτων (πέραν των 2kb) για την πιθανή ύπαρξη επιπλέον στοιχείων.

**TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE COUP-TF GENE IN
THE SEA URCHIN****Kalaboki L., Papadimitriou S., Panoutsopoulos A., and C.N. Flytzanis***Department of Biology, University of Patras*

COUP-TFs are transcription factors, which belong to the steroid-thyroid-retinoic acid receptor superfamily. Studies in a plethora of species have shown that COUP-TFs are extremely conserved genes preferentially expressed in the developing nervous system. They also play an important role in organogenesis, homeostasis and cellular differentiation in embryonic development. To study the transcriptional regulation of the sea urchin COUP-TF gene we cloned and sequenced a 2000bp upstream region and determined the transcription initiation site. This upstream region was inserted in a vector containing the reference green fluorescence protein gene (GFP) and the basal promoter of the sea urchin gene Endo16. The Endo16 promoter is unable to drive expression of the GFP gene without the presence of additional regulatory elements. Thus, GFP expression from the constructed vector depends on the regulatory sequences of the COUP-TF gene. In addition to this vector, a series of upstream deletions were also constructed, as well as insertions of isolated small fragments from the upstream region in front of the Endo16/GFP reference gene. All the various constructs were micro-injected in fertilized *P.lividus* eggs and resulting transgenic embryos were let developed to gastrula and pluteus stage. The results of this analysis will be presented in an initial regulatory model. Furthermore, to test whether there are more upstream cis-acting elements necessary for COUP-TF regulation, longer fragments (up to 6kb upstream) are inserted and tested into the Endo16/GFP vector.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ RNA ΣΙΓΗΣΗΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Καλαντίδης Κ.^{1,2*}

¹Ινστιτούτο Μορ. Βιολ. και Βιοσ/γίας, ΙΤΕ, Ηράκλειο, Κρήτη

²Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτη

Την τελευταία δεκαετία μια σειρά από σημαντικές ανακαλύψεις στον χώρο της βιολογίας του RNA έφεραν στο φώς έναν μέχρι τώρα άγνωστο μηχανισμό άμυνας αλλά και γονιδιακής ρύθμισης των ευκαρυωτικών οργανισμών. Ο μηχανισμός αυτός, γνωστός και ως RNA σίγηση, χαρακτηρίζεται από τον κεντρικό ρόλο που έχουν μικρά (21-25ντ), μέχρι τώρα άγνωστα, RNA μόρια. Ο μηχανισμός αυτός ενεργοποιείται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα από δίκλωνο RNA. Στα φυτά ο μηχανισμός αυτός αρκεί να επαχθεί σε ένα ή λίγα μόνο κύτταρα για να ενεργοποιηθεί ο μηχανισμός εξειδικευμένης ως προς την αλληλουχία καταστολής, διασυστηματικά, σε όλο τον οργανισμό. Οι παράγοντες που ρυθμίζουν και τελικά καθορίζουν την διασυστηματική σίγηση είναι μέχρι τώρα πολύ λίγο μελετημένοι. Με την βοήθεια διαγονιδιακών σειρών φυτών που υπερεκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP, μπορέσαμε να μελετήσουμε τις συνθήκες επαγωγής της διασυστηματικής σίγησης αλλά και παράγοντες που επηρεάζουν την μεταφορά του σιγητικού σήματος. Δημιουργήσαμε διαγονιδιακές σειρές που «αυθόρμητα» εκκινούν τον μηχανισμό της σίγησης διασυστηματικά αλλά και άλλες που αδυνατούν να μεταφέρουν το σιγητικό σήμα πέρα από λίγα γειτονικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα τις έρευνας αυτής αλλά και άλλων πτυχών της RNA σίγησης θα παρουσιαστούν σε αυτή την εργασία.

* Προσκεκλημένος ομιλητής

**UNDERSTANDING SYSTEMIC SPREAD OF RNA SILENCING IN
PLANTS (Title 2: The brave new world of RNA silencing)****Kalantidis K^{1,2*}***¹Inst. of Mol. Biol. & Biotech, FoRTH, Heraklion, Greece**²Department of Biology, University of Crete, Heraklion, Greece*

During the last decade there has been a rapid advancement of knowledge in the field of RNA biology. An RNA-mediated defence and regulatory mechanism that remained unknown in large, has been elucidated in most eucaryots. This mechanism termed RNA silencing, is characterised by the central role played by short (21-25nt) RNA molecules. It is now clear that this mechanism is efficiently induced by the introduction in the eukaryotic cell of double stranded RNA. In plants induction of RNA silencing in one or a few cells is enough to initiate a systemic spread of sequence-specific silencing of a gene throughout the organism. Factors influencing and eventually regulating systemic silencing are poorly understood. Using transgenic plants overexpressing the Green fluorescent Protein (GFP), we were able to study the conditions for systemic silencing induction and also factors influencing systemic spread. We generated transgenic lines that spontaneously initiate systemic silencing spread but also lines which were unable to spread silencing further than a dozen of neighbouring cells. Results of this research program and other aspects of RNA silencing are going to be presented and discussed.

* Invited speaker

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΜΕΤΑΦΟΡΕΑ Na^+/H^+ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Καλογιάννη Μ.*

Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Θεσσαλονίκη 54124, ΑΠΘ

Η οικογένεια των ανταλλακτών Na^+/H^+ (NHE) περιλαμβάνει 7 ισομορφές και λειτουργεί με ηλεκτρικά ουδέτερη ανταλλαγή του ενδοκυτταρικού H^+ με το εξωκυτταρικό Na^+ . Η μοναδική ισομορφή που εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους είναι η NHE1, που εδράζεται στην πλασματική μεμβράνη, όπου παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ενδοκυτταρικού pH (pHi) και στην ομοιόσταση του κυτταρικού όγκου. Η παρούσα ανακοίνωση αναφέρεται σε αποτελέσματα που προέρχονται από πειράματα σε μονοκύτταρα και ερυθροκύτταρα ανθρώπου, κύτταρα του μυδιού, σε ερυθροκύτταρα βατράχου καθώς και σε κυτταρική σειρά HEP-2. Εξωκυτταρικά σήματα (όπως οι ορμόνες αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη, ινσουλίνη, λεπτίνη και 17-β οιστραδιόλη, βαρέα μέταλλα, γλυκόζη και οσμωτικό stress) που μεσολαβούν μέσω ποικίλων επιφανειακών υποδοχέων, ρυθμίζουν τη δράση της NHE1 μέσω δικτύων σήμανσης. Μερικά μόρια που συμμετέχουν σε αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια είναι εκτός από τη NHE, η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), το cAMP, οι ελεύθερες ρίζες (ROS), η MAPK p42/44. Επώαση κυττάρων μυδιού με βαρέα μέταλλα οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων των ROS καθώς και την καταστροφή του DNA, με συμμετοχή της NHE και της PKC. Επιπλέον, κατεργασία των κυττάρων ώστε να διατηρούνται σε υψηλή συγκέντρωση οι ROS, προκάλεσε αύξηση του pHi, ενώ η παρουσία αντιοξειδωτικών ουσιών προκάλεσε μείωση του pHi, που οφειλόταν στη μεσολάβηση της NHE. Επίσης αναστολή της NHE σε καρκινικά κύτταρα οδήγησε σε απόπτωση με ενεργοποίηση της κασπάσης-3, θραυσματοποίηση του DNA και αναστολή της φωσφατιδυλοσερίνης. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν τον σημαντικό ρόλο της NHE στο σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγεται από ορμόνες και βαρέα μέταλλα. Μέσω της επίδρασης της NHE στην ομοιόσταση του pHi και του κυτταρικού όγκου καθώς και στον κυτταροσκελετό, η NHE ρυθμίζει ένα αριθμό από κυτταρικές συμπεριφορές, συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής προσκόλλησης, της μετανάστευσης, της έκφρασης του CD36, της σύνθεσης του DNA και της απόπτωσης.

* Προσκεκλημένη ομιλήτρια

Na⁺/H⁺ EXCHANGER ROLE IN CELL SIGNALING**Kaloyianni M.****Laboratory of Animal Physiology, Zoology Department, School of Biology, Faculty of Science, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, 54124*

The Na⁺/H⁺ family of ion exchangers includes seven isoforms that function in an electroneutral exchange of intracellular H⁺ for extracellular Na⁺. The only ubiquitously expressed isoform is NHE1, which is located at the plasma membrane, where it plays a critical role in intracellular pH (pHi) and cell volume homeostasis. The present review is referred on results obtained from experiments conducted on human monocytes and erythrocytes, frog erythrocytes, mussel cells as well as on HEp-2 cell line. Extracellular signals (as the hormones adrenaline, noradrenaline, insulin, leptin, 17-β estradiol, heavy metals, glucose and osmotic stress) mediated by diverse classes of cell-surface receptors, regulate NHE1 activity through distinct signaling networks. Molecules that are involved in these signaling pathways are, apart from NHE, protein kinase C (PKC), cAMP, reactive oxygen species (ROS), MAPK p42/44. In particular, incubation of mussel cells in the presence of heavy metals caused a significant increase in ROS levels as well as DNA damage, with the involvement of NHE and PKC. Furthermore, cell treatment to maintain high ROS levels, resulted in pHi increase, while the presence of antioxidants caused a decrease in pHi, which was due to NHE. In addition, inhibition of NHE in HEp-2 cells resulted in apoptosis through activation of caspase-3, DNA fragmentation and inhibition of phosphatidylserine. Our results show the key role of NHE in the signaling pathway induced by hormones and heavy metals. Through NHE effects on pHi and cellular volume homeostasis as well as on cytoskeleton, NHE regulates a number of cell behaviors, including adhesion, migration, CD36 expression, DNA synthesis and apoptosis.

* Invited speaker

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ CoCl_2 ΣΤΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΗΣ p38- MAPK ΣΤΗΝ ΚΑΡΔΙΑ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΙΟΥ *Rana Ribunda*

Καλπαχίδου Θ., Αγγελή Ι.Κ., Γαϊτανάκη Κ. και Ι. Μπέης

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Πανεπιστιμιούπολη,
157 84 Αθήνα

Το μονοπάτι σηματοδότησης της οικογένειας των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (MAPKs) αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά μονοπάτια ενδοκυτταρικής μεταγωγής σήματος. Ειδικότερα, η υποοικογένεια της p38 MAPK έχει βρεθεί ότι ενεργοποιείται στην καρδιά των αμφιβίων από διάφορες στρεσογόνες συνθήκες, μεταξύ των οποίων το οξειδωτικό και το μηχανικό στρες. Το χλωριούχο κοβάλτιο (CoCl_2) έχει βρεθεί ότι προσομοιάζει υποξικές συνθήκες και προκαλεί την παραγωγή ελεύθερων ριζών (ROS) σε ποικίλες κυτταρικές σειρές. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του CoCl_2 στη σηματοδότηση των MAPKs, σε εμποτισμένη απομονωμένη καρδιά του αμφιβίου *Rana ridibunda*. Με ανοσοδοκιμασία κατά Western ειδικά για τη φωσφορυλιωμένη μορφή της p38-MAPK προσδιορίστηκε η μέγιστη ενεργοποίησή της στα 500 μM συγκέντρωσης CoCl_2 . Παράλληλα, στην ίδια συγκέντρωση, παρατηρήθηκε μέγιστη ενεργοποίηση της MAPKAPK2 και της Hsp27, που αποτελούν αντίστοιχα, άμεσο και έμμεσο υπόστρωμα της p38-MAPK. Στις ίδιες συνθήκες βρέθηκε επίσης ότι ενεργοποιούνται τα μονοπάτια των ERKs και των JNKs. Μέγιστη ενεργοποίηση της p38-MAPK ανιχνεύθηκε στα 15 λεπτά επίδρασης με 500 μM CoCl_2 . Αντίστοιχο ήταν και το χρονικό πρότυπο φωσφορυλίωσης της Hsp27. Παρουσία των αντιοξειδωτικών ενώσεων Trolox ή/και λιποϊκού οξέος παρατηρήθηκε μείωση της ενεργοποίησης της p38-MAPK μετά από επίδραση με CoCl_2 (500 μM για 15 λεπτά). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν για την MAPKAPK2 και την Hsp27. Μελετήθηκαν τέλος τα επίπεδα mRNA (RT-PCR) του γονιδίου του ANF, η μεταγραφική ρύθμιση του οποίου έχει βρεθεί ότι συνδέεται με το μονοπάτι της p38-MAPK. Επίδραση με CoCl_2 προκάλεσε αύξηση των επιπέδων mRNA του ANF, ενώ παρουσία των αντιοξειδωτικών ενώσεων, τα μετάγραφα μειώθηκαν περίπου στο επίπεδο του μάρτυρα.

Η εργασία αυτή χρηματοδοτήθηκε από ερευνητικά προγράμματα του ΕΛΚΕ

EFFECTS OF CoCl₂ ON P38-MAPK SIGNALING PATHWAY IN THE PERFUSED AMPHIBIAN (*Rana ridibunda*) HEART**Kalpachidou Th., Aggeli I.K., Gaitanaki C., and I. Beis***Department of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, National & Kapodistrian University of Athens, Panepistimioupolis, 157 84- Athens*

Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) constitute one of the most important intracellular signaling pathways. In particular, the p38-MAPK subfamily is known to be activated under various stress conditions, such as mechanical or oxidative stress. On the other hand, cobalt chloride (CoCl₂) has been shown to mimic hypoxic responses in various cell lines and cause overproduction of reactive oxygen species (ROS). In the current study we investigated the effect of CoCl₂ on MAPKs signaling pathways (focusing mostly on p38-MAPK) in the perfused *Rana ridibunda* heart. Western immunoblot analysis of the phosphorylated thus activated form of p38-MAPK revealed that maximum phosphorylation was attained at 500 μM of CoCl₂. A similar profile was observed for MAPKAPK2 and Hsp27 phosphorylation levels (direct and indirect p38-MAPK substrates, respectively). In addition, CoCl₂ induced a strong activation of the ERKs and JNKs pathways. Analysis of p38-MAPK phosphorylation time course showed that the kinase reached its peak within 15 minutes of treatment with 500 μM of CoCl₂. Similar results were obtained for Hsp27 phosphorylation. In the presence of the antioxidants Trolox or/and Lipoic acid, p38-MAPK CoCl₂-induced phosphorylation was attenuated (500μM CoCl₂ for 15 minutes). Compliant results were obtained for Hsp27 and MAPKAPK2 phosphorylation profiles. Furthermore, mRNA levels of the ANF gene, a hormone whose transcriptional regulation has been shown to be related to the activated p38-MAPK cascade, were examined (RT-PCR). CoCl₂ treatment significantly increased ANF mRNA levels, whereas, in the presence of antioxidants, the transcripts returned to basal levels.

This work was funded by ELKE grants.

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΛΛΕΙΨΗΣ ΕΔΑΦΙΚΗΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ
ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΙ ΣΤΙΣ ΑΠΟΔΟΣΕΙΣ ΣΕ ΒΙΟΜΑΖΑ ΓΛΥΚΟΥ
ΣΟΡΓΟΥ [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]**

**Καμπράνης Α., Πιστική Α., Θεοδωρακοπούλου Α., Κούβελος Α.,
Αγγελόπουλος Κ.**

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πανεπιστημιούπολης Ρίον 26500

Μελετήθηκε η επίδραση τριών επιπέδων εδαφικής υγρασίας σε παραμέτρους αύξησης και στις αποδόσεις καλλιέργειας γλυκού σόργου [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Οργανώθηκε ένα πλήρως τυχαιοποιημένο πείραμα πεδίου 3Χ3 στο Πανεπιστήμιο της Πάτρας το 2005. Το πείραμα περιελάμβανε τρία επίπεδα άρδευσης Ψ₁: 512 mm, Ψ₂: 306 mm, Ψ₃: 232) με 3 επαναλήψεις για κάθε χειρισμό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μείωση της ποσότητας άρδευσης είχε ως συνέπεια τη μείωση της εδαφικής υγρασίας σε ένα βάθος από 0-30 εκατοστά στο χώρο της ριζόσφαιρας. Αυτό είχε περαιτέρω ως συνέπεια τη μείωση των αποδόσεων της ολικής βιομάζας της καλλιέργειας. Η αποδόσεις για το πρώτο επίπεδο άρδευσης ήταν B_{ψ1}: 10,67±0,097 κιλά/m², για το δεύτερο B_{ψ2}: 9,57±0,16 κιλά/m² και το τρίτο B_{ψ3}: 3,99±0,42 κιλά/m². Η έλλειψη εδαφικής υγρασίας επηρέασε την παραγωγικότητα της ολικής βιομάζας κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των φυτών της καλλιέργειας. Επίσης η έλλειψη υγρασίας στο έδαφος λόγω της μειωμένης άρδευσης επηρέασε και το δείκτη φυλλικής επιφάνειας (LAI). Οι αντίστοιχες τιμές του LAI για τα τρία επίπεδα άρδευσης 110 ημέρες μετά τη σπορά ήταν L₁: 3,6, L₂: 2,34 L₃: 2,4.

**THE EFFECT OF SOIL MOISTURE DEFICIENCY ON GROWTH
AND YIELDS IN SWEET SORGHUM BIOMASS *Sorghum bicolor*
(L.) Moench****Kampranis A., Pistiki E., Theodorakopoulou A., Kouvelas A.,
Aggelopoulos K.***Department of biology, University of Patras, Panepistimioupolis Rion 26500*

The effect of 3 irrigation levels on soil moisture, sweet sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] growth and biomass yields was investigated. A field experiment in a complete randomized design conducted at the University of Patras agricultural experiment station in 2005. The 3 irrigation levels were Ψ_1 : 512 mm, Ψ_2 : 306 mm, Ψ_3 : 232 mm. 3 replications per treatment were applied. The results shown that decreasing the irrigation water resulted a decline in soil moisture in soil depth 0-30 cm of the rizosphere. The decrease in soil moisture resulted a decline in crop biomass yields. The crop biomass yields found out B_{Ψ_1} : $10,67 \pm 0,097$ κιλά/m², B_{Ψ_2} : $9,57 \pm 0,16$ κιλά/m² and B_{Ψ_3} : $3,99 \pm 0,42$ κιλά/m² respectively. Biomass productivity during the crop development was also affected by soil moisture deficiency. The decrease in soil moisture also affected crop leaf area index (LAI). 110 days after sown the values of LAI, found out L_1 : 3,6, L_2 : 2,34 and L_3 : 2,4 respectively for the three irrigation levels.

**ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟ-
ΜΥΚΗΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ *Rhizoctonia solani* ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ
ΧΗΜΙΚΗΣ ΦΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ
ΕΝΩΣΕΩΝ**

**Κανινή Γ.Σ.¹, Ράμφου Σ.¹, Ρούσσης Β.², Χατζηνικολάου Δ.¹,
Κατσίφας Ε.Α.¹ και Α.Δ. Καραγκούνη¹**

¹Τομέας Βοτανικής, Αθήνα Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 15781 Αθήνα

²Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής,
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 15781 Αθήνα

Η σημασία της χρήσης μικροοργανισμών ως παράγοντες βιοελέγχου είναι μελετημένη και αποδεδειγμένη. Δύο μικροβιακά στελέχη, απομονωμένα από δύο διαφορετικά ελληνικά ενδαιτήματα και χαρακτηρισμένα μέσω της ανάλυσης της αλληλουχίας του 16s rDNA ως αντιπροσώποι του γένους *Streptomyces*, επιλέχθηκαν εξαιτίας της ικανότητας τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*. Η επιλογή έγινε μέσω *in vitro* δοκιμασίας ανταγωνισμού. Επιπρόσθετα, η αντιμυκητιακή δραστηριότητα των δύο επιλεγμένων Στρεπτομυκήτων εξετάστηκε *in vivo* και αποδείχτηκε ότι διατηρούν την αντιμυκητιακή τους δράση προωθώντας την ανάπτυξη φυτών φασολιάς σε μολυσμένο από *Rhizoctonia solani* χώμα. Επιπλέον, διερευνήθηκε η χημική φύση των αντιμυκητιακών παραγόντων που παράγονται από τους επιλεγμένους Στρεπτομύκητες. Προέκυψε ότι τα βιοενεργά συστατικά είναι σταθερά δεδομένου ότι μπορούν να διατηρούν τον αντιμυκητιακό χαρακτήρα τους για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την παραγωγή τους. Επίσης αποδείχθηκε ότι οι επιλεγμένοι μικροοργανισμοί δεν απαιτούν την παρουσία μύκητα-στόχου στο περιβάλλον τους για να παράγουν τους αντιμυκητιακούς παράγοντες. Δηλαδή η ανασταλτική ικανότητά τους δεν είναι επαγόμενη. Τα παραπάνω αποτελέσματα ενθαρρύνουν προσπάθειες για συστηματική χρήση των επιλεγμένων Στρεπτομυκήτων σε καλλιέργειες για τον έλεγχο των συμπτωμάτων “damping-off” εναλλακτικά της χρήσης χημικών μέσων.

**INVESTIGATION OF THE ANTAGONISTIC RELATIONSHIP
BETWEEN INDIGENOUS *Streptomyces* ISOLATES AND *Rhizoctonia
solani* AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE BIO-
ACTIVE SUBSTANCES**

**Kanini G.S.¹, Ramfou S.¹, Roussis V.², Xatzinikolaou D.¹,
Katsifas E.A.¹, and A.D. Karagouni¹**

¹ Microbiology Lab, Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis 157 81 Athens, Greece

² Division of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, Department of
Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis 157 81 Athens, Greece

The importance of using microorganisms as biocontrol agents is well understood. Two microbial strains, isolated from two different Greek habitats and characterized by 16s rDNA analysis as *Streptomyces* sp, were selected according to their ability to inhibit the soil pathogen *Rhizoctonia solani*. The selection was done by *in vitro* antagonism bioassay. These experiments showed the antifungal ability of the tested microbes as well as the strength of their activity. Additionally, the antifungal activity of the two selected *Streptomyces* stains was examined *in vivo*; data demonstrated that they could preserve their strong antifungal action by promoting the growth of bean plants in *Rhizoctonia solani* affected soil. Further experiments were done in order to investigate the chemical nature of the antifungal diffusible agents which are produced from the selected *Streptomyces* isolates. These experiments showed that the bioactive substances are stable as they can keep their antifungal character for a long time after their production. Furthermore, it was proved that the selected bacteria didn't need the presence of the fungi-target in their environment in order to produce the antifungal substances. All these provide the chemical stability and the non-induced production of the Streptomycetes' bioactive substances. The above results encourage the attempts of the systematic use of the selected *Streptomyces* strains in crops for the control of "damping-off" symptoms alternatively to the use of chemical media.

ΣΚΕΛΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΥΕ ΝΕΚΡΟΤΑΦΕΙΟΥ ΤΩΝ ΤΡΙΑΝΤΑ ΡΟΔΟΥ

Καούρης Χ., Πετρουτσά Ε.Ι., Μαρκέτου Τ.*, και Σ.Κ. Μανώλης

*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπων, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών*

** Εφορεία Προϊστορικών & Κλασσικών Αρχαιοτήτων, Αρχαιολογικό Μουσείο Ρόδου*

Η θέση Τριάντα Ρόδου υπήρξε πολύ σημαντική σε ολόκληρη την εποχή Χαλκού. Αρχαιολογικά χαρακτηριστικά της θέσης ανά περίοδο, έδωσαν σημαντικές πληροφορίες για την περίοδο γενικά και ειδικά για την γένεση, την ακμή και το τέλος του Κυκλαδικού πολιτισμού.

Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται η σκελετική μελέτη του νεκροταφείου που χρονολογείται στην Ύστερη εποχή Χαλκού (ΥΕ), με σκοπό την συμπλήρωση των αρχαιολογικών δεδομένων, μέσω της Ανθρωπολογικής έρευνας. Η δημογραφία της θέσης, η κατανομή των δύο φύλων και των ανηλίκων και οι παθολογικές περιπτώσεις, θα φωτίσουν πολιτιστικές, κοινωνικές και πολιτισμικές πτυχές της συγκεκριμένης κοινωνίας. Παράλληλα, η ανάλυση σταθερών ισοτόπων Άνθρακα και Αζώτου, για τη μελέτη της διατροφής θα εμβαθύνει στα παραπάνω ζητήματα και πιθανόν να δώσει επιπλέον στοιχεία που αφορούν, τυχόν διαφορές μεταξύ των ατόμων, των δύο φύλων και ίσως την αιτιολογία κάποιων παθολογικών περιπτώσεων.

*Η παρούσα μελέτη χρηματοδοτήθηκε από Ερευνητικό Πρόγραμμα «Καποδίστριας» της
Επιτροπής Ερευνών του ΕΚΠΑ (προς τον Σ.Κ.Μ)*

**SKELETAL AND DIETARY STUDY OF THE LATE BRONZE AGE
CEMETERY, TRIADA AT RHODES ISLAND, GREECE**

Kaouris C., Petroutsas E., Marketou T.*, and S.K. Manolis

*Department of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, National & Kapodistrian
University of Athens, Panepistimiopolis 15784 Athens, Greece*

** Ephorate of Prehistoric & Classical Antiquities, Archeological Museum of Rhodes*

The site Triada at Rhodes Island became very important during Greek Bronze Age, since the archaeological studies of the site, in its sub-period, provided information valuable for the generation, the prosperity and the end of the Aegean civilization. In this study we present the skeletal material of the cemetery that is dated and belong to Late Bronze Age, in order to give complementary elements to those provided from the Archaeological one. The demography of the site, the distribution of males and females, as such of adults and sub-adults and the pathological cases will enlighten the cultural and social structure of the specific society. Additionally, Stable Carbon and Nitrogen Isotope analysis will be presented with a view to reconstruct the dietary habits of the population. These results will also be used for the investigation of possible differences between gender and of the etiology pathological cases based on nutrient deficiencies.

*This research was funded by "Kapodistrias" Research Project of the Special Research
Account (N.K.U.A.) (to S.K.M.)*

**ΘΗΡΕΥΣΗ ΕΠΙ ΤΩΝ ΔΕΚΑΠΟΔΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΩΝ ΤΩΝ
ΚΟΚΚΙΝΩΝ ΓΑΡΙΔΩΝ ΤΩΝ ΒΑΘΙΩΝ ΝΕΡΩΝ *Aristaeomorpha
foliacea* (RISSO, 1827) ΚΑΙ *Aristeus antennatus* (RISSO, 1816)**

Καπίρης Κ.

*Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων, Αγ.
Κοσμάς, Ελληνικό – 167 77, Αθήνα.*

Οι βιολογικοί πόροι των βαθιών νερών της Ελλάδας άρχισαν να ερευνώνται πρόσφατα. Μια πληθώρα επιστημονικής γνώσης έχει ήδη συλλεχθεί όσον αφορά, τουλάχιστον, τη λεκάνη του Ιονίου, πάνω στα βαθιά νερά. Τα δύο είδη των κόκκινων γαρίδων των βαθιών νερών (*Aristaeomorpha foliacea*, *Aristeus antennatus*) (400-800 μ) εμφανίζονται σε όλο το Ιόνιο πέλαγος σε σημαντικές ποσότητες. Το γεγονός αυτό μας επιτρέπει να διατυπώσουμε την ελπίδα της ανάπτυξης μιας Ελληνικής αλιείας στα βαθιά νερά, λαμβάνοντας υπόψη τη γνώση της συμπεριφοράς αυτών στην αλιευτική πίεση και τις κοινωνικο-οικονομικές παράμετρους που συσχετίζονται με την αλιεία αυτή. Η παρούσα μελέτη εξετάζει τη συμμετοχή των δεκαπόδων Καρκινοειδών στη δίαιτα των κόκκινων γαρίδων. Τα δείγματα συλλέχθηκαν στο ΒΑ. Ιόνιο Πέλαγος, σε 12 μηνιαίες δειγματοληψίες (1996-1997) και εξετάστηκαν 703 στομάχια αρσενικών και 621 θηλυκών ατόμων *A. foliacea* και 150 στομάχια αρσενικών και 477 θηλυκών ατόμων *A. antennatus*. Ο προσδιορισμός τους βασίστηκε κύρια σε υπολείμματα των γναθικών, βαδιστικών και κολυμβητικών εξαρτημάτων τους. Συνολικά, προσδιορίστηκαν 22 ταξινομικές ομάδες δεκαπόδων στα στομάχια των γαρίδων που εξετάστηκαν. Τα δεκάποδα κατείχαν το 1,41% και το 2,52% της σχετικής αφθονίας των αρσενικών και θηλυκών ατόμων της *A. foliacea* και το 3,97% και 1,72% της σχετικής αφθονίας των αρσενικών και θηλυκών ατόμων της *A. antennatus*. Μελετάται η εποχιακή κατανομή των δεκαπόδων στα στομάχια των δύο ειδών, ανά φύλο και ανά μέγεθος γαρίδας. Τα είδη που αναγνωρίστηκαν είναι χαρακτηριστικά των μεσαίων ζωνών βάθους (500-700 m) και τα πλέον άφθονα ήταν τα γένη των γαρίδων *Plesionika sp.*, *Pasiphaea sp.* και καβούρια της οικ. Gragonidae.

**PREDATION ON CRUSTACEAN DECAPODS OF DEEP
WATER RED SHRIMPS *Aristaeomorpha foliacea* (RISSO, 1827)
AND *Aristeus antennatus* (RISSO, 1816)**

Kapiris K.

*Hellenic Centre for Marine Research, Institute of Marine Biological Resources, Ag.
Kosmas, Hellinikon, 167 77, Athens*

The biological resources of Greek deep waters have recently begun to study. A lot of scientific knowledge already has been collected regarding these waters, at least, for the Greek part of the Ionian Sea. The two species of red shrimps (*Aristaeomorpha foliacea*, *Aristeus antennatus*) are abundant in the whole Ionian Sea in important quantities. Recently, an unexploited and potentially exploitable stock was reported off the Greek coast of the Ionian Sea, which make allows us to formulate the hope of growth of a Greek fishery in deep waters, taking into consideration the knowledge of behavior of these in the fishing pressure and the socio-economic parameters that are connected with this fishery. The present study examines the attendance of Crustacean decapods in the diet of both red shrimps. The samples were collected in the NE Ionian Sea, in 12 monthly samplings (1996-1997). In totally, 703 stomachs of males and 621 of females' individuals of *A. foliacea* and 150 stomachs of males and 477 of females individuals of *A. antennatus* were examined. Their identification was mainly based on mandible's remains coming from the mandible, the pereopods and the pleiopods of the decapods. Globally, were determined 22 taxa of decapods in the shrimps' stomachs. These possessed the 1,41% and the 2,52% of relative abundance of male and female individuals of *A. foliacea* and 3,97% and 1,72% of relative abundance of male and female individuals of *A. antennatus*. The seasonal distribution of decapods in the shrimps' stomachs per sex and per individual's size was studied. The identified decapods found are characteristic taxa of the intermediate depths (500-700 m) in the area and the most abundant were the shrimps *Plesionika sp.*, *Pasiphaea sp.* and the family Gragonidae (crabs).

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΙΤΩΣΗ

Karakose E.^{1,2}, Σεραφειμίδης Ι.¹, Διαλλινός Γ.¹, και U.Tazebay²

¹Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, Αθήνα

²Bilkent University, Faculty of Science, 06800 Ankara, Turkey

Εντοπίσαμε μια νέα πρωτεΐνη, την MiAP (Mitosis Associated Protein), η οποία πιστεύουμε ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της μίτωσης. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την MiAP εντοπίστηκε αρχικά σε κύτταρα θηλαστικών, σε μη-συσχετιζόμενη μελέτη γειτονικού γονιδίου. Η MiAP είναι εξαιρετικά συντηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και παρ'όλο που δεν παρουσιάζει κάποιο μοτίβο αναγνωρισμένης λειτουργίας, έχει ομοιότητες με πρωτεΐνες που σχετίζονται με χρωματίνη. Επιπλέον, η πρωτεΐνη MiAP έχει ιδιαίτερα υψηλό βασικό χαρακτήρα, έχει αλληλουχίες πυρηνικής τοπολογίας (NLS) και πιθανόν να υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως φωσφορυλίωση. Πειράματα σε κύτταρα μαστικού αδένου (MCF -7) έδειξαν ότι η τοπολογία της πρωτεΐνης MiAP σε μη-μιτωτικά κύτταρα είναι κυτταροπλασματική, ενώ κατά τη διάρκεια της μίτωσης αυτή συμπίπτει με συμπυκνωμένα μεταφασικά χρωμοσώματα. Τα επόμενα πειράματα εκτελέστηκαν στο ομόλογο του MiAP στον οργανισμό *Aspergillus nidulans*, ο οποίος αποτελεί πρότυπο γενετικό σύστημα για μελέτες κυτταρικού κύκλου. Μελετήσαμε την τοπολογία της χιμαιρικής MiAP -GFP πρωτεΐνης και παράλληλη χρώση πυρήνων με DAPI. Εντοπίσαμε την MiAP κυρίως στο κυτταρόπλασμα και περιπυρηνικά.. Αρχικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι η υπερέκφραση της MiAP, μέσω ισχυρού υποκινητή, επιταχύνει τον ρυθμό αύξησης του οργανισμού και επηρεάζει τη μορφολογία των πυρήνων. Προτεραιότητα αποτελεί η κατασκευή και ο χαρακτηρισμός μη λειτουργικού ως προς την πρωτεΐνη MiAP στελέχους *Aspergillus*. Προκαταρκτικές ενδείξεις πιθανολογούν πως το *miaP* είναι γονίδιο ζωτικής σημασίας. Εναλλακτικές μέθοδοι “ελεγχόμενης απενεργοποίησης” του γονιδίου είναι σε εξέλιξη. Το knock-out στέλεχος θα χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη γενετικών και μοριακών αλληλεπιδράσεων σε στελέχη φυσικού τύπου ή μεταλλαγμένα ως προς γονίδια «κλειδιά» κυτταρικού κύκλου (*nimA5*, *bimE7*, *sudD7*).

**CHARACTERISATION OF A NOVEL MITOSIS ASSOCIATED
PROTEIN IN A MODEL FUNGAL SYSTEM****Karakose E.^{1,2}, Serafimidis I.¹, Diallinas G.¹, and U. Tazebay²**

¹*Faculty of Biology, Department of Botany, University of Athens, Panepistimioupolis, 15781, Athens,* ²*Bilkent University, Faculty of Science, 06800 Ankara, Turkey*

We have identified a new protein, MiAP (Mitosis Associated Protein), which we believe is involved in mitotic regulation. The gene encoding MiAP was first discovered in mammalian cells, in an unrelated study of *cis*-acting transcriptional elements of a neighbouring gene. MiAP is extremely conserved in eukaryotes from mammals through to fungi, and although it bears no clearly recognizable domains, it similarities to chromatin-associated proteins. Moreover, MiAP is very basic, it appears to have a Nuclear Localisation Signal (NLS) and it is also predicted to go through post-translational modifications that may include Ser/Thr or Tyr phosphorylation. Initial experiments on mammary gland cells (MCF-7) revealed that MiAP is cytoplasmic in non-mitotic cells, whereas it colocalizes with condensed chromosomes during mitosis. Subsequent experiments were performed on the homologue of MiAP in *Aspergillus nidulans*, an acclaimed genetic model organism for cell-cycle studies. We investigated the localization of MiAP-GFP and parallel staining nuclei with DAPI. In wild-type cells and several cell-cycle mutants indicated that MiAP is mostly cytoplasmic and often perinuclear. Preliminary observations suggest that over-expression of the protein leads to faster growth rates and elongated and irregularly shaped nuclei. We are currently attempting to knock out *MiAP* in *Aspergillus*. Preliminary evidence suggests that *MiAP* might be essential gene. Alternative methods for conditional “silencing” of *MiAP* will be discussed. Once a knock-out strain is available, this will be used to investigate its genetic and molecular interactions in wild-type and “key” cell division mutants (*nimA5*, *bimE7*, *sudD7*).

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ

**Καρακώστα Α.*, Κλεόπα Μ.*, Μαυροφρύδη Ο.*
και Π. Παπαζαφείρη**

*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών*

Η κυτταρική επιβίωση και η απόπτωση διαμεσολαβούνται εν μέρει από το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-Akt ενώ, συχνά, οι αλλοιώσεις της $[Ca^{2+}]_i$ αντιπροσωπεύουν απόκριση πρώτου βαθμού στην υποξία και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε μετέπειτα γεγονότα όπως, τροποποίηση των σηματοδοτικών μηχανισμών και της γονιδιακής έκφρασης. Στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση του ασβεστίου στην ενεργοποίηση της Akt και του HIF1α σε τρία κυτταρικά συστήματα : 1) B103 ή B35, τα οποία εκφράζουν λειτουργικούς υποδοχείς GABA_A και επομένως, μπορούν να λειτουργήσουν σαν αποδέκτες των ευεργετικών επιδράσεων των νευροστεροειδών 2) A431 και 3) MCF7 κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν χαμηλό ποσοστό επιβίωσης παρουσία αιθερικών φωσφολιπιδίων και εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα HIF1α. Όταν διερευνήθηκαν οι επιδράσεις των νευροστεροειδών στα κύτταρα B103 ή B35 σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία του κυτταροτοξικού Α-β πεπτιδίου, η ενεργοποιημένη Akt ανιχνεύθηκε σε μικρές ποσότητες, χωρίς διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Αντίθετα, η έκφραση των υποδοχέων GABA_A αυξήθηκε, γεγονός που υποδηλώνει μεγαλύτερη δυνατότητα ελέγχου της εισροής Ca²⁺. Επομένως, τα κύτταρα αυτά φαίνεται ότι δεν στηρίζονται στην ενεργοποίηση της Akt κατά την επαγωγή της επιβίωσης. Όσον αφορά στα άλλα συστήματα μελέτης, ο HIF1α παρουσιάζει ένα πρότυπο έκφρασης που εξαρτάται από τη συγκέντρωση και τη διάρκεια επώασης με τους προς μελέτη παράγοντες. Σε όλες πάντως τις περιπτώσεις, τα αιθερικά φωσφολιπίδια προκαλούν μαζική και παρατεταμένη εισροή ιόντων ασβεστίου και καταστρέφουν τη δυνατότητα των ενδοκυττάρων αποθηκών ασβεστίου να συμμετέχουν στη κυτταρική σηματοδότηση. Η επίδραση αυτή συνοδεύεται από μείωση της ενεργοποιημένης Akt και αναστρέφεται πλήρως παρουσία EGTA. Επομένως, φαίνεται ότι η ενεργοποίηση της Akt συνδέεται άμεσα με την είσοδο ασβεστίου ενώ εξαρτάται και από το τρόπο με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτή η είσοδος.

- *Ισότιμη συμμετοχή
- Χρηματοδοτήθηκε από τη ΓΓΕΤ, Κοινοπραξίες Επαν, έργα ΦΠ5 και ΥΒ39
- Ευχαριστούμε τη Μαρία Ξυλούρη για τη συμμετοχή της σε μερικά πειράματα

THE EFFECT OF CALCIUM ON CELL SURVIVAL MECHANISMS**Karacosta L.* , Kleopa M.* , Mavrofridi O.* , and P. Papazafiri***Department of Animal and Human Physiology, School of Biology, Faculty of Sciences,
National and Kapodistrian University of Athens*

The elevation of cytoplasmic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) is related to cell damage induced by stress conditions. Cellular functions, related to cell survival and apoptosis, are partially mediated by the PI3K-Akt signalling pathway. On the other hand, changes in $[Ca^{2+}]_i$, usually, represent the first degree response of many cell types to hypoxia and play an important role to downstream events, like modulation of signal trasduction mechanisms and gene expression. Finally, it seems that the activation of Akt induces the stabilization and accumulation of the transcription factor, HIF-1a, which is induced under hypoxic conditions. In the present study we investigated the effect of calcium on Akt and HIF-1a activation in three cellular systems: 1) neuroblastoma cells B103 or B35, that express functional GABA_A receptors that can be modulated by neurosteroids, which are closely related with the inhibition of calcium ions influx, 2) A431 and 3) MCF7 human cells which show a decreased rate of cell survival in the presence of ether phospholipids (anti-cancer compounds) and express the transcription factor HIF-1a. When we examined the possitive effects of the neurosteroids on neuroblastoma cells under hypoxic conditions or in the presence of the cytotoxic A-beta peptide, small amounts of the activated form of Akt kinase were detected with no significant differences among the treatments. In contrast, neurosteroid treatment increases the expression of $\alpha 1$ and $\beta 2$ subunits of the GABA_A receptors, indicating a greater potential for Ca^{2+} influx regulation. Thus, B103 and B35 cells seem not to depend on Akt activation during conditions of survival induction. In the A431 and MCF7 cellular systems we found that HIF-1a displays a time and dose dependent expression pattern in the presence of the test compounds. In all cases, ether phospholipids cause a massive and long term Ca^{2+} influx and also abolish the potential of intracellular calcium stores in cell signaling. This effect is accompanied by a decrease in Akt phosphorylation. EGTA, an extracellular calcium chelator was found to completely reverse the negative effect on Akt activation. These findings strongly suggest that Akt activation is directly associated with Ca^{2+} influx and depends on the the influx pathway which leads to intracellular calcium elevation.

- **Equal contribution.*
- *Funded by GSRT, Κοινοπραξίες Επαν, έργα ΦΠ5 και ΥΒ39.*
- *The contribution of Maria Xilouri is kindly acknowledged.*

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ
PSEUDOMONAS sp. ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗ ΡΥΠΑΣΜΕΝΩΝ
ΑΠΟ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΗ ΕΔΑΦΩΝ**

**Καραμπίκα Ε.¹, Ντάντος Α.¹, Καλλιμάνης Α.¹, Πηλίδης Γ.²,
Δραΐνας Κ.¹, Κούκκου Α.Ε.¹**

¹Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας,

²Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,
45110 Ιωάννινα, E-mail: akukku@cc.uoi.gr

Ένας από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους αποκατάστασης εδαφών ρυπασμένων με πετρελαιοειδή είναι η βιοαποδόμηση κατά την οποία μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τους ρυπαντές ως θρεπτικά υποστρώματα. Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη αποδόμησης πετρελαίου σε υγρές καλλιέργειες και έδαφος από ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα *Pseudomonas* sp. Για την απομόνωση μικροοργανισμών που αποδομούν πετρέλαιο, με την μέθοδο του εμπλουτισμού, δείγματα εδάφους (10 g), από περιοχή ρυπασμένη με πετρελαιοειδή, επαναιωρήθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό (MM) M9 (100 ml) και πετρέλαιο (1000 ppm). Απομονώθηκε ένα βακτηριακό στέλεχος (Spret), το οποίο με βάση την ανάλυση της αλληλουχίας 16S rDNA και των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (FAME) χαρακτηρίστηκε ως *Pseudomonas* (99%) με πλησιέστερο ανάλογο το *P. aeruginosa*. Για την ακινητοποίηση, κύτταρα Spret αναμείχθηκαν με μίγμα 2% αλγινικού νατρίου – 2% αμύλου και το μίγμα μεταφέρθηκε στάγδην σε CaCl₂ 0.1 M. Τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν με διάλυμα NaCl 0.9% - γλυκερόλης 5% και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C. Η βιοαποδόμηση του πετρελαίου σε υγρές καλλιέργειες και έδαφος χρησιμοποιώντας ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα μελετήθηκε αεριοχρωματογραφικά και είχε ως αποτέλεσμα την κατά 86%, 83%, 81% και 75% απομάκρυνσή του αντίστοιχα. Τα κύτταρα εντός των σφαιριδίων διατηρούν τη βιωσιμότητα τους και την ικανότητα αποδόμησης τουλάχιστον για δέκα μήνες. Ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα του στελέχους Spret καταβολίζουν πετρέλαιο αποτελεσματικά και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποκατάσταση ρυπασμένων με πετρελαιοειδή εδαφών.

Χρηματοδότηση: ΠΕΝΕΔ 2001 (ΓΤΕΤ)

**ISOLATION AND IMMOBILIZATION OF *PSEUDOMONAS* sp.
FOR THE BIOREMEDIATION OF PETROL CONTAMINATED
SOILS****Karabika E.¹, Dados A.¹, Kallimanis A.¹, Pilidis G.², Drainas C.¹,
Koukkou A.I.^{1*}**¹*Sector of Organic Chemistry and Biochemistry, Department of Chemistry,*²*Department of Biological Application and Technologies, University of Ioannina, 45110
Ioannina, Greece*** fax: +30-26510-47832, e-mail: akukku@cc.uoi.gr*

One of the best approaches to restoring contaminated soils is to make use of microorganisms able to degrade toxic compounds in a bioremediation process. The objective of this study was the investigation of the biodegradation of petrol by free and entrapped cells of *Pseudomonas* sp. in liquid cultures and in soil. The entrapment of cells is an efficient way to protect microorganisms against harsh environmental conditions. Bacteria able to grow on petrol were isolated from a petrol contaminated soil by enrichment cultures in M9 MM (100 ml) supplemented with trace elements (1000 µl/100ml) in which petrol (1000 ppm) was added as a sole carbon and energy source. A bacterial strain, Spet, capable of growing on petrol as sole carbon and energy source was isolated and it was identified as closest to *Pseudomonas aeruginosa* based on 16S rDNA sequence and fatty acids analysis. Cells grown on petrol were mixed with solution 2% alginate sodium –2% starch and the mixture was dropped into CaCl₂ solution 0.1 M using a pipette. The mixture was allowed to stand at room temperature for one hour, the beads were collected by gentle centrifuge, washed with NaCl 0.9% and glycerol 5% and stored at 4 °C. The biodegradation of petrol in liquid cultures and soil was monitored using free and entrapped cells by GC and resulted in 86%, 83 %, 81% and 75% degradation after 16 and 20 days respectively. Cells in gel beads maintained their viability and degrading ability for at least ten months. The bacterial strain Spet appears to be a promising candidate for environmental restorations both as free and entrapped cells.

This work was supported financially by PENED 2001 (GSRT)

**ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΑΚΡΟΑΣΠΟΝΔΥΛΩΝ
ΚΟΙΝΩΝΙΩΝ ΣΤΑ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΑ ΕΠΟΧΙΚΑ ΛΙΜΝΙΑ ΤΗΣ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΚΡΗΤΗΣ**

Καραούζας Ι., Δημητρίου Η., Γκρίτζαλης Κ. και Ν. Σκουλικίδης

Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών, Ινστιτούτο Εσωτερικών Υδάτων. 46.7 χλμ
Αθηνών – Σουνίου, Τ.Χ 712, 19 013, Ανάβυσσος, Αττική

Μακροασπόνδυλοι οργανισμοί που αποικούν εποχικά λιμνία ζουν σε πολύ απρόβλεπτα, ευαίσθητα και ασταθή οικοσυστήματα. Τα εποχικά λιμνία πλημ-μυρίζουν με ακανόνιστη περιοδικότητα τον χειμώνα και ξηραίνονται το καλοκαίρι έχοντας σαν επακόλουθο την θνησιμότητα των ειδών που κατοικούν σε αυτά. Οι τρεις κύριες στρατηγικές που οι οργανισμοί αναπτύσσουν για να επιβιώνουν σε τέτοιες συνθήκες είναι η ανθεκτικότητα, η αλλαγή του βιολογικού τους κύκλου και η μετανάστευση. Τα Μεσογειακά Εποχικά Λιμνία (ΜΕΛ) ανήκουν στους προστατευόμενους οικοτόπους προτεραιότητας (3170*, NATURA), έχουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά και συναντιούνται κυρίως στις Μεσογειακές χώρες. Αυτή η μελέτη έχει ως σκοπό να εξετάσει τις μακροασπόνδυλες κοινωνίες που αποικούν τα ΜΕΛ τις Δυτικής Κρήτης, όπου έχουν καταγραφεί τα περισσότερα από κάθε άλλη περιοχή της χώρας (17%). Μακροασπόνδυλοι οργανισμοί συλλέχθηκαν από τρεις περιοχές ΜΕΛ: Ελαφονήσι (2 λιμνία), Φαλάσαρνα (2 λιμνία) και Ομαλό (1 λιμνίο). Η συλλογή έγινε την χειμερινή περίοδο χρησιμοποιώντας απόχη με πλαίσιο σε σχήμα παραλληλόγραμμου με διαστάσεις 0.25 x 0.25 εκ. και με δίκτυο μεγέθους 500 μm. Συνολικά συλλέχθηκαν 16 διαφορετικά είδη που ανήκουν στις οικογένειες των Κολεοπτέρων (Hydrophilidae, Dytiscidae, Geotrupidae και Staphylinidae), Καρκινοειδών (Ostracoda), Τριχοπτέρων (Limnephilidae), Γαστερόποδων (Planorbidae), Διπτέρων (Chironomidae, Psychodidae, Tipulidae), Ετερο-πτέρων (Corixidae) και Κολλεμβόλων (Poduridae). Διαφορετικές βενθικές κοινωνίες βρέθηκαν σε όλα τα λιμνία των εξεταζόμενων περιοχών ΜΕΛ ακόμα και σε αυτά με πανομοιότυπα χαρακτηριστικά (π.χ. φυτικές κοινωνίες, ενδიაτήματα κ.α).

**A PRELIMINARY ASSESSEMENT OF THE MACRO-
INVERTEBRATE COMMUNITIES INHABITING MEDITER-
RANEAN TEMPORARY PONDS OF WESTERN CRETE****Karaouzas I., Dimitriou E., Gritzalis K., and N. Skoulikidis***Hellenic Centre for Marine Research, Institute of Inland Waters
46.7 km Athens-Sounion Av., PO BOX 712, 190 13 Anavissos, Attica, Greece*

Macroinvertebrate species inhabiting temporary ponds live in highly fragmented and unpredictable habitats. Temporary ponds are irregularly flooded in winter by rainwater and dry out in summer resulting to mortality of species. The three main evolved strategies by which invertebrates survive in temporary ponds are physiological tolerance, life history modification and migration. Mediterranean Temporary Ponds (MTPs) are a priority freshwater habitat type (3170*, NATURA 2000), that have the aforementioned characteristics and are mostly encountered in Mediterranean countries. The aim of this study is to examine the macroinvertebrate communities inhabiting the MTPs of Western Crete Island, which has the highest presence of MTPs from any other region of the country (17%). Macroinvertebrates were collected from three MTP sites namely Elafonisi (2 ponds), Falasarna (2 ponds) and Omalos (1 pond). Sampling was carried out during the winter season using a rectangular hand net of 0.25 m x 0.25 m with a mesh size of 500- μ m nytex screen. Overall, 16 species were collected belonging to the families of the Coleoptera order (Hydrophilidae, Dytiscidae, Geotrupidae and Staphylinidae), Crustacea (Ostracoda), Trichoptera (Limnephilidae), Gastropoda (Planorbidae), Diptera (Chironomidae, Psychodidae, Tipulidae), Heteroptera (Corixidae) and Collembola (Poduridae). All ponds within the assessed MTP sites comprised of distinct macroinvertebrate communities even those with similar habitat composition (e.g. plant communities, substrate etc.).

**ΤΟ ΜΟΤΙΒΟ «ΥΠΟΓΡΑΦΗ» ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ NAT/NCS2
ΣΤΗΝ ΠΕΡΜΕΑΣΗ ΥΓΦΟ ΤΗΣ *E. COLI*: Π. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ
ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ Q324, N325, G327, T332, G333**

Καρατζά Π. και Ε. Φριλίγγος

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Ιατρική Σχολή, Ιωάννινα 45110

Η περμεάση YgfO, ένας ειδικός και υψηλής συγγένειας συμμεταφορέας ξανθίνης:H⁺ της *E. coli*, αδυνατεί να μεταφέρει ουρικό οξύ, υποξανθίνη, άλλες πουρίνες ή ουρακίλη και αδυνατεί να αναγνωρίσει ανάλογα ξανθίνης με ογκώδεις υποκαταστάτες στις θέσεις 7 ή 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου όπως 7- ή 8-μεθυλοξανθίνη. Άλλες ομόλογες περμεάσες πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2, από Gram-θετικά βακτήρια ή από τον ασκομύκητα *Aspergillus nidulans* και άλλους μύκητες, έχει δειχθεί ότι εμφανίζουν λεπτές διαφορές στην εξειδίκευση αναγνώρισης προσδετών και υποστρωμάτων, εμπίπτοντας γενικά σε τρεις κατηγορίες: (α) περμεάσες που μεταφέρουν μόνο ουρικό οξύ (όπως η PucJ του *B. subtilis*), (β) περμεάσες που μεταφέρουν τόσο ουρικό όσο και ξανθίνη και δεν έχουν αυστηρούς περιορισμούς ως προς τους υποκαταστάτες στη θέση 8 του ιμιδαζολικού δακτυλίου (όπως η UapA του *A. nidulans*) και (γ) περμεάσες που μεταφέρουν μόνο ξανθίνη και όχι ουρικό και δεν αναγνωρίζουν ανάλογα με υποκαταστάτες στη θέση 8 (όπως η YgfO της *E. coli*). Βάσει πειραμάτων στο σύστημα του *A. nidulans*, για τον καθορισμό της εξειδίκευσης υποστρωμάτων και της λειτουργίας της διόδου μεταφοράς πουρινών φαίνεται ότι είναι σημαντική μία εξαιρετικά συντηρημένη αλληλουχία 10 καταλοίπων (θέσεις 324-333 στην YgfO), που ονομάστηκε μοτίβο «υπογραφή» της οικογένειας NAT/NCS2 (NAT signature motif). Για να κατανοήσουμε τον ρόλο των συντηρημένων καταλοίπων του μοτίβου «υπογραφή» στον μηχανισμό μεταφοράς και εξειδίκευσης υποστρωμάτων της YgfO, εφαρμόσαμε εκτενή σημειακή μεταλλάξη, αντικαθιστώντας την Gln324 με Asn, Glu, Pro, Ala ή Cys, την Asn325 με Asp, Gln, Ser, Thr, Cys ή Ala, την Gly327 με Ala, Pro ή Cys, την Thr332 με Asn, Ala, Asp ή Cys και την Gly333 με Cys, Arg ή Lys. Τα μεταλλάγματα αυτά αναλύθηκαν ως προς την ενεργότητα μεταφοράς [³H]ξανθίνης και τον ανταγωνισμό της πρόσληψης ξανθίνης από μία σειρά άλλων πουρινών και συνθετικών αναλόγων τους. Οι αναλύσεις μας δείχνουν ότι η Gln324 είναι απαραίτητη για την υψηλή συγγένεια δέσμευσης και μεταφοράς ξανθίνης, η Asn325 είναι αναντικατάσταση στον μηχανισμό της ενεργού μεταφοράς, η Gly327 δεν είναι ουσιαστικής σημασίας για την ενεργό μεταφορά ή τον καθορισμό της εξειδίκευσης, ενώ οι Thr332 και Gly333 αποτελούν σημαντικούς καθοριστές του ιδιαίτερου προφίλ αναγνώρισης προσδετών της YgfO.

Η έρευνα αυτή χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα «Ηράκλειτος» του Υπουργείου Εθνικής Παιδείας μέσω του 3^{ου} Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

**THE NAT/NCS2 SIGNATURE MOTIF IN THE YGFO PERMEASE
OF *E. COLI*: II. ROLE OF CONSERVED RESIDUES Q324, N325,
G327, T332, G333****Karatza P., and S. Frillingos***Laboratory of Biological Chemistry, University of Ioannina Medical School, Ioannina
45110*

YgfO permease is a specific, high-affinity, xanthine: H⁺ symporter from *E. coli*, that cannot transport uric acid, hypoxanthine, uracil or recognize any xanthine analogue with bulky substituents at position 7 or 8 of the imidazol ring. Characterized, purine-specific members of the ubiquitous NAT/NCS2 transporter family fall into three categories: (a) uric-acid specific transporters (like PucJ of *B. subtilis*), (b) uric-acid transporters that can also transport xanthine and recognize xanthine substituents at imidazol position 8 (like UapA of *A. nidulans*) and (c) xanthine-specific transporters that do not recognize position-8 analogues (like YgfO of *E. coli*). Experiments with UapA in the ascomycote transporter system have shown that the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif, a conserved 10-residue sequence of NAT/NCS2 transporters, is important to define function and selectivity of the purine translocation pathway. To understand the contribution of the key conserved residues of the NAT motif to the mechanism and ligand recognition profile of YgfO, positions Gln324, Asn325, Gly327, Thr332 and Gly333 were subjected to extensive site-directed mutagenesis and mutants were analyzed for active transport, kinetics and inhibition of [³H] xanthine uptake by a series of purines and synthetic analogues. Our mutant library included individual replacements of Gln324 with Asn, Glu, Pro, Ala or Cys, of Asn325 with Asp, Gln, Ser, Thr, Cys or Ala, of Gly327 with Ala, Pro or Cys, of Thr332 with Asn, Ala, Asp or Cys, and of Gly333 with Cys, Arg or Lys. Analysis of these mutants indicates that Gln324 is critical for high affinity uptake and ligand recognition, Asn325 is fully irreplaceable with respect to active xanthine transport, Gly327 is not essential for either active xanthine transport or specificity, while Thr332 and Gly333 are important determinants of the ligand specificity profile.

This research was co-funded by the European Union in the framework of the program "Heraklitos" of the "Operational Program for Education and Initial Vocational Training" of the 3rd Community Support Framework of the Hellenic Ministry of Education, funded by 25% from national sources and by 75% from the European Social Fund (ESF).

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ CTLA-4 ΜΕ ΤΗΝ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ

**Καρναούρη Α.Χ., Μπάγκος Π.Γ., Νικολόπουλος Γ.Κ.
και Σ.Ι. Χαμόδρακας**

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη 157 01 Αθήνα*

Ο CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CD152) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ομοιόσταση, ως εναλλακτικό πρόσδεμα των μορίων B7-1 και 2, δρώντας ως ανασταλτικός παράγοντας και μειορυθμίζοντας τη λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων. Ορισμένοι πολυμορφισμοί του CTLA-4 έχουν κατά καιρούς συσχετιστεί με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα, μεταξύ των οποίων είναι η σκλήρυνση κατά πλάκας. Πρόκειται για μια απομυελινωτική νόσο που εμφανίζεται με πλάκες στη λευκή ουσία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, μερικές φορές δε, επεκτείνεται και στη φαιά ουσία. Σε μια προσπάθεια συνεκτίμησης όλων των δεδομένων που έχουν παρουσιαστεί από τις επιμέρους μελέτες που συσχετίζουν το CTLA-4 με την εμφάνιση της σκλήρυνσης κατά πλάκας, προχωρήσαμε σε μια μετα-ανάλυση των επιδημιολογικών μελετών. Στη μελέτη μας συμπεριλήφθηκαν 18 έρευνες οι οποίες συγκέντρωναν πληροφορίες για συνολικά 3375 ασθενείς και 2930 υγιή άτομα (μάρτυρες). Οι πολυμορφισμοί που μας απασχόλησαν ήταν ο +49 A/G στο εξόνιο 1, που αφορά αντικατάσταση της θρεονίνης από αλανίνη στην 17^η θέση του προδρόμου πρωτεϊνικού μορίου (18 μελέτες) και ο -318 C/T στον υποκινητή που πιθανολογείται ότι σχετίζεται με διαφορετική έκφραση της πρωτεΐνης (10 μελέτες). Η μεγάλη ετερογένεια των αποτελεσμάτων μας οδήγησε στη χρήση μοντέλων τυχαίων επιδράσεων (random effects models). Τα αποτελέσματά μας, έδειξαν ότι δεν υπάρχει καμία συσχέτιση των συγκεκριμένων πολυμορφισμών του CTLA-4 και της ασθένειας. Επιπροσθέτως, βρέθηκε ότι τα πρώτα αποτελέσματα τα οποία έδειξαν μια θετική συσχέτιση του γονοτύπου με την ασθένεια, προκάλεσαν την επακόλουθη αύξηση των μελετών για το επίμαχο αυτό ζήτημα.

CORRELATION BETWEEN CTLA-4 POLYMORPHISMS AND RISK OF DEVELOPING MULTIPLE SCLEROSIS**Karnaouri A.C., Bagos P.G., Nikolopoulos G.K., and S.J. Hamodrakas***Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis Athens 157 01*

CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CD152) is a single-spanning membrane protein, member of the immunoglobulin superfamily and plays an important role in homeostasis, transmitting an inhibitory signal to T cells. Whereas the antigen-specific signal in T-cell activation is mediated through the HLA class II and T-cell receptor (TCR) interaction, the cytotoxic antigen 4 CTLA-4 is an important co-stimulatory receptor molecule, interacting with the B7-1 and B7-2 molecules of the antigen-presenting cell and down-regulating T-cell function. Various single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CTLA-4 gene have been implicated in susceptibility to autoimmune diseases, such as Multiple Sclerosis. Multiple Sclerosis is an inflammatory disease of the central nervous system thought to be mediated in part by an autoimmune response of T cells to protein components of the myelin sheath. In order to quantify all the results extracted from previous studies, we conducted a meta-analysis to evaluate the association of CTLA-4 variants with Multiple Sclerosis. We identified 18 eligible studies, which included 3375 MS cases and 2930 healthy controls. Two polymorphisms were the major target of our meta-analysis: the exon 1, +A49G polymorphism which is responsible for a substitution of Threonine by Alanine in the 17th position of the precursor protein, and the promoter -C318T polymorphism, which currently is speculated to be responsible for differential expression of the protein. Significant between studies heterogeneity was found, thus a random effect model was used. The results indicate a non-significant association of the two polymorphisms with the risk of Multiple Sclerosis. A major finding of the study is the conclusion, that the first published study that indicated a significant association of the genotype with the disease triggered the subsequent appearance of studies involving the above-mentioned association

ΔΟΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΔΙΥΔΡΟΦΟΛΙΚΗ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗ (DHFR) ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ

Καστρίτης Π.Α., Παπανδρέου Ν.Χ. και Σ.Ι. Χαμόδρακας

*Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη 157 01 Αθήνα*

Η Διυδροφολική Αναγωγή (DHFR E.C. 1.5.1.3) είναι το ένζυμο που καταλύει την αναγωγή του 7,8-διυδροφολικού οξέος σε τετραϋδροφολικό οξύ, χρησιμοποιώντας ως συνένζυμο το NADPH. Η DHFR συμμετέχει στη διαδικασία βιοσύνθεσης των πουρινών, της μονοφωσφορικής δεοξυθυμιδίνης καθώς και ορισμένων αμινοξέων. Λόγω της στρατηγικής σημασίας της στο μεταβολισμό, η DHFR αποτελεί κατάλληλο υποψήφιο στόχο για την καταπολέμηση ασθενειών όπως ο καρκίνος. Ανάμεσα στις ενώσεις για τις οποίες έχει διαπιστωθεί η ικανότητα αναστολής της δράσης της DHFR περιλαμβάνονται και οι σπειρο-s-τριαζίνες. Για μια σειρά ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία των 4,6-διαμινο-σπειρο-τριαζινών διεξήχθησαν θεωρητικές μελέτες προκειμένου να διαπιστωθεί αν είναι δυνατή η δράση τους ως αναστολείς του ενζύμου. Οι μελέτες αυτές περιλαμβάνουν δοκιμές αγκυροβόλησης (docking), ενεργειακούς υπολογισμούς και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής της DHFR ως σύμπλοκου με τις ενώσεις αυτές. Από τις μελέτες προκύπτει το συμπέρασμα ότι μέλη της σειράς των 4,6-διαμινο-σπειρο-τριαζινών είναι πιθανοί αναστολείς του ενζύμου, εξειδικευμένοι στις DHFRs των σπονδυλωτών, δίνοντας το έναυσμα για περαιτέρω ερευνητικές προσπάθειες και πιθανόν τελικά κλινική εφαρμογή τους. Τα παραπάνω συμπεράσματα έρχονται σε συμφωνία και με βιοχημικά πειράματα, ενισχύοντας έτσι τη διαπίστωση ότι οι συγκεκριμένες χημικές ενώσεις έχουν βιολογική δράση.

**STRUCTURAL AND THEORETICAL STUDIES OF NOVEL
INHIBITORS OF DIHYDROFOLATE REDUCTASE (DHFR) AND
THEIR COMPLEXES WITH THE ENZYME****Kastritis P.L., Papandreou N.C., and S.J. Hamodrakas***Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis Athens 157 01*

Dihydrofolate Reductase (DHFR E.C. 1.5.1.3) is the enzyme that catalyzes the reduction of 7,8-dihydrofolic acid to tetrahydrofolic acid utilizing NADPH as cofactor. DHFR participates in a metabolic pathway that leads to the formation of purines, monophosphate deoxythymidine and certain amino acids. Due to the strategic role of the enzyme in metabolism, DHFR is a suitable candidate target for the treatment of diseases such as cancer. Among the groups of chemical compounds that have been identified as possible inhibitors of DHFR, spiro-s-triazines are included. Theoretical studies for a number of compounds, which belong to the class of 4,6-diamino-spiro-triazines were performed, in order to identify whether these compounds have the ability to act as inhibitors of DHFR. These studies include docking experiments, energy calculations and molecular dynamics simulations of DHFR as a complex with these chemical compounds. The results lead us to the conclusion that members of the 4,6-diamino-spiro-triazine series may successfully act as selective inhibitors of the vertebrate DHFRs, providing the necessary stimulus to continue research that may conclude to clinical trials. The above mentioned results are in agreement with biochemical experiments, supporting the case that these compounds exhibit biological activity.

**ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΉ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ
ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΑΠΟ ΘΥΛΑΚΟΕΙΔΕΙΣ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΤΟΥ
ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΟΥ ΧΛΩΡΟΦΥΚΟΥΣ *Scenedesmus obliquus***

Καντζιλιάκης Κ.^{1,2}, Κωτάκης Χ.^{1,2}, Τσιώτης Γ.¹ και Κ. Κοτζαμπάσης²

¹Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τ.Θ. 2208, 71409 Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα

²Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τ.Θ. 2208, 71409 Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα

Η οξυγονική φωτοσύνθεση λαμβάνει χώρα στις μεμβράνες των θυλακοειδών των κυανοβακτηρίων, των πράσινων φυκών και των ανώτερων φυτών, όπου σύμπλοκα πρωτεϊνών/χρωστικών (φωτοσύστημα II, κυτόχρωμα b₆f, φωτοσύστημα I και ATP συνθετάση) μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια σε χημική [1]. Η πρωτεομική ανάλυση των φωτοσυνθετικών αυτών πρωτεϊνικών συμπλόκων σε λειτουργική μορφή αποτελεί μία πειραματική προσέγγιση η οποία επιτρέπει τόσο δομική ταυτοποίηση όσο και λειτουργική ιχνηλάτηση σχετικά με την πλαστικότητα της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού [2]. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η λειτουργική ανάλυση καθώς και ο δομικός χαρακτηρισμός του φωτοσυνθετικού πρωτεόματος του μονοκύτταρου χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*, με τη χρήση δισδιάστατης ηλεκτροφορητικής ανάλυσης (Blue-Native PAGE/SDS-Tricine PAGE). Αρχικά, έγιναν προσπάθειες διαλυτοποίησης των μεμβρανικών πρωτεϊνικών συμπλόκων με τη χρήση του μη ιοντικού απορρυπαντικού dodecyl-β-D-maltoside. Παράλληλα, έγιναν μελέτες όσον αφορά τόσο την απόδοση της διαλυτοποίησης τους όσο και την λειτουργική και δομική ακεραιότητα των διαλυτοποιημένων συμπλόκων, με χρήση φασματοσκοπίας ορατού, μη αποδιατακτικής Blue-Native PAGE ηλεκτροφόρησης (1D/πρώτη διάσταση) [3] και αποδιατακτικής SDS-Tricine PAGE ηλεκτροφόρησης. Η πρωτεϊνική σύσταση των φωτοσυνθετικών συμπλόκων αναλύθηκε με αποδιατακτική SDS-Tricine PAGE ηλεκτροφόρηση (2D/δεύτερη διάσταση). Τέλος, green native πηκτώματα συγκρίθηκαν με αντίστοιχα blue native ως προς τη διαχωριστική τους ικανότητα.

Αναφορές:

[1]: Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A.J., Peltier, J.B., Rudella, A., Sun, Q., and Wijk, K.J. (2004) In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell*, 16(2), 478-499.

[2]: Heinemeyer, J., Eubel, H., Wehmheoner, D., Jeansch, L., and Braun, H.P. (2004) Proteomic approach to characterize the supramolecular organization of photosystems in higher plants. *Phytochemistry*, 65, 1683-1692.

[3]: Schagger, H., and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, 199(2), 223-231.

**A PROTEOMIC STUDY OF PROTEIN COMPLEXES FROM
THYLACOID MEMBRANES OF THE UNICELLULAR GREEN
ALGA *Scenedesmus obliquus*****Kantzilakis K.^{1,2}, Kotakis Chr.^{1,2}, Tsiotis G.¹, and K. Kotzabasis²**¹Dept of Chemistry, University of Crete, P.O. Box 2208, 71409 Heraklion, Crete, Greece²Dept of Biology, University of Crete, P.O. Box 2208, 71409 Heraklion, Crete, Greece

The oxygenic photosynthesis takes place in the thylacoid membranes of cyanobacteria, green algae and higher plants, where protein/pigments complexes (photosystem II, cytochrome b₆f, photosystem I, and ATP synthase) convert the light energy into chemical energy [1]. The proteomic analysis of photosynthetic protein complexes constitutes an experimental approach which allows not only structural identification but also functional tracer with regard to the plasticity of molecular structure and function of photosynthetic apparatus [2]. The aim of the present study is the functional analysis as well as the structural characterization of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus* photosynthetic proteome, by applying two-dimensional electrophoretic analysis (Blue-Native PAGE/SDS-Tricine PAGE). Firstly, attempts to solubilize the membrane protein complexes using the non-ionic detergent dodecyl-β-D-maltoside were performed. These essays were evaluated, taking into consideration the efficiency of their solubilization and the functional/structural integrity of solubilized complexes. Therefore, visible spectroscopy measurements, non-denaturing Blue-Native PAGE electrophoresis (1D/first dimension) [3], and denaturing SDS-Tricine PAGE electrophoresis were realised, concerned to solubilized and non solubilized protein complexes. In parallel, the protein composition of photosynthetic complexes was investigated by denaturing SDS-Tricine PAGE electrophoresis (2D/second dimension). Finally, green native gels were compared with the corresponding blue native ones, relatively to their separative capacity.

References:

- [1]: Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A.J., Peltier, J.B., Rudella, A., Sun, Q., and Wijk, K.J. (2004) In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell*, 16(2), 478-499.
- [2]: Heinemeyer, J., Eubel, H., Wehmheoner, D., Jeansch, L., and Braun, H.P. (2004) Proteomic approach to characterize the supramolecular organization of photosystems in higher plants. *Phytochemistry*, 65, 1683-1692.
- [3]: Schagger, H., and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, 199(2), 223-231.

**ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΟΚΙΝΗΤΙΚΟΥ ΔΙΑΦΡΑΓΜΑΤΟΣ ΣΤΑ
ΦΑΙΟΦΥΚΗ: ΥΠΟΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΚΡΥΟΣΤΕΡΕΩΣΗ ΚΑΙ ΚΡΥΟΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ**

**Κατσαρός Χ.¹, Motomura T.², Καρροφύλλης Δ.¹, Nagasato C.²
και Β. Γαλάτης¹**

¹Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής, ΕΚΠΑ, Πανεπιστημιόπολη 15781, Αθήνα

²Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University Muroran
Marine Station, Japan

Στην παρούσα εργασία διερευνάται ο σχηματισμός κυτοκινητικού διαφράγματος σε αντιπροσώπους φαιοφυκών με νηματοειδές (*Sphacelaria rigidula*, *Haloptretris* sp.) και φυλλοειδές (*Dictyota dichotoma*) πρότυπο αύξησης του θαλλού. Η μελέτη έγινε σε σειρές τομών με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, μετά από κρυοστερέωση και κρυοαντικατάσταση, τεχνική που αποκαλύπτει λεπτομέρειες της λεπτής δομής, που δεν διατηρούνται με την κλασική τεχνική της χημικής στερέωσης. Αποκαλύφθηκε ότι αρχικά στο κυτοκινητικό επίπεδο συσσωρεύονται μεγάλα κυστίδια που μοιάζουν με χυμοτόπια. Στη συνέχεια, στο επίπεδο αυτό αναπτύσσεται μια κυτοπλασματική λωρίδα στην οποία παρατηρούνται ενεργά δικτυοσωμάτια και μεμβράνες ενδοπλασματικού δικτύου. Μικρά κυστίδια αποκόπτονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και ενσωματώνονται στη *cis* περιοχή των δικτυοσωματίων, ενώ από *trans* περιοχή αποκόπτονται σφαιρικά κυστίδια και πεπλατυσμένα σακκίδια. Στη συνέχεια, κυστίδια και ιδιόμορφα, λεπτά, πεπλατυσμένα σακκίδια, πιθανώς προερχόμενα από δικτυοσωμάτια, διατάσσονται κατά μήκος του επιπέδου διαίρεσης. Η προέλευση των κυστιδίων και ιδιαίτερα των σακκιδίων διερευνάται. Παρόμοιες δομές και ενεργά δικτυοσωμάτια έχουν παρατηρηθεί επίσης κοντά σε νεαρά, αναπτυσσόμενα κυτταρικά τοιχώματα. Σύντηξη των παραπάνω κυστιδίων και σακκιδίων, χωρίς κάποιο σαφές πρότυπο, οδηγεί στο σχηματισμό ενός διάτρητου μεμβρανώδους διαφράγματος. Σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης εμφανίζονται πρόδρομες δομές που αντιστοιχούν στις πλασμοδέσμες. Μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης του διαφράγματος σε όλο το επίπεδο διαίρεσης, εμφανίζεται η λεπτή γραμμή της έναρξης απόθεσης του κυτταρικού τοιχώματος ανάμεσα στις μεμβράνες.

Το έργο αυτό ενισχύθηκε οικονομικά από το Υπουργείο Παιδείας και τη Ευρωπαϊκή Ένωση (πρόγραμμα Πυθαγόρας Ι) και το ΕΚΠΑ (πρόγραμμα Καποδίστριας).

**CYTOKINETIC DIAPHRAGM FORMATION IN BROWN ALGAE:
A CRYOFIXATION-FREEZE SUBSTITUTION STUDY****Katsaros C.¹, Motomura T.², Karyophyllis D.¹, Nagasato C.², and B. Galatis¹**¹*Faculty of Biology, Department of Botany, University of Athens, Panepistimiopolis 15781*²*Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University
Muroran Marine Station, Japan*

In the present study the formation of the cytokinetic diaphragm in filamentous (*Sphacelaria rigidula*, *Haloptreteris* sp.) and ribbon-like (*Dictyota dichotoma*) brown algal species. The study was made in serial thin sections after cryofixation and freeze-substitution, a technique that reveals fine structural details which are not preserved with the conventional chemical fixation. It was revealed that initially, large vacuole-like vesicles are gathered in the space between the daughter nuclei, along the cytokinetic plane. A cytoplasmic strand is then formed at this plane, in which active dictyosomes and endoplasmic reticulum (ER) membranes are observed. Small vesicles, pinched off from the ER are incorporated in the cis region of the dictyosomes, whereas other vesicles and whole cisternae are liberated from the trans Golgi region. Vesicles and particularly thin, flattened cisternae, probably of dictyosomal origin, are arranged parallel to the cytokinetic plane. The origin of these vesicles and particularly of the cisternae is examined. Similar structures have been observed parallel to young, developing cell walls. Fusion of these structures without a definite pattern leads to the formation of a patch-like diaphragm showing irregular gaps. At this developmental stage structures similar to preliminary plasmodesmata are formed. After the completion of the diaphragm formation, the new cell wall material appears as a thin dark line between the two plasma membranes.

This work was financed by grants from the Hellenic Ministry of National Education and Religions Affairs and the EU (project "Pythagoras") and the University of Athens (project "Kapodistriasis").

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΑΡΧΙΚΟΣ ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
DNA - ΕΜΒΟΛΙΟΥ, ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΥ ΣΤΗΝ ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Β ΤΟΥ
ΙΟΥ ΕΡΙΠΗΤΑ ΑΠΛΟΥ ΤΥΠΟΥ 1 (HSV-1)**

Κατσικάρη Α., Αρσενάκης Μ. και Μ. Γιάγκου

*Εργαστήριο Γενικής Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας,
Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,
Θεσσαλονίκη 54124.*

Στόχος της παρούσης μελέτης είναι η παρασκευή DNA εμβολίου ενάντια στον ιό HSV-1. Το συγκεκριμένο εμβόλιο βασίστηκε στον πλασμιδιακό φορέα pRc/CMV-HBs(S). Το τμήμα του πλασμιδίου που κωδικοποιεί την HB(s)S περιοχή αντικαταστάθηκε από το τμήμα s858 (858bp) του γονιδίου της gB του HSV-1. Το τμήμα αυτό κωδικοποιεί 286aa του αμινοτελικού άκρου και περιλαμβάνει υδρόφιλες, εξωκυττάρειες περιοχές της gB. Ο ανασυνδυασμένος φορέας που προέκυψε, ps858, δοκιμάστηκε για την αποτελεσματικότητα έκφρασης του *in vitro* σε κυτταροκαλλιέργειες (HEK293T), έπειτα από διαμόλυνση, με τις τεχνικές του western blotting και του ανοσοφθορισμού. Η *in vivo* ικανότητα έκφρασης του ps858 ελέγχθηκε με ενδομυϊκό εμβολιασμό στον τετρακέφαλο μυ ποντικών της φυλής BALB/c και ανοσοϊστοχημεία. Τέλος, εξετάστηκε η προστασία που παρέχει το υπογρήφιο DNA εμβόλιο στο μοντέλο ραχιαίας μόλυνσης με τον ιό HSV-1, strain S. Τα σημαντικότερα ευρήματα από την εφαρμογή των παραπάνω μοριακών τεχνικών είναι τα εξής: 1) Το πλασμίδιο ps858 εκφράζεται παροδικά επιτυχώς στα ευκαρυωτικά κύτταρα HEK293T. 2) Το πεπτιδίο της gB εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα των διαμολυσμένων κυττάρων. 3) *In vivo*, η ενδομυϊκή χορήγηση του ps858 οδηγεί σε έκφραση του πεπτιδίου της gB στους μυς. 4) Τα ανοσοποιημένα ποντίκια διέφυγαν της μόλυνσης σε αντίθεση με τα μη ανοσοποιημένα της ομάδας ελέγχου. Συμπερασματικά, στα πλαίσια της παρούσης μελέτης επιτεύχθηκε η έκφραση και η ενδοκυτταρική παραγωγή τμήματος της γλυκοπρωτεΐνης Β του HSV-1. Σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα το συγκεκριμένο εμβόλιο επάγει κυτταρο-μεσολαβητική ανοσία και ανοσοβιολογική μνήμη.

CONSTRUCTION AND INITIAL IMMUNOBIOLOGIC CHARACTERIZATION OF DNA - VACCINE, BASED ON GLYCOPROTEIN B OF HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 (HSV-1)**Katsikari A., Arsenakis M., and M. Giangou**

Laboratory of General Microbiology, Department of Genetica, Development and Molecular Biology, School of Biology, Faculty of Sciences and Mathematics, Aristotle University of Thessaloniki, 54124.

We report on the construction of a DNA vaccine against HSV -1. The vaccine was based on the plasmid vector pRc/CMV-HBs(S). The HB(s)S region of the vector was replaced by the s858 region (858bp) of the gB gene of HSV-1. This region codes 286aa of the aminoterminal end and includes hydrophilic, extra - cellular regions of gB. The resultant recombinant plasmid, ps858, was tested for *in vitro* expression of the gB sequences in cell cultures, after transfection of HEK293T cells, by western blotting and immuno-fluorescence. The *in vivo* expressing ability of ps858 was checked by intramuscular vaccination in the quadriceps muscle of BALB/c mice and immuno-histochemistry. Finally, the ability of the candidate DNA vaccine to afford protection against HSV-1 infection, was examined in the model of epidermal dorsal abrasion infection with HSV-1, strain S.

The salient results of this study are: 1) Plasmid ps858 is transiently expressed successfully in eucaryotic HEK293T cells. 2) The gB peptide is located in the cytoplasm of transfected cells. 3) *In vivo*, the intramuscular administration of ps858 leads to expression in muscles. 4) The immunized mice were protected against HSV-1 infection relative to the non-immunized control group.

In conclusion, in the present study we achieved the expression and the intracellular production of a specific region of glycoprotein B of HSV -1. In *in vitro* and *in vivo* experiments the vaccine provides cell-mediated immunity and immunological memory.

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗΣ α ΣΤΙΣ
ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ
ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΩΝ**

**Κατσίκη Α.¹, Σκοπελίτη Μ.¹, Γσιατάς Μ.², Μπάμιας Α.², Neagu Μ.³,
Voelter W.⁴, Τσιτσιλώνη Ο.Ε.¹**

¹Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, ²Θεραπευτική Κλινική Νοσ. «Αλεξάνδρα», Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, ³Immunology Laboratory, Victor Babes Research Institute, Bucharest, ⁴Τμήμα Φυσιολογικής Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Tuebingen, Γερμανία

Η προθυμοσίνη α (προΤα) είναι ένα ισχυρά όξινο πολυπεπτίδιο, που αρχικά απομονώθηκε από το θύμο αδένα, έχει μήκος 109 αμινοξέα και έντονες ανοσοενισχυτικές ιδιότητες. Μέχρι σήμερα, η μελέτη της δράσης της προΤα έχει επικεντρωθεί στην επαγωγή ανοσολογικών απαντήσεων από τα λεμφοκύτταρα, που αποτελούν συστατικά της ειδικής ανοσίας. Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε τη δράση της προΤα στα ουδετερόφιλα, τα οποία ανήκουν στο σκέλος της φυσικής ανοσίας. Αναλυτικότερα, ουδετερόφιλα απομονώθηκαν από περιφερικό αίμα υγιών δοτών, με φυγοκέντρηση σε κλίση Ficoll και επακόλουθη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα ουδετερόφιλα επώαστηκαν τόσο με την προΤα, όσο και με την προΤα συνεργιστικά με χαμηλές δόσεις του βακτηριακού πεπτιδίου fMLP (formyl Met-Lys-Phe), το οποίο επάγει τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των ουδετερόφιλων. Παρατηρήσαμε ότι η προΤα αυξάνει κατά περίπου 3 φορές την ικανότητα φαγοκυττάρωσης σωματιδίων zymosan από τα ουδετερόφιλα. Όσον αφορά στην ενδοκυτταρική παραγωγή υπεροξειδικού ανιόντος (η οποία ελέγχθηκε μέσω της δοκιμασίας αναγωγής του NBT), η προΤα φάνηκε να επάγει την παραγωγή του κατά περίπου 4 φορές περισσότερο σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα, ενώ σε συνδυασμό με χαμηλή συγκέντρωση fMLP (0,01 μΜ), η αύξηση της παραγωγής του δεκαπλασιάστηκε. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η προΤα αυξάνει την αντιμικροβιακή δράση των ουδετερόφιλων. Μελλοντικός στόχος αποτελεί η διερεύνηση αντίστοιχης δράσης της προΤα σε ουδετερόφιλα ασθενών με καρκίνο.

STUDY OF THE EFFECT OF PROTHYMOSIN α ON ANTI-MICROBIAL PROPERTIES OF HUMAN NEUTROPHILS**Katsiki A.¹, Skopeliti M.¹, Tsiatas M.², Bamias A.², Neagu M.³, Voelter W.⁴, Tsitsilonis O.E.¹**

¹*Department of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, University of Athens,*
²*Department of Clinical Therapeutics «Alexandra» Hospital, School of Medicine,*
University of Athens, ³*Immunology Laboratory, Victor Babes Research Institute, Bucharest*
⁴*Department of Physiological Biochemistry, University of Tuebingen, Germany*

Prothymosin α (proT α) is a highly acidic polypeptide, initially isolated from the thymus gland, consisting of 109 amino acid residues, and presenting distinct immunoenhancing properties. So far, proT α research studies have focused on the induction of lymphocyte immune responses, i.e., of cells belonging to adaptive immunity. In this study, we investigated the effect of proT α on neutrophils which are cells of the innate arm of immunity. In more detail, neutrophils were isolated from peripheral blood of healthy donors over Ficoll gradient and upon subsequent lysis of red blood cells. Neutrophils were incubated with either proT α or proT α synergistically with low doses of the bacterial peptide fMLP (formyl Met-Lys-Phe), the latter known to promote the antimicrobial properties of neutrophils. We observed that proT α increases by 3-fold the phagocytosis of zymosan particles by neutrophils. As for the intracellular production of super oxide anion (which was tested using the NBT reduction test), proT α was shown to augment its production by 4-fold compared to the relevant control sample, whereas the combination of proT α and low concentration of fMLP (0.01 μ M) increased super oxide anion release by 10-fold. We conclude that proT α seems to enhance the antimicrobial activity of neutrophils. Our future directions refer to the investigation of proT α 's effect on neutrophils from patients with cancer.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΓΗΡΑΝΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΟΣΩΜΑΤΟΣ

Κατσίκη Μ.¹, Χονδρογιάννη Ν.¹, Χήνου Ι.², Γκόνος Ε.Σ.¹

¹Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης, Ινστιτούτο Βιοτεχνολογίας και Βιολογικών Ερευνών, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, ²Τομέας Φαρμακογνωσίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Η σταδιακή μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των ανθρώπινων πρωτογενών κυττάρων ονομάζεται αναδιπλασιαστική γήρανση *in vitro*. Τα γηρασμένα κύτταρα, αν και είναι ζωντανά και λειτουργικά, παρουσιάζουν ορισμένα χαρακτηριστικά, που τα διαφοροποιούν από τα αντίστοιχα νεαρά κύτταρα. Στα γηρασμένα κύτταρα, το πρωτεώσωμα—ο βασικός πρωτεολυτικός μηχανισμός του κυττάρου—έχει δείξει ότι υπολειτουργεί. Συγκεκριμένα, κατά τη γήρανση μειώνονται τόσο οι ενεργότητες όσο και τα επίπεδα έκφρασης των καταλυτικών υπομονάδων του πρωτεοσώματος, με συνέπεια τη μείωση της λειτουργικότητάς του. Αυτό έχει ως αντίκτυπο τη μειωμένη απόκριση του κυττάρου σε διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες, καθώς ο δευτερογενής αντιοξειδωτικός μηχανισμός του κυττάρου υπολειτουργεί. Εκτός από τους ενδογενείς μηχανισμούς, αντιοξειδωτική δράση εμφανίζουν ακόμα διάφορες φυτικές ουσίες. Ορισμένες από αυτές δρουν μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, ο οποίος προσδέεται σε αλληλουχίες ARE (Antioxidant Response Element) που υπάρχουν στους υποκινητές ορισμένων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων υπομονάδων (α και β) του πρωτεοσώματος και ο οποίος είναι υπεύθυνος για την προστασία των κυττάρων έναντι του οξειδωτικού στρες από διάφορα χημικά. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν 2 καθαρές ουσίες και τα αντίστοιχα εκχυλίσματα από τα οποία προήλθαν. Τα εκχυλίσματα αυτά προέρχονταν από φυτά της ελληνικής χλωρίδας και συσχετίστηκαν με το φαινόμενο της γήρανσης και τη λειτουργία του πρωτεοσώματος. Ανθρώπινοι εμβρυϊκοί ινοβλάστες (IMR90 και WI38) που καλλιεργήθηκαν παρουσία των εκχυλισμάτων και των καθαρών ουσιών παρουσίασαν αύξηση του προσδόκιμου ζωής κατά 15% περίπου. Επίσης εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα ελευθέρων ριζών οξυγόνου και λιγότερες οξειδωμένες πρωτεΐνες. Επίδραση με την ουσία Α σε πρωτογενείς ινοβλάστες οδήγησε σε αύξηση των ενεργοτήτων και των επιπέδων RNA και πρωτεϊνών των καταλυτικών υπομονάδων του πρωτεοσώματος. Η αύξηση στα επίπεδα των υπομονάδων φαίνεται να προάγεται μέσω της δράσης του Nrf2. Αντίθετα, η ουσία Β δεν εμφάνισε ανάλογη επίδραση στις υπομονάδες του πρωτεοσώματος σε πρωτογενείς ινοβλάστες. Ωστόσο, η ουσία αυτή βρέθηκε να προκαλεί αύξηση των πρωτεοσωμικών ενεργοτήτων σε *in vitro* συνθήκες, που φαίνεται να σχετίζεται με την τροποποίηση της δομής των εξωτερικών δακτυλίων των α-υπομονάδων του πρωτεοσώματος κατά αναλογία με τη δράση άλλων ουσιών που έχει δείξει ότι δρουν έτσι. Συμπερασματικά, οι φυσικές ουσίες που μελετήθηκαν καθυστερούν τη γήρανση και οδηγούν σε άμεση ή έμμεση ενεργοποίηση του πρωτεοσώματος.

**CORRELATION OF NATURAL COMPOUNDS BIOLOGICAL
ACTIVITIES TO HUMAN AGEING AND THE FUNCTION OF
THE PROTEASOME****Katsiki M.¹, Chondrogianni N.¹, Chinou I.², Gonos E.S.¹**

¹Laboratory of Molecular and Cellular Ageing, Institute of Biological Research and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, ²Division of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, School of Pharmacy, University of Athens.

Primary human fibroblasts exhibit a limited proliferative capacity *in vitro*, a process known as replicative senescence. Although senescent cells are viable and fully functional, they have several different properties and characteristics as compared to their young counterparts. The proteasome, the main proteolytic machinery of the cell, does not function properly in senescent cells as compared to young ones. Specifically, during replicative senescence we have found a decline of activities along with diminished expression levels of β -catalytic subunits. Given the fact that proteasome represents a secondary antioxidant mechanism, the diminished antioxidant response during replicative senescence is inevitable. However, apart from the intrinsic mechanisms, antioxidant properties have been attributed to several natural compounds. Some of these compounds act through activation of the Nrf2 transcription factor that binds to Antioxidant Response Element (ARE) sequences in the promoter region of genes involved in the mechanism of protection against chemically induced oxidative stress. Some proteasome subunits (α and β) genes possess ARE sequences to their promoters. In this study, 2 pure substances and the relative extracts were studied. These substances were derived from plants of the greek flora in order to find a correlation of their biological activities with replicative senescence and proteasome function. Normal human fibroblasts (IMR90 και WI38) treated with the extracts and pure substances exhibited an extension of their lifespan of approximately 15%. They, also, exhibited lower levels of reactive oxygen species and accumulated less oxidized proteins. Treatment of human fibroblasts with substance A resulted to an increase in proteasome activities and higher RNA and protein expression levels of β -catalytic subunits. This increase was possibly due to Nrf2 activation. Substance B didn't have the same effect on proteasome subunits in primary fibroblasts. However, substance B increased proteasome activities *in vitro* by possibly inducing conformational changes to α -gated channels of the proteasome similarly to other agents that act in this way. Conclusively, all the extracts and pure substances studied delay ageing and lead to direct or indirect activation of the proteasome.

**IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗΣ α
ΣΤΙΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΩΟΘΗΚΩΝ**

**Κατσίδα Θ.¹, Βουτσάς Ι.¹, Σκοπελίτη Μ.¹, Τσιατάς Μ.², Μπάμιας Α.²,
Δημόπουλος Μ.Α.², Τσιτσιλώνη Ο.Ε.¹**

¹Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, ²Θεραπευτική Κλινική
Νοσ. «Αλεξάνδρα», Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Η προθυμοσίνη α (προΤα) είναι ένα ισχυρά όξινο πολυπεπτίδιο μήκους 109 αμινοξέων με συντηρητική αλληλουχία μεταξύ των θηλαστικών και διακριτή ανοσοενισχυτική δράση *in vivo* και *in vitro*. Στην παρούσα μελέτη διερευνάται η επίδραση της προΤα στις ανοσολογικές απαντήσεις λεμφοκυττάρων απομονωμένων από ασκιτικό υγρό ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών. Για το σκοπό αυτό, τα εν λόγω λεμφοκύτταρα επώαστηκαν με προΤα, αλλά και το συνθετικό καρβοξυτελικό της πεπτίδιο (100-109), συνεργιστικά με χαμηλές δόσεις ιντερλευκίνης-2 (20 IU/mL), ώστε να εξεταστεί η επαγωγή της κυτταροτοξικότητάς τους. Πιο συγκεκριμένα, η κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων ελέγχθηκε έναντι K562 (ευαίσθητα σε NK λύση), ενώ αυτή των CD8+ T-λεμφοκυττάρων έναντι αυτόλογων καρκινικών κυττάρων-στόχων. Επιπρόσθετα, με κυτταρομετρία ροής προσδιορίστηκε η επίδραση της προΤα στον ανοσοφαινότυπο των λεμφοκυττάρων. Στο σύνολό τους, τα μέχρι τώρα πειραματικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η προΤα και το καρβοξυτελικό της πεπτίδιο (100-109) ενισχύουν σημαντικά την NK κυτταροτοξικότητα των λεμφοκυττάρων των υπό μελέτη ασθενών, μέσω της σημαντικής αύξησης του % ποσοστού των NK και NKT κυττάρων. Η μελέτη αυτή παρουσιάζει για πρώτη φορά την ανοσοενισχυτική δράση της προΤα σε λεμφοκύτταρα ασκιτικού υγρού ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, στα οποία η αυξημένη NK κυτταροτοξικότητα, σε συνδυασμό με την ενδογενή ειδικότητά τους για τα καρκινικά κύτταρα στο περιβάλλον του ασκίτη, προτείνει ισχυρά την εφαρμογή της προΤα σε κλινικά πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας του καρκίνου.

Χρηματοδότηση: ΕΠΕΑΚ II, ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II (ΤΔΥ 045)

**IN VITRO STUDY OF THE EFFECT OF PROTHYMOSIN α ON
THE IMMUNE RESPONSES OF LYMPHOCYTES IN PATIENTS
WITH OVARIAN CANCER****Katsila T.¹, Voutsas I.¹, Skopeliti M.¹, Tsiatas M.², Bamias A.²,
Dimopoulos M.A.², Tsitsilonis O.E.¹**

¹Department of Human & Animal Physiology, Faculty of Biology, University of Athens,
²Department of Clinical Therapeutics 'Alexandra' Hospital, School of Medicine, University
of Athens

Prothymosin alpha (ProT α) is a very acidic polypeptide of 109 amino acids, which presents a conservative primary structure among mammals and exhibits distinct immunoenhancing activity *in vivo* and *in vitro*. Herein, we investigated the effect of ProT α on the immune responses of lymphocytes isolated from the ascitic fluid of patients with ovarian cancer. These lymphocytes were incubated with either ProT α or the synthetic carboxy-terminal peptide of ProT α (100-109) synergistically with low doses of interleukin-2 (20 IU/mL) in order to determine their cytotoxicity. The cytotoxic effect of NK cells and CD8⁺ T cells were tested against K562 (an NK-sensitive cell line) and autologous tumor targets, respectively. Furthermore, using flow cytometry we investigated the effect of ProT α on the immunophenotype of these lymphocytes. So far, our data imply the potential of ProT α and its carboxy-terminal peptide to enhance NK cytotoxicity of lymphocytes deriving from the ascitic fluid of patients with ovarian cancer via increasing considerably the % percentage of both NK and NKT cells. It should be noted that this is the first report showing the immunoenhancing activity of ProT α on lymphocytes isolated from ascitic fluids of patients with ovarian cancer. Most importantly, the enhanced NK cytotoxicity as well as the endogenous specificity of these lymphocytes for autologous cancer cells concomitantly present in the ascitic fluid suggest the potential use of ProT α in clinical protocols of cancer immunotherapy.

Funded: EPEAK II, PYTHAGORAS II (TDY 045)

ΛΙΜΝΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΤΗΣ ΛΙΜΝΗΣ ΤΑΥΡΩΠΟΥ (Ν. ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ)

Καφούρης Σ. και Δ.Β. Δανιηλίδης

*Τομέας Οικολογίας και Ταξινόμησης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθήνας,
Πανεπιστημιόπολη Αθήνα 15784*

Η λίμνη Ν. Πλαστήρα βρίσκεται στην κεντρική Ελλάδα, 25 km δυτικά της πόλης Καρδίτσας σε υψόμετρο 792 μέτρων. Πρόκειται για τεχνητή λίμνη ηλικίας περίπου 45 ετών τα νερά της οποίας χρησιμοποιούνται για οικιστικούς και αρδευτικούς σκοπούς. Μελετήθηκαν τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της λίμνης και περιγράφεται η δομή της κοινωνίας του φυτοπλαγκτού στη διάρκεια του χρόνου. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι πρόκειται για μια θερμή μονομικτική λίμνη με έντονη εποχιακή διαφοροποίηση ως προς τον χημισμό και την ποιοτική και ποσοτική σύνθεση του φυτοπλαγκτού. Σύγκριση με δεδομένα προηγούμενων δεκαετιών απέδειξε ότι η λίμνη έχει μια σχετική σταθερότητα ως προς τις περιβαλλοντικές συνθήκες ενώ οι ποικίλες δραστηριότητες στην ευρύτερη περιοχή (τουρισμός, ιχθυοκαλλιέργειες) δεν φαίνεται να έχουν αλλοιώσει σημαντικά την ποιότητα των υδάτων της.

**A LIMNOLOGICAL STUDY OF THE TAVROPOS RESERVOIR
(KARDITSA)**

Kafouris S., and D.B. Danielidis

*Department of Ecology and Systematics, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis, Athens 15784*

The Tavropos reservoir is located in central Greece, 25 Km west of the town of Karditsa at an elevation of 792 meters. The impoundment is approximately 45 years old and its water has an extensive agricultural and domestic use. The physical and chemical environment as well as the structure and dynamics of the phytoplankton community were studied on a yearly basis. Results showed that Tavropos reservoir is a warm monomictic lake with considerable seasonal fluctuations of physical and chemical parameters as well as in the qualitative and quantitative composition of the phytoplankton. Comparison to available data from earlier decades shows that the various activities (fish farming, touristic development) have not altered considerably the water quality up to now.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ *PIK3CA* ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

Καχρίλας Σ.¹, Λιβαδάς Κ.², Αλιβιζάτος Γ.² και Γ. Βουτσινάς¹

¹Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», ²Β' Ουρολογική Κλινική Παν. Αθηνών,
Νοσ. Σισμανόγλειο, Αθήνα

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι ο συχνότερος καρκίνος του ουροποιητικού συστήματος, αντιπροσωπεύοντας το 4,5% του συνόλου των κακοηθειών και το 1.9% των θανάτων από καρκίνο. Η χαμηλή ευαισθησία στη χημειοθεραπεία και τα υψηλά ποσοστά υποτροπής οδηγούν σε φτωχά ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης και κάνουν ιδιαίτερα σημαντική τη μελέτη των εμπλεκόμενων μοριακών μηχανισμών για τη σωστότερη πρόβλεψη της έκβασης της νόσου και την επιλογή της καταλληλότερης θεραπείας. Η φωσφατιδυλινοσιτολ-3-κινάση (PI3K) είναι μια λιπιδική κινάση, που εμπλέκεται στην καρκινογένεση λόγω του ρυθμιστικού της ρόλου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την διεισδυτικότητα, την απόπτωση και την ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία. Η απορύθμιση του μονοπατιού της PI3K είναι σημαντικό και συχνό γεγονός στην καρκινογενετική διαδικασία. Στην εργασία αυτή διερευνήθηκε το ενδεχόμενο της ύπαρξης μεταλλάξεων στα εξόνια 9 και 20 του γονιδίου *PIK3CA*, στο οποίο κωδικοποιείται η καταλυτική υπομονάδα p110α της PI3K, χρησιμοποιώντας άμεση αλληλούχιση. Σε 30 δείγματα καρκινικού ιστού από διουρηθρική εκτομή όγκου κύστης ή από ριζική κυστεκτομή βρέθηκε μια μετάλλαξη στο εξόνιο 9. Ακολούθως, μελετήθηκαν η έκφραση του γονιδίου *PIK3CA* σε επίπεδο mRNA με τη χρήση RT-PCR. Σε RNA από 20 δείγματα καρκινικού ιστού δεν παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του *PIK3CA*, γεγονός που σημαίνει ότι η παρατηρούμενη ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K/Akt στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης οφείλεται σε άλλους παράγοντες, όπως αυξημένη ενεργοποίηση της PI3K, απενεργοποίηση του PTEN ή αυξημένη ενεργοποίηση άλλων μορίων ανοδικά ή καθοδικά της PI3K. Η σε βάθος κατανόηση της εμπλοκής του μορίου αυτού στους μοριακούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν την διεισδυτικότητα των όγκων της ουροδόχου κύστης είναι καθοριστικής σημασίας για την έγκυρη πρόγνωση και την έγκαιρη επιλογή της σωστότερης θεραπευτικής προσέγγισης.

STUDY OF THE STRUCTURE AND EXPRESSION OF *PIK3CA* IN URINARY BLADDER CANCER**Kachrilas S.¹, Livadas K.², Alivizatos G.², and G. Voutsinas¹**

¹*Institute of Biology, NCSR "Demokritos",* ²*2nd Department of Urology, Medical School, University of Athens, Sismanoglio Hospital, Athens, Greece*

Urinary bladder cancer is the most frequent cancer type of the genitourinary system, representing 4.5% of the total number of malignancies and 1.9% of cancer deaths. Low sensitivity to chemotherapy and a high percentage of recurrence leads to a poor 5-year survival, making the study of the implicated molecular mechanisms particularly important for better prognosis and choice of the appropriate therapeutic procedure. Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) is a lipid kinase, implicated in carcinogenesis due to its regulatory role in cell proliferation, invasion, apoptosis and resistance to chemotherapy. The deregulation of the PI3K pathway is an important and frequent event in the carcinogenic process. In this work, we have looked for mutations in exons 9 and 20 of the *PIK3CA* gene, which codes for the catalytic subunit p110 α of PI3K, using direct sequencing. In 30 tumor tissue samples from transurethral bladder tumor resection or after radical cystectomy, one mutation in exon 9 has been found. Subsequently, we have studied the expression of *PIK3CA* at the mRNA level, using RT-PCR. In 20 tumor tissue samples we have observed no *PIK3CA* overexpression, which means that the observed activation of the PI3K/Akt pathway in bladder cancer is due to other factors, such as overactivation of PI3K, inactivation of PTEN or overactivation of other molecules upstream or downstream of PI3K. In depth understanding of PI3K implication in the molecular mechanisms that regulate the invasion of urinary bladder tumors is of major importance for valid prognosis and the choice of the appropriate therapy.

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΣΤΟ
DNA ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HUBst ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *BACILLUS
STEAROTHERMOPHILUS***

Κέρου Μ., Στεφανίδη Ε. και Κ.Ε. Βοργιάς

*Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη, Ζωγράφου, 15784, Αθήνα, Ελλάδα,
τηλ.: +302107274514, e-mail: cvorgias@biol.uoa.gr*

Οι πρωτεΐνες HU ανήκουν στην οικογένεια των "histone-like" βακτηριακών πρωτεϊνών. Πρόκειται για μικρού μοριακού βάρους, ομοδιμερείς, άφθονες, βασικές, θερμοσταθερές, συντηρημένες εξελικτικά πρωτεΐνες με την ιδιότητα να προσδένονται μη ειδικά στο DNA και να προκαλούν κάμψη της νουκλεοτιδικής αλυσίδας, διευκολύνοντας ειδικές αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεϊνών. Το μονομερές μόριο των HU μπορεί να χωριστεί σε τρεις δομικά και λειτουργικά διακριτές περιοχές: την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD), το σήμα διμερισμού (DS) και την περιοχή HTH με δομικά στοιχεία α-έλικας και β-πτυχωτής επιφάνειας που αποτελεί το κυρίως σώμα του μορίου. Οι ευρύτεροι στόχοι της εργασίας περιλαμβάνουν τη μελέτη της συμμετοχής του κυρίως σώματος του πρωτεϊνικού μορίου (περιοχές HTH και DS) στην αλληλεπίδραση με το DNA και τη θερμοσταθερότητα του μορίου. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκε μεταλλαγμένη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη HUBst που φέρει έλλειψη της περιοχής DBD. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της *in vitro* κατευθυνόμενης μεταλλαξγένεσης του γονιδίου *hubst* με τη χρήση PCR, με στόχο την αντικατάσταση των αμινοξικών καταλοίπων της HUBst που αποτελούν το προεξέχον ευλύγιστο άκρο του μονομερούς με τη συνδετική αλληλουχία NGGV. Το μεταλλαγμένο γονίδιο που παράχθηκε *hubst*(Δ160-228)(ΩNGGV) και κωδικοποιεί την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη HUBst(-amms), κλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης pET-3a και μετασηματίστηκε σε κυτταρική σειρά BLR(DE3)pLysS. Ακολούθησε η επαγωγή της παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με την προσθήκη του επαγωγέα IPTG 0,5mM και επώαση στους 32°C για 3 ώρες. Για την απομόνωση και καθαρισμό της πρωτεΐνης από το διαλυτό εκχύλισμα των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας και κατιοντο-ανταλλακτική χρωματογραφία. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη HUBst(-amms) που κατασκευάστηκε αποτελεί πολύτιμο εργαλείο στην πορεία μελέτης των θεμάτων που τέθηκαν παραπάνω. Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν τη δυνατότητα πρόσδεσης της HUBst(-amms) στο DNA παρά την έλλειψη της περιοχής DBD, αλλά και τον διαφορετικό τρόπο αλληλεπίδρασης. Μελλοντικά θα ακολουθήσει πλήρης βιοφυσικός χαρακτηρισισμός και θερμοδυναμική ανάλυση της ανασυνδυασμένης μεταλλαγμένης πρωτεΐνης.

**STUDY OF THE STRUCTURAL DNA-BINDING
PARAMETERS OF THE HUBst PROTEIN FROM
*BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS*****Kerou M., Stefanidi E., and C.E. Vorgias**

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, , Panepistimiopolis, Zographou, 15784, Athens, Greece. Tel: +302107274514, e-mail: cvorgias@biol.uoa.gr

HU proteins belong to the “histone-like” family of bacterial proteins. They are small, homodimeric, abundant, basic, thermostable, evolutionary conserved proteins, capable of non-specific DNA binding and bending, and regulation of gene expression. The monomer of the HU molecule can be divided into three structurally and functionally distinct domains: the DNA-binding domain (DBD), the dimerization signal (DS) and the HTH domain, which is comprised by α -helices and β -sheets, and constitutes the main body of the protein. Aim of our study is to determine the participation of the main body of the molecule in the thermostability and DNA interaction. For this purpose we constructed a recombinant HUBst protein carrying a deletion of the DBD domain. Firstly we performed *in vitro* site-directed mutagenesis using PCR of the *hubst* gene, resulting in the substitution of the flexible DNA-binding arm of each monomer with the linker sequence NGGV. The produced mutant gene *hubst*(Δ 160-228)(Ω NGGV) which encodes the mutant protein HUBst(-arms), was cloned in the expression vector pET-3a and transformed into BLR(DE3)pLysS host cells. Production of the recombinant protein was induced after addition of IPTG 0,5mM and incubation at 32°C for 3 hours. For the isolation and purification of the protein from the soluble bacterial extract we used affinity and cation-exchange chromatography. The mutant protein can be a valuable tool for the investigation of the above issues. Our results prove the DNA-binding capability of the HUBst(-arms) protein despite the absence of the DNA-binding arms, together with a different mode of interaction. Future plans include a complete biophysical characterization and thermodynamic analysis of the mutant HUBst protein.

**ΤΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΤΩΝ ΜΑΡΚs ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ
ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ NF-κB ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ
ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥΣ ΜΥΟΒΛΑΣΤΕΣ**

Κεφαλογιάννη Ε., Γαϊτανάκη Κ. και Ι. Μπέης

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ο σκελετικός μυς έχει προσαρμοστεί να αποκρίνεται αποτελεσματικά στο οξειδωτικό στρες, καθώς υφίσταται την αυξημένη παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) κατά την έντονη άσκηση. Παρόλ' αυτά, το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε διάφορες ασθένειες του μυός. Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η συμμετοχή των σηματοδοτικών μονοπατιών των ΜΑΡΚs και του NF-κB στην απόκριση των σκελετικών μυοβλαστών στο οξειδωτικό στρες και η πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ των παραπάνω μονοπατιών. Το H₂O₂ προκάλεσε ισχυρή ενεργοποίηση των ERKs, των JNKs και της p38-MAPK με χρονο- και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η ενεργοποίηση των ERKs και των JNKs, αλλά όχι αυτή της p38-MAPK, από το H₂O₂ ήταν εξαρτώμενη από την κινάση Src και, τουλάχιστον μερικώς, από τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Το H₂O₂, επίσης, οδήγησε στη μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα, καθώς και στη φωσφορυλίωση (Ser32/36) του ενδογενούς κυτταροπλασματικού του αναστολέα, IκB, χωρίς όμως σημαντική μείωση στα συνολικά επίπεδα του IκB. Επιπρόσθετα, το οξειδωτικό στρες είχε ως αποτέλεσμα την ισχυρή φωσφορυλίωση της p65 υπομονάδας του NF-κB στη Ser536 και τη Ser276. Η αναστολή των μονοπατιών των ΜΑΡΚs, με τη χρήση ειδικών αναστολέων, δεν φάνηκε να επηρεάζει τη επαγόμενη από το H₂O₂ μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα, ούτε τη φωσφορυλίωση του IκB. Αντίθετα, η φωσφορυλίωση της p65 στη σερίνη 276 βρέθηκε ότι εξαρτάται από την MSK1, που αποτελεί υπόστρωμα τόσο των ERK όσο και της p38-MAPK. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι, κατά το οξειδωτικό στρες, η πυρηνική μετατόπιση του NF-κB δε σχετίζεται με την ενεργοποίηση των ΜΑΡΚs, ενώ οι φωσφορυλίωσεις της p65 εξαρτώνται, εν μέρει, από τα μονοπάτια των ΜΑΡΚs, πιθανώς καθορίζοντας την ειδικότητα του σήματος.

Η έρευνα αυτή χρηματοδοτήθηκε από τη Γ.Γ.Ε.Τ. (ΠΕΝΕΔ 01ΕΔ5)

**MAPK SIGNALING PATHWAYS ARE IMPLICATED IN
NF-κB ACTIVATION DURING OXIDATIVE STRESS IN
SKELETAL MYOBLASTS****Kefaloyianni E., Gaitanaki C., and I. Beis***Department of Animal and Human Physiology, School of Biology, UOA*

Skeletal muscle is adapted to respond to oxidative stress since it is continuously subjected to an increased production of reactive oxygen species (ROS) during intense exercise. However, oxidative stress has been associated with various muscle disorders. In this study, we examined whether MAPK and NF-κB are implicated in the response of skeletal myoblasts to oxidative stress and whether there is a cross-talk between these pathways. H₂O₂ induced a strong activation of ERKs, JNKs and p38-MAPK in a time- and dose-dependent pattern. ERK and JNK activation by H₂O₂, but not that of p38-MAPK, was mediated by Src kinase and, at least in part, by EGFR. H₂O₂ also stimulated the translocation of NF-κB into the nucleus and the phosphorylation (Ser32/36) of its cytoplasmic inhibitor, IκB, without, though, a significant decrease in IκB total levels. Moreover, oxidative stress induced a strong phosphorylation of NF-κB p65 subunit at Ser536 and Ser276. Inhibition of MAPK pathways by selective inhibitors did not appear to affect H₂O₂-induced nuclear translocation of NF-κB, or the phosphorylation of IκB. On the other hand, phosphorylation of p65 at Ser276 was found to be mediated by MSK1, a substrate of both, ERKs and p38-MAPK. In conclusion, it seems that during oxidative stress, NF-κB translocation in to the nucleus is most likely not related with the MAPK activation, while p65 phosphorylations are in part mediated by MAPKs pathways, probably modifying signal specificity.

This study was funded by GSRT (PENED 01ED5)

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΗ *IN VIVO* ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΑΙΝΟΞΟΔΙΟΛΗΣ

Κιτρομηλίδου Χ.¹, Γεωργάκη Σ.¹, Κωνσταντίνου Α.², Husband Α.³,
Τσιτσιλώνη Ο.Ε.¹

¹Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α, Αθήνα,

²Τμήμα Βιολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος,

³Novogen Limited, 140 Wicks Road, North Ryde, 2113, NSW 2113, Australia

Τα τελευταία χρόνια ένα σημαντικό κομμάτι της διεθνούς έρευνας έχει προσανατολιστεί στην αντικαρκινική δράση που παρουσιάζουν ορισμένα από τα ισοφλαβονοειδή, όπως η νταϊντζεΐνη (DAID), η γενιστεΐνη (GEN) και η εκουόλη (EQ). Τα ισοφλαβονοειδή αυτά είναι πολυφαινόλες που απομονώνονται από τη σόγια και χαρακτηρίζονται ως φυτικές ορμόνες. Η φαινοξοδιόλη (PXD) είναι ένα συνθετικό ανάλογο της DAID, που επάγει απόπτωση σε ορισμένους τύπους καρκινικών κυττάρων *in vitro*, ενώ η θεραπευτική της δράση διερευνάται σε κλινικές δοκιμές φάσης I και II, σε ασθενείς με χημειοανθεκτικές μορφές καρκίνου των ωθηκών. Στη μελέτη αυτή διερευνήσαμε την ανοσολογική δράση της PXD *in vivo* σε ένα θεραπευτικό μοντέλο όγκου σε ποντίκια της φυλής Balb/C. Στο πρωτόκολλο που εφαρμόσαμε, τα ζώα ενέθηκαν υποδόρια με $0,5 \times 10^6$ κύτταρα της συγγενικής σειράς καρκίνου του εντέρου CT26 και χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες. Στην πρώτη ομάδα χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός (ομάδα μάρτυρα), στη δεύτερη PXD σε δόση 20 mg/kg βάρους ζώου και στην τρίτη PXD σε δόση 10 mg/kg βάρους ζώου. Η ανάπτυξη του όγκου και η συνολική επιβίωση των πειραματοζώων αξιολογήθηκαν για συνολικό διάστημα 50 ημερών. Από την πιο πάνω μελέτη φάνηκε η ικανότητα της PXD να μειώνει *in vivo* το ρυθμό ανάπτυξης του όγκου και να παρατείνει την βιωσιμότητα των πειραματοζώων. Η δράση της αυτή φαίνεται να ασκείται καλύτερα στη συγκέντρωση των 10 mg/kg ποντικού. Συμπερασματικά η PXD φαίνεται να δρα θεραπευτικά σε *in vivo* μοντέλα όγκου ποντικών, ενώ μελλοντικό μας στόχο αποτελεί η εφαρμογή του πιο πάνω πρωτοκόλλου, θεραπευτικά και προστατευτικά σε διάφορα μοντέλα καρκίνου.

Χρηματοδότηση από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας

**PRELIMINARY IN VIVO IMMUNOLOGICAL STUDY OF
PHENOXODIOL****Kitromelidou C.¹, Georgaki S.¹, Constantinou A.², Husband A.³,
Tsitsilonis O.E.¹**

¹Department of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, University of Athens,
²Department of Biological Sciences, University of Cyprus, Cyprus, ³Novogen Limited, 140
Wicks Road, North Ryde, 2113, NSW 2113, Australia

Recently, several international research studies have focused on the anticancer properties of isoflavones, particularly of daidzein (DAID), genistein (GEN) and equol (EQ). These isoflavones are polyphenols isolated from soybeans and are referred to as plant hormones. Phenoxodiol (PXD) is a synthetic analogue of DAID, known to induce apoptosis in cancer cells of various types *in vitro*, and its therapeutic efficacy currently being tested in phase I and II clinical trials in patients with chemoresistant ovarian tumors. In this study; we investigated the immunological action of PXD *in vivo*, in a therapeutic animal tumor model in Balb/C mice. According to our protocol, the experimental animals were subcutaneously inoculated with $0,5 \times 10^6$ CT26 syngeneic colon cancer cells and were divided into three groups. The first group (control group) was injected therapeutically with normal saline, the second group, was administered PXD at 20 mg/kg of animal weight and the third group PXD at 10 mg/kg of animal weight. All animals were evaluated over a period of 50 days for tumor growth and overall survival. According to our results, PXD can suppress tumor growth and prolong the survival of cancer-bearing mice *in vivo*. This activity is best exerted at the concentration of 10 mg/kg of animal weight. In conclusion, PXD acts therapeutically in *in vivo* murine tumor models. In the near future we intend to apply similar *in vivo* protocols both protectively and therapeutically, in various cancer models.

Funded by General Secretariat of Research and Technology

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΔΥΟ COUP-TF ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΣΤΗΝ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΑΧΙΝΟΥ

Κοζάου Ζ., Κουμή Κ., Νταή Αικ. και Κ.Ν. Φλυτζάνης

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Οι COUP-TFs, είναι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων που εμφανίζονται συντηρημένοι σε όλα τα μετέζωα και εκφράζονται κατά προτίμηση στο νευρικό σύστημα. Εκτός της συντηρημένης αλληλουχίας τους επίσης συντηρημένες είναι οι θέσεις των εσωνίων τους στους διάφορους οργανισμούς, ενώ δεν έχει παρατηρηθεί εναλλακτικό μάτισμα. Σε τρία διαφορετικά είδη αχινού όμως, παρατηρήσαμε δύο μετάγραφα αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος ενός μικρού εξωνίου 63 bp. Τα δύο mRNAs παράγουν δύο πρωτεΐνες, η μεγαλύτερη εκ των οποίων περιέχει 21 επιπρόσθετα αμινοξέα στην καρβοξυτελική επέκταση της περιοχής πρόσδεσης στο DNA (DBD). Για να εξακριβωθούν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά πρόσδεσης στο DNA, που πιθανώς να προσδίδονται από μια τέτοια αλλαγή, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των δύο cDNAs που κωδικοποιούν τις δύο πρωτεΐνες. Κατόπιν παράχθηκαν RNAs *in vitro* στα οποία έγινε μετάφραση σε δύο διαφορετικά *in vitro* συστήματα. Οι προκύπτουσες πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν σε EMSAs (electrophoretic mobility shift assay) με το C1R στοιχείο απόκρισης του COUP-TF. Παράλληλα, και προκειμένου να γίνει αναγνώριση των δύο πρωτεϊνών *in vivo* και *in vitro*, κατασκευάστηκε ένα νέο αντίσωμα ειδικό για το πεπτίδιο των 21 αμινοξέων. Το ειδικό αυτό αντίσωμα αξιοποιήθηκε σε πειράματα ανάλυσης πρωτεϊνών (Western blots), όπου και διαπιστώθηκε η σταθερή παρουσία μιας πρωτεΐνης 25kDa, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια των αχινών *P.lividus* και *S.granularis*. Για μια διεξοδικότερη ανάλυση της πρωτεΐνης αυτής επιδιώχθηκε ανοσοκατακρήμνισή της από έμβρυα αχινού και κατόπιν πρωτεομική ανάλυσή της. Με τη χρήση του ειδικού αντισώματος σε πειράματα ανοσοφθορισμού επιδιώκεται, τέλος, η εύρεση ενδεχόμενης τοπολογικής διαφοροποίησης ή όχι, στην έκφραση των δύο πρωτεϊνών, για τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του αχινού που θα προσδώσει μια επιπλέον πληροφορία στην προσπάθειά μας να προσεγγίσουμε τον πιθανό ρόλο των δύο ισομορφών.

STUDY OF TWO COUP-TF ISOFORMS DURING EMBRYONIC DEVELOPMENT OF THE SEA URCHIN**Kozaou Z., Koumi K., Dai A., and C.N. Flytzanis***Department of Biology, University of Patras, Rio 26500, Greece*

COUP-TFs are transcription factors members of the orphan nuclear receptors, showing extensive conservation within all metazoans and expression preference in the developing nervous system. In addition to their sequence conservation, the positions of intron-exon boundaries in the COUP-TF genes are also conserved and alternative splicing has not been previously reported. In three different sea urchin species though, we observed two COUP-TF embryonic transcripts the result of an alternative spliced 63bp small exon. The translation products of these two mRNAs should be two proteins differing by 21 amino acids, since the additional exon is inserted in frame with the rest of the amino acid sequence. The insertion takes place in the c-terminal extension of the DNA binding domain of the protein. We set out to determine if this insertion alters the DNA binding characteristics of the transcription factor. Thus, we cloned the entire coding regions of the two cDNAs following RT-PCR and produced the two mRNAs *in vitro*. The two proteins were also produced *in vitro* using rabbit reticulocyte and wheat germ extracts and used in EMSA experiments with the response element CIR (a DR2 COUP-TF binding site). To identify the two proteins *in vitro* and *in vivo*, in addition to the previously characterized COUP-TF antibodies, we produced a new antibody specific for the 21 aa peptide (Ab Z). Western analysis with the AbZ shows the presence of a 25kDa protein (considerably smaller than the sea urchin COUP-TF) in all embryonic stages of the sea urchins *P.lividus* and *S.granularis*. The identity of this protein is tested using proteomic analysis, after immunoprecipitation assays with the specific antibodies. We are also studying the *in vivo* embryonic distribution and subcellular localization of the 25kDa protein using immunofluorescence experiments with the sea urchin embryos from different stages.

**Η ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ D ΣΥΜΜΕΤΕΧΕΙ ΣΤΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ
ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΗ ΠΛΑΣΜΟ-
ΛΥΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ
*Triticum turgidum***

Κόμης Γ.¹, Quader Η.², Γαλάτης Β.¹, Αποστολάκος Π.¹

¹Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής, ΕΚΠΑ, Αθήνα. ²Biocenter Klein Flottbek, D-22609 Hamburg, Germany

Τα πλασμολυμένα κύτταρα της ρίζας του φυτού *Triticum turgidum* έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ογκορρύθμισης, βασικά στοιχεία των οποίων είναι συστήματα μακροσωληνίσκων σωληνίνης (Plant Cell Physiol 8, 911-922, 2002) και η συσσώρευση μιας φωσφορυλιωμένης MAPK (phospho-p46 MAPK, FEBS Lett 573, 168-174, 2004). Επίσης είναι γνωστό ότι η υπερωσμωτική καταπόνηση ενεργοποιεί το ένζυμο φωσφολιπάση D (PLD), που επάγει τη σύνθεση φωσφατιδικού οξέος (PA). Στην εργασία αυτή διερευνάται εάν το σύστημα PLD/PA συμμετέχει στον παραπάνω μηχανισμό ογκορρύθμισης, μελετώντας τις επιπτώσεις στα πλασμολυμένα κύτταρα της επίδρασης των ουσιών βουτανόλη-1 και N-ακυλαιθανολαμίνη (NAE). Η πρώτη τροποποιεί, ενώ η δεύτερη αναστέλλει τη δραστηριότητα της PLD αναστέλλοντας τη σύνθεση PA. Βρέθηκε ότι τα μειωμένα επίπεδα PA στις πλασμολυμένες ρίζες προκαλούν: α) μείωση του όγκου των πλασμολυμένων πρωτοπλαστών, β) ανάσχεση της δημιουργίας μακροσωληνίσκων, γ) ανάσχεση της συσσώρευσης της phospho-p46 MAPK και δ) εκδήλωση νεκρωτικών φαινομένων. Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι το σύστημα PLD/PA συμμετέχει στο μηχανισμό μεταγωγής του υπερωσμωτικού ερεθίσματος εμπλεκόμενο στη διαδικασία φωσφορυλίωσης της p46 MAPK, η οποία επάγει τη δημιουργία μακροσωληνίσκων και την ενεργοποίηση του μηχανισμού ογκορρύθμισης. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι εξωγενώς παρεχόμενο PA εξουδετερώνει σε μεγάλο βαθμό τις επιπτώσεις της βουτανόλης-1 και της NAE στα πλασμολυμένα κύτταρα.

Το έργο αυτό ενισχύθηκε οικονομικά από: το ΙΚΥ και την DAAD (πρόγραμμα IKYDA 2002), το Υπουργείο Παιδείας και την Ευρωπαϊκή Ένωση (πρόγραμμα Πυθαγόρας Ι) και το ΕΚΠΑ (πρόγραμμα Καποδίστριας).

**INVOLVEMENT OF PHOSPHOLIPASE D IN PROTOPLAST
VOLUME REGULATION OF PLASMOLYZED CELLS OF
*Triticum turgidum*****Komis G.¹, Quader H.², Galatis B.¹, Apostolakos P.¹**¹ *Department of Botany, Faculty of Biology, National & Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, Athens, 157 81 Greece*² *Biocenter Klein Flottbek, University of Hamburg, D-22609 Hamburg, Germany*

The probable involvement of phospholipase D (PLD)/phosphatidic acid (PA) signalling in the hyperosmotic stress response of *Triticum turgidum* root cells was investigated by examining the effects of butanol-1, *N*-acylethanolamine (NAE) and PA, on the hyperosmotic response, the organization of the tubulin cytoskeleton and the accumulation of a phosphorylated p38-like MAP kinase (phospho-p46) in plasmolyzed root cells. The effects of all the treatments were assessed by DIC microscopy of living cells, tubulin immunofluorescence, conventional TEM, tubulin immunogold localization, protoplast volume measurements and western blot analysis. Butanol-1 and NAE, compromised the viability of plasmolyzed cells, induced a marked reduction in the plasmolyzed protoplast volume, inhibited the hyperosmotically-induced tubulin macrotubule formation and the accumulation of phospho-p46. Exogenous PA reinforced the hyperosmotic response of *T. turgidum* root cells and positively affected tubulin macrotubule formation. Additionally PA alleviated the butanol-1 induced defects in plasmolyzed cells. The data combined, suggest that PLD-mediated PA synthesis occurs upstream of the accumulation of phospho-p46 to regulate the hyperosmotically-induced macrotubule formation in plasmolyzed *T. turgidum* root cells.

This work was financed by grants from the State Scholarship Foundation of Greece and the DAAD (project "IKYDA-2002"), the Hellenic Ministry of National Education and Religions Affairs and the EU (project "Pythagoras") and the University of Athens (project "Kapodistrias").

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΙΟ-ΔΕΙΚΤΩΝ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ
ΔΕΥΤΕΡΟΒΑΘΜΙΑΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΑΣΤΙΚΩΝ ΛΥΜΑΤΩΝ**

Κοντάνα Α.¹, Παπαδημητρίου Χ.², Σαμαράς Π.³ και Μ. Γιάγκου¹

¹Τομέας Γενετ., Ανάπ. και Μορ. Βιολ., Τμήμα Βιολογίας, ΑΠΘ

²Εργ. Περιβαλ. και Ενεργ. Διεργ., Τεχνολογικό Πάρκο-Θεσσαλονίκη

³Τμήμα Τεχνολογίας Αντιρύπανσης ΤΕΙ Δυτικής Μακεδονίας

Η βιοπαρακολούθηση της απόδοσης του βιολογικού καθαρισμού αστικών λυμάτων με τη χρησιμοποίηση ανώτερων οργανισμών είναι ελάχιστα μελετημένη. Οι ανώτεροι οργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς άμυνας που έχουν ως στόχο την επαναφορά του οργανισμού στην αρχική ομοιόσταση. Οι πρωτεΐνες οξειάς φάσης (APPs) και οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (HSPs) είναι τα προϊόντα δύο ξεχωριστών οικογενειών γονιδίων stress που επάγονται ως απόκριση σε διάφορα φυσικά ή χημικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Τα επίπεδα των APPs α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (AGP) και C-Αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) καθώς και της αρνητικής-APP αλβουμίνη, βρέθηκαν αυξημένα στον ορό αρουραίων που έπιναν νερό εκροής. Αντίθετα, τα επίπεδα της APP α1-αντιτρυψίνη (AT) στον ορό των παραπάνω αρουραίων ήταν σταθερά. Το νερό που προερχόταν από τις Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων της ΕΥΑΘ (Σίνδος-Μηχανιώνα) είχε φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που βρισκόταν μέσα στα επιτρεπτά όρια. Επίσης, στο εκχύλισμα λευκοκυττάρων του αίματος των παραπάνω αρουραίων υπάρχουν αυξημένα επίπεδα της γλυκοσυλιωμένης AGP (50 KDa), ενώ δε μεταβάλλονται τα επίπεδα της θερμοεπαγόμενης πρωτεΐνης 70 (*Hsp 70*). Η κροκίδωση του νερού εκροής με άνυδρο τριχλωριούχο σίδηρο προκαλεί σημαντική μείωση στα αυξημένα επίπεδα των APPs στον ορό και τα κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η AGP, η CRP και πιθανά η αλβουμίνη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ευαίσθητοι βιοδείκτες για την αξιολόγηση της ποιότητας ανακτημένων λυμάτων. Επίσης, φαίνεται ότι ένα επιπλέον στάδιο επεξεργασίας των αστικών λυμάτων, με κροκίδωση, θα μπορούσε να βελτιώσει αισθητά την αποτελεσματικότητα του βιολογικού καθαρισμού.

**DETERMINATION OF MOLECULAR BIOMARKERS TO
EVALUATE THE EFFECTIVENESS OF DOMESTIC
WASTEWATER TREATMENT****Kontana A.¹⁺, Papademetriou C.², Samaras A.³, and M. Yiangou¹**¹*Dept. Genet., Dev. & Mol. Biol., Sch. Biol., Aristotle Univ. Thessaloniki*²*Chem. Proc. Eng. Res. Inst., Centre Res. & Technology-Thessaloniki*³*Sch. Technology, TEI West Macedonia*

In response to several physical or chemical stress stimuli eukaryotes possess natural defence mechanisms by which restorative processes are initiated. Acute phase protein genes belong to a distinct family of genes that responds to inflammatory agents, infections, heavy metals and heat shock. Several stress proteins have been suggested as biomarkers for biomonitoring domestic wastewater plant outflow. In this study we determined the levels of the α 1-acid glycoprotein (AGP), α 1-antitrypsin (AT), C Reactive Protein (CRP) and Albumin (ALB) in the serum of rats that were drinking secondary treated domestic wastewater. Our data showed increase of AGP, CRP and ALB while AT levels were unaffected. Additionally, intracellular AGP levels, isolated from blood leucocytes, were increased significantly, while Hsp 70 levels remained unaffected. Furthermore, ferric chloride coagulation of secondary treated wastewater resulted in significant reduction of serum and intracellular AGP levels. The above data indicate that AGP, CRP and ALB may serve as sensitive molecular biomarkers to evaluate the effectiveness of wastewater treatment.

Ο ΠΙΘΑΝΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ HSP70 ΣΤΟΥΣ ΠΥΡΗΝΙΣΚΟΥΣ: ΜΙΑ ΝΕΑ ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Κοτόγλου Π.¹, Βεζυράκη Π.³, Δούλιας Π-Θ.², Γαλάρης Δ.², Μποζίδης Π.¹, Τζαβάρας Θ.¹ και Χ. Αγγελίδης¹

¹Εργαστήριο Γ. Βιολογίας, ²Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, ³Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Για πολλά χρόνια δεν ήταν ξεκάθαρος ο ρόλος της μετακίνησης της Hsp70 (πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70) στους πυρηνίσκους κατά την διάρκεια έκθεσης των κυττάρων σε στρες. Στην παρούσα εργασία, προτείνουμε ότι η Hsp70 μεταναστεύει στον πυρήνα και στους πυρηνίσκους με σκοπό την προστασία του πυρηνικού DNA και του πυρηνισκικού rDNA (ριβωσωμικό DNA) από τα σπασίματα. Για να εξετάσουμε αυτήν την υπόθεση τροποποιήσαμε δύο μεθόδους, μία για την απομόνωση πυρηνίσκων και μία δεύτερη για την ανίχνευση σπασιμάτων των πυρηνισκικών rDNAs. Χρησιμοποιώντας αυτήν την μεθοδολογία καταφέραμε να μελετήσουμε τις διαφορές στα σπασίματα του πυρηνισκικού DNA (rDNA) κάτω από φυσιολογικές ή στρες συνθήκες. Συγκεκριμένα, το πυρηνισκικό “comet assay” (NCA: Nucleolar Comet Assay) φανέρωσε ότι το rDNA υφίσταται σπασίματα, πιθανόν κατά προτεραιότητα συγκρινόμενο με αυτό του πυρηνικού DNA, κατά την διάρκεια έκθεσης των κυττάρων σε υψηλή θερμοκρασία ή GO (Glucose Oxidase). Επιπλέον, αποδείξαμε ότι η συσσώρευση της Hsp70 στους πυρηνίσκους κατά την διάρκεια του στρες είναι απαραίτητη και έχει σαν στόχο την ακεραιότητα του rDNA. Η απουσία της Hsp70 στα HeLa κύτταρα, μέσω γονιδιακής αποσιώπησης με siRNA (Hsp70-knockdown), έδειξε τον σημαντικό ρόλο της Hsp70 στην προστασία του rDNA. Ετσι, HeLa-siRNA-Hsp70 κύτταρα (-Hsp70) ήταν πολύ ευαίσθητα σε επίδραση υψηλής θερμοκρασίας ή GO και τα DNA-σπασίματα ήταν αυξημένα συγκρινόμενα με αυτά των μαρτύρων HeLa κυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα σπασίματα του rDNA συνιστούν ένα νέο στάδιο, σε αυτό που αποκαλούμε πυρηνική απόπτωση, τα οποία και πιθανόν να είναι η αιτία για την Hsp70 πυρηνισκική μεταφορά, κατά την διάρκεια των αποπτωτικών στρες.

Αυτή η ερευνητική πρόταση συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση/Ελληνικό Υπουργείο Παιδείας/Heraklitos Κωδικός υποέργου: #1784#. Επίσης, αυτή η πρόταση χρηματοδοτήθηκε μερικώς με πρόγραμμα από το Εμπειρικό Ίδρυμα (11-7-2000).

THE POSSIBLE ROLE OF HSP70 IN NUCLEOLUS: A NEW METHOD FOR STUDYING NUCLEAR APOPTOSIS**Kotoglou P.¹, Vezyraki P.³, Doulias P-T.², Galaris D.², Bozidis P.¹,
Tzavaras T.¹, and C. Angelidis¹**¹Laboratory of General Biology, ²Laboratory of Biological Chemistry³Laboratory of Physiology, University of Ioannina, Medical School, Ioannina 45110

For many years it was not clear the target of hsp70 translocation to the nucleoli during cells' stress exposure. In this report, we propose that hsp70 translocates to the nucleus and to nucleoli in order to protect the nuclear DNA and the nucleolar rDNA (ribosomal DNA) from the breaks. To examine this hypothesis, we modified two methods, one for nucleoli isolation and a second one for rDNA breaks identification. Using this methodology we managed to study the differences in rDNA-breaks under control or stress condition. Concretively, the "Nucleolus's Comet Assay" (NCA) revealed that rDNA undergoes DNA-breaks, possible on priority compared to that of nuclear DNA, during exposure of cells to heat or GO (Glucose Oxidase) treatment. Furthermore, we demonstrated that the hsp70 accumulation in the nucleoli during stress is indispensable in order to have less breaks in the rDNA. The hsp70 absence in HeLa cells, via hsp70 gene silencing (knockdown) indicated the essential role of hsp70 in rDNA protection. Therefore, HeLa-siRNA-hsp70 cells (-hsp70) were very sensitive in both heat or GO treatment and their rDNA breaks were increased comparing to that of control HeLa cells. Taking all together, we suggested that rDNA strand breaks constitute a new step in what we usually name as nuclear apoptosis, which is maybe the reason for hsp70 nucleoli translocation during apoptotic stresses.

This research was co-funded by the European Union in the framework of the program "Heraklitos" of the "Operational Program for Education and Initial Vocational Training" of the 3rd Community Support Framework of the Hellenic Ministry of Education, funded by 25% from national sources and by 75% from the European Social Fund (ESF). Code No#1784#.

Also, this work was partial supported by grant from Empeirikio Institution (11-7-2000).

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΟΣ 3-ΠΟΛΥΑΜΙΝΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΦΑΙΝΙΚΟΛΗΣ

Κούβελα Α.Χ.¹, Γκαρνέλης Θ.², Παπαϊωάννου Δ.² και Δ.Α. Καλπαξής¹

¹Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Παν/μιο Πατρών

²Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Πατρών

Η χλωραμφαινικόλη (CAM) αναστέλλει την πρωτεϊνική σύνθεση στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, αλληλεπιδρώντας με τη μεγάλη ριβοσωματική υπομονάδα. Προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριό μας έχει δείξει ότι η σπερμίνη (SPM), δεσμευόμενη πλησίον της θέσης πρόσδεσης της CAM, διευκολύνει την αλληλεπίδραση αυτού του αντιβιοτικού με το ριβόσωμα, πιθανώς δρώντας απ' ευθείας ή μεταβάλλοντας την τοπική διαμόρφωση του ριβοσώματος. Μεταξύ των μορίων της SPM που εμπλέκονται σ' αυτή την αλληλεπίδραση, εκείνο που προσδέεται στη θέση U2506 του 23S rRNA βρέθηκε να παίζει κεντρικό ρόλο, με το να διαμεσολαβεί στη σύνδεση της θέσης U2506 με τη 3-OH ομάδα της CAM. Οι παρατηρήσεις αυτές μας ώθησαν να συνθέσουμε ένα ανάλογο της CAM που είχε ομοιοπολικά συνδεδεμένο στη θέση 3 ένα μόριο SPM και να ελέγξουμε την ικανότητά του να αναστέλλει την πρωτεϊνική σύνθεση και ανάπτυξη κυττάρων της *Escherichia coli*. Η δραστηριότητα του αναλόγου CAM-SPM, ως αναστολέα της πρωτεϊνικής σύνθεσης, ελέγχθηκε σε *in vitro* σύστημα της *E. coli*. Η εισαγωγή της SPM στο μόριο της CAM δεν μετέβαλε το τύπο της αναστολής. Δηλ. το ανάλογο CAM-SPM βρέθηκε να αλληλεπιδρά με το ριβόσωμα μέσω μηχανισμού δύο σταδίων, συμπεριφερόμενο ως αναστολέας βραδείας δεσμεύσεως. Ωστόσο, η ανασταλτική του δράση βρέθηκε σχετικά ελαττωμένη, συγκρινόμενη με εκείνη της CAM ($K_i = 5,6 \mu\text{M}$ έναντι $3,1 \mu\text{M}$). *In vivo* πειράματα απεκάλυψαν ότι η τιμή MIC της CAM ήταν $8 \mu\text{g/ml}$, ενώ η τιμή MIC του αναλόγου CAM-SPM ήταν σημαντικά υψηλότερη, ίση με $300 \mu\text{g/ml}$. Επειδή φαινόμενα στερεοχημικής παρεμπόδισης δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά τη συγγένεια του ριβοσώματος για το αντιβιοτικό, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η περιορισμένη αντιβακτηριακή δραστηριότητα του αναλόγου οφείλεται μάλλον σε ελαττώση της ικανότητας για ενδοκυττάρωση, πιθανώς προκαλούμενη από το αυξημένο μέγεθος του αναλόγου και την εισαγωγή μιας πολικής ομάδας.

**SYNTHESIS AND BIOLOGICAL POTENCY OF A 3-POLYAMINE
TETHERED DERIVATIVE OF CHLORAMPHENICOL****Kouvela E.C.¹, Garnelis T.², Papaioannou D.², and D.L. Kalpaxis¹**¹*Laboratory of Biochemistry, School of Medicine, University of Patras*²*Laboratory of Organic Chemistry, School of Chemistry, University of Patras*

Chloramphenicol (CAM) inhibits protein synthesis in prokaryotes, interacting with the large ribosomal subunit. Previous work in our laboratory has demonstrated that spermine bound at the vicinity of CAM binding pocket facilitates the interaction of CAM with ribosomes, either directly or by changing the local conformation of ribosomes. Among the spermine molecules implicated in this interaction, one anchoring at U2506 of 23S rRNA was realized to possess central role by bridging this position with the 3-OH group of CAM. These observations prompted us to synthesize an analogue of CAM harboring one spermine (SPM) unit covalently linked to its 3-OH position and to test its ability to inhibit protein synthesis and growth of *Escherichia coli* cells. Activity of the CAM-SPM conjugate as protein synthesis inhibitor was tested in an *E. coli* cell-free system in which a peptide bond is formed between puromycin and AcPhe-tRNA bound at the P-site of poly(U)-programmed ribosomes. The insertion of spermine in the CAM molecule did not alter the type of inhibition; CAM-SPM was found again to interact with ribosomes via a two-step mechanism, behaving as a slow binding inhibitor of peptide bond formation. Nevertheless, the inhibitory activity of CAM-SPM was found somewhat reduced, compared to that of CAM ($K_i = 5.6 \mu\text{M}$ vs $3.1 \mu\text{M}$). In vivo experiments revealed that the minimal inhibitory concentration (MIC) of CAM was $8 \mu\text{g/ml}$, whereas the MIC of CAM-SPM was significantly higher, that is $300 \mu\text{g/ml}$. Since steric effects do not appear to play a substantial role in the ribosome affinity for CAM-SPM, we can conclude that the reduced antibacterial activity of CAM-SPM may be attributed to its decreased uptake by the cells, possibly due to the increased molecular weight and basicity of the analogue.

ΑΝΘΙΣΤΑΜΕΝΟ ΣΤΗΝ 1,8-ΚΙΝΕΟΛΗ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *E.coli*

Κουρτζέλης Ι. και Α. Σιβροπούλου

Εργαστήριο Γ. Μικροβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 54124
Θεσσαλονίκη

Η 1,8-κινεόλη, ένα μονοτερπένιο, είναι το κύριο συστατικό πολλών αιθερίων ελαίων (*Eucalyptus* ssp, *Salvia fruticosa* κ.α.). Προηγούμενες μελέτες μας έδειξαν ότι η 1,8-κινεόλη εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια. Σε μια προσπάθεια προσέγγισης του μηχανισμού αντιμικροβιακής δράσης της ένωσης αυτής, απομονώθηκε μετά από διαδοχικούς κύκλους επιλογής στην παρουσία της 1,8-κινεόλης, το ανθιστάμενο στέλεχος *E.coli* 8879^A το οποίο ήταν λιγότερο ευαίσθητο στην 1,8-κινεόλη από ότι το πατρικό στέλεχος *E.coli* 8879. Σύγκριση της κινητικής ανάπτυξης των δύο στελεχών στην απουσία ή παρουσία της 1,8-κινεόλης σε αραιώση 1/500, έδειξε τα ακόλουθα: (α) η παρουσία της 1,8-κινεόλης οδήγησε σε σημαντική αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού του ανθιστάμενου στελέχους *E.coli* 8879^A συγκριτικά με την ανάπτυξη του στην απουσία της ένωσης και (β) στην απουσία της 1,8-κινεόλης η κινητική ανάπτυξης των δύο στελεχών ήταν σχεδόν ισοδύναμες, ενώ η παρουσία της 1,8-κινεόλης προκάλεσε σχεδόν πλήρη αναστολή της ανάπτυξης του πατρικού στελέχους. Σύγκριση του πολυπεπτιδικού προτύπου των δύο στελεχών έδειξε ότι αυτά διαφέρουν ως προς την έκφραση ενός πολυπεπτιδίου μεγέθους 43 kDa. Το 43 kDa πολυπεπτίδιο απομονώθηκε από SDS-PAGE και χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση ποντικών. Ο πολυκλωνικός ορός που παράχθηκε αναγνώρισε το αντιγόνο (Western immunoblotting) στα δύο στελέχη. Η πρωτεΐνη αυτή επάγεται μετά από θερμικό πλήγμα στο *E.coli* 8879 ή μετά από ανάπτυξη στην παρουσία 1,8-κινεόλης στο *E.coli* 8879^A. Μελέτες ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται σε συγκεκριμένα σημεία στις εξωτερικές μεμβράνες του *E.coli* 8879^A που αναπτύχθηκε στην παρουσία της 1,8-κινεόλης και στο πατρικό στέλεχος που είχε υποστεί θερμικό πλήγμα. Αντίθετα, ο εντοπισμός της πρωτεΐνης διέφερε όταν το πατρικό στέλεχος δεν είχε υποστεί θερμικό πλήγμα και σε αυτήν την περίπτωση η πρωτεΐνη ήταν διάχυτη στο εσωτερικό του κυττάρου.

E. coli* STRAIN RESISTANT TO 1,8-CINEOLE*Kourjelis I., and A. Sivropoulou**

Lab. of G. Microbiology, Department of Biology, Aristotle University, Thessaloniki 54124, Greece

1,8-cineole, a monoterpene, is the major component of many essential oils (*Eucalyptus* spp, *Salvia fruticosa*). Previously we reported the antimicrobial properties of 1,8-cineole against Gram positive and Gram negative bacteria. In an effort to approach the mechanism of antimicrobial action of 1,8-cineole, we isolated after repeated rounds of selection in the presence of 1,8-cineole the resistant strain *E.coli* 8879^A, that was less sensitive to 1,8-cineole than the parental *E.coli* 8879 strain. Comparison of the growth kinetics of the resistant and the parental strains in the absence or in the presence of 1/500 dilution of 1,8-cineole showed the following: (i) the growth of the resistant strain *E.coli* 8879^A in the presence of 1,8-cineole led to considerable increase of bacterial population, compared to its growth in the absence of 1,8-cineole, and (ii) in the absence of 1,8-cineole the growth kinetics of both strains were almost equivalent, while the presence of 1,8-cineole almost abrogated the growth of the parental strain. The polypeptide profile of these strains showed that it differs in the expression of a 43 kDa polypeptide. The 43 kDa polypeptide was isolated from SDS-PAGE and used to immunize mice. The derived polyclonal antibodies recognized (Western immunoblotting) the antigen in both strains. This protein was induced after heat shock treatment in *E. coli* 8879 or after growth in the presence of 1,8-cineole in *E.coli* 8879^A. Studies of immunofluorescence showed that the protein is localized in particular points on the external membranes of *E.coli* 8879^A that has been grown in the presence of 1,8-cineole and in heat shock-treated parental strain. In contrast, the protein localization was different in untreated *E.coli* 8879 cells, and in this case the protein was diffuse in the interior of the cell.

**ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΤΕΝΑ ΣΥΓΓΕΝΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΩΝ
ΠΑΡΑΣΙΤΟΕΙΔΩΝ *Aphidius colemani* ΚΑΙ *A. transcaspicus*
(HYMENOPTERA: BRACINIDAE) ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΩΝ ITS2
DNA ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ**

Κούρτη Α., Γαραντωνάκης Ν. και Θ. Γκουβίτσας

Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Ιερά Οδός 75, 11855, Αθήνα

Διάφορα γονίδια έχουν χρησιμοποιηθεί για να υπολογίσουν τη γενετική απόκλιση στενά συγγενικών ειδών ή πληθυσμών εντόμων. Το ταξινομικό επίπεδο στο οποίο τα κατάλληλα γονίδια ή οι νουκλεοτιδικές περιοχές είναι χρήσιμα, ποικίλει μεταξύ των διαφόρων ταξινομικών ομάδων. Τα τμήματα του ITS2, που βρίσκονται μεταξύ του 5.8 S και 28S ριβοσωμικών DNAs, χρησιμοποιούνται ως κατάλληλοι μάρτυρες, επειδή εμφανίζουν υψηλή επαναληπτικότητα και σχετική απόκλιση ακολουθιών μεταξύ στενά συγγενικών πληθυσμών. Αποτελούν έτσι χρήσιμη πηγή πληροφοριών για συγκρίσεις στενά συγγενικών ειδών, υποειδών ή πληθυσμών εντόμων. Το γένος της σφήκας *Aphidius*, είναι μια ομάδα που περιέχει μεγάλο αριθμό ειδών, εκ των οποίων όλα προσβάλλουν αφίδες και χρησιμοποιούνται ως φυσικός (βιολογικός) τρόπος καταπολέμησης των αφίδων σε κήπους και πάρκα και καλλιέργειες. Κλωνοποιήσαμε και αλληλουχίσαμε τη ριβοσωμική DNA ακολουθία του ITS2, για τα στενά συγγενικά είδη *Aphidius colemani* (από προσβολή σε *Aphis gossypii*) and *A. transcaspicus* (από προσβολή σε *Hyalopterus pruni*). Σχεδιάσαμε εξειδικευμένους εκκινητές βασιζόμενοι στις ITS2 ακολουθίες. Η ενίσχυση με PCR σε DNA από *Aphidius*, μετά από ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης, διέκρινε επιτυχώς τα *A. colemani* και *A. transcaspicus* από άλλα. Αλληλουχίσαμε ένα τμήμα νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 750 βάσεων για το *A. colemani* και 680 βάσεων για το *A. transcaspicus*, ενώ δεν πήραμε παρόμοια τμήματα από άλλα είδη *Aphidius*. Η ITS2 αλληλουχία των *A. colemani* και *A. transcaspicus* εμφανίζει A/T 75% και 73% αναλογικά και νουκλεοτιδικές διαφορές της τάξεως του 0.13%. Η ποικιλομορφία και το μέγεθος της αλληλουχίας της περιοχής ITS2 σ' αυτούς τους δύο πληθυσμούς *Aphidius* προτείνει ότι συνολικά η εξελικτικοί μηχανισμοί δεν έχουν ομογενοποιήσει όλα τα rDNA αντίγραφα για τη φυλογενετική πληροφοριακή και το ορισμό των δύο πληθυσμών. Τα δεδομένα από την ανάλυση του ITS2 δηλώνουν ότι υπάρχει κάποιος διαχωρισμός μεταξύ των δύο πληθυσμών, αλλά δεν συγκλίνουν σε διαφορές ειδών ή υποειδών. Αυτά τα προκαταρκτικά δεδομένα προτείνουν ότι οι πληθυσμοί του *A. colemani* και *A. transcaspicus* δεν αποτελούν ξεχωριστά είδη ή υποείδη.

**EVALUATION OF THE RIBOSOMAL ITS2 DNA SEQUENCES IN
SEPARATING CLOSELY RELATED POPULATIONS OF THE
PARASITOID *Aphidius colemani* AND *A. transcaspicus*
(HYMENOPTERA: BRACINIDAE)**

Kourti A., Garantonakis N., and T. Gkouvitsas

*Department of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens, Iera Odos
75, 11855, Athens*

Different genes have been used to evaluate the genetic divergence of closely related species or populations of insects. The taxonomic level at which specific genes or nucleotide regions are useful varies across taxa. Fragments of ITS2, located between the 5.8 S and 28S ribosomal DNAs, are good candidates for markers. They have highly repetitive and relatively divergent sequences among closely related populations, and have proven useful for comparison of closely related insect species, subspecies, or populations. The wasp genus *Aphidius* is a large group containing numerous species, all of which attack aphids and provide natural control of aphids in backyard gardens, commercial fields, and urban landscapes. Ribosomal DNA sequences for the internal transcribed spacer 2 (ITS2) were first cloned and sequenced from *Aphidius colemani* (from *Aphis gossypii*) and *A. transcaspicus* (from *Hyalopterus pruni*). We designed specific primers based on the ITS2 sequences. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of aphid DNA using these primers, followed by agarose gel electrophoresis, successfully distinguishes *Aphidius colemani* and *A. transcaspicus* from other *Aphidius* species. A 750-bp nucleotide fragment and a 680-bp fragment were amplified only from *Aphidius colemani* and *A. transcaspicus*, respectively, and no such fragments were amplified from any other wasp species. The ITS2 sequence of *Aphidius colemani* and *A. transcaspicus* has A/T bias 75% and 73% and the nucleotide differences are 0.13%. The variation in sequence and length of the ITS2 region in *Aphidius* populations suggests that concerted evolution has not homogenized all rDNA copies within phylogenetically informative and defined the two populations. The data from ITS2 indicate that there may be some separation between populations, but it is not congruent with host-plant differences. These preliminary data suggest that the *Aphidius colemani* population is not a distinct species or subspecies from the *A. transcaspicus* populations

ΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΩΡΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Galeus melastomus* ΣΤΟΝ ΕΥΒΟΪΚΟ ΚΟΛΠΟ

Κουστένη Β., Μετόχης Χρ., Μεγαλοφώνου Π.

*Τομέας Ζωολογίας-Θαλάσσιας Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, 15784 Αθήνα*

Ο μελανόστομος καρχαρίας (*Galeus melastomus* Rafinesque, 1810) της οικογένειας Scyliorhinidae, είναι είδος βαθύβιο, περιορισμένης εμπορικότητας που απαντάται στην ηπειρωτική υφαλοκρηπίδα και στην ανώτερη ηπειρωτική κατώφλεια της Μεσογείου και του Ανατολικού Ατλαντικού σε βάθη μεταξύ 55 και 1200 μέτρων. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά της βιολογίας αναπαραγωγής του είδους στον Ευβοϊκό κόλπο. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν κατά την άνοιξη και το καλοκαίρι του έτους 2005 με αλιευτικά σκάφη παράκτιας αλιείας. Συνολικά εξετάστηκαν τα μορφομετρικά στοιχεία και το στάδιο γεννητικής ωριμότητας σε 85 άτομα των οποίων το ολικό μήκος κυμαινόταν από 359 έως 550 mm. Η αναλογία φύλων ήταν περίπου 1:1 με τα θηλυκά να είναι σημαντικά μεγαλύτερα των αρσενικών. Για την μελέτη της γεννητικής ωριμότητας με μακροσκοπική παρατήρηση των γονάδων χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα Stehmann. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικά κριτήρια και υπολογίστηκε ο γοναδοσωματικός δείκτης. Τόσο η μακροσκοπική όσο και η μικροσκοπική παρατήρηση των γονάδων έδειξε ότι περισσότερα του 70% των ατόμων που εξετάστηκαν ήταν ώριμα γεννητικά. Ανάλογα με το στάδιο γεννητικής τους ωριμότητας όλα τα άτομα κατατάχθηκαν σε ανώριμα και ώριμα και με βάση το μοντέλο της σιγμοειδούς καμπύλης εκτιμήθηκε το μήκος πρώτης γεννητικής ωριμότητας L_{50} και στα δύο φύλα. Διαπιστώθηκε ότι τα αρσενικά ωριμάζουν σε μικρότερο μέγεθος σε σχέση με τα θηλυκά. Με τη παρατήρηση και καταμέτρηση των ωρίμων ωοκυττάρων στις ωοθήκες καθώς επίσης με την αρίθμηση των αυγών στους διευρυμένους ωαγωγούς υπολογίστηκε η γονιμότητα. Ο αριθμός των αυγών σε κάθε ωαγωγό κυμάνθηκε από ένα έως επτά.

Η εργασία αυτή χρηματοδοτήθηκε στα πλαίσια του έργου ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II – ΕΠΕΑΕΚ, που συγχρηματοδοτήθηκε κατά 75% από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και κατά 25% από εθνικούς πόρους.

SEXUAL MATURITY AND FECUNDITY OF THE BLACKMOUTH CATSHARK, *Galeus melastomus*, IN THE EVOIKOS GULF**Kousteni V., Metochis Chr., Megalofonou P.***Department of Zoology Marine Biology, Faculty of Biology, National & Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, 15784 Athens*

The blackmouth catshark (*Galeus melastomus*, Rafinesque, 1810) belongs to the family Scyliorhinidae and is a deepwater bottom-dwelling shark, not of a high commercial value. It is found on the outer continental shelves and upper slopes in depths that range between 55 and 1200 m, in the Mediterranean Sea and the eastern Atlantic Ocean. In the present study, some basic characteristics of the reproductive biology of the species were studied in the Evoikos Gulf. Sampling was carried out during the spring and summer months in 2005 by fishing vessels of the coastal small-scale fishery. In a total of 85 specimens ranging in total length from 359 to 550 mm the morphometric measurements and stages of sexual maturity were investigated. The sex ratio was 1:1, with females being larger than males. Sexual maturity was determined by macroscopic observation following the scale described by Stehmann. Moreover, histological criteria and gonadosomatic indices were also used. Both microscopic and macroscopic observations showed that more than 70% of the specimens were mature. Once all individuals were classified, size-at-first-maturity L_{50} was determined by fitting maturity ogives using the logistic curve. Males were found to be mature in a smaller size than females. Fecundity was assessed numbering both the ripe oocytes in the ovaries and the egg capsules in the oviducts. The number of egg capsules ranged from one to seven in each oviduct.

The present study was funded through the Operational Programme for Education & Initial Vocational Training (O.P. "Education") in the framework of the project "Pythagoras II – support of University Research Groups with 75% from European Social Funds and 25% from national funds.

**Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜHC ΤΗΣ ΚΛΑΣΗΣ II ΤΟΥ
ΓΟΝΙΔΙΟΥ DQA ΣΤΟΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΛΑΓΟ (*LEPUS EUROPAEUS*)
ΚΑΙ ΤΟΝ ΟΡΕΙΝΟ ΛΑΓΟ (*LEPUS TIMIDUS*) ΣΤΗΝ ΕΛΒΕΤΙΑ**

**Κουτσογιαννούλη Ε.¹, Πυροβέτση Α.¹, Σταμάτης Κ.¹, Suchentrunk F.²,
Μαμούρης Ζ.¹**

¹Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας ²Research Institute of
Wildlife Ecology, Vienna, Austria

Το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) είναι μια γονιδιοματική περιοχή, που εμπλέκεται στην ανοσολογική απόκριση. Ο συνήθης υψηλός πολυμορφισμός που βρέθηκε στα γονίδια της κλάσης II του MHC, επικεντρώνεται κυρίως στο εξόνιο 2. Μεταξύ των θηλαστικών έχουν χαρακτηριστεί διάφορα γονίδια της κλάσης II (DRA, DRB, DQA, DQB). Μελέτες ανάλυσης αλληλουχιών σε διάφορα είδη θηλαστικών έδειξαν σημαντική διακύμανση του πολυμορφισμού. Τα επίπεδα του πολυμορφισμού συχνά έρχονται σε αντίθεση με προβλέψεις που βασίζονται στη γνωστή δημογραφική ιστορία των ειδών και κάνουν δύσκολη την εξαγωγή γενικών συμπερασμάτων ως προς τους μηχανισμούς εξέλιξης του MHC. Κοινωνικοί και οικολογικοί παράγοντες όπως το σύστημα ζευγαρώματος, η κοινωνική δομή και η οικοθέση παίζουν υποθετικά σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του ανοσολογικού συστήματος. Στην παρούσα μελέτη διερευνούμε με τη μέθοδο SSCP, σε συνδυασμό με άμεση αλληλούχιση, τα επίπεδα πολυμορφισμού του γονιδίου DQA σε 56 άτομα *L. timidus* και 84 άτομα *L. europaeus* στην Ελβετία, όπου τα δύο είδη συνυπάρχουν. Η ανάλυση έδειξε δυο καλά διαχωρισμένα είδη με τελείως διαφορετικά πρότυπα SSCP. Παρατηρήθηκε μεγαλύτερος πολυμορφισμός για το *L. europaeus* (11 πρότυπα, 13%) σε σχέση με το *L. timidus* (5 πρότυπα, 8,9%), σε αντίθεση με αυτόν που καταγράφηκε για το mtDNA σε προηγούμενη μελέτη για τους ίδιους πληθυσμούς. Τέλος υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για εισδοχικό υβριδισμό μεταξύ των δύο φυλογενετικά καλά διαχωρισμένων ειδών.

POLYMORPHISM OF THE MHC CLASS II *DQA* GENE IN BROWN HARES (*LEPUS EUROPAEUS*) AND MOUNTAIN HARES (*LEPUS TIMIDUS*) FROM SWITZERLAND**Koutsogiannouli E.¹, Pyrovetsi A.¹, Stamatis C.¹, Suchentrunk F.², Mamuris Z.¹**¹*Department of Biochemistry and Biotechnology, 26 Ploutonos Street, GR-41221, Larissa University of Thessaly*²*Research Institute of Wildlife Ecology, Vienna Veterinary University, Savoyenstrasse 1, A-1160 Vienna, Austria*

The major histocompatibility complex (MHC) is a genomic region involved in the immune response. The usually high polymorphism found in MHC class II genes is generally confined to exon 2. Among different mammals species various MHC class II genes (DRA, DRB, DQA and DQB) have been characterised. Sequence variation studies in several species have found a range of variability, often conflicting with predictions based on known demographic history, making it difficult to draw general conclusion on the role of selection in MHC evolution in these taxa. Social and ecological parameters such as mating system, social structure, and habitat are hypothesised to play an important role in the evolution of the immune system. In this study we investigate, using the SSCP method, in combination with nucleotide sequence analysis, the levels of polymorphism of the DQA gene in 56 *L. timidus* individuals and 84 *L. europaeus* individuals from Switzerland, where the two species coexist. Data analysis showed two well-defined species with completely different SSCP profiles. Higher level of polymorphism was observed for *L. europaeus* (11 profiles, 13%) compared with *L. timidus* (5 profiles 8,9%), in contrast to the pattern of polymorphism observed for the mitochondrial DNA in a previous study on the same populations. Finally, there was clear indication of bi-directional nuclear introgression among these two species.

**ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΑΙΜΟΧΡΩΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΣΚΕΛΕΤΟ ΚΑΙ ΣΤΗ
ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ
ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ**

**Κριεμπάρδης Α.^{1,2}, Αντωνέλου Μ.¹, Σταμούλης Κ.², Οικονόμου-
Petersen Ε.², Μαργαρίτης Λ.Χ.¹, Παπασιδέρη Ι.¹**

¹Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρων & Βιοφυσικής,
²Εθνικό Κέντρο Αιμοδοσίας, Αθήνα

Κατά την αποθήκευση συμπτωκωμένων ερυθρών προς μετάγγιση σε διαλύματα συντήρησης, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες υφίστανται προοδευτικές παθολογικές μεταβολές. Σκοπός της μελέτης αυτής είναι ο προσδιορισμός τυχόν οξειδωτικών τροποποιήσεων της αιμοσφαιρίνης που προσδέεται στη μεμβράνη και η πιθανή συσχέτισή της με τους σκελετούς. Μελετήθηκαν έξι ασκοί ερυθρών αιμοσφαιρίων σε CPDA σε τακτά χρονικά διαστήματα της μεταγγίσιμης περιόδου. Μεμβράνες και σκελετοί αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά και ανιχνεύτηκε η αιμοσφαιρίνη σε ανοσοστοπώματα. Βρέθηκε, ότι κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης αυξάνεται η πρόσδεση της αιμοσφαιρίνης στη μεμβράνη και μάλιστα με τη μορφή πιθανά οξειδωμένων ή αποδιαταγμένων συμπλεγμάτων (αιμοχρώματα). Παράλληλα παρατηρήθηκε προοδευτική συσσώρευση αιμοσφαιρίνης και αιμοχρωμάτων στους σκελετούς σε ποσότητες που ήταν ανάλογες του χρόνου αποθήκευσης. Συμπεραίνεται ότι η αλληλεπίδραση της οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης με τη μεμβράνη και το σκελετό, όπως συμβαίνει στα σύνδρομα της Μεσογειακής αναιμίας και στην ερυθροκυτταρική γήρανση, πιθανώς συνιστά μια νέα παράμετρο της παθοφυσιολογίας της αποθήκευσης. Επιβεβαιώνεται επίσης η ύπαρξη οξειδωτικών βλαβών στις ερυθροκυτταρικές πρωτεΐνες κατά την αποθήκευση και προτείνεται η πιθανή χρήση αντιοξειδωτικών στους ασκούς των ερυθρών που προορίζονται για μετάγγιση.

Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από το “Εμπειρικό Ίδρυμα” και τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του Παν/μίου Αθηνών προς την Ι. Παπασιδέρη. Ο Υποψήφιος Διδάκτορας Α. Κριεμπάρδης είναι υπότροφος του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών.

ACCUMULATION OF HEMOCHROMES IN STORED RED BLOOD CELL MEMBRANE AND CYTOSKELETON**Kriebardis A.^{1,2}, Antonelou M.¹, Stamoulis K.², Economou-Petersen E.², L.H. Margaritis¹, Papassideri I.¹**

¹University of Athens, Faculty of Biology, Department of Cell Biology & Biophysics,
²National Blood Center, Athens, Greece

During storage in anticoagulant media, red cell (RBC) membrane proteins undergo progressive alterations such as pathological interactions, oxidation and crosslinking. The aims of the present study were to determine whether the storage-induced membrane bound of Hb is in denatured/oxidized form and whether this Hb-accumulation defect concerns the skeletal proteins as well. RBC concentrates in CPDA were followed up during the storage period of 35 days and shortly afterwards. Membrane ghosts and cytoskeletons were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted for human Hb. As expected, the Hb was increasingly associated with the membrane in proportion to the duration of storage. A considerable proportion of the membrane-bound globin species consists of crosslinkings of probably oxidized/denatured hemoglobin or hemichromes. The immunoblotting analysis of the cytoskeletons, revealed a progressive accumulation of Hb and crosslinked multimers to them in amounts proportionate to the age of storage. In conclusion, these data add new insights in the pathophysiology of RBC storage lesion as an oxidized Hb- and cytoskeleton-associated pathology. Similar findings in severe thalassemia and in senescent RBCs are dictated by increased oxidative stress and are positively correlated with increased cell density and membrane rigidity that are also evident in RBC storage. These data corroborate the evidence for the occurrence of oxidative damage in membrane proteins of stored RBCs and suggest the possible use of antioxidants in the RBC stored units intended for transfusion.

This study was supported by the "Empirikion Foundation" and the Special Account for Research Grants of the University of Athens to I. S. Papassideri. PhD student A. Kriebardis, MSc also thanks the "Hellenic State Scholarship Foundation" for the award of PhD fellowship.

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ
ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΓΙΑ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ**

**Κριεμπάρδης Α.^{1,2}, Αντωνέλου Μ.¹, Σταμούλης Κ.², Οικονόμου-
Petersen Ε.², Μαργαρίτης Λ.Χ.¹, Παπασιδέρη Ι.¹**

¹Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρων & Βιοφυσικής,
²Εθνικό Κέντρο Αιμοδοσίας, Αθήνα

Η αποθήκευση του αίματος επιφέρει διάφορες βιοχημικές και μηχανικές αλλαγές στα ερυθροκύτταρα που αποδίδονται με τον όρο “αποθηκευτική βλάβη ερυθρών”. Πολλές από τις αρνητικές επιπτώσεις των μεταγγίσεων σχετίζονται με αυτές τις αλλαγές. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση τυχόν οξειδωτικών τροποποιήσεων της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού κατά την αποθήκευση ερυθρών για μετάγγιση. Αναλύθηκαν έξι ασκοί ερυθρών σε διάλυμα CPDA σε τακτά διαστήματα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Οι μεμβράνες και οι σκελετοί αναλύθηκαν με τεχνικές ηλεκτροφόρησης και ανοσοστυπώματος για διάφορα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα. Η καρβονυλίωση υπολογίστηκε μετά από επίδραση δινιτροφαινυλδραζίνης (DNPH) και ανίχνευση του επαγόμενου μορίου DNP με ειδικό αντίσωμα. Βρέθηκε ότι οι μεμβράνες και οι κυτταροσκελετοί των αποθηκευμένων για διαφορετικά χρονικά διαστήματα ερυθρών έχουν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά της καρβονυλίωσης. Καθώς προάγεται ο χρόνος αποθήκευσης αυξάνεται η ένταση και ο αριθμός των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών μοριακού βάρους 240-15 kDa, ενώ δεν παρατηρείται σημαντική πρωτεόλυση σκελετικών συστατικών. Η επαγόμενη αυξημένη καρβονυλίωση των πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και του κυτταροσκελετού σχετίζεται με τη μείωση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των ερυθροκυττάρων κατά την αποθήκευση. Τα δεδομένα υποστηρίζουν προηγούμενα έμμεσα ευρήματα σχετικά με την πρωτεϊνική οξείδωση ως παράγοντα της αποθηκευτικής βλάβης και προτείνουν νέες βελτιωμένες συνθήκες αποθήκευσης ερυθρών που προορίζονται για μετάγγιση.

Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από το “Εμπειρικό Ιδρυμα” και τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του Παν/μίου Αθηνών προς την Ι. Παπασιδέρη. Ο Υποψήφιος Διδάκτορας Α. Κριεμπάρδης είναι υπότροφος του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών.

RED BLOOD CELL PROTEIN CARBONYLATION DURING STORAGE**Kriebardis A.^{1,2}, Antonelou M.¹, Stamoulis K.², Economou-Petersen E.²,
L.H. Margaritis¹, Papassideri I.¹**

¹University of Athens, Faculty of Biology, Department of Cell Biology & Biophysics,
²National Blood Center, Athens, Greece

Ex vivo storage of blood causes a number of biochemical and mechanical changes to the red cells (RBCs) and accumulation of bioactive substances in storage medium, collectively referred to as “storage lesion”. Some of the negative effects of RBC transfusion are associated with the storage lesion. The aim of the present study was to determine the possible storage-induced membrane and cytoskeleton protein oxidation in CPDA-preserved RBCs. Ghosts and skeletons from six RBC concentrates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted against a variety of erythroid-specific antibodies. Carbonylated protein content was determined following 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization and SDS-PAGE coupled with Western blotting. Immunoblotting with DNP-specific antibody revealed increased RBC membrane and cytoskeleton protein carbonyls with prolonged storage in blood bags. A quantitative and statistically important difference in carbonylation was detected in membrane and cytoskeleton proteins stored for different time periods. There was an evident increase in the number and the intensity of the carbonylated protein bands appearing in the immunostained gel, ranging from MW 240 kDa to 15 kDa. We conclude that the protein carbonylation is increased probably in association with the diminution in total antioxidant activity of RBCs. The specific carbonylation of a set of RBC membrane and cytoskeleton proteins with prolonged storage in CPDA supports the concept of protein oxidation as a part of storage lesion. These data could give additional, useful information in valuating improved conditions for storage of RBCs intended for transfusion.

This study was supported by the “Empirikion Foundation” and the Special Account for Research Grants of the University of Athens to I. S. Papassideri. PhD student A. Kriebardis, MSc also thanks the “Hellenic State Scholarship Foundation” for the award of PhD fellowship.

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ, ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HUSH ΑΠΟ ΤΟ
ΨΥΧΡΟΦΙΛΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *SHEWANELLA PUTREFACTIENS***

Κυπραίος Μ., Στεφανίδη Ε. και Κ.Ε. Βοργιάς

*Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, Ζωγράφου, 15784, Αθήνα, Ελλάδα, Τηλ:
+302107274514, e-mail: cvorgias@biol.uoa.gr*

Το βακτηριακό χρωμόσωμα αποτελείται από ένα πλήθος προσδεδεμένες στο DNA πρωτεΐνες σχηματίζοντας μια δομή που ονομάζεται βακτηριακό νουκλεοειδές. Η κυριότερη οικογένεια αυτών των πρωτεϊνών είναι οι HU πρωτεΐνες. Η HU πρωτεΐνη προσδέεται μη ειδικά στο DNA και προκαλεί κάμψη και υπερελίκωση του μορίου. Εμπλέκεται επίσης στις διαδικασίες της αντιγραφής, μετάφρασης, επιδιόρθωσης και γονιδιακής ρύθμισης. Είναι διμερές μόριο και μπορεί να βρίσκεται είτε ως ετεροδιμερές (HUαβ) είτε ως ομοδιμερές. Δομικά η HU συνίσταται από μια συμπαγή δομή και δύο εύκαμπτες περιοχές που τυλίγουν το μόριο του DNA. Οι πρωτεΐνες HU έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοντέλα για τη μελέτη της θερμοσταθερότητας. Κυρίως έχουν απομονωθεί και μελετηθεί οι πρωτεΐνες HUBsu, HUBst και HUTmar που είναι μεσόφιλες και θερμοφιλες. Μελετήσαμε την HUSH που προέρχεται από το ψυχρόφιλο βακτήριο *Shewanella putrefaciens*. Αρχικά έγινε απομόνωση του γονιδίου *huSh* (270bp) από τη *Sh. putrefaciens* και πολλαπλασιασμός αυτού με τη χρήση της τεχνικής PCR. Ακολούθησε κλωνοποίηση του γονιδίου σε φορέα pGEM-HUSH. Μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *NdeI* και *BamHI*, έγινε κλωνοποίηση του γονιδίου στο φορέα έκφρασης pET-11a και μετασχηματισμός των κυττάρων έκφρασης BLR(DE3). Ακολούθησε επαγωγή της παραγωγής της πρωτεΐνης με προσθήκη του επαγωγέα IPTG (0,5mM) σε υγρή καλλιέργεια, στους 18°C για 3h. Για τον καθαρισμό και την απομόνωσή της χρησιμοποιήθηκαν δύο στήλες Heparin-Sepharose CL-6B, αφού προηγήθηκε εκχύλιση των κυττάρων με υπερήχους και εκλεκτική καταβύθιση της πρωτεΐνης με θειικό αμμώνιο. Σκοπός της εργασίας είναι η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων καθαρής HUSH για περαιτέρω βιοχημική, δομική και θερμοδυναμική μελέτη καθώς επίσης και σύγκρισής της με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της HU οικογένειας.

**CLONING, ISOLATION, OVERPRODUCTION AND
CHARACTERIZATION OF A HUSH PROTEIN OF THE
PSYCHROPHILIC BACTERIUM *SHEWANELLA PUTREFATIENS*****Kypraiou M., Stefanidi E., and C.E. Vorgias**

*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopoli, Zografou, 15784, Athens, Greece.
Tel: +30-210-7274514. E-mail: cvorgias@biol.uoa.gr*

The bacterial chromosome contains a number of DNA binding proteins creating a structure called bacterial nucleoid. The few hundreds HU proteins comprise the HU-histone-like protein family. HU protein binds DNA, non-specifically, causes DNA bending and negative supercoiling. It also participates in DNA replication, protein translation, DNA repairing and gene regulation. HU exists as a heterodimer (HU $\alpha\beta$) or homodimer. The structure of HU-dimer consists of a compact main body with high α -helical content and two flexible DNA binding arms. HU proteins have been used as a model system for thermostability studies. HU proteins that have been mostly studied are HUBsu, HUBst and HUTmar, which are mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic, respectively. We have studied the HUSH protein which is psychrophilic since it was isolated from the psychrophilic bacterium *Shewanella putrefaciens*. At the first step, we isolated the gene (270bp) from *Sh. putrefaciens* using PCR reaction and cloned the gene in the pGEM vector for sequencing. The pGEM-HUSH plasmid was digested with the restriction enzymes *Nde*I and *Bam*HI and the *hush* gene was ligated to pET-11a expression vector. The pET-11a-hush plasmid was transformed into the host cells *E.coli* BLR(DE3). The HUSH protein was overproduced upon induction with IPTG at 18 °C for 3h at the mid-log growth phase of the cells. The purification of HUSH was completed successfully after two steps: (a) ammonium sulfate fractionation and (b) affinity chromatography using a Heparin-Sepharose CL-6B column. The main purpose of this study is the production of large amounts of purified HUSH protein for further biochemical, structural and thermodynamic studies, in order to compare this new psychrophilic protein with the other mesophilic and thermophilic ones. This is the first study undertaken in such level.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ DOXORUBICIN ΣΤΑ HepG2 ΚΥΤΤΑΡΑ

Κυριακίδου Η.¹, Cieslak D.¹, Παπαδοπούλου Α.², Τσιφτσόγλου Α.², Λάζου Α.¹

¹ Εργ. Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας και ² Εργ. Φαρμακολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 54124

Η κυτταροτοξικότητα και κυρίως στο ήπαρ, είναι από τις σημαντικότερες παρενέργειες των φαρμάκων. Παρόλα αυτά δεν έχει αναπτυχθεί ακόμη μία απλή μέθοδος για την εκτίμηση τέτοιων βλαβερών επιδράσεων. Στην εργασία αυτή διερευνήθηκε η επίδραση της doxorubicin (DOX), ενός χημειο-θεραπευτικού παράγοντα, στην απόπτωση σε κύτταρα HepG2 με σκοπό αφενός να αποσαφηνιστούν οι μηχανισμοί που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο και αφετέρου να αναγνωριστούν μοριακοί δείκτες της κυτταροτοξικής της δράσης.

Μετά από επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων DOX (0.5μM, 1μM, 2.5μM και 5 μM) για 3, 24 και 48 ώρες, προσδιορίστηκε η βιωσιμότητα (MTT) και ο βαθμός απόπτωσης (APOPercentage, χρώση με Hoechst, θράυση DNA) των κυττάρων. Επίσης προσδιορίστηκε η ενεργοποίηση της κασπάσης 3, η πρωτεόλυση της PARP (Poly ADP-ribose polymerase) καθώς και τα επίπεδα των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, Bad και Bcl-xL. Σημαντικός βαθμός απόπτωσης των κυττάρων παρατηρήθηκε μετά από 24 και 48 ώρες από την επίδραση με την DOX. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και πρωτεόλυση της PARP. Η κασπάση 3 ενεργοποιήθηκε μετά τις 16 ώρες ενώ στις 48 ώρες επανήλθε στα αρχικά της επίπεδα. Ο βαθμός απόπτωσης των κυττάρων καθώς και η δραστηριότητα της κασπάσης 3 εξαρτώνταν ανάλογα από την συγκέντρωση της DOX. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα της Bcl-xL, η οποία επίσης εξαρτώνταν από την συγκέντρωση της DOX. Αντίθετα, η DOX προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της Bad. Συμπερασματικά, η επαγωγή της απόπτωσης και οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται στα HepG2 κύτταρα, εξαρτώνται από την συγκέντρωση της DOX. Το σύστημα αυτό μπορεί να αποτελέσει ένα *in vitro* εργαλείο για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας διάφορων φαρμακολογικών παραγόντων.

EVALUATION OF DOXORUBICIN-INDUCED APOPTOSIS IN HepG2 CELLS

Kyriakidou H.¹, Cieslak D.¹, Papadopoulou L.², Tsiftoglou A.², Lazou A.¹

*¹Lab of Animal Physiology, Sch of Biology and ²Dept of Pharmacology, Sch of
Pharmaceutical Sciences, Aristotle University of Thessaloniki*

While drug toxicity, especially hepatotoxicity, is the most frequent reason cited for withdrawal of an approved drug, no simple solution exists to adequately predict such adverse events. In this study, we investigated the effect of Doxorubicin (DOX), a commonly used chemotherapeutic agent, on apoptosis of HepG2 cells, in order to elucidate the mechanisms leading to cell death and to identify molecular markers of cell toxicity. After treatment of the cells with various concentrations of DOX (0.5 μ M, 1 μ M, 2.5 μ M και 5 μ M) for different times (3, 24 and 48 h), cell viability and the degree of apoptosis were determined. In addition, we determined activation of caspase 3, PARP cleavage as well as expression of the Bcl-2 family proteins, Bad and Bcl-xL. Apoptosis was evident after 24 and 48 hours of treatment with DOX. Caspase 3 was activated after 16 h while at 48 h, the activity returned to basal levels. PARP was also cleaved at 24 h of treatment. DOX induced a reduction in Bcl-xL levels after 24 h of treatment whereas Bad levels were increased. In conclusion, the effects of DOX in HepG2 cells were dose-dependent. This cell system can be used as an in vitro tool to assess drug toxicity.

ΛΕΤΟΥΡΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΗΣ GTP-ΑΣΗΣ, RHOΔ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Κύρκου Α., Φώτσης Θ. και C. Murphy

Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας / Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών» (ITE-IBE)

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας των μικρών GTPασών Rho συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και η ρύθμιση αυτή εξαρτάται από τη μετατροπή των μορίων αυτών από την ανενεργή GDP μορφή τους, στην ενεργή GTP κατάσταση. Τα πιο μελετημένα μέλη της οικογένειας είναι οι Rho A, B και C και η λειτουργική τους δράση επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης με καθοδικούς, στο μοριακό τους μονοπάτι, τελεστές. Οι Diaphanous-related formins (Drfs) αποτελούν μέλη της συντηρημένης οικογένειας των Formin homology (FH) πρωτεϊνών και θεωρούνται βασικοί τελεστές των μικρών GTPασών. Οι Drfs χαρακτηρίζονται από μια σειρά κοινών περιοχών (domains), μεταξύ των οποίων οι περιοχές Formin homology-1 (FH1) και FH2 που διαδραματίζουν ενεργό ρόλο στον πολυμερισμό της ακτίνης. Στην N-τελική περιοχή τους υπάρχει η περιοχή πρόσδεσης των GTPασών (GBD), ενώ στην C-τελική περιοχή διαθέτουν την υψηλά συντηρημένη περιοχή αυτορύθμισης ή αλλιώς Dia-autoregulatory domain (DAD). Η ενεργοποίηση των Drfs πραγματοποιείται μόνο εφόσον κάποια ενεργοποιημένη Rho (στην GTP μορφή της) αλληλεπιδράσει με την GBD διακόπτοντας την αυτοπεριοριστική δράση της DAD. Η πρόσφατα μελετημένη RhoD έχει αναφερθεί να παρεμβαίνει όχι μόνο στην ομοτυπική σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων, αλλά και στην κυτταροκίνηση. Η κυτταροκίνηση πραγματοποιείται μέσω της σύσπασης του δακτυλίου περίσφιξης, μιάς δέσμης ακτομυοσίνης τοποθετημένη στο ισημερινό επίπεδο μεταξύ δύο διαφερένων πυρήνων που καταλήγει στο σχηματισμό δύο θυγατρικών κυττάρων. Τα ευρήματά μας υποστηρίζουν την ύπαρξη μηχανισμού δράσης της RhoD κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, μέσω αλληλεπίδρασης με το μέλος της οικογένειας Drf, mDia1. Η mDia1 απαντάται και στους τρεις τύπους των μικροσωληνίσκων της ατράκτου που απαιτούνται για τη φυσιολογική κυτταρική διαίρεση, δηλαδή τους μικροσωληνίσκους του κινητοχώρου, τους μη-κινητοχωρικούς μικροσωληνίσκους που διαμορφώνουν την κεντρική άτρακτο και τους αστρικούς μικροσωληνίσκους. Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα του εργαστηρίου μας καταδεικνύουν μια ισχυρή παρεμβολή της RhoD κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε επίπεδο τόσο καρυοκίνησης (διαχωρισμός αδελφών χρωματίδων), όσο και κυτταροκίνησης (ισότιμος κυτταροπλασματικός διαχωρισμός και σχηματισμός θυγατρικών κυττάρων). Η επικρατώς ενεργή μορφή της RhoD ανεξαρτήτως τρόπου επιμόλυνσης και κυτταρικού τύπου, οδηγεί στη δημιουργία έντονα κατακεραματισμένων πυρήνων σε κύτταρα που περνούν το στάδιο της μίτωσης, όσο και το σχηματισμό πολυπυρήνικών κυττάρων. Στόχος μας είναι να διερευνήσουμε τόσο τον υποκυτταρικό εντοπισμό της RhoD κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου όσο και οι μοριακές αλληλεπιδράσεις κατά τα στάδια της μίτωσης που επηρεάζονται από την ενεργοποίησή της.

EFFECTS OF THE SMALL GTPASE, RHOD DURING THE CELL CYCLE**Kyrkou A., Fotsis T., and C. Murphy***Biomedical Research Institute / Foundation for Research & Technology- Hellas*

Rho small GTPases regulate actin cytoskeleton by shuttling between the GDP-bound inactive form and the GTP-bound active conformation (Narumiya et al, 1997; Hall et al, 1998). Several members of the Rho family have been identified, but the most actively studied members of the family are Rho A, B and C (reviewed by Jaffe and Hall, 2005) and these molecules perform their cellular functions by binding to downstream effectors. The Diaphanous-related formins (Drfs) constitute a conserved subfamily of Formin homology (FH) proteins (Wasserman et al, 1998) that act as critical effectors for small GTPases (Evangelista et al, 1997; Watanabe et al, 1997; Fujiwara et al, 1998). Drfs are characterized by a variety of common domains, including the Formin homology-1 (FH1) and FH2 domains identified by Castrillon and Wasserman (1994, 1997), which are involved in actin rearrangement. Drfs also have N- terminal GTPase binding domain (GBD) and highly conserved Dia-autoregulatory domain (DAD) in the C-terminus (Watanabe et al, 1997; Alberts et al; 1998). Drfs are activated when GTP-bound Rho binds to the GBD and disrupts its autoinhibitory interaction with DAD (Watanabe et al, 1999). RhoD (Murphy et al, 1996; Narumiya et al, 1997) has been shown to regulate endosome motility (Murphy et al, 1996) and has also been implicated in cytokinesis as well (Tsubakimoto et al, 1999). Cytokinesis occurs by contraction of the contractile ring, an actomyosin bundle anchored to the equatorial cell cortex between two divided nuclei, which results in production of two daughter cells (Rappaport, 1996; Robinson and Spudich, 2000). Our findings support an effect of RhoD activation during cell division, through its interaction to mammalian diaphanous mDia1. mDia1 localizes to all of three types of spindle microtubules (Mastronarde et al, 1993; Kato et al, 2000), that is the kinetochore microtubules, the nonkinetochore microtubules comprising the central spindle in the anaphase, and the astral microtubules and is required for normal cell division (Watanabe et al, 1997; Kato et al, 2001). Ongoing work, in our lab, has shown strong interference of RhoD during cell division in terms of both karyokinesis (division of sister chromatids) and cytokinesis (cytoplasmic division of daughter cells). The activated form of RhoD causes intense nuclear fragmentation, plus formation of multinucleated cells. Our aim is to identify the molecular mechanism by which RhoD exerts its effect on cell division.

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΑ
ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΑ ΩΘΟΥΛΑΚΙΑ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *Ceratitis*
*capitata***

**Κωνσταντή Ο., Αντωνέλου Μ., Νέζης Ι., Στραβοπόδης Δ.,
Παπασιδέρη Ι. και Λ.Χ. Μαργαρίτης**

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστιμίοπολις, 15784, Αθήνα, Ελλάδα*

Κατά τη διάρκεια του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου τα κύτταρα υφίστανται χαρακτηριστικές μορφολογικές τροποποιήσεις, όπως η συμπύκνωση της χρωματίνης, ο θρυμματισμός του DNA και η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Θεμελιώδη συστατικά του κυτταροσκελετικού δικτύου του αναπτυσσόμενου ωθυλακίου αποτελούν η αγκυρίνη, οι σπεκτρίνες, η (φρ)ακτίνη και η πρωτεΐνη hu-li tai shao (hts). Εφαρμόζοντας τις τεχνικές ανάλυσης στυλώματος Western και ανοσοεντόπισης με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού μελετήθηκαν οι παραπάνω πρωτεΐνες σε αναπτυσσόμενα ωθυλάκια διαφορετικών σταδίων του εντόμου *Ceratitis capitata*. Η αγκυρίνη εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη τόσο των θυλακοκυττάρων όσο και των τροφοκυττάρων κατά τη διάρκεια της όψιμης ωογένεσης, ενώ το αποκτώμενο σήμα εμφανίζεται ελαφρώς ισχυρότερο στα μικρότερα στάδια. Η α-σπεκτρίνη ανιχνεύεται στην πλευρική και κορυφαία μεμβράνη των τροφοκυττάρων, των θυλακοκυττάρων και του ωοκυττάρου, ενώ το σήμα είναι σημαντικά ισχυρότερο στα ωθυλάκια των μικρότερων σταδίων. Η β-σπεκτρίνη εντοπίζεται κυρίως στην πλευρική μεμβράνη των θυλακο-κυττάρων, ενώ η παρουσία της είναι εμφανής τόσο στα τροφοκύτταρα όσο και στο ωοκύτταρο. Η φρακτίνη, ένα ακρωτηριασμένο θραύσμα της ακτίνης, ανιχνεύεται εκλεκτικά σε ανώμαλα (ατρησικά) ωθυλάκια μέσω αναπτυξιακών σταδίων (7-8) και σε ωθυλάκια μεγαλύτερων αναπτυξιακών σταδίων 13 και 14 στη διάρκεια της όψιμης ωογένεσης. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες και προτείνουν ότι η δραστική αναδιορ-γάνωση των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετικού δικτύου και ο θρυμματισμός του DNA αντιπροσωπεύουν δύο διακριτά και ανεξάρτητα γεγονότα.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του ερευνητικού προγράμματος Πυθαγόρας Ι, το οποίο συγχρηματοδοτείται από το ΕΠΕΑΕΚ και τη ΓΓΕΤ.

**DETECTION OF CYTOSKELETON PROTEINS IN THE
DEVELOPING FOLLICLES OF *Ceratitis capitata*****Konstandi O., Antonelou M., Nezis I., Stravopodis D., Papassideri I.,
and L.H. Margaritis***Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis, 15784, Athens, Greece*

Apoptosis, an essential pattern of programmed cell death, constitutes an evolutionary conserved, active and genetically determined process. During apoptosis, cells that are no longer needed are self-destructed through an internal suicide program, manifesting characteristic morphological alterations, such as nuclear chromatin condensation, genomic DNA fragmentation and actin cytoskeleton severe reorganization. The most essential structural components of the cytoskeleton network are the ankyrin, the spectrins, the (fr)actin and the hu-li tai shao (hts) proteins, whose study represents the major goal of this work. The above mentioned cytoskeletal proteins were studied in the developing follicles of *Ceratitis capitata*, by applying Western blotting analysis and immunolocalization techniques. Ankyrin is localized in the cytoplasmic membranes of the follicle and nurse cells during late oogenesis, while the obtained immunostaining signal is slightly stronger in the follicles of earlier stages. The α -spectrin protein is detected in the apical and lateral membrane of the follicle cells, as well as in the nurse cells and the oocyte. Fractin, a truncated actin fragment, is selectively detected in abnormal (atretic) follicles of mid-oogenesis developmental stages (7-8) and in late developmental stages 13 and 14. The above results are in absolute agreement with previously reported observations and they strongly suggest that the cytoskeleton network severe reorganization and genomic DNA fragmentation represent two distinct and independent processes.

The present study was financially supported by the Research Grant Pythagoras I, which is co-funded by EPEAEK and GSRT.

Η ΛΕΠΤΙΝΗ ΣΥΜΜΕΤΕΧΕΙ ΣΤΗ ΜΕΓΕΘΥΝΣΗ ΤΩΝ ΑΘΗΡΟΓΟΝΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Κωνσταντινίδης Δ.¹, Κολιάκος Γ.², Καλογιάννη Μ.¹

¹ Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών
Επιστημών, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη 54124

² Τομέας Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη 54124

Η ορμόνη λεπτίνη παράγεται από τον λιπώδη ιστό και συμβάλλει στη ρύθμιση της λήψης και κατανάλωσης ενέργειας από τον οργανισμό. Συμμετέχει στην εκκίνηση μονοπατιών μεταγωγής σήματος σε διάφορους κυτταρικούς τύπους που φέρουν τους κατάλληλους υποδοχείς, μεταξύ των οποίων και τα μονοκύτταρα. Αυτά είναι κύτταρα του ανοσοβιολογικού συστήματος που έλκονται χημειοτακτικά προς τις πιθανές εστίες μόλυνσης. Τα μονοκύτταρα συμμετέχουν σε αθηρωματικά γεγονότα, κυρίως μέσω της ικανότητάς τους να φαγοκυτταρώνουν οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (oxLDLs) και να μετατρέπονται εν τέλει σε αφρώδη κύτταρα, βασικά συστατικά των αθηρωματικών πλακών. Στην παρούσα εργασία βρέθηκε ότι η επίδραση λεπτίνης (100nM) αυξάνει στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$) τόσο την ικανότητα προσκόλλησης και μετανάστευσης των μονοκυττάρων σε υπόστρωμα λαμινίνης-1, όσο και την έκφραση υποδοχέων CD36 (των κύριων υποδοχέων για την εσωτερίκευση των oxLDL). Με ταυτόχρονη χρήση λεπτίνης και κατάλληλων αναστολέων της PI3K (50nM wortmannin), του αντιμεταφορέα $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ (20nM cariporide) και του πολυμερισμού της ακτίνης (2μM cytochalasin D), διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αναστολή ($p < 0.05$) των προαναφερθέντων δράσεων της λεπτίνης υποδηλώνοντας τη συμμετοχή των παραπάνω πρωτεϊνών στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που εκκινούν από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα της λεπτίνης και οδηγούν σε φαινόμενα αθηρογένεσης. Επιπρόσθετα, με τη χρήση των αναστολέων GF109203X (10μM) και Gδ6976 (500nM) διαπιστώθηκε η συμμετοχή και της ζ- ή/και ι- ισομορφής της πρωτεϊνικής κινάσης C στην όλη διαδικασία. Τα αποτελέσματά μας φανερώνουν την πολυπλοκότητα του μηχανισμού μέσω του οποίου η λεπτίνη ενισχύει τις αθηρογόνες ιδιότητες των μονοκυττάρων.

**LEPTIN PARTICIPATES IN THE AMPLIFICATION OF THE
ATHEROGENIC PROPERTIES OF MONOCYTES****Konstantinidis D.¹, Koliakos G.², Kaloyianni M.¹**¹*Laboratory of Animal Physiology, Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki (AUTH), 54124*²*Department of Biological Chemistry, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki (AUTH), 54124*

Leptin is an adipose tissue-derived hormone whose main function is the regulation of energy intake and consumption. It exerts its effects on a wide array of cell types utilizing a number of signal transduction pathways. Monocytes are amongst these cell types, as they express functional leptin receptors on their surface. They are cells of the immune system and have the ability to migrate in a chemotactic manner towards potential sites of infection. Their ability to phagocytose oxidized low density lipoproteins (oxLDLs) can result in their transformation into foam cells, which are amongst the primary elements of atheromatous plaques. In the present study it was found that leptin (100nM) causes a statistically significant increase ($p < 0.05$) in the ability of monocytes to adhere and migrate on laminin-1, as well as an increase in their expression of CD36 receptors (the main receptors responsible for oxLDL uptake). Incubation with both leptin and potent inhibitors of PI3K (50nM wortmannin), the Na⁺-H⁺ exchanger (20nM cariporide) and of actin polymerization (2 μ M cytochalasin D), led to a statistically significant inhibition ($p < 0.05$) of the previously described effects of leptin. These results indicate that the aforementioned proteins have roles to play in the signal transduction pathways which originate from the activated leptin receptor on the cell surface and lead to the manifestation of atherogenic phenomena. Additionally, through the use of the inhibitors GF109203X (10 μ M) and Gö6976 (500nM) it was determined that the ζ - (zeta) and/or ι - (iota) isoform of protein kinase C is also involved in some way in the whole atherogenic process. Our results demonstrate the complexity of the mechanism through which leptin augments the atherogenic properties of monocytes.

ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΖΥΜΗΣ

Κωνσταντινίδης Θ.Χ.¹, Ζουριδάκης Μ.¹, Πατσούκης Ν.², Ζερβουδάκης Γ.²,
Γεωργίου Χ.Α.² και Δ. Συνετός¹

¹Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, και ²Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο
Πατρών, 261 10 Πάτρα

Μεταλλάξεις στο 18S rRNA της ζύμης επηρεάζουν τη λειτουργία του ριβοσωματικού κέντρου αποκωδικοποίησης, που ανήκει στην 40S υπομονάδα. Συγκεκριμένα, η μεταστροφή C1054A (*rdn1A*) στην έλικα 34 αύξησε τα μεταφραστικά λάθη, ενώ η μετάπτωση C1054U (*rdn1T*) προκάλεσε υπερακρίβεια. Ομοίως, η μετάλλαξη G517A (*rdn2*) στην έλικα 18 και η διπλή μετάλλαξη U912C G888A (*rdn4rdn6*) στην έλικα 27 του 18S rRNA προκάλεσαν υψηλή υπερακρίβεια. Εξετάσαμε την συσχέτιση της μεταφραστικής ακρίβειας προς την οξειδωτική κατάσταση του κυττάρου. Δείκτες οξειδωτικού στρες προσδιορίστηκαν σε εκχυλίσματα στελεχών που φέρουν μια εκ των ως άνω μεταλλάξεων που επηρεάζουν τη μεταφραστική ακρίβεια. Η επιρρεπής σε λάθη μετάλλαξη *rdn1A* επέδειξε χαμηλότερο οξειδωτικό στρες υποδεικνύμενο από μείωση των μη πρωτεϊνικών/ πρωτεϊνικών δισουλφιδίων και της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Επίσης, οι πρωτεϊνικέςθειόλες, ένας δείκτης χαμηλού οξειδωτικού στρες, αυξήθηκαν. Αντίθετα, οι περιοριστικές των λαθών μεταλλάξεις *rdn1T*, *rdn2* και *rdn4rdn6* παρουσίασαν αύξηση του οξειδωτικού στρες υποδεικνύμενο από αύξηση των μη πρωτεϊνικών/πρωτεϊνικών δισουλφιδίων και της υπεροξειδωσης των λιπιδίων αλλά και από ελάττωση των πρωτεϊνικώνθειολών. Αν ευσταθεί η υπόθεση ότι τα αυξημένα μεταφραστικά λάθη σχετίζονται με ελάττωση των οξειδωτικών τροποποιήσεων, τότε η προσθήκη ενός επαγωγέα λαθών όπως η παρομομυκίνη θα βελτίωνε την οξειδωτική κατάσταση των κυττάρων ελαττώνοντας το οξειδωτικό στρες και ενισχύοντας την αντιοξειδωτική άμυνα. Όντως, η παρομομυκίνη αύξησε τα λάθη και ελάττωσε το οξειδωτικό στρες σε όλα τα στελέχη. Προτείνουμε ότι η υπερακρίβεια απαιτεί αυξημένη δαπάνη ενέργειας, γεγονός που καθιστά το κύτταρο πιο ευάλωτο στις οξειδωτικές τροποποιήσεις.

Ευχαριστούμε το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ), το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαιδευτικής και Επαγγελματικής Κατάρτισης II (ΕΠΕΑΕΚ II) και ειδικά το πρόγραμμα ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ για την ενίσχυση του έργου.

**TRANSLATIONAL ACCURACY MUTATIONS INFLUENCE THE
OXIDATIVE STATUS OF YEAST CELLS****Konstantinidis T.C.¹, Zouridakis M.¹, Patsoukis N.², Zervoudakis G.²,
Georgiou C.D.², and D. Synetos¹**¹Laboratory of Biochemistry, School of Medicine, and ²Department of Biology, University of Patras, 261 10 Patras, Greece

We have shown previously that several mutations in 18S rRNA of yeast affect the function of the decoding center of the ribosome, which belongs to the 40S subunit. Specifically, transversion C1054A (*rdn1A*) in helix 34 increased translational errors, while transition C1054U (*rdn1T*) caused hyperaccuracy. Likewise, mutation G517A (*rdn2*) in helix 18 and a double mutation U912C G888A (*rdn4rdn6*) in helix 27 of 18S rRNA caused also strong hyperaccuracy. In the present study we examined the possible interference of the level of translational accuracy with the cell's oxidative status. Several oxidative stress markers were determined in extracts derived from strains each carrying one of the aforementioned translational accuracy mutations. The error-prone mutation *rdn1A* exhibited less pronounced oxidative stress indicated by decreased nonprotein/protein disulfides and lipid peroxidation levels. Additionally, protein thiols, an indicator of low oxidative stress, were increased. On the contrary, error-restrictive mutations *rdn1T*, *rdn2* and the double mutant *rdn4rdn6* demonstrated increased oxidative stress indicated by elevated levels of nonprotein/protein disulfides and lipid peroxidation as well as by depressed levels of protein thiols. If the hypothesis holds that increased translational errors are related with decreased oxidative modifications, then the addition of an error-inducing agent such as paromomycin would improve the cell's oxidative status by lowering the oxidative stress markers and enhancing the antioxidant defense system. Indeed, paromomycin increased translational errors *in vitro* and decreased oxidative stress in all strains under examination. We propose that hyperaccuracy is related to higher energy expenditure and this fact makes the cell more susceptible to oxidative modifications.

We thank the European Social Fund (ESF), the Operational Program for Educational and Vocational Training II (EPEAEK II), and particularly the program HERAKLEITOS for funding the above work.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΙΑΣ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Κωσταρίδης Π.

*Τομέας Βιολογίας Κυψάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη, 15784 Αθήνα.*

Οι μαθητές, οι εκπαιδευτικοί και τα περιβάλλοντα στα οποία παρέχεται εκπαίδευση αποτελούν δυναμικά σύνολα που βρίσκονται σε άμεση σχέση, εξάρτηση και αλληλεπίδραση με την κοινωνία και τις δομές της. Η σύγχρονη παιδαγωγική βλέπει την τροποποίηση της συμπεριφοράς ως συνάρτηση όλων των παραγόντων που εμπλέκονται στη διαδικασία της εκπαίδευσης, δηλ. του μαθητή, του παιδαγωγού και του περιβάλλοντος. Η πρότασή μας εστιάζεται στη Βιωματική διδασκαλία. Μια εκπαιδευτική μέθοδο διδασκαλίας που επιτρέπει στον εκπαιδευόμενο να αποκτήσει προσωπική εμπειρία του θέματος που αναπτύσσεται, συμμετέχοντας σε ειδικές ατομικές εκπαιδευτικές δραστηριότητες, καθώς και σε ομαδικές διεργασίες επικοινωνίας και δημιουργικότητας. Κατά την αξιολόγηση εκτιμούνται και δεξιότητες όπως η ικανότητα των μαθητών για επικοινωνία, ανάληψη πρωτοβουλιών, εύρεσης λύσεων για την αντιμετώπιση προβλημάτων, αλληλεγγύης προς τους συμμαθητές τους κ.α. Ο μαθητής (με τη βοήθεια του δασκάλου) κατακτά μόνος του τη γνώση και βιώνει τη διαδικασία της ανάπτυξης των ατομικών και ιδιαίτερων δεξιοτήτων του μέσα από ατομικές και κοινωνικές δραστηριότητες. Η Βιωματική διδασκαλία, με διάφορες μορφές, έχει ήδη βρει εφαρμογή με μεγάλη επιτυχία σε προγράμματα Περιβαλλοντικής Εκπαίδευσης και Αγωγής Υγείας. Τις περισσότερες όμως φορές η εφαρμογή γίνεται ή σε πολύ μικρές ηλικίες ή σε θέματα εκτός Αναλυτικού Προγράμματος. Στην εργασία μας προτείνουμε την εφαρμογή της Βιωματικής διδασκαλίας σε θέματα Βιολογίας με τρόπο ώστε να υπάρχει απόλυτη συμφωνία με τους στόχους του Αναλυτικού Προγράμματος, να επιτυγχάνονται όλοι οι στόχοι που έχουν καθοριστεί από το Παιδαγωγικό Ινστιτούτο, αλλά και να επιτρέπει στο μαθητή να «καρπωθεί» όλα τα πλεονεκτήματα που προσφέρει ο βιωματικός τρόπος μάθησης. Παρουσιάζουμε με βιωματικό τρόπο το 2^ο κεφάλαιο της Βιολογίας της Γ' Γυμνασίου (Αμυντικοί μηχανισμοί). Το θέμα που χρησιμοποιούμε ως αρχικό «εργαλείο» για να προσπελάσουμε τους στόχους μας είναι το AIDS. Η πορεία θα περάσει από όλα τα στάδια μιας Βιωματικής διδασκαλίας. Στο τέλος ότι παραχθεί θα είναι προσωπική κατάρκτηση του μαθητή διαφορετική από το πλήθος των γνώσεων, διηγήσεων και «αληθειών» από τους άλλους. Η πρότασή μας πιστεύουμε ότι είναι εφικτή και πραγματοποιήσιμη.

Η εργασία αυτή αποτελεί τμήμα διπλωματικής εργασίας για το ΜΔΕ «Σύγχρονες τάσεις διδακτικής των βιολογικών μαθημάτων και νέες Τεχνολογίες». Ευχαριστούμε τον επ. υπεύθυνο καθηγητή κ. Θ. Κατσώρη Θεόδωρο, τα μέλη της τριμελούς, κ.Ι. Παπασιδέρη και κ.Ε. Μουτζούρη όπως και την κ. Μ.Γκούβρα για τη βοήθεια, καθοδήγηση και επίβλεψή τους.

APPLICATIONS OF EMPIRICAL COMMUNIKATIVE TEACHING IN BIOLOGY

Kostaridis P.

Department of Cell Biology & Biophysics, Faculty of Biology, National & Kapodistrian
University of Athens, Panepistimiopoli, 15784, Athens, Greece

The students, the teachers and the environments in which education is provided, constitute dynamic parts that are in direct relation, dependence and interaction with the society and its structures. The modern pedagogy considers the modification of behaviour as interrelation of all factors that are involved in the process of education, that is to say the student, the educator and the environment. Our proposal is focused in the Empirical-Communikative teaching. An educational method of teaching that allows students to acquire personal experience and participate in special individual educational activities, as well as in activities of communication and creativity. ¶The teacher evaluates skills as the faculty of students for communication, the undertaking of initiatives, the finding of problems solutions, the solidarity to their schoolmates etc. The students (with the teachers help) achieve the knowledge and develop their skills through individual and social activities. The Empirical-Com-munikative teaching, with different forms, has already applied with great success in programs of Environmental Education and Education of Health. However, these applications in most times undertaking in very young pupils and on issues except Analytic Program. In our work we propose the application of Empirical-Communikative teaching on biological issues in a way that exists absolute agreement with the Analytic Program and the students enjoy all the benefits that offers this way of learning. We present with empirical way the 2nd chapter of Biology of third year of education in a Greek secondary school. (Defence mechanisms). The subject that we use as initial "tool" in order to achive our objectives is the AIDS. The course will pass from all the stages of the Empirical-Communikative teaching: Search-reflection, planning of activities, conduct of activities, evaluation. In the end the result will be personal conquest of student and different from the crowd of knowledge, narrations and "truths" from the other people. We believe that our proposal is feasible. The action in the class will confirm us or it will help us to re-define our approach.

This work is a part of the Master Degree diploma "New processes in teaching of biological lessons by using modern technology" We thank the supervisor prof. T. Katsorchis and the members of the committee I Papassideri and E. Moutzouri as well as M. Gkouvra for their help, guidance and supervision in all the stages of the work.

ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΑΜΙΝΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΚΑΙ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

Κωστίδου Ε.¹, Κολιάκος Γ.², Καλογιάννη Μ.¹

¹Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΑΠΘ, ²Εργαστήριο Βιολογικής χημείας, Τμήμα Ιατρικής, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη 54124

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ικανότητα των μονοκυττάρων να οξειδώνουν τη λαμινίνη, την κυριότερη πρωτεΐνη των βασικών μεμβρανών, παρουσία γλυκόζης και ινσουλίνης. Παράλληλα προσδιορίστηκε η επαγωγή παραγωγής των ανιόντων σουπεροξειδίου από τη γλυκόζη και την ινσουλίνη. Ο βαθμός οξείδωσης της λαμινίνης βρέθηκε ότι είναι μεγαλύτερος στην περίπτωση που τα μονοκύτταρα επωάζονταν με γλυκόζη ($p=0.0068$) και ινσουλίνη ($p=0.0010$) σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Αντίθετα, η ταυτόχρονη παρουσία των αναστολέων του αντιμεταφορέα Na^+/H^+ (NHE-1), της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), της NADPH οξειδάσης και της 3-κινάσης του φωσφοϊνοσιτιδίου (PI3K) με τη γλυκόζη, είτε με την ινσουλίνη, ανέστειλε την αυξημένη οξείδωση της λαμινίνης. Παράλληλα βρέθηκε ότι παρουσία του ενεργοποιητή της PKC, PMA, τα μονοκύτταρα οξειδώνουν περισσότερο τη λαμινίνη σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Επίσης διαπιστώθηκε ότι παρουσία γλυκόζης και ινσουλίνης τα μονοκύτταρα παράγουν αυξημένα ποσά ανιόντων σουπεροξειδίου, τα οποία μειώνονται παρουσία του αναστολέα του αντιμεταφορέα NHE-1, καριπορίδιο. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τόσο η γλυκόζη όσο και η ινσουλίνη αυξάνουν το βαθμό οξείδωσης της λαμινίνης από τα μονοκύτταρα μέσω ενεργοποίησης της PKC, της αντλίας NHE-1, της NADPH οξειδάσης και της PI3K, και επίσης επηρεάζουν την παραγωγή ανιόντων σουπεροξειδίου, πιθανότατα με τη συμμετοχή του αντιμεταφορέα NHE-1. Τα ακριβή μονοπάτια που ενεργοποιούνται μένει να διευκρινιστούν.

**MONOCYTE LAMININ OXIDATION IN THE PRESENCE OF
GLUCOSE AND INSULIN****Kostidou E.¹, Koliakos G.², Kaloyianni M.¹**

¹Laboratory of Animal Physiology, Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, ²Department of Biological Chemistry, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, 54124

In the present study we evaluated the ability of monocytes to oxidize laminin, the main basement membrane protein, in the presence of either glucose or insulin. Moreover, superoxide anion production levels in the presence of glucose and insulin were estimated. The level of laminin oxidation was higher when monocytes were incubated in the presence of glucose ($p=0.0068$) and insulin ($p=0.0010$) than in controls. On the contrary, the presence of the inhibitors of the Na^+/H^+ exchanger, protein kinase C (PKC), NADPH oxidase and phosphoinositide 3-kinase (PI3K), together with either glucose or insulin counteracted the increase in laminin oxidation. Furthermore, the presence of the activator of PKC, PMA showed higher laminin oxidation in relation to controls. It was also observed that in the presence of glucose and insulin, monocytes produced increased levels of superoxide anions in relation to controls, which were inhibited after treatment with inhibitor of the Na^+/H^+ exchanger, cariporide. Our results indicate that both glucose and insulin affect monocyte-induced laminin oxidation through activation of PKC, Na^+/H^+ exchanger, NADPH oxidase and PI3K as well as the production of superoxide anions possibly through the involvement of the Na^+/H^+ exchanger. The exact pathways that are activated remain to be investigated.

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ
ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ-ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΕ *in vitro*
ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΑ ΗΚ-2 ΚΥΤΤΑΡΑ**

**Κωτσαντής Π.¹, Παπαχρήστου Ε.², Μπίτα Θ.², Παπαδημητρόπουλος Α.¹,
Δρακόπουλος Α.², Βλαχογιάννης Ι.² και Π. Κατσώρης¹**

¹Τμήμα Βιολογίας, ²Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ενας από τους κύριους παράγοντες πρόκλησης οξείας νεφρικής ανεπάρκειας είναι η πρωτεϊνουρία. Στην παθολογική αυτή κατάσταση, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα νεφρικά σωληναριακά κύτταρα, που απαντούν στην επίδραση μιας πλειάδας μεσολαβητών της νεφρικής βλάβης (όπως η λευκωματουρία), αλλάζοντας το φαινότυπό τους και επάγοντας την ίνωση. Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η διερεύνηση του τρόπου δράσης της αλβουμίνης που περιέχεται στο διήθημα ασθενών με πρωτεϊνουρία, στην πρόκληση νεφρικής ίνωσης. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά ΗΚ-2 (ανθρώπινα σωληναριακά κύτταρα). Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων αλβουμίνης για διαφορετικές χρονικές περιόδους. Με ανοσοστύπωμα και RT-PCR ποσοτικοποιήθηκε η παρουσία των υποδοχέων της ενδοθηλίνης ETR-A και ETR-B, των συνθετασών του NO (iNOS και eNOS) και της τουμπουλίνης. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της αλβουμίνης στον πολλαπλασιασμό, την προσκόλληση και στη μετανάστευση των ΗΚ-2 κυττάρων, καθώς και στην παραγωγή NO. Παρατηρήθηκε ότι η αλβουμίνη τροποποιεί με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο την έκφραση των γονιδίων της ET-1 και των υποδοχέων της, των συνθετασών του NO, τη συσσώρευση των αντίστοιχων πρωτεϊνών, καθώς και το παραγόμενο NO. Επίσης, προκαλεί αποδιάταξη του κυτταρο-σκελετού, μειώνοντας της συσσώρευσης της τουμπουλίνης. Τέλος, επάγει τον πολλαπλασιασμό, ενώ εμποδίζει την προσκόλληση και τη μετανάστευση των ΗΚ-2 κυττάρων.

**EFFECT OF ALBUMIN IN THE NITRIC OXIDE/ENDOTHELIN-1
SYSTEM IN CULTURED PROXIMAL TUBULAR EPITHELIAL
CELLS****Kotsantis P.¹, Papachristou E.², Bita Th.², Papadimitropoulos A.¹,
Drakopoulos A.², Vlachojannis J.², and P. Katsoris¹**¹Department of Biology, ²Internal Medicine-Nephrology, University of Patras

Proteinuria is the main feature of renal disease. Filtered proteins reach the proximal tubular cells leading to phenotypic alteration, and development of fibrosis. Experiments were carried out using HK-2 cells, a cell line of proximal tubular epithelial cells. Cells were cultured in the presence of various concentrations of albumin and for different incubation time periods. Total proteins or RNA were isolated and detection of eNOS, iNOS, ETR-A, ETR-B and ET-1 was performed by western blot analysis or RT-PCR. Migration of HK-2 cells was studied using the wound healing test, while proliferation was measured with the MTT assay. The presence of NO was measured in the supernatant of the cultured cells using the Griess method. We concluded that incubation of HK-2 cells with albumin induces mRNA as well as protein accumulation of iNOS, eNOS, ETR-A ETR-B and ET-1 in a concentration and incubation time manner. The NO production shows a linear increase reaching a 5 fold maximum. Albumin induces the HK-2 proliferation and inhibits the HK-2 migration and adhesion. Finally, it appears to disassociate the cytoskeleton via a concentration dependant reduction of tubulin.

References

1. Zoja C., Morigi M., Figliuzzi M., Bruzzi I., Oldroyd S., Benigni A., Ronco P., Remuzzi G. *Am J Kidney Dis* 1995; 6: 934-41.
2. Vlachojannis J.G., Tsakas S., Petropoulou C., Goumenos D.S., Alexandri S. *Clin. Nephrol* 2002; 58(5): 337-343.
3. Liang M., Knox F.G. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2000; 278: 1117-1124.
4. Sharma S.P. *Indian J Nephrol* 2004, 14: 77-84.

Η ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΟΥ ΟΥΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Λαγγούσης Γ., Γκουντέλα Σ. και Γ. Διαλλινάς

Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη 15781,
Αθήνα

Στον *Aspergillus nidulans* το μονοπάτι καταβολισμού πουρινών έχει χαρακτηριστεί πλήρως, τόσο με γενετικές και φυσιολογικές όσο και μοριακές μελέτες. Η οξειδάση του ουρικού οξέος (UaZ) ή ουρικάση, ένα από τα βασικά ένζυμα του παραπάνω μονοπατιού, καταλύει την οξειδωση του πουρινικού δακτυλίου του ουρικού οξέος σε αλλαντοΐνη. Βιοχημικές μέθοδοι αλλά και ανάλυση της αλληλουχίας των περισσότερων γονιδίων που κωδικοποιούν ουρικάση, υποδεικνύουν ότι η κυτταρική τοπολογία του ενζύμου εντοπίζεται στα υπεροξυσώματα. Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε *in vivo* την τοπολογία της UaZ στον *A. nidulans* χρησιμοποιώντας την τεχνολογία GFP/RFP. Η χμιαρική UaZ-GFP πρωτεΐνη, εκφραζόμενη από το φυσικό της υποκινητή, σε στελέχη μονής ενσωμάτωσης, εντοπίζεται κυρίως κυτταροπλασματικά. Παρουσία προσδετών, που δρουν επίσης ως επαγωγείς της έκφρασης του *uaZ* (ουρικό οξύ, 2-θειοξανθίνη), η UaZ-GFP φάνηκε να εντοπίζεται και σε κοκκιώδη στίγματα, πιθανότατα υπεροξυσώματα. Σε στέλεχος πολλαπλής ενσωμάτωσης, απουσία προσδετών, η UaZ-GFP εντοπίζεται κυτταροπλασματικά αλλά και στα πιθανά υπεροξυσώματα. Παρουσία προσδετών (ουρικό οξύ, 2-θειοξανθίνη, 8-αζαξανθίνη) η UaZ-GFP εντοπίζεται αποκλειστικά σε υπεροξυσώματα. Η αλλαγή της τοπολογίας της UaZ-GFP παρουσία 8-αζαξανθίνης, προσδέτη ο οποίος δεν επάγει την αύξηση της πρωτεΐνης, πιθανότατα οφείλεται σε φαινόμενα αλλοστερισμού. Η επιβεβαίωση της ταυτότητας των υπεροξυσωμάτων έγινε με εξειδικευμένη στόχευση της RFP. Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη φορά που η τοπολογία και η λειτουργία ενός ενζύμου ρυθμίζεται, τόσο ποσοτικά όσο και αλλοστερικά, από την παρουσία των προσδετών.

ON THE DYNAMIC TOPOLOGY OF URIC ACID OXIDASE**Langousis G., Goudela S., and G. Diallinas***Faculty of Biology, Department of Botany, University of Athens, Panepistimioupolis 15781, Athens*

In *Aspergillus nidulans*, the purine degradation pathway has been thoroughly characterized by genetic, physiological and molecular studies. Uric acid oxidase (UaZ) or uricase, a key enzyme in this pathway, catalyzes the oxidation of the purine ring of uric acid to yield allantoin. The cellular topology of most uricases is predicted, or biochemically shown, to be the peroxisomes. However, no formal proof exists for this assumption. In this work we investigated the *in vivo* dynamic topology of UaZ in *A. nidulans* using the GFP/RFP methodology. A chimeric UaZ-GFP expressed from its native promoter was shown to complement a *uaZ* mutant. Several single or high-copy transformants were selected for Epifluorescence analysis. Our results show that the cellular topology of UaZ changes according to the level of protein expression and the presence of specific ligands. In single-copy transformant, UaZ-GFP is mostly cytoplasmic. The addition of ligands that are also inducers of protein expression (uric acid, 2-thioxanthine), UaZ can also be seen in small discrete granules, possibly peroxisomes. In a multicopy transformant, grown in absence of ligands, UaZ is found to be both cytoplasmic and in discrete granules. In the presence of ligands (uric acid, 2-thioxanthine, 8-azaxanthine) UaZ is found exclusively in the peroxisomal structures. The fact that 8-azaxanthine is a ligand not altering UaZ protein levels, suggests that alteration in topology should be due ligand-promoted allostery. To confirm that the observed discrete granules are peroxisomes, we developed a molecular tool to label these organelles using the RFP marker. To our knowledge, this is the first time that the cellular topology and function of an enzyme is finely regulated, both quantitatively and allosterically, by its ligands.

ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΦΥΛΟΚΑΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΤΟ ΕΝΤΟΜΟ *Bactrocera oleae*

Λαγός Δ.,¹ Σαββάκης Χ.² και Κ. Κομητοπούλου¹

¹Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ. ²Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, ΙΤΕ Ηράκλειο.

Η απομόνωση των φυλοκαθοριστικών γονιδίων *Sxl* (sex-lethal), *tra* (transformer), *tra2* (transformer-2) και *dsx* (doublesex) στο έντομο *B. oleae* (Δάκος της ελιάς), πραγματοποιήθηκε με την τεχνική RT-PCR και τη σάρωση μίας γενωμικής και cDNA βιβλιοθηκών ενήλικων ατόμων. Το γονίδιο *Sxl* παράγει ένα κοινό μετάγγραφο και στα δύο φύλα το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BoSXL³³⁹, και δεν έχει το ρυθμιστικό ρόλο που είχε στη Δροσόφιλα. Το γονίδιο *tra2* καταλαμβάνει μία χρωμοσωμική περιοχή 4.3 kb και οργανώνεται σε 7 εξώνια - 6 εσώνια. Η έκφραση του ρυθμίζεται ανάλογα με το φύλο. Παράγει ένα κοινό και στα δύο φύλα μετάγγραφο που κωδικοποιεί για την ισομορφή BoTPA2²⁵¹, καθώς επίσης και δύο αρρενοειδικά μετάγραφα, αποτέλεσμα της απαραίτητης για τη γονιμότητα των αρσενικών αυτορύθμισης του γονιδίου. Το γονίδιο *dsx* καταλαμβάνει μία χρωμοσωμική περιοχή 55 kb. Οργανώνεται σε 6 εξώνια - 5 εσώνια και παράγει διαφορετικά μετάγραφα που κωδικοποιούν για τους μεταγραφικούς παράγοντες DSXF και DSXM, που ρυθμίζουν την έκφραση περαιτέρω θηλεοειδικών και αρρενοειδικών γονιδίων αντίστοιχα. Το γονίδιο *tra* εντοπίστηκε σε γονιδιωματικό κλώνο δίπλα στο πολύ συντηρημένο γονίδιο *Bol(3)73Ah*. Καταλαμβάνει μία χρωμοσωμική περιοχή 3.6 kb και οργανώνεται σε 3 εξώνια - 2 εσώνια. Το γονίδιο παράγει φυλοειδικά μετάγραφα, εκ των οποίων το θηλεοειδικό κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BoTRA⁴²², ενώ τα αρρενοειδικά μετάγραφα οδηγούν σε μη λειτουργικά προϊόντα. Η ανάλυση της λειτουργίας του γονιδίου έγινε με πειράματα καταστολής του με την τεχνική RNA interference. Διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το κύριο γονίδιο φυλοκαθορισμού στο Δάκο, καθώς η σίγαση του προκάλεσε την μετατροπή ατόμων με καρυότυπο XX σε γόνιμα αρσενικά, σε πολύ υψηλό ποσοστό 87 %. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *tra* και *dsx* στα άτομα αυτά έδειξε ότι η παρουσία δίκλωνου *Botra* RNA είχε ως αποτέλεσμα την μόνιμη καθιέρωση του αρρενοειδικού προτύπου ματίσματος των συγκεκριμένων γονιδίων. Τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του γονιδίου το καθιστούν ιδανικό υπομήφιο για την κατασκευή διαγονιδιακών στελεχών επιλογής φύλου και τη βελτίωση της μεθόδου στέρωσης εντόμων για τον έλεγχο του πληθυσμού του Δάκου.

Το έργο συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και Εθνικούς Πόρους (ΕΠΕΑΕΚ II) ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II και τον ΕΛΚΕ.

**THE GENES OF THE SEX-DETERMINING CASCADE IN THE
INSECT *BACTROCERA OLEAE*****Lagos D.¹, Savvakis C.², and K. Komitopoulou¹**

¹Div. of Genetics and Biotechnology, Dep. of Biology, University of Athens. ²Institute of Molecular Biology and Biotechnology, FORTH, Heraklion

The sex-determining genes *Sxl* (Sex-lethal), *tra* (transformer), *tra-2* (transformer-2) and *dsx* (doublesex) in the insect *B. oleae* were isolated by RT-PCR and screening of a genomic and cDNA libraries from male and female adult flies. *BoSxl* produces the same functional polypeptide BoSXL³³⁹ in both male and female flies and therefore has lost the master sex-determining role that had in *D. melanogaster*. *Botra-2* holds a region of 4.3kb and is organized in 8 exons -7 introns. It expresses sex-specific transcripts: a common one present in both sexes that encodes for the isoform BoTRA2²⁵¹ and two additional male-specific transcripts that predict an autoregulatory mechanism that serves to ensure male germline fertility. *Bodsx* expands in a chromosomal region of 55kb, is organized in 6 exons - 5 introns and produces different sex-specific mRNAs. These mRNAs code for the female and male specific transcription factors DSXF and DSXM that regulate expression of other downstream sex-specific genes. The *Botra* homologue is syntenic to the very conserved *Bol(3)73Ah* gene that was isolated by RT-PCR. It expands in a chromosomal region of 3.6 kb and is organized in 6 exons–5 introns. It produces sex-specific transcripts of which the female-specific codes for the protein BoTRA⁴²², while the male-specific transcripts produce non-functional polypeptides. *Botra* functional analysis was performed by the RNA interference technique. Our findings showed that *tra* is the master sex-determining gene in *B.oleae*, since *tra* silencing resulted in an 87 % sex-reversal of karyotypically XX flies, into normal male fertile flies. Expression analysis by RT-PCR in these flies showed that the presence of *Botra* dsRNA resulted in the permanent establishment of the male-specific splicing pattern for the genes *tra* and *dsx*. These results suggest that *Botra* is a useful candidate for the construction of transgenic sexing strains that would improve SIT (Sterile Insect Technique) and the *Bactrocera* control.

The project is co-funded by the European Social Fund and National Resources-(EPEAEK II) PYTHAGORAS II and ELKE

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ ΣΗΣΑΜΙ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ
ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΗΣ ΦΑΣΗΣ II
ΑΠΟΤΟΞΙΝΩΣΗΣ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ**

Λαζάρου Δ., Μπουκουβάλα Ε., Παπαδόπουλος Α.Ι.

*Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών
Επιστημών, ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝ/ΜΙΟ ΘΕΣ/ΝΙΚΗΣ*

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της διατροφής με σηςάμι στην γονιδιακή έκφραση των ισοενζυμικών μορφών GST-A2, GST-M2, GST-Pi καθώς επίσης και στην μικροσωμική ισομορφή GST-Mic της ενζυμικής οικογένειας αποτοξίνωσης GST με τη μέθοδο Northern blotting. Για το σκοπό αυτό σε τέσσερις διαφορετικές ομάδες πειραματόζωων αρουραίων Wistar ηλικίας 4 εβδομάδων χορηγήθηκε επί οκτώ εβδομάδες σε ποσοστό 20% επί της κανονικής τροφής σηςάμι υπό μορφή αποφλοιωμένου στη μία ομάδα, μη αποφλοιωμένου στη δεύτερη, στην τρίτη χορηγήθηκε μίγμα πολυφαινολών από αιθανολικό εκχύλισμα περισπερμίου σε ποσοστό 0,015% (w/w) και στην τέταρτη μίγμα πολυφαινολών σε ποσοστό 0,03% (w/w). Πειραματόζωα της ίδιας ηλικίας στα οποία χορηγήθηκε κανονική τροφή χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα αναφοράς. Ολικό RNA απομονώθηκε από το ήπαρ των ατόμων κάθε ομάδας, με τη μέθοδο «ενός βήματος» της γουανιδίνης. Ολικό RNA που απομονώθηκε από το ήπαρ ατόμου της ομάδας αναφοράς μεταγράφηκε αντίστροφα (Expand Reverse Transcriptase). Χρησιμοποιώντας ως μήτρα το παραγόμενο cDNA και εξειδικευμένους εκκινητές για κάθε ισομορφή της GST, ενισχύθηκαν τα cDNAs των τεσσάρων ισομορφών. Με «εσωτερικά» (nested) PCRs ενισχύθηκαν τμήματα 380-480bp που χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές Northern blotting. Στους αρουραίους που χορηγήθηκε αποφλοιωμένο και μη αποφλοιωμένο σηςάμι παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση και των τεσσάρων ισομορφών της GST που μελετήσαμε, και ιδιαίτερα στην ομάδα των πειραματόζωων που τους χορηγήθηκε αποφλοιωμένο σηςάμι σε σχέση με την ομάδα αναφοράς. Αντίθετα η χορήγηση αιθανολικού εκχυλίσματος πολυφαινολών από περισπέρμιο σησαμιού οδήγησε σε μείωση των επιπέδων των mRNA και των τριών ισομορφών GST-A2, GST-M2 και GST-Pi, και αντίθετα αύξηση στα επίπεδα mRNA της μικροσωμικής GST.

**EFFECT OF SESAME NUTRITION ON THE GENE EXPRESSION
OF THE PHASE II DETOXIFICATION ENZYME GST****Lazarou D., Boukouvala E., Papadopoulos A.I.***Laboratory of Animal Physiology, Dept. of Zoology, School of Biology, Faculty of Science,
ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI*

In this study it was investigated the effect of sesame nutrition on the mRNA levels of isoforms of hepatic glutathione S-transferase (GST), GST-A2, GST-M2, GST-Pi, and GST-Mic, by using Northern blotting method. For this purpose four groups of 4-weeks old Wistar rats were fed for a period of 8 weeks with standard chow diet containing for the first group 20% (w/w) hulled sesame seeds, for the second 20% (w/w) shelled sesame seeds and for the third 0,015% (w/w) ethanolic extract from sesame seed perisperm, rich in polyphenols and the fourth 0,03% of the same extract. Normally fed male rats of the same age were used as control group. Hepatic total RNA from each group of rats was isolated using guanidine "single step" method. Total RNA from liver of control group was subjected to reverse transcription (Expand Reverse Transcriptase). The cDNA of each GST isoform was amplified with RT-PCR using specific primers. Fragments of 380-480bp of each GST isoform were isolated with nested PCRs and used as the probes for Northern blotting. An increase in the expression of all four isoforms of GST that we investigated was observed in rats consuming unshelled seeds and even higher levels were observed in rats consuming hulled sesame seeds. In rats fed with polyphenolic extract from the perisperm of sesame seed, the levels of most of the hepatic GST isoforms were declining, except from the microsomal GST isoform, the mRNA levels of which were elevated.

**ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ
ΓΟΝΙΔΙΟΥ HB LEPORE ΣΕ ΑΡΡΕΝ ΕΜΒΡΥΟ ΤΗΝ 7^Η ΕΒΔΟΜΑΔΑ
ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ**

**Λάζαρος Α., Χατζή Ε., Μπούμπα Ι., Πλαχούρας Ν., Παρασκευαΐδης Ε.,
Γεωργίου Ι.**

*Εργαστήριο Γενετικής της Ανθρώπινης Αναπαραγωγής, Τομέας Μαιευτικής και
Γυναικολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.*

Η παρουσία του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία κατά τη διάρκεια της κύησης δημιούργησε νέες προοπτικές στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση. Περιγράψαμε την αξιόπιστη μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση του ανασυνδυασμένου γονιδίου που προκαλεί την παθολογική αιμοσφαιρίνη Lepore, πατρικής προέλευσης, και την ταυτοποίηση του φύλου του εμβρύου στο πρώτο τρίμηνο της κύησης. Αναλύθηκε το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA, καθώς και το πατρικό και μητρικό DNA. Ειδικοί γενετικοί εκκινητές για το φυσιολογικό και το μεταλλαγμένο χρωμόσωμα Lepore καθώς και ειδικές γενετικές αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης πιστοποιήθηκαν με τη λήψη χοριακών λαχνών (CVS) τη 12^η εβδομάδα της κύησης. Η αιμοσφαιρίνη Lepore, πατρικής προέλευσης, και οι ειδικές γενετικές αλληλουχίες DYS14 και DYZ1 του Y χρωμοσώματος ανιχνεύθηκαν στο δείγμα του μητρικού ορού εγκύου γυναίκας την 7^η εβδομάδα της κύησης. Καμία από τις ανωτέρω αλληλουχίες δεν ανιχνεύθηκε στο μητρικό DNA. Η ανάλυση του μητρικού ορού με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση του φύλου του εμβρύου και της πατρικής αιμοσφαιρίνης Lepore τόσο νωρίς όσο η 7^η εβδομάδα της κύησης. Σε περιπτώσεις γονέων που είναι φορείς διαφορετικών μεταλλάξεων, η παρουσία της πατρικής μετάλλαξης στη μητρική κυκλοφορία αυξάνει την πιθανότητα του εμβρύου να πάσχει στο 50%. Η απουσία της πατρικής μετάλλαξης στη μητρική κυκλοφορία μπορεί να μειώσει την πιθανότητα αυτή στο 0%, αποτελώντας μία ισχυρή ένδειξη ότι το έμβρυο είναι ελεύθερο νόσου και μάλιστα στα μέσα του πρώτου τριμήνου της κύησης.

**NON INVASIVE PRENATAL DETECTION OF PATERNAL
ORIGIN HB LEPORE IN A MALE FETUS AT THE 7TH WEEK
OF GESTATION****Lazaros L., Hatzi E., Bouba I., Plahouras N., Paraskevaidis E., Georgiou I.***Laboratory of Human Reproductive Genetics, Department of Obstetrics and Gynaecology,
Medical School, University of Ioannina, Ioannina.*

The presence of cell-free fetal DNA in maternal circulation during pregnancy created new opportunities in non invasive prenatal diagnosis. We described a reliable non invasive prenatal detection of the Hb Lepore paternal mutation and the fetal gender determination in the first trimester of pregnancy. We analyzed the cell-free fetal DNA and the parental DNA. Hb Lepore specific, mutant and normal, primers as well as Y-chromosome-specific sequences were used to carry out the analysis. PCR results were verified by chorionic villous sampling (CVS) at the 12th week of the pregnancy. Paternal Hb Lepore and the DYS14 and DYZ1 Y chromosome-specific sequences were detected in the serum sample obtained at the 7th week of pregnancy. None of the above sequences was detectable in the maternal peripheral blood DNA. Conventional PCR analysis of cell-free fetal DNA can be used to determine fetal gender and paternal Hb Lepore as early as the 7th week of pregnancy. When the parents are carriers of different mutations or polymorphisms linked to mutations, the absence or the presence of the paternal mutation determines the probability of the fetus to be affected by the disorder. If the paternal mutation is present in the maternal serum then the probability of the fetus to have thalassemia is 50%, as high as in the dominant disorders. In these cases the invasive procedures such as CVS or amniocentesis are necessary. Consequently, the absence of the paternal mutation may reduce this probability to 0%, given that the assay for the detection of the paternal contribution is reliable and linked to the mutation polymorphic markers have been used, as well, to verify this absence.

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΛΟΦΙΛΩΝ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΑΠΟ ΛΕΚΑΝΕΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ
ΑΛΑΤΟΣ ΤΩΝ ΑΛΥΚΩΝ ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ**

**Λαζούρα Π., Καλλιμάνης Α., Περυσινάκης Α., Δραΐνας Κ.
και Α.Ε. Κούκκου**

*Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,
45110 Ιωάννινα. E-mail: akukku@cc.uoi.gr*

Αλόφιλα Βακτήρια και Αρχαία είναι οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί που έχουν αναπτύξει τους μηχανισμούς για να επιβιώνουν σε υπεραλατούχα περιβάλλοντα. Στην παρούσα εργασία, από δειγματοληψία στις λεκάνες κρυστάλλωσης άλατος των αλυκών Μεσολογγίου, απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν αλόφιλοι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί με σκοπό την καταγραφή της μικροβιακής χλωρίδας της περιοχής και εκτίμηση πιθανών βιοτεχνολογικών εφαρμογών τους. Με τη μέθοδο του εμπλουτισμού, χρησιμοποιώντας θρεπτικό μέσο SW απομονώθηκαν τα στελέχη: HSC3, HSC4b, LSC2 και LSC3. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές δοκιμασίες, ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, λιπιδιακή ανάλυση, προσδιορισμός ποσοστού G+C %, παραγωγή PHB και ανάλυση 16S rDNA. Ανάλυση της αλληλουχίας 16S rDNA έδειξε για το HSC3 ομολογία 99 % με *Halobacterium salinarum*, για το HSC4b ομολογία 99 % με *Haloferax volcanii* και για το LSC3 99 % ομολογία με *Haloferax mediterranei*. Το στέλεχος LSC2, εμφανίζει 96% ομολογία με *Pseudomonas halophila* και *Halovibrio denitrificans*. Παρόλα αυτά σημαντικές διαφορές όπως το μέγεθος (0,2 x 0,4 μm), η σύσταση των λιπαρών οξέων (10-Me 18:0), οι βιοχημικές δοκιμασίες και η απαίτηση σε αλάτι που δεν συμπίπτουν με αυτά της *Pseudomonas halophila*, το κατατάσσουν στο γένος *Halovibrio* και προτείνεται γι' αυτό η ονομασία *Halovibrio mesolongii*. Η παρούσα ανάλυση αποδεικνύει μικροβιακή ποικιλία τόσο Βακτηρίων (*Halovibrio*) όσο κυρίως Αρχαίων (*Halobacterium* και *Haloferax*) στις αλυκές Μεσολογγίου που μπορούν να αποτελέσουν πηγή χρήσιμων βιοτεχνολογικών προϊόντων.

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HALOPHILIC
MICROORGANISMS FROM THE SOLAR SALTERNS OF
MESOLONGI****Lazoura P., Kallimanis A., Perysinakis A., Drainas C.,
and A.I. Koukkou***Section of Organic Chemistry and Biochemistry, Department of Chemistry, University of
Ioannina, 45110 Ioannina. E-mail: akukku@cc.uoi.gr*

Halophilic bacteria and Archaea are the dominant microorganisms that have developed the mechanisms in order to survive in hypersaline environments. In the present study, from samples from the solar salterns of Mesolongi, halophilic microorganisms have been isolated with a view to record the microbial flora of the area and to estimate possible biotechnological applications. By enrichment methods, using SW medium 4 strains were chosen for further characterization: HSC3, HSC4b, LSC2 and LSC3. In particular there have been performed biochemical tests, protein electrophoresis, lipid analysis, G+C % content, PHB production and 16S rDNA analysis. Strain HSC3 was characterised as *Halobacterium salinarum* with 99 % similarity, strain HSC4b as *Haloferax volcanii* with 99 % similarity and LSC3 as *Haloferax mediterranei* with 99 % similarity. Strain LSC2 shows 96% similarity with *Pseudomonas halophila* and *Halovibrio denitrificans*. However distinct characteristics such as size (0,2 x 0,4 µm), fatty acid methyl esters composition (10-Me 18:0), biochemical tests and salt requirement that do not coincide with *Pseudomonas halophila*, justify it as a new species within the genus *Halovibrio* for which the name *Halovibrio mesolongii* is proposed. The present study reveals microbial diversity of bacteria (*Halovibrio*) and mostly Archaea (*Halobacterium* and *Haloferax*) at the solar salterns of Mesologi that can be used as useful sources of biotechnological products.

**ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΙΝΙΔΙΩΝ ΑΚΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟ-
ΣΩΛΗΝΙΣΚΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΟΦΑΓΙΑ, ΣΤΑ
ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΜΥΓΑΣ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ**

Λάμπρου Ε., Καραγιάννης Φ., Λαμπροπούλου Μ., Μαρμάρας Β.Ι.

Εργαστήριο Βιολογίας - Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Στα πολυμορφοπύρηντα και στα μακροφάγα κύτταρα των θηλαστικών η κυτταροφαγία συνοδεύεται από σημαντική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και της τουμπουλίνης. Για την πρόσληψη *E. coli* και σφαιριδίων latex, από τα αιμοκύτταρα της *C. capitata*, απαιτείται αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, αλλά όχι για τον LPS. Το σηματοδοτικό μονοπάτι ιντεγκρίνες-Ras-FAK-Src εμπλέκεται στη κυτταροφαγία LPS/*E.coli*/latex. Με αυτά τα δεδομένα, ερευνήσαμε, περαιτέρω, τη συμμετοχή των ινιδίων της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων στην πρόσληψη των LPS/ *E.coli*/σφαιρίδια latex. Ενωρήματα αιμοκυττάρων προεπελάστηκαν με αναστολείς του πολυμερισμού της ακτίνης, κυτταρο-χαλασίνη Β και D και λατρονκουλίνη Α, καθώς και με αναστολείς του πολυμερισμού της τουμπουλίνης, νοκοταζόλη και δεμεκολσίνη. Τα αποτελέσματα με κυτταρομετρία ροής έδειξαν σε όλες τις περιπτώσεις σημαντική μείωση της κυτταροφαγίας της *E. coli* και των σφαιριδίων latex και καμία επίδραση στην ενδοκυττάρωση του LPS. Με δεδομένη την ενεργοποίηση των MAP κινασών από LPS/*E.coli*/σφαιρίδια latex και την εμπλοκή τους στη κυτταροφαγία, διερευνήθηκε με western ανάλυση και χρήση αντισωμάτων έναντι φωσφορυλιωμένων MAP κινασών, η θέση τους στη μεταγωγή του μηνύματος που οδηγεί σε κυτταροφαγία, σε σχέση με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και της τουμπουλίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο κυτταροσκελετός της ακτίνης δρα μετά από τη JNK και την ERK και πιο μπροστά από τη p38, ενώ ο κυτταροσκελετός της τουμπουλίνης δρα μετά και από τις τρεις MAP κινάσες.

INVOLVEMENT OF THE ACTIN FILAMENTS AND MICROTUBULES IN PHAGOCYTOSIS BY MEDFLY HEMOCYTES**Lamprou E., Karagiannis F., Lampropoulou M., Marmaras V. J.***Laboratory of Biology – Department of Biology University of Patras*

Phagocytosis in mammalian polymorphonuclears and macrophages is followed by a significant reorganization of the actin and tubulin cytoskeleton. The *E. coli* and latex beads uptake by medfly hemocytes require the reorganization of the actin cytoskeleton, a process that does not take place in LPS uptake. The implication of the signalling pathway integrins-Ras-FAK-Src in the LPS/*E.coli*/latex beads phagocytosis has also been demonstrated. Based on these results the participation of the actin and tubulin cytoskeleton in the LPS/*E.coli*/latex uptake was investigated in detail. Hemocytes in suspension were preincubated with inhibitors of actin polymerization, cytochalasin B and D and latrunculin A, and inhibitors of tubulin polymerization, nocodazole and demecolcine. Flow cytometry analysis showed a significant reduction in the phagocytosis of *E.coli*/latex beads and no effect on the endocytosis of LPS. Given that the MAP kinases are phosphorylated by LPS/*E.coli*/latex beads and implicated in phagocytosis, we explored the order of the MAP kinases in the signaling pathway of phagocytosis regarding the actin and tubulin cytoskeleton with immunoblot analysis using antibodies against phosphorylated MAP kinases. The obtained results showed that the actin filaments function downstream of JNK and ERK and upstream of p38, while the microtubules function downstream all three MAP kinases.

Η FAK/SRC ΡΥΘΜΙΖΕΙ ΤΗΝ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΟΥ *S. aureus* ΑΠΟ ΤΑ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ *C. capitata*

Λάμπρου Ε., Λιλής Γ., Λαμπροπούλου Μ., Μαρμάρας Β.Ι.

Εργαστήριο Βιολογίας - Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Τα αιμοκύτταρα της μύγας της Μεσογείου προσλαμβάνουν την ενδοτοξίνη LPS, την *E. coli* και τα σφαιρίδια latex με διαφορετικούς μηχανισμούς. Για την πρόσληψη των LPS και *E. coli* απαιτείται έκκριση από τα αιμοκύτταρα, ενώ για τα σφαιρίδια latex όχι. Ακόμη, η πρόσληψή τους ρυθμίζεται από τις MAP κινάσες. Στην κυτταροφαγία της *E. coli* συμμετέχουν οι β υπομονάδες των ιντεγκρινών, που ενεργοποιούν το σύμπλοκο FAK/Src. Η παρούσα εργασία διερευνά τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην πρόσληψη του Gram (+) βακτηρίου *S. aureus*, από τα αιμοκύτταρα *C. capitata*. Με κυτταρομετρία ροής και μικροσκοπία φθορισμού, διαπιστώθηκε η κυτταρο-φαγία του *S. aureus* από τα αιμοκύτταρα της *C. capitata*. Με ανάλυση κατά Western διαπιστώθηκε ότι το βακτήριο ενεργοποιεί τη FAK, στη θέση Y397, τη Src και τις τρεις MAP κινάσες. Στη συνέχεια διερευνήθηκε εάν η πρόσληψή του από τα αιμοκύτταρα γίνεται μέσω των ιντεγκρινών. Διαπιστώθηκε ότι παρουσία του τριπεπτιδίου RGD και της φιμπρονεκτίνης, αυξάνουν την πρόσληψη του *S. aureus*. Η παρουσία αντισωμάτων έναντι των β1 μειώνει την κυτταροφαγία ενώ η παρουσία των αντισωμάτων έναντι της β3 δεν έχει καμία επίδραση. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι το RGD και η φιμπρονεκτίνη, διευκολύνουν τη δέσμευση του *S. aureus* στις β1 υπομονάδες των ιντεγκρινών και έτσι αυξάνουν την κυτταροφαγία του, όπως στα θηλαστικά. Με τη χρήση του pp2, αναστολέα ενεργοποίησης της Src και dsRNA έναντι της FAK, διερευνήθηκε η εμπλοκή του συμπλόκου FAK/Src στη κυτταροφαγία του *S. aureus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της κυτταροφαγίας παρουσία του pp2 και του dsRNA έναντι της FAK. Συμπερασματικά, ο *S. aureus* δεσμεύεται στη β1 υπομονάδα των ιντεγκρινών στην επιφάνεια των αιμοκυττάρων με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συμπλόκου FAK/Src, που οδηγεί στην κυτταροφαγία του βακτηρίου.

FAK/SRC REGULATES THE UPTAKE OF *S. aureus* FROM *C. capitata* HEMOCYTES**Lamprou E., Lilis J., Lampropoulou M., Marmaras V.J.***Laboratory of Biology – Department of Biology, University of Patras*

Medfly hemocytes uptake endotoxin LPS, *E. coli* and latex beads with distinct mechanisms. Haemocyte secretion is required for *E. coli* and LPS uptake, but not for latex beads. In addition, the uptake of the above agents is regulated by the MAP kinases. Integrin β subunits participate in *E. coli* phagocytosis and activate the FAK/Src complex. The present study explores the signalling pathways implicated in the uptake of the Gram(+) bacterium *S. aureus* from *C. capitata* hemocytes. Flow cytometry analysis and fluorescence microscopy showed the uptake of *S. aureus* by the *C. capitata* hemocytes, via integrins. Western blot analysis showed that *S. aureus* phosphorylates FAK, at the Y397, Src and the three MAP kinases. Furthermore, it was demonstrated that when the tripeptide RGD or fibronectin are present, the phagocytosis of *S. aureus* increases, whereas, anti- β 1 antibodies reduce phagocytosis. On the contrary, anti- β 3 has no effect on *S. aureus* uptake. These results show that RGD and fibronectin facilitate the binding of *S. aureus* to the β 1 subunit of integrins, thus, promoting its phagocytosis, similarly to mammals. In addition, we investigated the implication of the FAK/Src complex in the phagocytosis of *S. aureus* using pp2, a Src inhibitor, and FAK dsRNA. The results clearly showed a decrease of phagocytosis in the presence of pp2 and FAK dsRNA. *S. aureus* binds onto the β 1 integrin subunit of the hemocyte surface, hence resulting to the activation of the FAK/Src complex, which leads to the phagocytosis of the bacteria.

**ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΠΟΛΥΜΕΤΡΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ
ΒΕΝΘΙΚΩΝ ΜΑΚΡΟΑΣΠΟΝΔΥΛΩΝ (ΠΔΒΜ) ΓΙΑ ΤΗΝ
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΡΕΟΝΤΩΝ ΥΔΑΤΩΝ**

Λέκκα Ε. και Μ. Λαζαρίδου

*Εργαστήριο Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ., 54006 Θεσσαλονίκη,
e-mail : mlazarid@bio.auth.gr*

Για τη δημιουργία του ΠΔΒΜ χρησιμοποιήθηκαν 274 δείγματα βενθοπανίδας από 5 ποτάμια συστήματα της Ελλάδας, χρησιμοποιώντας δείγματα βενθικών μακροασπονδύλων προσδιορισμένα σε επίπεδο οικογένειας. Για τη δημιουργία του ακολουθήθηκαν 4 βήματα: α) επιλογή και κατηγοριοποίηση των σταθμών σε 3 κατηγορίες (καθαροί, ενδιάμεσοι και ρυπασμένοι), χρησιμοποιώντας παραμέτρους όπως οι χρήσεις γης, βιολογικούς και χημικούς δείκτες, β) συγκέντρωση των παραμέτρων: χρησιμοποιήθηκαν 26 παράμετροι που σχετίζονταν με την αφθονία των ταξινομικών ομάδων, τη σχετική τους αφθονία και την ανθεκτικότητά τους στη ρύπανση, γ) αξιολόγηση και επιλογή των παραμέτρων: χρησιμοποιήθηκαν 3 κριτήρια, η απόκριση – ευαισθησία της παραμέτρου σε συνθήκες ρύπανσης, η ποικιλότητά της στους σταθμούς αναφοράς (Ενδοτεταρτημοριακός συντελεστής, C_{10}) και η συσχέτιση μεταξύ τους (Συντελεστής Συσχέτισης). Τελικά, επιλέχθηκαν 4 παράμετροι: ο συνολικός αριθμός taxa, ο αριθμός taxa Εφημεροπτέρων, Πλεκοπτέρων και Τριχοπτέρων (EPT), ο αριθμός taxa Τριχοπτέρων και ο αριθμός των ευαίσθητων στη ρύπανση taxa. δ) δημιουργία-αξιολόγηση του δείκτη: η τελική τιμή του ΠΔΒΜ για κάθε σταθμό υπολογίστηκε με το άθροισμα των τιμών των 4 παραμέτρων. Οι κατηγορίες ποιότητας των νερών καθορίστηκαν χρησιμοποιώντας την ελάχιστη, τη μέγιστη και την ενδιάμεση τιμή των παραμέτρων και αυτές που αντιστοιχούν στο 25% και 95% των μετρήσεων σε όλους τους σταθμούς. Ο ΠΔΒΜ εφαρμόστηκε σε 137 δείγματα σταθμών με ποσοστό πρόβλεψης (Discriminant analysis) 89,2% (100% στους καθαρούς σταθμούς). Οι τιμές του ΠΔΒΜ δεν επηρεάστηκαν από τη σχετική αφθονία και την εποχή, ενώ αντίθετα επηρεάστηκαν από το υπόστρωμα στην περίπτωση των ενδιάμεσων και των ρυπασμένων σταθμών. Η σύγκρισή του ΠΔΒΜ με άλλα scores π.χ. BMWP' έδειξε ότι αποτελεί ένα αξιόπιστο και εύκολα υπολογίσιμο score της ποιότητας των ρεόντων υδάτων στην Ελλάδα.

CREATION OF THE MACROINVERTEBRATE MULTIMETRIC INDEX (MMI) AS A COST-EFFECTIVE METHOD FOR THE EVALUATION OF THE WATER QUALITY STATUS**Lekka E., and M. Lazaridou***Department of Zoology, School of Biology, Faculty of Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, 54006, Thessaloniki, Hellas. E-mail: mlazarid@bio.auth.gr*

For the creation of the MMI 274 samples were used from 5 riverine systems in Hellas. The development process consisted of 4 steps: selection and classification of the sites in three categories (reference, impaired and moderately polluted sites) using criteria such as human activities, physico-chemical data and biological quality indices. b) selection of the metrics to be used in MMI: we examined 26 metrics connected to composition of macrofauna, richness of taxa, and tolerance/intolerance to pollution measures c) evaluation and final selection of metrics: the criteria for the final selection were the metric response to stress, metric variability (according to Interquartile Coefficient C_{IQ}), and redundancy of metrics (according to Correlation Coefficient). Four (4) metrics were finally used for the MMI (Total number of taxa, EPT taxa, Trichoptera taxa and Intolerant taxa). d) Calculation of the MMI: the final score of each site was calculated as the sum of the 4 selected metrics. The metric values for each category of water quality were determined by quadrisection of the distribution of the metric value in all sites, using the minimum, the maximum and the median value and the 95th and 25th percentile of each metric. MMI was applied into 137 sites and classified 89,2% of them into the category expected according to their macroinvertebrate fauna (Discriminant analysis) (100% successful classification for the reference sites). The scores of MMI was not affected by the richness of taxa and the seasonal variation, contrary to the substrate type which affected the classification of the impaired and moderate polluted sites. MMI proved to be a reliable and easy to calculate score compared to other scores such as BMWP', because it uses macroinvertebrate data identified to family level.

**ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΦΟΡΕΩΝ
ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΣΤΟΝ *ASPERGILLUS NIDULANS***

Lemuh N.D., Πανταζοπούλου Α., Διαλλινάς Γ. και Δ.Γ. Χατζηνικολάου

Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, 15781

Ο *Aspergillus nidulans* διαθέτει δυο βασικούς μεταφορείς πουρινών, τον UapA και τον AzgA. Ο UapA εμφανίζει εξειδίκευση για το ουρικό οξύ και τη ξανθίνη, ενώ ο AzgA για την αδερίνη, τη γουανίνη και την υποξανθίνη. Και οι δυο μεταφορείς έχουν μελετηθεί μέσω γενετικών και μοριακών προσεγγίσεων. Έχουμε ξεκινήσει να μελετάμε τη ρύθμιση της έκφρασής τους στο επίπεδο του υποκυτταρικού εντοπισμού. Στην παρούσα μελέτη, παρουσιάζεται για η ανοσοχημική ανίχνευση των δυο μεταφορέων και η μελέτη της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης της έκφρασής τους. Με τεχνικές γενετικής μηχανικής κατασκευάστηκαν ανασυνδυασμένα πρωτεϊνικά μόρια με επίτοπο ιστιδίνης στο C-τερματικό άκρο της πρωτεΐνης του UapA και του πεπτιδίου της GFP και στους δυο μεταφορείς. Οι δυο σημασμένοι μεταφορείς εκφράστηκαν υπό τον έλεγχο τόσο του φυσικού τους όσο και ενός ισχυρού υποκινητή (*alcA*). Οι πρωτεΐνες UapA-His, UapA-GFP και AzgA-GFP ανιχνεύτηκαν στο μεμβρανικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα με Western χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα αντισώματα. Επιτεύχθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του UapA-His μεταφορέα μέσω του υποκινητή *alcA* γεγονός που αναμένεται να διευκολύνει την επιτυχή απομόνωση του μεταφορέα με την εφαρμογή μεθόδων υγρής χρωματογραφίας. Η έκφραση των δυο μεταφορέων, υπό τον έλεγχο του φυσικού υποκινητή τους, φάνηκε να αντικατοπτρίζει την μεταγραφική ρύθμιση ως αποτέλεσμα της επαγωγής από πουρίνες και της καταστολής από την αμμωνία. Ωστόσο, ο UapA, σε επίπεδο πρωτεΐνης, εμφανίστηκε ιδιαίτερα ευαίσθητος στην απενεργοποίηση παρουσία αμμωνίας καθώς παρατηρήθηκε γρήγορη εξοφάνισή του από το μεμβρανικό κλάσμα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν απόλυτα με προηγούμενα αποτελέσματα που αφορούν στην κυτταρική έκφραση των δυο μεταφορέων με την χρήση μικροσκοπίας επιφθορισμού.

**IMMUNODETECTION AND REGULATION OF PURINE
TRANSPORTERS IN *ASPERGILLUS NIDULANS*****Lemuh N.D., Pantazopoulou A., Diallinas G., and D. Hatzinikolaou***Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimioupolis,
Athens 15781, Greece.*

The fungus *Aspergillus nidulans* possesses two major purine transporters, UapA and AzgA. UapA is specific for uric acid and xanthine, and AzgA for adenine, guanine and hypoxanthine. UapA and AzgA have been widely studied using various facets of genetic and molecular approaches. Both UapA and AzgA are regulated primarily at the level of transcription and recently we addressed the regulation of expression at the level of subcellular sorting and protein stability. Due to difficulties inherent in transmembrane protein isolation, no study has so far addressed the proteomics of these two major purine transporters of *Aspergillus nidulans*. In this study we present the first immunological detection of these two transporters and their post-translational regulation of expression. We engineered a His-tag to the C-terminus of UapA for detection and eventual purification and the GFP marker on both transporter genes for detection and subcellular sorting. We expressed these tagged transporters both from their native and a strong (*alcA*) promoter. The His-tagged recombinant protein was revealed in total membrane protein extract by direct immunodetection method on western blot using anti-histidine antibody conjugate (chemiluminescent method) whereas the sGFP-tagged fusion protein was immunodetected using two mouse monoclonal antibodies. The result showed very strong expression from the *alcA* promoter, opening as such the gateway for their eventual purification and further study. Expression of UapA and AzgA from the native promoters in response to purine induction and ammonia repression directly reflected regulation at the level of transcription. UapA was very sensitive to ammonia repression as the protein is seen to disappear from the membrane fraction after two hours of repression. AzgA shows slight sensitivity to ammonia repression within the experimental period of study. These results of the post-translational regulation of UapA and AzgA concord well with previous results on the cellular expression of the two transporters using epifluorescence microscopy.

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ *UROGEBIA PUSILLA* ΣΤΙΣ ΒΕΝΘΙΚΕΣ ΡΟΕΣ ΚΑΙ
ΤΟ ΝΕΡΟ ΤΩΝ ΠΟΡΩΝ ΣΕ ΙΖΗΜΑΤΑ ΕΠΙΒΑΡΗΜΕΝΑ ΜΕ
ΜΕΤΑΛΛΕΥΤΙΚΗ ΣΚΩΡΙΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΚΟ ΥΛΙΚΟ:
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ**

Λιακόπουλος Η., Βελέντζα Μ., Παπασπύρου Σ., Θεσσαλού-Λεγάκη Μ.

*Τομέας Ζωολογίας-Θαλάσσιας Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολις 157 84, Αθήνα*

Μελετήθηκε η επίδραση της ενδοβενθικής αιωρηματοφάγου γαρίδας *Urogebia pusilla* σε ιζήματα επιβαρημένα με οργανικό υλικό (θρύμματα *Ulva lactuca*) και/ή μεταλλευτική σκωρία για μια περίοδο 90 ημερών. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν οκτώ πειραματικοί συνδυασμοί των παραπάνω παραγόντων (παρουσία/απουσία ζώων, σκωρίας, *Ulva*, και μάρτυρας) σε εργαστηριακούς μικρόκοσμους, και ακολουθήθηκε η εξέλιξη των βενθικών ροών (O_2 , Fe^{2+} , NH_4^+) και του νερού των πόρων (CO_2 , Fe^{2+} , NH_4^+). Παρουσία ζώων και οργανικού υλικού, η είσοδος O_2 στο ιζημα αυξήθηκε. Η προσθήκη της σκωρίας δεν φάνηκε να επηρεάζει την ολική ανοργανοποίηση, αλλά μόνο τον καταμερισμό της στις διαφορετικές μεταβολικές οδούς. Όσον αφορά στο διαλυμένο στο νερό των πόρων Fe^{2+} , η παρουσία των ζώων προκάλεσε μια σημαντική αύξηση –με μέγιστο σε βάθος 2 cm- σε όλους τους αντίστοιχους συνδυασμούς, πιθανότατα λόγω της απομάκρυνσης του H_2S που δεσμεύει το Fe^{2+} μέσω άρδευσης. Η επίδραση αυτή ήταν πολύ μεγαλύτερη ακόμα και από εκείνη που προκαλείται από τη προσθήκη σκωρίας σε ιζήματα χωρίς ζώα. Τέλος, η παρουσία οργανικού υλικού φάνηκε ότι μειώνει το μέγιστο του Fe^{2+} μόνο στις περιπτώσεις που δεν είχε προστεθεί σκωρία. Τα αποτελέσματα συζητούνται σε σχέση με τη δυναμική των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στο ιζημα.

Το έργο συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και Εθνικούς Πόρους (ΕΠΕΑΕΚ II) ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II.

**EFFECT OF *UPOGEBIA PUSILLA* ON BENTHIC FLUXES AND
POREWATER SOLUTES IN SEDIMENTS AMENDED WITH ORE
SLAG AND ORGANIC MATTER: AN EXPERIMENTAL
APPROACH**

Liakopoulos I., Velentza M., Papaspyrou S., Thessalou-Legaki M.

*Department of Zoology-Marine Biology, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis 157 84, Athens*

The effect of the burrowing, suspensivore shrimp *Upogebia pusilla* on benthic fluxes and porewater solute concentrations was studied experimentally in sediments amended with ore slag and/or organic matter. The eight different combinations (presence/absence of animals, ore slag, *Ulva lactuca* detritus, and control) were installed in laboratory microcosms. The temporal evolution of benthic fluxes (O_2 , Fe^{2+} , NH_4^+) and pore water solutes (CO_2 , Fe^{2+} , NH_4^+) was followed for a period of 90 days. The influx of O_2 was increased in microcosms with animals and organic matter. Enrichment with ore slag did not appear to effect total carbon mineralisation, but only the relative importance of its metabolic pathways. Regarding porewater Fe^{2+} , the presence of animals resulted to a significant increase –with a peak at 2 cm depth- in corresponding combinations studied, possibly due to H_2S removal by irrigation. This effect was even larger than that produced by slag amendment in defaunated microcosms. Finally, organic matter enrichment decreased Fe^{2+} peak only in microcosms without slag. The results are discussed in relation to the metabolic processes occurring in the sediments.

The project is co-funded by the European Social Fund and National Resources – (EPEAEK II) PYTHAGORAS II.

**ΣΤΕΡΕΟΔΙΑΤΑΞΙΚΟΙ ‘ΔΙΑΚΟΠΤΕΣ’: Η ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑ ΠΟΥ
ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΕΙ ΤΟ ΔΑΘΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ
ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΕΙΣ**

Λιάππα Χ.Θ., Οικονομίδου Β.Α. και Σ.Ι. Χαμόδρακας

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Αθήνα 157 01*

Ένας μεγάλος αριθμός νόσων που ονομάζονται αμυλοειδώσεις οφείλονται σε πρωτεΐνες που από τη φυσιολογική διαλυτή τους κατάσταση διπλώνονται κατά ένα μη φυσιολογικό τρόπο και αυτοσυγκροτούνται σε αδιάλυτες ινιδιακές δομές. Τα αμυλοειδή ινίδια που δημιουργούνται και εναποτίθενται σε όργανα και ιστούς, δημιουργώντας συσσωματώματα, πιθανότατα, αποτελούν την κύρια αιτία αυτών των παθολογικών καταστάσεων. Τα ινίδια έχουν πάχος ~100 Å, ακαθόριστο μήκος, είναι ευθύγραμμα και αδιακλάδιστα, δεσμεύουν τη χρωστική Congo red και, αν και προέρχονται από πρωτεΐνες με διαφορετική δομή και λειτουργία, υιοθετούν έναν κοινό, ειδικό, τύπο β-πτυχωτών επιφανειών, την ‘cross-β’ δομή (οι β-κλώνοι είναι κάθετοι στον μακρύ άξονα των ινιδίων). Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας των πρωτεϊνών που σχηματίζουν αμυλοειδή ινίδια και η αναζήτηση μέσα σ’ αυτή, της κρυμμένης πληροφορίας που σηματοδοτεί το λανθασμένο δίπλωμα τους, προκαλώντας τη δημιουργία των ινιδίων. Αναζητείται, επομένως, στην ακολουθία, η ύπαρξη πιθανών στερεοδιαταξικών ‘διακοπών’, επιτρέποντας, σε κατάλληλες συνθήκες, τη μετάπτωσή τους από τη μια δομική κατάσταση στην άλλη. Συνολικά μελετήθηκαν δεκαπέντε διαφορετικές αμυλοειδογενείς πρωτεΐνες, με τη βοήθεια του προγράμματος πρόγνωσης δευτεροταγούς δομής, SecStr (Hamodrakas, 1988). Ακολούθησε σύγκριση των αποτελεσμάτων με την πειραματικά προσδιορισμένη δομή των πρωτεϊνών που έχει κατατεθεί στην βάση δεδομένων PDB και κατόπιν, ένα χαρακτηριστικό μοτίβο (εξαπεπτίδιο) που πειραματικά έχει βρεθεί ότι ευνοεί τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων αναζητήθηκε και βρέθηκε κατά μήκος των ακολουθιών τους.

CONFORMATIONAL ‘SWITCHES’: THE INFORMATION THAT TRIGGERS THE MISFOLDING OF PROTEINS THAT ARE RELATED TO AMYLOIDOSES**Liappa C.T., Iconomidou V.A., and S.J. Hamodrakas***Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Athens 157 01*

A great number of human diseases commonly referred to as amyloidoses are due to proteins that, from their natural soluble form, following a misfolding pathway, self-assemble into insoluble fibrils. The amyloid fibrils that accumulate in a variety of organs and tissues by forming aggregates are, most probably, the leading cause of these clinical disorders. The fibrils are 100 Å in diameter, have indeterminate length, are straight and unbranched, bind Congo red and despite that they derive from different proteins, they share a common structure of β -pleated sheet, the ‘cross- β ’ structure, in which continuous β -sheets are formed by β -strands running perpendicular to the long axis of the fibrils. The main purpose of this project was the analysis of these proteins by searching for hidden information in their amino acid sequence that triggers misfolding and the formation of amyloid fibrils. More specifically, we were looking for the existence of specific conformational ‘switches’, leading to the switch from the natural to the misfolding state under certain conditions. The secondary structure of fifteen different proteins was predicted by using the software SecStr (Hamodrakas, 1988). The results were compared with the experimentally determined structure of these proteins found in the Protein Data Bank and finally their amino acid sequences were scanned for the existence of a characteristic hexapeptide pattern-switch experimentally found to be related to the formation of amyloid fibrils. This pattern-switch was found to exist in all fifteen proteins examined.

**ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΩΝ ΠΑΡΑΛΟΓΩΝ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ
α-ΕΛΙΚΟΕΙΔΕΙΣ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ**

Λιμήσιου Ο.Κ.¹, Προμπονάς Β.Ι.^{1,2}

¹Τομέας Βιολογίας Κυττάρων και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Αθήνα 157 01

²Τμήμα Βιολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κύπρου, 1678 Λευκωσία, Κύπρος

Γεγονότα γονιδιακών διπλασιασμών είναι γνωστό ότι οδηγούν στη δημιουργία οικογενειών παράλογων γονιδίων. Με δεδομένο ότι τα γονίδια τέτοιων πολυγονιδιακών οικογενειών μπορούν στη συνέχεια να εξελίσσονται ανεξάρτητα, ο μηχανισμός αυτός αποτελεί σημαντικό εξελικτικό μηχανισμό επινόησης νέων κυτταρικών λειτουργιών. Μελετήσαμε τις οικογένειες παράλογων α-διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το πλήρως προσδιορισμένο γονιδίωμα του βακτηρίου *Escherichia coli* σε συσχέτιση με τις ορθολογές τους (γονίδια που προήλθαν από διαδικασίες ειδογένεσης) στη *Chlamydia trachomatis*. Πέρα από την προφανή προσπάθεια για την εξακρίβωση των παράλογων οικογενειών, στοχεύσαμε παράλληλα και στην προτυποποίηση μιας διαδικασίας επιτυχούς διαχωρισμού των πραγματικών ορθολόγων γονιδίων σε περιπτώσεις περισσότερο απομακρυ-σμένων οργανισμών. Η επιλογή των οικογενειών των α-ελικοειδών δια-μεμβρανικών πρωτεϊνών έγινε αφενός γιατί σε μεγάλο βαθμό αντικατο-πρίζουν τις διαφορετικές λειτουργικές ανάγκες οι οποίες δημιουργήθηκαν εξελικτικά στα βακτήρια για την ενσωμάτωσή τους σε διαφορετικά περιβάλλοντα, αφετέρου διότι συχνά οι πληροφορίες σχετικά με τη δομή και τη λειτουργία τους είναι περιορισμένες. Για τον εντοπισμό των παράλογων γονιδίων και των ορθολόγων τους βασιστήκαμε σε μια τοπική εγκατάσταση του λογισμικού BLAST. Χρησιμοποιήσαμε διαφορετικά κατώφλια e-value για την επιλογή των στατιστικά σημαντικών ομοιοτήτων και τον καθορισμό 123 παράλογων οικογενειών στην *E. coli* (340 πρωτεΐνες με μέσο ποσοστό ταυτόσημων καταλοίπων 41.25%) και 10 στη *C. trachomatis* αντίστοιχα (33 πρωτεΐνες, 35.14% ταυτόσημα κατάλοιπα). Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι αντίστοιχες ορθολογες πρωτεΐνες παρουσίαζαν κατά μέσο όρο 36.39% ταυτόσημα κατάλοιπα.

**COMPUTATIONAL IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF
PARALOGOUS GENE FAMILIES ENCODING FOR BACTERIAL
 α -HELICAL TRANSMEMBRANE PROTEINS****Limitsiou O.K.¹, Promponas V.J.^{1,2}**¹*Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Athens 157 01*²*Faculty of Biological Sciences, University of Cyprus, 1678 Leukosia, Cyprus*

Gene duplication events are responsible for the creation of paralogous gene families. Since the genes of these families are under different selective pressure they may have evolved separately, this being a major evolutionary mechanism for the invention of novel cellular functions. We have initially identified paralogous gene families encoding for α -helical transmembrane (α -TM) proteins from the completely annotated genome of *Escherichia coli* in combination with their orthologs (genes which resulted from evolutionary procedures) in *Chlamydia trachomatis*. Besides the apparent goal for the ascertainment of common and diverse functions in these two parasitic bacteria we also aimed to standardize the process of successfully separating real ortholog genes for more distantly related organisms. The selection of the family of α -helical transmembrane proteins for this study was due to the fact that they illustrate the different functional needs, which have evolutionary been established in bacteria for their growth in different environments. In addition, experimental data regarding their function and structure are limited. A local installation of the BLAST suit of programmes served for paralog and ortholog identification, using different e-value cutoffs to assess the statistical significance of detected similarities. Our results show that 340 α -helical integral membrane proteins encoded in the *E. coli* genome may be grouped in 123 paralogous families with an average of 41.25% pairwise (within family) identities. The same figures for the *C. trachomatis* genome were 33 proteins, 10 paralogous families and 35.14% identities. It is worth noting that the detected orthologous α -TM proteins exhibit an average of 36.39% identities.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΣΗΣ ΑΦΕΨΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *Sideritis clandestina subsp. peloponnesiaca* ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΜΥΩΝ

**Λιναρδάκη Ζ.¹, Παπανδρέου Μ.¹, Κωνσταντίνου Κ.¹, Ζιαβρά Δ.^{1*},
Ζαμπίρα Ι.¹, Παπαθανασίου Ε.¹, Ιατρού Γρ.¹, Λάμαρη Φ.Ν.²,
και Μ. Μαργαρίτη¹**

¹Τμήμα Βιολογίας, ²Τμήμα Φαρμακευτικής, Παν/μιο Πατρών
* Παρούσα διεύθυνση : Τμήμα Ιατρικής, Παν/μιο Πατρών

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της πόσης του αφεψήματος (4% κ.β.) του είδους *Sideritis clandestina subsp. peloponnesiaca* για 40 ημέρες στην αντιοξειδωτική ικανότητα των κεντρικών ημισφαιρίων, της παρεγκεφαλίδας και του μεσεγκεφάλου ενήλικων μυών. Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας εφαρμόστηκαν η μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας αναγωγής του σιδηρι-κατιόντος (FRAP) και της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών ισοδύναμης με το trolox (TEAC), ένα υδατοδιαλυτό παράγωγο της βιταμίνης Ε. Αρχικά, μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του αφεψήματος διαφορετικών ειδών του γένους *Sideritis* και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το αφέψημα του *S. clandestina subsp. peloponnesiaca* παρουσίασε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Τα πειραματόζωα που κατανάλωναν το αφέψημα του *S. clandestina subsp. peloponnesiaca* εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική μείωση του βάρους τους και αύξηση τόσο της ημερήσιας κατανάλωσης τροφής όσο και της κατανάλωσης υγρών. Η αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ των εγκεφαλικών περιοχών στα ζώα-μάρτυρες παρουσίασε διαφορές (κεντρικά ημισφαίρια > παρεγκεφαλίδα > μεσεγκεφαλος). Επίσης, η αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των εγκεφαλικών περιοχών ήταν αυξημένη μετά την κατανάλωση του αφεψήματος, ακολουθώντας διαφορετικές ποσοστιαίες αλλαγές (11%-50%). Τα αποτελέσματα της μελέτης μας δείχνουν ότι το είδος *S. clandestina subsp. peloponnesiaca* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών, ενώ είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα η περαιτέρω μελέτη της διαφορετικής επίδρασης στις εγκεφαλικές περιοχές.

EFFECT OF CONSUMPTION OF TEA OF *Sideritis clandestina subsp. peloponnesiaca* ON THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF ADULT MICE BRAIN REGIONS

**Linardaki Z.¹, Papandreou M.A.¹, Constantinou C.¹, Ziavra D.^{1*},
Zampira I.¹, Papathanasiou E.¹, Iatrou G.¹, Lamari F.N.²,
and M. Margarity¹**

¹Department of Biology, ²Department of Pharmacy, University of Patras
*Present address: Department of Medicine, University of Patras

Aim of the present study was to examine the effect of drinking a herbal tea (4% w/v) from *Sideritis clandestina subsp. peloponnesiaca* for 40 days on the antioxidant properties of the cerebral hemispheres, cerebellum and midbrain of adult mice. Antioxidant activity was determined using the assays of ferric-reducing antioxidant power (FRAP) and the trolox-equivalent antioxidant capacity (TEAC) to scavenge free radicals. Study of the *in vitro* antioxidant properties of the hot water extracts of various *Sideritis* species showed that *S. clandestina subsp. peloponnesiaca* hot water extract displayed the strongest antioxidant activity *in vitro*. The experimental animals exhibited a statistically significant decrease of their body weight and increase in their daily consumption of food and liquids, in comparison to the control animals. The antioxidant activity of the brain areas of the control animals differed (cerebral hemispheres>cerebellum>midbrain). In addition, the antioxidant activity of all the brain areas of the treated animals was elevated at different percentages (11%-50%). Our findings indicate that *S. clandestina subsp. peloponnesiaca* could be used as a source of natural food antioxidants, whereas further investigation of its differential effects on the antioxidant properties of the brain regions is extremely interesting.

**ΑΥΤΟΜΕΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ
ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΟ ΕΝΤΕΡΟ ΤΟΥ ΒΑΤΡΑΧΟΥ *Rana ridibunda***

Λουμπουρδής Ν.Σ.

*Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,
Θεσσαλονίκη, ΤΚ 54124*

Ο υδράργυρος είναι ένα πολύ δραστικό μόριο, που έχει πολύ ισχυρά τοξικά αποτελέσματα. Είναι ένας πολύ διαδεδομένος περιβαλλοντικός και βιομηχανικός ρυπαντής. Στο περιβάλλον απαντά υπό τρεις μορφές, ως ατομικός (Hg^0), ως ανόργανος (Hg^{2+}) και ως οργανικός. Η γαστρεντερική απορρόφηση του υδραργύρου δεν φαίνεται να απαιτεί κάποιο ειδικό σύστημα μεταφοράς. Ο ανόργανος υδράργυρος δεν φαίνεται να διαπερνά εύκολα το επιθήλιο του γαστραγγειακού σωλήνα, τον διαπερνά όμως εύκολα με τη μορφή οργανικού υδραργύρου, που σχηματίζεται με τη δράση κυρίως αναεροβίων βακτηρίων. Ο ιστοχημικός εντοπισμός του υδραργύρου γίνεται με την τεχνική της αυτομεταλλογραφίας, κατά την οποία οι κόκκοι του υδραργύρου εγκλείονται από ένα στρώμα αργύρου. Στο στόμαχο εντοπίστηκε η μικρότερη συγκέντρωση κόκκων υδραργύρου, κυρίως στο κορυφαίο τμήμα των επιθηλιακών κυττάρων. Στο λεπτό έντερο παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση υδραργύρου, σε σύγκριση με το στόμαχο. Υψηλές συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν στο γλυκοκάλυκα, μια ένδειξη ότι ο υδράργυρος συνδέεται με μεταλλοθειονεΐνες. Το πολύ ενδιαφέρον στοιχείο αυτής της έρευνας είναι η μεγάλη συγκέντρωση υδραργύρου σε έναν ειδικό τύπο κυττάρου, πιθανόν νευροενδοκρινούς τύπου. Πιθανόν ο υδράργυρος να συνδέεται με κάποιο αμινοξύ, ολιγοπεπτίδιο, κάποια πρωτεΐνη ή ένζυμο. Πιθανόν αυτή να είναι μια άλλη οδός αποτοξίνωσης. Ένας μεγάλος αριθμός κόκκων υδραργύρου παρατηρήθηκε κάτω από τη βασική μεμβράνη, μια ένδειξη ότι η βασική μεμβράνη άρχισε να καταστρέφεται. Η μέγιστη συγκέντρωση κόκκων υδραργύρου παρατηρήθηκε στο παχύ έντερο. Ενδιαφέρονσα είναι και η παρατήρηση ότι κόκκοι υδραργύρου δεν παρατηρήθηκαν στο τελικό πλέγμα (terminal web).

**AUTOMETALLOGRAPHIC STUDY OF THE DISTRIBUTION
OF MERCURY IN THE GUT OF THE FROG *Rana ridibunda*****Loumbourdis N.S.***Department of Zoology, University of Thessaloniki, GR 54124- Thessaloniki, Greece.*

Mercury (Hg) is a highly reactive molecule that produces toxic effects. It is widely distributed as an environmental and industrial pollutant. Three forms of mercury are found in the environment. Elemental mercury (Hg^0), inorganic (Hg^{2+}) mercury and organic mercury. Gastrointestinal absorption of mercury does not appear to require specific transport process. But it is transformed in marine and freshwater sediments as a result of the action of anaerobic bacteria to methylmercury, which readily crosses the gastrointestinal epithelium. Histochemical detection of mercury is performed by the autometallographical technique, where the mercury sulphide/selenide grains are encapsulated into a shell of silver. The lowest concentration of mercury grains in the gut were detected in the stomach, and, especially in the apical part of epithelial cells. Fewer grains were detected in the deeper parts of the crypts. As in the stomach, the higher concentration of mercury grains in the small intestine were observed in the apical parts of the absorptive epithelial cells and in the apical glycocalyx, an indication that this mercury is bound to metallothioneins. Very interesting is the observation that high concentrations of mercury were detected in a special cell type, most probably of neuroendocrine origin. Probably, mercury is bound to an aminoacid, oligopeptide, protein or enzyme. This might be another route of detoxification. Of importance is also the observation that mercury is concentrated under the basement membrane, an indication that this membrane was disorganized. Destruction of basement membrane may result in the diffusion of mercury into the internal organs, finally, by the blood vessels to the kidney. The highest mercury concentration was detected in the large intestine. Of interest is the observation that no mercury grains were observed in the terminal web.

**ΠΙΘΑΝΕΣ ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΗΠΑΡ ΤΟΥ
ΒΑΤΡΑΧΟΥ *Rana ridibunda* ΑΠΟ ΤΟ ΠΟΤΑΜΙ ΤΑΦΡΟΣ 66**

Λουμπουρδής Ν.Σ.

*Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Θεσσαλονίκη, ΤΚ 54124*

Τα τελευταία χρόνια πολλοί πληθυσμοί αμφιβίων ελαττώνονται σε αριθμούς, μερικοί δε πληθυσμοί έχουν εκλείψει τελείως. Αυτό, κυρίως, είναι συνέπεια του ότι οι πληθυσμοί είναι ευαίσθητοι στους διάφορους περιβαλλοντικούς ρυπαντές. Η ευαισθησία αυτή είναι συνέπεια κυρίως της μη ύπαρξης προστατευτικής μεμβράνης στα αυγά τους και της υψηλής διαπερατότητας του δέρματός τους. Τα πρώιμα στάδια καρκινογένεσης εμφανίζονται με διάφορες μορφές, όπως προ-νεοπλαστικές εστίες που αποτελούνται από χαρακτηρι-στικούς κυτταρικούς φαινότυπους. Ο πλεομορφισμός των ηπατικών κυττάρων είναι μια άλλη μορφή προ-νεοπλασίας, όπως επίσης η εμφάνιση σε μεγάλους αριθμούς μικρών χοληφόρων αγωγών και η ύπαρξη PAS θετικής ύλης μέσα σε χοληφόρους αγωγούς. Στη μελέτη αυτή εντοπίστηκαν χοληφόροι αγωγοί με PAS θετική ύλη, μικροί χοληφόροι αγωγοί μέσα σε στρώμα συνδετικού ιστού και πλεομορφικοί ηπατικοί πυρήνες. Παρατηρήθηκε έντονη ίνωση γύρω από τα ηπατοκύτταρα και τους μεγάλους χοληφόρους αγωγούς. Πολύ χαρακτηριστική ήταν η ύπαρξη τριών διαφορετικών κυτταρικών εστιών με διαφοροποιημένα ηπατοκύτταρα. Η ύπαρξη εκτεταμένης ινώδους περιοχής με μικρούς χοληφόρους αγωγούς πιθανόν να είναι ένα πρώιμο στάδιο χολαγγειοϊνώσεως, προδρόμου χολαγγειοκαρκινώματος. Η περιοχή του ποταμού Τάφρος 66 βρέθηκε να είναι επιβαρυνόμενη με βαρέα μέταλλα, κυρίως χαλκό, μόλυβδο και ψευδάργυρο. Λαμβανομένου υπ όψιν ότι τα μέταλλα αυτά πιθανόν να συμβάλλουν στην παρεμπόδιση ανακατασκευής του DNA, όλα αυτά τα στοιχεία πιθανόν να είναι μέχρι ενός βαθμού υπεύθυνα για την εμφάνιση αυτών των πρώιμων προ-νεοπλασιών. Πολλοί όμως άλλοι, άγνωστοι μέχρι τώρα παράγοντες, μπορεί να συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία.

**POSSIBLE PRENEOPLASTIC CHANGES IN THE LIVER OF
THE FROG *Rana ridibunda* FROM THE TAFROS 66 RIVER****Loumbourdis N.S.***Department of Zoology, University of Thessaloniki, Thessaloniki TK 54124 Greece*

Over the last few years, many amphibian populations are declining dramatically and extinction has occurred in a few populations. This is mainly the result of the fact that the populations are vulnerable in the various environmental pollutants. This vulnerability is mainly the expression of the lack of a protective membrane of their eggs and the high permeability of their skin. The early stages of carcinogenesis appear in various forms, such as pre-neoplastic foci, which comprise characteristic cellular phenotypes. Pleomorphism of hepatocytes, as well as the development of many small bile ductuli and the presence of PAS positive material into the lumen of larger bile ducts are another forms of pre-neoplasia. Extensive fibrosis was also present around hepatocytes and around larger bile ducts. Very characteristic was also the presence of three different hepatocyte foci with strongly differentiated hepatocytes. The first one was a classic basophilic focus, the second with no regular hepatocytes was a necrotic focus and the third was a focus consisted of hepatic nodules with a plenty of fibrotic material, suggesting hepatocyte regeneration. The presence of foci of hepatocellular alterations may represent progenitor lesions from which hepatocellular neoplasia may arise. The strong PAS positive material filling some lumens of bile ducts may be early signs of holangiofibroma. The existence of an extensive fibrous area with duct-like structures in the liver, similarly may indicate an early holangiofibroma. All the histopathological alterations observed in this study indicate that the animals are under intense environmental stress. Considering the extremely high concentrations of copper, zinc and chromium in the liver of frogs and the fact that these metals may inhibit the repair of DNA damage, they heavy metals together with other unknown factors may contribute to such histopathological lesions.

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΣΕ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΑ
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΔΕΞΑΜΕΝΩΝ ΦΡΕΣΚΟΥ ΝΕΡΟΥ**

Λυμπεροπούλου Δ.Σ. και Α.Δ. Καραγκούνη

*Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη, Αθήνα,
15781*

Η απομόνωση εντεροκόκκων από περιβαλλοντικά δείγματα νερού αποτελεί σύνθετο φαινόμενο, με τα είδη *Enterococcus faecalis* και *E. faecium* να αποτελούν τα πλέον παθογόνα. Δεδομένου ότι οι εντεροκόκκοι φαίνεται να συσχετίζονται καλύτερα με συμβάντα γαστροεντερικών ασθενειών, κυρίως σε νερά αναψυχής (π.χ. πισίνες), έχει προταθεί ότι αποτελούν καλύτερους δείκτες της κοπρανώδους μόλυνσης στο νερό από την *E. coli* ή άλλα κολίμορφα βακτήρια και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου σε αυτό. Από την άλλη, το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει περισσότερους από 2500 ορότυπους και αν και οι περισσότεροι από αυτούς μπορούν να προσβάλλουν τον άνθρωπο, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός αυτών φαίνεται να επικρατεί στα περιβαλλοντικά δείγματα. Επιπλέον υπάρχουν αρκετά προβλήματα όσον αφορά στην ανίχνευση της *Salmonella* στο νερό, όπως οι σχετικά χαμηλοί αριθμοί με τους οποίους απαντάται, καθώς και η περιοδική παρουσία της, η οποία σχετίζεται με αντίστοιχους υψηλούς αριθμούς των μικροοργανισμών δεικτών. Στην παρούσα μελέτη, οι αριθμοί των εντεροκόκκων εκτιμήθηκαν παράλληλα με την παρουσία της *Salmonella* σε πέντε θέσεις δειγματοληψίας της λίμνης του Μαραθώνα, η οποία αποτελεί τη δεξαμενή παροχής πόσιμου νερού της πόλης των Αθηνών. Οι μικροοργανισμοί απομονώθηκαν σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και διαχωρίστηκαν βάσει των διαφορετικών προτύπων που έδωσαν σε αντίδραση *ger*-PCR. Τα διαφορετικά στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως εντεροκόκκοι ή *Salmonella* με PCR και χρήση εξειδικευμένων μορίων εκκινητών, καθώς και με αλληλούχιση των 16S προϊόντων της PCR. Τέλος, απευθείας ενίσχυση των μικροοργανισμών έλαβε χώρα τόσο σε ακατέργαστα δείγματα νερού, όσο και σε δείγματα τα οποία επιμολύνθηκαν με γνωστές συγκεντρώσεις των υπό εξέταση μικροοργανισμών.

**CORRELATION OF THE PRESENCE OF *SALMONELLA* SPP. AND
THE POPULATIONS OF ENTEROCOCCI IN UNTREATED
FRESHWATER RESERVOIRS****Lymperopoulou D.S., and A.D. Karagouni***Microbiology group, Dept. of Botany, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis 15781 Athens, Greece*

Enterococci are frequently isolated from environmental waters, with *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* being the two major pathogenic species. Since they correlate better with the incidence of gastrointestinal illnesses in recreational bathers, it has been suggested to be a superior indicator of fecal contamination and they are widely used for microbial source tracking. On the other hand, the genus *Salmonella* includes more than 2500 serovars and although all of them are considered as potential human pathogens, only a limited number of serovars seem to prevail within environmental isolates. On the other hand, there are several problems concerning the detection of *Salmonella* in water, such as their low numbers and sometimes intermittent presence. There is general agreement that *Salmonella* is present at high densities of indicator organisms. In this study, enterococci were estimated in parallel with the prevalence of *Salmonella* spp. in five distinct sampling sites of the Marathonas lake the drinking water supply of Athens. Enterococci and *Salmonella* strains were isolated on selective media and they were distinguished with the rep-PCR DNA fingerprinting technique. Genus specific primers were used for the identification of the strains, as well as 16S rDNA PCR products sequence analysis. Direct PCR amplification of enterococci and salmonellae from untreated and spiked water samples also took place.

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΚΑΙ
ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΧΡΩΜΙΟΥ
ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗ α NK
ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ**

**Μαθιουδάκη Ε.¹, Καρχιλάκη Ε.², Τόπακας Γ.², Σκοπελίτη Μ.¹,
Σταυροπούλου-Γκιόκα Α.², Τσιτσιλώνη Ο.¹**

¹Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, ²Ανοσολογικό Τμήμα & Εθνικό Κέντρο Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Γ. Γεννηματάς»

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία σύγχρονη μέθοδος η οποία επιτυγχάνει ανάλυση των χαρακτηριστικών μεγάλου αριθμού κυττάρων, με ταχύτητα, ακρίβεια και ευαισθησία, και μπορεί να υποκαταστήσει ραδιομετρικές μεθόδους μέτρησης της κυτταροτοξικότητας. Σκοπός μας ήταν η εκτίμηση της NK κυτταροτοξικότητας, με την πρότυπη δοκιμασία απελευθέρωσης χρωμίου (⁵¹Cr) και με την κυτταρομετρία ροής και η αξιολόγηση των δύο μεθόδων. Γι αυτό, εξετάσαμε την ενίσχυση της NK κυτταροτοξικότητας από την προθυμοσίνη α (προΤα) και το συνθετικό θραύσμα του καρβοξυτελικού της άκρου, προΤα100-109. Η προΤα είναι ένα συντηρητικό πολυπεπτίδιο 109 αμινοξέων, με ασυνήθιστη δομή και επαγωγικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ εμφανίζει ανοσοενισχυτική δράση, η οποία, σύμφωνα με μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της. Αναλυτικά, μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) υγιών δοτών απομονώθηκαν μετά από φυγοκέντρηση σε Ficoll-Histopaque και επώαστηκαν για 3 ημέρες με την προΤα ή το πεπτίδιο προΤα100-109 συνεργιστικά με χαμηλή δόση ιντερλευκίνης 2. Στη συνέχεια, τα PBMC επώαστηκαν για 4 h με καρκινικά κύτταρα-στόχους της ανθρώπινης ερυθρολευχαιμικής σειράς K562 (ευαίσθητα σε λύση από NK κύτταρα) που είχαν σημειωθεί με τη φθορίζουσα χρωστική καλσεΐνη ή με ⁵¹Cr και προσδιορίστηκε η κυτταροτοξική τους δραστηριότητα με κυτταρομετρία ροής και δοκιμασία απελευθέρωσης ⁵¹Cr. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας των δύο μεθόδων, διαπιστώθηκε ότι συσχετίζονται και μάλιστα, τόσο η προΤα όσο και το πεπτίδιο προΤα100-109, ακόμη και σε χαμηλή αναλογία κυττάρων-τελεστών προς κύτταρα-στόχους, βρέθηκαν να ενισχύουν την κυτταροτοξική δράση των NK κυττάρων.

**COMPARATIVE STUDY OF FLOW CYTOMETRY AND
STANDARD CHROMIUM-RELEASE ASSAY IN PROT α -INDUCED
NK CYTOTOXICITY****Mathioudaki E.¹, Karchilaki E.², Topakas G.², Stavropoulos-Giokas C.²,
Tsitsilonis O.E.¹**¹*Department of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, University of Athens,*²*Department of Immunology & National Tissue Typing Laboratory, «G. Gennimatas»
General Hospital of Athens*

Flow cytometry is a contemporary technique, which achieves analysis of large cell populations, with high speed, accuracy and sensitivity and it can substitute radiometric cytotoxicity assays. Our aim was the determination of NK cytotoxicity by standard chromium (⁵¹Cr) release assay (CRA) and flow cytometry and the subsequent evaluation of both methods. In this respect, we investigated the enhancement of NK cytotoxicity by prothymosin α (proT α) and the synthetic fragment of its carboxy-terminus, proT α 100-109. ProT α is a conservative polypeptide of 109 aminoacids with unusual structure, presenting a modulatory role in cell proliferation and an immunoenhancing activity in general. According to recent studies from our research group, the immunologically active site of proT α is located at the carboxy-terminus of the molecule. Specifically, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors were isolated by centrifugation on Ficoll-Histopaque and were incubated for 3 days with proT α or the peptide proT α 100-109 synergistically with low dose interleukin 2. PBMC were further co-incubated for 4 h with human erythroleukemic K562 cells (sensitive to lysis by NK cells), labeled with the fluorescent dye calcein or with ⁵¹Cr and their cytotoxic activity was assessed by flow cytometry and CRA, respectively. Comparison of the cytotoxicity results from the 2 methods revealed a significant correlation between them. Moreover, both proT α and the peptide proT α 100-109 were found to enhance the cytotoxic activity of NK cells, even at low effector to target cells ratios.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗΣ 6 (hk6) ΣΤΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ

Μαΐστρου Β.¹, Γιώτη Ι.¹, Βιλαράς Γ.², Καραμέρης Α.², Ταλιέρη Μ.¹

¹Κέντρο Ογκολογικής Έρευνας «Γ. Παπανικολάου» Α.Ο.Ν.Α “ Ο Άγιος Σάββας”, Αθήνα,

²Τμήμα Παθολογικής Ανατομικής, Νοσοκομείο ΝΙΜΤΣ, Αθήνα

Η ανθρώπινη γονιδιακή οικογένεια των ιστικών καλλικρεΐνών κωδικοποιεί για μια ομάδα 15 πρωτεασών σερίνης, οι οποίες έχειδειχθεί ότι παίζουν ρόλο σε κακοήθεις διεργασίες. Το γονίδιο *KLK6* είναι ένα καινούργιο μέλος της ανθρώπινης γονιδιακής οικογένειας των καλλικρεΐνών και κωδικοποιεί για μια εκκρινόμενη πρωτεάση, την ανθρώπινη καλλικρεΐνη 6 (hk6). Στόχος μας ήταν να διερευνήσουμε την έκφραση της hk6 σε ενδομητρικούς καρκινικούς ιστούς μέσω της ανοσοϊστοχημείας και να εξετάσουμε το ρόλο της ως πιθανού βιολογικού δείκτη, μέσα από τον συσχετισμό της έκφρασης της με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους και την επιβίωση των ασθενών. Αναλύσαμε 61 όγκους ενδομητρίου σε τομές παραφίνης που προήλθαν από 61 γυναίκες με καρκίνο του ενδομητρίου. Για να εντοπίσουμε την hk6, χρησιμοποιήσαμε πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την hk6, το οποίο είχε παραχθεί σε κουνέλι, καθώς και το σύμπλοκο αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης. Η έκφραση της πρωτεΐνης ήταν κυτοπλασματική. Αυξημένη έκφραση βρέθηκε να είναι πιο συχνή σε αδενοκαρκινώματα (ενδομητριώδους ιστολογικού τύπου), σε όγκους με βαθμό διαφοροποίησης I, στάδιο νόσου I και σε όγκους με θετική έκφραση ορμονικών υποδοχέων. Επιπλέον αυξημένη έκφραση βρέθηκε σε όγκους με εισβολή στο στρώμα του ενδομητρίου. Η ανάλυση επιβίωσης έδειξε ότι η αυξημένη έκφραση της hk6 σχετίζεται με υψηλό χρόνο ελεύθερο νόσου(DFS)($p=0.002$). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η hk6 αντιπροσωπεύει πιθανόν έναν νέο βιολογικό δείκτη για τον καρκίνο του ενδομητρίου, ο οποίος μελλοντικά μπορεί να χρησιμεύσει ως διαγνωστικό και προγνωστικό εργαλείο. Ωστόσο, επιπλέον μελέτες και εκτενής βιοστατιστική ανάλυση είναι αναγκαία για να εδραιώσουν την κλινική χρησιμότητα της hk6.

**EXPRESSION ANALYSIS OF HUMAN KALLIKREIN 6 (hK6) IN
ENDOMETRIAL CARCINOMA****Maistrrou V.¹, Gioti I.¹, Vilaras G.², Karameris A.², Talieri M.¹**¹*“G. Papanicolaou” Research Center of Oncology “Saint Savvas” Hospital, Athens,*²*Department of Pathology, N.I.M.T.S. Hospital, Athens*

The human tissue *KLK* gene family encodes a group of 15 serine proteases many of which have been shown to play a role in malignant processes. The *KLK6* gene is a new member of the human kallikrein gene family and encodes for a secreted serine protease, human kallikrein 6 (hk6). Our purpose was to examine the expression of hk6 in endometrial cancer tissues using immunohistochemistry and to investigate its role as a new potential biomarker through the association of hK6 with various clinicopathologic variables and patient survival. We analysed 61 samples. In order to localize hk6, we employed an hK6 specific polyclonal rabbit antibody and avidin-biotin-HRP complex. The expression of hk6 was cytoplasmatic. Increased hk6 expression was found to be more frequent in adenocarcinomas (endometrioid histotype), in grade I, stage I tumors and tumors expressing hormone receptors. Furthermore, increased expression of hk6 was found in tumors with stromal invasion. Survival analysis showed that increased *KLK6* expression is associated to increased disease free survival (DFS) of patients. Our results suggest that hk6 probably represents a new biomarker for endometrial carcinoma, which might prove to be of potential utility as a diagnostic and prognostic tool. However, further studies and extended biostatistic analysis will establish the clinical usefulness of hk6 as a new biomarker for endometrial cancer.

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ Ρ0 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ
ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΟΥ ΜΙΣΧΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ ΚΑΙ ΣΤΟ
ΜΥΔΙ *M. galloprovincialis***

Μακαρόνα Μ., Τασγιώργος Σ. και Σ. Κουγιανού–Κουτσούκου

*Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη, Αθήνα 15701*

Ο μίσχος της 60S ριβοσωμικής υπομονάδος αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό πενταμερές, Ρ0(P1/P2)₂, που αλληλεπιδρά με τους παράγοντες επιμήκυνσης και επηρεάζει την ριβοσωμική ενεργότητα κατά την πρωτεϊνοσύνθεση. Η πρωτεΐνη Ρ0 εμπλέκεται σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα, ενώ υπερέκφραζεται σε συνθήκες στρες σε διάφορους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η λειτουργία της πρωτεΐνης Ρ0 στον άνθρωπο - σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα-, και στο μύδι *M. galloprovincialis*, -σε συνθήκες περιβαλλοντικού stress-. Για το σκοπό αυτό, το γονίδιο της ανθρώπινης ριβοσωμικής πρωτεΐνης Ρ0 υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης pT7, εκφράσθηκε σε κύτταρα *Escherichia coli* BL21 και η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα 3HB5. Η καθαρισμένη ανθρώπινη Ρ0 πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο για την ανίχνευση αυτο-αντισωμάτων στον ορό ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα, όπως αρθρίτιδα και Συστηματικός Ερυθρωματώδης Λύκος. Στο μεσογειακό μύδι *M. galloprovincialis*, το cDNA της πρωτεΐνης MgP0 απομονώθηκε με σάρωση μιας cDNA βιβλιοθήκης με χρήση ομόλογου ανιχνευτή που κατασκευάσθηκε με την τεχνική PCR. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής και της προβλεπόμενης αμινοξικής του αλληλουχίας έδειξε αξιοσημείωτη ομολογία με το Ρ0 γονίδιο άλλων ευκαρυωτικών οργανισμών. Εκθεση μυδιών σε συνθήκες στρες κι ανάλυση κυτταρικών εκχυλισμάτων από μανδύα ή βράγχια με SDS ηλεκτροφόρηση και ανοσομεταφορά κατά Western με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έδειξε υπερέκφραση της πρωτεΐνης Ρ0. Το απομονωμένο cDNA μόριο πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση κατά Northern, για να διαπιστωθεί αν η υπερέκφραση της Ρ0 πρωτεΐνης του μυδιού ρυθμίζεται μεταγραφικά.

Το πρόγραμμα αυτό χρηματοδοτήθηκε από τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΛΚΕ, 70 / 4 / 7803 στην Σ.Κ).

**FUNCTIONAL STUDY OF THE RIBOSOMAL STALK P0 PROTEIN
IN HUMAN AND IN THE MUSSEL *M. galloprovincialis*****Makarona M., Tasigiorgos S., and S. Kouyanou-Koutsoukou***Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis, Athens 15701*

The stalk of the 60S ribosomal subunit consists of a protein pentamer, P0(P1/P2)₂, that reacts with the elongation factors, affecting the ribosomal activity during protein synthesis. P0 protein is involved in auto-immune diseases, while it is over expressed at stress conditions in several eucaryotic species. We present here a study of the ribosomal P0 function in human auto-immune diseases and in the mussel *M. galloprovincialis*, -at environmental stress conditions. To this direction, the cDNA of the human P0 protein was subcloned in the expression vector pT7 and was subsequently expressed in *Escherichia coli* BL21 cells. The recombinant protein was isolated and identified with the specific monoclonal antibody 3HB5. The purified human P0 protein was then used as an antigen for the detection of auto-antibodies in the serum of patients with auto-immune diseases, like arthritis and Systemic Lupus Erythromatosus. In the Mediterranean mussel *M. galloprovincialis*, the cDNA of the MgP0 protein was isolated by screening a cDNA library with the use of a homologue probe prepared by PCR. Study of the nucleotide and predicted amino acid sequence showed remarkable homology with other eukaryotic organisms. When mussels were exposed at stress conditions, analysis of cell extracts from mantle of gills with SDS-PAGE and immunoblotting with a specific monoclonal antibody showed over expression of the MgP0 protein. The isolated mussel P0 cDNA will be used for Northern blot analysis, to verify if the P0 protein expression is transcriptionally regulated.

This project has been supported by the Special Account for Research Grants of Athens University (SARG, 70 / 4 / 7803 to SKK).

**Η FAK ΡΥΘΜΙΖΕΙ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ
ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΤΑ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΜΥΓΑΣ ΤΗΣ
ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ**

Μάμαλη Ε., Τάταρη Μ., Καποδίστρια Κ., Λαμπροπούλου Μ., Μαρμάρης Β. Ι.

Εργαστήριο Βιολογίας - Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Η FAK και τα σηματοδοτικά μόρια που ρυθμίζονται από αυτήν εμπλέκονται στην απόπτωση που προκαλείται από διάφορα εξωτερικά ερεθίσματα, σε διάφορα συστήματα στα θηλαστικά. Στην παρούσα εργασία εξετάσαμε αν η FAK και τα σηματοδοτικά μόρια που επηρεάζει, ρυθμίζουν την απόπτωση των αιμοκυττάρων που γίνεται φυσιολογικά κατά τη νυμφοποίηση της μύγας της μεσογείου. Με ανάλυση κατά western, ELISA και κυτταρομετρία ροής, διαπιστώθηκε πως όταν παρεμποδίζεται η έκφραση της FAK με FAK dsRNA, η απόπτωση των αιμοκυττάρων διπλασιάζεται. Η μεταγωγή του σήματος γίνεται μέσω των Src, MEK/ERK, και PI-3K/Akt σηματοδοτικών μονοπατιών. Η έκφραση-φωσφορυλίωση των FAK, Src, ERK, PI-3K και Akt φαίνεται να εξαρτάται από τα στάδια ανάπτυξης. Το μέγιστο της έκφρασης-φωσφορυλίωσής τους απαντάται στο στάδιο της λευκής νύμφης. Το σημαντικό στοιχείο της εργασίας αυτής είναι ότι τα αιμοκύτταρα προσπαθούν να καταστείλουν την αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη απόπτωση με αύξηση της έκφρασης-φωσφορυλίωσης της FAK και των σηματοδοτικών μορίων Src, ERK, PI-3K και Akt, που ρυθμίζονται από αυτήν. Σημειώνεται ακόμα, ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια επιβίωσης στα έντομα και στα θηλαστικά, φαίνεται να παραμένουν αναλλοίωτα κατά την εξέλιξη.

**FAK REGULATES THE DEVELOPMENTALLY INDUCED
APOPTOSIS IN MEDFLY HAEMOCYTES****Mamali I., Tatari M., Kapodistria K., Lampropoulou M., Marmaras V.J.***Laboratory of Biology - Department of Biology, University of Patras*

Focal adhesion kinase (FAK) and its downstream signaling targets are implicated in the process of apoptosis induced by external stimuli, in several mammalian systems. In this report, we tested the hypothesis that FAK and its downstream targets regulate apoptosis, during development, in normal insect hemocytes. It was demonstrated by western blot, ELISA and flow cytometry analysis that FAK expression silencing, in transfected by FAK dsRNA hemocytes, enhances about twofold hemocyte apoptosis, by signalling via Src, MEK/ERK, and PI-3K/Akt signaling pathways. The expression and phosphorylation of FAK, Src, PI-3K, Akt and ERK signaling molecules appear to be dependent upon developmental stages. The maximum of expression and phosphorylation was achieved just after the white pupal stage. The novel aspect of this report is that hemocytes attempt to suppress the developmentally-regulated apoptosis, by increasing the expression/phosphorylation of FAK and, hence its downstream targets signalling molecules Src, ERK, PI-3k and Akt. Evidently, the basic survival pathways among insects and mammals appear to remain unchanged, during evolution.

**ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
Bacillus subtilis ΚΑΙ *Lactococcus lactis* ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

Μαμάρα Α., Τουλούπη Κ., Τουράκη Μ., Καραμανλίδου Χ.

Τομέας Γενετ., Αναπτ. Και Μορ. Βιολ., Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ.

Ως προβιοτικά ορίζονται τα ζωντανά μικροβιακά διατροφικά συμπληρώματα, τα οποία επηρεάζουν ευεργετικά το ζώο – ξενιστή βελτιώνοντας τη μικροβιακή ισορροπία του εντερικού του συστήματος. Τα προβιοτικά βακτήρια παράγουν ουσίες που επιδρούν στην ανάπτυξη παθογόνων και μη μικροοργανισμών και μπορούν πιθανόν να χρησιμοποιηθούν αντί των συνθετικών αντιβιοτικών. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να αποφευχθεί η εκδήλωση ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά αλλά και η ρύπανση του περιβάλλοντος λόγω της χρήσης χημικών ουσιών, φαινόμενα των οποίων η ύπαρξη έχει αναφερθεί στην περιοχή μονάδων υδατοκαλλιέργειας του εξωτερικού. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση των εξωτοξινών που παράγονται κατά τον μεταβολισμό των προβιοτικών βακτηρίων *Bacillus subtilis* και *Lactococcus lactis* στην αναπτυξιακή πορεία διαφόρων μικροοργανισμών. Από υγρή καλλιέργεια των παραπάνω προβιοτικών, συλλέγονταν δείγματα κάθε 12 ώρες, φυγοκεντρούνταν και ακολουθούσε απομόνωση και αποστείρωση των υπερκειμένων που ενδεχομένως περιείχαν τις δραστικές εξωτοξίνες. Στα υπερκείμενα αυτά πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των μικροοργανισμών *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* και *Lactococcus lactis*. Παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης των προαναφερθέντων βακτηρίων σε σύγκριση με την ανάπτυξη σε μάρτυρα που περιείχε καθαρό θρεπτικό υλικό της ίδιας σύστασης και με την ίδια ποσότητα μικροοργανισμών. Μέγιστη αναστολή παρατηρήθηκε στο υπερκείμενο που απομονώθηκε από καλλιέργεια 72 ωρών του *Bacillus subtilis*, γεγονός που πιθανόν να συνάδει με την διαδικασία σχηματισμού σπορίων. Για το *Lactococcus lactis* μέγιστη αναστολή παρατηρείται στο υπερκείμενο που απομονώθηκε από καλλιέργεια 24 ωρών, με ακόλουθη σταδιακή μείωση της παρατηρούμενης ανασταλτικής δράσης. Η ανασταλτική δράση του *Lactococcus lactis* είναι πιθανόν να συνδέεται με τη μέγιστη μείωση του pH της καλλιέργειας, η οποία επίσης παρατηρείται στις 24 ώρες. Συμπερασματικά, οι εξωτοξίνες των *Bacillus subtilis* και *Lactococcus lactis* παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των υπό μελέτη μικροοργανισμών, και συνεπώς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες προστασίας αντί των αντιβιοτικών.

FUNCTIONAL INHIBITORY EFFECT OF PROBIOTICS *Bacillus subtilis* AND *Lactococcus lactis* ON THE GROWTH OF VARIOUS STRAINS OF MICROORGANISMS**Mamara A., Touloupi K., Touraki M., Karamanlidou G.***Dept of Genet., Develop. & Mol. Biol., Sch. Biol., Aristotle University of Thessaloniki*

Probiotics are defined as viable microorganisms that support a beneficial balance of the autochthonous microbial population of the gastro – intestinal tract (GIT). Probiotics produce specific substances that produce a profound negative effect on the growth of pathogens and non – pathogens, and for this reason they can potentially be used instead of chemically synthesized antibiotics. Thus through their use, adaptation and resistance of bacteria that usually appears towards common antibiotics can be avoided. The aim of this study is to investigate the effect of exotoxins that are produced during the metabolic processes of *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis*, on the growth of other microorganisms. The culture of the above probiotics was performed in liquid media from which samples were collected every 12 hours and centrifuged. The next step was to isolate and sterilize the supernatants that might contain the exotoxin. The microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* were suspended into those supernatants in order to study the inhibition of their growth, in comparison with a control, which contained the suitable broth of the same composition with the supernatant and an equal quantity of microorganisms. The supernatant of *Bacillus subtilis*, that was isolated from the culture after 72 hours, presented maximum inhibition. This fact is in accordance with the sporulation data on these bacteria. The maximum inhibition due to *Lactococcus lactis* was seen at the supernatant that was isolated from the culture after 24 hours of incubation. This might be related to the maximum reduction of culture's pH that also appears at 24 hours. In conclusion, exotoxins of *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* inhibit the growth of the under study microorganisms, and therefore they could potentially be used as protective agents instead of antibiotics.

ΚΑΔΜΙΟ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΡΙΝΗΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ

Μανέ Φ.¹, Βεζυράκη Π.¹, Στεφάνου Δ.², Φωτόπουλος Α.³, Λεονάρδος Ι.⁴,
Κάγκαλου Ι.⁴, Νάτσης Α.⁵, Καλφακάκου Β.¹

¹Μονάδα Περιβαλλοντικής Φυσιολογίας, Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, ²Εργαστήριο Παθολογοανατομίας, Ιατρική Σχολή, ³Εργαστήριο Πυρηνικής Ιατρικής, Ιατρική Σχολή, ⁴Εργαστήριο Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα. ⁵Εργαστήριο Υδατ. Οικοσυστημάτων, Τμήμα Ιχθυοκομίας-Αλιείας, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Ηπείρου, 46100 Ηγουμενίτσα.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: Κάδμιο, ενδοκρινής διαταραχή, αναπαραγωγή ιχθύων.

Τα βαρέα μέταλλα επηρεάζουν την νευροενδοκρινική λειτουργία μεταβάλλοντας το ευαίσθητο περιβάλλον των βιολογικών σταδίων της διαφοροποίησης των γονάδων και της αναπαραγωγής. Στην παρούσα μελέτη ερευνάται κατά πόσο το κάδμιο αποτελεί έναν ενδοκρινή διαταράκτη της αναπαραγωγικής λειτουργίας του χρυσόψαρου. Θηλυκά χρυσόψαρα (*Carassius auratus*) εκτέθηκαν σε 1 και 5μg/l Cd και παρακολούθηθηκαν επί 4 μήνες:

- 1) οι συγκεντρώσεις του καδμίου στις γονάδες και το ήπαρ με Φασματοφωτομετρία Ατομικής Απορρόφησης (AAS)
- 2) τα επίπεδα της 17-β οιστραδιόλης (E₂) στον ορό με ραδιοανοσομετρία (RIA)
- 3) η σταδιοποίηση της ωρίμανσης των γονάδων ιστολογικά
- 4) η εξέλιξη του γοναδοσωματικού (GSI) και ηπατοσωματικού (HSI) δείκτη με μακρομορφολογικές μετρήσεις.

Τα χρυσόψαρα που εκτέθηκαν σε Cd εμφάνισαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα καδμίου στο ήπαρ μετά 60 ημέρες έκθεσης. Στις γονάδες των χρυσόψαρων που εκτέθηκαν σε 5μg/l Cd εμφανίζονταν σημαντικά αυξημένα επίπεδα καδμίου μετά 120 ημέρες έκθεσης. Ο Γοναδοσωματικός Δείκτης (GSI) και τα επίπεδα οιστραδιόλης (E₂) των ιχθύων που εκτέθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση των 5μg/l Cd αυξήθηκαν μετά 120 ημέρες έκθεσης ενώ στους ιχθύες που εκτέθηκαν στη χαμηλότερη συγκέντρωση του 1μg/l Cd και οι δύο παράμετροι μειώθηκαν την ίδια χρονική περίοδο. Η ιστολογική ανάλυση των γονάδων αποκάλυψε βιτελλογενικά ωοκύτταρα στους ιχθύες που εκτέθηκαν σε 5μg/l Cd επί 120 ημέρες ενώ η ομάδα του 1μg/l Cd εμφάνιζε τόσο ώριμα όσο και ανώριμα ωοκύτταρα. Φαίνεται ότι το κάδμιο έχει έναν μάλλον παράδοξο ρόλο ως ορμονικός διαταράκτης καθώς επίπεδα του μετάλλου της τάξης του 1μg/l στο νερό προκαλούν σοβαρότερες διαταραχές στο ενδοκρινικό σύστημα και την ωρίμανση των ωοκυττάρων από ότι υψηλότερες συγκεντρώσεις, ένα εύρημα που πιθανώς να σχετίζεται με την επαγωγή των μεταλλοθειονινών και την απάντηση στο περιβαλλοντικό stress.

CADMIUM AND HORMONE DISRUPTION

**Mane F.¹, Vezyraki P.¹, Stefanou D.², Fotopoulos A.³, Leonardos I.⁴,
Kagalou I.⁴, Natsis L.⁵, Kalfakakou V.¹**

¹Environmental Physiology Unit, Experimental Physiology Lab, Faculty of Medicine.

²Pathology Lab, Faculty of Medicine. ³Nuclear Medicine Lab, Faculty of Medicine. ⁴Zoology Lab, Department of Biological Applications, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece.

⁵Department of Ichthyology and Fisheries, Technological Educational Institute of Epirus, 46100 Igoumenitsa, Greece.

KEY WORDS: Cadmium, endocrine disruptor, reproduction, goldfish.

Heavy metals interfere with the neuroendocrine pathways altering the sensitive life stages' environment of gonad differentiation and reproduction. The present study investigates whether cadmium acts as an endocrine disruptor in relation to goldfish reproductive functions. Female goldfish (*Carassius auratus*) were exposed to 1 and 5µg/l Cd and for 4 months the following were registered:

- 1) Cadmium levels of gonads and livers by means of Atomic Absorbance Spectrophotometry (AAS)
- 2) Serum 17-β estradiol (E₂) by radioimmunoassay (RIA)
- 3) Gonad maturation staging by histological methods
- 4) Gonadosomatic (GSI) and hepatosomatic (HSI) indices evolution by macromorphological measurements.

Significantly increased Cd levels in the fish liver were found after 60 days of exposure and in the gonads of fish exposed to 5µg/l Cd after 120 days. GSI and E₂ of fish exposed to the higher concentration of 5µg/l Cd increased after 120 days of exposure whereas in fish exposed to the lower concentration of 1µg/l Cd both parameters decreased at the same period. Gonads' histological analysis revealed vitellogenic oocytes in fish exposed to 5µg/l Cd after 120 days of exposure while the 1µg/l Cd exposed fish group presented immature together with mature oocytes. It seems that Cd has a rather peculiar role as a hormone disruptor since water levels of 1µg/l Cd produce heavier endocrine and oocyte maturation disruption in relation to higher Cd concentrations probably due to metallothionein induction and environmental stress response.

**ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ
ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΙΟΥ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ**

Μανούσου Α.¹, Οικονομίδου Β.¹, Willis J.H.², και Σ.Ι. Χαμόδρακας¹

¹Τομέας Βιολ. Κυττάρων & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
157 01

²Department of Cellular Biology, University of Georgia, USA

Τα αρθρόποδα είναι τα πιο επιτυχημένα ζώα του πλανήτη. Αυτό το οφείλουν κυρίως στον εξωσκελετό/δερμάτιό τους, μια ιδιαίτερα σκληρή, συχνά ελαστική κατασκευή, που συνίσταται από ινίδια χιτίνης βυθισμένα σε μία πρωτεϊνική μήτρα. Κατά τη μελέτη πρωτεϊνών του δερματίου, που εμφανίζουν διαφορές ανά αναπτυξιακό στάδιο, αλλά και ανά περιοχή του σώματος των εντόμων, εστιαστήκαμε στην ανάλυση μιας νέας οικογένειας 17 πρωτεϊνικών ακολουθιών που απαντά σε 6 διαφορετικά είδη εντόμων (*A. mellifera*, *A. gambiae*, *D. melanogaster*, *L. migratoria*, *T. molitor*, *A. pernyi*), οι οποίες, μετά από στοίχιση, διαπιστώθηκε ότι μοιράζονται μια κοινή ακολουθία 'συναίνεσης', 51 αμινοξικών καταλοίπων, στην C-τελική τους περιοχή:

x(6)Ax(9)RSxGx(4)VSxYxKx(2)Dx(3)SSVxKxDxRx(2)Nx(3).

Με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος πρόγνωσης δευτεροταγούς δομής SecStr (Hamodrakas, 1988) προβλέφθηκαν 5 περιοχές β-κλώνων που εναλλάσσονται με 4 περιοχές β-στροφών. Αυτή η πρόγνωση εμφανίζει ομοιότητα με την αντίστοιχη για την περιοχή της εκτεταμένης ακολουθίας 'συναίνεσης' RR1 και RR2 των πρωτεϊνών του 'σκληρού' και 'μαλακού' δερματίου (Iconomidou et al., 1999), όπου είχε φανεί η κυριαρχία β-πτυχωτών επιφανειών και η απουσία α-έλικας, η οποία είναι γνωστό ότι δεσμεύει χιτίνη, υποδεικνύοντας ότι και αυτή η περιοχή είναι πιθανή περιοχή πρόσδεσης με χιτίνη. Εκατέρωθεν της ακολουθίας 'συναίνεσης' παρατηρήσαμε πολλαπλές επαναλήψεις μοτίβων, όπως τα: AAP(A/V), AAP(I/L), GYLG, GGY, GLLG, με σημαντικότερο το AAP(A/V). Μετά από ανάλυση 329 πρωτεϊνών της PDB, που φέρουν το AAP(A/V) στην ακολουθία τους, το μοτίβο AAP(A/V) δεν φάνηκε να αποκτά μία συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή. Ωστόσο, ενδέχεται να παίζει το ρόλο συνδέτη μεταξύ δομικών αυτοτελών περιοχών σε πρωτεΐνες με πολλαπλές αυτοτελείς δομικές περιοχές.

**STRUCTURAL STUDIES OF A NEW PROTEIN FAMILY
OF INSECT CUTICLE****Manoussou A.¹, Iconomidou V.¹, Willis J.H.², and S.J. Hamodrakas¹**¹*Dept of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Athens 157
01*²*Department of Cellular Biology, University of Georgia, USA*

The arthropods are the most successful animals on earth. This is attributed mainly to their special exoskeleton or cuticle, a hard, light but often flexible construction, composed of chitin filaments embedded in a protein matrix, which protects them from environmental hazards. During the study of cuticular proteins, which exhibit differences per developmental stage, as well as per segment, we focused on the analysis of a new family of 17 cuticular protein sequences from 6 different species (*A. mellifera*, *A. gambiae*, *D. melanogaster*, *L. migratoria*, *T. molitor*, *A. pernyi*), which, after alignment, appear to share a common consensus of 51 amino acid residues in their C-terminal region, that is:

x(6)Ax(9)RSxGx(4)VSxYxKx(2)Dx(3)SSVxKxDxRx(2)Nx(3).

Utilizing the secondary structure prediction package SecStr, (Hamodrakas, 1998) we predicted for this consensus, 5 β -strands alternating with 4 β -turns. This prediction shows similarity with that of the 'extended RR consensus' of the 'hard' and 'soft' cuticular proteins (Iconomidou et al., 1999), a chitin binding motif, which indicates that the 51 a.a.r motif might comprise a chitin binding domain as well. On both sides of the consensus, multiple repeats of specific motifs are observed, such as: AA(P/V), AAP(I/L), GYLG, GGY, GLLG, with the AAP(A/V) motif being the most abundant. After analysis of 329 proteins from PDB, which contain the AAP(A/V) motif, it was found that the motif AAP(A/V) does not seem to adopt a specific secondary structure. However, it is known from the literature and from analysis of the 329 structures that this motif might be playing the role of a linker between domains in multi-domain proteins.

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΩΡΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΟΥ
Anemonia viridis (FORSKAL, 1775) ΣΤΗ ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ (Β. ΑΙΓΑΙΟ)**

Μαργαρίτης Μ., Γλαρόπουλος Α., Αντωνιάδου Χρ., Χιντήρογλου Χ.

Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Gr-54124,
Θεσσαλονίκη e-mail: mmargar@bio.auth.gr

Η μελέτη της χωροδιάταξης των πληθυσμών συμβάλει στη βιοπαρακολούθηση των παράκτιων θαλάσσιων οικοσυστημάτων, εφόσον υπάρχουν επαρκή στοιχεία της βιολογίας των ειδών. Για το *Anemonia viridis*, το οποίο συγκαταλέγεται στους πιο κοινούς κάτοικους των σκληρών υποστρωμάτων της υποπαραλιακής ζώνης στο Βόρειο Αιγαίο, η βιβλιογραφική ανασκόπηση έδειξε ότι οι σχετικές πληροφορίες είναι πολύ περιορισμένες. Η παρούσα εργασία στοχεύει στη διερεύνηση της χωροδιάταξης των πληθυσμών του *A. viridis* σε περιοχές της Χαλκιδικής, προκειμένου να συγκροτηθεί βάση δεδομένων. Από ένα σύνολο 24 σταθμών επισκόπησης στη Χαλκιδική επιλέχθηκαν επτά (7) όπου η πληθυσμιακή πυκνότητα του είδους ήταν σημαντική. Οι δειγματο-ληψίες πραγματοποιήθηκαν το καλοκαίρι του 2005 με κατάδυση. Σε κάθε σταθμό δειγματοληψίας, καταγράφηκαν τα άτομα του *A. viridis* μέσα σε 10 τυχαία τοποθετημένα πλαίσια-δείγματα επιφάνειας 1 m². Η χωροδιάταξη των πληθυσμών εκτιμήθηκε με τον δείκτη του Morisita (I'), ενώ η απόκλιση της τιμής του I' από την τυχαία κατανομή έγινε με τη δοκιμασία χ^2 . Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η χωροδιάταξη των πληθυσμών του *A. viridis* είναι συσσωματική και στους 7 σταθμούς (η τιμή I κυμάνθηκε από 1,095 - 1,621). Το πρότυπο αυτό αποδόθηκε στο συνδυασμό βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων (π.χ. τροφοληπτική συμπεριφορά, βαθμός έκθεσης των σταθμών) και όχι σε ανθρωπογενείς επιδράσεις. Τα αποτελέσματα αυτά δεν διαφοροποιούνται από αντίστοιχες ερευνητικές προσπάθειες, παρά το γεγονός ότι σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. κόλπος Θεσσαλονίκης) έχει παρατηρηθεί και η τυχαία κατανομή των πληθυσμών, που αποδόθηκε όμως σε ανθρωπογενείς επιδράσεις.

**SPATIAL DISPERSION OF THE *Anemonia viridis* (FORSKAL 1775)
POPULATIONS IN CHALKIDIKI (N. AEGEAN)****Margaritis M., Glaropoulos A., Antoniadou Chr., Chintiroglou Ch.***Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, Gr-54124, Thessaloniki e-mail: aglaropo@bio.auth.gr*

The pattern of spatial dispersion is frequently used in biomonitoring; however this prerequisite data on the biology of the species. Although, *Anemonia viridis* is among the commonest inhabitants in sublittoral hard bottoms of the North Aegean Sea, the available information on its spatial dispersion is scarce. Considering the above, the aim of the present work is to study the spatial dispersion of *A. viridis* populations in Chalkidiki, as well as to create a data base. Preliminary sampling involved the survey of a large number of sites (24). Overall, 7 sampling stations were selected, in which the population density of *Anemonia viridis* was found increased. Field sampling was carried out by diving, in summer 2005. At every station the number of individuals contained in 10 frame samples, 1m² each, was recorded. From these data Morisita's index of dispersion (I) was calculated to estimate spatial dispersion, whereas a chi-square test was used to determine the significance of deviation from random. Results showed that the dispersion of *Anemonia viridis* populations was aggregated at all seven sampling stations (I values ranged from 1.095 to 1.621). This pattern was attributed to a combination of biotic and abiotic factors (e.g. feeding behaviour, degree of exposure of the sampling stations). These results generally agree with relevant reports, besides the reported random pattern of *A. viridis* populations in some cases (Thessaloniki Bay), attributed to human interference.

**IN VIVO ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΤΗΣ
ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ
ΣΦΑΙΡΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ**

**Μαργέτης Π.¹, Αντωνέλου Μ.¹, Καράμπαμπα Φ.², Λουτράδη Α.²,
Μαργαρίτης Α.Χ.¹, Παπασιδέρη Ι.¹**

¹Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, ²
Κέντρο Μεσογειακής Αναιμίας, Αθήνα

Η κληρονομική σφαιροκυττάρωση (ΚΣ) συνιστά μια ετερογενή ομάδα ασθενειών με παθολογική μορφολογία ερυθρών που οφείλεται σε ανεπάρκεια/δυσλειτουργία πρωτεϊνών, όπως σπεκτρίνης, αγκυρίνης, ζώνης-3 και παλλιδίνης. Προηγούμενες μελέτες *in vitro* έδειξαν αυξημένη ευαισθησία των σφαιροκυττάρων σε οξειδωτικούς παράγοντες. Σκοπός της εργασίας αυτής είναι ο προσδιορισμός πιθανών οξειδωτικών αλλοιώσεων των πρωτεϊνών της μεμβράνης και του οξειδωτικού δείκτη της μεμβράνης και του σκελετού σε ασθενείς με ΚΣ. Εξετάστηκαν 12 ασθενείς με ανεπάρκεια σπεκτρίνης, αγκυρίνης ή ζώνης 3. Οι ερυθροκυτταρικές μεμβράνες και οι σκελετοί αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοστύπωμα έναντι αιμοσφαιρίνης, IgG's, διάφορα μεμβρανικά συστατικά και DNP ύστερα από επίδραση δινιτροφαινυλδραζίνης (DNPH). Η πλειονότητα των μεμβρανών των ασθενών παρουσιάζουν πρωτεϊνική αποικοδόμηση, συσσωματώματα υψηλού MB και αυξημένη περιεκτικότητα σε αιμοσφαιρίνη, αιμοχρώματα, ζώνη 8 και IgG's. Στο 30% των σκελετών ανιχνεύτηκαν παθολογικά υψηλά ποσά αιμοσφαιρίνης και αιμοχρωμάτων, ενώ στην πλειονότητα των δειγμάτων ο οξειδωτικός δείκτης έδειξε ότι αυξάνεται. Συμπερασματικά, τα ερυθροκύτταρα στην ΚΣ χαρακτηρίζονται από οξειδωτικές αλλοιώσεις μεμβρανικών πρωτεϊνών και αιμοσφαιρίνης και υψηλό οξειδωτικό δείκτη μεμβρανών και σκελετών. Παρόμοια ευρήματα στα σύνδρομα της Μεσογειακής αναιμίας και στη γήρανση συσχετίζονται θετικά με λειτουργικές διαταραχές της μεμβράνης. Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν τις *in vitro* μελέτες στην ΚΣ και προσθέτουν νέα στοιχεία στην παθοφυσιολογία της νόσου.

Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από το "Εμπειρικό Ίδρυμα" και τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του Παν/μίου Αθηνών προς την Ι. Παπασιδέρη.

**IN VIVO OXIDATIVE DAMAGE OF ERYTHROCYTE MEMBRANE
PROTEINS IN HEREDITARY SPHEROCYTOSIS****Margetis P.¹, Antonelou M.¹, Karababa F.², Loutradi A.², Margaritis
L.H.¹, Papassideri I.¹**¹University of Athens, Faculty of Biology, Department of Cell Biology & Biophysics, (2)
Center of Thalassemias, Athens, Greece

Hereditary spherocytosis (HS) is a heterogeneous group of disorders. The abnormal red cell morphology (resulting in shortened cell survival) is due to a deficiency/dysfunction in, spectrin, ankyrin, band 3 or pallidin. Previous *in vitro* studies suggested that the spherocytes are sensitive to the action of oxidative agents. The aim of this study was to determine the possible oxidation-related protein alterations and the oxidative index of the membrane ghosts and cytoskeletons in clinically diagnosed cases of HS. For this purpose, 12 patients with clinical and laboratory diagnosis of mild to moderate HS (due to deficiencies in ankyrin, spectrin, band 3) were examined. Total ghosts and cytoskeletons were analyzed by SDS-PAGE and probed for hemoglobin, human IgG's, various membrane proteins and DNP moiety after 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization. Protein degradation, formation of high molecular weight aggregates and increased Hb, band 8 and IgG's binding to the membrane were found in the majority of the HS patients examined. The membrane-associated globin was in the form of probably oxidized/denatured Hb or hemichromes. Pathologically increased amounts of skeleton-associated Hb and aggregates were revealed in 30% of the samples, while increased protein carbonyls were evident in the majority of the HS patients. In conclusion, the red cells in HS *in vivo* are characterized by oxidative alterations in Hb and increased protein carbonylation levels. Similar defects in thalassemia, *ex-vivo* stored and senescent RBCs are dictated by increased oxidative stress and are positively correlated with perturbations in membrane properties. These data corroborate the evidence for the occurrence of oxidative damage in membrane proteins in HS and add some new insight in the field of HS pathophysiology.

This study was supported by the "Empirikion Foundation" and the Special Account for Research Grants of the University of Athens to I. S. Papassideri.

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ VITRONECTIN ΣΤΗΝ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑ ΠΕΣΤΡΟΦΑ*

Μαριόλη Δ.Ι., Χονδρού Μ.Π. και Ι.Κ. Ζαρκάδης

Εργαστήριο Γεν. Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, 25600 Πάτρα

Η vitronectin, μια γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος και της εξωκυττάριας ύλης, είναι γνωστή και με τα ονόματα : serum spreading factor, somatomedin B, complement S-protein. Ενέχεται σε ποικίλες φυσιολογικές διεργασίες όπως είναι η ρύθμιση της αιμόστασης και του συστήματος του Συμπληρώματος, η κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση, η μετάσταση καρκινικών κυττάρων και η ανάπλαση ιστών. Όσον αφορά τη ρύθμιση του συστήματος του Συμπληρώματος, η vitronectin αναστέλλει τη δημιουργία του τελικού λυτικού συμπλόκου MAC, μέσω πρόσδεσης της στο διαλυτό σύμπλοκο C5b-7, εμποδίζοντας έτσι την κυτταρική λύση. Προκειμένου να μελετηθεί η εξέλιξη του μορίου απομονώθηκε ένας κλώνος της vitronectin από cDNA βιβλιοθήκη ήπατος ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*). Η πέστροφα, ένας ημιτετραπλοειδής οστεϊχθύς, εμφανίζει ένα πλήρες ανεπτυγμένο σύστημα Συμπληρώματος. Επιπλέον φαίνεται να επεκτείνει μοναδικά τη φυσική ανοσία μέσω διπλασιασμού των γονιδίων του Συμπληρώματος και λειτουργικής διαφοροποίησής τους, καθιστώντας τον οργανισμό αυτό σημαντικό μοντέλο μελέτης. Στην παρούσα εργασία θα παρουσιαστεί η πλήρης cDNA και αμινοξική αλληλουχία, η γονιδιακή οργάνωση (εξόνια- εσόνια) του γονιδίου καθώς και Southern blot, RT-PCR και φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου της vitronectin στην ιριδίζουσα πέστροφα.

* Υποστηρίζεται από το ΕΜΠΕΙΡΙΚΕΙΟ ΙΔΡΥΜΑ

**MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF
VITRONECTIN IN RAINBOW TROUT*****Marioli D.I., Chondrou M.P., and I.K. Zarkadis***Department of Biology, School of Medicine, University of Patras, 26500 Patras, Greece*

Vitronectin, also known as serum spreading factor, somatomedin B, complement S-protein, is a glycoprotein found in plasma and ECM. It mediates various physiological processes, including blood coagulation and complement system regulation, cell adhesion and migration, tumor metastasis and tissue remodeling. As far as the complement system is concerned, vitronectin inhibits the formation of lytic MAC complex by binding to the soluble complex C5b-7. Thus, it prevents cytolysis. In order to elucidate the evolution of this molecule we have isolated the full-length cDNA clone of vitronectin from a trout liver cDNA library. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is a quasi-tetraploid bony fish which represents a significant research model as it possesses a well developed complement system which has evolved through gene duplication and functional diversity. In this report, we will present the full-length cDNA nucleotide and amino acid sequence, the exon-intron organization, as well as Southern blot, RT-PCR and phylogenetic analysis of the trout vitronectin gene.

**Supported by EMPEIRIKEIO FOUNDATION*

ΤΟ ΟΓΚΟΓΟΝΟ *Ha-Ras* ΕΠΑΓΕΙ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ

Μαρκοπούλου Σ. και Ε. Κωλέττας

*Μονάδα Κυτταρικής & Μοριακής Φυσιολογίας, Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων*

Φυσιολογικά κύτταρα έχουν αμυντικούς μηχανισμούς, για να ελαχιστοποιήσουν τα καταστροφικά αποτελέσματα μεταλλάξεων, που εξαλείφονται κατά την καρκινογένεση. Οι προστατευτικοί μηχανισμοί εμφανίζονται ως αντί-πολλαπλασιαστικές αποκρίσεις - διακοπή της αύξησης ή πρόωρη γήρανση και απόπτωση - σε υπερβολικά μιτογόνα μηνύματα ή σε ογκογόνο στρες. Μελέτες έδειξαν ότι το *Ha-RasV12* προάγει την πρόωρη γήρανση πρωτογενών ινοβλαστών. Στην παρούσα μελέτη κατασκευάστηκαν ινοβλάστες MRC-5 που έφεραν την τελομεράση (TERT) ή/και το ογκογόνο *Ha-RasV12*, προκειμένου να διερευνηθούν οι επιδράσεις του στην απόπτωση φυσιολογικών και τελομερισμένων ινοβλαστών. Η TERT οδήγησε στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής των MRC-5 (PDL~55) ή την αθανатоποίηση τους αφού έχουν ανακαλλιεργηθεί >220 διαιρέσεις. Το *Ha-RasV12* μείωσε το ρυθμό αύξησης τους και επήγαγε την απόπτωση των MRC-5 και MRC-5TERT. Η αφαίρεση του ορού επηρέασε την έκβαση της απόπτωσης, που διερευνήθηκε με ανάλυση του DNA, και με την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της αύξησης και απόπτωσης, όπως p53, p21, p16, μέλη της οικογένειας της Bcl-2 και PARP. Επομένως το *Ha-RasV12*, ενώ επάγει την πρόωρη γήρανση ορισμένων στελεχών ανθρωπίνων ινοβλαστών, επάγει την απόπτωση άλλων, σαν αποτέλεσμα του ογκογόνου στρες σε συνάρτηση με υπερβολικά μιτογόνα μηνύματα. Η TERT μολονότι αθανатоποιεί τις ινοβλάστες δεν είναι ικανή να διασώσει τα κύτταρα από την απόπτωση που επάγεται από το *Ha-RasV12*.

*Συγχρηματοδοτήθηκε από την ΕΕ στα πλαίσια του προγράμματος «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ» του ΕΠΕΑΕΚ
II του 3^{ου} ΚΠΣ του ΥΠ.Ε.Π.Θ., με χρηματοδότηση από εθνικούς πόρους και το ΕΚΤ*

Ha-RasV12* INDUCES APOPTOSIS OF HUMAN FIBROBLASTS*Markopoulou S., and E. Kolettas***Cell and Molecular Physiology Unit, Laboratory of Physiology, University of Ioannina
Medical School, 45110 Ioannina, Greece*

Normal cells possess natural defenses that minimize the deleterious consequences of mutations, and these safeguards are often disrupted during multistep carcinogenesis. One such safeguard involves antiproliferative responses, growth arrest or premature senescence and apoptosis, to excess mitogenic signaling or oncogenic stress. Oncogenic Ras promotes uncontrolled mitogenesis but when expressed in primary cells including normal human diploid fibroblasts provokes a permanent cell cycle arrest with senescence features, in the absence of telomere shortening. In the present study MRC5 fibroblasts carrying TERT and/or oncogenic Ha-RasV₁₂ were constructed, in order to investigate the effects of HaRasV₁₂ on the apoptosis of normal and telomerised fibroblasts. Expression of TERT resulted in the extension of MRC5's life span (PDL ~55) or their immortalization, since they have been subcultured for >220 doublings. HaRasV₁₂ reduced MRC5's growth rate and induced apoptosis of MRC5 and MRC5-TERT cells. Serum withdrawal affected apoptosis and that effect was investigated with DNA analysis and expression of proteins implicated in growth regulation and apoptosis such as p53, p21, p16, members of the Bcl-2 family and PARP. It appears that HaRasV₁₂ induces early senescence in certain strains of human fibroblasts while in others it induces apoptosis in response to oncogenic stress and excessive mitogenic signals. Expression of TERT immortalizes fibroblasts but is not sufficient for rescuing them from HaRasV₁₂-induced apoptosis.

Acknowledgements: Supported by a GSRT research grant, in the framework of a Bilateral Agreement between Greece and Cyprus.

Η ΦΑΙΝΥΛΕΦΡΙΝΗ ΕΠΑΓΕΙ ΤΟΝ c-Jun ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΟΔΩΝ ΤΩΝ JNKs ΚΑΙ MSK1 ΣΤΑ ΚΑΡΔΙΟΜΥΟΚΥΤΤΑΡΑ ΕΝΗΛΙΚΟΥ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ

Μάρκου Θ.¹, Γαϊτανάκη Α.², Λάζου Α.¹

¹Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ.

²Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Το πρωτο-ογκογονίδιο c-Jun είναι ένα από τα συστατικά του μεταγραφικού παράγοντα AP-1, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο σε κρίσιμες βιολογικές διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η υπερτροφία. Σκοπός της εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης της φαινυλεφρίνης (PE), ενός παράγοντα που προκαλεί υπερτροφία στα καρδιακά μυοκύτταρα, στο c-Jun και η αποσαφήνιση των σηματοδοτικών οδών που εμπλέκονται σε αυτήν την απόκριση. Τα επίπεδα του mRNA του c-Jun βρέθηκαν αυξημένα 30 min μετά τη διέγερση των καρδιομυοκυττάρων με 100 μM PE και διατηρήθηκαν μέχρι 1 h. Αναστολή των κινάσων ERKs, p38 MAPK, JNKs and MSK1 με ειδικούς αναστολείς προκάλεσε τη μείωση των επιπέδων του mRNA του c-Jun. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια μετά από προσδιορισμό των επιπέδων φωσφορυλίωσης του c-Jun. Για να διερευνηθούν περαιτέρω οι κινάσες που εμπλέκονται σε αυτήν την απόκριση, εξετάστηκε η επίδραση της PE στις JNKs. Η PE προκάλεσε φωσφορυλίωση των JNKs με μέγιστο στα 5-15 min μετά την διέγερση. Ο ειδικός αναστολέας των JNKs, SP600125, μείωσε αυτή τη φωσφορυλίωση ενώ ο Ro318220, αναστολέας της MSK1, δεν είχε καμία επίδραση. Επίσης, ο SP600125 δεν μείωσε την επαγόμενη από την PE φωσφορυλίωση της MSK1 δείχνοντας ότι η ενεργοποίηση της κινάσης αυτής είναι ανεξάρτητη από αυτήν των JNKs. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η PE επάγει την έκφραση και την φωσφορυλίωση του c-Jun μέσω των σηματοδοτικών οδών των JNKs και της MSK1 στα καρδιομυοκύτταρα.

Η έρευνα χρηματοδοτήθηκε από το Εμπειρικό Ιδρυμα.

PHENYLEPHRINE UPREGULATES c-Jun THROUGH JNKs AND MSK1 SIGNALLING PATHWAYS IN ADULT RAT CARDIOMYOCYTES**Markou T.¹, Gaitanaki A.², Lazou A.¹**¹*Lab of Animal Physiology, Sch of Biology Aristotle University of Thessaloniki*²*Dept of Human and Animal Physiology, Sch of Biology, University of Athens*

The protooncogene c-Jun is one of the components of Activator Protein-1 (AP-1), a transcription factor complex involved in fundamental biological processes such as proliferation, apoptosis, tumor angiogenesis and hypertrophy. This study was undertaken to investigate the effect of the hypertrophic agonist phenylephrine (PE) on c-Jun and to elucidate the signalling pathways involved in this response, in adult rat cardiomyocytes. c-Jun mRNA levels were found to be maximally induced within 30 min of treatment with 100 μ M PE and remained elevated for 1 h. Inhibition of ERKs, p38 MAPK, JNKs and MSK1 pathways by pharmacological inhibitors reduced c-Jun mRNA levels in PE- treated cardiomyocytes. Similar results were obtained when the phosphorylation status of c-Jun was assessed by immunoblotting. To further investigate the kinases involved in this response, we examined the effect of PE on JNKs. PE induced phosphorylation of JNKs with maximal levels observed at 5-15 min after stimulation. The specific JNK inhibitor SP600125 reduced the PE-induced phosphorylation of JNKs whereas Ro318220, a potent inhibitor of MSK1 had no effect. We have previously shown that PE stimulates ERKs and p38 MAPK pathways in adult rat cardiomyocytes, which in turn activate MSK1. In this study we examined the role of JNKs in MSK1 activation using the JNK inhibitor SP600125. PE-induced phosphorylation of MSK1 was not inhibited by SP600125 suggesting that the activation of JNKs and MSK1 by PE are independent events. These results demonstrate that PE stimulates c-Jun expression and phosphorylation in adult rat cardiomyocytes through JNKs and MSK1 pathways.

The work was supported by Empirikion Foundation.

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΦΑΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΜΥΓΑΣ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ

Μαρμάρας Β.Ι.*

Εργαστήριο Βιολογίας - Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Τα κύτταρα δέχονται διάφορα εξωτερικά ερεθίσματα χρησιμοποιώντας ένα περιορισμένο αριθμό υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας και των σηματοδοτικών μονοπατιών, που ενεργοποιούνται από αυτούς. Η απόκριση των κυττάρων στα πολυάριθμα και διαφορετικά εξωτερικά ερεθίσματα, είναι εξειδικευμένη. Πως όμως επιτυγχάνει το κύτταρο την εξειδίκευση στα ερεθίσματα; Φαίνεται ότι η αποκωδικοποίηση των ερεθισμάτων οφείλεται στη χωροταξική και χρονική δυναμική των σηματοδοτικών μονοπατιών του κυττάρου, τα οποία αλληλοσυνδέονται και σχηματίζουν δίκτυα. Στόχος μας τα τελευταία χρόνια είναι η μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την κυτταροφαγία και την απόπτωση στα έντομα. Η κυτταροφαγία είναι ένας αμυντικός μηχανισμός και η απόπτωση είναι ένας αναπτυξιακός και αμυντικός μηχανισμός. Κι αυτό γιατί εξαλείφει κύτταρα μολυσμένα με ιούς και κύτταρα με ανεπιθύμητες μεταλλάξεις. Πρέπει να σημειωθεί, ότι τα αιμοκύτταρα έχουν πολλά κοινά γνωρίσματα με τα λευκά αιμοσφαίρια των θηλαστικών. Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δείχνουν μεγάλες ομοιότητες των σηματοδοτικών μονοπατιών, που ρυθμίζουν την κυτταροφαγία και την απόπτωση, μεταξύ των αιμοκυττάρων των εντόμων και των λευκοκυττάρων των θηλαστικών. Υπάρχουν όμως και βασικές διαφορές. Η κυτταροφαγία στα αιμοκύτταρα χρειάζεται απαραίτητα την εξειδικευμένη έκκριση τουλάχιστον ορισμένων ειδικών πρωτεασών σερίνης, που ενεργοποιούν το σύστημα της προφαινολο-ξειδάσης, με επακόλουθο το σχηματισμό μελανίνης και την απελευθέρωση από τα παράγωγα των κινονών, ενεργών ριζών, όπως O_2^- , H_2O_2 , NO , που δρουν τοξικά για τα παθογόνα.

* Προσκεκλημένος ομιλητής

**REGULATION OF PHAGOCYTOSIS AND APOPTOSIS IN
MEDFLY HEMOCYTES****Marmaras V.J.****Laboratory of Biology – Department of Biology, University of Patras*

Cells respond to external stimuli using a limited number of cell surface receptors and a number of signaling pathways that are activated, by plasma membrane receptors. The specificity of cellular responses to external stimuli is encoded by the spatial and temporal dynamics of downstream signaling networks. Our goal is to explore the signaling pathways that regulate phagocytosis and apoptosis processes in insect hemocytes. Phagocytosis is the main cell-mediated defense mechanism and apoptosis is a developmental and defense process, as it is of central importance for the elimination of unwanted cells, such as, virally infected cells or cells with potentially harmful genomic mutations. The existed data clearly show many similarities between signaling pathways regulating phagocytosis and apoptosis in insects and mammals. However, there are also distinct differences. Phagocytosis by hemocytes requires the secretion of certain serine proteases that activate the prophenoloxidase cascade. Prophenoloxidase cascade activation leads to the formation of melanin and the release of reactive oxygen and nitrogen intermediates that are toxic to pathogens.

* Invited speaker

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ELISA ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΔΙΑΚΡΙΣΗΣ ΟΡΟΤΥΠΩΝ ΤΩΝ ΙΩΝ COXSACKIE

Μαυρούλη Μ., Σπανάκης Ν., Λεγάκης Ν., Ρούτσιας Ι.

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ

Οι ιοί Cocksackie (CV) προκαλούν λοιμώξεις, που κυμαίνονται από απλή λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος έως άσηπτη μηνιγγίτιδα και μυοπερι-καρδίτιδα. Στη χώρα μας, κατά το παρελθόν, έχει αναφερθεί σποραδική συνάθροιση επεισοδίων θανατηφόρου μυοκαρδίτιδας από ιό Cocksackie. Σήμερα, η τυποποίηση των ιών γίνεται με επίπονες τεχνικές, όπως καλλιέργεια/ απομόνωση του ιού και ταυτοποίησή του με εξουδετερωτικά αντισώματα. Η τεχνική ELISA έχει εφαρμοστεί στην ορολογική διάγνωση, όμως η χρήση της περιορίζεται λόγω συχνών διασταυρούμενων αντιδράσεων με άλλους εντεροϊούς. Σκοπός της εργασίας αυτής, είναι η ανάπτυξη ανοσοδιαγνωστικής τεχνικής (ELISA) με δυνατότητα διάκρισης διαφόρων οροτύπων των ιών Cocksackie. Συλλέχθηκαν 258 οροί φυσιολογικών αιμοδοτών από όλη την Ελλάδα. Η παρουσία αντισωμάτων τάξεως IgG και IgM έναντι Cocksackie B ελέγχθηκε με ELISA με τρία διαφορετικά αντιγόνα: την πρωτεΐνη VP1 των CVB1 και CVB5, συνθετικό πεπτίδιο που αντιστοιχεί στο NH₂ άκρο της πρωτεΐνης VP1 του CV B3 (perCVB3) και συνθετικό πεπτίδιο που αντιστοιχεί στο NH₂ άκρο της πρωτεΐνης VP1 του CV B4 (perCVB4). Αντισώματα IgG έναντι των Cocksackie B1/B5, B3 και B4 ανιχνεύθηκαν στο 15, 17 και 13 %, αντίστοιχα, των ορών, ενώ αντισώματα IgM ανιχνεύθηκαν στο 5, 3 και 1 % των δειγμάτων. Παρατηρήθηκε συσχέτιση της αντι-CVB4 με την αντι-CVB1/CVB5 δραστηριότητα. Η ειδικότητα αναγνώρισης των πεπτιδίων επιβεβαιώθηκε με πειράματα αναστολής. Η προεπώαση ορών με αντι-CVB3 ή αντι-CVB4 δραστηριότητα με τα πεπτίδια perCVB3 ή perCVB4 οδήγησε σε αναστολή 78 % και 65 %, αντίστοιχα. Συμπερασματικά, η ELISA με κατάλληλα επιλεγμένα πεπτίδια της VP1 περιοχής μπορεί να αποτελέσει εναλλακτική μέθοδο για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων οροτύπων των ιών Cocksackie.

**DEVELOPMENT OF SEROTYPE-SPECIFIC METHOD (ELISA)
FOR THE DETECTION OF COXSACKIEVIRUSES****Mavrouli M., Spanakis N., Legakis N., Routsias J.***Lab of Microbiology, Dept of Medicine, University of Athens*

Coxsackieviruses (CV) cause human diseases, ranging from mild upper respiratory infections to severe conditions like aseptic meningitis and myocarditis. In our country, a sporadic cluster of cases of fatal myocarditis caused by Coxsackieviruses has been previously reported. Nowadays, virus identification is depended on laborious techniques, such as virus cultivation and identification with neutralization test. ELISA is used in serologic diagnosis but its application is limited due to the occurrence of crossreactions between antibodies recognizing Coxsackievirus and other enteroviruses. In this study, we indented to develop α serodiagnostic method (ELISA) with the ability to discriminate between different serotypes of Coxsackieviruses. Sera were obtained from 258 healthy blood donors from different Greek hospitals. The presence of IgG and IgM antibodies was tested using ELISA assays with different antigenic specificity: (i) the VP1 protein of heat-denaturated Coxsackie type B1 and B5 virions, (ii) a synthetic peptide of the NH₂-terminus of the VP1 protein of CV B3 (pepCVB3) and (iii) a synthetic peptide of the NH₂-terminus of the VP1 protein of CV B4 (pepCVB4). IgG antibodies against Coxsackie B1/B5, B3 and B4 were detected in 15%, 17% and 13 %, respectively, of sera tested, while IgM antibodies were found in 5%, 3% and 1% of the samples. A correlation between anti-CVB4 and anti-CVB1/CVB5 reactivities was demonstrated, most probably reflecting the antigenic similarity of CVB4 and CVB1. The specificity of the recognition of the peptides was confirmed with inhibition experiments. Preincubation of anti-CVB3 or anti-CVB4 positive serums with the pepCVB3 or pepCVB4 peptides led to inhibition of about 78 % and 65 %, respectively. Conclusively, ELISA assay utilizing properly selected peptides of VP1 region may be an alternative diagnostic method for the detection of antibodies with specificity against different Coxsackievirus serotypes.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΕΜΒΡΥΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μελιδώνη Α.Ν., Λαζαρίδης Ι., Λαδοπούλου Α., Κούκλης Π.

Εργαστήριο Βιολογίας και Μονάδα Βλαστικών Κυττάρων, Ιατρική σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45 110 Ιωάννινα.

Τα εμβρυοειδικά σωματίδια (embryoid bodies, EBs) αποτελούν τρισδιάστατα συσσωματώματα διαφόρων κυτταρικών τύπων, προερχόμενων και από τα τρία εμβρυικά στρώματα (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα), τα οποία προκύπτουν από την *in vitro* διαφοροποίηση των πολυδύναμων (pluripotent) εμβρυικών βλαστικών κυττάρων (embryonic stem cells, ES cells). Τα EBs χαρακτηρίζονται από μια ιεραρχία και χρονική ακολουθία στην διαφοροποίηση αντίστοιχης με αυτήν που παρατηρείται κατά την πρόωμη εμβρυογένεση *in vivo*. Κατά συνέπεια αποτελούν ένα εξαιρετικά χρήσιμο σύστημα διερεύνησης αναπτυξιακών διεργασιών στα θηλαστικά, όπως η κυτταρική διαφοροποίηση και οργανογένεση. Στην παρούσα εργασία το σύστημα των EBs χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της διαφοροποίησης του ενδοθηλιακού ιστού, ο οποίος δημιουργείται από κύτταρα του μεσοδέρματος στις αιματικές νησίδες του λεκιθικού σάκκου, κατά το φαινόμενο της *vasculogenesis*, δηλαδή της *de novo* δημιουργίας του πρόδρομου τριχοειδούς πλέγματος (primordial vascular plexus), που πραγματοποιείται την 7.5 ημέρα της εμβρυογένεσης του ποντικού. ES κύτταρα ποντικού οδηγήθηκαν προς διαφοροποίηση σε EBs παρουσία αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών (VEGF, FGF-b, Erythropoietin, Intereukin-6) που επάγουν τη δημιουργία των ιστών με μεσοδερμική προέλευση. Για την χρονική ταυτοποίηση της διαφοροποίησης σε EB μελετήθηκε η έκφραση δεικτών διαφοροποίησης που αντιστοιχούν στα τρία εμβρυικά στρώματα: Bmp2, Fgf-5, Bmp4, Brachyury, GATA-1, Runx1, Scl, beta-H1, beta globin major, Flk1, Flt1, VE-cadherin, SM22a και MyoG. Ο χωροχρονικός εντοπισμός των ενδοθηλιακών κυττάρων επιτεύχθηκε με τη δημιουργία EBs που εκφράζουν την πρωτεΐνη EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) υπό τον έλεγχο τμήματος του υποκινητή της Vascular Endothelial Cadherin (Pvc/EGFP-EBs) ειδικό για ενδοθηλιακή έκφραση. Σε συμφωνία με δημοσιευμένες μελέτες παρατηρήθηκε έναρξη έκφρασης της πρωτεΐνης EGFP στα EBs κατά την ημέρα 5 της *in vitro* διαφοροποίησης που αντιστοιχεί στην ημέρα 7.5 της εμβρυογένεσης του ποντικού. Η χρονική στιγμή έκφρασης συμπίπτει με αυτήν της VE-Cadherin (VE-C) στα EBs αγρίου τύπου. Επίσης, επιβεβαιώθηκε με whole-mount ανοσοιστοχημεία στα Pvc/EGFP-EBs, ότι η ενεργότητα του PvcC περιορίζεται στα κύτταρα που εκφράζουν VE-C. Η ανάπτυξη του προαναφερθέντος συστήματος επιτρέπει την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου πληθώρας μορίων στη διάρκεια της ενδοθηλιακής διαφοροποίησης. Πιο συγκεκριμένα, αυτό περιλαμβάνει την κλωνοποίηση μεταλλαγμένων μορφών των υπό εξέταση μορίων σε εξωχρωμοσωμικούς, επισωματικούς φορείς έκφρασης υπό τον έλεγχο του PvcC, διαμόλυνση ES κυττάρων, θετική επιλογή ES κλώνων, διαφοροποίηση αυτών μέσω EBs και φαινοτυπική ανάλυση των μεταλλαγμένων EBs με μεθόδους όπως ανοσοιστοχημεία, western blot, RT-PCR και microarray analysis. Θετικό μάρτυρα αυτών των πειραμάτων θα αποτελούν τα PvcC/EGFP-Ebs. Με βάση το σύστημα που περιγράφεται εδώ εξετάζουμε τον ρόλο μορίων που συμμετέχουν στις συνδέσεις προσδεσης (adherens junctions) και στο Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι, (VE-Cadherin και β-catenin) στην πορεία της κυτταρικής διαφοροποίησης κατά την *vasculogenesis*.

**EMBRYONIC STEM CELL DIFFERENTIATION SYSTEM TO
STUDY VASCULOGENESIS****Melidoni A.N., Lazaridis I., Ladopoulou A., Kouklis P.***Laboratory of Biology and Stem Cell Unit, School of Medicine, University of Ioannina, 45
110 Ioannina, Greece.*

Embryoid bodies (Ebs) are 3-D aggregates, comprised of various cell types, derived from all three germ layers (endoderm, mesoderm, exoderm). They form through *in vitro* differentiation of pluripotent embryonic stem cells (ES cells). Differentiation in EBs is thought to recapitulate early embryogenesis events. Therefore, EB formation is a very useful system to elucidate developmental processes in mammals, like early lineage determination and organogenesis. In this work this system was used to study the differentiation of endothelium, derived from mesodermal cells. This process takes place in the blood islands of the yolk sac during vasculogenesis at day 7.5 d.p.c. of mouse embryogenesis. Mouse ES cells differentiated towards EBs in the presence of growth factors and cytokines (VEGF, FGF-b, Erythropoietin, Interleukin-6), which induce formation of mesodermal origin cell types. The expression of the following developmental marker genes was analysed during EB differentiation: Bmp2, Fgf-5, Bmp4, Brachyury, GATA-1, Runx1, Scl, beta-H1, beta globin major, Flk1, Flt1, VE-cadherin, SM22 α και MyoG. The onset of endothelial phenotype and localization was achieved in EBs expressing EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), under the control of an endothelial-specific VE-Cadherin promoter fragment (Pvec/EGFP-EBs). The onset of EGFP expression was observed at day 5 in EBs differentiation, a time-point corresponding to day 7.5 d.p.c. of mouse embryogenesis. This timing correlates to VE-Cadherin's (VE-C) expression in wild-type EBs in accordance to previous studies. Furthermore, whole-mount immunocytochemistry showed that Pvec activity is specific to VE-Cadherin-expressing cells. The system described here is suitable for elucidation of the functional role of a plethora of molecules during endothelial differentiation. Specifically, this can be achieved by cloning mutants of interest in episomal vectors under the control of Pvec followed by transfection and positive selection of ES cells. Stably transfected ES cells can then differentiate and mutant EBs can be analyzed by immunocytochemistry, western blot, RT-PCR and microarray analysis. The Pvec/EGFP-EBs serves as positive control for these experiments. Based on this system, we study the potential regulatory role of VE-Cadherin and β -catenin, molecules involved in endothelial adherens junctions and Wnt signalling in vasculogenesis.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΕΡΥΘΡΑ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΑ IN VITRO

Μεσσήνη Ν.¹, Δούλαλα Χ.¹, Νικολάκη Μ.²

¹Τμήμα Βιολογίας Ε.Κ.Π.Α. ²Τμήμα Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση ηλεκτρομαγνητικού πεδίου έντασης 125 Gauss, φάσματος συχνοτήτων 0.3-250 MHz, παλμικής εκπομπής 50 msec σε ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά την διάρκεια αποθήκευσης σε ασκούς αιμοδοσίας. Χρησιμοποιήθηκε αίμα υγιούς δότη με CPD. Τα ερυθρά, μετά από συμπύκνωσή τους, ισοδιανεμήθηκαν σε δύο ασκούς και φυλάσσονταν στους 4°C. Ο ένας χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, ενώ ο δεύτερος υποβάλλονταν στην επίδραση του πεδίου επί 10 λεπτά ανά τακτά χρονικά διαστήματα καθ'όλη τη διάρκεια της μεταγγίσιμης περιόδου (28 ημέρες) και για επιπλέον 78 ημέρες. Η δειγματοληψία γινόταν δύο φορές την εβδομάδα. Με την κυτταρομετρία ροής δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην βιωσιμότητα των ερυθρών στους δύο ασκούς. Επίσης, με τη χρήση ιοντοανταλλακτικών ηλεκτροδίων διαπιστώθηκε ότι η πορεία μεταβολής της εξωκυττάριας συγκέντρωσης Na^+ - K^+ συναρτήσει του χρόνου ήταν η ίδια και για τους δύο ασκούς. Μετά από μικροσκοπική εξέταση των ερυθροκυττάρων παρατηρήθηκε επίδραση του πεδίου επί των μορφολογικών αλλαγών των αποθηκευμένων ερυθρών σε σχέση με το χρόνο. Στα ερυθρά του μάρτυρα επιβεβαιώθηκαν οι μορφές που αναφέρονται στην βιβλιογραφία, δηλαδή δισκοειδή ερυθροκύτταρα, σφαιροκύτταρα, ακανθοκύτταρα, ενώ στα ερυθρά του ακτινοβοληθέντος ασκού τα μορφολογικά στάδια ήταν τα ακόλουθα: δισκοειδή ερυθροκύτταρα, ελλειψοειδή, ατρακτοειδή, ακανθοκύτταρα. Η δημιουργία σφαιρικού σχήματος στα αποθηκευμένα ερυθρά έχει σχετιστεί με οξειδωτικές βλάβες της σπεκτρίνης του υπομεμβρανικού σκελετού. Η απουσία σφαιροκυττάρων από τον ακτινοβοληθέντα ασκό και η παρουσία ελλειψοειδών και ατρακτοειδών μορφών ίσως οφείλεται σε μία πιθανή ιδιότητα του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου να τροποποιεί τις οξειδωτικές βλάβες της σπεκτρίνης, με αποτέλεσμα την μετατροπή του υπομεμβρανικού σκελετού.

*Ευχαριστούμε τον Καθηγητή Π. Παππά για την παραχώρηση της συσκευής.
Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από τον Ε.Λ.Κ.Ε. του Πανεπιστημίου Αθηνών.*

INFLUENCE OF ELECTROMAGNETIC FIELD ON HUMAN RED BLOOD CELLS IN VITRO**Messini N.¹, Doulala H.¹, Nikolaki M.²***¹Faculty of Biology, University of Athens, ²Faculty of Chemical Engineering, N.T.U.A.*

In the present study was examined the influence of an electromagnetic field in the frequency range 0.3-250 MHz, with an intensity of 125 Gauss, on human red blood cells (RBC) during their storage in blood bank bags. Blood of a healthy donor with CPD was used. RBCs were condensed, equally divided into two blood bags and stored at 4°C. The first bag was used as a control, while the second was exposed to the electromagnetic field for 10 minutes in regular time periods during the expected transfusion period (28 days) and for 78 more days. Samples were taken twice a week. Flow cytometry demonstrated no differences in RBCs viability between the two bags. Also, with the use of ion-exchange electrodes it was observed that the behavior of the extracellular Na⁺-K⁺ concentrations versus time was the same for both bags. Microscopic examination of the RBCs showed an effect of the field on the morphological changes of the stored RBCs with storage time. For the control RBCs were confirmed the forms listed in the bibliography, that is disc shape red blood cells, spherocytes, echinocytes, while the RBCs of the exposed blood bank bag underwent the following morphological stages: disc shape red blood cells, ovalocytes, fusocytes, echinocytes. The appearance of spherocytes during storage of RBCs has been correlated to the oxidant damage of spectrin, a submembrane framework protein. The absence of spherocytes from the exposed tissue may be due to a possible property of electromagnetic fields to modify spectrine's oxidant damage, having as a result a change in the submembrane framework.

The present study was supported by the Special Account for Research Grants of Athens University.

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ ΕΥΡΥΤΑΤΟΥ
ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΛΑΣΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ
ΠΟΝΤΙΚΩΝ**

**Μεσσήνη Ν.¹, Νεοφύτου Ν.¹, Τσιώλη Π.¹, Νικολάκη Μ.², Μαλούχου-
Γκρίμπα Β.¹**

¹Τμήμα Βιολογίας Ε.Κ.Π.Α, ²Τμήμα Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση ηλεκτρομαγνητικού πεδίου ευρυτάτου φάσματος συγκεκριμένης διαμόρφωσης διπλής αντίθετα πολωμένης εκπομπής στην ανάπλαση επιδερμικού ιστού ποντικών. Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί ποντικοί του είδους Swiss alpine swg ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Αφαιρέθηκε τμήμα δέρματος από την πλάτη εμβαδού 4 cm² και στην περιοχή της κοιλιάς προκλήθηκε ουλή μήκους 2cm. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτέλεσε τους μάρτυρες (C), ενώ η δεύτερη υποβαλλόταν σε συνεχή έκθεση στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο (P). Η έκθεση στο πεδίο άρχισε αμέσως μετά την πρόκληση βλάβης. Στα μέλη των δύο ομάδων δεν χορηγήθηκε καμιά φαρμακευτική αγωγή. Ανά τρεις ημέρες λαμβανόταν δείγμα από τον αναγεννώμενο ιστό μελών και των δύο ομάδων. Συνολικά έγιναν πέντε δειγματοληψίες. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για ιστολογική επεξεργασία και παρατήρηση στο Φωτονικό Μικροσκόπιο. Στους ιστούς που πάρθηκαν από ακτινοβολημένα πειραματόζωα παρατηρούνται έντονες μιτωτικές διαιρέσεις από την πρώτη μέρα της έκθεσης στο πεδίο και έντονη αύξηση της βλαστικής στιβάδας. Η επούλωση του τραύματος και η ανάπλαση του δέρματος έγινε με σαφέστατα ταχύτερους ρυθμούς στα ποντίκια που εκτέθηκαν στο πεδίο. Συγκεκριμένα, η εικόνα που παρουσιάζει ιστός από την πλάτη από ακτινοβολημένο ποντίκι κατά την 6^η ημέρα είναι όμοια με την εικόνα που παρουσιάζει ιστός από μάρτυρα κατά την 12^η ημέρα του πειράματος. Στην 12^η ημέρα στο ποντίκι που εκτέθηκε στο πεδίο παρατηρούμε φύτρες τριχών να κάνουν την εμφάνιση τους, ενώ στον μάρτυρα όχι. Η ουλή στην κοιλιά ενός μάρτυρα κατά την 6^η ημέρα παρουσιάζει την ίδια εικόνα από ιστολογικό δείγμα ενός ακτινοβολημένου κατά την 3^η όμως ημέρα.

**INFLUENCE OF A BROAD BAND ELECTROMAGNETIC FIELD
ON MOUSE SKIN REPAIR****Messini N.¹, Neofytou N.¹, Tsioli P.¹, Nikolaki M.², Malouchou-Grimba B.¹***¹Faculty of Biology, University of Athens, ²Faculty of Chemical Engineering N.T.U.A.*

In the present study was examined the influence of a broad-band electromagnetic field with a specific modulation of a double opposite polarized emission on rat skin repair. Male mice of the species Swiss albino swr four weeks old were used. There was removed a segment of skin sized 4cm² from the back and a 2 cm long scar was inflicted on the abdominal area. The mice were separated into two groups. The first group (C) was used as control, while the second group (P) was continually exposed to the influence of the electromagnetic field. The exposure to the field started immediately after the damage was inflicted. The mice did not receive any pharmaceutical treatment. Every three days samples were taken from the regenerative skin of both groups. These samples were used for histological preparation and observation in the photonic microscope. Five samplings were conducted. In the tissue taken from exposed mice were observed intense mitotic divisions from the very first day of the exposure to the electromagnetic field and an intense increase of the germinative layer. It was established that for the individuals that were exposed to the influence of the field the wound healed faster than the control. Specifically, the image of the tissue from the back of exposed individuals on the 6th day resembled the image of the skin from witnesses on the 12th day. On the 12th day the wound exposed to the field showed evidence of hair growth, while the witness did not. The image of the mouse skin from the abdominal area exposed to the field on the 3rd day resembled the image of the skin from witnesses on the 6th day.

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ ΣΤΗΝ
*D. Melanogaster***

Μεσσήνη Ν.¹, Κωστή Α.², Φιλίππετης Α.²

¹Τμήμα Βιολογίας Ε.Κ.Π.Α., ²Τμήμα Φυσικής Ε.Κ.Π.Α.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση ηλεκτρομαγνητικού πεδίου στην διάρκεια ζωής της *D. Melanogaster*, στον συνολικό αριθμό απογόνων της πατρικής γενεάς (P), καθώς και η αναπαραγωγική ικανότητα τεσσάρων διαδοχικών γενεών. Για τον σκοπό αυτό σε κάθε δοχείο καλλιέργειας τοποθετήθηκαν 10 ζεύγη νεοεκκολαφθέντων εντόμων (0-2 ωρών). Οι μισές καλλιέργειες T υποβάλλονταν καθημερινά επί 10 λεπτά σε επίδραση πεδίου έντασης 125 Gauss, φάσματος συχνοτήτων 0.3-250 MHz, παλμικής εκπομπής 50 μsec . Οι άλλες μισές (C) χρησίμευαν ως μάρτυρες. Κάθε μία έως δύο ημέρες τα έντομα των καλλιέργειών T και C μεταφέρονταν σε νέα δοχεία. Η διαδικασία μεταφοράς των εντόμων της P γενεάς διαρκούσε μέχρι το θάνατο των εντόμων. Με νεοεκκολαφθέντα έντομα κατά την 9^η-11^η ημέρα της F1 γενεάς T και C ετοιμάζονταν νέες καλλιέργειες και ακολουθούσε η ίδια πορεία όπως και στην P γενεά με την διαφορά ότι η όλη διαδικασία διαρκούσε 12 ημέρες. Με τον ίδιο τρόπο ετοιμάσθηκαν 4 διαδοχικές γενεές. Σε όλες τις περιπτώσεις μετά την μεταφορά των εντόμων σε νέα δοχεία τα παλαιά δοχεία διατηρούνταν στον θάλαμο καλλιέργειών μέχρι την εκκόλαψη όλων των εντόμων από τα αυγά που είχαν γεννηθεί σε αυτά. Όλα τα εκκολαπτόμενα έντομα παρατηρούνταν στο μικροσκόπιο και γινόταν καταμέτρηση τόσο του συνολικού αριθμού τους όσο και χωριστά αρσενικών και θηλυκών. Από την στατιστική ανάλυση που έγινε στα αριθμητικά δεδομένα δεν παρατηρήθηκε καμμία στατιστικά σημαντική διαφορά στον συνολικό αριθμό και στην διανομή των φύλων μεταξύ απογόνων T και C. Επίσης η διάρκεια ζωής της P γενεάς δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά παρ'όλο που σε όλα τα πειράματα εμφανιζόταν μια ελαφρά τάση αύξησης του χρόνου ζωής στα έντομα που εξετίθονταν στο πεδίο. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν μικροσκοπικές διαφορές στην εμφάνιση των εντόμων ούτε στο ποσοστό θνησιμότητάς τους.

Ευχαριστούμε τον Καθηγητή Π. Παππά για την παραχώρηση της συσκευής.

**INFLUENCE OF ELECTROMAGNETIC FIELD ON
*D. Melanogaster*****Messini N.¹, Kosti A.², Philippetis A.²***¹Faculty of Biology, University of Athens, ²Faculty of Physics, University of Athens*

In the present study was examined the influence of an electromagnetic field on the lifetime of *D. Melanogaster*, on the total number of descendants of the parental generation (P), as well as on the reproductive ability of four consecutive generations. For this purpose there were placed 10 couples of newly-hatched insects (0-2 hours) in every culture vial. Half of the cultures (T) were exposed daily for 10 min to an electromagnetic field with an intensity of 125 Gauss, in the frequency range 0.3-250 MHz. The other half (C) served as control. Every one to two days the insects of the T and C cultures were moved to new vials. The procedure of moving the insects of the P generation lasted until the insects' death. With newly-hatched insects during the 9th-11th day of the F1 generation of T and C new cultures were prepared and the same procedure as for the P generation was followed the only difference lying in the fact that the whole procedure lasted 12 days. In exactly the same way four consecutive generations were prepared. In all cases after the insects' transport to new vials, the old vials were preserved in the culture room until all eggs hatched. All the hatched insects were observed in the microscope and their total number was counted, as well as the population numbers of males and females separately. After statistically processing all the numerical data no statistically significant difference was noted neither in the total number nor in the sexual distribution between T and C descendants. Also, no microscopical differences were observed in the appearance of the insects or in their mortality percentage.

We would like to thank Professor Pappas for the gratuitous supply of the magnetic field device.

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΛΗΡΟΥΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΩΝ F ΚΑΙ M ΤΟΥ *Mytilus galloprovincialis*: ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ ΜΟΝΟΓΟΝΕΪΚΗΣ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑΣ (ΔΜΚ)

Μίτζη Α.¹, Ζούρος Ε.² και Γ.Κ. Ροδάκης¹

¹Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, 15701 Αθήνα

²Τμήμα Βιολογίας, ΠΚ, 71409 Ηράκλειο, Κρήτη

Ο προσδιορισμός και η ανάλυση της πλήρους αλληλουχίας του μητρικά (τύπος F) και του πατρικά (τύπος M) κληρονομούμενου μιτοχονδριακού γονιδιώματος του *Mytilus galloprovincialis*, έδειξε ότι αν και διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, έχουν ίδια γονιδιακή οργάνωση, νουκλεοτιδική σύσταση και προτίμηση χρήσης κωδικών. Εντοπίστηκαν τα ιδιαίτερα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά κάθε τύπου, ανάμεσά τους και μια παρεμβολή στο μόριο τύπου M, που αποδίδεται σε πολλαπλά γενετικά γεγονότα. Η διατήρηση του μήκους και της οργάνωσης του γονιδιώματος, παρά τα συχνά γεγονότα ανακατατάξεων, είναι πιθανότατα αποτέλεσμα επιλεκτικής πίεσης. Εντοπίστηκαν τα πιθανά σημεία έναρξης της αντιγραφής της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας και, υπό την παραδοχή του ασύμμετρου τρόπου αντιγραφής του mtDNA, διερευνήθηκε η συσχέτιση του νουκλεοτιδικού περιεχομένου σε διακριτές λειτουργικές περιοχές, με το χρόνο παραμονής της βαριάς αλυσίδας σε μονόκλωνη κατάσταση κατά το διπλασιασμό. Τρεις τύποι νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του νουκλεοτιδικού περιεχομένου των μορίων. Από τη συγκριτική ανάλυση των γονιδιωμάτων του *Mytilus* με τα αντίστοιχα άλλων οργανισμών που παρουσιάζουν το φαινόμενο της ΔΜΚ, προέκυψαν συμπεράσματα σχετικά με την εμφάνιση του ιδιόμορφου αυτού χαρακτήρα. Συζητείται η ομαδοποίηση των διακριτών τύπων ανάλογα με τον οργανισμό ή τον τρόπο μεταβίβασης, η παρουσία ειδικών αλληλουχιών με καθοριστικό ρόλο στον τρόπο μεταβίβασης του mtDNA, η υπόθεση του αυξημένου ρυθμού μεταλλακτικότητας του τύπου M, καθώς και η σημασία του φαινομένου της «αντιστροφής ρόλων» στη διαφοροποίηση των δύο τύπων.

Η έρευνα αυτή χρηματοδοτείται από τη Γ.Γ.Ε.Τ (ΠΕΝΕΔ 01ΕΔ42)

**THE COMPLETE MATERNAL AND PATERNAL
MITOCHONDRIAL GENOMES OF *Mytilus galloprovincialis*:
IMPLICATIONS FOR THE DOUBLY UNIPARENTAL
INHERITANCE MODE (DUI) OF mtDNA**

Mizi A.¹, Zouros E.², and G.C. Rodakis¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Athens, 15701 Athens, ²Department of Biology, University of Crete, 71409, Heraklion, Crete

The complete sequencing of the maternal (F type) and paternal (M type) mitochondrial genomes of *Mytilus galloprovincialis* showed that they retained identical gene content and gene arrangement and similar nucleotide composition and codon usage bias, even though they have diverged by about 20% in nucleotide sequence. Here we present the structural and functional features of the various domains of the genomes. We trace the molecular mechanism that might have produced an insertion in the examined M and conclude that selection acts to conserve the standard gene order and size in spite of frequent events of insertions and rearrangements. The detection of the putative origins of replication of the mtDNA heavy and light strand allowed the examination of possible correlations between nucleotide content and relative time of exposure to single-strand state of the heavy strand during replication, under the assumption of the asymmetrical replication model. Three types of non-enzymatic damage of single-stranded DNA have been recognized as possible causes of strand asymmetry and intra-strand variation in nucleotide content. Several features of DUI emerged from the comparison of F and M genomes from different bivalves. We obtained the phylogenetic clustering of molecules according to species origin rather than to their mode of transmission. We discuss the possible presence of “transmission-specific” sequences in the two types, the hypothesis that the M genome evolves faster than the F, and the implication of the phenomenon of “role-reversal” in the differentiation of mitochondrial genomes in species with DUI.

This research is funded by G.S.R.T. (PENED 01ED42)

ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗ ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΕ ΕΛΛΗΝΕΣ ΥΠΕΡΗΛΙΚΕΣ

Μιχαήλ-Κλεφτούρη Κ.¹, Οικονομίδης Δ.², Βασάρα Ε.³,
Αποστολίδου Κ.¹, Δερμιτζάκη Χ.¹

¹Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας, Αλεξάνδρειο ΤΕΙ Θεσσαλονίκης, ²Τμήμα Ιατρικής,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ³Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Η σωματική σύσταση και ο Δείκτης Σωματικής Μάζας (ΔΣΜ-βάρος/ύψος²) χρησιμοποιούνται ως δείκτες του επιπέδου θρέψης και γενικότερα του επιπέδου υγείας σε όλες τις ηλικίες. Οι μεταβολές στη σωματική σύσταση με την ηλικία και η σημασία τους για την υγεία δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς, ιδιαίτερα στον ελληνικό πληθυσμό, όπου τα στοιχεία που υπάρχουν αφορούν κυρίως το ΔΣΜ. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να περιγράψει τη σωματική σύσταση και τη σχέση της με το ΔΣΜ σε Έλληνες υπερήλικες. Στη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε με cross-sectional σχεδιασμό, συμπεριλήφθηκαν 31 άντρες και 196 γυναίκες ηλικίας άνω των 60 ετών που επισκέφθηκαν τα εξωτερικά ιατρεία του Γηριατρικού Τμήματος της Β' Παθολογικής Κλινικής του Ιπποκρατείου Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης κατά την περίοδο 2004-2005. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνουν ανθρωπομετρικές μετρήσεις βάρους, ύψους, πάχους δερματοπτυχής σε διάφορες περιοχές του σώματος, περιμέτρου κνήμης, μέσης και ισχίου καθώς και υπολογισμούς δεικτών θρέψης όπως ΔΣΜ, δείκτες υποδόριου σωματικού λίπους, δείκτες μυϊκής μάζας και δείκτη κοιλιακού λίπους. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι μεταβολές στη σωματική σύσταση ήταν διαφορετικές στα δυο φύλα. Ο ΔΣΜ στις ηλικίες 60-69 έτη, και στα δυο φύλα, είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με όλους τους δείκτες λιπώδους και μυϊκής μάζας, συμπεριλαμβανομένου και του κοιλιακού λίπους, αλλά, σε πιο προχωρημένες ηλικίες, η συσχέτιση με το κοιλιακό λίπος δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Στους άντρες άνω των 80 ετών δεν υπήρχε σημαντική συσχέτιση ούτε με τους δείκτες μυϊκής μάζας. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο ΔΣΜ, που χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης υγείας και μακροβιότητας, μπορεί να έχει διαφορετική σημασία στα δυο φύλα, όπως επίσης και σε διαφορετικές ηλικίες: μετά την ηλικία των 70 ετών δεν φαίνεται να σχετίζεται με το κοιλιακό λίπος ούτε σε άντρες ούτε σε γυναίκες, ενώ μετά την ηλικία των 80 ετών στους άντρες φαίνεται να μην σχετίζεται ούτε με την μυϊκή μάζα. Σε προχωρημένες ηλικίες, μπορεί να μην έχει την ίδια σχέση με την υγεία που έχει σε νεότερα άτομα.

Η εργασία έγινε στα πλαίσια του ΕΠΕΑΕΚ II, 2.2.6 Αρχιμήδης I

CHANGES IN BODY COMPOSITION IN GREEK ELDERLY**Michael-Kleftouri K.¹, Economides D.², Vasara E.³, Apostolidou K.¹,
Dermitzaki Ch.¹**

¹*Department of Nutrition and Dietetics, Alexandrion TEI of Thessaloniki, ²School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, ³Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki*

Body composition and Body Mass Index (BMI; weight/height²) are used as indicators of nutritional status and health status in general, in all ages. Changes in body composition with age and their significance for health have not been studied extensively, especially in Greek populations, where the only data available refer to BMI. The aim of the present study is to describe body composition and its relation to BMI in a Greek elderly population. The sample of the cross-sectional designed study included 31 men and 196 women, aged above 60 years, recruited from the outpatients' clinic of the Geriatric Department of Ippokration Hospital of Thessaloniki during the time period 2004-2005. The methods used included anthropometric measurements of weight, height, thickness of skinfolds, calf, waist and hip circumferences, and calculations of indices of nutritional status such as BMI, subcutaneous fat indices, abdominal fat index and muscle mass indices. According to the results of the study, the changes in body composition are different in the two genders. BMI was correlated with all indices of muscle and fat mass, including abdominal fat, in ages 60-69 years, in both genders, but in more advanced ages the correlation with abdominal fat was not significant. In males above 80 years there was not a statistically significant correlation of BMI with the indices of muscle mass studied. Thus, BMI which often is used as an indicator of health and longevity might have a different meaning in the two genders and in different ages. It might not be related with abdominal fat in any of the two genders after 70 years of age, and also it might not be related with muscle mass in males above 80 years of age. Therefore, in advanced ages it might not have the same relation with health that it has in younger ages.

The study was supported by EPEAEK II, 2.2.6 ARCHIMIDES I

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΗ-
ΜΕΤΡΗΣΙΜΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΠΕΝΤΕ
ΝΕΚΡΟΤΑΦΕΙΑ ΤΗΣ ΑΡΧΑΙΑΣ ΚΟΡΙΝΘΟΥ**

**Μιχαλίτση Ε., Καπουράλου Δ., Μαλούχου-Γκρίμπα Β.
και Σ.Κ. Μανώλης**

*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 157 81 Αθήνα*

Η ποικιλομορφία των κρανιακών επιγενετικών χαρακτηριστικών, μετρικών και μη-μετρήσιμων, χρησιμοποιείται στις ανθρωπολογικές μελέτες για τη σύγκριση μεταξύ πληθυσμών. Στην παρούσα εργασία αναλύθηκε η κρανιακή ποικιλομορφία διαφόρων αρχαίων Ελληνικών πληθυσμών, χρησιμοποιώντας είκοσι επιγενετικά μη μετρήσιμα χαρακτηριστικά. Τα επιγενετικά χαρακτηριστικά που καταγράφηκαν είναι: βρεγματικό οστό, στεφανιαίο οστάριο, οστάριο στο λάμδα, λαμβδοειδή οστάρια, οστάριο στο αστέριο, ινιακό-μαστοειδές οστάριο, βρεγματικό οδοντωτό οστό, επιπερικό οστό, βρεγματικό τρήμα, μετωπισμός, υποκογχικά τρήματα, ζυγωματικό-προσωπικό τρήμα, υπερόφρυα εγκοπή, υπερόφρυο τρήμα, μαστοειδές τρήμα, εξόστωση ακουστικού πόρου, μυλουοειδής γέφυρα, γενειακό τρήμα, κονδυλικός πόρος, *inca bone*. Η καταγραφή αφορά στην αμφίπλευρη παρουσία ή απουσία του χαρακτηριστικού (με εξαίρεση τον μετωπισμό, τα οστάρια της βρεγματικής ραφής και το οστάριο στο λάμδα). Παράλληλα έγινε συσχέτιση της έκφρασης των χαρακτηριστικών μεταξύ των δύο φύλων. Τα πληθυσμιακά δείγματα προέρχονται από πέντε αρχαιολογικές θέσεις του νομού Κορινθίας (Ιδιοκτησία Ράτα, Ιδιοκτησία Σούκουλη, Ιδιοκτησία Δελή, Κρητικά, Αλμυρή) που χρονολογούνται σε διαφορετικές ιστορικές περιόδους. Συγκρίθηκαν και αξιολογήθηκαν οι κατανομές των χαρακτηριστικών αυτών για κάθε πληθυσμό. Επειδή τα μη μετρήσιμα χαρακτηριστικά έχουν ισχυρή γενετική συνιστώσα, η παρατηρούμενη ποικιλομορφία θα μπορούσε να εξηγηθεί ως αποτέλεσμα γενετικής παρέκκλισης αλλά και ροής γενετικού υλικού στον χώρο και τον χρόνο.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το Πρόγραμμα «Καποδίστριας» του Ειδικού Λογαριασμού Κονδυλίων Έρευνας (Επιτροπή Ερευνών, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών)

**COMPARATIVE ANALYSIS OF NON-METRIC TRAITS FROM
FIVE BURIAL SITES OF ANCIENT CORINTH****Michalitsi E., Kapouralou D., Malouchou-Grimba V., and S.K. Manolis***Department of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, National & Kapodistrian
University of Athens, Panepistimiopolis 157 84 Athens, Greece*

In this study, twenty non-metric traits were recorded in order to analyze the biodiversity of several Greek populations. These traits are the following: bregmatic bone, coronal ossicle, apical bone, lambdoid ossicles, asterionic bone, ossicle in occipito–mastoid suture, parietal notch bone, epipteric bone, parietal foramen, metopic suture, multiple infraorbital foramina, zygomatico-facial foramen, supraorbital notch, supraorbital foramen, mastoid foramen sutural, auditory exostosis, mylohyoid bridge, mental foramen, condylar canal, inca bone. The bilateral presence or absence of the traits was documented with the exception of metopic suture, bregmatic bone and apical bone. Further more, we analyzed the correlation of these traits between sexes. The five burial sites are located in a region near Corinth (Rota, Soukouli, Deli, Almyri, and Kritika) and represent different chronological periods. The distributions of these traits were compared and evaluated for each population. Because non-metric traits have powerful genetic component, the observed diversity could be explained as result of genetic drift but also of genetic flow, spatially and temporally.

*This work is funded by the Programme “Kapodistrias” of the Special Research Account
(National & Kapodistrian University of Athens)*

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ
ΠΕΤΑΛΟΥΔΑΣ *Carassius gibelio* (BLOCH, 1782) (CYPRINIDAE) ΤΗΣ
ΛΙΜΝΗΣ ΠΑΜΒΩΤΙΔΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA**

**Μουτσάκη Π.¹, Τριανταφυλλίδης Α.², Λιάσκο Ρ.¹, Παπαλουκάς Κ.¹,
Κάγκαλου Ι.¹, Αμπατζόπουλος Θ.², Λεονάρδος Ι.¹**

¹ Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Παν/μιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα

² Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Παν/μιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη

Η εισαγωγή του αλλόχθονου είδους *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) στα ευρωπαϊκά λιμναία οικοσυστήματα, συμπεριλαμβανομένων και των ελληνικών, οδήγησε στη διατάραξη της οικολογικής ισορροπίας των εν λόγω συστημάτων. Αυτό οφείλεται τόσο στην αναπαραγωγική συμπεριφορά του είδους, όσο και στην εξαιρετική αντοχή του σε αντίξοες περιβαλλοντικά συνθήκες. Το είδος αυτό είναι πιθανότατα ασιατικής προέλευσης και περιλαμβάνεται μεταξύ των λίγων που παρουσιάζουν γυνογενετική αναπαραγωγική συμπεριφορά, χρησιμοποιεί δηλαδή για την γονιμοποίησή του το σπέρμα άλλων ειδών. Με βάση γενετικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν σε ασιατικούς και βορειοευρωπαϊκούς πληθυσμούς πεταλούδας, φαίνεται ότι τα άτομα του είδους μπορούν να διακριθούν σε κλώνους. Δεν υπάρχει αντίστοιχη πληροφορία όσον αφορά τους πληθυσμούς της νοτίου Ευρώπης. Στην παρούσα μελέτη διερευνάται η γενετική σύσταση του πληθυσμού *Carassius gibelio* της λίμνης Παμβώτιδας εστιάζοντας στην πιθανότητα παρουσίας διακριτών κλώνων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανάλυσης μικροδορυφορικού DNA και μελετήθηκαν τρεις γονιδιακοί τόποι. Η γενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 100 άτομα και τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός πεταλούδας της λίμνης αποτελείται από τρεις κλωνικές γενεές. Οι γενετικοί δείκτες που προέκυψαν θα χρησιμοποιηθούν στην περαιτέρω μελέτη της γενετικής σύστασης πληθυσμών πεταλούδας σε άλλες λίμνες της Ελλάδας.

**STUDY OF THE GENETIC COMPOSITION OF THE PRUSSIAN
CARP *Carassius gibelio* (BLOCH, 1782) (CYPRINIDAE) POPU-
LATION IN LAKE PAMVOTIS USING MICROSATELLITE DNA**

**Moutsaki P.¹, Triantafyllidis A.², Liasko R.¹, Papaloukas K.¹,
Kagalou I.¹, Abatzopoulos Th.², Leonardos I.¹**

¹*Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina, Ioannina*

²*Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Aristotle
University of Thessaloniki, Thessaloniki*

The introduction of the alien species *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) in European lakes, including Greece, has caused ecological disturbance. This is due to the reproductive behavior of the species and to its extensive tolerance to environmentally adverse conditions. The species is most likely of Asian origin and is included amongst the few that exhibit gynogenetic reproductive behavior; which means that it uses sperm from other species to fertilise its eggs. Based on genetic analysis conducted on Asian and northern European Prussian carp populations, it appears that the individuals of this species can be assigned to different clones. Information concerning Southern European populations does not exist. In the present study, we explore the genetic composition of the *Carassius gibelio* population in Lake Pamvotis. For this purpose, three microsatellite DNA loci were studied. Genetic analysis was carried out in 100 individuals and the results suggest that the Prussian carp population of the lake consists of three clonal lineages. The genetic markers developed will be further used in the study of the genetic composition of the Prussian carp populations in other Greek lakes.

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ ΣΤΑ
ΤΡΟΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ
Bombyx mori (Lepidoptera: *Bombycidae*).**

**Μπάκου Β.Ε., Νέξης Ι.Π., Στραβοπόδης Δ.Ι., Μαργαρίτης Λ.Χ.
και Ι.Σ. Παπασιδέρη**

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Πανεπιστημιούπολις,
Ζωγράφου 15784, Αθήνα.*

Στην παρούσα μελέτη περιγράφουμε τα χαρακτηριστικά του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των τροφοκυττάρων στα ωοθυλάκια του μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* κατά τη διάρκεια της βιτελλογένεσης. Στο αναπτυξιακό στάδιο 5, τα τροφοκύτταρα καταλαμβάνουν το μισό όγκο του ωοθυλακίου και οι πυρήνες τους παρουσιάζουν εντυπωσιακά μεγάλους λοβούς. Στο αναπτυξιακό στάδιο 6, ο όγκος των τροφοκυττάρων μειώνεται και το σχήμα τους γίνεται ελλειπτικό. Οι πυρήνες τους παραμένουν λοβωτοί, με τους εκτεταμένους λοβούς να συγκρατούν τον πυρήνα στο κέντρο του τροφοκυττάρου κατά τη διάρκεια της απόθεσης του τροφοκυτταρικού κυτταροπλάσματος στο αναπτυσσόμενο ωοκύτταρο. Στο αναπτυξιακό στάδιο 7, στο κυτταρόπλασμα των τροφοκυττάρων εμφανίζονται αυτοφαγικά κυστίδια, όπως αποδεικνύεται μετά από χρώση με MDC (monodansylcadaverine), καθώς και μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης. Η ενεργοποίηση των κασπασών είναι εμφανής στο κυτταρόπλασμα των τροφοκυττάρων σε ωοθυλάκια σταδίου 7, όπως αποδεικνύεται μετά από επώαση με το ειδικό υπόστρωμα Red-VAD-FMK. Στα στάδια 8 και 9 οι πυρήνες των τροφοκυττάρων περιέχουν συμπυκνωμένη χρωματίνη και θρυμματισμένο DNA, ενώ στο στάδιο 10 τα υπολείμματα των τροφοκυττάρων απομακρύνονται μέσω φαγοκύτωσης από τα γειτονικά θυλακοκύτταρα. Συμπερασματικά, προτείνουμε ότι κατά τη διάρκεια της βιτελλογένεσης στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*, η απόπτωση και ο αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος δρουν συνεργατικά με σκοπό την πιο γρήγορη και αποτελεσματική απορρόφηση και εκκαθάριση των εκφυλισμένων τροφοκυττάρων.

Η παρούσα μελέτη χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

PROGRAMMED CELL DEATH OF THE OVARIAN NURSE CELLS DURING OOGENESIS IN *Bombyx mori* (Lepidoptera: *Bombycidae*).**Bakou V.E, Nezis I.P., Stravopodis D.J., Margaritis L.H.,
and I.S. Papassideri***Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis, Athens, Greece.*

In the present study, we thoroughly describe the features of programmed cell death of the ovarian nurse cells occurring during vitellogenesis of the silkworm *Bombyx mori*. At developmental stage 5, the nurse cells occupy one half of the follicular volume and obtain a rather spherical shape, while the nurse cell nuclei appear large, elongated, forming impressive projections. At the following stage 6, the nurse cells decrease in size and their shape becomes elliptic. The nuclei remain elongated, being also characterized by large lobes. The lobes of the ramified nurse cell nuclei seem to retain the nucleus in the center of the cell during the dumping of the nurse cell cytoplasm into the growing oocyte. At stage 7, membrane enclosed large vacuoles can be easily detected into the nurse cell cluster cytoplasm. Ultrastructural analysis of these vacuoles combined with the mono-dansyl-cadaverine staining approach reveal that they virtually represent autophagic vacuoles. Caspase activity is unambiguously detected during stage 7, as it is demonstrated by using the Red-VAD-FMK staining reagent. At developmental stages 8 and 9, the nurse cells exhibit chromatin condensation, DNA fragmentation and caspase activity. Finally, during the following stage 10, the nuclear remnants are assembled into apoptotic vesicles, which, after being phagocytosed, are observed in the cytoplasm of adjacent follicle cells. We propose that apoptosis and autophagy operate synergistically during vitellogenesis of *B. mori*, in order to achieve an efficient and rapid clearance of the degenerated nurse cell cluster.

This research was supported by the Hellenic State Scholarship Foundation "IKY".

ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ: ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Μπαρμπούτη Α., Αμοργιαννιώτης Χρ. και Δ. Γαλάρης

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά αποπτωτικά ερεθίσματα. Παρόλα αυτά, σε μελέτες του εργαστηρίου μας παρατηρήθηκε ότι το H_2O_2 , μπορεί να αναστείλει αποπτωτικά μονοπάτια όταν παράγεται συνεχώς στην καλλιέργεια. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να διευκρινιστούν οι μηχανισμοί της ανασταλτικής δράσης και της πρόκλησης κυτταρικού θανάτου από τη συνεχή δράση του H_2O_2 . Μετά από προσεκτική ανάλυση, παρατηρήθηκε ότι το H_2O_2 δρα στα μιτοχόνδρια προκαλώντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα. Έχει αναφερθεί, ότι το γεγονός αυτό προκαλεί τον ολιγομερισμό του παράγοντα Araf-1, τη στρατολόγηση της προκασπάσης-9 και την αυτοενεργοποίησή της. Στην περίπτωση της συνεχούς παρουσίας του H_2O_2 , λαμβάνουν χώρα όλα αυτά τα γεγονότα, εκτός από την ενεργοποίηση της προκασπάσης-9. Κατ' επέκταση, αναστέλλεται ο καταρράκτης των κασπασών και όλα τα επακόλουθα γεγονότα. Μια πιθανή εκδοχή που μελετάται αυτή τη στιγμή, είναι η οξειδωση ενός καταλοίπου κυστεΐνης της προκασπάσης-9, γεγονός που θα οδηγούσε και στην παρατηρούμενη αναστολή του ενζύμου. Είναι σημαντικό πάντως, ότι η αναστολή του καταρράκτη των κασπασών, δεν είναι ικανή να προστατέψει από τον κυτταρικό θάνατο, ο οποίος λαμβάνει χώρα μέσω μιας πορείας που μεσολαβείτε από τη μετατόπιση του μιτοχονδριακού παράγοντα πρόκλησης της απόπτωσης (AIF) στον πυρήνα, γεγονός που συνοδεύεται από συμπύκνωση και κατακερματισμό της χρωματίνης. Συμπερασματικά, από τη μελέτη αυτή προκύπτει ότι η συνεχής παρουσία του H_2O_2 κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της απόπτωσης, αναστέλλει την κασπάσης-9, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο μέσω μιας πορείας που είναι ανεξάρτητη των κασπασών, αλλά εξαρτάται από τον παράγοντα AIF.

Η μελέτη αυτή χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα «ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ Ι» του Υπουργείου Παιδείας και Θρησκευμάτων

HYDROGEN PEROXIDE AND APOPTOSIS: MOLECULAR MECHANISMS**Barbouti A., Amorgianiotis C., and D. Galaris***Laboratory of Biological Chemistry, Medical School, University of Ioannina*

Hydrogen peroxide (H₂O₂) is a well known inducer of apoptosis in a variety of cell types. However, we have previously shown that continuously generated H₂O₂ is able to inhibit caspase activation and internucleosomal DNA fragmentation. The main purpose of the present investigation was to elucidate the molecular mechanism(s) of this inhibitory action of H₂O₂ and to define the ultimate fate of the cells under these conditions. The results presented indicate that outer mitochondrial membrane permeabilization, release of cytochrome c from mitochondria, oligomerization of Apaf-1, and recruitment of procaspase-9 onto apoptosomes are all taking place normally, but further advancement toward activation of the execution caspases is interrupted when H₂O₂ is continuously present during the apoptotic process. The oxidation of a sensitive cysteine residue of procaspase-9, which can prevent its auto-activation, and consequently the downstream activation of execution caspases emerges as the most probable explanation of the above results. In addition, although the presence of H₂O₂ could effectively inhibit the activation of caspases, it could not prevent the ultimate cell death. Translocation of apoptosis inducing factor (AIF) from mitochondria to nucleus and chromatin condensation were detected under these conditions, indicating a caspase-independent type of cell death. In summary, the data presented in this investigation show that the presence of H₂O₂ during the execution of apoptotic process interrupts the cascade of caspase activation just at the point of procaspase-9 auto-activation and diverts the death type from caspase-dependent to caspase-independent apoptosis.

This research was funded by the program "Pythagoras I" of the Hellenic Ministry of Education.

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΞΥΛΑΝΑΣΗΣ ΣΕ
ΘΕΡΜΟΦΙΛΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΗΦΑΙΣΤΕΙΑΚΟΥ
ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΣΑΝΤΟΡΙΝΗΣ**

**Μπατίλα Γ., Μείντάνης Χ., Χάλκου Κ.Ι., Χατζηνικολάου Δ.Γ.
και Καραγκούνη Α.Δ.**

*Τομέας Βοτανικής, Ομάδα Μικροβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τ.Κ. 15781, Αθήνα. E-mail: akar@biol.uoa.gr*

Η παρουσία και έκφραση του θερμοσταθερού ενζύμου ξυλανάση σε θερμοφιλα βακτηριακά στελέχη παρουσιάζει εξαιρετικό βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον λόγω της δυνατότητας χρήσης των θερμοσταθερών ξυλανασών στη βιομηχανία χαρτιού. Οι θερμοφιλοι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με τους μεσόφιλους και είναι ανθεκτικότεροι στις συνθήκες που επικρατούν κατά τις βιομηχανικές διαδικασίες. Για το λόγο αυτό τις τελευταίες δεκατίες γίνονται συνεχώς προσπάθειες απομόνωσης θερμοφίλων μικροοργανισμών και παραγωγής από αυτούς θερμοσταθερών ενζύμων με σκοπό την εκμετάλλευσή τους σε βιομηχανικό επίπεδο. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση του γονιδίου που κωδικοποιεί για θερμοφιλή ξυλανάση σε 200 θερμοφιλα βακτηριακά στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από διαφορετικές οικοθέσεις του συμπλέγματος της Σαντορίνης. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί το ένζυμο ξυλανάση, ένα υδρολυτικό ένζυμο που διασπά τους δεσμούς της ξυλάνης, κυρίαρχο συστατικό των ημικυτταρινών του τοιχώματος των φυτικών κυττάρων. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη ξυλανάση εντοπίστηκε σε 166 θερμοφιλα βακτηριακά στελέχη τα οποία βρέθηκαν μετά από ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16s rRNA να παρουσιάζουν φυλογενετική συγγένεια με στελέχη που ανήκουν στα είδη *Bacillus* και *Geobacillus*. Από το σύνολο των στελεχών που φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί τη θερμοφιλή ξυλανάση, 29 είχαν την ικανότητα να αυξάνονται σε στερεό υπόστρωμα με μόνη πηγή άνθρακα και ενέργειας ξυλάνη. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ένα ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο για τα θερμοφιλα βακτηριακά στελέχη με ικανότητα αποικοδόμησης ξυλάνης, αφού υπάρχει η δυνατότητα χρησιμοποίησής τους στην απομάκρυνση λιγνίνης στα διάφορα στάδια λεύκανσης του χαρτοπολτού. Το γεγονός αυτό συμβάλει στη μείωση χρήσης χλωρίνης για την παραπάνω διαδικασία και κατά συνέπεια στην μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος που προκύπτει κατά τη χρήση οργανικών ουσιών στη χαρτοβιομηχανία

DETECTION OF XYLANASE ACTIVITY AMONG THERMOPHILIC BACTERIAL STRAINS FROM A VOLCANO ISLAND**Batila G., Meintanis C., Chalkou K.I., Hatzinikolaou D.G.,
and A.D. Karagouni**

Department of Botany, Microbiology Group, Faculty of Biology, National & Kapodestrian University of Athens, P.C. 15781, Athens. E-mail: akar@biol.uoa.gr.

Presence and expression of the thermostable enzyme xylanase in thermophilic bacteria is of special biotechnological interest as they can be used in applications of the paper industry. It is recognised that enzymes from thermophiles withstand physical and chemical denaturation. This fact combined with faster growth rates exhibited by thermophiles compared to growth rates of mesophiles has directed research, over the past decades, to the isolation of thermophiles and the production of thermostable enzymes by these microorganisms. In this study, 200 thermophilic bacteria isolated from different volcanic habitats were screened for detection of the xylanase gene. This gene encodes for a hydrolytic enzyme, xylanase which catalyse the endohydrolysis of linkages in xylan. Xylan is the dominating component of hemicelluloses in plant cells and one of the most abundant organic substances on earth with great application in the paper industry. Xylanase gene was detected in 166 bacterial isolates, using PCR. Strain typing performed by sequencing of a region of the 16s rRNA gene, identified the isolates carrying the xylanase gene as *Bacillus* and *Geobacillus* strains. Isolates found to be carrying the xylanase gene were further examined for their ability to metabolize xylan. It was found that 29 of the total isolates could grow on xylan as the sole carbon and energy source. Results indicated that thermophilic bacteria which could grow on xylan are of special significance as they could be used in lignin removal in various stages of bleaching offering a major step in the reduction of chlorine consumption, lowering this way environmental pollution caused by organic halogens.

Η Bcl-2 ΚΑΤΕΣΤΕΙΛΕ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ Jurkat ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ H₂O₂ ΚΑΙ ΤΟ ΡΟΣΜΑΡΙΝΙΚΟ ΟΞΥ

Μπάτση Χ.¹, Λενέτη Ε.², Μάνος Γ.² και Ε. Κωλέττας¹

¹Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, ²Σ.Τ.Ε.Γ., Τ.Ε.Ι. Ηπείρου

Το ροσμαρινικό οξύ (RosA) που συχνά απαντάται ως δευτερεύων μεταβολίτης σε βότανα και φαρμακευτικά φυτά, φαίνεται να έχει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Έχει δείχτει ότι το ροσμαρινικό οξύ (RosA) αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση των ανθρώπινων καρκινικών T-λεμφοκυττάρων Jurkat αλλά ο μηχανισμός δράσης του στην απόπτωση παραμένει εν πολλοίς άγνωστος. Το ροσμαρινικό οξύ (RosA) ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Jurkat κατά ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο μειορρυθμίζοντας την έκφραση της κυκλίνης D₃ και της p21^{Cip/Waf1} και επάγοντας την έκφραση της p27^{Kip1}. Το ροσμαρινικό οξύ (RosA) επήγαγε την απόπτωση των κυττάρων Jurkat κατά ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο και δεν προστάτευσε τα Jurkat από την επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση. Η επαγόμενη απόπτωση από το RosA συσχετιζόταν με την καταστολή της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 αλλά όχι των προ-αποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2, Bak και PUMAα. Η υπερέκφραση της Bcl-2 προστάτευσε τα κύτταρα Jurkat από την απόπτωση που επάγεται από το RosA και το H₂O₂ μεταβάλλοντας τον λόγο των προ-αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2. Συμπερασματικά, το ροσμαρινικό οξύ ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Jurkat μεταβάλλοντας την έκφραση των κυκλινών και των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών. Επιπλέον, το RosA δεν φαίνεται να δρα ως αντί-οξειδωτικό αλλά επήγαγε την απόπτωση των κυττάρων Jurkat διαμέσου της ενεργοποίησης της μιτοχονδριακής πορείας απόπτωσης, η οποία αναστάληκε από τη Bcl-2.

Συγχρηματοδοτήθηκε από την ΕΕ στα πλαίσια του προγράμματος «ΑΡΧΙΜΗΔΗΣ Ι» του ΕΠΕΑΕΚ ΙΙ του 3^{ου} ΚΠΣ του ΥΠ.Ε.Π.Θ., με χρηματοδότηση από εθνικούς πόρους και το ΕΚΤ

Bcl-2 SUPPRESSED H₂O₂- AND ROSMARINIC ACID-MEDIATED APOPTOSIS OF Jurkat CELLS**Batsi Chr.¹, Leneti E.², Manos G.², and E. Kolettas¹**

¹Laboratory of Physiology, University of Ioannina Medical School, 45110 Ioannina, Greece and ²School of Agricultural Technology, T.E.I. of Epirus, Greece

Rosmarinic acid (RosA), frequently found as a secondary metabolite in herbs and medicinal plants, has exhibited antioxidant and anti-inflammatory activities. RosA was shown to inhibit the proliferation and induce apoptosis of Jurkat T cells but the mechanism of action of RosA in apoptosis remains elusive. RosA inhibited the proliferation of Jurkat cells in a dose-dependent manner by suppressing the expression of cyclin D₃ and p21^{Cip1/Waf1} and up-regulating p27^{Kip1}. RosA induced apoptosis of Jurkat cells in a dose-dependent manner and failed to protect them from hydrogen peroxide (H₂O₂)-mediated apoptosis. Induction of apoptosis by RosA correlated with suppression of Bcl-2 but no changes in the expression of the pro-apoptotic members of the Bcl-2 family, Bak or PUMA α were detected. Over-expression of Bcl-2 protected Jurkat cells from both H₂O₂- and RosA-induced apoptosis by altering the ratio of anti- to pro-apoptotic members of the Bcl-2 family. In conclusion, RosA inhibited Jurkat cell proliferation by altering the expression of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors and induced apoptosis most likely acting through the mitochondrial pathway and possessed no anti-oxidant properties.

This research was co-funded by the EU in the framework of the program "ARCHIMEDES I" of the "Operational Program for Education and Initial Vocational Training" of the 3rd Community Support Framework of the Hellenic Ministry of Education, funded by national sources and the ESF.

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ: ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VEGF ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Μπέλλου Σ.¹, Μπαγκλή Ε.¹, Καραλή Ε.¹, Murphy C.² και Θ. Φώτσης¹

¹Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110
Ιωάννινα, Ελλάδα

²Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας / Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών» (ITE-IBE), 45110
Ιωάννινα, Ελλάδα

Αγγειογένεση είναι ο σχηματισμός νέων τριχοειδών αγγείων από προϋπάρχοντα, και αποτελεί μία αυστηρά ρυθμιζόμενη και αυτοπεριοριζόμενη φυσιολογική διαδικασία. Όμως σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις η αγγειογένεση ενεργοποιείται και χάνει την ικανότητά της να αυτοπεριορίζεται. Μια από τις πιο σημαντικές εκδηλώσεις της παθολογικής αγγειογένεσης είναι αυτή που προκαλείται από συμπαγείς όγκους. Ένας από τους περισσότερο σημαντικούς ρυθμιστικούς παράγοντες της αγγειογένεσης είναι ο αγγειοενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). Η υπερέκφρασή του VEGF παίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία παθολογικής αγγειογένεσης ανατρέποντας την ισορροπία διεγερτών και αναστολέων της αγγειογένεσης. Ειδικότερα στους καρκίνους, ο VEGF υπερεκφράζεται σαν αποτέλεσμα της υποξίας ή των γενετικών αλλαγών του νεοπλασμάτων. Μέχρι σήμερα γνωρίζουμε πολύ λίγα για τα γονίδια που ρυθμίζονται από τον VEGF. Η διασύνδεση των εναλλακτικών μονοπατιών μεταγωγής του σήματος του VEGF (ισομορφή-υποδοχέας-διαμεσολαβητές-γονίδια) με τις αγγειογενετικές ανταποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων (πολλαπλασιασμός, επιβίωση, μετακίνηση, διαφοροποίηση) σαφώς χρήζει παραπέρα μελέτης. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ελέγχθηκε η έκφραση 22.000 γονιδίων μετά από επαγωγή από VEGF για διάφορα χρονικά διαστήματα. (3-22 ώρες) χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA. Από τα γονίδια, των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται από τον VEGF, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ομάδα των φωσφατασών διπλής εξειδίκευσης, DUSPs, καθώς αποτελούν πιθανοί ρυθμιστές της μεταγωγής του σήματος του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται η διασύνδεση της DUSP5 με συγκεκριμένο μεταγωγικό μονοπάτι του VEGF καθώς και ο καθορισμός του ρόλου της DUSP5 στις βασικές αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων.

**MOLECULAR MECHANISMS OF ANGIOGENESIS: GENE
REGULATION BY THE ANGIOGENIC FACTOR VASCULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)
IN ENDOTHELIAL CELLS**

Bellou S.¹, Bagli E.¹, Karali E.¹, Murphy C.², and T. Fotsis¹

¹*Laboratory of Biological Chemistry, University of Ioannina, Medical School, 45110
Ioannina, Greece*

²*Foundation for Research and Technology – Hellas, Biomedical Research Institute, 45110
Ioannina, Greece*

Angiogenesis, the formation of new vessels from pre-existing ones, is a strictly regulated and self-restricted physiological process. A growing number of diseases derive from excessive, deregulated angiogenesis. However, the most important manifestation of pathological angiogenesis is that seen in the vicinity of solid tumors. One of the most important factors regulating angiogenesis is Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF. Indeed, VEGF is over-expressed in most cancers following hypoxia and/or as a consequence of the genetic changes of cancer, such as mutations of oncogenes and tumor suppressor genes. However, very little is known about VEGF-regulated genes linking signalling cascades of VEGF with angiogenic responses of endothelial cells. We have examined the expression of 22.000 genes after induction of VEGF in different time points (3-24h). Among the genes that are regulated by VEGF, a cluster of Dual Specificity Phosphatases displays particular interest, since these enzymes are fundamental components of VEGF-signal transduction pathways. In the present study, the crucial role of DUSP5 during basic endothelial responses (proliferation, survival, migration & differentiation) has been established along with its contribution in the level of MAPK activation by VEGF.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΩΚΥΤΟΚΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΝΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ, ΚΑΙ ΣΤΗΝ *IN VITRO* ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Μπερέτσος Π.¹, Κουσουλάκος Σ.¹, Μαργαρίτης Λ.Χ.¹, Στεφανίδης Κ.²,
Βλάχου Α.¹, Μπλέτσα Ρ.², Λουτράδης Δ.², Αντσακλής Α.²

¹Τμήμα Βιολογίας, ²Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Η ωκυτοκίνη και ο υποδοχέας της διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε σχετικές με την αναπαραγωγή διαδικασίες. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η διαλεύκανση του ρόλου της ωκυτοκίνης στην εμφύτευση του προ-εμβρύου του ποντικού, καθώς και στην *in vitro* ανάπτυξη του. Προς επίτευξη αυτού του στόχου μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά και με RT-PCR η τοπολογία της έκφρασης του υποδοχέα της και του mRNA του, αντίστοιχα, καθώς και οι επιδράσεις ποικίλων συγκεντρώσεων ωκυτοκίνης και αναστολέως της στην ανάπτυξη του προ-εμβρύου. Ενώ ο υποδοχέας της ωκυτοκίνης εκφράζεται κανονικά στο ενδομήτριο των ποντικών, μειωρυθμίζεται κατά την ωορρηξία και την εκκριτική φάση. Κατά τη διάρκεια της κύησης ο υποδοχέας ανιχνεύεται μόνο στους αδένες του ενδομητρίου και στα κύτταρα του εμβρύου, ενώ απουσιάζει από τα κύτταρα της περι-εμφυτευτικής περιοχής. Η παρουσία mRNA του υποδοχέα της ωκυτοκίνης στα κύτταρα της βλαστοκύστης επιβεβαιώνεται και με RT-PCR, ενώ, μετά τη διείσδυση του προ-εμβρύου παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα στην περιοχή σχηματισμού του πλακούντα. Σε έμβρυα «καλλιιεργούμενα» παρουσία ωκυτοκίνης, ο αριθμός των αναπτυσσόμενων εμβρύων όσο και η «ποιότητα» αυτών μάλλον δεν επηρεάζονται από την παρουσία της ορμόνης ($p > 0.05$). Αντίθετα, παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων (10^{-4} M) αναστολέως παρατηρείται διακοπή της ανάπτυξης του προ-εμβρύου στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων ($n > 200$), χωρίς όμως να σημειωθεί εκφυλισμός του εμβρύου, ενώ παρουσία 10^{-5} M αναστολέα διακόπτεται η ανάπτυξη μόνο στο 40% περίπου των εμβρύων ($p < 0.01$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου). Συνάγεται ότι, η εμφύτευση του προεμβρύου συνοδεύεται πιθανόν από ελεγχόμενη μείωση ή/και αναστολή της έκφρασης του υποδοχέα της ωκυτοκίνης στο ενδομήτριο του ποντικού. Οι παρατηρήσεις μας επιβεβαιώνουν την έκφραση του mRNA του υποδοχέα της ωκυτοκίνης στη βλαστοκύστη του ποντικού, ενώ φαίνεται η δράση της να είναι απαραίτητη προκειμένου να επιτευχθούν τα πρώτα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το Πρόγραμμα «Καποδίστριας» του Ειδικού Λογαριασμού Κονδυλίων Έρευνας (Επιτροπή Ερευνών, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών)

**EFFECTS OF OXYTOCIN AND ITS ANTAGONIST IN MOUSE
EMBRYO IMPLANTATION AND *IN VITRO* EARLY
DEVELOPMENT****Beretsos P.¹, Koussoulakos S.¹, Margaritis L.H.¹, Stefanidis K.²,
Vlachou A.¹, Bletsas R.², Loutradis D.², Antsaklis A.²**¹*Faculty of Biology,* ²*Medical School, National & Kapodistrian University of Athens*

Oxytocin (OT) and its receptor (OTR) appear to play an important physiological role in a variety of reproductive functions. The aim of this study was to elucidate the role of OT in the implantation and early embryonic development of mouse pre-embryos. Therefore, the expression and localization patterns of OTR and its mRNA were studied immunohistochemically and by RT-PCR respectively, as well as the effects of OT and its antagonist in early embryonic *in vitro* development of mouse pre-embryos. Although OTR is physiologically expressed in the mouse endometrium, it appeared to be down-regulated during ovulation and the secretory phase of the cycle. During early pregnancy OTR was detected only in the epithelial cells of the endometrial glands of the uterus and the embryonic cells of the attaching embryo, but not in the cells of the peri-implantation area. The expression of OTR mRNA was verified by RT-PCR, while early placentation was accompanied by an up-regulation of OTR at the area of placental development. In cultured embryos, both blastocyst development and quality did not appear to be influenced by the presence of OT ($p > 0.05$). On the other hand, high concentrations of its antagonist (10^{-4} M) appeared to completely inhibit embryo development at the 4-cell stage ($n > 200$), without affecting embryo quality, while 10^{-5} M of antagonist blocked development in only 40% of the embryos ($p < 0.01$). According to our observations it appears that embryonic implantation in the mouse is probably accompanied by a controlled down-regulation or/and inhibition of OTR expression in the endometrium. This process seems to be part of the normal mouse reproductive cycle. We have verified the expression of OTR and its mRNA in the mouse embryonic cells and have concludes that the actions of oxytocin appear to be important for the normal development of the early embryo.

*This work is funded by the Programme "Kapodistrias" of the Special Research Account
(National & Kapodistrian University of Athens)*

**Η ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΤΡΟΦΟΚΥΤΤΑΡΑ
ΚΑΙ ΘΥΛΑΚΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΩΘΟΥΛΑΚΙΟΥ ΤΗΣ *Drosophila
melanogaster* ΕΛΕΓΧΕΤΑΙ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ
ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ DNA**

Νέξης Ι.Π., Στραβοπόδης Δ.Ι., Μαργαρίτης Λ.Χ., Παπασιδέρη Ι.Σ.

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρων και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Πανεπιστημιόπολη,
Ζωγράφου 15784, Αθήνα*

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αποτελεί ένα πολύ σημαντικό γεγονός κατά τη διάρκεια της ωογένεσης σε διάφορους οργανισμούς. Στη Δροσόφιλα (*Drosophila melanogaster*), διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο στη διαδικασία της ωρίμανσης του ωοθυλακίου. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων ενεργοποιητών και αναστολέων του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου κατά τη διάρκεια των τελευταίων αναπτυξιακών σταδίων της ωογένεσης, χρησιμοποιώντας ένα *in vitro* σύστημα ανάπτυξης των ωοθυλακίων σε θρεπτικό μέσο Schneider's. Επίδραση στα ωοθυλάκια με ετοποσίδιο και σταυροσπορίνη, διακόπτει την περαιτέρω ανάπτυξή τους και επάγει τη συμπύκνωση της χρωματίνης αλλά όχι την αποδόμηση του DNA, στα τροφοκύτταρα και στα θυλακοκύτταρα, όπως φαίνεται μετά από χρώση με ιωδιούχο προπίδιο και TUNEL. Επιπλέον επώαση των ωοθυλακίων με τον αναστολέα της κασπάσης 3, Z-DEVD-FMK, προκαλεί σημαντική καθυστέρηση στην ωρίμανση των ωοθυλακίων, αποτρέπει την αποδόμηση του DNA, αλλά όχι και τη συμπύκνωση της χρωματίνης των τροφοκυττάρων και των θυλακοκυττάρων. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν για πρώτη φορά ότι η συμπύκνωση της χρωματίνης των τροφοκυττάρων και των θυλακοκυττάρων στα ωοθυλάκια της Δροσόφιλα είναι μια διαδικασία ανεξάρτητη από την κασπάση 3 και ρυθμίζεται αυτόνομα από την αποδόμηση του DNA.

Η παρούσα έρευνα χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα ΕΠΕΑΕΚ II στα πλαίσια του έργου «ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II-ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΣΤΑ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑ» (70/3/7928) με συγχρηματοδότηση 75% από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και 25% από Εθνικούς Πόρους.

CHROMATIN CONDENSATION OF OVARIAN NURSE AND FOLLICLE CELLS IS CONTROLLED INDEPENDENTLY FROM DNA FRAGMENTATION DURING *Drosophila melanogaster* LATE OOGENESIS

Nezis I.P., Stravopodis D.J., Margaritis L.H. and I.S. Papassideri

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, 157 84 Athens, Greece

Programmed cell death constitutes a common fundamental incident occurring during oogenesis in a variety of different organisms. In *Drosophila melanogaster*, it plays a significant role in the maturation process of the egg chamber. In the present study, we have used an *in vitro* development system for studying the effects of inducers and inhibitors of programmed cell death during the late stages of oogenesis. Treatment of the developing egg chambers with two widely used inducers of cell death, etoposide and staurosporine, blocks further development and induces chromatin condensation but not DNA fragmentation in nurse and follicle cells, as revealed by propidium iodide staining and TUNEL assay. Moreover, incubation of the developing egg chambers with the caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK significantly delays development, prevents DNA fragmentation, but does not affect chromatin condensation. The above results demonstrate, for the first time, that chromatin condensation in *Drosophila* ovarian nurse and follicle cells is a caspase-3-like independent process and is regulated independently from DNA fragmentation.

The present study was co-funded by the European Social Fund and National Resources (EPEAEK II-PYTHAGORAS II 70/3/7928) to I. S. Papassideri.

ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΟ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΗΣ ΩΟΘΗΚΗΣ

Νίκας Β.¹, Πρατσίνης Χ.¹, Βλάχος Γ.², Αντσακλής Α.², Κλέτσας Δ.¹
και Γ. Βουτσινάς¹

¹Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ, ²Α' Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική Παν.
Αθηνών, Νοσ. Αλεξάνδρα, Αθήνα

Ο επιθηλιακός καρκίνος της ωοθήκης αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από γυναικολογικούς καρκίνους. Λόγω της αρχικής διάγνωσης σε προχωρημένο στάδιο της νόσου καθώς και της συχνής ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα συνήθη χημειοθεραπευτικά η 5ετής επιβίωση δεν υπερβαίνει το 30-40%. Η πειραματική έρευνα λοιπόν αναζητά νέα φάρμακα που να στοχεύουν σε συγκεκριμένα μόρια-στόχους με ρόλο-κλειδί στη διαδικασία της καρκινογένεσης, μέσω ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης. Τα φάρμακα αυτά δοκιμάζονται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, καθώς αυτές διατηρούν αρκετές από τις μοριακές βλάβες που οδήγησαν στην ογκογένεση, ενώ η *in vitro* μελέτη της δράσης τους προσομοιάζει σε σημαντικό βαθμό την *in vivo* κατάσταση. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δράση αναστολέων φαρνεσυλίωσης και αναστολέων της Hsp90 σε κυτταρικές σειρές επιθηλιακού καρκίνου ωοθήκης. Ο αναστολέας φαρνεσυλίωσης FTI-277, όπως φαίνεται από πειράματα προσδιορισμού επίδρασης στην κυτταρική επιβίωση (MTT, PI-FACS) σε συγκέντρωση μέχρι 100μΜ δεν αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τόσο στην ανθεκτική κυτταρική σειρά SKOV-3 όσο και στην ευαίσθητη κυτταρική σειρά A2780. Αντίθετα ο αναστολέας της Hsp90 geldanamycin (GA) προκαλεί μείωση της κυτταρικής επιβίωσης με δόσοεξαρτώμενο τρόπο τόσο στην κυτταρική σειρά SKOV-3 (65% επιβίωση σε συγκέντρωση 10μΜ) όσο και στην A2780 (28% επιβίωση σε συγκέντρωση 10μΜ). Με βάση τα αποτελέσματα πειραμάτων PI-FACS για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα SKOV-3, η επίδραση της GA στην κυτταρική επιβίωση φαίνεται να οφείλεται στην παρατηρούμενη αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 και τελικά σε αυξημένα ποσοστά απόπτωσης. Τα παραπάνω ευρήματα συμφωνούν με τα αποτελέσματα πειραμάτων ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης για τη μελέτη του νεοσυντιθέμενου DNA. Τα αποτελέσματα αυτά αναμένεται να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη εναλλακτικών πρωτοκόλλων στοχευμένης χημειοθεραπείας στο επιθηλιακό καρκίνωμα της ωοθήκης.

**TARGETED CHEMOTHERAPY IN OVARIAN EPITHELIAL
CANCER****Nikas V.¹, Pratsinis H.¹, Vlahos G.², Antsaklis A.², Kletsas D.¹,
and G. Voutsinas¹**

¹*Institute of Biology, NCSR "Demokritos",* ²*First Department of Obstetrics and Gynaecology, Medical School, University of Athens, Alexandra Hospital, Athens, Greece*

Ovarian cancer constitutes the most common cause of death from gynaecologic malignancies. As diagnosis is usually made in an advanced stage and resistance in chemotherapy usually occurs, 5-year survival does not exceed 30-40%. Therefore, experimental research is looking for new drugs that target specific molecules inhibiting their activity. The target-molecules are ones that play an important role in the process of malignant transformation participating in the control of cell proliferation, differentiation and apoptosis. The above drugs are initially tested in cancer cell lines that maintain many of the molecular aberrations leading to tumorigenesis, while the response to these drugs *in vitro* correlates well with their *in vivo* effect. In the present work we have studied the effect of a farnesyltransferase inhibitor and an Hsp90 inhibitor on two ovarian epithelial cancer cell lines. In experiments studying cell survival (MTT, PI-FACS) farnesyltransferase inhibitor FTI-277 at a concentration of up to 100µM had no effect on survival of the sensitive A2780 or the resistant cell line SKOV-3. In contrast Hsp90 inhibitor geldanamycin (GA) was shown to suppress survival in a dose dependent manner in both SKOV-3 (65% survival at 10µM) as well as A2780 cell lines (28% survival at 10µM). Based on results from PI-FACS experiments for the study of the cell cycle in SKOV-3 cells, the effect of GA on cell survival must be due to the observed inhibition of cell cycle in phase G2 and finally to an increased percentage of apoptosis. The above findings agree with the results from radioactive thymidine incorporation experiments into newly synthesized DNA. These results are expected to contribute to the development of alternative protocols of targeted chemotherapy in ovarian epithelial carcinoma.

**Η ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ ΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ VL30 ΕΠΑΓΕΙ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΘΑΝΑΤΟ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟ ΑΠΟ p53 ΚΑΙ
ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΟ ΚΑΣΠΙΑΣΩΝ**

**Νουτσόπουλος Δ.¹, Ντόβα Α.², Βαρθολομάτος Γ.², Μαρκόπουλος Γ.¹,
Κωλέττας Ε.³ και Θ. Τζαβάρας¹**

*Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή, Εργαστήρια: ¹Γενικής Βιολογίας & ³Φυσιολογίας.
²Αιματολογικό Εργαστήριο, Μονάδα Μοριακής Βιολογίας, ΠΠΝΙ, Ιωάννινα.*

Τα στοιχεία VL30 είναι μη αυτόνομα LTR-ρετροτρανσποζόνια στο γένωμα του επίμυος και έχουν αποδείξει ότι ρετρομετατίθενται σε κύτταρα επίμυος SVTT1 μετασηματισμένα από τον ιό SV40. Η ρετρομετάθεση προκαλεί βλάβες στο DNA, ωστόσο το αποτέλεσμα πολλαπλών γεγονότων ρετρομετάθεσης στη ζωή του κυττάρου και η απόκρισή του σε αυτή την ενδογενή πηγή βλάβης παραμένουν ασαφή. Διαμόλυνση κυττάρων SVTT1 με ένα ανασυνδυασμένο VL30, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση παραγωγής κλώνων. Ανάλυσή τους με FACS έδειξε επαγωγή γεγονότων ρετρομετάθεσης, αλλά και κυτταρικού θανάτου και το ποσοστό των νεκρών κυττάρων συσχετίστηκε άμεσα με τη συχνότητα ρετρομετάθεσης. Ο κυτταρικός θάνατος συνοδεύθηκε από χαρακτηριστικά απόπτωσης όπως πυρηνική συμπύκνωση και κατατεμαχισμό του DNA, αλλά και αυτοφαγίας με ανίχνευση κενοτοπίων στο κυτταρόπλασμα. Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση έδειξε μη ενεργοποίηση κασπασών που επιβεβαιώθηκε με φθορισμομετρία και ανοσοφθορισμό. Μετά από ρετρομετάθεση η έκφραση της p53 αυξήθηκε, ενώ το σύμπλοκο p53/μεγάλου T αντιγόνου διασπάστηκε. Ανάλυση της έκφρασης γονιδίων καθοδικά της p53, έδειξε αύξηση της έκφρασης της PUMA και καταστολή της Bcl-2. Αντίθετα, εκτοπική έκφραση της Bcl-2, κατέστειλλε τον κυτταρικό θάνατο, όχι όμως τη ρετρομετάθεση, δείχνοντας την εμπλοκή της μιτοχονδριακής πορείας θανάτου. Τα αποτελέσματά μας απέδειξαν ότι η ρετρομετάθεση των στοιχείων VL30 επάγει κυτταρικό θάνατο εξαρτώμενο από την p53 και ανεξάρτητο από κασπάσες. Συνεπώς, η ρετρομετάθεση των VL30 φαίνεται να είναι ένα εναρκτήριο σήμα επαγωγής βλαβών στον πυρήνα που οδηγεί στην ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής πορείας θανάτου.

** Συγχρηματοδοτήθηκε από την ΕΕ στα πλαίσια του προγράμματος «Ηράκλειτος» του ΕΠΕΑΕΚ ΙΙ του 3^{ου} ΚΠΣ του ΥΠΕΠΘ, με χρηματοδότηση από εθνικούς πόρους και το ΕΚΤ.*

VL30 RETROTRANSPOSITION INDUCES CELL DEATH IN A p53-DEPENDENT AND CASPASE-INDEPENDENT MANNER**Noutsopoulos D.¹, Dova L.², Vartholomatos G.², Markopoulos G.¹,
Kolettas E.³, and Th. Tzavaras¹***University of Ioannina, Medical School, Laboratories: ¹GeneralBiology & ³Physiology.**²Hematology Laboratory, Unit of MolecularBiology, University Hospital of Ioannina.*

VL30 elements are non-autonomous LTR-retrotransposons present in the mouse genome. We have previously shown that VL30s are retrotransposition-competent in SV40-transformed mouse cells, SVTT1. Retrotransposition contributes to DNA damage, however the impact of retrotransposition on cell fate and cellular response to this endogenous source of DNA damage remains unclear. Transfecting SVTT1 cells with a recombinant VL30 element a significantly reduced clone number was obtained. FACS analysis showed induction of VL30 retrotransposition, as well as cell death and the fraction of dead cells was directly associated to retrotransposition frequency. Retrotransposition-induced cell death was accompanied by hallmarks of apoptosis, such as nuclear condensation and DNA fragmentation, but also by autophagy, such as cytoplasmic vacuolization. Western blot analysis revealed no caspase activation confirmed by fluorometric assay and immunofluorescence. Upon retrotransposition, increased levels of p53 were detected and the complex p53/large T antigen was disrupted. Analysis of p53 downstream genes revealed an increase of PUMA α expression and down-regulation of Bcl-2. In contrast, following ectopic expression of Bcl-2 retrotransposition-induced cell death was suppressed, but not retrotransposition, suggesting the involvement of the mitochondrial death pathway. Our data demonstrates that VL30 retrotransposition induces cell death in a p53-dependent and caspase-independent manner. Thus, VL30 retrotransposition appears to be an initiation signal in nucleus leading to the activation of the mitochondrial death pathway.

**This research was co-funded by the EU in the framework of the program "HERAKLITOS" of the "Operational Program of Education and Initial Vocational Training" of the 3rd Community Support Framework of the Hellenic Ministry of Education, funded by national sources and the ESF.*

ΗΜΕΡΟΝΥΚΤΙΑ ΚΑΤΑΚΟΡΥΦΗ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΤΟΥ ΖΩΟΠΛΑΓΚΤΟΥ ΣΤΗ ΛΙΜΝΗ ΤΡΙΧΩΝΙΔΑ

Ντούλκα Ε. και Γ. Κεχαγιάς

Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Σεφέρη 2,
30 100, Αγρίνιο. E-mail: gkechagi@cc.uoi.gr

Στα πλαίσια της μελέτης του ζωοπλαγκτού της λίμνης Τριχωνίδας, πραγματοποιήθηκε μία 24ωρη δειγματοληψία σε έναν πελαγικό σταθμό στη λίμνη το Μάιο του 2005. Δείγματα ζωοπλαγκτού συλλέχθηκαν με κατακόρυφες σύρσεις ενός πλαγκτικού διχτυού με μήκος 1m, διάμετρο στομίου 40 cm και “μάτι” γάζας 50 μm, σε διαστήματα βάθους 5 m, από την επιφάνεια έως και τα 45 m. Βρέθηκαν συνολικά 28 είδη ζωοπλαγκτικών ασπονδύλων (19 τροχόζωα, 3 κωπήποδα, 5 κλαδόκερα και την προνύμφη του διθύρου μαλακίου *Dreissena polymorpha*). Η αφθονότερη ομάδα του ζωοπλαγκτού ήταν τα κωπήποδα (44.2 %) και από αυτά κυρίαρχο ήταν το είδος *Eudiarptomus drieschi* (97.4 %). Για το σύνολο του ζωοπλαγκτού δεν ήταν εμφανές ένα πρότυπο ημερονύκτιας κατακόρυφης μετανάστευσης (HKM). Αντίθετα, τα κωπήποδα και ιδιαίτερα οι κωπηποδίτες του είδους *E. drieschi* (που ήταν και οι αφθονότεροι στον πληθυσμό του) έδειξαν να ακολουθούν ένα πρότυπο μετανάστευσης γνωστό ως “μετανάστευση του λυκόφωτος” (twilight migration). Οι κωπηποδίτες βρισκόταν σε μεγάλο ποσοστό στην επιφάνεια (0-5 m) το πρωί (09:00), ενώ το μεσημέρι (13:00) κατέβαιναν φτάνοντας το κατώτερο όριο του θερμοκλινούς, το οποίο αναπτύσσεται σε βάθος 8-24 m. Το απόγευμα (17:00) άρχιζε η άνοδός τους προς την επιφάνεια όπου έφταναν το βράδυ (21:00). Στις πρώτες πρωινές ώρες (01:00) κατανέμονταν σε μεγαλύτερα βάθη, ενώ ανέβαιναν ξανά στην επιφάνεια το χάραμα (05:00). Τα αρσενικά και θηλυκά άτομα του είδους αυτού δεν εμφάνισαν ξεκάθαρο πρότυπο HKM, ενώ οι ναύπλιοι παρέμεναν καθ’ όλη τη διάρκεια της ημέρας στο επιλίμνιο. Από τα κλαδόκερα κυριάρχησε το γένος *Diaphanosoma sp.*, το οποίο βρισκόταν συνεχώς στο επιλίμνιο, ενώ αντίθετα το γένος *Daphnia sp.* εμφάνισε το πρότυπο της “μετανάστευσης του λυκόφωτος”. Από τα τροχόζωα κανένα είδος δεν έδειξε κάποιο πρότυπο HKM, ενώ κυρίαρχο ήταν το είδος *Kellicotia longispina* (75%) που βρέθηκε στα όρια του θερμοκλινούς.

DIEL VERTICAL MIGRATION OF ZOOPLANKTON IN LAKE TRICHONIS**Doulka E., and G. Kehayias**

Department of Environmental & Natural Resources Management, University of Ioannina, Seferi 2, 30100, Agrinio. E-mail: gkechagi@cc.uoi.gr

During the study of the zooplankton of Lake Trichonis, a 24hour sampling was conducted in a pelagic station in May 2005. Zooplankton samples were taken every 4 h with vertical hauls in 5 m depth intervals from the surface to 45 m, using one closing plankton net (1 m in length, 40 cm in diameter, 50 µm mesh size). The zooplankton community consisted of 28 planktonic invertebrates (19 rotifera, 3 copepoda, 5 cladocera, and the mollusk larvae of *Dreissena polymorpha*). Copepoda were the most abundant zooplankton group (44.2%) and among them *Eudiaptomus drieschi* was dominant (97.4 %). The total zooplankton did not show any clear pattern of diel vertical migration (DVM). However, copepoda, and especially the copepodites of *E. drieschi* (which were the most abundant in the species population), showed a pattern of vertical migration known as “twilight migration”. Following this pattern, the copepodites were found in higher percentages in the surface 0-5 m layer in the morning (09:00), in noon (13:00) they descended in deeper layers, reaching the deepest limit of the thermocline, which was formed in the 8-24 m depth layer. In the afternoon (17:00) the animals started to migrate upwards, reaching the surface in the night (21:00). During the first hours after midnight (01:00) they were distributed in deeper layers, while in dawn (05:00) they returned to the surface. No clear pattern of DVM was found for the males and females of *E. drieschi*, while the nauplii of this species stayed in the epilimnion throughout the 24h period. *Diaphanosoma sp.* dominated the cladoceran community. This species was not found to migrate and was always present in the epilimnion, while *Daphnia sp.* showed the characteristic pattern of the “twilight migration”. None of the rotifer species showed any migration pattern, while *Kellicotia longispina*, which was the dominant species (75%), was found into the layer of the thermocline during the entire 24h period.

ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΣΕ P19-ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Ξυλούρη Μ. και Π. Παπαζαφείρη

*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 157 81 Αθήνα*

Τα νευροστεροειδή, είναι ισχυροί αλλοστερικοί τροποποιητές της λειτουργίας του GABA_A υποδοχέα, μέσω της άμεσης, μη γενωμικής αλληλεπίδρασής τους με συγκεκριμένες υπομονάδες του υποδοχέα. Επιπρόσθετα, σε μερικά συστήματα έχει δειχθεί ότι οι μεταβολές της συγκέντρωσης της προγεστερόνης και ειδικότερα της αλλοπρεγναλόνης, μεταβάλλουν τη γονιδιακή έκφραση υπομονάδων του GABA_A υποδοχέα, επηρεάζοντας τη λειτουργία του. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν P19 πολυδύναμα εμβρυϊκά καρκινικά κύτταρα, τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πλήρως μετα-μιτωτικούς νευρώνες (P19-N) που εκφράζουν νευρωνικούς δείκτες, συμπεριλαμβανομένων των GABA_A και NMDA υποδοχέων. Η ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων σε P19-νευρώνες, οδήγησε σε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, που συνοδεύτηκε από αναστολή της φωσφορυλίωσης της κινάσης PKB/Akt που προάγει την κυτταρική επιβίωση, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* στο κυτταρόπλασμα και τη μετατόπιση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax, στα μιτοχόνδρια. Η παρουσία των νευροστεροειδών αλλοπρεγναλόνη και δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), ανέστειλε την απόπτωση, μέσω επαγωγής της φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt και διατήρησης του κυτοχρώματος *c* και της πρωτεΐνης Bax στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα, αντίστοιχα. Η εξειδίκευση της νευροπροστατευτικής δράσης των παραπάνω νευροστεροειδών, επιβεβαιώθηκε παρουσία wortmanin, του ειδικού αναστολέα της κινάσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3-K). Επιπρόσθετα, μικρής διάρκειας επίδραση (1–20 μM, 24 ώρες) της αλλοπρεγναλόνης ή του DHEA στους P19-νευρώνες οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης των α1 και β2 υπομονάδων του GABA_A υποδοχέα, ενώ τα επίπεδα της NR1 υπομονάδας του NMDA υποδοχέα παρέμειναν αμετάβλητα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα νευροστεροειδή μπορούν να δρουν σαν παράγοντες επιβίωσης για τα νευρικά κύτταρα, μέσω της ενεργοποίησης του PI3-K/Akt μονοπατιού και της παρέμβασης στο ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι, ενώ ταυτόχρονα συμβάλλουν στην πλαστικότητα του GABA_A υποδοχέα, μεταβάλλοντας την έκφραση των υπομονάδων του.

*Η εργασία αυτή χρηματοδοτείται από την Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας
(ΠΕΝΕΔ 2001)*

ANTI-APOPTOTIC EFFECTS OF NEUROSTEROIDS ON P19-NEURONS**Xilouri M., and P. Papazafiri***Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, 15784 Athens*

Progesterone and its metabolites are potent allosteric modulators of GABA_A receptor function, through a direct, non-genomic interaction with specific receptor subtypes. In addition, fluctuations in the concentration of progesterone, and allopregnanolone in particular, have been shown to modulate GABA_A receptor gene expression and activity. In the present study, mouse P19 cells were induced to differentiate into post-mitotic neurons expressing specific neuronal markers, including GABA_A and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. Activation of NMDA receptors in P19-neurons caused apoptotic cell death, which involved suppression of the phosphorylation of the survival kinase PKB/Akt, release of the pro-apoptotic factor cytochrome *c* to the cytoplasm and translocation of the pro-apoptotic protein Bax to the mitochondria. Allopregnanolone and DHEA, at 10 μ M protected P19 neurons from apoptosis, promoting the phosphorylation of the Akt kinase and maintaining *cyt c* and Bax proteins, to the mitochondria and the cytoplasm respectively. The specificity of the neuroprotective effects of the above neurosteroids was further confirmed by wortmanin, the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) inhibitor. In addition, short-term exposure (1–20 μ M, 24 h) of P19-derived neurons to allopregnanolone or DHEA, significantly increased the levels of α 1 and β 2 subunit mRNAs of GABA_A receptor, while the levels of NR1 subunit mRNA of NMDA receptor, were not altered. These results suggest that neurosteroids are able to act as survival factors in neuronal cells, promoting the activation of the PI3-K/Akt pathway and interfering with the mitochondrial apoptotic pathway, while they contribute to GABA_A receptor plasticity modulating the expression of its subunits.

This work is funded by the General Secretariat of Research and Technology, Athens, Greece (PENED, 2001)

**ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΕΣ ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΩΟΘΗΚΗΣ ΤΟΥ
ΚΑΡΧΑΡΙΑ *Galeus melastomus* ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ATR FT-IR
ΚΑΙ FT-RAMAN**

**Οικονομίδου Β.Α.¹, Γεωργακά Μ.Β.¹, Χρυσικός Γ.², Γκιώνης Β.²,
Μεγαλοφώνου Π.³ και Σ.Ι. Χαμόδρακας¹**

¹Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη Αθήνα 157 01

²Ινστιτούτο Θεωρητικής & Φυσικής Χημείας, Ε.Ι.Ε., Αθήνα 11635

³Τομέας Ζωολογίας-Θαλάσσιας Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη, Αθήνα 157 01

Το *Galeus melastomus* είναι ένα είδος καρχαρία που κατανέμεται στον ανατολικό Ατλαντικό ωκεανό, από τη Νορβηγία έως τη Σενεγάλη, και σε όλη τη Μεσόγειο Θάλασσα. Εμφανίζει ευρεία βαθυμετρική κλίμακα στη Μεσόγειο, στην οποία έχει εντοπιστεί σε βάθη από 55 μέχρι 1750 μέτρα. Ανήκει στην Οικογένεια Scyliorhinidae και είναι ωτόκο είδος το οποίο αναπαράγεται καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου με αυξημένη δραστηριότητα την άνοιξη και το καλοκαίρι. Γεννά δεκατρία αυγά τη φορά τα οποία αφήνει να μεγαλώσουν χωρίς γονική προστασία. Το αναπτυσσόμενο έμβρυο προστατεύεται από μία ωοειδή, επιμήκη, δερματώδη ωοθήκη (eggcase) διαστάσεων 4 επί 2 εκατοστά. Η ωοθήκη είναι μια δομή που συνδυάζει μηχανική αντοχή και σκληρότητα όπως και υψηλή διαπερατότητα σε μικρού μοριακού βάρους μόρια και ιόντα. Η ωοθήκη εκκρίνεται από τη ζώνη D του ωοθηκικού αδένα. Πειράματα περίθλασης ακτίνων-X, φασματοσκοπίας υπερερυθρού και αμινοξικής ανάλυσης σε δείγματα ωοθηκών του είδους *Scyliorhinus canicula*, της ίδιας οικογένειας, παρείχαν, στο παρελθόν, ισχυρές ενδείξεις ότι η ωοθήκη περιέχει κολλαγόνο το οποίο παρουσιάζει ομοιότητες, σε μοριακό επίπεδο, με τα κολλαγόνα τύπου IV, VI και X των θηλαστικών. Σε αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία ATR FT-IR και φασματοσκοπία FT-Raman, σε δύο δείγματα ωοθήκης διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων του *Galeus melastomus*, προκειμένου να εντοπίσουμε τυχόν ομοιότητες/ διαφορές με την αντίστοιχη του *Scyliorhinus canicula*, από τη μελέτη της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνικών του συστατικών. Οι πρώτες ενδείξεις από τα πειραματικά μας δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι και η ωοθήκη του *Galeus melastomus* αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV.

**PRELIMINARY STRUCTURAL STUDIES OF THE EGGCASE OF
THE CATSHARK *Galeus melastomus* UTILIZING ATR FT-IR AND
FT-RAMAN SPECTROSCOPY****Iconomidou V.A.¹, Georgaka M.V.¹, Chryssicos G.², Gionis V.²,
Megalofonou P.³, and S.J. Hamodrakas¹**¹*Department of Cell Biology & Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Athens
157 01*²*Institute of Theoretical and Physical Chemistry, N.H.R.F., Athens 11635*³*Department of Zoology - Marine Biology, Faculty of Biology, University of Athens, Athens
157 01*

Galeus melastomus is a species, the so-called Blackmouth catshark, distributed in the eastern Atlantic Ocean, from Norway to Senegal, and in the whole Mediterranean Sea. It shows a wide bathymetric range throughout the Mediterranean, in which it has been captured from depths of 55 to 1750 metres. It belongs to the Family Scyliorhinidae and it is an oviparous species, spawning all the year in the Mediterranean with a peak of activity in spring and summer. It gives birth to thirteen eggs at a time, which are left growing without parental protection. The developing embryo is protected by an ovoid, elongate, leathery eggcase, measuring 4 by 2 cm. The eggcase is a remarkable structure that combines mechanical tensile strength and toughness with high permeability to small molecules and ions. The eggcase is secreted by the D-zone of the oviducal gland. Some years ago, experiments involving X-ray diffraction, infrared spectroscopy and amino acid analysis in specimens of the eggcase of the species *Scyliorhinus canicula*, which is classified under the same family, provided strong evidence that the eggcase presents similarities with the mammalian collagen types IV, VI and X, on the basis of similarities at molecular level. In this study, we applied ATR-FT-IR spectroscopy and FT-Raman spectroscopy into two specimens of *Galeus melastomus* at different developmental stages, in order to detect similarities/differences with the corresponding eggcase of *Scyliorhinus canicula*, by studying the secondary structure of its protein components. The first indications from our experimental data strongly support that the eggcase of *Galeus melastomus* consists of collagen type IV.

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΓΕΝΟΤΥΠΟΥ ΤΗΣ *CERATITIS*
CAPITATA ΚΑΙ ΤΩΝ ΞΕΝΙΣΤΩΝ ΤΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ
ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ**

**Οικονόμου Κ., Στρατικόπουλος Η.¹, Αυγουστίνος Α., Ματθιόπουλος Κ.²,
Ζαχαροπούλου Α.**

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

¹Παρούσα διεύθυνση: *Department of Genetics and Development, Columbia University, New York, NY 10032*

²Παρούσα διεύθυνση: *Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.*

Η μεσογειακή μύγα αποτελεί το κύριο παράσιτο πολλών καλλιεργούμενων φρούτων προκαλώντας ετησίως μεγάλες καταστροφές σε γεωργικές καλλιέργειες. Η μελέτη του εντόμου τόσο σε γενετικό όσο και σε πληθυσμιακό επίπεδο μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην ανάπτυξη ή και τη βελτίωση αποτελεσματικών και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων ελέγχου. Οι μικροδορυφόροι είναι απλές επαναλήψεις ενός νουκλεοτιδικού μοτίβου που αποτελείται 1-6 ζεύγη βάσεων. Αποτελούν πολύ χρήσιμους γενετικούς δείκτες διότι είναι άφθονοι και διάσπαρτοι στο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών. Επιπλέον είναι υψηλά πολυμορφικοί, κληρονομούνται ως συνυπερέχοντες Μεντελικοί δείκτες και αναλύονται εύκολα μέσω PCR, χαρακτηριστικά που τους καθιστούν πολύτιμα εργαλεία για πληθυσμιακές και εξελικτικές μελέτες. Από τους μικροδορυφορικούς δείκτες που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριό μας, επιλέχθηκαν 10 με βάση το βαθμό πολυμορφισμού που έδειξαν σε εργαστηριακά στελέχη. Οι δείκτες αυτοί χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση 481 ενηλίκων ατόμων που προέρχονταν από 19 διαφορετικά δείγματα φρούτων που συλλέχθηκαν από εννέα διαφορετικές περιοχές της Δυτικής Ελλάδας και της Βόρειας Πελοποννήσου. Η γενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για κάθε γενετικό δείκτη σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου και επακόλουθη αυτοραδιογραφία. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μας, βρίσκεται σε εξέλιξη. Οι πρώτες ενδείξεις από την ανάλυση δείχνουν μια τάση για ομαδοποίηση των δειγμάτων τόσο σε σχέση με τη γεωγραφική προέλευση όσο και με τον ξενιστή.

**STUDY OF THE ASSOCIATION BETWEEN GENOTYPE OF
CERATITIS CAPITATA AND ITS HOST SPECIES USING
MICROSATELLITE MARKERS**

**Economou K., Stratikopoulos E.¹, Augoustinos A., Mathiopoulos K.²,
Zaharopoulou A.**

Department of Biology, University of Patras

¹*Present Address: Department of Genetics and Development, Columbia University, New
York, NY 10032*

²*Present Address: Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly,
Larissa*

C. capitata is the main pest of many cultivated fruits and responsible for a significant loss in annual products, resulting in great economic damage. Studies on the genetic and population analysis will make a contribution towards the development or the improvement of environmental friendly control methods. Microsatellites are tandem simple sequence repeats of short (1-6) nucleotide motifs. They are very important genetic markers because they are dispersed and abundant in most eukaryotic genomes. They are highly polymorphic, inherited as co-dominant Mendelian markers and easily scored by PCR. Consequently, they have become one of the most popular molecular markers with application in many studies, including analysis of natural populations and evolutionary studies. Ten of the microsatellite markers generated in our laboratory, were selected for this study, based on the degree of polymorphism in laboratory strains. A total of 481 adult flies, collected from nineteen different samples of fruits from nine different areas of west Greece and north Peloponnesus were screened. Genotyping was performed by polyacrylamide gel electrophoresis of the PCR products for each genetic marker, followed by autoradiography. The statistic analysis of our results is in progress. Preliminary data analysis shows a tendency for grouping of samples according to both geographic and host origin.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΞΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟΥ ΟΥΣΙΑΣ SPINOSAD

Ονουφριάδης Α., Παπαδοπούλου Χ., Φραντζιός Γ., Μαυραγάνη-
Τσιπίδου Π.

Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας,
Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 541 24 Θεσσαλονίκη

Η παρούσα μελέτη εντάσσεται σε ένα γενικότερο πλαίσιο ελέγχου της ανασυνδυαστικής και της μεταλλαξιγόνου δράσης διαφόρων ευρέως χρησιμοποιούμενων ουσιών. Η εντομοκτόνος ουσία Spinosad χρησιμοποιείται για τη καταπολέμηση ενός μεγάλου αριθμού εντόμων μεγάλης οικονομικής σημασίας. Θεωρείται φιλικό προς το περιβάλλον εντομοκτόνο, δεδομένου ότι είναι παράγωγο της αερόβιας ζύμωσης του βακτηρίου εδάφους *Saccharopolyspora spinosa*. Για τον καθορισμό της τοξικότητας του, χρησιμοποιήθηκε το έντομο *Drosophila melanogaster* και προσδιορίστηκε η τιμή LD₅₀ (Lethal Dose 50%), η οποία αποτελεί την κρίσιμη συγκέντρωση κάθε ουσίας, που προκαλεί το θάνατο στο 50% των ατόμων. Πραγματοποιήθηκαν χρόνιες επιδράσεις με διάφορες συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου (από 0,1 ppm έως 0,5 ppm) σε προνύμφες και ενήλικα άτομα *D. melanogaster*. Για τον έλεγχο της γενοτοξικής δράσης του Spinosad εφαρμόστηκε η δοκιμή SMART (Somatic Mutation And Recombination Test). Στην μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται ως πειραματόζωο το έντομο *D. melanogaster*, που θεωρείται ως ένα από τους ιδανικότερους οργανισμούς-μοντέλα για τον καθορισμό της τοξικότητας διαφόρων ουσιών. Γίνεται χρήση δύο γενετικών δεικτών (mwh και flr), που κάνουν δυνατή την αναγνώριση μεταλλάξεων ή ανασυνδυασμών σε άτομα trans-ετερόζυγα ως προς τους δυο αυτούς δείκτες. Στην παρούσα μελέτη έγινε χρόνια επίδραση με διάφορες συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου spinosad σε προνύμφες από την διασταύρωση θηλυκών ατόμων του στελέχους flr με αρσενικά άτομα του στελέχους mwh. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της μεταλλαξιγόνου και ανασυνδυαστικής δράσης της ουσίας έγινε με την καταγραφή του αριθμού των κηλίδων στα φτερά των εντόμων, σύγκριση τους με τον αντίστοιχο μάρτυρα και στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

**TOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF THE INSECTICIDE
SPINOSAD****Onoufriadis A., Papadopoulou C., Frantzios G., Mavragani-Tsipidou P.***Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Faculty of Sciences, Aristotle University, 541 24 Thessaloniki*

The present study is a part of a general project of screening the toxic and genotoxic activity of substances widely used as insecticides. Spinosad is a pesticide used for the control of a great number of insects of great economical importance. It is an aerobic fermentation product of the soil bacterium *Saccharopolyspora spinosa*. In order to test both the toxic and the genotoxic activities of Spinosad, *Drosophila melanogaster*, one of the best model-organisms was used. Its toxicity was estimated by calculating the LD₅₀ value (Lethal Dose 50%), which is the crucial dose of each individual compound that causes death to 50% of the tested larvae or adults. In the present study we used concentrations from 0.1ppm to 0.5ppm of Spinosad. For screening the genotoxic activity of the tested compound, the wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) was applied. The wing spot test makes use of the two recessive markers *mwh* and *flr* of *D. melanogaster*. The relative frequencies of events such as the induction of mitotic recombination, point mutations, deletions, and others, depend on the nature of the primary damage on DNA. They give rise to clones of mutant cells showing up as mosaic spots on the wings of the adult flies. The statistical analysis of the mosaic spots gives the answer about the mutagenic and/or recombinogenic effects of the tested agent.

ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Παναγιώτου Γ.*

*Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμιγκ"
Αλ. Φλέμιγκ 34, Βάρη 16672*

Οι αυξητικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίοι εμφανίζουν ενεργότητα πρωτεϊνικής κίνησης της τυροσίνης και επάγουν σήματα που καταλήγουν στην κυτταρική αύξηση. Έχει γίνει φανερό ότι οι παραδοσιακές προσεγγίσεις που εστιάζουν στη μελέτη μεμονωμένων μορίων είναι ανεπαρκείς για την πλήρη κατανόηση αυτών των πολύπλοκων διαδικασιών και συνεπώς οι καινοτόμες μεθοδολογίες της «βιολογίας συστημάτων» έχουν ήδη αρχίσει να εφαρμόζονται σε αυτό το ερευνητικό πεδίο. Η τεχνολογία της πρωτεωμικής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των μεταβολών που υφίστανται οι πρωτεΐνες ενός κυττάρου ή ιστού, μετά από επαγωγή των σηματοδοτικών μονοπατιών, τόσο σε ποιοτικό όσο και σε ποσοτικό επίπεδο. Στο εργαστήριο μας μελετώνται διάφορα συστήματα επιδεκτικά στη πρωτεωμική ανάλυση. Τα βιολογικά ερωτήματα που απευθύνονται μέσω αυτών των προσεγγίσεων αφορούν στις διαδικασίες ενεργοποίησης και αναστολής της κυτταρικής αύξησης, τη κυτταρική διαφοροποίηση και τον καρκινικό μετασχηματισμό. Η εφαρμογή δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης και η επακόλουθη ανάλυση με χρήση φασματογράφου μαζών, έχει οδηγήσει στην αναγνώριση ενός αριθμού πρωτεϊνών, αρκετές εκ των οποίων δεν είχαν συσχετιστεί στο παρελθόν με τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς. Κατέστη επίσης δυνατή η αναγνώριση μεταβολών που αποδίδονται στην παρουσία συγκεκριμένων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων αλλά και στην ενδοκυτταρική μετατόπιση των πρωτεϊνών. Τέλος, εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές μεθοδολογίες χρωματογραφίας συγγένειας για την απομόνωση πρωτεϊνικών συμπλόκων που εμπεριέχουν σηματοδοτικά μόρια και την αναγνώριση των αλληλεπιδρώντων συστατικών μέσω φασματογραφίας μαζών. Οι καινοτόμες αυτές προσεγγίσεις μπορούν να μας προσφέρουν μια πληρέστερη εικόνα της κυτταρικής απόκρισης σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα.

* Προσκεκλημένος ομιλητής

**PROTEOMIC ANALYSIS OF GROWTH FACTOR SIGNALLING
PATHWAYS****Panayotou G.****Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming"
34 Fleming St., Vari 16672*

Growth factors interact with specific cell-surface receptors, which have intrinsic protein tyrosine-kinase activity and elicit cascades of intracellular signaling events, culminating in cellular growth. In order to understand these complex processes, traditional approaches that focus on isolated components are not sufficient. It is increasingly becoming apparent that global approaches to analyze the complex networks of cellular signaling are required and therefore the modern methodologies of systems biology are beginning to be applied to this research area. Proteomic technology can be used for the detection of qualitative and quantitative changes of proteins that occur upon activation of these signaling pathways. We have established several systems that are amenable to proteomic analysis, including the comparison of growth-factor stimulated and resting cells, the over-expression of oncogenic receptors and the use of transgenic mice in which specific signaling components have been altered. The issues addressed include activation and inhibition of cell growth, cellular differentiation and oncogenic transformation. Using two-dimensional electrophoresis followed by mass spectrometric analysis we have identified a number of proteins, several of which had not been implicated previously in the pathways activated by receptor-tyrosine kinases. In additions to changes in expression levels, we have also identified post-translational modifications as well as intracellular protein translocations. Finally, we have employed two distinct affinity purification strategies for the isolation of protein complexes involving signaling molecules, followed by the identification of the interacting components using mass spectrometry. These novel approaches can offer us a better picture of the complex machinery that regulates cellular responses to extracellular stimuli and help us understand the specificity inherent in these processes.

* Invited speaker

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΥ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ (TMS1) ΤΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ ΟΥΡΙΚΟΥ-ΞΑΝΘΙΝΗΣ ΥΑΡΑ

Πανταζοπούλου Α. και Γ. Διαλλινάς

*Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη 15781, Αθήνα*

Στην παρούσα εργασία μελετάμε το ρόλο της πρώτης διαμεμβρανικής περιοχής (TMS1) του μεταφορέα UapA του *Aspergillus nidulans*. Μέσω μιας μοριακής γενετικής ανάλυσης εξετάσαμε αρχικά τον ρόλο του μοτίβου Q⁸⁵H⁸⁶, το οποίο είναι συντηρημένο στην οικογένεια NAT. Τα μεταλλαγμένα ως προς το Q85 στελέχη ήταν *κρυοευαίσθητα* με μειωμένη (Q85L, Q85N, Q85E) ή εκμηδενισμένη (Q85T) ικανότητα μεταφοράς πουρινών, χωρίς επίδραση στη φυσιολογική δέσμευση του υποστρώματος ή στη στόχευση του μεταφορέα στην πλασματική μεμβράνη. Όλα τα μεταλλαγμένα ως προς το H86 στελέχη είχαν σχεδόν φυσιολογική συγγένεια δέσμευσης των υποστρωμάτων, αλλά τα περισσότερα (H86A, H86K, H86D) παρουσίασαν κρυοευαισθησία, φαινότυπος που φάνηκε ότι σχετίζεται με μερική «παγίδευση» στο ενδοπλασματικό δίκτυο και/ή με στόχευση του UapA σε μικρά χυμοτόπια. Μόνο το μετάλλαγμα H86N έδειξε λειτουργία παρόμοια με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη, υποδεικνύοντας πως τα κατάλοιπα ιστιδίνης ή ασπαραγίνης μπορεί να δρουν ως δότες ιόντων υδρογόνου σε αλληλεπιδράσεις που επηρεάζουν την τοπολογία του UapA. Συμπερασματικά, τα κατάλοιπα Q85 και H86 πιθανώς επηρεάζουν την πλαστικότητα του UapA, με έναν τρόπο που επιδρά είτε στην κατάλυση της μεταφοράς αυτής καθαυτής (Q⁸⁵), είτε στην έκφραση στην πλασματική μεμβράνη (H⁸⁶). Στη συνέχεια, εξετάσαμε το ρόλο ενός διαμεμβρανικού μοτίβου επανάληψης λευκινών (LR), που συναντάται στο TMS1 του UapA αλλά όχι στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας NAT. Μεταλλαγές αντικατάστασης των λευκινών με κατάλοιπα αλανίνης επηρέασαν διαφορετικά τη συγγένεια δέσμευσης ξανθίνης και ουρικού οξέος, φαινόμενο που ήταν θερμοεξαρτώμενο. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει πως η παρουσία των L⁷⁷, L⁸⁴ και L⁹¹ επηρεάζει την πλαστικότητα του ενεργού κέντρου δέσμευσης υποστρωμάτων του UapA, με τρόπο που είναι απαραίτητος για την υψηλή συγγένεια του μεταφορέα ως προς το ουρικό οξύ. Τέλος, σχολιάζεται ένας πιθανός ρόλος του LR μοτίβου σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις ή σε πιθανό διμερισμό του UapA.

**ON THE ROLE OF THE FIRST TRANSMEMBRANE SEGMENT
OF THE UAPA URIC ACID-XANTHINE TRANSPORTER****Pantazopoulou A., and G. Diallinas***Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimioupolis 15781,
Athens*

UapA, a member of the NAT/NCS2 family, is a high affinity, high capacity, uric acid-xanthine/H⁺ symporter in *Aspergillus nidulans*. Determinants critical for substrate binding and transport lie in a highly conserved signature motif downstream from TMS8 and within TMS12. Here we examine the role of TMS1 in UapA biogenesis and function. First, using a mutational analysis, we studied the role of a short motif (Q⁸⁵H⁸⁶), conserved in all NATs. Q85 mutants were cryosensitive, decreasing (Q85L, Q85N, Q85E) or abolishing (Q85T) the capacity for purine transport, without affecting physiological substrate binding or expression in the plasma membrane. All H86 mutants showed nearly normal substrate binding affinities but most (H86A, H86K, H86D) were cryosensitive, a phenotype associated with partial ER retention and/or targeting of UapA in small vacuoles. Only mutant H86N showed nearly wild-type function, suggesting that His or Asn residues might act as H donors in interactions affecting UapA topology. Thus, residues Q85 and H86 seem to affect the flexibility of UapA, in a way that affects either transport catalysis *per se* (Q⁸⁵), or expression in the plasma membrane (H⁸⁶). We then examined the role of a transmembrane Leu Repeat (LR) motif present in TMS1 of UapA, but not in other NATs. Mutations replacing Leu with Ala residues altered differentially the binding affinities of xanthine and uric acid, in a temperature-sensitive manner. This result strongly suggested that the presence of L⁷⁷, L⁸⁴ and L⁹¹ affects the flexibility of UapA substrate binding site, in a way that is necessary for high affinity uric acid transport. A possible role of the LR motif in intramolecular interactions or in UapA dimerization is discussed.

**ΑΣΥΜΜΕΤΡΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ ΣΤΑ
ΠΡΟΦΑΣΙΚΑ ΜΗΤΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΤΟΜΑΤΙΚΩΝ
ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *Zea mays***

Παντερής Ε., Αποστολάκος Π., Γαλάτης Β.

*Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη, 157 81 Αθήνα*

Στα αναπτυσσόμενα στοματικά σύμπλοκα των αγρωστωδών, τα μητρικά κύτταρα των καταφρακτικών (ΜΚ) εκπέμπουν επαγωγικά ερεθίσματα που καθιερώνουν πολικότητα στα μητρικά κύτταρα των παραστοματικών (ΜΠ), τα οποία διαιρούνται ασύμμετρα δημιουργώντας τα παραστοματικά κύτταρα. Κατά την καθιέρωση πολικότητας, ο πυρήνας των ΜΠ μεταναστέυει και εγκαθίσταται στο περιφερειακό κυτόπλασμα γειτονικά με το επάγον ΜΚ. Κατά την πρόφαση, δημιουργείται μια μονοπολική προφασική άτρακτος μικροσωληνίσκων (ΜΣ), η οποία συνδέεται με τη προπροφασική ζώνη ΜΣ, δημιουργώντας ένα κώνο ΜΣ που καλύπτει την επιφάνεια του πυρήνα που βρίσκεται μακριά από το επάγον ΜΚ. Η επιφάνεια του πυρήνα που γειτονεύει με το ΜΚ επενδύεται από μικρονημάτια ακτίνης (ΜΑ) προερχόμενα από το σύστημα ΜΑ που επενδύει το τοίχωμα του ΜΠ που συνορεύει με το ΜΚ. Δηλαδή ο προφασικός πυρήνας του ΜΠ περιβάλλεται κατά το ένα ήμισυ από προφασική άτρακτο ΜΣ και κατά το άλλο ήμισυ από ΜΑ, φαινόμενο που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά. Αποδιοργάνωση των ΜΣ με ορυζαλίνη είχε ως αποτέλεσμα τη σταδιακή απομάκρυνση του προφασικού πυρήνα από την πολική θέση. Αντίθετα, αποδιοργάνωση των ΜΑ με κυτοχλασίνη Β ανέστειλε τη μετανάστευση του πυρήνα των ΜΠ στην πολική θέση, μη επηρεάζοντας όμως όσους πυρήνες βρίσκονταν ήδη εκεί. Επίσης, απουσία ΜΑ διαταρασσόταν ο προσανατολισμός του άξονα της μιτωτικής ατράκτου. Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι ΜΣ σχετίζονται με την αγκυροβόληση του προφασικού πυρήνα του ΜΠ στην πολική θέση, ενώ τα ΜΑ με τη μετανάστευσή του εκεί, καθώς και με τη σταθεροποίηση του ενός πόλου της ατράκτου γειτονικά με το επάγον ΜΚ.

Το έργο αυτό ενισχύθηκε οικονομικά από το Υπουργείο Παιδείας και τη Ευρωπαϊκή Ένωση (πρόγραμμα Πυθαγόρας Ι) και το ΕΚΠΑ (πρόγραμμα Καποδίστριας).

**CYTOSKELETAL ASYMMETRY IN PROPHASE SUBSIDIARY
CELL MOTHER CELLS OF *Zea mays*****Panteris E., Apostolakos P., Galatis B.**

*Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens,
157 81 Greece*

In developing stomatal complexes of grasses, guard cell mother cells (GMCs) induce polarization of subsidiary cell mother cells (SMCs), which divide asymmetrically to produce the subsidiary cells. By establishment of polarity, the SMC nucleus migrates and settles at the cortical cytoplasm adjacent to the inducing GMC. At prophase, a monopolar prophase microtubule (MT) spindle is organized that is connected with the preprophase MT band, forming thus a cone of MTs, which surrounds the nuclear surface distal to the inducing GMC. The nuclear surface proximal to the inducing GMC is surrounded by actin filaments (AFs) originating from the AF patch that lines the SMC wall adjacent to the inducing GMC. Consequently, one hemisphere of the SMC prophase nucleus is surrounded by the monopolar MT spindle, while the other hemisphere by AFs, which is observed for the first time. Disruption of the MTs with oryzalin resulted to a gradual escape of the prophase nucleus from the polar site. Contrarily, AF disruption by cytochalasin B inhibited the migration of SMC nuclei to the polar site but did not affect those already settled there. In addition, in the absence of AFs, the axis of the mitotic spindle was disturbed. According to the above, it seems that anchoring of the SMC prophase nucleus to the polar site is MT-dependent, while AFs contribute to the migration of the nucleus there, as well as to the stabilization of one spindle pole proximal to the inducing GMC.

This work was financed by grants from the Hellenic Ministry of National Education and Religious Affairs and the EU (project ‘Pythagoras’) and the University of Athens (project ‘Kapodistrias’).

**ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΤΟΠΙΟΥ: Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΡΙΚΩΝ ΤΟΠΙΟΥ
ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ, ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΩΝ
ΠΕΡΙΟΧΩΝ NATURA2000**

Παντής Ι.Δ.*

Τομέας Οικολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ.

Η οικολογία τοπίου, ένας ραγδαία αναπτυσσόμενος κλάδος της οικολογίας, μελετά την επίδραση της δομής του τοπίου στις οικολογικές διεργασίες, που καθορίζουν την αφθονία και διανομή των οργανισμών στο χώρο. Η δομή του τοπίου αναφέρεται συνδυαστικά τόσο στην αφθονία των διαφορετικών ενδιαιτημάτων όσο και στη χωρική κατανομή τους. Για την περιγραφή της δομής του τοπίου έχουν αναπτυχθεί εξειδικευμένοι δείκτες-μετρικές που αναφέρονται σε ολόκληρο το τοπίο, στα επιμέρους ενδιαιτήματα που το συνθέτουν, και στα επιμέρους κατατμήματα (patches) του κάθε ενδιαιτήματος. Οι 70 αυτές μετρικές μπορούν να διακριθούν σε επτά κατηγορίες ανάλογα με το χαρακτηριστικό που περιγράφουν. Με τη χρήση των μετρικών τοπίου, στην περιοχή του Εθνικού Δρυμού Βίκου-Αώου, μελετήσαμε τις αλλαγές στο χωρικό πρότυπο της βλάστησης από το 1945 έως 1995. Παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση της δασοκάλυψης, μείωση του κατακερματισμού και της ισοκατανομής, και αύξηση της διαθέσιμης επιφάνειας πυρήνα των ενδιαιτημάτων. Ερευνήσαμε την επίδραση της αγροτικής δραστηριότητας στην ποικιλότητα ενδιαιτημάτων σε όλες τις περιοχές του δικτύου Natura2000. Παρατηρήσαμε ότι η έκταση των καλλιεργειών επηρέασε μόνο την ισοκατανομή των ενδιαιτημάτων και όχι την αφθονία τους. Ομαδοποιήσαμε τους υγρότοπους της σύμβασης Ramsar με βάση τις μετρικές τοπίου, και η ανάλυση ανέδειξε τη σημασία της ανθρώπινης παρέμβασης και των μικροπεριβαλλοντικών χαρακτηριστικών στη διαμόρφωση του χωρικού προτύπου του κάθε υγροτόπου. Κατασκευάσαμε στατιστικά μοντέλα πρόβλεψης της ποικιλότητας φυτικών ειδών σε συγκεκριμένους τύπους οικοτόπων. Τα μοντέλα που βασίστηκαν στα χωρικά πρότυπα των ενδιαιτημάτων απέδωσαν μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης της βιοποικιλότητας συγκριτικά με εκείνα που βασίστηκαν στα γεωγραφικά και τοπογραφικά χαρακτηριστικά της κάθε περιοχής. Συμπερασματικά, η θεωρία της οικολογίας τοπίου και η μεθοδολογία των μετρικών τοπίου διαμορφώνουν μία νέα προσέγγιση στην οικολογική έρευνα. Η προσέγγιση αυτή παρέχει πρόσθετες πληροφορίες για την περιγραφή και αξιολόγηση των προστατευόμενων περιοχών του δικτύου Natura 2000, βελτιώνοντας και εξειδικεύοντας τα μέτρα διαχείρισής τους.

* Προσκεκλημένος ομιλητής

**LANDSCAPE ECOLOGY: THE USE OF LANDSCAPE METRICS
FOR THE DESCRIPTION, EVALUATION AND MANAGEMENT
OF THE NATURA2000 NETWORK****Pantis J.D.****Department of Ecology, School of Biology, A.U.TH.*

Landscape ecology, a growing subdiscipline of ecology, is the study of how landscape structure affects the ecological processes that determine the abundance and spatial distribution of organisms. Landscape structure implies spatial heterogeneity and refers to both amounts of different habitat types and their spatial arrangement. For the description of landscape structure, special metrics-indices have developed for the entire landscape, the distinct habitat classes as well as for the patches. These 70 metrics can be distinguished into seven groups according to the characteristic they describe. With the application of landscape metrics, we investigated the dynamics of vegetation spatial pattern in the Vikos-Aoos National Reserve for the period 1945-1995. We recorded remarkable increase of forest cover, and core areas, as well as a significant decline of fragmentation and edge density. We studied the effect of agricultural land use on habitat diversity of all Natura 2000 sites. We found that the amount of cultivated land affected the dominance of the landscape but not habitat richness. We clustered the Ramsar wetlands of Greece based on landscape metrics. The results highlighted the importance of human activities and microenvironmental factors for the spatial configuration of the wetlands. We built statistical prediction models for the plant species diversity for specific habitat types. The models based on the spatial pattern of habitats accounted for a higher proportion of the biodiversity variance than the ones based on geographical and topographical features of the sites. The theory of landscape ecology and the methodology of landscape metrics form a new approach to ecological research. This approach offers additional information for the description and evaluation of the Natura 2000 protected areas network, and thus improves and specializes the management measures employed.

* Invited speaker

ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΟΣ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΤΟΥ *TRYPANOSOME* ΣΤΟ *S. CEREVISIAE*

Παπαγεωργίου Ι.^{1,2}, Σωτηριάδου Κ.¹ και Γ. Διαλλινάς²

¹Εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, 11521, Αθήνα

²Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη 15781

Οι μεταφορείς πουρινών των πρωτοζώων παρουσιάζουν ενδιαφέρον καθώς παίζουν ρόλο στην πρόσληψη απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Πρόσφατα κλωνοποιήθηκε ένας μεταφορέας νουκλεοτιδικών βάσεων του *T. brucei* (TbNBT1), ο οποίος παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για τις: αδερίνη, υποξανθίνη, ξανθίνη, γουανίνη, γουανοσίνη και αλλοπουρινόλη και μικρότερη για την ινοσίνη. Παρά τη σημασία των μεταφορέων νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδικών βάσεων, δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για τα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση των υποστρώματων τους. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε τυχαία και κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση για να διαλευκάνουμε σχέσεις δομής-λειτουργίας του μεταφορέα TbNBT1 όσον αφορά στη διαδικασία της μεταφοράς του υποστρώματος. Στην πρώτη περίπτωση, η έκφραση της μεμβρανικής πρωτεΐνης σε στέλεχος ζύμης που δεν εκφράζει τον ενδογενή μεταφορέα πουρινών, επέτρεψε την επιλογή μεταλλαγών οι οποίες προσδίδουν ανθεκτικότητα στην 8-αζαγουανίνη. Μοριακή και βιοχημική ανάλυση έδειξε ότι οι τυχαίες αυτές μεταλλαγές οδηγούν σε απώλεια λειτουργικότητας του TbNBT1 και εντοπίζονται στα διαμεμβρανικά τμήματα 5, 7 και 8 καθώς και στις ενδιάμεσες διαμεμβρανικές περιοχές. Αντίθετα, οι κατευθυνόμενες μεταλλαγές που σχεδιάστηκαν οδηγούν σε μείωση της συγγένειας του μεταφορέα για συγκεκριμένα υποστρώματα όπως: αδερίνη, ινοσίνη και 2, 6-διαμινοπουρίνη, στοιχείο που φανερώνει την πιθανή συμμετοχή της 7^{ης} διαμεμβρανικής περιοχής στην αναγνώριση του υποστρώματος. Η ταυτοποίηση συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων που σχετίζονται με τη δέσμευση του υποστρώματος θα αποκαλύψει τις διαμεμβρανικές περιοχές που σχηματίζουν το κανάλι διέλευσης του υποστρώματος και θα επιτρέψει τον κατευθυνόμενο σχεδιασμό εξειδικευμένων αντιπαρασιτικών παραγόντων.

**GENETIC ANALYSIS OF A *TRYPANOSOME* PURINE
TRANSPORTER IN *S. CEREVISIAE*****Papageorgiou I.^{1,2}, Soteriadou K.P.¹, and G. Diallinas²**

¹Laboratory of Molecular Parasitology, Hellenic Pasteur Institute, Athens ²Faculty of Biology, Department of Botany, University of Athens, Panepistimioupolis 15781, Athens

Purine transporters of protozoan parasites have attracted much attention because of their role in the salvage of essential nutrients and the accumulation of chemotherapeutic agents within the parasite. Recently, a high affinity nucleobase transporter (TbNBT1), from *T. brucei* was cloned. The respective protein shows high-affinity transport activity for adenine, hypoxanthine, xanthine, guanine, guanosine and allopurinol and moderate affinity for inosine. Despite the importance of nucleobase and nucleoside transporters in cellular nutrition, little is known about the amino acid residues involved in binding of their substrates. In the present study we used random mutagenesis with hydroxylamine and site-directed mutagenesis of the TbNBT1 to further elucidate the role of specific residues in the transport process. In the first case, expression of TbNBT1 in a *S. cerevisiae* strain lacking an endogenous purine transporter allowed the isolation of mutants conferring 8-azaguanine resistance. The biochemical and molecular characterization of these mutants showed that the respective mutations led to loss-of-function and map within the transmembrane domains 5, 7 and 8, as well as in the loops between these transmembrane segments of TbNBT1. The site-directed mutations designed are located in transmembrane segment 7 and show a loss of the transporter affinity for adenine. The biochemical characterization of the site-directed mutations, which are located in transmembrane segment 7 (TM7), show a reduced affinity for adenine, inosine and 2, 6-diaminopurine. Therefore it is plausible that these residues lie within the permeation pathway of TbNBT1. The identification of specific amino acid residues involved in substrate binding will reveal the transmembrane segments that are responsible for the formation of the substrate permeation pathway.

**ΑΡΧΑΙΟΖΩΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΛΟΓΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ
ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΣΚΑΦΗ ΤΟΥ ΟΙΚΙΣΜΟΥ ΝΕΟΛΙΘΙΚΗΣ ΕΠΟΧΗΣ
«ΆΓΙΟΣ ΒΛΑΣΗΣ» (ΑΤΑΛΑΝΤΗ, ΦΘΙΩΤΙΔΑ)**

Παπαδοπούλου Α., Ψαθή Ε. και Σ. Κ. Μανώλης

*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα*

Αρχαιοζωολογία είναι η μελέτη των ζωικών καταλοίπων από αρχαιολογικές θέσεις. Τα κατάλοιπα αποτελούνται κυρίως από τα σκληρά μέρη του σώματος όπως οστά, δόντια, κελύφη ή κέρατα. Αυτού του είδους η μελέτη βοηθά τους αρχαιολόγους στην ανασύσταση του ανθρώπινου διαιτολογίου καθώς και στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων του ανθρώπου με τα ζώα και το ευρύτερο περιβάλλον του συμπληρώνοντας έτσι την εικόνα μας για τη μορφή των τότε κατοικούμενων περιοχών. Η παρούσα εργασία αφορά στην αρχαιοζωολογική μελέτη του οστεολογικού υλικού του Νεολιθικού οικισμού της θέσης «Άγιος Βλάσης» στην Αταλάντη. Στη διάρκεια της Νεολιθικής περιόδου εμφανίζονται, αρχικά στη Μέση Ανατολή, οι πρώτοι μόνιμοι ή ημιμόνιμοι οικισμοί. Ταυτόχρονα συντελείται το πέρασμα από το τροφосуλεκτικό στάδιο στο παραγωγικό στάδιο τροφής. Εμφανίζονται η γεωργία και η κτηνοτροφία ενώ περιορίζεται το κυνήγι των μεγάλων θηραμάτων. Τα ζωικά είδη τα οποία εκτρέφονταν στον Άγιο Βλάση ήταν τα αιγοπρόβατα, οι χοίροι και τα βοοειδή με τα πρώτα να υπερτερούν αριθμητικά έναντι των άλλων. Επίσης φαίνεται ότι οι κάτοικοι της θέσης αυτής είχαν και κυνηγετική δραστηριότητα εξαιτίας των δειγμάτων αγρίων ειδών ελαφιών και ζαρκαδιών. Ακόμη φαίνεται ότι ήταν συχνή και η προσφορά των υπολειμμάτων της ανθρώπινης κατεργασίας ως τροφή στα εξημερωμένα σαρκοφάγα ζώα που συνυπήρχαν μαζί τους.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το Πρόγραμμα «Καποδίστριας» του Ειδικού Λογαριασμού Κονδυλίων Έρευνας (Επιτροπή Ερευνών, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών)

**ARCHAEOZOOLOGICAL STUDY OF FAUNAL REMAINS
FROM THE NEOLITHIC SETTLEMENT “AGIOS VLASIS”
(ATALANTI, FTHIOTIDA, GREECE)****Papadopoulou A., Psathi E. & S.K. Manolis***Department of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, National & Kapodistrian
University of Athens, Panepistimiopolis 15784 Athens, Greece*

Archaeozoology is the study of animal remains from archaeological sites. The remains consist primarily of the hard parts of the body such as bones, teeth, shells and horns. This kind of study helps archaeologists to reconstruct past human nutrition habits and to understand the interrelationships between people, animals, and the environment completing our picture of the kind of environments humans have inhabited. This project is about the archaeozoological study of the bone material of the Neolithic settlement “Agios Vlasis”, Atalanti. During the Neolithic period the first permanent or semi-permanent settlements appear, at first at the Middle East. Simultaneously the transformation from the gathering to the productive way of feeding occurs. Agriculture and herding appear, whilst the hunting of large game is limited. The animal species that were bred in Agios Vlasis were sheep, goats and cattle, the first two being predominant in number. It is also obvious that the inhabitants of this site had some hunting activity as well, because of the wild species of deer and roe deer. Frequent enough was to dispose the remains of human processing as food for the domesticated carnivores that co-existed with them.

*This work is funded by the Programme “Kapodistrias” of the Special Research Account
(National & Kapodistrian University of Athens)*

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ ΒΑΤΡΑΧΟΥ *Rana ridibunda* ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΧΕΙΜΕΡΙΑΣ ΝΑΡΚΗΣ

Παπαθανασίου Ι., Κυριακοπούλου-Σκλαβούνου Π., Μιχαηλίδης Β.

Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο
Θεσσαλονίκης, TK 541 24 Θεσσαλονίκη E-mail: Kyriakop@bio.auth.gr

Η κυριότερη αντίδραση των βατράχων των εύκρατων περιοχών κατά τις περιόδους χαμηλών θερμοκρασιών περιβάλλοντος είναι η είσοδός τους σε χειμρία νάρκη η οποία χαρακτηρίζεται από μειωμένη δραστηριότητα των ζώων και σημαντική μείωση του μεταβολικού τους ρυθμού. Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να μελετηθούν οι βιοχημικές προσαρμογές του βατράχου *Rana ridibunda* κατά τη διαχείμαση. Για το λόγο αυτόν υπολογίστηκαν οι μέγιστες δραστηριότητες των γλυκολυτικών ενζύμων εξωκινάση ΗΚ), αλδολάση (ALD), κινάση του πυροσταφυλικού οξέος (PK) και αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (LDH) στην καρδιά και στο γαστροκνήμιο μυ των βατράχων. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος στους ίδιους ιστούς. Τα ζώα διατηρήθηκαν σε θαλάμους που τοποθετήθηκαν έξω από το εργαστήριο για χρονικό διάστημα πέντε μηνών (Οκτώβριος 2004–Μάρτιος 2005). Κάθε εβδομάδα τα ζώα απομακρύνονταν και συλλέγονταν οι ιστοί τους οι οποίοι αποθηκεύονταν στους -80°C μέχρι τον προσδιορισμό των δραστηριοτήτων των παραπάνω ενζύμων και της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος σύμφωνα με γνωστές μεθόδους. Επίσης άτομα εγκλιματίστηκαν για 15 μέρες στους 5°C (πειραματικές συνθήκες) προκειμένου να εξετασθεί μόνο η επίδραση της θερμοκρασίας στον μεταβολικό τους ρυθμό. Στην περίπτωση αυτή, οι ιστοί συλλέγονταν κάθε 5 ημέρες και ακολουθούσαν οι μετρήσεις όπως περιγράφονται παραπάνω. Κατά τη διάρκεια της διαχείμασης παρατηρήθηκε αύξηση των δραστηριοτήτων των γλυκολυτικών ενζύμων εκτός της L-LDH. Οι μεταβολές της δραστηριότητας της L-LDH σε σχέση με τις αλλαγές της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος δείχνουν την ισχυρή επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική δραστηριότητα, κάτι που υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα της δεύτερης σειράς πειραμάτων. Η αύξηση της δραστηριότητας των υπολοίπων γλυκολυτικών ενζύμων ίσως δείχνει μια αντίδραση αντιστάθμισης του μεταβολικού ρυθμού στις χαμηλές θερμοκρασίες, όπως αναφέρεται και για άλλα εξώθερμα ζώα.

**BIOCHEMICAL RESPONSES OF THE FROG *Rana ridibunda*
DURING HIBERNATION****Papathanasiou I., Kyriakopoulou-Sklavounou P., Michaelidis B.***Department of Zoology, Faculty of Biology, School of Science, Aristotle University of
Thessaloniki, GR-541 24 Thessaloniki*

Physiological processes of ectothermic animals are strongly affected by ambient temperature. Frogs inhabiting temperate zone tolerate low winter temperatures by entering hibernation. This adaptive response is characterized by reduced activity of animals and a decrease in their metabolic rate. The aim of the present study was to investigate the biochemical responses and mechanisms that contribute in depressing metabolic rate in the frog *Rana ridibunda* during hibernation. So, the maximum activities of the glycolytic enzymes, hexokinase (HK), aldolase (ALD), pyruvate kinase (PK) and L-lactate dehydrogenase (L-LDH) were determined in heart and gastrocnemius muscle of frogs. Also, the levels of anaerobic end-product lactic acid were determined in the same tissues. Frogs immediately after their field collection were placed in terrariums and kept outdoors for a period of 5 months (October 2004-March 2005). Individuals were drawn out every week and tissues were dissected and stored at -80°C until the determination of enzymatic activities and the levels of lactic acid. In a second series of experiments frogs were maintained at 5°C for 15 days in order to examine only the effects of low temperature on the enzyme activities. In the latter case animals were sacrificed every 5 days and the tissues were treated as reported above. Hibernation caused a significant increase in the activities of all glycolytic enzymes examined except for L-LDH. The activity of L-LDH decreased in the tissues indicating a strong impact of hibernation on the glycolytic rate. The pattern of ambient temperature changes and that of L-LDH activity indicate a strong influence of temperature on the enzymatic activity. The latter is supported by the results obtained in the second series of experiments. The observed increases in the activities of rest examined enzymes may indicate a compensation for low ambient temperature as reported for many other ectotherms.

ΧΡΩΜΑΤΙΝΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΠΟΛΥΟΞΙΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ: ΡΟΛΟΣ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

Παπαμαρκάκη Θ.*

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τα τελευταία χρόνια, έχει μελετηθεί εκτενώς ο ρόλος της δομής της χρωματίνης στη ρύθμιση της μεταγραφής. Οι συνδετικές ιστόνες H1 συνδέονται δυναμικά στα νουκλεοσώματα στο σημείο εισόδου/εξόδου του DNA και επάγουν το σχηματισμό δομών χρωματίνης ανώτερης τάξης (1). Κατά συνέπεια, η ρύθμιση της σύνδεσης/αποσύνδεσης αυτών των πρωτεϊνών καθορίζει τη δυνατότητα πρόσβασης του νουκλεοσωμικού DNA σε μεταγραφικούς παράγοντες. Πυρηνικές πρωτεΐνες που περιέχουν πολυγλουταμικές περιοχές (πολυΕ-πρωτεΐνες) συνδέονται με την ιστόνη H1 και επηρεάζουν την αλληλεπίδραση της H1 με τη χρωματίνη (3, 4). Η υπερέκφραση αυτών των πρωτεϊνών στα κύτταρα αυξάνει τη δυνατότητα πρόσβασης της χρωματίνης σε πέψη με μικροκοκκική νουκλεάση και προκαλεί αποσυμπύκνωση της χρωματίνης. Τα αποτελέσματά μας προτείνουν έναν ρόλο των πολυ-Ε πρωτεϊνών στη ρύθμιση της δομής χρωματίνης και της γονιδιακής έκφρασης (5).

Βιβλιογραφία

1. van Holde, K.E. and Zlatanova, J. (2006) *J. Biol. Chem.* in press.
2. Misteli, T. (2001) *Science* 291, 843-847.
3. Karetsoy, Z., Sandaltzopoulos, R., Frangou-Lazaridis, M., Lai, C-Y., Tsolas, O., Becker, P.B. and Papamarcaki, T. (1998) *Nucleic Acids Res.* 13, 3111-3113.
4. Martic, G., Karetsoy, Z., Kefala, K., Clapier, C., Straub, T., and Papamarcaki, T. (2005) *J. Biol. Chem.* 280:16143-16150.
5. Karetsoy, Z., Kretsovali, A., Murphy, C., Tsolas, O., and Papamarcaki T., (2002) *EMBO Reports* 3, 361-366.

* Προσκεκλημένη ομιλήτρια

**CHROMATIN PROTEINS CONTAINING POLYACIDIC
STRETCHES: INVOLVEMENT IN THE REGULATION OF
STRUCTURE AND FUNCTION OF CHROMATIN****Papamarcaki Th.****Laboratory of Biological Chemistry, Medical School, University of Ioannina, 451 10
Ioannina, Greece.*

In recent years, the connection between chromatin structure and its transcriptional activity has attracted considerable experimental effort. H1 linker histones bind to nucleosomes in a dynamic fashion and prevent the unpeeling of DNA from the histone surface at the point of entry of the DNA into the nucleosome (1). Thus, controllable binding/displacement of these proteins to the nucleosome entry/exit point determines the accessibility of the nucleosomal DNA to the transcriptional machinery and creates 'windows of opportunity' for either 'opening' or 'closing' factors to bind. Nuclear proteins containing long polyglutamic stretches (poly-E proteins) bind to histone H1 and modulate the interaction of H1 with chromatin (3, 4). Overexpression of these proteins in HeLa cells increases the accessibility of chromatin to micrococcal nuclease digestion and induces global chromatin decondensation. Measurement of the polyE-proteins mobility by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) indicates that they move very rapidly throughout the cell nucleus (4). Our data propose a role of poly-E proteins in the regulation of higher-order chromatin structure and point to their involvement in gene regulation (5).

References

6. van Holde, K.E. and Zlatanova, J. (2006) *J. Biol. Chem. in press.*
7. Misteli, T. (2001) *Science* 291, 843-847.
8. Karetsoy, Z., Sandaltzopoulos, R., Frangou-Lazaridis, M., Lai, C-Y. , Tsolas, O., Becker, P.B. and Papamarcaki, T. (1998) *Nucleic Acids Res.* 13, 3111-3113.
9. Martic, G., Karetsoy, Z., Kefala, K., Clapier, C., Straub, T., and Papamarcaki, T. (2005) *J.Biol. Chem.* 280:16143-16150.
10. Karetsoy, Z., Kretsovali, A., Murphy, C., Tsolas, O. , and Papamarcaki T., (2002) *EMBO Reports* 3, 361-366.

* Invited speaker

**ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΥΣΙΜΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ
ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΣΕ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ**

Παπανικολάου Β., Καλιάφας Α.

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500, Ρίο Πατρών

Η βιοαιθανόλη παράγεται από την αλκοολική ζύμωση σακχαρούχων, αμυλούχων και κυτταρινούχων πρώτων υλών. Η χρήση της ως εναλλακτικό καύσιμο (βιοκαύσιμο), μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην μείωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Στην βιοτεχνολογική παραγωγή αιθανόλης έχει μελετηθεί εκτεταμένα η χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων, ως μέσο για τη αύξηση της παραγωγικότητας των ζυμώσεων. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η προοπτική αξιοποίησης ενός φυσικού υλικού, ως φορέα ακινητοποίησης των κυττάρων της ζύμης για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Ο φορέας αυτός (ελίφη) αποτελεί το εσωτερικό του αποξηραμένου καρπού του φυτού *Luffa cylindrica* και συνιστά ένα ινώδες πλέγμα. Σε όλα τα πειράματα με βιοαντιδραστήρες διαλείποντος έργου, παρουσία της ελίφης η παραγωγικότητα σε αιθανόλη αυξήθηκε σημαντικά και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις διπλασιάστηκε σε σχέση με τις αντίστοιχες ζυμώσεις απουσία του φορέα. Η βελτίωση είναι ιδιαίτερα σημαντική σε διαλύματα υψηλής αρχικής πυκνότητας σακχάρων ($> 18 \text{ }^{\circ}\text{Be}$), στα οποία τα κύτταρα της *Saccharomyces cerevisiae*, απουσία του φορέα αδυνατούν να αξιοποιήσουν το μεγαλύτερο ποσοστό των διαθέσιμων σακχάρων. Η θετική επίδραση της ελίφης, παρουσίασε σταθερότητα κατά την χρήση του ίδιου φορέα σε διαδοχικές ζυμώσεις, γεγονός που αποτελεί ένα επιπλέον θετικό στοιχείο που αφορά στη διαχρονική χρήση του. Η ακινητοποίηση των κυττάρων στον φορέα, μελετήθηκε με παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM). Επιβεβαιώθηκε πώς η επιφάνεια του φορέα καλύφθηκε από ένα εκτεταμένο βιολογικό υμένιο βιοκαταλύτη, το οποίο αυξάνει σημαντικά και με μικρό κόστος την παραγωγικότητα του βιοαντιδραστήρα. Συμπερασματικά, η ελίφη φαίνεται ότι συγκεντρώνει σημαντικά πλεονεκτήματα για να αποτελέσει η χρήση της μια ουσιαστική πρόταση για βελτίωση της τεχνολογίας παραγωγής βιοαιθανόλης.

**CELL IMMOBILIZATION SUPPORTS AND METHODS FOR
APPLICATION IN FUEL AND INDUSTRIAL ALCOHOL
PRODUCTION****Papanikolaou V., Kaliafas A.***Department of Biology, University of Patras, 26500, Rio, Patras*

Bioethanol is produced by the alcoholic fermentation process of sugar-containing, starchy and cellulosic raw materials. Its use as an alternative fuel (biofuel) could significantly contribute in air pollution reduction. Considerable amount of research has been carried out to develop new, highly efficient fermentation processes. One such area that has received great attention has been the use of immobilized cell systems. In the present study, we investigated the perspective to use a new natural material as a carrier for yeast cell immobilization. This material is Loofa sponge, consisting of a fibrous network and obtained from the matured dried fruit of *Luffa cylindrica*. All batch fermentations that carried out in the presence of loofa sponge, had enhanced productivities (even 100% increase related to the fermentations without the carrier). This was more intense at high sugar densities (18 °Be). The positive effect of loofa sponge showed significant viability, when the same carrier was used in repeated batch fermentations. Cell immobilization on the carrier, was confirmed after observation in Scanning Electron Microscope. Carrier's surface was covered by layers of biocatalyst (biofilm). Consequently, it was demonstrated that loofa sponge assembles enough advantages in order to constitute an effective suggestion, to improve the alcohol production technology.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΑ ΤΩΝ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑ GRAM ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

**Παπανικολοπούλου Β.Π., Τσιρίγος Κ.Δ., Μπάγκος Π.Γ.
και Σ.Ι. Χαμόδρακας**

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη Αθήνα 157 01*

Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, αποτελούν περίπου το 25-30% όλων των πλήρως προσδιορισμένων γονιδιωμάτων και επιτελούν μια σειρά από βιολογικά σημαντικές λειτουργίες. Η πολυπληθέστερη ομάδα αυτών, είναι οι α-ελικοειδείς διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες διαπερνούν τη λιπιδική διπλοστιβάδα με τη μορφή υδρόφοβων α-ελίκων. Για την πρόγνωση της δομής και της τοπολογίας των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών έχουν αναπτυχθεί μια σειρά από υπολογιστικές τεχνικές, των οποίων η λειτουργία βασίζεται σε Νευρωνικά Δίκτυα, σε στατιστικές αναλύσεις, ή σε Hidden Markov Models. Αντικείμενο μελέτης μας αποτέλεσαν οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες της εσωτερικής (κυτταρικής) μεμβράνης των αρνητικών αλλά και των θετικών κατά Gram βακτηρίων. Στην παρούσα ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι αλγόριθμοι πρόγνωσης: PRED-CLASS, MEMSAT, HMMTOP και PrediSi. Από την ανάλυση 194 πλήρως προσδιορισμένων βακτηριακών γονιδιωμάτων (129 αρνητικών, 65 θετικών κατά Gram), ένα σημαντικό εύρημα είναι ο εντοπισμός μιας σημαντικής διαφοράς στην κατανομή των πρωτεϊνών με διαφορετικό αριθμό διαμεμβρανικών τμημάτων. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι στα θετικά κατά Gram βακτήρια, οι πρωτεΐνες με 6 διαμεμβρανικά τμήματα είναι σημαντικά περισσότερες από ότι στα αρνητικά κατά Gram. Το γεγονός αυτό πρέπει να διερευνηθεί καθώς 6 διαμεμβρανικά τμήματα απαντώνται σε διάφορες οικογένειες διαμεμβρανικών μεταφορέων οι οποίες σχετίζονται με πρόσληψη ουσιών από τα βακτήρια. Γενικότερες διαφορές σε άλλες παραμέτρους (μήκη διαμεμβρανικών τμημάτων, κατανομές αμινοξέων κλπ) δεν παρατηρήθηκαν. Παρατηρήθηκε τέλος, μια διαφορετική συσχέτιση του λόγου των αμινοξέων (V+A)/(F+I) στα διαμεμβρανικά τμήματα, με το λόγο των νουκλεοτιδίων (G+C)/(A+T) σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Οι διαφορές αυτές πρέπει να ερευνηθούν περαιτέρω, αλλά πιθανόν να οφείλονται στη διαφορετική σύσταση των μεμβρανών σε λιπίδια και κατ' επέκταση σε διαφορές στην υδροφοβικότητα της μεμβράνης.

**COMPARISON OF MEMBRANE PROTEINS IN THE COMPLETE
GENOMES OF GRAM-POSITIVE AND GRAM-NEGATIVE
BACTERIA****Papanikolopoulou V.P., Tsirigos K.D., Bagos P.G.,
and S.J. Hamodrakas***Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Athens 157 01*

Transmembrane proteins constitute roughly 25-30% of all completely sequenced genomes and are responsible for a wide range of biologically important functions. The majority of these are the α -helical transmembrane proteins that span the lipid bilayer with segments formed by hydrophobic helices (isolated or in the form of a bundle). For the prediction of the structure and topology of transmembrane proteins, a series of computational methods have been developed, based on Neural Networks, statistical analyses, or Hidden Markov Models. The aim of this work was to perform a computational study of the transmembrane proteins located at the inner (cellular) membrane of the Gram-negative as well as the Gram-positive bacteria. In the present analysis we used the following prediction algorithms: PRED-CLASS, MEMSAT, HMMTOP and PrediSi. From the analysis of 194 completely sequenced genomes (129 of Gram-negative and 65 of Gram-positive bacteria), an important finding is the discovery of significant differences in the distribution of proteins with certain number of transmembrane segments. In particular, it was found that in the Gram-positive bacteria, the proteins with 6 transmembrane segments are significantly more abundant than in the Gram-negative ones. This is something that should be investigated further since various families of transmembrane carriers that are related with the import of substances into the bacterial cells, are known to possess 6 transmembrane segments. Significant differences in other studied parameters (length of transmembrane segments, distribution of amino-acids etc) were not observed. Finally, a difference in the correlation of the amino-acids ratio (V+A)/(F+I) in the transmembrane segments, with the nucleotide ratio (G+C)/(A+T) in the entire genome was observed. These differences should be investigated further, but they are likely due to the different composition of membranes in lipids and subsequently to differences in the membrane hydrophobicity.

**ΟΙ ‘ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΟΙ’ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ BmHMGA ΚΑΙ BmCHD1
ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΟΥΝ ΕΙΔΙΚΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΕΝΟΝΤΑΙ ΙΣΧΥΡΑ ΣΕ CIS-
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΥΠΟΚΙΝΗΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΧΟΡΙΟΥ ΤΟΥ
ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ**

Παπαντώνης Α., Κωνσταντινίδης Ν. και Ρ. Λεκανίδου

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

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του χορίου στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* εμφανίζουν αυστηρή εξειδίκευση σε ότι αφορά στον ιστό και το χρόνο έκφρασής τους. Εκφράζονται κατ’ αποκλειστικότητα στα επιθηλιακά κύτταρα που περιβάλλουν το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο και η διαδοχή της μεταγραφικής τους ενεργοποίησης ακολουθεί ένα καλά καθορισμένο αναπτυξιακό πρότυπο. Ο μοριακός μηχανισμός που ελέγχει τη συγκεκριμένη αλληλουχία γεγονότων φαίνεται πως εξαρτάται από τη δράση γενικών μεταγραφικών παραγόντων και σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετήσει τη συμμετοχή επιπλέον πρωτεϊνικών μορίων. Οι παράγοντες BmHMGA και BmCHD1 εμφανίζουν υψηλή ομολογία με πρωτεΐνες ‘αρχιτεκτονικού’ και ‘ρυθμιστικού’ χαρακτήρα. Πρόκειται για μόρια με δυνατότητες αναδόμησης χρωματινικών δομών και επαγωγής αλλαγών στη διαμόρφωση του δίκλωνου DNA μέσω κάμψης. Οι εν λόγω πρωτεΐνες εκφράστηκαν ως προϊόντα σύντηξης σε ετερόλογο βακτηριακό σύστημα και υπέστησαν μερικό καθαρισμό. Ακολούθησαν πειράματα αλληλεπίδρασης DNA-πρωτεϊνών *in vitro*, όπου παρατηρήθηκε ισχυρή και ειδική αλληλεπίδρασή τους με τμήματα υποκινητών των γονιδίων του χορίου. Σημειώνεται δε η δυνατότητά τους να προσδέονται συνεργατικά σε θέσεις των υποκινητών, ισχυροποιώντας περαιτέρω την αλληλεπίδραση. Τα πειραματικά αυτά δεδομένα, σε συνδυασμό με τα πρότυπα έκφρασης των δύο παραγόντων, συνιστούν ισχυρές ενδείξεις για τη συμμετοχή τους στους μοριακούς μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων του χορίου και επιβάλλουν τη διευκρίνιση του ρόλου τους.

Η ερευνητική προσπάθεια υποστηρίζεται από το πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ 2003 (03ΕΔ 124).

**‘ARCHITECTURAL’ PROTEINS BmHMGA AND BmCHD1
RECOGNIZE SPECIFICALLY AND BIND STRONGLY TO
SILKMOTH CHORION GENE PROMOTER CIS-ELEMENTS**

Papantonis A., Constandinides N., and R. Lecanidou

*Dept. of Biochemistry and Mol. Biology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian
University of Athens, 15701 Greece*

Genes that code for silkmoth *Bombyx mori* chorion proteins demonstrate strict specificity as regards their tissue and temporal expression. Being expressed solely in the follicular cells surrounding the developing oocyte, their transcriptional activation is consistent with a developmentally defined profile. The molecular mechanisms that underlie this sequence of events implicate specific general transcription factors and this study aims at the identification of additional proteins involved in this process. The BmHMGA and BmCHD1 factors are highly homologous to proteins of both ‘architectural’ and ‘regulatory’ nature, that are capable of remodeling chromatin structure and inducing bending to double-stranded DNA. These two silkmoth factors were expressed as fusion products in a heterologous bacterial system and affinity purified. Consequently, they were used in DNA-protein interaction assays *in vitro*, where specific and high affinity binding to chorion gene promoter fragments was observed. Synergistic binding of even higher affinity should be noted. The above data, in correlation to their expression patterns, comprise strong evidence for their implication in the chorion gene regulation cascade.

This study is supported by a PENED 2003 grant (03ED 124)

Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ *VNIR1* 1a/1a ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΦΥΛΟ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

Παπαχατζοπούλου Α.¹, Μητρόπουλος Κ.², Κολονέλου Χ.¹,
Μενούνος Π.Γ.³, Πατρινός Γ.Π.^{2,4}

¹ Πανεπιστήμιο Πατρών, Ιατρικό Τμήμα, Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Πάτρα, ² Asclepion Genetics, Lausanne, Ελβετία. ³ Σχολή Αξιοματικών Νοσηλευτικής, Ερευνητικό Εργαστήριο, Βύρωνας, Αθήνα, ⁴ Erasmus MC, Faculty of Medicine and Health Sciences, MGC-Department of Cell Biology and Genetics, Rotterdam, Ολλανδία

Οι φερομόνες είναι χημικές ουσίες, οι οποίες εκπέμπονται από τους ζωντανούς οργανισμούς και λειτουργούν ως σήματα μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους. Στα έντομα και στα θηλαστικά έχουν βρεθεί πολλά γονίδια για τους υποδοχείς τους, ενώ στον άνθρωπο έχει βρεθεί μόνον ένα τέτοιο λειτουργικό γονίδιο. Το γονίδιο αυτό είναι το *VNIR1*, που κωδικοποιεί, θεωρητικά, μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη με επτά έλικες. Το μετάγραφο του *VNIR1* ανιχνεύεται σε οσφρητικά-νευροενδοκρινή κύτταρα, που εδράζονται στη βάση των εσωτερικών ρινικών κοιλιοτήτων και μεταφέρουν μηνύματα, μέσω του άξονα τους από το βλεννώδες επιθήλιο στον ινιο-οσφρητικό βολβό. Για να μελετήσουμε εάν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο αλληλομόρφων (1a, 1b) του *VNIR1* γονιδίου, και αν αυτές οι διαφορές σχετίζονται με το φύλο, πραγματοποιήσαμε μία μελέτη, η οποία περιελάμβανε 77 άτομα από τον Ελληνικό πληθυσμό. Στη παρούσα μελέτη βρέθηκε, ότι αν και τα δύο αλληλόμορφα *VNIR1* 1a /1b προσδιορίστηκαν στα χρωμοσώματα ανδρών και γυναικών σε συχνότητες 31,3/27,0% και 68,7/73,0% αντίστοιχα, ο γονότυπος 1a/1a δεν παρατηρήθηκε ποτέ στις γυναίκες. Αντίθετα ο γονότυπος 1a/1a βρέθηκε στους άνδρες σε παρόμοια αναλογία αναμενομένων /παρατηρηθέντων ατόμων, με βάση την ισορροπία Hardy–Weinberg. Με δεδομένη την ισοκατανομή των συχνοτήτων των δύο αλληλομόρφων, στους άνδρες και στις γυναίκες και την υποθέση ότι οι λειτουργικές ιδιότητες των δύο τύπων των αλληλομόρφων που παράγουν την *VNIR1* πρωτεΐνη είναι διαφορετικές, και με βάση την προσομοίωση της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης με το λογισμικό TMHMM, η απουσία ομόζυγων 1a/1a γυναικών, είναι πιθανόν να σχετίζεται με ξεχωριστή, εξαρτώμενη από το φύλο, συμπεριφορά.

**GENDER-SPECIFIC ASSOCIATION OF HUMAN *VN1R1* 1a/1a
GENOTYPE IN THE HELLENIC POPULATION****Papachatzopoulou A.¹, Mitropoulos C.², Kolonelou Chr.¹,
Menounos P.G.³, Patrinos G.P.^{2,4}**

¹University of Patras, School of Medicine, Department of General Biology, Patras, Greece, ²Asclepion Genetics, Lausanne, Switzerland, ³Nursing Military Academy, Laboratory of Research, Vironas, Athens, Greece, ⁴Erasmus MC, Faculty of Medicine and Health Sciences, MGC-Department of Cell Biology and Genetics, Rotterdam, The Netherlands

Pheromones are water-soluble chemicals used as signals that provide information about gender, dominance and reproduction within individuals of the same species, while they elicit profound neuroendocrine and physiological changes. Although multiple functional pheromone receptor genes are present in insects and mammals, there is only one such gene found to be functional in humans, namely the *VN1R1* gene, encoding for a putative seven-transmembrane protein and whose transcripts are found in the human olfactory mucosa. We have undertaken a large mutation screening approach in 77 (40 males and 37 females) adult individuals from the Hellenic population to investigate whether the allelic differences, present in the *VN1R1* gene, are gender-specific. We found that, although both *VN1R1* 1a and 1b alleles are found in chromosomes of male and female subjects at a (male/female) frequency of 31.3/27.0% respectively, the 1a/1a genotype has never been observed in our female group, contrary to what is expected. On the other hand, the number of observed male subjects, bearing the *VN1R1* 1a/1a genotype, was similar to the one expected, as calculated by Hardy–Weinberg equilibrium. Those allelic differences potentially cause minor changes in the protein conformation and its transmembrane domains, as simulated by the TMHMM software. Given the more or less equal of 1a and 1b allelic frequencies in both male and female subjects and assuming that the functional properties of the two allelic forms of the *VN1R1* protein are different, based on the protein conformation simulation, our data suggest that the absence of female subjects in the Hellenic population, bearing the 1a/1a genotype, may correlate with distinct gender-specific behaviour.

**ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΟΓΚΟΓΟΝΟΥ
ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΤΙ ΤΟΥ *Agrobacterium tumefaciens* ΑΠΟ ΠΛΑΣΜΙ-
ΔΙΑΚΟΥΣ ΚΑΤΑΣΤΟΛΕΙΣ ΚΑΙ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΣΗΜΑΤΑ**

Παππά Κ.Μ.*

*Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη 15701, Αθήνα*

Το πλασμίδιο Τί του *A. tumefaciens* ευθύνεται για την ογκογένεση στα φυτά μέσω μεταφοράς DNA, ενώ πολλά από τα μοριακά συστατικά του μηχανισμού αυτού χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη σύγχρονη φυτική βιοτεχνολογία. Το Τί σε κανονικές συνθήκες βρίσκεται σε ένα αντίγραφο ανά κύτταρο, ενώ στον αυστηρό έλεγχο των αντιγράφων του βρέθηκε να παίζουν βασικό ρυθμιστικό ρόλο οι δύο πρώτες πρωτεΐνες, RepA και RepB, του *repABC* συνεργιώματος ανοδιπλασιασμού και καταμερισμού του πλασμιδίου. Οι RepA και RepB είναι μέλη οικογένειας πρωτεϊνών που συνεργάζονται για τον ακριβή καταμερισμό πλασμιδίων, φάγων και χρωμοσωμάτων στα διαρούμενα βακτηριακά κύτταρα, η πρώτη ως αυτοκαταστολέας και ΑΤΡάση, και η δεύτερη προσδεδεμένη σε περιοχές κεντρομεριδιακής φύσεως. Το γονίδιο *repC* του *repABC* συνεργιώματος εκφράζει τη ρεπλικάση του Τί πλασμιδίου και η ρύθμιση αυτής, όπως και όλου του συνεργιώματος, φάνηκε να εξαρτάται από καταστολή από τη RepA *in cis* και από συνδυασμό δράσης των RepA και RepB *in trans*. Εξίσου, η πρόσδεση της RepA σε DNA *in vitro* αποδείχτηκε να αυξάνεται παρουσία τόσο της RepB όσο και δι- ή τρι-φωσφορικής αδενοσίνης και καλύπτει περιοχή τουλάχιστον 70 βάσεων καθοδικά του κύριου υποκινητή του *repABC* συνεργιώματος. Ο τελευταίος, σε αντιδιαστολή από την καταστολή που υπόκειται από τις RepA/RepB πρωτεΐνες, βρέθηκε να ενεργοποιείται από δύο συστήματα μετάδοσης σήματος: α) από σύστημα quorum sensing (qs), που σε υψηλές πυκνότητες βακτηριακών κυττάρων οδηγεί σε ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα TraR, και β) από το δυαδικό σύστημα μεταγωγής σήματος VirA/VirG, που ανταποκρίνεται στην παρουσία ακετοσυριγκόνης ή άλλων φαινολικών ουσιών, εκλυόμενων από τραυματισμένα φυτά, οι οποίες επάγουν τελικά την ογκογένεση. Σε συνθήκες ενεργοποίησης ο μεταγραφικός παράγοντας VirG φωσφορυλιώνεται από την κινάση VirA, προσδένεται σε *vir*-box που προηγείται του κύριου *repABC* υποκινητή και ενεργοποιεί τη μεταγραφή. Αντίστοιχα, μετά από qs-επαγωγή σε πυκνούς πληθυσμούς βακτηρίων, ο μεταγραφικός ενεργοποιητής TraR, σε σύμπλοκο με τη φερομόνη 3-οξο-οκτανύλ-λακτόνη της ομοσερίνης, καταδείχτηκε να προσδένεται σε δύο *tra*-boxes ανοδικά του κύριου *repABC* υποκινητή και να ενεργοποιεί τρεις καινούργιους υποκινητές επιπρόσθετα του κύριου *repABC* υποκινητή. Η μεταγραφική ενεργοποίηση από το *vir* ή το qs σύστημα αποδείχτηκε αναλογικά εντονότερη παρουσία των RepA/RepB καταστολέων και τελικά καταλήγει σε αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του Τί πλασμιδίου κατά 4 φορές (*vir*-ενεργοποίηση) ή κατά 8 φορές (qs-ενεργοποίηση), με επακόλουθη αύξηση της ογκογένεσης σε ανώτερα φυτά.

* Προσκεκλημένη ομιλήτρια

**COPY NUMBER CONTROL OF THE ONCOGENIC Ti PLASMID
OF *Agrobacterium tumefaciens* BY PLASMID REPRESSORS AND
EXTRACELLULAR SIGNALS****Pappas K.M.****Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis, Athens 15701, Greece*

The Ti plasmid of *A. tumefaciens* is known to mediate DNA transfer and cause tumors in higher plants, whereas components of this mechanism are widely exploited nowadays in plant biotechnology. Under normal growth conditions, Ti is found in one copy per bacterial cell and this strict copy number control was proven to be exerted by the first two proteins, RepA and RepB, of the *repABC* replication and partitioning operon of the plasmid. RepA and RepB are members of a wide family of proteins collaborating in the proper partitioning of plasmids, phages and chromosomes in bacterial daughter cells, with RepA mostly acting as an autorepressor and an ATPase, and RepB as a centromere-binding protein. The *repC* gene of the *repABC* operon codes for the Ti replicase and its expression proved dependent on predominantly the RepA repressor *in cis* and both RepA and RepB *in trans*. RepA binding to DNA *in vitro* was found to increase in the presence of either RepB or adenosine di- and tri-phosphates, and led to protection of a 70-bp operator region downstream of the immediate *repABC* promoter. The latter, contrary to undergoing repression by RepA/RepB, was proven activated by two separate signaling systems: i) a quorum sensing (qs) high-cell density-dependent system which leads to activation of the transcriptional regulator TraR, and ii) a two component signal-transduction system mediated by the VirA/VirG phosphorelay proteins, known to respond to phenolic compounds such as acetosyringone, present in wounded plant exudates and inducing oncogenesis. Upon activation, the VirG transcriptional regulator undergoes phosphorylation by the VirA signal kinase, and VirG-P was shown to bind to a designated *vir*-box lying prior to the immediate *repABC* promoter and activate transcription. Likewise, at high-cell density (qs) conditions, TraR gets activated by its cognate inducing pheromone, 3-oxo-C8 HSL (OOHL), and the TraR(OOHL) complex proved to bind to two separate *tra*-boxes further upstream of the main *repABC* promoter and activate three new promoters and evidently the immediate *repABC* promoter, itself. The described transcriptional activation by the *vir* or qs system was more pronounced in the presence of the RepA/RepB repressors and resulted in Ti copy number increase of either 4-fold (*vir*-activation) or 8-fold (qs-activation). The last ultimately leads to an increase in oncogenesis, as monitored with the use of plant-substrate assays.

* Invited speaker

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΟΜΟΛΟΓΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ C/EBP ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΙΤΕΛΛΟΓΕΝΙΝΗΣ 1 ΣΤΟ ΔΙΠΤΕΡΟ *BACTROCERA OLEAE*

Παππάς Β.¹, Ντίνη Ε.², Λεκανίδου Ρ.², Κομητοπούλου Κ.¹

¹Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, ²Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Πανεπιστημιόπολη 157 81 Αθήνα

Η οικογένεια των CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBP) περιλαμβάνει μεταγραφικούς παράγοντες με δομή φερμουάρ λευκίνης, οι οποίοι εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, από τα σπονδυλωτά ως τα έντομα. Στα έντομα, έχουν χαρακτηριστεί δύο ομόλογα των C/EBP, ένα στο γένος *Drosophila* και ένα στον μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*. Στην *Drosophila*, το ομόλογο C/EBP καλείται *slbo* (*slow border cells*) και εμπλέκεται στην ωογένεση (βιτελλογένεση και μετανάστευση οριακών κυττάρων) και την βιωσιμότητα των εμβρύων. Στο *Bombyx mori*, το ομόλογο C/EBP παίζει ρόλο κατά την χοριογένεση. Στην παρούσα εργασία επιτελέστηκαν: α) η απομόνωση του ομόλογου C/EBP παράγοντα από το δίπτερο *Bactrocera oleae* (Δάκος της ελιάς), μετά από σάρωση γενωμικής βιβλιοθήκης Δάκου, β) η έκφρασή του σε ετερόλογο βακτηριακό σύστημα και ο έλεγχος της παραχθείσας πρωτεΐνης με πολυκλωνικό αντίσωμα για την SLBO πρωτεΐνη και γ) η απομόνωση και χαρακτηρισμός ενός ομόλογου γονιδίου των βιτελλογενινών στο *Bactrocera oleae*, μέσω σάρωσης της αντίστοιχης γενωμικής βιβλιοθήκης. Από τα παραπάνω προέκυψε ότι το *BoC/EBP*, κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο μήκους 457 αμινοξέων που, στην συντηρημένη βασική περιοχή, εμφανίζει ομολογία 88% με την αντίστοιχη της *Drosophila* και 78% με εκείνη του *Bombyx mori*. Το πολυπεπτίδιο που προέκυψε κατά την ετερόλογη έκφραση έχει MB 65 kDa. Τέλος, απομονώθηκε το ομόλογο γονίδιο της βιτελλογενίνης 1 στο *Bactrocera oleae*, τόσο η κωδική αλληλουχία, όσο και ο υποκινητής, όπου βρέθηκαν πιθανές θέσεις πρόσδεσης του C/EBP. Η λειτουργική μελέτη του παράγοντα C/EBP πρόκειται, αφ' ενός, να συνεισφέρει στην διαλεύκανση των μηχανισμών της ωογένεσης στα έντομα, και αφ'ετέρου, στην βιοτεχνολογική εκμετάλλευση της στειρότητας που ενδέχεται να προκύψει από καταστολή του γονιδίου C/EBP, στο οικονομικής σημασίας έντομο *Bactrocera oleae*.

Το έργο συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και Εθνικούς Πόρους (ΕΠΕΑΕΚ II) ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II και τον ΕΛΚΕ.

**ISOLATION OF THE *C/EBP* AND *VITELLOGENIN 1* HOMOLOGUES IN
THE DIPTERAN SPECIES *BACTROCERA OLEAE*****Pappas V.¹, Ntini E.², Lecanidou R.², Komitopoulou K.¹**

¹*Department of Genetics and Biotechnology, ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Athens. Panepistimiopolis 15784 Athens*

The CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBP) family includes transcription factors that have the basic region/leucine zipper structure and are implicated in various cellular processes, from vertebrates to insects. In insects, two *C/EBP* homologues have been characterized, one in *Drosophila* and the other in the silkworm *Bombyx mori*. In *Drosophila*, the *C/EBP* homologue is called *slbo* (*slow border cells*) and is implicated in oogenesis and embryonic lethality. In *Bombyx mori*, a role in choriogenesis has been attributed to the *C/EBP* homologue. In this study are presented: a) isolation of a *Bactrocera oleae* *C/EBP* homologue, after a *Bactrocera oleae* genomic library screening, b) its expression in a heterologous bacterial system and confirmation of the produced polypeptide by Western blotting with a polyclonal anti-SLBO *Drosophila* antibody c) the isolation and characterization of a *Bactrocera oleae* vitellogenin homologue, after screening of the genomic library. The functional analysis of the C/EBP factor is expected to result in further elucidation of the insect oogenesis mechanisms, as well as in the biotechnological exploitation of the sterility that may arise, due to gene silencing, in the economical importance insect *Bactrocera oleae*.

The project is co-funded by the European Social Fund and National Resources-(EPEAEK II) PYTHAGORAS II and ELKE

ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΕΩΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΑΠΟ ΖΥΜΟΥΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ

Παραπούλη Μ.¹, Περυσινάκης Α.¹, Χατζηλουκάς Ε.¹, Φράγκος-
Λιβάνιος Α.², Σαμιωτάκη Μ.², Παναγιώτου Γ.², Δραΐνας Κ.¹

¹Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45 110 Ιωάννινα, ²Ινστιτούτο Βιοιατρικών Ερευνών
«Αλέξανδρος Φλέμινγκ», 16 672 Αθήνα E-mail: me00762@cc.uoi.gr

Η διαρκώς αυξανόμενη κατανάλωση καθώς και η απαίτηση των καταναλωτών για οίνους υψηλής ποιότητας δημιουργεί την ανάγκη για βελτιστοποίηση των βιομηχανικών διεργασιών οινοποίησης με στόχο πάντοτε την αρίστευση και σταθερότητα της ποιότητας. Για την επίτευξη αυτού του στόχου απαιτείται βελτίωση και συστηματοποίηση της καλλιέργειας των αμπέλων αφ' ενός αλλά και διαθεσιμότητα κατάλληλων, αποδοτικών και προσαρμοσμένων στελεχών οινοποιητικών ζυμομυκήτων αφ' ετέρου για τη βελτίωση των παραμέτρων της οινοποίησης. Παράλληλα, απαιτείται μελέτη μηχανισμών που ελέγχουν το άρωμα και τη γεύση του οίνου και παραμένουν ακόμα σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι θεμελιώδους σημασίας τόσο για την ποιότητα του προϊόντος όσο και την ανταγωνιστικότητα των βιομηχανιών οινοποίησης. Με βάση τα παραπάνω, οι στόχοι αυτής της εργασίας ήταν η απομόνωση και η μοριακή ταυτοποίηση γηγενών στελεχών ζυμομυκήτων καθώς και η ολοκληρωμένη πρωτεομική ανάλυση της ζύμωσης του γλεύκους. Έχουν ταυτοποιηθεί πέντε γηγενή οινοποιητικά στελέχη που ανήκουν στο είδος *Saccharomyces cerevisiae*. Από αυτά το Z622 δίνει οίνο με το πλουσιότερο αρωματικό δυναμικό ακόμα και σε σύγκριση με εμπορικό μίγμα οινοποίησης όπως αποδεικνύει η ανάλυση με αέρια χρωματογραφία. Επίσης έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί, με βάση τις ITS1-5.8S-ITS2 και D1/D2-26S rDNA αλληλουχίες, στελέχη με β-γλυκοζιτική δράση που ανήκουν στα είδη: *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula mecilaginosa* καθώς και ένα νέο στέλεχος του γένους *Metschnikowia*. Επιπλέον, έχει ολοκληρωθεί η πρωτεϊνική χαρτογράφηση της ζύμωσης με Z622 και έχουν εντοπιστεί η δεοξυγονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης, η ενολάση-2 και η σουλφυδρυλάση της Ο-ακετυλο-σερίνης/Ο-ακετυλο-ομοσερίνης, πρωτεΐνες που επάγονται μόνο στο αρχικό στάδιο της ζύμωσης του γλεύκους.

(Χρηματοδότηση: ΠΕΝΕΔ 2003-ΓΤΕΤ)

**PROTEOMIC ANALYSIS OF NEW WINE YEAST-STRAINS
DURING MUST FERMENTATIONS****Parapouli M.¹, Perysinakis A.¹, Hatziloukas E.¹, Fragkos-Livanios L.²,
Samiotaki M.², Panagiotou G.², Drainas C.¹**¹University of Ioannina, 45 110 Ioannina, Greece, ²Biomedical Sciences Research Center
"Alexander Fleming", 16 672 Athens, Greece. E-mail: me00762@cc.uoi.gr

The quality of wines depends on two major parameters: must quality and variety of microbial communities. Must quality is a result of vine cultivation, physiology and weather conditions. Microbial populations are diverse mixtures of prokaryotic and lower eukaryotic microorganisms, the population of which varies every year, it is influenced also by the same parameters and it is mostly uncontrollable. Baring in mind that the final product of must fermentations is a result of microbial transformations of chemical precursors present in the must, we realize that all quality parameters of wine depend on in essence on microbial activities during fermentation and maturation. Modern wine industries world wide have focused on the development of starter cultures from wild wine yeast, used to speed up fermentation and reduce dominance of undesired microbes that could degrade quality. In these frames, the objectives of this work were the genetic screening, typing and collection of indigenous wine yeast strains and the complete analysis of proteins expressed during must fermentations. Five yeast strains were isolated, belonging to *Saccharomyces cerevisiae* species. One of them, Z622, produced wine with the richest aromatic bouquet, even in comparison with commercially available yeast inocula. In addition, yeast strains with β -glucosidase activity were isolated and identified on the basis of ITS1-5.8S-ITS2 and 26S rRNA nucleotide sequences, as *Hanseniaspora gulliermondii*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula mecilaginoso* and a new strain of *Metschnikowia* sp. Proteomic analysis of Z622 during must fermentation indicated that proteins with catalytic activity of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, enolase-2 and O-acetylserine/ O-acetylhomoserine sulfhydrylase are induced at early stages of fermentation.

This work was supported financially by PENED 2003 (GSRT).

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ
ΔΡΑΣΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΑΠΟ
ΙΖΗΜΑΤΑ ΔΕΞΑΜΕΝΩΝ ΠΟΣΙΜΟΥ ΝΕΡΟΥ**

**Παράσχος Γ.Ι., Λυμπεροπούλου Δ.Σ., Κατσίφας Ε.Α.,
Μεϊντάνης Χ. και Α.Δ. Καραγκούνη**

*Τομέας Βοτανικής, Ομάδα Μικροβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη 15781, Αθήνα. Email: akar@biol.uoa.gr*

Τα Ακτινοβακτήρια αποτελούν αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος, λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν μία μεγάλη ποικιλία βιοτεχνολογικά σημαντικών δευτερογενών μεταβολιτών. Το γένος των Στρεπτομυκήτων επικρατεί μεταξύ των ακτινοβακτηρίων και παράγει το 80 % των γνωστών φαρμάκων. Ενώ η ποικιλότητα των ακτινοβακτηρίων στα εδαφικά οικοσυστήματα έχει μελετηθεί ευρύτατα, ελάχιστη είναι η πληροφόρηση για την ποικιλότητα τους στα υδάτινα ιζήματα. Επιπλέον, αν και οι Στρεπτομύκητες εξακολουθούν να αποτελούν μία ανεξάντλητη πηγή βιοενεργών ουσιών, απαιτούνται συμπληρωματικές τεχνικές απομόνωσης ακτινοβακτηρίων, προκειμένου να ανακτηθούν από τα περιβαλλοντικά δείγματα νέα στελέχη ακτινοβακτηρίων. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση ακτινοβακτηρίων με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον από ιζήματα δεξαμενών πόσιμου νερού και ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης των απομονωθέντων στελεχών έναντι ευρέως χρησιμοποιούμενων μικροβιακών δεικτών. Εκλεκτικά και εμπειρικά θρεπτικά υποστρώματα σε συνδυασμό με ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών επώασης και κατεργασίας του περιβαλλοντικού δείγματος χρησιμοποιήθηκαν, ώστε να επιτευχθεί η ανάκτηση του μεγαλύτερου δυνατού αριθμού ακτινοβακτηρίων. Τα απομονωθέντα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως ακτινοβακτήρια με εφαρμογή της μεθόδου PCR και χρήση εξειδικευμένων μορίων εκκινητών για την ενίσχυση περιοχής του γονιδίου 16S rDNA των ακτινοβακτηρίων. Τα διαφορετικά στελέχη, όπως προέκυψαν με βάση τα διαφορετικά πρότυπα που έδωσαν με αντίδραση BOX PCR, ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής της αύξησης παθογόνων μικροβιακών δεικτών.

**STUDY OF THE DIVERSITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY
OF ACTINOBACTERIA ISOLATED FROM FRESHWATER
RESERVOIR SEDIMENTS****Paraschas G.I., Lympelopoulou D.S., Katsifas E.A., Meintanis C.,
and A.D. Karagouni***Dept. of Botany, Microbiology group, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis 15781 Athens, Greece*

The class of Actinobacteria is a major group of scientific research interest because of its ability to produce a vast range of biotechnologically important secondary metabolites. In fact, the genus *Streptomyces* alone accounts for a remarkable 80 % of the actinomycete natural products reported to date. However, while the diversity of actinobacteria in terrestrial environments has been extensively studied, little is known about their diversity in aquatic sediments. Furthermore, although *Streptomyces* continue to provide new bioactive products, techniques for the isolation of rare and novel actinomycete and the reduction of the re-isolation of strains producing known bioactive compounds are in demand. The aim of this study was the isolation of biotechnologically important actinobacteria from freshwater reservoir sediments and the screening of their antimicrobial activity against a number of widely used microbial indicators. Selective media combined with a wide range of incubation and treatment temperatures of the environmental samples were used, in order to increase the number of the recovered actinobacteria. The isolates were identified as actinobacteria with polymerase chain reaction (PCR) and the use of actinobacteria – specific primers for the amplification of a region of their 16S rDNA gene. All isolates were differentiated based on the fingerprinting patterns given in the BOX-PCR. Finally, the different identified strains were tested for their ability to inhibit the growth of the microbial indicators used.

**ΟΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ HOMER ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΔΡΟΜΗ
ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ
ΤΗΣ ΚΑΙ ΤΟΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΗΣ**

Παρισιάδου Α., Κρούστη Π., Ευθυμιόπουλος Σ.

*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 157 84
Πανεπιστημιούπολης, Ιλίσια, Ελλάδα*

Η νόσος Alzheimer είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από την παρουσία στον εγκέφαλο νευροϊνιδιακών δεματίων και αμυλοειδικών πλακών. Το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό των αμυλοειδικών πλακών είναι το Αβ πεπτιδίο (40 ή 42 αμινοξέων) το οποίο προκύπτει από την πρωτεολυτική επεξεργασία της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP) από την β- και την γ-εκκριτάση (αμυλοειδογενές μονοπάτι). Αντίθετα με την δράση των α- και γ-εκκριτασών δεν έχουμε παραγωγή του Αβ πεπτιδίου (μη αμυλοειδογενές μονοπάτι). Έχειδειχθεί ότι η πρωτεολυτική επεξεργασία της APP ρυθμίζεται μέσω της αλληλεπίδρασής της με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Η APP φέρει στην κυτταροπλασματική της ακολουθία το συντηρημένο μοτίβο GYENPTY μέσω του οποίου πραγματοποιείται η αλληλεπίδρασή της με πρωτεΐνες που φέρουν ακολουθίες που αλληλεπιδρούν με φωσφορική τυροσίνη (phosphor-tyrosine binding domain, PTB). Οι πρωτεΐνες Homer φέρουν στο άμινοτελικό τους άκρο την EVH1 περιοχή που δομικά ανήκει στην υπεροικογένεια των PTB ακολουθιών. Η δομική αυτή ομοιότητα μας ώθησε να ερευνήσουμε αν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ Homer και APP. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι οι Homer αλληλεπιδρούν με την APP μέσω της EVH1 περιοχής. Έλλειψη του μεγαλύτερου μέρους της κυτταροπλασματικής ακολουθίας της APP που συμπεριλαμβάνει το μοτίβο GYENPTY δεν επηρέασε την αλληλεπίδραση της με τις πρωτεΐνες Homer. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ APP και Homer μπορεί να είναι έμμεση. Η έκφραση των πρωτεϊνών Homer είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της ωρίμανσης της APP και την μείωση της έκφρασης της στην κυτταρική επιφάνεια. Παράλληλα, μειώθηκε σημαντικά η έκκριση του πεπτιδίου Αβ και των λοιπών πρωτεολυτικών παραγωγών της APP. Η ρύθμιση της αλληλεπίδρασης της APP με τις Homer μπορεί να αποτελέσει στόχο θεραπευτικών στρατηγικών που στοχεύουν στην μείωση της παραγωγής της Αβ.

Αυτή η έρευνα χρηματοδοτήθηκε από τα προγράμματα του υπουργείου Παιδείας «Πυθαγόρας I & II», του Πανεπιστημίου Αθηνών «Καποδίστριας» και της Ευρωπαϊκής ένωσης «APOPIS».

**HOMER PROTEINS INTERACT WITH AMYLOID PRECURSOR
PROTEIN AND REGULATE ITS MATURATION AND METABOLISM****Parisiadou L., Krousti P., Efthimiopoulos S.***Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, National and
Kapodistrian University of Athens*

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder that is characterized by the presence of neurofibrillary tangles and amyloid plaques in the brain. Amyloid plaques consist primarily of A β peptides (40 or 42 amino acid residues), which are produced by the sequential proteolysis of amyloid precursor protein (APP) by β - and γ - secretases (amyloidogenic processing). Alternatively, cleavage of APP by α - and γ - secretases prevents production of A β (non amyloidogenic processing). A number of studies show that cytoplasmic proteins that possess the phosphotyrosine binding domain (PTB domain) interact with the conserved -GYENPTY- domain in the cytoplasmic tail of APP and modify its processing. Homer proteins possess an EVH1 domain in their N-terminus, which is structurally similar to the PTB domain. This similarity prompted us to examine whether there is interaction between Homer and APP. Our data shows that Homer and APP interact through the EVH1 domain. Deletion of a large part of the cytoplasmic tail of APP, including the GYENPTY motif, has no effect on the interaction with Homer proteins. This data shows that the interaction of APP and Homer could be indirect. Co-expression of Homers and APP results in inhibition of APP maturation and in reduction of its expression at the plasma membrane. In addition, generation of the A β peptide and of the other proteolytic products of APP was reduced. Regulation of the Homer-APP interaction could be a target for therapeutic strategies aiming at reducing production of A β peptide.

This research is funded by the Greek Ministry of Education grants "Pythagoras I & II", the University of Athens grant "Kapodistrias", European Grant APOPIS co-ordinated by the Verum foundation.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ *BMPs* ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΘΥΜΟΥ ΑΔΕΝΑ

Πασσά Ο., Τσάλαβος Σ., Graf D.

Ινστιτούτο Ανοσολογίας, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών 'Αλ. Φλέμινγκ', 166 72
Βάρη

Οι Οστικές Μορφογενετικές Πρωτεΐνες (*BMPs*) είναι φυλογενετικά συντηρημένα μόρια μεταγωγής σήματος τα οποία ανήκουν στην υπεροικογένεια του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β (*TGF-β*) και εμπλέκονται στις διαδικασίες ανάπτυξης και μορφογένεσης. Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι τα πυροδοτούμενα από τα *BMPs* μονοπάτια μεταγωγής σήματος εμπλέκονται επίσης στην ανάπτυξη του θύμου καθώς και στη διαφοροποίηση των θυμοκυττάρων. Συγκεκριμένα, *in vitro* πειράματα υποστηρίζουν ότι η *BMP-4* και οι ανταγωνιστές της *Chordin/Twisted Gastrulation (Tsg)* ρυθμίζουν τη μετάβαση των θυμοκυττάρων από το DN2 στο DN3 στάδιο και από το DN4 στο διπλά θετικό στάδιο. Ωστόσο, ελάχιστα στοιχεία είναι γνωστά από *in vivo* πειράματα. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα έως τώρα γνωστά από *in vitro* μελέτες αλλά και να διερευνήσουμε περαιτέρω τη λειτουργία των *BMPs* μοριακών σημάτων στο θύμο, ακολουθούμε μια διττή προσέγγιση. Αρχικά, οριοθετούμε την έκφραση των *BMPs* και των ανταγωνιστών τους σε όλο το φάσμα του θύμου αδένος χρησιμοποιώντας ποντίκια μάρτυρες που εκφράζουν το *lacZ* στη θέση του ενδιαφερόμενου γονιδίου. Εν συνεχεία συνδιάζουμε αυτή την ανάλυση με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας οι οποίες μας επιτρέπουν να αναγνωρίσουμε την προέλευση των κυττάρων καθώς και τους κυτταρικούς στόχους του σήματος των *BMPs*. Τα στοιχεία μας επιβεβαιώνουν την έκφραση των *BMPs* στο θύμο και μάλιστα με μια διαφορική κατανομή ανάμεσα στο μυελό και το φλοιό του θύμου αδένος. Έπειτα, η έρευνα μας επικεντρώθηκε στους ανταγωνιστές των *BMPs*, όπως η *Tsg*, η *Gremlin* και η *Noggin*, η έκφραση των οποίων χαρτογραφήθηκε με παρόμοιο τρόπο. Η ανάλυση μεμονωμένων υποπληθυσμών θυμοκυττάρων αποκάλυψε διακριτά πρότυπα έκφρασης στις διάφορες υπο-ομάδες. Επιπροσθέτως, σχεδιάζουμε να χρησιμοποιήσουμε προσεγγίσεις λειτουργικής γονιδιοματικής για να προσδιορίσουμε τη λειτουργία αυτών των μορίων *in vivo*. Σε αυτό το σημείο τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι τα ποντίκια στα οποία έχει απαλοιφεί το γονίδιο *Tsg*, παρουσιάζουν μερικό φραγμό ανάμεσα στα στάδια DN2/DN3 και DN4/SP, τα οποία επιβεβαιώνουν τα έως τώρα *in vitro* πειράματα. Η ανάλυση της έκφρασης των *BMPs* υποδηλώνει ότι τα συγκεκριμένα σήματα πιθανότατα ρυθμίζουν τη φυσιολογία του θύμου πέραν των ήδη γνωστών και είναι πλέον δυνατόν να τη διερευνήσουμε με την ελεγχόμενη απαλοιφή γονιδίου.

ROLE OF *BMPs* IN THYMUS DEVELOPMENT**Passa O., Tsalavos S., Graf D.***Institute of Immunology Biomedical Sciences Research Centre 'Al Fleming', 166 72 Vari,
Greece*

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are phylogenetically conserved signaling molecules that belong to the transforming growth factor (TGF)- β superfamily, and are involved in the cascades of body patterning and morphogenesis. There is good evidence that BMP signaling is also involved in thymopoiesis and thymocyte development, although *in vivo* data is largely missing. *In vitro* experiments have shown that BMP-4 and the antagonist pair Chordin/Twisted Gastrulation (tsg) regulate the transition of thymocytes from the DN2 to the DN3 stage and from the DN4 to the double positive stage. To confirm these data and probe for the wider function of BMP signals in the thymus we are using a two-pronged approach. On the one hand we delineate expression of various BMPs and their antagonists in the context of the whole thymus using gene reporter mice that express lacZ in lieu of the gene of interest. We combine this analysis with immunohistochemistry that allows us to identify cellular sources as well as cellular targets of BMP signaling. We find that various BMPs are expressed in the thymus with distinct distribution between medulla and cortex. Similarly, expression of BMP antagonists such as Twisted Gastrulation (Tsg), Gremlin and Noggin was also tested and their topological expression was uncovered. Analysis on sorted thymocytes sub-populations revealed distinct expression between various subsets. Additionally, we plan to use functional genomic approaches to delineate the function of these molecules *in vivo*. To this end we find that tsg knock-out mice display a partial block between the DN2/DN3 and the DN4/SP stages, which is in line with the results from *in vitro* experiments. Our expression analysis indicates that BMP signals must be regulating aspects of thymus biology beyond the ones described which we can now address using conditional gene targeting.

ΔΙΑ-ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΤΗΣ
ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΜΥΓΑΣ *Ceratitis capitata* ΣΕ ΕΙΔΗ ΤΗΣ
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΕΡΗΡΙΤΙΔΑΕ

Παυλόπουλος Ι., Αυγουστίνος Α., Στρατικόπουλος Η.¹, Ματθιόπουλος Κ.²,
Ζαχαροπούλου Α.

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

¹Παρούσα διεύθυνση: Department of Genetics and Development, Columbia University, New York, NY 10032

²Παρούσα διεύθυνση: Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Η οικογένεια Terphritidae των Διπτέρων εντόμων περιλαμβάνει είδη με μεγάλη οικονομική σημασία. Τα περισσότερα αποτελούν σημαντικά παράσιτα γεωργικών καλλιεργειών προκαλώντας μεγάλες καταστροφές στην παραγωγή φρούτων και λαχανικών παγκοσμίως. Τα σημαντικότερα παράσιτα ανήκουν στα γένη *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Dacus* και *Rhagoletis*. Η μελέτη των ειδών αυτών στο επίπεδο της γενετικής και της μοριακής βιολογίας θα μπορούσε να συμβάλει σημαντικά στην ανάπτυξη μεθόδων βιολογικού ελέγχου των πληθυσμών τους. Με εξαίρεση τη Μεσογειακή μύγα, *Ceratitis capitata*, που θεωρείται ο καλύτερα μελετημένος οργανισμός της οικογένειας, η πληροφορία για άλλα είδη είναι πολύ περιορισμένη. Στη παρούσα μελέτη εξετάστηκε η πιθανότητα δια-ειδικής ενίσχυσης μικροδορυφορικών δεικτών που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριό μας για τη Μεσογειακή μύγα σε είδη των γενών *Anastrepha*, *Bactrocera* και *Rhagoletis* με κύριο στόχο την ανάπτυξη κατάλληλων γενετικών δεικτών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε γενετικές ή και πληθυσμιακές μελέτες των ειδών αυτών. Από τους 108 μικροδορυφορικούς δείκτες που αναλύθηκαν μέσω της PCR, οι 30 (27,7%) έδωσαν δια-ειδική ενίσχυση σε τουλάχιστον ένα από τα εξεταζόμενα είδη. Το μέγεθος των προϊόντων αυτών ήταν παρόμοιο ή και ταυτόσημο με το αναμενόμενο στη Μεσογειακή μύγα. Τα πρώτα αποτελέσματα από την αλληλούχιση των προϊόντων PCR και τη σύγκριση τους είναι ενθαρρυντικά. Η δομή των μικροδορυφορικών μοτίβων αλλά και των μοναδικών περιοχών που τους περιβάλλουν φαίνεται να διατηρείται στη πλειοψηφία των περιπτώσεων. Η συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών αυτών μπορεί να προσφέρει πολύτιμους γενετικούς δείκτες για τα είδη αυτά αλλά και πληροφορίες για τις φυλογενετικές τους σχέσεις.

CROSS-SPECIES AMPLIFICATION OF *Ceratitis capitata* MICRO-SATELLITE MARKERS IN OTHER TEPHITIDAE SPECIES**Pavlopoulos I., Augustinos A., Stratikopoulos E.¹, Mathiopoulos K.², Zacharopoulou A.***Department of Biology, University of Patras*¹*Present Address: Department of Genetics and Development, Columbia University, New York, NY 10032*²*Present Address: Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larisa*

Tephritidae family of Diptera includes species of great economical importance. Most of them are significant parasites of agriculture causing severe damages by attacking fruits and vegetables world wide. The most important pests belong to the genera *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Dacus* and *Rhagoletis*. Studies of these species on genetic and molecular level could contribute significantly to the development of methods for their biological control. Except for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, which is the best understood fruit fly pest at the genetic/molecular level, limited information exists for other species. In the present work we examined the possibility of cross-species amplification of microsatellite markers that were developed in our laboratory for *C. capitata*. Cross-species analyses were performed on species belonging to the genera *Anastrepha*, *Bactrocera* and *Rhagoletis*, aiming at the development of suitable markers that could be used in genetic and/or population studies of these species. A total of 108 microsatellites markers were examined through PCR. Thirty of them (27.7%) showed cross-species amplification in at least one of the analyzed species. The majority of the products were similar or identical in size to those expected in *C. capitata*. Preliminary sequencing analyses of the PCR products are encouraging when compared to the Medfly markers. The structures of the repeat motifs and their flanking sequences are maintained in most studied cases. This analysis can provide not only useful genetic markers for the analyzed species but also information for their phylogenetic relationships.

Η ΑΥΤΟΤΟΜΙΑ ΤΗΣ ΟΥΡΑΣ ΣΕ ΝΕΑΡΑ ΑΤΟΜΑ ΣΑΥΡΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ LACERTIDAE

Παφίλης Π., Αδαμόπουλος Χ., Σκέλλα Α., Σίμου Χ. και Ε.Δ. Βαλάκος

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπων, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, 157-84 Αθήνα

Η αυτοτομία θεωρείται εξαιρετικά αποτελεσματικός αντιθηρευτικός μηχανισμός και απαντάται σε αρκετές ζωικές ομάδες. Στις σαύρες έχει ευρεία εφαρμογή και συνίσταται στην αποκοπή της ουράς η οποία κινείται για παρατεταμένο χρονικό διάστημα προκειμένου να προσελκύσει την προσοχή του θηρευτή μέχρι το ζώο να αποδράσει. Η κίνηση του τμήματος συντηρείται από αναερόβιο μεταβολισμό κατά τη διάρκεια του οποίου παράγεται γαλακτικό οξύ ενώ ταυτόχρονα τα αποθέματα σε γλυκογόνο ελαττώνονται δραματικά. Ο χαρακτήρας φαίνεται ότι είναι συντηρητικός, τουλάχιστον ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας Lacertidae. Σε πολλές περιπτώσεις η αυτοτομία μπορεί να χαθεί δευτερογενώς ενώ έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου η απόδοση της ιδιότητας μεταβάλλεται ανάλογα με την ηλικία του ζώου. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η κατάσταση των μεταβολιτών κατά τον αναερόβιο μεταβολισμό αποκλειστικά σε νεαρά άτομα 6 ειδών (*Lacerta graeca*, *Podarcis erhardii*, *P. peloponnesiaca*, *P. gaigeae*, *P. muralis* και *P. milensis*) ώστε να διαπιστωθούν πιθανές διαφοροποιήσεις σε σχέση με τα ενήλικα άτομα. Η αποθήκευση λιπιδίων και η συγκέντρωση πρωτεϊνών στους ιστούς της ουράς δεν διαφέρουν από τα αντίστοιχα μεγέθη στα ενήλικα άτομα. Αποκλίσεις δεν παρατηρούνται ούτε στην περίπτωση της παραγωγής γαλακτικού οξέος ή του χρόνου κίνησης. Φαίνεται λοιπόν ότι ο μηχανισμός είναι κοινός και δεν τροποποιείται στον κύκλο ζωής των συγκεκριμένων ειδών.

Το έργο συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και Εθνικούς Πόρους (ΕΠΕΑΕΚ II) ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II

**CAUDAL AUTOTOMY IN YOUNG LIZARDS BELONGING TO
THE FAMILY LACERTIDAE****Pafilis P., Adamopoulos C., Skella A., Simou C., and E.D. Valakos***Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimioupolis, 157-84 Athens*

Autotomy is considered a rather effective antipredator mechanism in various animal groups and it is widespread among lizards. Tail shed is thrashing vigorously for prolonged time period in order to distract predator and hence to facilitate lizard's escape. This movement is fueled by anaerobic metabolism and the main product is lactic acid while glycogen reserves are vastly reducing. It seems that the character is conservative, at least among lacertids. Autotomy may have been lost in several phylogentic lines when costs exceed its benefits while a substantial reduction may be observed in different ages as a derived feature. In the present study we examine metabolites' levels involved to anaerobic metabolism in six species young individuals (*Lacerta graeca*, *Podarcis erhardii*, *P. peloponnesiaca*, *P. gaigeae*, *P. muralis* and *P. milensis*). Our aim was to detect any possible differences in comparison to adults. We failed to find any significant difference in lipid store and proteins concentration in the tissues of the tail between young and adults individuals. No alterations were detected in the case of lactate production or in the duration of the movement. Thus it seems that the mechanism is common and does not alter during the life circle of the specific species.

The project is co-funded by the European Social Fund and National Resources – (EPEAEK II) PYTHAGORAS II

ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑ-ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ NSAID

Περούλης Ν., Κουρουνάκη Α.¹, Γιάγκου Μ., Χατζηπέτρου Α.

*Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών
επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124. ¹Τομέας Φαρμακευτικής
Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής Πανεπιστήμιο Αθηνών, 15771.*

Η βλάβη που παρατηρείται κατά την ισχαιμία-επαναιμάτωση σχετίζεται με μία φλεγμονώδη αντίδραση καθώς και με την απόπτωση στην πληγείσα περιοχή. Η αντίδραση φλεγμονής χαρακτηρίζεται, μεταξύ άλλων, από αυξημένη παραγωγή διαφόρων κυτοκινών, ενώ οι κασπεάσες μετέχουν στον έλεγχο της απόπτωσης. Στην παρούσα εργασία αποπειραθήκαμε να προσδιορίσουμε αλλαγές στα επίπεδα φλεγμονωδών και αποπτωτικών παραγόντων σε εγκεφάλους αρουραίων μετά από εγκεφαλική ισχαιμία-επαναιμάτωση και να εκτιμήσουμε την επίδραση ενός μη-στεροειδούς αντιφλεγμονώδους παραγώγου (*N*- (2-θειολεθυλ)-2-[*N'*- (2,6-διχλωροφενυλ) αμινο] φενυλ] ακεταμίδη) σε αυτούς τους παράγοντες. Χρησιμοποιήσαμε ένα μοντέλο εγκεφαλικής ισχαιμίας-επαναιμάτωσης τρωκτικού για να ερευνήσουμε, μέσω ανοσοϊστοχημικών και χρωματομετρικών τεχνικών, την παρουσία στον εγκέφαλο (και στον σπλήνα) των ενζύμων φλεγμονής COX-1 και COX-2, των κυτοκινών ιντερλευκίνη (IL)-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-18, TNF-α και IFN-γ καθώς επίσης και της ενεργού μορφής της κασπεάσης-3, σε πειραματόζωα που υπέστησαν ή όχι αγωγή. Η εγκεφαλική ισχαιμία-επαναιμάτωση είχε ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα στον εγκέφαλο των αρουραίων όλων των υπό εξέταση κυτοκινών και ενζύμων στις 1, 3 και 5 ημέρες μετά την ισχαιμία. Η αγωγή με το αντιφλεγμονώδες παράγωγο μείωσε την αύξηση, εξαιτίας της ισχαιμίας, των επιπέδων της IFN-γ, TNF-α, IL-1β IL-6, IL-18 και της κασπεάσης-3 στις 3 ημέρες μετά την ισχαιμία, ενώ αύξησε τα επίπεδα της IL-10. Δείχνουμε ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις ενός μεγάλου εύρους κυτοκινών που μετέχουν στην αντίδραση φλεγμονής προκαλώντας εγκεφαλική βλάβη μετά την ισχαιμία-επαναιμάτωση μπορεί μερικώς να αντιστραφεί από το αντιφλεγμονώδες παράγωγο που χρησιμοποιήσαμε στην μελέτη μας.

IMMUNOBIOLOGICAL PARAMETERS DURING EXPERIMENTAL ISCHAEMIA-REPERFUSION. THE EFFECT OF NSAID**Peroulis N., Kourounakis A.P.¹, Yiangou M., Hadjipetrou L.**

Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Faculty of Sciences, Aristotelian University of Thessaloniki, 54124. ¹Dept. of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of Athens, 15771.

Ischaemia-reperfusion injury is associated with an inflammatory response as well as apoptosis in the affected area. Inflammatory responses are characterized, among others, by an increased production of several cytokines, while caspases are implicated in the control of apoptosis. In the present work we sought to determine changes in the levels of inflammatory and apoptotic indices in the rat brain after cerebral ischaemia-reperfusion and evaluated the effect of a non-steroidal anti-inflammatory compound (*N*-(2-Thiolethyl)-2- $\{2$ -[*N'*-[2,6-dichlorophenyl) amino] phenyl} acetamide) on these indices. We used a cerebral ischaemia-reperfusion rodent model to investigate, via immunohistochemical and colorimetric techniques, the presence in the brain (and spleen) of inflammatory enzymes cyclooxygenases COX-1 and COX-2, cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α and IFN- γ as well as the activated form of caspase-3, in treated and untreated animals. Cerebral ischaemia-reperfusion caused elevated levels in the rat brain of all enzymes and cytokines included in this study, at 1, 3 and 5 days post-ischaemia. Treatment with the anti-inflammatory derivative reduced the elevation, caused by ischaemia, of IFN- γ , TNF- α , IL-1 β IL-6, IL-18 and caspase-3 levels at 3 days post-ischaemia, while increased the levels of IL-10. We show that the increased concentrations of a wide range of cytokines involved in the inflammatory reaction causing brain damage after ischaemia-reperfusion can be partially reversed by the anti-inflammatory derivative used in our study.

**ΠΑΛΑΙΟΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΙ ΠΑΛΑΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ
ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΣΚΑΦΗ
ΤΗΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ ΡΩΤΑ, ΑΡΧΑΙΑ ΚΟΡΙΝΘΟΣ**

**Πετρουτσά Ε.Ι., Φουντουλάκης Γ.Μ., Μαλούχου-Γκρίμπα Β.
και Σ.Κ. Μανώλης**

*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστήμιοπολη 157 84 Αθήνα*

Η πτώση των πολιτισμών της Εποχής του Χαλκού στην Ελλάδα στο τέλος το δέκατου τρίτου και τον δωδέκατο αιώνα π.Χ., οδήγησαν στην έναρξη μιας περιόδου περίπου 400 χρόνων, που συχνά ονομάζεται ως Greek Dark Ages. Ο πιο ουδέτερος όρος που χρησιμοποιείται για αυτή την περίοδο είναι Εποχή του Σιδήρου και αυτό γιατί υπήρξαν κάποιας μορφής εξελίξεις στην Ελλάδα, λόγω επαφών που αναπτύχθηκαν με την Εγγύς Ανατολή και την υπόλοιπη Ευρώπη. Τα πρώτα βασικά συμβάντα ήταν δύο κύματα μεταναστεύσεων στη λεκάνη του Αιγαίου, με πρώτο την εισβολή των Δωριέων, τον οποίων η επικράτηση φαίνεται κυρίως από την επικράτηση της γλώσσας τους στην Νότια Ελλάδα. Παράλληλα, κατά τον ενδέκατο αιώνα π.Χ. μετανάστευσαν και οι Έλληνες κατά μήκος των ακτών της Ανατολίας. Η ανασκαφή που έγινε στην ιδιοκτησία Ρώτα, στη διάρκεια της διάνοιξης της γραμμής του προαστιακού σιδηροδρόμου κοντά στην Αρχαία Κόρινθο, έφερε στο φως ένα αριθμό ταφών, οι οποίοι χρονολογούνται στην Εποχή του Σιδήρου. Λόγω απουσίας έγγραφων μαρτυριών της εποχής, η μελέτη του ανθρώπινου σκελετικού υλικού θα προσθέσει πολύτιμες πληροφορίες, στις ήδη υπάρχουσες που έχουν προέλθει από τις πρόσφατες αρχαιολογικές μελέτες. Η Παλαιοδημογραφική και παλαιοπαθολογική μελέτη του σκελετικού υλικού επιτεύχθηκε με σκοπό την κατανόηση της κοινωνικής και πολιτιστικής κατάστασης της Αρχαίας Κορίνθου, για την εποχή αυτή, καθώς και για τη διερεύνηση πιθανών αλλαγών που οφείλονταν στην εισβολή των Δωριέων.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το Πρόγραμμα «Καποδίστριας» του Ειδικού Λογαριασμού Κονδυλίων Έρευνας (Επιτροπή Ερευνών, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών)

**PALAEODEMOGRAPHIC AND PALAEOPATHOLOGIC STUDY
OF THE SKELETAL MATERIAL FROM THE EXCAVATION OF
THE ROTA PROPERTY, ANCIENT CORINTH**

**Petroutsas E.I., Foudoulakis G.M., Malouchou-Grimba V.,
and S.K. Manolis**

*Department of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, National & Kapodistrian
University of Athens, Panepistimiopolis 15784 Athens, Greece*

The collapse of the Bronze Age cultures of Greece in the late thirteenth and twelfth centuries BC initiated a period of some 400 years often called the Greek Dark Ages. "Iron Age Greece" is a more neutral term, in that it brings developments in Greece in line with the Near East and the rest of Europe. The first key events are two roughly contemporary waves of migrations within the Aegean basin. The first is the so-called Dorian Invasion and their dialect was predominated southern Greece: the Peloponnesus, the islands of the south Aegean and the south coast of Aegean Anatolia. The second round of early migrations concerns the Greek migration eastwards across the Aegean to the shores of Anatolia. The excavation conducted in Rota property, during the railroad works near Ancient Corinth brought to light a number of burials that are dated to the Iron Age. In the absence of contemporary documents for the specific period, the anthropological study of the skeletal material will provide valuable information, added to those from the modern archaeological studies. Palaeodemographical and palaeopathological study of the skeletal material was conducted in order to understand the social and cultural state of Ancient Corinth and investigate changes based on the Dorian invasion.

*This work is funded by the Programme "Kapodistrias" of the Special Research Account
(National & Kapodistrian University of Athens)*

ΒΙΟΑΡΧΑΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΑΣ ΜΥΚΗΝΑΪΚΗΣ ΘΕΣΗΣ ΣΤΗ ΘΗΒΑ

Πετροτσά Ε.Ι.¹, Κουντούρη Ε.² & Σ.Κ. Μανώλης¹

¹Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Ε. & Κ. Πανεπιστήμιο Αθηνών

²Θ' Εφορεία Προϊστορικών και Κλασικών Αρχαιοτήτων, Αρχαιολογικό Μουσείο Θήβας

Στο οικόπεδο ιδιοκτησίας Αικ. και Δημ. Μαρίνου, που βρίσκεται επί της οδού Κάδμου 1, στο νοτιοδυτικό άκρο της Καδμείας ακρόπολης της Θήβας ήρθαν στο φως το 2003, 14 τάφοι λακκοειδείς και κιβωτιόσχημοι. Η μελέτη των λιγιστών κτερισμάτων που συνόδευαν τους νεκρούς έδειξε ότι το νεκροταφείο είχα διάρκεια χρήσης από το τέλος των Μεσοελλαδικών έως τους ΥΕ ΙΙ χρόνους.

Η ανθρωπολογική μελέτη του υλικού που προήλθε από την παραπάνω ανασκαφή κρίνεται ως ιδιαίτερα σημαντική, όχι μόνο γιατί είναι η πρώτη που πραγματοποιείται σε ανάλογο υλικό από τη μυκηναϊκή Θήβα, αλλά και γιατί καλείται να συμπληρώσει την εικόνα που διαμορφώνουν οι αρχαιολογικές μαρτυρίες.

Τα σκελετικά υπολείμματα αφορούν μονωμένες ταφές, που ανήκουν κυρίως σε ενήλικα άτομα, με σχετικά καλή υγεία, εκτός από την περίπτωση ενός ανήλικου που εμφανίζει *Cribra Orbitalia*, που είναι χαρακτηριστικό αναιμίας.

**BIOARCHAEOLOGICAL STUDY OF A MYCEANAEAN SITE IN
THEBES, GREECE****Petroutsia E.¹, Kountouri E.², and S.K. Manolis¹**

¹Department of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, National & Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis 15784 Athens, Greece

²9th Ephorate of Prehistoric and Classical Antiquities, Archaeological Museum of Thebes, Boeotia

The Marinou plot is located at Kadmou 1 street, at the south-west end of the Kadmeia acropolis in Thebes. The excavation took place in 2003 and revealed 14 pit and cist graves. The few grave artefacts revealed that the cemetery was in use from the Late phase of Middle Helladic period to Late Helladic II period.

The anthropological study of this site is very important, firstly because it's the first one conducted in Mycenaean Thebes and secondly because it supplements the evidences coming from the archaeological study. The skeletal study concerns individual burials that belong to mainly adults, in rather good health status. There is only one subadult case indicating Cribra Orbitalia, which is a feature of anaimia.

**ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ JNK1/2 ΚΑΙ ΤΟΥ
ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΣΕ ΚΑΡΔΙΑΚΟΥΣ
ΜΥΟΒΛΑΣΤΕΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ**

Πεχτελίδου Α., Γαϊτανάκη Κ. και Μπέης Ι.

*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη, 157 84 Αθήνα*

Σε προηγούμενη μελέτη σε καρδιακούς μυοβλάστες αρουραίου (σειρά H9c2) είδαμε ότι παροδική ή συνεχής επίδραση οξειδωτικού στρες (H_2O_2) οδηγεί σε διαφορετικό πρότυπο ενεργοποίησης των JNK1/2, με αντίστοιχες διαφορές στη βιωσιμότητα και τον κυτταρικό φαινότυπο. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε το πρότυπο ενεργοποίησης του μονοπατιού JNK1/2 κάτω από τις δύο αυτές συνθήκες οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι κατά τη συνεχή επίδραση H_2O_2 τα επίπεδα των ενεργοποιημένων κινασών και c-Jun παρέμειναν υψηλά για 6 ώρες, ενώ μετά από σύντομο οξειδωτικό επεισόδιο η ενεργοποίηση ήταν παροδική. Με χρήση του αναστολέα των JNKs, SP600125, παρατηρήσαμε πλήρη καταστολή της ενεργότητας των κινασών. Πειράματα συγκατακρήμνισης επιβεβαίωσαν την αλληλεπίδραση των JNKs και του c-Jun. Μελέτη των πυρήνων με χρώση Hoechst έδειξε ότι κατά το συνεχές στρες υπάρχει αποπτωτικός φαινότυπος με έντονη συμπύκνωση της χρωματίνης, ενώ στην παροδική επίδραση τα κύτταρα παρουσίασαν φυσιολογική μορφολογία. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενα πειράματα βιωσιμότητας από τα οποία, σε συνδυασμό με μικροσκοπική παρατήρηση, προέκυψε ότι η συνεχής επίδραση H_2O_2 , σε αντίθεση με την παροδική, μειώνει σημαντικά το ποσοστό ζωντανών κυττάρων. Στο ίδιο συνηγορούν και προκαταρκτικά πειράματα κυτταρομετρίας ροής, όπου μόνο το παρατεταμένο οξειδωτικό στρες οδηγεί σε προχωρημένο αποπτωτικό φαινότυπο περίπου για το 50% των ζωντανών κυττάρων, αντίθετα με το παροδικό στρες που επάγει πρόωρο αποπτωτικό φαινότυπο. Τα αποτελέσματά μας ενισχύονται από δεδομένα ότι το ίδιο μονοπάτι μπορεί να λειτουργεί προ- ή αντι-αποπτωτικά ανάλογα με τον τύπο και την ένταση του ερεθίσματος. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης, συμπεραίνουμε ότι στα κύτταρα H9c2 το μονοπάτι των JNK1/2 εμπλέκεται στη διαφορετική αποπτωτική απόκριση που επάγεται μετά από συνεχές ή παροδικό οξειδωτικό στρες.

Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από πόρους του ΕΠΕΑΕΚ2/2003 που επιδοτεί το ΜΔΕ: «Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική».

**DIFFERENTIAL INDUCTION OF JNK1/2 SIGNALING PATHWAY
AND APOPTOTIC PHENOTYPE IN CARDIAC MYOBLASTS
AFTER OXIDATIVE STRESS****Pechtelidou A., Gaitanaki C., and I. Beis***Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimopolis 157 84 Athens, Greece*

In previous studies on rat cardiac myoblasts (H9c2 cell line) we showed that sustained or transient oxidative stress (H₂O₂) causes differential activation of JNK1/2 kinases, with respective differences in viability and cellular phenotype. In the present study we investigated the activation profile of JNK1/2 pathway under the previously mentioned oxidative conditions. Namely, during sustained H₂O₂ stimulation the levels of activated kinases and c-Jun remained high for 6 hours, while the activation was transient during the short-term oxidative episode. Using JNK inhibitor II, SP600125, abrogation of kinase activity was demonstrated. Co-immunoprecipitation experiments confirmed JNK~ c-Jun interaction. Fluorescence experiments using Hoechst staining showed that during sustained H₂O₂ exposure cells display an intense apoptotic phenotype with increased chromatin condensation, in contrast with transient stress which causes no nuclear alterations. This result is in line with previous viability assays, which- in combination with morphological examination- demonstrated that sustained stimulation significantly decreased cell viability, by contrast to transient H₂O₂ exposure. Preliminary flow cytometry experiments also support this notion, since only sustained oxidative stress was found to cause late apoptotic phenotype, for about 50% of viable cells. On the other hand, transient oxidative stimulation induced early apoptotic phenotype. Our results are corroborated by data supporting that the same pathway may act in a pro- or anti-apoptotic way depending on the cellular context and the type and duration of the stimulus. Based on the present results, we conclude that in H9c2 cells the JNK1/2 pathway may be involved in the differential apoptotic response induced by sustained and transient oxidative stress.

*This study was funded by EPEAEK2/2003 which supports the Postgraduate Program:
"Clinical Biochemistry & Molecular Diagnostics"*

**ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ
ΖΥΘΟΠΟΙΕΙΑΣ**

Πιταράκης Γ., Γωγάκος Σ., Σιβροπούλου Α.

*Εργαστήριο Γ. Μικροβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 54124
Θεσσαλονίκη*

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η βελτίωση του βιολογικού καθαρισμού με τον χειρισμό των ενδογενών μικροοργανισμών σε απόβλητα ζυθοποιείας. Για αυτό, κατασκευάστηκε σε μακέτα η διαδικασία επεξεργασίας των αποβλήτων που εφαρμόζεται στην ζυθοποιεία, ώστε να γίνει προσομοίωση της επεξεργασίας των αποβλήτων στο εργαστήριο. Αρχικά μεγάλος αριθμός δειγμάτων αποβλήτων μεταφέρθηκε από τη ζυθοποιεία και υποβλήθηκε σε επεξεργασία σε εργαστηριακές συνθήκες. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας μελετήθηκαν οι ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές του πληθυσμού των μικροοργανισμών σε σχέση με τον χρόνο. Στα αρχικά στάδια της διαδικασίας παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός τριών μικροοργανισμών ήταν υψηλός και διαδοχικά αυξήθηκε μέχρι ποσοστού 77-100%, σε σχέση με τον συνολικό πληθυσμό των μικροοργανισμών στο δείγμα αποβλήτων. Επειδή οι μικροοργανισμοί αυτοί ενδεχομένως συμμετέχουν στη διαδικασία επεξεργασίας, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν. Κάθε ένας από αυτούς τους μικροοργανισμούς αναπτύχθηκε σε κατάλληλες συνθήκες και συλλέχθηκε με φυγοκέντριση. Η προσθήκη των μικροοργανισμών αυτών ξεχωριστά σε πυκνότητα 10^6 CFU/ml στο δείγμα των αποβλήτων, οδήγησε σε 25% ελάττωση των τιμών COB και BOD συγκριτικά με τον μάρτυρα (μη προσθήκη μικροοργανισμών). Τα παραπάνω προκαταρκτικά αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι επιπρόσθετη έρευνα σχετικά με τον κατάλληλο χειρισμό των ενδογενών μικροοργανισμών θα βελτιώσει ακόμη περισσότερο την αποτελεσματικότητα του βιολογικού καθαρισμού.

**ENDOGENOUS MICROORGANISMS FOR THE IMPROVEMENT
OF BIOLOGICAL TREATMENT OF BREWERY PLANT
WASTEWATER****Pitarakis G., Gogakos S., Sivropoulou A.***Εργαστήριο Γ. Μικροβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 54124
Θεσσαλονίκη*

The purpose of the present study was the manipulation of endogenous microorganisms in outcast water of brewery installations in order to improve the effectiveness of biological treatment. Accordingly, a small scale reproduction of the wastewater treatment process applied by the brewery plant was constructed, so as to simulate in the laboratory the treatment in the brewery plant. Initially numerous samples of wastewater were transferred from the brewery installations and were treated under laboratory conditions. During this process the time-dependent qualitative and quantitative changes of microbial populations was studied. At the initial stages of the process it was observed that the population of three microorganisms was high and gradually increased up to 77-100% of the total microbial population of the samples. Since these microorganisms may participate in the treatment process, they were isolated and identified. Each of the three isolates was propagated under the appropriate conditions, and harvested by centrifugation. Addition of these microorganisms separately, at a density of 10^6 CFU/ml to wastewater samples, led to a 25% reduction of BOD and COD compared to the controls (no addition of microorganisms). The above preliminary results suggest that additional research on the appropriate handling of endogenous microorganisms in outcast water will further improve the effectiveness of biological treatment.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗΝ ΚΑΡΔΙΑ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΙΟΥ *Rana ridibunda*

Πλιάτσκα Μ., Σταθοπούλου Κ., Γαϊτανάκη Κ. και Ι. Μπέης

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπων, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, 157 84, Αθήνα

Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) πυροδοτούν ποικιλία ενδοκυτταρικών οδών μεταγωγής μηνυμάτων, ανάμεσα στις οποίες είναι και αυτή της p38-MAPK. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτής της κινάσης από έμμεσο οξειδωτικό στρες, όπως αυτό προκλήθηκε από την επίδραση CuCl_2 , στην απομονωμένη εμποτισμένη καρδιά του αμφιβίου *Rana ridibunda*. Διαπιστώθηκε ότι η επαγωγή της φωσφορυλίωσης της p38-MAPK εξαρτάται από τη συγκέντρωση αυτού του παράγοντα, με μέγιστη ενεργοποίηση μετά από επίδραση 500 μM CuCl_2 για 15 min, ενώ πειράματα επανεμποτισμού με φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα, έδειξαν ότι η ενεργοποίηση αυτή παραμένει σε υψηλά επίπεδα, ακόμα και 60 min μετά την απομάκρυνση του παράγοντα. Η ενεργοποίηση της p38-MAPK από το CuCl_2 φαίνεται να συνδέεται με προστατευτικούς κυτταρικούς μηχανισμούς, αφού στις ίδιες συνθήκες παρατηρήθηκε παρόμοια αύξηση της φωσφορυλίωσης της HSP27, ενός έμμεσου υποστρώματος της p38-MAPK. Επίσης, εμποτισμοί με 500 μM CuCl_2 παρουσία 100 μM L-ασκορβικού οξέος ή 150 U/ml καταλάσης έδειξαν ότι οι αντιοξειδωτικοί αυτοί παράγοντες δεν αναστέλλουν την επαγωγή της p38-MAPK, υποδηλώνοντας ότι τα παραγόμενα ROS δεν αποτελούν άμεσο στόχο τους. Σε πειράματα ταυτόχρονης επίδρασης CuCl_2 και υπερθερμίας (42°C), που επίσης σχετίζεται με την δημιουργία ROS, παρατηρήθηκε αθροιστική ενεργοποίηση της p38-MAPK, η οποία οδήγησε σε έντονη φωσφορυλίωση της HSP27. Την ενεργοποίηση της p38-MAPK από τη συνδυασμένη δράση CuCl_2 και υπερθερμίας ανέστειλε μερικώς η καταλάση, υποδεικνύοντας ότι η υπερθερμία επάγει την κινάση μέσω της παραγωγής H_2O_2 . Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν στον πιθανό προστατευτικό ρόλο της p38-MAPK στην καρδιά του αμφιβίου *Rana ridibunda*, μετά από την επίδραση οξειδωτικού στρες, μέσω της μικρής πρωτεΐνης του θερμικού σοκ, HSP27.

Η έρευνα αυτή χρηματοδοτήθηκε από τον ΕΛΚΕ του ΕΚΠΑ.

**EFFECT OF OXIDATIVE MECHANISMS IN THE HEART OF THE
AMPHIBIAN *Rana ridibunda*****Pliatska M., Stathopoulou K., Gaitanaki C., and I. Beis***Dept. of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian
University of Athens, Panepistimioupolis, 157 84, Athens*

Reactive oxygen species (ROS) are known to trigger a variety of intracellular signalling pathways, among which is that of p38-MAPK. In the present study, we investigated the activation of this pathway by indirect oxidative stress, as it was exemplified with the use of CuCl₂, in the isolated perfused heart of the amphibian *Rana ridibunda*. It was found that the induction of p38-MAPK phosphorylation depends on the concentration of this agent, with maximum activation after treatment with 500 μM CuCl₂ for 15 min, while reperfusion experiments with normal bicarbonate buffer showed that this activation sustained even after 60 min after the removal of the agent. The CuCl₂-induced p38-MAPK activation seems to be related with protective cellular mechanisms, since a similar increase under the same conditions was also detected in the phosphorylation of HSP27, an indirect p38-MAPK substrate. Furthermore, perfusions with 500 μM CuCl₂ in the presence of 100 μM L-ascorbic acid or 150 U/ml catalase revealed that these antioxidant factors did not attenuate the p38-MAPK activation, implying that the ROS produced are not their direct targets. In experiments using simultaneously CuCl₂ and hyperthermia (42°C), which is also related to the production of ROS, an additive activation of p38-MAPK was also observed and this caused the intense phosphorylation of HSP27, as well. The p38-MAPK phosphorylation induced by the combined action of CuCl₂ and hyperthermia was partially inhibited by catalase, indicating that hyperthermia activates the kinase through the production of H₂O₂. All the above-mentioned results suggest that, in the heart of the amphibian *Rana ridibunda*, p38-MAPK has a possible protective role, after the effect of oxidative stress, through the small heat shock protein HSP27,

This study was funded by the Special Research Account of the University of Athens.

**ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΙ ΥΠΟΤΟΜΕΙΣ ΠΟΥ ΕΝΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ
ΑΝΑΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ: ΔΟΜΗ ΚΑΙ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

Πολίτου Α.Σ.*

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα 45110

Η αναδιάταξη της χρωματινικής δομής που απαιτείται για διαδικασίες όπως η αντιγραφή και η μεταγραφή του γενετικού υλικού στα ευκαρυωτικά κύτταρα, διαμεσολαβείται από πρωτεϊνικά σύμπλοκα γνωστά ως αναδιαμορφωτές χρωματινής. Πολλές από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό αυτών των ενζυμικών μηχανών περιέχουν συντηρημένα πρωτεϊνικά μοτίβα, κυρίως από τις οικογένειες των bromo-, chromo- και tudor domains. Τα μοτίβα αυτά αλληλεπιδρούν ειδικά με χρωματινικά στοιχεία, αναγνωρίζοντας κατά κύριο λόγο συγκεκριμένες χημικές τροποποιήσεις των ιστονών. Συνδυασμοί τέτοιων τροποποιήσεων (κυρίως ακετυλίωσης, φωσφορυλίωσης και μεθυλίωσης) πιστεύεται ότι οδηγούν στη δημιουργία ενός επιγενετικού κώδικα, του «κώδικα ιστονών», που καθοδηγεί τη διαδικασία αναδιαμόρφωσης της χρωματινικής δομής και, τελικά, τη χρονο- και τοπο-ειδική ρύθμιση γονιδίων. Έχει πρόσφατα προταθεί ότι η αναγνώριση συγκεκριμένων τροποποιήσεων από αντίστοιχους χρωματινικούς αναδιαμορφωτές (και από τα πρωτεϊνικά μοτίβα που αυτοί περιέχουν) παίζει πρωτεύοντα ρόλο στην αποκρυπτογράφηση του «κώδικα ιστονών» και συνδέεται μονοσήμαντα με την τελική έκβαση διεργασιών όπως η μεταγραφή που προϋποθέτουν αναδιοργάνωση της χρωματινής. Στο πλαίσιο αυτό προσδιορίσαμε με NMR την τριτοταγή δομή και μελετήσαμε τις αλληλεπιδράσεις αντιπροσωπευτικών πρωτεϊνικών μοτίβων που περιέχονται σε γνωστούς χρωματινικούς αναδιαμορφωτές. Μελετήσαμε επίσης *in silico* και *in vitro* συνδυασμούς ιστονικών τροποποιήσεων που εμφανίζονται στη μίτωση. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής και πρόσφατες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία θα συζητηθούν βασικά χαρακτηριστικά της υπόθεσης του «κώδικα ιστονών» και της διαδικασίας αποκρυπτογράφησης του.

* Προσκεκλημένη ομιλήτρια

**PROTEIN MODULES INVOLVED IN CHROMATIN
REMODELING: STRUCTURES AND INTERACTIONS
WITH CHROMATIN COMPONENTS**

Politou A.S.*

*Laboratory of Biological Chemistry, Medical School, University of Ioannina, Ioannina
45110, Greece*

Many protein components of large enzymatic assemblies involved in chromatin remodeling contain specialized protein modules, such as *chromo*, *bromo* and *tudor* domains. It is thought that each one of these domains interacts with a specific chromatin component having, ultimately, a distinct effect on chromatin remodeling. Most of these interactions involve specific histone modifications. Combinatorial patterns of post-translational histone modifications are believed to provide specific readouts utilized in DNA transactions or chromatin state transitions and to constitute an epigenetic information code, the “histone code”. It has been suggested that recognition of even single-site histone modifications by protein modules of several classes could mediate the decoding of the “histone code” and determine, in a linear fashion, the specific outcome of chromatin remodeling-dependent processes, such as transcription. In this context, we solved the structures and studied the binding preferences of representative chromatin-associated domains. We also studied *in silico* and *in vitro* novel experimentally verified histone modification patterns peculiar to the mitotic state. Based on our results and on data amassed from several other groups we will discuss the “one domain-one partner-one modification-one transcriptional output” concept that is central to the “histone code” hypothesis and its ramifications.

* Invited speaker

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ O_2^- , H_2O_2 ΚΑΙ NO ΣΤΑ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ
C. capitata, ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΟΦΑΓΙΑ.
ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ MAP ΚΙΝΑΣΩΝ**

Πουλλιλιού Σ., Τσάκας Σ., Λαμπροπούλου Μ., Μαρμάρας Β.Ι.

Εργαστήριο Βιολογίας - Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Τα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του αίματος, στον άνθρωπο, ως μέρος της άμυνας του οργανισμού, όταν έλθουν σε επαφή με μικροβιακούς οργανισμούς, παράγουν NO και ενεργές ρίζες οξυγόνου (O_2^-), οι οποίες μετατρέπονται σε H_2O_2 . Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η παραγωγή των διαφόρων μορφών ενεργού οξυγόνου, στα αιμοκύτταρα του εντόμου *C. capitata* κατά την κυτταροφαγία, με κυτταρομετρία ροής. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένα φθορίζοντα μόρια, όπως η διγλωροφλουοροσεΐνη (DCFH) για NO και H_2O_2 , η διυδροροδαμίνη (DHR) για το H_2O_2 και το υδροαιθιδίνη (HE) για το O_2^- . Τα πειράματα έδειξαν ότι κατά την κυτταροφαγία τόσο της *E. coli* (- gram) όσο και του *S. aureus* (+ gram) παράγεται O_2^- που το περισσότερο μετατρέπεται σε H_2O_2 και πολύ λίγο NO. Η παραγωγή των μορίων αυτών ελέγχθηκε με εξειδικευμένους αναστολείς των ενζύμων σύνθεσής τους, NEM για τη NADPH οξειδάση, NaN_3 για την καταλάση και L-NAME για τη συνθετάση του NO. Για την κυτταροφαγία και των δύο ειδών βακτηρίων, συμμετέχουν οι MAP κινάσες και η παρουσία των παραπάνω αναστολέων έδειξε ότι η φωσφορυλίωση της ERK εξαρτάται κυρίως από H_2O_2 και NO και καθόλου από το O_2^- . Η φωσφορυλίωση τόσο της JNK όσο και της p38 εξαρτώνται από O_2^- και H_2O_2 και καθόλου από NO. Σε ανάλογα πειράματα, η παρουσία αναστολέων της φωσφορυλίωσης των ERK και p38 δεν προκάλεσαν καμία αλλαγή στην παραγωγή O_2^- , H_2O_2 και NO. Αντίθετα, η παρουσία αναστολέα της φωσφορυλίωσης της JNK προκάλεσε αύξηση της παραγωγής και των τριών ριζών O_2 αλλά και ταυτόχρονα, αύξηση της κυτταροφαγίας. Φαίνεται ότι οι μηχανισμοί πρόσληψης των *E. coli* και *S. aureus* σχετίζονται με την παραγωγή O_2^- , H_2O_2 και NO. Η παραγωγή των μορίων αυτών οδηγεί και στη διαφορετική φωσφορυλίωση MAP κινασών απαραίτητων για την ολοκλήρωση της κυτταροφαγίας.

**HEMOCYTIC PRODUCTION OF O_2^- , H_2O_2 AND NO IN
C. capitata, DURING PHAGOCYTOSIS.
DIFFERENTIAL PHOSPHORYLATION OF MAP KINASES****Pouliliou S., Tsakas S., Lampropoulou M., Marmaras V.J.***Laboratory of Biology – Department of Biology, University of Patras*

The human polymorphonuclear blood cells destroy microbial organisms by producing superoxide anions (O_2^-) (which are then dismutated in H_2O_2) and NO. This production is part of normal host defense against infectious diseases. In the present work, the production of these reactive oxygen species (ROS) was studied in the hemocytes of *C. capitata*, during phagocytosis, with flow cytometry. For this purpose, three specific fluorescent probes, dichlorofluorescein (DCFH) for NO and H_2O_2 , dihydrorhodamine (DHR) for H_2O_2 and hydroethidine (HE) for O_2^- were used. Results showed that during phagocytosis of *E. coli* (gram -) as well as *S. aureus* (gram +), O_2^- is the main reactive oxygen species which is produced and dismutated in H_2O_2 , while NO is produced in only small amounts. The production of these species was investigated with specific inhibitors of their synthesis enzymes, such as NEM for NADPH oxidase, NaN_3 for katalase and L-NAME for NO synthase. MAP kinases are involved in the phagocytosis of the above bacteria and the presence of ROS production inhibitors showed that the phosphorylation of ERK depends only on H_2O_2 and NO and not at all on O_2^- . The phosphorylation of JNK and p38, as well, depends on O_2^- and H_2O_2 and not on NO. In parallel experiments the presence of p-ERK and p-p38 inhibitors did not cause any change on the production of O_2^- , H_2O_2 and NO. On the contrary, the presence of p-JNK inhibitor induced the production of all reactive oxygen species but also increased phagocytosis. Thus, it reveals that the mechanisms, for *E. coli* and *S. aureus* uptake, are related with the production of O_2^- , H_2O_2 and NO. The production of these species leads to the differential phosphorylation of MAP kinases which are necessary for phagocytosis.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΣΤΟΝΗΣ Η2ΑΧ ΜΕ ΤΟ ΠΥΡΗΝΙΚΟ ΣΚΕΛΕΤΟ

Ρογκάκου Έ.Π.*

Ερευνητικό Κέντρο Βιοιατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ» Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Φλέμιγκ 34, Βάρη, Αττική.

Η ιστόνη Η2ΑΧ είναι ένα μέλος της οικογένειας των Η2Α ιστονών που διαφέρει από τα υπόλοιπα μέλη κατά ένα συντηρημένο SQ μοτίβο στο καρβόξυ-τελικό άκρο. Η σερίνη στη θέση 139 φωσφορυλιώνεται γρήγορα (επονομαζόμενη ως γΗ2ΑΧ) όταν προκαλούνται διπλά σπασίματα στο DNA κυττάρων ή πειραματόζωων, είτε από φυσικούς ή χημικούς παράγοντες, είτε σε φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες. Κατά την απόπτωση όμως, ο γ-επίτοπος είναι επικαλυμμένος. Η υπόθεση-ελέγχου που διατυπώνουμε είναι ότι ο παράγοντας επικάλυψης είναι μία πρωτεΐνη η οποία βρίσκεται σε φυσική αλληλεπίδραση με την γΗ2ΑΧ. Προκειμένου να προσεγγίσουμε πειραματικά αυτή την υπόθεση, αναπτύξαμε ένα πρωτόκολλο εκχύλισης με βάση το οποίο αποκαλύψαμε τον επίτοπο της γΗ2ΑΧ κατά την απόπτωση. Κύτταρα υποβλήθηκαν σε ένα καινούργιο πρωτόκολλο εκχύλισης ήπιας υδροφοβικότητας (MiHE) και το εκχύλισμα υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, και στη συνέχεια ακολουθήθηκε από φασματοσκοπία μάζας. Μέχρι τώρα, περίπου 200 πρωτεϊνικά στίγματα έχουν χαρακτηριστεί. Ανάλυση ομαδοποίησης στις ταυτοποιημένες πρωτεΐνες αποκαλύπτει ότι μία κύρια κατηγορία αποτελούν οι πρωτεΐνες του πυρηνικού σκελετού. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε ένα σύστημα επιλογής πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την γΗ2ΑΧ. Το σύστημα αυτό αποτελείται από φωσφορυλιωμένα και μη-φωσφορυλιωμένα βιοτινυλιωμένα καρβοξυτελικά πεπτίδια της Η2ΑΧ, τα οποία είναι προσδεδεμένα σε παραμαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης. Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα μας υποδεικνύουν ότι η γΗ2ΑΧ αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του πυρηνικού σκελετού για να οργανώσει τις γΗ2ΑΧ εστίες σε καθορισμένα τοπολογικά κέντρα, προκειμένου να διευθετηθούν και να εναρμονιστούν οι πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση που ξεκινά από την χρωματίνη.

* Προσκεκλημένη ομιλήτρια

BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF H2AX MASKING IN APOPTOSIS**Rogakou E.****BSRC "Al. Fleming" Institute of Molecular Biology and Genetics, Fleming 34, 166 72, Vari, Attiki.*

Histone H2AX is a ubiquitous member of the H2A histone family that differs from the other H2A histones by the presence of an evolutionarily conserved C-terminal motif. The serine-139 residue in this motif becomes rapidly phosphorylated (known as γ H2AX) in cells and animals when double-strand breaks are introduced into their chromatin by various physical, and chemical means. In apoptosis though, the γ -epitope is masked. Our working hypothesis is that the "masking" factor in apoptosis is a protein that physically interacts with γ H2AX. To approach this hypothesis, we developed a extraction procedure to unmask the apoptotic γ H2AX. Cells were subjected to a novel Mild Hydrophobic Extraction (MiHE) procedure, and the extract was subjected to characterization by 2D gel electrophoresis and mass-spectroscopy analysis. Up to now, about 200 spots have been resolved on 2D gels. Clustering analysis on identified proteins reveals that one main category represents proteins of the nuclear skeleton. Further, we have set up a system to screen for γ H2AX interactors that are present in the MiHEExtract. The system we utilize is beads conjugated to the unphosphorylated and the phosphorylated C-terminal H2AX peptide. Up to now, we have identified several structural proteins that interact with the C-terminal H2AX peptide. Our results point to the direction that γ H2AX interacts with nuclear skeleton proteins in order to organize γ H2AX-foci into DNA repair machinery centers to accommodate and orchestrate chromatin-based signal transduction responses.

* Invited speaker

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΙ Η ΑΓΓΕΙΟΤΑΣΙΝΗ II ΣΕ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ

Σάιλερ Ξ.¹, Κολιάκος Γ.², Καλογιάννη Μ.¹

¹ Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών
Επιστημών, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη 54124

² Τομέας Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη 54124

Η αγγειοτασίνη II είναι ισχυρό αγγειοσυσταλτικό πεπτίδιο με πολλαπλές επιδράσεις στο καρδιαγγειακό και νεφρικό σύστημα. Οι σηματοδοτικοί μηχανισμοί τους οποίους η αγγειοτασίνη II εκκινεί δεν είναι απόλυτα γνωστοί. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του μονοπατιού μεταγωγής σήματος που επάγεται από την αγγειοτασίνη II και στο οποίο συμμετέχουν ο αντιμεταφορέας Na^+/H^+ (NHE1), ισομορφές της PKC και οξειδωτικές ρίζες. Στη συγκεκριμένη εργασία μετρήθηκε το ενδοκυτταρικό pH (pHi) μονοκυττάρων παρουσία αγγειοτασίνης II (1ng/ml και 5ng/ml). Διαπιστώθηκε ότι η αγγειοτασίνη II αυξάνει σημαντικά το pHi. Με την προσθήκη ξεχωριστά, του αναστολέα της NHE1, cariporide (20nM), του αναστολέα της NADPH οξειδάσης, DPI (10μM) και του αναστολέα της NO-συνθάσης L-NAME (10μM), το pHi επανήλθε στα επίπεδα των κυττάρων ελέγχου. Επιπρόσθετα, με χρήση των αναστολέων GF109203X (10μM) και Gö6976 (500nM) φάνηκε η συμμετοχή και των ζ- ή/και ι-ισομορφών της PKC στο μηχανισμό αύξησης του pHi που προκαλείται από την αγγειοτασίνη II. Ακόμη, μετρήθηκαν τα επίπεδα της ελεύθερης ρίζας O_2^- και βρέθηκε πως η αγγειοτασίνη II τα αυξάνει σε σχέση με τα επίπεδα των κυττάρων ελέγχου, ενώ ταυτόχρονη χρήση cariporide (20nM) ανέστειλε αυτό το φαινόμενο. Επίσης, η ικανότητα προσκόλλησης των μονοκυττάρων σε υπόστρωμα λαμινίνης-1 εμφανίστηκε αυξημένη παρουσία αγγειοτασίνης II (5ng/ml). Χρήση του cariporide (20nM) απέτρεψε αυτή την αύξηση. Επομένως, η αγγειοτασίνη II ενεργοποιεί την NHE1 μέσω μονοπατιών των PKC με συμμετοχή των ριζών O_2^- . Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας αποτελούν ένδειξη της συμμετοχής της αγγειοτασίνης II και της NHE1 στις αθηρογόνες ιδιότητες των μονοκυττάρων.

**STUDY OF THE SIGNALING MECHANISMS INDUCED BY
ANGIOTENSIN II IN HUMAN MONOCYTES****Sailer X.¹, Koliakos G.², Kaloyianni M.¹**¹*Laboratory of Animal Physiology, Department of Zoology, School of Biology, Aristotle of
University of Thessaloniki (AUTH), 54124*²*Department of Biological Chemistry, School of Medicine, Aristotle University of
Thessaloniki (AUTH), 54124*

Angiotensin II is a powerful vasoconstrictive peptide with multiple effects on the cardiovascular and renal system. Signaling mechanisms, which are triggered by angiotensin II, have not been fully elucidated. The purpose of this study was to investigate the signal transduction pathway induced by angiotensin II, in which the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1), isoforms of PKC and reactive oxygen species take part. The intracellular pH (pHi) of monocytes was measured in the presence of angiotensin II (1ng/ml and 5ng/ml). It was found that angiotensin II increases pHi significantly. Addition of the NHE1 inhibitor, cariporide (20nM), the inhibitor of NADPH oxidase, DPI (10μM) and the inhibitor of NO-synthase L-NAME (10μM), separately, caused an inhibition of pHi increase. Moreover, using the inhibitors GF109203X (10μM) and Gö6976 (500nM), the participation of ζ (zeta) and/or i- (iota) isoforms of PKC was observed in the pathway induced by angiotensin II. Furthermore, it was shown that angiotensin II caused an increase in superoxide ion (O₂⁻) levels in relation to the control sample. The use of cariporide inhibited this effect. The ability of adhesion of monocytes to laminin-1 was increased in the presence of angiotensin II (5ng/ml). Cariporide counteracted this increase. Consequently, angiotensin II activates NHE1 through pathways involving PKCs with the participation of O₂⁻. In conclusion, our results demonstrate a connection between angiotensin II and the atherogenic properties of monocytes with the involvement of NHE1.

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ
ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ**

**Σαλή Α., Ηλιάδης Π., Παπασιδέρη Ι.¹, Μαργαρίτης Α.Χ.¹,
Λυμπέρη Π.**

*Εργαστήριο Ανοσολογίας, Τμήμα Βιοχημείας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ,
Βασ. Σοφίας 127, Τ.Κ.115 21 Αθήνα*

*¹Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τ.Κ.157 84*

Η ανθρώπινη θυρεοσφαιρίνη (hTg) είναι μια μεγάλου μεγέθους (660 kDa, ομοδιμερής), ιωδογλυκοπρωτεΐνη. Συντίθεται στον θυρεοειδή αδένα, συμμετέχει στη σύνθεση των ορμονών, θυροξίνη (T₄), τριωδοθυρονίνη (T₃) και αποτελεί ένα από τα κύρια αυτοαντιγόνα του αδένα. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η παραγωγή, απομόνωση και καθα-ρισμός μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs) ποντικού ειδικών για την hTg, και παράλληλα η διερεύνηση για την παραγωγή μονοκλωνικών φυσικών αυτοαντισωμάτων (ΦΑΑ) (χαρακτηρίζονται συχνά από πολυειδικότητα), μετά από υπερανοσοποίηση ποντικών με hTg. Δύο ποντίκια BALB/c ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με 50 μg hTg σε πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund (CFA) και 15 μέρες μετά, χορηγήθηκε αναμνηστική δόση σε ατελής FA. Έγινε σύντηξη των σπληνοκυττάρων με τη μυελωματική σειρά NSO με χρήση PEG-1500, αφού προηγήθηκε έλεγχος του τίτλου των Abs στον αντιορό. Ο έλεγχος αντιορών και mAbs έγινε με ELISA. Συνολικά παρήχθησαν 26 mAbs τάξης IgG, 14 ειδικά για την hTg και 12 έναντι τριών άλλων αυτοαντιγόνων: ακτίνης ποντικού, ανθρώπινης μυοσίνης και τρι-νιτροφαινόλης, που επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ΦΑΑ κατά την υπερανο-σοποίηση με ένα αντιγόνο και την παραγωγή μονοειδικών Abs υψηλής συγγένειας. Ασκιτικό υγρό παρήχθη για 10/14 αντί-Tg κλώνους και μελετήθηκε η ειδικότητά τους έναντι hTg, T₃ και T₄. Εφτά είχαν υψηλή ειδικότητα για την hTg, ενώ κανένα δεν αναγνώριζε τις T₃ και T₄. Έξι αναγνώριζαν την Tg από 4 άλλα είδη (χοίρου, βοδιού, αρουραίου, κουνελιού), λόγω των εξελικτικά συντηρημένων περιοχών. MAbs απομονώθηκαν από 2/7 ασκίτες με χρωματογραφία σε στήλη πρωτεΐνης A-Sepharose και διατηρούσαν την αντι-hTg δραστικότητα τους. Τα αντί-hTg mAbs, αποτελούν ένα σημαντικό διαγνωστικό μέσο για την ανίχνευση της κυκλοφορούσας hTg σε παθολογικούς ορούς, και ταυτόχρονα ένα σημαντικό εργαλείο για την μελέτη των διαφόρων B επιτόπων στο μόριο της hTg, καθώς και διάφορων μηχανισμών ανοσορρύθμισης.

**PRODUCTION OF MOUSE MONOCLONAL ANTIBODIES
AGAINST EPITOPES OF HUMAN THYROGLOBULIN****Sali A., Eliades P., Papisideri I.¹, Margaritis L.H.¹,
Lymberi P.***Immunology Laboratory, Department of Biochemistry, Hellenic Pasteur Institute, Vas.
Sofias 127, 115 21 Athens**¹Department of Cell Biology & Biophysics, Faculty of Biology, National and Kapodistrian
University of Athens, 157 84 Athens*

Human Thyroglobulin (hTg) is a large (660 kDa, homodimeric) iodinated glycoprotein. It is produced in the thyroid gland where it participates in the synthesis of thyroxine (T₄) and triiodothyronine (T₃) and constitutes one of the main autoantigens of the gland. This study aims at the production, isolation and purification of mouse monoclonal antibodies (mAbs) against hTg, as well as at the investigation of the presence of naturally-occurring monoclonal autoantibodies (NAbs) (frequently characterized by polyspecificity), after hyperimmunization of mice with hTg. Two BALB/c mice were injected intraperitoneally with 50 µg of hTg in Complete Freund's Adjuvant (CFA) and 15 days later were boosted with the same dose of antigen in Incomplete FA (IFA). Splenocytes were fused with NSO myeloma cells by means of PEG-1500, after testing the Abs titre in the antiserum. Antisera and mAbs were tested by ELISA. A total of 26 IgG mAbs was produced, 14 to hTg and 12 to three other autoantigens: murine actin, human myosin and trinitrophenyl, thus confirming the theory of NAbs, present during hyper-immunization with an antigen leading to monospecific Abs of high affinity. Ten out of 14 anti-Tg clones were tested against hTg, T₃ and T₄ after the production of ascitic fluid. Seven recognised hTg but none T₃ and T₄. Six were found to recognise Tg from four other species (porcine, bovine, rat, rabbit), due to the evolutionary conserved Tg sequences. MAbs were purified from 2/7 ascites with chromatography on a protein-A Sepharose column and their anti-hTg activity was retained. Anti-hTg mAbs are useful diagnostic tools (i.e. in the measurement of circulating hTg) and are exploited in basic research for the study of numerous B-cell epitopes on hTg as well as of immunoregulatory mechanisms.

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ
ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΑ *A.oryzae* (IMI: 283876), ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΩΣ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΗΣ**

Σανούτσι Φ.Σ., Καλιάφας Α.

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο, 26500.

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και η δράση περιβαλλοντικών παραγόντων στην ανάπτυξη των στελεχών των μυκηλιακών μυκήτων *A. oryzae* και *Fusarium equiseti*. Κατά την διάρκεια της έρευνας εντοπίστηκαν οι καλύτερες συνθήκες καλλιέργειας των εξεταζόμενων μυκήτων και επιλέχθηκε το στέλεχος του *A. oryzae* ως πλέον κατάλληλο για την συνέχιση της εργασίας. Επίσης εξετάστηκαν διάφορα συνθετικά και αγροτοβιομηχανικά θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης του μύκητα και προσδιορίστηκε το οικονομικότερο και αποδοτικότερο για μαζική παραγωγή μυκηλίων. Κύριος στόχος της έρευνας ήταν να μελετηθεί η δυνατότητα χρήσης μυκηλιακής πρωτεΐνης *A. oryzae* ως αποκλειστικής ιχθυοτροφής σε πειραματόζωα του είδους *C. auratus*. Για το σκοπό αυτό η μυκηλιακή πρωτεΐνη παράχθηκε υπό μορφή σφαιριδίων (πελλετών) και έγινε άμεσα αποδεκτή από τους ιχθείς. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι οι τρεφόμενοι αποκλειστικά με μυκηλιακή πρωτεΐνη ιχθύες επεβίωσαν για χρονικό διάστημα περίπου 150 ημερών, αλλά διαπιστώθηκε μείωση του βάρους των ιχθύων κατά 15%. Μελέτη ελέγχου των αντανακλαστικών τους με οπτικοκινητικές δοκιμασίες, έδειξαν ότι οι εξεταζόμενοι ιχθύες παρουσίασαν ποσοστό αποτυχίας υπερδιπλάσιο των πειραματόζωων ελέγχου. Στην συνέχεια διεξήχθη μορφολογική και ανατομική μελέτη των τρεφόμενων αποκλειστικά με μυκήλια ιχθύων, η οποία αποκάλυψε την παρουσία, εξωτερικά και εσωτερικά, πλήθους φαιόχρωμων κηλίδων που συνήθως προκαλούνται από τροφική καταπόνηση ή περιβαλλοντική πίεση. Λεπτομερής ιστολογική μελέτη του πεπτικού και μυϊκού συστήματος των πειραματόζωων εντόπισε πιθανά σημεία εισβολής του μύκητα μέσω του βλεννογόνου του οπισθεντέρου αλλά και σαφή αποδόμηση του μυϊκού ιστού από τη διείσδυση των μυκηλιακών υφών. Συμπερασματικά, η χρήση της μικροβιακής πρωτεΐνης υπό μορφή ζωντανών μυκηλιακών σφαιριδίων, ως ιχθυοτροφής, αποδείχτηκε ακατάλληλη καθώς φαίνεται ότι ο μύκητας αναπτύσσεται εις βάρος των ιστών του ψαριού. Το γεγονός είναι πιθανόν να αντιμετωπισθεί με την χρήση αδρανοποιημένης βιομάζας *A. oryzae* ως τροφής, πρόταση που αποτελεί την συνέχεια τις ερευνητικής εργασίας.

**STUDY OF THE FACTORS AFFECTING THE GROWTH
OF ASCOMYCETON *A. oryzae* (IMI: 283876) BIOMASS
PRODUCTION AND ITS USE AS A FISH NUTRIENT****Sanoussi F.S., Kaliafas A.**

*Laboratory of Microbiology, Section of Genetics, Cell and Developmental Biology,
Department of Biology, University of Patras, Rion, 26500*

In the present study, the morphological characteristics and the effect of environmental factors on the growth of *A. oryzae* and *Fusarium equiseti* strains, were investigated. During the study, the optimal conditions for the culture and growth of *A. oryzae* and *Fusarium equiseti* were examined and the strain of *A. oryzae* was selected as most suitable for the continuation of the investigation. In addition, various synthetic and agro-industrial substrates were examined as culture media and the most economic and efficient for mass production of mycelia was determined. Another aim of the project, was the study of possible utilization, of microbial protein produced from *A. oryzae* as exclusive fish food for the *C. auratus* species. For this reason, the microbial protein was produced in spherical form (pellets) and became immediately accepted from the fish. It was also observed that the fish, which were exclusively fed with microbial protein, survived for roughly 150 days, and that there was a reduction of 15% of their weight. With regard to studies concerning their reflexes in optical and motion tests, it was observed that the microbial protein fed fish presented a rate of failure, that was more than double the one of the control group. The anatomical and morphological studies of the fish, fed with the microbial protein, revealed the presence, externally and internally, of numerous blots which are characteristic of trophic stress or environmental pressure. Furthermore, the histological study, of the peptic and muscular system of the fed fish, has presented likely points of invasion of the mycete via the intestinal mucus and explicit deconstruction of muscular tissue from the infiltration of microbes. Therefore, the use of microbial protein in the form of active microbial spherules, as fish food, has proved in appropriate, as it appears that the mycete is developing causing great destruction to the tissues of the fish. It is possible to overcome this problem by using a non-active form of the biomass produced from *A. oryzae* as fish food, a proposal which requires further scientific research.

ΕΝΑ ΝΕΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΕΤΑΙ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟ-ΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΜΙΣΧΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΥΠΟΥ Α ΣΤΟ *DICTYOSTELIUM*

Σεραφειμίδης Ι.¹, Nuñez-Corcuera Β.², Kay R.R.¹ και Τ. Suárez²

¹MRC-Laboratory of Molecular Biology, CB2-2QH, Cambridge (UK)

²Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.), 28040, Madrid (Spain)

Σε συνθήκες έλλειψης τροφής, βλαστικές αμοιβάδες του οργανισμού *Dictyostelium* συναθροίζονται για να σχηματίσουν το καρπόσωμα. Απομονώσαμε με μέθοδο τυχαίας μεταλλαξιγένεσης στέλεχος που παρουσιάζει αργή ανάπτυξη με αραιά, μικρά και αδιαφοροποίητα καρποσώματα. Εντοπίσαμε το μεταλλαγμένο γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας και χωρίς πιθανά ομόλογα σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν πως το γονίδιο αυτό (*padA*) είναι ζωτικής σημασίας και πως το *padA* στέλεχος είναι θερμοευαίσθητο στην αύξηση αλλά και στην ανάπτυξη του οργανισμού. Στους 27°C το *padA* στέλεχος χρειάζεται 24 ώρες για την συνάθροιση και άλλες 24 ώρες για να δώσει ψευδοπλασμόδια. Αυτά έπειτα επιχειρούν να αναστυλωθούν αλλά είναι λεπτά, με τραχιά επιφάνεια και ανίκανα να διαφοροποιηθούν περαιτέρω. Η έκφραση του προμίσχικού μάρτυρα *ectA*, ο οποίος καθορίζει την prestalk-A (*pstA*) περιοχή, εξαφανίζεται στους 27°C ενώ είναι ιδιαίτερα ελαττωμένη στους 22°C. Επίσης, το *padA* στέλεχος δεν διαθέτει τον χαρακτηριστικό προμίσχικό σωλήνα κατά το πρώιμο στάδιο καρποσώματος, όπως καθορίζεται από τον μάρτυρα *car2*. Όταν το *padA* στέλεχος αναπτύσσεται σε συνεργασία με μικρό ποσοστό κυττάρων φυσικού τύπου, η ανάπτυξη προχωρά και κορυφώνεται φυσιολογικά. Ιχνηλατώντας με GFP κύτταρα φυσικού τύπου σε χιμαιρικά ψευδοπλασμόδια αποδείχθηκε πως το *padA* στέλεχος δεν καταλαμβάνει θέσεις στο εμπρόσθιο τμήμα (*padA* ζώνη) αλλά αντικαθίσταται αποκλειστικά από κύτταρα φυσικού τύπου τα οποία αναπόφευκτα διαφοροποιούνται σε προμίσχικά κύτταρα. Η συμπεριφορά “εξαπάτησης” του στελέχους *padA* στα ψευδοπλασμόδια επιτρέπει φαινομενικά στο μεταλλαγμένο αυτό στέλεχος να πολλαπλασιάζεται ως σπόρια και να κερδίζει έδαφος έναντι του φυσικού στελέχους, παρέχοντας στον οργανισμό εξελικτικό μειονέκτημα. Αυτό όμως τελικά αποτρέπεται. Πιθανοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται για να αποφευχθεί η εξαπάτηση στη φύση θα συζητηθούν.

**A NEW GENE INVOLVED IN PRESTALK-A DIFFERENTIATION
IN *DICTYOSTELIUM*****Serafimidis I.¹, Nuñez-Corcuera B.², Kay R.R.¹, and T. Suárez²**¹MRC-Laboratory of Molecular Biology, CB2-2QH, Cambridge (UK)²Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.), 28040, Madrid (Spain)

Dictyostelium cells live as solitary amoebae, however upon starvation thousands of them aggregate together to form a fruiting body, a structure consisting of a cellular stalk supporting a mass of spores. We have isolated by random mutagenesis a mutant showing delayed development and sparse, small and abnormal fruiting bodies. Identification of the disrupted gene led to the discovery of a protein of unknown function and with no obvious homologues. Further studies showed that the gene (now named *padA*) is essential for growth and that the recapitulated *padA* mutant is thermo-sensitive for growth and development. At 27°C, it takes 24 hrs for the mutant to reach the mound stage and another 24hrs to make slugs. These then attempt to rise but appear short, thin and rough, and are unable to differentiate any further. Expression of the prestalk marker *ecmA*, which defines the prestalk-A (pstA) region, is abolished at 27°C and significantly diminished at 22°C. At the restrictive temperature, the mutant also lacks the characteristic prestalk tube defined by the *car2* marker. Other prestalk (*ecmO*, *ecmB*) and prespore (*pspA*) markers tested remained unchanged at both temperatures. When *padA* cells are co-developed with a small percentage of wild-type AX2 cells, development is rescued and culmination proceeds normally. GFP-tracking of wild-type cells in chimeric slugs however revealed that the mutant is excluded from the tip (pstA zone) and is replaced by wild-type cells, which unavoidably become prestalk cells. The “cheating” behaviour of *padA* in slugs would potentially allow the mutant to propagate as spores and win over wild-type cells, giving the organism an evolutionary disadvantage. Interestingly this does not happen and possible mechanisms employed to avoid cheating in nature will be discussed. Mature stalk cells are a heterogeneous population in the *Dictyostelium* fruiting body and consequently there is a great diversity of prestalk cell types probably arising through specific regulatory pathways. We believe we have identified a new gene involved in pstA cell differentiation that can be classified as a cheater in chimeras with wild-type cells.

**Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΗΣ ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗΣ ΤΗΣ DOPA ΣΤΗΝ
ΚΥΤΤΑΡΟΦΑΓΙΑ ΤΗΣ *E. coli* ΑΠΟ ΤΑ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΜΕΣΟ-
ΓΕΙΑΚΗΣ ΜΥΓΑΣ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΜΕ O_2^- ΚΑΙ H_2O_2**

Σίδερη Μ., Τσάκας Σ., Λαμπροπούλου Μ., Μαρμάρας Β.Ι.

Εργαστήριο Βιολογίας - Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Η αποκαρβοξυλάση της Dopa (Dopa Decarboxylase - DDC) δρα σε πρώιμο στάδιο της μελανογένεσης, καταλύοντας τη μετατροπή της Dopa σε Dopamine. Περαιτέρω οξείδωση της Dopamine καταλήγει στην παραγωγή μελανίνης. Στα έντομα η Dopa βρίσκεται στο επιδερμίδιο, στα νευρικά κύτταρα και στα κύτταρα των ωοθηκών. Συμμετέχει δε στην ανάπτυξη του εμβρύου και στη σκλήρυνση του επιδερμιδίου. Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η συμμετοχή της DDC στην κυτταροφαγία του βακτηρίου *E. coli* από τα αιμοκύτταρα της μύγας της Μεσογείου. Επίσης, συσχετίστηκε η δράση της DDC με την παραγωγή διαφόρων μορφών ενεργού οξυγόνου, όπως, O_2^- και H_2O_2 . Με τη χρήση αντισωμάτων έναντι DDC, πιστοποιήθηκε η παρουσία του ενζύμου, με κυτταρομετρία ροής και ανοσοφθορισμό, στην επιφάνεια των αιμοκυττάρων. Η DDC είναι παρούσα στα αιμοκύτταρα κατά το τέλος του προνυμφικού σταδίου μέχρι και τις πρώτες ώρες του νυμφικού και είναι σταθερά συνδεδεμένη στη μεμβράνη των αιμοκυττάρων. Πειράματα παρουσία των αναστολέων της DDC, Benzerazide και Carbidopa, έδειξαν ότι μειώνεται σημαντικά τόσο η κυτταροφαγία της *E. coli*, όσο και η παραγωγή H_2O_2 (μόριο που είναι επίσης απαραίτητο για την είσοδο του βακτηρίου στα αιμοκύτταρα). Η κυτταροφαγία της *E. coli* σε ισότονο αλατούχο διάλυμα Ringer's, γίνεται σε μικρότερο βαθμό, σε σύγκριση με ανάλογο πείραμα σε θρεπτικό μέσο Grace's, ενώ η προσθήκη τυροσίνης, Dopa ή Dopamine στο διάλυμα Ringer's αυξάνει την κυτταροφαγία, στα επίπεδα του Grace's. Φαίνεται ότι η DDC συμμετέχει στην κυτταροφαγία ως μέρος της αλληλουχίας αντιδράσεων με εκκινητή το σύστημα φαινολοξειδάσης, ρυθμίζοντας επιπλέον και την παραγωγή H_2O_2 .

THE INVOLVEMENT OF DOPA DECARBOXYLASE IN THE PHAGOCYTOSIS OF *E. coli* BY THE HEMOCYTES OF MEDFLY *C. Capitata*. CORRELATION OF THE ENZYME WITH O_2^- AND H_2O_2 .

Sideri M., Tsakas S., Lampropoulou M., Marmaras V.J.

Laboratory of Biology – Department of Biology, University of Patras

Dopa Decarboxylase (DDC) acts at the early stages of melanogenesis, by converting Dopa to Dopamine. Further oxidation of Dopamine leads to the production of melanin. In insects, Dopa is found in the cuticle, the neural cells and the ovarian cells. DDC is involved in the embryonic development and the cuticle sclerotization. In the present work, the role of DDC in the phagocytosis of *E. coli*, by the hemocytes of medfly, was investigated. The action of DDC was also correlated with the production of the reactive oxygen species O_2^- and H_2O_2 . Flow cytometry analysis and immunofluorescence, using anti-DDC antibodies, revealed that DDC was located on the surface of medfly hemocytes. It was found that DDC was present on the surface of hemocytes, during the last hour of larval stage (non feeding stage) and the first hours of pupal stage and that is stable connected with the cell membrane. The presence of DDC inhibitors, Benzerazide and Carbidopa, reduced significantly *E. coli* phagocytosis and it also decreased the production of H_2O_2 (a reactive oxygen species necessary for the uptake of bacteria by the hemocytes). Phagocytosis of *E. coli* in an isotonic Ringer's buffered solution occurs in a lesser degree, compared with phagocytosis in Grace's cultured medium. The addition of tyrosine, Dopa or Dopamine in the Ringer's solution enhanced phagocytosis, at levels, same as in Grace's cultured medium. It appears that DDC is involved in phagocytosis as part of the phenoloxidase reaction sequence and also regulates the production of H_2O_2 .

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ
ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗΣ α ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗΣ
ΑΝΑΛΥΣΗΣ**

**Σκοπελίτη Μ.¹, Kratzer U.², Altenberend F.³, Fecker M.⁴, Κλημέντζου
Π.⁵, Λιβανίου Ε.⁵, Kalbacher H.², Stevanovic S.³, Voelter W.⁴,
Τσιτσιλώνη Ο.Ε.¹**

¹Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, ²Medical and Natural Sciences Research Centre, ³Department of Immunology, και ⁴Department of Physiological Biochemistry, Univ. of Tuebingen, ⁵Ινστιτούτο Ραδιοπροστασίας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Αθήνα

Η προθυμοσίνη α (προΤα) είναι όξινο πολυπεπτίδιο 109 αμινοξέων που παρουσιάζει διακριτή ανοσοενισχυτική δράση στην ενίσχυση του T-κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της NK κυτταροτοξικότητας, ενώ ο ακριβής ανοσολογικός μηχανισμός δράσης της παραμένει αδιευκρίνιστος. Σε κυτταρικό επίπεδο η δράση της προΤα εκδηλώνεται, μετά από τριήμερη επώαση, μέσω των μονοκυττάρων και σε συνέργια με άλλους ανοσοτροποποιητές, πχ. η ιντερλευκίνη (IL)-2. Για να ανακαλύψουμε πιθανά εμπλεκόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια και/ή μόρια στην δράση της προΤα, αναλύσαμε πρωτεϊνικά μοτίβα μονοπύρηνων του περιφερικού αίματος (PBMC) από φυσιολογικούς δότες και ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών που επώαστηκαν για 1-3 ημέρες με προΤα. Τα κυτταροπλασματικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και αναλύθηκαν σε 2D-PAGE. Πρωτεϊνικές κηλίδες με διαφορές στην έκφραση αναλύθηκαν για πεπτιδικό τους αποτύπωμα σε φασματομετρία μάζας τύπου MALDI-TOF. Συνολικά, περίπου 40 πρωτεϊνικές κηλίδες ταυτοποιήθηκαν, οι οποίες κατηγοριοποιούνται σε 4 κύριες ομάδες: (α) κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες (πχ. vinculin); (β) ένζυμα του μεταβολισμού (πχ. hexokinase); (γ) σηματοδοτικά μόρια (πχ. IL-1 receptor kinase) και (δ) διαλυτούς παράγοντες (πχ. οι IL-1β, HSP-90, MX-2). Από τα αποτελέσματά μας, προτείνουμε ότι η προΤα, την πρώτη ημέρα της επώασης, διεγείρει τα μονοκύτταρα, τα οποία παράγουν αυξημένα ποσά HSP-90, και σταθεροποιεί την ανοσολογική τους σύναψη με τα T λεμφοκύτταρα; τη δεύτερη ημέρα, επάγει την ενδοκυτταρική παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (όπως η IL-1); ενώ την τρίτη ημέρα έχει καθιερώσει κυτταρικές αλληλεπιδράσεις και τη σηματοδότηση καταρροϊκά μορίων των ιντεγκρινών.

Χρηματοδοτήθηκε από το ΙΚΥ (IKYDA 2003) και το Εμπειρικό Ιδρυμα Αθηνών

INVESTIGATION OF THE IMMUNOLOGICAL ACTIVITY OF PROTHYMOSIN α BY PROTEOMIC ANALYSIS TECHNIQUES**Skopeliti M.¹, Kratzer U.², Altenberend F.³, Fecker M.⁴, Klimentzou P.⁵, Livaniou E.⁵, Kalbacher H.², Stevanovic S.³, Voelter W.⁴, Tsitsilonis O.E.¹**¹*Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, University of Athens,*²*Medical and Natural Sciences Research Centre,* ³*Department of Immunology and*⁴*Department of Physiological Biochemistry, University of Tuebingen,* ⁵*Institute of RRP, NCSR 'Demokritos', Athens*

Prothymosin α (proT α) is an acidic polypeptide of 109 amino acids, which presents distinct immunomodulatory properties, in enhancing normal donor and cancer patient-derived T cell proliferation and NK cell cytotoxicity, with its mode of action remaining elusive until today. At cellular level, it is established that proT α acts *via* a monocyte-dependent pathway, in synergy with other immunoregulators such as low dose interleukin (IL)-2 and upon a 3-day stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). In order to reveal possibly implicated cell signalling pathways and/or molecules in proT α 's activity, we analysed intracellular protein profiles of normal donor and ovarian cancer-patient derived PBMC stimulated with proT α , for 1, 2 and 3 days with 2-D PAGE. Protein spots presenting differential expression were excised and analyzed for their peptide-mass fingerprint by MALDI-TOF mass spectrometry. In total, 40 protein spots were identified, which can be classified into 4 main categories: (a) cytoskeletal proteins (eg. vinculin); (b) metabolic enzymes (eg. hexokinase); (c) cell signaling molecules (eg. IL-1 receptor kinase) and (d) soluble mediators (eg. IL-1 β , HSP-90, MX-2). Based on our results, we propose that proT α exerts a stepwise immunoenhancing effect on PBMC; on day-1, it stimulates monocyte activation, which accordingly produce increased amounts of HSP-90, and stabilizes monocyte-T cell immune synapses; on day 2, it promotes intracellular proinflammatory cytokine (eg IL-1) expression; and on day-3 it most likely participates in the mediation and downstream signaling of integrin-molecule cell interactions.

Funded by IKY (IKYDA 2003) and by the Empeirikion Foundation of Athens

ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΣΥΝΔΕΤΙΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΣΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΔΥΟ ΔΟΜΙΚΑ ΑΥΤΟΤΕΛΗ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ

Σκορίλα Ε.Δ., Μπάγκος Π.Γ. και Σ.Ι. Χαμόδρακας

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Αθήνα 157 01

Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στο σχηματισμό πρωτεϊνικών συγκροτημάτων τα οποία ευθύνονται για την επιτέλεση βιολογικών λειτουργιών. Μια σημαντική κατηγορία πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων είναι αυτές που εμφανίζονται μεταξύ δομικών αυτοτελών στοιχείων (domains) που ανήκουν στην ίδια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Με τον όρο δομικά αυτοτελή στοιχεία, αναφερόμαστε σε τμήματα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας τα οποία διπλώνουν ανεξάρτητα και σχηματίζουν ένα ή περισσότερα διάκριτα σφαιρικά συγκροτήματα. Τα δομικά αυτοτελή στοιχεία ενώνονται μεταξύ τους με τμήματα της ακολουθίας τα οποία ονομάζονται συνδετικά τμήματα ή συνδέτες (linkers). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι συνδέτες παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δομικών στοιχείων καθώς καθορίζουν την απόσταση και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δομικών αυτοτελών στοιχείων. Στην εργασία αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος αναγνώρισης των συνδετικών τμημάτων σε λυμένες κρυσταλλογραφικά δομές με δύο δομικά αυτοτελή στοιχεία του οργανισμού *Saccharomyces cerevisiae*. Αρχικά δημιουργήθηκε ένα μη-ομόλογο σύνολο δομών και οι συνδέτες προσδιορίστηκαν οπτικά με τη χρήση προγραμμάτων μοριακών γραφικών. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε μια μαθηματική μέθοδος αναγνώρισης γεωμετρικών δομών που βασίζεται στη φασματική ανάλυση πινάκων (ιδιοτιμές και ιδιοανύσματα). Η μέθοδος χρησιμοποιεί τις συντεταγμένες των ατόμων και δημιουργεί έναν πίνακα που παρουσιάζει τις μεταξύ τους αποστάσεις. Ο πίνακας αναλύεται και τα συστατικά του στοιχεία (ιδιοτιμές και ιδιοανύσματα) που προκύπτουν αναπαριστούν γεωμετρικά δομικά στοιχεία της πρωτεΐνης. Με τη χρήση των διαγραμμάτων αναπαράστασης των ιδιοανυσμάτων, διακρίνεται το συνδετικό τμήμα/συνδέτης των δύο αυτοτελών δομικών στοιχείων. Στην περίπτωση που τα δομικά αυτοτελή στοιχεία είναι σαφώς διακεκριμένα η μέθοδος έχει απόλυτη επιτυχία στη διάκρισή τους. Όταν τα στοιχεία δεν είναι απόλυτα διακριτά, η μέθοδος είναι πιθανόν να αποτυγχάνει και ίσως απαιτούνται πιο προχωρημένες τεχνικές.

**LINKER IDENTIFICATION IN TWO-DOMAIN PROTEINS USING
A GRAPH SPECTRAL METHOD****Scorila E.D., Bagos P.G. and S.J. Hamodrakas***Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Athens 157 01*

Protein interactions play an important role in the formation of protein clusters, which are responsible for specific biological functions. An important category of protein interactions involves those, which are built up between domains that belong to the same polypeptide chain. The term domain is referred to polypeptide chain segments, which fold independently and adopt one or more discrete globular structures. Domains are connected by segments of the sequence called linkers. It has been shown by previous studies that linkers play an important role to domain interaction since they determine the inter-domain distance. In this study a new linker identification method was developed. This method was applied to all experimentally determined proteins with two domains of the organism *Saccharomyces cerevisiae*. In the beginning, a non-redundant set of proteins that satisfy the above-mentioned criteria was created and all the linkers were determined by visual inspection utilizing molecular graphics software. The next step involves the application of the spectral identification method, which is based on matrices eigenvalues and eigenvectors calculations. The method constructs an inter-distance matrix, which is calculated by the protein atoms coordinates. The derived matrix is spectrally analyzed resulting to its eigenvalue and eigenvector matrix components, which represent the protein geometry characteristics. Eigenvector representation diagrams illustrate the linking region between the two domains. When two domains are clearly discrete, the method is fully successful in identifying the two regions and the linker. In cases where the distance between two domains is close enough, the method sometimes fails, and more advanced techniques may be required.

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΕΡΙΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΚΗΤΑ
ASPERGILLUS NIGER BTL**

Σουρβίνου Ι., Σαββίδης Α., Χατζηνικολάου Δ.Γ.

*Ομάδα Μικροβιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθήνας,
Πανεπιστημιούπολη, 157 81 Ζωγράφου E-mail: xatzdim@biol.uoa.gr*

Το στέλεχος BTL του μύκητα *Aspergillus niger* έχει την ικανότητα παραγωγής σημαντικών επιπέδων οξειδάσης της γλυκόζης (ΟΞΓ) και καταλάσης (ΚΑΤ). Οι δυο αυτές οξειδοαναγωγάσες τυγχάνουν μεγάλης κλίμακας τεχνολογική και εμπορική αξιοποίηση. Αποτελούν ένα πολύ αποτελεσματικό ενζυμικό σύστημα για την απομάκρυνση από διάφορα τρόφιμα, του οξυγόνου ή/και της γλυκόζης. Η πιο σημαντική βιομηχανική «εφαρμογή» της ΟΞΓ αφορά στην παραγωγή γλυκονικού οξέος από αγροτικά παραπροϊόντα υψηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες. Η καταλάση βρίσκει επίσης σημαντικό αριθμό αυτοτελών εφαρμογών είτε για απομάκρυνση του H₂O₂ είτε για παραγωγή O₂. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του αερισμού στην παραγωγή ΟΞΓ και ΚΑΤ από το μύκητα *Aspergillus niger* BTL σε κλειστό σύστημα βιοαντιδραστήρα. Ως πηγές άνθρακα και αζώτου χρησιμοποιήθηκαν σακχαρόζη και NaNO₃, αντίστοιχα. Η επιλογή της τελευταίας, καθώς και ο προσδιορισμός της άριστης συγκέντρωσής της στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, πραγματοποιήθηκαν μετά από αριστοποίηση σε καλλιέργειες φιαλών Erlenmeyer. Τα επίπεδα αερισμού στο βιοαντιδραστήρα, διαμορφώθηκαν με τη μεταβολή της παροχής αποστειρωμένου ατμοσφαιρικού αέρα ενώ ο ρυθμός ανάδευσης παρέμεινε σταθερός σε χαμηλά επίπεδα, για προστασία του μυκηλίου από τις διατμητικές τάσεις. Προσδιορίστηκε πως η αύξηση του βαθμού οξυγόνωσης της καλλιέργειας έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτερη ανάπτυξη του μικροοργανισμού και αυξημένα επίπεδα ενζυμικής παραγωγής. Οι τελικές όμως συγκεντρώσεις γλυκονικού οξέος δεν επηρεάζονται από τον αερισμό. Επίσης διαπιστώθηκε πως ο μηχανισμός ελεγχόμενης έκκρισης της ΟΞΓ στο μέσο καλλιέργειας αναστέλλεται από την αύξηση των επιπέδων αερισμού της καλλιέργειας.

**THE ROLE OF AERATION ON THE PRODUCTION OF OXIDO-
REDUCTASES BY THE FUNGUS *ASPERGILLUS NIGER* BTL****Sourvinou I.S., Savvidis A., Hatzinikolaou D.G.**

*Microbiology Group, Sector of Botany, Department of Biology, University of Athens,
Zografou Campus, 157 81 Zografou, Greece. E-mail: xatzdim@biol.uoa.gr*

The *Aspergillus niger* strain BTL produces elevated levels of glucose oxidase (GOX) and catalase (CAT). Both oxido-reductases exhibit large scale technological and commercial exploitation. They represent a very efficient enzyme system for the removal of either oxygen or glucose from various food products. The most important industrial application for GOX is the gluconic acid production using agroindustrial byproducts of high carbohydrate content. Catalase is also used in a number of independent applications concerning either the removal of H₂O₂ or the production of O₂ in various systems. In the present work, we studied the effect of aeration conditions in the production of glucose oxidase and catalase by the fungus *A. niger* BTL in a batch bioreactor system. Saccharose and NaNO₃ were used as carbon and nitrogen sources, respectively. The latter, as well as its concentration in the culture medium, was selected following optimization studies in Erlenmeyer flasks cultures. Bioreactor aeration levels were controlled through the manipulation of sterilized air flowrate, while agitation speed was maintained at low levels in order to protect the mycelium from shear distress. It was found, that increased culture aeration levels resulted in faster microorganism growth and increased enzyme production. The final gluconate concentrations though, did not seem to be affected by the levels of culture oxygenation. It was also verified, that the controlled secretion mechanism of glucose oxidase is probably repressed by increased aeration.

**Η ΤΡΙΧΟΣΤΑΤΙΝΗ Α ΕΠΑΓΕΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΑ ΣΕ
ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΣΤΙΣ ΟΠΟΙΕΣ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΠΑΡΑΛΛΗΛΑ
ΑΚΕΤΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ ΤΟΥΜΠΟΥΛΙΝΗΣ**

Σουρλίγκα Θ.Γ., Νινιός Ι.Π. και Κ.Ε. Σέκερη-Παταργιά

Ινστιτούτο Βιολογίας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και οι μορφολογικές και βιοχημικές διαδικασίες που τον χαρακτηρίζουν και είναι γνωστές ως απόπτωση είναι μία φυσιολογική λειτουργία, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο κατά την ανάπτυξη ενός οργανισμού. Εξ άλλου απόπτωση κυττάρων μπορεί να προκληθεί από δυσμενείς συνθήκες περιβάλλοντος, να είναι αποτέλεσμα δυσλειτουργίας του επιδιορθωτικού μηχανισμού του DNA ή να επαχθεί από ουσίες που έχουν αντικαρκινική δράση. Η σηματοδότηση για την επαγωγή της απόπτωσης είναι προφανώς περίπλοκη και εξαρτάται τόσο από το αποπτωτικό ερέθισμα όσο και από τον τύπο των κυττάρων. Εφόσον η απόπτωση είναι μια προγραμματισμένη διαδικασία, χρειάζονται αλλαγές στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Μεταξύ των ουσιών που επάγουν απόπτωση είναι και αναστολείς των απόακετυλασών των ιστονών, οι οποίοι οδηγούν σε ακετυλίωση των ουρών των ιστονών. Μια από τις πιο δραστικές και καλά μελετημένες ουσίες αυτής της κατηγορίας είναι η τριχοστατίνη Α, η οποία χρησιμοποιείται και ως αντικαρκινικό μέσο. Πρόσφατα έχει βρεθεί ότι εκτός από τις ιστόνες, ακετυλιώνονται και άλλες μη ιστονικές πρωτείνες, όπως παράγοντες μεταγραφής αλλά και η πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων, τουμπουλίνη. Δεδομένου ότι οι μικροσωληνίσκοι εμπλέκονται σε μορφολογικές αλλαγές καθώς επίσης και στην απόπτωση ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της επίδρασης της TSA επί της ακετυλίωσης της τουμπουλίνης σε συνδυασμό με την ακετυλίωση των ιστονών και την απόπτωση. Η παρούσα μελέτη εστιάζεται στην ανάλυση των τριών αυτών παραμέτρων μετά από την επίδραση του αναστολέα TSA σε έξι ανθρώπινες λευχαιμικές κυτταρικές σειρές και σε φυσιολογικά λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ανθρώπου. Παρουσιάζονται κινητικές συγκεντρώσεων του αναστολέα και χρόνου επώασης των κυττάρων με TSA. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπάρχει μια διαφορική επίδραση της TSA ως προς τα επίπεδα ακετυλίωσης, τόσο της ιστόνης H4 όσο και της τουμπουλίνης, τα οποία διαφέρουν ανάλογα με το υπό μελέτη κυτταρικό σύστημα και ότι τα επίπεδα ακετυλίωσης σχετίζονται με τον επαγόμενο βαθμό απόπτωσης. Η παρούσα μελέτη προσθέτει πληροφορία για τους στόχους της TSA, καθώς και για τα ενδεχόμενα μονοπάτια σηματοδότησης στην πορεία της επαγωγής της απόπτωσης.

**TRICHOSTATIN A SELECTIVELY INDUCES APOPTOSIS IN
LEUKEMIC CELL LINES IN WHICH TUBULIN ACETYLATION
IS ALSO INDUCED****Sourlingas Th.G., Ninios, Y.P., and K.E. Sekeri-Pataryas***Institute of Biology, N.C.S.R. "DEMOKRITOS"*

Programmed cell death or apoptosis has distinct morphological and biochemical characteristics and is part of a physiological cellular process that plays a significant role during organismal development. However, cellular apoptosis can also be induced under unfavorable environmental conditions, or as a result of dysfunction of the DNA repair machinery or can also be induced by anticancer agents. The molecular signaling pathways for the induction of apoptosis are clearly complicated and are dependent not only on the apoptotic stimuli but also on the specific cell type. Since apoptosis is a programmed event, changes in the expression of certain genes are necessary. Amongst the list of agents that can induce apoptosis are also inhibitors of histone deacetylases, substances that lead to the accumulation of acetylation on the N-terminal tails of nucleosomal core histones. One of the most effective and well-studied histone deacetylase inhibitor is trichostatin A. This agent is also used in anticancer regimens. Recently, it has been shown that aside from histones, other nonhistone proteins, such as transcription factors, as well as the microtubule protein, tubulin, are also acetylated. In light of the fact that microtubules are involved in various morphological changes as well as in apoptosis, the study of the effect of trichostatin A on tubulin acetylation in relation to histone acetylation may be of unique interest. In this respect, the present study has focused on these three parameters, tubulin and histone acetylation and induction of apoptosis after treatment with trichostatin A in six leukemic cell lines as well as in physiological human peripheral blood lymphocytes. To this end, with respect to the above, the effect of different concentrations and incubation times with this agent were analyzed. The results showed that trichostatin A has a differential effect on the levels of histone H4 and tubulin acetylation in the different cellular systems analyzed and more importantly, that these levels are related to the levels of induced apoptosis. The present study adds pertinent information on the cellular targets of trichostatin A, as well as on the possible signaling pathways during the course of apoptosis induction.

ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΣΤΙΔΙΚΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ ΜΟΝΟΑΜΙΝΩΝ (VMAT2) ΣΤΗΝ ΜΕΛΑΙΝΑ ΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΥΠΟΜΕΛΑΝΑ ΤΟΠΟ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ

Σπηλιόπουλος Π.², Χρυσάνθου-Πιτερού Μ.^{1,2}, Ισιδωρίδου Μ.Ρ.^{1,2}

¹Ερευνητική Μονάδα Ιστοχημείας και Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, Ψυχιατρική Κλινική Παν/μίου Αθηνών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, ²Ινστιτούτο Νευροβιολογικών Ερευνών, Τδρμα Θ. Θ. Κότσικα

Ο VMAT2 είναι δείκτης ενδοκυττάρων περιοχών αποθήκευσης μονοαμινών στους ντοπαμινικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας (SN) και στους νοραδρενεργικούς νευρώνες του υπομέλανα τόπου (LC). Κυρίως πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκυτταροχημική εντόπιση του VMAT2 σε όλα τα περιοχές των μονοαμινικών νευρώνων. Βιοχημικές και φαρμακολογικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η πρόσληψη και η αποθήκευση μονοαμινικών νευροδιαβιβαστών επιτυγχάνεται μέσω τέτοιων ειδικών κυστιδικών μονοαμινικών μεταφορέων (VMATs). Στους ανθρώπινους κατεχολαμινικούς νευρώνες, οι μελέτες μας έχουν ταυτοποιήσει μεγάλα σφαιρικά πρωτεϊνικά σωμάτια (PB) τα οποία είναι δομές αποθήκευσης του νευροδιαβιβαστή στο περικάρυο και στους δενδρίτες. Με σκοπό να αποδείξουμε, σε ανθρώπινο νεκροτομικό υλικό, την ταυτότητα των PB ως κυστιδίων αποθήκευσης κατεχολαμινών, χρησιμοποιήσαμε πολυκλωνικό αντίσωμα για την ανοσοεντόπιση του VMAT2 στην SN και LC φυσιολογικών και παρκινσονικών ατόμων, σε τομές παραφίνης. Γειτονικές τομές χρώστηκαν με Rhodamine B, για την εντόπιση του ειδικού δείκτη (σφιγγομυελίνης) των μεμονωμένων κυστιδίων (PB). Τα αποτελέσματα έδειξαν, στους φυσιολογικούς μάρτυρες, την ταυτόχρονη παρουσία διάχυτης και κοκκώδους ανοσοαντίδρασης με ποικιλία έντασης στο περικάρυο και στους δενδρίτες των νευρώνων της SN και LC, ενώ σε παρκινσονικούς, που ως γνωστόν έχουν μειωμένη ντοπαμίνη, παρατηρήθηκε κυρίως ελάχιστη κοκκώδης αντίδραση στο κυτταρόπλασμα, στους δενδρίτες και στα σωμάτια Lewy. Η εντόπιση και η κατανομή του VMAT2 πράγματι σχετίζεται στενά με την κατανομή των PBs που θεωρούνται δομές αποθήκευσης κατεχολαμινών, κάτι που υποστηρίζεται και από την ελάττωσή τους στην Πάρκινσον.

**SUBCELLULAR LOCALIZATION OF THE VESICULAR
MONOAMINE TRANSPORTER (VMAT2) IN SUBSTANTIA
NIGRA AND LOCUS COERULEUS OF THE HUMAN BRAIN****Spiliopoulos P.², Chrysanthou-Piterou M.^{1,2}, Issidorides M.R.^{1,2},**

¹*Department of Psychiatry, Medical School, University of Athens, Eginition Hospital, Greece, and* ²*Neurobiology Research Institute, Theodor Theohari Cozzika Foundation, Athens, Greece*

VMAT2 is a novel marker for sites of intracellular monoamine storage within dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN) and noradrenergic neurons in the locus coeruleus (LC). Experimental animals have been mostly used for the immunocytochemical demonstration of VMAT2 in all parts of monoamine neurons. Biochemical and pharmacological evidence has shown that uptake and storage of monoamine neurotransmitters is mediated by these specific vesicular monoamine transporters (VMATs). In human catecholamine neurons our studies have identified, large spherical protein bodies (PB) which are storage sites of the neurotransmitter in the perikarya and dendrites. In order to prove, in postmortem human brain, the identity of the PB as catecholamine storage sites, we used a polyclonal antibody for the immunolocalization of the VMAT2 in the SN and LC of both controls and parkinsonian subjects. Adjacent sections stained with Rhodamine B for the localization of a specific marker (sphingomyelin) of the isolated granules (PB) revealed the specific localization of the individual PB. Our results showed in the controls the presence of both diffuse and granular immunoreactivity of various intensities in the perikarya and dendrites of the SN and LC neurons, while in Parkinsonians a variety of immunostaining patterns was observed, but mostly minimal granular reactivity in the cytoplasm, dendrites and around Lewy bodies. Our results indicate that VMAT2 localization and distribution is indeed correlated closely with the distribution of PBs, known storage sites of catecholamines, and this is also supported by their reduction in Parkinsonism.

Η ΑΛΚΑΛΩΣΗ ΕΠΑΓΕΙ ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΓΕΓΟΝΟΤΑ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΤΩΝ ΜΑΡ ΚΙΝΑΣΩΝ ΣΤΑ Η9c2 ΚΥΤΤΑΡΑ

Σταθοπούλου Κ.*, Γαϊτανάκη Κ. και Ι. Μπέης

*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Πανεπιστημιούπολη
157 84, Αθήνα*

Η οξεοβασική ισορροπία είναι μια από τις βασικότερες φυσιολογικές παραμέτρους, που επηρεάζουν τη λειτουργία των κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της αλκάλωσης στα σηματοδοτικά μονοπάτια των ERKs και των JNKs, στους Η9c2 καρδιακούς μυοβλάστες. Επώαση με αλκαλικό μέσο (pH 8,5) προκάλεσε την παρατεταμένη φωσφορυλίωση των ERKs και των JNKs, που στην πρώτη περίπτωση ήταν ήπια και στη δεύτερη ισχυρή. Οι αναστολείς της αντλίας Na^+/H^+ , αμιλορίδη και HOE642 (προσφορά της Aventis Pharma Deutschland), προκάλεσαν μερική αναστολή αυτών των ενεργοποιήσεων, υποδεικνύοντας την εμπλοκή της αντλίας σε αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια. Επιπλέον, η αλκάλωση αύξησε τη φωσφορυλίωση του c-Jun με έναν τρόπο εξαρτώμενο από τις JNKs, όπως έδειξαν πειράματα με τον αναστολέα SP600125. Το αποτέλεσμα αυτό συμβαδίζει με δεδομένα πειραμάτων EMSA, όπου η αλκάλωση ενίσχυσε την ικανότητα πρόσδεσης σε ολιγονουκλεοτίδια που έφεραν τη συναινετική αλληλουχία του μεταγραφικού παράγοντα AP1, κάτι που επίσης ανέστειλε ο SP600125. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν αυτή η ενεργοποίηση των JNKs είναι προστατευτική για το κύτταρο, μελετήθηκε η φωσφορυλίωση της Bcl-2, ενός υποστρώματος των JNKs με αντι-αποπτωτική δράση. Έτσι, τόσο η σύντομη όσο και η παρατεταμένη αλκάλωση αύξησε τη φωσφορυλίωση της Bcl-2, ενώ πειράματα μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας έδειξαν ότι η επίδραση αυτή προκαλεί αυξημένη επιβίωση των κυττάρων. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η αλκάλωση επάγει σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην κυτταρική προστασία, πιθανόν μέσω της Bcl-2.

*Η έρευνα αυτή χρηματοδοτήθηκε από τον ΕΛΚΕ του ΕΚΠΑ και το πρόγραμμα Πυθαγόρας Ι (70/3/7399). * Η κ. Σταθοπούλου είναι υπότροφος του Ι.Κ.Υ.*

**ALKALOSIS INDUCES ANTI-APOPTOTIC EVENTS VIA THE
MAPK SIGNALLING PATHWAYS IN THE H9c2 CELLS****Stathopoulou K.*, Gaitanaki K., and I. Beis***Department of Animal and Human Physiology, School of Biology, University of Athens,
Panepistimioupolis 157 84*

The acid-base balance is one of the most important physiological parameters, affecting the cell function. In the present study we examined the effect of alkalosis on the signalling pathways of ERKs and JNK in the H9c2 cardiac myoblasts. Treatment with alkaline medium (pH 8.5) induced a prolonged activation of ERKs and JNKs, which was moderate in the first case and strong in the second. The Na⁺/H⁺ exchanger inhibitors, amiloride or HOE642 (a kind gift from Aventis Pharma Deutschland) partially attenuated these activations, suggesting that this exchanger is implicated in these signalling pathways. Also, alkalosis increased the c-Jun phosphorylation in a JNK dependent manner, as shown with experiments using the inhibitor SP600125. This result correlated well with EMSA experiments in which alkalosis enhanced the binding at oligonucleotides containing the AP1 consensus sequence and this enhancement was also abrogated by SP600125. In order to determine whether this JNK activation is protective for the cell, we studied the phosphorylation of Bcl-2, a JNK substrate with anti-apoptotic function. Both short- and long-term alkalosis increased Bcl-2 phosphorylation, while cell viability experiments showed that this stimulus caused enhanced cell survival. The above-mentioned results suggest that alkalosis induces signal transduction pathways that are implicated in cell survival, possibly via Bcl-2.

This study was funded by the Special Research Account of the University of Athens and the Pythagoras I grant (70/3/7399).

** Ms Stathopoulou is a recipient of a State Scholarships Foundation fellowship.*

**ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ
ΘΕΡΜΟΦΙΛΟ ΜΥΚΗΤΑ *Sporotrichum thermophile***

**Σταθοπούλου Π., Κατσίφας Ε., Καραγκούνη Α.
και Δ.Γ. Χατζηγικολάου**

*Ομάδα Μικροβιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθήνας,
Πανεπιστημιούπολη, 157 81 Ζωγράφου. E-mail: xatzdim@biol.uoa.gr*

Ο θερμόφιλος ασκομύκητας *Sporotrichum thermophile* παράγει ποικιλία θερμοσταθερών ενζύμων με σημαντικές εμπορικές εφαρμογές. Έως σήμερα δεν έχει αναφερθεί απομόνωση λιπασών από το μικροοργανισμό. Τα ένζυμα αυτά, καταλύουν τόσο την υδρόλυση (παρουσία νερού) όσο και τη σύνθεση (απουσία νερού) των εστέρων μεταξύ γλυκερόλης και μακράς αλυσίδας λιπαρών οξέων και χρησιμοποιούνται ευρέως στις βιομηχανίες απορρυπαντικών, τροφίμων κι επεξεργασίας χάρτου. Στην εργασία αυτή ανιχνεύτηκε λιπάση κατά την ανάπτυξη του *S. thermophile* σε καλλιέργειες οι οποίες περιείχαν λιπίδια μακράς αλυσίδας ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Μελετήθηκε ο εντοπισμός του ενζύμου σε βιοαντιδραστήρα με τη χρήση ελαιολάδου ως πηγή άνθρακα.. Ελήφθησαν δείγματα καθ' όλη τη διάρκεια του κλειστού κύκλου αύξησης και πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση των εσωκυτταρικών εκχυλισμάτων με επιφανειοδραστικές ουσίες. Στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας το μεγαλύτερο ποσοστό της παραγόμενης λιπάσης εκκρίνεται εξωκυτταρικά ενώ στη συνέχεια το ένζυμο παραμένει ασθενώς προσδεμένο στις μεμβράνες. Επίσης, παρατηρήθηκε συσσώρευση γλυκερόλης στην καλλιέργεια, γεγονός που καταδεικνύει πως ο μύκητας καταναλώνει μόνο τα λιπαρά οξέα που παράγονται κατά τη διάσπαση της πηγής άνθρακα από τη λιπάση. Ακολούθησε μελέτη της επίδρασης σημαντικού αριθμού διαφορετικών πηγών άνθρακα καθώς και του pH της καλλιέργειας στην ενζυμική παραγωγή. Μέγιστη παραγωγή λιπάσης επιτεύχθηκε με τη χρήση κόκκων σπάδικα καλαμποκιού (corn cob) ως πηγή άνθρακα, αποτέλεσμα με πολύ θετική επίδραση στην οικονομικότητα της συνολικής διεργασίας. Καταβλήθηκε, τέλος, προσπάθεια καθαρισμού του ενζύμου από το εξωκυτταρικό υγρό των καλλιεργειών. Η διαδικασία περιελάμβανε καταβύθιση με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και χρωματογραφικές τεχνικές (εναλλαγή ιόντων, υδρόφοβη χρωματογραφία και μοριακή διήθηση).

**BIOSYNTHESIS AND LOCALIZATION OF LIPASE FROM THE
THERMOPHILIC FUNGUS *Sporotrichum thermophile*****Stathopoulou P.M., Katsifas E., Karagouni A.D.,
and D.G. Hatzinikolaou**

*Microbiology Group, Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens,
Zografou Campus, 157 81 Attica, Greece E-mail: xatzdim@biol.uoa.gr*

The thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* produces a variety of enzymes with considerable industrial importance. Yet till today, there have been no reports concerning the isolation and characterization of lipases from this particular microorganism. These enzymes catalyze the hydrolysis (in the presence of water) as well as the synthesis (in the absence of water) of the esters between glycerol and long chain fatty acids, and find a large number of biotechnological applications especially in the detergent, food and paper pulp industries. In this work, we initially verified the production of lipase during growth of *S. thermophile* in the presence of long-chain lipids as a sole carbon and energy source. We studied the localization of the enzyme in bioreactor cultures with olive oil as carbon source. Samples were withdrawn during the entire growth cycle and the intracellular extracts were fractionated with surfactants. It was verified, that at the early stages of growth, lipase is rapidly released into the extracellular medium, while it remained loosely bound on the membranes at the later stages. In addition, glycerol accumulation was observed, a fact that clearly shows that the microorganism consumes only the fatty acids released during hydrolysis of the carbon source. The effect of various carbon sources as well as initial culture pH on enzyme production in a series of Erlenmeyer flask cultures was studied next. Maximum lipase production was achieved not with the use of lipids but with corn cob as a sole carbon source, a result with significant economical impact on the production process, since this material is a very low cost agro-industrial byproduct. Finally we attempted to purify the enzyme from the culture supernatant using ammonium sulfate precipitation followed by a series of FPLC steps (ion exchange, hydrophobic interaction, gel filtration).

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ QUORUM SENSING
(ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ ΣΕ ΠΥΚΝΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ) ΣΤΟ
ΑΙΘΑΝΟΛΟΠΑΡΑΓΩΓΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Zymomonas mobilis***

Σταύρου Ε.Ε. και Κ.Μ. Παππά

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη 15701, Αθήνα

Το βακτήριο *Zymomonas mobilis* θεωρείται υποψήφιος οργανισμός για μεγάλης κλίμακας παραγωγή αιθανόλης, μόνος ή σε συνεργασία με βακτήρια και μύκητες, ενώ έχει επί πλέον αναφερθεί ότι παράγει τοξική ένωση απέναντι στο βακτήριο *E. coli*. Στο πλαίσιο της διερεύνησης των σχέσεων του *Z. mobilis* με άλλους οργανισμούς, επιδιώχθηκε η μελέτη της έκλυσης ουσιών ή ύπαρξης γονιδίων στο βιομηχανικό στελεχος CP4, που σχετίζονται με συστήματα βακτηριακής επικοινωνίας σε υψηλές συγκεντρώσεις πληθυσμών κυττάρων (quorum sensing, QS). Συστήματα QS επάγουν στα βακτήρια πολλαπλές λειτουργίες όπως παθογένεια, έκκριση τοξινών, δημιουργία βιοφίλμ, κυτταρική διαφοροποίηση και διαίρεση κ.ά., ενώ συνήθως εξαρτώνται από παραγωγή και ανταπόκριση σε φερομόνες τύπου είτε ακυλωμένων λακτονών ομοσερίνης (AHLs), είτε υποκατεστημένων φουρανονών (ενώσεις τύπου AI-2). Η παραγωγή και έκλυση εν λόγω ουσιών από το *Z. mobilis* μελετήθηκε με τη χρήση ειδικών στελεχών *A. tumefaciens*, *E. coli*, *C. violaceum* και *V. harveyi* που χρησιμοποιούνται ως βιοαισθητήρες QS ουσιών (biosensors). Στις δοκιμασίες αυτές φάνηκε ότι το *Z. mobilis* παράγει ουσία, πιθανόν AHL-τύπου, που δρα ανταγωνιστικά ως προς τις συγγενείς AHLs που επάγουν τους *A. tumefaciens* και *C. violaceum* βιοαισθητήρες, ενώ δεν φάνηκε να παράγει ένωση AI-2 τύπου. Εξέταση του δημοσιευμένου γονιδιώματος του *Z. mobilis* στελέχους ZM4 (συγγενικού ως προς το CP4), ενίσχυσε το τελευταίο, καθώς ο οργανισμός δεν φάνηκε να φέρει γονίδιο ανάλογο συνθετασών AI-2, ενώ αντίθετα φέρει ένζυμα καταβολισμού προδρόμων μορίων αυτού. Επί πλέον στο γονιδίωμα του *Z. mobilis*, μετά από ανάλυση 1.489 χαρακτηρισμένων ή δομικά συντηρημένων ORFs και αναζήτηση ομολογιών ως προς 60 γονίδια QS-τύπου, αναγνωρίστηκαν γονίδια ομόλογα με: τη συνθετάση HdtS του *P. aeruginosa* για την AHL 3-OH-7-cis-C14-λακτόνη ομοσερίνης (YP_161817), τη συνθετάση RpfB του *X. campestris* για τη φερομόνη cis-11-μεθυλ-2-δωδεκενοϊκού οξέως (YP_162439), το μεταγραφικό παράγοντα PheB του *R. solanacearum* που ανταποκρίνεται στη φερομόνη 3-OH-παλμιτικό μεθυλεστέρα (YP_163592, YP_162941) και τις AHL-υδρολάσες AiiA και AttM των *B. subtilis* και *A. tumefaciens* (YP_162512, YP_162494). Από τα γονίδια αυτά, το ομόλογο με την HdtS συνθετάση της 3-OH-7-cis-C14 HSL είναι άκρως ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη, καθώς η συγκεκριμένη ένωση έχει αποδειχτεί ότι εκτός από σινιάλο QS-τύπου, λειτουργεί ως βακτηριοσίνη έναντι σε στελέχη *Rhizobium*, στο δε παρόν εργαστήριο το *Z. mobilis* αποδείχθηκε ιδιαίτερα τοξικό απέναντι στο αγροβακτήριο (οικ. *Rhizobiaceae*), με τοξικότητα επαγόμενη σε υψηλή πυκνότητα κυττάρων.

**STUDY OF QUORUM SENSING PROPERTIES OF THE
ETHANOL-PRODUCING BACTERIUM *Zymomonas mobilis*****Stavrou E.E., and K.M. Pappas***Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis, Athens 15701, Greece*

Zymomonas mobilis is an α -proteobacterium considered important for large-scale ethanol production, on its own or in the presence of other bacteria or fungi, whereas it has been reported that it produces a toxin-like substance against *E. coli*. To address the issue of *Z. mobilis* behaviour against other organisms, it was thought pertinent to enquire on high-cell density dependent behaviour exhibited by the bacterium, currently known as quorum sensing (QS). QS mechanisms induce multiple functions in bacteria, from pathogenicity and toxin secretion to cellular differentiation and division, and are usually dependent on release and perception of signalling pheromones of usually two molecular classes: acylated homoserine lactones (AHLs) and furanone derivatives (AI-2 type compounds). Production and release of relevant pheromones by the *Z. mobilis* industrial strain CP4 was bioassayed with the use of biosensor *A. tumefaciens*, *C. violaceum*, *E. coli* and *V. harveyi* strains. In such assays it appeared that *Z. mobilis* produces a putative AHL-type compound, most likely antagonistic against cognate AHL compounds able to induce the *A. tumefaciens* and *C. violaceum* biosensors, whereas the bacterium does not seem to release an AI-2 type compound. Gene-search in the *Z. mobilis* strain ZM4 (kin to CP4) published genome reinforced the latter, since no homologous AI-2 type synthases were found in the annotated and non-annotated genomic content, whereas alternative AI-2 precursor breakdown pathway genes were readily detected. Additionally, search amidst a total of 1,489 genomic annotated or conserved-domain harbouring ORFs and genome BLASTing with 60 well characterized QS-related genes from various organisms, led to identification of genes homologous to: the *P. aeruginosa* HdtS AHL synthase of 3-OH-7-cis-C14 homoserine lactone (YP_161817), the *X. campestris* RpfB synthase of pheromone cis-11-methyl-2-dodecenoic acid (YP_162439), the *R. solanacearum* PhcB transcriptional regulator responding to the pheromone 3-OH-palmitic methylester (YP-163592, YP_162941) and the *A. tumefaciens* and *B. subtilis* AttM and AiiA AHL hydrolases (YP_162512, YP_162494). Of these, the HdtS-homolog to the synthase of compound 3-OH-7-cis-C14 HSL is highly interesting for further study, since the particular pheromone is known to act as a bacteriocin against rhizobial isolates, whereas *Z. mobilis* is found in the present lab to behave especially toxic against *Agrobacterium* (member of the *Rhizobiaceae*) and the observed toxicity seems to be high-cell density dependent.

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ, ΥΠΕΡΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΦΥΣΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΟΣ ΧΙΤΙΝΟΛΥΤΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ
ΑΠΟ ΤΟ ΨΥΧΡΟΦΙΛΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *MORITELLA MARINA***

Στεφανίδη Ε. και Κ.Ε. Βοργιάς

*Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιοχημείας και
Μοριακής Βιολογίας, Πανεπιστημιόπολη, Ζωγράφου, 15784, Αθήνα, Ελλάδα.
Τηλ: +30-210-7274514. E-mail: cvorgias@biol.uoa.gr*

Η χιτίνη είναι ένα βιοπολυμερές που αποτελείται από γραμμικά επαναλαμβανόμενες μονάδες Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης και αποτελεί το δεύτερο μετά την κυτταρίνη, φυσικό βιοπολυμερές. Στο υδάτινο περιβάλλον υπολογίζεται ότι ανακυκλώνονται ετησίως περισσότεροι από 10^{11} μετρικοί τόνοι χιτίνης. Αν και το περιβάλλον του βυθού των υδάτινων οικοσυστημάτων χαρακτηρίζεται από υψηλές πιέσεις και χαμηλές θερμοκρασίες, η μικροβιακή κοινότητα που αναπτύσσεται ευθύνεται σε σημαντικό βαθμό για την αποικοδόμηση της χιτίνης. Επομένως, οι χιτανάσες που παράγονται από τα παραπάνω βακτήρια, εκδηλώνουν υψηλή καταλυτική ενεργότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες. Στην προσπάθειά μας να απομονώσουμε το γονίδιο που κωδικοποιεί για χιτανάση από το βακτήριο *M. marina*, ακολουθήσαμε την παρακάτω διαδικασία. Χρωμοσωμικό gDNA από το *M. marina* θρυμματίστηκε με το ένζυμο *EcoRI*. Τα τμήματα DNA από την πέψη συνδέθηκαν με τα άκρα τμημάτων μήκους 50bp, που αναγνωρίζονται από την *EcoRI* (*EcoRI* Cassette). Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια σχεδιάστηκαν βασισμένα σε ομιόλογες περιοχές γνωστών χιτανάσων. Αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ειδικών εκκινητών, για την αλληλουχία της *EcoRI* Cassette και των εκκινητών που σχεδιάστηκαν όπως παραπάνω, καθώς και με υπόστρωμα το μίγμα gDNA και *EcoRI* Cassette που περιγράφηκε αρχικά. Η διαδικασία αυτή οδήγησε στην απομόνωση αρκετών αλληλουχιών από το γονίδιο της χιτανάσης του *M. marina*. Βάση αυτών των αλληλουχιών, σχεδιάσαμε ένα ζεύγος εκκινητών, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις PCR με υπόστρωμα το χρωμοσωμικό DNA του *M. marina*. Το αποτέλεσμα ήταν η απομόνωση ενός τμήματος DNA μήκους 1653bp, το οποίο αντιστοιχεί στο γονίδιο της χιτανάσης, που ονομάσαμε *chi-60Mm*. Η πρωτεΐνη Chi-60Mm αποτελείται από 550 αμινοξέα, έχει θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο-pI 4,27 και έχει ένα πεπτίδιο έκκρισης μήκους 22 αμινοξέων. Η Chi-60Mm εκφράστηκε σε κύτταρα (*E. coli*) BLR(DE3), σε διαλυτή μορφή και σε υψηλά επίπεδα. Ο καθαρισμός της Chi-60Mm ολοκληρώθηκε επιτυχώς σε τρία βήματα: Κλασμάτωση με θειικό αμμώνιο, χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων σε στήλη Phenyl Sepharose CL-6B και ανιοανταλλακτική χρωματογραφία σε στήλη Q-Sepharose FF. Η βιοχημική ανάλυση της Chi-60Mm έδειξε ότι η χιτανάση έχει εξειδίκευση σε υποστρώματα χιτίνης, είναι θερμοευαίσθητη και δεν επηρεάζεται από μέταλλα. Η θερμοδυναμική ανάλυση της Chi-60Mm έδειξε ότι η πρωτεΐνη αποδιατάσσεται αντιστρεπτά ακόμα και μετά από επώαση στους 60 °C, γεγονός που περιγράφεται για πρώτη φορά σε ένζυμα της οικογένειας των υδρολασών.

ISOLATION, CLONING, PRODUCTION, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION OF A CHITINASE PROTEIN OF THE PSYCHROPHILIC BACTERIUM *MORITELLA MARINA***Stefanidi E., and C.E. Vorgias**

National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Panepistimioupoli, Zographou, 15784, Athens, Greece. Tel: +30-210-7274514. Email: cvorgias@biol.uoa.gr

Chitin, a carbohydrate polymer composed of alternating beta-1,4-linked N-acetylglucosamine residues, is the second most abundant organic compound in nature. In the aquatic biosphere alone, it is estimated, that more than 10^{11} metric tons of chitin are produced annually. Although the deep-sea marine environment is characterized by high hydrostatic pressures and low temperatures, there seems to be a highly active microbial community that is able to decompose chitin. Consequently, the chitinases, produced from the bacteria above, and are responsible for the degradation of the chitin should have high catalytic activities under these low-temperature conditions compared with those of mesophilic and thermophilic species. In our attempts to isolate the gene for the chitinase of *Moritella marina* we carried out the following procedure. Chromosomal DNA from *M. marina* was totally digested with restriction enzyme *EcoRI*. The fragments from the digested chromosomal DNA were ligated to a *EcoRI* Cassette. Synthetic oligonucleotides for PCR were designed, based on the homology region of known chitinases. PCR reactions were performed using synthetic primers, which anneal on the cassette sequence and the mixture of the digested gDNA and the cassettes, as a template. According to that procedure we isolated several sequences from the chitinase gene of *M. marina*. Based on the DNA sequence of this *chitinase*, we designed a pair of primers in terms to isolate and clone the entire gene. Performing PCR reactions using the chromosomal DNA of *M. marina*, as a template and the primers above, we resulted to a DNA fragment of 1653bp, which is the gene of the chitinase, called *chi-60Mm*. The protein Chi-60Mm is consisting of 550 amino acids and has a theoretical pI of 4,27. Chi-60Mm contains a signal peptide of 22 amino acids, responsible for secretion. The chitinase Chi-60Mm was expressed in (*E. coli*) BLR(DE3). The protein was soluble and produced at high levels. The purification of Chi-60Mm was completed successfully after three steps: Ammonium sulfate fractionation, hydrophobic chromatography using the column Phenyl Sepharose CL-6B and anionexchange chromatography using the column Q-Sepharose FF. The biochemical analysis of Chi-60Mm has shown that the chitinase is very specific for chitin substrates, very sensitive to temperatures above 40°C and is unaffected of the presence of metal ions. Thermothydamic analysis of Chi-60Mm clearly shown that the protein unfolds reversibly even after heating at 60°C, a very valuable result described for the first time in the glycosyl-hydrolase family.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ ΩΚΥΤΟΚΙΝΗΣ ΣΕ ΕΜΒΡΥΪΚΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Στεφανίδης Κ.¹, Μπερέτσος Π.^{1,2}, Κουσουλάκος Σ.², Αναστασιάδη Κ.¹,
Ντινοπούλου Β.^{1,2}, Λουτράδης Δ.¹, Αντσακλής Α.¹

¹Εργαστήριο Πολυδύναμων Κυττάρων και Αναπαραγωγικής Βιολογίας, Α' Μαιευτική και
Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Τμήμα Αναπαραγωγικής Ιατρικής, Ιατρική
Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

²Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Η ωκυτοκίνη (OT) είναι μια μικρή, πεπτιδική ορμόνη, η οποία διαδραματίζει πρωτεύοντα φυσιολογικό ρόλο σε διαδικασίες αναπαραγωγής, όπως είναι ο τοκετός, η έκκριση γάλατος, η μητρική συμπεριφορά, κ.α. Η δράση της διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα της (OTR), ο οποίος με ενεργοποίηση της φωσφορικής λιπάσης C αυξάνει τη συγκέντρωση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου και επάγει μυϊκές συσπάσεις. Ωστόσο, πρόσφατα διαπιστώθηκε και εμπλοκή του συστήματος OT/OTR σε διαφοροποίηση εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων ποντικού, η δε διαφοροποίηση ρυθμίζεται από το ρετινοϊκό οξύ. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διαπίστωση της καθολικότητας ύπαρξης του OTR και σε άλλες σειρές εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων ποντικού. Εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα ποντικού (ATCC, SCRC-1003, ES-D3 GL) καλλιεργήθηκαν επί εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού (ATCC, CRL-1503, STO) σε καλλιεργητικό μέσο DMEM/10% FBS/IGF-1. Ύστερα από 10 έως 20 ημέρες καλλιέργειας σχηματίστηκαν αρκετά «εμβρυοειδή» σώματα βλαστοκυττάρων, η πολυδύναμη φύση των οποίων επιβεβαιώθηκε από την παρουσία των ειδικών δεικτών Oct-3/4 και DAZL. Σε αυτά τα κύτταρα ανιχνεύθηκε ανοσοϊστοχημικά η παρουσία OTR. Στη συνέχεια, από τα καλλιεργημένα αυτά κύτταρα απομονώθηκε mRNA και επιβεβαιώθηκε με RT-PCR η έκφραση του OTR-mRNA. Η παρουσία στα κύτταρά μας δύο ειδικών για εμβρυϊκά κύτταρα δεικτών (Oct-3/4 και DAZL), σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη έκφραση του OTR αποτελεί ένα ισχυρό κίνητρο περαιτέρω μελετών προς επιβεβαίωση/διαλεύκανση του ρόλου της ωκυτοκίνης στη διαφοροποίηση αδιαφοροποιήτων, εμβρυϊκών κυττάρων.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το Πρόγραμμα «Καποδίστριας» του Ειδικού Λογαριασμού Κονδυλίων Έρευνας (Επιτροπή Ερευνών, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών)

**EXPRESSION OF OXYTOCIN RECEPTOR IN MOUSE
EMBRYONIC STEM CELLS****Stefanidis K.¹, Beretsos P.^{1,2}, Koussoulakos S.², Anastasiadi K.¹,
Dinopoulou V.^{1,2}, Loutradis D.¹, Antsaklis A.¹**

¹*Stem Cells Laboratory and Reproductive Biology, 1st Dept of Obstetrics and Gynecology,
Division of Reproductive Medicine, Athens University Medical School, Athens*

²*Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens*

Oxytocin (OT) is a small nonapeptide hormone that holds a crucial role in various reproductive functions, such as the induction of labor, milk ejection and maternal behaviour. Its actions are mediated through oxytocin receptor (OTR) that increases the intracellular Ca²⁺ and induces muscle contraction, through the activation of phospholipase C. Nevertheless, the OT/OTR system has recently been found to be implicated in mouse embryonic stem cell differentiation. The aim of this study was the investigation of the abundance of OTR expression in mouse embryonic stem cells. Mouse embryonic stem cells (ATCC, SCRC-1003, ES-D3 GL) were cultured in the presence of mouse embryonic fibroblasts (ATCC, CRL-1503, STO) in DMEM/10% FBS/IGF-1. Well-defined embryonic bodies were formed after 10-20 days of culture and were assessed for Oct-3/4 and DAZL expression (stem cell markers). The expression of OTR was detected through immunofluorescence and the expression of OTR mRNA was verified by RT-PCR. The presence of the two molecular markers (Oct-3/4 and DAZL), in combination with the expression of OTR, in the studied stem cells opens new perspectives in the study of the role of OT in the differentiation of embryonic stem cells.

*This work is funded by the Programme "Kapodistrias" of the Special Research Account
(National & Kapodistrian University of Athens)*

**ΝΕΕΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΗ ΣΥΓΧΡΟΝΗ
ΑΝΘΡΩΠΟΛΟΓΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ. ΜΙΑ ΠΙΛΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΚΡΗΞΕΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΪΣΤΟΡΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ**

**Στραβοπόδη Ε.^{1,4}, Μανώλης Σ.Κ.¹, Κουσουλάκος Σ.² Αλεπόρου-
Μαρίνου Β.³ και Μ. Schultz⁵**

¹Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, ²Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,
³Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα. ⁴Εφορεία Παλαιοανθρωπολογίας-Σπηλαιολογίας, ΥΠΠΟ.
⁵Dept of Histology -Embryology, Zentrum Anatomy, University of Göttingen

Τα νέα στοιχεία που προκύπτουν από ερωτήματα στη μελέτη των παθολογικών αλλοιώσεων των οστών στις προϊστορικές κοινωνίες του Ελλαδικού χώρου επιβάλλουν την αναθεώρηση της επικρατούσας μεθοδολογίας και εισηγούνται την υιοθέτηση νέων πεδίων τεχνογνωσίας. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο των νέων τάσεων της έρευνας ένα πιλοτικό πρόγραμμα βρίσκεται σε εξέλιξη με εφαρμογή εναλλακτικών εργαστηριακών αναλύσεων. Στόχος της μελέτης είναι η εγκαθίδρυση παλαιο-επιδημιολογικών μοντέλων στην προϊστορία μέσα από μία σειρά αναλύσεων που παρέχουν αξιόπιστα δεδομένα όσον αφορά στην διαφορική διάγνωση του παθολογικού προφίλ προς ανάλυση. Σε συνδυασμό με τη μακροσκοπική και ακτινολογική εξέταση, εφαρμόστηκαν νέες αναλύσεις, η ενδοσκοπηση, η σάρωση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και η μικροσκοπική εξέταση των οστικών λύσεων. Τα πρώτα αποτελέσματα σε δείγματα της πρώιμης και ύστερης προϊστορίας από διαφορετικές αρχαιολογικές θέσεις και γεωμορφολογικά μικρο-περιβάλλοντα επαναπροσδιορίζουν τα υπάρχοντα δεδομένα και αμφισβητούν τα επιδημιολογικά μοντέλα που έχουν υποστηριχθεί στη βιβλιογραφία. Η καμπύλη της συχνότητας των αναιμιών στη Νεολιθική περίοδο, ως επιδημιολογικής έκρηξης, λόγω της δριμείας αλλαγής διατροφικών και κοινωνικών αλλαγών, ένα σχήμα που επικρατεί στη βιβλιογραφία, δεν τεκμηριώνεται στην παρούσα εργασία. Αντίθετα, σε όλο το φάσμα της προϊστορίας η κατανομή συχνότητας της νόσου φαίνεται απρόβλεπτη, ενώ σημαντική είναι η επικράτηση μολυσματικών νοσημάτων που προέρχονται από φλεγμονές της σκληρά μήνιγγας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η στατιστικά ασήμαντη συχνότητα αναιμικών επεισοδίων, σκορβούτου και ραχίτιδας. Είναι αναμενόμενο ότι απαιτούνται περαιτέρω «πληθυσμιακά» δεδομένα για την εκτίμηση της υγείας των κοινωνιών, με σκοπό την δημιουργία τράπεζας δεδομένων, τη βιογεωγραφική εξέλιξη των ασθενειών και κυρίως τις διακυμάνσεις ποικιλομορφίας και ιδιοπάθειας της νόσου ανά περιβάλλον.

NEW METHODOLOGICAL APPROACHES IN BIOLOGICAL ANTHROPOLOGY: A PILOT STUDY ON THE EPIDEMIOLOGICAL OUTBREAK OF PREHISTORIC GREECE**Stravopodi E.^{1,2}, Manolis S.K.¹, Kousoulakos S.³, Aleporou-Marinou V.⁴, and M. Schultz⁵**

¹Dept of Animal & Human Physiology, ²Dept of Cell Biology & Biophysics ³Dept of Genetics & Biotechnology, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis 15784 Athens. ⁴Ephorate of Paleoanthropology – Speleology, Ministry of Culture ⁵Dept of Histology -Embryology, Zentrum Anatomy, University of Göttingen

New evidence and the consequent implications from the analysis of disease in the prehistoric societies in Greece demand the re-evaluation of the prevailing methodology and suggest the need for introducing new laboratory techniques. Under that perspective, a pilot study has been initiated and is being in progress. The project's aims to build up the epidemiological models in Greek prehistoric societies, applying a series of analytical methods in order to provide reliable data and pursue the differential diagnosis of the pathology. In comparison with the routine investigation, the macroscopic and radiological analyses, new techniques are tested, the endoscopy, scanning electron microscopy (SEM) and the microscopic examination of the pathological bone. The first results from the study of samples in Greek sites of varying environmental and geomorphologic setting dated in the early and late prehistory, thus, Mesolithic, Neolithic and Bronze period, put in dispute the epidemiological models supported and point to further review. The prevalence of the anemic episodes in the Neolithic, as a consequence of diet shifts and socio-cultural changes, is not documented under the current research. Adversely, there is evidence that the profile of the pathology, which is considered as the epidemic event in Neolithic, identified as iron-deficiency anemia, is actually unpredictable and idiopathic *per site*. Interestingly enough, the prevalence of the inflammatory disorders is significant even in sites where anemic events are expected. It is remarkable that the diseases such as scurvy and rickets, attributable to a diet deficiency as well, expose low frequency through time and across space in prehistory. Without eliminating the diet and the social variables as possible co-factors of the etiology of disease in prehistory, it is proposed that the overall scenario of the health decline in the Neolithic is overemphasized. Before any paleo-epidemiological model is to be established, conclusive evidence for the clinical profile of the pathologies, testing more reliable techniques, has to be primarily provided.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΟΝ TGF-β: SARA-ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΩΣΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Σφλώμος Γ.¹, Πανοπούλου Α.¹, Μπέλλου Σ.¹, Φώτσης Θ.^{1,2}
και C. Murphy^{1,2}

¹Εργ. Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα.

²Ιδρυμα Έρευνας & Τεχνολογίας-Ελλάδας, Ινστιτ. Βιοιατρικής Έρευνας, 45110 Ιωάννινα.

Τα μέλη της οικογένειας και οι διαμεσολαβητές της μεταγωγής του σήματος από τον TGF-β είναι σημαντικοί ρυθμιστές πολλών αναπτυξιακών και ομοιοστατικών διεργασιών του ευκαρυωτικού κυττάρου, ενώ η δυσλειτουργία τους εμπλέκεται σε ποικίλες ανθρώπινες ασθένειες από τον καρκίνο ως την χονδροδυσπλασία και την πνευμονική υπέρταση (Mehra and Wrana, *Biochem Cell Biol*, 2002). Η SARA, μια πρωτεΐνη με τομέα FYVE έχει καθοριστικό ρόλο σε αυτό το μονοπάτι στρατολογώντας τις μη-φωσφορυλιωμένες μορφές των SMAD πρωτεϊνών στο σύμπλοκο του υποδοχέα για φωσφορυλίωση (Tsukazaki et al., *Cell*, 1998). Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η SARA εντοπίζεται στο πρώιμο ενδόσωμα και ότι η εσωτερικοποίηση των υποδοχέων του TGF-β είναι απαραίτητη προκειμένου να φθάσουν τις συνδεδεμένες στην SARA SMAD πρωτεΐνες (Panopoulou et al., *J Biol Chem*, 2002).

Επειδή το σύμπλοκο TGF-βRII/ALK5/SARA/SMAD2/SMAD3 εντοπίζεται στις μεμβράνες των πρώιμων ενδοσωμάτων, αναλάβαμε τον στόχο για την ανεύρεση των υπόλοιπων πρωτεϊνών του συμπλόκου στο πρώιμο ενδόσωμα που πιθανόν επηρεάζουν τη μεταγωγή του σήματος από τον TGF-β. Κατά συνέπεια, ερευνήσαμε τις SARA-αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές προσεγγίσεις: 1) τη μοριακή βιολογική προσέγγιση (σύστημα των δύο υβριδίων) και 2) τη βιοχημική προσέγγιση (ανοσοκατακρήμνιση και ταυτοποίηση με φασματομετρία μάζας). Χρησιμοποιώντας το σύστημα των δύο υβριδίων (LEXA), προσδιορίσαμε 32 SARA-αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες, ενώ 8 πρωτεΐνες προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας.

MECHANISMS OF TGF- β SIGNALING: SARA-INTERACTING PROTEINS**Sflomos G.¹, Panopoulou E.¹, Bellou S.¹, Fotsis Th.^{1,2}, and C. Murphy^{1,2}**¹*Laboratory of Biological Chemistry, Medical School, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece*²*Biomedical Research Institute, Foundation for Research and Technology-Hellas, 45110 Ioannina, Greece*

Transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily members are important regulators of many diverse developmental and homeostatic processes and disruption of their activity has been implicated in a variety of human diseases ranging from cancer to chondrodysplasias and pulmonary hypertension (Mehra and Wrana, *Biochem Cell Biol*, 2002). SARA, a FYVE finger protein plays a leading role in this pathway by recruiting non-phosphorylated SMAD proteins to the receptor complex for phosphorylation (Tsukazaki et al., *Cell*, 1998). Recently, it was shown that SARA is localized to the early endosome and internalization of TGF- β receptors is required to reach the SARA-bound SMAD substrate ((Panopoulou et al., *J Biol Chem*, 2002).

Because the TGF- β /T β RII/ALK5/SARA/SMAD2/SMAD3 complex occurs on the membranes of early endosomes, we have undertaken the task of identifying additional proteins interacting with this complex and possibly affecting TGF- β signaling. As a consequence, we have searched for SARA-interacting proteins using two different approaches: 1) a molecular biological approach (two-hybrid system) and 2) a biochemical approach (co-immunoprecipitation and proteomics). Using the two-hybrid system (LEXA), we have identified 32 SARA-interacting proteins, whereas 8 proteins have been identified using mass spectrometry.

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΤΟΑΛΕΞΙΝΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΑ ΤΡΙΓΩΝΙΣΚΟΥ
(*TRIGONELLA FOENUM GRAECUM L.*) ΩΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗΝ
ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΑΠΟ *PSEUDOMONAS SYRINGAE***

**Σωτηρίου Π.¹, Τσίρη Δ.¹, Χήνου Ι.², Χαραλαμπίδης Κ.¹, Γκανή-
Σπυροπούλου Κ.¹**

¹Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α. ²Τομέας Φαρμακογνωσίας, Τμήμα
Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α

Τα φυτά έχουν αναπτύξει ποικιλία στρατηγικών άμυνας προκειμένου να αντιδράσουν σε μια μικροβιακή επίθεση. Οι φυτοαλεξίνες είναι ουσίες μικρού μοριακού βάρους οι οποίες συσσωρεύονται στα φυτά ως απόκριση σε επαγωγείς, βιοτικούς ή αβιοτικούς. Η επαγωγή της σύνθεσης φυτοαλεξίνης μετά από μόλυνση φυτών τριγωνίσκου (ποτισμένων και απότιστων) από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* var *tomato* (*Pst*) εκτιμήθηκε με RP-HPLC ανάλυση. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα των μετάγραφων της αναγωγής της βεσιτόνης (VR), ενός ενζύμου που καταλύει το προτελευταίο βήμα της βιοσύνθεσης της μεντικαρπίνης, εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας ημιποσοτική RT-PCR. Μόλυνση με *Pst* του πρώτου φύλλου ποτισμένων φυτών προκάλεσε επαγωγή της παραγωγής μεντικαρπίνης στον ιστό αυτόν. Η μεντικαρπίνη αυξήθηκε τις πρώτες 24 ώρες μετά την μόλυνση και μετά μειώθηκε. Όταν υδατικά καταπονημένα φυτά μολύνθηκαν με *Pst* η σύνθεση της μεντικαρπίνης μειώθηκε. Τα επίπεδα των μετάγραφων της VR στα φύλλα των φυτών (φυσιολογικών και υδατικά καταπονημένων) συμφωνούσαν με τα αυξημένα επίπεδα της μεντικαρπίνης στα φύλλα, υπονοώντας ότι το *Pst* επάγει τη σύνθεση της μεντικαρπίνης. Παρόλα αυτά δεν ήταν ξεκάθαρο εάν επρόκειτο για *de novo* σύνθεση ή αν η μεντικαρπίνη προήλθε από τη μετατροπή πρόδρομων ουσιών που ανήκουν στα φαινυλπροπανοειδή και οι οποίες προϋπήρχαν. Για το λόγο αυτό εξετάζεται και η έκφραση του γονιδίου της συνθάσης της ισοφλαβόνης (IFS). Είναι ενδιαφέρον ότι μόλυνση του φύλλου από το *Pst* προκάλεσε επαγωγή της έκφρασης της VR στις κοτυληδόνες, χωρίς όμως συνακόλουθη σημαντική αύξηση της μεντικαρπίνης. Θα ήταν δελεαστικό να υποθέσουμε ότι η μεντικαρπίνη που συντέθηκε στις κοτυληδόνες, εξαιτίας μακρινού σήματος από το φύλλο, μεταφέρθηκε στο φύλλο.

**PHYTOALEXIN RESPONSE IN *PSEUDOMONAS SYRINGAE*
INFECTED FENUGREEK PLANTS (*TRIGONELLA FOENUM*
GRAECUM L.).****Sotiriou P.¹, Tsiri D.¹, Chinou I.², Haralampidis K.¹, Spyropoulos C.G.¹**¹*Department of Botany, Faculty of Biology, Univ. of Athens*²*Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Univ. of Athens*

Plants have developed a series of defense strategies to respond to microbial attack. Phytoalexins are low molecular weight compounds that accumulate in plants in response to elicitors, biotic or abiotic. Induction of phytoalexin formation upon infection with the bacteria *Pseudomonas syringae* var tomato (*Pst*) of watered or water-stressed fenugreek plants was assessed by RP-HPLC analysis. In addition, the transcript level of vestitone reductase (*VR*) which catalyzes the penultimate step of medicarpin biosynthesis was assayed using semi-quantitative RT-PCR. *Pst* infection of the first leaflet of watered plants induced the production of medicarpin in this tissue, which increased until 24 h post infection and then decreased. When water-stressed plants were infected with *Pst* medicarpin production was decreased. The transcript levels of *VR* in leaves of normal and water-stressed plants were in accordance with the increased levels of medicarpin in this organ, suggesting that *Pst* induces the synthesis of medicarpin. However, it was not clear whether its synthesis was from phenylpropanoid precursors or *de novo*. For this reason, the expression of isoflavone synthase (*IFS*) gene is currently investigated. Interestingly leaflet infection with *Pst* induced the expression of *VR* in cotyledons without a concomitant significant increase of medicarpin. It is tempting to speculate that medicarpin synthesized in cotyledons, due to a remote signal from the leaflet, was transported to the infected leaflet.

The project is co-financed within Op. Education by the ESF (European Social Fund) and National Resources

ΧΙΜΑΙΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ ΔΥΟ ΟΜΟΛΟΓΩΝ ΜΕΤΑΦΟΡΕΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΛΥΟΥΝ ΤΗΝ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Ταβουλάρη Σ.^{1,3}, Kaback H.R.² και Ε. Φριλίγγος¹

¹Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Ιατρική Σχολή, Ιωάννινα,

²Department of Physiology, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA, ³τρέχ.

διεύθυνση: Dept of Pharmacology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT

Η περιμέωση μελβιόζης του *Enterobacter cloacae* (MelY) και η περιμέωση λακτόζης της *Escherichia coli* (LacY) ανήκουν στην οικογένεια OHS της υπεροικογένειας MFS. Τα κατάλοιπα της LacY που συμμετέχουν στη δέσμευση υποστρώματος συντηρούνται και στην MelY ενώ το μεθυλ-1-θειο-β-D-γαλακτοσίδιο (TMG), ένα από τα γνωστά υποστρώματα της LacY, δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια αλλά δεν μπορεί να προσληφθεί από την MelY, γεγονός που αποτελεί την μόνη ουσιαστική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο μεταφορέων. Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η δέσμευση του TMG από την MelY αποδίδει αμελητέα ενεργότητα πρόσληψης διότι δεν μπορούν να επαχθούν οι αλλαγές διαμόρφωσης που απαιτούνται για τον κύκλο κατάλυσης (turnover). Από την ομάδα των 43 θέσεων της LacY που είχαν υποδειχθεί ως σημαντικές για τις αλλαγές διαμόρφωσης βάσει πειραμάτων Cys-scanning mutagenesis και Scanning Cysteine Accessibility Methods (SCAM), επιλέξαμε ως στόχους περαιτέρω μεταλλάξευσης τις 6 όπου η MelY διαφέρει της LacY. Τα πειράματα απεκάλυψαν ότι δύο μεταλλάγματα της LacY, V367A και V367A/C355Q (έλικα XI), οδηγούν σε φαινότυπο όμοιο με αυτόν της MelY, δηλ. αμελητέα επίπεδα πρόσληψης TMG χωρίς να αναστέλλεται η ενεργότητα πρόσληψης των άλλων υποστρωμάτων. Οι αντίστροφες μεταλλάξεις στο υπόστρωμα της MelY δεν οδηγούν σε αντιστροφή του φαινότυπου. Μελέτη μίας σειράς χημικών κατασκευών που ανταλλάσσουν συγκεκριμένες διαμεμβρανικές έλικες μεταξύ των δύο μεταφορέων έδειξε ότι η αντικατάσταση μόνο του τομέα N6 ή μόνο του τομέα C6 της LacY με αυτόν της MelY επίσης οδηγεί σε αναστολή της μεταφοράς TMG. Εισαγωγή της A367V ή A367V/Q355C (έλικα XI) στο υπόστρωμα της χημικής N6(LacY)-C6(MelY) αντιστρέφει πλήρως τον φαινότυπο οδηγώντας σε υψηλή ενεργότητα πρόσληψης TMG και εξειδίκευση υποστρωμάτων όμοια με αυτήν της LacY. Συμπεραίνεται ότι για την αποτελεσματική διεκπεραίωση των αλλαγών διαμόρφωσης που οδηγούν στην μεταφορά TMG απαιτείται αυστηρός συντονισμός μεταξύ του τομέα N6 και της έλικας XI, ο οποίος δεν φαίνεται να είναι απαραίτητος για άλλα υποστρώματα, όπως μελβιόζη ή λακτόζη.

Αρχικά στάδια της έρευνας χρηματοδοτήθηκαν από το Ίδρυμα Fulbright (Ε.Φ.) και από ερευνητικά προγράμματα του NIH (H.R.K.). Ευχαριστούμε τους M. Sahin-Toth, Π. Πάνο, Α. Μπόμπορη και Π. Καρατζά για την αρωγή τους σε ορισμένα πειράματα, τις K. Stempel και D. Haraly για σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων και αλληλούχηση DNA σε αρχικά στάδια του προγράμματος, τον Tomohisa Tsuchiya για την παραχώρηση του πλοσμιδίου pNOEC73 που έφερε κλωνοποιημένο το γονίδιο melY και τον Gerard Leblanc για την γενναιόδωρη παραχώρηση 2 mCi ³H]μελβιόζης.

**SUBSTRATE-SPECIFICITY CHIMERAS BETWEEN TWO
HOMOLOGOUS GALACTOSIDE SYMPORTERS****Tavoulari S.^{1,3}, Kaback H.R.², and S. Frillingos¹**

¹Laboratory of Biological Chemistry, University of Ioannina Medical School, Ioannina, Greece, ²Department of Physiology, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA, ³cur. address: Dept of Pharmacology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT

Enterobacter cloacae melibiose permease (MelY) and *Escherichia coli* lactose permease (LacY) belong to the OHS family, a member of the MFS superfamily. The LacY residues known to bind substrate are conserved in MelY and evidence is available by us that methyl-1-thio- β -D-galactoside (TMG), an efficient substrate in LacY, binds with high affinity but is not transported by MelY to any significant extent. Our data imply that binding of TMG in MelY may specifically impair the conformational changes of turnover. From a set of 43 alkylation-sensitive LacY positions identified previously by us as conformationally important, we selected the 6 where MelY differs from LacY as mutagenesis targets. Site-directed mutagenesis revealed that V367A or V367A/C355Q, where amino acids at one face of helix XI of LacY have been changed with the corresponding ones of MelY, resulted in a MelY-like phenotype, with impaired TMG transport. The mirror-image replacements on MelY background did not result in reversion of the transport phenotype. We engineered several cross-homologue chimeras and showed that a MelY phenotype with impaired TMG transport is also achieved by replacing domain N6 or domain C6 of LacY with the corresponding domain of MelY. Introduction of A367V or A367V/Q355C (helix XI) on the background of N6(LacY)-C6(MelY) chimera completely reverses phenotype to yield a LacY-like pattern with highly significant TMG uptake. It is concluded that fine-tuned coordination between the N6 domain and helix XI is needed for the OHS transporter to complete conformational movements of turnover for uptake of TMG, while the lactose or melibiose transport cycle is not dependent on such coordination.

Initial phases of this research were funded by a Fulbright Senior Research Fellowship to S.F. and by a NIH grant to H.R.K. We thank M. Sahin-Toth, P. Panos, A. Bobori and P. Karatza for help with certain experiments. We thank K. Stempel and D. Hardy for assistance with oligonucleotide synthesis and DNA sequencing in initial phases of the project. We are indebted to Tomofusa Tsuchiya for providing us with plasmid pNOEC73 (expressing MelY) and to Gerard Leblanc for his generous gift of 2 mCi of [³H]melibiose.

Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ USP31 ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΕΙΝΑΙ ΕΝΑ ΕΝΖΥΜΟ ΑΠΟΟΥΒΙΚΙΤΙΝΩΣΗΣ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΕΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NF-κB

Τζήμας Χ., Αρσενάκης Μ., Μόσιαλος Γ. και Ε. Χατζηβασιλείου

Εργαστήριο Γενικής Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 54124

Οι πρωτεΐνες TRAF συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος από τους υποδοχείς της υπεροικογένειας TNFR. Με την τεχνική των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα, απομονώθηκε από βιβλιοθήκες cDNA του ανθρώπου, μία πρωτεΐνη που παρουσιάζει ομολογία με τα ένζυμα αποουβικιτινώσης (USP31, ubiquitin specific protease 31) και αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TRAF2. Αναγνωρίστηκαν 2 τουλάχιστον cDNA που σχετίζονται με την πρωτεΐνη USP31. Το ένα cDNA κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 1035 αμινοξέων (USP31, μεγάλη ισομορφή), ενώ το δεύτερο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 485 αμινοξέων (USP31S1, μικρή ισομορφή). Οι δύο ισομορφές έχουν κοινή αμινοτελική περιοχή, η οποία παρουσιάζει ομολογία με την καταλυτική περιοχή γνωστών ενζύμων αποουβικιτινώσης. Η μελέτη της ενζυμικής δράσης έδειξε ότι μόνο η μεγάλη ισομορφή USP31 και όχι η μικρή ισομορφή USP31S1, διαθέτει ενζυμική δράση αποουβικιτινάσης. Επιπρόσθετα, αποδείχτηκε ότι η πρωτεΐνη USP31 παρουσιάζει υψηλότερη δραστικότητα απέναντι σε αλυσίδες πολυουβικιτίνης που συνδέονται μέσω της λυσίνης-63, συγκριτικά με αλυσίδες πολυουβικιτίνης που συνδέονται μέσω της λυσίνης 48. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης USP31 σε ανθρώπινα νεφρικά εμβρυϊκά κύτταρα HEK293T παρεμπόδισε την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB που επάγεται από τον TNF α , τον υποδοχέα CD40, την πρωτεΐνη LMP1, τις πρωτεΐνες TRAF2 και TRAF6 και τις κινάσες IKK α και IKK β . Επιπρόσθετα, και οι δύο ισομορφές της πρωτεΐνης USP31 αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη p65/RelA. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν ένα πιθανό ρόλο της πρωτεΐνης USP31 στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, που επάγεται από διάφορα μέλη της υπεροικογένειας TNFR.

HUMAN UBIQUITIN SPECIFIC PROTEASE 31 IS A DEUBIQUITINATING ENZYME IMPLICATED IN ACTIVATION OF NUCLEAR FACTOR-KAPPAB

Tzimas Chr., Arsenakis M., Mosialos G., and E. Hatzivassiliou

Laboratory of General Microbiology, Division of Genetics, Development and Molecular Biology, Department of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 54124

TRAFs constitute a family of proteins that participate in signal transduction by members of the TNF receptor superfamily. A yeast two-hybrid screen of a human cDNA library identified a ubiquitin specific protease homologue (USP31) as a TRAF2-interacting protein. Two cDNAs encoding for USP31 were identified. One cDNA encodes a 1035-amino-acid-long isoform of USP31 (USP31, long isoform) and the other a 485-amino-acid-long isoform of USP31 (USP31S1, short isoform). USP31 and USP31S1 share a common amino terminal region with homology to the catalytic region of known deubiquitinating enzymes. Enzymatic assays demonstrated that USP31, but not USP31S1, possess deubiquitinating activity. Furthermore, it was shown that USP31 has a higher activity towards lysine-63-linked, as compared to lysine-48-linked polyubiquitin chains. Overexpression of USP31 in HEK 293T cells inhibited TNF α , CD40, LMP1, TRAF2, TRAF6, IKK α and IKK β -mediated NF- κ B activation. In addition, both USP31 isoforms interact with p65/RelA. Our data support a role for USP31 in the regulation of NF- κ B activation by members of the TNF receptor superfamily.

ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΥΠΟΣΧΕΣΕΙΣ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ J/ΚΛΑΣΤΕΡΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Τρουγκάκος Ι.Π.*

*Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (Ε.Ι.Ε), Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών & Βιοτεχνολογίας,
Εργαστήριο Μοριακής & Κυτταρικής Γήρανσης, Βασ. Κωνσταντίνου 48, 116 35, Αθήνα*

Η πρωτεΐνη Απολιποπρωτεΐνη J/Κλαστερίνη (CLU) είναι μια ετεροδιμερής εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί βιοδείκτη *in vitro* και *in vivo* γήρανσης. Επιπλέον έχειδειχθεί ότι εμπλέκεται στην καρκινική εξαλλαγή και στην ανάπτυξη αντοχής των καρκινικών κυττάρων σε διάφορους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Πρόσφατες μελέτες δεικνύουν ότι η CLU θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως στόχος για την ανάπτυξη αντικαρκινικών θεραπειών. Στην κατεύθυνση αυτή, χρησιμοποιούμε την τεχνολογία της αποσιώπησης RNA μέσω ολιγονουκλεοτιδίων παρεμβολής RNA (small interference RNA), για την μείωση των επιπέδων της CLU σε U2 OS οστεοσαρκωματικά καρκινικά κύτταρα. Η παρέμβαση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή αύξησης των κυττάρων στη φάση G₁/S του κυτταρικού κύκλου και την επαγωγή κασπασο-εξαρτώμενου κυτταρικού θανάτου. Περαιτέρω μοριακή ανάλυση έδειξε ότι η επαγωγή του κυτταρικού θανάτου οφείλεται στην μείωση έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2 and bcl-X_L και στη ενεργοποίηση του p53 και του bax. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν στην κυτταρική σειρά Sa OS στην οποία έχει διαγραφεί το γονίδιο p53. Η μείωση των επιπέδων της CLU επάγει την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 είτε μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-8 και του bid είτε μέσω απευθείας μετακίνησης του bax στα μιτοχόνδρια. Η επίδραση των μειωμένων επιπέδων της CLU στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου αυξάνεται δραματικά αν συνδυαστεί με παράλληλη έκθεση των κυττάρων σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Προτείνουμε ότι τα ειδικά για το γονίδιο της CLU siRNA ολιγονουκλεοτίδια που αναπτύχθηκαν, θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημαντικά θεραπευτικά εργαλεία τόσο σε διάφορους τύπους καρκίνου όσο και σε άλλες νόσους όπου εμπλέκεται η CLU.

* Προσκεκλημένος ομιλητής

CHALLENGE AND PROMISE: ROLES FOR APOLIPOPROTEIN J/ CLUSTERIN IN PATHOGENESIS AND THERAPY OF CANCER**Trougakos I.P.***

Laboratory of Molecular & Cellular Aging, Institute of Biological Research & Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, 48 Vas. Constantinou Ave., Athens 11635, Greece

Apolipoprotein J/clusterin (CLU) has been implicated in various cell functions including senescence and *in vivo* tumor progression. CLU expression has been associated with tumorigenesis of various malignancies and with the acquisition and maintenance of cancer cells resistance to chemotherapeutic drugs. Preliminary results indicate that therapeutic modalities targeting CLU may be effective in cancer treatment. We have been using the technology of small-interference-RNA (siRNA) to knock down CLU in human cancer cells. Effective and sustained CLU depletion from the U2 OS osteosarcoma cancer cells by siRNA induces late morphological alterations, growth arrest at the G₁/S checkpoint and caspase-dependent apoptosis. Apoptosis initiation is promoted via down regulation of the BH pro-survival (bcl-2 and bcl-X_L) proteins and activation of p53 and its downstream target, namely bax. Parallel investigation of the CLU knock down effects in the Sa OS p53-null cellular context revealed the induction of mild apoptosis, via bcl-2 and bcl-X_L down-regulation, but no effect on cellular growth indicating that although p53 is essential for the growth inhibitory effect it acts as an enhancer of the apoptotic outcome. CLU depletion activates caspase-9 and the mitochondrial axis of apoptosis either by caspase-8 activation and bid cleavage or by immediate bax translocation to mitochondria. All these effects are dramatically enhanced after combining CLU knock down with cancer cell exposure to chemotherapeutic drugs. We suggest that the CLU-specific siRNA oligonucleotides used, may prove valuable agents during anti-tumor therapy or at other pathological conditions where CLU has been implicated.

* Invited speaker

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΑΙΜΑ ΤΟΥ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟ
ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΕΝΗΛΙΚΑ**

**Τσάγιας Ν.¹, Κουζή-Κολιάκου Κ.², Καραγιάννης Β.³, Ιωαννίδου Ε.⁴,
Κολιάκος Γ.¹**

*¹Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, ²Εργαστήριο Ιστολογίας Εμβρυολογίας, ³Γ'
Γυναικολογική- Μαιευτική Κλινική, ⁴Β' Παθολογική Κλινική Ιατρική Σχολή, Α.Π.Θ.*

Στο αίμα του ομφάλιου λώρου και στο περιφερικό αίμα ενηλίκων υπάρχουν πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, που μπορούν να καλλιεργηθούν και να διαφοροποιηθούν σε απογόνους που ανήκουν και στα τρία βλαστικά δέρματα. Σκοπός της εργασίας είναι η συγκριτική μελέτη της απομόνωσης, καλλιέργειας και κατάψυξης αρχέγονων πολυδύναμων κυττάρων από το αίμα του ομφάλιου λώρου και από το περιφερικό αίμα ενηλίκων. Το αίμα συλλέγονταν από τον ομφάλιο λώρο στο τέλος του τοκετού σε ειδικό ασκό συλλογής, ενώ το περιφερικό αίμα ενηλίκων συλλέγονταν σε ασκούς αιμοδοσίας. Και στις δυο περιπτώσεις ο μονοκυτταρικός πληθυσμός απομονωνόταν φυγοκεντρικά με βαθμίδωση φικόλης. Μέρος του πληθυσμού αυτού καλλιεργούνταν άμεσα και το υπόλοιπο καταψύχονταν βαθμιαία και συντηρούνταν σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια τα κύτταρα αποψύχονταν και καλλιεργούνταν. Η βιωσιμότητα των κυττάρων ελέγχονταν με χρώση κυανού του τρυπανίου και φωτομετρικά με τη χρήση resazurin-resorufin. Ο ομφάλιος λώρος περιέχει τριπλάσιο αριθμό κυττάρων συγκριτικά με το περιφερικό αίμα ενηλίκων. Η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνονταν κατά 10-15 % μετά από την απόψυξη. Τα κύτταρα που απομονώνονταν από το περιφερικό αίμα ήταν μικρότερα σε μέγεθος και πολλαπλασιάζονταν με βραδύτερο βαθμό σε σχέση με τα αντίστοιχα προερχόμενο από το αίμα του ομφάλιου λώρου. Τα κύτταρα αυτά τελικά στις καλλιέργειες δημιουργούσαν ανεξάρτητες αποικίες και εμφάνιζαν μορφολογικές ομοιότητες με ινοβλάστες. Η μορφολογία των κυττάρων που απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν είναι παρόμοια με αυτή που αναφέρεται από άλλους ερευνητές για τα κύτταρα προερχόμενα από αίμα του ομφάλιου λώρου. Παραμένει η αντιγονική ταυτοποίηση και ο έλεγχος της διαφοροποίησης.

ISOLATION, EXPANSION AND CRYOPRESERVATION OF STEM CELLS FROM UMBILICAL CORD BLOOD AND PERIPHERAL BLOOD**Tsagias N.¹, Kouzi-Koliakou K.², Karagiannis V.³, Ioannidou E.⁴, Koliakos G.¹**

¹Laboratory of Biological Chemistry, ²Laboratory of Istology-Embryology ³Third Department of Gynecology and Obstetric, ⁴Second Department of Pathology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, 54124

It is estimated that in umbilical cord blood (UCB) and in peripheral blood exist stem cells with pluripotent differentiation potential. The aim of the present work is the comparative study of the isolation, expansion and cryopreservation of pluripotent stem cells from the UCB and peripheral blood. Blood was collected from the umbilical cord vein and the peripheral blood was kept in specific blood bags. In both cases the mononuclear cell fraction was obtained by ficoll. Part of the cells was cultivated immediately, while others were cryopreserved gradually and preserved in liquid nitrogen. After cryopreservation procedures, cells were thawed and cultivated. The cell viability was measured by trypan blue and a spectrophotometric cell assay using resazurin-resorufin. Cord blood contains three-fold number of cells as compared to the peripheral blood. The cell viability was decreased 10-15 % after thawing. Peripheral blood cells were smaller and multiplied with lower rate as compared to those collected from umbilical cord blood. The cultivated cells formed independent columns and appeared fibroblastic morphology. The morphology of the isolated and cultured cells was similar to that referred from other researchers for stem cells collected from umbilical cord blood. The immunophenotyping identification and the differentiation capacity of the cells remain to be estimated.

Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ BMP ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΗ TWISTED GASTRULATION ΣΤΟΥΣ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥΣ ΛΕΜΦΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΕΙ ΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ BMP ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΚΤΗΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ

Τσάλαβος Σ.¹, Πασσά Ο.¹, Οικονομίδης Α.Ν.², Graf D.¹

¹Ινστιτούτο Ανοσολογίας, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλ. Φλέμιγκ» 166 72
Βάρη ²Regeneron Pharmaceuticals, Inc. Tarrytown, NY

Οι BMP (Bone Morphogenetic Proteins- Μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών) είναι εκκρινόμενες πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των σηματοδοτικών μορίων του TGF-β. Οι BMP μαζί με BMP αγωνιστές/ανταγωνιστές σχηματίζουν ένα εξωκυττάριο σηματοδοτικό δίκτυο το οποίο ρυθμίζει τη δραστηριότητα των BMP σε επίπεδο προ-υποδοχέα. Η σημασία αυτού του δικτύου στη ρύθμιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης έχει αναλυθεί και τεκμηριωθεί ικανοποιητικά σε πολλά είδη, ωστόσο σχετικά λίγα είναι γνωστά όσον αφορά τους ρόλους τους σε ενήλικους ιστούς. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι ανεπάρκεια ως προς τις περισσότερες BMP πρωτεΐνες ή BMP ανταγωνιστές αποβαίνει θανατηφόρα σε εμβρυϊκό ή νεογνικό επίπεδο. Πλην όμως, έχει υπονοηθεί κάποιος ρόλος για τις BMP στο ανοσοποιητικό σύστημα μέσα από μια σειρά *in vitro* μελετών καθώς και από το συσχετισμό κάποιων BMP με αιμοποιητικές διαταραχές. Συνεπώς, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η BMP σηματοδότηση δύναται να παίζει έναν εξίσου σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση του ενήλικου ανοσοποιητικού συστήματος με το αρχέτυπο αυτής της υπεροικογένειας, ήτοι τον παράγοντα TGF-β. Για να προσεγγίσουμε αυτό το ζήτημα δημιουργήσαμε ένα σύστημα για την μακροσκοπική περιγραφή περιοχών BMP σηματοδότησης. Χρησιμοποιούμε διάφορα ποντίκια-αναφορές ως προς κάποιο γονίδιο (gene reporter mice), όπου το γονίδιο lacZ εκφράζεται αντί του γονιδίου που μας ενδιαφέρει. Συνδυάζοντας το παραπάνω σύστημα με ανοσοϊστοχημεία μπορούμε να προσδιορίσουμε περιοχές και πηγές έκφρασης των BMP/BMP ανταγωνιστών καθώς και κυτταρικούς στόχους της δράσης τους. Υιοθετήσαμε αυτή την προσέγγιση για να παρακολουθήσουμε την έκφραση του BMP ανταγωνιστή, Twisted Gastrulation (tsg), στο σπλήνα και στους λεμφαδένες κατά την εξέλιξη μιας ανοσολογικής αντίδρασης. Εντοπίζουμε ότι το tsg εκφράζεται σε περιοχές του σπλήνα εντός και εκτός των θυλακίων και ιδιαίτερος σε B και T λεμφοκύτταρα καθώς και σε υποσύνολα B κυττάρων που σχετίζονται με Βλαστικά Κέντρα (Germinal Centers) (GCs). Στο GC, η Tsg βρίσκεται πρωτίστως στη σκούρα ζώνη του GC υποδεικνύοντας ένα πιθανό ρόλο στην ωρίμανση του GC. Η χρώση για τον εντοπισμό φωσφορυλιωμένων SMAD 1/5/8 (οι άμεσοι καθοδικοί διαμεσολαβητές της BMP σηματοδότησης) ήταν θετική για τους θύλακες της σπλήνας συνιστώντας ενεργή BMP σηματοδότηση, γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανώς οι BMP ρυθμίζουν ενεργά κάποιες πλευρές των διαδικασιών της ανοσιακής απόκρισης. Βάσει αυτής της δουλειάς είμαστε τώρα σε θέση να διερευνήσουμε λεπτομερώς το δίκτυο της BMP σηματοδότησης αναφορικά με τη ρύθμιση της επίκτητης ανοσίας με τη χρήση κατά συνθήκην στοχευμένων ποντικών.

**EXPRESSION OF THE BMP ANTAGONIST TWISTED
GASTRULATION IN PERIPHERAL LYMPHOID TISSUES SUGGESTS
A ROLE FOR BMP SIGNALING IN THE REGULATION OF ADAPTIVE
IMMUNITY****Tsalavos S.¹, Passa O.¹, Economides A.N.², Graf D.¹**

¹*Institute of Immunology, Biomedical Sciences Research Centre "Al. Fleming" 166 72 Vari*
²*Regeneron Pharmaceuticals, Inc. Tarrytown, NY*

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are secreted proteins that belong to the TGF- β superfamily of signaling molecules. BMP together with BMP agonists/antagonists form an extracellular signaling network regulating BMP activity at the pre-receptor level. The importance of this network for the regulation of embryonic development is well documented in many species, but comparatively little is known about their roles in adult tissues. This can be attributed to the fact that deficiency for most BMP/BMP antagonists is embryonic or neonatal lethal. Nevertheless, a role for BMPs in the immune system has been implicated through a series of in vitro studies and through the association of some BMPs with hematopoietic malignancies. It is therefore feasible that BMP signals play a similarly important role in the regulation of the adult immune system as the prototype of this superfamily, TGF- β . To approach this we set up a system to visually describe sites of BMP signaling. We are using a combination of gene reporter mice, where lacZ is expressed in lieu of the gene of interest, and combine it with immunohistochemistry. This way we can identify sites and source of BMP/BMP antagonist expression as well as cellular targets of their action. Examples for this will be presented. We applied this approach to follow expression of the BMP antagonists, Twisted Gastrulation (tsg), in spleen and lymph nodes throughout the course of an immune response. We find that tsg is expressed in intrafollicular and extrafollicular areas of the spleen and in particular in B and T lymphocytes as well as in Germinal Centre (GC) B cell subsets. In the Germinal centre, tsg is predominantly found in the dark zone of the GC indicating a possible role in the maturation of the GC. Staining for phosphorylated SMAD 1/5/8 (the direct downstream mediators of BMP signaling) was positive in the splenic follicles suggesting active BMP signaling, indicating that BMPs might actively regulate aspects of immune response processes. Based on this work we can now functionally dissect the BMP signaling network in the regulation of adaptive immunity using conditional knock-out mice.

ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΤΟΠΟΛΟΓΙΑΣ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Τσαούσης Γ.Ν., Μπάγκος Π.Γ. και Σ.Ι. Χαμόδρακας

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Αθήνα 157 01*

Το 20-30% των γνωστών πρωτεωμάτων είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες αντιπροσωπεύουν μία ιδιαίτερα σημαντική κατηγορία πρωτεϊνών καθώς λαμβάνουν μέρος σε πολλές κυτταρικές δραστηριότητες. Για να κατανοήσουμε την λειτουργία τους πρέπει να μελετήσουμε την δομή και την τοπολογία τους στην μεμβράνη. Δεδομένης όμως της δυσκολίας να μελετηθεί η δομή των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, έχουν αναπτυχθεί τόσο υπολογιστικές μέθοδοι πρόγνωσης δομής και τοπολογίας όσο και πειραματικές τεχνικές. Τέτοιες είναι οι τεχνικές συντήξης γονιδίων (gene fusion) με ένζυμα όπως η αλκαλική φωσφατάση, η β-γαλακτοσιδάση, η β-λακταμάση και διάφορες φθορίζουσες πρωτεΐνες, τεχνικές που στηρίζονται στην ανίχνευση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων όπως η γλυκοζυλίωση, η φωσφορυλίωση και η βιοτινυλίωση, τεχνικές εισαγωγής καταλοίπων κυστεΐνης, μέθοδοι πρωτεόλυσης και τεχνικές χαρτογράφησης αντιγονικών επιτόπων. Ύστερα από εκτενή αναζήτηση στην διεθνή βιβλιογραφία (έως τον Ιούνιο του 2005) συλλέχθηκαν συνολικά 900 επιστημονικά άρθρα για 1538 διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, συγκεντρώθηκαν 326 άρθρα με συντήξεις γονιδίων, 110 με τεχνικές γλυκοζυλίωσης, 7 με τεχνικές φωσφορυλίωσης, 10 με τεχνικές βιοτινυλίωσης, 78 με τεχνικές εισαγωγής καταλοίπων κυστεΐνης, 204 με τεχνικές χαρτογράφησης αντιγονικών επιτόπων, και 103 με μεθόδους πρωτεόλυσης. Οι πληροφορίες που εξάγονται για την τοπολογία των πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα σημαντικές καθώς έχει δειχθεί ότι η ενσωμάτωση πειραματικής πληροφορίας στην πρόγνωση, την καθιστά περισσότερο αξιόπιστη. Σκοπός μας είναι η στατιστική αξιολόγηση των δεδομένων αυτών αλλά και η δημιουργία μιας βάσης δεδομένων που θα εμπεριέχει την πειραματική αυτή πληροφορία και θα συνεισφέρει στην βελτίωση των υπαρχόντων αλγορίθμων πρόγνωσης τοπολογίας διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.

**INCORPORATION OF EXPERIMENTAL TECHNIQUES FOR
TOPOLOGY PREDICTION OF TRANSMEMBRANE PROTEINS****Tsaousis G.N., Bagos P.G., and S.J. Hamodrakas***Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Athens 157 01*

Transmembrane proteins are approximately 20 to 30% of fully sequenced proteomes and constitute an important class of proteins, as they are crucial for a wide variety of cellular functions. In order to understand their function we must acquire knowledge about their structure and topology across the membrane. However, due to the difficulty of obtaining crystals of transmembrane proteins suitable for crystallographic analyses, biochemical and prediction methods are routinely used to determine the topology of transmembrane proteins. Biochemical methods include: techniques of gene fusions, using enzymes such as alkaline phosphatase, β -galactosidase, β -lactamase, and various fluorescent proteins, detection of post-translational modifications such as glycosylation, phosphorylation and biotinylation, cysteine-scanning mutagenesis, proteolysis methods and epitope mapping techniques. After an extended literature search (until June 2005), we collected 900 articles regarding 1538 transmembrane proteins. Specifically, 326 articles refer to gene fusions of various reporter proteins, 110 refer to glycosylation scanning, 7 refer to phosphorylation scanning, 10 refer to biotinylation scanning, 78 refer to cysteine scanning, 204 refer to epitope mapping and 103 refer to proteolysis experiments. The information we acquire regarding the proteins' topology is of great importance as it has been shown that one way to improve the prediction performance is to incorporate experimental information into the prediction algorithms. Our goal is to evaluate these data statistically and construct a database containing the experimental information in order to improve the prediction performance of topology prediction algorithms.

Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΩΝ ΔΕΣΜΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΚΥΣΤΕΙΝΗΣ ΣΥΜΒΑΛΛΕΙ ΣΤΟΝ ΟΜΟΔΙΜΕΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ BRI2

Τσαχάκη Μ., Μελαχροινού Κ., Ghiso J.¹, Ευθυμιόπουλος Σ.

*Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 157 84
Πανεπιστήμιοπολης, Πίσια, Ελλάδα*

*¹Departments of Pathology and Psychiatry, New York University School of Medicine, 550
First Avenue, TH-432, New York, NY 10016, USA*

Οι οικογενείς άνοιες Βρετανικού και Δανέζικου τύπου είναι δύο σπάνιες νευροεκφυλιστικές νόσοι που σχετίζονται με δύο διαφορετικές μεταλλάξεις της πρωτεΐνης BRI2. Πρωτεύουσα της BRI2 που φέρει αυτές τις μεταλλάξεις έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση των πεπτιδίων ABri και ADan, τα οποία δημιουργούν αμυλοειδείς αποθέσεις στους εγκεφάλους ασθενών με Βρετανική και Δανέζικη άνοια αντίστοιχα. Η BRI2 είναι μια τύπου II διαμεμβρανική πρωτεΐνη με άγνωστη λειτουργία. Πολλές πρωτεΐνες και ιδιαίτερα διαμεμβρανικοί υποδοχείς εκδηλώνουν την λειτουργία τους μέσω ομοδιμερισμού ή ακόμα και πολυμερισμού τους. Με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης διαφορετικά επιτοπικά σημασμένων BRI2 πρωτεϊνών βρέθηκε ότι αυτές ομοδιμερίζονται. Ομοδιμερή της BRI2 εντοπίστηκαν και στην κυτταρική επιφάνεια. Χρησιμοποιώντας ελλείψεις της πρωτεΐνης BRI2 διαπιστώθηκε ότι η διαμεμβρανική ακολουθία και ένα κομμάτι της εξωκυτταροπλασματικής περιοχής εμπλέκονται στον ομοδιμερισμό της. Η διαμεμβρανική ακολουθία της BRI2 περιλαμβάνει μοτίβα GXXXG αλλά και τρία αμινοξέα κυστεΐνης ενώ η εξωκυτταροπλασματική ακολουθία περιλαμβάνει μια ελεύθερη κυστεΐνη. Τα μοτίβα GXXXG και τα αμινοξέα κυστεΐνης θα μπορούσαν να εμπλέκονται στον ομοδιμερισμό της BRI2. Για να μελετήσουμε κατά πόσο το μοτίβο GXXXG εμπλέκεται στον ομοδιμερισμό της BRI2 τα συντηρημένα αμινοξέα γλυκίνης (G) μεταλλάχθηκαν σε λευκίνες. Η ανίχνευση ομοδιμερών της BRI2 παρά την παρουσία των μεταλλάξεων δείχνει ότι το μοτίβο GXXXG δεν εμπλέκεται στον ομοδιμερισμό της. Για να εξεταστεί κατά πόσο αμινοξέα κυστεΐνης εμπλέκονται στον ομοδιμερισμό της BRI2 κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης σε αναγωγικές και μη αναγωγικές συνθήκες. Παρατηρήσαμε μονομερή, ομοδιμερή και ολιγομερή της BRI2 σε μη αναγωγικές συνθήκες (απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης) και μονομερή της σε αναγωγικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα ομοδιμερή της BRI2 συγκρατούνται μέσω δισουλφιδικών δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ κυστεϊνών. Από τα παραπάνω, λοιπόν, συμπεραίνουμε ότι η BRI2 υπάρχει με τη μορφή ομοδιμερών, τα οποία εμφανίζονται και στην κυτταρική επιφάνεια, και ότι αυτά τα ομοδιμερή είναι δυνατόν εκτός των άλλων να συγκρατώνται και από δισουλφιδικούς δεσμούς.

Αυτή η έρευνα χρηματοδοτήθηκε από τα προγράμματα του υπουργείου Παιδείας «Πυθαγόρας I & II», του Πανεπιστημίου Αθηνών «Καποδίστριας» και της Ευρωπαϊκής ένωσης «ΑΡΟΠIS».

**THE FORMATION OF DISULFIDE BONDS BETWEEN CYSTEINS
CONTRIBUTES TO THE HOMODIMERIZATION OF BRI2 PROTEIN****Tsachaki M., Melachrinou C., Ghiso J.¹, Efthimiopoulos S.***Department of Biology, Division of Animal and Human Physiology, University of Athens,
157 84 Panepistimiopolis, Ilisia, Greece**¹Departments of Pathology and Psychiatry, New York University School of Medicine, 550
First Avenue, TH-432, New York, NY 10016, USA*

Familial British and Danish dementias are two rare neurodegenerative diseases that are linked to two different mutations in BRI2 protein. Proteolysis of mutant BRI2 results in the release of ABri and ADan peptides that form amyloid deposits in the brains of patients. BRI2 is a type II transmembrane protein with unknown function. Many proteins and especially membrane receptors function via homodimerization or even polymerization. By immunoprecipitation of differently tagged BRI2 proteins, it was found that these are homodimerized. Homodimers of BRI2 were detected also at the cell surface. Using deletion mutants of BRI2 it was found that the transmembrane sequence and a small piece of the extracellular domain are involved in the homodimerization of BRI2. The transmembrane sequence of BRI2 includes GXXXG motifs and three cysteins while the extracellular domain includes one free cystein. The GXXXG motifs and/or the cysteins could be involved in the homodimerization of BRI2. In order to study whether the GXXXG motif is involved in the homodimerization of BRI2 the conserved glycines were mutated to leucines. The detection of BRI2 homodimers despite the presence of the mutations indicates that the motif GXXXG is not involved in its homodimerization. To examine whether the cysteins are involved in the homodimerization of BRI2, cell extracts were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis under reducing and non-reducing conditions. Monomers, dimmers and oligomers of BRI2 were observed under non-reducing conditions and only monomers under reducing conditions. These results indicate that the BRI2 homodimers are held together via disulfide bonds formed between cysteins. We conclude that BRI2 exists in the form of homodimers that are expressed at the cell surface and that disulfide bonds contribute to the formation of these homodimers.

This research is funded by the Greek Ministry of Education grants "Pythagoras I & II", the University of Athens grant "Kapodistrias", European Grant APOPIS co-ordinated by the Verum foundation.

**ΜΙΑ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΟ ΑΠΟΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ
18S rRNA ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΗΝ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΚΑΙ
ΠΡΟΣΔΙΔΕΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΖΙΤΩΝ**

Τσελίκια Σ., Κωνσταντινίδης Θ.Χ. και Δ. Συνετός

Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26110 Πάτρα

Η μετάλλαξη U1495C απομονώθηκε αρχικά στην *Tetrahymena thermophila* ως μια ανθεκτική στην υδρομυκίνη μετάλλαξη. Μελετήσαμε την επίδραση της μετάλλαξης αυτής στην A θέση του 18S rRNA του *Saccharomyces cerevisiae* επί της πρωτεϊνοσύνθεσης και επί της δράσης των αμινογλυκοζιτών παρομομυκίνης και τομπραμυκίνης. Ριβοσώματα ζύμης που φέρουν την μετάλλαξη U1495C (*rdnhyg1*) παρουσίασαν αυξημένη συχνότητα λάθους ίση προς 0,0081, δηλαδή 81 λανθασμένες ενσωματώσεις αμινοξέων ανά 10.000 κωδικία, έναντι 0,0048 για το αγρίου τύπου (*rdnwt*) στέλεχος. Άλλες παράμετροι της πρωτεϊνοσύνθεσης, όπως η πρόσδεση των υποστρωμάτων στο ριβόσωμα και η ενεργότητα της πεπτιδυλο-τρανσφεράσης δεν επηρεάστηκαν. Η μετάλλαξη αυτή δεν επέδρασε στον σχηματισμό των 80S ριβοσωμάτων, σε αντίθεση με την αντίστοιχη μετάλλαξη στο προκαρυωτικό ριβόσωμα. Αντίθετα, επέδρασε αρνητικά στην μετατόπιση, καθώς το 50% της μετατόπισης επιτεύχθηκε στα 0,042 mg/ml μερικώς καθαρού πρωτεϊνικού κλάσματος περιέχοντος eEF2 για το *rdnwt* έναντι 0,080 mg/ml για το *rdnhyg1*. Τα αμινογλυκοζιτικά αντιβιοτικά προσδένονται στο κέντρο αποκωδικοποίησης της 40S υπομονάδας και προκαλούν μεταφραστικά λάθη. Έτσι, παρουσία 50μM παρομομυκίνης η συχνότητα λάθους στα *rdnwt* ριβοσώματα αυξήθηκε από 0,0048 σε 0,0270 και παρουσία 50μM τομπραμυκίνης σε 0,0267. Αντίθετα, η *rdnhyg1* ήταν ανθεκτική και στους δύο αμινογλυκοζίτες *in vitro*. Έτσι, παρουσία 50μM παρομομυκίνης η συχνότητα λάθους του *rdnhyg1* αυξήθηκε σε μικρότερο βαθμό, από 0,0081 σε 0,0234, ενώ παρουσία 50μM τομπραμυκίνης αυξήθηκε μόνο σε 0,0125. Όπως αναμενόταν, η παρομομυκίνη ανέστειλε την κυτταρική ανάπτυξη, ενώ η τομπραμυκίνη ήταν αναποτελεσματική, πιθανώς λόγω αδυναμίας να προσεγγίσει την θέση πρόσδεσής της.

Χρηματοδοτήθηκε από την Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας, Υπουργείο Ανάπτυξης (624/ΠΕΝΕΔ01)

**A MUTATION IN THE DECODING REGION OF YEAST 18S rRNA
AFFECTS TRANSLATION AND CONFERS RESISTANCE TO
AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTICS****Tselika S, Konstantinidis Th.C., and D. Synetos***Laboratory of Biochemistry, School of Medicine, University of Patras, 26110 Patras,
Greece*

Mutation U1495C was initially isolated as a hygromycin resistance mutation in *Tetrahymena thermophila*. We examined the effects of this mutation in the A site of the 18S rRNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on various aspects of protein synthesis, as well as on the binding of the aminoglycoside antibiotics paromomycin and tobramycin. Yeast ribosomes carrying the U1495C (*rdnhyg1*) mutation possessed an increased error frequency of 0.0081, i.e 81 aminoacid misincorporations per 10,000 codons, compared to 0.0048 for the wild type (*rdnwt*). Other aspects of translation, such as substrate binding to the ribosome and peptidyltransferase activity were not influenced. This mutation did not affect ribosomal subunit association, unlike the corresponding mutation in the prokaryotic ribosome. However, this mutation impaired the process of translocation, since 50% of translocation was achieved at 0.042 mg/ml of crude eEF2 for *rdnwt* compared to 0.080 for *rdnhyg1*. Aminoglycoside antibiotics bind to the decoding region of the 40S subunit and induce translational errors. Thus, in the presence of 50µM paromomycin, the error frequency of the *rdnwt* ribosomes was increased from 0.0048 to 0.0270 and in the presence of 50µM tobramycin to 0.0267. However, mutation *rdnhyg1* was resistant towards both aminoglycosides *in vitro*. Specifically, in the presence of 50µM paromomycin the error frequency of *rdnhyg1* ribosomes was increased to a lesser degree, from 0.0081 to 0.0234, while in the presence of 50µM tobramycin the error frequency was increased to only 0.0125. As expected, paromomycin inhibited yeast cell growth, whereas tobramycin was ineffective, presumably due to an inability to reach its eukaryotic binding site.

*Supported in part by a grant from the General Secretariat of Research and Technology,
Ministry of Development of Greece (624/PENED01).*

Η ΒΕΝΘΙΚΗ ΒΙΟΚΟΙΝΩΝΙΑ ΣΤΗ ΛΙΜΝΟΘΑΛΑΣΣΑ ΜΑΖΩΜΑ ΤΟΥ ΑΜΒΡΑΚΙΚΟΥ ΚΟΛΠΟΥ

Τσιάμης Κ., Πρωτόπαπας Ν. και Α. Νικολαΐδου

Τομέας Ζωολογίας-Θαλάσσιας Βιολογίας, Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Ωκεανογραφίας,
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη, Αθήνα 15784

Το Μάζωμα είναι μια υφάλμυρη λιμνοθάλασσα έκτασης 3km² και βάθους που δεν ξεπερνά το 1.5m, και επικοινωνεί μέσω δύο στομιών με τον Αμβρακικό κόλπο. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες βένθους και μετρήσεις φυσικών και χημικών παραμέτρων νερού και ιζήματος σε 10 επιλεγμένους σταθμούς ανά δίμηνο στη διάρκεια ενός έτους. Ο βυθός ήταν ιλυώδης και στο ανατολικό του τμήμα καλυπτόταν από το θαλάσσιο αγγειόσπερμο *Zostera noltii* και από το χλωροφύκος *Chaetomorpha* sp. Τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του νερού και του ιζήματος (θερμοκρασία, αλατότητα, διαλυμένο οξυγόνο, οργανικός άνθρακας) δε διέφεραν μεταξύ των σταθμών αλλά παρουσίασαν τις αναμενόμενες εποχικές διακυμάνσεις. Η βενθική πανίδα ήταν χαρακτηριστική των λιμνοθαλασσών της Μεσογείου, με επικρατέστερα είδη τα *Abra ovata*, *Hediste diversicolor* και *Mytilaster minimus*. Η πολυπαραμετρική ανάλυση MDS έδειξε ότι υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ των σταθμών από το δυτικό προς το ανατολικό τμήμα της λιμνοθάλασσας, οφειλόμενη κυρίως στην παρουσία των θαλάσσιων φυτών. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε εποχική διαφοροποίηση της βιοκοινωνίας, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στη συνεχή αναπαραγωγή πολλών ειδών. Ο δείκτης ποικιλότητας Shannon-Wiener κι ο δείκτης ομοιομορφίας Pielou δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σταθμών. Τέλος, υπήρξαν ενδείξεις για την ύπαρξη ανταγωνισμού μεταξύ συγγενικών ειδών, όπως για παράδειγμα των Πολυχαίτων της οικογένειας Nereidae *Hediste diversicolor* και *Platynereis dumerili*.

**THE BENTHIC COMMUNITY IN MAZOMA LAGOON OF
AMVRAKIKOS GULF****Tsiamis K., Protopapas N., and A. Nicolaidou***Department of Zoology-Marine Biology, M.Sc. in Oceanography, University of Athens,
Panepistimiopoli, Athens 15784*

Mazoma is a 3km² brackish water lagoon with a maximum depth of 1.5m, which communicates with the Amvrakikos Gulf through two openings. Benthic samples and physical and chemical measurements of water and sediment were carried out at 10 stations, bimonthly for one year. The bottom was muddy and in the east part of the lagoon it was covered by the seagrass *Zostera noltii* and the green alga *Chaetomorpha* sp. Physical and chemical conditions of water and sediment (temperature, salinity, dissolved oxygen, organic carbon) did not vary among stations, However, they presented seasonal fluctuations. Benthic fauna was typical of Mediterranean lagoons, the most dominant species being *Abra ovata*, *Hediste diversicolor* and *Mytilaster minimus*. The Multi Dimensional Scaling (MDS) revealed a diversification of the biological community from the west to the east part of the lagoon, which was due to the presence of marine plants. On the other hand, there was no obvious seasonal variability of the biological community, probably because of the constant reproduction of many species. The Shannon-Wiener diversity index and the Pielou Evenness index did not present statistically important differences among the stations. Finally, there were indications of competition between related species, for example between the two nereid polychaete species *Hediste diversicolor* and *Platynereis dumerili*.

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ
ΜΕΝΤΙΚΑΡΠΙΝΗΣ ΑΠΟ ΑΡΤΙΒΛΑΣΤΑ ΤΡΙΓΩΝΙΣΚΟΥ.
ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *IFS* ΚΑΙ *VR***

Τσίρη Δ.¹, Χήγου Ι.², Χαραλαμπίδης Κ.¹, Γκανή-Σπυροπούλου Κ.¹

¹Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Παν. Αθηνών ²Τομέας Φαρμακογνωσίας,
Φαρμακευτική Σχολή, Παν. Αθηνών

Η μεντικαρπίνη είναι ισοφλαβονοειδής φυτοαλεξίνη που παράγεται κυρίως από φυτά της οικογένειας Leguminosae, ως απόκριση βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων και προέρχεται από υδρόλυση των γλυκοζιτών ή γλυκοζιλικών εστέρων της. Στη ανακοίνωση αυτή αναφέρεται η παραγωγή ισοφλαβονοειδών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης αρτίβλαστων τριγωνίσκου (*Trigonella foenum-graecum* L.) σε φυσιολογικές συνθήκες ή μετά από επίδραση CuCl₂. Η ταυτοποίηση των ισοφλαβονοειδών που απομονώθηκαν έγινε με φασματοσκοπική ανάλυση (NMR, MS), ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός τους στις ρίζες και τα υπέργεια όργανα έγινε με RP-HPLC των εκχυλισμάτων τους. Σπέρματα τριγωνίσκου αναπτύχθηκαν για 4, 6, 8 και 11 ημέρες. Το κυριότερο ισοφλαβονοειδές των ριζών ήταν ο 3-Ο-γλυκοσίδης της μεντικαρπίνης (MG) ο οποίος αυξάνονταν σταδιακά, ενώ μετά από 11 ημέρες προσδιορίστηκε και μικρή ποσότητα μεντικαρπίνης (M). Αντίθετα τα υπέργεια όργανα δεν περιείχαν M ενώ η ποσότητα του MG ήταν πολύ μικρή. Επίδραση των ριζών αρτιβλάστων 6 ημερών με 0.5 mM CuCl₂ για 6, 12 και 24 h αλλά και με διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.1 mM, 0.5 mM, 1.0 mM) CuCl₂ για 24 h, προκάλεσε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του MG στις ρίζες με ταυτόχρονη αύξηση της M τόσο στις ρίζες όσο και στα υπέργεια τμήματα, ενώ παρατηρήθηκε μεγάλη ποσότητα μεντικαρπίνης και στο μέσο καλλιέργειας των φυτών. Παράλληλα παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή των ισοφλαβονοειδών, της ισοφλαβονικής συνθάσης (*IFS*) και της αναγωγάσης της βεστιτόνης (*VR*), επιβεβαιώνοντας την *de novo* σύνθεση της μεντικαρπίνης.

Το έργο συγχρηματοδοτείται στα πλαίσια του ΕΠΕΑΕΚ (πρόγραμμα «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ») από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και Εθνικούς πόρους.

**EFFECT OF COPPER CHLORIDE ON THE PRODUCTION OF
MEDICARPIN BY FENUGREEK SEEDLINGS. EXPRESSION OF
IFS AND *VR* GENES****Tsiri D.¹, Chinou I.², Haralampidis K.¹, Ganis-Spyropoulos C.¹**¹*Department of Botany, Faculty of Biology, Univ. of Athens*²*Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Univ. of Athens*

Medicarpin is an isoflavonoid phytoalexin produced mainly by plants of the Leguminosae family in response to biotic and abiotic elicitors from the hydrolysis products of the constitutive glucose and malonyl glucose conjugates. Here we report on the isoflavonoid production by fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seedlings during the course of growth and in response to CuCl₂. Isoflavonoid identification was performed by the NMR and MS of the purified compounds, while the quantitative determination was performed by RP-HPLC of the root or aerial part extracts. Fenugreek seeds were grown under aseptic conditions for 4, 6, 8 and 11 d in light. The major isoflavonoid in fenugreek roots was medicarpin 3-*O*-glucoside (MG) which increased during the course of seedling growth, while roots of 11-d-old seedling contained also small amount of free medicarpin (M). In contrast, the aerial parts did not contain any M, while the amount of MG was considerably lower than in the roots. Treatment of 6-d-old seedlings with 0.5 mM CuCl₂ for 6, 12 and 24 h or with different CuCl₂ concentrations (0.1, 0.5 and 1.0 mM) for 24 h, caused considerable decrease of MG in the roots and in parallel increase of M levels in the roots and aerial parts, while part of M was released in the seedling growth medium. The study of isoflavone synthase (*IFS*) and vestitone reductase (*VR*) expression, enzymes which catalyse the entry point to the isoflavonoid pathway and the penultimate step of medicarpin synthesis, respectively, by semi-quantitative RT-PCR, showed a significant increase of their transcripts, after 2 h of CuCl₂ treatment, confirming the de novo synthesis of medicarpin.

The project is co-financed within Op. Education by the ESF (European Social Fund) and National Resources

**ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΔΟΜΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΕΚ
ΤΩΝ ΥΣΤΕΡΩΝ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΑΠΟ
ΠΟΛΛΑΠΛΕΣ ΣΤΟΙΧΙΣΕΙΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ**

**Τσιρίγος Κ.Δ¹, Προμπονάς Β.Ι.^{1,2}, Μπάγκος Π.Γ.¹, Ροδάκης Γ.Κ.³
και Σ.Ι. Χαμόδρακας¹**

¹Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
15701 Αθήνα

²Τμήμα Βιολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κύπρου, 1678 Λευκωσία, Κύπρος

³Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
15701 Αθήνα

Από τις διαθέσιμες κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες τρισδιάστατες πρωτεϊνικές δομές, είναι εμφανές ότι η πρωτεϊνική δομή είναι περισσότερο συντηρημένη από την ακολουθία. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε σε σημαντική ώθηση στο πεδίο της πρόβλεψης (δευτεροταγούς) δομής πρωτεϊνών, με την ενσωμάτωση εξελικτικής πληροφορίας (όπως εμπεριέχεται σε πολλαπλές στοιχίσεις πρωτεϊνικών ακολουθιών) στα δεδομένα εισόδου αρκετών προγνωστικών μεθόδων. Στην εργασία αυτή, δείχνουμε ότι η εξελικτική πληροφορία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και εκ των υστέρων με επιτυχία για τη βελτίωση των προγνώσεων. Μελετήσαμε πρωτεϊνικές οικογένειες που ανήκουν στη σημαντική κατηγορία των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (OMP), που διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη με β-βαρέλια, και για τις οποίες είναι διαθέσιμα ελάχιστα δομικά δεδομένα σε ατομική διακριτικότητα. Χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο PRED-TMBB, η οποία πρόσφατα αναπτύχθηκε από την ομάδα μας, και προβλέπει με υψηλή ακρίβεια την τοπολογία των OMPs. Δύο πρωτεϊνικές οικογένειες, συγκεκριμένα οι πορίνες και οι βακτηριακοί μεταφορείς λιπαρών οξέων, με τουλάχιστον έναν αντιπρόσωπο με προσδιορισμένη δομή, βοήθησαν στην αξιολόγηση της μεθόδου. Ειδικότερα, χρησιμοποιήσαμε μόνο τις ακολουθίες οι οποίες συμπεριλαμβάνονται στις ημι-αυτόματα κατασκευασμένες στοιχίσεις της PFAM (18 και 23 ακολουθίες αντίστοιχα). Δείχνουμε ότι ορισμένα κοινά προβλήματα των προγνωστικών μεθόδων μπορούν να ξεπεραστούν χρησιμοποιώντας την κατά θέση συντήρηση και την κατανομή των κενών από πολλαπλές στοιχίσεις. Επιπλέον, δείχνουμε ότι ακόμη και όταν γίνει χρήση μιας πλήρως αυτοματοποιημένης στοιχίσης τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα.

Το έργο συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και Εθνικούς Πόρους (ΕΠΕΑΕΚ II) ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ I.

**ENHANCING THE PERFORMANCE OF PROTEIN STRUCTURE
PREDICTION METHODS BY INFORMATION ENCODED IN
MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENTS****Tsirigos K.D.¹, Promponas V.J.^{1,2}, Bagos P.G.¹, Rodakis G.C.³,
and S.J. Hamodrakas¹**¹*Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Athens, 157 01*²*Department of Biological Sciences, University of Cyprus, 1678 Nicosia, Cyprus*³*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of
Athens, Athens, 157 01*

From studies of experimentally solved protein structures, it is apparent that protein structure is much more conserved than the sequences themselves. This observation led towards a major boost in protein (secondary) structure prediction methods, with the incorporation of evolutionary information (as encoded in protein multiple sequence alignments) in the input of several prediction methods. In this work we demonstrate that evolutionary information may be successfully applied to post-process the results of prediction methods based on single sequence information in order to enhance their performance. We studied protein families belonging to the class of β -barrel outer membrane proteins (OMP) of Gram-negative bacteria, this class having just a few experimentally derived high-resolution three-dimensional structures available. We have also used PRED-TMBB, a well known method for topology prediction of β -barrel OMPs recently developed by our group. Two families of OMPs, namely the porins and the bacterial fatty acid transporters, with at least one of their members having a solved three-dimensional structure, have been used to establish and validate our methodology. In particular, we have only used those sequences present in the semi-automatically created PFAM seed alignments for the corresponding families, comprising 18 and 23 sequences respectively. We show that some common pitfalls of prediction methods may be resolved by using the positional conservation and gap distribution of multiple sequence alignments. Furthermore, we demonstrate that even when a fully automatic (CLUSTALW) multiple sequence alignment is used the results are comparable.

*The project is co-funded by the European Social Fund and National Resources –
(EPEAEK II) PYTHAGORAS I.*

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΕΡΙΚΟΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ
ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Ρ ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Zymomonas mobilis***

**Τσιτλαΐδου Μ.¹, Βουρεκάς Α.¹, Καλαβριζιώτη Δ.¹, Σταματοπούλου Β.¹,
Αφένδρα Α.², Δραΐνας Κ.³ και Δ. Δραΐνας¹**

*Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας¹, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Εργαστήριο Βιοχημείας³, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων*

Η ριβονουκλεάση Ρ (RNase P) είναι ένα πανταχού παρών ένζυμο, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενδονουκλεολυτική θραύση των πρόδρομων μεταγράφων tRNA προκειμένου να παραχθούν τα 5' ώριμα άκρα τους. Οι περισσότερες μορφές του ένζυμου είναι ριβονουκλεοπρωτεΐνες. Δραστικότητα RNase P έχει απομονωθεί από βακτήρια, αρχαία, ευκαρυωτικά, καθώς και από υποκυτταρικά οργανίδια. Η RNA υπομονάδα των βακτηρίων καθώς και η αντίστοιχη υπομονάδα από ορισμένα αρχαία παρουσιάζουν ενζυμική δραστικότητα *in vitro*, απουσία πρωτεΐνης σε υψηλές ιοντικές συνθήκες. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται για πρώτη φορά ο μερικός καθαρισμός και χαρακτηρισμός της ριβονουκλεάσης Ρ από το αιθανολοπαραγωγό βακτήριο *Zymomonas mobilis*. Το ένζυμο καθαρίστηκε με ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία και ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας έγινε παρουσία σημασμένου με ³²P προδρόμου μεταγραφήματος *in vitro* μορίου tRNA (ptRNA) του γονιδίου *supS1* του *Schizosaccharomyces pombe*. Το βέλτιστο pH και η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 8 και 37°C αντίστοιχα. Επίσης το ένζυμο δείχνει βέλτιστη δραστικότητα παρουσία 100 mM NH₄Cl και 25 mM MgCl₂. Πειράματα απενεργοποίησης με μικροκοκκική νουκλεάση και πρωτεΐνάση K έδειξαν ότι το ένζυμο για να δράσει απαιτεί την παρουσία πρωτεΐνης και RNA. Μετά από εκτεταμένη ανάλυση *in silico* εντοπίστηκαν δύο αλληλουχίες μεγέθους 500 nts και 462 nts, οι οποίες παρουσιάζουν ομολογία με την RNA και την πρωτεϊνική υπομονάδα της RNase P από το *Escherichia coli* αντίστοιχα. Τέλος μελετήθηκε η επίδραση αναστολέων της πρωτεϊνικής σύνθεσης όπως η νεομυκίνη, η πουρομυκίνη, η σπιραμυκίνη και το φουσιδικό οξύ, τα οποία επιλέχθηκαν λόγω της ικανότητάς τους να προσδένονται στο RNA. Μεταξύ των προαναφερθέντων αντιβιοτικών που μελετήθηκαν η σπιραμυκίνη και το φουσιδικό οξύ έδειξαν ότι ενεργοποιούν την ενζυμική δραστικότητα της RNase P από το *Zymomonas mobilis*, αντίθετα η νεομυκίνη και η πουρομυκίνη την αναστέλλουν.

**ISOLATION AND PARTIAL PURIFICATION OF
RIBONUCLEASE P FROM THE BACTERIUM *Zymomonas mobilis*****Tsitlaidou M.¹, Vourekas A.¹, Kalavrizioti D.¹, Stamatopoulou V.¹,
Afendra A.², Drainas C.³, and D. Drainas¹**

Department of Biochemistry¹, School of Medicine, University of Patras
Department of Biological Applications and Technologies², University of Ioannina
Laboratory of Biochemistry³, Department of Chemistry, University of Ioannina

Ribonuclease P (RNase P) is an ubiquitous enzyme that endonucleolytically cleaves all precursor tRNA transcripts to produce the mature 5' ends. Most forms of RNase P enzymes are ribonucleoproteins. RNase P activity has been identified in bacteria, archaea, and eucarya and in subcellular organelles. *In vitro*, the RNA subunit of the bacteria as well as the relevant subunit of some archaea is catalytically active in the absence of protein at high ionic conditions. Here we report for the first time, the partial purification and characterisation of RNase P from the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis*. The enzyme was purified with anion exchange chromatography. The substrate for RNase P assays was an *in vitro* ³²P labeled transcript of the *Schizosaccharomyces pombe* tRNA^{Ser} gene *supS1*. pH and temperature optima for the enzyme activity are 8 and 37°C respectively. The enzyme shows optimal activity in the presence of 100 mM NH₄Cl and 25 mM MgCl₂. Inhibition of *Zymomonas mobilis* RNase P by proteinase K and micrococcal nuclease strongly indicates that the activity requires both protein and RNA components. Extensive *in silico* analysis revealed two sequences 500 nts and 462 nts, which cluster with the RNA and the protein subunit of RNase P from *Escherichia coli* respectively. Furthermore, we have studied the effect of some protein synthesis inhibitors such as neomycin, puromycin, spiramycin and fucidic acid, which were selected due to their ability to bind to RNA. Among the aforementioned antibiotics spiramycin and fucidic acid activated the RNase P activity from *Zymomonas mobilis* on the contrary the enzyme is inhibited by neomycin and puromycin.

ACHILLES, ΕΝΑ ΝΕΟ ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΟ ΜΕ ΠΡΟΤΙΜΗΣΗ ΣΤΟ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

**Τσουμάνη Κ.¹, Κακάνη Ε.¹, Γαριού-Παπαλεξίου Α.², Μπούρτζης Κ.³,
Ζαχαροπούλου Α.² και Κ. Ματθιόπουλος¹**

¹Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Παν/μιο Θεσσαλίας, Λάρισα

²Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα

³Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Αργίτιο

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, θεωρείται το πιο επιβλαβές έντομο των ελαιοκαλλιέργειών. Ο έλεγχος του παρασίτου περιορίζεται στη χρήση χημικών εντομοκτόνων. Η εξερεύνηση εναλλακτικών τεχνικών καταπολέμησής του δυσχεραίνεται από την απουσία βασικών μοριακών και γενετικών δεδομένων. Η ανίχνευση του φυλοκαθορισμού στο δάκο, μπορεί να συνεισφέρει στη βελτιστοποίηση των μεθόδων βιολογικού ελέγχου του εντόμου που βασίζονται στην απελευθέρωση στείρων αρσενικών ατόμων. Ο φυλοκαθορισμός στα *Tephritidae* οφείλεται στο Υ χρωμόσωμα. Η απομόνωση και ανάλυση Υ-ειδικών κλώνων θα μπορούσε να δώσει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη δομή και την οργάνωση του Υ χρωμοσώματος καθώς και να αποκαλύψει τον παράγοντα γονιμότητας που βρίσκεται στο χρωμόσωμα αυτό. Οι ίδιοι οι κλώνοι επίσης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την μοριακή διάγνωση του φύλου του δάκου ή ως Υ-ειδικοί δείκτες σε πληθυσμιακές αναλύσεις. Το μικρό, συγκριτικά, μέγεθος του Υ χρωμοσώματος και η μεγάλη του διαφορά από τα υπόλοιπα χρωμοσώματα του εντόμου έδωσε τη δυνατότητα διαχωρισμού του σε ηλεκτροφόρηση παλμικού πεδίου (PFGE). Το απομονωμένο από το gel ηλεκτροφόρησης Υ-DNA αποτέλεσε πρώτη ύλη για την κατασκευή Υ-ειδικών βιβλιοθηκών. Στη συνέχεια, έγινε παράλληλη διαλογή των βιβλιοθηκών αυτών με ανιχνευτές γενωμικό DNA από θηλυκά και αρσενικά άτομα ώστε να απομονωθούν κλώνοι που υβριδοποιούνταν κατά προτίμηση με ανιχνευτή το DNA αρσενικών ατόμων. Ο κλώνος που εμφάνισε τη μεγαλύτερη διαφορά έντασης σήματος στην υβριδοποίηση επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση. Ο προσδιορισμός της DNA αλληλουχίας του έδειξε ότι υπάρχει ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο με μεγάλη ομοιότητα με τις τραπεζοζάσες gag των ρετρομεταθετών στοιχείων της οικογένειας *BEL-Pao*, καθώς και ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο ανοδικά της gag με χαρακτηριστικές περιοχές δακτύλων ψευδαργύρου. Το δυνητικό αυτό ρετρομεταθετό στοιχείο το ονομάσαμε *Achilles*. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο *Achilles* εμφανίζει στατιστικά σημαντική ομοιότητα και με το ρετρομεταθετό στοιχείο *MAX* της *Drosophila melanogaster* που ανακαλύφθηκε πρόσφατα. Το στοιχείο αυτό εντοπίζεται στις ετεροχρωματινικές περιοχές των αυτοσωμάτων ενώ είναι διάσπαρτο στο Υ χρωμόσωμα.

**ACHILLES, A NEW RETROTRANSPOSON OF THE OLIVE FLY
WITH Y-CHROMOSOME PREFERENCE****Tsoumani K.¹, Kakani E.¹, Gariou-Papalexiou A.², Bourtzis K.³,
Zacharopoulou A.², and K. Mathiopoulos¹**¹Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa²Department of Biology, University of Patras, Patras³Department of Environmental and Natural Resources Management, University of
Ioannina, Agrinio

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is the single most important pest of the olive fruit. Its control is based on the use of chemical pesticides. The search for new methods of biological control for the fly is limited by the lack of basic molecular and genetic data. Understanding the basis of sex determination in this insect could contribute to control methods that are based on the release of sterilized male insects. Sex determination in Tephritidae depends on the presence of the Y chromosome. The isolation and analysis of Y-specific clones could provide useful information on the structure and organization of the chromosome, as it could disclose the maleness factor that lies on it. Such clones could also be used in molecular diagnosis of sex or as male-specific markers in population analyses. The relatively small size of the Y chromosome and its large difference from the other chromosomes of the insect gave us the opportunity to isolate it in a pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Subsequently, Y-enriched DNA from the PFGE was used as starting material in order to construct partial Y-specific libraries. Screening of these libraries with male and female genomic DNA as probes, yielded several clones with differential preference towards the male DNA. The clone with the largest such difference was chosen for further study. Sequencing analysis showed the presence of a gag-like ORF with significant similarity to the *BEL-Pao* family of retrotransposons, as well as an ORF upstream of the gag gene, which possessed characteristic zinc fingers. This putative retrotransposon we named *Achilles*. It is worth mentioning that *Achilles* shows significant similarity to the *MAX* retrotransposon of *Drosophila melanogaster* that was recently discovered. *MAX* is localized in the heterochromatin of all autosomes and is abundant on the Y chromosome.

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΟΥ *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) ΣΕ
ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΣΕ 12
ΛΙΜΝΕΣ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ**

**Τσουμάνη Μ.¹, Λιάσκο Ρ.¹, Μουτσάκη Π.¹, Κάγκαλου Ι.¹,
Παπαλουκάς Κ.² και Ι. Λεονάρδος¹**

¹Εργαστήριο Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων, 45 500 Ιωάννινα

²Εργαστήριο Βιοπληροφορικής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45 500 Ιωάννινα

Στην παρούσα μελέτη διερευνάται η επίδραση του τροφικού χαρακτήρα των λιμνών στην αύξηση του παμφάγου, αλλόχθονου κυπρινοειδούς *Carassius gibelio* (πεταλούδα). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δείχνουν ότι οι σχέσεις αυτές συνδέονται μεταξύ τους με γραμμική παλινδρόμηση και η παράμετρος b αυτών κυμαίνεται από 2,33 έως 3,38. Οι τιμές του b είναι υψηλότερες στις oligότροφες και mesότροφες λίμνες και κυμαίνονται από 3,25 έως 3,28. Στις εύτροφες κυμαίνονται από 2,72 έως 3,06 ενώ στις μικρές και ρηχές εύτροφες έως υπερεύτροφες λίμνες που συχνά παρατηρούνται φαινόμενα μαζικών θανάτων, οι τιμές του b κυμαίνονται από 2,33 έως 2,58. Οι τιμές του b που προέκυψαν από τις εξισώσεις μήκους-βάρους για κάθε λίμνη συσχετίστηκαν στην συνέχεια με τις μέσες ετήσιες συγκεντρώσεις των ορθοφωσφορικών (PO_4-P), οι οποίες είναι ενδεικτικές της τροφικής κατάστασης των λιμνών. Η σχέση που τις συνδέει είναι λογαριθμική και εκφράζεται από την εξίσωση $b=1,37-0,13\log(PO_4-P)$ ($r^2>0,44$, $P=0.02$). Από τη σχέση αυτή προκύπτει ότι οι τιμές της παραμέτρου b μειώνονται όσο αυξάνεται η τροφική κατάσταση των λιμνών.

STUDY OF *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) GROWTH IN RELATION TO ENVIRONMENTAL EFFECT IN 12 GREEK LAKES**Tsoumani M.¹, Liasko R.¹, Moutsaki P.¹, Kagalou I.¹, Papaloukas K.², and I. Leonardos¹**

¹Laboratory of Zoology, Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina, 45110 Greece.

² Laboratory of Bioinformatics, Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina, 45110 Greece.

In the present study, the influence of the trophic state of the lakes in the growth of the omnivore alien cyprinidae *Carassius gibelio* (Prussian carp) was examined. The length-weight relationship was studied in 12 Greek lakes. The relationship was found to be linear and b value ranged from 2.33 to 3.38. The b values were higher in oligotrophic to mesotrophic lakes and ranged from 3.25 to 3.28. In eutrophic lakes, b value ranged from 2.72 to 3.06 while in small and shallow eutrophic to hypertrophic lakes, where fish death phenomenon is common, b values ranged from 2.33 to 2.58. The b values, estimated from the length-weight equations for each lake, were subsequently correlated with the annual average concentrations of PO₄-P for each lake; these values being indicative of the trophic state of a lake. The relationship was logarithmic and was expressed by the equation $b=1,37-0,13\log(\text{PO}_4\text{-P})$ ($r^2>0,44$, $P=0.02$). This relationship suggests that the lower the b value is the more eutrophic is the state of a lake.

**ΟΔΟΝΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ
ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΜΕΤΡΙΚΑ ΟΔΟΝΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΕ
ΕΝΑ ΝΕΚΡΟΤΑΦΕΙΟ ΤΗΣ ΑΡΧΑΙΑΣ ΚΟΡΙΝΘΟΥ**

**Φουντουλάκης Γ.Ε., Αθανασίου Ε.Ι., Μαλούχου-Γκρίμπα Β.
και Σ.Κ. Μανώλης**

*Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Ε. & Κ. Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη, 157 84, Αθήνα. E-mail: smanol@biol.uoa.gr*

Η διερεύνηση και αποτίμηση της υγείας καθώς και η σχέση της με τη θνησιμότητα έχει απασχολήσει κατ' επανάληψη τους ανθρωπολόγους σε μελέτες παρελθόντων πληθυσμών. Οι δείκτες του συστηματικού στρες, όπως αυτοί αποτυπώνονται πάνω στα οστά, αποτελούν μια σημαντικότερη πηγή πληροφοριών η οποία οδηγεί στην αναπαράσταση της υγείας των παλαιότερων πληθυσμών. Ο όρος στρες έχει αποδοθεί στην στερεοτυπική απόκριση της φυσιολογία ενός οργανισμού απέναντι στις δυσμενείς περιβαλλοντικές επιδράσεις. Ωστόσο τόσο η επίδραση των βλαπτικών αιτιών όσο και η απόκριση αυτή είναι μη ειδικές. Για το λόγο αυτό, ολοένα και μεγαλύτερη προσπάθεια γίνεται για την επιστημονική μελέτη και καταγραφή αυτών των μη ειδικών δεικτών ύπαρξης στρες στους πληθυσμούς. Ένας τέτοιος δείκτης είναι και οι υποπλασίες αδαμαντίνης. Τα μετρικά χαρακτηριστικά των δοντιών καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από γενετικούς παράγοντες και επηρεάζονται από τις επιδράσεις του περιβάλλοντος. Για το λόγο αυτό δίνουν πληθώρα στοιχείων για την κατανόηση πιθανών σχέσεων και διαφορών μεταξύ των πληθυσμών. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα μετρικά χαρακτηριστικών των δοντιών καθώς και οι υποπλασίες της αδαμαντίνης ώστε να γίνει δυνατή η ανασύσταση των επιπτώσεων του περιβαλλοντικού στρες, σε ένα πληθυσμό της αρχαίας Κορίνθου, (νεκροταφείο ιδιοκτησίας Σούκουλη), καθώς και η σύγκρισή του με άλλα πληθυσμιακά σύνολα.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το Πρόγραμμα «Καποδίστριας» του Ειδικού Λογαριασμού Κονδυλίων Έρευνας (Επιτροπή Ερευνών, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών)

**DENTAL INDICATORS OF SYSTEMIC PHYSIOLOGICAL STRESS
AND DENTAL METRIC TRAITS IN A ANCIENT CORINTHIAN
CEMETERY****Fountoulakis G.E., Athanassiou E.I., Malouchou-Grimba V.,
and S.K. Manolis**

*Dept of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, National & Kapodistrian
University of Athens, Panepistimiopolis 15784, Athens-Greece.
E-mail: smanol@biol.uoa.gr*

The evaluation of the health status of ancient populations has long been of major concern to biological anthropologists. Indicators of general metabolic stress represent an important source of data for the reconstruction of ancient health status. Stress has been defined as a stereotypic physiological reaction to environmental insult. One result of severe stress is growth disruption. However, the influence of pathogens and individuals responses to them is often unspecific. Thus, more and more scientific research has recently focused on the analysis of non specific stress indicators, especially on the epidemiology of enamel hypoplasias. Tooth crown measurements are traits induced in major extend by genetic factors modulated by environmental influences. Thus, are widely used in numerous studies comparing similarities and differences among populations. The study consists of recording metric dental traits and enamel hypoplasia frequencies which gives us the opportunity to evaluate the health status of the ancient Corinthian population, (Soukouli's property), while dental metric data contribute to the comparison with other population samples.

*This work is funded by the Programme "Kapodistrias" of the Special Research Account
(National & Kapodistrian University of Athens)*

**ΕΠΑΓΩΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΤΙΔΑΣ
ΣΤΟΝ ΠΟΝΤΙΚΟ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ
ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ**

**Φραγκοπούλου Α., Χατζηϊωάννου Κ., Παπασιδέρη Ι.¹,
Μαργαρίτης Α.Χ.¹, Λυμπέρη Π.**

*Εργαστήριο Ανοσολογίας, Τμήμα Βιοχημείας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, 11521.
¹Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστημιούπολη, 15784*

Η πειραματική αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (EAT) μιμείται τη θυρεοειδίτιδα Hashimoto στον άνθρωπο (μια οργανοειδική αυτοάνοση νόσο) και επάγεται μετά από ανοσοποίηση πειραματοζώων είτε με ολόκληρο το μόριο της θυρεοσφαιρίνης (Tg), είτε με πεπτιδιά της, τα οποία φέρουν T-επιτόπους. Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έχει βρεθεί ότι το 20πεπτιδίο της ανθρώπινης Tg (hTg) p2340 (αα2340-2359), με τα άκρα του δεσμευμένα με μια ακετυλομάδα και μια αμινομάδα, είναι παθογονικό στη φυλή AKR/J ποντικών (απλοτύπου H-2^k), ύστερα από ανοσοποίηση των ποντικών με 200 ή 100 nmol πεπτιδίου. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των παθογονικών ιδιοτήτων του πεπτιδίου, με τα άκρα του είτε δεσμευμένα είτε ελεύθερα, σε χαμηλότερη δόση (50 nmol). Για τον σκοπό αυτό έγινε προσπάθεια εύρεσης των άριστων συνθηκών για την παρασκευή ιστολογικών τομών θυρεοειδούς αδένων ποντικών. Έξι ποντίκια AKR/J ανοσοποιήθηκαν υποδορίως με 50 nmol p2340 -με ελεύθερα άκρα- σε πλήρες ανοσοενισχυτικό έκδοχο του Freund (CFA) και 4 ποντίκια της ίδιας φυλής με 50 nmol πεπτιδίου -με δεσμευμένα άκρα- σε CFA. Τρεις εβδομάδες αργότερα έγινε αναμνηστική χορήγηση με τη μισή δόση σε ατελές FA και σε 2 εβδομάδες έγινε λήψη των αδένων. Για την ιστολογική μελέτη τους και τον προσδιορισμό του βαθμού διήθησης εφαρμόστηκε μια σειρά από πρωτόκολλα, όπως έγκλειση των ιστών σε OCT και παραφίνη και τομές σε κρυοτόμο και μικροτόμο αντίστοιχα, με τη δεύτερη να δίνει καλύτερη εικόνα της δομής και της συνοχής των θυλακίων του αδένου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το πεπτιδίο p2340 είναι επίσης παθογονικό στην ποσότητα των 50 nmol, τόσο με δεσμευμένα άκρα (3/6 ποντίκια παρουσίασαν διήθηση του αδένου), όσο και με ελεύθερα (1/4 ποντίκια).

**INDUCTION OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE THYROIDITIS
IN THE MOUSE AND HISTOLOGICAL STUDY OF THYROID
GLANDS****Fragopoulou A., Hadjiioannou K., Papasideri I.¹, Margaritis L.H.¹,
Lymberi P.***Immunology Lab, Department of Biochemistry, Hellenic Pasteur Institute, Athens, 11521.**¹Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis, 15784*

Experimental Autoimmune Thyroiditis (EAT) resembles Hashimoto's thyroiditis (HT) in humans (an organ-specific autoimmune disease) and is induced in animals by immunization with thyroglobulin (Tg) or Tg-peptides bearing T-cell epitopes. In previous studies of our laboratory it has been found that the human Tg (hTg) 20mer peptide p2340 (aa 2340-2359) with its terminal ends blocked (with an amino and an acetyl group), is pathogenic to the AKR/J strain of mice (H-2^k haplotype), after administration of 200 or 100 nmol of peptide. The present study aimed at the investigation of the pathogenicity of p2340, with its terminal ends either blocked or unblocked, at a lower dose (50 nmol). For the achievement of this goal, many protocols were applied, in order to determine the optimal conditions for the preparation of histological sections of mouse thyroid gland. Six AKR/J mice were immunized with 50 nmol of p2340, unblocked, and four mice with 50 nmol of p2340, blocked, in Complete Freund's Adjuvant (CFA). Three weeks later, mice were boosted with half the immunizing dose in incomplete FA. Two weeks later, thyroids were removed. The infiltration index was estimated via the application of various protocols, such as OCT and paraffin embedding of the tissue and dissection at cryostat and microtome respectively, with the second technique being more precise as far as the structure and the cohesion of the thyroid follicles is concerned. The results indicate that p2340 peptide is pathogenic at the concentration of 50 nmol, either in its blocked (3/ 6 mice showed thyroid infiltration), or in its unblocked form (1/ 4 mice).

ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΣ ΠΥΡΕΤΟΣ: ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΟΝ ΚΡΗΤΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

Φραγκούλη Ε.¹, Ηλιόπουλος Η.², Γαλανάκης Ε.³, Κρητικός Η.⁴, Σιδηρόπουλος Π.⁴, Aksentijevich I.⁵, Μπούμπας Δ.Τ.^{1,4} και Γ. Ν. Γουλιέλμος¹

¹Εργαστήριο Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 715 00 Ηράκλειο,
²Εργαστήριο Γενετικής, Τομέας Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο
Αθηνών, ³Κλινική Παιδιατρικής, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου, ⁴Κλινική
Ρευματολογίας, Κλινικής Ανοσολογίας και Αλλεργιολογίας, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο
Ηρακλείου, ⁵ Genetics Section, Arthritis and Rheumatism Branch, National Institute of
Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, Bethesda, USA

Ο οικογενής μεσογειακός πυρετός αποτελεί το πρότυπο νόσημα μιας κατηγορίας νοσημάτων που αναφέρονται ως κληρονομούμενοι υποτροπιάζοντες πυρετοί ή αυτοφλεγμονώδη νοσήματα. Μεταβιβάζεται σύμφωνα με το αυτοσωμικό υπολειπόμενο πρότυπο κληρονομησης. Το υπεύθυνο για τη νόσο γονίδιο ονομάζεται *MEFV* και κωδικοποιεί την πυρίνη, μια πρωτεΐνη 781 αμινοξέων. Ο οικογενής μεσογειακός πυρετός προσβάλλει με αυξημένη συχνότητα εθνικές ομάδες όπως είναι οι Non Ashkenazi Εβραίοι, οι Αρμένιοι, οι Άραβες και οι Τούρκοι, με τις μεταλλαγές M694V, V726A, M694I, M680I and E148Q να ανευρίσκονται στο 74% των ασθενών. Αν και δεν είναι γνωστός ο επιπολασμός της νόσου, ο ελληνικός πληθυσμός θεωρείται «ενδιάμεσου κινδύνου», με τις πλέον διαδεδομένες μεταλλαγές να εδράζονται στα εξόνια 2 και 10. Προκαταρκτικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η επίπτωση της νόσου είναι αυξημένη στην Κρήτη. Μελετήθηκε το φάσμα των μεταλλαγών του γονιδίου *MEFV* σε 34 ασθενείς από την Κρήτη, εστιάζοντας στις πλέον συχνές από αυτές. Σε 29 ασθενείς εντοπίστηκε τουλάχιστο μια μεταλλαγή, ενώ 5 από αυτούς δεν έφεραν καμία από τις 12 μεταλλαγές που ελέγχθηκαν. Οι μεταλλαγές που ανιχνεύθηκαν ήταν αυτές που χαρακτηρίζονται ως οι πλέον συνήθεις σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου, με την μεταλλαγή M694V να εμφανίζει τον υψηλότερο βαθμό διεισδυτικότητας. Επίσης, αποκαλύφθηκε η ύπαρξη τόσον απλών όσο και σύνθετων ετεροζυγωτών. Σε μια προσπάθεια να ερμηνευτεί η συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ γονοτύπων των ασθενών και κλινικών εκδηλώσεων της νόσου, κατασκευάστηκε ένα τρισδιάστατο μοντέλο της δομικής περιοχής PRYSPRY της πυρίνης. Ως γνωστό, οι περισσότερες από τις γνωστές μεταλλαγές του *MEFV* βρίσκονται σ' αυτή την περιοχή. Ακολούθησε ταξινόμηση των μεταλλαγών ανάλογα με τη βαρύτητα της νόσου και τοποθέτηση αυτών πάνω στο τρισδιάστατο μοντέλο. Ακόμα, μια νέα παθάνη μεταλλαγή που βρέθηκε για πρώτη φορά σε έναν ασθενή, η S702C, τοποθετήθηκε επίσης πάνω στο μοντέλο αυτό. Η PRYSPRY δομική ενότητα της πυρίνης σχηματίζεται από δυο β-πτυχωτές επιφάνειες και περιέχει μια επιμήκη υδρόφοβη εσοχή. Οι μεταλλαγές που συνδέονται με σοβαρά συμπτώματα είναι διάσπαρτες στο χείλος της εσοχής ενώ αυτές που δεν συσχετίστηκαν με σοβαρή κλινική εικόνα εδράζονται σε β-βρόχους μακριά από το κύριο σημείο αναγνώρισης.

**FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER (FMF): A GENETIC AND
BIOCHEMICAL APPROACH OF THE DISEASE IN CRETAN
POPULATION****Fragouli E.¹, Eliopoulos E.², Galanakis E.³, Kritikos H.⁴, Sidiropoulos
P.⁴, Aksentijevich I.⁵, Boumpas D.T.^{1,4}, and G.N. Goulielmos¹**

¹Department of Internal Medicine, School of Health Sciences, University of Crete, Heraklion, ²Laboratory of Genetics, Department of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens, ³Department of Paediatrics, University Hospital of Heraklion, ⁴Department of Rheumatology, Clinical Immunology and Allergy, University Hospital of Heraklion, ⁵Genetics Section, Arthritis and Rheumatism Branch, National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, Bethesda, USA.

FMF is a prototype of a group of diseases referred to as hereditary recurrent fevers or autoinflammatory diseases. It is inherited in an autosomic recessive manner. The gene responsible for the FMF is *MEFV* and encodes for the pyrin protein. FMF is common among Non Ashkenazi Jewish, Armenians, Arabs and Turks, where 5 mutations, M694V, V726A, M694I, M680I and E148Q, account for the 74% of FMF chromosomes. In not at risk populations, individual mutations are preferentially identified. Although the exact prevalence is not yet known, Greeks are considered to be at "intermediate risk" with the most prevalent mutations localized in exons 2 and 10. The incidence of FMF in Greece seems to be higher in the island of Crete. The spectrum of *MEFV* gene mutations in 34 patients from Crete was studied by performing a molecular analysis focused on the most frequent mutations identified so far. Among these FMF patients, 29 had at least one mutation. No mutations were detected in 5 patients. Common mutations were found in patients under examination as in high risk populations, with the M694V being the most penetrant. Heterozygotes, unexpectedly, appear with severe clinical manifestations and, moreover, complex genotypes also seem to exist. Aiming to correlate specific genotypes and clinical manifestations of the disease, from the structural point of view, we constructed a three-dimensional model (3-D model) of the PRYSPRY domain of pyrin. The majority of the known *MEFV* mutations located on this domain have been classified, according to the disease severity caused, and localized on this 3-D model. One novel putative missense mutation, S702C, was identified in exon 10 of the *MEFV* gene and located on the constructed 3-D model. The PRYSPRY pyrin globular domain is formed by a beta sandwich and contains an elongated hydrophobic cavity. Mutations causing severe effects are spread on the rim of the cavity while mutations with no severe effects are localized on loops away from the major recognition site.

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΟΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΑΥΤΟΤΕΛΩΝ
ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΣΕ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΕΝΑ
ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ**

Φρούσιος Κ.Κ., Λίτου Ζ.Ι. και Σ.Ι. Χαμόδρακας

*Τομέας Κυτταρικής Βιολογίας και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Αθήνα 157 01*

Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που διαπερνούν τη μεμβράνη μόνο μια φορά, αποτελούνται συνήθως και από μια αμινο- ή καρβοξυ-τελική ουρά (ή και τις δύο) με σημαντικό μήκος. Διακρίνονται δύο βασικοί τύποι διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με βάση τη διαμεμβρανική περιοχή σε σχέση με τη μεμβράνη στην οποία βρίσκονται: Ως τύπου I αναφέρονται οι πρωτεΐνες που έχουν το αμινοτελικό τους τμήμα στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) του κυττάρου ή στον εξωκυτταρικό χώρο και το καρβοξυτελικό τους τμήμα εντός του κυτταροπλάσματος, ενώ οι πρωτεΐνες τύπου II έχουν τον ακριβώς αντίθετο προσανατολισμό, με το αμινοτελικό τους τμήμα εντός του κυτταροπλάσματος και το καρβοξυλικό τους τμήμα στον εξωκυτταρικό χώρο ή τον αυλό του ΕΔ. Αυτοτελή δομικά και λειτουργικά τμήματα (structural and functional domains) εντοπίζονται κυρίως στις υδατοδιαλυτές ουρές, αν και τα διαμεμβρανικά τμήματα συμμετέχουν στον σχηματισμό ορισμένων domain. Μερικά domains των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με ένα διαμεμβρανικό τμήμα είναι ειδικά για αυτή την ομάδα πρωτεϊνών, ενώ άλλα είναι κοινά με τις σφαιρικές πρωτεΐνες. Σκοπός της εργασίας μας είναι η ανάλυση της αρχιτεκτονικής αυτών των domains διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με ένα διαμεμβρανικό τμήμα σε τρία επίπεδα: Πρώτος στόχος μας είναι η ανεύρεση πιθανών διαφορών μεταξύ των πρωτεϊνών τύπου I και τύπου II, με ενδεχόμενη χρήση της πληροφορίας στην πρόγνωση των πρωτεϊνικών τύπων. Δεύτερος στόχος είναι η ανεύρεση domains που εντοπίζονται σταθερά στη μία εκ των δύο πλευρών της μεμβράνης, κάτι που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στην πρόγνωση της τοπολογίας διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Τέλος, συγκρίνουμε τα domains των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με ένα διαμεμβρανικό τμήμα με αυτά των σφαιρικών πρωτεϊνών. Αυτό θα μπορούσε να βοηθήσει στη βελτίωση των αλγορίθμων πρόγνωσης, ώστε να διαχωρίζουν σαφέστερα τις σφαιρικές από τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες.

**DOMAIN ANALYSIS OF SINGLE-SPANNING TRANSMEMBRANE
PROTEINS****Frousios K.K., Litou Z.I., and S.J. Hamodrakas***Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Athens 157 01*

Single-spanning transmembrane proteins consist of one transmembrane region and usually a N-terminal or C-terminal tail (or both) of considerable length. There are two types of single-spanning proteins, based on their orientation with respect to the membrane in which they are embedded: Type I refers to proteins with their N-terminal in the lumen or extracellular space and their C-terminal in the cytosol, whereas type II proteins have the opposite orientation, ie. with their N-terminal into cytosol and their C-terminal in the lumen or extracellular space. Structural or functional domains usually reside mainly on the soluble tails, although the membrane-spanning regions also take part in the formation of certain domains. Some of them are exclusively found on single-spanning proteins, while others are common between single-spanning membrane proteins and soluble proteins. In our study, we attempt to analyze the similarities and differences in domain architecture of single-spanning membrane proteins for three reasons: The first goal is to find possible differences between the domains found on type I and type II proteins, with potential use of this information in the prediction of protein types. Secondly, we aim at finding domains that are consistently and exclusively found on either side of the membrane, which could be used for the prediction of membrane protein topology. Finally, the domains of single-spanning proteins are compared with domains found on soluble proteins. This could be used for further improvement of prediction algorithms, in order to report correctly single-spanning and soluble proteins.

Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ BRI2 ΡΥΘΜΙΖΕΙ ΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΗΣ APP ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΩΝΤΑΣ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗΝ BACE1

Φωτεινοπούλου Α., Τσαχάκη Μ., Βλαβάκη Μ., Μαρούλη Ε., Rostagno
Α.¹, Frangione B.¹, Ghiso J.¹, Ευθυμίου Σ.

Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 157 84
Πανεπιστήμιοπολης, Ιλίσια, Ελλάδα ¹Departments of Pathology and Psychiatry, New York
University School of Medicine, 550 First Avenue, TH-432, New York, NY 10016, USA

Οι οικογενείς άνοιες τύπου Βρετανίας (Familial British, FBD) και Δανίας (Danish, FDD) είναι δύο αυτοσωμικές κυρίαρχες νευροεκφυλιστικές ασθένειες που σχετίζονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο της BRI2. Αυτές οι μεταλλάξεις είναι μια σημειακή μετάλλαξη στο κωδικόνιο λήξης και ένας διπλασιασμός πριν από το κωδικόνιο λήξης που οδηγούν σε μια πρωτεΐνη με δέκα επιπλέον αμινοξέα και στην απελευθέρωση μετά από πρωτεόλυση των αμυλοειδογενικών πεπτιδίων ABri και ADan, αντίστοιχα. Η νόσος Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) είναι η πιο κοινή μορφή αμυλοειδωσης στους ανθρώπους και η κύρια αιτία άνοιας. Οι αμυλοειδικές πλάκες και η εναπόθεση του αμυλοειδούς στα τοιχώματα των αγγείων του εγκεφάλου στην AD αποτελούνται κυρίως από αμυλοειδική β πρωτεΐνη (Αβ). Έχει προταθεί ότι η εναπόθεση των αμυλοειδογενικών πεπτιδίων ADan, ABri ή Αβ στον εγκεφαλο οδηγεί στην νευρωνική βλάβη που παρατηρείται στις FDD, FBD ή AD. Υπάρχουν σημαντικές νευροπαθολογικές ομοιότητες μεταξύ της νόσου Alzheimer και των FBD/FDD. Αυτές συμπεριλαμβάνουν αμυλοειδικές πλάκες στο παρέγχυμα του εγκεφάλου και εναπόθεση αμυλοειδούς στα τοιχώματα των αγγείων καθώς επίσης και προ-αμυλοειδικές βλάβες που συνοδεύονται από ενεργοποίηση των αστροκυττάρων. Επιπλέον, τα νευροϊνιδιακά δεμάτια στην AD είναι ακριβώς όμοια με αυτά που παρατηρούνται στις FBD/FDD. Είναι αξιοσημείωτο ότι στους ασθενείς με FDD, Αβ μερικές φορές συν-εναποτίθεται με το πεπτίδιο ADan, γεγονός που δεν παρατηρείται στην FBD. Οι νευροπαθολογικές ομοιότητες μεταξύ της νόσου Alzheimer και FBD ή FDD μας οδήγησε στο να ερευνήσουμε κατά πόσο η BRI2 αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην νόσο Alzheimer. Αποκτήσαμε δεδομένα που δείχνουν ότι υπάρχει ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ της BRI2 και της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (Amyloid Precursor Protein, APP) ή την BACE 1 (β-εκκριτάση που εμπλέκεται στην πρωτεόλυση της APP). Επίσης βρήκαμε ότι η BRI2 ρυθμίζει τον μεταβολισμό της APP, ειδικά αυξάνοντας τα κυτταρικά επίπεδα της APP και διαμεμβρανικών καρβοξυτελικών τμημάτων της. Βρήκαμε επίσης ότι η έκφραση της BRI2 αναστέλλει έντονα την έκκριση της APP και των πεπτιδίων Αβ που συσσωρεύονται στους εγκεφάλους των ασθενών με νόσο Alzheimer. Ο καθορισμός των μοριακών μονοπατιών που επηρεάζονται από την ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ BRI2 και APP ή BACE 1 μπορεί να οδηγήσει στην αναγνώριση κοινών θεραπευτικών στόχων για αυτές τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Αυτή η έρευνα χρηματοδοτήθηκε από τα προγράμματα του υπουργείου Παιδείας «Πυθαγόρας I & II», του Πανεπιστημίου Αθηνών «Καποδίστριας» και της Ευρωπαϊκής ένωσης «APOPIΣ».

BRI2 REGULATES APP PROCESSING BY INTERACTING AND DESTABILIZING BACE1**Fotinopoulou A., Tsachaki M., Vlavaki M., Rostagno A.¹, Frangione B.¹, Ghiso J.¹, Efthimiopoulos S.**

Department of Biology, Division of Animal and Human Physiology, University of Athens, 157 84 Panepistimiopolis, Ilisia, Greece ¹Departments of Pathology and Psychiatry, New York University School of Medicine, 550 First Avenue, TH-432, New York, NY 10016, USA

Familial British (FBD) and Danish (FDD) dementias are two autosomal dominant neurodegenerative disorders associated with mutations of the BRI2 gene. These mutations are a stop codon mutation and a decamer duplication resulting in an extended precursor protein and the release of the amyloidogenic fragments ABri and ADan, respectively. Alzheimer's disease (AD) is the most common form of amyloidosis in humans and the leading cause of dementia. Senile plaques and cerebrovascular amyloid deposits in AD are mainly composed of amyloid β ($A\beta$). It has been proposed that deposition of the amyloidogenic ADan, ABri or $A\beta$ peptides in the brain results in the neuronal damage leading to FDD, FBD or AD. There are striking neuropathological similarities between AD and FBD/FDD. These include vascular and parenchymal amyloid plaques and pre-amyloid lesions that are accompanied by a prominent astrocytic response. Furthermore, the neurofibrillary tangles observed in AD are identical to that observed in FBD/FDD. Importantly, in FDD patients, $A\beta$ sometimes co-deposits with ADan, a feature not observed in FBD. The neuropathological similarities between Alzheimer's disease and FBD or FDD stimulated us to investigate whether BRI2 interacts with proteins involved in AD. We obtained data indicating that there is specific interaction between BRI2 and the Amyloid Precursor Protein (APP) or BACE 1 (β -secretase involved in APP processing). We also found that the presence of BRI2 had a modulatory effect on APP processing, specifically increasing the levels of cellular APP and transmembrane C-terminal fragments of APP. Importantly, we found that expression of BRI2 resulted in a strong inhibition of the secretion of APP and $A\beta$ peptides that accumulate in the brains of Alzheimer's disease patients. Determining the precise molecular pathways affected by the specific binding between BRI2 and APP or BACE 1 could result in the identification of common therapeutic targets for these neurodegenerative disorders.

This research is funded by the Greek Ministry of Education grants "Pythagoras I & II", the University of Athens grant "Kapodistriasis", European Grant APOPIS co-ordinated by the Verum foundation.

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΝΕΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ

Φώτης Θ. *

*Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή & Ιδρυμα
Τεχνολογίας και Έρευνας / Ινστιτούτο Βιοιατρικής Έρευνας, Ιωάννινα, Ελλάδα*

Η αγγειακή διαφοροποίηση και η αγγειογένεση είναι σημαντικές διαδικασίες της φυσιολογικής ανάπτυξης και λειτουργίας του ανθρώπου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι διαδικασίες αυτές υπόκεινται σε αυστηρούς μηχανισμούς ρύθμισης, τόσο αναφορικά με την τοπολογία τους όσο και σε σχέση με τη χρονική διάρκειά τους. Ομως, σε μερικές παθολογικές καταστάσεις, η αγγειογένεση επάγεται δραματικά και χάνει την ικανότητα αυτορύθμισης. Η ανεξέλεκτη αυτή δημιουργία νέων τριχοειδών οδηγεί σε καταστροφή ιστών και αλλοίωση της αρχιτεκτονικής τους. Τέτοια ανεξέλεκτη δημιουργία αγγείων απαντάται σε σειρά νοσημάτων, όπως οι νεοπλασίες, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η ψωρίαση, και άλλες νόσους. Αν και οι μηχανισμοί, οι οποίοι οδηγούν σε παθολογική αγγειογένεση, δεν είναι οι ίδιοι σε κάθε αγγειογενετική νόσο, πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι υπάρχει ανατροπή της ισορροπίας μεταξύ ενεργοποιητών, όπως ο VEGF και ο FGF-2, και αναστολέων της αγγειογένεσης. Κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποδομούν τοπικά την βασική μεμβράνη των αγγείων και μεταναστεύουν στον εξωκυττάριο χώρο όπου δημιουργούν μικρές εκβλαστήσεις, οι οποίες εισβάλλουν στον περιαγγειακό συνδετικό ιστό. Καθώς οι εκβλαστήσεις αυτές επιμηκύνονται, με μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων στη κορυφή και πολλαπλασιασμό στην βάση, αρχίζει βαθμιαία να δημιουργείται αυλός. Ο VEGF είναι ένας από τους βασικούς ενεργοποιητές της αγγειογένεσης, ο οποίος μπορεί να ρυθμίζει όλα σχεδόν τα παραπάνω βήματα της αγγειακής ανάπτυξης. Άλλα μόρια, όπως η αγγειοποιητίνη και μέλη της οικογένειας του TGF-β, ρυθμίζουν την προσέλκυση περικυττάρων και λείων μυϊκών κυττάρων από τους γειτονικούς ιστούς, γεγονός το οποίο έχει μεγάλη επίδραση στην στεγανότητα και συσπαστικότητα του νέου αγγείου. Στην παρουσίαση αυτή θα αναπτυχθούν βασικοί μοριακοί μηχανισμοί, οι οποίοι συμμετέχουν στην δημιουργία νέων αγγείων.

* Προσκεκλημένος ομιλητής

MOLECULAR MECHANISMS OF VESSEL FORMATION**Fotsis Th.***

Laboratory of Biological Chemistry, University of Ioannina, Medical School & Foundation for Research and Technology Hellas / Biomedical Research Institute, Ioannina, Greece

Vasculogenesis and angiogenesis are important processes for normal development and function in humans. Under physiological conditions, these processes are spatially and temporally restricted. However, in certain pathological conditions, angiogenesis is dramatically enhanced and loses its self-limiting capacity and the deregulated formation of new capillaries results in destruction of normal tissue function and architecture. Thus, uncontrolled production of vessels is seen during the development and progression of solid tumors, rheumatoid arthritis, psoriasis, and diabetic retinopathy. Though the mechanisms leading to persistent angiogenesis are unclear and certainly not the same in each angiogenic disease, recent evidence indicates that they all lead to an imbalance between angiogenic factors, such as FGF-2 and VEGF, and inhibitors. During angiogenesis endothelial cells focally degrade the basement membrane and migrate to the extracellular space where they form tiny sprouts, which invade the perivascular connective tissue. As these sprouts elongate, by migration of endothelial cells at their tip and proliferation of endothelial cells below the tip, a lumen is gradually formed. VEGF is probably the most important factor regulating several partial steps of vascular remodeling *i.e.*; it induces endothelial cells to digest the underlying basement membrane, to migrate and invade adjacent tissues, and to proliferate. Other molecules, such as angiopoietin 1 and members of TGF- β superfamily, regulate recruitment of pericytes and vascular smooth muscle cells from adjacent tissue, which has major impact on vessel wall integrity and contractility. However, there is a vast gap in the literature regarding the molecules and mechanisms by which coordinated changes occur in endothelial cells during the transition between quiescence and angiogenesis. In this presentation, basic molecular mechanisms of vessel formation will be reviewed.

* Invited speaker

**Η ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΦΟΡΒΟΛΙΚΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΡΜΑ ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΑΣΤΟΥ:
ΑΝΟΣΤΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΟΣ ΗΜΙΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ C-α (PKCα)**

**Χαβάκη Σ.¹, Δρόσος Γ.², Αμawi Κ.¹, Γεωργούλης Αν.¹, Μαρίνου Χ.¹,
Γούτας Ν.³, Βλαχοδημητρόπουλος Δ.³, Βασίλαρος Στ.⁴, Μπαλτατζή Ε.⁵,
Αλεπόρου-Μαρίνου Β.², Παταργιάς Θ.², Κίττας Χ.¹, Κουλούκουσα Μ.¹,
Μαρίνος Ε.¹**

¹Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας,

²Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας,

³Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας,

⁴Ιατρικό Κέντρο Διάγνωσης και Παρακολούθησης «Πρόληψη», ⁵Αντικαρκινικό Νοσοκομείο
“Άγιος Σάββας”, Ερευνητικό Κέντρο Ογκολογίας “Γ. Παπανικολάου”, Τμήμα
Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου και Κυτταρικής Βιολογίας

Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) αποτελεί οικογένεια ισοενζύμων που ενεργοποιούνται από διάφορους ενδογενείς παράγοντες, όπως η διακυλγλυκερόλη (DAG) και οι οποίοι παίζουν ρόλο στην μεταγωγή σήματος κατά την ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Στον καρκίνο του μαστού τα αυξημένα επίπεδα της PKCα σχετίζονται με αυξημένη μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων. Βιβλιογραφικά προκύπτει ότι η παρατεταμένη δράση του ΡΜΑ στον καρκίνο του μαστού προκαλεί ελάττωση της κακοήθειας. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται ο ρόλος του ΡΜΑ ως υποστρώματος της PKCα αντί της DAG. Πρωτογενείς καλλιέργειες καρκίνου του μαστού διαφόρων βαθμών κακοήθειας, που αποτελούνται από κύτταρα που εκφράζουν τον αυθεντικό φαινότυπο (in situ) σε σύγκριση με τις κυτταρικές σειρές, επωάζονται με ΡΜΑ για 1 έως 5h. Ακολουθεί ημιποσοτική ανοσοϊστοχημική εντόπιση της PKCα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι έκθεση στο ΡΜΑ για 1h προκαλεί ενεργοποίηση του κυτταροπλασματικού κλάσματος της PKCα, ενώ έκθεση για 5h προκαλεί τη μειορρυθμισή του.

"Το έργο συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και Εθνικούς Πόρους (ΕΠΕΑΕΚ II) ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ (Κ.Α.: 70/3/7916).

**THE EFFECT OF PHORBOL ESTER PMA IN PRIMARY BREST
CANCER CELL CULTURES: SEMI-QUANTITATIVE IMMUNO-
HISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF THE PROTEIN KINASE
C ALPHA (PKC α)**

**Havaki S.¹, Drosos Y.², Amawi K.¹, Georgoulis An.¹, Marinou Ch.¹,
Goutas N.³, Vlachodimitropoulos V.³, Vassilaros St.⁴, Voloudakis-
Baltatzis I.⁵, Aleporou-Marinou V.², Pataryas Th.², Kittas Chr.¹,
Kouloukousa M.¹, Marinos E.¹**

¹Lab of Histology and Embryology, Medical School, University of Athens, Greece, ²Dept. of Genetics and Biotechnology, School of Biology, University of Athens, Greece, ³Lab of Forensic Medicine and Toxicology, Medical School, University of Athens, Greece, ⁴"Prolipsis" Breast Diagnostic Center, Athens, Greece, ⁵Dept. of Electron Microscopy and Cell Biology, Research Center of Oncology "G. Papanikolaou", Saint Savas Anticancer Hospital, Athens, Greece

Protein kinase C (PKC) is a family of isoenzymes that can be activated by several endogenous factors, such as diacylglycerol (DAG), playing a critical role in signal transduction during cell development and differentiation. In breast cancer the increased levels of PKC α are correlated with increased metastatic activity of these cells. It is evident from literature that prolonged PMA treatment of breast cancer cell lines causes reduction of oncogenicity. In the present work the role of PMA is examined as PKC α substrate instead of DAG. Primary breast cancer cell cultures of various malignancy grades are treated with PMA for 1 h and 5 h. These cell cultures are from several aspects of view superior to cell lines, since they normally express the authentic cell phenotype they originate from. In the present work a semi-quantitative immunohistochemical localization of PKC α is performed. The results indicate that PMA treatment for 1 h activates the cytosolic fraction of PKC α , whereas treatment for 5 h causes its down regulation.

"Το έργο συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και Εθνικούς Πόρους (ΕΠΕΑΕΚ II) ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ (Κ.Α.: 70/3/7916).

ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Χαμόδρακας Σ.Ι.*

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη 157 01 Αθήνα*

Η πρόγνωση της δομής και λειτουργίας πρωτεϊνών από την αλληλουχία τους και μόνο είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της Δομικής Μοριακής Βιολογίας. Πολλές προσπάθειες έγιναν και γίνονται ειδικά για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες γιατί: α) αποτελούν το 25-30% των προσδιορισμένων πρωτεομάτων β) επιτελούν πολλές και σημαντικές βιολογικές λειτουργίες και γ) η δομή τους είναι δύσκολο να προσδιοριστεί σε ατομική διακριτικότητα με μεθόδους κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ ή φασματοσκοπίας NMR. Γι' αυτή την κατηγορία πρωτεϊνών είναι πλέον επιτακτική η ανάγκη για την ανάπτυξη μεθόδων πρόγνωσης δομής και λειτουργίας, παρά για την περίπτωση των σφαιρικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών.

Θα παρουσιάσω τις προσπάθειες της ομάδας μας, κατά την τελευταία δεκαετία περίπου, σ' αυτή την κατεύθυνση. Οι προγνωστικοί αλγόριθμοι, τα εργαλεία και οι βάσεις δεδομένων που αναπτύχθηκαν, παρουσιάζονται λεπτομερώς στη δικτυακή διεύθυνση: <http://biophysics.biol.uoa.gr> και είναι ελεύθερα διαθέσιμοι για χρήση στην ακαδημαϊκή κοινότητα.

* Προσκεκλημένος ομιλητής

**PREDICTION OF STRUCTURE AND FUNCTION OF MEMBRANE
PROTEINS****Hamodrakas S.J.****Department of Cell Biology & Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis 157 01 Athens*

The prediction of protein structure is still an open problem in structural molecular biology. Efforts were especially devoted to transmembrane proteins, because they constitute 25-30% of determined proteomes, they are involved in a broad range of important biological processes and functions and, unfortunately, it is very difficult to solve their three-dimensional structure by X-ray crystallography or NMR. For this class of proteins, structure and function prediction methods are needed more urgently than for globular water-soluble proteins.

I shall present the efforts of our lab, during the last decade or so, towards this direction. All prediction algorithms, tools and databases developed, are presented in detail at <http://biophysics.biol.uoa.gr> and are freely available to the academic community.

* Invited speaker

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΙΑΣ ΜΙΚΡΗΣ ΓΤΡΑΣΗΣ ΤΗΣ RAS ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΣΤΟ TGF- β ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ

Χήρα Π.¹, Ψυχάρη Ε.², Φώτσης Θ.^{1,3}, Chavrier P.² και C. Murphy^{1,3}

¹Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή, 45110 Ιωάννινα, Ελλάδα ²Ινστιτούτο Κιουρί, CNRS-UMR144, 75248 Παρίσι, Γαλλία ³Ίδρυμα Έρευνας και Τεχνολογίας-Ελλάδας, Ινστιτούτο Βιοιατρικής Έρευνας, 45110 Ιωάννινα,

Η Ras υπεροικογένεια αποτελείται από μια ποικιλία GTPασών συμπεριλαμβανομένων των αδενοσύνο-διφώσφο παραγόντων ριβοζυλίωσης (γνωστών ως ARFs). Η δράση των ARF GTPασών συνίσταται στα εξής: 1) στρατολογούν στη μεμβράνη κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες κυστιδικού καλύμματος ώστε να διευκολύνουν τη διαλογή και τον σχηματισμό κυστιδίων, 2) ενεργοποιούν ένζυμα τροποποίησης μεμβρανικών λιπιδίων, 3) διαμορφώνουν τις δομές της ακτίνης. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα ενισχύουν την άποψη ότι η ARF6 συμμετέχει σε μονοπάτια μεταγωγής του σήματος. Συγκεκριμένα, η ARF6 ενισχύει την διείσδυση των μελανοκυττάρων ρυθμίζοντας την ενεργοποίηση της ERK (Tague SE et al., PNAS, 2004). Επιπλέον, υπερέκφραση της μόνιμα ανενεργής μορφής της ARF6 (ARF6T27N) εμποδίζει σχεδόν ολοκληρωτικά την ενεργοποίηση της Rac1 από VEGF και την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα VEGF τύπου II στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Ikeda S. et al., Circ Res, 2005). Με βάση τα παραπάνω, βρήκαμε ότι η ARF6 αλληλεπιδρά με την SMAD4 σημαντικό συστατικό του σηματοδοτικού μονοπατιού των TGF- β /Ακτιβίνης. Η αλληλεπίδραση αυτή παρατηρήθηκε αρχικά με το σύστημα του διπλού υβριδίου και επιβεβαιώθηκε με μεταγραφικές και βιοχημικές προσεγγίσεις όπως πρωτεϊνική καταβύθιση και ανοσοκαταβύθιση. Περαιτέρω πειράματα θα εστιαστούν στις δομικές απαιτήσεις αυτής της αλληλεπίδρασης καθώς και στις λειτουργικές συνέπειές της στο μονοπάτι των TGF- β /ακτιβίνης.

**INVOLVEMENT OF SMALL GTPASES OF RAS SUPERFAMILY
IN TGF- β SIGNALLING****Chira P.¹, Psichari E.², Fotsis T.^{1,3}, Chavrier P.², and C. Murphy^{1,3}***¹Laboratory of Biological Chemistry, University of Ioannina Medical School, 45110
Ioannina, Greece**²Institut Curie, CNRS-UMR144, 75248 Paris, France**³Foundation for Research and Technology-Hellas, Biomedical Research Institute, 45110
Ioannina, Greece*

Ras superfamily comprises of a variety of GTPases including adenosine diphosphate-ribosylation factors (ARFs). The ADP-ribosylation factors (ARFs) are low molecular weight (~20kD) GTP-binding proteins that are expressed in all eukaryotes. There are six mammalian Arfs and many Arf-like proteins. Arfs are thought to act through 1) the recruitment of cytosolic coat proteins onto membranes to facilitate sorting and vesicle formation, 2) the activation of lipid modifying enzymes, and 3) the modulation of actin structures. Recent data strongly support the notion that Arf6 is involved in signalling pathways. ARF6-enhanced melanoma cell invasion depends on the activation of the extracellular signal regulated kinase (ERK), which in turn depends on the ARF6 GTPase cycle (Tague SE et al., PNAS, 2004). Overexpression of dominant-negative ARF6 (ARF6T27N) almost completely inhibits VEGF-induced Rac1 activation and VEGFR2 autophosphorylation in endothelial cells (Ikeda S et al., Circ Res, 2005). In this context, we have recently found that ARF6, a known membrane trafficking modulator, interacts with SMAD4, a critical downstream component of TGF- β /activin signalling. There is strong evidence that ARF6 interacts with the effector protein and tumor suppressor SMAD4 known to mediate TGF- β /activin signalling responses. The ARF6/SMAD4 interaction has been initially observed using a two-hybrid system but also has been confirmed with transcriptional and biochemical approaches such as pull down assays and immunoprecipitation. Further work will focus on the structural requirements of this interaction and its functional consequences on TGF- β /activin signalling.

ΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΠΕΡΔΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑ ΠΕΣΤΡΟΦΑ*

Χονδρού Μ.Π.¹, Σφυρόερα Γ.^{1,2} και Ι.Κ. Ζαρκάδης¹

¹Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Ρίο, Πάτρα.

²Τομέας Παθολογίας και Εργαστηριακής Ιατρικής, Ιατρική σχολή, Πανεπιστήμιο
Πεννσυλβανίας, Φιλαδέλφεια, PA 19104, Η.Π.Α.

Η προπερδίνη, μια γλυκοπρωτεΐνη του ορού με μοριακό βάρος 50kDa, αποτελεί το μοναδικό θετικό ρυθμιστή του συστήματος του Συμπληρώματος. Συμμετέχει τόσο στο σχηματισμό, όσο και στη σταθεροποίηση ενός ενζυμικού συμπλόκου, της κομβεργτάσης του C3, κομβικό σημείο της αλληλουχίας των γεγονότων ενεργοποίησης του συστήματος. Προκειμένου να μελετηθεί η εξέλιξη του Συμπληρώματος, παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία η κλωνοποίηση και ο χαρακτηρισμός του γονιδίου της προπερδίνης στην ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*). Η πέστροφα, ένας ημιτετραπλοειδής οστεϊχθύς, εμφανίζει ένα πλήρως αναπτυγμένο σύστημα του συμπληρώματος. Επιπλέον, φαίνεται να επεκτείνει μοναδικά τη φυσική του ανοσία, μέσω διπλασιασμού των γονιδίων του Συμπληρώματος και λειτουργικής διαφοροποίησής τους, καθιστώντας τον, έτσι, πρότυπο μοντέλο μελέτης του συστήματος. Το γονίδιο της προπερδίνης αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα διπλασιασμού. Πιο συγκεκριμένα, απομονώθηκαν δύο πλήρεις cDNA κλώνοι για την προπερδίνη, από βιβλιοθήκη ήπατος πέστροφας. Οι συναγόμενες αμινοξικές αλληλουχίες των εμφανίζουν 86% ταυτοσημία μεταξύ τους και 43% με την αντίστοιχη ανθρώπινη ορθόλογη πρωτεΐνη, παρουσιάζοντας επιπλέον και την ίδια δομική αρχιτεκτονική (έξι επαναλήψεις της δομικής περιοχής TSP1). Η απομόνωση και αλληλούχηση γονιδιακών κλώνων, καθώς και η ανάλυση κατά Southern δείχνουν ότι στην πέστροφα υπάρχουν τουλάχιστον δύο γονίδια για την προπερδίνη, με ομολογία πάνω από 85%, σε αντίθεση με ό,τι έχει δειχθεί για τα θηλαστικά και τα αμφίβια. Τα δύο γονίδια εμφανίζουν τόσο διαφορετική οργάνωση εξονίων-ιντρονίων όσο και διαφορετική εικόνα ιστικής έκφρασης, σε επίπεδο mRNA. Τέλος, θα παρουσιαστεί φυλογενετική ανάλυση του γονιδίου της προπερδίνης.

*Υποστηρίζεται από πρόγραμμα ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II.

GENE DUPLICATION OF THE PROPERDIN GENE IN RAINBOW TROUT***Chondrou M.P.¹, Sfyroera G.^{1,2}, and I.K. Zarkadis¹**¹*Dept of Biology, School of Medicine, University of Patras, Rion, 26500, Patras, Greece*²*Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, School of Medicine, Philadelphia, PA 19104, USA.*

Properdin, a serum glycoprotein of 50kDa, is the only positive regulator of complement system. It participates at the C3 convertase formation and stabilization, an enzyme complex of the alternative and lectin pathway, activating by subsequent proteolysis following steps of the complement system. In order to study complement evolution we present here the molecular cloning and characterization of properdin gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Rainbow trout, a quasi-tetraploid bony fish, possesses a fully extended and well developed complement system, that have been established through gene duplication and functional diversity, representing a significant research model. As far as properdin is concerned, two full cDNA clones were isolated, from a trout liver cDNA library. The deduced amino acid sequences of trout properdin exhibit 86% identity each other and 43% to the human ortholog, presenting the same modular architecture, consisted by six TSP1 motifs. Isolation of genomic clones, as well as Southern blot analysis indicate the presence of two distinct properdin genes in the trout genome, in contrast to the presence of a single copy in the mammalian and amphibian genomes. The two genes show differences in intron-exon organization, as well as in mRNA tissue expression. Finally, phylogenetic analysis of trout properdin will be presented.

**Supported by PYTHAGORAS II.*

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΣΙΤΙΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥ ΚΟΡΗΓΟΝΟΥ (*Coregonus lavaretus*)

Χριστοπούλου Ν.Θ.¹, Κάγκαλου Ι.², Αντωνοπούλου Ε.¹

¹ Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 541 24, Θεσσαλονίκη,
Email: eantono@bio.auth.gr

² Εργαστήριο Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων, 45 110, Ιωάννινα

Η αύξηση της παραγωγής των προϊόντων υδατοκαλλιεργειών σε συνδυασμό με την αύξηση του κόστους των ιχθυοτροφών καθιστά απαραίτητη την ανάπτυξη επιστημονικά τεκμηριωμένων συστημάτων σίτισης που να συντελούν στην αύξηση των ιχθυδίων. Η επιτυχία ενός ολοκληρωμένου συστήματος σίτισης έγκειται στον προσδιορισμό της βέλτιστης συχνότητας της τροφής. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της συχνότητας σίτισης στις παραμέτρους που σχετίζονται με το ρυθμό αύξησης και το δείκτη ευρωστίας του κορήγονου (*Coregonus lavaretus*) σε ανοιχτό σύστημα εκτροφής. Η ποσότητα της χορηγηθείσας βιομηχανικής τροφής (48% πρωτεΐνη / 20% λιπίδια) υπολογίστηκε στο 2,4% της συνολικής βιομάζας, ισοκατανεμημένη σε 3 ή 6 ισοθερμικά γεύματα ανά ημέρα με χρήση ταΐστρας. Παράλληλα μετρήθηκε η συγκέντρωση των θρεπτικών αλάτων (νιτρικά, νιτρώδη, αμμωνία και φωσφορικά) σε κάθε δεξαμενή. Μετά από ένα μήνα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο ρυθμό αύξησης στις διαφορετικές συχνότητες σίτισης. Τα άτομα (n=290) που τρέφονταν 3 φορές την ημέρα αύξησαν το αρχικό μέσο βάρος τους (g) από 12,42±0,21 σε 16,58±0,27 (P<0,001). Επίσης, τα άτομα (n=288) που σιτίζονταν 6 φορές την ημέρα αύξησαν το αρχικό μέσο βάρος τους από 11,56±0,21 σε 15,60±0,28 (P<0,001). Από τις τιμές των νιτρικών, νιτρωδών και φωσφορικών του νερού δεν προέκυψαν σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάλογα με την συχνότητα σίτισης ενώ διαπιστώθηκε τάση αύξησης της συγκέντρωσης της αμμωνίας.

**THE EFFECT OF FEEDING FREQUENCY ON THE GROWTH OF
THE WHITEFISH (*Coregonus lavaretus*)****Christopoulou N.Th.¹, Kagalou I.², Antonopoulou E.¹**¹*Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, 541 24, Thessaloniki, E-mail: eamtono@bio.auth.gr*²*Laboratory of Zoology, Department of Biological Applications and Technologies, University of Ioannina, 45 110, Ioannina*

The increase in aquaculture and the increasing cost of fish diets requires well planned feeding systems that will increase the fish growth at lower costs. The success of the integrated feeding system depends on determining the optimal feeding frequency. In the present work, we studied the effect of feeding frequency on the growth and condition related parameters of the whitefish (*Coregonus lavaretus*) kept in an open flow system. The fish were fed with industrial dry feed (48% protein / 20% lipids) at 2.4% of the total biomass, divided in three or six isothermical meals per day using a belt feeder. The nutrient concentration (nitrate, nitrite, ammonium and phosphate) in each tank was also measured. The growth rate of the fish was not statistically different between the two treatments within the first 30 days of the experiment. An increase in the mean body weight from 12.42±0.21 g to 16.58±0.27 was recorded for the fish fed 3 times a day (n=290). The fish fed 6 times a day (n=288) increased their mean body weight from 11.56±0.21 to 15.60±0.28 g. No significant changes were observed in NO₃, NO₂, PO₄ concentrations while NH₄ appears to be increased with the feeding frequency.

**Η ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ ΤΟΝ ΑΝΤΙΜΕΤΑΦΟΡΕΑ $\text{Na}^+ - \text{H}^+$
ΣΕ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΜΕ ΤΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ
MAPKp42/44, PKC και PI3K**

Χρυσαλίδου Σ.¹, Κολιάκος Γ.², Καλογιάννη Μ.¹

¹ Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών
Επιστημών, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη, 54124

² Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη, 54124

Η ενδοθηλίνη είναι ένα πεπτίδιο 21 αμινοξέων που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Διαθέτει ισχυρή αγγειοσυσταλτική και μιτογόνο δράση. Κάποιοι από τους πιο σημαντικούς βιολογικούς της ρόλους αφορούν στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου και στην απορρόφηση νερού και αλάτων. Σε προηγούμενη εργασία μας δείχτηκε ότι η ενδοθηλίνη (10pg/ml) αυξάνει τη δραστηριότητα του αντιμεταφορέα $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ (NHE-1) σε ερυθρά αιμοσφαίρια ανθρώπου. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του μονοπατιού μεταβίβασης σήματος που επάγεται από την ενδοθηλίνη με τη συμμετοχή του αντιμεταφορέα $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ σε ερυθρά αιμοσφαίρια ανθρώπου. Η πειραματική διαδικασία αφορούσε την εκτίμηση της δραστηριότητας του αντιμεταφορέα $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ με τη μέτρηση της αλλαγής του ενδοκυτταρικού pH (pHi), καθώς και της αλλαγής στη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού νατρίου που επιφέρει η ενδοθηλίνη (10pg/ml) με ταυτόχρονη χρήση ειδικών αναστολέων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι ουσίες PD 98059 (50μM), αναστολέας της MEK1 (κινάση που ενεργοποιεί τη MAPKp42/44), GF-109203X (10μM), αναστολέας όλων των ισομορφών της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), Gö6976 (500nM), ειδικός αναστολέας όλων των ισομορφών της PKC πλην των ζ- και ι- και wortmannin (50nM), αναστολέας της PI3K (κινάση της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων υποδηλώνουν ότι η ενδοθηλίνη επάγει την ενεργοποίηση του αντιμεταφορέα $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ με τη συμμετοχή των πρωτεϊνών MAPKp42/44, ισομορφών της PKC, καθώς και της PI3K (κινάση της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης).

ENDOTHELIN ACTIVATES THE Na⁺-H⁺ EXCHANGER IN HUMAN ERYTHROCYTES THROUGH MAPKp42/44, PKC AND PI3K**Chrysalidou S.¹, Koliakos G.², Kaloyianni M.¹**

¹Laboratory of Animal Physiology, Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki (AUTH), 54124

²Department of Biological Chemistry, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki (AUTH), 54124

Endothelin is a 21 amino-acid peptide that is produced by endothelial cells. It is a potent vasoconstrictive and mitogenic peptide. Endothelin participates in vessel tone regulation, as well as water and salt absorption. In a previous study we showed that endothelin (10pg/ml) increases the activity of the Na⁺-H⁺ exchanger (NHE-1) in human red blood cells. The aim of the present study was to investigate the signal transduction pathway induced by endothelin with the involvement of the Na⁺-H⁺ exchanger. The experimental procedure included the measurement of the changes caused by endothelin (10pg/ml), alone or together with specific inhibitors, in both the intracellular pH (pHi) value and the intracellular Na⁺ concentration of human red blood cells. The inhibitor of MEK1 (a kinase which activates MAPKp42/44) PD98059 (50μM), an inhibitor of all protein kinase C (PKC) isoforms, GF-109203X (10μM), an inhibitor of all PKCs except the ζ- (zeta) and ι- (iota) isoforms, Gö6976 (500nM) and finally, a PI3K inhibitor, wortmannin (50nM) were used. Our results indicate that endothelin induces a signal transduction pathway with the involvement of MAPKp42/44, specific isoforms of PKC and PI3K, where the Na⁺-H⁺ exchanger plays an important role.

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΧΥΜΟΘΡΥΨΙΝΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΘΡΥΨΙΝΟ-
ΓΟΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΤΣΙΠΟΥΡΑ (*SPARUS AURATA*): ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ
ΑΥΞΗΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΖΥΜΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ**

Ψόχιου Ε.¹, Σαρροπούλου Ε.², Μαμούρης Ζ.¹, Μούτου Κ.Α.¹

¹Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Πλούτωνος 26, 41221 Λάρισα; ² Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας και Γενετικής, Γούρνες Πεδιάδος, 71500 Ηράκλειο

Η θρυψίνη και η χυμοθρυψίνη είναι ενδοπεπτιδάσες της οικογένειας των πρωτεασών της σερίνης, που συντίθενται στο πάγκρεας και εκκρίνονται στον εντερικό αυλό ως ανενεργά ζυμογόνα. Δεδομένου του κεντρικού ρόλου που κατέχουν στην πέψη των πρωτεϊνών και τη διάθεσή τους για αύξηση, είναι πιθανόν να τελούν υπό τον έλεγχο του άξονα GH-IGF1. Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η κλωνοποίηση των ισομορφών θρυψινογόνου και χυμοθρυψινογόνου από την τσιπούρα και η μελέτη του πρότυπου έκφρασης τους σε διαφορετικούς ιστούς καθώς και της πιθανής ρύθμισής τους από την αυξητική ορμόνη. Δύο διαφορετικοί κλώνοι χυμοθρυψινογόνου (CHTRI, CHTRII) και ένας θρυψινογόνου (TRPII) απομονώθηκαν από μία ηπατική cDNA βιβλιοθήκη. Τόσο τα χυμοθρυψινογόνα όσο και το θρυψινογόνο διατηρούν τα αμινοξικά κατάλοιπα, απαραίτητα για την καταλυτική τους δράση και τη στερεοχημική τους διαμόρφωση: τα αμινοξέα Ser195, His57 και Asp102 που σχηματίζουν την καταλυτική τριάδα και οκτώ κυστεΐνες που σχηματίζουν τις κυστεΐνικές γέφυρες. Ανάλυση κατά Northern έδειξε ότι η έκφραση όλων των ζυμογόνων είναι μέγιστη στο ήπαρ. Όπως αναμενόταν, μετάγραφα όλων των ζυμογόνων ανιχνεύθηκαν και στα τμήματα του πεπτικού σωλήνα (στομάχι, πυλωρικά τυφλά, πρόσθιο και οπίσθιο έντερο), με την μεγαλύτερη έκφραση να εντοπίζεται στα πυλωρικά τυφλά. Αξιοσημείωτο είναι ότι δεν ανιχνεύθηκε έκφραση του CHTRI στο πρόσθιο έντερο. Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της αυξητικής ορμόνης (GH) στην έκφραση των ζυμογόνων και την ενζυμική τους δραστηριότητα, σε τρεις ομάδες νεαρών ατόμων τσιπούρας χορηγήθηκε 0.1 μg/g BW, 1 μg/g BW ή 10 μg/g BW οGH. Στην ομάδα μάρτυρα χορηγήθηκε διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Δείγματα ιστών συλλέχθηκαν τις ημέρες 1, 2, 4 και 7 μετά τη χορήγηση της GH. Ανάλυση κατά Northern και πυκνομετρία έδειξε ότι η GH δεν είχε σημαντική επίδραση στα επίπεδα έκφρασης των ζυμογόνων στο ήπαρ ή στα πυλωρικά τυφλά. Οι ενζυμικές δραστηριότητες επηρεάστηκαν σημαντικά ($P < 0.05$) τις ημέρες 1 και 2. Ωστόσο, δε διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας των ολικών αλκαλικών πρωτεασών και της δραστηριότητας της χυμοθρυψίνης ή της θρυψίνης σε κανένα τμήμα του πεπτικού σωλήνα.

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια διδακτορικής διατριβής που χρηματοδοτείται από το πρόγραμμα ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ στα πλαίσια του ΕΠΕΑΕΚ II.

**ISOLATION OF CHYMOTRYPSINOGEN AND TRYPSINOGEN
FROM *SPARUS AURATA*: EFFECTS OF GROWTH HORMONE ON
ZYMOGEN EXPRESSION AND ENZYME ACTIVITY****Psochiou E.¹, Sarropoulou E.², Mamuris Z.¹, Moutou K.A.¹**

¹Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly, 26 Ploutonos st., 41221 Larissa, Greece; ² Hellenic Centre for Marine Research Crete, Thalassocosmos, Gournes Pediados, 71500 Heraklion, Greece

Trypsin and chymotrypsin are endopeptidases of the serine protease family, which are synthesized in the pancreas and are secreted into the intestinal lumen as inactive zymogens. Given their central role in the digestion and availability of dietary proteins for growth, they might be under the regulation of GH-IGFI axis. The aim of this study was the molecular cloning of trypsinogen and chymotrypsinogen isoforms of gilthead sea bream and the study of their expression pattern in different tissues and their possible regulation by growth hormone. Two different clones of chymotrypsinogen (CHTRI, CHTRII) and one clone of trypsinogen (TRPII) were retrieved from a liver cDNA library. Both chymotrypsinogens and trypsinogen retain common conserved amino acid residues, essential for their catalytic activity and conformational maintenance; the residues Ser195, His57 and Asp102 forming the catalytic triad and at least eight cysteine residues forming the cysteine bridges. Northern-blot analysis revealed that the liver was the major transcription site for all zymogens. As expected, all zymogen transcripts were detected in parts of the digestive tract (stomach, pyloric caeca, anterior and posterior intestine), with pyloric caeca presenting the most intense expression. Interestingly, no CHTRI expression was detected in the anterior intestine. In order to investigate the short term effects of growth hormone (GH) on zymogen expression and enzyme specific activity, three groups of *S. aurata* juveniles were injected with 0.1 µg/g BW, 1 µg/g BW and 10 µg/g BW of oGH, respectively. Control group was injected with saline. Tissue samples were collected at days 1, 2, 4 and 7 after administration. Northern blot followed by densitometry showed that GH had no significant effect on the chymotrypsinogen and trypsinogen expression levels in the liver or the pyloric caeca. Enzyme activities were significantly affected ($P < 0.05$) on days 1 and 2. In the pyloric caeca, total alkaline protease activity was significantly elevated according to GH dose on day 2. However, no significant correlations were observed between total alkaline protease activity and chymotrypsin or trypsin activities in any of the intestinal segments. Trypsin activity remained unaffected by GH administration, whereas chymotrypsin was significantly elevated according to GH dose only in the posterior intestine on day 1.

The financial support of EPEAEK II framework, Ministry of Education and Religious Affairs, Greece, is gratefully acknowledged.

**ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ
(INDEX)**

A

Aksentijevich I., 429,
Altenberend F., 371,
Amawi K., 437,

C

Chavrier P., 441,
Cieslak D., 183,
Courty J., 69,

F

Fecker M., 371,
Frangione B., 433,

G

Ghiso J., 409, 433,
Graf D., 337, 405,

H

Hamidi Alambari D., 77,
Husband A., 157,

K

Kaback H.R., 397,
Kalbacher H., 371,
Karakose E., 123,
Kay R.R., 367,
Kratzer U., 371,

L

Lemuh N.D., 215,

M

Motomura T., 139,
Murphy C., 185, 283, 393, 441,

N

Nagasato C., 139,
Neagu M., 143,
Nuñez-Corcuera B., 367,

Q

Quader H., 161,

R

Rostagno A., 433,

S

Schultz M., 391,
Stevanovic S., 371,
Stoian G., 19,
Suárez T., 367,
Suchentrunk F., 175,

T

Tazebay U., 123,

V

Voelter W., 41, 143, 371,

W

Willis J.H., 243,

A

Αγγελή Ι.Κ., 1, 113
Αγγελίδης Χ., 165,
Αγγελίδου Ε., 97,
Αγγελόπουλος Κ., 115,
Αδαμόπουλος Χ., 341,
Αθανασίου Ε.Ι., 425,
Αλατζάς Α., 3,
Αλεπόρου-Μαρίνου Β., 391,437,
Αλιβιζάτος Γ., 7, 151,
Αμίλλης Σ., 57,
Αμοργιανιώτης Χρ., 277,
Αμπατζόπουλος Θ., 273,
Ανασοντζής Γ.Ε., 5,
Αναστασιάδη Κ., 389,
Αναστασίου Δ., 7,
Ανέστης Α., 9, 11,
Αντσακλής Α., 285, 289, 389,
Αντωνέλου Μ., 177, 179, 187, 247,
Αντωνιάδου Χρ., 51, 245,
Αντωνοπούλου Ε., 13, 445,
Αποστολάκος Π., 161, 307,
Αποστολίδης Α.Π., 47,
Αποστολίδου Κ., 269,
Αρβανιτάκη Ζ., 15,
Αρμένης Γ., 17,
Αρσενάκης Μ., 141, 399,
Αυγουστίνος Α., 299, 339,
Αφένδρα Α., 419,

B

Βαλάκος Ε.Δ., 341,
Βανδέρα Ε., 19,
Βάννα Β.Γ., 21, 23,
Βαρθολομάτος Γ., 291,
Βαρσάκη Α., 19,
Βασάρα Ε., 269,
Βασιλάκου Μ., 25,

Βασίλαρος Σ.Τ., 437,
Βασιλείου Γ., 27, 67,
Βεζυράκη Π., 165, 241,
Βελεγράκη Α., 37,
Βελέντζα Μ., 217,
Βελέντζας Α.Δ., 29,
Βενέτης Κ., 31,
Βιλαράς Γ., 63, 233,
Βίλλιας Γ., 33,
Βλαβάκη Μ., 433,
Βλαντή Α., 57,
Βλαχογιάννης Ι., 197,
Βλαχοδημητρόπουλος Δ., 437,
Βλαχονάσιος Κ.Ε., 35,
Βλάχος Γ., 289,
Βλάχου Α., 285,
Βογιατζής Ν., 27, 67,
Βοργιάς Κ.Ε., 153, 181, 387,
Βοττέας Β., 25,
Βουρεκάς Α., 419,
Βουρνάζου Β., 37,
Βουτσάς Ι., 41, 147,
Βουτσινάς Γ., 7, 151, 289,

Γ

Γαϊτανάκη Αικ., 1, 55, 113, 155, 253,
349, 353, 381,
Γαλανάκης Ε., 429,
Γαλάρης Δ., 73, 165, 277,
Γαλάτης Β., 139, 161, 307,
Γαραντωνάκης Ν., 171,
Γαριού-Παπαλεξίου Α., 421,
Γαρμπής Σ., 87,
Γερμπανάς Γ.Β., 39,
Γεωργακά Μ.Β., 297,
Γεωργάκη Σ., 41, 157,
Γεωργίου Ι., 205,
Γεωργίου Χ.Δ., 191,

Γεωργοπούλου Α., 43,
Γεωργούλης Αν., 437,
Γιάγκου Μ., 141, 163, 343,
Γιαννούλη Σ., 45,
Γιώτη Ι., 63, 233,
Γκανή-Σπυροπούλου Κ., 395, 415,
Γκαρνέλης Θ., 167,
Γκέλια Δ., 47,
Γκιγκέλου Φ., 59,
Γκίκας Δ.Β., 49,
Γκιώνης Β., 297,
Γκόνος Ε.Σ., 145,
Γκουβίτσας Θ., 171,
Γκουντέλα Σ., 199,
Γκρίτζαλης Κ., 129,
Γλαρόπουλος Α., 51, 245,
Γουλιέλμος Γ. Ν., 53, 429,
Γουργού Ε., 55,
Γουρνάς Χ., 57,
Γούτας Ν., 437,
Γρίβας Δ., 59,
Γωγάκος Σ., 351,

Δ

Δανηλίδης Δ.Β., 149,
Δασούλα Α., 61,
Δεβετζή Μ., 63,
Δελιδάκης Χ., 57,
Δερμιτζάκη Χ., 269,
Δημητριάδης Β.Κ., 77, 99, 101,
Δημητριάδου Ε., 65,
Δημητρίου Η., 129,
Δημόπουλος Ε.Γ., 15,
Δημόπουλος Μ.Α., 147,
Δημοπούλου Α., 27, 67,
Διαλλινάς Γ., 57, 123, 199, 215, 305,
311,
Διαμαντοπούλου Ζ., 69,

Διαπούλη Φ., 41,
Διβριώτη Ι., 71,
Διοκμετζίδου Α., 45,
Δούλαλα Χ., 261,
Δούλιας Π-Θ., 73, 165,
Δραΐνας Δ., 419,
Δραΐνας Κ., 19, 103, 127, 207, 331,
419,
Δρακόπουλος Α., 197,
Δρόσος Γ., 437,

Ε

Ελευσινιώτη Α.Λ., 75, 89,
Ευθυμιόπουλος Σ., 87, 335, 409,
433,
Ευστρατίου Μ.Α., 37,

Ζ

Ζαμπίρα Ι., 223,
Ζάννου Α., 77,
Ζαρκάδας Θ., 37,
Ζαρκάδης Ι.Κ., 249, 443,
Ζάττας Δ., 45,
Ζαχαριουδάκης Γ., 79,
Ζαχαροπούλου Α., 299, 339, 421,
Ζερβουδάκης Γ., 191,
Ζιαβρά Δ., 223,
Ζολώτα Ζ., 81,
Ζουριδάκης Μ., 191,
Ζούρος Ε., 31, 53, 91, 95, 267,
Ζυγουρίδης Ν., 83,
Ζωγραφίδης Α., 85,

Η

Ηλιάδης Π., 363,
Ηλιάδου Α., 87,
Ηλιόπουλος Η., 53, 429,

Θ

Θεοδωρακοπούλου Α., 115,
Θεοδωροπούλου Μ.Κ., 89,
Θεολογίδης Γ., 91,
Θεσσαλού-Λεγάκη Μ., 217,
Θωμαδάκη Ε., 93,

Ι

Ιατρού Γρ., 223,
Ιερεμιάδου Φ., 95,
Ιορδανίδου Α., 97,
Ισιδωρίδου Μ.Ρ., 379,
Ίτζιου Α., 99, 101,
Ιωαννίδου Ε., 403,

Κ

Καβακιώτης Κ., 103,
Κάγκαλου Ι., 241, 273, 423, 445,
Κακάνη Ε., 105, 421,
Καλαβριζιώτη Δ., 419,
Καλαμπόκη Λ., 107,
Καλανταρίδου Σ., 61,
Καλαντίδης Κ., 109,
Καλιάφας Α., 319, 365,
Καλλιμάνης Α., 103, 127, 207,
Καλογιάννη Μ., 77, 81, 111, 189, 195,
361, 447,
Καλπαχίδου Θ., 113,
Καλπαξής Δ.Λ. 39, 167,
Καλφακάκου Β., 241,
Καμπράνης Α., 115,
Καναβάρος Π., 73,
Κανινή Γ.Σ., 117,
Καντζιλιάκης Κ., 137,
Καούρης Χ., 119,
Καπίρης Κ., 121,
Καποδίστρια Κ., 237,
Καπόλας Γ., 85,

Καπουράλου Δ., 271,
Καραγιάννης Β., 403,
Καραγιάννης Φ., 209,
Καραγκούνη Α.Δ., 5, 117, 229, 279,
333, 383,
Καρακώστα Λ., 125,
Καραλή Ε., 283,
Καραμανλίδου Χ., 239,
Καραμέρης Α., 233,
Καράμπαμπα Φ., 247,
Καραμπίκα Ε., 127,
Καραούζας Ι., 129,
Καρατζά Π., 43, 131,
Καρναούρη Α.Χ., 133,
Καρυοφύλλης Δ., 139,
Καρχιλιάκη Ε., 231,
Κασπαριάν Χ., 25,
Καστρίτης Π.Λ., 135,
Κατσαρός Χ., 139,
Κατσικάρη Α., 141,
Κατσίκη Α., 143,
Κατσίκη Μ., 145,
Κατσίλα Θ., 41, 147,
Κατσίφας Ε.Α., 117, 333, 383
Κατσούλας Χ., 41,
Κατσώρης Π., 69, 197,
Καφούρης Σ., 149,
Καχρίλας Σ., 151,
Κέρου Μ., 153,
Κεφαλογιάννη Ε., 155,
Κεχαγιάς Γ., 293,
Κιτρομηλίδου Χ., 157,
Κίττας Χ., 437,
Κλεόπα Μ., 125,
Κλέτσας Δ., 7, 289,
Κλημέντζου Π., 371,
Κοζάου Ζ., 159,
Κοκκίνη Σ., 71,

Κολιάκος Γ., 77, 81, 189, 195, 361, 403, 447,
Κολονέλου Χ., 325,
Κόμης Γ., 161,
Κομητοπούλου Κ., 201, 329,
Κοντάνα Α., 163,
Κοσμίδης Ν., 53,
Κοτζαμπάσης Κ., 137,
Κοτόγλου Π., 165,
Κούβελα Α.Χ., 167,
Κούβελος Α., 115,
Κουβέλης Β.Ν., 49,
Κουγιανού-Κουτσούκου Σ., 235,
Κουζή-Κολιάκου Κ., 403,
Κουκ Κ.Μ., 71,
Κούκκου Α.Ε., 103, 127, 207,
Κούκλης Π., 259,
Κουλούκουσα Μ., 437,
Κουμή Κ., 159,
Κουντούρη Ε., 15, 347,
Κουρουνάκη Α., 343,
Κουρτζέλης Ι. 169,
Κούρτη Α., 171,
Κουσουλάκος Σ., 285, 389, 391,
Κουστένη Β., 173,
Κουτσογιαννούλη Ε., 175,
Κρητικός Η., 429,
Κριεμπάρδης Α., 177, 179,
Κρούστη Π., 335,
Κυπραίου Μ., 181,
Κυριακίδου Η., 183,
Κυριακοπούλου-Σκλαβούνου Π., 315,
Κυρίτσης Α., 45,
Κύρκου Α., 185,
Κωλέττας Ε., 251, 281, 291,
Κωνσταντή Ο., 187,
Κωνσταντινίδης Δ., 189,
Κωνσταντινίδης Θ.Χ., 191, 411,

Κωνσταντινίδης Ν., 323,
Κωνσταντίνου Α., 157,
Κωνσταντίνου Κ., 223,
Κωσταρίδης Π., 193,
Κωστή Α., 265,
Κωστίδου Ε., 195,
Κωτάκης Χ., 137,
Κωτσαντής Π., 197,

Λ

Λαγγούσης Γ., 199,
Λαγός Δ., 201,
Λαδοπούλου Α., 259,
Λαζαρίδης Ι., 259,
Λαζαρίδου Μ., 213,
Λάζαρος Λ., 205,
Λαζάρου Δ., 203,
Λάζου Α., 9, 11, 97, 183, 253,
Λαζούρα Π., 207,
Λάλου Η., 65,
Λάμαρη Φ.Ν., 223,
Λάμνησου Κ., 25,
Λαμπροπούλου Μ., 209, 211, 237, 357, 369,
Λάμπρου Ε., 209, 211,
Λαναράς Θ., 71,
Λεγάκης Ν., 257,
Λεκανίδου Ρ., 323, 329,
Λέκκα Ε., 213,
Λενέτη Ε., 281,
Λεονάρδος Ι., 13, 241, 273, 423,
Λιακόπουλος Η., 217,
Λιάππα Χ.Θ., 219,
Λιάσκο Ρ., 273, 423,
Λιβαδάς Κ., 7, 151,
Λιβανίου Ε., 371,
Λιλής Γ., 211,
Λιμήτσιου Ο.Κ., 221,

Λιναρδάκη Ζ., 223,
Λίτου Ζ.Ι., 431,
Λουκάς Μ., 53,
Λουμπουρδής Ν.Σ., 225, 227,
Λουτράδη Α., 247,
Λουτράδης Δ., 285, 389,
Λυμπέρη Π., 363, 427,
Λυμπεροπούλου Δ.Σ., 229, 333,

Μ

Μαθιουδάκη Ε., 231,
Μαΐστρου Β., 233,
Μακαρώνα Μ., 235,
Μαλούχου-Γκρίμπα Β., 263, 271,
345, 425,
Μάμαλη Ε., 237,
Μαμάρα Α., 239,
Μαμόπουλος Α., 81,
Μαμούρης Ζ., 175, 449,
Μανέ Φ., 241,
Μάνος Γ., 281,
Μανούσου Α., 243,
Μανώλης Σ.Κ., 15, 21, 23, 119, 271,
313, 345, 347, 391, 425,
Μαργαρίτη Μ., 223,
Μαργαρίτης Λ.Χ., 29, 95, 177, 179,
187, 247, 275, 285, 287, 363,
427,
Μαργαρίτης Μ., 51, 245,
Μαργέτης Π., 247,
Μαρίνος Ε., 437,
Μαρίνου Χ., 437,
Μαριόλη Δ.Ι., 249,
Μαρκέτου Τ., 119,
Μαρκόπουλος Γ., 291,
Μαρκοπούλου Σ., 251,
Μάρκου Θ., 253,

Μαρμάρας Β. Ι., 209, 211, 237, 255,
357, 369,
Μαρούλη Ε., 433,
Ματθιόπουλος Κ., 83, 105, 299, 339,
429,
Μαυραγάνη-Τσιπίδου Π., 301,
Μαυροματίδης Β., 97,
Μαυρούλη Μ., 257,
Μαυροφρύδη Ό., 125,
Μεγαλοφώνου Π., 173, 297,
Μεϊντάνης Χ., 279, 333,
Μελαχροινού Κ., 409,
Μελιδώνη Ά.Ν., 259,
Μενούνος Π.Γ., 325,
Μέρτζιου Θ., 65,
Μεσσήνη Ν., 261, 263, 265,
Μετόχης Χ., 173,
Μηλιώνη Δ., 85,
Μητρόπουλος Κ., 325,
Μίζη Α., 267,
Μιχαηλίδης Β., 9, 11, 315,
Μιχαήλ-Κλεφτούρη Κ., 269,
Μιχαλίτση Ε., 271,
Μιχαλόπουλος Ν., 59,
Μόσιαλος Γ., 399,
Μουστάκας Μ., 35,
Μουτόπουλος Δ.Κ., 17,
Μούτου Κ.Α., 449,
Μουτσάκη Π., 273, 423,
Μπαγκλή Ε., 283,
Μπάγκος Π.Γ., 75, 89, 133, 321, 373,
407, 417,
Μπάκου Β.Ε., 275,
Μπαλτατζή Ε., 437,
Μπάμιας Α., 41, 143, 147,
Μπαρμπούτη Α., 277,
Μπατίλα Γ., 279,
Μπάτση Χ., 281,

Μπέης Ι., 1, 55, 113, 155, 349, 353,
381,

Μπέλλου Σ., 283, 393,
Μπερέτσος Π., 285, 389,
Μπίρμπας Χ., 69,
Μπίτα Θ., 197,
Μπλέτσα Ρ., 285,
Μποζίδης Π., 165,
Μπουκουβάλα Ε., 203,
Μπούμπα Ι., 205,
Μπούμπας Δ.Τ., 429,
Μπούρτζης Κ., 421,

Ν

Νάκου Ι., 65,
Νάστος Π., 25,
Νάτσης Λ., 241,
Νέζης Ι.Π., 29, 187, 275, 287,
Νεοφύτου Ν., 263,
Νίκας Β., 289,
Νικολαΐδου Α., 413,
Νικολάκη Μ., 261, 263,
Νικολάκης Δ., 25,
Νικολόπουλος Γ.Κ., 133,
Νικολούδη Α., 35,
Νινιός Ι.Π., 377,
Νουτσόπουλος Δ., 291,
Νταή Α., 159,
Ντάντος Α., 127,
Ντίνη Ε., 329,
Ντινοπούλου Β., 389,
Ντίνος Γ., 39,
Ντόβα Λ., 291,
Ντούλκα Ε., 293,

Ξ

Ξυλούρη Μ., 295,

Ο

Οικονομίδης Α.Ν., 405,
Οικονομίδης Δ., 269,
Οικονομίδου Β.Α., 219, 243, 297,
Οικονόμου Κ., 299,
Οικονόμου-Petersen Ε., 177, 179,
Ονουφριάδης Α., 301,

Π

Παλέτας Κ., 81,
Παναγιώτου Γ., 303, 331,
Πανοπούλου Α., 393,
Πάνος Π., 43,
Πανουτσόπουλος Α., 107,
Πανταζοπούλου Α., 215, 305,
Παντερής Ε., 307,
Παντής Ι.Δ., 309,
Παπαγεωργίου Ι., 311,
Παπαδημητρίου Σ., 107,
Παπαδημητρίου Χ., 163,
Παπαδημητρόπουλος Α., 197,
Παπαδόπουλος Α.Ι., 203,
Παπαδοπούλου Α., 313,
Παπαδοπούλου Λ., 183,
Παπαδοπούλου Χ., 301,
Παπαζαφείρη Π., 125, 295,
Παπαθανασίου Ε., 223,
Παπαθανασίου Ι., 315,
Παπαϊωάννου Δ., 167,
Παπαλουκάς Κ., 273, 423,
Παπαμαρκάκη Θ., 317,
Παπανδρέου Μ., 223,
Παπανδρέου Ν.Χ. 135,
Παπανικολάου Β., 319,
Παπανικολοπούλου Β.Π., 321,
Παπαντώνης Α., 323,
Παπασιδέρη Ι.Σ., 29, 177, 179, 187,
247, 363, 427, 275, 287,

Παπασπύρου Σ., 217,
Παπαχατζοπούλου Α., 325,
Παπαχρήστου Ε., 197,
Παππά Κ.Μ., 33, 327, 385,
Παππάς Β., 329,
Παραπούλη Μ., 331,
Παρασκευαΐδης Ε., 205,
Παράσχας Γ.Ι., 333,
Παρισιάδου Λ., 335,
Πασσά Ο., 337, 405,
Παταργιάς Θ., 437,
Πατρινός Γ.Π., 325,
Πατσούκης Ν., 191,
Πατσούρης Ε., 59,
Παυλόπουλος Ι., 339,
Παύλου Ε., 67,
Παύλου Μ., 61,
Παφίλης Π., 341,
Περούλης Ν., 343,
Περυσινάκης Α., 19, 103, 207, 331,
Πετρουτσά Ε.Ι., 119, 345, 347,
Πεχτελίδου Α., 349,
Πηλίδης Γ., 127,
Πιστική Α., 115,
Πιταράκης Γ., 351,
Πιτσούλη Χ., 57,
Πλαχούρας Ν., 205,
Πλιάτσκα Μ., 353,
Πολίτου Α.Σ., 355,
Πολυδώρου Χ., 35,
Πολυκράτης Α., 69,
Πουλιλιού Σ., 357,
Πρατσίνης Χ., 7, 289,
Προμπονάς Β.Ι., 221, 417,
Πρωτόπαπας Ν., 413,
Πυροβέτση Α., 175,

Ρ

Ράμφου Σ., 117,
Ραφτοπούλου Ε., 99, 101,
Ρέντεση Γ., 19,
Ρογκάκου Έ.Π., 359,
Ροδάκης Γ.Κ., 31, 91, 95, 267, 417,
Ρούσσης Β., 117,
Ρούσσο Ι., 27,
Ρούτσιας Ι., 257,

Σ

Σαββάκης Χ., 201,
Σαββίδης Α., 375,
Σαέττα Α., 59,
Σάιλερ Ξ., 361,
Σαλή Α., 363,
Σαμαράς Π., 163,
Σαμιωτάκη Μ., 331,
Σανούσι Φ.Σ., 365,
Σαρροπούλου Ε., 449,
Σέκερη-Παταργιά Κ.Ε., 377,
Σεκερλή Ε., 27, 67,
Σεραφειμίδης Ι., 123, 367,
Σιβροπούλου Α., 169, 351,
Σίδερη Μ., 369,
Σιδηρόπουλος Π., 429,
Σίμου Χ., 341,
Σκέλλα Α., 341,
Σκοπελίτη Μ., 41, 143, 147, 231,
371,
Σκορίλα Ε.Δ., 373,
Σκορίλας Α., 93,
Σκουλικίδης Ν., 129,
Σουρβίνου Ι., 375,
Σουρλίγκα Θ.Γ., 377,
Σπανάκης Ν., 257,

- Σπηλιόπουλος Π., 379,
Σταθόπουλος Κ., 45,
Σταθοπούλου Κ., 353, 381,
Σταθοπούλου Π., 383,
Σταματέλλη Α., 59,
Σταμάτης Κ., 175,
Σταματοπούλου Β., 419,
Σταμούλης Κ., 177, 179,
Σταυροπούλου-Γκικόκα Α., 231,
Σταύρου Ε.Ε., 385,
Στεργίου Κ.Ι., 17,
Στεφανάκης Ν., 25,
Στεφανίδη Ε., 153, 181, 387,
Στεφανίδης Κ., 285, 389,
Στεφάνου Δ., 241,
Στραβοπόδη Ε.Ι., 391,
Στραβοπόδης Δ.Ι., 29, 187, 275,
287,
Στρατικόπουλος Η., 299, 339,
Συνετός Δ., 191, 411,
Σύρρου Μ., 27, 61, 65,
Σφαιρόπουλος Ν., 27,
Σφλώμος Γ., 393,
Σφυρόερα Γ., 443,
Σωτηριάδης Α., 61,
Σωτηριάδου Κ., 311,
Σωτηρίου Π., 395,
- Τ**
- Ταβουλάρη Σ., 397,
Ταλαμάγκας Α., 5,
Ταλιέρη Μ., 63, 233,
Τασιγιώργος Σ., 235,
Τάταρη Μ., 237,
Τενοπούλου Μ., 73,
Τζαβάρας Θ., 165, 291,
Τζήμας Χ., 399,
Τζούφη Μ., 65,
- Τόπακας Γ., 231,
Τοπαλίδης Α., 27, 67,
Τουλούπη Κ., 239,
Τουράκη Μ., 239,
Τριανταφυλλίδης Α., 273,
Τρουγκάκος Ι.Π., 401,
Τσάγιας Ν., 403,
Τσάκας Σ., 357, 369,
Τσάλαβος Σ., 337, 405,
Τσαλίκη Ε., 25,
Τσαούσης Γ.Ν., 407,
Τσαχάκη Μ., 409, 433,
Τσελίκα Σ., 411,
Τσιάμης Κ., 413,
Τσιάμπας Ε., 63,
Τσιατάς Μ., 41, 143, 147,
Τσίκληρας Α., 13,
Τσίρη Δ., 395, 415,
Τσιρίγος Κ.Δ., 321, 417,
Τσιτλαΐδου Μ., 419,
Τσιτσιλώνη Ο.Ε., 41, 143, 147, 157,
371, 231,
Τσιφτσόγλου Α., 183,
Τσιώλη Π., 263,
Τσιώτης Γ., 137,
Τσουμάνη Μ., 13, 423,
Τσουμάνη Κ., 421,
Τύπας Μ.Α., 49,
- Φ**
- Φιλιππέτης Α., 265,
Φλυτζάνης Κ.Ν., 107, 159,
Φλώρος Κ., 93,
Φουντουλάκης Γ.Ε., 15, 425, 345,
Φουντούλη Α., 3,
Φραγκοπούλου Α., 427,
Φράγκος-Λιβάνιος Λ., 331,
Φραγκούλη Ε., 429,

Φραντζιός Γ., 301,
Φριλίγγος Ε., 43, 131, 397,
Φρούσιος Κ.Κ., 431,
Φωτεινοπούλου Α., 433,
Φωτόπουλος Α., 241,
Φώτσης Θ., 185, 283, 393, 435, 441,

Χ

Χαβάκη Σ., 437,
Χάλκου Κ.Ι., 279,
Χαμόδρακας Σ.Ι., 75, 89, 133, 135,
219, 243, 297, 321, 373, 407,
417, 431, 439,
Χαραλαμπίδης Κ., 85, 395, 415,
Χατζή Ε., 205,
Χατζηβασιλείου Ε., 399,
Χατζηϊωάννου Κ., 427,
Χατζηλουκάς Ε., 331,
Χατζηνικολάου Δ.Γ., 5, 117, 383,
215, 279, 375,
Χατζηπέτρου Α., 343,
Χατζοπούλου-Κλαδάρá Μ., 97,
Χήνου Ι., 145, 395, 415,
Χήρα Π., 441,
Χιντήρογλου Χ., 51, 245,
Χονδρογιάννη Ν., 145,
Χονδρού Μ.Π., 249, 443,
Χριστοπούλου Ν.Θ., 445,
Χρυσalίδου Σ., 447,
Χρυσάνθου-Πιτερού Μ., 379,
Χρυσικοπούλου Ε., 77,
Χρυσικός Γ., 297,

Ψ

Ψαθή Ε., 313,
Ψιχάρη Ε., 441,
Ψόχιου Ε., 449,