

**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**24^ο Ετήσιο Συνέδριο
Ερέτρια Μάιος 2002**

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

(ABSTRACTS)

Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ: Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΣΑΥΡΑΣ *Podarcis milensis* ΣΤΗ ΜΗΛΟ

Αδαμοπούλου, Χ. και Α. Λεγάκης

Ζωολογικό Μουσείο, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, 157 84 Αθήνα

Η σαύρα *Podarcis milensis* είναι ένα είδος ενδημικό της Μήλου και των γύρω νησιών που προστατεύεται από την ελληνική και τη διεθνή νομοθεσία. Για να είναι αποτελεσματικά τα μέτρα προστασίας της, είναι απαραίτητη η γνώση ορισμένων στοιχείων της βιολογίας της. Η *P. milensis* μελετήθηκε σε έναν αντιπροσωπευτικό βιότοπο της Μήλου ο οποίος διαθέτει έναν πληθυσμό με πυκνότητα περίπου 500 άτομα/ha, μια πυκνότητα η οποία είναι από τις μεγαλύτερες που έχουν υπολογιστεί στον ελλαδικό χώρο. Οι θηλυκές *P. milensis* γεννούν 1-3 αυγά σε κάθε γέννα, αριθμός ο οποίος είναι μεν σχετικά χαμηλός, συνοδεύεται όμως από την παρατεταμένη αναπαραγωγική περίοδο και τον αυξημένο αριθμό γεννών το χρόνο. Η *P. milensis* έχει μια ισορροπημένη δίαιτα που περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος ασπονδύλων στα οποία επικρατούν είδη με συναθροιστική κατανομή. Η τροφή περιλαμβάνει επιπλέον και φυτικό υλικό. Η *P. milensis* προτιμά περιοχές με θάμνους κάτω από τους οποίους βρίσκει τροφή και προστασία από τις ακραίες καιρικές συνθήκες και τη θήρευση, η ένταση της οποίας φαίνεται να είναι υψηλή. Χρειάζεται όμως και ακάλυπτους χώρους τους οποίους χρησιμοποιεί για θερμορρύθμιση καθώς θεωρείται περιστασιακός θερμορρυθμιστής με πλαστικότητα στη θερμορρυθμιστική συμπεριφορά. Η συμπεριφορά της απέναντι στα άλλα άτομα του ίδιου είδους καθορίζεται τόσο από τον ιδιαίτερο χρωματισμό που διαθέτουν κυρίως τα αρσενικά άτομα, όσο και από μια σειρά τυποποιημένων συμπεριφορών. Συμπερασματικά, η *P. milensis* φαίνεται να είναι ένα είδος καλά προσαρμοσμένο στις τοπικές συνθήκες το οποίο δεν απειλείται άμεσα αυτή τη στιγμή. Όμως ανθρώπινες δραστηριότητες, όπως η απομόνωση των πληθυσμών, η αλλαγή των χρήσεων γης, η εισαγωγή θηρευτών και η χρήση φυτοφαρμάκων, μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά αυτές τις ικανότητες προσαρμογής και να δημιουργήσουν σοβαρά προβλήματα καθώς το είδος δεν έχει πιθανώς την ικανότητα να προσαρμοστεί εύκολα σε νέες συνθήκες.

THE IMPORTANCE OF ECOLOGICAL RESEARCH FOR THE CONSERVATION OF SPECIES: THE CASE OF THE LIZARD *Podarcis milensis* IN MILOS ISLAND

Adamopoulou, C., and A. Legakis

Zoological Museum, Dept. of Biology, Univ. of Athens, Panepistimioupolis, 157 84 Athens, Greece

The lizard *Podarcis milensis* is an endemic species of Milos and surrounding islands, which is protected by Greek and international legislation. In order to take effective protection measures, knowledge of some elements of its biology is necessary. *P. milensis* was studied in a representative biotope on Milos where the population density was 500 ind./ha, a density which is one of the highest recorded so far from Greece. Female *P. milensis* give birth to 1-3 eggs in every batch, a low number which is accompanied however, by an extended reproductive period and an increased number of births per year. *P. milensis* has a balanced diet that includes a large range of invertebrates, in particular species with aggregated distribution. The diet also includes plant material. *P. milensis* prefers areas with bushes under which it finds food and protection against predation which seems to be high. It also needs open spaces, which it uses for thermoregulation as it is considered to be an occasional thermoregulator presenting a flexible behavior. Its behavior towards conspecific individuals is determined by specific coloration patterns, especially in males, and by a series of stereotyped behavioral patterns. In conclusion, *P. milensis* seems to be a species well adapted to the local conditions, which is not threatened at the moment. However, human activities such as isolation of populations, changes in land uses, introduction of predators and use of pesticides, may affect negatively its abilities to adapt, and thus create serious problems since the species may not be flexible enough to adapt easily to new conditions.

ΛΕΥΚΟ Η ΚΟΚΚΙΝΟ; ΧΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΠΙΛΟΓΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΣΤΑ ΑΝΘΗ ΤΟΥ *Nerium oleander*

Αθανασόπουλος, Α., Μειντάνης, Χ., Ριζοπούλου, Σ. και Α.Α. Καραγκούνη

Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη Αθήνα 15784

Είναι γενικώς αποδεκτό ότι τα χρώματα που παρατηρούμε στα άνθη των φυτών είναι στην πραγματικότητα το αποτέλεσμα της αντανάκλασης του φωτός προς τις διάφορες χρωστικές ουσίες, που εντοπίζονται σε αυτά. Οι χρωστικές των φυτών είναι κυρίως δυο τύπων: καροτινοειδή και φλαβονοειδή. Τα καροτινοειδή είναι κίτρινα, πορτοκαλί και κόκκινα τερπένια. Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια τάξη δευτερευόντων μεταβολιτών, άφθονα σε όλα τα ανώτερα φυτά. Παίζουν σημαντικό ρόλο στο χρωματισμό του άνθους και παρέχουν προστασία στο φυτό έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας, καθώς και των φυτοφάγων ζώων και μικροοργανισμών.

Σκοπός της εργασίας είναι να εξετασθεί αν η βακτηριακή χλωρίδα του άνθους του φυτού *Nerium oleander* (πικροδάφνη), «επηρεάζεται» από το χρώμα του.

Από λευκά και κόκκινα άνθη του φυτού *Nerium oleander* απομονώθηκαν σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα βακτηριακά στελέχη, τα οποία διαχωρίστηκαν σε επίπεδο είδους με βάση τα πρότυπα των στελεχών όπως προκύπτουν από Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) όπου ενισχύονται τα τμήματα που βρίσκονται μεταξύ των BOX περιοχών του προκαρυωτικού γονιδιώματος. Συνολικά απομονώθηκαν 21 βακτηριακά στελέχη από κόκκινα και 20 από λευκά άνθη του *Nerium oleander*.

Ακολούθησε συγκριτική ανάλυση μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών τα οποία έδωσαν διαφορετικά πρότυπα στο BOX-PCR με σκοπό να διαπιστωθούν ποιοτικές αλλά και ποσοτικές διαφορές στην σύσταση των δυο βακτηριακών πληθυσμών, αλλά και να εκτιμηθεί εάν τα φλαβονοειδή επιδρούν στη βακτηριακή χλωρίδα του άνθους.

DIFFERENTIATION IN BACTERIAL POPULATION DUE TO FLOWER COLOR OF *Nerium oleander*

Athanasopoulos, A., Meintanis, C., Rhizopoulou, S., and A.D. Karagouni

Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis 157 84, Athens - Greece

The color that we see in flowers is actually the result of reflected light from various plant pigments.

The colored pigments of plants are of two principal types: carotenoids and flavonoids. Carotenoids are yellow, orange and red terpenoid compounds. The flavonoids constitute a large group of secondary plant metabolites that are ubiquitous among higher plants. They are phenolic compounds that serve important functions in flower pigmentations and importantly provide plants with UV protection, as well as protection against herbivores and microbes.

The aim of this work was to examine if the composition of the bacterial community is affected by the flower color in *Nerium oleander*.

We isolated 21 bacterial strains from white and 20 from red flowers of *Nerium oleander*, using selective nutrient media. The isolates were distinguished using BOX –PCR genomic fingerprint patterns.

In order to determine the differences between the bacterial populations on white and red flowers, as well as the effect of flavonoids on the microflora, we did comparative study of the different BOX-PCR profiles, gained from the isolates.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΜΕ ΟΖΟΝ ΣΕ ΔΕΥΤΕΡΟΒΑΘΜΙΕΣ ΕΚΡΟΕΣ

Ανασοντζής, Γ.Ε.¹, Σαμαράς, Π.², Πεταλά, Μ.², Σακελλαρόπουλος, Γ.Π.²,
Λαζαρίδου-Δημητριάδου Μ.¹

¹Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54006, Θεσσαλονίκη

²Ινστιτούτο Τεχνικής Χημικών Διεργασιών/ Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης
και Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Η απολύμανση των αστικών λυμάτων πριν την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον είναι πλέον επιτακτική. Αποτελεί απαραίτητο στάδιο, ώστε να εξασφαλιστεί ότι ο άνθρωπος και το φυσικό του περιβάλλον δεν θα διατρέχουν κανένα κίνδυνο από την επαναχρησιμοποίησή και τη διάθεσή τους. Σήμερα είναι γνωστό ότι κατά τη χλωρίωση των λυμάτων παρουσία οργανικών ουσιών παράγονται τοξικές ενώσεις όπως τα αλογονωμένα μεθάνια. Για το λόγο αυτό, η χλωρίωση δεν ενδείκνυται, ιδιαίτερα αν ενδιαφέρει η επαναχρησιμοποίηση των επεξεργασμένων λυμάτων. Έτσι, η χρησιμοποίηση του όζοντος αποτελεί μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική μέθοδο απολύμανσης.

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του όζοντος ως οξειδωτικού και απολυμαντικού μέσου. Επιπλέον, οι ιδιότητες τοξικότητας των παραγόμενων λυμάτων εξετάζονται με συνδυασμό χημικών αναλύσεων και αναλύσεων με βιοδοκιμές.

Τα δείγματα λυμάτων ελήφθησαν από ένα σύστημα βιολογικού καθαρισμού ενεργού ιλύος, από την έξοδο μιας δεξαμενής δευτεροβάθμιας καθίζησης. Υπέστησαν απολύμανση με όζον σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ενεργού όζοντος, 4,2mg/L και 8,4mg/L. Σε κάθε περίπτωση, ο χρόνος επαφής ήταν 5, 10 και 20min. Ακολούθησαν οι φυσικοχημικές μετρήσεις, οι μικροβιολογικές αναλύσεις και οι βιοδοκιμές.

Όσον αφορά στα προκαταρκτικά αποτελέσματα, στην υψηλή δόση όζοντος το δείγμα τείνει να προσεγγίσει τα όρια του WHO για το πόσιμο νερό, μικροβιολογικά και χημικά. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω ανάλυση πριν αυτό χαρακτηριστεί ως πόσιμο. Από την άλλη, στη δόση των 4.2mg/L, το νερό δεν μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί ούτε στη γεωργία, ούτε στις ιχθυοκαλλιέργειες. Απαιτείται πιθανώς μια μέση δόση. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι μεγαλύτερη σημασία για την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης έχει η δόση του όζοντος που εφαρμόζεται παρά ο χρόνος επαφής. Τέλος, δεν βρέθηκαν σημαντικές ιδιότητες τοξικότητας στα απόβλητα.

EFFECT OF DISINFECTION USING OZONE ON SECONDARY EFFLUENTS

**Anasontzis, G.E.¹, Samaras, P.², Petala, M.², Sakellaropoulos, G.P.²,
Lazaridou-Dimitriadou, M.¹**

¹Dept. of Zoology, Sch. of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, 54006, Thessaloniki

²Chemical Process Engineering Research Institute / Center for Research and Technology-Hellas and Department of Chemical Engineering, Aristotle University of Thessaloniki

Disinfection of municipal wastewater, prior to its discharge into the environment, is essential in order to achieve the lowest environmental impact to an ecosystem. However, chlorine disinfection may result in the formation of toxic byproducts, such as trihalomethanes (THM), in the presence of organic substances. Thus, chlorination as a method of disinfection is avoided, especially in cases where wastewater is going to be reclaimed and reused in various applications. Thus, the use of ozone as an alternative disinfectant is an interesting prospect.

The aim of this work is the evaluation of the effectiveness of ozone disinfection on the properties of secondary effluents. The characteristics of disinfected wastewater were determined by the measurement of their chemical properties and their toxic characteristics by bioassays.

The samples were collected from the secondary sedimentation basin, of an activated sludge wastewater treatment plant. Disinfection of the samples took place by using two different concentrations of ozone, 4.2mg/L and 8.4mg/L. In each case, the reaction time varied from 5 to 20min. Afterwards the physicochemical, microbiological and toxicity analysis took place.

From these preliminary results, it was found that the sample, which was treated by the highest dose of ozone, presented characteristics similar to the threshold set by WHO for drinking water in all three test methods. On the other hand, when using the lowest dose of ozone, wastewater should not be reused neither in agriculture nor in aquaculture. An average dose of ozone seems to be necessary for the proper disinfection. Finally, it was assumed that concentration was the critical factor for wastewater disinfection, rather than time of reaction.

ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟ-ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΧΑΡΟΥΠΙΑ (*Ceratonia siliqua*) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΠΙΤΑΧΥΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

Αντωνάκης Ε., Χρυσάνθης Γ. και Α. Καλιάφας

Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης
Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Στην Ελλάδα ευδοκίμει το φυτό *Ceratonia siliqua* (κοινώς χαρουπιά), το οποίο φύεται σε περιθωριακά εδάφη, έχει ελάχιστες καλλιεργητικές φροντίδες και υδατικές απαιτήσεις, εμφανίζει καλή στρεμματική απόδοση καθώς και υψηλή συγκέντρωση σακχάρων (40-50%) στον καρπό του.

Η παραγωγή υψηλόβαθμων σακχαρούχων εκχυλισμάτων του περικαρπίου του χαρουπιού είναι δυνατή μετά από κατάλληλη επεξεργασία, όπως αυτή περιγράφεται στην εργασία. Το πλέον σημαντικό αποτέλεσμα αφορά τη διαδικασία παραγωγής βιο-αιθανόλης, η οποία βελτιώνεται θεαματικά με τη συμμετοχή του προτεινόμενου οργανικού φορέα, ο οποίος αφθονεί στον ελλαδικό χώρο (μικροκύλινδροι οξιάς).

Το σύνολο των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η χρήση διάταξης του εν λόγω φορέα σε βιοαντιδραστήρες μιας παρτίδας (batch reactors) με γόμωση μειώνει το χρόνο ζύμωσης έως 3 φορές, αυξάνει την αντοχή των κυττάρων του βιοκαταλύτη σε υπερωσμωτικό περιβάλλον αλλά και έναντι της τοξικότητας της αλκοόλης, παράγει τελικό προϊόν με υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης έως 30% συγκριτικά με τις συνθήκες της βιομηχανίας και εμφανίζει σημαντική βιωσιμότητα (χρήση του ίδιου φορέα 30 φορές με σταθερή απόδοση). Τέλος αξιοποιούνται φθηνά ελληνικά προϊόντα (*Ceratonia siliqua*) ως υποστρώματα αλλά και υλικά από την ελληνική χλωρίδα (*Pinus sp.*, *Quercus ispanica*) ως φορείς ακινητοποιημένων κυττάρων αλλά και ως επιταχυντές της αλκοολικής ζύμωσης.

Συμπερασματικά, η λειτουργία οργανικών φορέων ως προαγωγών της αλκοολικής ζύμωσης σε συνδυασμό με την ακινητοποίηση των κυττάρων του βιοκαταλύτη στη πορώδη επιφάνειά τους, όπως έδειξε μελέτη με Η.Μ., προβάλλει ως μια ενδιαφέρουσα πρόταση για τη μετατροπή με μικρό κόστος των κλασικών ζυμωτήρων, σε βιοαντιδραστήρες με βελτιωμένη παραγωγικότητα αιθανόλης.

IMPROVEMENT OF BIOETHANOL PRODUCTION PROCEDURE FROM *Ceratonia siliqua* USING IMMO- BILIZED CELLS AND ORGANIC ACCELERATORS OF ALCOHOLIC FERMENTATION

Antonakaki, E., Chrysanthis, G., and A. Kaliafas

Laboratory of Applied Microbiology, Section of Genetics, Cell Biology and Development
Department of Biology, University of Patras

Ceratonia siliqua, commonly carob tree, is a greek plant that grows in marginal soils, needs limited care and water. It also has very good productivity and high concentration of sugars (40-50%) in its fruit.

The production of dense saccharate extracts from carob pods is feasible after appropriate process as described in the project. The most important result concerns the procedure of alcohol production, which is improved spectacularly with the participation of the suggested organic carrier (microcylinders of beech).

The whole number of the results showed that the use of beech arrangement in packed bioreactors reduces fermentation time up to 3 times, increases alcohol and osmotic resistance of the biocatalyst cells, brings out a product with higher ethanol concentration up to 30 % compared with industry standards and shows significant viability (use if the same carrier 30 times with the same yield). There are also being utilized inexpensive greek products *Ceratonia siliqua* and *Pinus* sp., *Quercus ispanica* as substrate and accelerators, respectively, of alcoholic fermentation.

Concluding, the organic carriers as promoters of alcoholic fermentation combined with the immobilization of cells on their porous surface, as observed in S.E.M., raises an interesting proposal for the low cost conversion of classic fermentors to bioreactors with improved alcohol productivity.

ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΟΕΙΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΜΙΑ ΝΕΑ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΣΥΓΓΕΝΟΥΣ ΑΝΑΙΜΙΑΣ

Αντωνέλου, Μ.Χ., Παπασιδέρη, Ι.Σ., και Λ.Χ. Μαργαρίτης

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη, Αθήνα 15784

Στην εργασία αυτή παρουσιάζουμε τον πρωτότυπο κυτταροβιολογικό φαινότυπο που προκύπτει από το συνδυασμό της Συγγενούς Δυσερυθροποιητικής Αναιμίας τύπου Ι (CDA-I) με την αιμοσφαιρινοπάθεια-H σε έναν ασθενή. Ανάλυση της λεπτής δομής και ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία σε ερυθροειδή κύτταρα του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος του ασθενή, αποκαλύπτουν δυσπλαστικές και συστατικές αλλαγές τυπικές αμφοτέρων των συνδρόμων αλλά και άλλες οι οποίες είναι πρωτοφανείς και αποδίδονται στο συνδυασμό τους. Σε αυτές τις αλλαγές συμπεριλαμβάνονται μηχανική αστάθεια της πλασματικής μεμβράνης, ανίχνευση πρωτεϊνικών ιζημάτων ασυνήθιστης ενδοκυττάριας τοπολογίας και σύστασης, πληθώρα κενοτοπίων στο κυτταρόπλασμα, υψηλά ποσοστά διπυρήνωσης των ερυθροβλαστών και ενδείξεις αυξημένης ερυθροφαγοκυττάρωσης και απόπτωσης. Τα ευρήματα επιβεβαιώνουν τις διαταραχές της πρωτεϊνοσύνθεσης και τις επιδράσεις τύπου β-Μεσογειακής αναιμίας που επιφέρει η CDA-I σε κυτταρικό επίπεδο, στοιχειοθετούν έναν κυτταρικό φαινότυπο διαγνωστικής σημασίας και αναδεικνύουν την αξία της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας στη μελέτη της δυσερυθροποίησης.

*Το ερευνητικό έργο χρηματοδοτήθηκε από τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας
Πανεπιστημίου Αθηνών ΕΛΚΕ: 70/4/5719, 2001 στην Ι. Σ. Π.*

STRUCTURE AND COMPOSITION OF THE ERYTHROID CELLS IN A NOVEL CASE OF CONGENITAL ANAEMIA

Antonelou, M.H., Papassideri, I.S., and L.H. Margaritis

University of Athens, Faculty of Biology, Department of Cell Biology & Biophysics,
Panepistimiopolis, Athens 15701

We present a unique cell phenotype that is produced by the combination of Congenital Dyserythropoietic Anaemia type I (CDA-I) with the haemoglobin-H disease in a patient. Fine structure and Transmission Electron Microscope immunolabeling analysis of the patient's bone marrow and peripheral blood erythroid cells revealed dysplastic and referential cell changes typical of both syndromes, as well as novel changes produced by the combination of the above mentioned defects. The novel findings include the mechanical instability of the plasma membrane, the detection of protein precipitates of unusual cellular topology and composition, the excessive vacuolation of the cytoplasm, the high percentage of binucleated erythroblasts and the evidence of increased erythrophagocytosis and apoptosis. The reported data confirm the notion that the CDA-I induces disturbances of the protein synthesis and effects of the β -Thalassaemia-type at the cell level prescribe a cell phenotype of diagnostic importance and provide additional evidence of the usefulness of the Electron Microscopy in the study of dyserythropoiesis.

*Supported by the Special Account for Research Grants of Athens University, SARG: 70/4/5719,
2001 to I. S. P.*

ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Αποστολοπούλου Μ.

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

Η αειφορική ανάπτυξη αποτελεί σήμερα τον διεθνώς καθιερωμένο στόχο της διαχείρισης του φυσικού περιβάλλοντος. Μεταξύ των κύριων αξόνων για την επίτευξη της είναι η περιβαλλοντική προστασία. Ο βασικός συντελεστής του προβλήματος της προστασίας του περιβάλλοντος είναι τα έμβια οικοσυστήματα.

Έχουν προταθεί πολλά συστήματα εκτίμησης των επιπτώσεων των φυσικών και διαταρακτικών παραγόντων στα οικοσυστήματα, αρκετά δε περιλαμβάνουν αποκλειστικώς μετρήσεις φυσικών και χημικών παραγόντων. Είναι όμως δύσκολο, αν όχι αδύνατο, να προβλέψουμε τις επιπτώσεις στα βιολογικά συστήματα βασιζόμενοι αποκλειστικά σε φυσικές ή χημικές αναλύσεις. Μέχρι σήμερα δεν έχει προταθεί μία αξιόπιστη μέθοδος που να προσδιορίζει την επίδραση των τιμών διαφόρων παραγόντων στους οργανισμούς χωρίς την χρησιμοποίηση οργανισμών ως δεικτών και ως πειραματικών οργανισμών.

Πρόσφατα η Σύνοδος του Ρίο αναγνώρισε τη σημασία των βιολογικών δεικτών στη λήψη αποφάσεων και αναφέρθηκε στην ανάγκη ανάπτυξης Δεικτών Αειφορικής Ανάπτυξης. Για την παρακολούθηση της κατάστασης του περιβάλλοντος έχουν αναπτυχθεί βιολογικοί/οικολογικοί δείκτες για όλα τα επίπεδα οργάνωσης των βιολογικών συστημάτων:

- Στο μοριακό επίπεδο: γονιδιακοί δείκτες για γενετικές αλλοιώσεις οργανισμών ή πληθυσμών. Επίσης δείκτες ενζυμικής δραστηριότητας, ενδοκρινολογίας, ιστοχημείας.
- Στο κυτταρικό επίπεδο: αλλοιώσεις κυτταρικής δομής, σύστασης αίματος κ.ο.κ.
- Στο οργανισμικό επίπεδο: δείκτες επιπτώσεων στη φυσιολογία (ανάπτυξη, αναπαραγωγή, μεταβολισμός) και συμπεριφορά.
- Στο επίπεδο πληθυσμών: γενετικής πληθυσμών, αλλοιώσεων στη δυναμική των πληθυσμών.
- Στο επίπεδο βιοκοινωνιών και οικοσυστημάτων: δείκτες δομής, σύστασης, λειτουργικότητας, αλλοιώσεων βιοκοινωνιών, βιολογική επισκόπηση ενδιαιτημάτων.

THE USE OF BIOLOGICAL INDICATORS FOR ENVIRONMENTAL QUALITY ASSESSMENT AND PROTECTION

Apostolopoulou M.

Department of Zoology-Marine Biology, Section of Biology, University of Athens

Sustainable development is the internationally established objective of environmental management. Among the main axes for its achievement is environmental protection. The major factor in the question of environmental protection, are the ecosystems.

Various systems for the assessment of the effects of natural and disturbance factors in ecosystems have been proposed, several of which are based exclusively on measurements of physical and chemical parameters. However, it is difficult, if not impossible, to forecast the impact in biological systems based solely on physical and chemical analyses. To date, there is no reliable method of determining the effect of the levels of various factors on organisms, without the use of organisms either as indicators or as experimental material.

Recently the Rio Conference recognised the importance of biological indicators in decision-making and referred to the necessity of developing Indicators of Sustainable Development.

In order to monitor the state of the environment biological/ecological indicators have been developed at various levels of organization.

- At the molecular level: gene indicators of genetic changes of organisms or populations, as well as indicators of enzymatic activity, endocrinology and histochemistry.
- At the cellular level: changes in the cell structure, blood composition etc.
- At the organism level: indicators of impact on the physiology (growth, reproduction, metabolism) and behaviour.
- At the population level: population genetics, changes in the population dynamics
- At the community and ecosystem levels: indicators of structure, composition, functioning, community changes, and biological survey of habitats.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΣΤΕ- ΡΙΚΩΝ Β-ΟΜΟ-ΑΖΑ-ΣΤΕΡΟΕΙΔΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΜΟΥΣΤΑΡΔΩΝ ΑΖΩΤΟΥ

Αρσένου, Ε.¹, Καραγιάννη, Β.², Κουτσουρέα, Α.¹, Μιόγλου, Ε.²,
Φουστέρης, Μ.¹, Ιακωβίδου, Ζ.², Κωλέττη, Φ.¹, Νικολαρόπουλος, Σ.¹,
και Δ. Μουρελάτος²

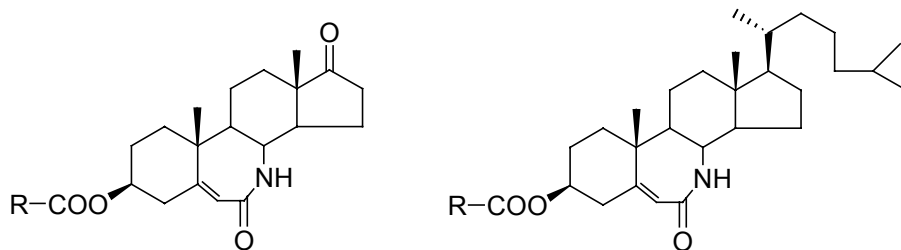
¹ Εργαστ. Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας,
Πανεπιστήμιο Πατρών.

² Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας και Γενετικής, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο
Θεσσαλονίκης, 54124 Θεσσαλονίκη.

Προγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η ύπαρξη λακταμικής ομάδας στον Δ δακτύλιο του στεροειδικού φορέα αποτελεί κρίσιμη παράμετρο για την ενίσχυση της αντινεοπλασματικής δράσης εστερικών παραγώγων μουσταρδών αζώτου με Δ-ομο-αζα-στεροειδή. Στην παρούσα μελέτη συνθέσαμε 7 νέους στεροειδικούς εστέρες μουσταρδών αζώτου, στους οποίους ο Β δακτύλιος του στεροειδικού σκελετού έχει τροποποιηθεί προς λακτάμη. Η τροποποίηση αυτή είναι ιδιαίτερου συνθετικού ενδιαφέροντος, δεδομένων των δυσκολιών που χαρακτηρίζουν παρόμοιες τροποποιήσεις. Πρόκειται για τους εστέρες των Β-ομο-αζα-λακταμικών παραγώγων του 3β-υδροξυ-5-χολεστενίου και της 3β-υδροξυ-5-ανδροστεν-17-όνης με την χλωραμπουκίλη (EA102, AK337), τον ενεργό μεταβολίτη αυτής *p*-N,N-δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινο φαινυλοξικό οξύ (EA139, AK333), το *p*-μεθυλο-*m*-N,N-δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινοβενζοϊκό οξύ (EA101, AK335), αντίστοιχα καθώς και το Β-ομο-αζα-λακταμικό παράγωγο του 3β-υδροξυ-5-χολεστενίου με το *o*-N,N-δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινοβενζοϊκό οξύ (EA103).

Στην εργασία αυτή παρουσιάζουμε τα αποτελέσματα που προέκυψαν από προκαταρκτική μελέτη της επίδρασης αυτών των μορίων στον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου (ΔΡΠ ή Δείκτης Ρυθμού Πολ/σμού) και της ικανότητάς τους να επάγουν χρωματιδικές ανταλλαγές (SCEs) στα κύτταρα αυτά. Σε ορισμένα βιολογικά συστήματα αποδείχτηκε ότι η αντινεοπλασματική και η κυτταρογενετική δράση των μουσταρδών αζώτου ενισχύονται όταν οι αλκυλιωτικοί αυτοί παράγοντες ενωθούν με συγκεκριμένο οργανικό μόριο.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες η συνεργική δράση του οργανικού τμήματος του «υβριδίου» μορίου πιθανώς να οφείλεται α) στις μεταβολές της εκλεκτικής διαβατότητας της κυτταρικής μεμβράνης καρκινικών κυττάρων (αύξηση ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του αλκυλιωτικού παράγοντα στα κύτταρα-στόχους), β) στη δυνατότητα πρόσδεσής του στο DNA και γ) στην παραγωγή δραστικών μεταβολιτών (Η AK333 για το λόγο αυτό είναι αρκετά πιο δραστική, σε μοριακή βάση, συγκρινόμενη με τη AK337, της οποίας είναι ο δραστικός μεταβολίτης).



R = *p*-μεθυλο-*m*-*N,N*-δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινο βενζοϊκό οξύ (**AK335, EA101**)
p-*N,N*- δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινο φαινυλοξικό οξύ (**AK333, EA139**)
p-*N,N*- δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινο φαινυλ βουτυρικό οξύ (χλωραμπουκίλη) (**AK337, EA102**)
o- *N,N*-δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινο βενζοϊκό οξύ (**EA103**)

Η εργασία αυτή υποστηρίχθηκε από το πρόγραμμα "Κ. Καραθεοδωρή" Νο 2456, της Επιτροπής Ερευνών του Πανεπιστημίου Πατρών

STRUCTURE BIOLOGICAL ACTIVITY RELATIONSHIP OF ESTERIC B-HOMO-AZA-STEROIDAL DERIVATIVES OF NITROGEN MUSTARDS

Arsenou, E.¹, Karayianni, V.², Koutsourea, A.¹, Mioglou, E.², Fousteris, M.¹,
Iakovidou, Z.², Koletti, F.¹, Nikolaropoulos, S.¹, and D. Mourelatos²

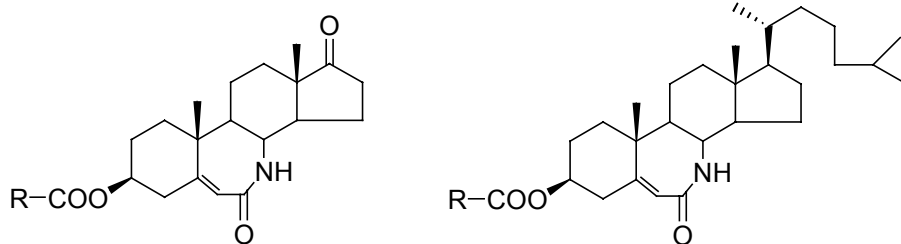
¹Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Department of Pharmacy, School of Health Sciences,
University of Patras.

²Laboratory of Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki
54124, Thessaloniki.

Previous studies showed that the existence of a lactamic moiety in the D ring of the steroidal carrier of esteric derivatives of nitrogen mustards with D-homo-steroidal lactams is a critical parameter for enhancing their antineoplastic activity. In this study we synthesized 7 new steroidal esters of nitrogen mustards in which there is a lactamic moiety in the B ring of the steroidal ligand. This modification is of specific synthetical interest, due to the difficulties, which characterize this kind of modifications. The compounds studied were the esters of the B-homo-aza-lactamic derivatives of 3 β -hydroxy-5-cholestene and 3 β -hydroxy-5-androsten-17-one with chlorambucil (EA102, AK337), its active metabolite *p*-N,N-bis(2-chloroethyl)aminophenyl acetic acid (EA139, AK333), *p*-methyl-*m*-N,N-bis(2-chloroethyl)amino benzoic acid (EA101, AK335) respectively, and the B-homo-aza-lactamic derivative of 3 β -hydroxy-5-cholestene with *o*-N,N-bis(2-chloroethyl)amino benzoic acid (EA103).

In this study, we present the results obtained from our first attempts to study the effect of the newly synthesized compounds on sister chromatid exchange (SCEs) induction and on normal human lymphocyte proliferation kinetics (PRI or Proliferation Rate Index). In some biological systems the antineoplastic and cytogenetic effects of nitrogen mustards are enhanced when the alkylating agent is bound to an organic molecule.

According to previous studies the synergistic activity of the organic part of the hybrid molecule may be possibly attributed to: a) Changes in cell membrane permeability of cancer cells (increase of the intracellular concentration of the alkylator in the target cells), b) the ability to bind on DNA and c) the intracellular production of active metabolites (compound AK333 is the active metabolite of AK337, that is why compound AK333 is quite more effective compared to compound AK337 on a molar basis).



R = *p*-methyl-*m*-N,N-bis(2-chloroethyl)amino benzoic acid (**AK335, EA101**)
p-N,N-bis(2-chloroethyl)aminophenyl acetic acid (**AK333, EA139**)
p-N,N-bis(2-chloroethyl)aminophenyl butyric acid (*chlorambucil*) (**AK337, EA102**)
o-N,N-bis(2-chloroethyl)amino benzoic acid (**EA103**)

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΟΙ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΔΑΚΟ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, *Bactrocera oleae*

Αυγουστίνος, Α., Δροσοπούλου, Ε.¹, Στρατικόπουλος, Η., Μαυραγάνη-
Τσιπίδου¹, Π., Ζαχαροπούλου, Α., Ματθιόπουλος, Κ.

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, GR-26500

¹Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειον Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, GR-54006

Το έντομο *Bactrocera oleae*, ο κοινός δάκος της ελιάς, θεωρείται ως ένα από τα πλέον βλαβερά έντομα δεδομένου ότι προκαλεί τεράστιες καταστροφές στην ελαιοπαραγωγή που κυμαίνονται από 5% έως και 60% ετησίως. Παρά την οικονομική του σημασία η γενετική καθώς και η ανάλυση των φυσικών πληθυσμών του έχουν ελάχιστα μελετηθεί.

Με στόχο τη μελέτη της γενετικής δομής φυσικών πληθυσμών του δάκου της ελιάς προχωρήσαμε στην απομόνωση μικροδορυφορικών δεικτών. Οι δείκτες αυτοί είναι πολυάριθμοι στο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών και χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό πολυμορφισμού, στοιχεία που τους καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμους σε πληθυσμιακές μελέτες. Για την απομόνωσή τους έγινε διαλογή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών με ανιχνευτές συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια. Με την πορεία αυτή απομονώθηκαν κλώνοι που η ανάλυση της πρωτοδιάταξής τους αποκάλυψε ότι 65 από αυτούς είχαν τουλάχιστον ένα μικροδορυφόρο. Εικοσιδύο από τους κλώνους αυτούς χρησιμοποιήθηκαν για την γενετική ανάλυση ατόμων από 7 διαφορετικές τοποθεσίες στον Ελλαδικό χώρο καθώς και από μία σε Ιταλία και Ισπανία. Η ανάλυση αυτή έδειξε τον αριθμό των αλληλομόρφων καθώς και τη συχνότητά τους για κάθε γενετικό τόπο. Από τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα φαίνεται ότι ο πληθυσμός της Ισπανίας εμφανίζει μεγαλύτερη ομοιογένεια και διαφοροποιείται από τους υπόλοιπους πληθυσμούς.

Ένας αριθμός μικροδορυφορικών κλώνων χρησιμοποιήθηκε για κυτταρογενετική χαρτογράφηση στα πολυταινικά χρωμοσώματα του εντόμου με *in situ* υβριδοποίηση. Οι περισσότεροι έδειξαν να έχουν μοναδική θέση στο φυσικό χάρτη. Το γεγονός αυτό θα διευκολύνει σημαντικά τον εμπλουτισμό των γενετικών χαρτών με νέους γενετικούς δείκτες.

POLYMORPHIC MICROSATELLITE MARKERS FOR THE OLIVE FLY, *Bactrocera oleae*

Augustinos, A.A., Drosopoulou, E.¹, Stratikopoulos, E., Mavragani-Tsipidou¹, P., Zacharopoulou, A., Mathiopoulos, K.D.

Department of Biology, University of Patras, GR-26500

¹Department of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, GR-54006

The olive fly, *Bactrocera oleae*, is the most devastating olive pest since it can cause an annual damage of olive production between 5% and 60%. In spite of its economic importance, there is very little known on the genetics of this insect as well as the structure of its natural populations.

Aiming at the study of the genetic structure of natural olive fly populations we isolated a set of microsatellite markers. These markers are very abundant in the eukaryotic genome and are characterized by a high degree of polymorphism. These elements make them very useful for the analysis of natural populations. Screening of genomic libraries with synthetic oligonucleotides resulted in the isolation of 65 microsatellite-containing clones, as revealed by sequencing analysis. Twenty-two of them were used in genotypic analysis of individuals from 7 different localities in Greece, one from Italy and one from Spain. This analysis revealed the number and the frequency of the different alleles for each genetic locus. Data so far indicate that the Spanish population is genetically more distant from the Italian and the Greek populations and presents a higher degree of homogeneity.

A number of microsatellite clones were also localized cytogenetically on the polytene chromosomes of this insect by *in situ* hybridization. Most clones mapped at a unique site on the cytological map. This will greatly facilitate the enrichment of genetic maps with new genetic markers.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ ΠΛΑΙΣΙΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΚΥΡΙΑΣ ΚΩΔΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C

Βασιλάκη Ν. και Π. Μαυρομαρά

Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) αποτελεί τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα πρόκλησης ιογενούς μη-A, μη-B ηπατίτιδας επιφέροντας συχνά κίρρωση του ήπατος και ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Το γονιδίωμα του ιού είναι ένα μόριο RNA θετικής πολικότητας που κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη. Αυτή ωριμάζει με τη βοήθεια ιικών και κυτταρικών πρωτεασών. Η core πρωτεΐνη (21 kDa), που αποτελεί το κύριο συστατικό του ιικού καψιδίου, συνιστά το αμινοτελικό άκρο της πολυπρωτεΐνης. Η core κωδική αλληλουχία κάποιων στελεχών του ιού έχει παρατηρηθεί να εκφράζει εκτός της 21 kDa core πρωτεΐνης (P21) και μια 17 kDa πρωτεΐνη (P17), που μέχρι πρόσφατα θεωρούταν προϊόν πρωτεόλυσης της P21. Επιπλέον, ανάλυση του γονιδιώματος του ιού HCV έχει αποκαλύψει την παρουσία ενός επιπρόσθετου ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) που επικαλύπτεται της core κωδικής αλληλουχίας στο +1 πλαίσιο. Πρόσφατα, στο εργαστήριό μας δείχθηκε ότι η P17 του πρωτότυπου στελέχους HCV-1 αντιπροσωπεύει μια νέα πρωτεΐνη, που ταυτοποιήθηκε ως core+1 εφόσον περιέχει επιτόπους των core και core+1 ORFs και ότι εκράζεται κατά τη διάρκεια της μόλυνσης με τον ιό (Βαρακλιώτη Ρ., Βασιλάκη Ν., Γεωργοπούλου Ο., Μαυρομαρά Π., JBC, υπό δημοσίευση). Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού που εμπλέκεται στην παραγωγή της core+1 πρωτεΐνης. Πειράματα σύζευξης με το γονίδιο της firefly λουσιφεράσης καθώς και κατευθυνόμενης *in vitro* μεταλλαξογένεσης ανιχνεύουν τη λειτουργία ενός ριβοσωμικού +1 πλαισιοτροποποιητικού μηχανισμού εντός της core κωδικής αλληλουχίας και υποδεικνύουν την συμμετοχή του στην παραγωγή της core+1 πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, βρήκαμε ότι : α) Η μετάφραση της core+1 ξεκινά από το εναρκτήριο κωδικόνιο της core πρωτεΐνης. β) Οι πρωτεΐνες core και core+1 έχουν κοινούς τους πρώτους 9-11 κωδικούς. γ) Η περιοχή των κωδικών 9-11 είναι καθοριστική για τη λειτουργία του +1 μηχανισμού αλλαγής του πλαισίου ανάγνωσης. δ) Το καρβοξυτελικό άκρο της core+1 πρωτεΐνης συμπίπτει με αυτό του core+1 ORF. Την περίοδο αυτή μελετάται το φαινοτυπικό αποτέλεσμα επιλεγμένων μεταλλαγών στα core και core+1 ORFs *in vivo*, σε επιμολυμένα κύτταρα.

EVIDENCE FOR THE PRESENCE OF A NOVEL RIBOSOMAL FRAMESHIFTING MECHANISM WITHIN THE CORE CODING REGION OF THE HEPATITIS C VIRUS

Vassilaki, N., and P. Mavromara

Molecular Virology Laboratory, Hellenic Pasteur Institute

Hepatitis C virus (HCV) is the major cause of non-A, non-B viral hepatitis, which frequently leads to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. HCV has a positive single-stranded RNA genome encoding a single polyprotein, which is processed by viral and cellular proteases. The core protein (21 kDa), the main component of the viral capsid, constitutes the aminoterminal part of the polyprotein. Notably, the core coding sequence of some HCV isolates was shown to express, apart from the 21 kDa core protein (P21), a 17 kDa protein (P17), which was assumed to represent a truncated form of P21. Furthermore, computer based analysis of the HCV genome has revealed the presence of an additional open reading frame (ORF), overlapping with the core coding region on the +1 frame. Interestingly, recent studies from our laboratory showed that the P17 protein of the prototype HCV-1 isolate represents a novel protein containing epitopes of both core and core+1 ORFs. For that reason, we designated this polypeptide as core+1. In addition, strong evidence was provided for its expression during natural infection with the virus (Varaklioti R., Vassilaki N., Georgopoulou U., Mavromara P., *JBC in press*). The aim of the present work was to investigate the molecular mechanism implicated with the synthesis of the core+1 protein. Tagging experiments with the firefly luciferase gene combined with site-directed *in vitro* mutagenesis studies suggested that a novel ribosomal +1 frameshifting mechanism operates within the core coding region and provided evidence for the involvement of this mechanism in the synthesis of the core+1 protein. Specifically, it was shown that : a) Core+1 utilised the same AUG initiation codon as core protein. b) Only the first 9-11 codons were common for both the core and core+1 proteins. c) The region of codons 9-11 was critical for the frameshifting. d) The carboxy-terminus of the core+1 protein coincided with the stop codon of core+1 ORF. Currently, we are evaluating the phenotype of selected mutations in the core and core+1 ORFs *in vivo*, in transfected cells.

ΜΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *ecNOS* ΜΕ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

Βασιλάκου, Μ.¹, Μαραθεύτης, Χ.¹, Κασπαριάν, Κ.², Πανταζόπουλος, Ν.²,
Βοττάς, Β.², Δέλτας, Κ.³, Λάμνισου, Κ.¹

¹Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

²Καρδιολογική Κλινική, Λαϊκό Νοσοκομείο Αθηνών

³Τμήμα Μοριακής Γενετικής, Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου

Ο πολυμορφισμός του γονιδίου *ecNOS* που κωδικοποιεί για την ενδοθηλιακή συνθεάση του μονοξειδίου του αζώτου έχει θεωρηθεί σαν ένας από τους παράγοντες που προκαλούν στεφανιαία νόσο σε κάποιους πληθυσμούς. Δυο αλληλόμορφα του γονιδίου έχουν εντοπιστεί στο εσώνιο 4 και αφορούν επανάληψη μιας αλληλουχίας 27 ζευγών βάσεων. Το μεγαλύτερο αποτελείται από 5 επαναλήψεις και ονομάζεται *b* (*NOSb*) και το μικρότερο από 4 επαναλήψεις και ονομάζεται *a* (*NOSa*).

Στην εργασία αυτή μελετήσαμε την πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού *ecNOS4* σε Έλληνες ασθενείς στους οποίους έγινε διάγνωση για στεφανιαία νόσο (CAD). Χρησιμοποιήθηκαν 60 ασθενείς ηλικίας κάτω των 60 ετών και 72 υγιή άτομα του γενικού πληθυσμού, ίδιας ηλικίας, για control. Οι συχνότητες των *bb*, *ab*, *aa* που παρατηρήθηκαν στο γενικό πληθυσμό είναι 0.69, 0.28, 0.03, αντίστοιχα, ενώ στην ομάδα των ασθενών οι συχνότητες που παρατηρήθηκαν είναι 0.67, 0.28, 0.02, αντίστοιχα. Τα δεδομένα αυτά μετά από έλεγχο με το τεστ ομοιότητας χ^2 έδειξαν ότι δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση του πολυμορφισμού αυτού με την στεφανιαία νόσο.

Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο *ecNOS4a* πολυμορφισμός δεν αποτελεί παράγοντα ρίσκου για στεφανιαία νόσο στον Ελληνικό πληθυσμό. Τα αντίθετα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν σε κάποιους άλλους πληθυσμούς, όπως π.χ. οι Ιάπωνες, φαίνεται ότι σχετίζονται με το διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο που έχουν οι Ασιάτες σε σχέση με τους Καυκάσιους (Έλληνες).

LACK OF ASSOCIATION BETWEEN ecNOS GENE POLYMORPHISM AND CORONARY ARTERY DISEASE IN THE GREEK POPULATION

**Vasilakou, M.¹, Maratheftis, C.¹, Kasparian, C.², Pantazopoulos, N.J.²,
Botteas, V.², Deltas, C.³, Lamnissou, K.¹**

¹Division of Genetics, Dept of Biology, University of Athens, Greece

²Dept of Cardiology, "Laiko" Hospital, Athens, Greece

³The Cyprus Institute of Neurology & Genetics

Genetic polymorphism in the gene for endothelial nitric oxide synthase (ecNOS) has been considered as a potential risk factor for the development of coronary artery disease (CAD) in some populations. We studied a 27 base-pair tandem repeat polymorphism in intron 4 ecNOS gene in 60 patients and 72 controls of Greek population. The patient group was consistent of subjects aged under 60 years presenting with symptomatic CAD, documented by coronary angiography. We found no significant difference in the frequency of 4ab genotypes between patients and controls. The frequencies for ecNOS4bb, ecNOS4ab and ecNOS4aa genotypes were 0.69, 0.28, 0.03, respectively, in controls compared to 0.67, 0.28, 0.02 in patients. The data between the two groups were analyzed by chi-square test. Thus, we may conclude that, in contrast to earlier findings by others from some Asian populations, we have found no evidence for an association between ecNOS4a allele as well as ecNOS4aa genotype and the risk of premature coronary disease in the Greek population.

ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΑΡΡΥΘΜΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΖΟΝΤΑΙ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΕΠΑΝΕΜΠΟΤΙΣΜΟ ΑΠΟ ΑΝΤΙ- ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

**Βασιλόπουλος, Α.¹, Κουφάκη, Μ.², Καλογεροπούλου, Θ.², Γαϊτανάκη, Κ.¹,
και Π. Παπαζαφείρη¹**

¹Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,

²Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Τα τελευταία χρόνια αυξημένο ενδιαφέρον έχει προκαλέσει ο ρόλος της οξειδωτικής βλάβης στις ασθένειες του ανθρώπου. Ειδικότερα, κατά την επανοξυγόνωση του ισχαιμικού μυοκαρδίου, οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται, επηρεάζουν την εκλεκτική διαπερατότητα των μεμβρανών και αυτό οδηγεί στην ανάπτυξη επικίνδυνων για τη ζωή κοιλιακών αρρυθμιών και/ή μαρμαρυγής.

Σκοπός της έρευνάς μας είναι η διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των αντιοξειδωτικών, που ταυτόχρονα καταστέλλουν τις αρρυθμίες. Με βάση τα αποτελέσματα από τη συνεργιστική δράση του λιποϊκού οξέος και της βιταμίνης Ε στην προστασία της ισχαιμικής-επανοξυγονωμένης καρδιάς, συντέθηκαν υβρίδια των δύο αυτών ενώσεων και μελετήθηκε η δράση τους. Επιπρόσθετα, για να εξετάσουμε αν η ηλικία επηρεάζει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, ερευνήσαμε τη δράση των αντιαρρυθμικών ενώσεων σε αρουραίους μεγάλης ηλικίας.

Η αξιολόγηση της αντιαρρυθμικής και αντιοξειδωτικής δράσης πραγματοποιήθηκε σε απομονωμένες καρδιές αρουραίου με τη χρήση της συσκευής Langerdloff. Τα επίπεδα της μαλονδϋαλδεύδης (MDA), ως δείκτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ενώσεων, μετρήθηκαν με βάση τη δημιουργία συμπλόκων με TBA. Το trolox και το λιποϊκό οξύ μείωσαν τις αρρυθμίες, αλλά τα επίπεδα της MDA δεν επηρεάστηκαν σημαντικά. Αντίθετα, οι υβριδικές ενώσεις, που ήταν ισχυρά αντιοξειδωτικά, κατέστειλαν πλήρως τις αρρυθμίες, ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά ανάμεσα στους νεαρούς και ηλικιωμένους αρουραίους. Είναι πιθανόν, η καρδιοπροστατευτική δράση να οφείλεται εν μέρει στην αντιοξειδωτική ικανότητα και επειδή οι αλλοιώσεις που δημιουργούνται κατά την ισχαιμία-επανεμπότισμό είναι πολυπαραγοντικής φύσης, η ταυτοποίηση συγκεκριμένων γεγονότων που οδηγούν στη βλάβη του μυοκαρδίου είναι απαραίτητη για την αποτελεσματικότερη προστασία του.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από τον Ε.Λ.Κ.Ε του Πανεπιστημίου Αθηνών

INHIBITION OF REPERFUSION ARRHYTHMIAS BY ANTIOXIDANTS

**Vasilopoulos, A.¹, Koufaki, M.², Calogeropoulou, Th.², Gaitanaki, C.¹,
and P. Papazafiri¹**

¹Department of Animal & Human Physiology, School of Biology, University of Athens,

²Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, National Hellenic Research Foundation

The role of free radical oxidative damage in human diseases has attracted considerable attention during the last few years. In particular, during the reoxygenation of the ischemic heart, the formation of free radicals is one of the most prominent factors responsible for the damage of cells and tissue. It is postulated that the free radicals produced during reperfusion affect the selective permeability of cell membranes leading to the development of life threatening ventricular arrhythmias and/or fibrillation.

Our research interests have focused on the mechanism of action of antioxidant compounds that could also suppress reperfusion arrhythmias. Based on the promising synergistic effects of the combined use of lipoic acid and vitamin E, hybrids of these two compounds were synthesized and their cardioprotective activity was studied. In addition, in order to examine whether age influences free radical formation, the action of antiarrhythmic compounds was also investigated in aged rats. The evaluation of the antiarrhythmic and antioxidant activity of the compounds was carried out on isolated rat heart preparations using the non-recirculating Langerdorff mode. Tissue levels of malondialdehyde (MDA) reflecting the antioxidant capacity of the compounds under study were measured by using the thiobarbituric acid assay.

Trolox and/or lipoic acid attenuated reperfusion arrhythmias but MDA levels were not significantly affected. On the contrary, the trolox-lipoic acid hybrids, which exhibited very potent antioxidant activity, totally suppressed arrhythmias during reoxygenation. Surprisingly, no difference was observed between young and aged rats. The observed cardioprotective activity is probably due only in part to their antioxidant potency although we measured total tissue MDA production and we cannot distinguish between local MDA production differences. Since the ischemia-reperfusion injury is of multifactorial nature, identification of specific events contributing to myocardial damage is necessary for more effective cardioprotection.

This project was supported by the Special Research Account of Athens University

ΨΗΦΙΑΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Βελέντζας, Α.Δ. και Λ.Χ. Μαργαρίτης

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας Παν/μιου Αθηνών
(<http://kyttariki.biol.uoa.gr>, <http://media4.biol.uoa.gr>)

Η χρήση εικόνων και video clips σε ψηφιακή μορφή μέσω πολλαπλών πηγών άντλησης πληροφοριών, έχει αναπτυχθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια τόσο για ερευνητικούς όσο και για εκπαιδευτικούς σκοπούς

Η σύλληψη **εικόνας** που μπορεί να προέρχεται είτε από μικροσκόπιο (φωτονικό – ηλεκτρονικό) η από ηλεκτροφόρημα η και από άλλες πηγές απεικόνισης πληροφοριών, γίνεται είτε μέσω ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής, η μέσω ψηφιακής ή CCD βιντεοκάμερας. Η επιθυμητή ανάλυση σε «εικονοστοιχεία» (pixels) καθώς και η φωτεινότητα του δείγματος (π.χ. φθορισμός παρασκευάσματος ή ηλεκτροφορήματος) καθορίζει και τον τύπο της συσκευής που θα χρησιμοποιηθεί. Αφού γίνει αποθήκευση στον κατάλληλο τύπο αρχείου γίνεται επεξεργασία της εικόνας είτε με γνωστά εμπορικά πακέτα, είτε με ειδικά λογισμικά ανάλυσης εικόνων. Από τις εικόνες αυτές μπορούμε να υπολογίσουμε, π.χ. μεγέθη οργανιδίων, να κάνουμε σύγκριση σε κυτταρικό επίπεδο μεταξύ διαφορετικών οργανισμών, να υπολογίσουμε τα μοριακά βάρη και τη σχετική ένταση των ζωνών σε ηλεκτροφόρημα, να ενισχύσουμε το σήμα μιας εικόνας, να προβούμε σε ψευδοχρωματισμό, κ.λ.π.

Η σύλληψη του **βίντεο** μπορεί να προέρχεται είτε από μικροσκόπιο (για ζωντανή καταγραφή φαινομένων) είτε από πειραματική διαδικασία ή μάθημα και γίνεται μέσω ψηφιακής βιντεοκάμερας. Η διαδικασία αυτή απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό Η/Υ (video grabber, ειδικό λογισμικό κ.λ.π) και αφού γίνει ψηφιοποίηση, πραγματοποιείται επεξεργασία. Αυτή μπορεί να περιλαμβάνει, α) προσθήκη ήχου (π.χ. επεξηγηματικά σχόλια), β) εφαρμογή πρωτοκόλλων συμπίεσης/αποσυμπίεσης (codecs) σε διάφορους τύπους αρχείων, π.χ. .avi και mpeg (για χρήση σε Η.Υ η σε CD) και wmv για χρήση σε ροή πολυμέσων στο Διαδίκτυο και σε διαφορετικούς ρυθμούς μετάδοσης δεδομένων» (bit rate) ανάλογα με τη χρήση του video clip (τοπικό δίκτυο ή τηλεφωνική ζεύξη – modem).

Τέλος, τα αρχεία εικόνων και video που έχουν δημιουργηθεί μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την προετοιμασία μαθημάτων με τη βοήθεια του προγράμματος PowerPoint όπου ο συνδυασμός των πολυμέσων αυτών διευκολύνει στην κατανόηση του διδακτικού αντικειμένου, ενώ παράλληλα με τη βοήθεια ειδικών Η/Υ – εξυπηρετητών πολυμέσων (media servers) προσφέρονται μέσω του Διαδικτύου είτε ζωντανά (σύγχρονη τηλε-εκπαίδευση) είτε «κατ' απαίτηση (on demand) (ασύγχρονη τηλε-εκπαίδευση). Το υλικό αυτό μπορεί επίσης να διατεθεί με τη μορφή CD-ROM.

Χρηματοδοτήθηκε από τον «Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας» του ΕΚΠΑ.

DIGITAL IMAGING AND PROCESSING IN BIOLOGICAL APPLICATIONS

Velentzas, A.D., and L.H. Margaritis

Dept. of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens
(<http://kyttariki.biol.uoa.gr>, <http://media4.biol.uoa.gr>)

Digital imaging is being widely used nowadays in order to serve multiple purposes on biological research and education

Image capturing is normally using microscope sources or electropherograms and is using digital cameras or CCDs. The desired resolution and the available illumination of the specimen (i.e. fluorescence) are critical in order to select the appropriate imaging device. Following image capturing in selected format according to the final destination of the file, appropriate image analysis software can be applied for quantitative or qualitative estimations, such as, pseudocolouring, size and distribution of cellular components, gel electrophoresis zones' intensity, molecular weight measurements, e.t.c.

Video capturing is performed through suitable grabbers on live microscope specimens or experimental procedures and lectures. Following digitization, video clip production may involve, a) commentary incorporation, b) application of compression/decompression protocols (codecs) in order to produce files of suitable format, i.e. type avi and mpeg (for local use) or type wmv (for intranet or internet client access via specific media servers).

Finally, the so made image and video files can be inserted into PowerPoint multimedia presentations for educational purposes. Thus the presentation can be watched "live" (synchronous e-learning) or "on demand" (asynchronous e-learning). The so produced material can be also distributed in the form of CD-ROM.

Supported by the "Special research account" of Athens University.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΣΠΟΝΔΥ- ΛΩΤΩΝ ΚΑΙ ΑΣΠΟΝΔΥΛΩΝ

Γαϊτανάκη Κ.

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα

Όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα αντιμετωπίζουν και αποκρίνονται *in vivo* σε διάφορες καταστάσεις στρες. Στους μηχανισμούς μεταγωγής μηνυμάτων συμμετέχουν και οι ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs). Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εξέταση της επίδρασης διαφόρων μορφών περιβαλλοντικού στρες στην ενδοκυτταρική μεταγωγή μηνυμάτων σε σπονδυλωτά και ασπόνδυλα. Στην καρδιά των αμφιβίων, το άμεσο μηχανικό στρες προκάλεσε έντονη φωσφορυλίωση και των τριών υπο-οικογενειών των MAPKs, με διαφορετικό όμως χρονικό και ποσοτικό πρότυπο. Επιπλέον, βρέθηκε ότι οι φωσφορυλιωμένες ισομορφές των κινασών αυτών κατανέμονται τόσο στον πυρήνα όσο και το κυτόπλασμα, υποδηλώνοντας τα πολλαπλά ενδοκυτταρικά τους υποστρώματα. Το οξειδωτικό (H_2O_2) και το υπερωσμωτικό στρες (0.5 M σορβιτόλης, 400 mM NaCl, ή 16 mM KCl), αλλά όχι το υποωσμωτικό, προκάλεσε άμεση και αντιστρεπτή ενεργοποίηση της κατεχοχόην εξαρτώμενης από στρες p38-MAPK. Η υποθερμία, προκάλεσε ήπια και η υπερθερμία έντονη και παρατεταμένη ενεργοποίηση της κινάσης. Με χρήση κατάλληλων αδρενεργικών αγωνιστών και ανταγωνιστών βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση των α_1 - και β -αδρενεργικών υποδοχέων επάγει την ενεργοποίηση της p38-MAPK με διαφορετικό χρονικό και ποσοτικό πρότυπο. Με χρήση κατάλληλων τεχνικών βρέθηκε ότι κάτω από τις συνθήκες στρες που εξετάστηκαν επάγεται η έντονη έκφραση του κολπικού νατριουρητικού πεπτιδίου (ANP) μέσω της φωσφορυλιωμένης p38-MAPK. Με σκοπό τη διερεύνηση των μηχανισμών μεταγωγής μηνυμάτων σε επίπεδο ολόκληρου οργανισμού, εξετάστηκαν επίσης διάφορες μορφές περιβαλλοντικού στρες στο θαλάσσιο ασπόνδυλο *M. galloprovincialis*. Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν ότι παρά τις μεγάλες διαφορές στη δομή και τη φυσιολογία των οργανισμών αυτών, σε σχέση με τα θηλαστικά, οι βασικοί μηχανισμοί μεταγωγής μηνυμάτων είναι παρόμοιοι.

Η έρευνα αυτή χρηματοδοτήθηκε από την Επιτροπή Ερευνών του ΕΚΠΑ και το Εμπειρικό Ίδρυμα Αθηνών

ENVIRONMENTAL STRESS AND INTRACELLULAR SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISMS IN VERTEBRATE AND INVERTEBRATE TISSUES

Gaitanaki K.

Dept. of Animal and Human Physiology, School of Biology, University of Athens

Eukaryotic cells face in vivo various stressful conditions and respond via different intracellular signal transduction mechanisms. MAPKs are involved in intracellular signal transduction pathways, in various cell types, altering the transcription of specific genes. The aim of the present study was the investigation of the effects of various stressful conditions on vertebrate and invertebrate tissues. In amphibian heart, direct mechanical stress, induced strong phosphorylation of all three MAPK subfamilies in a different time- and quantitative manner. Furthermore, phosphorylated MAPKs were identified in both, the cytosolic and the nuclear fractions, indicating their multiple intracellular substrates. Oxidative (H₂O₂) and hyperosmotic stress (0.5 M sorbitol, 400 mM NaCl, or 16 mM KCl), but not hypoosmotic stress, induced immediate and reversible activation of p38-MAPK. Hypothermia induced a modest whereas hyperthermia induced a strong and sustained activation of p38-MAPK. Using various specific adrenergic agonists and antagonists, we found that the activation of α_1 - and β -adrenergic receptors induces the activation of all three MAPK subfamilies, in a different time- and quantitative manner. Under the stressful conditions examined, we found that atrial natriuretic peptide (ANP) expression was also induced possibly via the phosphorylated p38-MAPK. In order to investigate the mechanisms involved at the organism level, we also examined the effects of various environmental stressful conditions on the MAPKs in *M. galloprovincialis*. The results of these studies showed that despite the fundamental structural and functional differences between mammalian and the lower vertebrates and invertebrates, the basic signal transduction mechanisms are similar.

This work was supported by grants from the Special Research Account of Athens University and the Empeirikio Foundation of Athens

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΙΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥ- ΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΜΙΤΟΓΟΝΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΔΙΑ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΙΟΥ *Rana ridibunda*

Γαϊτανάκη, Κ., Σταθοπούλου, Κ., Σταυρίδου, Χ. και Ι. Μπέης

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα

Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) πυροδοτούν ποικιλία ενδοκυτταρικών οδών μεταγωγής μηνυμάτων, που μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο με μηχανισμούς απόπτωσης. Ειδικότερα στην καρδιά των θηλαστικών, η ενδοκυτταρική συσσώρευση τέτοιων ριζών, ως αποτέλεσμα οξειδωτικού στρες κατά τη διάρκεια ισχαιμίας ή ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, μπορεί να συσχετιστεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Ανάμεσα στους διάφορους ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς μεταγωγής μηνυμάτων, περιλαμβάνονται και αυτοί στους οποίους συμμετέχουν οι MAPKs. Στο εργαστήριό μας έχουν χαρακτηριστεί και οι τρεις υπο-οικογένειες των MAPKs στην καρδιά του αμφιβίου *Rana ridibunda*. Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση οξειδωτικού στρες στις ERK, JNKs και p38-MAPKs σε σχέση με το χρόνο και τη δόση του οξειδωτικού παράγοντα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το H₂O₂, ενεργοποιεί και τις τρεις υπο-οικογένειες των MAPKs με διαφορετικό χρονικό και ποσοτικό πρότυπο. Η εξέταση της απόκρισης σε συνάρτηση με τη δόση του H₂O₂ έδειξε ότι οι JNKs και η p38-MAPK ενεργοποιούνται μέγιστα από 30 μM H₂O₂. Πειράματα με χρήση αντισωμάτων ειδικών για τις φωσφορυλιωμένες μορφές των μικρών πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP27), έδειξαν ότι το H₂O₂ επάγει έντονη ενεργοποίηση των πρωτεϊνών αυτών. Μάλιστα, ο ειδικός αναστολέας της p38-MAPK SB203580 βρέθηκε ότι αναστέλλει πλήρως την επαγόμενη από το H₂O₂ φωσφορυλίωση τόσο της p38-MAPK όσο και των HSP27. Τα αποτελέσματα συνηγορούν για τον πιθανό προστατευτικό ρόλο των MAPKs και HSP27 σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες στην καρδιά του αμφιβίου *Rana ridibunda*.

Η έρευνα αυτή χρηματοδοτήθηκε από το Εμπειρικό Ίδρυμα Αθηνών

EFFECT OF OXIDATIVE STRESS ON THE MITOGEN- ACTIVATED PROTEIN KINASES IN *Rana ridibunda* HEART

Gaitanaki, K., Stathopoulou, K., Stavridou, C., and I. Beis

Dept. of Animal and Human Physiology, School of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis
157 84 Athens Greece

Reactive oxygen radicals (ROS) initiate a variety of intracellular signalling pathways, which may lead to cell death through apoptosis. In particular, the intracellular generation of ROS as a result of oxidative stress during ischaemia or ischaemia/reperfusion in the mammalian heart may be related with various pathological conditions. Among the various intracellular signalling mechanisms, MAPKs are included. In our laboratory, all three MAPK subfamilies have been characterised in *Rana ridibunda* heart. In the present study the effect of oxidative stress on ERK, JNKs and p38-MAPK in the perfused *R. ridibunda* heart was examined. Studies on the time course of the MAPKs phosphorylation (hence activation) by H₂O₂ showed that these kinases are activated in a different manner. Studies on the H₂O₂ dose response of these kinases showed that JNKs and p38-MAPK are maximally activated by 30 µM of this substance. Experiments using antibodies specific for the phosphorylated small heat shock proteins (HSP27) showed that H₂O₂ induces strong phosphorylation/activation of these proteins. Furthermore, the specific p38-MAPK inhibitor SB203580 (1 µM) abolishes the activation of both p38-MAPK and HSP27 induced by H₂O₂. These results support the suggestion that p38-MAPK has a cardioprotective role during oxidative stress in *R. ridibunda* heart.

This work was supported by the Empeirikio Foundation of Athens

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΤΡΗΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΚΕΝΩΝ ΩΘΟΥΛΑΚΙΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΑΔΟΣΩΜΑΤΙΚΟ ΔΕΙΚΤΗ ΤΗΣ ΣΑΡΔΕΛΛΑΣ

Γκάνιας, Θ.Κ.¹, Σωμαράκης, Σ.^{2,3}, Κουτσικόπουλος, Κ.³, Μαχιάς, Α.²,
Θεοδώρου, Α.¹

¹Παν/μιο Θεσσαλίας, Εργ. Ωκεανογραφίας, Οδός Φυτόκου 38446 Ν. Ιωνία, Βόλος,

²Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας Κρήτης (ΙΘΑΒΙΚ), Τ.Θ. 2214, 71003 Ηράκλειο,

³Παν/μιο Πατρών, Τμήμα Βιολογίας, Εργ. Ζωολογίας, 26500 Ρίο, Πάτρα

Ο γοναδοσωματικός δείκτης (GSI=βάρος γονάδας/βάρος σώματος *100) αποτελεί το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο μέσο ποσοτικοποίησης της αναπαραγωγικής κατάστασης των ψαριών. Οι σπουδαιότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη διακύμανση του GSI στα ψάρια είναι η γονιμότητα και το μέγεθος των ωοκυττάρων. Η πρώτη παράμετρος σχετίζεται κυρίως με το μέγεθος του σώματος ενώ η δεύτερη με το στάδιο ωρίμανσης της ωοθήκης. Στις περισσότερες όμως μελέτες που αφορούν τη μελέτη της διακύμανσης του GSI σε είδη ψαριών, ένα σημαντικό ποσοστό της διακύμανσης αυτής παραμένει ανεξήγητο γεγονός που σημαίνει ότι και άλλοι παράγοντες, πέραν του μεγέθους του σώματος και του σταδίου ωρίμανσης της ωοθήκης, θα πρέπει να τον επηρεάζουν.

Στην παρούσα συμβολή εξετάζεται ο τρόπος με τον οποίο το σύνολο των ιστολογικών χαρακτηριστικών της ωοθήκης επιδρούν στο γοναδοσωματικό δείκτη της σαρδέλας της Μεσογείου (*Sardina pilchardus*). Έτσι πέραν των ιστολογικών σταδίων ωριμότητας των ωοκυττάρων, εξετάζεται η επίδραση των διαφόρων τύπων ατρησίας καθώς και της ύπαρξης ή μη στην ωοθήκη κενών ωοθυλακίων (POFs).

Η ατρησία τύπου 1 ($\leq 50\%$ α-ατρητικά ωοκύτταρα) επηρεάζει το γοναδοσωματικό δείκτη μόνο κατά την έναρξη της λεκιθογένεσης. Ωοθήκες με ατρησία τύπου 2 ($> 50\%$ α-ατρητικά ωοκύτταρα) έχουν χαμηλότερο GSI από το σύνολο των ωοθηκών με λεκιθογενετικά ωοκύτταρα, ενώ ωοθήκες με ατρησία τύπου 3 (100% β-ατρητικά ωοκύτταρα) έχουν υψηλότερο GSI από το σύνολο των μη-λεκιθικών ωοθηκών. Επίσης τα κενά ωοθυλάκια επηρεάζουν το γοναδοσωματικό δείκτη μόνο κατά την έναρξη της συσώρευσης λεκίθου στα ωοκύτταρα.

THE EFFECT OF ATRESIA AND INCIDENCE OF POST- OVULATORY FOLLICLES ON THE GONOSOMATIC INDEX OF SARDINE

Ganias, K.¹, Somarakis, S.^{2,3}, Koutsikopoulos, C.³,
Machias, A.², Theodorou, A.¹

¹University of Thessaly, Lab. of Oceanography, Fytokou st. 38446, N. Ionia, Volos, Greece,

²Institute of Marine Biology of Crete (IMBC), P.O.Box 2214, 710 03 Iraklion, Greece,

³University of Patras, Department of Biology, Laboratory of Zoology, 26500 Rio, Patras, Greece

The gonosomatic index (GSI=ovary weight/body weight*100) is the most widely used parameter to quantify the reproductive condition in fishes. It is generally assumed that GSI depends on fecundity and oocyte size. The former is correlated with body size and the latter with stage of ovarian development. However, in most studies a considerable amount of variability in GSI remains unexplained indicating that factors, other than body size and maturity stage of the ovary, also affect the gonosomatic index.

In the present contribution we examined the effect of the different histological characteristics of the ovary on the gonosomatic index of the Mediterranean sardine (*Sardina pilchardus*). Apart from histological stages of oocyte maturation, other factors were also considered such as different states of atresia (atresia 1,2 and 3) and presence of postovulatory follicles (POFs).

State-1 atresia ($\leq 50\%$ of α -atretic oocytes) only affected GSI at the beginning of vitellogenesis (primary yolk globule stage). Atretic state-2 ovaries ($>50\%$ of α -atretic oocytes) had significantly lower GSI than non-atretic ovaries with vitellogenic oocytes ($P < 0.05$), whereas ovaries with state-3 atresia (100% of β -atretic oocytes) had higher GSI than non-vitellogenic ovaries ($P < 0.05$). The incidence of postovulatory follicles was shown to affect the gonosomatic index only at the beginning of yolk accumulation (primary yolk globule stage). This was attributed to the fact that after egg release the new postovulatory follicles (POFs-0) are considerably large in size and oocytes of the recruiting batch are generally very small, i.e. in incipient stages of vitellogenesis.

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ TOXIN-LIKE ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΤΗΝ ΠΕΣΤΡΟΦΑ

Γεωργάκα, Ε.¹, Ναστόπουλος, Β.², Ζαρκάδης, Ι.Κ.¹

¹Εργαστήριο Γεν. Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ²Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών,
Πανεπιστημιούπολη, 26500 Ρίο, Πάτρα

Η οικογένεια τοξινών τριών δακτύλων απαρτίζεται από δομικά όμοιες πρωτεΐνες με διαφορετικές λειτουργίες και περιλαμβάνει τοξίνες ερπετών με νευρο- και καρδιοτοξική δράση, ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συστήματος του συμπληρώματος και πρωτεΐνες της οικογένειας Ly-6. Η δομή τους υπαγορεύεται από την παρουσία τεσσάρων συντηρημένων δισουλφιδικών δεσμών που βρίσκονται στο εσωτερικό ενός σφαιρικού πυρήνα, από τον οποίο αναδύονται τρεις χαρακτηριστικές αγκύλες. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: μακράς και βραχείας αλύσου, μεγέθους 70 και 60 περίπου αμινοξέων αντίστοιχα. Στους ιχθείς δεν έχει περιγραφεί μόριο με τα χαρακτηριστικά αυτά. Κατά τη διάρκεια της μελέτης που αφορά στην εξέλιξη του συστήματος του συμπληρώματος απομονώθηκε από cDNA λgt11 βιβλιοθήκη ήπατος ιριδιζουσας πέστροφας, cDNA κλώνος 482 νουκλεοτιδίων, που ονομάστηκε Ttoxin1-like. Μία πρωτεΐνη 76 αμινοξέων παράγεται με σήμα έκκρισης 16 καταλοίπων. Εισαγωγή της αμινοξικής αλληλουχίας σε τράπεζες δεδομένων έδειξε 23% ομολογία με τοξίνη κόμπρας, κατατάσσοντας το μόριο στην κατηγορία των τοξινών βραχείας αλύσου. Χαρακτηριστική είναι η συντήρηση των 8 καταλοίπων κυστεΐνης. Το γονίδιο Ttoxin1-like εκφράζεται σε επίπεδο mRNA, κυρίως στο ήπαρ και στο σπλήνα και λιγότερο στο νεφρό και στο νευρικό ιστό. Έκφραση του γονιδίου Ttoxin1-like σε ετερόλογο κυτταρικό σύστημα E.coli, παρήγαγε προϊόν 7.5Kda, το οποίο απομονώθηκε και καθαρίστηκε με χρωματογραφικές στήλες. Ποσότητα της καθαρής πρωτεΐνης (10mg) χρησιμοποιείται για κρυσταλλογραφική ανάλυση, ενώ παρήχθησαν αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης, για τη διεκρίνιση του λειτουργικού της ρόλου.

Η εργασία υποστηρίζεται από πρόγραμμα Πανεπιστημίου Πατρών «Κ.Καραθεοδωρή» 2455

CLONING AND CHARACTERIZATION OF TOXIN-LIKE GENE IN RAINBOW TROUT

Georgaka, E.¹, Nastopoulos, V.², Zarkadis, I.K.¹

¹Department of G. Biology, School of Medicine, ²Department of Chemistry, University of Patras, 26500 Rion Panepistimioupolis, Patra

The three-finger toxin family consists of structurally similar proteins, which display different functions, such as snake neuro- and cardio toxins, regulatory proteins of the complement system and members of the Ly-6 family. Their three dimensional structure is suggested by the presence of four highly conserved disulfide bonds that form a global core. Three characteristic loops are emerged from that core. Three finger toxins are categorized into two classes: long and short chain toxins consisting of 70 and 60 amino acid residues respectively. Molecule, having these properties has not been described in fish. During the evolutionary study of the complement system, a full-length clone of 482nt, named Ttoxin1-like, was isolated from λ gt11 cDNA liver rainbow trout library. The deduced protein 76 residues, includes a 16 amino acid signal peptide.

Comparison of the amino acid sequence of Ttoxin1-like to others of the databases, reveals 23% identity to cobra toxin, suggesting that the molecule belongs to the group of short chain toxins. The crucial 8 cystein residues are conserved. Ttoxin1-like mRNA is produced mainly in liver, spleen and, at lower level, in kidney and cortex. Expression of recombinant Ttoxin1-like in E.coli cells has produced a 7.5Kda protein. The protein has been isolated and purified by the application of chromatography methods. 10mg of purified protein are being used in x-ray analysis. In order to identify the functional role of this molecule, anti-Ttoxin1-like antibodies are being used.

ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΦΥΛΟΥ ΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΑΡΧΑΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΚΑΙ ΔΙΚΑΣΤΙΚΟΥ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Γεωργίου, Μ., Ζουγανέλης, Γ., Λαμπρινουδάκης, Β.¹, Κουτσελίνης, Α.

Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Μ. Ασίας
75, ΤΚ 115 27, e-mail: mggeorgiou@hotmail.com

¹Τομέας Αρχαιολογίας & Ιστορίας Τέχνης, Τμήμα Ιστορίας & Αρχαιολογίας, Πανεπιστημιόπολη
157 84 Αθήνα

Ο καθορισμός του φύλου ανθρωπίνων σκελετικών υπολειμμάτων αποτελεί πρόβλημα τόσο κατά τη διερεύνηση διαφόρων Ιατροδικαστικών ζητημάτων και Δικαστικών υποθέσεων, όσο και κατά την αρχαιολογική μελέτη των προϊόντων των ανασκαφών. Η προσέγγιση του προβλήματος με μορφομετρικές τεχνικές δεν είναι πάντοτε εφικτή η / και επιτυχής. Στην εργασία αυτή επιχειρήθηκε , για πρώτη φορά στην Ελλάδα, με μοριακές τεχνικές ο καθορισμός του φύλου ανθρωπίνων οστικών υπολειμμάτων, ηλικίας μέχρι και 4800 ετών, στα οποία ο μορφολογικός τους χαρακτηρισμός είχε οδηγήσει σε αμφιλεγόμενα αποτελέσματα ή ήταν ανέφικτος. Στη μελέτη συμπεριλαμβάνονται και 10 μακρά οστά γνωστού φύλου, για τα οποία ο χρόνος που μεσολάβησε από τον θάνατο μέχρι την ανάλυση είναι από 3 έως 10 χρόνια ("σύγχρονα" δείγματα). Από όλα τα δείγματα εκχυλίστηκε DNA και διενεργήθηκε επιλεκτική ποσοτική ενίσχυση (PCR) του X-Y ομολόγου γονιδίου της αμυλογενίνης, με τη χρήση εκκινητών (primers) ειδικά σχεδιασμένοι για την αναζήτηση του χρωματοσώματος του φύλου. Ο βαθμός επιτυχίας της PCR της ήταν της τάξεως του 100%. Σε κάθε δείγμα προσδιορίστηκε με απόλυτη βεβαιότητα το φύλο του ατόμου στο οποίο ανήκε το οστικό υπόλειμμα. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων του μοριακού καθορισμού του φύλου με τα αντίστοιχα (όπου αυτά υπήρχαν) του μορφομετρικού προσδιορισμού αποδεικνύει την αξιοπιστία ή / και την υπεροχή της μοριακής έναντι της μορφομετρικής προσέγγισης του προβλήματος.

Λέξεις ευρετηρίου: Αρχαίο DNA, Μοριακή ανθρωπολογία, Αμυλογενίνη, Καθορισμός φύλου.

SEX DETERMINATION IN HUMAN SKELETAL REMAINS OF FORENSIC AND ARCHAEOLOGICAL INTEREST BY USING MOLECULAR TECHNIQUES

Georgiou, M., Zouganelis, G., Lambrinoudakis, B.¹, and A. Coutselinis

Department of Forensic Medicine and Toxicology, School of Medicine, University of Athens
75 M. Asias St., Goudi 115 27, Athens, Greece, E-mail: mggeorgiou@hotmail.com

¹Department of Archaeology & History of Arts, Faculty of History & Archaeology, University of
Athens, Panepistimiopolis 157 84 Athens, Greece

Sex determination of human skeletal remains, modern and ancient as well, is a major concern in forensic and archaeological context, respectively. It is not always possible to determine sex using morphological techniques. In the present study, first time in Greece, molecular techniques were used to determine sex from 19 ancient skeletal remains, 4800 BP, where the morphological results were ambiguous or inconclusive. 10 skeletal remains of known sex with 3-10 years time since death ("modern samples") were also included. DNA was extracted and the Y-X homologous amelogenin gene was amplified. The success rate of amelogenin amplification was 100%. For every individual an unambiguous molecular sex typing result was obtained. Furthermore, by comparing the results, concerning sex determination, obtained by morphological and molecular methods it was shown that these were in accordance with each other, giving evidence for the authenticity and the ancient origin of the polymerase chain reaction (PCR) products.

Keywords: Ancient DNA, Molecular anthropology, Amelogenin, Sex determination

PROTEOGLYCANS MODULATE CELL DETERMINATION AND DIFFERENTIATION IN EARLY EMBRYO

Giakoumaki A., Soulintzi, N., Zagris, N.

Division of Genetics, Cell and Developmental Biology
Department of Biology, University of Patras, Patras, Greece

Proteoglycans modulate growth factor activities and act as tissue organizers, influence cell proliferation, migration and differentiation and control morphogenetic interactions in numerous organ systems. To probe the role of proteoglycans in the development of early chick embryo, we used β -D-xyloside, a compound that has been shown to stimulate the synthesis of protein-free glycosaminoglycan chains thereby competing with the proteoglycan core protein. Newly synthesized proteins (^3H -leucine labeled) were separated by electrophoresis (SDS- 4 to 18% gradient PAGE) and detected by fluorography. Relative to the control embryos, β -D-xyloside (0.3 mM) did not inhibit total protein synthesis during the 8 h of incubation (embryo started culture at stage XI-morula stage). However, several proteins from xyloside-treated embryos had a slightly greater mobility on PAGE electrophoresis. It was interesting that β -D-xyloside upregulated the synthesis of the decorin and perlecan proteoglycans. Decorin and perlecan (^{35}S -methionine labeled) were identified by immunoprecipitation with specific monoclonal antibodies. The observed biochemical alterations in proteoglycans translated into disruptions in the organization of the extracellular matrix in the xyloside-treated embryos. The most striking effect of xyloside was on morphogenesis of brain and heart. It is interesting that the continuous presence of β -D-xyloside inhibited the induction of mesoderm and neurectoderm and vegetalized the embryos.

This work was supported by grants from the General Secretariat for Research and Technology of Greece and the European Social Fund (99ΕΔ 352), and from the University of Patras ("K. Karatheodoris" grant 2435).

**ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΕΝΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΤΟΥ LPS ΜΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
CD14 ΣΤΑ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ *Ceratitis capitata***

Γιαννάκας, Ν., Σολδάτος, Α.Ν., Χριστοδούλου, Χ. και Μ. Λαμπροπούλου

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Το αμυντικό σύστημα των εντόμων βασίζεται στην κυτταρική και στη χυμική ανοσοαπόκριση και ενεργοποιείται από τον LPS, τις πεπτιδογλυκάνες κλπ. Οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αναγνώριση των ενεργοποιητών αυτών ονομάζονται πρωτεΐνες αναγνώρισης βιοενεργών μορίων (pattern recognition proteins) και συμμετέχουν σε διάφορες οδούς των αμυντικών μηχανισμών. Στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* έγινε καθαρισμός, απομόνωση και κλωνοποίηση μιας πρωτεΐνης 50 kDa της αιμολέμφου η οποία αναγνωρίζει το κυτταρικό τοίχωμα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας αμινοξέων της πρωτεΐνης αυτής έδειξε ότι περιέχει μια περιοχή που εμφανίζει σημαντική ομολογία με μια ομάδα βακτηριακών γλυκανασών και μια δεύτερη περιοχή που έχει ομολογία με τον υποδοχέα του LPS στα θηλαστικά, CD14. Μάλιστα, η περιοχή αυτή αναγνωρίζεται από πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του CD14. Με βάση τα δεδομένα αυτά, εξετάσαμε αν υπάρχει πρωτεΐνη με αντίστοιχη ομολογία ως προς τη CD14 στα αιμοκύτταρα της μύγας της Μεσογείου. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης έδειξαν ότι πολυκλωνικά αντισώματα έναντι hCD14 αναγνωρίζουν μια πρωτεΐνη στα αιμοκύτταρα μοριακού βάρους ~55kDa γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη αυτή των εντόμων είναι ομόλογη με τη CD14 των θηλαστικών. Η πρωτεΐνη αυτή εκκρίνεται μετά από επίδραση LPS σύμφωνα με ανοσοϊστοχημικές μελέτες και ανάλυση κατά Western. Τέλος, παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη αυτή ενώ δε συμμετέχει στη μεταγωγή μηνύματος από τον LPS, εντούτοις φαίνεται να εμπλέκεται στις διεργασίες της κυτταροφαγίας.

EVIDENCE OF AN LPS-RECOGNITION FACTOR SHOWING CD14 CHARACTERISTICS IN MEDFLY HEMOCYTES

Giannakas, N., Soldatos, A.N., Christodoulou, C., and M. Lambropoulou

Department of Biology, University of Patras, 26 500 Patras

The defense system of insects is based on both cellular and humoral immune responses and is triggered by LPS or peptidoglycans. The proteins involved in the recognition of elicitors have been named pattern recognition proteins, and they are involved in various ways in the biological defense mechanisms. Purification and molecular cloning of a 50 kDa hemolymph protein from the silkworm *Bombyx mori* demonstrated strong affinity to the cell wall of Gram negative bacteria. Comparison of the deduced amino acid sequence with known sequences revealed that GNBPs contained a region displaying significant homology to a group of bacterial glucanases and a region displaying sequence similarity to the vertebrate LPS receptor CD14. The latter was recognized specifically by a polyclonal anti-CD14 antibody. Based on these data we explored whether a protein derived from medfly hemocytes, cross-react with human anti-CD14. Immunoprecipitation experiments using a goat anti-rabbit human CD14 polyclonal antibody, specifically cross-reacted with a protein with an approximately 55 kDa from medfly hemocytes. The cross-reactivity of the protein under consideration with the mammalian CD14 suggests that this protein might be an insect hemocyte CD14 homologue. CD14-like protein appears to be secreted upon LPS triggering, as indicated by immunostaining and immunoblotting experiments. In addition, we observed that this protein might be involved in phagocytosis process but not in LPS signaling.

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΑΚΡΟΒΙΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Γκόνος Στάθης

Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών & Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Η γήρανση και η μακροβιότητα είναι δύο πολυπαραγοντικά βιολογικά φαινόμενα τα οποία, σε μοριακό επίπεδο, παραμένουν ακόμα ανεξιχνίαστα. Προκειμένου να μελετηθεί το κατά πόσο η κυτταρική γήρανση σχετίζεται με τη έκφραση ορισμένων γονιδίων δημιουργήσαμε κατά συνθήκη αθανάτοποιημένες κυτταρικές σειρές οι οποίες γηράσκουν κατόπιν απενεργοποίησης του ογκογονιδίου SV40 T αντιγόνου. Εφαρμογή μεθοδολογίας διαφορικής σάρωσης στις προαναφερόμενες κυτταρικές σειρές είχε σαν αποτέλεσμα την κλωνοποίηση οκτώ γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση στα θηλαστικά. Τα εν λόγω γονίδια κωδικεύουν για τη Ινονεκτίνη, την Οστεονεκτίνη, το α1-προκολλαγόνο, την α-υπομονάδα των GTP προσδεδεμένων πρωτεϊνών, την πρωτεΐνη SM22, την Απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ), την Οξειδάση του Κυτοχρώματος C, καθώς και για ένα νέο γονίδιο. Ανάλυση RNA έδειξε ότι τα προαναφερόμενα γονίδια υπερεκφράζονται σε διάφορους *in vitro* γηρασμένους πρωτογενείς ιστούς του ανθρώπου και του αρουραίου, καθώς και σε συνθήκες πρόωμης γήρανσης ένεκα έκθεσης ανθρώπινων ινοβλαστών σε παράγοντες που προκαλούν κυτταρικό στρες. Επιπρόσθετα δείχθηκε ότι η Ινονεκτίνη υπερεκφράζεται σε επιδερμικούς ινοβλάστες απομονωμένους από υπερήλικες δότες σε σχέση με αντίστοιχους από νεαρούς δότες, δεικνύοντας ότι το εν προκειμένω γονίδιο αποτελεί *en* δυνάμει δείκτη *in vivo* γήρανσης. Σε αντίθεση όλα τα γονίδια υποεκφράζονται σε μετασχηματισμένα από το ογκογονίδιο *ras* κύτταρα.

Ανάλυση της λειτουργίας της ApoJ δεικνύει ότι το εν λόγω γονίδιο κωδικεύει για ένα νέο επιβιωτικό παράγοντα. Το γονίδιο υπερεκφράζεται σε διάφορες συνθήκες κυτταρικού στρες (θερμικό, έκθεση σε οξειδωτικούς παράγοντες κλπ), καθώς επίσης και σε κύτταρα και πρωτογενείς όγκους που παρουσιάζουν χημειοαντοχή. Επιπρόσθετα δείχθηκε ότι υπερέκφραση της ApoJ έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη επιβίωση των επιμολυσμένων κυττάρων έναντι διαφόρων κυτταροτοξικών παραγόντων. Ταυτόχρονα δείχθηκε ότι η υπερέκφραση της ApoJ στις προαναφερόμενες συνθήκες σχετίζεται με την Πρωτεϊνική Κίνηση C. Προκειμένου να μελετηθούν οι μοριακοί παράγοντες οι οποίοι ενέχονται στη μακροβιότητα έχουμε δημιουργήσει κυτταρική τράπεζα από υγιείς υπεραϊωνόβιους. Έχουμε συγκρίνει τα εν λόγω δείγματα με αντίστοιχα από δότες μάρτυρες διαφόρων ηλικιών.

Ανάλυση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων, της λειτουργίας του πρωτεοσώματος, του μήκους των τελομερών, καθώς και γονιδιακής έκφρασης έδειξε ότι τα δείγματα των υπεραϊωνοβίων έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά προερχόμενα από νεαρούς δότες. Έχουμε επίσης εφαρμόσει τεχνικές διαφορικής σάρωσης και έχουμε απομονώσει αρκετά υποψήφια γονίδια μακροβιότητας.

THE MOLECULAR GENETICS OF HUMAN AGEING AND LONGEVITY

Efstathios S. Gonos

National Hellenic Research Foundation, Institute of Biological Research and Biotechnology, Athens
11635, Greece
Tel: +30-10-7273756, FAX: +30-10-7273677, e-mail: sgonos@eie.gr

Aging and longevity are two multifactorial biological phenomena whose knowledge at molecular level is still limited. In order to determine whether cellular aging is regulated by the expression of a set of genes, we have developed and further employed a clonal system of rat embryo fibroblast conditionally immortalized cell lines, which undergo senescence upon SV40 T antigen inactivation. Application of differential screening techniques in these cells has resulted in the cloning of eight genes that are associated with mammalian replicative senescence. The genes encode for Fibronectin, Osteonectin, α 1-procollagen, GTP binding protein- β , SM22, Apo J, Cytochrome C Oxidase and a novel gene. RNA analysis has shown that the genes are over-expressed in several primary human and rat tissues undergoing *in vitro* aging, as well as in human fibroblasts undergoing premature senescence after exposure to different stress inducing agents. Moreover, Fibronectin was found over-expressed in skin fibroblasts from old donors as compared to young donors, indicating the gene is a likely *in vivo* aging biomarker. In contrast, the expression of all genes is repressed in *ras*-transformed cells.

Analysis of the function of the Apo J gene suggests that the gene is a novel candidate "survival factor". The gene is over-expressed under a variety of stress conditions (oxidative stress, heat shock etc), as well as in cells and primary tumors, which confer chemotherapeutic drug resistance. In addition, it has been demonstrated that stable over-expression of Apo J gene results in increased cell survival rates following treatment with various cytotoxic agents. Finally, we have shown that upon cytotoxic treatment Protein Kinase C activity is related to Apo J over-expression.

In a complementary approach aimed at studying the molecular parameters that are linked to longevity, we have established cell, DNA and RNA banks of healthy centenarians. We have compared such samples with samples originated from control donors of different ages. Analysis of tissue culture characteristics, proteasome status and function, telomeres shortening and gene expression levels shows that most of the centenarian samples have similar characteristics with the samples originated from the younger rather than the old donors. Finally, we have applied various differential-screening techniques to these samples and we have isolated several candidate longevity genes.

ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΥΚΗΤΑ
Candida albicans**Γκουντέλα Σ., και Γ. Διαλλινάς**

Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ο διμορφικός μύκητας *Candida albicans* περιλαμβάνεται στους σημαντικότερους παθογόνους για τον άνθρωπο ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Η φαρμακολογική του αντιμετώπιση παρουσιάζει προβλήματα κυρίως λόγω των παρενεργειών των φαρμάκων που χορηγούνται. Η δυνατότητα της συστηματικής μελέτης των πρωτεϊνών που διαμεσολαβούν για τη κυτταρική πρόσληψη ουσιών που χρησιμοποιούνται ενάντια στις μικροβιακές μολύνσεις υπόσχεται να αποτελέσει ένα σημαντικό πρώτο βήμα στη στοχευμένη και χωρίς παρενέργειες φαρμακολογική αντιμετώπιση μικροβίων όπως η *C. albicans*. Αναγνωρίζοντας τις αντιμικροβιακές δυνατότητες ουσιών όπως οι πουρίνες και τα ανάλογα τους, μελετήσαμε σε βιοχημικό και μοριακό επίπεδο τα συστήματα πρόσληψης των ουσιών αυτών στην *C. albicans*. Μετρήσεις πρόσληψης ραδιοσημασμένων πουρινών και φυσιολογικές μελέτες αύξησης παρουσία πουρινών σαν πηγές αζώτου έδειξαν ότι η *C. albicans* έχει i) ένα εξαιρετικά αποδοτικό σύστημα πρόσληψης αδενίνης, υποξανθίνης και κυτοσίνης το οποίο εκφράζεται σε «φτωχά» θρεπτικά μέσα, και ii) ένα χαμηλής συνάφειας σύστημα για την πρόσληψη ουρικού και ξανθίνης του οποίου η έκφραση φαίνεται να εξαρτάται από το στάδιο αύξησης των κυττάρων σε μια κλειστή καλλιέργεια. Ενδιαφέρον προκαλεί η σύγκριση της κινητικής πρόσληψης πουρινών στην *C. albicans* και στη συγγενική ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* η οποία οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα συστήματα της *C. albicans* φαίνεται να αντανακλούν τη προσαρμογή τους στα επίπεδα πουρινών στο ανθρώπινο σώμα. Τέλος, σημαντική παρατήρηση αποτελεί ότι τα συστήματα πρόσληψης πουρινών της *C. albicans* είναι υπεύθυνα για την πρόσληψη γνωστών φαρμάκων για την αντιμετώπιση καντινιώσεων, όπως η 5-φθοροκυτοσίνη. Σε μια προσπάθεια να αναγνωρίσουμε τα γονίδια που αντιστοιχούν στους μεταφορείς πουρινών της *C. albicans* αναγνωρίσαμε στις βάσεις δεδομένων τρία γονίδια τα οποία κωδικεύουν πρωτεΐνες όμοιες με γνωστούς μεταφορείς πουρινών σε άλλους μύκητες. Δυο από αυτά είναι όμοια με τον μεταφορέα αδενίνης-υποξανθίνης-γουανίνης-κυτοσίνης του *S. cerevisiae* (Fcy2p) και ένα είναι όμοιο με τον μεταφορέα ουρικού-ξανθίνης του *A. nidulans* (UapA). Καθώς η μελέτη της λειτουργίας νέων γονιδίων στην *C. albicans* παρουσιάζει δυσκολίες λόγω της διπλοειδούς φύσης του μύκητα αυτού, προτείνουμε τη μελέτη των γονιδίων αυτών μέσω της ετερόλογης έκφρασης τους στο σύστημα του *A. nidulans*. Θα παρουσιάσουμε αποτελέσματα που αφορούν τη προσπάθεια έκφρασης του γονιδίου της *C. albicans* το οποίο είναι ομόλογο του μεταφορέα ουρικού του *A. nidulans*.

PURINE TRANSPORTERS IN THE HUMAN PATHOGEN *Candida albicans* S

Goudela, S., and G. Diallinas

Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens

Candida albicans is one of the most important human parasites. Although drugs against *C. albicans* infections include nucleobase analogues (e.g. 5-fluorocytosine) no studies have systematically addressed the purine uptake systems of this fungus. We wanted to identify and study all major *C. albicans* nucleobase transport systems. We searched using *blast* analysis all sequences of *C. albicans* available in databases. Search was carried out using as *in silico* probes representatives of all three nucleobase transporter families (1). These were the following: UapA (NAT), FCY2 (purine-cytosine transporter of *S. cerevisiae*; PUR), atPUP1 (purine related permease of *A. thaliana*; PUP). Three homologous sequences of significant similarity were detected; one homologous to UapA (55% identity)(2), the two other to FCY2 (56% and 44% identity)(3). To investigate whether *C. albicans* can take up all kinds of purines we performed a series of growth tests and uptake studies. Best growth was observed in the order uric acid>xanthine>hypoxanthine, adenine. Reduced growth on hypoxanthine and adenine is most probably due to catabolism. To further confirm the existence of specific purine uptake systems we performed transport measurements using radiolabeled (³H) xanthine or hypoxanthine. We confirmed the existence of specific uptake systems for both purines tested. A high-affinity, high-capacity hypoxanthine transporter, which, as judged from competition uptake studies, is also specific for adenine, cytosine and 5-fluorocytosine, was expressed in minimal media but not in rich media. Compared to the analogous transporter in *S. cerevisiae*, the *C. albicans* transporter has certain interesting differences, which probably reflect its life as a successful parasite. In particular the *C. albicans* transporter does not recognize efficiently guanine, its uptake rate is increasing linearly for 4-5 min rather than 1-2 min, and it has lower *K_m* and higher *V_m* values. This transporter should correspond to one of the two FCY2 homologues identified in databases, probably the one with highest similarity. The characteristics of the xanthine transporter, which probably corresponds to the UapA homologue identified in databases, are currently analyzed and will be presented. To assign transport activities to specific genes this would necessitate gene-disruption experiments. However, this is not simple in *C. albicans*, a diploid organism. We rather chose to perform the functional analysis of the novel genes identified *in silico* by expression in appropriate *A. nidulans* strains. As a first step to this direction, we isolated by PCR and cloned the open reading frame of the UapA homologue of *C. albicans* (caUapA) into an appropriate expression vector. This new vector will be used to transform an *A. nidulans* strain lacking all endogenous purine-pyrimidine transporters and selected transformants will be used for the functional analysis of caUapA.

1. de Koning H, Diallinas G, Mol Membr Biol 2000,17(2):75-94
2. Diallinas G, et al., J Biol Chem 1995, 270(15): 8610-22
3. Weber E, Rodriguez C, Chevallier MR, Jund R, Mol Microbiol 1990 Apr;4(4): 585-96

**SCEs ΩΣ «ΔΕΙΚΤΗΣ» ΓΟΝΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ Sn ΜΕ ΓΝΩΣΤΑ ΜΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ
ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΦΑΡΜΑΚΑ**

**Γκούρτσα, Β.¹, Ιακωβίδου, Ζ.¹, Μιόγλου, Ε.¹, Καραγιάννη, Β.¹,
Μουρελάτος, Δ.¹, Κόβαλα-Δεμερτζή, Δ.², Ντόκορου, Β.²,
Κουρκουμέλης, Ν.² και Μ. Δεμερτζής²**

¹Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας και Γενετικής, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο
Θεσσαλονίκης, 54124 Θεσσαλονίκη

²Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Το diclofenac (voltaren) και το mefenamic acid (ronstan, αντιπυρετικό) είναι δυναμικά μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα ιδιαίτερα για την αντιμετώπιση της αρθρίτιδας, παρά την ανεπιθύμητη κυτταροτοξικότητά τους. Οργανομεταλλικές ενώσεις τους με Sn παρουσιάζουν βιολογικό ενδιαφέρον διότι εμφανίζουν αντιμικροβιακή και αντineοπλασματική δράση. Στην προσπάθεια ανεύρεσης παραγώγων αυτών των ουσιών με αποτελεσματικότερη αντικαρκινική δράση και μειωμένες παρενέργειες οδηγηθήκαμε στη σύνθεση των εξής νέων συμπλόκων:

1) $\text{Ph}_2\text{SnDODSnPh}_2(\text{H}_2\text{O})$ (D= Dio, Diclofenac), 2) Me_2SnL_2 (mef221) (L= mef, mefenamic acid), 3) $\text{Ph}_2\text{SnL}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 4) $(\text{Me}_2\text{SnL})_2\text{O}$, 5) $(\text{Ph}_2\text{SnL})_2\text{O} \cdot \text{C}_5\text{H}_6$, 6) $(\text{Bu}_2\text{SnL})_2\text{O}$

Η πιθανή αντineοπλασματική τους δράση πιθανολογείται από τη συσχέτιση της πρόκλησης των χρωματιδιακών ανταλλαγών (SCEs) και της συμπίεσης του Δείκτη Ρυθμού Πολλαπλασιασμού (ΔΡΠ) σε καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου. Δεδομένου ότι τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν ανάλογους μηχανισμούς επιδιόρθωσης με τα φυσιολογικά, ανεπιδιόρθωτες βλάβες του DNA (εκφρασμένες υπό τη μορφή των SCE) από δυνάμει αντineοπλασματικές ουσίες στα φυσιολογικά κύτταρα αντανακλούν σε ανεπιδιόρθωτες βλάβες στα καρκινικά. Στο σύνολό τους τα σύμπλοκα που μελετήσαμε εμφανίζουν γονοτοξικότητα (αύξηση των SCEs) και κυτταροστατικότητα (πτώση του ΔΡΠ) που θα μπορούσαν να αποδοθούν σε ηπιότερη δράση των νεοσυνθεθειμένων συμπλόκων έναντι των μητρικών ενώσεων. Διευκρινίζεται ότι το diclofenac αφενός επάγει τον κατατεμαχισμό του DNA μέσω του οξειδωτικού stress που προκαλεί και αφετέρου η αντιμικροβιακή του δράση αποδίδεται στην αναστολή της σύνθεσης του DNA.

*Η εργασία αυτή υποστηρίχθηκε από το πρόγραμμα "Κ. Καραθεοδωρή" Νο 2456, της Επιτροπής
Ερευνών του Πανεπιστημίου Πατρών*

SCEs AS INDICATOR OF GENOTOXIC ACTIVITY OF Sn COMPLEXES WITH NON STEROIDAL ANTIINFLAMMATORY DRUGS

Gourtsa, V.¹, Iakovidou, Z.¹, Mioglou, E.¹, Karayianni, V.¹,
Mourelatos, D.¹ Kovala-Demertzi, D.², Dokorou, V.², Kourkoumelis,
N.², Demetris, M.²

¹ Laboratory of Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki
54124 Thessaloniki

² Laboratory of Inorganic and Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina

Diclofenac (voltaren) and mefenamic acid (ponstan, antipyretic) are potential non steroidal anti-inflammatory drugs that are especially used for the treatment of arthritis, despite their cytotoxicity. Their complexes with Sn present biological interest because they have antimicrobial and antineoplastic effect. In an effort to find derivatives of these compounds with effective antitumour activity and reduced side effects, we decided to synthesize the following complexes:

- 1) $\text{Ph}_2\text{SnDODSnPh}_2(\text{H}_2\text{O})$ (D= Dio, Diclofenac)
- 2) Me_2SnL_2 (mef221) (L= mef, mefenamic acid)
- 3) $\text{Ph}_2\text{SnL}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- 4) $(\text{Me}_2\text{SnL})_2\text{O}$
- 5) $(\text{Ph}_2\text{SnL})_2\text{O} \cdot \text{C}_5\text{H}_6$
- 6) $(\text{Bu}_2\text{SnL})_2\text{O}$

Their possible antineoplastic activity is hypothesized from the relationship between SCE induction and Proliferation Rate Index (PRI) suppression in normal human lymphocytes *in vitro*. Having in mind that cancer cells have similar DNA repair mechanisms with normal cells, it is deduced that unrepaired damage in DNA caused by potential antitumour agents upon normal cells, and expressed as SCEs, could reflect unrepaired damage in cancer cells. All the complexes studied appeared as having genotoxicity (increase on SCEs) and cytostatic activity (PRI depression), which could be attributed to a milder action of the new complexes compared to their parent compounds. It is clarified that diclofenac induces fragmentation upon DNA due to oxidative stress and, on the other, hand its antimicrobial action derives from DNA synthesis inhibition.

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙ- ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙ- ΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΟΠΑΘΕΙΣ ΚΑΙ ΣΕ ΧΡΟΝΙΑ ΕΝΕΡΓΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β ΚΑΙ C

Γουρδή, Μ.Χ., Κεραμάρης, Κ.Ε., Μαργαρίτης, Λ.Χ.

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αντιπυρηνικά και κυτταροπλασματικά αντισώματα παρατηρούνται κυρίως σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα, όπως συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, σύνδρομο Sjogren's, σκληρόδερμα κ.λ.π.

Σκοπός της εργασίας: Να χαρακτηρισθούν τα αυτοαντισώματα που συνδέονται 1) με ορούς καρκινοπαθών 2) με ορούς φορέων της ηπατίτιδας Β και C και, τέλος, να εκτιμηθεί η επίδραση των αυτοαντισωμάτων στο profile της ασθένειας.

Υλικά και μέθοδοι: Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν 25 οροί ασθενών με καρκίνο του γαστρεντερικού, 25 οροί ενεργών φορέων ηπατίτιδας Β και 35 οροί ενεργών φορέων ηπατίτιδας C. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν για αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) με ειδικότητα τάξης IgG και IgM. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε διπλό υπόστρωμα κυττάρων Hep-2 και κυττάρων συκωτιού. Επιπλέον, έγινε Western blotting σε επιλεγμένα δείγματα.

Αποτελέσματα: Στα δείγματα των καρκινοπαθών τα ANA τάξης IgG ήταν θετικά σε ποσοστό 100%, ενώ τα IgM σε ποσοστό 52%. Υπήρχε έντονη αυτοάνοση απόκριση και ο φθορισμός ήταν κυρίως πυρηνικός, ενώ χαρακτηριστικό των ANA τάξης IgM, ήταν ότι παρουσίασαν θετικό κυτταροπλασματικό φθορισμό τύπου βιμεντίνης. Στην ηπατίτιδα Β και C υπήρχε αυτοάνοση απόκριση τάξης IgG σε ποσοστό 76% και 88.5% αντίστοιχα, ενώ η αυτοάνοση απόκριση τάξης IgM ήταν 20% και 31,4% αντίστοιχα. Ο τύπος ανοσοφθορισμού ήταν, κυρίως, στικτός και χαμηλού τίτλου. Αξιοσημείωτη είναι η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων τάξης IgM έναντι ινιδίων τύπου βιμεντίνης σε ποσοστό 24% για την ηπατίτιδα Β και 31,4% για την ηπατίτιδα C.

Συμπέρασμα: Ο προσδιορισμός πυρηνικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών-στόχων των αυτοαντισωμάτων μπορεί να αποτελέσουν δείκτες πρόγνωσης της καρκινικής εξαλλαγής, ενώ στις ηπατίτιδες Β και C έντονη αυτοάνοση απόκριση μπορεί να αποτελέσει δείκτη έκτασης καταστροφής του ήπατος και ανάπτυξης αυτοάνοσης ηπατίτιδας.

AUTOIMMUNE RESPONSE AND PRODUCTION OF ANTI-NUCLEAR AND CYTOPLASMIC ANTIBODIES OF CANCER PATIENTS AND OF PATIENTS WITH CHRONIC ACTIVE HEPATITIS B AND C

Gourdi, M.C., Keramaris, K.E., Margaritis, L.H.

Cell Biology and Biophysics Division, Biology Department, University of Athens, Panepitimiopolis
157 84 Athens - Greece

Antinuclear and cytoplasmic antibodies are mostly detected in patients with autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome, scleroderma e.t.c.

Purpose: To characterize the autoantibodies, which are, related, 1) with cancer patients' sera, 2) with sera of chronic active patients with hepatitis B and C and, finally, to evaluate the influence of these autoantibodies on the disease's profile.

Materials and methods: We tested 25 sera of patients with gastrointestinal cancer, 25 sera of chronic active patients with hepatitis B and 35 sera of chronic active patients with hepatitis C. All sera were tested for antinuclear antibodies (ANA) of class specificity IgG and IgM. The method used was indirect immunofluorescence with a combination of two substrates i.e. human epithelial cells (Hep-2) and primate liver cells.

Results: In cancer patients' sera, ANA of IgG class were 100% positive, while ANA of IgM class were 52% positive. There was intense autoimmune response and the type of immunofluorescence was mostly nucleolar, while a characteristic of ANA of IgM class was positive cytoplasmic immunofluorescence of vimentin type. In hepatitis B and C there was autoimmune response of IgG class in 76% and 88.5% respectively, while the autoimmune response of IgM class was 20% and 31.4% respectively. The immunofluorescence type was mostly speckled and of low titer. It is worth noticing the presence of autoantibodies of IgM class against fibers of vimentin type in 24% of the cases of hepatitis B and in 31.4% of the cases of hepatitis C.

Conclusions: The identification of nuclear and cytoplasmic protein-targets may be used as prognostic markers in malignancies, while intense autoimmune response in hepatitis B and C can be used as a marker of the extent of liver destruction and initiation of autoimmune hepatitis.

ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΦΥΛΟΥ**Δάβανος, Ν.¹, Μπάργας, Π.², Μανιάτης, Γ.Μ.¹ και Δ.Χ. Σπάθας¹**¹ Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Πατρών² Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική, Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου Πατρών "ΑΓΙΟΣ ΑΝΔΡΕΑΣ"

Οι αυξανόμενες ανάγκες προγεννητικής και προεμφυτευτικής διάγνωσης σε συνδυασμό με τους περιορισμούς των συμβατικών μεθόδων απαιτούν την καθιέρωση νέων προσεγγίσεων αναγνώρισης χρωμοσωμικών συνδρόμων. Στην παρούσα εργασία, παρουσιάζονται τα πρώτα αποτελέσματα αξιοποίησης της μεθοδολογίας της ποσοτικής φθορίζουσας αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction, QF-PCR) για την ανίχνευση αριθμητικών χρωμοσωμικών αλλαγών σε εμβρυϊκό DNA από αμνιακά κύτταρα, μητρικό πλάσμα αίματος και μητρικά ούρα. Αναλύθηκαν με επιτυχία και χωρίς γνώση των αποτελεσμάτων της συμβατικής χρωμοσωμικής ανάλυσης, 20 περιστατικά αμνιακού υγρού για τα χρωμοσώματα 13, 18 και 21 με χρήση κατάλληλων πολυμορφικών θέσεων (STRs) ειδικών για τα χρωμοσώματα αυτά, ενώ τα φυλετικά χρωμοσώματα προσδιορίστηκαν με χρήση ειδικών μη πολυμορφικών γενετικών δεικτών. Επίσης, προσδιορίστηκαν με επιτυχία αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος, σε πλάσμα αίματος και ούρα από εγκύους με άρρενα έμβρυα, μετά την όγδοη εβδομάδα κύησης. Εξ άλλου διαπιστώθηκε ότι ο προσδιορισμός πατρικής προέλευσης πολυμορφισμών σε αυτά τα δείγματα για τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα είναι εφικτός και επομένως η QF-PCR μπορεί να αξιοποιηθεί για μη επεμβατικό προγεννητικό χρωμοσωμικό έλεγχο. Η μεθοδολογία τέλος μπορεί να εξυπηρετήσει τους σκοπούς της προεμφυτευτικής χρωμοσωμικής διάγνωσης λόγω της μικρής ποσότητας DNA που απαιτείται για την ανάλυση.

Το ερευνητικό έργο χρηματοδοτείται από πρόγραμμα "Κ. Καραθεοδωρή" της Επιτροπής Ερευνών του Πανεπιστημίου Πατρών

MOLECULAR PRENATAL DIAGNOSIS OF CHROMOSOMAL ANEUPLOIDIES AND FETAL GENDER

Davanos, N.¹, Barlas, P.², Maniatis, G.M.¹, and D.H. Spathas¹

¹ Laboratory of General Biology, Medical School, University of Patras

² Department of Obstetrics and Gynecology, Peripheral General Hospital of Patras "AGIOS ANDREAS"

The increasing demands for prenatal and preimplantation diagnosis combined with the limitations of the conventional methods, require the establishment of new approaches for the detection of chromosomal aneuploidies. We report here the first results of the application of quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the detection of numerical chromosomal changes in fetal DNA from amniotic cells, maternal plasma and maternal urine. Twenty amniotic fluid samples were successfully analysed, without the prior knowledge of the conventional analysis, for chromosomes 13, 18 and 21 using suitable polymorphic loci (STRs) specific for these chromosomes, whereas the sex chromosomes were detected using specific non-polymorphic markers. Additionally, Y chromosomal sequences were successfully detected in plasma and urine samples from pregnant women carrying male fetuses from as early as the eighth week of gestation. Paternally inherited polymorphisms, specific for the autosomal chromosomes, were also detected in maternal plasma and urine samples, indicating that QF-PCR can be exploited for non-invasive prenatal chromosomal analysis. Finally, this approach may also be applied for preimplantation chromosomal diagnosis given the small amount of DNA required for analysis.

This work is supported by a "K. Karatheodori" grant from the Research Committee of University of Patras

**ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΥΦΗ ΤΩΝ ΚΥΣΤΟΛΙΘΩΝ ΣΕ ΙΔΙΟ-
ΒΛΑΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑΣ ΑΝΑΠΤΥΣ-
ΣΟΜΕΝΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΤΗΣ ΣΥΚΙΑΣ (*Ficus carica* L.)****Δαρμογιάννη, Α., Δεμπονέρα, Έ., Φιλίππου, Μ. και Κ. Φασσέας**Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Βιολογίας
Φυτών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα.

Οι κυστόλιθοι έχουν παρατηρηθεί σε πολλές οικογένειες φυτών μέσα σε ιδιόβλαστα κύτταρα, τις λιθοκύστες. Ο ρόλος τους δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένος αλλά οι πιο πρόσφατες αντιλήψεις είναι ότι ένας από τους πιθανούς ρόλους τους είναι και η άμυνα του φυτού από φυτοφάγα ζώα.

Με τη διαφοροποίηση των ιστών του φύλλου διαφοροποιούνται και οι ιδιοβλάστες στην αποαξονική επιφάνεια των φύλλων της συκιάς. Ο αριθμός των ιδιοβλαστών στα πλήρως αναπτυγμένα φύλλα είναι $27 \pm 5 \text{mm}^{-2}$. Στο ΗΜΣ οι ιδιοβλάστες αναγνωρίζονται από μια χαρακτηριστική κυκλική δομή με ένα ημισφαιρικό σφαιρικό έπαρμα στο κέντρο της το οποίο πολλές φορές έχει τη μορφή κοντής τρίχας. Ο κυστόλιθος αποτελείται από μια ακανόνιστη σφαιρική δομή και έναν αναρτήρα με τον οποίο αναρτάται από το κέντρο του εξωτερικού κυτταρικού τοιχώματος. Η μάζα του κυστόλιθου είναι ανομοιογενής. Διακρίνεται μια κεντρική ηλεκτρονικά πυκνή περιοχή που περιβάλλεται από μια λιγότερο πυκνή. Με το ΗΜΔ διακρίνονται μέσα στον κυστόλιθο κυστίδια, κυρίως κατά την ανάπτυξη του, δομές που μοιάζουν με κυτταρικό τοίχωμα και ηλεκτρονικά πυκνές μάζες με κοκκιώδη ή ινώδη μορφή. Μικροανάλυση με ακτίνες Χ έδειξαν ότι στον αναρτήρα, όπως και στο εξωτερικό έπαρμα ή την τρίχα, υπάρχει κυρίως πυρίτιο ενώ στο σφαιρικό τμήμα του κυστόλιθου υπάρχει κυρίως ασβέστιο. Ο χαρακτηριστικός κίτρινος-καφέ φθορισμός τους δείχνει την ύπαρξη φαινολικών ουσιών στο σφαιρικό τμήμα του κυστόλιθου όχι όμως και στον αναρτήρα. Το εξωτερικό περικλινές κυτταρικό τοίχωμα του ιδιόβλαστου κυττάρου είναι κατά πολύ λεπτότερο του εξωτερικού τοιχώματος των γειτονικών επιδερμικών κυττάρων, χωρίς εφυμενίδα ενώ εμφανίζεται έντονα ηλεκτρονικά πυκνό.

**DEVELOPMENT AND STRUCTURE OF LITHOCYSTS IN
IDIOBLASTIC CELLS OF THE EPIDERMIS OF
EXPANDING LEAVES OF THE FIG TREE (*Ficus carica* L.)**

Darmogianni, A., Dembonera, E., Filippou, M., and C. Fasseas

Electron Microscopy Laboratory, Faculty of Agricultural Biotechnology, Department of Plant Biology,
Iera Odos 75, 11855 Athens

Cystoliths have been observed in many plant families within idioblastic cells, the lithocysts. Their role is not yet fully clarified but most recent thoughts suppose that they participate in defense against herbivores.

As the leaf tissues differentiate, lithocysts (or idioblasts) differentiate on the abaxial surface of the fig leaves. The number of lithocysts on a fully expanded leaf is $27 \pm 5 \text{ mm}^{-2}$. With the SEM lithocysts can be identified from a circular structure with a hemispherical projection, which often appears as a small hair. The cystolith is composed of an irregular spherical structure and a suspensor from which the cystolith is suspended from the center of the external cell wall. The mass of the cystolith is inhomogeneous. The center of the cystolith is electron dense surrounded by a less dense area. In the center of the cystolith numerous vesicle like structures are observed and especially in those which are not fully developed, cell wall-like structures and electron dense structures with either granular or fibrillar appearance. X-ray microanalysis reveals that the cystolith suspensor and the projection contain mainly silicone and the spherical mass mainly contains calcium. The characteristic yellow-brown fluorescence emitted by the cystoliths but not the suspensor, indicates the presence of phenolic compounds. The external periclinal cell wall of the lithocyst is much thinner than the walls of the neighboring cells and it is very electron dense and lacks cuticle.

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΟΜΟΛΟΓΕΣ ΠΡΟΣ ΤΙΣ HIGH MOBILITY GROUP ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΕ ΕΝΤΟΜΑ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ

Δελή Χ., Νινιός Γ., Αγγελουπούλου Β., Αλεπόρου-Μαρίνου Β., Παταργιάς Θ.

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 157 81 Αθήνα

Οι high mobility group (HMG) πρωτεΐνες συνιστούν μια ομάδα χρωμοσωμικών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μελετηθεί εκτεταμένα στα θηλαστικά και έχουν ομαδοποιηθεί σε τρεις οικογένειες: την HMGB, την HMGN και την HMGA. Η πρώτη αναφορά HMG-παρόμοιων πρωτεϊνών σε έντομα έγινε πριν δύο δεκαετίες περίπου και συγκεκριμένα στη *Drosophila melanogaster* και στο *Chironomus tetans*. Στα δύο αυτά είδη διπτέρων έχει πιστοποιηθεί η παρουσία τριών πρωτεϊνών της κατηγορίας αυτής, αλλά ο κυτταρικός τους ρόλος παραμένει αδιευκρίνιστος. Οι δύο από τις πρωτεΐνες αυτές ανήκουν στην οικογένεια HMGB και η μια στην οικογένεια HMGA. Συγκεκριμένα, στο *Chironomus tetans* οι cHMGB1a και cHMGB1b ανήκουν στην οικογένεια HMGB ενώ οι αντίστοιχες πρωτεΐνες της *Drosophila* είναι οι HMGD και HMGZ. Οι πρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται από τη δομή HMG-box, που είναι η περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο DNA. Το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών κυμαίνεται στα 12-16 kDa, πρόκειται δηλαδή για μικρού μεγέθους πρωτεΐνες. Η οικογένεια HMGA αντιπροσωπεύεται στο *Chironomus* και στη *Drosophila* από δύο πρωτεΐνες που διαφέρουν πολύ ως προς το μέγεθος. Στο *Chironomus* έχει ταυτοποιηθεί η πρωτεΐνη cHMGA με μοριακό βάρος 10.4 kDa, που περιέχει τρεις περιοχές δομής AT-αγκιστριού (AT-hook), ενώ στη *Drosophila* η αντίστοιχη πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 37 kDa και εμφανίζει 11 περιοχές δομής AT-αγκιστριού. Η περιοχή αυτή αντιστοιχεί στην περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο DNA. Σε κανένα από τα δύο έντομα δεν έχουν βρεθεί μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών HMGN. Στο εργαστήριό μας γίνεται προσπάθεια να συμπληρωθεί η εικόνα του προτύπου των πρωτεϊνών αυτών, πέρα από τα δίπτερα που έχουν ήδη μελετηθεί. Για το σκοπό αυτό σε προηγούμενη εργασία μελετήθηκαν οι HMG πρωτεΐνες στην *Plodia interpunctella* που ανήκει στα λεπιδόπτερα και διαπιστώθηκε η ύπαρξη πρωτεϊνών ομόλογων προς τις ήδη γνωστές HMGD, HMGZ, cHMGB1a, cHMGB1b και cHMGA. Σε επόμενο στάδιο έγινε προσπάθεια να μελετηθούν οι HMG-παρόμοιες πρωτεΐνες σε δύο έντομα οικονομικής σημασίας: στο *Dacus oleae* και στο *Ceratitis capitata*. Για το σκοπό αυτό έγινε εκχύλιση των πρωτεϊνών από προνύμφες των εντόμων και ακολούθησε ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός. Ο προσδιορισμός τους και η συσχέτισή τους με τις ήδη γνωστές πρωτεΐνες των εντόμων έγινε με τη μέθοδο της ανοσοεντόπισης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών HMGD και HMGZ της *Drosophila* καθώς και έναντι των πρωτεϊνών cHMGB1α, cHMGB1β και cHMGA του *Chironomus*. Έγινε επίσης προσδιορισμός του μοριακού βάρους με βάση την ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-ακρυλαμίδης.

PROTEINS HOMOLOGOUS TO MAMMALIAN HIGH MOBILITY GROUP PROTEINS IN INSECTS OF FINANCIAL IMPORTANCE

Deli, C., Ninios, Y., Agelopoulou, B., Aleporou-Marinou, V., Patargias, T.

Department of Biology, Division of Genetics and Biotechnology, University of Athens

The High Mobility Group (HMG) proteins are an abundant class of chromosomal proteins. The mammalian HMG proteins have been grouped in three distinct families on the basis of their electrophoretic and biochemical properties: the HMGB, the HMGN and the HMGA family. The insects provide an excellent system in which to study the architectural HMG proteins since biochemical, genetic, cytological, and molecular approaches can be combined easily. The HMG proteins of the fruit fly *Drosophila melanogaster* and the midge *Chironomus tentans* probably are the best characterized non-mammalian members of this group of non-histone proteins. Both *Drosophila* and *Chironomus* seem to have three abundant HMG proteins. In *Chironomus* the HMGB protein family is represented by the cHMGB1a and cHMGB1b. In *Drosophila* the HMGB counterparts are the proteins HMGD and HMGZ. These proteins are rich in both acidic and basic amino acids, have low molecular weight in the range of 12-16 kDa and contain the characteristic HMG1-box domain. The HMGA family is represented in *Chironomus* by the cHMGA protein which contains 3 AT-hooks (the DNA binding domain) and an acidic tail and has a molecular weight of 10.4 kDa. Its counterpart in *Drosophila* is a much larger protein (M.W=37 kDa) which has 11 AT-hook motifs and no acidic tail. No members of the HMGN family have been reported in insects.

In the present work attention is focused on the analysis of HMG proteins in insects of financial importance, such as *Ceratitis capitata* and *Dacus oleae*. Previous work of our team reported the presence of HMG-like proteins in *Plodia interpunctella* (member of lepidoptera) that were characterized by immunoblot analysis. Proteins homologous to the HMGD, HMGZ, cHMGB1a, cHMGB1b and cHMGI proteins have been identified in this insect. In *Ceratitis* and *Dacus* protein extraction was performed by 5% perchloric acid, 0.35 M NaCl and 10 mM Ethidium bromide. The proteins were characterized electrophoretically and using immunoblotting technique. Antibodies against the proteins HMGD, HMGZ, cHMGB1a, cHMGB1b and cHMGA were used. The amino acid constitution of the proteins was also estimated. The results indicate that both insects have proteins homologous to the mammalian HMG proteins belonging to HMGB and HMGA families.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΦΩΣΦΟΪΝΟΣΙΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΔΥΟ ΣΤΕΛΕΧΗ
***Tetrahymena thermophila* ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΠΟΥ**
ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΠΟΡΕΙΕΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ**Δελλή, Α.¹, Λεονταρίτης, Γ.¹, Tiedtke, A.² και Ντ. Γαλανοπούλου²**¹Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας, Ζωγράφου, 15771 Αθήνα²Institute of General Zoology and Genetics, University of Muenster,
Schlossplatz 5, D48149 Muenster, Germany

Είναι ήδη γνωστή η παρουσία φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PtdIns) και των 4-φωσφορυλιωμένων παραγώγων της στο πρωτόζωο *Tetrahymena*. Πρόσφατα εντοπίστηκαν στον οργανισμό αυτό και 3-φωσφορυλιωμένα παράγωγα της PtdIns (3-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, PtdIns3P), ενώσεις που σε κύτταρα θηλαστικών αλλά και στη ζύμη ρυθμίζουν πορείες ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας μεμβρανών. Για να διαπιστωθεί αν ανάλογοι μηχανισμοί λειτουργούν και στην *Tetrahymena* είναι αναγκαία η μελέτη των φωσφοϊνοσιτιδίων και ειδικότερα της PtdIns3P σε μεταλλαγμένα στελέχη που δεν διαθέτουν μια από τις πορείες κυκλοφορίας μεμβρανών. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν το στέλεχος MS-1, το οποίο δεν εκκρίνει λυσοσωμιακές όξινες υδρολάσες και το στέλεχος B4, το οποίο δεν σχηματίζει φαγοσώματα. Τα μεταλλαγμένα στελέχη εμφάνισαν, μετά από επισήμανση με [³H]ινοσιτόλη, μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε PtdInsP σε σχέση με αυτήν του στελέχους αγρίου τύπου (στο B4 είναι διπλάσια όταν η επισήμανση γίνεται σε πλουσιότερο θρεπτικό υλικό), αν και η ενσωμάτωση της [³H]ινοσιτόλης στα φωσφολιπίδια είναι μειωμένη κατά 30%. Όλα τα στελέχη διαθέτουν το 3-ισομερές της PtdInsP, το στέλεχος MS-1 όμως έχει μικρότερο λόγο PtdIns3P/PtdIns4P. Τέλος, και τα δυο μεταλλαγμένα στελέχη εμφανίζουν ~50% μικρότερη περιεκτικότητα σε φωσφατιδυλοχολίνη, ένα από τα κύρια μεμβρανικά λιπίδια της *Tetrahymena*. Σε συνθήκες διέγερσης, υπεροσμωτικό σοκ προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της συνολικής PtdInsP και στα 3 στελέχη χωρίς μεταβολές των επιπέδων της PtdInsP₂. Στα μεταλλαγμένα, ωστόσο η αύξηση αυτή είναι διπλάσια. Οι διαφορές στα σχετικά επίπεδα των φωσφοϊνοσιτιδίων στα συγκεκριμένα μεταλλαγμένα στελέχη *T.thermophila* υποδηλώνουν πιθανή συμμετοχή των φωσφολιπιδίων αυτών στη λειτουργία του φαγολυσοσωμιακού συστήματος του πρωτοζώου.

COMPARATIVE ANALYSIS OF PHOSPHOINOSITIDES IN TWO *Tetrahymena thermophila* MUTANTS BLOCKED IN SECRETION OF LYSOSOMAL ENZYMES AND BIOGENESIS OF PHAGOSOMES

Deli, D.¹, Leondaritis, G.¹, Tiedtke, A.², and D. Galanopoulou¹

¹University of Athens, Department of Chemistry, Zografou, 15771

²Institute for General Zoology and Genetics, University of Muenster,
Schlossplatz 5, D-48149 Muenster, Germany

Studies from our group and others have shown that phosphatidylinositol, PtdIns and 4-phosphorylated analogues are present in the unicellular eukaryote *Tetrahymena*. Recently, there was evidence for the presence of 3-phosphorylated analogues of PtdIns (phosphatidylinositol 3-phosphate, PtdIns3P) in *T.pyriformis*. The 3-phosphoinositides are involved in the regulation of several membrane trafficking pathways in mammalian and yeast cells. In order to determine the role of these phospholipids, and especially PtdIns3P, in *Tetrahymena* we studied their metabolism in mutant cells that are blocked in two distinct but interactive intracellular membrane trafficking pathways. Therefore, we used MS-1, a mutant strain of *T.thermophila* blocked in secretion of lysosomal acid hydrolases and B4, a mutant strain blocked in biogenesis of phagosomes. After *in vivo* labelling with [³H]inositol, both mutants were found to have 30% less incorporation of [³H]inositol into the phospholipid fraction. Both mutants, however, exhibited higher levels of PtdInsP when compared to the wild type. Although all strains possess the 3-phosphorylated analogue, MS-1 cells exhibited a lower PtdIns3P/PtdIns4P ratio. In addition, both mutant cells exhibited a striking decrease (~50%) in phosphatidylcholine, one of the main structural lipids of *Tetrahymena*. In stimulation experiments, we found that an hyperosmotic shock increased total PtdInsP levels without any effects on PtdInsP₂. In mutant cells this increase was 2-fold higher than in the wild type. The differences observed in phosphoinositide levels in mutant *T.thermophila* cells suggest a possible involvement in the phagosome-lysosome trafficking pathway. However, further studies are needed to elucidate a functional significance of these metabolites in membrane trafficking in *Tetrahymena*.

ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΥΦΗ ΤΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ ΟΞΑΛΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ΣΕ ΙΔΙΟΒΛΑΣΤΕΣ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΤΗΣ ΣΥΚΙΑΣ (*Ficus carica* L.)

Δεμπονέρα, Ε., Α. Δαρμογιάννη, Μ. Φιλίππου και Κ. Φασσέας

Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Βιολογίας
Φυτών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα.

Οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα όργανα πολλών φυτικών ειδών. Ο ρόλος του δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένος. Μια εκδοχή για το ρόλο του είναι η απενεργοποίηση του οξαλικού οξέως που παράγεται κατά την κυτταρική αναπνοή που είναι τοξικό για τα κύτταρα.

Οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου εμφανίζονται σε όλα τα κύτταρα του μεσόφυλλου της συκιάς. Μεγάλοι όμως κρύσταλλοι περίπου 20-30μm που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου παρατηρούνται σε ιδιόβλαστα κύτταρα που διαφοροποιούνται με μεγαλύτερη συχνότητα στο πασσαλώδες και πολύ μικρότερη στο σπογγώδες παρέγχυμα, καθώς και στις επεκτάσεις των ηθμαγγειωδών δεσμίδων. Η οντογένεσή τους ξεκινάει με τη διαφοροποίηση των διαφόρων ιστών όταν το φύλλο είναι περίπου 10mm μήκος. Οι κρύσταλλοι εμφανίζονται ένας ανά κύτταρο ενώ το μέγεθός τους αυξάνεται με την ενηλικίωση των φύλλων. Τα ιδιόβλαστα κύτταρα που περιέχουν κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου εμφανίζονται είτε μεμονωμένα είτε σε ομάδες 2-4 κυττάρων. Οι κρύσταλλοι εμφανίζονται εντελώς διαφανείς οπτικά, δεν χρωματίζονται με κυανό της τολουιδίνης και δεν φθορίζουν. Η δημιουργία του κρυστάλλου ξεκινάει από το κέντρο του κυττάρου. Αρχικά εμφανίζονται χυμοτόπια στην περιφέρεια που περιβάλλουν τον αναπτυσσόμενο κρύσταλλο και τα οποία τελικά συντήκονται σε ένα χυμοτόπιο που περιέχει τον κρύσταλλο. Τα υπολείμματα τμημάτων του τονοπλάστη διατάσσονται γύρω από τον κρύσταλλο. Μικροανάλυση με ακτίνες Χ επιβεβαίωσε ότι το στοιχείο που κυριαρχεί στους κρυστάλλους είναι το ασβέστιο. Τα κυτταρικά τοιχώματα των ιδιοβλαστών είναι παχύτερα από εκείνα των γειτονικών κυττάρων. Το κυτταρόπλασμα των ιδιοβλαστών κυττάρων είναι αραιότερο από εκείνο των γειτονικών με λιγότερα οργανίδια.

**DEVELOPMENT AND STRUCTURE OF CALCIUM
OXALATE CRYSTALS IN IDIOBLASTIC CELLS
DEVELOPING IN EXPANDING LEAVES OF THE
FIG TREE (*Ficus carica* L.)**

Dembonera, E., Darmogianni, A., Filippou, M., and C. Fasseas

Electron Microscopy Laboratory, Department of Plant Biology, Faculty of Agricultural Biotechnology,
Iera Odos 75, 11855 Athens

Calcium oxalate crystals have been observed in a number of plant parts of many plant families. Their role is not fully understood. One role is considered to be the inactivation of oxalic acid, a byproduct of cellular respiration, which is toxic for the cell. Calcium oxalate crystals develop in all types of cells of the fig leaf mesophyll. Large crystals, approx. 20-30 μ m which occupy most of the cell volume are observed in idioblastic cells which more often differentiate within the palisade cells and to a lesser extent amongst the spongy parenchyma cells as well as within some cells of the bundle sheath extensions. The crystal development starts with the differentiation of the leaf tissues when the leaf is approx. 10mm long. The crystals develop singly in the cells and their size increases with age. The idioblasts containing the calcium oxalate crystals appear either singly or in groups of 2-4 cells. The crystals appear totally transparent, they do not stain with toluidine blue and they do not emit any fluorescence when examined with the fluorescence microscope. The crystals always develop in the middle of the cells. Their development begins with the development of vacuoles in the periphery of the cells that surround the developing crystal and finally fuse into one large vacuole that contains the crystal. X-ray microanalysis verified that the dominant element in the crystal is calcium. The cell walls of the crystal containing idioblastic cells are thicker than the other mesophyll cells and with fewer organelles.

**ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ ΤΗΣ
ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ SHOCK ΣΤΑ ΔΙΚΤΥΑ ΑΚΤΙΝΗΣ ΚΑΙ
ΜΙΚΡΟΣΩΛΗΝΙΣΚΩΝ ΣΕ ΣΙΑΛΟΓΟΝΟΥΣ ΑΔΕΝΕΣ ΤΗΣ
*Drosophila auraria***

Δημοπούλου, Κ.¹, Ψαρρά, Α-Μ.², Θωμόπουλος, Γ.Ν.¹

¹ Τομέας Γενετικής Ανάπτυξης και Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 541 24, Θεσσαλονίκη

² Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας, Γουδί 115 27, Αθήνα

Η επίδραση θερμικού shock σε σιαλογόνους αδένες *Drosophila auraria* που βρίσκονται στο τέλος του τρίτου προνυμφικού σταδίου ανάπτυξης, προκαλεί τρεις κύριες αλλαγές στη λεπτή δομή των κυτάρων: α) εμφάνιση λυσοσωμικών δομών, β) αλλαγές στη μιτοχονδριακή μορφολογία και εμφάνιση ενδομιτοχονδριακών κοκκίων και γ) μορφολογικές αλλαγές στα εκκριτικά κοκκία (Dimopoulou & Thomopoulos, 2000). Για να μελετηθεί η επίδραση του θερμικού shock στο τρισδιάστατο δίκτυο του κυτταρικού σκελετού χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού και συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης. Ολόκληροι σιαλογόνοι αδένες *Drosophila auraria* που βρίσκονταν στο τέλος του 3^{ου} προνυμφικού σταδίου επεξεργάστηκαν με φαλλοϊδίνη ή anti-β-tubulin, τα οποία αναγνωρίζουν ειδικά μικροϊνίδια ακτίνης και μικροσωληνίσκους, αντίστοιχα. Τα πειράματα έγιναν σε σιαλογόνους αδένες από ζώα που βρίσκονταν σε θερμοκρασία δωματίου (25°C±1) ή υποβλήθηκαν σε θερμικό shock στους 37° C ή 40°C, για 40min. Τα αποτελέσματα δηλώνουν ότι η επίδραση θερμικού shock δεν προκαλεί την πλήρη κατάρρευση των δικτύων μικροϊνιδίων ακτίνης και μικροσωληνίσκων, αλλά μικρές αναδιατάξεις. Το δίκτυο ακτίνης μετατοπίζεται κοντά στην πλασματική μεμβράνη, ενώ το δίκτυο των μικροσωληνίσκων συγκεντρώνεται γύρω από τον πυρηνικό φάκελο.

Βιβλιογραφία: Dimopoulou, K., and Thomopoulos GN (2000). *J Submicrosc Cytol Pathol* 32(4): 573-84

CONFOCAL MICROSCOPIC STUDY OF THE HEAT SHOCK EFFECT ON *Drosophila auraria* LATE THIRD INSTAR SALIVARY GLAND CYTOSKELETAL NETWORKS OF MICROFILAMENTS AND MICROTUBULES

Dimopoulou, K.¹, Psarra, A-M.², Thomopoulos, G.N.¹

¹Dept. of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Aristotle University, 54 124 Thessaloniki

²Medical School, Dept. of Pathology and Physiology, University of Athens, Goudi 115 27, Athens

Heat shock treatment on *Drosophila auraria* late 3rd instar larval salivary glands induces three main changes, compared to the normal ultrastructure of the salivary gland cells: a) appearance of lysosomal structures; b) alterations in mitochondrial morphology and appearance of intramitochondrial granules and c) morphological changes of the secretory granules (Dimopoulou and Thomopoulos, 2000). In order to study the three-dimensional cytoskeletal structure of microfilaments and microtubules, immunofluorescence and confocal microscopy techniques have been applied. Whole-mounted late third instar salivary glands from *Drosophila auraria* have been treated with FITC-conjugated phalloidin or FITC-conjugated anti- β -tubulin, which recognize actin microfilaments and microtubules, respectively. The three-dimensional actin microfilament and microtubule networks were examined in control salivary glands (25 \pm 1°C) and in salivary glands after a temperature rise from normal to 37°C or 40°C for 40 min. The results suggest that heat shock treatment does not cause collapse of these networks, but moderate rearrangements. Actin microfilaments relocate near the cell membrane, while microtubule network becomes denser around the nucleus.

References: Dimopoulou, K and Thomopoulos GN (2000). *J Submicrosc Cytol Pathol* 32(4): 573-84

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *nf1*
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΕΥΡΙΝΩΜΑΤΩΣΗ ΤΥΠΟΥ 1****Διακίδη-Κώστα, Α.^{1,2}, Κατάκη, Α.¹, Κωνσταντουλάκης, Μ.¹,
Βασιλόπουλος, Δ.², Γιαπιτζάκης, Χ.²**¹ Α' Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Ιπποκράτειο Νοσοκομείο² Νευρολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αιγινήτειο
Νοσοκομείο

Η νευρινωμάτωση τύπου 1 (NF1, νόσος von Recklinghausen) είναι μία νευρολογική αυτοσωματική επικρατητική διαταραχή, που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *nf1*. Η συχνότητα εμφάνισης είναι 1 / 3000 άτομα. Χαρακτηριστικές κλινικές εκδηλώσεις της νόσου αποτελούν τα νευρινώματα, οι café au lait κηλίδες, τα καλοήγη αμαρτώματα της ίριδας, καθώς και η ανάπτυξη όγκων στον εγκέφαλο. Το υπεύθυνο γονίδιο *nf1* εδράζεται στη θέση 17q11.2, καλύπτει >350 kb του γονιδιωματικού DNA και περιλαμβάνει 60 εξόνια. Το συχνότερο μετάγραφο του κωδικοποιεί για ένα πολυπεπτιδίο 2818 αα (νευρινωμίνη), που φυσιολογικά φαίνεται ότι δρα ογκοκατασταλτικά. Το μεγάλο μέγεθος του γονιδίου συνδέεται με αυξημένη συχνότητα de novo μεταλλάξεων, με αποτέλεσμα περίπου το 50% των παρατηρούμενων περιστατικών με NF1 να είναι σποραδικά. Η ανίχνευση της υπεύθυνης μετάλλαξης σε κάθε ασθενή έχει ιδιαίτερη σημασία, αφενός για τη συσχέτιση φαινοτύπου-γονοτύπου και την καλύτερη κατανόηση της μοριακής αιτιολογίας της νόσου και αφετέρου για παροχή γενετικής συμβουλής στην οικογένεια του ασθενούς.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δείγματα αίματος 40 μη συγγενών ασθενών με NF1 από όλη την Ελλάδα. Απομονώθηκε DNA από λεμφοκύτταρα και με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ενισχύθηκαν συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου (εξόνια 31-34). Με ανάλυση διαμόρφωσης μονής αλυσίδας (SSCP) επιχειρήθηκε έλεγχος για ανίχνευση μεταλλάξεων. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA από δείγματα αίματος 8 ασθενών, παραγωγή cDNA (με RT-PCR) και in vitro πρωτεϊνοσύνθεση με μέθοδο PTT (protein truncated test). Με τις δύο μεθοδολογίες ανιχνεύθηκε ένας αριθμός υποψήφιων μεταλλάξεων, στις οποίες πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων. Έως τώρα ανιχνεύθηκαν οι μεταλλάξεις UCC(Ser)→UGC(Tyr) (κωδικόνιο 2180, εξόνιο 34), ACA(Thr)→AGA(Arg) (κωδικόνιο 1983, εξόνιο 32), AAA(Lys)→ATA(Asn) (κωδικόνιο 2006, εξόνιο 32) καθώς και οι πολυμορφισμοί AAA(Lys)→Lys (AAG) (κωδικόνιο 1995) και GTT(Val)→GTA(Val) (κωδικόνιο 2029). Η παρούσα μελέτη είναι σε εξέλιξη.

MUTATION SCREENING OF THE *nf1* GENE, IN NEUROFIBROMATOSIS TYPE 1 PATIENTS

Diakidi-Kosta A.^{1,2}, Katakis, A.¹, Konstadoulakis, M.¹, Vassilopoulos, D.²,
Yapijakis, C.²

¹First Department of Propaedeutic Surgical Clinic, Medical School, University of Athens,
Hippocraton Hospital

²Dept of Neurology, Medical School, University of Athens, Eginition Hospital

Neurofibromatosis type 1 (NF1, von Recklinghausen's disease) is a common autosomal dominant disorder caused by mutations in the *nf1* gene. It has a prevalence of 1/3000 individuals. Clinical characteristics of the disease include multiple neurofibromas, café-au-lait spots, iris hamartomas, as well as brain tumors. The responsible gene *nf1* is located on chromosome 17q11.2, spans over 350 Kb of the genomic DNA and includes 60 exons. Its most common transcript encodes a polypeptide of 2818 amino acids, called neurofibromin, which is considered to be a tumor suppressor protein. The great size of the gene reflects to an increased rate of de novo mutations, and as a consequence, up to 50% of NF1 cases are sporadic. Detection of the responsible mutation is very important for phenotype-genotype correlation studies, for unravelling the molecular pathogenetic mechanisms, and for genetic counselling to interested families.

The used mutation analysis approach included DNA isolation from blood lymphocytes from 40 unrelated Greek patients with NF1, PCR amplification of exons 31-34 and SSSP analysis. In parallel, another approach was used, including RNA isolation from blood samples of 8 Greek patients, cDNA production with RT-PCR and in vitro proteinsynthesis with the protein truncation test (PTT). A number of candidate mutations was identified with the two approaches, which were further analysed by DNA sequencing. Preliminary results include point mutations UCC(Ser)→UGC(Tyr) (codon 2180, exon 34), ACA(Thr)→AGA(Arg) (codon 1983, exon 32), AAA(Lys)→ATA(Asn) (codon 2006, exon 32) as well as polymorphisms AAA(Lys)→Lys(AAG) (codon 1995) and GTT(Val)→GTA(Val) (codon 2029). This study is in progress.

**ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΛΑΓΚΤΙΚΩΝ ΔΙΝΟΜΑΣΤΙΓΩ-
ΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΘΕΡΜΑΪΚΟ ΚΟΛΠΟ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ SSU
ΚΑΙ LSU ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΟΥ RNA ΚΑΙ
ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ SEM**

Δολαψάκης, Ν.¹, Kilpatrick, Μ.², Οικονόμου-Αμίλλη, Α.¹ και Τ. Τάφας¹

¹Τομέας Οικολογίας και Ταξινόμικης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών 15784

²Department of Pediatrics, UCHC, University of Connecticut, USA

Ανάλυση αλληλουχιών της μικρής υπομονάδας (SSU) και της μεγάλης υπομονάδας (LSU) rDNA χρησιμοποιήθηκαν για την ταξινόμική ταυτοποίηση πλαγκτικών μικροφυκών από τον Θερμαϊκό κόλπο που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς λίγα είναι γνωστά για την γενετική του θαλάσσιου πλαγκτού της Μεσογείου. Σε δύο απομονωμένους κλώνους δινομαστιγωτών μελετήθηκε μικροσκοπικά η μορφολογία της θήκης τόσο σε ζωντανά όσο και σε συντηρημένα δείγματα με οπτική μικροσκοπία, μικροσκοπία φθορισμού και ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Για την ανάλυση rDNA, αλληλουχία 700 bp από το 5' άκρο της LSU που περιείχε διαφοροποιημένες περιοχές και μια αλληλουχία 1.8 kbp που περιλάμβανε το μεγαλύτερο μέρος της SSU πολλαπλασιάστηκαν με PCR γενωμικού DNA και αναλύθηκαν με απευθείας sequencing. Με βάση τη μορφολογία οι δύο κλώνοι κατατάσσονται ως *Prorocentrum cf. micans* (Prorocentrales, Prorocentraceae) και *Coolia cf. monotis* (Gonyaulacales, Ostreopsidaceae). Σύγκριση των αλληλουχιών rDNA με υπάρχουσες κατατεθειμένες αλληλουχίες επιβεβαίωσε τα μορφολογικά ευρήματα. Η *Prorocentrum* LSU βρέθηκε να είναι σχεδόν ταυτόσημη με μια προηγούμενως αναφερθείσα αλληλουχία *P. micans*, ενώ η αλληλουχία SSU έδωσε παρόμοια αποτελέσματα. Για την *Coolia*, η αλληλουχία LSU έδειξε να είναι σχεδόν ταυτόσημη με τα *C. malayense* και *C. monotis* και παρόμοια με αλληλουχίες κλώνων *Alexandrium* και *Protoceratium*. Δεν βρέθηκαν κατατεθειμένες πληροφορίες για το θραύσμα SSU, αλλά ομοιότητα βρέθηκε με αλληλουχία κλώνου *Alexandrium*. Εκτός του ότι η μοριακή ταυτοποίηση των δύο κλώνων υποστηρίζει τα μορφολογικά ευρήματα δίνεται η ευκαιρία δημιουργίας μοριακών εκκινήτων για την ακριβή και ταχεία μικροσκοπική ανίχνευση των οργανισμών αυτών σε περιβαλλοντικά δείγματα.

TAXONOMIC CHARACTERIZATION OF TWO PLANKTIC DINOFLAGELLATE STRAINS FROM THERMAIKOS GULF, USING SSU AND LSU RIBOSOMAL DNA SEQUENCES AND SEM AND FLUORESCENCE MICROSCOPY

Dolapsakis, N.¹, Kilpatrick, M.², Economou-Amilli, A.¹, and T. Tafas¹

¹Department of Ecology and Systematics, Faculty of Biology, University of Athens 15784, Greece

²Department of Pediatrics, UCHC, University of Connecticut, USA

The sequences of ribosomal RNA genes (rDNA) have been used extensively in phylogenetic microalgal analysis. Sequence analysis of small-subunit (SSU) and large subunit (LSU) rDNA were used for the taxonomic characterization of plankton dinoflagellates from Greek waters. This approach is interesting as a limited amount of genetic information is available on marine plankton from the Mediterranean area. Two isolated dinoflagellate strains were analyzed using both standard morphological methods and rDNA analysis. Cellular morphology was studied using live and fixed specimens under optical and scanning electron microscopy and compared to published material. For rDNA analysis, a 700 bp fragment from the 5'end of the LSU containing the divergent domains and a 1.8 kbp fragment comprising most of the SSU were generated by PCR amplification of genomic DNA and analyzed by direct sequencing. Results showed that morphologically, the two dinoflagellates appeared to be *Prorocentrum* cf. *micans* (Prorocentrales, Prorocentraceae) and *Coolia* cf. *monotis* (Gonyaulacales, Ostreopsidaceae). Comparison of the rDNA sequences to existing databases confirmed the morphological findings. The *Prorocentrum* LSU was found to be nearly identical to a previously reported *P. micans* sequence, while the SSU sequence gave similar results. For *Coolia*, the LSU fragment proved to be nearly identical to those of *C. malayense* and *C. monotis* and similar to *Alexandrium* and *Protoceratium* strains. No deposited data was available for the SSU fragment, but the sequence was similar to that of *Alexandrium*. Molecular characterization of the two strains is supporting morphological findings in our study. Furthermore, the detection of such organisms in environmental samples can be done very efficiently, by using the above findings for the creation of species-specific molecular markers.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ ΤΟΠΟΥ *WHITE* ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *Bactrocera oleae*

Δροσοπούλου, Ε., Καρπουχτσής, Ι., Σκούρας, Ζ.Γ., και Π. Μαυραγάνη-Τσιπίδου

Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 54 124 Θεσσαλονίκη

Το έντομο *Bactrocera oleae*, ο κοινός "δάκος της ελιάς", έχει ιδιαίτερη οικονομική σημασία για όλες τις μεσογειακές χώρες, καθώς προκαλεί εκτεταμένες καταστροφές στην ελαιοπαραγωγή. Η μελέτη του εντόμου αυτού, σε μοριακό κυρίως επίπεδο, μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην προσπάθεια καταπολέμησής του με βιολογικές μεθόδους. Η παρούσα εργασία, που αποτελεί μέρος μιας συνολικότερης προσπάθειας ανάλυσης και χαρτογράφησης του γονιδιώματος του δάκου, επικεντρώνεται στη μελέτη του γονιδιωματικού τόπου *white*. Ο τόπος αυτός έχει αναγνωριστεί και χαρακτηριστεί σε αρκετά δίπτερα και έχει χρησιμοποιηθεί ως φαινοτυπικός μάρτυρας σε πειράματα γενετικού μετασχηματισμού. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν άτομα του εργαστηριακού στελέχους ΑΤ του *B. oleae*, ενώ ως ανιχνευτής στους υβριδισμούς χρησιμοποιήθηκε γονιδιωματικό τμήμα του γονιδίου *white* του εντόμου *B. tryoni*. Πραγματοποιήθηκαν υβριδισμοί *in situ* σε πολυταινικά χρωμοσώματα σιαλογόνων αδένων και βρέθηκε ότι το γονίδιο *white* του *B. oleae* εδράζεται στη θέση 13 του ΙΙ χρωμοσωματικού βραχίονα. Επιπρόσθετα, κατασκευάστηκε ολική γονιδιωματική βιβλιοθήκη του εντόμου *B. oleae*, από την οποία απομονώθηκαν τέσσερις γονιδιωματικοί κλώνοι. Χαρτογράφηση των κλώνων με ενδονουκλεάσες περιορισμού και υβριδισμούς κατά Southern έδειξε ότι καλύπτουν γονιδιωματική περιοχή μεγέθους περίπου 24 kb, μέσα στην οποία αναγνωρίστηκε τμήμα *EcoRI/SalI* μεγέθους 3.2 kb, που παρουσιάζει ομολογία με τα εξώνια 2-6 του γονιδίου *white* του *B. tryoni*. Υποκλωνοποίηση του παραπάνω τμήματος αναμένεται να δώσει περισσότερες πληροφορίες για την οργάνωση του γονιδίου *white* στο *B. oleae*.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE *WHITE* GENOMIC LOCUS OF *Bactrocera oleae*

Drosopoulou E., Karpouhtsis, I., Scouras, Z.G., and P. Mavragani-Tsipidou

Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology,
Faculty of Science, Aristotle University, 54 124 Thessaloniki

Bactrocera oleae is an insect species of great economical importance due to the losses of the olive fruit crops. Molecular studies of the insect can significantly contribute to the efforts of its biological control. The present report is part of an ongoing effort of analyzing and mapping the *B. oleae* genome and is focussed on the analysis of the *white* locus. The *white* locus has been identified and characterized in a number of Diptera species and it has been used as a phenotypic marker of choice in insect transformation systems. In all experiments we used the standard laboratory *B. oleae* population. In all hybridization procedures parts of a genomic clone of the *B. tryoni white* gene were used as probes. By *in situ* hybridization on the salivary gland polytene chromosomes of *B. oleae*, the *white* sequence was localized on region 13 of IL polytene arm. Furthermore, a genomic library of *B. oleae* was constructed and four λ clones bearing *white* sequences were isolated. Mapping of the genomic clones by restriction endonuclease digestions and southern blottings revealed that they represent an approximately 24 kb long genomic region. In the analyzed clones a 3.2 kb *EcoRI/SalI* fragment presenting homology with introns 2-6 of the *B. tryoni white* gene was identified. Subcloning of the above fragment is expected to give more information on the genomic organization of the *white* locus in *B. oleae*.

Η ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ Shh ΚΑΙ Bmp2 ΚΑΙ ΠΩΣ ΕΛΕΓΧΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΡΟΣΘΙΟΥ-ΟΠΙΣΘΙΟΥ ΑΞΟΝΑ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΑ ΤΗΣ ΟΡΝΙΘΑΣ

Δροσοπούλου, Γ.^{1,2}, Sanz-Ezquerro, J.J.¹, Βεϊνή, Μ.² και C.A. Tickle¹

¹Dept of Anatomy and Developmental Biology, University College London, WC1 E 6BT, UK.

²Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Παν/πολη 15784 Αθήνα.

Η μελέτη της ανάπτυξης των άκρων στα έμβρυα της όρνιθας αποτελεί ένα αξιόλογο πειραματικό μοντέλο για τη διερεύνηση του πρότυπου εμβρυϊκού σχηματισμού (pattern formation), τόσο από μοριακή, όσο και από κυτταρική σκοπιά. Αναλυτικές μελέτες του ρυθμού ανάπτυξης των άκρων κατά τους τρεις ανατομικούς άξονες (πρόσθιο-οπίσθιο, ρυχχιαίο-ουραίο και ραχιαίο-κοιλιακό) έχουν δείξει ότι οι άξονες αυτοί είναι αλληλοεξαρτώμενοι και ότι η ανάπτυξη τους είναι συντονισμένη με μεγάλη ακρίβεια. Οι μοριακές και κυτταρικές διεργασίες κατά την ανάπτυξη των άκρων, απαντώνται και σε άλλα συστήματα του εμβρύου και το γεγονός αυτό καθιστά τη μελέτη τους πολύ σημαντική. Το άνω άκρο του εμβρύου της όρνιθας αποτελείται από τρία δάκτυλα που χαρακτηρίζονται ως 2, 3 και 4, διακρίνονται μορφολογικά και σχηματίζονται σε διαφορετικές θέσεις κατά τον πρόσθιο-οπίσθιο άξονα. Ο πρόσθιος-οπίσθιος άξονας ελέγχεται από τη ΖΠΑ, ένα σύμπλεγμα μεσεγγυματικών κυττάρων στο οπίσθιο τμήμα του εμβρυϊκού άκρου. Αξίζει να σημειωθεί ότι μόσχευμα αποτελούμενο από τα κύτταρα αυτά, εάν τοποθετηθεί στο πρόσθιο τμήμα του άνω άκρου ενός εμβρύου-ξενιστή προκαλεί τον σχηματισμό κατοπτρικής συμμετρικών προς τα γνήσια δακτύλων. Έχει υποστηριχθεί ότι η ταυτότητα των δακτύλων ρυθμίζεται από ένα μορφογενετικό παράγοντα που παράγεται από τη ΖΠΑ και είναι δόσοεξαρτώμενη. Ως πιθανός υποψήφιος παράγοντας, έχει ορισθεί η πρωτεΐνη Shh, αλλά δεν έχει διευκρινισθεί εάν η Shh έχει μεγάλο ή μικρό εύρος δράσης, ή κατά πόσο δρα μέσω των Bmp πρωτεϊνών. Χαρακτηριστικό είναι ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τις Bmp πρωτεΐνες εκφράζονται στη ΖΠΑ. Το ερώτημά μας ήταν να αποσαφηνίσουμε, όσο δυνατό, τη σχέση μεταξύ των πρωτεϊνών Shh και Bmp2, το κατά πόσο η Bmp2 εμπλέκεται στο σχηματισμό των δακτύλων και να διαχωρίσουμε τη λειτουργία των Shh και Bmp2 στη διαφοροποίηση των δακτύλων. Βρήκαμε ότι η Shh είναι απαραίτητη όχι μόνο για την επαγωγή του Bmp2 γονιδίου, αλλά και για τη διατήρηση της έκφρασης του γονιδίου αυτού. Επίσης βρήκαμε ότι μπορούμε να μιμηθούμε ένα μέρος της δράσης της Shh με τη χορήγηση Bmp2 και μόνο. Επίσης μελετήσαμε εάν οι Bmp πρωτεΐνες ελέγχουν τον σχηματισμό των δακτύλων χορηγώντας την πρωτεΐνη Noggin (ανταγωνιστή των Bmp πρωτεϊνών), καθώς και αντι-Bmp αντισώματα σε εμβρυϊκά άκρα στα οποία είχε προηγουμένως χορηγηθεί Shh. Επιπροσθέτως μελετήσαμε την έκφραση του γονιδίου *ptc*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί τον υποδοχέα της Shh πρωτεΐνης και ο οποίος παρεμποδίζει τη διάχυσή της. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι μετά την εξωγενή χορήγηση Shh πρωτεΐνης, ή ΖΠΑ μοσχευμάτων, ακολουθεί ταχύτατη επαγωγή του *ptc* γονιδίου. Η αρχική επαγόμενη έκφραση είναι εκτεταμένη αλλά στη συνέχεια περιορίζεται. Κατά συνέπεια, είναι πιθανό, η Shh πρωτεΐνη να έχει αρχικά ένα εκτεταμένο εύρος δράσης καθορίζοντας τα κύτταρα που θα διαφοροποιηθούν σε δάκτυλα. Στη συνέχεια το εύρος της περιορίζεται και το μορφογενετικό ρόλο τον αναλαμβάνουν οι Bmp πρωτεΐνες.

SYNERGISTIC ACTIONS OF SHH AND BPM-2 REGULATE ANTEROPOSTERIOR PATTERNING IN THE EMBRYONIC CHICK LIMB BUD

Drossopoulou, G.^{1,2}, Sanz-Ezquerro, J.J.¹, Veini, M.², and C. Tickle¹

¹Dept of Anatomy and Developmental Biology, University College London, WC1 E 6BT, UK.

²Dept of Zoology, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis 15784, Athens

The developing chick limb bud is a well-established model for investigating cellular and molecular basis of embryonic pattern formation. Extensive experimental analysis has elucidated aspects of patterning of all three limb axes, anteroposterior, proximodistal and dorsoventral, and shown that they are interdependent and act coordinately. Limb signalling pathways are also used elsewhere and therefore investigations of limb development may illuminate understanding of patterning of other regions of the embryo. The chick wing has three digits, designated 2, 3 and 4. These arise at different positions across the anteroposterior axis (digit 2 being most anterior and digit 4 most posterior) and are morphologically distinct. Anteroposterior digit pattern is controlled by the polarising region, a small region of mesenchyme cells at the posterior margin of the limb bud. When it is grafted from one wing bud to the anterior margin of a second wing bud, a pattern of duplicated digits results. It has been proposed that digit identity in chick limb bud is specified in a dose-dependent fashion by a long-range morphogen, produced by this region. One candidate is Sonic hedgehog (Shh) protein, but it is not clear whether Shh acts long or short range or via Bone Morphogenetic Proteins (Bmps). Genes encoding Bmps have also shown to be expressed in the polarising region. Our first aim was to dissect the relationship between Shh and Bmp signalling and test whether Bmps are involved in digit specification and distinguish between the function of Shh and Bmps in specification of digit type. We showed that Shh is necessary not only for initiating *Bmp2* expression but also for sustaining its expression during the period when additional digits are being specified. We also showed that we can reproduce much of the effect of Shh during this period by applying only Bmp2. We further demonstrated that it is Bmps that are responsible for digit specification by transiently adding Noggin or Bmp antibodies to limbs treated with Shh. In such limbs, multiple additional digits still form but they all have the same identity. Furthermore, since Shh diffusion is contained by binding to *ptc*, its receptor, we explored time dependency and range of Shh signalling by examining *ptc* expression. We found that high-level *ptc* expression is induced rapidly when either Shh beads or polarising regions are grafted to a host limb. Furthermore, we found that high-level *ptc* expression is first widespread but later more restricted. We can suggest that Shh initially acts as a long range morphogen to prime the region of the limb to competent to form digits and thus control digit number. Then later, Shh acts short range to induce expression of Bmps whose morphogenetic action specifies digit identity.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ NUCKS ΣΤΑ ΣΠΟΝΔΥΛΟΖΩΑ *Sparus aurata* ΚΑΙ *Rana ridibunda*

Δρόσος, Γ., Νινιός, Γ., Αγγελοπούλου, Β., Ostvold, A-C.¹, Αλεπόρου-
Μαρίνου, Β., Παταργιάς, Θ.

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
¹Department of Medical Biochemistry, University of Oslo, Norway

Η πρωτεΐνη NUCKS (nuclear, casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate) είναι μια χρωμοσωμική πρωτεΐνη που εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με την οικογένεια των HMG (high mobility group) πρωτεϊνών. Είναι διαλυτή σε 5% υπερχλωρικό οξύ, και η αμινοξική της σύσταση παρομοιάζει με την οικογένεια των HMGB πρωτεϊνών. Η NUCKS φωσφορυλιώνεται σε πολλές θέσεις σε διαιρούμενα κύτταρα *in vivo*. Φωσφορυλιώνεται από την CK-2, που σχετίζεται με την κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση, καθώς και από τις κινάσες Cdk1, 2, 4, και 6, που έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Επίσης αποτελεί ένα καλό υπόστρωμα για την *in vitro* φωσφορυλίωση από κινάσες που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι περίπου 50 kDa. Η NUCKS προσδένεται τόσο σε μονόκλωνο όσο και σε δίκλωνο DNA *in vitro*, ενώ η φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης προσδένεται ισχυρότερα στο DNA. Τα πειραματικά δεδομένα συγκλίνουν στο ότι πρόκειται για πρωτεΐνη που σχετίζεται με επιδιορθωτικούς μηχανισμούς και δρα στο στάδιο της μεσόφασης. Πιθανότατα όμως πρόκειται για πολυλειτουργική πρωτεΐνη, όπως γίνεται φανερό από την φωσφορυλίωση σε πολλές θέσεις του μορίου.

Μέχρι σήμερα η NUCKS έχει προσδιορισθεί σε κύτταρα θηλαστικών, ενώ είναι γνωστό ότι δεν εμφανίζεται σε ασπόνδυλα. Προκειμένου να επεκταθούν οι γνώσεις μας για αυτό το μόριο επεκτείνουμε τη μελέτη στα σπονδυλόζωα *Sparus aurata* και *Rana ridibunda*. Και στα δύο είδη σπονδυλοζώων προσδιορίστηκε η πρωτεΐνη NUCKS με τη χρήση Western ανοσοεντόπισης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι αντισωμάτων, το ένα ειδικό για το καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης πρωτεΐνης και το άλλο για την περιοχή πρόσδεσης στο DNA. Σε πειράματα *in vitro* φωσφορυλίωσης διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη φωσφορυλιώνεται με CK-2 και στα δύο είδη σπονδυλοζώων, σε πολύ μικρότερο βαθμό όμως από τα θηλαστικά.

Τέλος, έγινε προσπάθεια απομόνωσης του γονιδίου της NUCKS από cDNA βιβλιοθήκη σολωμού σε λgt11. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτές σχεδιασμένοι βάσει της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδίου. Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δεν έχουν προσδιορίσει το γονίδιο και η προσπάθεια συνεχίζεται.

ANALYSIS OF THE NUCKS PROTEIN IN *Sparus aurata* AND *Rana ridibunda*

**Drosos, Y., Ninios, Y., Agelopoulou, B., Ostvold, A.-C.¹, Aleporou-
Marinou, V., Patargias, Th.**

Division of Genetics and Biotechnology, Department of Biology, University of Athens

¹Department of Medical Biochemistry, University of Oslo, Norway

A highly phosphorylated protein, the NUCKS (nuclear, casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate), with an apparent molecular mass of about 50 kDa has been shown to be a general constituent of mammalian cells and tissues. This protein has some unusual features. It is soluble in 5% perchloric acid (PCA), and the amino acid composition resembles that of the high mobility group (HMG) proteins and especially, the HMGB group proteins. NUCKS is phosphorylated at multiple sites in proliferating cells *in vivo*. It is phosphorylated by CK-2, which is implicated in cell growth and proliferation, and the cyclin-dependent kinases Cdk1, 2, 4 and 6, all of which play important roles in regulation of the cell cycle. In addition, NUCKS is an *in vitro* substrate for DNA-activated protein kinase, which is involved in DNA repair.

DNA-binding experiments have shown that NUCKS binds to ssDNA and dsDNA *in vitro*.

Given that numerous physical properties of the NUCKS protein are known and as the protein is highly expressed throughout the mammalian kingdom, we were interested to determine the appearance of the protein in other spondylozoa, such as fishes and frogs. It is well known that NUCKS is not expressed in aspondyla. For this reason NUCKS was analysed in *Sparus aurata* and *Rana ridibunda*.

The protein was extracted from the liver of the above organisms with 5% PCA. The extracts were analysed electrophoretically and the protein was determined by Western immunoblotting. For this reason antibodies raised against the carboxy-terminal end of the human protein and the DNA-binding site of the protein were used.

NUCKS of *Rana* and *Sparus* is phosphorylated *in vitro* by CK-2 but to a lesser extent than in mammals.

Efforts were made to clone the NUCKS gene from a cDNA library of solomon fish in λgt11. Sequences of oligonucleotides based on the human NUCKS gene were used. The screening of the cDNA library was not promising and our efforts are continued.

Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΕΣΕΝΙΛΙΝΗΣ 1 ΚΑΙ ΤΗΣ E-CADHERIN ΚΑΙ ΟΙ ΠΙΘΑΝΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMER

Ευθυμιόπουλος Σ.

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη, 157 84, Αθήνα

Η κληρονομική μορφή της νόσου Alzheimer προκαλείται από μεταλλάξεις στην πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς, την πρεσενιλίνη 1 και την πρεσενιλίνη 2. Για να διερευνήσουμε τον μηχανισμό μέσω του οποίου οι μεταλλάξεις στην πρεσενιλίνη 1 προκαλούν την νόσο Alzheimer μελετήσαμε την υποκυτταρική κατανομή και τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της. Αποκτήσαμε αποτελέσματα που έδειξαν ότι η πρεσενιλίνη 1 εμπλουτίζεται σε μεταφορικά κυστίδια (Efthimiou et al., 1998). Αυτά τα αποτελέσματα πρότειναν ότι η πρεσενιλίνη 1 μπορεί να εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια. Πράγματι, στην συνέχεια αποκτήσαμε βιοχημικά και ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα που έδειξαν ότι η πρεσενιλίνη 1 εκφράζεται στις θέσεις κυτταρικής επαφής των MDCK κυττάρων και σχηματίζει σύμπλοκα με την E-cadherin και την β-catenin. Η έκφραση της πρεσενιλίνης 1 στην κυτταρική επιφάνεια και η αλληλεπίδραση της με την E-cadherin και την β-catenin αποτέλεσαν ένδειξη ότι η πρεσενιλίνη 1 μπορεί να λειτουργεί στην κυτταρική προσκόλληση. Πράγματι, βρήκαμε ότι ο άγριος τύπος της πρεσενιλίνης 1, αλλά όχι ένας μεταλλαγμένος τύπος που προκαλεί την κληρονομική μορφή της νόσου Alzheimer, σταθεροποιεί το σύμπλοκο της E-cadherin/β-catenin και προάγει την κυτταρική προσκόλληση (Baki et al., 2001).

Το σύστημα κυτταρικής προσκόλλησης της E-cadherin/β-catenin είναι σημαντικό για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και την διατήρηση της νευρικής λειτουργίας καθώς φαίνεται να σταθεροποιεί τις νευρωνικές συνάψεις. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις της πρεσενιλίνης 1 μπορεί να προκαλούν την κληρονομική μορφή της νόσου Alzheimer με το να αποσταθεροποιούν το σύστημα κυτταρικής προσκόλλησης της E-cadherin/β-catenin στις νευρωνικές συνάψεις.

Αυτή η εργασία εκτελέστηκε στην Ιατρική Σχολή Mount Sinai σε συνεργασία με τον Δρ Ρομπάκη και υποστηρίχθηκε οικονομικά με χρηματοδότηση του Δρ Σπύρου Ευθυμιόπουλου από την American Health Assistance Foundation.

THE INTERACTION OF PRESENILIN 1 AND E-CADHERIN AND ITS POSSIBLE INVOLVEMENT IN THE DEVELOPMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

Efthimiopoulos S.

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

Familial Alzheimer's disease is caused by mutations in at least three proteins. These are the Amyloid Precursor Protein (APP), presenilin 1 (PS1), and presenilin 2 (PS2). In order to investigate the mechanism by which PS1 mutations cause Alzheimer's disease, we studied its subcellular distribution and protein-protein interactions. We obtained data showing that presenilin 1 is enriched in transport vesicles of PC12 cells (Efthimiopoulos et al., 1998). This data suggested that presenilin 1 is trafficking to the cell surface. In agreement, we also obtained biochemical and immunofluorescence data (Georgakopoulos et al., 1999) showing that presenilin 1 is expressed at cell-cell adhesion sites of MDCK cells and forms complexes with components of the cadherin-based adherens junctions including E-cadherin and beta-catenin. The cell surface expression of presenilin 1 and its association with components of the cadherin-based cell-cell adhesion system suggests that PS1 may function in cell-cell adhesion. Indeed, we found that the wild type PS 1, but not the exon nine deletion familial Alzheimer's disease-linked PS1 mutation, stabilizes the complex of E-cadherin/ β -catenin and stimulates cell-cell aggregation (Baki et al., 2001).

The E-cadherin cell-cell adhesion system is very important for proper development of the nervous system and the maintenance of neuronal function, as it seems to stabilize the neuronal connections. Our data indicate that familial Alzheimer's disease-linked mutations may cause Alzheimer's disease by destabilizing the cadherin based adhesion system at neuronal synapses.

This work was performed at Mount Sinai School of Medicine in collaboration with Dr. Robakis and was also supported by a grant to Dr. Spiros Efthimiopoulos from the American Health Assistance Foundation.

**ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΙ ΚΑΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
ΚΑΘΟΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ
WOLBACHIA-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ
ΑΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗ *DROSOPHILA***

Ζαμπάλου, Σ.¹, Βενέτη, Ζ.², Παυλικάκη, Χ.² και Κ. Μπούρτζης^{2,3}

¹Τομέας Βασικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

²Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ηράκλειο Κρήτης

³Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Η *Wolbachia* είναι ένα υποχρεωτικώς ενδοκυττάριο και μητρικά κληρονομούμενο βακτήριο που απαντά σε πλήθος ειδών ασπόνδυλων (έντομα, ισόποδα, ακάρεα, νηματώδεις). Η *Wolbachia* ανήκει στην α-υποδιαίρεση των Πρωτεοβακτηρίων και έχει μια μοναδική ικανότητα να χρησιμοποιεί το αναπαραγωγικό σύστημα των ξενιστών της για την εξάπλωση και επικράτησή της. Συγκεκριμένα, η *Wolbachia* έχει συνδεθεί με μια σειρά αναπαραγωγικών ανωμαλιών όπως η παρθενογένεση (parthenogenesis), η θηλυκοποίηση γενετικά αρσενικών ατόμων feminization), η θανάτωση των αρσενικών εμβρύων (male killing) και κυρίως, η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Κ.Α., cytoplasmic incompatibility). Η Κ.Α. εμφανίζεται, στην απλή της μορφή (Κ.Α. μίας κατεύθυνσης), μετά από διασταυρώσεις μεταξύ μη μολυσμένων θηλυκών με μολυσμένα αρσενικά. Κ.Α. εμφανίζεται επίσης μετά από διασταυρώσεις μολυσμένων αρσενικών εντόμων (με ένα ή περισσότερα στελέχη *Wolbachia*) με θηλυκά έντομα διαφορετικής μολυσματικής κατάστασης (μολυσμένα με διαφορετικό(α) στέλεχος(η) *Wolbachia*). Σε όλες τις περιπτώσεις το φαινόμενο της Κ.Α. χαρακτηρίζεται ως διακοπή της εμβρυϊκής ανάπτυξης σε πρώιμο στάδιο. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την κατανομή του βακτηρίου και τα επίπεδα μόλυνσης κατά τη σπερματογένεση τόσο σε φυσικά όσο και σε επιμολυσμένα στελέχη ειδών *Drosophila*. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας δείχνουν ότι τόσο βακτηριακοί όσο και ευκαρυωτικοί παράγοντες καθορίζουν την έκφραση του φαινομένου της *Wolbachia*-επαγόμενης κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας.

**BACTERIAL AND HOST FACTORS DETERMINE THE
EXPRESSION OF *WOLBACHIA*-INDUCED CYTO-
PLASMIC INCOMPATIBILITY IN *DROSOPHILA***

Zabalou, S.¹, Veneti, Z.², Pavlikaki, H.², and K. Bourtzis^{2,3}

¹Division of Basic Sciences, Medical School, University of Crete,

²Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Heraklion, Crete,

³Department of Environmental and Natural Resources Management, University of Ioannina

Wolbachia is a group of obligatory intracellular maternally transmitted bacteria that infect a wide range of invertebrate species (insects, isopods, mites, nematodes). *Wolbachia* belong to α -Proteobacteria and have a unique property to manipulate their hosts' reproductive system in order to invade and spread themselves in natural populations. *Wolbachia* have been related to a number of reproductive abnormalities such as parthenogenesis, feminization, male killing and mainly cytoplasmic incompatibility (CI). There are two forms of cytoplasmic incompatibility: a) unidirectional CI is expressed in crosses between infected males and uninfected females; b) bi-directional CI is expressed in crosses between infected males and females of different infection status. In all cases, CI results in early embryonic death. In the present work, we studied the distribution and infection levels of *Wolbachia* during spermatogenesis in naturally infected and transinfected strains of different *Drosophila* species. Our results indicate that both bacterial and host factors determine the expression of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*.

ΜΙΑ ΠΟΛΥΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΕΞΠΑΝΣΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΠΕΠΟΝΙΑ: ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΡΟΛΟ ΤΩΝ ΕΞΠΑΝΣΙΝΩΝ ΣΕ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Ζερβού, Δ., Διαλλινάς, Γ., και Σ. Ριζοπούλου

Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη, Αθήνα 15784

Οι εξπανσίνες (expansins) είναι πολυγονιδιακές πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος των ανώτερων φυτών και θεωρούνται υπεύθυνες για την χαλάρωσή του, συμβάλλοντας στην είσοδο του νερού. Οι α-εξπανσίνες θεωρούνται υπεύθυνες για την επέκταση των κυττάρων και οι β-εξπανσίνες βρέθηκαν στη γύρη. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τις πρωτεΐνες αυτές κατά την ανάπτυξη της πεπονιας. Ο λόγος διπός: ήτοι το οικονομικό ενδιαφέρον του καλλιεργούμενου είδους και το αρμόζον πειραματικό υλικό (δηλ. ταχέως αναπτυσσόμενοι ιστοί). Έτσι, ειδικά για εξπανσίνες εκφυλισμένα ολιγονουκλεοτίδια σχεδιάστηκαν, σύμφωνα με όλες τις διαθέσιμες αλληλουχίες που υπάρχουν στις βάσεις δεδομένων. Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκαν μ' επιτυχία στον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος του DNA της πεπονιας, με χρήση PCR, μεγέθους συμβατού με το μέγεθος γονιδίων των εξπανσινών (250 ζεύγη βάσεων περίπου). Τα προϊόντα του PCR κλωνοποιήθηκαν στον pGEM και βρέθηκε αλληλουχία αρκετών από τους διαφορετικούς κλώνους που προέκυψαν. Με τον τρόπο αυτό ταυτοποιήσαμε έξι διαφορετικά γονίδια εξπανσινών. Δύο επιπλέον γονίδια απομονώθηκαν και βρέθηκε η αλληλουχία τους με RT-PCR, από RNA ωθηκών. Η ανάλυσή μας δείχνει ότι στην πεπονια υπάρχει μια πολυγονιδιακή οικογένεια εξπανσινών που αναμένουμε να περιλαμβάνει 15-20 γονίδια, τελικά. Οι αλληλουχίες των γονιδίων που βρήκαμε είναι σε μεγάλο βαθμό παρόμοια με εξπανσίνες άλλων φυτών. Ανάλυση κατά Northern έδειξε ότι οι εξπανσίνες στην πεπονια εκφράζονται κυρίως σε ανθικούς ιστούς, κατά την επάκρια ανάπτυξη του βλαστού και κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού. Το γεγονός ότι δεν ανιχνεύσαμε εξπανσίνες κατά τη διάρκεια της υπερωρίμανσης του φρούτου, ήταν έκπληξη. Τα αποτελέσματα αυτά θα συζητηθούν σε συνδυασμό με τις σύγχρονες αντιλήψεις σε ότι αφορά τον ρόλο των εξπανσινών στη Βιολογία φυτών.

A MULTIGENE EXPANSIN FAMILY IN MELON: EVIDENCE FOR A ROLE IN CELL ENLARGEMENT

Zerbou, D., Diallinas, G., and S. Rhizopoulou

Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, 15784 Athens - Greece

Expansins are plant extracellular proteins that loosen cell walls in novel ways. They are encoded by two multigene families, the α - and β -expansins, which function in pH-dependent cell enlargement or pollen tube invasion of the stigma, respectively. Recent evidence suggests that β -expansins are also involved in wall disassembly during fruit ripening and probably in other plant processes involving modifications of the cell wall status. In fact, expansins have been detected in a range of plant tissues and showed considerable variation in abundance. Although primary sequence analysis indicates that an expansin domain resembles the catalytic domain of endoglucanases, glucanase activity has not been detected. Biochemical evidence suggests that expansins disrupt noncovalent bonding between microfibrils and the matrix of cellulose walls.

Fruit color, flavor, aroma, and texture, all depend on a complex interplay of genetically programmed biochemical alterations occurring during ripening. Thus controlled fruit ripening is of primary agricultural importance. Here, we describe preliminary studies to investigate the role of β -expansins in an economically important, but also experimentally appropriate for studying fruit ripening, system, such as melon (cv Charentais). We designed degenerate β -expansin-specific oligonucleotides based on all available expansin sequences present in databases. These oligonucleotides were successfully used to amplify, by PCR, melon DNA of a size compatible with the size of expansin genes (approx. 250 bp). PCR products were cloned into pGEM and several individual clones were sequenced. We have thus identified 6 different β -expansin genes. Two more β -expansin genes were isolated and sequenced by RT-PCR from ovary RNA. Our analysis shows that melon has a multigene family with an estimated number of more than 15-20 expansin genes. Similar observations have recently been made for the evolutionary close relative cucumber. Melon expansin sequences are highly similar to other β -expansins including a fruit ripening-specific gene identified in tomato. Northern blot analysis has shown that expansin(s) is expressed mostly in floral parts, the growing tips and during fruit enlargement (maturation). To our surprise, we did not detect expansin expression during fruit softening associated with ripening. These results will be discussed in line with current ideas on the role of expansins in other plants.

Η ΓΛΥΚΟΖΗ ΕΠΑΓΕΙ ΤΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΑΝΤΑΛΛΑΚΤΗ Na^+/H^+ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΜΟΝΟΚΥΤ- ΤΑΡΑ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ C

Ζολώτα, Ζ.¹, Καλογιάννη, Μ.¹, και Γ. Κολιάκος²

¹Εργαστήριο Φυσιολογίας των Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, ²Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Η σύνδεση των μονοκυττάρων της κυκλοφορίας στο αγγειακό ενδοθήλιο, η μετανάστευση τους στον υπενδοθηλιακό χώρο και η εν συνεχεία μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα αποτελούν σημαντικά γεγονότα για την έναρξη του σχηματισμού της αθηρωματικής βλάβης. Αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης επαυξάνουν τις λειτουργίες αυτές των μονοκυττάρων καθώς και τη δραστηριότητα της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) των μονοκυττάρων που είναι μεσολαβητής σήματος προς τον ανταλλάκτη Na^+/H^+ (NHE). Για το λόγο αυτό μελετήσαμε την επίδραση της γλυκόζης στον NHE.

Τα μονοκύτταρα απομονώνονταν από δύο υγιείς ενήλικες. Η επίδραση της γλυκόζης, της φρουκτόζης, της γαλακτόζης, τηςμανιτόλης, της ινσουλίνης και του οξικού μυριστικού εστέρα της φορβόλης (PMA) στη δραστηριότητα του NHE μελετήθηκε με το αντιδραστήριο BCECF καθώς και με μετρήσεις της εισόδου Na^{22} στα κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκε εθυλισοπροπύλαμιλορίδιο (EIPA) για να αναστείλει τον NHE, καλφωστίνη C για να αναστείλει την PKC, φλορετίνη για να εμποδίσει τη σύνδεση της γλυκόζης στα κύτταρα και κυτοχλασίνη για να διακόψει τη μεταβίβαση σήματος μέσω του κυτταρικού σκελετού.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η γλυκόζη και σε μικρότερο βαθμό η γαλακτόζη ενεργοποιεί τον NHE μέσω της PKC. Το αποτέλεσμα αυτό δεν παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιούσαμε φρουκτόζη ή μανιτόλη. Η φλορετίνη και η κυτοχλασίνη ανέστειλαν τη δράση αυτή της γλυκόζης, υπογραμμίζοντας την ανάγκη σύνδεσης της γλυκόζης στον φορέα της και την συμμετοχή του κυτταρικού σκελετού στη μεταβίβαση του σήματος προς τον ανταλλάκτη.

GLUCOSE INCREASES HUMAN MONOCYTE Na⁺/H⁺ EXCHANGER ACTIVITY VIA PROTEIN KINASE C

Zolota, Z.¹, Kaloyianni, M.¹, and G. Koliakos²

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

The binding of the circulating monocytes to the vascular endothelium, their migration to the subendothelium and the subsequent formation of foam cells are key early events leading to atherosclerosis. Increased glucose concentrations increase these monocyte functions.

It has been also reported that increased glucose concentrations induce the activity of Na⁺/H⁺ exchanger. Moreover hyperglycemia up regulates monocyte protein kinase C. Protein kinase C is a mediator of various hormones on Na⁺/H⁺ exchanger activity. Therefore we investigated the effect of glucose on Na⁺/H⁺ exchanger activity in human monocytes.

Monocytes were isolated from two healthy adults. The effect of glucose, fructose, galactose, manitol, insulin and phorbol myristate acetate (PMA) on monocyte Na⁺/H⁺ exchanger was estimated by measuring the intracellular pH with BCECF, a specific fluorescent reagent, as well as by measuring sodium uptake with Na²². Ethylisopropylamiloride (EIPA) was used to inhibit Na⁺/H⁺ exchanger activity. Calphostin C was used to inhibit protein kinase C, phloretin was used to antagonize glucose binding to the cells and cytochalasin B to interfere with the cytoskeleton.

The results indicate that glucose and in a lesser degree galactose stimulate monocyte Na⁺/H⁺ exchanger activity by a protein kinase C dependent manner. This effect was not observed for fructose or manitol. Phloretin and cytochalasin inhibited glucose action on Na⁺/H⁺ exchanger, indicating the necessity of glucose binding to its carrier and the importance of the integrity of the cytoskeleton.

ΟΙ ΑΛΦΑ ΕΝΑ ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΠΟΙΟΥΝ ΤΟΝ ΑΝΤΑΛΛΑΚΤΗ Na^+/H^+ ΣΤΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Ζολώτα, Ζ.¹, Καλογιάννη, Μ.¹, και Γ. Κολιάκος²

¹Εργαστήριο Φυσιολογίας των Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, ²Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Μελέτες σε εμπύρνηνα ερυθρά αιμοσφαίρια έδειξαν ότι οι κατεχολαμίνες αυξάνουν τη δραστηριότητα του ανταλλάκτη Na^+/H^+ (NHE-1). Παρ' όλα αυτά όμως δεν υπάρχουν αντίστοιχες πληροφορίες για τα ερυθρά αιμοσφαίρια του ανθρώπου. Είναι γνωστό ότι τα ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν και βήτα (βήτα-2) και άλφα-1 αδρενεργικούς υποδοχείς. Τα δύο αυτά είδη των υποδοχέων χρησιμοποιούν διαφορετικά μονοπάτια μεταβίβασης σήματος.

Μελετήσαμε, την επίδραση της αδρεναλίνης στην είσοδο του Na^{22+} σε ερυθρά αιμοσφαίρια ανθρώπου. Η εθυλισοπροτυλαμιλορίδη (EIPA) χρησιμοποιήθηκε για να αναστείλει τον NHE1. Η πραζοσίνη για να εμποδίσει τη σύνδεση της αδρεναλίνης στους άλφα-1 και η προπρανολόλη στους βήτα αδρενεργικούς υποδοχείς. Ο οξικός μυριστικός εστέρας της φορβόλης (PMA) χρησιμοποιήθηκε για να ενεργοποιήσει και η καλφωσίνη C για να αναστείλει την πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Τέλος χρησιμοποιήσαμε ισοβουτυριλομεθυλξανθίνη (IBMX) για να αυξήσουμε την ενδοκυτάρια συγκέντρωση του cAMP.

Η είσοδος του Na^{22+} στα ερυθροκύτταρα αυξάνονταν με την προσθήκη της αδρεναλίνης. Η επίδραση αυτή αναστέλλονταν από την EIPA και από την πραζοσίνη αλλά όχι από την προπρανολόλη. Η καλφωσίνη C, ανταγωνίζονταν ενώ ο PMA ενεργοποιούσε τον NHE1. Τέλος η αύξηση του cAMP που προκαλούσε η IBMX προκαλούσε οριακή ελάττωση στη δραστηριότητα του NHE 1. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι η αδρεναλίνη δραστηριοποιεί τον NHE-1 στα ερυθρά αιμοσφαίρια του ανθρώπου. Στη δράση αυτή της αδρεναλίνης μεσολαβούν οι άλφα-1 αδρενεργικοί υποδοχείς και η PKC.

ALPHA 1 ADRENERGIC RECEPTORS SIMULATE Na⁺/H⁺ EXCHANGER IN HUMAN ERYTHROCYTES

Zolota, Z.¹, Kaloyianni, M.¹, and G. Koliakos²

¹Laboratory of Animal Physiology, School of Biology, and ²Laboratory of Biological Chemistry, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki

Studies on nucleated erythrocytes indicated that catecholamines increase Na⁺/H⁺ exchanger (NHE-1) activity. However no information is available concerning the effect of catecholamines on human NHE-1 erythrocyte activity. It is known that human erythrocytes possess beta-adrenergic receptors, which appear to belong to beta-2 group and alpha-1 adrenergic receptors as well. These receptors act through different signal transduction pathways.

We examined, the effects of adrenaline on Na²²⁺ influx in human erythrocytes. Ethylisopropylamiloride (EIPA) was used to inhibit NHE1. Prazosin was used to block to alpha 1 adrenergic receptors and propranolol to block beta-adrenergic receptors. Phorbol myristate acetate ester (PMA) was used to stimulate and calphostine C to inhibit protein kinase C. Finally isobutyrylmethylxanthine (IBMX) was used to increase intra erythrocyte cAMP.

Na²²⁺ influx increased after addition of adrenaline in erythrocyte suspensions. This effect was inhibited by EIPA. The effect of adrenaline on erythrocyte NHE-1 activity was also inhibited by the alpha-1 adrenergic receptor blocker prazosin but not by the beta adrenergic receptor blocker propranolol. Calphostin C, inhibited NHE1 activation induced by adrenaline in erythrocytes and PMA activated NHE1 indicating similar characteristics to the hormone effect. The increase of cAMP by addition of IBMX marginally decreased erythrocyte NHE 1 activity.

These data indicate that adrenaline induces an increase of Na⁺ uptake of human erythrocytes through stimulation of NHE-1 activity. This effect is mediated by alpha-1 adrenoceptor stimulation and signal transduction via the PKC pathway.

**Ο ΕΠΙΚΡΑΤΗΣ ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΚΤΗΣ ATF-2
ΚΑΙ Ο ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ MEK, PD 98059,
ΚΑΤΑΣΤΕΛΟΥΝ ΤΗΝ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ
ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑΣ
ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ**

**Ζουμπουρλής, Β., Παπασάββα, Π., Πίντζας, Α., Παπαευαγγελίου, Δ.,
Σολακίδη, Σ., και Δ. Μανδήλης**

Εργαστήριο Γονιδιακής Ρύθμισης, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό
Ίδρυμα Ερευνών, Βασ. Κωνσταντίνου 48, 116 35 Παγκράτι, Αθήνα.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε με βιολογική και χημική προσέγγιση, η δυνατότητα αναστολής των καρκινικών φαινοτύπων της επιδερμίδας του ποντικού.

Ο αρνητικός επικρατής μεταλλάκτης του μεταγραφικού παράγοντα ATF-2 καθώς και ο αναστολέας των MEK κινασών, PD98059, χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικά εργαλεία. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στις κυτταρικές σειρές A5 και CarB, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τα τελικά στάδια της εξέλιξης του καρκίνου της επιδερμίδας του ποντικού. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και οι κυτταρικές σειρές PDV και PDVC57, οι οποίες παρουσιάζουν πλακώδη φαινότυπο και έχουν διαφορετική αναλογία του φυσιολογικού και μεταλλαγμένου γονιδίου H-ras. (Συγκεκριμένα, η κυτταρική σειρά PDV έχει 2 φυσιολογικά και 1 μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του H-ras, ενώ η κυτταρική σειρά PDVC57 έχει 1 φυσιολογικό και 2 μεταλλαγμένα αλληλόμορφα). Το ζεύγος αυτών των κυτταρικών σειρών, οι οποίες έχουν κοινή προέλευση, αποτελούν πρότυπο σύστημα για την μελέτη του ρόλου των MEK κινασών ως αποδεκτών μηνυμάτων από την πρωτεΐνη Ras κατά την καρκινική εξαλλαγή. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η μεταφορά του μεταλλαγμένου ATF-2 στα ατρακτοειδή καρκινώματα, καθώς και η επεξεργασία τους με τον PD98059, που αναστέλει τις κινάσες ERK1/2, έχουν ως αποτέλεσμα την αναστροφή του ατρακτοειδούς φαινοτύπου σε πλακώδη, που δεν παρουσιάζει μεταστατικές ιδιότητες. Συνεπώς οι κινάσες ERK1/2 και ο μεταγραφικός παράγοντας ATF-2 παίζουν σημαντικό ρόλο στον βαθμό εξέλιξης των καρκινωμάτων της επιδερμίδας του ποντικού.

**DOMINANT NEGATIVE ATF-2 AND MEK KINASE
INHIBITOR, PD98059, SUPPRESS THE METASTATIC
DYNAMICS OF MOUSE SKIN CANCER CELL LINES**

**Zoumpourlis, V., Papassava, P., Pintzas, A., Papaevangeliou, D.,
Solakidi, S., and D. Mandilis**

Gene Regulation Laboratory, Institute of Biological Research and Biotechnology, National Hellenic
Research Foundation, 48 Vas. Constantinou Ave., 116 35 Pagrati, Athens.

In the present study we investigated the inhibition of aggressive cancerous phenotypes, using a biological and chemical approach. A dominant negative form of ATF-2 transcription factor, as well as the PD98059 MEK kinase inhibitor were used as experimental tools. For this study A5 and CarB spindle cell lines were used, which represent the late stages of carcinogenesis in the mouse epidermis. We also used the cell lines PDV and PDVC57, which present squamous phenotype and different ratio of normal and mutated H-ras alleles (PDV cell line has 2 normal and 1 mutated alleles, while PDVC57 cell line has 1 normal and 2 mutated alleles). This pair of cell lines, which have a common origin, is an ideal model for studying the role of MEK kinases as receivers of Ras mediated signaling during the progression of carcinogenesis. From the results we can conclude that the transfer of mutated ATF-2 in the spindle carcinomas, as well as treatment with PD 98059, which inhibits ERK1/2 kinases, result in reversion of the spindle phenotype to squamous. Therefore, ERK1/2 kinases and ATF-2 transcription factor play an important role in the degree of progression of mouse skin carcinomas.

ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΟΥ ΣΗΜΕΙΟΥ ΩΟΑΠΟΘΕΣΗΣ ΤΗΣ *Caretta caretta*

Ζωμενή, Μ.¹, Σγαρδέλης, Σ.Π.¹, Χιντήρογλου, Χ.² και Ι.Α. Παντής¹

¹Τομέας Οικολογίας, ²Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ., Τ.Κ. 54124, Θεσ/νίκη.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την επιλογή του σημείου ωοαπόθεσης της *Caretta caretta* δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Διάφοροι φυσικοχημικοί παράγοντες όπως το μέγεθος των κόκκων της άμμου και η συνοχή της, η διαμόρφωση των αμμόλοφων της παραλίας, η θερμοκρασία και η υγρασία του υποστρώματος, έχουν προταθεί ως ενεργοποιητές σ' αυτήν τη διαδικασία. Στην έρευνα αυτή μετρήθηκαν οι μικροκλιματικές παράμετροι (θερμοκρασία και υγρασία άμμου και αέρα) στην παραλία του Καλαμακίου στο νησί της Ζακύνθου το καλοκαίρι του 2000, για να εξεταστεί κατά πόσον αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν καθοριστικά την επιλογή του σημείου ωοαπόθεσης. Με βάση τις τιμές της θερμοκρασίας και της υγρασίας της άμμου σε καθορισμένα σημεία, κατασκευάστηκε μοντέλο πρόβλεψης των παραμέτρων αυτών σ' ολόκληρη την παραλία. Τέλος, με βάση τα παραπάνω δεδομένα (θερμοκρασία και υγρασία άμμου στα σημεία ωοαπόθεσης) κατασκευάστηκε μοντέλο (που επεξηγεί το 80 % της διακύμανσης) το οποίο προβλέπει την απόσταση της φωλιάς από την ακτή. Οι φωλιές ακολουθούν συσσωματικό πρότυπο κατανομής στο χώρο στη ζώνη από 12.5 m έως 20 m από την ακτή ενώ αντίθετα στη ζώνη από 5 m έως 12.5 m το αντίστοιχο πρότυπο είναι τυχαίο. Η επιλογή του σημείου ωοαπόθεσης καθώς επίσης και το πρότυπο κατανομής των φωλιών στο χώρο φαίνεται να επηρεάζονται κυρίως από τη μεταβολή της θερμοκρασίας και της υγρασίας της άμμου.

NEST SITE SELECTION FOR LOGGERHEAD TURTLES *Caretta caretta*

Zomeni, M.S.¹, Sgardelis, S.P.¹, Chintiroglou, Ch.² and J.D. Pantis¹

¹Department of Ecology, ²Department of Zoology, School of Biology, A.U.TH., 54124, Thessaloniki

The factors influencing nest site selection for loggerhead turtles *Caretta caretta* are yet to be fully clarified. Various physical and chemical factors such as sand grain size, dune configuration, compressibility of beach sand, sand temperature and moisture, have been suggested as nest site selection stimulators. During this study, sand and air temperature and moisture were measured at Kalamaki beach on Zakynthos island during the summer of 2000, in order to examine whether these microclimatic factors are determinant in nest site selection. According to sand temperature and moisture values in specific points on the beach, we created a model for the prediction of these parameters on the beach. Based on the above data (sand temperature and moisture at the sites where nests were laid) we created a model (which explains approximately 80 % of the variance) for the prediction of the distance from the coastline that nests are laid. Nesting activity follows a clumped pattern; nests form distinct clumps on the sampling belt between 12.5 m and 20 m from the coastline. On the contrary the respective spatial pattern on the sampling belt between 5 m and 12.5 m is random. Nest site selection as well as nest spatial patterns seem to be affected mainly by the variation of sand temperature and moisture.

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΦΥΛΟΥ ΚΑΙ ΗΛΙΚΙΑΣ ΣΕ ΣΚΕΛΕΤΟΥΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Ηλιόπουλος, Κ.¹, και Σ.Κ. Μανώλης²

¹Department of Archaeology and Prehistory, University of Sheffield, U.K.

²Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα

Δύο από τις σημαντικότερες παραμέτρους στα πλαίσια μιας ανθρωπολογικής εξέτασης σκελετικών λειψάνων είναι η εκτίμηση του φύλου και της ηλικίας. Για τον σκοπό αυτό γίνεται χρήση μετρικών και μορφολογικών γνωρισμάτων τα οποία συνδέονται με τις διαφορές μεταξύ των δύο φύλων και τις διαφοροποιήσεις που υπόκειται ο ανθρωπίνος σκελετός ανάλογα με την ηλικία του.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα από ανθρωπολόγους ανά τον κόσμο έχουν στην πλειοψηφία τους αναπτυχθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και όπως είναι φυσικό αντικατοπτρίζουν τον συγκεκριμένο πληθυσμό. Την τελευταία πενταετία πολλοί ερευνητές έχουν συνειδητοποιήσει την ανάγκη για δημιουργία μεθόδων που θα είναι καλύτερα προσαρμοσμένες για πληθυσμούς έξω από την Βόρειο Αμερική. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας η παρούσα έρευνα φιλοδοξεί να αναπτύξει μεθόδους που θα βοηθήσουν στην εκτίμηση φύλου και ηλικίας σε λείψανα που προέρχονται από τον Ελλαδικό χώρο με μεγαλύτερη ακρίβεια.

Η εφαρμογή των μεθόδων που έχουν αναπτυχθεί στην Βόρειο Αμερική στην σύγχρονη σκελετική συλλογή αναφοράς του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, είναι απαραίτητη ώστε να διευκρινιστεί ο βαθμός αξιοπιστίας τους. Από τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της έρευνας αυτής επιβεβαιώνεται η αναγκαιότητα ανάπτυξης νέων μεθόδων προσδιορισμού φύλου και ηλικίας, οι οποίες θα ανταποκρίνονται στις μορφολογικές ιδιαιτερότητες του Ελληνικού πληθυσμού.

SEX AND AGE DETERMINATION IN SKELETONS OF GREEK ORIGIN

Eliopoulos, C.¹, and S.K. Manolis²

¹Department of Archaeology and Prehistory, University of Sheffield, U.K.

²Department of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, National & Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, 157 84 Athens - Greece

Two of the most important parameters in an anthropological examination of human skeletal remains are the determination of sex and age. For this purpose, certain metric and morphological characteristics are used, which are linked to the differences between the two sexes and the changes that the human skeleton undergoes according to its age.

The majority of the methods that are used by anthropologists around the world have been developed in the United States of America and as a result they better reflect this particular population. In the past five years many researchers have realized the need to develop methods that are better adapted to populations outside North America. As part of this new trend the present study aims to develop methods that will aid in sex and age determination in remains from Greece with greater accuracy.

The application of the North American methods on the modern skeletal reference collection of the Department of Animal and Human Physiology is the first step to determine the degree of reliability of these methods. The preliminary results of this study underline the need for the development of new methods for sex and age determination, which will reflect the morphological idiosyncrasies of the Greek population

**ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
ΧΡΩΜΙΟΥ ΚΑΙ ΜΙΓΜΑΤΟΣ ΧΡΩΜΙΟΥ ΚΑΙ
ΚΑΔΜΙΟΥ ΣΤΟ ΒΑΤΡΑΧΟ *Rana ridibunda***

Θεοδωροπούλου Β., Καλμαντή Δ., Λουμπουρδής Ν.

Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας Σχολής Θετικών Επιστημών Α.Π.Θ. Τ.Κ.54124.

Μελετήθηκε η επίδραση υδατικού διαλύματος χρωμίου (σύστασης 114 ppm) και διαλύματος χρωμίου και καδμίου (σύστασης 57 ppm και 34 ppm αντίστοιχα) για δεκατέσσερις ημέρες σε δύο ομάδες ζώων. Μια τρίτη ομάδα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τις μετέπειτα ιστολογικές μελέτες.

Η μελέτη επικεντρώθηκε κύρια στο ήπαρ, στους νεφρούς και στον πεπτικό σωλήνα των ζώων. Τα αποτελέσματα της μελέτης συνοψίζονται στα παρακάτω. Ο αριθμός των μελανομακροφάγων κυττάρων είναι μεγαλύτερος στους ιστούς των ζώων που δέχθηκαν την επίδραση χρωμίου, μικρότερος αλλά σαφώς μη φυσιολογικός στη ομάδα του μίγματος, για να καταλήξει σε φυσιολογικές τιμές στα ζώα της ομάδας ελέγχου. Ο αριθμός των μακροφάγων κυττάρων εμφανίζει την ίδια τάση αύξησης αλλά επιπλέον αυξάνεται από τον οισοφάγο προς τον στόμαχο από άποψη ιστολογικής εντόπισης. Τα καλυκοειδή κύτταρα διογκώνονται και καταστρέφονται σε μεγαλύτερο βαθμό στην επίδραση χρωμίου και λιγότερο στην επίδραση του μίγματος χρωμίου - καδμίου. Στο ήπαρ των ζώων που βρέθηκαν υπό την επίδραση των βαρέων μετάλλων, υπήρξε αύξηση της διαμέτρου των κολποδών τριχοειδών αγγείων. Τέλος στους ιστούς των ζώων της ομάδας του χρωμίου παρατηρήθηκε αύξηση του μεγέθους των κυττάρων Küpffer του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, φαινόμενο που δεν παρατηρείται στα ζώα των άλλων ομάδων.

HISTOPATHOLOGIC EFFECTS OF CHROMIUM AND CHROMIUM-CADMIUM MIXTURE IN THE FROG

Rana ridibunda

Theodoropoulou, V., Kalmanti, D., Loumbourdis, N.

Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki. T.K. 54124

The study was focused on the impact of chromium solution (consistent of 114 ppm chromium) and chromium – cadmium mixture (consistent of 57 ppm chromium and 34 ppm cadmium) on histological changes in three groups of animals after a fourteen days exposure. Another group was used as control.

The tissues studied were liver, kidneys and the alimentary tract. The results of the study are concentrated to the following. The number of melanomacrophage cells is high in the chromium group tissues, reduced in the mixture, turning to normal in the control group of animals. The number of macrophage cells is comparable to that of melanomacrophages and appears to increase from esophagus to large intestine. The goblet cells were larger and more affected in the chromium exposure than in mixture of the heavy metals. There has also been observed that the metal exposed animals had larger diameter of liver sinusoids. The Küpffer cells of the reticuloendothelial system (RES) were larger in the chromium-exposed animals than those of the other group of animals.

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΑΘΟ-
ΛΟΓΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ****Θεολογίδης, Χ.¹, Μαλούχου-Γκρίμπα, Β.¹, Θεολογίδης, Π.¹, Λυσιώτης, Δ.¹,
Γεωργιάδης, Χ.², Κατσώρχης, Θ.²**¹Τομέας Ζωολογίας και Θαλάσσιας Βιολογίας, ²Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα

Ο θυρεοειδικός ιστός χαρακτηρίζεται από μία ποικίλη διαφοροποίηση της κυτταρικής του δομής. Σημαντικό σημείο αναφοράς στη συγκριτική μελέτη των φυσιολογικών και παθολογικών κυττάρων του θυρεοειδούς αποτελεί η θυρεοσφαιρίνη. Η πρωτεΐνη αυτή χρησιμοποιείται στην παρακολούθηση της ανεξέλεγκτης ανάπτυξης του καρκίνου. Σκοπός είναι η διαπίστωση της παρουσίας και της ταυτοποίησης της πρωτεΐνης θυρεοσφαιρίνης με τη χρήση μονοκλωνικών anti-g και της χρωστικής DAB, όπου και αν αυτή βρίσκεται, είτε στο θυρεοειδή, είτε σε άλλο ιστό λόγω μετάστασης. Ο χρωματισμός επιτυγχάνεται με την τελική αντίδραση του συμπλέγματος της πρωτεΐνης-αντίσωμα με την DAB και αποδίδει ίζημα καφέ χρώματος. Η μελέτη αναφέρεται κυρίως στους εξής τύπους καρκινωμάτων: στο θηλώδες καρκίνωμα, στα μυελοειδή καρκινώματα και στον αναπλαστικό καρκίνο. Το θηλώδες καρκίνωμα αναγνωρίζεται από τις θηλώδεις προσεκβολές εντός των θυλακίων. Παρατηρείται σημαντική ή ολική διαφοροποίηση των θυλακίων, μικρά θυλάκια αλλοιωμένου σχήματος, ελλειπές ή καθόλου κολλοειδές, κυριάρχηση καρκινικών κυττάρων και τοπική μετάσταση μέσω διηθημένων λεμφαδένων. Στα μυελοειδή καρκινώματα παρατηρούνται εστίες καρκινικών κυττάρων ενδιάμεσως φυσιολογικών, μικρά, ομοιόμορφα, στρογγυλά ή ατρακτοειδή κύτταρα μέσα στο συνδετικό ιστό και διήθηση περιφερειακού παρεγχύματος και αιμοφόρων αγγείων. Τέλος, παρατηρούνται αναπλαστικά καρκινώματα τα πλέον κακοήθη νεοπλασμάτα του θυρεοειδούς αδένου. Εδώ παρατηρείται εμφανής κυτταρική ανομοιομορφία, αποδιαφοροποίηση θυλακίων, ακανόνιστη και μαζική συγκέντρωση καρκινικών κυττάρων και συνδετικού ιστού, εστίες νεκρώσεως, μεγάλη κίνηση των πυρήνων και μετάσταση μέσω διήθησης λεμφαγγείων. Άλλες παρατηρήσεις στα πειράματά μας είναι η ανίχνευση της πρωτεΐνης καλσιτονίνης με τη χρήση μονοκλωνικών anti-c. Με τη μέθοδο αυτή παρατηρούνται τα παραθυλακικά κύτταρα του θυρεοειδούς αδένου, τα οποία εκκρίνουν την καλσιτονίνη.

COMPARATIVE STUDY BETWEEN NORMAL AND PATHOLOGICAL CELLS OF THE THYROID GLAND

**Theologides Chr.¹, Malouhou-Grimba, V.¹, Theologides, P.¹, Lissiotis D.¹,
Georgiadis Chr.², Katsorchis, Th.²**

¹Department of Zoology & Marine Biology, ²Department of Cell Biology & Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, 157 84, Athens Greece

The thyroid tissue is characterized by a variable diversification of its cellular structure. An important point of reference to the comparative study between the normal and pathological cells of the thyroid is thyroglobulin. This protein is useful for the examination of the uncontrolled development of cancer. The objective of this study is the identification of the presence and certification of thyroglobulin by the use of monoclonal anti-thyroglobulin and the coloring agent DAB, wherever this is, either in the thyroid or in any other tissue due to metastasis. The coloring is succeeded by the final chemical reaction between the protein-antibody complex and DAB, and gives a brown-colored precipitate. The study mainly concerns to the following type of malignant growths: papillary cancer, medullary cancer, and anaplastic cancer. The papillary cancer is defined by the papillary ingrowths within the follicles. A significant or total diversification of the follicles is observed, small follicles of disintegrative shape, a reduced amount or totally missing colloid, imperative existence of cancer cells, and local metastasis due to infiltrated lymphocytic gland. In medullary cancer, centers of cancer cells are distinguished going through normal cells, small, homoeomorphous, rounded or atractoid cells within the connective tissue and infiltration of the surrounding parenchyma and blood vesicles. Finally, anaplastic carcinomas; the most malignant neoplasms of the thyroid gland are observed. In this vicinity, an obvious cellular deformation is seen, follicular disintegration, random and accumulation of cancerous cells and connective tissue, cores of necrosis, significant movement of nuclei and metastasis from infiltrated lymphocytic vesicles. An additional observation in our experiments was the detection of the protein calcitonin by the use of monoclonal anti-calcitonin. With this method the parafollicular cells of the thyroid gland could be distinguished. These are the cells responsible for the secretion of calcitonin.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΤΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΑΛΙΕΙΑΣ ΜΕ ΜΗΧΑΝΟΤΡΑΤΑ ΣΤΑ ΒΕΝΘΙΚΑ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΕΥΒΟΪΚΟΥ ΚΟΛΠΟΥ

**Θεσσαλού-Λεγάκη, Μ.¹, Ζενέτου, Α.², Σύμπουρα, Ν.², Παπασπύρου, Σ.¹ και
Rancucci-Παπαδοπούλου Α.²**

¹Τομέας Ζωολογίας-Θαλάσσιας Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολις, 15784, Αθήνα

²Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών, Άγιος Κοσμάς Ελληνικό, 16604 Αθήνα

Οι μεσοπρόθεσμες επιπτώσεις της αλιείας με μηχανότρατα μελετήθηκαν σε δύο γειτονικούς κόλπους: το Ν. Ευβοϊκό και τον Κόλπο των Πεταλιών. Το πειραματικό σχέδιο περιελάμβανε τη διενέργεια πυκνών πειραματικών σύρσεων μηχανότρατας σε επιλεγμένη περιοχή τους και τη μηνιαία παρακολούθηση της εξέλιξης του βενθικού οικοσυστήματος για διάστημα έξι μηνών (εκτός αλιευτικής περιόδου). Παράλληλα, σε κάθε κόλπο ορίστηκαν αντίστοιχες περιοχές αναφοράς όπου έγιναν δειγματοληψίες ανά τρίμηνο. Οι δύο κόλποι διαφέρουν ως προς την επίδραση των αλιευτικών εργαλείων και την ιζηματολογική τους σύσταση: στο Ν. Ευβοϊκό με το λασπώδη βυθό απαγορεύεται η αλιεία με μηχανότρατα, ενώ αντίθετα, ο αμμώδης βυθός του Κόλπου των Πεταλιών υφίσταται την έντονη επίδραση των μηχανοτρατών. Η πειραματική αλιεία είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του περιεχομένου του επιφανειακού ιζήματος σε οργανικό υλικό και στους δύο κόλπους χωρίς αντίστοιχη αλλαγή της κοκκομετρικής του σύστασης. Και στους δύο κόλπους, οι διαταραγμένες περιοχές, παρόλη τη συχνότερη δειγματοληψία, παρουσίασαν στο σύνολο της μελέτης μείωση του αριθμού ειδών. Η Ανάλυση της Διακύμανσης με παράγοντες το χρόνο και την πειραματική εντατική αλιεία έδειξε ότι στον Κόλπο των Πεταλιών η αφθονία του μακροβένθους εξαρτάται πολύ σημαντικά από το χρόνο, ο αριθμός ειδών εξαρτάται από το χρόνο αλλά κυρίως από την εντατική αλιεία και τέλος, η ποικιλότητα μόνο από την αλιεία. Στο Ν. Ευβοϊκό Κόλπο, τόσο ο χρόνος όσο και η αλιεία είχαν μια ήπια επίδραση στην αφθονία, η αλιεία είχε μια ήπια επίσης επίδραση στον αριθμό ειδών, ενώ η ποικιλότητα δεν φάνηκε να επηρεάζεται από κανένα από τους δύο παράγοντες. Αναλυτικότερα, η πειραματική αλιεία ελάττωσε την αφθονία του μακροβένθους στο Ν. Ευβοϊκό Κόλπο, τον αριθμό των ειδών και στους δύο κόλπους και την ποικιλότητα στον Κόλπο των Πεταλιών. Στο επίπεδο της βιοκοινωνίας, η ανάλυση της Πολυδιάστατης Διαβάθμισης (MDS) έδειξε ότι στον Κόλπο των Πεταλιών η επίδραση της πειραματικής αλιείας είναι πιο σαφής από ότι στο Ν. Ευβοϊκό, πράγμα που επιβεβαιώνεται από τις καμπύλες Κ-κυριαρχίας. Τέλος, στον περισσότερο διαταραγμένο Κόλπο των Πεταλιών δεν παρατηρήθηκε τάση ανάκαμψης της βενθικής βιοκοινωνίας, τουλάχιστον για το χρονικό διάστημα των έξι μηνών που διάρκεσε η μελέτη.

ASSESSMENT OF THE IMPACT OF OTTER-TRAWLING ON EVVOIKOS GULF BENTHIC ECOSYSTEMS

**Thessalou-Legaki, M.¹, Zenetos, A.², Symboura, N.², Papaspyrou, S.¹, and
Pancucci-Papadopoulou, A.²**

¹Dept. of Zoology-Marine Biology, School of Biology, National and Kapodistrian University of
Athens, Panepistimiopolis, GR-15784, Athens, Greece

²Hellenic Center for Marine Research, Agios Kosmas, 16604 Hellinikon, Greece

The mid-term impact of otter trawling was studied in two adjacent bays of S. Evvoikos and Petalioi (Aegean Sea, Greece). Intensive experimental trawling was conducted in selected localities of both bays. Sediment and macrozoobenthos monitoring was carried out for six months after the experimental trawling in a period during which no commercial fishing is allowed. Samples were also collected from reference sites every three months. The bays have different substrata and fisheries management: S. Evvoikos with muddy sediments is closed to otter trawling, while the sandy bottoms of Petalioi Bay are subjected to fishing pressure. Experimental trawling resulted to an increase of sediment organic matter of both bays but did not notably affect sediment texture. In both bays, the experimentally disturbed localities, although more intensively sampled, exhibited an overall decrease in species number. The two-way ANOVA, using time and intensive trawling as factors, showed that in Petalioi the macrozoobenthic abundance was greatly affected by time, the species number by time and mainly by the intensive trawling, while diversity was solely affected by intensive trawling. In S. Evvoikos, time and trawling had a moderate effect on abundance; trawling also moderately affected species numbers, while diversity did not show significant variation that could be attributed to these two factors. In detail, the intensive experimental trawling caused a statistically significant decrease in the benthic abundance of S. Evvoikos. Furthermore, it reduced the species number in both bays especially in Petalioi, in which the community diversity was also decreased. The community analysis (MDS) revealed a prominent change in community structure of Petalioi Bay caused by intensive trawling, a fact that is supported by the k-dominance curves. The benthic ecosystem of that bay had not recovered at the end of the six-month period of the study.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ HELA ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΒΙΤΑΜΙΝΗ C

Θωμάς, Χ., Βεζυράκη Π., Καλφακάκου, Β. και Α. Ευαγγέλου

Εργαστήριο Φυσιολογίας: Μονάδα Κυτταρικής και Μοριακής Φυσιολογίας
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Ιωάννινα 45110

Ο ρόλος της βιταμίνης C στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως καθώς μόνο σε μικρό αριθμό μελετών σε κυτταροκαλλιέργειες το ασκορβικό οξύ ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Πολλοί είναι οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την παραπάνω δράση. Η αλληλεπίδραση της βιταμίνης C με το σύστημα πρωτεϊνικών κινασών και φωσφατασών έχει παρουσιαστεί ως μία υπόθεση η οποία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Επίσης είναι γνωστό ότι η παρουσία της γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό ανταγωνίζεται την-με διευκολυνόμενη διάχυση- είσοδο του δεϋδροασκορβικού οξέος στα κύτταρα.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τρεις συνθήκες στις οποίες οι δύο τύποι της βιταμίνης C, ασκορβικό και δεϋδροασκορβικό οξύ, επιδεικνύουν κυτταροτοξική δράση και αναστέλλουν την αύξηση των HeLa κυττάρων. Επιπλέον στην περίπτωση του δεϋδροασκορβικού οξέος μελετήσαμε την κυτταροτοξική και την κυτταροστατική του δράση παρουσία και απουσία γλυκόζης. Για να διερευνήσουμε τους μηχανισμούς με τους οποίους η βιταμίνη C αναστέλλει τον πολ/σμό των HeLa κυττάρων, εξετάσαμε τις επιδράσεις της στα επίπεδα ολικής πρωτεϊνικής τυροσινικής φωσφορυλίωσης των κυτταρικών πρωτεϊνών. Παρατηρήσαμε ότι το ασκορβικό οξύ επέδειξε κυτταροτοξική δράση σε συγκεντρώσεις πάνω από 1mM, ενώ παράλληλα ανέστειλε την κυτταρική αύξηση σε εύρος συγκεντρώσεων από 100μM έως 1mM. σε χρόνους επώασης έως 5 ώρες. Το δεϋδροασκορβικό οξύ παρουσία και απουσία της γλυκόζης, ανέστειλε τον πολ/σμό των κυττάρων σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση του ασκορβικού οξέος (500μM-2mM). Και οι δύο τύποι της βιταμίνης C δεν φαίνεται να επηρέασαν τα επίπεδα της ολικής πρωτεϊνικής τυροσινικής φωσφορυλίωσης ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις της τάξης των 2mM.

CYTOTOXIC EFFECTS AND CELL GROWTH INHIBITION ON HELA CELLS BY VITAMIN C

Thomas Chr., Vezyraki P., Kalfakakou, V., and A. Evangelou

Laboratory of Physiology, Cellular and Molecular Physiology Unit, Medical School, University of
Ioannina, Ioannina Greece 45110

The effects of vitamin C on carcinoma cell growth has been one of some confusion as, only in the minority of cell culture studies, ascorbic acid inhibited cell proliferation. The underlying mechanisms are not fully understood. Interference with protein kinase/phosphatase systems may be offered as hypotheses to be further investigated. It has been shown that glucose and dehydroascorbic acid use the same facilitated glucose transporters and as a result, glucose antagonizes the uptake of dehydroascorbic acid especially in tumor cells.

In our study we treated Hela cells with two types of vitamin C, ascorbic acid and dehydroascorbic acid and tested their toxicity with trypan blue dye exclusion method. We also study the ability of test compounds to inhibit cell growth using the colony-forming efficiency test. Particularly, in the case of dehydroascorbic acid, cells were incubated either in the absence or in the presence of glucose. In our attempt to investigate the possible mechanisms of the antiproliferative role of vitamin C, we examined its effects on protein tyrosine phosphorylation of cellular proteins. We found that the toxicity of ascorbic acid is observed above 1mM ascorbic acid in the medium and cell growth is inhibited at ascorbic acid concentrations of 100 μ M -1mM. Dehydroascorbic acid with or without glucose inhibited cell growth at greater concentrations than ascorbic acid (500 μ M – 2mM). Regarding the participation of vitamin C in the protein kinase/phosphatase systems, we found that the protein tyrosine phosphorylation level of cellular proteins was not affected by both types of vitamin C even at concentrations of 2mM.

Η NS5A ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΤΙΤΙΔΑΣ C ΕΠΑ- ΝΑΦΕΡΕΙ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΣΕ ΑΝΡΩ- ΠΙΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΠΟΥ ΜΟΛΥΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΕΡΠΗΤΟΪΟΥΣ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΟΠΟΙΟΥΣ ΕΛΛΕΙΠΕΙ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ 34.5

Καλαμβόκη Μ. και Π. Μαυρομαρά

Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα

Μηχανισμοί που σχετίζονται με τις ιντερφερόνες προστατεύουν καθημερινά το κύτταρο από συνθήκες στρες, που ποικίλουν, από ιική μόλυνση μέχρι έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης. Η πρωτεϊνική κινάση R (PKR), είναι ένα καλά χαρακτηρισμένο μόριο, που επάγεται από ιντερφερόνες και έχει αντιική δράση. Η ενεργοποιημένη PKR διμερίζεται και φωσφορυλιώνει μόρια κλειδιά, όπως είναι η α υπομονάδα του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF-2α. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Ως εκ τούτου, πολλοί ιοί έχουν αναπτύξει στρατηγικές για τη ρύθμιση της λειτουργίας της PKR. Ο ιός της ηπατίτιδας C, ένας RNA ιός θετικής πολικότητας, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη NS5A που παρεμποδίζει το διμερισμό της PKR. Αυτό είναι αξιοσημείωτο αφού σε κανένα από τα υπάρχοντα συστήματα κυτταροκαλλιέργειας ο ιός δεν δίνει υψηλούς τίτλους ιικών σωματιδίων. Ανάλογα, σε ανθρώπινα κύτταρα που μολύνονται από τον ιό HSV-1, η γ₁34.5 πρωτεΐνη παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση του eIF-2α από την PKR. Ερπητοιοί, που δεν εκφράζουν την 34.5 πρωτεΐνη (R3659) προκαλούν καταστολή της πρωτεΐνης σύνθεσης. Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε ένα ιικό σύστημα, που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση ιικών πρωτεϊνών, που τροποποιούν τη δράση της PKR. Το σύστημα χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της λειτουργίας της NS5A. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η πρωτεΐνη NS5A από τον ιό R3659-NS5A επαναφέρει τα επίπεδα πρωτεϊνοσύνθεσης στην ηπατική κυτταρική σειρά HepG2, που όταν μολύνεται από τους 34.5 ερπητοιοί παρατηρείται καταστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Επιπλέον, σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, που μολύνονται από τον R3659-NS5A παρατηρείται μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης του eIF-2α, συγκριτικά με τη μόλυνση από τον R3659. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης δείχνουν άμεση φυσική αλληλεπίδραση της NS5A με την PKR. Τέλος, θα παρουσιαστούν αποτελέσματα όπου φαίνεται η επίδραση πρωτεασών σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις της NS5A πρωτεΐνης.

**THE NS5A PROTEIN OF HEPATITIS C VIRUS (HCV)
EFFICIENTLY RESTORES PROTEIN SYNTHESIS IN
HUMAN CELL LINES INFECTED WITH 34.5⁻ HERPES
SIMPLEX VIRUSES**

Kalamvoki, M., and P. Mavromara

Molecular Virology Laboratory, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vas. Sofias Avenue, 115 21 Athens

Interferon response represents a powerful cellular mechanism against stresses ranging from viral infection to keeping cellular growth under control. Protein kinase R (PKR) is one of the best-characterized interferon-induced gene products that is critical for the antiviral response. Once PKR is activated, it dimerizes and phosphorylates key proteins among which is the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF-2 α). The net effect is the total shutoff of protein synthesis. As such, PKR is a primary target for viral inhibition and many viruses have evolved strategies to regulate its activity. Recent studies have shown that hepatitis C virus (HCV), an RNA positive stranded virus, encodes for a protein known as NS5A, capable of binding to PKR and inhibiting the kinase activity. As there is no efficient cell culture system for HCV infection, the biological importance of this interaction remains elusive. Similarly, the product of an HSV-1 gene, known as γ_1 34.5, recruits and redirects phosphatase 1 α to dephosphorylate eIF-2 α enabling uninterrupted protein synthesis. HSV mutants that do not express 34.5 protein, like R3659, exhibit a premature total shutoff of protein synthesis in human cells. In this study we showed that HSV can be used as a surrogate viral system to identify and study viral proteins targeting the PKR activity. We found that the NS5A protein expressed in the context of a 34.5⁻ HSV-1 virus (R3659) efficiently restored protein synthesis in the R3659-NS5A infected HepG2 cells. Furthermore, immunoprecipitation experiments indicated a direct interaction between NS5A and PKR. Additionally, the levels of eIF-2 α phosphorylation are lower in HepG2 cells infected with the R3659-NS5A recombinant virus as compared to R3659 infected cells. Data will be presented which suggest the participation of a novel cellular protease(s) in the posttranslational processing of the NS5A protein.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΑΝΩ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ II ΤΟΥ IRES ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C

Καλλιαμπάκου Κ., Ψαρίδη Α. και Π. Μαυρομαρά

Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, 127 Βασ. Σοφίας, 115 21 Αθήνα

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) έχει γενετικό υλικό μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας. Στα 5' και 3' άκρα της κωδικής περιοχής υπάρχουν πολύ συντηρημένες και με έντονη δευτεροταγή δομή μη-μεταφραζόμενες περιοχές (NTRs). Το μήκος 341 νουκλεοτιδίων 5'NTR αποτελείται από τέσσερις δομές (I-IV), μία έλικα και ένα ψευδόκομβο. Αντίθετα με το γενικό κανόνα για την έναρξη της μετάφρασης στα ευκαρυωτικά, ο HCV υποστηρίζει εσωτερική πρόσδεση ριβοσώματος (IRES). Η RNA αλληλουχία που απαιτείται περιλαμβάνει όλη την 5'NTR εκτός της δομής I. Η δομή II δεν είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του ριβοσώματος αλλά επάγει μία στερεοδομική αλλαγή που πιθανά σχετίζεται με τη σωστή αποκωδικοποίηση. Επιπλέον, οι μονόκλωνες περιοχές της δομής II περιλαμβάνουν πολύ συντηρητικές αλληλουχίες που πιθανά έχουν ένα σημαντικό ρόλο στην έναρξη της μετάφρασης. Μελετήθηκε η σημασία του άνω τμήματος της δομής II στην IRES λειτουργία του HCV μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης (προσθήκες, ελλείψεις και αντικαταστάσεις). Η επίδραση της κάθε μετάλλαξης προσδιορίστηκε *in vitro* και *in vivo* (κυτταρικές σειρές: COS-7, BHK-21 και HepG2) με χρήση πλασμιδιακού φορέα που φέρει διιστρονικό σύστημα έκφρασης αποτελούμενο από την ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφαινικόλης (CAT) ως πρώτο και την firefly λουσιφεράση (LUC) ως δεύτερο γονίδιο. Η έκφραση της LUC ελέγχεται από την IRES λειτουργία ενώ η έκφραση της CAT χρησιμεύει ως μάρτυρας. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαίωσαν τη σημασία της δευτεροταγούς δομής του άνω τμήματος στελέχους-θηλιάς της δομής II στην IRES λειτουργία. Αντίθετα, δεν επιβεβαιώθηκε ο ρόλος που είχε υποτεθεί για τις πολύ συντηρημένες αλληλουχίες της δομής II στην έναρξη της μετάφρασης. Παρόλα αυτά, απλές αντικαταστάσεις συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων κατέστειλαν ισχυρά την IRES λειτουργία πράγμα το οποίο ίσως σημαίνει μια πιθανή συμμετοχή αυτών των βάσεων στη διαδικασία αποκωδικοποίησης του ιού.

MUTATIONAL ANALYSIS OF THE APICAL REGION OF DOMAIN II OF THE HCV VIRUS

Kalliampakou, K., Psaridi, L. & P. Mavromara

Molecular Virology Laboratory, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vas. Sofias Avenue, 115 21 Athens

Hepatitis C virus (HCV) has a single-stranded, positive sense RNA genome. The coding region is flanked at both the 5' and 3' ends by highly structured and well conserved non-translated regions (NTRs). The 5'NTR, about 341 nt in length, consists of four structural domains (I-IV), a helical structure and a pseudoknot. In contrast to the general rule for translation initiation in eukaryotic cells, HCV is able to mediate translation of its polyprotein via an internal ribosome entry site (IRES). The RNA sequence required for this activity covers the 5'NTR region downstream of domain I. Domain II is not required for ribosome binding but induces a conformational change that may be involved in the decoding process. Furthermore, the apical unpaired regions of domain II contain conserved nucleotide motifs. This strong conservation has suggested a key role in translation initiation. To elucidate the importance of the apical region of domain II in the HCV IRES function we performed an extensive site-directed mutational analysis in this region (insertion, deletion and substitution mutations). The effect of each mutation was assessed both in vitro and in vivo (cell lines: COS-7, BHK-21 and HepG2) with a disistronic expression plasmid vector that carries the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) and the firefly luciferase (LUC) as the first and second cistron respectively. Expression of the LUC gene was directly related to the functional properties of the IRES, while the CAT activity served as an internal control. Our results confirmed the structural importance of the apical stem-loop segment on the IRES function. On the other hand, our data did not support an essential role on translation of the previously identified conserved nucleotide motifs. However, single nucleotide substitutions strongly inhibited the IRES function, which may suggest a possible contribution of those bases to the viral decoding process.

ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΧΡΩΜΙΟΥ ΚΑΙ ΚΑΔΜΙΟΥ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΤΟΥ ΒΑΤΡΑΧΟΥ *Rana ridibunda***Καλμαντή, Δ., Θεοδωροπούλου, Β., Κωσταρόπουλος, Ι., Λουμπουρδής Ν.**

Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας Σχολής Θετικών Επιστημών Α.Π.Θ. Τ.Κ.54124.

Σκοπός της εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της επίδρασης χρωμίου και μίγματος χρωμίου και καδμίου σε βατράχια *Rana ridibunda*. Από τα 12 βατράχια που μελετήθηκαν, τα 3 υπέστησαν την επίδραση χρωμίου για 14 ημέρες, τα 5 την επίδραση μίγματος χρωμίου – καδμίου για το ίδιο χρονικό διάστημα ενώ τα υπόλοιπα 4 χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Ακολούθησε κατάλληλη επεξεργασία των ιστών του ήπατος, του λεπτού εντέρου και του νεφρού προκειμένου να προσδιοριστεί η ειδική δραστηριότητα της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) και της οξειδάσης του κυτοχρώματος P450.

Παρατηρήθηκε σημαντική πτώση της ειδικής δραστηριότητας της GST σε όλους τους ιστούς, στους οποίους έγινε επίδραση βαρέων μετάλλων, σε σχέση με τους μάρτυρες. Ιδιαίτερα έντονα ήταν οι επιπτώσεις του χρωμίου στο ήπαρ. Η πτώση της δραστηριότητας της GST φαίνεται ότι οφείλεται στην ελάτωση των επιπέδων γλουταθειόνης (GSH), που αποτελεί και το υπόστρωμά του ενζύμου. Η GSH μειώνεται είτε λόγω της απουσίας των αμινοξέων που την αποτελούν, είτε λόγω της έλλειψης ενεργειακών αποθεμάτων. Παράλληλα μελετήθηκε η επίδραση των βαρέων μετάλλων στην δραστηριότητα της οξειδάσης του κυτοχρώματος του P450 στην οποία πρώτον παρατηρήθηκε πτώση μικρότερου βαθμού από την ελάτωση της GST και δεύτερον η μείωση αυτή δεν παρουσιάστηκε σε όλους τους ιστούς. Η παραπάνω μελέτη οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα βαρέα μέταλλα, αναστέλλοντας την λειτουργία συγκεκριμένων ενζύμων, εμποδίζουν την ομαλή λειτουργία των μηχανισμών του κυττάρου και κατ' επέκταση του ιστού.

THE IMPACT OF CHROMIUM AND CADMIUM ON THE ACTIVITY OF GST AND CYTOCHROME OXIDASE P450 IN TISSUES OF THE FROG *Rana ridibunda*

Kalmanti, D., Theodoropoulou B., Kostaropoulos, I., Loumbourdis, N.

Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki. T.K. 54124

The aim of this project is to study the effect of chromium and mixture of chromium and cadmium on the frogs *Rana ridibunda*. Three of the 12 frogs studied had been subjected to chromium for 14 days and other 5 frogs had been exposed to mixture of chromium and cadmium for the same days. We used the last 4 frogs as control. We processed the tissues of liver, small intestine and kidney in order to define the specific activity of the enzymes GST (transferase of glutathione) and oxidase of the cytochrome P450.

We found a significant decrease of the specific activity of GST (transferase of glutathione) in the tissues that had been affected by chromium and mixture of chromium and cadmium in comparison with control. The most remarkable result is the impact of chromium in the liver of the frogs. The reduction of the specific activity of GST seems to be related to the decrease of glutathione (GSH) which is the substrate of GST (transferase of glutathione). Glutathione has been decreased because of the reduction of the amino acids that compose it or because of the reduction of the power supply in the cell. We also studied the impact of chromium and cadmium on the specific activity of the oxidase of cytochrome P450. We noted reduction of the activity of the enzyme in comparison with control but not in all tissues. The decrease of the activity of GST is more significant than the reduction of the activity of oxidase of the cytochrome P450. After all these results we came in the conclusion that heavy metals such as chromium and cadmium suppress the activity of enzymes like GST (transferase of glutathione) and oxidase of the cytochrome P450 and also inhibited the regular operation of the cell.

Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΑΝΤΑΛΛΑΚΤΗ Na^+/H^+ ΑΝΑΣΤΕΛΛΕΙ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΜΙΤΟΓΟΝΟΥ ΚΙΝΑΣΗΣ P 44/42

Καλογιάννη, Μ.¹, Μπαντέκας, Χ.¹, Λιάκος, Π.², Τραχανά, Β.², και Γ. Κολιάκος²

¹Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, ²Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Η έναρξη της σύνθεσης του DNA σε κύτταρα θηλαστικών εξαρτάται από το ενδοκυττάριο pH. Επίσης τα μιτογόνα αυξάνουν τη δραστηριότητα του ανταλλάκτη Na^+/H^+ (NHE). Ο NHE ρυθμίζει τη δημιουργία εστιών προσκόλλησης. Οι εστίες προσκόλλησης δρουν και ως διαβιβαστές σήματος προς τις μιτογόνες κινάσες (MAPK). Από την άλλη πλευρά όμως η MAPK p42/p44 ενεργοποιεί τον NHE.

Η επίδραση της προσθήκης 10% FCS στο υλικό καλλιέργειας κυττάρων Hep-2 στη δραστηριότητα του NHE υπολογίζονταν με μέτρηση του ενδοκυττάρου pH με το ειδικό αντιδραστήριο BCECF. Για να ανασταλεί η δραστηριότητα του NHE χρησιμοποιήθηκε εθυλισοπροπυλαμιλορίδιο (EIPA). Η μιτογόνος δραστηριότητα εκτιμήθηκε από την ενσωμάτωση στα κύτταρα ³H-θυμιδίνης. Τέλος χρησιμοποιήσαμε ανοσοαποτύπωση κατά Western και ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα για να εξετάσουμε τη φωσφορυλίωση της p38 και της MAPK p42/44.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αναστολή του NHE με EIPA αναστέλλει την επίδραση του FCS στη μιτογόνο δραστηριότητα και στη φωσφορυλίωση της MAPK p42/44 αλλά δεν επηρεάζει τη φωσφορυλίωση της MAPK p38 και την ταχύτητα προσκόλλησης των κυττάρων στη λαμινίνη. Επειδή η MAPK p42/44 μπορεί να ενεργοποιεί τον ανταλλάκτη Na^+/H^+ μπορεί να υποθέσει κανείς την ύπαρξη αγκύλης θετικής ανάδρομης δράσης μεταξύ του ανταλλάκτη Na^+/H^+ και της MAPK p42/44.

**Na⁺/H⁺ EXCHANGER INHIBITION INHIBITS CELL
PROLIFERATION VIA MITOSIS ACTIVATING
PROTEIN KINASE P 44/42 (MAPK P42/P44)**

Kaloyianni, M.¹, Bantekas, Ch.¹, Liakos, P.², Trachana, V.² and G. Koliakos²

¹Laboratory of Animal Physiology, School of Biology, and ²Laboratory of Biological Chemistry, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki.

It has been reported that the initiation of DNA synthesis in mitogen stimulated cells is pH sensitive. It is also known that one of the earliest events in the response of mammalian cells to mitogens is the activation of Na⁺/H⁺ exchanger (NHE). It has been also reported that NHE mediates the signal downstream of RhoA and regulates focal adhesion formation. Focal adhesions serve as signal transducers to mitogen activating protein kinase (MAPK) cascades. On the other hand it has been reported that MAPK p42/p44 is mediating the activation of NHE. However the effect of NHE inhibition on MAPK cascades remains unknown. Therefore we investigated the effect of NHE inhibition on MAPK phosphorylation in Hep 2 cells under the mitogenic effect of fetal calf serum (FCS).

The effect of 10% FCS on NHE activity was estimated in Hep-2 cells by measuring the intracellular pH with BCECF, a specific fluorescent reagent. Ethylisopropylamiloride (EIPA) was used to inhibit NHE. Cell proliferation activity was measured by H³Thymidine uptake. Finally we used Western blotting and specific monoclonal antibodies to examine the phosphorylation of p38 and p42/44 MAPK .

The results indicate that inhibition of NHE activity with EIPA inhibits FCS induced cell proliferation and MAPK p42/44 phosphorylation but does not influence p38 phosphorylation and cell attachment to laminin. Since the same kinase may activate Na⁺/H⁺ exchanger a positive feedback loop between Na⁺/H⁺ exchanger and MAPK p42/44 is suspected.

ΤΙ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΠΡΟΣΦΕΡΕΙ Η ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ; ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ DNA ΑΠΟ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Καλοδήμος, Γ.Χ. και R. Kaptein

Bijvoet Center for Biomolecular Research, NMR Spectroscopy, Padualaan 8, 3584 CH. Utrecht,
The Netherlands

Η αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη λειτουργία πολλών βιολογικών διεργασιών που σχετίζονται με τη ροή της γεννητικής πληροφορίας. Οι πρωτεΐνες που ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων είναι ικανές να ανιχνεύσουν και να επιλέξουν τη σωστή ακολουθία ανάμεσα σ' ένα εξαιρετικά μεγάλο αριθμό μη ειδικών ακολουθιών DNA. Παρόλο τον εμπλουτισμό της γνώσης μας με πληθώρα πληροφοριών για τους μηχανισμούς αναγνώρισης του DNA από πρωτεΐνες, παρά πολλές ερωτήσεις παραμένουν αναπάντητες.

Στόχος της παρούσας ομιλίας είναι να καταδείξει τη σπουδαιότητα της φασματοσκοπίας NMR στη δομική βιολογία και ειδικότερα στη μελέτη συμπλόκων πρωτεϊνών με DNA. Πιο συγκεκριμένα, θα παρουσιάσουμε πολύ πρόσφατα αποτελέσματα δομικών μελετών της δέσμευσης του καταστολέα της λακτόζης στο ειδικό του DNA¹. Τα δεδομένα επιδεικνύουν μία ασυνήθιστη πλαστικότητα στη δομή τόσο της πρωτεΐνης όσο και του DNA και παρουσιάζουν με λεπτομέρεια τους μηχανισμούς που μπορεί να χρησιμοποιήσει μία πρωτεΐνη προκειμένου να αναγνωρίσει διαφορετικές ειδικές ακολουθίες DNA. Επιπλέον, θα παρουσιαστεί η μοναδική ικανότητα της φασματοσκοπίας NMR στη παροχή πληροφοριών για τα δυναμικά φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά την αναγνώριση DNA από πρωτεΐνες, τα οποία εκτείνονται από κλίμακες χρόνου ns μέχρι sec. Τέλος, θα παρουσιάσουμε μία πρόσφατη μεθοδολογία² που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας και η οποία παρέχει για πρώτη φορά πληροφορίες σε επίπεδο αμινοξέως για την ακολουθία των γεγονότων που καταλήγουν στην αναγνώριση και αποδέσμευση των συμπλόκων πρωτεϊνών με DNA. Οι μελέτες αυτές, σε συνδυασμό με βιοχημικά³ και γενετικά δεδομένα, οδηγούν σε πιο ολοκληρωμένη και λεπτομερή κατανόηση των μηχανισμών αναγνώρισης DNA από πρωτεΐνες.

WHAT CAN NMR DO FOR MOLECULAR BIOLOGY? THE EXAMPLE OF PROTEIN-DNA RECOGNITION

Kalodimos, G.Ch., and R. Kaptein

Bijvoet Center for Biomolecular Research, NMR Spectroscopy, Padualaan 8, 3584 CH. Utrecht,
The Netherlands

Interactions between protein and nucleic acids are fundamental to all steps of expression, replication, and recombination of the genetic information embedded in a DNA sequence. The DNA binding proteins that regulate transcription are capable of selecting the correct binding site out of a vast number of potential sites in the genome. Although our understanding of how these proteins do so has expanded tremendously over the last years, most of the questions remain still unanswered.

In this lecture, we will summarize how NMR spectroscopy can be used to obtain information on complexes of proteins with their specific DNA targets. In particular, a very recent structural determination of the lactose repressor-operator system will be described¹. The structural data revealed an unprecedented plasticity in both the protein and the DNA, demonstrating the mechanisms a protein can use to recognize different DNA sequences. Moreover, it will be described how NMR spectroscopy makes its unique contribution to the understanding of protein-DNA interactions by highlighting their dynamic aspect: dynamics of disorder-to-order transitions upon DNA binding, dynamics at the protein-DNA interface, and flexibility in μ s to ms and ps to ns time scales. Finally, a recent development in our lab of a methodology that provides for the first time a residue-specific view of the association and dissociation pathway in protein-DNA recognition will be discussed². Combined with biochemical³ and genetic studies, these studies have lead to a better understanding of the mechanisms a protein can use in order to bind selectively to DNA sequences.

References

1. Kalodimos, C.G., Bonvin, A., Boelens, R. & kaptein, R. *submitted*.
2. Kalodimos, C.G., Boelens, R. & kaptein, R. *Nature Struc. Biol.* 2002, 9, 193.
3. Kalodimos, C.G., Folkers, G., Boelens, R. & kaptein, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 6039.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΟΙΝΗΣ ΠΟΙΚΙΛΗΣ ΑΝΟΣΟ- ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ ΣΤΟΥΣ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΤΙΚΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΟΥ DNA

**Καναβέτας, Π.^{1,3}, Μεσσήνη-Νικολάκη, Ν.³, Κανάριου, Μ.², Τσιλιμιγκάκη, Σ.¹,
και Σ.Μ. Πιπεράκης¹**

¹Εργαστήριο Επιδιορθωτικών Μηχανισμών DNA, Ινστ. Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ 'Δημόκριτος', Αθήνα.

²Τμήμα Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, Νοσοκομείο Παίδων 'Αγία Σοφία', Αθήνα

³Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Η κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (CVID) είναι μία ασθένεια που εμφανίζεται σε συχνότητα 1/10000-100000 σε άτομα ανεξαρτήτως φύλου. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η ευαισθησία πληθυσμών με κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια στην επίδραση εξωγενών παραγόντων (υπεροξειδίο, ακτινοβολία) και έγινε σύγκριση τους με την επίδραση των ίδιων παραγόντων σε φυσιολογικά άτομα. Με την τεχνική του "comet assay" μετρήθηκαν οι βλάβες στο DNA και συγκεκριμένα τα θραύσματα στην αλυσίδα του γονιδιώματος καθώς και η επιδιορθωτική τους ικανότητα. Οι πληθυσμοί που συμμετείχαν στην έρευνα επιλέχθηκαν με βάση ερωτηματολόγιο που περιελάμβανε ερωτήσεις σχετικές με την ηλικία, τις διατροφικές συνήθειες, το κάπνισμα κλπ. Τα μέχρι σήμερα αναλυθέντα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι άτομα που υποφέρουν από κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια εμφανίζουν μία πιθανή ελαττωματικότητα στην λειτουργία των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA.

EFFECT OF COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY ON DNA REPAIR SYSTEMS

**Kanavetas, P.^{1,2}, Messini-Nikolaki, N.³, Kanariou, M.², Tsilimigaki, S.¹, and
S.M. Piperakis.¹**

¹DNA Repair Laboratory, Institute of Biology, NCSR 'Demokritos', Athens, Greece

²Department of Immunology & Histocompatibility, Hospital 'Agia Sofia', Athens, Greece

³Department of Cell Biology, School of Biology, University of Athens, Athens, Greece

Common variable immunodeficiency (CVID) is a disease affecting 1/10000-100000 individuals. In the present study the effects of external factors and the DNA repair efficiency in a CVID population were examined in comparison to controls. The populations were selected with the use of a detailed questionnaire containing questions on health, lifestyle, diet, age, smoking habits, etc. The damage on DNA and the repair efficiency were estimated with the comet assay technique, which is a sensitive and rapid method for the detection of DNA breaks. Preliminary results show that individuals suffering from CVID seem to possibly have a defective DNA repair system.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Κανδρή, Ν.^{1,2}, Βοργιάς, Κ.Ε.², Τσιλιμιγκάκη, Σ.¹ και Πιπεράκης, Σ.Μ.¹

¹Εργαστήριο Επιδιορθωτικών Μηχανισμών DNA, Ινστ. Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ, 'Δημόκριτος', Αθήνα.

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

Ως γνωστόν οι βλάβες στο γενετικό υλικό σχετίζονται με την καρκινογένεση. Η αλκοόλη (αιθανόλη) είναι ένας σημαντικός παράγοντας πρόκλησης βλαβών στο DNA. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της αλκοόλης σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Με την τεχνική του "comet assay" μετρήθηκαν οι βλάβες στο DNA και συγκεκριμένα τα θραύσματα στην αλυσίδα του γονιδιώματος καθώς και η επιδιορθωτική ικανότητα. Επίσης μελετήσαμε την μορφολογία των κυττάρων με χρωστικές (AO + EtBr) για να προσδιορίσουμε τον αριθμό των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων. Με τις παραπάνω χρωστικές διαχωρίστηκαν τρεις σαφείς κατηγορίες κυττάρων, τα φυσιολογικά που βάφονται πράσινα, τα νεκρωτικά που βάφονται κόκκινα και τα αποπτωτικά που βάφονται πράσινα με τα αποπτωτικά σωμάτια κόκκινα. Τα μέχρι σήμερα αναλυθέντα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η αλκοόλη δημιουργεί αυξημένο αριθμό βλαβών στο DNA. Επίσης προωθεί φρέσκα κύτταρα σε απόπτωση και όχι σε νέκρωση. Σε αντίθεση αποψυγμένα λεμφοκύτταρα βρέθηκε ότι μεταβαίνουν εξ ολοκλήρου σε νέκρωση και όχι σε απόπτωση.

A STUDY ON THE EFFECTS OF ALCOHOL (ETHANOL) ON HUMAN LYMPHOCYTES

Kandri, N.^{1,2}, Vorgias, C.E.², Tsilimigaki, S.¹, and S.M. Piperakis¹

¹DNA Repair Laboratory, Institute of Biology, NCSR 'Demokritos', Athens, Greece.

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece.

There is no doubt that DNA damage plays an important role and can contribute to carcinogenesis. Alcohol is an important agent that can induce DNA damage. In our present study the damage on DNA induced by alcohol was estimated with the comet assay technique. To study apoptosis and necrosis using morphology, cells were stained with acridine orange in combination with ethidium bromide. With the above stains, we distinguished three cells' categories. The normal cells, which are painted green, necrotic ones, which are painted red, and the apoptotic cells, which are painted green with the apoptotic particles, painted red. Our results suggest that alcohol increases DNA damage on fresh human lymphocytes and also promotes apoptosis but not necrosis. Defrosted lymphocytes on the other hand are been lead to necrosis and not to apoptosis..

**ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΣΤΕΡΙΚΩΝ ΣΤΕΡΟ-
ΕΙΔΙΚΩΝ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΜΟΥΣΤΑΡΔΩΝ ΑΖΩΤΟΥ. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ
ΜΕΛΕΤΗ**

Καραγιάννη, Β.¹, Αρσένου, Ε.², Ιακωβίδου, Ζ.¹, Φουστέρης, Μ.², Μιόγλου, Ε.¹, Κουτσουρέα, Α.², Δίπλας, Α.², Νικολαρόπουλος, Σ.² και Δ. Μουρελάτος¹

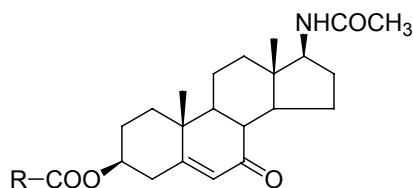
¹ Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας και Γενετικής, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124 Θεσσαλονίκη.

² Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Πατρών.

Παρά το γεγονός ότι οι μουστάρδες αζώτου αποτελούν μια σημαντική κατηγορία αποδεκτών αντικαρκινικών παραγόντων, με ευρεία εφαρμογή στην χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση του καρκίνου, η αντineοπλασματική τους δράση χαρακτηρίζεται ως μη ιδιαίτερα εκλεκτική και σημαντικής τοξικότητας. Προκειμένου να υπερκερασθούν τα μειονεκτήματα αυτά, έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιολογικές «πλατφόρμες» των μουσταρδών αζώτου στεροειδείς ορμόνες, αποδίδοντας παράγωγα με αυξημένη αντineοπλασματική δράση και ελαττωμένη κυτταροτοξικότητα. Παράλληλα, έχει αναφερθεί ότι διάφορα οξειδωμένα παράγωγα Δ⁵-στεροειδών απεδείχθησαν περισσότερο τοξικά έναντι καρκινικών κυττάρων σε σχέση με φυσιολογικά. Όλα τα ανωτέρω μας ενθάρρυναν να σχεδιάσουμε και να συνθέσουμε μια σειρά στεροειδικών εστερικών προϊόντων 4 διαφορετικών αρωματικών μουσταρδών αζώτου με ένα 7-κέτο τροποποιημένο ανδρογονικό παράγωγο. Με βάση τα ενδιαφέροντα πρόσφατα αποτελέσματα που προέκυψαν από την *in vitro* και *in vivo* μελέτη του 3β-υδροξυ-17β-ακεταμιδο-5-ανδροστεν-ρ-N,N-δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινο φαινυλοξικού εστέρα [SN26] συνθέσαμε τον αντίστοιχο 7-κετο-εστέρα [EA92], προκειμένου να διερευνήσουμε την επίδραση της εισαγωγής της κετονικής ομάδας στο στεροειδικό τμήμα του εστέρα στην κυτταρογενετική δράση του εστερικού αλκυλιωτικού παραγώγου. Για την εισαγωγή της κετόνης στην 7 θέση του στεροειδικού σκελετού αναπτύχθηκε μια νέα συνθετική προσέγγιση. Εκτός αυτού του παραγώγου, όπως αναφέρθηκε, συντέθηκαν και τα εστερικά παράγωγα της 3β-υδροξυ-17β-ακεταμιδο-5-ανδροστεν-7όνης με το *p*-μεθυλο-*m*-N,N-δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινοβενζοϊκό οξύ [EA120], το *o*-N,N-δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινοβενζοϊκό οξύ [EA121] και τη χλωραμπουκίλη [EA122].

"Η εργασία αυτή υποστηρίχθηκε από το πρόγραμμα "Κ.Καραθεοδωρή" Νο 2456, της Επιτροπής Ερευνών του Πανεπιστημίου Πατρών"

Εντυπωσιακά αποτελέσματα απορρέουν από τη συγκριτική μελέτη των 5 ενώσεων, σε μοριακό επίπεδο, ως προς την ικανότητά τους να επάγουν χρωματιδικές ανταλλαγές (SCEs) και να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε ανθρώπινα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα *in vitro*. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την *in vitro* μελέτη των νέων εστερικών ενώσεων έδειξαν ότι η εισαγωγή της κετονικής ομάδας στην 7 θέση του στεροειδικού σκελετού επαυξάνει σημαντικά την κυτταρογενετική επίδραση της ένωσης EA92, σε σχέση με την SN26. Ικανοποιητική δράση μετρήθηκε και για τις άλλες 3 εστερικές ενώσεις [EA120, EA121, EA122], μεταξύ των οποίων εξαιρετικά καλύτερη αποδείχθηκε σε μοριακή βάση η EA120 με τις EA121 και EA122 να ακολουθούν.



R = *p*-μεθυλο-*m*-*N,N*-δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινο βενζοϊκό οξύ [EA120]
p-*N,N*-δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινοφαινυλοξικό οξύ [EA92]
p-*N,N*-δισ(2-χλωροαιθυλ)φαινυλ βουτυρικό οξύ [EA122]
o-*N,N*-δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινο βενζοϊκό οξύ [EA121]

CYTOGENETIC EFFECTS OF ESTERIC STEROIDAL AND OXIDIZED STEROIDAL DERIVATIVES OF NITROGEN MUSTARDS. A COMPARATIVE STUDY

Karayianni, V.¹, Arsenou, E.², Iakovidou, Z.¹, Fousteris, M.², Mioglou, E.¹, Koutsourea, A.², Diplas, A.², Nikolaropoulos, S.² and D. Mourelatos¹

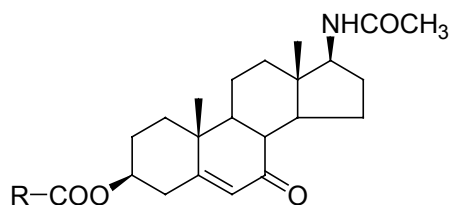
¹ Laboratory of Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki
54124 Thessaloniki

² Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Department of Pharmacy, School of Health Sciences,
University of Patras

Although nitrogen mustards constitute an important class of anticancer agents, with wide use in cancer chemotherapy, nowadays, their antineoplastic activity is characterized non selective and with significant toxicity. In order to overcome these drawbacks, steroidal hormones have been successfully used as biological platforms for nitrogen mustards, giving derivatives with increased antineoplastic activity and reduced cytotoxicity. At the same time, several oxidized products of Δ^5 -steroids have been reported to be more toxic towards cancerous than non-cancerous cells. All these mentioned above, prompted us to

design and synthesize a series of esteric products of 4 different aromatic nitrogen mustards with an oxidized, at the 7 position of its molecule, modified androgenic derivative. Based on the interesting results obtained recently from the *in vitro* and *in vivo* study of 3 β -hydroxy-17 β -acetamido-5-androsten *p*-N, N-bis(2-chloroethyl)aminophenyl acetate [SN26], we designed and prepared the corresponding 7-keto-ester [EA92], in order to investigate its cytogenetic activity. A new synthetic approach was followed for the introduction of a 7 keto- group in the steroidal skeleton. Except from this new ester, we also synthesized the esteric derivatives of the 3 β -hydroxy-17 β -acetamido-5-androsten-7-one with *p*-methyl-*m*-N, N-bis(2-chloroethyl)amino benzoic acid [EA120], *o*-N,N-bis(2-chloroethyl)amino benzoic acid [EA121] and chlorambucil [EA122]. The comparative study of the 5 compounds, on a molecular basis, regarding their ability to induce Sister Chromatid Exchange (SCEs) and to inhibit cell proliferation in normal human lymphocytes *in vitro* gave impressive results.

The results obtained from the *in vitro* study of the esteric compounds mentioned above, which showed that the introduction of the keto-group at the 7-position of the steroidal skeleton enhanced significantly the cytogenetic effects of EA92 in comparison to SN26. Sufficient activity was measured for the other 3 new esteric compounds [EA120, EA121, EA122], and the most active among these, on a molar basis, was EA120 with EA102 and EA101 following.



- R =** *p*-methyl-*m*-N,N-bis(2-chloroethyl)amino benzoic acid [EA120]
p-N,N-bis(2-chloroethyl)aminophenyl acetic acid [EA92]
p-N,N-bis(2-chloroethyl)aminophenyl butyric acid [EA122]
o-N,N-bis(2-chloroethyl)amino benzoic acid [EA121]

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΛΕΥΧΑΙΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΝΟΣ
ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΟΥ ΕΣΤΕΡΙΚΟΥ ΣΤΕΡΟΕΙΔΙΚΟΥ
ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΤΟΥ 4-ΜΕΘΥΛΟ-3-N,N-ΔΙΣ(2-
ΧΛΩΡΟΑΙΘΥΛ)ΑΜΙΝΟΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ**

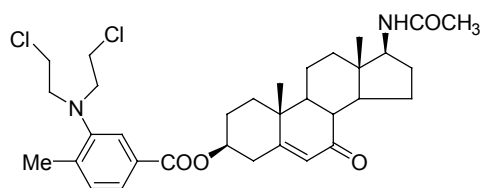
**Καραγιάννη, Β.¹, Αρσένου, Ε.², Ιακωβίδου, Ζ.¹, Κουτσουρέα, Α.²,
Μιόγλου, Ε.¹, Φουστέρης, Μ.², Λαγωνικάκος, Ν.², Μουρελάτος, Δ.¹ και
Σ. Νικολαρόπουλος²**

¹Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας και Γενετικής, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο
Θεσσαλονίκης, 54124 Θεσσαλονίκη.

²Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας,
Πανεπιστήμιο Πατρών.

Στα πλαίσια της προσπάθειας για τη σύνθεση αποτελεσματικότερων ενώσεων με αντικαρκινική δράση που να προκύπτουν από ήδη γνωστές ενώσεις και να μελετήσουμε τη σχέση μεταξύ της χημικής δομής και της δράσης των στεροειδικών εστέρων μουσταρδών αζώτου συνθέσαμε μια σειρά οξειδωμένων στην 7 θέση του στεροειδικού σκελετού στεροειδών εστέρων αυτής της κατηγορίας. Τα 7-κετο-Δ⁵-στεροειδή έχει αναφερθεί ότι εμφανίζονται περισσότερο τοξικά έναντι των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με τα φυσιολογικά. Πρόσφατα σε καλλιέργειες φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου (*in vitro*) αποδείξαμε ότι μεταξύ 3 νέων παραγώγων η EA120 είναι δραστικότερη γονοτοξικά και σε ισομοριακή βάση από τις EA102 και EA101, που ακολουθούν αντίστοιχα. Από τα παραπάνω αποτελέσματα κρίθηκε αναγκαία η *in vivo* μελέτη της αντινεοπλασματικής δράσης της EA120 σε ποντίκια που έφεραν P388 λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Η EA120 σε συγκέντρωση 7.5 μM/g Β.Σ. ποντικών έδωσε T/C%=242.8 (καθημερινή χορήγηση επί 9 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό του όγκου). Ιδιαίτερα εντυπωσιακά ήταν τα αποτελέσματα της EA120 όταν χορηγήθηκε σε 30 μM/g Β.Σ. (1/7 της LD₁₀/3) δίνοντας T/C%=331, ενώ σε 15 μM/g Β.Σ. το T/C%=264% (ημέρες 1, 4, 7). Τα ανωτέρω υποδεικνύουν ότι το στεροειδικό μόριο δεν αποτελεί απλά ένα μόριο-φορέα για την αποτελεσματικότερη μεταφορά του αλκυλιωτικού παράγοντα στις θέσεις-στόχους του DNA, αλλά επιπλέον συνεισφέρει στη δράση αυτού, ειδικά μέσω της ύπαρξης της 7 κετονικής ομάδας.

Οι αποτελεσματικές δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα αντιλευχαιμικά πειράματα ήταν αρκετά χαμηλές και προέκυψαν από κυτταρογενετικές παρατηρήσεις. Η EA120 απεδείχθει, σε μοριακή βάση, αρκετά πιο αποτελεσματική στην πρόκληση κυτταρογενετικής βλάβης και αντινεοπλασματικής δράσης σε σύγκριση με τις EA101 και 102. Επομένως περαιτέρω επιβεβαιώνεται ότι η αποτελεσματικότητα στην πρόκληση των SCEs *in vitro* από δυνάμει αντινεοπλασματικά μέσα θα μπορούσε θετικά να συσχετιστεί με την *in vivo* ανταπόκριση του όγκου σε αυτά τα μέσα.



EA120

β-υδροξυ-17β-ακεταμιδο-5-ανδροστεν-7-ον-ρ-μεθυλο-*m*-N,N-δισ (2-χλωροαιθυλ)αμινο βενζοϊκός εστέρας [EA120]

3β-υδροξυ-5-χολεστεν-ρ-μεθυλο-*m*-N,N-δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινο βενζοϊκό οξύ [EA101]

3β-υδροξυ-5-χολεστεν-ρ-N,N- δισ(2-χλωροαιθυλ)αμινο φαινυλ βουτυρικό οξύ [EA102]

STUDY OF ANTILEUKEMIC EFFECTS OF AN OXIDIZED ESTERIC STEROIDAL DERIVATIVE OF 4-METHYL-3-N,N-BIS(2-CHLOROETHYL)AMINO BENZOIC ACID

Karayianni, V.¹, Arsenou, E.², Iakovidou, Z.¹, Koutsourea, A.², Mioglou, E.¹, Fousteris, M.², Lagoniacos, N.², Mourelatos, D.¹ and S. Nikolaropoulos²

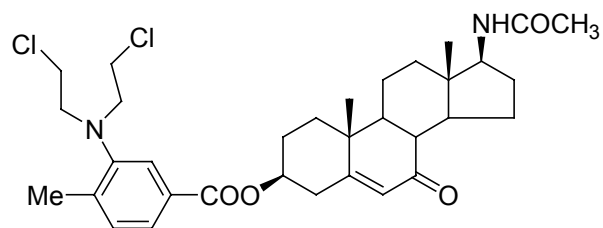
¹ Laboratory of Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki
54124 Thessaloniki

² Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Department of Pharmacy, School of Health Sciences, University of Patras

In an effort to synthesize more effective compounds with anticancer activity derived from known compounds and to study the relationship between the chemical structure and the biological activity of nitrogen mustards' steroidal esters, we synthesized a series of oxidized, at the 7 position of the steroidal ligand, esteric steroidal derivatives as 7-keto- Δ^5 -steroids have been reported to be more toxic toward cancerous than non cancerous cells. From the *in vitro* study of 3 newly synthesized molecules in normal human lymphocytes, it was shown that EA120 was a quite more efficient inducer of cytogenetic damage, on a molar basis, while EA102 and EA101 followed. Based on these results it was decided that EA120 had also to be studied *in vivo* for its antineoplastic activity upon leukemia P388-bearing mice. EA120 showed T/C%=242.8 at 7.5 μ M/g bodyWt given at days 1-9 after tumour implantation. It was very impressive that EA120 caused a T/C%=331 at 30 μ M/g bodyWt, which is the 1/7 of LD₁₀/3, and T/C%=264 at 15 μ M/g bodyWt (days 1, 4, and 7). This indicates that the steroidal molecule is not just a carrier for the efficient transportation of the alkylating moiety to the target sites of DNA but also confers to the antileukemic activity of the final esteric molecule, especially through the existence of the 7-keto-group. The effective doses used for antileukemic experiments were quite low and were derived from cytogenetic observations. EA120 was proved, on a molar basis, quite more efficient

inducer of cytogenetic damage and of antineoplastic activity compared with EA101 and EA102.

Therefore it is further confirmed that the effectiveness on SCE induction by potential chemotherapeutics *in vitro* could be positively correlated with *in vivo* tumour response to these agents.



3β-hydroxy-17β-acetamido-5-androsten-7-on-*p*-methyl-*m*-N,N-bis(2-chloroethyl)amino benzoic acid [EA120]

3β-hydroxy-5-cholesten-*p*-methyl-*m*-N,N-bis(2-chloroethyl)amino benzoic acid [EA101]

3β-hydroxy-5-cholesten-*p*-N,N-bis(2-chloroethyl)aminophenyl butyric acid [EA102]

**ΟΡΙΟΘΕΤΗΣΗ ΕΝΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝ-
ΣΗΣ ΣΤΟ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ 6 ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΜΕ ΜΕΛΕ-
ΤΕΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ****Καραγιάννη, Ε.¹, Morelli, C.², Barbanti-Brodano, G.², Μανιάτης, Γ.Μ.¹ και
Δ.Χ. Σπάθας¹**¹Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Ιατρικό Τμήμα, Πανεπιστημίου Πατρών, Πάτρα και ²Εργαστήριο
Μικροβιολογίας και Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Φερράρας, Φερράρα

Μοριακές και κυτταρογενετικές μελέτες οριοθετούν την παρουσία ενός γονιδίου κυτταρικής γήρανσης στην περιοχή q14-q21 του ανθρώπινου χρωμοσώματος 6. Ελλείψεις του 6q έχουν διαπιστωθεί σε αθανатоποιημένους εμβρυϊκούς ινοβλάστες, ενώ κύτταρα από όγκους ωοθηκών, εμφανίζουν πάλι τον φαινότυπο γήρανσης όταν προστεθεί η περιοχή q14-q21. Προσθήκη του χρωμοσώματος 6 χωρίς την παραπάνω περιοχή δεν αντιστρέφει το φαινότυπο των κυτάρων αυτών που εξακολουθούν να παραμένουν αθανатоποιημένα. Επιπλέον μελέτες οριοθέτησαν το γονίδιο της κυτταρικής γήρανσης σε μια περιοχή 6Mb στην ζώνη 6q21, μεταξύ των γενετικών δεικτών D6S278 και D6S266. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν πειράματα μελέτης απώλειας ετεροζυγωτίας γενετικών δεικτών σε πρωτογενείς καλλιέργειες εμβρυϊκών ινοβλαστών (NAO2250, NAO2345, MRC5) και των αντίστοιχων αθανатоποιημένων κυτταρικών σειρών, που προέκυψαν από αυτές (GMO4429, GMO4312, MRC5-tg1, MRC5-tg2), προκειμένου να οριοθετηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια το γονίδιο της κυτταρικής γήρανσης. Από τα πειράματα αυτά διαπιστώθηκε απώλεια ετεροζυγωτίας γενετικών δεικτών σε όλες τις αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές ως εξής: GMO4429, (δείκτες D6S1635, D6S1023), GMO4312 (δείκτες D6S1635, D6S1594, D6S1023, D6S1698, D6S404), MRC5-tg1 και 2 (δείκτης D6S1698). Η διάταξη των παραπάνω δεικτών στο χρωμόσωμα οριοθετεί μία περιοχή μήκους 2Mb και έτσι περιορίζει σημαντικά την πιθανή περιοχή θέσης του γονιδίου της κυτταρικής γήρανσης. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες για το χρωμόσωμα πληροφορίες σε βάσεις δεδομένων μπορούν να διευκολύνουν την κλωνοποίηση του γονιδίου της κυτταρικής γήρανσης.

Το ερευνητικό έργο επιχορηγείται από το Εμπειρικό Ίδρυμα

LOCALIZATION OF A CELL SENESCENCE GENE AT HUMAN CHROMOSOME 6 THROUGH OF LOSS OF HETEROZYGOSITY STUDIES

**Karayianni, E.¹, Morelli, C.², Barbanti-Brodano, G.², Maniatis, G.M.¹ and
D.H. Spathas¹**

¹Laboratory of General Biology, Medical School, University of Patras and ²Laboratory of
Microbiology and Medical Genetics, University of Ferrara

Molecular and cytogenetic studies indicate that a cell senescence gene is located at region q14-q21 of human chromosome 6. Deletions of 6q have been identified in immortalized human embryonic fibroblasts whereas transfer of chromosome segment 6q14-q21 to human ovarian tumor cells restored senescence. Incorporation of chromosome 6 lacking the above region does not confer senescence to these cells. Additional studies defined a 6 Mb segment in band 6q21 containing the senescence gene, between the genetic markers D6S278 and D6S266. In this study we have looked for loss of heterozygosity of genetic markers using primary cultures of embryonic fibroblasts (NAO2250, NAO2345, MRC5) and their respective immortalized counterparts (GMO4429, GMO4312, MRC5-tg1, MRC5-tg2) in order to refine the localization of the cell senescence gene. We have demonstrated loss of heterozygosity of genetic markers in all immortalized cell lines that we have used, as follows: GMO4429, (markers D6S1635, D6S1023), GMO4312 (markers D6S1635, D6S1594, D6S1023, D6S1698, D6S404), MRC5-tg1 και 2 (marker D6S1698). The order of the above markers on the chromosome defines a 2Mb segment, which therefore must carry the site of the candidate gene. These results along with the existing information in databases may now facilitate cloning of the cell senescence gene.

This study was supported by a grant from Empeirikeion Foundation

**ΦΥΣΙΚΗ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΚΛΩΝΩΝ DNA (YACs) ΚΑΙ
ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ (ESTs) ΣΤΗΝ
ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ 6q21 ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ****Καραγιάννη, Ε., Μανιάτης, Γ.Μ. και Δ.Χ. Σπάθας**

Εργ. Γενικής Βιολογίας, Ιατρικό Τμήμα, Πανεπιστημίου Πατρών

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η περιοχή 6q21 ενοχοποιείται για διάφορες νεοπλασίες. Η λεπτομερής χαρτογράφηση της περιοχής 6q21 με οριοθέτηση κλώνων DNA (YACs) και εκφραζόμενων αλληλουχιών (ESTs) μπορεί να συμβάλλει καθοριστικά στον εντοπισμό άγνωστων γονιδίων που εδράζονται στην περιοχή. Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χαρτογραφήθηκαν επακριβώς επτά κλώνοι DNA (YACs) καθώς βρέθηκε ότι οι κλώνοι αυτοί περιέχουν ESTs γνωστής θέσης πάνω στο χρωμόσωμα 6. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά και την γνωστή πλέον αλληλουχία του DNA της περιοχής προκύπτει ότι οι έξι (933c4, 963d6, 823g7, 804a10, 713g11, 17DA1) από τους επτά κλώνους που χρησιμοποιήθηκαν είναι αλληλοεπικαλυπτόμενοι και τοποθετούνται στην ζώνη 6q21 και συγκεκριμένα στο τμήμα της που αντιστοιχεί μεταξύ των 117,639Mb – 118,159Mb. Ο έβδομος κλώνος (870b3) τοποθετείται στην ίδια ζώνη στο τμήμα της που αντιστοιχεί στις 113,668Mb -114,664 Mb. Παράλληλα με την βοήθεια των παραπάνω επτά κλώνων έγινε πιο επακριβής χαρτογράφηση έξι ESTs (WI-18481, A006H26, sgc33792, sgc22449, stsg10282, WI-15199). Από αυτές οι τέσσερις πρώτες με τα νέα δεδομένα τοποθετούνται στο 6q21 στο τμήμα που αντιστοιχεί μεταξύ των 114,462Mb-117,536Mb και οι δύο τελευταίες αντιστοίχως ευρίσκονται μεταξύ των 117,802Mb-118,005Mb. Οι περισσότερες από τις ESTs που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη δεν αντιστοιχούν σε γνωστά γονίδια και επομένως η επακριβής χαρτογράφηση των ιδίων καθώς και κλώνων DNA που τις φέρουν μπορεί να βοηθήσει παραπέρα στον χαρακτηρισμό των γονιδίων που αντιπροσωπεύουν.

Το ερευνητικό έργο επιχορηγείται από το Εμπειρικό Ίδρυμα

PHYSICAL MAPPING OF DNA CLONES (YACs) AND EXPRESSED SEQUENCE TAGS (ESTs) AT REGION q21 OF HUMAN CHROMOSOME 6

Karayianni, E., Maniatis, G.M., and D.H. Spathas

Laboratory of General Biology, Medical School, University of Patras

It has been shown by recent studies that region 6q21 is involved in the pathogenesis of human cancer. The detailed physical mapping of DNA clones (YACs) and expressed sequences (ESTs) may contribute to the identification of unknown genes in the region. With the use of the polymerase chain reaction, we were able, in this study, to fine map, seven DNA clones (YACs) by screening them for ESTs of known position on chromosome 6. Taking into account the existing knowledge of sequence mapping in the region our results show that six (933c4, 963d6, 823g7, 804a10, 713g11, 17DA1) out of the seven clones that we have used overlap each other and are located at band 6q21 between 117,639Mb-118,159Mb. The seventh clone (870b3) is located in the same band between 113,668Mb-114,664Mb. The above clones have also been used to precisely map six ESTs (WI-18481, A006H26, sgc33792, sgc22449, stsg10282, WI-15199). The new data saw that the first four of them are located at 6q21 between 114,462Mb- 117,536Mb and the last two between 117,802Mb-118,005Mb respectively. Most of the ESTs that have been used in this study do not correspond to known genes. Their precise mapping as well as mapping of DNA clones that bear them may contribute to the characterization of the genes they represent.

This study was supported by a grant from Empeirikeion Foundation

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΤΡΙΩΝ ΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ
Trachurus ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΚΑΙ
ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ DNA ΔΕΙΚΤΩΝ****Καραϊσκού, Ν., Τριανταφυλλίδης, Α., Αποστολίδης, Α.Π., Κουβάτση,
Α. και Κ. Τριανταφυλλίδης**Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ., 54124
ΘεσσαλονίκηΤηλ. 031 0998309, Fax 031 0998374, e-mail: triant@bio.auth.gr

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτελεί η γενετική ταυτοποίηση τριών ειδών του γένους *Trachurus* που βρίσκονται στα Ευρωπαϊκά ύδατα: *T. trachurus* (γκριζοσαύριδο), *T. mediterraneus* (ασπροσαύριδο) και *T. picturatus* (μαυροσαύριδο). Η διάκριση των τριών ειδών βασίζεται κυρίως στη θέση κατάληξης του ραχιαίου τμήματος της πλευρικής γραμμής. Ωστόσο, η ομοιότητα σε κάποια βιολογικά χαρακτηριστικά καθώς και η αλληλοεπικάλυψη των ενδαιτημάτων, δυσχεραίνουν την ταυτοποίηση των νεαρών κυρίως ατόμων των οποίων τα μορφολογικά χαρακτηριστικά δεν διακρίνονται εύκολα. Ιδιαίτερα δύσκολη είναι και η διάκριση των τριών ειδών από το στάδιο του αυγού με τη χρήση μορφομετρικών χαρακτηριστικών μια και τα αυγά τους παρουσιάζουν εξαιρετική ομοιότητα. Πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της πρωτοδιάταξης περιοχής του κυτοχρώματος b του μιτοχονδριακού DNA μεγέθους 310 βάσεων σε 84 δείγματα που καλύπτουν μεγάλο εύρος της εξάπλωσης των τριών ειδών και αποκαλύφθηκε η ύπαρξη χαρακτηριστικών ειδο-ειδικών θέσεων: 8 νουκλεοτιδικές θέσεις επιτρέπουν το διαχωρισμό του *T. trachurus* από το *T. mediterraneus*, 6 του *T. trachurus* από το *T. picturatus* και 4 του *T. picturatus* από το *T. mediterraneus*. Ακολουθώντας, με βάση τις ειδο-ειδικές θέσεις επιλέχθηκαν κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού οι οποίες δίνουν χαρακτηριστικά ειδο-ειδικά πρότυπα, επιτρέποντας τη διάκριση των τριών ειδών. Παράλληλα, ενισχύθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) το πυρηνικό γονίδιο 5S rRNA το οποίο εμφανίζεται με τη μορφή πολλαπλών αντιγράφων στο γονιδίωμα. Το γονίδιο αυτό αποτελείται από μια συντηρητική περιοχή 120 βάσεων και συνδέεται με μια μη μεταγραφόμενη περιοχή ποικίλου μεγέθους και υψηλού μεταλλακτικού ρυθμού. Έλεγχος της ενισχυμένης περιοχής σε πηκτή αγαρόζης, αποκάλυψε την ύπαρξη τριών διαφορετικών προτύπων χαρακτηριστικών για κάθε είδος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν δύο διαφορετικές DNA προσεγγίσεις ικανές να διακρίνουν τα τρία είδη του γένους *Trachurus*. Η μεθοδολογία είναι χρήσιμη στον υπολογισμό της βιομάζας και την εξακρίβωση της εμπορικής νοθείας.

Το πρόγραμμα χρηματοδοτήθηκε από την Ε. Ε.: QLKS-CT 1999-01157

IDENTIFICATION OF THREE SPECIES OF THE GENUS *Trachurus* BASED ON MITOCHONDRIAL AND NUCLEAR DNA MARKERS

**Karaiskou, N., Triantafyllidis, A., Apostolidis, A.P., Kouvatsi, A., and
C. Triantafyllidis**

Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Aristotle
University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Macedonia, Greece
Tel. 031 0998309, Fax 031 0998374, e-mail: triant@bio.auth.gr

The genetic identification of three species of the genus *Trachurus* (*T. trachurus*, *T. mediterraneus* and *T. picturatus*) present in European Waters is investigated in the present study. The morphological identification of the three species relies, mainly, on the terminal point of the dorsal accessory of the lateral line. However, similarities of specific traits and overlapping of their respective habitats makes their identification difficult, especially when dealing with young juveniles as morphological features cannot be easily distinguished. The identification becomes even more difficult for the early stages of eggs, because all three species have eggs similar to horse mackerel. Sequence analysis of a 310bp segment of the cytochrome b of the mtDNA was performed in 84 individuals of all three species of the genus with broad geographical distribution and species-specific positions were revealed: 8 positions allow distinguishing *T. trachurus* from *T. mediterraneus*, 6 *T. trachurus* from *T. picturatus* and 4 *T. picturatus* from *T. mediterraneus*. Based on these species-specific positions, restriction enzymes were selected that generated species-specific patterns. Thus, a simple species-specific digestion could be used for the discrimination of the three *Trachurus* species. Simultaneously, PCR amplification of the nuclear 5S rRNA multi-copy gene was also performed. In higher eukaryotes, the 5S gene codes for a highly conserved 120bp rRNA and is associated with a nontranscribed intergenic spacer with various sizes and rapid base substitution rates. The amplification of the nuclear 5S rRNA gene revealed that each of the three species gave its own pattern in agarose gel producing bands of different length and hence mobility. The results so far provide a double DNA approach capable of distinguishing the three species of the genus *Trachurus*, which is important for fish stock biomass estimation and the detection of commercial fraud.

This study was supported by the EU: QLKS-CT 1999-01157

ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Καραμπάτσου Α., Νικολακοπούλου Θ. και Α. Δ. Καραγκούνη

Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 157 81 Πανεπιστημιούπολη, Αθήνα

Οι τετρακυκλίνες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τα τελευταία 40 χρόνια σαν θεραπευτικοί παράγοντες στην Ιατρική, όπως επίσης σαν παράγοντες αύξησης και προφύλαξης στην κτηνοτροφία. Η εκτενής αυτή χρήση προκάλεσε τη γρήγορη διασπορά των γονιδίων ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη σε πληθυσμούς βακτηρίων. Μελέτες υποστηρίζουν ότι η διασπορά τους σχετίζεται με κινητά γενετικά στοιχεία, κυρίως πλασμίδια, που είναι κοινά μεταξύ των βακτηρίων και μπορεί εν μέρει να οφείλεται σε οριζόντια μεταφορά μέσω πλασμιδίων. Οι μελέτες που έχουν γίνει στο φυσικό περιβάλλον σχετικά με την κυριαρχία και τη διασπορά τους είναι περιορισμένες.

Ο σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της διασποράς γονιδίων των βακτηρίων με ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη σε θαλάσσια δείγματα νερού από 4 διαφορετικά σημεία: εκβολή αγωγού βιολογικού καθαρισμού Ψυπάλειας (κόλπος Σαρωνικού), ιχθυοτροφείο στην ανατολική Πελοπόννησο, Εύβοια (Ερέτρια) και νήσια Φλέβες (κόλπος Σαρωνικού). Από δείγματα θαλάσσιου νερού, απομονώθηκαν βακτήρια σε στερεό θρεπτικό μέσο παρουσία τετρακυκλίνης. Τα βακτήρια ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση FAME. Κυρίαρχο είδος το *Stenotrophomonas maltophilia* που απομονώθηκε και από τα 4 σημεία δειγματοληψίας. Καθαρές καλλιέργειες των βακτηρίων ελέγχθησαν για την παρουσία πλασμιδίων και γονιδίων ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη. Με βάση γνωστές αλληλουχίες γονιδίων ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη σχεδιάστηκαν μόρια-εκκινητές και δημιουργήθηκαν ανιχνευτές. Για την ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη πραγματοποιήθηκαν δοκιμές PCR και υβριδισμοί κατά Southern. Η παρούσα προσέγγιση έδωσε τη δυνατότητα εκτίμησης της επίδρασης του ανθρώπου στη διασπορά των ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηρίων στη φύση, καθώς επίσης και στη φυσική επιλογή τους.

DISSEMINATION OF TETRACYCLINE RESISTANCE BACTERIA IN GREEK MARINE ECOSYSTEMS

Karabatsou, A., Nikolakopoulou, T., and A.D. Karagouni

Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, 15784, Panepistimioupolis, Athens

Tetracyclines have been widely used for the last 40 years as therapeutical agents in medicine, as well as growth promotor and for prophylaxis in animal husbandry. This extensive use has provoked the rapid dissemination of tetracycline resistance genes in bacterial populations. Research has shown that their distribution is related to mobile genetic elements, especially plasmids, which are very common among bacteria and can be partly attributed to plasmid – mediated horizontal transfer. Their dominance and distribution in environmental habitats has received minor attention.

The aim of this work was to examine the distribution of bacterial tetracycline resistance determinants, isolated from sea-water samples from 4 different environmental habitats: outflow of the wastewater treatment plant in Psittalia (Saronikos Gulf), fishfarm in the eastern Peloponnese, Evia Island (Eretria), Fleves Island (Saronikos Gulf). From these samples bacteria were isolated on solid media with the addition of tetracycline. The bacteria were identified by FAME analysis. The dominant strain was *Stenotrophomonas maltophilia* that was isolated from all 4 sampling sites. Pure bacterial cultures were screened for the presence of plasmids and tetracycline resistant genes. Based on published sequence information of known resistance genes, primers and generated probes were designed. For the detection of tetracycline resistance genes, PCR tests, confirmed by Southern hybridizations, were performed. The present approach enables to assess the impact of human activities on the selection and distribution of antibiotic resistant bacteria in nature.

ΕΡΕΤΡΙΑ Η ΠΟΛΗ ΤΩΝ ΑΕΙΝΑΥΤΩΝ ΚΑΙ Η ΔΙΑΧΡΟΝΙΚΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ

Αμαλία, Αν. Καραπασχαλίδου, Έφορος Αρχαιοτήτων

ΙΑ' Εφορεία Προϊστορικών & Κλασικών Αρχαιοτήτων, Αρχαιολογικό Μουσείο Χαλκίδας

Ερέτρια ή Αρότρια ή Μελανής ή η πόλη των Αειναυτών όπως αποκαλείται, είναι η πόλη που πρωτοστάτησε στα πολιτιστικά, πολιτικά, εμπορικά και ναυτικά δρώμενα, με τη μητρόπολη της Εύβοιας, τη Χαλκίδα.

Η παρουσία της είναι αδιάλειπτη και δυναμική, από την πολύ πρώιμη Αρχαιότητα, μέχρι σήμερα. Γνωστή και σημαντική η συμμετοχή της στον Ευβοϊκό αποικισμό μαζί με την Χαλκίδα και άλλες Ευβοϊκές πόλεις. Η περίοδος θαλασσοκρατίας της πόλης τοποθετείται μεταξύ 505-490 π.Χ. Μαζί δε με τις άλλες τρεις μεγάλες ευβοϊκές πόλεις, τη Χαλκίδα, την Ιστιαία και την Κάρυστο, κόβει νομίσματα. Το εύφορο Ληλάντιο πεδίο στάθηκε αφορμή για πολεμικές συρράξεις μεταξύ των Ερετριέων και των Χαλκιδέων, που είχαν μεγάλη διάρκεια. Οι μελετητές δεν συμφωνούν για το ποιος ήταν ο νικητής. Η επικρατέστερη άποψη είναι νικήτρια ήταν η Χαλκίδα. Η μεγάλη καταστροφή της Ερέτριας συνέβη στην εποχή των Μηδικών πολέμων, από τους Πέρσες, οι οποίοι την τιμώρησαν, διότι βοήθησε στην Ιωνική επανάσταση συμμετέχοντας με πέντε πλοία. Τότε υπέστη μεγάλη φθορά ο ναός του Δαφνηφόρου Απόλλωνα, τα δημόσια κτήρια, οι κατοικίες και τα ιερά της. Στην Ερέτρια έζησε και έδρασε ο γνωστός φιλόσοφος Μενέδημος, ο οποίος ίδρυσε και την ομώνυμη Φιλοσοφική Σχολή. Ο Μενέδημος ακόμη διατηρούσε καλές σχέσεις με τους βασιλικούς Μακεδονικούς οίκους.

Το αρχαίο θέατρο της πόλης που είχε οικοδομηθεί σε τεχνητό λόφο (μοναδική ιδιομορφία) σε ακέραια συνοικία και προοριζόταν για 6.300 θεατές. Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν ασβεστολιθικός πωρόλιθος. Το θέατρο καταστράφηκε το 198 π.Χ. από τον Ρωμαίο Λεύκιο Μόμμιο, όπως άλλωστε και ολόκληρη η πόλη και ανοικοδομήθηκε πάλι αλλά πτωχότερο. Εντός των τειχών αναπτύχθηκε η πόλη με τα παντός είδους κτίσματα και το εμπορικό της κέντρο, δηλαδή την αγορά με τα στωϊκά κτίσματα μεταξύ του λιμανιού και του ναού του Δαφνηφόρου Απόλλωνα. Τα νεκροταφεία της εντοπίζονται εκτός των τειχών της πόλης, τα οποία ήταν ιδιαίτερα εκτεταμένα. Στην Ερέτρια και την περιφέρειά της, αλλά και στη Χαλκίδα απαντάται ο γνωστός ως μακεδονικού τύπου τάφος, ο οποίος υποδηλώνει τη Μακεδονική παρουσία στην περιοχή.

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΝΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA (mtDNA) ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ
*Bactrocera oleae***

**Καρπουχτσής, Ι., Νικολαΐδης, Ν., Δροσοπούλου, Ε., Μαυραγάνη-
Τσιπίδου, Π. και Ζ.Γ. Σκούρας**

Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών
Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 541 24 Θεσσαλονίκη

Το έντομο *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*), ο «δάκος της ελιάς», θεωρείται ένα από τα πλέον βλαβερά έντομα, αφού προκαλεί τεράστιες καταστροφές στην ελαιοπαραγωγή σε όλες τις μεσογειακές χώρες. Η μελέτη του εντόμου αυτού σε διάφορα επίπεδα και κυρίως στο μοριακό, μπορεί να δώσει σημαντικά στοιχεία για την καταπολέμησή του. Η παρούσα εργασία, που αποτελεί μέρος μιας γενικότερης προσπάθειας ανάλυσης και χαρτογράφησης του γονιδιώματος του δάκου, επικεντρώνεται στην ανάλυση ενός τμήματος του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA).

Ολικό mtDNA απομονώθηκε από νύμφες του εργαστηριακού στελέχους του *B. oleae* εφαρμόζοντας τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Pissios and Scouras (1992), με μικρές τροποποιήσεις. Μετά από πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού *HaeIII* απομονώθηκε ένα τμήμα mtDNA μεγέθους περίπου 4000 βάσεων, το οποίο κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEM-T Easy και προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του. Από την ανάλυση βρέθηκε ότι το τμήμα αυτό περιέχει τις ακολουθίες που κωδικοποιούν για το μικρό ριβοσωμικό rRNA, το μεγάλο ριβοσωμικό rRNA, την Ndh-U2, 5 διαφορετικά tRNAs, καθώς επίσης και την περιοχή έναρξης της αντιγραφής του μιτοχονδρίου (AT rich region). Ολόκληρη η ακολουθία παρουσιάζει ποσοστό ομοιότητας 82% με την αντίστοιχη του εντόμου *Ceratitis capitata*. Με βάση δεδομένα για την συγκεκριμένη περιοχή του mtDNA συζητούνται οι φυλογενετικές σχέσεις ειδών της οικογένειας *Tephritidae* και άλλων δίπτερων.

ISOLATION AND ANALYSIS OF A MITOCHONDRIAL DNA (mtDNA) FRAGMENT OF THE INSECT *Bactrocera oleae*

**Karpouhtsis, I., Nikolaidis, N., Drosopoulou, E., Mavragani-Tsipidou,
P., and Z.G. Scouras**

Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Faculty of
Sciences, Aristotle University (AUTH), 541 24 Thessaloniki

Bactrocera oleae (*Dacus oleae*) is included among the insect species of great economic importance for all Mediterranean countries due to the losses of the olive fruit crops. The knowledge of the biology of the insect, especially at the molecular level, could provide substantial help for its control. The present study is a part of a general attempt on analyzing and mapping its genome and it focuses on the analysis of the mitochondrial DNA (mtDNA).

Total mtDNA from pupae of the standard laboratory *B. oleae* population was isolated, according to the protocol described by Pissios and Scouras (1992). A 4 kb *HaeIII* fragment was cloned into the pGEM-T Easy vector and sequenced. The results showed that the clone includes the sequences of the large rRNA, the small rRNA, the Ndh-U2, 5 different t-RNAs, as well as the AT rich region (the replication origin). The analysed fragment presents 82% similarity with the respective region of the *Ceratitidis capitata* mtDNA. The phylogenetic relationships among several species of the *Tephritidae* family and other diptera are discussed.

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ
ΟΛΟΚΛΗΡΟΥ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ
ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΑΣΤΑΚΟΚΑΡΑΒΙΔΑΣ (*H. gammarus* L.)**

**Κατσαρές, Β., Τριανταφυλλίδης, Α., Αποστολίδης, Α.Π., Κουβάτση, Α.
και Κ. Τριανταφυλλίδης**

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

Τηλ. 031 0998309, Fax 031 0998374, e-mail: triant@bio.auth.gr

Η Ευρωπαϊκή αστακοκαραβίδα (*Homarus gammarus*) αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά από οικονομική άποψη θαλάσσια είδη. Παρόλη την τόσο μεγάλη οικονομική της σημασία, ελάχιστες πληροφορίες υπάρχουν στη βιβλιογραφία όσον αφορά στο μιτοχονδριακό της γονιδίωμα. Είναι γνωστό ότι το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο (με ελάχιστες εξαιρέσεις). Το μέγεθός του, στα ζώα, κυμαίνεται συνήθως από 14 έως 17 kb. Η μητρική του κληρονόμηση (με ελάχιστες εξαιρέσεις), η απλοειδής του φύση και ο γρηγορότερος ρυθμός εξέλιξης, σε σύγκριση με το πυρηνικό DNA, είναι μερικά από τα χαρακτηριστικά που το καθιστούν έναν από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους μοριακούς δείκτες για πληθυσμιακές γενετικές αναλύσεις. Η χρήση του mtDNA έχει βελτιστοποιηθεί με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Επιπλέον, με την τεχνική της long-PCR κατέστη δυνατή η ενίσχυση πολύ μεγάλων τμημάτων του mtDNA, αλλά ακόμη και ολόκληρου του μιτοχονδριακού γονιδιώματος σε μερικούς οργανισμούς. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να παρακαμφθεί η εξαιρετικά χρονοβόρα και επίπονη απομόνωση του μιτοχονδριακού DNA. Έχουν σχεδιαστεί ήδη στο εργαστήριό μας τέσσερα ζεύγη εκκινήτων που επιτρέπουν με την τεχνική της PCR την ενίσχυση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος της Ευρωπαϊκής αστακοκαραβίδας σε τέσσερα μεγάλα τμήματα. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιώντας δύο από τους εκκινήτες αυτούς και την τεχνική της long-PCR, ενισχύθηκε ολόκληρο το μιτοχονδριακό γονιδίωμα της Ευρωπαϊκής αστακο-καραβίδας. Το εκτιμώμενο μέγεθος ανταποκρίνεται στο άθροισμα των μεγεθών των προηγούμενων τεσσάρων τμημάτων. Μέχρι σήμερα ενίσχυση ολόκληρου του μιτοχονδριακού γονιδιώματος αναφέρεται μόνο στον άνθρωπο, σε εντομοφάγα θηλαστικά, σε δύο πρωτοστόματα σκουλήκια και σε τέσσερα αρθρόποδα.

Το πρόγραμμα χρηματοδοτήθηκε από την Ε. C. (FAIR CT98-4266)

DEVELOPMENT OF PRIMERS FOR THE AMPLIFICATION OF THE WHOLE MITOCHONDRIAL GENOME OF THE EUROPEAN LOBSTER (*H. gammarus* L.)

Katsares, V., Triantafyllidis, A., Apostolidis, A.P., Kouvatsi, A., and C. Triantaphyllidis

Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology,
Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Macedonia, Greece
Tel. 031 0998309, Fax: 031 0998374, E-mail: triant@bio.auth.gr

The European clawed lobster (*Homarus gammarus*) is one of the most commercially important marine species. However, very little information is available for its mitochondrial genome (mtDNA). The mitochondrial genome of multicellular animals consists of a circular DNA molecule (with few exceptions). Its usual size ranges from 14 to 17 kb. Because of its maternal inheritance, haploid nature, smaller effective size (one fourth of the nuclear DNA), and rapid rate of evolution, mtDNA has many advantages as a marker for phylogenetic analyses, and is one of the most frequently used markers in molecular systematics. The use of mtDNA has been facilitated by the advent of PCR. Furthermore, after the development of long-PCR, amplification of very large segments, even full-length mtDNA has been reported for few organisms. Isolation of mtDNA by conventional methods, which are laborious and time-consuming, can be circumvented that way. Four primer sets, which enable the amplification of the mtDNA genome of the European lobster in four large segments, had already been designed in our laboratory. In this study, using two of these and the long-PCR technique, the whole mitochondrial genome of the European lobster has been amplified in one-step. The size of the whole mtDNA corresponds to the sum of the sizes of the four mtDNA segments. Heretofore, one-step full-length mtDNA has been reported only for human, Armadillos, two protostom worms and four arthropods.

This study was supported by the E. C. (FAIR CT 98-4266).

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΞΙΚΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

Κατσίβελα Ε.

Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Πολυτεχνειούπολη, 73100 Χανιά,
E-mail: ekatsive@mred.tuc.gr

Η επεξεργασία τοξικών αποβλήτων με βιολογικές μεθόδους πραγματοποιείται με την χρήση του μεταβολικού δυναμικού των μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν όχι μόνο μία τεράστια μεταβολική ποικιλότητα, αλλά έχουν την ικανότητα να αναπροσαρμόζονται στο περιβάλλον και να αναπτύσσουν νέες καταβολικές ιδιότητες μεταβολίζοντας πολλές διαφορετικές ξενοβιοτικές ενώσεις. Συχνά η ικανότητα αποικοδόμησης ξενοβιοτικών ενώσεων σε μικροοργανισμούς κερδίζεται κάτω από συνθήκες επιλεκτικής πίεσης και μετά από μεταλλαγή του γενετικού τους υλικού. Η ικανότητα αποικοδόμησης ξενοβιοτικών ενώσεων είναι κωδικοποιημένη σε πλασμίδια ή στο χρωματόσωμα των μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί, που λαμβάνουν μέρος στις βιολογικές μεθόδους επεξεργασίας τοξικών αποβλήτων, αποικοδομούν τους ρυπαντές χρησιμοποιώντας τους σαν πηγή άνθρακα, αζώτου, θείου ή φωσφόρου. Το μικροβιακό κύτταρο καταβόλιζει τις τοξικές ουσίες μέσω βιοχημικών μονοπατιών, που καταλήγουν συνήθως σε βασικούς κεντρικούς μεταβολίτες όπως οργανικά οξέα που μπαίνουν στον κύκλο του Krebs. Τα τελικά παραγόμενα προϊόντα των βιολογικών μεθόδων επεξεργασίας ξενοβιοτικών ενώσεων είναι διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), νερό (H₂O) και βιομάζα. Έτσι η βιολογική αποικοδόμηση τοξικών ουσιών διαφαίνεται σαν η πιο εναρμονισμένη μορφή κατεργασίας τοξικών αποβλήτων σε σχέση με άλλες ευρέως διαδεδομένες εναλλακτικές μορφές επεξεργασίας (π.χ. καύση ή υγειονομική ταφή) χωρίς να δημιουργεί πρόσθετα προβλήματα ρύπανσης του περιβάλλοντος και με χαμηλότερο κόστος. Η ομιλία θα αναφερθεί στη βιοεξυγίανση, στο βιοαερισμό και στη φυτοεξυγίανση εδαφών και υπογείων υδάτων. Επίσης θα περιγραφούν τα βιοχημικά μονοπάτια αποικοδόμησης αρωματικών ενώσεων, πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, πολυχλωριωμένων διφαινυλίων και διβενζο-π-διοξινών.

- B. Γκέκας, Ν. Φραντζεσκάκη, Ε. Κατσίβελα, Τεχνολογίες Επεξεργασίας Τοξικών και Επικίνδυνων Αποβλήτων, 2002. Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.
G. R. Chaudhry, Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals, 1994, Dioscorides Press, Portland, Oregon

BIOLOGICAL TREATMENT OF TOXIC WASTES

Eleftheria Katsivela

Technical University of Crete, Department of Environmental Engineering,
Polytechniupolis, GR-73100 Chania, E-mail: ekatsive@mred.tuc.gr

The biological treatment of toxic wastes uses the metabolic potential of the microorganisms. Microorganisms exhibit a fascinating metabolic diversity as well as the ability to evolve new catabolic properties rapidly for the degradation of several xenobiotics. The ability of degradation of xenobiotic compounds by microorganisms is often attained under conditions of selective pressure and after changes at the genetic level. The genes responsible for the degradation of xenobiotics is encoded on plasmids or on the chromosome. The microbial cell utilizes xenobiotic compounds as sources of carbon, nitrogen, sulfur, or phosphorus, and it is often necessary to convert the compounds to normal intermediates of central metabolism, chiefly organic acids that can enter the Krebs cycle. The final products of the biological treatment of xenobiotic compounds are carbon dioxide (CO₂), water (H₂O) and biomass. Thus, the biological degradation of toxic compounds emerges as the most promising environmental approach to treat toxic wastes. Currently available approaches to the pollution problem such as incineration or excavation and storage are expensive, inefficient, and lead to additional problems. This paper will present the bioremediation, the bioventing and the phytoremediation of contaminated soils and ground water. An overview of the biochemical pathways of degradation of aromatic compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and dibenzo-p-dioxins will be given.

ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΜΕ ΑΝΟΣΟ-ΕΝΙΣΧΥΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΠΟ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Κατσούλας, Χ., Τσιτσιλώνη, Ο., Παναγιώτου, Γ.¹, Μπεκρής, Σ., Μαργωμένου, Λ., Τσιατάς, Μ., Κάκουλλου, Ν., Μπαξεβάνης, Κ., Παπαμιχαήλ, Μ.

Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου, Νοσοκομείο "Αγ. Σάββας", Λεωφ. Αλεξάνδρας 171, 11522 και Ίνστιτούτο «Αλέξανδρος Φλέμιγκ», Αθήνα

Υπερκείμενα πλούσια σε κυτταροκίνες (ACD3S) που παράγονται μετά από ενεργοποίηση λεμφοκυττάρων με αντι-CD3, περιέχουν κυτταροενισχυτικούς παράγοντες. Προκειμένου να προσδιοριστούν και να χαρακτηριστούν οι υπεύθυνες για αυτή τη δράση λεμφοκίνες (γνωστές ή/και καινούργιες) δοκιμάσαμε στις καλλιέργειες το ελεύθερο πρωτεϊνών καλλιεργητικό υλικό PFHM. Το ACD3S που παρήχθει, παρουσίασε ανάλογη επαγωγή της κυτταρολυτικής ικανότητας ετερόλογων PBMC έναντι NK-ευαίσθητων κυττάρων-στόχων σε σχέση με υπερκείμενα που παρήχθησαν χρησιμοποιώντας τα RPMI-10%FCS ή AIM-V θρεπτικά υλικά. Η επαγωγική ικανότητα εστιάστηκε κυρίως στα CD3⁺CD56⁺ (NK) κύτταρα, τα οποία δοκιμάστηκαν είτε πριν είτε μετά από τρίωρη επώαση με το ACD3S. Μετά την προτυποποίηση των βέλτιστων συνθηκών παραγωγής ACD3S, λεμφοκύτταρα από πολλούς φυσιολογικούς δότες ενεργοποιήθηκαν για 3 ημέρες, τα παραχθέντα ACD3S και τα αντίστοιχα ACS (δηλ. υπερκείμενα παραχθέντα απουσία αντι-CD3) συλλέχθηκαν, συμπυκνώθηκαν σε σύστημα υπερδιήθησης Amicon, αφαλατώθηκαν, κατακρημνίστηκαν με ακετόνη και διαχωρίστηκαν σε σύστημα ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων (2-DE). Περιοχές (spots) του ACD3S προτύπου με εντονότερη χρώση κόπηκαν, τρυψινοποιήθηκαν και πρόκειται να διαχωριστούν σε τριχοειδικό σύστημα HPLC συνδεδεμένο με ion-spray φασματογράφο μάζας. Παράλληλα, συμπυκνωμένο ACD3S κλασματώθηκε σε στήλη MonoQ. Τα κλάσματα ελέχθησαν και οι περιοχές με αυξημένη κυτταροτοξικότητα επιλέχθησαν για περαιτέρω ανάλυση με RP-HPLC. Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή συνεργιστική δράση γνωστών κυτταροκινών που εμπεριέχονται στο ACD3S, οι ιντερλευκίνες-12, -15, -18, -2, -21, -17 και -1β εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα επαγωγής αυξημένης κυτταροτοξικότητας λεμφοκυττάρων. Καμία από τις παραπάνω ή συνδυασμοί τους δεν υποκαθιστούν πλήρως την σε τρεις μόνο ώρες επαγόμενη κυτταροτοξική ικανότητα του ACD3S.

PROTEOMIC ANALYSIS OF AGENTS WITH CYTO-TOXICITY- ENHANCING PROPERTIES FROM ACTIVATED-LYMPHOCYTE SUPERNATANTS

Katsoulas, H.L., Tsitsilonis, O.E., Panayiotou, G.¹, Bekris, S., Margomenou, L., Tsiatas, M.L., Cacoullou, N.T., Baxevanis, C.N., and M. Papamichail

Cancer Immunology and Immunotherapy Center, St. Savas Cancer Hospital, 171 Alexandras Ave, 11522 and ¹B.S.R.C. «Alexander Fleming», Athens, Greece

Cytokine-rich supernatants (termed ACD3S) generated upon lymphocyte stimulation with anti-CD3 monoclonal antibody contain agents with cytotoxicity-enhancing properties. To reveal and consequently characterize known and/or novel lymphokines responsible for the observed effect, we performed a series of experiments using the protein free culture medium PFHM. ACD3S thus produced, induced the same cytolytic effect on allogeneic PBMC vs NK-sensitive targets as supernatants generated using RPMI-10% FCS or AIM-V culture media. This effect was more pronounced on CD3⁺CD56⁺ (NK) cells, isolated from total PBMC either prior to or after the 3-hour incubation with ACD3S. Following standardization of optimal conditions for ACD3S production, activated lymphocytes from various normal donors were cultured for 3 days, the produced ACD3S and the respective ACS (i.e. supernatant generated in the absence of anti-CD3) were harvested, concentrated by Amicon ultrafiltration, desalted, acetone-precipitated and separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE). Spots of sufficient staining intensity from ACD3S gels were excised, in-gel digested with trypsin and will be subjected to capillary HPLC combined with ion-spray Mass Spectrometry analysis. In parallel, concentrated ACD3S was fractionated on a Mono-Q column. Fractions were screened using a standard cytotoxicity assay and areas that retained the activity of the ACD3S were selected for analysis by RP-HPLC. To investigate the putative synergistic effect of substituent cytokine(s) within ACD3S on the induction of enhanced cytotoxicity, interleukins IL-12, IL-15, IL-18, IL-2, IL-21, IL-17, IL-1 β were assayed. We determined that neither one alone nor combinations thereof could fully substitute for ACD3S *per se* upon 3-hour incubation of allogeneic PBMC.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ cDNA ΚΛΩ- ΝΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΙΑΤΗΝ MDH ΚΑΙ ΤΗΝ IDH ΣΤΟ ΛΙΠΩΔΗ ΙΣΤΟ ΤΟΥ ΠΡΟΒΑΤΟΥ (*Ovis aries*)

Κενούτης, Χ.¹, Κατινάκης, Π.² & Ε. Ρογδάκης²

¹Εργαστήριο Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Γ.Π.Α. Ιερά Οδός 75,
Βοτανικός

²Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γ.Π.Α. Ιερά Οδός 75,
Βοτανικός

Η σχέση του προβάτου με τον άνθρωπο ξεκινά πριν 11000 χρόνια περίπου και είναι ένα από τα καλύτερα μελετημένο μηρυκαστικό σε ότι αφορά στην διατροφή και την ηθολογία του. Ωστόσο, ο λιπώδης ιστός του προβάτου καθώς και η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων χρίζουν μελέτης, με απώτερο σκοπό την κατανόηση του μεταβολισμού των λιπιδίων στο λιπώδη ιστό και την βελτίωση των παραγομένων προϊόντων. Στα θηλαστικά ο λιπώδης ιστός αποτελείται από στρώσεις λιποκυττάρων που περιβάλλονται από ίνες κολλαγόνου και εμπεριέχει νεύρα, αιμοφόρα αγγεία και τα συνήθη χαρακτηριστικά των κυττάρων του συνδετικού ιστού. Υπάρχουν δύο τύποι λιπώδους ιστού: α) ο λευκός ο οποίος στο πρόβατο αναπτύσσεται υποδόρια, περιμυϊκά και ενδομυϊκά, περινεφρικά, μεσεντέρια, πλευρικά και σε μικρότερο ποσοστό περικαρδικά και β) ο φαιός ο οποίος αναπτύσσεται κατά την γέννηση του προβάτου και στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια είναι ο μοναδικός τύπος ιστού που παρατηρείται και σταδιακά αντικαθίσταται από τον λευκό. Ο μεταβολισμός των λιπιδίων στο λιπώδη ιστό των μηρυκαστικών έχει προκαλέσει το επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω των διαφορών που παρατηρούνται κυρίως στην βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων μεταξύ των μονογαστρικών και των πολυγαστρικών ζώων αλλά και λόγω της μεγάλης σημασίας του λίπους για την ποιότητα του σφαγίου και του παραγόμενου γάλακτος. Ένα από τα ένζυμα που έχουν σημαντικό ρόλο στην βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων είναι η κυτταροπλασματική NADP-Ισοκιτρική αφυδρογονάση. Η μηλική αφυδρογονάση έχει ενεργό ρόλο στην βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων στα θηλαστικά ενώ συμμετέχει σε πολύ μικρό ποσοστό και στο αντίστοιχο μονοπάτι των μηρυκαστικών. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων στο λιπώδη ιστό του προβάτου σε μοριακό επίπεδο. Ειδικότερα, απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν οι cDNA κλώνοι που κωδικοποιούν για τα ένζυμα κυτταροπλασματική μηλική αφυδρογονάση και κυτταροπλασματική NADP-Ισοκιτρική αφυδρογονάση.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF cDNA CLONES CODING FOR MDH AND IDH FROM SHEEP (*OVIS ARIES*) ADIPODE TISSUE

Kenoutis, Ch.A.¹, Katinakis, P.² and E. Rogdakis¹

¹Laboratory of Animal breeding, Dept. of Animal production, Agric. University of Athens, Iera Odos 75, Botanikos

²Laboratory of Molecular Biology, Dept. of Agricultural Biotechnology, Agric. University of Athens, Iera Odos 75, Botanikos

The sheep is one of the first farm animals being used for over 11000 years and one of the ruminants whose breeding and ethology has been better studied. Nevertheless, better understanding of the lipid metabolism and subsequent improvement of produce, requires further study of the adipose tissue and fatty acid biosynthesis. In mammals the adipose tissue is consisting of adipocyte layers surrounded by collagen and contains nerves and blood vessels. There are two types of adipose tissue: a) the white, developed subcutaneously, intramuscularly perirenally, and pericardially and b) the brown, the only one present during the early developing stages of the sheep. Progressively it is replaced by the white. There is scientific interest on the lipids metabolism of the ruminants adipose tissue due to the differences between the fatty acids biosynthesis in ruminants and other mammals and the important role that the fat has in the quality of the carcass and milk. The cytoplasmic NADP-isocitrate dehydrogenase is one of the most important enzymes in fatty acid biosynthesis. The malate dehydrogenase has an important role in fatty acids biosynthesis in other mammals but a minor role in the same pathway in ruminants. Here we report a fatty acids biosynthesis study in sheep adipose tissue on a molecular base. Specifically, the cDNA clones that code for the cytoplasmic NADP-isocitrate dehydrogenase and the malate dehydrogenase were isolated from sheep adipose tissue and characterized via Southern and Northern analysis.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ MAPKs ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΑΣΠΟΝΔΥΛΟ *Mytilus galloprovincialis*

Κεφαλογιάννη, Ε., Γαϊτανάκη, Κ., Μαρμάρη, Α. και Ι. Μπέης

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 157 84, Αθήνα.

Μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων στρεσογόνων συνθηκών στην ενεργοποίηση των υποοικογενειών των εξαρτώμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (MAPKs), στο μανδύα του *M. galloprovincialis*. Κατά την αναεροβίωση παρατηρήθηκε γρήγορη (15^ο λεπτό) ενεργοποίηση της p38-MAPK, η οποία διατηρήθηκε όσο χρόνο διήρκεσε το ερέθισμα. Κατά την επαναφορά στις αερόβιες συνθήκες, μετά από αναεροβίωση για 15 λεπτά, παρατηρήθηκε αρχικά αύξηση της ενεργοποίησης της κινάσης και στη συνέχεια μείωσή της στα επίπεδα του μάρτυρα, μετά από περίπου μία ώρα. Το υπερωσμωτικό στρες (0,5M σορβιτόλης), προκάλεσε έντονη και παρατεταμένη φωσφορυλίωση της p38-MAPK με μέγιστο στο 15^ο λεπτό (περίπου 9,4 φορές σε σχέση με το μάρτυρα). Αντίθετα, το υποωσμωτικό στρες (50% θαλασσινό νερό) προκάλεσε σταδιακή αύξηση της φωσφορυλίωσης της κινάσης με το χρόνο, που παρουσίασε μέγιστο στο 30^ο λεπτό (περίπου 6,9 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) ενώ μετά από δύο ώρες παρατηρήθηκε επαναφορά στα επίπεδα του μάρτυρα, αποτέλεσμα που υποδηλώνει αντιστρεπτή δράση. Από την άλλη πλευρά, το οξειδωτικό στρες (5μM H₂O₂) προκάλεσε έντονη ενεργοποίηση της p38-MAPK (περίπου 8,5 φορές σε σχέση με το μάρτυρα). Σε όλες τις παραπάνω συνθήκες δεν παρατηρήθηκε αύξηση της φωσφορυλίωσης της υποοικογένειας των ERKs σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ επίσης δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της υποοικογένειας των JNKs. Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν για πρώτη φορά ότι παρά τις τεράστιες διαφορές στη φυσιολογία των ασπονδύλων, το περιβαλλοντικό στρες προκαλεί ενεργοποίηση των υποοικογενειών ERKs και p38-MAPKs, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να φωσφορυλιώνουν άλλα ενδοκυτταρικά υποστρώματα με σκοπό τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης.

Το ερευνητικό έργο χρηματοδοτήθηκε από το Εμπειρικό Ίδρυμα Αθηνών

**ENVIRONMENTAL STRESS AND MAPKs IN MARINE
INVERTEBRATE *Mytilus galloprovincialis***

Kefalogianni, E., Gaitanaki, C., Marmari, A., and I. Beis

Dept. of Animal & Human Physiology, School of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis
157 84 Athens, Greece

The effect of various stressful conditions on the activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) subfamilies in *M. galloprovincialis* mantle muscle was studied. During anoxia an immediate (at the 15th min) p38-MAPK phosphorylation (hence activation) was observed that remained elevated for at least 12 hours. During reoxygenation followed a 15 min anoxia period, an initial further activation of the kinase was observed, gradually decreasing thereafter to the control levels. Hyperosmotic stress (0.5 M of sorbitol) induced an intense and sustained p38-MAPK phosphorylation reaching a maximal value at the 15th min (~9.4-fold relative to control values). On the contrary, hypoosmotic stress (50% v/v sea-water) induced a gradual increase of p38-MAPK phosphorylation with a maximal value been attained at the 30th min (~6.9-fold relative to control values), decreasing thereafter to control levels after 2 hours, a result indicative of the reversible effect of this stressful condition. Furthermore, oxidative stress (5 μ M H₂O₂) induced an intense p38-MAPK activation (~8.5-fold relative to control values). Under the stressful conditions examined no changes of ERK phosphorylation profile were observed, whereas no JNKs' activation was detected. The results of the present study show for the first time that despite the fundamental differences in invertebrate physiology, environmental stress induces ERK and p38-MAPK activation, which in turn may phosphorylate other intracellular substrates in order to achieve cellular homeostasis.

The Empeirikio Foundation of Athens supported this work

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *tra-2* ΣΤΟ ΕΝΤΟΜΟ *Bactrocera oleae*

Κινινής, Μ., Λαγός, Δ.Ι. και Κ. Κομητοπούλου

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Παιπιστήμιο
Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα

Μια ομάδα γονιδίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του φύλου σε πολλά εξελικτικά απομακρυσμένα είδη εντόμων είναι τα γονίδια *Sxl*, *tra*, *tra-2* και *dsx*. Πρώτο στην ιεραρχία είναι το γονίδιο *Sxl* και τελευταίο το *dsx*. Η πρωτεΐνη TRA-2, σε συνεργασία με την πρωτεΐνη TRA που παράγεται μόνο στα θηλυκά άτομα, προσδένεται στο RNA του γονιδίου *dsx* και κατευθύνει το θηλεοειδικό μάτισμα του.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός του ομόλογου γονιδίου *tra-2* στο έντομο *Bactrocera oleae*, που αποτελεί το πρώτο έντομο εκτός της οικογένειας των Δροσοφιλίδων στο οποίο η αλληλουχία του γονιδίου *tra-2* γίνεται γνωστή. Αρχικά, επιλέχθηκε ένας κλώνος από cDNA βιβλιοθήκη χρησιμοποιώντας ως μόριο ανιχνευτή ένα τμήμα RT-PCR. Ανάλυση της πρωτοδιάταξης του κλώνου αυτού μας έδωσε το μεγαλύτερο τμήμα της cDNA αλληλουχίας του γονιδίου *tra-2* στο Δάκο, του παρουσιάζει ομοιότητα 49% σε επίπεδο DNA και 49% σε επίπεδο πρωτεΐνης με το ομόλογο γονίδιο της *D. melanogaster* ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για την *D. virilis* είναι 55% και 48%. Για να αποκαλύψουμε ολόκληρη την γενωμική αλληλουχία του γονιδίου *tra-2* επιλέξαμε τρεις κλώνους από γενωμική βιβλιοθήκη του Δάκου χρησιμοποιώντας ως μόριο ανιχνευτή το τμήμα του cDNA. Η μελέτη των κλώνων αυτών, μετά από ανάλυση κατά Southern, μας έδειξε ότι το μέγεθος του γονιδίου *tra-2* στον Δάκο είναι 3,4 Kb και περιέχει 8 εξώνια. Η οργάνωση αυτή δείχνει αρκετά συντηρημένη κατά τη διάρκεια της εξέλιξης όταν συγκρίνεται με τη δομή στη *D. melanogaster* και ακόμη περισσότερο με τη *D. virilis*.

Στα *Drosophilidae* από το γονίδιο *tra-2* παράγονται εναλλακτικά mRNAs που κωδικοποιούν για τέσσερις διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης TRA-2, μία από τις οποίες είναι αρρενοειδική. Η μελέτη του προτύπου έκφρασης του *tra-2* στο *Bactrocera oleae* με τις μεθόδους RT-PCR και 5' RACE και τη χρήση ειδικών μορίων-εναρκτών βρίσκεται σε εξέλιξη.

Το ερευνητικό έργο χρηματοδοτήθηκε από τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του Παν/μιου Αθηνών ΕΛΚΕ 70/4/5706

CHARACTERIZATION OF THE SEX-DETERMINING GENE *tra-2* IN THE INSECT *Bactrocera oleae*

Kininis, M., Lagos, D.I., and K. Komitopoulou

Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, National & Kapodistrian University
of Athens, Panepistimiopolis 157 84 Athens, Greece

A group of genes that hold significant role in the process of sex determination in many evolutionary diverse insects are the genes *Sxl*, *tra*, *tra-2* and *dsx*. In the top of the hierarchy is the gene *Sxl*, whereas the final target is *dsx*. The protein TRA-2, in cooperation with the protein TRA, which is produced only in females, binds the *dsx* RNA and directs its female-specific splicing pattern.

The object of the present work was the isolation and characterization of the homologous gene *tra-2* in the insect *Bactrocera oleae* (Olive tree Dacus), which is the first insect that does not belong to the *Drosophilidae* family, in which the sequence of the gene *tra-2* is getting known. Firstly, one clone was isolated from the cDNA library of the female Dacus by using as a probe a RT-PCR fragment amplified with conserved, degenerated primers. The sequencing of this clone revealed the nearly full length cDNA sequence of the *tra-2* gene in *Dacus*. Comparison between the *B. oleae* and the *D. melanogaster* homologues showed more than 49% similarity in the DNA level and 49% similarity in the protein level, while between *B. oleae* and *D. virilis* the similarity is 55% and 48% respectively. In order to elucidate the whole genomic sequence of the *tra-2* gene, we isolated three clones from a genomic library of *Dacus* by using as a probe the nearly full-length cDNA sequence. Southern blot analysis of these clones and sequencing showed that the *tra-2* gene in *Bactrocera oleae* is 3,4Kb and consists of 8 exons. This organization pattern seems to be quite conserved during evolution when compared with *D. melanogaster* and even more when compared with *D. virilis*.

In the *Drosophilidae* the *tra-2* RNAs encode four distinct alternative isoforms of the TRA-2 protein, one of which is male-specific. The study of the expression pattern of *tra-2* in the insect *Bactrocera oleae* by using RT-PCR and 5'RACE and specific oligonucleotide-primers is in process.

Supported by the Special Account for Research Grants of Athens University SARG 70/4/5706

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΟΦΟΡΙΚΟΥ DNA ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ, ΧΟΛΗΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ ΚΑΙ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Κοιλάκου, Σ., Σαέττα, Α., Γκουντοπούλου, Α., Μιχαλόπουλος, Ν., Δάβαρης Π.

Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

ΣΚΟΠΟΣ: Α) Η ανίχνευση της αστάθειας του μικροδορυφορικού DNA, ως ένδειξη ανεπάρκειας του συστήματος επιδιόρθωσης MMR (mismatch repair) και ο προσδιορισμός του ποσοστού της παρουσίας της σε καρκινώματα ουροδόχου κύστεως, χοληδόχου κύστεως και σε σποραδικά καρκινώματα παχέος εντέρου στον ελληνικό πληθυσμό και Β) η συσχέτιση της με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων.

ΥΛΙΚΟ – ΜΕΘΟΔΟΙ: Μελετήθηκαν 60 καρκινώματα ουροδόχου κύστεως, 20 καρκινώματα χοληδόχου κύστεως και 97 σποραδικά καρκινώματα παχέος εντέρου, ως προς το μονονουκλεοτιδικό δείκτη μικροδορυφορικής αστάθειας BAT-26 και την poly-A αλληλουχία του *TGF-β RII*. Μετά την απομόνωση του DNA από ιστούς μονιμοποιημένους και εγκλεισμένους σε παραφίνη, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των συγκεκριμένων αλληλουχιών του DNA με τη μέθοδο PCR και ακολούθησε ανίχνευση της μεταβολής του μήκους του δείκτη BAT-26 με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανάλυση του *TGF-β RII* με τη μέθοδο SSCP και sequencing.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Στα καρκινώματα της ουροδόχου κύστεως παρατηρήθηκε μικροδορυφορική αστάθεια στο δείκτη BAT-26 σε ποσοστό 15 % και στον *TGF-β RII* σε ποσοστό 17 %, ενώ στα καρκινώματα της χοληδόχου δεν παρατηρήθηκε μικροδορυφορική αστάθεια σε κανέναν από τους δύο δείκτες. Στα σποραδικά καρκινώματα του παχέος εντέρου ανιχνεύθηκε μικροδορυφορική αστάθεια στο δείκτη BAT-26 σε ποσοστό 12 %. Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε συσχέτιση της μικροδορυφορικής αστάθειας με το βαθμό κακοήθειας, και το στάδιο των νεοπλασμάτων, παρά μόνο, όσον αφορά στα καρκινώματα του παχέος εντέρου, με την εντόπιση στο δεξιό κόλον.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Η μικροδορυφορική αστάθεια φαίνεται να εμπλέκεται στο μηχανισμό της καρκινογένεσης τόσο στο παχύ έντερο όσο και στην ουροδόχο κύστη, ενώ για την αποσαφήνιση του ρόλου της στην καρκινογένεση της χοληδόχου απαιτείται η εξέταση επιπλέον δεικτών.

*Μέρος της παραπάνω έρευνας που αφορά το παχύ έντερο χρηματοδοτήθηκε από τον ΕΛΚΕ

DETECTION OF MICROSATELLITE INSTABILITY IN URINARY BLADDER CARCINOMAS, GALLBLADDER CARCINOMAS AND SPORADIC COLORECTAL CARCINOMAS

Koilakou, S., Saetta A., Goudopoulou, A., Michalopoulos, N., Davaris, P.

Department of Pathology, Medical School, The National and Kapodistrian University of Athens

AIMS: a) To detect the presence of microsatellite instability (MSI) due to an underlying defect in DNA mismatch repair mechanism (MMR) in urinary bladder carcinomas, gallbladder carcinomas and sporadic colorectal carcinomas from Greek patients, and b) To determine any correlation between MSI and the clinicopathological features of the tumors

MATERIALS – METHODS: We examined 60 urinary bladder carcinomas, 20 gallbladder carcinomas and 97 sporadic colorectal carcinomas with regard to BAT-26, a mononucleotide marker, and the poly-A sequence of *TGF- β RII* gene. DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues was amplified using the polymerase chain reaction (PCR) and the alterations in length of BAT-26 were detected by polyacrylamide electrophoresis and silver staining, whereas the alterations of *TGF- β RII* were screened by SSCP and determined by sequencing analysis.

RESULTS: 15% of the carcinomas of the urinary bladder displayed BAT-26 instability and 17% *TGF- β RII* alterations, whereas none of the gallbladder carcinomas displayed instability in either one of the two markers. We observed BAT-26 instability in 12% of the sporadic colorectal carcinomas. A statistical correlation was found between the presence of microsatellite instability and the location at the proximal colon of the sporadic colorectal carcinomas. No correlation was found regarding the grade or the stage of the tumors.

CONCLUSIONS: Microsatellite instability seems to be involved in the mechanisms of colorectal and urinary bladder carcinogenesis, whereas it is necessary to examine additional markers in order to clarify its role in gallbladder carcinogenesis.

* Part of the above study, concerning the colorectal cancer, was funded by ELKE

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΣΜΩΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΦΥΤΟ *Chlorophyton comosum*

Κόμης, Γ., Αποστολάκος, Π., Γαλάτης, Β.

Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 157 84

Στην παρούσα εργασία μελετάται η οργάνωση των μικρονηματίων ακτίνης (MA) κατά τη διάρκεια του πλασμολυτικού κύκλου σε κύτταρα φύλλου του φυτού *Chlorophyton comosum*. Σε όλα τα πλασμολυμένα κύτταρα πραγματοποιείται έντονη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού των MA. Τα λεπτά περιφερειακά MA εξαφανίζονται και σχηματίζονται νέα περιφερειακά, υποπεριφερειακά και ενδοπλασματικά MA οργανωμένα σε δεσμίδες. Οι περιφερειακές δεσμίδες MA εντοπίζονται κυρίως στις συρρικνωμένες περιοχές του πρωτοπλάστη επενδύοντας τις αποκολλημένες περιοχές του πλασμαλήμματος. Οι ενδοπλασματικές δεσμίδες MA εντοπίζονται στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα και στην επιφάνεια του τονοπλάστη. Μέσω ανάλυσης εικόνας διαπιστώθηκε ότι τα πλασμολυμένα κύτταρα διαθέτουν κατά 120% περισσότερα MA σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα.

Αποδιοργάνωση των MA με την επίδραση κυτοχλασίνης Β (CB) επέφερε σημαντικές μεταβολές στο πρότυπο και το χρονοδιάγραμμα της πλασμόλυσης. Η συρρίκνωση του πρωτοπλάστη διαρκούσε περισσότερο χρόνο, ενώ ο τελικός όγκος του πρωτοπλάστη ήταν πολύ μικρότερος σε σχέση με αυτόν των τυπικά πλασμολυμένων κυττάρων. Στα περισσότερα κύτταρα, ο πρωτοπλάστης είχε «αμοιβαδοειδή» μορφή και συχνά υποδιαιρείτο σε υποπρωτοπλάστες.

Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν για πρώτη φορά ότι ο κυτταροσκελετός των MA αγγειοσπέρμων υφίσταται μεταβολές κατά τη διάρκεια της πλασμόλυσης, οι οποίες φαίνεται ότι σχετίζονται με τη ρύθμιση του όγκου και της μορφής του πρωτοπλάστη.

Ο ογκορρυθμιστικός ρόλος των MA πιθανώς σχετίζεται με τον έλεγχο της λειτουργίας καναλιών μεταφοράς ιόντων στο πλασμαλήμμα όπως συμβαίνει στα ζωικά κύτταρα.

Το έργο αυτό χρηματοδοτήθηκε από τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του ΕΚΠΑ

**THE EFFECTS OF HYPEROSMOTIC STRESS ON THE
ORGANIZATION OF THE ACTIN CYTOSKELETON
OF *Chlorophyton comosum***

Komis, G., Apostolakos, P., Galatis, B.

Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Athens 157 84

In the present work, the organization of actin microfilaments (AFs) was studied during the course of the plasmolytic cycle in leaf cells of *Chlorophyton comosum*. In every plasmolyzed cell, an intense reorganization of the AF cytoskeleton was observed. Thin cortical AFs disappear and novel cortical, subcortical and endoplasmic AFs organized in bundles are formed. Cortical AF bundles are mostly localized within the most shrunk protoplast regions lining the detached plasmalemma areas. Endoplasmic AF bundles are localized at the perinuclear cytoplasm and on the tonoplast surface. Through digital image analysis it was found that the plasmolyzed cells display more AFs by 120% compared to the control ones.

Disassembly of AFs through the use of cytochalasin B (CB) brought about discernible changes at both the form and the time course of plasmolysis. The protoplast shrinkage lasted for a longer time and the final protoplast volume was smaller compared to that of typically plasmolyzed cells. In most cells, the protoplast assumed an "amoeboid" form and frequently was subdivided in subprotoplasts.

The above results show for the first time that the angiosperm AF cytoskeleton is reorganized during plasmolysis, and that these changes are correlated with the regulation of the protoplast volume and shape. The AFs are probably involved in the regulation of plasmalemma ion transport channel function, as is the case for animal cells.

**IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΩΝ P-
ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ *Bombyx mori* ΣΤΟ
ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΑ *Saccharomyces cerevisiae***

**Κουγιανού-Κουτσούκου, Σ.¹, Santos, C.², Κολιάρáκη, Β.¹ και J-P. G.
Ballesta²**

¹Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστημιούπολη, Αθήνα,

²Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Ο μίσχος είναι μια χαρακτηριστική δομή της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας που εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με τους παράγοντες επιμήκυνσης κατά τη μετάφραση. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ο ριβοσωμικός μίσχος αποτελείται από δύο οικογένειες όξινων πρωτεϊνών P1 και P2, και από την πρωτεΐνη P0 που συνδέεται με το 28S RNA. Στο παρόν πρόγραμμα πραγματοποιήθηκε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός και η απομόνωση των cDNAs των συστατικών του μίσχου στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* και η έκφραση τους σε κατά συνθήκη μεταλλαγμένα στελέχη του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Ένας cDNA κλώνος της πρωτεΐνης BmP0, μεγέθους 1151 bp, απομονώθηκε από μια cDNA βιβλιοθήκη, ενώ τα cDNAs των πρωτεϊνών BmP1 και BmP2, μεγέθους 339 bp, κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο RT-PCR. Κατεργασία των ριβοσωμάτων με 0.5M NH₄Cl οδήγησε στην απελευθέρωση των πρωτεϊνών BmP1 και BmP2, αντίθετα από την πρωτεΐνη BmP0, η οποία παρέμεινε στενά συνδεδεμένη στο ριβόσωμα. Για την έκφραση των ριβοσωμικών P-πρωτεϊνών του *B. mori* στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae*, οι κωδικές περιοχές των γονιδίων BmP0, BmP1 και BmP2 εισήχθησαν σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς rFL, υπό τον έλεγχο των 5' και 3' ρυθμιστικών περιοχών των ομόλογων γονιδίων YP0, YP1 και YP2 του *S. cerevisiae*, αντίστοιχα. Οι κατασκευές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό του μεταλλαγμένου στελέχους D₆₇, στο οποίο έχουν αδρανοποιηθεί τα γονίδια YP1α και YP1β, και του κατά συνθήκη μεταλλαγμένου -ως προς το γονίδιο YP0- στελέχους D₆₇dGP0. Η πρωτεΐνη BmP0 αντικατέστησε λειτουργικά την ενδογενή πρωτεΐνη YP0 στο μεταλλαγμένο στέλεχος D₆₇dGP0, και η πρωτεΐνη BmP1 τις ενδογενείς πρωτεΐνες YP1α και YP1β, στο στέλεχος D₆₇.

Το πρόγραμμα αυτό χρηματοδοτήθηκε από τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΛΚΕ, 70/4/5707, 2001 στην Σ.Κ).

**IN VIVO ANALYSIS OF THE RIBOSOMAL P-PROTEIN
GENES OF THE SILKMOTH *Bombyx mori* IN THE YEAST
*Saccharomyces cerevisiae***

Kouyanou-Koutsoukou, S.¹, Santos, C.², Koliaraki, V.¹, and J.-P. G. Ballesta²

¹University of Athens, Department of Biology, Division of Genetics and Biotechnology,
Panepistimiopolis, Athens,

²Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

The stalk is a universal structure of the large ribosomal subunit involved in the interaction of soluble factors during translation. In eucaryotic organisms, the stalk consists of two families of acidic proteins P1 and P2, and of the protein P0, bound to the 28S RNA. We present here the biochemical identification and the isolation of the cDNAs of the stalk components in the silkmoth *Bombyx mori*, as well as their expression in conditional mutant strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. A 1151 bp cDNA clone of the BmP0 protein, was isolated from a cDNA library, while the cDNAs of the BmP1 and BmP2 proteins, (339 bp each), were constructed by RT-PCR. Treatment of ribosomes with 0.5M NH₄Cl released the acidic BmP1 και BmP2 proteins, in contrast to the BmP0 protein, that remained firmly bound to the ribosome. In order to study the expression of the P-genes of *B. mori* in *S. cerevisiae*, appropriate constructions were made, carrying the coding regions of the genes BmP0, BmP1 και BmP2, between the 5' and 3' untranslated regions of the genes YP0, YP1 και YP2 of *S. cerevisiae*, respectively. These constructs were used for the transformation of the mutant strain D67, deficient for the acidic proteins YP1α and YP1β, and the conditional P0 protein-null strain D₆₇dGP0. The BmP0 protein replaced the endogenous yeast protein YP0 in the mutant strain D₆₇dGP0 and the BmP1 protein replaced the endogenous proteins YP1α and YP1β in the D67 strain.

This project has been supported by the Special Account for Research Grants of Athens University (SARG, 70/4/5707, 2001 to SK).

ΝΕΩΤΕΡΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΣΤΙΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΔΟΜΗΣ- ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ ΟΥΡΙΚΟΥ UapA

Κουκάκη, Μ., Καγιάς, Κ., Τουρναβίτη, Σ. και Γ. Διαλλινάς

Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 15784 Αθήνα

Ο μεταφορέας ουρικού UapA του *Aspergillus nidulans* αποτελεί το καλύτερα μελετημένο παράδειγμα της οικογένειας μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων-ασκορβικού (1-2). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι αμινοξέα σε μια συντηρημένη αλληλουχία-μοτίβο στην 10^η διαμεμβρανική α-έλικας (TMS10) είναι σημαντικά στην αναγνώριση και μεταφορά πουρινών (3-5). Στην περιοχή αυτή, οι μεταφορείς ασκορβικού των θηλαστικών, που επίσης ανήκουν στην οικογένεια NAT, έχουν διαφορές συγκρινόμενες με τους μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων. Εξετάσαμε εάν οι διαφορές αυτές αποτελούν τη βάση της διαφορετικής εξειδίκευσης των μεταφορέων NAT. Μελετήσαμε μεταλλαγές που αντικαθιστούν συγκεκριμένα αμινοξέα στον UapA με αυτά που έχουν οι μεταφορείς ασκορβικού. Οι μεταλλαγές κατασκευάστηκαν σε κατάλληλο φορέα με κατευθυνόμενη *in vitro* μεταλλαξίγνεση και εισήχθησαν στον *A. nidulans*. Καμία από τις μεταλλαγές δεν προσέδωσε στον UapA την ικανότητα να μεταφέρει ασκορβικό. Οι περισσότερες από αυτές απλώς ελαττώνουν την απόδοση του UapA να μεταφέρει τα υποστρώματα του. Ωστόσο, η αντικατάσταση Q449P απενεργοποιεί πλήρως τον UapA. Συμπεραίνουμε ότι αν και η αντικατάσταση αυτή δεν είναι από μόνη της ικανή να μετατρέψει τον UapA σε μεταφορέα ασκορβικού, ωστόσο η θέση 449 είναι σημαντική στην λειτουργία του UapA. Επεκτείναμε τις μελέτες μας που αφορούν τον ρόλο της θέσης 449 στην λειτουργία του UapA απομονώνοντας και μελετώντας 13 κατασταλτικές μεταλλαγές στο μετάλλαγμα UapA-Q449P. Ο γενετικός και μοριακός χαρακτηρισμός των μεταλλαγών αυτών είναι σε εξέλιξη. Παράλληλα, απομονώσαμε και μελετάμε 4 κατασταλτικές μεταλλαγές στο μετάλλαγμα UapA-A404D. Η αντικατάσταση αυτή, 20 αμινοξέα πριν την 10^η διαμεμβρανική α-έλικα, έχει προηγουμένως βρεθεί ότι οδηγεί σε ολική απώλεια της λειτουργίας του UapA. Ενδιαφέρον προκαλεί ότι 3 από τις 4 κατασταλτικές μεταλλαγές που απομονώθηκαν όχι μόνο «διορθώνουν» την ανικανότητα του στελέχους UapA-A404D να μεταφέρει τα υποστρώματα του αλλά προσδίδουν επίσης την νέα ικανότητα να μεταφέρει άλλες πουρίνες όπως η αδενίνη και η υποξανθίνη. Ο γενετικός και μοριακός χαρακτηρισμός των μεταλλαγών αυτών είναι σε εξέλιξη και αρχικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τουλάχιστον 2 από τις κατασταλτικές μεταλλαγές χαρτογραφούνται στο γονίδιο *uapA*. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο συνδυασμός κατευθυνόμενης μεταλλαξίγνεσης και η απομόνωση κατασταλτικών μεταλλαγών στον *A. nidulans* αποτελούν μια εξαιρετική μεθοδολογία για την προσέγγιση ερωτημάτων που αφορούν στις σχέσεις δομής-λειτουργίας σε διαμεμβρανικούς μεταφορείς.

1. Gorfinkiel L, Diallinas G, Sczzocchio C, J Biol Chem 1993, 268(31):23376-81
2. de Koning H, Diallinas G, Mol Membr Biol 2000,17(2):75-94
3. Diallinas G, Valdez J, Sophianopoulou V, Rosa A, Sczzocchio C, EMBO J 1998,17(14):3827-37
4. Meintanis C, Karagouni AD, Diallinas G, Mol Membr Biol 2000, 17(1):47-57
5. Amillis S, Koukaki M, Diallinas G, J Mol Biol 2001, 313(4):765-74

STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS IN THE URIC ACID TRANSPORTER UAPA: FURTHER EVIDENCE FOR THE FUNCTIONAL ROLE OF AMINO ACID RESIDUES IN OR CLOSE TO TMS10

Koukaki M., Kagias, K., Tournaviti, S., and G. Diallinas

Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis 157 84 Athens

UapA, a uric acid-xanthine transporter in *Aspergillus nidulans*, is the best studied example of a nucleobase transporter belonging to the highly conserved NAT family (1-2). Apart from nucleobase transporters, the NAT family also includes the mammalian ascorbate transporters. Several studies with the UapA transporter have previously shown the involvement of amino acid residues within a conserved motif located in TMS10 in purine binding and transport (3-5). Interestingly, in mammalian ascorbate transporters this motif presents some important differences compared to the sequence present in UapA and other NAT nucleobase transporters (2). We examined whether these differences are the basis for the different substrate specificity of nucleobase and ascorbate transporters. We constructed several oligonucleotide directed UapA mutations which replace residues present in all nucleobase transporters with those present in ascorbate transporters, and asked the question whether UapA itself is converted into an ascorbate transporter. The mutations were introduced by genetic transformation into an appropriate *A. nidulans* strain. None of the mutations conferred the ability for UapA-mediated ascorbate or pyrimidine transport. Most of the mutations had a minor effect on UapA activity for purine uptake. However, mutations replacing residue Q449, which has previously been shown to be critical for UapA specificity, with P449, the residue present in ascorbate transporters totally abolishes UapA function. Thus, although substitution Q449P is not by itself sufficient to convert UapA into an ascorbic acid transporter, our results emphasize the importance of this residue in UapA function. In order to further investigate the role of residue Q449 in UapA function, but also in line with our effort to convert UapA into ascorbate transporter, we isolated suppressor mutations of a mutant strain carrying the substitution Q449P. A strain carrying a single copy of UapA-FAQ449SSP was mutagenised and 13 colonies able to grow on uric acid or xanthine were isolated. Efforts are in progress to classify these mutations as intragenic or extragenic. We also isolated suppressors of mutation UapA-A404D. This mutation has previously been shown to be a total loss-of-function mutation in the hydrophilic region upstream from TMS10. 4 colonies able to grow on uric acid were selected. As expected, all mutants were also able to grow on xanthine. Interestingly however, 3 of them had also acquired the capacity to grow on hypoxanthine and adenine. Preliminary genetic analysis has shown that at least two of these mutations map in the *uapA* gene. These results showed that selection of suppressors of original *uapA* mutations is a powerful approach to select for specificity mutations in the UapA transporter.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΥΠΕΡΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ NSAIDS

**Κουρουνάκη, Α., Βικτωράτος, Π., Περούλης, Ν., Στεφάνου, Μ.,
Γιάγκου, Μ., Χατζηπέτρου, Α., Κουρουνάκης, Π.**

Α.Π.Θ., Σ.Θ.Ε., Βιολογία, Τομέας Γ.Α.Μ.Β. και Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας

Πολλά δεδομένα υποστηρίζουν ότι στην αθηρωμάτωση –η οποία είναι μια εξαιρετικά πολυπαραγοντική διαδικασία - φλεγμονώδεις και ανοσολογικοί μηχανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο. Έχει αναγνωρισθεί ότι η υπερχοληστερολαιμία και τα υψηλά επίπεδα LDL-χοληστερόλης είναι τα εναρκτήρια γεγονότα της αθηρογένεσης. Για τους παραπάνω λόγους αποφασίσαμε να εξετάσουμε και να συγκρίνουμε πολλά από τα γνωστά αντιφλεγμονώδη για *in vivo* υπολιπιδαιμική δραστηριότητα σε ένα πειραματικό μοντέλο υπερλιπιδαιμίας αρουραίου.

Η υπερλιπιδαιμία στα ζώα επιτυγχάνεται με ένεση triton WR1339 (Tyloxapol) σε 1,15% KCl μια ώρα πριν τη χορήγηση των υπό εξέταση φαρμάκων. 24 ώρες μετά τις χορηγήσεις στο πλάσμα αίματος έγιναν μετρήσεις των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης (TC), τριγλυκεριδίων (TG) και LDL-χοληστερόλης.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα περισσότερα φάρμακα προκαλούν σημαντική μείωση των επιπέδων τόσο της TC όσο και των TG και της LDL-χοληστερόλης. Η υπολιπιδαιμική δράση πολλών εκ των υπό έρευνα φαρμάκων σε σχέση με την χορηγηθείσα δοσολογία ήταν ακανόνιστη, καθώς και κάποια φάρμακα έδειξαν υπερλιπιδαιμική δράση σε κάποιες δόσεις και υπολιπιδαιμική σε άλλες, γεγονότα που πιθανά αντανακλούν την πολυπλοκότητα σχέσεων και/ή δράσεων. Τη μεγαλύτερη υπολιπιδαιμική δράση, σε ότι αφορά τον κλινικά σημαντικό για την αθηρωμάτωση παράγοντα της LDL-χοληστερόλης, έδειξαν η Ινδομεθακίνη (70-90% μείωση), η Δικλοφαινάκη (60-95% μείωση) και η Ασπιρίνη (60-80% μείωση). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα προαναφερθέντα φάρμακα είναι εκλεκτικοί ή μη εκλεκτικοί αναστολείς της COX-1, ενώ το φάρμακο Νιμεσουλίδη που είναι μη εκλεκτικός αναστολέας της COX-2 εμφανίζει πολύ κατώτερη υπολιπιδαιμική δράση.

Συμπερασματικά η έρευνά μας δείχνει την πιθανότητα ύπαρξης σύνδεσης μεταξύ της αντιφλεγμονώδους και της υπολιπιδαιμικής δράσης των NSAIDs.

EXPERIMENTAL HYPERLIPIDEMIA AND THE EFFECT OF NSAIDS

Kourounakis, A.², Victoratos, P.¹, Peroulis, N.¹, Stefanou, M.¹, Yiangou, M.¹, Hadjipetrou, L.¹ and P. Kourounakis²

¹Dept. of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Faculty of Sciences,

²Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Aristotelian University of Thessaloniki, Thessaloniki 54124, GREECE.

Since among other pathological causes, atherosclerosis is linked to inflammation and hyperlipidemia, we studied the effects of administration of NSAIDs in experimentally induced hyperlipidemia in rats. An isotonic solution of triton WR1339 (tyloxapol) was administered i.p. to rats one hour after i.p. administration of the examined anti-inflammatory drug. After 24h, blood was collected for the determination of plasma total cholesterol (TC), LDL and triglyceride (TG) concentrations.

Our results showed that most of the drugs significantly reduced the TC, TG and LDL-cholesterol concentrations. The hypolipidemic activity of some of the drugs examined relative to their dose used was irregular, while some drugs exhibited hyperlipidemic activity in certain doses and hypolipidemic activity in other doses, facts that probably indicate complex interrelations and/or interactions. The most efficient hypolipidemic activity, was exhibited by Indomethacin (70-90% decrease), Diclofenace (60-95% decrease) and Aspirin (60-80% decrease). It is noteworthy that the drugs listed above are selective or non selective COX-1 inhibitors, while the non selective COX-2 inhibitor Nimesulid exhibits much lower hypolipidemic activity.

While studies link atheromatosis to inflammation, our results potentially also link anti-inflammatory activity with hypolipidemia. Thus, NSAIDs not only may address the inflammatory aspect of atherosclerosis but also may contribute directly by inducing hypolipidemia.

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΙΑΣ *HSP70* ΑΚΟΛΟΥΘΙΑΣ
ΤΟΥ *Mytilus galloprovincialis***

**Κουρτίδης, Α.¹, Χατζή, Β.¹, Νικολαΐδης, Ν.¹, Δροσοπούλου, Ε.¹,
Χιντήρογλου, Χ.² και Ζ.Γ. Σκούρας¹**

¹Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, ²Τομέας Ζωολογίας,
Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 54 124 Θεσσαλονίκη

Το *Mytilus galloprovincialis* αποτελεί ένα διαδεδομένο και οικονομικά σημαντικό είδος μυδιού στη Μεσόγειο Θάλασσα. Ωστόσο, δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα γι' αυτό σε μοριακό επίπεδο, ειδικά σε ότι αφορά τους πληθυσμούς της Ανατολικής Μεσογείου. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάλυση λειτουργικά σημαντικών γονιδίων του είδους, όπως τα μέλη της γονιδιακής οικογένειας *hsp70*. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει θερμοεπαγόμενα γονίδια τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική απόκριση σε ποικίλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Αρχικά, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές με βάση γνωστή cDNA *hsp70* ακολουθία από το συγγενικό είδος *Mytilus edulis*. Ακολούθησε ενίσχυση ενός γονιδιωματικού τμήματος DNA μεγέθους περίπου 400 bp του *M. galloprovincialis* με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Σύμφωνα με την ανάλυση της πρωτοταγούς ακολουθίας του τμήματος αυτού φαίνεται ότι αποτελεί τμήμα της περιοχής της ΑΤΡάσης του *hsp70*. Επιπλέον, η *hsp70* ακολουθία του *M. galloprovincialis* παρουσιάζει υψηλά ποσοστά ομολογίας με γνωστές *hsp70* ακολουθίες ειδών των οικογενειών *Mytilidae* και *Ostreidae*. Στη συνέχεια, η απομονωμένη ακολουθία χρησιμοποιήθηκε ως ομόλογος ανιχνευτής για τη σάρωση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του *M. galloprovincialis*. Πραγματοποιήθηκαν δύο κύκλοι σάρωσης μετά τους οποίους απομονώθηκαν αρκετοί κλώνοι, οι οποίοι υπόκεινται σε περαιτέρω ανάλυση.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN *HSP70* SEQUENCE OF *Mytilus galloprovincialis*

Kourtidis, A.¹, Hatzis, V.¹, Nikolaidis, N.¹, Drosopoulou, E.¹,
Chintiroglou, C.² and Z.G. Scouras¹

¹Department of Genetics, Development and Molecular Biology, ²Department of Zoology,
School of Biology, Faculty of Sciences, Aristotle University, 54 124 Thessaloniki

Mytilus galloprovincialis is the most common mussel species in the Mediterranean Sea. In spite of its great economical importance, little is known about the species at the molecular level, especially in the Eastern Mediterranean populations. The aim of this study is to analyze functionally important genes of the species such as the *hsp70* gene family. The family includes heat-shock related genes which are of great importance to all species, as they are responsible for the cellular response to a number of environmental stimuli. In order to isolate a member of the *hsp70* gene family of *M. galloprovincialis* synthetic oligonucleotide primers were constructed based on the known *hsp70* cDNA sequence of its sibling species *Mytilus edulis*. Genomic DNA derived from *M. galloprovincialis* was subjected to PCR amplification which resulted in an approximately 400bp-long fragment. Sequence analysis of the amplified product showed that it consists a region of the ATPase domain of the *hsp70* molecule. Furthermore this *hsp70* related sequence of *M. galloprovincialis* exhibits extensive similarity to *hsp70* sequences of *Mytilidae* and *Ostreidae* species. The amplified fragment was used as a homologous probe for screening a λ FIXII genomic library of *M. galloprovincialis*, in order to study the genomic organisation of the *hsp70* gene family of *M. galloprovincialis*. Several positive clones were isolated after two rounds of screening and are subjected to further analysis.

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ Ή ΚΟΙΝΩΝΙΚΗ ΑΝΑΓΚΑΙΟΤΗΤΑ;

Κουσουλάκος, Σ. και Λ.Χ. Μαργαρίτης

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα

Η σημερινή έννοια της κλωνοποίησης (δηλαδή της δημιουργίας γενετικά ταυτόσημων οργανισμών, και κατ' επέκταση οργάνων, κυττάρων και μορίων) είναι απόρροια ενός βιολογικού προβλήματος που κυριαρχούσε πριν από 150 περίπου χρόνια, και συγκεκριμένα του πώς από ένα σχετικά αδιαφοροποίητο κύτταρο, το ζυγωτό, δημιουργείται ένας περίπλοκος οργανισμός ο οποίος αποτελείται από δισεκατομμύρια κύτταρα εκατοντάδων διαφορετικών τύπων. Τα πειράματα του Hans Driesch (1892) με έμβρυα αχινού απέδειξαν ότι τουλάχιστον τα πρώτα βλαστομερίδια ήταν μεταξύ τους γενετικά ισοδύναμα και ικανά να δημιουργήσουν έναν πλήρη οργανισμό. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα ο Hans Spemann προσπαθούσε να διαπιστώσει το «πότε» καθορίζεται το πεπρωμένο των εμβρυϊκών κυττάρων, και το «εάν» ένα διαφοροποιημένο κύτταρο θα μπορούσε να εκφράσει εκ νέου όλο το γενετικό του πρόγραμμα. Η απάντηση στο «πότε» δόθηκε με μεταμοσχεύσεις κυτταρικών ομάδων. Η αναμφισβήτητη απάντηση στο «εάν», θα μπορούσε να δοθεί μόνον στην περίπτωση που ένας πλήρης οργανισμός δημιουργείται με γενετικό υλικό από ένα διαφοροποιημένο κύτταρο. Τα πρώτα πειράματα αντιμετώπιζαν προβλήματα τα οποία οφείλονταν στην αδυναμία των επιστημόνων να συνδυάσουν πυρήνα από ένα διαφοροποιημένο κύτταρο, με κυτταρόπλασμα ικανό να υποστηρίξει όλες τις αναπτυξιακές διαδικασίες. Τότε ο Spemann πρότεινε την αντικατάσταση του πυρήνα του ωοκυττάρου από τον πυρήνα ενός «διαφοροποιημένου» κυττάρου. Έτσι, δημιουργείται ένα «κύτταρο» το οποίο περιέχει όλο το γενετικό υλικό του είδους, αλλά και όλο το κυτταρόπλασμα το οποίο χρησιμοποιεί το είδος για την ανάπτυξη του εμβρύου. Ο Mangold ανέφερε το 1911 ότι κατάφερε να δημιουργήσει λίγους γυρίνους, γεγονός που αποτελεί την πρώτη πειραματική κλωνοποίηση υπό τη σημερινή αντίληψη του όρου. Μετά τον Mangold ορισμένοι ερευνητές (δεκαετίες '60 και '70) αναφέρουν κλωνοποίηση σε κατώτερους οργανισμούς αλλά τα αποτελέσματά τους αμφισβητούνται από πολλούς.

Το 1986 δημοσιεύεται στο Nature από τον S.M. Willadsen και τους συνεργάτες του η γέννηση προβάτων με την τεχνική της κλωνοποίησης. Αν και αυτή η περίπτωση προηγήθηκε της Dolly κατά μια δεκαετία, δικαίως δεν απέκτησε τέτοια δημοσιότητα αφού το κύτταρο-δότης του πυρήνα δεν ήταν σωματικό, διαφοροποιημένο, αλλά προερχόταν από ένα βλαστομερίδιο του σταδίου των οκτώ κυττάρων. Το 1997 ανακοινώθηκε από τον I. Wilmut και τους συνεργάτες του, η από εξαμήνου γέννηση της Dolly. Το γεγονός αυτό έλαβε τεράστια έκταση ακριβώς επειδή ο Wilmut ισχυρίστηκε ότι το κύτταρο-δότης του γενετικού υλικού προερχόταν από διαφοροποιημένο ιστό. Έκτοτε, κλωνοποίηση έχει επιτευχθεί σε ορισμένα είδη θηλαστικών, όμως σε καμιά περίπτωση δεν έχει αποδειχθεί ξεκάθαρα ότι η λήψη του γενετικού υλικού έγινε από διαφοροποιημένο κύτταρο. Ως

κύτταρα-δότες πυρήνων χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από ποικίλα όργανα, όμως πάντα οι «αντίπαλοι» όρθωναν το επιχείρημα ότι μάλλον τα θετικά περιστατικά που αναφέρονταν οφείλονταν στην παρουσία αδιαφοροποίητων, εφεδρικών κυττάρων, (όπως είναι τα γεναρχικά κύτταρα της επιδερμίδας, τα περικύτταρα των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων και εν γένει τα «εφεδρικά», πολυδύναμα) που υπάρχουν στους ιστούς. Τα παραπάνω κύτταρα έχουν την ικανότητα να εκφράζουν μεγάλο μέρος του γενετικού τους δυναμικού (πολυδύναμα κύτταρα). Επί πλέον, το ποσοστό επιτυχίας που αναφέρεται συνήθως είναι περίπου ίσο με το ποσοστό συμμετοχής των εφεδρικών («αδιαφοροποίητων», πολυδύναμων) κυττάρων στον ώριμο ιστό. Η κλωνοποίηση, διακρίνεται πλέον σε **αναπαραγωγική** και σε **θεραπευτική**. Αν και υπάρχουν ακόμη κάποιες τεχνικές δυσκολίες, σύντομα θα υπερνικηθούν. Το παράδειγμα της αναγέννησης ιστών και οργάνων, ιδίως δε η αναγέννηση του φακού των ουρόδηλων αμφιβίων δείχνει ότι η αποδιαφοροποίηση και ο αναπρογραμματισμός του πεπρωμένου των κυττάρων είναι εφικτός.

Σχετικά με την αναπαραγωγική κλωνοποίηση και ειδικότερα με αυτήν του ανθρώπου, έχει διαμορφωθεί σήμερα ένα ισχυρά φορτισμένο κλίμα λόγω της αντιπαράθεσης δύο αντιθέτων αντιλήψεων. Από την μια πλευρά προτάσσονται τα «χειροπιαστά» οφέλη που μπορούν να προκύψουν (π.χ. τεκνοποίηση) ενώ από την άλλη, οι υπαρκτοί ηθικοί ενδοιασμοί καθώς και το ασαφές νομικό πλαίσιο. Στην εισήγηση θα επιδιωχθεί η σκιαγράφηση αυτής της αντιπαράθεσης κυρίως μέσα από το πρίσμα της βιολογίας.

Η εργασία αυτή χρηματοδοτήθηκε εν μέρει από τον Ειδικό Λογαριασμό Έρευνας του ΕΚΠΑ (Σ.Κ.)

HUMAN CLONING: SCIENTIFIC OR SOCIAL NECESSITY?

Koussoulakos, S., and L.H. Margaritis

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis 157 84 Athens, Greece

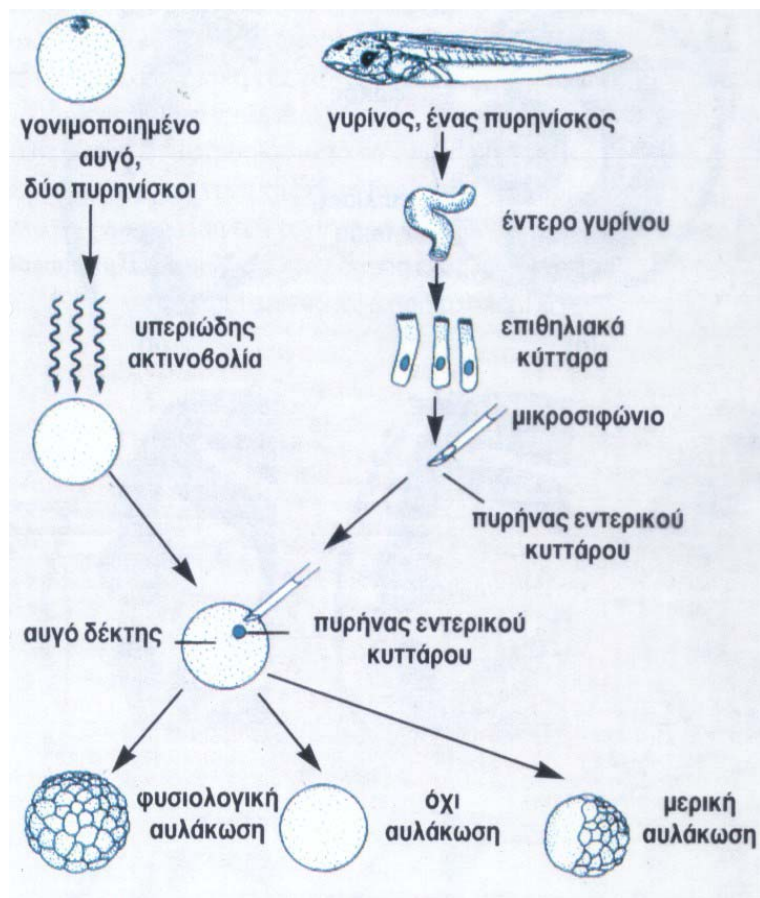
On February 23rd, 1997 world media reported the birth of Dolly, a sheep cloned from an adult sheep. A few days later it was admitted that frozen cells had been used to make Dolly, a fact that led to the notion that animals and people could be cloned after death. Soon thereafter many Governments announced that human cloning should be prohibited. Nevertheless, experimental formation of human clones became soon legal in USA and the UK, so long as the embryos were made for medical research and destroyed before implantation. Thereafter, despite huge risks and widespread public condemnation, a number of scientists across the world started efforts to clone the first (?) human.

Many Governments and a lot of scientists are against human cloning. Of course there are good reasons why we should be very careful with such experiments. For the time being the main arguments against human cloning are the following:

- (a) The age of the clone: There is much confusion. Data from many scientists report that the clones die early, whereas other teams claim the animals live as long as their "normal" counterparts.
- (b) Health risks: At present, the technique is extremely risky. A lot of animal experimentation should precede human cloning, even for therapeutic applications.
- (c) Illegal cloning: After some years, when the technique will be perfected, the implantation of a cloned embryo will be technically a routine procedure. Even worse, scientists could possibly clone a desired person from samples of blood or hair.

Some reasons that lead people to be in favor of reproductive human cloning are understandable but biologically unacceptable (recovery of lost baby, infertility) whereas others are not ethically and socially acceptable (eugenics, megalomania, spare parts). However, therapeutic cloning is faced more or less favorably by the majority of the scientific community and seems to be rather acceptable both socially and ethically.

Since the economic aspect of cloning is enormous, we believe that human cloning shall become a major issue in the near future. However, given the fact that cloning is associated with complicated social, legal and ethical issues, it should be treated by internationally agreed legislation.



Η κλασική πειραματική διαδικασία κλωνοποίησης όπως επινοήθηκε από τον H. Spemann και πραγματοποιήθηκε από τους Mangold (1911) και Briggs και King (1952)

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ ΡΕΤΙΝΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ BMP4 ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΚΡΑΝΙΟΥ

Κουσουλάκου, Δ., Μαργαρίτης, Λ.Χ., Κουσουλάκος, Σ.

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα

Το ρετινοϊκό οξύ (RA, παράγωγο της βιταμίνης Α) είναι ένα ενδογενές, πληροφοριακό μόριο, απαραίτητο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης των θηλαστικών, αλλά και αρκετά σημαντικό κατά την υπόλοιπη ζωή. Μεγάλες ποσότητες RA και/ή ανεπάρκεια βιταμίνης Α επάγουν σοβαρές μορφογενετικές ανωμαλίες κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον εστιάζεται στις συγγενείς κρανιοπροσωπικές παραφορφώσεις. Η διαλεύκανση του τρόπου δράσης των μορφογενετικών παραγόντων είναι σημαντική για την κατανόηση των θεμελιωδών μηχανισμών της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Το citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal, $C_{10}H_{16}O$) αποτελεί αναστολέα της σύνθεσης του ρετινοϊκού οξέος. Επειδή σήμερα η χρήση του citral αυξάνεται αλματωδώς (απαντάται ως αρωματικό σε καλυντικά, ενισχυτικό γεύσης λεμονιού σε τροφές, ποτά και γλυκά, απορρυπαντικά, καθαριστικά, καθαρτικά, αρώματα και άλλα είδη προσωπικής υγιεινής), έχει προταθεί από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (NIH) ως ουσία χρήζουσα εμπειριστατωμένης και μακροχρόνιας πειραματικής μελέτης, *in vivo*. Πλην του ρόλου του citral ως αναστολέως της σύνθεσης του RA, οι βλαπτικές του επιδράσεις αποδίδονται και σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις λόγω έκλυσης νευροδιαβιβαστών, ή σε άμεση προσβολή των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν μια αρχική εκτίμηση των κινδύνων, στους οποίους εκτίθενται τα θηλαστικά, (με απώτερο σκοπό την ασφάλεια της κύησης στις έγκυες γυναίκες), με τη χρήση ουσιών, όπως είναι το citral. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, σε δύο ομάδες (α, β) θηλυκών, εγκύων ποντικών χορηγήθηκαν κατά την έννατη προς δέκατη ημέρα κύησης (α) 3μl citral/gbw, και (γ) 3μl φυσιολογικού ορού/gbw, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν (i) με διπλή χρώση χόνδρου (Alcian blue)- οστίτη ιστού (alizarin red S), (ii) με συμβατική, ιστολογική χρώση (Domagk), καθώς και με ανοσοϊστοχημεία ανίχνευσης της κατανομής του BMP4. Εδείχθει ότι, πράγματι, το citral επηρεάζει όλες τις εξετασθείσες παραμέτρους, τα δε αποτελέσματα εκτίθενται λεπτομερώς στη συνοδευτική, αναρτώμενη ανακοίνωση.

Η εργασία αυτή χρηματοδοτήθηκε εν μέρει από τον Ειδικό Λογαριασμό Έρευνας του ΕΚΠΑ (Σ.Κ), και από το Ι.Κ.Υ. (Δ.Κ.)

EFFECTS OF RETINOIC ACID INHIBITORS IN BMP4 DISTRIBUTION AND CRANIAL BONE OSSIFICATION

Koussoulakou, D., Margaritis, L.H., Koussoulakos, S.

Faculty of Biology, Department of Cell Biology and Biophysics, University of Athens,
Panepistimiopolis 157 84 Athens - Greece

Retinoic acid is an important biological signaling molecule. During mammalian development it modulates the differentiation in many cell lineages, including those of the chondrogenic lineage. Numerous studies of experimental hyper- and hypovitaminosis A have long suggested that this molecule is involved in several morphogenetic abnormalities during embryonic development. Of particular interest are those concerning congenital craniofacial anomalies. The unraveling of the mode of action of morphogenetic factors is important for understanding fundamental mechanisms of development.

For revealing the common denominator of countless birth defects and for providing new strategies for their prevention and cure, some mice were administered with citral, a known inhibitor of retinoic acid synthesis. The results were evaluated (a) by double-staining of cartilage and bone, (b) by conventional histological staining and (c) by immunohistochemical localization of BMP4.

The obtained results show that actually citral plays a major role in affecting all the parameters studied. The results are discussed in detail in the accompanying poster.

ΤΑ ΔΟΝΤΙΑ ΩΣ ΙΔΑΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΣΗΣ

Κουσουλάκου, Δ., Μαργαρίτης, Λ.Χ., Κουσουλάκος, Σ.

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα

Οι περισσότεροι ζωικοί οργανισμοί ξεκινούν τη ζωή τους μετά τον σχηματισμό του ζυγωτού. Ακολουθούν κυτταρικές διαιρέσεις κατά τις οποίες μητρικής προέλευσης mRNAs (mRNA της πρωτεΐνης bicoid και πολικό πλάσμα στη Δροσόφιλα, mRNA της RNA-ελικάσης, mRNA του TGF-β, mRNA κυκλινών, κ.α.) κατανέμονται σε διαφορετικά βλαστομερίδια. Η παρουσία διαφορετικών, μητρικής προέλευσης mRNAs, σε συνδυασμό με τη διαφορετική θέση του κάθε κυττάρου στον αναπτυσσόμενο οργανισμό έχουν ως αποτέλεσμα τον εφοδιασμό των κυττάρων με τοπικές πληροφορίες, με βάση τις οποίες καθορίζεται σταδιακά το πεπρωμένο κάθε κυττάρου, το κύτταρο αρχίζει να αποκτά ιστοειδικά χαρακτηριστικά και συμμετέχει στη δημιουργία οργάνων.

Από πολλά χρόνια καταβάλλονται σημαντικές προσπάθειες κατανόησης των μηχανισμών οι οποίοι καθοδηγούν τη μορφογένεση. Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί προς αυτόν τον σκοπό αρκετοί, διαφορετικοί οργανισμοί (*Dictyostelium*, *Acetabularia*, ζύμη, νηματώδεις, κατσαρίδες, δροσόφιλα, αμφίβια, πτηνά θηλαστικά) με επίκεντρο ποικίλα όργανα (κυρίως πνεύμονες, νεφρά, άκρα).

Τα τελευταία χρόνια, τα δόντια των σπονδυλοζώων αρχίζουν να κερδίζουν σημαντικές μετοχές ως όργανα λίαν κατάλληλα για τη διερεύνηση των μηχανισμών της μορφογένεσης. Για παράδειγμα, η εναλλαγή δοντιού με νωδό διάστημα στα ομόδοντα ερπετά αποτελεί ιδανικό σύστημα μελέτης των μορφογενετικών θεωριών «διάχυσης-αντίδρασης» και «πλευρικής αναστολής». Για τα ζώα στα οποία παρατηρείται ετεροδοντία (όπως συμβαίνει και στον άνθρωπο) γεννάται το ερώτημα της δημιουργίας διαφορετικών τύπων δοντιών. Κατ αναλογία προς το παλαιό και επιβεβαιωμένο δόγμα της πειραματικής εμβρυολογίας (ότι δηλαδή το πρώιμο έμβρυο θεωρείται ως ένα μωσαϊκό μορφογενετικών πεδίων, έκαστο των οποίων ακολουθεί ίδια αναπτυξιακή πορεία), διατυπώθηκε η υπόθεση ότι κάτι παρόμοιο συμβαίνει και στην ετεροδοντία.

Συγκεκριμένα, η σειρά των οκτώ δοντιών εκάστου τεταρτημορίου διακρίνεται σε τρία βασικά, μορφογενετικά πεδία, (α) στην περιοχή των τομέων, (β) στην περιοχή του κυνόδοντα και (γ) στη γομφιακή περιοχή. Σε κάθε περιοχή υπάρχει το καλύτερο πρότυπο. Για παράδειγμα, οι κυνόδοντες θεωρούνται πολύ σταθερά δόντια διότι διατηρούν το σχήμα τους και ελλείπουν σπανιότατα. Αντίθετα, οι πλευρικοί τομείς διαφέρουν ως προς το σχήμα τους, ενώ συχνά ελλείπουν εκ γενετής. Στη γομφιακή περιοχή, το καλύτερο πρότυπο θεωρείται ο πρώτος μόνιμος γομφίος. Ο δεύτερος και ο τρίτος είναι διαδοχικά μικρότεροι, το σχήμα τους είναι μεταβλητό, τα δε οπισθογλωσσικά φύματα τείνουν να εξαφανισθούν. Παλαιοντολογικά ευρήματα διαπιστώνουν ότι τα πρωτόγονα θηλαστικά είχαν τέσσερις προγομφίους, ενώ αυτό που χαρακτηρίζουμε εμείς σήμερα ως πρώτο και δεύτερο προγόμφιο είναι στην πραγματικότητα ο τρίτος και ο τέταρτος, αντίστοιχα, Ο

πραγματικός πρώτος και ο πραγματικός δεύτερος προγόμφιος έχουν εξαφανισθεί, ως ευρισκόμενοι μακρύτερα από το μορφογενετικό πεδίου του πρώτου μόνιμου γομφίου. Η αγένεση ενός ή περισσότερων δοντιών είναι μια από τις συνηθέστερες ανωμαλίες της ανάπτυξης του ανθρώπου. Στο 20% του πληθυσμού δεν επιτυγχάνεται η δημιουργία του ενός ή περισσότερων εκ των τρίτων γομφίων (M3).

Στόχος αυτή της μελέτης είναι η διεξοδική διερεύνηση του φαινομένου της αγένεσης του M3 στα ποντίκια. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, σε δύο ομάδες (α, β) θηλυκών, εγκύων ποντικών χορηγήθηκαν κατά την έννατη προς δέκατη ημέρα κύησης (α) 3μl citral/gbw, και (γ) 3μl φυσιολογικού ορού/gbw, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν (i) με μακροσκοπική παρατήρηση σε νεαρά ποντίκια μετά την ανατολή και του τρίτου γομφίου, (ii) με συμβατική, ιστολογική χρώση (Domagk) και (iii) με ανοσοϊστοχημεία ανίχνευσης της κατανομής του BMP4 αμέσως μετά τη γέννηση. Μέχρι τώρα, (ίσως λόγω του αριθμητικά ανεπαρκούς δείγματος), δεν γεννήθηκε άτομο με έλλειψη M3. Τα ιστολογικά και ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα αναλύονται στη συνοδευτική, αναρτώμενη έκθεση.

Η εργασία αυτή χρηματοδοτήθηκε εν μέρει από τον Ειδικό Λογαριασμό Έρευνας του ΕΚΠΑ (Σ.Κ), και από το Ι.Κ.Υ. (Δ.Κ.)

TEETH AS AN IDEAL MODEL SYSTEM FOR ANALYZING DEVELOPMENTAL MECHANISMS

Koussoulakou D., L.H. Margaritis, S. Koussoulakos

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis 157 84 Athens - Greece

When an egg cleaves, the resulting blastomeres receive different morphogenetic factors which are firmly located at various places within the ooplasm. These factors stem from the so called maternal effect genes and contribute to the initial steps of cell fate. Later on the expression of the zygotic genes sets forth the processes of cell determination, acquisition of positional information, differentiation and morphogenesis. Among the various organs used to elucidate cellular and molecular mechanisms of morphogenesis are lungs, kidney, limbs, and many others. Recently, teeth have been added to the list of the favored experimental organs, since the various dentitions of different organisms offer comparative advantages. A functionally specialized dentition is present in mice: each jaw quadrant includes one permanently growing incisor separated from three molars by a toothless jaw segment, the diastema. The purpose of the present investigation was to test the validity of Butler's hypothesis that the third molar is a frequently missing teeth, since it is away from the center of the morphogenetic field (see poster). Control and experimental (administered with 3μl citral/gbw) mice were examined by macroscopic observation (after tooth eruption), by microscopical anatomy (just after birth) and by immunohistochemistry. Our results so far are not conclusive, a fact which might be attributed to the small number of animals so far tested.

ΕΚΦΡΑΣΗ ΕΝΕΡΓΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ *Drosophila melanogaster* ΣΤΟΝ ΜΥΚΗΤΑ *Pichia pastoris*

Κωνσταντή, Ο.¹, Wever, R.² και Λ.Χ. Μαργαρίτης¹

¹Τομέας Βιολογίας Κυπάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Παν/μιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολις, Τ.Κ. 15784, Αθήνα

²Instituut voor Moleculaire Chemie, Faculteit der Natuurwetenschappen, University of
Amsterdam, Nieuwe Achtergracht 129, 1018 WS Amsterdam

Οι υπεροξειδάσες καταλύουν τον καταβολισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου με στόχο την προστασία των οργανισμών από την υπεροξειδίωση. Οι υπεροξειδάσες των εντόμων ανήκουν στην υποομάδα των υπεροξειδασών των ζώων με αισθητά μικρότερο αριθμό ισοενζύμων από τα φυτά. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, ένας από τους ρόλους των υπεροξειδασών στα έντομα είναι η σκλήρυνση του χορίου μέσω της δημιουργίας δεσμών δι- και τρι- τυροσίνης. Στην *Drosophila melanogaster* έχουν εντοπισθεί τρία γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για υπεροξειδάσες. Σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα, το DmPO γονίδιο φαίνεται να κωδικοποιεί για την υπεροξειδάση του χορίου. Το DmPO εντοπίζεται στα θυλακοκύτταρα ωθυλακίων (σταδίων 11-14) με *in situ* υβριδισμό, απομονώθηκε με RT από mRNA ωθυλακίων και δίνει θετικό σήμα υβριδισμού (στα 55kDa) σε Western ανάλυση χοριονικών πρωτεϊνών. Ακολούθησε επιτυχής έκφραση της πρωτεΐνης στον μύκητα *Pichia pastoris*. Το γονίδιο υποκλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα *picZαA*. Τα στελέχη KM, X33 και GS του μύκητα, μεσηματίστηκαν με τον παραπάνω κλώνο. Εκφράστηκαν δύο αποικίες KM και δύο για το X33 στέλεχος. Η επαγωγή της έκφρασης έγινε με την προσθήκη 0.5% μεθανόλης. Δείγμα υπερκειμένου διαλύματος ελέγχθηκε για ενζυμική ενεργότητα και αναλύθηκε το πρωτεϊνικό του πρότυπο που παρουσίασε μία έντονη ζώνη 79 kDa. Ως πρώτο βήμα καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε η DEAE Sephacel στήλη. Ανακτήθηκε το 90% του ενζύμου και καθαρίστηκε ~ 70% από το αρχικό διάλυμα. Η πρωτεΐνη έχει βέλτιστο pH 5.5 ενώ παρεμποδίζεται η δράση της σε υψηλές συγκεντρώσεις H₂O₂. Μετρήθηκε απορρόφηση στα 410nm με μία μετακίνηση στα 430nm όταν το ένζυμο ανήχθη με Na₂S₂O₄. Σύμφωνα με τα παραπάνω η πρωτεΐνη ανήκει στην κατηγορία των αιμοπρωτεϊνών.

Η χρηματοδότηση είναι από ερευνητικό πρόγραμμα TMR N^οERB4061PL970047 στον καθηγητή
Λ.Χ. Μαργαρίτη.

FUNCTIONAL EXPRESSION OF THE *Drosophila melanogaster* PEROXIDASE IN THE YEAST *Pichia pastoris*

Konstandi, O.¹, Wever, R.² and L.H. Margaritis¹

¹Fac. of Biol., Dept. of Cell Biol. & Biophysics, Univ. of Athens, Panepistimiopolis, Athens, GR-15784, Greece

²Instituut voor Moleculaire Chemie, Faculteit der Natuurwetenschappen, University of Amsterdam, Nieuwe Achtergracht 129, 1018 WS Amsterdam

Peroxidases protect organisms from oxidation by catalysing hydrogen peroxide. Insect peroxidases are a subgroup of the mammalian peroxidases and they have less isoenzymes than the plant peroxidases. According to previous studies in our laboratory, one of the role of the insect peroxidase is chorion hardening via the formation of di- and tri-tyrosine bonds. Three genes coding for peroxidase have been identified in *Drosophila melanogaster*. According to previous experiments the DmPO gene codes for the chorion peroxidase. The DmPO has been identified in follicle cells (stages 11-14) by in situ hybridisation, isolated from follicular mRNA via RT and had positive signal in Western blot analysis of chorionic proteins. The expression of the DmPO was successful in the yeast *Pichia pastoris*. The gene was amplified via PCR and subcloned into the picZaA vector. The KM71, X33 and GS115 *Pichia* strains have been transformed with the DmPO clone. Two colonies from each strain KM71 and X33 have been used for expression. The expression is induced by the addition of 0.5% methanol. Supernatant samples were assayed for activity. A single band, 79 kDa is present in the supernatant sample after SDS-electrophoresis. First step purification was performed with DEAE-Sephacel. 90% of the enzyme was recovered, with ~70% purification. The absorption maximum was shifted from 410nm to 430nm when the enzyme was reduced with Na₂S₂O₄. The optimum pH for the protein is 5.5 and it is inhibited in the excess of H₂O₂. These results suggest that the expressed protein is a heme-containing enzyme

This work was supported by a TMR grant N° ERB4061PL970047 to Prof. L.H. Margaritis.

Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΟΥ IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ: ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Κωνσταντή, Ο.Α. και Λ.Χ. Μαργαρίτης

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 15784, Πανεπιστημιόπολη, Αθήνα

Ο in situ υβριδισμός είναι μια τεχνική ανίχνευσης νουκλεϊνικών οξέων (DNA ή RNA), στο κυτταρόπλασμα, σε οργανίδια, σε χρωμοσώματα ή στον πυρήνα βιολογικού υλικού. Η μέθοδος έτυχε μεγάλης ανάπτυξης, τα τελευταία 40 χρόνια και έχει το πλεονέκτημα της in vivo μελέτης των βιολογικών διαδικασιών. Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι in situ υβριδισμού (φθορισμού, FISH) καθώς και πολλές διαφορετικές μέθοδοι προετοιμασίας και εμπότισης του βιολογικού υλικού (τομές παραφίνης, ρητίνης ή κρυστομές ή σε ακέραιο ιστό), σήμανσης των νουκλεϊνικών οξέων (ραδιενεργά ή μη) και εμφάνιση των θέσεων υβριδισμού (οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία). Η κατανόηση των εικόνων in situ υβριδισμού απαιτεί γνώσεις κυτταρικής και μοριακής βιολογίας, γενετικής, ανοσοκυτταροχημείας και ιστοχημείας. Ένα από τα πρώτα in situ πειράματα ήταν η ανίχνευση rDNA αλληλουχιών σε παρασκευάσματα κυττάρων (Gall and Pardue 1969). Σταδιακά, ο in situ υβριδισμός χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή φυσικών χαρτών χρωμοσωμάτων, την ανάλυση της δομής των χρωμοσωμάτων και του γονιδιώματος, την έρευνα της λειτουργίας και εξέλιξης των χρωμοσωμάτων και των γονιδιωμάτων, τον καθορισμό της τοπολογικής και χρονικής έκφρασης των γονιδίων, την ανίχνευση και τον καθορισμό ιικών και βακτηριακών αλληλουχιών DNA, το καθορισμό του φύλου, τον εντοπισμό αλληλουχιών μετασχηματισμού και ογκογονιδίων και την ανάλυση νευροδιαβαστικών μηνυμάτων. Με τον in situ υβριδισμό απαντώνται θεμελιώδη βιολογικά ερωτήματα, έχοντας πλέον μία σαφέστερη εικόνα των συσχετιζόμενων κυτταρικών φαινομένων, της οργάνωσης, μεταγραφής, ωρίμανσης και μεταφοράς των αλληλουχιών. Η μέθοδος έχει ήδη σημαντικό διαγνωστικό ρόλο στην Ιατρική και σε προγράμματα βελτίωσης φυτών. Στο μέλλον, σταδιακά θα χρησιμοποιηθεί για την επίλυση σημαντικών βιολογικών προβλημάτων. Στην παρουσίαση αυτή, θα αναφερθούμε στις αρχές του in situ υβριδισμού και σε παραδείγματα εφαρμογών σε διάφορους οργανισμούς: ιούς, βακτήρια, φυτά, έντομα και θηλαστικά.

THE IN SITU HYBRIDIZATION TECHNIQUE: PRINCIPLES AND APPLICATIONS IN BIOLOGY

Konstandi, O.A., and L.H. Margaritis

Dept. of Cell Biology and Biophysics, Fac. of Biology, University of Athens, Kouponia, 15784,
Panepistimiopolis, Athens Greece

In situ hybridization is a powerful method for the localization of nucleic acid sequences (either DNA or RNA) in the cytoplasm, organelles, chromosomes or nuclei of biological material. The method has been developed for the last 40 years and has the advantage of performing studies on the biological procedures in vivo. There are many different types of in situ hybridization (usage of fluorochromes, fluorescence or FISH) and many different methods to prepare and embed material (paraffin, resin or cryo- sections, whole-mount), label nucleic acids (radioactively or non-radioactively) and visualize probe hybridization sites (light or electron microscopy). Understanding in situ hybridization requires knowledge of molecular biology, genetics, immunocytochemistry and histochemistry. One of the first in situ experiments was the detection rDNA sequences in cytological preparations (Gall and Pardue 1969). Increasingly, in situ hybridization has been used to construct physical maps of chromosomes, to analyze chromosome and genome structure, investigate the function and evolution of chromosomes and genomes, determine the spatial and temporal expression of genes, identify and characterize viral and bacterial sequences, determine sex, localize transformation sequences and oncogenes and analyze neurotransmitter messages. In situ hybridization is already giving fundamental insights into how cellular events interrelate and how sequences are organized, transcribed, spliced and transported answering in fundamental biological questions. The method has already an important role in medical diagnosis and plant breeding programmes and in the future it will increasingly address important biological problems. In this study we will refer to the in situ hybridization principles and to some application examples on different organisms: virus, bacteria, plants, insects and mammals.

ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ 18S rRNA ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ ΜΕΤΑΒΑΛΛΟΥΝ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΤΟΥ ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ ΠΑΡΟΜΟΜΥΚΙΝΗ

Κωνσταντινίδης, Θ., Πανόπουλος, Π. και Δ. Συνετός

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, 261 10 Πάτρα

Μεταλλάξεις στο 16S rRNA της *Escherichia coli*, όπως η G517A στην θηλειά 530 και οι υποκαταστάσεις C1054A ή T στην έλικα 34, έχουν εμπλακεί στη ρύθμιση της ακρίβειας της μετάφρασης. Στην *E. coli*, οι μεταλλάξεις αυτές δρουν ως καταστολείς και μειώνουν τη μεταφραστική ακρίβεια. Εξετάσαμε τη λειτουργία των αντίστοιχων μεταλλάξεων *rdn2* (G517A), *rdn1A* (C1054A) και *rdn1T* (C1054T) στο 18S rRNA της ζύμης, σε στελέχη από τα οποία έχει απομακρυνθεί το χρωμοσωμικό rDNA και όλα τα rRNA κωδικοποιούνται από το κατάλληλο πλασμίδιο. Στη ζύμη, η *rdn2* προκάλεσε φαινότυπο βραδείας ανάπτυξης και εξαιρετικά υψηλή αντίσταση έναντι της παρομομυκίνης, χαρακτηριστικό υπερακριβούς μετάλλαξης, αντίθετα προς την *E. coli*. Η μετάλλαξη *rdn1T* δεν επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη των κυττάρων αλλά προκάλεσε ήπια αντίσταση έναντι της παρομομυκίνης, δείχνοντας και αυτή χαρακτηριστικά υπερακριβούς μετάλλαξης, σε αντίθεση και πάλι προς την *E. coli*. Τέλος, η μετάλλαξη *rdn1A* προκάλεσε πολύ βραδεία ανάπτυξη και υψηλή ευαισθησία έναντι της παρομομυκίνης. Ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων τριπλασιάστηκε (240 min) έναντι αυτού των κυττάρων αγρίου τύπου, ενώ 50 % αναστολή της αύξησης παρατηρήθηκε παρουσία μόλις 10 μM παρομομυκίνης έναντι 70 μM για τα κύτταρα αγρίου τύπου. Συνεπώς, εκ των τριών μεταλλάξεων, μόνο η *rdn1A* συμπεριφέρθηκε καθ' όμοιο τρόπο τόσο στη ζύμη όσο και στην *E. coli*. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ακόμη και όταν περιοχές του rRNA είναι συντηρημένες και εμπλέκονται στις ίδιες λειτουργίες, η επίδραση συγκεκριμένων μεταλλάξεων μπορεί να διαφοροποιείται. Αρχικά πειράματα προσδιορισμού των συχνοτήτων λάθους κάθε μιας εκ των τριών μεταλλάξεων με κριτήριο την λανθασμένη ενσωμάτωση λευκίνης *in vitro*, δείχνουν ότι οι *rdn2* και *rdn1T* είναι πράγματι μεταλλάξεις περιοριστικές των λαθών, ενώ η *rdn1A* επιρρεπής στα λάθη κατά τη μετάφραση.

MUTATIONS IN YEAST 18S rRNA ALTER THE FUNCTION OF THE RIBOSOMAL ACCURACY CENTER AND THE RESISTANCE TO ANTIBIOTIC PAROMOMYCIN

Konstantinidis, Th., Panopoulos, P., and D. Synetos

Laboratory of Biochemistry, School of Medicine, University of Patras, 261 10 Patras

Several mutations in 16S rRNA of *Escherichia coli* have been implicated in the control of the accuracy of translation. They include G517A in the 530 loop and base substitutions C1054A or T in helix 34 of 16S rRNA. In *E. coli*, these mutations behave as suppressors and reduce translational accuracy. We have examined the function of the corresponding mutations *rdn2* (G517A), *rdn1A* (C1054A) and *rdn1T* (C1054T) in yeast 18S rRNA. We have used yeast strains in which all chromosomal rDNA repeats have been deleted and all cellular rRNAs are encoded by plasmid. In yeast, *rdn2* exhibited a slow growth phenotype accompanied by extreme resistance to paromomycin. These results are compatible with a hyperaccuracy-causing mutation, unlike in *E. coli*. Mutation *rdn1T* did not significantly affect growth and caused mild resistance to paromomycin, compatible with the properties of an antisuppressor mutation, in contrast to *E. coli*. Finally, mutation *rdn1A* caused very poor growth and extreme sensitivity to paromomycin. The doubling time was increased three-fold to 240 min compared to wild type, and 50 % inhibition of growth was observed in the presence of only 10 μ M paromomycin compared to 70 μ M for the wild type. Thus, of the three mutations under study, only *rdn1A* behaved as a suppressor both in yeast and in *E. coli*. These results show that even when rRNA regions are conserved and involved in the same functions, the effects of mutational changes may differ in prokaryotes and eukaryotes. Experiments are under way to examine the rate of misincorporation of the noncognate amino acid leucine and determine the error frequencies of these strains. Preliminary results indicate that *rdn2* and *rdn1T* are error-restrictive mutations, while *rdn1A* is an error-prone mutation.

Supported in part by a grant from the Karatheodoris 2000 Research Program of the University of Patras.

**ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑ SOUTHERN ΤΡΙΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ
ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΕ ΥΒΡΙΔΙΟ *Drosophila*
mauritiana / *D. melanogaster***

Κώστα Α., Νικολαΐδης Ν. και Γ.Ν. Θωμόπουλος

Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών
Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Τα μεταθετά στοιχεία (ΜΣ) είναι ευρέως διαδεδομένα στο γονιδίωμα των οργανισμών και πιθανότατα έχουν παίξει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη, μέσω της μεταφοράς γενετικού υλικού (Finnegan, 1989). Ειδικά στα *Drosophilidae*, οι ασυνέχειες στην κατανομή και στη φυλογένεση των ΜΣ έχουν συχνά εξηγηθεί με τη βοήθεια της οριζόντιας μετάθεσης (Mizokhi and Mazo, 1990). Για την κατανόηση της δυναμικής των ΜΣ και για να εκτιμηθεί η πιθανή επίδρασή τους στην εξέλιξη, χρειάζονται περισσότερα δεδομένα για την κατανομή τους σε διαφορετικά είδη. Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκε η κατανομή τριών μεταθετών στοιχείων, τα οποία ήταν το coria-like 1731, το gypsy και το gypsy-like 297 με τη βοήθεια του υβριδισμού κατά Southern, σε ένα σπάνιο διαειδικό υβρίδιο ανάμεσα στην *D. mauritiana* και την *D. melanogaster*, το "mame" (Alahiotis and Goulielmos, 1986; Goulielmos and Alahiotis, 1988) περίπου 250 γενιές μετά τη "δημιουργία" του. Τα αποτελέσματα του υβριδισμού του υβριδίου συγκρίθηκαν με αυτά των γονικών ειδών, καθώς και των ειδών *D. melanogaster* (στέλεχος C-S) και *D. auraria*. Το διαειδικό υβρίδιο mame παρουσιάζει ένα διακριτό πρότυπο υβριδισμού και για τα τρία μεταθετά στοιχεία, το οποίο διαφέρει από αυτά των γονικών ειδών του, έχει ωστόσο πολλές ομοιότητες με το πρότυπο της *D. melanogaster*. Αυτό συμφωνεί με τα δεδομένα που υπάρχουν για μορφολογικά, αναπαραγωγικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά (Alahiotis & Goulielmos 1986, Goulielmos & Alahiotis 1988, Kiliias *et al.* 1989, Kosta & Thomopoulos 2002), που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα στο υβρίδιο mame. Εάν οι παρατηρούμενες διαφορές στο γονιδίωμα του υβριδίου οφείλονται στην κάθετη μεταβίβαση των ΜΣ από τα γονικά είδη ή οφείλονται σε ενδοειδικές αναδιατάξεις κατά τη διάρκεια των 250 γενεών από τη δημιουργία του υβριδίου χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

**GENOMIC DISTRIBUTION OF THREE TRANSPOSABLE
ELEMENT SEQUENCES IN *Drosophila mauritiana* /
D.melanogaster HYBRID**

Kosta, A., Nikolaidis, N., and G.N. Thomopoulos

Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Faculty of
Sciences, Aristotle University of Thessaloniki

Transposable elements (TEs) are known to be ubiquitous components of genomes, and probably have played an important role in eukaryotic evolution through genetic transfer (Finnegan, 1989). Especially in *Drosophilidae*, incongruences in TEs distribution patterns and phylogenies have frequently been justified by invoking horizontal transfers (Mizrokhi and Mazo, 1990). To understand TEs dynamics and estimate their possible effects on evolution, data concerning their genomic distribution in different species are needed. In the present study the distribution of three transposable sequences, namely, copia-like 1731, gypsy and gypsy-like 297 was analysed by Southern hybridization, in a very rare interspecific hybrid of *D. mauritiana* and *D. melanogaster*, called "mame" (Alahiotis and Goulielmos, 1986; Goulielmos and Alahiotis, 1988) approximately 250 generations after its origin. The distribution pattern obtained was compared to that of its parental species, as well as to *D. melanogaster* strain C-S and *D. auraria*. The interspecific hybrid presents a distinct hybridization pattern compared to that of its parental species, for all three transposable element sequences tested, inclining however to that of *D. melanogaster*. The latter is consistent with previously published data (Alahiotis and Goulielmos, 1986; Goulielmos and Alahiotis, 1988; Kiliyas et al., 1989; Kosta and Thomopoulos, 2002). Whether differences observed in the hybridization patterns are due to the inheritance from its parental species, or are due to intraspecific rearrangements during its inbred period of the 250 generations, calls for further investigation.

ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΙ ΠΑΛΑΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΝΟΣ ΠΑΛΑΙΟΧΡΙΣΤΙΑΝΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΝΗΣΙ ΤΗΣ ΚΩ

Λάγια, Α., Πετρουτσά, Ε. και Σ.Κ. Μανώλης

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα

Στη μελέτη αυτή διερευνώνται δημογραφικές παράμετροι καθώς και η οδοντική και σκελετική υγεία ενός πληθυσμού της παλαιοχριστιανικής περιόδου από τα Καρδάμαινα της Κω. Συλλέχθηκαν δεδομένα για ενήλικα και ανήλικα άτομα τα οποία ανασκάφηκαν στρωματογραφικά από έναν αριθμό πολλαπλών ταφών. Στο δείγμα αντιπροσωπεύονται και τα δυο φύλα, καθώς και όλες οι ηλικιακές ομάδες. Η παρουσία ταφονομικών αλλοιώσεων με τη μορφή επιμηκών γραμμώσεων στα μακρά οστά κάνουν φανερή την έκθεση των οστών σε εξωτερικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον, η παρουσία πράσινου χρωματισμού στην επιφάνεια αυχενικών σπονδύλων ανήλικου ατόμου κάνουν φανερή την παρουσία χάλκινων αντικειμένων μεταξύ των κτερισμάτων. Η εκτίμηση της ηλικίας των ανήλικων ατόμων βασίστηκε στο βαθμό σχηματισμού των δοντιών, τη συνοστέωση των επιφύσεων και το μήκος των μακρών οστών. Αντιπροσωπεύονται όλες οι ηλικιακές ομάδες από άτομα βρεφικής έως άτομα εφηβικής ηλικίας. Η πιο κοινή ένδειξη σκελετικής παθολογίας ήταν η περιοστίτιδα στις διαφύσεις των μακρών οστών η οποία υποδεικνύει τη παρουσία μη-ειδικών μολυσματικών ασθενειών. Επιπλέον, παρατηρήθηκε πόρωση στις οφθαλμικές κόγχες και μέτριου βαθμού πορώδης υπερόσωση πράγμα που φανερώνει την παρουσία αναιμικών επεισοδίων κατά την παιδική ηλικία. Ο προσδιορισμός του φύλου και η εκτίμηση της ηλικίας θανάτου των ενήλικων ατόμων παρουσίασε δυσκολίες εξαιτίας το αναμεμιγμένου χαρακτήρα του σκελετικού υλικού. Ο προσδιορισμός του φύλου βασίστηκε σε μορφολογικά και μετρικά χαρακτηριστικά των μακρών και βραχέων οστών. Η ηλικία θανάτου βασίστηκε στις μορφολογικές μεταμορφώσεις της ωτοειδούς περιοχής της λεκάνης, στο βαθμό φθοράς της μασητικής επιφάνειας και την παρουσία εκφυλιστικών αλλοιώσεων. Μεταξύ των παθολογικών αλλοιώσεων περιλαμβάνονται ποικίλες μορφές τραύματος, εκφυλιστικές αλλοιώσεις με τη μορφή οστεοφύτων, σκλήρυνσης και πόρωσης στην άρθρωση του γονάτου, του ισχίου, καρπού, αγκώνα και ώμου, εκτεταμένες εκφυλιστικές αλλοιώσεις στη σπονδυλική στήλη, οζίδια του Schmorl καθώς και αγκύλωση φαλαγγών. Οι οδοντικές παθολογίες περιλαμβάνουν υποπλασία της αδαμαντίνης, τερηδόνα, τρυγία, εκτεταμένη απώλεια δοντιών εν ζωή και αποστήματα. Η ανάλυση αυτή έχει σκοπό να συνεισφέρει στην κατανόηση των διατροφικών και περιβαλλοντικών παραγόντων καθώς και του επιπέδου υγείας και παθολογίας ενός νησιωτικού πληθυσμού κατά την παλαιοχριστιανική περίοδο.

Η έρευνα επιχορηγήθηκε από το Υπουργείο Αιγαίου

A DEMOGRAPHIC AND PALEOPATHOLOGICAL ASSESSMENT OF A PALEOCHRISTIAN POPULATION FROM THE ISLAND OF KOS

Lagia, A., Petroutsa, I., and S.K. Manolis

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

This study investigates demographic parameters as well as dental and skeletal disease patterns of an adult and subadult population of the paleochristian era from the site of Kardamaina in Kos. Data was collected for adults and subadults that were excavated stratigraphically from a number of multiple burials. All age groups and both sexes are represented among the deceased. Taphonomic alterations with the form of longitudinal cracks indicate exposure of the bones to weathering. Green coloration on the cervical vertebrae of a subadult indicates the presence of bronze items among the grave goods. Age-at-death of the subadults was based on dental formation patterns, epiphyseal fusion and long bone length. All subadult groups are represented ranging from infants to adolescents. The most common skeletal disease indicator among subadults was periostitis on the shafts of the long bones indicating the presence of non-specific infections. Furthermore, cribra orbitalia and porotic hyperostosis were observed in cranial subadult remains revealing the presence of iron deficiency anemia during childhood. Determination of sex and assessment of age-at-death of the adults was confounded due to the commingled nature of the material. Sex determination was based on morphologic and metric characteristics of the long and short bones. Age-at-death was assessed in a limited way and was based on the morphological transformations of the auricular area, on dental wear and on the presence of degenerative changes. Pathologic lesions include various forms of trauma (such as severe trauma of the elbow joint followed by post-traumatic osteoarthritis), degenerative lesions in the form of osteophytosis, eburnation and porosity at the knee, hip, wrist, elbow and shoulder joints, osteochondritis dissecans of the knee joint, extensive spinal degenerative joint disease, Schmorl's nodes and ankylosis of hand phalanges. Dental pathologies include enamel hypoplasia, caries, extensive antemortem tooth loss, calculus formation and abscesses. This analysis is aimed to contribute to our understanding of dietary and environmental factors as well as health and disease patterns and in an island population of the paleochristian era.

The Hellenic Ministry of Aegean supported this research.

ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΦΥΛΟΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *Sxl* ΚΑΙ *dsx* ΣΤΟ ΕΝΤΟΜΟ *Bactrocera oleae*

Λαγός, Δ.Ι. και Κ. Κομητοπούλου

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα γονίδια *dsx* (doublesex) και *Sxl* (sex-lethal) που θεωρείται ότι εμπλέκονται στην φυλοκαθοριστική διαδικασία, στο έντομο *Bactrocera oleae*. Και τα δύο γονίδια συμμετέχουν σε μία ιεραρχική αλληλουχία γονιδίων με το *Sxl* να βρίσκεται στην κορυφή του καταρράκτη και το *dsx* να έχει το ρόλο του τελικού αποδέκτη αλλά και κύριου ρυθμιστή της διαδικασίας.

Για την απομόνωση των γονιδίων *dsx* και *sxl* κατασκευάστηκαν cDNA βιβλιοθήκες ενήλικων θηλυκών και αρσενικών ατόμων και μια γενωμική.

Για το γονίδιο *dsx*, η σάρωση των cDNA βιβλιοθηκών έγινε με ανιχνευτή, τμήμα RT-PCR. Μελέτη και ανάλυση των κλώνων που απομονώθηκαν, έδειξε την ύπαρξη δύο διαφορετικών ειδών cDNA που προκύπτουν από διαφορεική συρραφή των mRNAs ανάμεσα στα δύο φύλα. Η οργάνωση του γονιδίου καθορίστηκε μετά από τη χαρτογράφηση μιας σειράς γενωμικών κλώνων που προέκυψαν από διαδοχικές σαρώσεις της γενωμικής βιβλιοθήκης, με τα κατάλληλα τμήματα των cDNA κλώνων. Το γονίδιο καταλαμβάνει μία χρωμοσωμική περιοχή 55kb, με 6 εξώνια (3 κοινά, ένα θηλεοειδικό και δύο αρρενοειδικά) διατηρώντας την οργάνωση συντηρητική με τη *D.melanogaster*. Η μελέτη της έκφρασης του *dsx* έγινε με ανάλυση κατά Northern και έδειξε μηνύματα μεγέθους 2.9kb στα θηλυκά και 3.3kb στα αρσενικά άτομα.

Σάρωση των αντίστοιχων βιβλιοθηκών για το γονίδιο *Sxl* έγινε με μόριο ανιχνευτή ένα τμήμα RT-PCR. Μελέτη των cDNA κλώνων ανέδειξε όμοια μετάγραφα (2.5-3.2kb) και στα δύο φύλα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και από ανάλυση κατά Northern και RT-PCR που έδειξαν το ίδιο προτύπο μηνυμάτων και στα δύο φύλα. Όπως έχει γίνει γνωστό από αντίστοιχες μελέτες και σε άλλα έντομα εκτός της οικογένειας των Δροσοφιλίδων (*C.capitata* και *M.domestica*) το *Sxl* του *B.oleae* φαίνεται να μην διατηρεί το ρόλο του βασικού ρυθμιστή που ελέγχει το φυλοκαθορισμό, όπως στη *D.melanogaster*. Η χρωμοσωμική οργάνωση και δομή του γονιδίου είναι υπό μελέτη.

Το ερευνητικό έργο χρηματοδοτήθηκε από τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του Παν/μιου Αθηνών ΕΛΚΕ 70/4/5706

STRUCTURE AND ORGANIZATION OF THE SEX-SPECIFIC GENES *Sxl* AND *dsx* IN THE INSECT *BACTROCERA OLEAE*

Lagos, D.I., and K. Komitopoulou

Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis 157 84 Athens Greece

In the present study the genes *dsx* (double-sex) and *Sxl* (sex-lethal), which are considered to have a crucial role in sex-differentiation, were characterized in the insect *Bactrocera oleae*. Both genes are part of the regulatory cascade controlling sexual development. *Sxl* is located at the top of the cascade, whereas *dsx* at the bottom of it, is the major gene which further induces and establishes sexual differentiation.

For the *dsx* and *Sxl* isolation two adult *B.oleae* female and male cDNA libraries were constructed along with a genomic library.

A *dsx* RT-PCR fragment was used as probe to screen the cDNA libraries. Analysis of the derived sex-specific clones, revealed the occurrence of an alternative splicing pattern between the two sexes. The organization of the *dsx* gene was defined after successive screenings of the genomic library using the appropriate fragments of the cDNA clones. The *B.oleae dsx* gene seems to maintain the *D.melanogaster dsx* structure with 6 exons (3 common in both sexes, 1 female and 2 male specific) and it covers a 55kb region of genomic sequence. The *dsx* expression profile was determined by Northern analysis and confirmed the existence of sex-specific transcripts of 2.9kb in females and 3.3kb in males.

In order to isolate *Sxl* cDNA clones, the cDNA libraries were screened using an *Sxl* RT-PCR fragment. Sequencing of the sex-specific cDNA clones showed the presence of identical transcripts of variable size (2.5-3.2kb) in both sexes. Expression analysis by Northern hybridization also revealed an identical pattern of *Sxl* female and male transcripts. Our conclusion is in agreement with similar studies in other insect families (*C.capitata*, *M.domestica*) where it seems that *Sxl* is not functionally conserved between them and the *Drosophilidae* family.

Supported by the Special Account for Research Grants of Athens University SARG 70/4/5706

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΣΤΗ ΜΕΤΑ- ΓΩΓΗ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΑ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ

Αντιγόνη Λάζου

Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ.

Τα μυοκύτταρα της καρδιάς είναι τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα που αποκρίνονται σε διάφορα νευροορμονικά ή μηχανικά ερεθίσματα με αύξηση του μεγέθους τους (υπερτροφία) παρά με κυτταρική διαίρεση. Η υπερτροφία είναι μία σημαντική διαδικασία προσαρμογής in vivo, η οποία, βραχυπρόθεσμα τουλάχιστον, επιτρέπει τη διατήρηση της καρδιακής παροχής. Η αντίδραση της υπερτροφίας χαρακτηρίζεται από μεταβολές στη μορφολογία των κυττάρων καθώς και στην έκφραση γονιδίων. Οι ενδοκυτταρικοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται κατά τη διαδικασία αυτή είναι σύνθετοι και περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση μικρών G πρωτεϊνών, πρωτεϊνικών κινάσων και μεταγραφικών παραγόντων. Σημαντικό ρόλο φαίνεται ότι παίζουν οι κινάσες που ενεργοποιούνται από τα μιτογόνα (MAPK). Οι κινάσες αυτές αποτελούν μία οικογένεια κινάσων Ser/Thr, οι οποίες ενεργοποιούνται ως αντίδραση σε μία πληθώρα διεγέρσεων, σε πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων και μπορεί να αποτελούν το σύνδεσμο μεταξύ των εξωκυτταρικών ερεθισμάτων και της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Στα καρδιακά μυοκύτταρα από ενήλικο αρουραίο, υπερτροφικοί παράγοντες όπως είναι οι α₁ αδρενεργικοί αγωνιστές και η ενδοθηλίνη-1 ενεργοποιούν και τις τρεις υποοικογένειες των MAPK (ERKs, JNKs, p38 MAPK). Επιπλέον, οι ίδιοι παράγοντες φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν μία άλλη κινάση, την MSK1 (mitogen- and stress-activated protein kinase-1) η οποία έχει χαρακτηριστεί πρόσφατα και θεωρείται ότι αποτελεί υπόστρωμα τόσο των ERKs όσο και των p38 MAPK. Η φωσφορυλίωση της MSK1 στα καρδιακά μυοκύτταρα απαιτεί την ταυτόχρονη ενεργοποίηση δύο υποοικογενειών MAPK (ERKs, p38 MAPK), όπως φαίνεται με τη χρήση κατάλληλων αναστολέων των κινάσων αυτών. Ο φυσιολογικός ρόλος της MSK1 είναι απόλυτα γνωστός αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι στα καρδιακά μυοκύτταρα ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα, CREB (cAMP responsive element binding protein) με φωσφορυλίωση στη Ser133. Η ενεργοποίηση του CREB μπορεί να ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση κατά την υπερτροφία της καρδιάς.

THE ROLE OF PROTEIN KINASE SIGNAL TRANSDUCTION IN CARDIAC HYPERTROPHY

Antigone Lazou

Laboratory of Animal Physiology, Dept. of Zoology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki

Mammalian cardiac myocytes are terminally differentiated cells that respond to neurohumoral or mechanical stimuli by an increase in cell size rather than cell division. Cardiac hypertrophy is an important adaptive response in vivo that, at least in the shorter term, allows the organism to maintain or increase its cardiac output. The hypertrophic response is associated with alterations in gene expression and cell morphology. The intracellular signaling events activated in this response are complex and they involve the activation of small G proteins, protein kinases and transcription factors. Recently, much attention has focused on the regulation of the MAPK (mitogen-activated protein kinases) cascades. These kinases are a large family of Ser/Thr protein kinases that are activated in response to a variety of different stimuli in many cell types and may provide a link from the extracellular stimuli to the regulation of gene expression. In adult rat cardiac myocytes, hypertrophic agents such as α_1 -adrenergic agonists and endothelin-1, activate all three MAPK subfamilies (ERKs, JNKs, p38 MAPK). Furthermore, they phosphorylate and activate MSK1 (mitogen- and stress- activated protein kinase-1), a recently identified protein kinase that it appears to be a substrate of both ERKs and p38 MAPK. In cardiac myocytes, phosphorylation of MSK1 requires the simultaneous activation of both ERKs and p38 MAPK, as evidenced by the use of specific inhibitors of these cascades. The physiological role of MSK1 has not been elucidated yet but, we present evidence that, in cardiac myocytes, MSK1 activates the transcription factor CREB by phosphorylation on Ser133. Activation of CREB may regulate expression in cardiac hypertrophy.

C1r- I_p (C1r-LIKE PROTEIN): ΜΙΑ ΝΕΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ

Λιγουδιστιανού, Χ., Garnier, G., Circolo, A., Βολανάκης, Ι.

Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "ΑΛ. ΦΛΕΜΙΓΚ", Βάρη

Πρόσφατες μελέτες στο εργαστήριο μας αποκάλυψαν ένα νέο γονίδιο ποντικού, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, τύπου C1r. Σε τράπεζα δεδομένων βρέθηκε cDNA που κωδικοποιεί μια παρόμοια ανθρώπινη C1r-I_p. Με RT-PCR σε RNA από ανθρώπινο ήπαρ, απομονώσαμε έναν κλώνο cDNA που περιέχει το πλήρες αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου του C1r-I_p. Το γονίδιο C1r-I_p κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 53.4 kDa, η οποία αποτελείται από μία CUB δομική μονάδα (module), μία μη τυπική CCP δομική μονάδα, ένα συνδετικό τμήμα και μία δομική περιοχή (domain) σερινικής πρωτεάσης (ΣΠ). Η πρωτεΐνη περιέχει 7 πιθανές θέσεις γλυκοσυλίωσης και παρουσιάζει 52% ποσοστό ομοιότητας της αμινοξικής της αλληλουχίας με την αντίστοιχη αλληλουχία του C1r. Το τμήμα ΣΠ της C1r-I_p έχει συντηρήσει τα δομικά στοιχεία λειτουργικής σημασίας των σερινικών πρωτεασών, συμπεριλαμβανομένης της καταλυτικής τριάδας His-Asp-Ser. Εντούτοις, στη θέση που αντιστοιχεί στον πυθμένα του θυλάκου εξειδίκευσης των τυπικών σερινικών πρωτεασών, η C1r-I_p έχει Ser αντί του τυπικού Asp των ΣΠ με εξειδίκευση τρυψίνης. Επιπλέον, η C1r-I_p δεν έχει Arg στο σημείο διάσπασης/ενεργοποίησης ούτε τη συντηρημένη αμινοτελική αλληλουχία ενεργών ΣΠ. Northern blot ανάλυση σε πολυ-A⁺ RNA από ανθρώπινους ιστούς, ανέδειξε δύο ζώνες των 3.1 και 4.1 Kb κυρίως στο ήπαρ. Εν αντιθέσει, το mRNA του C1r ανιχνεύθηκε ως ζώνη περίπου 2.4 Kb, όχι μόνο στο ήπαρ αλλά και σε άλλους ιστούς. Το μεγάλο μέγεθος του mRNA του C1r-I_p οφείλεται στη μεγάλη μήκους μη μεταφραζόμενης περιοχής του 3'-άκρου. Η παρουσία δύο ζωνών εξηγείται πιθανά από την ύπαρξη πολλαπλών αλληλουχιών πολυαδενυλίωσης. Τμήμα της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του C1r-I_p εκράστηκε σε *E.coli* και χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή C1r-I_p αντιορού. Western blot ανάλυση ανθρώπινου ορού έδειξε την παρουσία της C1r-I_p στον ορό ως ζώνη των 68 kDa, η οποία αντιστοιχεί σε γλυκοσυλιωμένη της μορφή. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε ανθρώπινο ορό, χρησιμοποιώντας C1q, C1r, C1s ή C1r-I_p αντιορό, δεν έδειξαν σύνδεση της C1r-I_p με τα υπόλοιπα συστατικά του C1-συμπλέγματος. Επιπρόσθετα, ανασυνδυασμένη C1r-I_p εκφράστηκε σε κύτταρα θηλαστικών CHO-K1. Η καθαρή, απομονωμένη C1r-I_p θα ελεγχθεί για την πιθανή εστερολυτική και πρωτεολυτική δραστηριότητα της.

C1r-LIKE PROTEIN (C1r-LP): A NOVEL HUMAN COMPLEMENT-RELATED PROTEIN

Ligoudistianou, C., Garnier, G., Circolo, A., Volanakis, J.E.

Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming", Vari, Greece

Previous work in our laboratory revealed a novel murine gene encoding a C1r-like protein (C1r-lp). A database search identified a cDNA encoding a similar human C1r-lp. Using human liver RNA we have obtained by RT-PCR a cDNA clone containing the full length open reading frame for C1r-lp. It predicts a 53.4 kDa protein consisting of a leader peptide, a CUB module, an atypical CCP module, a connecting segment (CS) and a serine protease (SP) domain. It contains 7 potential N-linked glycosylation sites and has 52% residue identity with the corresponding regions of human C1r. The SP domain of C1r-lp has conserved structural elements of functional significance to SP, including the His-Asp-Ser catalytic triad. However, at the position corresponding to the bottom of the specificity pocket of typical SP, C1r-lp has a Ser residue instead of the invariant Asp of enzymes with trypsin-like specificity. Furthermore, C1r-lp lacks the activating/cleavage site Arg and the conserved aminoterminal sequence of active SP. Northern blot analysis of poly-A⁺ RNA from several tissues revealed the presence of two bands of 3.1 and 4.1 kb, respectively, mainly in the liver. In contrast, C1r mRNA of about 2.4 Kb was detected not only in the liver, but also in several other tissues. The large size of the C1r-lp mRNA is due to a very long 3'-UTR. The presence of multiple polyadenylation signals could possibly explain the double band. The nucleotide sequence encoding the CUB, CCP and CS modules was expressed in *E. coli* and the resulting protein fragment used to raise a rabbit antiserum. Western blot analysis of human serum showed the presence of a single C1r-lp band of about 68 kDa which corresponds to a fully glycosylated form of C1r-lp. Immunoprecipitation experiments using human serum and antisera to C1q, C1r, C1s or C1r-lp, failed to demonstrate an association of C1r-lp with the C1-complex or any of its components. The full length recombinant protein is being expressed in CHO-K1 cells. The purified C1r-lp will be used to test its potential esterolytic and proteolytic activity.

ΑΠΟ ΤΟ ΜΕΓΑΛΕΞΑΝΔΡΟ ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΩΦΕΛΟΥΣ: ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

Λούης Κίτσος

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης και Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας,
ΙΤΕ, Ηράκλειο

Δεν υπάρχει άλλο ζώο που έχει επηρεάσει σε τόσο μεγάλο βαθμό τον ρού της πολιτικής και της κοινωνικής ιστορίας όσο τα κουνούπια. Πράγματι, μέσω των πλασμωνδίων της ελονοσίας που μεταφέρουν, οι ανωφελείς κώνωπες ήταν υπεύθυνοι για την πανωλεθρία των Αθηναίων στις Συρακούσες και τον πρόωρο θάνατο του Μέγα Αλέξανδρου, τον αποδεκατισμό των αποικιοκρατικών στρατών των περασμένων δύο αιώνων και τον θάνατο χιλιάδων στρατιωτών στους δύο παγκόσμιους πολέμους. Κι ενώ στον λεγόμενο πολιτισμένο κόσμο η ασθένεια αυτή έχει πρακτικώς εξολοθρευθεί, στις τροπικές περιοχές όλων των ηπείρων η ελονοσία με 500 εκατομμύρια κρούσματα και περίπου 2 εκατομμύρια νεκρούς ετησίως καταδικάζει σε οικονομικό μαρασμό μεγάλες περιοχές του πλανήτη μας. Παρά τις μεγάλες προσπάθειες του Π.Ο.Υ. και άλλων διεθνών και κρατικών φορέων υγείας, ο έλεγχος της ελονοσίας είναι ακόμα αδύνατος. Και αυτό οφείλεται σε γεωγραφικά και κοινωνικά δεδομένα, στην αδυναμία περιορισμού των πληθυσμών των κουνουπιών φορέων στις τροπικές χώρες, και τέλος, στην ανθεκτικότητα των πλασμωνδίων σε ανθελνοσιστικά φάρμακα και την έλλειψη αποτελεσματικού εμβολίου.

Όμως, μια μικρή ελπίδα έχει αρχίσει να διαφαίνεται στον ορίζοντα της επιστημονικής προόδου. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των γονιδιωμάτων του ανθρώπου και του πλασμωνδίου, και σύντομα του *Anopheles gambiae*, κυριότερου φορέα στην Αφρική, ανοίγει δρόμους για την αποτελεσματικότερη καταπολέμηση της ασθένειας. Η πρόοδος στη μοριακή βιολογία και τη γενετική των ανωφελινών επιτρέπει μια μικρή αισιοδοξία ότι στο μέλλον θα γίνει πιθανώς εφικτός ο έλεγχος των φορέων και πέρα από τον "Βορά". Αν αυτό αποτελέσει πραγματικότητα, θα γίνει δυνατή η σταδιακή υποχώρηση της ελονοσίας και στο τροπικό περιβάλλον, όπως έγινε και στην Ευρώπη το δεύτερο μισό του περασμένου αιώνα. Η ομιλία αυτή θα δώσει μια περίληψη των νεωτέρων αυτών αποτελεσμάτων με παραδείγματα από το εργαστήριο της Κρήτης.

FROM ALEXANDER THE GREAT TO MOLECULAR BIOLOGY OF *ANOPHELES*: BEFORE AND AFTER THE GENOME

Kitsos Louis

Dept. of Biology, University of Crete and Institute of Molecular Biology and Biotechnology, FORTH,
Heraklion

No animal has had such a profound effect on the shaping of political and social history as mosquitoes. Indeed, through the malaria *Plasmodia* carried by them, anophelines have been responsible for the disastrous defeat of the Athenians at Syracuse and the premature death of Alexander the Great, for the decimation of colonial armies during the previous two centuries and for the death of thousands of soldiers during the two world wars. While this disease has been practically eradicated from the so-called civilised world, in the tropical regions of all continents malaria, with 500 million cases and roughly 2 million deaths per year still sentences to economic decline large areas of the earth. In spite of the extensive effort of W.H.O. as well as of additional international and national health agencies, malaria control is almost impossible. This is due to geographical and social facts, to the impossibility of restricting vector mosquito populations, and finally to the resistance developed by *Plasmodia* against antimalarial drugs as well as the absence of an effective vaccine.

A small hope, though, is visible on the horizon of scientific progress. The sequencing of the human and *Plasmodium* genome, soon to be complemented by that of *Anopheles gambiae*, the major vector in Africa opens up ways for a more efficient fight against the disease. Progress in anopheline Molecular Biology and Genetics allows for some optimism regarding a potential vector control beyond the "North". If this comes true it will be feasible for malaria to slowly retreat from the tropical environment as well, as was the case in Europe in the second half of the previous century. This talk will summarise these results offering examples from the Crete laboratory.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΤΟΥ ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΤΟΥ ΒΑΤΡΑΧΟΥ *Rana ridibunda*

Λουμπουρδής Νικόλαος

Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας Α.Π.Θ., Τ.Κ.52441, Θεσσαλονίκη

Μελετήθηκε η διασπορά του υδραργύρου σε ιστούς του βατράχου *Rana ridibunda*. Τα ζώα εκτέθηκαν για 10 ημέρες σε 1ppm υδατικού διαλύματος υδραργύρου με τη μορφή $HgCl_2$. Οι ιστοί που μελετήθηκαν ήταν το ήπαρ, οι νεφροί, ο πεπτικός σωλήνας και γραμμωτοί μύες. Για τον εντοπισμό του μετάλλου εφαρμόστηκε η μέθοδος της αυτομεταλλογραφίας (AMG). Στο ήπαρ, υδράργυρος αρχικά εντοπίστηκε στα κύτταρα του ενδοθηλίου των κολλοειδών τριχοειδών και στη συνέχεια εμφανίσθηκε στα ηπατοκύτταρα. Λίγος υδράργυρος εντοπίστηκε στα μελανομακροφάγα. Στους νεφρούς, σχεδόν αποκλειστικά εμφανίσθηκε στα εγγύς εσπειραμένα νεφρικά σωληνάκια. Βέβαια, κάποια ποσότητα εμφανίσθηκε και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών. Στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια παρατηρήθηκε μια ανομοιόμορφη κατανομή του υδραργύρου, μια πιθανή ένδειξη ότι η δομή τους πιθανόν να μην είναι η ίδια σε όλο το μήκος τους και να υπάρχει διαφορά στην ικανότητα επαναρρόφησης. Στο πεπτικό σύστημα η συγκέντρωση του υδραργύρου έβαινε αυξανόμενη από τον οισοφάγο προς το παχύ έντερο. Ο κύριος όγκος του υδραργύρου συγκεντρωνόταν στα κιονοειδή κύτταρα και μια μικρή ποσότητα στα μακροφάγα. Μεγάλες συγκεντρώσεις υδραργύρου παρατηρήθηκαν επίσης στη βλέννα του γλυκοκάλυκα. Στα γραμμωτά μυϊκά κύτταρα δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση υδραργύρου. Πολύ μικρές ποσότητες παρατηρήθηκαν στους ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών.

MERCURY DISTRIBUTION IN THE TISSUES OF THE FROG *Rana ridibunda*

Loumbourdis Nikolaos

Department of Zoology, University of Thessaloniki, GR 52441. Thessaloniki, Greece

The distribution of mercury in the tissues of the frog *Rana ridibunda* was investigated. The animals were exposed in 1 ppm aqueous solution of mercury as $HgCl_2$ for 10 days. The studied tissues were: liver, kidneys, the entire gut and striated muscles. For the histological localization of mercury, the autometallographic (AMG) method was employed. In the liver, mercury initially was localized in the endothelial sinusoidal cells. Later on, they were detected in the hepatocytes and melanomacrophages. In the kidneys, mercury was detected nearly exclusively in the Proximal Convoluting Tubules (PCT) and the endothelial cells covering the lumen of the capillaries. The distribution of mercury was not uniform in the PCT, a possible indication that their structure is not similar in their entire length. In the gut, the concentration of mercury was continuously increased from esophagus to large intestine. The bulk of mercury was concentrating in the columnar cells and in macrophages. Heavy mercury concentration was also detected in the mucus of the glycocalyx. In the striated muscles, no mercury was detected. A few granules were observed in the fibroblasts and in the endothelial cells of capillaries.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΣΤΟ ΚΩΔΙΚΟΝΙΟ 129 ΓΟΝΙΔΙΟΥ PRNP ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

Μαζμανιάν, Ν., Σαέττα, Α., Πατσούρης, Ε., Μιχαλόπουλος, Ν., Δάβαρης, Π.

Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικό, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο
 Αθηνών, Μ. Ασίας 75 Γουδί Αθήνα

ΣΚΟΠΟΣ: Η σημασία διερεύνησης του γονότυπου στο κωδικόνιο 129 του γονιδίου PRNP για την πρωτεΐνη πρίον (PrP) στο γενικό πληθυσμό είναι μεγάλη, διότι υπάρχουν ενδείξεις ότι άτομα ομόζυγα Met/Met εμφανίζουν προδιάθεση για ανάπτυξη νοσήματος ριπιο (σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας) σποραδικής, ιατρογενούς αλλά και παραλλαγμένης μορφής (vCJD). Σημειωτέον ότι όλοι οι ασθενείς της παραλλαγμένης μορφής της νόσου είναι ομόζυγοι Met/Met. Στην παρούσα εργασία έγινε ανάλυση του γονότυπου στο κωδικόνιο 129 στον Ελληνικό πληθυσμό και προσδιορίστηκε το ποσοστό ομοζυγωτίας Met/Met και Val/Val καθώς και ετεροζυγωτίας Met/Val.

ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ: Μελετήθηκαν 198 υγιή άτομα, από τα οποία ήταν γνωστά το φύλο και η ηλικία, από το γενικό πληθυσμό του νομού Αττικής. Αρχικά έγινε απομόνωση DNA από αίμα των υπό εξέταση ατόμων και εφαρμόστηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση του εξωνίου 3 του γονιδίου PRNP. Ο γονότυπος καθορίστηκε μετά από πέψη του προϊόντος PCR με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες MaeII και NspI και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Τα ποσοστά των γονότυπων που ανιχνεύθηκαν είναι τα παρακάτω:

Περιπτώσεις	Γονότυπος	Ποσοστό
101	MM	51%
77	MV	39%
20	VV	10%

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Στο υλικό που μελετήθηκε από την περιοχή του νομού Αττικής παρατηρήθηκαν ποσοστά γονότυπων παρόμοια με άλλους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Για την εξαγωγή στατιστικώς ασφαλών αποτελεσμάτων πρόκειται να διερευνηθεί μεγαλύτερο πλήθος ατόμων.

Η παραπάνω έρευνα χρηματοδοτήθηκε από τον ΕΛΚΕ του Πανεπιστημίου Αθηνών

PRNP GENE CODON 129 GENOTYPING IN THE GREEK POPULATION

Mazmanian, N., Saetta, A., Patsouris, E., Michalopoulos, N., Davaris, P.

Dept. of Pathology, Medical School, University of Athens, M. Asias 75 Goudi, Athens, Greece

AIM: The aim of this study was to determine the codon 129 of the prion protein gene genotype distribution in the Greek population. The polymorphism at codon 129 is considered to be important as it is suggested that homozygous individuals may be susceptible to CJD. An over-representation of MM homozygotes has been observed in sporadic CJD in comparison to the general population and moreover all cases of vCJD (variant CJD) analyzed up to date are of the MM genotype at codon 129 of the PRNP gene.

MATERIALS-METHODS: For the determination of codon 129 genotype blood samples taken from 198 individuals of the general population were used for DNA extraction and PCR amplification of exon 3 of the PRNP gene. The genotype was determined after digestion of the PCR product with restriction enzymes MaeII and NspI and agarose gel electrophoresis.

RESULTS: Codon 129 genotyping gave the following results:

Cases	Codon 129 Genotype	Percentage (%)
101	MM	51
77	MV	39
20	VV	10

CONCLUSION: The observed genotype percentages of the general population of Attiki were similar to those of other European populations previously reported. A larger group of individuals will be studied in order to draw statistically significant results.

The above study was partially funded by ELKE- Athens University

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟ-
ΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ΘΡΑΥΣΜΑ-
ΤΩΝ DNA ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ****Μαΐστρος, Α.Δ.¹, Μπουγά, Μ.², Παπασωτηρόπουλος, Β.², Κίλιας, Γ.² και
Σ. Αλαχιώτης²**¹Μηχανολόγος-Ηλεκτρολόγος Μηχανικός, ²Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης,
Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα.

Αναπτύχθηκε μια υπολογιστική μέθοδος με την οποία προσδιορίζεται η πιθανή αλληλουχία στα άκρα των θραυσμάτων του DNA που προκύπτουν με την τεχνική RFLP's. Η μέθοδος αυτή συνίσταται σε μία συστηματική διερεύνηση μέσω σειράς συγκριτικών ελέγχων, όλων των πιθανών συνδυασμών διάταξης των θραυσμάτων αυτών μεταξύ τους, σε σχέση με γνωστή αλληλουχία βάσεων αντίστοιχου τμήματος DNA. Η μέθοδος αυτή επίσης επιβεβαιώνει τα προκύπτοντα από την πειραματική διαδικασία μεγέθη (αριθμός βάσεων) των θραυσμάτων του DNA, μειώνοντας την αβεβαιότητα από τα σφάλματα οπτικής ανάγνωσης των ηχημάτων και ακόμη προσδιορίζει και επιβεβαιώνει την ύπαρξη σε διαφορετικά πρότυπα κοινών θέσεων αναγνώρισης. Χρησιμοποιείται κατάλληλη επαναληπτική μέθοδος, στηριζόμενη σε πολυπαραμετρικό αλγόριθμο, στην οποία λαμβάνεται υπ' όψη μία σειρά παραμέτρων, όπως η αλληλουχία των βάσεων και η θέση "κοπής" από το αντίστοιχο ένζυμο περιορισμού, καθώς και τα μεγέθη των θραυσμάτων (αριθμός βάσεων) που έχουν προκύψει από την πειραματική διαδικασία. Οι υπολογισμοί αναπτύχθηκαν στο MS-Excel™, μέσω συναρτήσεων, μακροεντολών και MS-VBA™. Εφαρμόστηκε σε θραύσματα τμημάτων τριών γονιδίων, των 16s rDNA (965 bp), CO I (1028 bp) και ND5 (822 bp) του mtDNA φυλών της μέλισσας *Apis mellifera*, που προέκυψαν με τη μέθοδο RFLP's. Η γνωστή αλληλουχία, βάσει της οποίας έγινε η σύγκριση ήταν από το χαρτογραφημένο γονιδίωμα του mtDNA της ιταλικής μέλισσας *A. m. ligustica*. Για το γονιδιακό τμήμα του 16s rDNA χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού: Sau3A I, Ssp I, Dra I, Hinc II, EcoR I, Pst I, Alu I, για το γονιδιακό τμήμα του CO I: Nco I, Sau3A I, Fok I, Bcl I, Ssp I, Sty I, BstU I, Xho I και για το γονιδιακό τμήμα του ND5: Dra I, Taq I, Nla III, Alu I, Hinc II, Fok I και Ssp I. Με αυτή τη μέθοδο προσδιορίστηκαν επακριβώς 34 θέσεις περιορισμού και 178bp.

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR COMPUTATION OF DNA RESTRICTION FRAGMENTS ORDER AND COMPARATIVE APPLICATION

**Maistros, A.D.¹, Bouga, M.², Papisotiropoulos, V.², Kiliass, G.² and S.
Alahiotis²**

¹ Mechanical and Electrical Engineer, ² Division of Genetics, Cell Biology and Development,
Department of Biology, University of Patras, Patras, Greece.

A computing method has been developed to define the most probable order of DNA gene fragments. It is also used to identify the sequence of the DNA end-fragments. The DNA gene fragments are originally detected using RFLP's method.

The above method performs a systematic comparison over all the possible combinations in correlation with known DNA sequence. This approach offers a validation of gene fragment size detected with RFLP's method as well as the common recognized sites in different haplotypes. It also minimizes the uncertainty in gel reading. A suitable recursive method is adopted based on a multivariate algorithm with parameters, such as gene fragment size, restricted enzymes sequence, and recognized sites. Functions, macros, and MS-VBA™ are used for the calculations on MS-Excel™.

This method is applied on 16s rDNA (965 bp), CO I (1028 bp) and ND5 (822 bp) mitochondrial gene fragments of Greek races of honeybee *Apis mellifera*. The comparison is with the known mtDNA genome of Italian honeybee *A. m. ligustica*. Sau3A I, Ssp I, Dra I, Hinc II, EcoR I, Pst I, Alu I, are the restricted enzymes that recognize sites for 16s rDNA gene; Nco I, Sau3A I, Fok I, Bcl I, Ssp I, Sty I, BstU I, Xho I for CO I; Dra I, Taq I, Nla III, Alu I, Hinc II, Fok I, and Ssp I for ND5 gene. Thirtyfour recognized sites and 178 bp are identified with this method.

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ β, ΣΕ
ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΑΠΟ ΕΝΔΙΑΜΕΣΗ β-ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ
ΑΝΑΙΜΙΑ, ΠΟΥ ΔΕΝ ΦΕΡΟΥΝ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΗΡFH**

Μακροπούλου Π. και Α. Παπαχατζοπούλου

Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο 26500 Πάτρα.

Μελετήθηκαν ενήλικα άτομα, που πάσχουν από ενδιάμεση β-Μεσογειακή αναιμία. Τα άτομα αυτά φέρουν μεταλλάξεις που συνδέονται με φαινότυπο βαρείας β-Μεσογειακής Αναιμίας, αλλά εμφανίζουν ενδιάμεσο φαινότυπο λόγω αυξημένων επίπεδων HbF, απουσία συνδρόμου ΗΡFH με επίπεδα ολικής αιμοσφαιρίνης περί τα 8g/dl χωρίς μεταγγίσεις. Στα άτομα αυτά έγινε *in vitro* προσδιορισμός του βιοσυνθετικού λόγου(β+γ/α)αλυσίδων, ο οποίος αντικατοπτρίζει την ικανότητα του πάσχοντα να παράγει σφαιρινικές αλυσίδες.

Η γονοτυπική ανάλυση του κάθε πάσχοντα αφορούσε τον προσδιορισμό των μεταλλάξεων β-Μεσογειακής Αναιμίας στο γονίδιο της σφαιρίνης β, μεταλλάξεις ή ανακατατάξεις σε άλλα γονίδια του συμπλέγματος των γονιδίων της σφαιρίνης β και α, προσδιορισμό του απλοτύπου και τέλος ανάλυση της πρωτοταγούς δομής περιοχών, οι οποίες βρίσκονται πέραν του 5' άκρου του κλασσικού υποκινητή των γονιδίων των σφαιρινών β και γ, καθώς και των θέσεων HS2 και HS3 της περιοχής LCR. Συγκεκριμένα στο γονίδιο της σφαιρίνης β πέρα του 5' άκρου του υποκινητή του υπάρχουν μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (motifs) του τύπου (AT)_xTψ. Επίσης στην θέση HS2 υπάρχουν motifs του τύπου 10AT.2CA.2TA.CG.11TA, καθώς και σημειακές μεταλλάξεις. Τα motifs αυτά αναγνωρίζονται από γενικές, αλλά και ειδικές πυρηνικές πρωτεΐνες. Η παρουσία αυτών των motifs σε χρωμοσώματα πασχόντων, φαίνεται να συνδέεται με την εμφάνιση του ενδιάμεσου φαινοτύπου των και να σηματοδοτεί την ικανότητα των ατόμων αυτών να παράγουν υψηλά επίπεδα HbF.

Η λεπτομερής μοριακή ανάλυση των συγκεκριμένων περιοχών του συμπλέγματος των γονιδίων της σφαιρίνης β των πασχόντων αυτών από ενδιάμεση β-Μεσογειακή Αναιμία συμβάλλει στην διαλεύκανση των μηχανισμών που ενέχονται στην παράγωγή αυξημένων επιπέδων HbF.

*Το ερευνητικό έργο επιχορηγείται από την Επιτροπή Ερευνών Πανεπιστημίου Πατρών,
Πρόγραμμα Κ. Καραθεοδωρή*

MOLECULAR ANALYSIS OF THE HUMAN β -GLOBIN GENE CLUSTER IN NON HPFH β -THALASSAEMIA INTREMEDIA PATIENTS

Makropoulou, P. and A. Papachatzopoulou

Laboratory of General Biology, Medical School, University of Patras, Rio 26500 Patras

We have studied non HPFH β -thalassaemia intermedia patients with elevated levels of HbF, carrying β -thalassaemia mutations usually associated with β -thalassaemia major phenotype. Their total hemoglobin level was about 8g/dl, without transfusions.

The biosynthetic ratio of (β + γ / α) globin chains of these patients, which reflects their ability to produce α , β and γ globin chains, was determined by in vitro biosynthesis.

The genetic analysis involved the determination of the β -thalassaemia mutations, the haplotypes, mutations and rearrangements in the β or/and α clusters. We present here the analysis of the sequences of the 5' prime end upstream of the promoter of the β and γ globin genes, as well as sequences in the HS2 and HS3 sites of the β -LCR region. In the 5' end upstream region, in respect to the promoter of the human β -globin gene, there are motifs of the type (AT) x T ψ . Also in the HS2 site of the LCR region there is a motif of the type 10AT.2CA.2TA.CG.11TA, as well as point mutations. These motifs are binding sites for ubiquitous and/or specific transcription factors. The presence of those motifs along with specific haplotypes in these β -thalassaemic chromosomes appears to be involved in their ability to produce elevated HbF levels.

The fine molecular analysis of these regions might shed light in the mechanism/s that are involved in the ability of those patients to express elevated levels of HbF and present an intermedia β -thalassaemia phenotype.

This study is supported by a 'K.Karatheodori' grant from the Research Committee of the University of Patras

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ
ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΚΑΙ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗΣ
ΣΦΑΙΡΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ**

Μαργέτης, Π., Παπασιδέρη, Ι. Σ. και Α.Χ. Μαργαρίτης

Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής,
Πανεπιστημιόπολη 157 84, Αθήνα

Οι περιφερειακές και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης είναι υπεύθυνες για το σχήμα και τις φυσιολογικές λειτουργίες του ερυθροκυττάρου. Οι αλλοιώσεις στις πρωτεΐνες αυτές συσχετίζονται με ασθένειες όπως η κληρονομική σφαιροκυττάρωση, η κληρονομική ελλειπτοκυττάρωση, η πυροποικιλλοκυττάρωση αλλά και κάποιες άλλες αιμολυτικές αναιμίες. Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης τριών μεμονωμένων ασθενών και δύο οικογενειών με διαφορετικό κλινικό φαινότυπο σε κάθε περίπτωση. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε αρχικά σε βιοχημικό επίπεδο (SDS-PAGE ηλεκτροφορήσεις), ακολούθησε ανοσοβιοχημικός έλεγχος (Western blotting), ψηφιοποίηση και ανάλυση των εικόνων με κατάλληλο λογισμικό και επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Κατά την ανάλυση εντοπίστηκαν διαφοροποιήσεις από το φυσιολογικό πρότυπο που αφορούν σε κύριες ή δευτερεύουσες πρωτεΐνες των ερυθροκυττάρων. Τα δείγματα που εξετάστηκαν από ασθενείς με ΚΣ μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο κατηγορίες: α) Σε εκείνα που παρουσιάζουν σαφή μεταβολή στο ηλεκτροφορητικό πρότυπο της ζώνης-3, ελάττωση της πρωτεΐνης 4,2 και αύξηση του ποσοστού της ζώνης 8 και της σφαιρίνης. β) Στα δείγματα με αποκλίσεις από το φυσιολογικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο των αγκυρινών σε συνδυασμό με ελάττωση στη ζώνη 4,2. Σε μία περίπτωση ΚΣ μετά πρωτεολυτική πέψη με χυμοθρυψίνη της ζώνης-3 διαπιστώθηκε η ύπαρξη δύο επιπλέον ζώνων M.B.= 68 & 71 kDa.

*Το ερευνητικό έργο χρηματοδοτήθηκε από τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας
Πανεπιστημίου Αθηνών ΕΛΚΕ: 70/4/5719, 2001 στην Ι. Σ. Π.*

CORRELATION BETWEEN THE RED CELL MEMBRANE PROTEINS AND HEREDITARY SPHAEROCYTOSIS

Margetis, P.I., Papassideri, I.S., and L.H. Margaritis

University of Athens, Faculty of Biology, Department of Cell Biology & Biophysics,
Panepistimiopolis, 157 84 Athens, Greece

The peripheral and transmembrane red cell membrane proteins are responsible for the shape and the physiology of the erythrocyte. The alterations in these proteins are connected with disorders such as hereditary sphaerocytosis, hereditary elliptocytosis and hereditary pyropoikilocytosis but also certain other haemolytic anaemias. The study of red cell membrane proteins of three individual patients and two families, with different clinical phenotypes in every case, was realised initially at the biochemical level (SDS electrophoresis), followed by western blot analysis, analysis of the scanned images with suitable software. The analysis revealed variations from the normal pattern of the main or secondary proteins of erythrocytes. The samples from patients with HS can be grouped in two categories: a) Those that present changes in the electrophoretic pattern of band-3 in combination with a decrease of protein 4,2. b) In the second group we observed changes in the electrophoretic pattern of ankyrins as well as a decrease of protein 4.2. In one case of HS proteolytic digestion of band-3 with chymotrypsin revealed two extra polypeptides of 68 & 71 kDa.

*Supported by the Special Account for Research Grants of Athens University, SARG: 70/4/5719,
2001 to I. S. P.*

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ (C, E) ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.

Μαριδάκη, Κ.^{1,2}, Μεσσήνη-Νικολάκη, Ν.², Τσιλιμιγκάκη, Σ.¹ και Σ.Μ.
Πιπεράκης¹

¹Εργ. Επιδιορθωτικών Μηχανισμών DNA, Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Αθήνα.

²Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Οι βιταμίνες C (Ασκορβικό οξύ) και E (Τοκοφερόλη) θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη του καρκίνου λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Στην παρούσα μελέτη προσπαθήσαμε να μελετήσουμε την «προστατευτικότητα» που προσφέρουν οι αντιοξειδωτικές αυτές βιταμίνες σε λεμφοκύτταρα *in vitro*. Για τον σκοπό αυτό επώασαμε λεμφοκύτταρα από φρέσκο περιφερειακό αίμα νεαρών ατόμων με διάφορες συγκεντρώσεις των παραπάνω βιταμινών και για διάφορους χρόνους. Στη συνέχεια εκθέσαμε τα παραπάνω κύτταρα σε διάφορους παράγοντες όπως H₂O₂ και UV που προκαλούν βλάβες στο DNA. Τα αποτελέσματα μελετήθηκαν με δύο διαφορετικές τεχνικές. Πρώτον με την τεχνική του comet assay που προσδιορίζει τις βλάβη του DNA και συγκεκριμένα τα θραύσματα στην αλυσίδα του γονιδιώματος παρουσιάζοντας τα με την μορφή κομήτη μετά από ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό περιβάλλον και δεύτερον προσδιορίζοντας τα φυσιολογικά, αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα με βάση την μορφολογία τους μετά από χρώση με τις χρωστικές acridine orange και ethidium bromide. Από τα μέχρι σήμερα αποτελέσματα μας είναι δύσκολο να καταλήξουμε σε συμπέρασμα εάν οι παραπάνω βιταμίνες μπορούν να προσφέρουν *in vitro* αντιοξειδωτική προστασία.

A STUDY ON THE EFFECTS OF ANTIOXIDANT VITAMINS (C, E) IN HUMAN LYMPHOCYTES

Maridaki, K.^{1,2}, Messini-Nikolaki, N.², Tsilimigaki, M.¹ and S.M. Piperakis¹

¹DNA Repair Laboratory, Institute of Biology, NCSR "Democritus", Athens, Greece.

²Department of Cell Biology, University of Athens, Athens, Greece

Vitamins C and E are believed to play an important role in the prevention of cancer through their antioxidant function. In the present study the "protective" effects of these vitamins in human lymphocytes pre-incubated with various concentrations and before been effected with DNA damaging factors (H₂O₂ and UV) were investigated. The damage on DNA and the repair capacity were estimated with the comet assay technique. Apoptosis and necrosis were also investigated with the examination of the morphology of the cells and their staining with acridine orange and ethidium bromide. From our preliminary results it is difficult to conclude whether an effective antioxidant protection is possible *in vitro*.

ΕΝΑ ΜΑΡΚΟΒΙΑΝΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΙΚΑΝΟ ΝΑ ΔΙΑΧΩΡΙΖΕΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΗΣ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΒΑΚΤΗ- ΡΙΩΝ ΑΠΟ ΣΦΑΙΡΙΚΕΣ ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Μπάγκος, Π.Γ., Λιακόπουλος, Θ.Δ. και Σ.Ι. Χαμόδρακας

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη, Αθήνα 15784

Η μελέτη των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών απαιτεί υπολογιστικά εργαλεία για τη διαλεύκανση της δομής και της λειτουργίας τους, με χρήση της αμινοξικής ακολουθίας και μόνο. Ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα έχει σχέση με τον διαχωρισμό των μεμβρανικών από μη μεμβρανικές πρωτεΐνες, σε ολόκληρα γονιδιώματα. Ένα εξίσου σημαντικό πρόβλημα που προκύπτει, αφορά στη διάκριση των, σπουδαίων από φαρμακολογική άποψη, πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης βακτηρίων από σφαιρικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, δεδομένου ότι όλοι οι αλγόριθμοι πρόγνωσης τις ταξινομούν εσφαλμένα στην κατηγορία αυτή. Ο λόγος για αυτό είναι το γεγονός ότι, τα διαμεμβρανικά τμήματα αυτών των πρωτεϊνών, απαρτίζονται από β-πτυχωτές επιφάνειες, σε αντίθεση με την πλειοψηφία των μεμβρανικών πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, των οποίων τα διαμεμβρανικά τμήματα απαρτίζονται από α-έλικες. Η μεθοδολογία που αναπτύσσουμε, στηρίζεται στη μαθηματική θεωρία των αλυσίδων Markov, με εξαρτήσεις πέραν της πρώτης τάξης. Το μοντέλο μας, αφού εκπαιδευτεί με αντιπροσωπευτικά παραδείγματα ακολουθιών (που υπάρχουν κατατεθειμένες σε δημόσιες βάσεις δεδομένων όπως η SWISS-PROT), οι οποίες ανήκουν στη μια ή στην άλλη κατηγορία, και αφού έχουν απομακρυνθεί οι ομόλογες ακολουθίες, είναι ικανό να διακρίνει τις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης βακτηρίων από σφαιρικές, υδατοδιαλυτές με ευαισθησία και ειδικότητα από 75 έως 94%, ανάλογα με το κατώφλι που θα χρησιμοποιηθεί. Αντίστοιχα, το ποσοστό των σωστών προβλέψεων κυμαίνεται από 76 έως 90%.

A MARKOV CHAIN MODEL CAPABLE OF DISCRIMINATING BACTERIAL OUTER MEMBRANE PROTEINS FROM GLOBULAR, WATER-SOLUBLE PROTEINS

Bagos, P.G., Liakopoulos, Th.D., and S.J. Hamodrakas

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis, Athens 15784

The study of membrane proteins requires computational tools to elaborate (predict) their structure, utilizing amino-acid sequence alone. A very important aspect of this effort deals with the discrimination of transmembrane proteins from non-transmembrane ones, in complete genomes. A much more difficult task is the discrimination of, the pharmacologically important, bacterial outer membrane proteins (O.M.P) from globular, water-soluble proteins. This is due to the fact that, the transmembrane regions of bacterial outer membrane proteins consist mainly of β -sheets, in contrast to the majority of the integral membrane proteins, whose transmembrane regions consist of hydrophobic α -helices. The methodology we are developing is based on the Markov chain model, with dependencies higher than the first order. Our model was trained with representative examples of sequences (from publicly available databases such as SWISS-PROT) and after the removal of highly homologous sequences, it is capable of discriminating the outer membrane proteins from the globular ones, with both, sensitivity and specificity ranging from 75 to 94%, depending on the threshold used. Similarly, the success rate for correct prediction ranges from 76 to 90%.

ΕΠΙΤΟΠΟΙ ΤΗΣ ΟΓΚΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HER-2/NEU ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΟΝΤΑΙ ΚΑΙ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΑ CD3+CD56+ (NK-T) ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Μπαξεβάνης, Κ.Ν., Κατσούλας, Χ.Α., Τσιτσιλώνη, Ο.Η., Γκριτζάκης, Α.Δ.
και Μ. Παπαμιχαήλ

Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου, Νοσοκομείο "Αγ. Σάββας", Λεωφ.
Αλεξάνδρας 171, 11522, Αθήνα

Το γονίδιο HER-2/neu κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 185 kDa που αναγνωρίζεται από κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (CTL) μέσω των MHC μορίων τάξης I. Στην εργασία αυτή δείχνουμε ότι CTL πεπτιδικοί επίτοποι της HER-2/neu αναγνωρίζονται και από κυτταροτοξικά NK-T λεμφοκύτταρα. Εκχυλίσματα πεπτιδίων προερχόμενα από την κατεργασία με οξύ καρκινικών κυτάρων HLA-A2 θετικών (+) HER-2/neu⁺ ασθενών με μεταστατικό καρκίνο των ωθηκών (ACE) χρησιμοποιήθηκαν για την *in vitro* παραγωγή κυτταροτοξικών σειρών. Μονοπύρρηνα περιφερικού αίματος καρκινοπαθών που ενεργοποιήθηκαν με ACE δημιούργησαν κυτταροτοξικές σειρές που περιείχαν αβTCR⁺CD3⁺CD56⁻ και αβTCR⁺CD3⁺CD56⁺ κύτταρα με την ιδιότητα να αναγνωρίζουν μέσω των MHC τάξης I και να λύουν T2 κύτταρα που έφεραν στην επιφάνειά τους πεπτίδια από το ACE. Οι ίδιες κυτταροτοξικές σειρές έλυαν T2 κύτταρα που παρουσίαζαν γνωστούς κυτταροτοξικούς επίτοπους της HER-2/neu, την HLA-A2⁺ σειρά μελανώματος FM3 επιμολυσμένη με το γονίδιο της HER-2/neu, καθώς και αυτόλογα καρκινικά κύτταρα. Κυτταροτοξικές αβTCR⁺CD3⁺CD56⁺ σειρές έδειξαν επίσης NK-τύπου κυτταροτοξικότητα έναντι των αυτόλογων καρκινικών κυτάρων. Κλώνοι που απομονώθηκαν από τις αβTCR⁺CD3⁺CD56⁺ σειρές έδειξαν τόσο MHC- όσο και μη-MHC-περιοριζόμενη κυτταροτοξικότητα, επιβεβαιώνοντας την διπλή λυτική ικανότητα των NK-T κυτάρων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι εκχυλίσματα πεπτιδίων από μεταστατικούς καρκίνους ωθηκών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλια για την δημιουργία *in vitro*, εκτός των κλασικών CTL, και NK-T κυτάρων με ικανοποιητική MHC- και μη-MHC-περιοριζόμενη κυτταροτοξικότητα έναντι αυτόλογων καρκινικών κυτάρων-στόχων. Τέτοια NK-T κύτταρα με διπλή κυτταροτοξικότητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα.

HER-2/NEU-DERIVED PEPTIDE EPITOPES ARE ALSO RECOGNIZED BY CYTOTOXIC CD3⁺CD56⁺ (NK-T) LYMPHOCYTES

**Baxevanis, C.N., Katsoulas, H.L., Tsitsilonis, O.E., Gritzapis, A.D., and
M. Papamichail**

Cancer Immunology and Immunotherapy Center, St. Savas Cancer Hospital, 171 Alexandras Ave.,
11522, Athens, Greece.

The human HER-2/neu gene encodes a 185 kDa transmembrane glycoprotein recognized by MHC class I-restricted CTLs. We report that HER-2/neu peptide CTL epitopes can be also recognized by cytotoxic NK-T lymphocytes. Unfractionated peptides derived from HLA-A2 positive (+), HER-2/neu⁺ tumor cells (acid cell extracts; ACE), which were collected from patients with metastatic ovarian cancer, were used as antigen to generate *in vitro* cytotoxic effectors. ACE was able to elicit from cancer patients' PBMC both $\alpha\beta$ TCR⁺CD3⁺CD56⁻ and $\alpha\beta$ TCR⁺CD3⁺CD56⁺ (NK-T) CTLs that lysed ACE-sensitized T2 cells in an HLA-A2-restricted manner. The same CTL lines also recognized T2 cells pulsed with HER-2/neu-derived CTL peptide epitopes and most importantly a HER-2/neu-transfected HLA-A2⁺ cell line and the autologous tumor cells. $\alpha\beta$ TCR⁺CD3⁺CD56⁺ CTL lines also exhibited NK-like cytotoxicity against autologous tumor cells. CTL clones were isolated from $\alpha\beta$ TCR⁺CD3⁺CD56⁺ bulk cultures displaying both MHC- and non-MHC-restricted cytotoxicity, thus confirming the dual cytolytic function of such cells. Our data demonstrate that ACE from metastatic ovarian tumors can be used as multiepitope vaccines for generating *in vitro* besides classical CTLs, NK-T cells exerting efficient MHC- and non-MHC-restricted cytotoxicity against autologous tumor targets. Such NK-T cells expressing dual cytotoxic activity may prove advantageous in cancer immunotherapy.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ NK1.1⁺ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΙΣΧΥΡΗ *IN VITRO* ΚΑΙ *IN VIVO* ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΣΥΓΓΕΝΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗΣ (IL)-12, IL-15 ΚΑΙ IL-18

Μπαξεβάνης, Κ.Ν., Κατσούλας, Χ.Α., Βουτσάς, Ι.Φ., Μπεκρής, Σ.,
Τσιτσιλώνη, Ο.Η., Γκριτζάκης, Α.Δ. και Μ. Παπαμιχαήλ

Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου, Νοσοκομείο "Αγ. Σάββας", Λεωφ.
Αλεξάνδρας 171, 11522, Αθήνα

Είναι γνωστό ότι ορισμένες κυτταροκίνες ελέγχουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των φυσικών φονικών κυττάρων (NK). Στην εργασία αυτή δείχνουμε ότι ο συνδυασμός των ιντερλευκινών (IL)-12, IL-15 και IL-18 επάγει, μετά από επώαση 24 ωρών, την εμφάνιση ισχυρής αντικαρκινικής δράσης από NK1.1⁺ κύτταρα έναντι κυτταρικών καρκινικών σειρών και συγγενικών κυττάρων MC57X ινοσαρκώματος και ALC λεμφώματος. Τα NK1.1⁺ κύτταρα που δημιουργήθηκαν παρουσία των κυτταροκινών ανήκαν σε δύο πληθυσμούς, στα NK1.1⁺CD3⁺ (NK-T) και NK1.1⁺CD3⁻ (NK) κύτταρα. Τα NK-T κύτταρα αποτελούσαν το 20% του ολικού NK1.1⁺ πληθυσμού και παρουσίασαν την μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα μετά από ενεργοποίηση με IL-12/IL-15/IL-18. Ο συγκεκριμένος συνδυασμός κυτταροκινών συσχετίστηκε με σημαντική αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων ιντερφερόνης-γ, του παράγοντα νέκρωσης όγκων, της IL-2 και της περφορίνης και με υπερέκφραση των μεμβρανικών μορίων προσκόλλησης CD2 και CD18. Η ενίσχυση των παραμέτρων αυτών ήταν σημαντικότερη στα NK1.1⁺CD3⁺ παρά στα NK1.1⁺CD3⁻ κύτταρα. Η αντικαρκινική λυτική ικανότητα των ενεργοποιημένων NK1.1⁺ κυττάρων δείχθηκε και σε δύο πειραματικά μοντέλα όγκων *in vivo*. Ποντίκια C57BL/6 στα οποία ενέθηκαν κύτταρα συγγενικών MC57X και ALC όγκων, παρουσίασαν παράταση της επιβίωσής τους όταν παράλληλα τους χορηγήθηκαν ενεργοποιημένα ολικά NK1.1⁺ κύτταρα. Η προστασία ήταν καλύτερη όταν δόθηκαν NK1.1⁺CD3⁺ παρά NK1.1⁺CD3⁻ κύτταρα. Φαίνεται ότι η επαγωγή ενεργοποίησης, μέσω των IL-12/IL-15/IL-18, ήταν πιο έντονη στα NK1.1⁺CD3⁺ κύτταρα ως προς τον έλεγχο της εμφάνισης των όγκων *in vivo*. Η εργασία αυτή είναι η πρώτη που δείχνει την ανοσοεπιτήρηση που ασκείται *in vivo* από NK1.1⁺ κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν *in vitro* με IL-12/IL-15/IL-18 και υποδεικνύει ότι τέτοια κύτταρα μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικά στην ανάπτυξη νέων πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας του καρκίνου.

**GENERATION OF NK1.1⁺ CELLS WITH POTENT *IN VITRO*
AND *IN VIVO* CYTOTOXICITY AGAINST SYNGENEIC
TUMORS IN THE PRESENCE OF INTERLEUKIN (IL)-12, IL-
15 AND IL-18**

**Baxevanis, C.N., Katsoulas, H.L., Voutsas, J.F., Bekris, S., Tsitsilonis, O.E.,
Gritzapis, A.D., and M. Papamichail**

Cancer Immunology and Immunotherapy Center, St. Savas Cancer Hospital, 171 Alexandras Ave.,
11522, Athens, Greece

In the past few years several cytokines have been demonstrated to control natural killer (NK) cell activation and proliferation. In this report we demonstrate that the combination of interleukin (IL)-12, IL-15 and IL-18 induces NK1.1⁺ cells within 24 h of incubation to display strong *in vitro* anti-tumor activity against several tumor cell lines, also including the syngeneic MC57X fibrosarcoma and ALC lymphoma. NK1.1⁺ cells elicited in the presence of this cytokine combination, belonged to two different populations, namely NK1.1⁺CD3⁺ (NK-T) and NK1.1⁺CD3⁻ cells (NK). The former comprised almost 20% of the total NK1.1⁺ population and exhibited the greatest cytotoxicity upon activation with IL-12/IL-15/IL-18. The effect of this particular cytokine combination was associated with a dramatic increase in the levels of cytoplasmic gamma-interferon (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), IL-2 and perforin. Membrane expression of adhesion molecules CD2 and CD18 was also enhanced. Changes in these immune parameters were more profound in NK1.1⁺CD3⁺ than in NK1.1⁺CD3⁻ cells. The anti-tumor lytic ability of activated NK1.1⁺ cells was also shown in two different experimental tumor models *in vivo*. C57BL/6 mice inoculated with ALC or MC57X syngeneic tumors exhibited prolonged survival when co-injected with IL-12/IL-15/IL-18-activated syngeneic total NK1.1⁺ cells. Mice were better protected when injected with activated NK1.1⁺CD3⁺ cells than with NK1.1⁺CD3⁻ cells, suggesting that IL-12/IL-15/IL-18-induced activation dictated a greater role of NK1.1⁺CD3⁺ cells in controlling tumor growth *in vivo*. This is the first report demonstrating *in vivo* innate immune system surveillance of syngeneic tumor cells mediated by NK1.1⁺ cells activated *in vitro* with IL-12/IL-15/IL-18 and indicates that such cells may be critical for the development of immunotherapeutic protocols in cancer patients.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ «ΓΗΡΑΝΣΗ» ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ, *IN VITRO*

Μπερέτσος, Π.,

Department of Biological Sciences, Imperial College of Science, Technology and Medicine

Η κατανόηση της «γήρανσης» του σπέρματος, *in vitro*, έχει αποτελέσει κατά τα τελευταία χρόνια ένα σημαντικό ερευνητικό αντικείμενο της βιολογίας της αναπαραγωγής, λόγω της αυξανόμενης εφαρμογής της υποβοηθούμενης γονιμοποίησης. Ωστόσο, οι μελέτες που έχουν εστιασθεί σε παρατηρήσεις πέραν των 48 ωρών μετά τη λήψη του σπέρματος είναι σχετικά ολιγάριθμες. Επιπλέον, ο γνωστός σπερματικός ενεργοποιητής πεντοξυ-φυλλίνη, έχει δοκιμασθεί μόνον σε προσφάτως ληφθέν σπέρμα.

Στην παρούσα μελέτη, δοκιμάσθηκε η κινητικότητα και η επιβίωση, (i) σπερματοζωαρίων εκπλυμένων σε EBSS, και (ii) πλήρους σπέρματος σε θερμοκρασίες (α) 4°C, (β) «δωματίου» και (γ) 37°C. Οι μεταβολές στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων παρακολουθούνται μέσω μικροσκοπίου, ενσωματωμένης κάμερας, και ειδικού προγράμματος ηλεκτρονικού υπολογιστή. Η επιβίωσή τους εκτιμάται με τη χρωστική ηωσίνη.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, μέσα στο υλικό EBSS διατήρησης των σπερματοζωαρίων, αυτά εκδηλώνουν αρκετά καλύτερη κινητικότητα και βιωσιμότητα, από τα σπερματοζωάρια που παραμένουν στο σπέρμα. Όσον αφορά στη θερμοκρασία, οι 4 και οι 37°C αποδεικνύονται ακατάλληλοι προς διατήρηση των σπερματοζωαρίων, αφού η κινητικότητα και η βιωσιμότητα ελαττώνονται δραματικά. Αντίθετα, σε θερμοκρασία δωματίου τα σπερματοζωάρια εκδηλώνουν αρκετά καλή συμπεριφορά ακόμη και 72 ώρες ύστερα από τη λήψη του σπέρματος. Επιπρόσθετα, η πεντοξυφυλλίνη φαίνεται να ενισχύει τη ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων που διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου.

Λεπτομερής ανάλυση των αποτελεσμάτων θα εκτεθεί στη συνοδευτική αναρτώμενη έκθεση.

INVESTIGATION OF CONDITIONS AFFECTING SPERM SENESCENCE, *IN VITRO*

Beretsos P.

Department of Biological Sciences, Imperial College of Science, Technology and Medicine

Understanding sperm senescence *in vitro* has been an essential field of reproductive biology for the last few years due to its importance in assisted conception. However, only few studies have investigated sperm life *in vitro* for more than 48 hours in different environmental conditions. Additionally, though pentoxifylline has been considered as a successful way to increase sperm motility *in vitro*, the majority of the studies have concentrated only on fresh samples. Pentoxifylline is a phosphodiesterase inhibitor and is thought to induce sperm motility by inhibiting cAMP phosphodiesterase and therefore resulting to increased levels of intracellular cAMP. In this study, spermatozoa were incubated in flush medium (E.B.S.S. – HEPES medium, supplemented with human serum albumin) or semen at the most common clinically used temperatures (37°C, 4°C or room temperature) for up to 72 hours. The changes in spermatozoa motility and vitality were assessed in each sample using Computer-Aided Sperm Analysis and Eosin staining, respectively. Human spermatozoa incubated in semen lost their motility after 24 hours, except of those incubated at room temperature that showed extremely low motility. The staining process verified the presence of live cells at the samples at this time. Nevertheless, the number of live spermatozoa appeared drastically reduced. A significant decrease in the vitality of human spermatozoa was also observed when samples in flush medium were incubated at 37°C or 4°C for 72 hours, while the spermatozoa were virtually immotile after the first 24 hours. In contrast, spermatozoa vitality of samples incubated at room temperature in flush medium showed only a minor tendency to decrease after 72 hours, while sperm motility gradually decreased to low values. In both environments, semen and medium, room temperature and 37°C appeared to be the optimal and less favourable temperature condition, respectively. Moreover, pentoxifylline appeared to induce a significant increase in the motility properties of aged spermatozoa, incubated in semen at room temperature for 24 hours. Quite the opposite, its effect was minimal in aged spermatozoa, incubated in medium for 24 hours at 37°C or 72 hours at room temperature. Not all samples responded to treatment with pentoxifylline, suggesting variability among different individuals. Statistical analysis excluded a correlation between the response and the age or abstinence period of an individual.

ΠΙΘΑΝΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΘΕΡΜΟΑΝΟΧΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ hsp70

Μποζίδης, Π.¹, Βεζυράκη, Π.², Λαζαρίδης, Ι.¹, Τζάλλας, Σ.¹, Αγγελίδης, Χ.¹

¹Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας ²Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας: Μονάδα Κυτταρικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα 45110.

Η hsp70 αποτελεί το κύριο μέλος της 70 kDa οικογένειας πρωτεϊνών θερμικού σοκ και η έκφρασή της επάγεται εντυπωσιακά σε περιβάλλον αυξημένης θερμοκρασίας. Η επαγωγή αυτή έχει αποδειχθεί ότι συνοδεύεται από μετακίνηση της hsp70 στον πυρήνα και ειδική συσσώρευση στους πυρηνίσκους. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η υπερέκφραση της hsp70 προσδίδει αυξημένη κυτταρική θερμοανθεκτικότητα η οποία πιθανώς να οφείλεται στην πρωτεϊνοσυνοδευτική (chaperoning) ενεργότητά της που της επιτρέπει να καταλύει την επιδιόρθωση ή τον καταβολισμό λανθασμένα αναδιπλούμενων ή μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Τέλος έχει αποδειχθεί ότι οι παραπάνω δραστηριότητες της hsp70 υλοποιούνται με την βοήθεια μιας ομάδας πρωτεϊνικών ομο-συνόδων (co-chaperones) οι οποίοι συνδυαζόμενοι με την hsp70 συγκροτούν λειτουργικές νανομηχανές.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την θερμοανθεκτικότητα μυοβλαστικών κυττάρων τα οποία υπερεκφράζουν μία μορφή της hsp70 που φέρει το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) του SV40 ιϊκού ογκογονιδίου T αντιγόνου. Παρατηρήσαμε ότι στα κύτταρα αυτά, υπό φυσιολογικές συνθήκες, η hsp70 εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα και ότι η έκθεση των κυττάρων σε θερμικό σοκ οδηγεί σε ταχύτερη συσσώρευση της hsp70-NLS στους πυρηνίσκους σε σχέση με την ενδογενή hsp70. Παρατηρήσαμε επίσης ότι τα υπερεκφράζοντα την hsp70-NLS κύτταρα επιδεικνύουν αυξημένη θερμοανθεκτικότητα τόσο σε σχέση με τα πατρικά τους κύτταρα όσο και σε σχέση με τα κύτταρα που υπερεκφράζουν την hsp70 χωρίς NLS. Τέλος, παρατηρήσαμε ότι στα υπερεκφράζοντα την hsp70-NLS κύτταρα, δημιουργούνται ύστερα από θερμικό σοκ πυρηνικά σωματίδια εντυπωσιακού μεγέθους, στα οποία συνεντοπίζονται η hsp70-NLS και ο πρωτεϊνικός ομο-συνόδος της dj1. Αντίθετα ο πρωτεϊνικός ομοσυνόδος dj2 δεν φαίνεται να συμμετέχει στην δημιουργία των πυρηνικών αυτών σωματιδίων. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να υποδεικνύουν την ύπαρξη hsp70 νανομηχανών με ειδική σύνθεση η οποία χαρακτηρίζει την συγκεκριμένη λειτουργία τους.

POTENTIAL MECHANISM OF INCREASED THERMOTOLERANCE DUE TO NUCLEAR hsp70 OVEREXPRESSION

Bozidis, P.¹, Vezyraki, P.², Lazaridis, I.¹, Tzallas, S.¹, and Ch. Angelidis¹

¹Laboratory of General Biology, ²Laboratory of Experimental Physiology: Cellular Physiology unit.
Medical School, University of Ioannina, Ioannina 45110.

Hsp70 is the major member of the 70 kDa heat shock protein family and its expression is dramatically induced in elevated environmental temperatures. This induction has been shown to be accompanied by the hsp70 translocation to the cell nucleus with specific accumulation to the nucleoli. It has also been shown that hsp70 overexpression results in increased cell thermotolerance, probably due to the chaperoning activity of hsp70 which allows the protein to fold or degrade misfolded or denatured proteins. Finally it has been shown that the hsp70 functions take place in cooperation with a team of co-chaperone proteins which combining with hsp70 form functional nanomachines.

In the present study we investigated the thermotolerance of myoblastic cells overexpressing a form of hsp70 carrying the nuclear localization signal (NLS) of the SV40 viral oncoprotein T antigen. We observed that in these cells, under physiological conditions, hsp70 is localized mainly in the nucleus and upon heat shock the protein accumulates to the nucleoli faster than its endogenous homologue. We also observed that the hsp70-NLS overexpressing cells are more thermotolerant compare to their parent cells and to cells overexpressing hsp70 without NLS. Finally we found that the hsp70-NLS overexpressing cells form upon heat shock nuclear bodies of significant size, in which hsp70-NLS and dj1 colocalize. In contrast to dj1 another hsp70 co-chaperone, namely dj2, was not found to be present in the above nuclear bodies. Our results seem to indicate the existence of hsp70 nanomachines with specific composition characteristic to their specific functions.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ mtDNA ΤΗΣ ΜΕΛΙΣΣΑΣ *Apis mellifera* ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ

Μπουγά Μ.¹, Χαριζάνης Π.², Κίλιας Γ.¹ και Αλαχιώτης Σ.¹

¹Τομέας Γενετικής, Βιολ. Κυττάρου & Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα.

²Εργαστήριο Σηροτροφίας και Μελισσοκομίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Διερευνήθηκαν οι φυλογενετικές σχέσεις πληθυσμών της μέλισσας *Apis mellifera* των περιοχών Ικαρίας, Κάσου, Κυθήρων, Μακεδονίας, Φθιώτιδας και Κύπρου. Οι πληθυσμοί αυτοί ανήκουν σε διαφορετικές φυλές, σύμφωνα με τη μορφολογική ανάλυση κατά Ruttner το 1988. Η εν λόγω προσέγγιση αφορά την ανάλυση τριών γονιδίων του mtDNA με την τεχνική των RFLP's. Από κάθε περιοχή συλλέχθηκαν 15 περίπου ενήλικες εργάτριες, που προήλθαν από διαφορετικές βασιλίσσες, από τις οποίες απομονώθηκε ολικό DNA. Στη συνέχεια πολλαπλασιάστηκαν με την PCR τα τμήματα των γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA 16s rDNA (965 bp), CO I (1028 bp) και ND5 (822 bp) και δοκιμάστηκαν 28 ένζυμα περιορισμού. Θέσεις αναγνώρισης για το τμήμα του 16s rDNA εντοπίστηκαν με επτά ένζυμα περιορισμού, για το τμήμα του CO I με οκτώ και για το τμήμα του ND5 με επτά. Με το ένζυμο περιορισμού Sau3A I αποκαλύφθηκαν πολυμορφισμοί για το τμήμα του 16s rDNA, στους πληθυσμούς Φθιώτιδας και Κυθήρων, ενώ με το Ssp I αποκαλύφθηκε ενδοπληθυσμιακός πολυμορφισμός μόνο σε τμήμα πληθυσμού των Κυθήρων. Για το τμήμα του CO I αποκαλύφθηκαν πολυμορφισμοί στον πληθυσμό της Φθιώτιδας με τα ένζυμα BstU I, Xho I, Sty I και Nco I, ενώ με το Bcl I στον πληθυσμό της Κάσου. Τα ένζυμα Nco I και Sty I είναι διαγνωστικά για τον πληθυσμό της Μακεδονίας για το τμήμα του CO I, ενώ το Alu I για το τμήμα του ND5. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και η κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων έγινε με τα υπολογιστικά πακέτα REAP και PHYLIP. Διαπιστώθηκε ότι η γενετική δομή αυτών των πληθυσμών έχει μεταβληθεί γεγονός που μπορεί να ερμηνευθεί στη βάση των μετακινήσεων και των ανεξέλεγκτων αγοραπωλησιών μελισσιών που γίνονται τα τελευταία 20 χρόνια. Η μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων δείχνει ότι ο πληθυσμός μελισσών της Μακεδονίας είναι γενετικά ο πιο απομακρυσμένος.

RESTRICTED ANALYSIS OF mtDNA IN HONEYBEE *Apis mellifera* AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS

Bouga, M.¹, Harizanis, P.², Kiliass, G.¹ and S. Alahiotis¹

¹Division of Genetics, Cell Biology and Development, Department of Biology, University of Patras, Patras, Greece

²Laboratory of Sericulture and Apiculture, Agricultural University of Athens, Athens, Greece

The phylogenetic relationships of honeybee *Apis mellifera* populations from six different areas Ikaria, Kassos, Kythira, Phthiotida, Macedonia, and Cyprus have been examined. These populations may correspond to different races according to morphometric analysis by Ruttner in 1988. This approach refers to three mtDNA genes analysis using RFLP's method. From each area 15 adult worker bees are analyzed originating from different queen. Total DNA was extracted, then 16s rDNA (965 bp), COI (1028 bp), and ND5 (822bp) genes were amplified using PCR.

Twenty-eight restricted enzymes were tested. Seven enzymes recognize sites for 16s rDNA gene, 8 for CO I, and 7 for ND5. Polymorphism was revealed in 16s rDNA using Sau3A I restricted enzyme in Phthiotida population as well as in Kythira. Intra-polymorphism was revealed, using Ssp I restricted enzyme, only in Kythira population. Polymorphism was also detected for CO I gene using the restricted enzymes BstU I, Xho I, Sty I, and Nco I in Phthiotida and Bcl I only in Kassos. Nco I and Sty I are diagnostic for CO I gene and Alu I is diagnostic for ND5 gene, for Macedonia population.

For data processing and phylogenetic trees the programs REAP and PHYLIP were applied. It was found out that the genetic structure of these populations has been changed because of migratory beekeeping and commercial breeding during last two decades. The examination of phylogenetic relationships shows that the more distant population is that of Macedonian honeybee.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ ΕΛΙΚΑΣ 27 ΤΟΥ 18S rRNA ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ ΕΠΙ ΤΗΣ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ

Μπουζιάνης, Π., Πανόπουλος, Π., Δρέσιος, Ι. και Δ. Συνετός

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, 261 10 Πάτρα

Η πιστότητα της μετάφρασης, δηλαδή η επιλογή των σωστών αμινοάκυλο-tRNA, είναι ευθύνη της μικρής ριβοσωματικής υπομονάδας. Στην *Escherichia coli*, η έλικα 27 του 16S rRNA εμπλέκεται απευθείας στην πιστότητα της αποκωδικοποίησης του μηνύματος. Εξετάσαμε τη λειτουργία της έλικας 27 του 18S rRNA του *Saccharomyces cerevisiae* με τη βοήθεια σημειακών μεταλλάξεων. Μεταλλάξεις σε θέσεις του 18S rRNA της ζύμης που αντιστοιχούν στις θέσεις της *E. coli* 912 (*rdn4*), 888(*rdn6*) και 886(*rdn8*) αύξησαν την πιστότητα της μετάφρασης και μείωσαν την πρόσδεση του tRNA στην περιοχή A των μεταλλαγμένων ριβοσωμάτων. Επίσης, μείωσαν την ικανότητα της παρομομυκίνης να προωθεί την ανάγνωση των κωδικίων τερματισμού και έδειξαν αυξημένη αντίσταση έναντι αυτού του αντιβιοτικού, σε συμφωνία με τον χαρακτηρισμό τους ως μεταλλάξεων που προκαλούν αυξημένη πιστότητα. Η ισχυρότερη επίδραση προήλθε από το διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος *rdn4rdn6*, που μείωσε την συχνότητα λάθους κατά 3 φορές. Ο φαινότυπος αυξημένης πιστότητας του στελέχους *rdn4rdn6* ήταν προσθετικός, σε αντίθεση με το αντίστοιχο στέλεχος στην *E. coli* που καθίσταται επιρρεπές στα λάθη κατά τη μετάφραση. Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν τη λειτουργική συντήρηση της έλικας 27 κατά την επιλογή των tRNA. Ακολούθως εξετάσαμε αν οι υπό μελέτη μεταλλάξεις, ενώ προκαλούν αυξημένη πιστότητα, επηρεάζουν και την άλλη κεντρική λειτουργία του ριβοσώματος, την σύνθεση πεπτιδικών δεσμών. Διαπιστώσαμε περιορισμένη αλλά μετρήσιμη επίδραση επί της ενεργότητας της πεπτιδυλοτρανσφεράσης. Μια τέτοια έμμεση επίδραση ενισχύει την άποψη περί αλληλοσυσχετισμού των δύο κεντρικών ριβοσωματικών λειτουργιών, της αποκωδικοποίησης των mRNA και της σύνθεσης πεπτιδικών δεσμών, της μικρής και της μεγάλης ριβοσωματικής υπομονάδας αντίστοιχα.

EFFECT OF MUTATIONS IN HELIX 27 OF YEAST 18S rRNA ON TRANSLATIONAL FIDELITY AND RIBO- SOMAL PEPTIDYLTRANSFERASE ACTIVITY

Bouzianis, P., Panopoulos, P., Dresios, J., and D. Synetos

Laboratory of Biochemistry, School of Medicine, University of Patras, 261 10 Patras

The fidelity of translation, i.e., the selection of cognate over non-cognate tRNAs, is the responsibility of the small ribosomal subunit. In *Escherichia coli*, helix 27 of 16S rRNA has been proposed to directly affect the fidelity of translational decoding. We have examined the function of helix 27 in eukaryotes with the aid of random and site-specific mutations in helix 27 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* 18S rRNA. Mutations at positions of yeast 18S rRNA corresponding to *E. coli* 912 (*rdn4*), 888 (*rdn6*) and 886 (*rdn8*) increased the fidelity of translation and caused a reduction in tRNA binding to the A-site of mutant ribosomes. They also reduced the ability of the aminoglycoside antibiotic paromomycin to promote readthrough of stop codons and showed increased resistance to this antibiotic, consistent with their characterization as hyperaccurate mutations. The strongest effect was exhibited by the double mutant *rdn4rdn6*, which decreased translational errors three-fold. The accuracy phenotype of the *rdn4rdn6* mutant was additive, unlike the corresponding double mutant in *E. coli* which is error-prone. These results strongly suggest a functional conservation of this region in tRNA selection. Next, we asked whether these mutations, while causing hyperaccuracy, affected also the other main ribosomal activity, peptide bond formation, with which the large ribosomal subunit is associated. As expected, a limited but measurable effect on peptidyltransferase activity was observed. Such an effect, although indirect, helps demonstrate the interconnectedness between the two central ribosomal activities, decoding and peptide bond formation.

Supported by the General Secretariat of Research and Technology through a bilateral Greece-Italy program.

ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΣΑΡΚΟΦΑΓΩΝ ΖΩΩΝ ΠΑΝΩ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΟΣΤΑ

Μωραΐτης, Κ., Σπηλιοπούλου, Χ. και Α. Κουτσελίνης

Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών.
Μ. Ασίας 75, Γουδή 115 27, Αθήνα.

Η δραστηριότητα σαρκοφάγων ζώων έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προκαλέσει σημαντικές αλλοιώσεις σε ανθρώπινα σκελετικά υπολείμματα, δυσχεραίνοντας έτσι την ιατροδικαστική διερεύνηση και τη διαδικασία ταυτοποίησης. Με την παρούσα μελέτη διερευνάται η φύση των ιδιαίτερων οδοντικών αποτυπωμάτων, καθώς επίσης και η τυπική φθορά που παρατηρήθηκε σε συγκεκριμένα οστά κατά την εξέταση ανθρώπινων υπολειμμάτων που έγιναν αντικείμενο βοράς σαρκοφάγων ζώων. Από την ανθρωπολογική ανάλυση καταδεικνύεται ότι οι οστικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν οφείλονται στη δράση σαρκοφάγων ζώων μικρού ή μεσαίου μεγέθους. Μια από τις πιο σημαντικές παρατηρήσεις που προκύπτει από την εν λόγω μελέτη είναι ότι τα σαρκοφάγα ζώα αλλοιώνουν τα ανθρώπινα οστά με συγκεκριμένο τρόπο, αφήνοντας ευδιάκριτα ίχνη, που προκαλούνται κυρίως κατά τη διάρκεια της αφαίρεσης των μαλακών μορίων που καλύπτουν το σκελετό. Η προτίμηση των ζώων αυτών σε συγκεκριμένες ανατομικές περιοχές -κυρίως στις επιφύσεις των μακρών οστών- είναι αναμενόμενη εξαιτίας της υψηλής θρεπτικής τους αξίας σε οστικό μυελό. Το φάσμα της φθοράς που προκαλείται στα οστά, κυμαίνεται από την παρουσία χαρακτηριστικών ιχνών που αφήνουν τα δόντια των σαρκοφάγων ζώων, έως την απεξάρθρωση του σκελετού και το διασκορπισμό των οστών σε μια ακτίνα αρκετών μέτρων. Η δραστηριότητα σαρκοφάγων ζώων μπορεί να αλλοιώσει ή να καταστρέψει ενδείξεις που σχετίζονται με το μηχανισμό πρόκλησης και την πιθανή αιτία θανάτου. Κατά συνέπεια, σκελετικές αλλοιώσεις που παρεκκλίνουν από τις τυπικές μορφές εκείνων που οφείλονται στη δράση σαρκοφάγων ζώων, θα πρέπει να εξετάζονται ενδελεχώς προκειμένου να διαπιστωθεί εάν πράγματι οφείλονται στη δραστηριότητα αυτή ή είναι αποτέλεσμα κακώσεων που έλαβαν χώρα κοντά στο χρόνο θανάτου.

FORENSIC IMPLICATIONS OF ANIMAL SCAVENGING ACTIVITY ON HUMAN SKELETAL REMAINS

Moraitis, K., Spiliopoulou, Ch., and A. Coutselinis

Department of Forensic Medicine and Toxicology, School of Medicine, University of Athens
75 M. Asias St., Goudi 115 27, Athens, Greece

Animal scavenging activity may produce significant alterations on human skeletal remains, confounding the interpretation of skeletal material and the identification process. This study aims to investigate the nature of various animal tooth mark artifacts and the typical damage to selected bony elements observed on scavenged human remains. The anthropological analysis has shown that the remains had been subjected to gnawing by small to medium-sized carnivores. One of the most important observations resulting from the present study is that carnivores alter the human bones according to a specific pattern, while leaving visible marks produced mainly during the removal of the soft tissue covering the skeleton. The preference of the scavengers to certain anatomical areas -mainly the epiphyses of long bones- is expected due to their high nutritional value in bone marrow. The spectrum of the potential damage produced by them ranges from characteristic tooth mark artifacts to disarticulation and scattering of the remains over a wide area. Animal scavenging activity can alter or destroy indications related to the cause and manner of death. Therefore, scavenging patterns deviating from the expected ones should be examined closely for indications of perimortem trauma.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗΣ ΣΑΡΩΤΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ LASER ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Νέζης, Ι.Π. και Λ.Χ. Μαργαρίτης

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη, Αθήνα 15784

Στο χώρο της φωτονικής μικροσκοπίας η σημαντικότερη ίσως εξέλιξη των τελευταίων είκοσι χρόνων είναι η κατασκευή του συνεστιακού σαρωτικού μικροσκοπίου laser (confocal laser scanning microscope). Η αρχή λειτουργίας του οργάνου στηρίζεται στην ύπαρξη δέσμης laser η οποία σαρώνει το παρασκευάσμα σε ένα επίπεδο και ουσιαστικά γίνεται μια οπτική τομή. Με αυτό τον τρόπο ο χειριστής του μικροσκοπίου μπορεί να πάρει οπτικές τομές από όλο τον όγκο του παρασκευάσματος μέσα σε λίγα λεπτά. Οι οπτικές αυτές τομές μέσω κάμερας αποθηκεύονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Έτσι με την χρήση κατάλληλων λογισμικών και μετά από σειριακές οπτικές τομές μπορούμε να πραγματοποιήσουμε τρισδιάστατη απεικόνιση της κυτταρικής οργάνωσης. Η χρήση δεσμών laser διαφορετικού μήκους κύματος μας επιτρέπει την ανίχνευση διπλής και τριπλής σήμανση των διαφόρων κυτταρικών συστατικών και την σύγχρονή τους απεικόνιση σε μία φωτονιογραφία. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα της συνεστιακής σαρωτικής μικροσκοπίας σε σχέση με τη συμβατική φωτονική μικροσκοπία, διάφορα πρωτόκολλα προετοιμασίας παρασκευασμάτων, καθώς επίσης και παραδείγματα τρισδιάστατης απεικόνισης κυτταρικών δομών.

APPLICATIONS OF CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY IN CELL BIOLOGY

Nezis, I.P., and L.H. Margaritis

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis 15784 Athens, Greece

The most significant achievement in the field of light microscopy in the past twenty years is probably the development of confocal laser scanning microscope (CLSM). The principle of this microscope is based on the presence of a laser beam that scans the specimen at one level and we actually obtain an optical section. In this way the operator of the microscope can obtain optical sections from the whole volume of the specimen in a few minutes. These sections are stored via a camera in the hard disk of a PC and using the appropriate software we can obtain three-dimensional reconstruction of the cell. Also using laser beams of different wavelengths we can achieve double or triple labeling. In the present study we are presenting the advantages of confocal laser scanning microscopy in comparison to conventional light microscopy, various protocols for confocal microscopy and also some examples of three-dimensional reconstruction of whole cells or subcellular structures.

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ
ΘΥΛΑΚΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΩΝ
ΤΕΛΕΥΤΑΙΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ ΤΗΣ ΩΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΗ
*Drosophila melanogaster***

**Νέζης, Ι.Π.¹, Στραβοπόδης, Δ.¹, Παπασιδέρη, Ι.¹, Robert-Nicoud, M.²
και Α.Χ. Μαργαρίτης¹**

¹Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα, ²DyOGen, INSERM U309, Institute Albert Bonniot, Joseph
Fourier University, Grenoble, France

Στην παρούσα εργασία, παρουσιάζουμε τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης των θυλακοκυττάρων κατά την διάρκεια των τελευταίων σταδίων της ωογένεσης στη *Drosophila melanogaster*. Η μορφολογία των θυλακοκυττάρων παρουσιάζεται φυσιολογική από το στάδιο 10 μέχρι το στάδιο 14, εμφανίζοντας ευχρωματινικούς πυρήνες και καλά οργανωμένο κυτταρόπλασμα. Τα πρώτα σημάδια της απόπτωσης εμφανίζονται στο εμπρόσθιο πόλο του ωοθυλακίου στο στάδιο 14A, και χαρακτηρίζονται από την απουσία των μικρολαχνών, συμπύκνωση της χρωματίνης του πυρήνα, αναδιπλώσεις στην πυρηνική μεμβράνη και συμπύκνωση του κυτταροπλάσματος. Στο επόμενο στάδιο 14B οι πυρήνες των θυλακοκυττάρων περιέχουν αποδομημένο DNA, όπως φαίνεται μετά από χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης και TUNEL. Στη συνέχεια τα αποπτωτικά θυλακοκύτταρα φαίνεται να αποκολλούνται από το χόριο όταν το ώριμο ωοθυλάκιο βγαίνει από το ωοθηκάριο και περνάει από τον πλευρικό αγωγό. Τα αποκολλημένα θυλακοκύτταρα έχουν συμπυκνωμένη χρωματίνη, αποδιοργανωμένο κυτταρόπλασμα και περιβάλλονται από επιθηλιακά κύτταρα του αγωγού. Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να συνδυασθούν με το γεγονός ότι στις εισόδους των πλευρικών αγωγών παρατηρείται έντονη φαγοκυτταρική δράση από τα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία περιέχουν αποπτωτικά σωμάτια. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση του επαγωγέα της απόπτωσης etoposide στα ωοθυλάκια και διαπιστώθηκε ότι επάγεται η απόπτωση των θυλακοκυττάρων με σταδιοειδικό τρόπο. Σύμφωνα με τις παραπάνω παρατηρήσεις προτείνεται ένας πιθανός τρόπος απορρόφησης των αποπτωτικών θυλακοκυττάρων που αποτρέπει την απόφραξη των ωοθηκάρων και βοηθάει στην ομαλή παραγωγή των ωρίμων ωοθυλακίων κατά τη διάρκεια της ωογένεσης.

Η έρευνα αυτή επιχορηγήθηκε από το πρόγραμμα TMR-Network, Grant N° ERBFMRXCT 980200 στον Α.Χ.Μ)

DYNAMICS OF APOPTOSIS IN THE OVARIAN FOLLICLE CELLS DURING THE LATE STAGES OF *DROSOPHILA* OOGENESIS

Nezis, I.P.¹, Stravopodis, D.¹, Papassideri, I.¹, Robert-Nicoud, M.² and L.H. Margaritis¹

¹Faculty of Biology, Department of Cell Biology and Biophysics University of Athens, Panepistimiopolis 15784 Athens, Greece

²DyOGen, INSERM U309, Institute Albert Bonniot, Joseph Fourier University, Grenoble, France

In the present study, we demonstrate the apoptotic events of the ovarian follicle cells during the late stages of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. Follicle cell morphology appears normal from stage 10 up to stage 14, exhibiting euchromatic nuclei and well-organized cytoplasm. First signs of apoptosis appear at the anterior pole of the egg chamber at stage 14A. They are characterized by loss of microvilli at the apical cell membrane, alterations in nuclear morphology, such as chromatin condensation and convolution of the nuclear membrane and also by condensation and vacuolization of the cytoplasm. During the following stage 14B the follicle cell nuclei contain fragmented DNA as demonstrated by acridine orange staining and TUNEL assay. Finally, the apoptotic follicle cells seem to detach from the eggshell when the mature egg chamber exits the ovariole. The detached follicle cells exhibit condensed nuclear chromatin, disorganized cytoplasm with crowded organelles and are surrounded by epithelial cells. The above results seem to associate with the abundant phagocytosis that was observed at the entry of the lateral oviducts, where the epithelial cells contain apoptotic cell bodies. Additionally, the effect of etoposide treatment was tested in the follicular epithelium and it was found that it induces apoptosis in a stage- and site- specific manner. These observations suggest a possible manner of absorption of the apoptotic follicle cells that prevents the blockage of the ovarioles and helps the regular production of mature eggs during oogenesis.

This work was supported by grant to L.H. Margaritis from European Union (TMR-Network, Grant N^o ERBFMRXCT 980200)

ΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΤΟΥ ΕΥΒΟΪΚΟΥ ΚΟΛΠΟΥ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΩΓΕΝΕΙΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Νικολαΐδου, Α.¹ και Σύμπουρα, Ν.²

¹Τομέας Ζωολογίας-Θαλάσσιας Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

²Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών, Άγιος Κοσμάς, Ελληνικό

Ο Ευβοϊκός κόλπος διαιρείται σε δύο τμήματα, τον Βόρειο και τον Νότιο Ευβοϊκό, μεταξύ των οποίων η ανταλλαγή θαλασσίων μαζών είναι περιορισμένη. Ο Ν. Ευβοϊκός δέχεται μεγαλύτερη επίδραση από την ανοικτή θάλασσα απ'ότι ο Β. Ευβοϊκός ο οποίος επηρεάζεται περισσότερο από τη χέρσο. Γενικά, από οικολογική άποψη, ο Ευβοϊκός κόλπος είναι μια περιοχή αδιατάρακτη και ολιγοτροφική ενώ τα προβλήματα εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές.

Στον Β. Ευβοϊκό τα επιφανειακά ιζήματα χαρακτηρίζονται από πολύ λεπτόκοκκη ιλύ στα βορειότερα, βαθύτερα (400μ) σημεία και από βιογενείς άμμους στα νοτιότερα. Η κύρια βενθική βιοκοινωνία αντιστοιχεί σ'αυτή της παράκτιας χερσογενούς ιλύος. Περιβαλλοντικά προβλήματα παρουσιάζουν η περιοχή της Στυλίδας, ο Νότιος Λιμένας Χαλκίδας και ο Όρμος της Λάρυμνας. Στις δύο πρώτες περιοχές τα κύρια αίτια της ρύπανσης φαίνεται να είναι η απόπλυση λιπασμάτων και τα αστικά λύματα. Ο όρμος της Λάρυμνας φορτίζεται από τις δραστηριότητες του εργοστασίου επεξεργασίας λατερίτη (φορτοεκφόρτωση των μεταλλευμάτων και των παραπροϊόντων τους, απόβλητα του εργοστασίου) και από τα λύματα της πόλης της Λάρυμνας. Τα επιφανειακά ιζήματα είναι εμπλουτισμένα σε Fe, Cr, Ni, Co, Mn, Zn, Pb, Cu ενώ υψηλά επίπεδα βιοσυσσώρευσης αυτών των βαρέων μετάλλων παρατηρούνται σε βενθικά ζώα.

Ο Ν. Ευβοϊκός στο βόρειο τμήμα του χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη αλατότητα υψηλότερες συγκεντρώσεις θρεπτικών αλάτων και σωματιδιακού οργανικού άνθρακα απ'ότι στο νότιο. Υψηλές τιμές χλωροφύλλης, ενδεικτικές ευτροφισμού, παρατηρήθηκαν από τον Κάλαμο μέχρι την Αυλίδα. Οι βενθικές βιοκοινωνίες παρουσίασαν μέτρια διατάραξη στις περιοχές Κερατέας, Πόρτο Ράφτη και Μαραθώνα οφειλόμενη σε συνδυασμό επεμβάσεων όπως αγωγούς λυμάτων, λιμάνια αλλά και αλιεία. Διαρροή καυσίμων από ναυάγιο τον Σεπτέμβριο του 2000 προκάλεσε τοπικά έντονη μείωση των βενθικών ειδών και υψηλές συγκεντρώσεις υδρογονανθράκων σε κυδώνια και κουτσομούρες. Οι φυσιολογικές συνθήκες όμως επανήλθαν σταδιακά τους επόμενους μήνες.

THE MARINE ENVIRONMENT OF EVOIKOS GULF AND ANTHROPOGENIC INFLUENCES

Nicolaidou, A.¹ and Simboura, N.²

¹Department of Zoology-Marine Biology, Section of Biology, University of Athens

²Greek Centre for Marine Research, Agios Kosmas, Elliniko

Evoikos Gulf is divided into two distinct parts, Northern and Southern Evoikos, with limited water exchange between them. Southern Evoikos is influenced more by the open sea than N. Evoikos, which is under the influence of the land. From the ecological point of view, Evoikos is generally an undisturbed, oligotrophic area with environmental problems restricted to certain areas.

In N. Evoikos, the surface sediment is very fine sand, in the deeper (400m) northern parts, and biogenic sands in the southern. Environmental disturbance has been observed in the area of Stylida, The Southern Harbour of Chalkida and the Bay of Larymna. In the first two areas, pollution is caused by the run off of fertilisers and sewage outfall. The Bay of Larymna is affected by the operation of a laterite treatment plant (loading-unloading of ore and by-products, plant wastes) and the sewage of the town of Larymna. The surface sediments are enriched in Fe, Cr, Ni, Co, Mn, Zn, Pb, Cu, while high levels of these heavy metals have accumulated in benthic organisms.

Southern Evoikos, in its northern part, is characterised by lower salinity and higher concentrations of nutrients and particulate organic carbon than in the southern. High chlorophyll levels, indicative of eutrophication, have been observed from Kalamos to Avlida. The benthic communities were slightly disturbed in the areas of Keratea, Porto Rafti and Marathon, due to a combination of anthropogenic activities including sewage discharge, harbours and trawling. An oil spill after a nautical accident in September 2000 caused a drastic decrease of benthic species and high concentrations of hydrocarbons in clams and fish. The ecosystem returned to normal conditions gradually within a few months.

ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΟΞΥΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙ- ΝΗ *otrA* ΚΑΙ *otrB*: Η ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥΣ ΣΕ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥ- ΚΗΤΕΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΟΙΚΟΣΥΤΗΜΑΤΩΝ

Νικολακοπούλου, Θ. και Α.Δ. Καραγκούνη

Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 157 81 Αθήνα

Η παρουσία των γονιδίων *otrA* και *otrB* μελετήθηκε σε δείγματα διαφορετικών ευρωπαϊκών περιοχών, με τη χρήση τεχνικών PCR. Έχει βρεθεί ότι γονίδια αυτά εντοπίζονται στο χρωμόσωμα του βακτηρίου *Streptomyces rimosus* και εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της οξυτετρακυκλίνης στο ίδιο στελέχος. Τα δείγματα που εξετάστηκαν προέκυψαν από έδαφος του ορίζοντα Ο₁, χώμα ριζόσφαιρας, περιπτώματα ζώων από κτηνοτροφικές μονάδες, κατεργασμένα λύμματα, και θαλασσινό νερό. Με βάση τις διαθέσιμες δημοσιευμένες αλληλουχίες, σχεδιάστηκαν μόρια εκκινήτες και ανιχνευτές, προκειμένου να εντοπιστούν τα γονίδια *otr* στα απομονωθέντα στελέχη στρεπτομυκήτων ανθεκτικών στην τετρακυκλίνη. Από τα αποτελέσματα της μελέτης, τα γονίδια ανιχνεύθηκαν σε 15 στελέχη στρεπτομυκήτων, κυρίως εδαφικής προέλευσης, στο σύνολο των 217 που εξετάστηκαν. Τα αποτελέσματα του PCR επιβεβαιώθηκαν με πειράματα υβριδισμού κατά Southern. Από τη μελέτη προκύπτει ότι η παρουσία των γονιδίων *otr* είναι πολύ περιορισμένη, και πως το γονίδιο *otrB* είναι περισσότερο διαδεδομένο στους συγκεκριμένους πληθυσμούς στρεπτομυκήτων σε σχέση με το γονίδιο *otrA*.

OXYTETRACYCLINE RESISTANCE GENES *otrA* AND *otrB*: THEIR DISTRIBUTION IN STREPTOMYCETES OF EUROPEAN HABITATS

Nikolakopoulou, T., and A.D. Karagouni

Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis 157 81 Athens

In this study, different European habitats were screened, using PCR typing methods, for the presence of the oxytetracycline resistance genes *otrA* and *otrB*, known to be involved in oxytetracycline biosynthesis in *Streptomyces rimosus*. Samples originated from soil, rhizosphere, manure, activated sludge and seawater. Molecular tools were developed to detect *otr* genes in tetracycline resistant streptomycete isolates. Resistant streptomycetes isolated from the different environments, were assigned to different taxonomic groups. 15 out of 217 isolates, mostly originated from soil samples, hosted *otr* genes. Our results indicated that the occurrence of *otr* genes in the investigated environments was limited and that *otrB*, in comparison to *otrA*, was more common among the screened streptomycete populations.

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ MANNOSE-BINDING LECTIN ΣΤΗΝ ΙΡΙΑΙΖΟΥΣΑ ΠΕΣΤΡΟΦΑ

Νικολακοπούλου, Κ. και Ι.Κ. Ζαρκάδης

Εργαστήριο Γεν. Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Ρίο,
Πανεπιστημιούπολη, Πάτρα

Κατά την διάρκεια της εξέλιξης αναπτύχθηκαν δύο συστήματα άμυνας των οργανισμών έναντι λοιμώξεων, η φυσική και η προσαρμοστική ανοσία. Το συμπλήρωμα είναι ένα αρχέγονο σύστημα με ρόλο τελεστή και για τους δύο μηχανισμούς άμυνας, μέσω των τεσσάρων οδών ενεργοποίησής του (κλασσικής, εναλλακτικής, λεκτινής και λυτικής οδού). Η Mannose-binding lectin (MBL) είναι λεκτίνη τύπου-C που εμπλέκεται στην πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή μέσω της δέσμευσης σε υδατάνθρακες της επιφάνειας των μικροοργανισμών, και οδηγεί σε οψωνινοποίησή τους. Για την ενεργοποίηση της οδού της λεκτινής η MBL απαιτεί την δράση των σερινοπρωτεασών MASP. Με σκοπό την αποσαφήνιση της προέλευσης και εξέλιξης της πρωτεΐνης MBL των θηλαστικών, απομονώθηκαν cDNA κλώνοι ομόλογοι της MBL από cDNA βιβλιοθήκη ήπατος ιριδίζουσας πέστροφας. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν δύο cDNA κλώνοι, TMBL1 και TMBL2 μεγέθους 1002 και 743 νουκλεοτιδίων, αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες που παράγονται από τα γονίδια TMBL1 και TMBL2 απαρτίζονται από 185 και 186 κατάλοιπα αμινοξέων αντίστοιχα και εμφανίζουν μεταξύ τους 83.73% ομολογία. Η ανάλυση της αλληλουχίας έδειξε πως το καρβοξυτελικό άκρο των MBL πρωτεϊνών της πέστροφας περιλαμβάνει την περιοχή δέσμευσης υδατανθράκων CRD (carbohydrate recognition domain) η οποία παρουσιάζει 32% ομολογία με αντίστοιχες περιοχές των λεκτινών τύπου-C στα θηλαστικά. Η περιοχή collagen-like, κοινό χαρακτηριστικό των MBL στα ανώτερα σπονδυλωτά, απουσιάζει από τις MBL1 και MBL2, σε συμφωνία με τις γνωστές πρωτεΐνες MBL στα ασπόνδυλα. Τα γονίδια MBL1 και MBL2 εμφανίζουν διαφορική έκφραση στο επίπεδο του mRNA μεταξύ των ιστών του οργανισμού της πέστροφας.

Η εργασία υποστηρίζεται από πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ 99ΕΔ483

MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF MANNOSE- BINDING LECTIN GENES IN RAINBOW TROUT

Nikolakopoulou, K., and I.K. Zarkadis

Department of General Biology, School of Medicine, University of Patras, 26500 Rion,
Panepistimioupolis, Patra

During evolution, immunity to infection is mediated by two general systems, adaptive and innate. The complement is an ancestral system, which plays an important role as an effector of both host defence mechanisms, through four pathways of activation (classical, alternative, lectin and lytic). Mannose-binding lectin (MBL) is a serum collectin (i.e. mosaic protein with collagenous and lectin domains) involved in the first line of host defence against various microbes. MBL exerts its function by binding to the carbohydrate structures on microbial surfaces through its carbohydrate recognition domain (CRD), followed by direct opsonization or complement lectin pathway activation via the MBL associated serine proteases (MASP). To elucidate the origin and evolution of mammalian MBL, two cDNA clones of MBL homologous, named TMBL1 (1002bp) and TMBL2 (743bp), were isolated from a cDNA λ gt11 liver rainbow trout library. The deduced proteins contain 185 and 186 amino acid residues, respectively and they present 83.73% identity. Sequence analysis revealed that the carboxyl-terminal half of the trout MBLs contains a carbohydrate recognition domain (CRD) that present 32% identity to homologous C-type lectins of mammalian MBLs. They lack a collagen-like domain that is characteristic in higher vertebrate MBLs, in agreement to known invertebrate MBLs. MBL1 and MBL2 genes present differential expression in m-RNA levels among trout tissues.

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΔΜΙΟΥ ΣΤΟ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ pH
ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΥΡΟΣΤΑΦΥΛΙΚΗΣ
ΚΙΝΑΣΗΣ ΣΕ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΠΤΙΚΟΥ
ΑΔΕΝΑ ΤΟΥ ΜΥΔΙΟΥ *Mytilus galloprovincialis***

Νταϊλιάνης, Σ., Καλογιάννη, Μ.

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

Είναι γνωστό πως τα βαρέα μέταλλα και συγκεκριμένα το κάδμιο, είναι μεταξύ των κυριότερων ρυπαντών του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Στα δίθυρα μαλάκια τα βαρέα μέταλλα μπορούν να επιδράσουν σε διάφορα στάδια του κυτταρικού μεταβολισμού, όπως στη μεμβρανική μεταφορά, στη δραστικότητα διαφόρων ενζύμων ή στη σταθερότητα της λυσοσωμικής μεμβράνης, καθώς και να οδηγήσουν σε φυσιολογικές αλλαγές του οργανισμού. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η μεταβολή του ενδοκυτταρικού pH (pHi) σε απομονωμένα κύτταρα πεπτικού αδένου του μυδιού *Mytilus galloprovincialis*, καθώς και η μεταβολή της δραστικότητας της πυροσταφυλικής κινάσης (PK) μετά από επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων καδμίου. Επίδραση CdCl₂ (50 μM) προκάλεσε σημαντική αύξηση του pHi των κυττάρων του πεπτικού αδένου. Ομοίως, μετά από επίδραση καδμίου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της δραστικότητας της PK συγκριτικά με την δραστικότητα στα κύτταρα ελέγχου. Η αύξηση του pHi των κυττάρων αναστάληκε, όταν μαζί με το κάδμιο χρησιμοποιήθηκαν αμιλορίδιο (10 μM), ο αναστολέας του ανταλλάκτη Na⁺-H⁺, σταυροσπορίνη (20 nM), ο αναστολέας της πρωτεϊνικής κινάσης C, καθώς και προπρανολόλη (10 μM), ο ανταγωνιστής των β-αδρενεργικών υποδοχέων. Επίδραση των παραπάνω αναστολέων είχε παρόμοια αποτελέσματα και στην δραστικότητα της PK. Αντίθετα, επίδραση PMA 10 nM (phorbol 12-myristate 13-acetate) είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του pHi και της ενζυμικής δραστικότητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το κάδμιο προκαλεί αύξηση του pHi και επαγωγή της δραστικότητας της PK σε κύτταρα του πεπτικού αδένου του μυδιού *Mytilus galloprovincialis*, πιθανά μέσω ενεργοποίησης του ανταλλάκτη Na⁺-H⁺ και με τη συμμετοχή της πρωτεϊνικής κινάσης C.

**EFFECTS OF CADMIUM ON INTRACELLULAR pH AND
ON PYRUVATE KINASE ACTIVITY IN ISOLATED
DIGESTIVE GLAND CELLS OF MUSSEL *Mytilus
galloprovincialis***

Dailianis, S., Kaloyianni, M.

Laboratory of Animal Physiology, Zoology Department, School of Biology, Aristotle University of
Thessaloniki, Thessaloniki – 54124 Greece

It is well known that heavy metals are among the major pollutants in the marine environment. In particular, cadmium represents one of the major aquatic pollutants. In mussels, heavy metals are known to affect several aspects of cell metabolism such as membrane transport mechanisms, enzyme activities, lysosomal stability and can ultimately lead to physiological alterations at the organismal level. In the present study the effects of various cadmium concentrations on the intracellular pH (pHi) and pyruvate kinase (PK) activity of isolated digestive gland cells of mussel *Mytilus galloprovincialis* was investigated. Incubation of the isolated cells with CdCl₂ (50 μM) caused a significant rise in pHi compared to the control cells. PK activity was also significantly increased in the presence of cadmium. When together with cadmium, amiloride (10 μM), which inhibits Na⁺-H⁺ exchanger, staurosporine (20 nM), an inhibitor of protein kinase C (PKC), and propranolol (10 μM), an antagonist of β-adrenergic receptors, were used, a significant decrease of pHi was observed. Effect of the latter molecules also inhibited PK activity. The presence of PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) resulted in an increase of pHi as well as of PK activity. The results suggest that cadmium causes an increase of pHi as well as an activation of PK activity, possibly through Na⁺-H⁺ exchanger induction and protein kinase C involvement, in isolated digestive gland cells of mussel *Mytilus galloprovincialis*.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ, ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΦΩΤΟΣΗΜΑΝΣΗΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Ξαπλαντέρη, Μ. και Δ.Α. Καλαζής

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα

Το φωτοδραστικό ανάλογο της σπερμίνης, η Ν¹-αζιδοβενζαμιδινο (ABA) -σπερμίνη, διατηρεί σχεδόν όλες τις βιοχημικές ιδιότητες της μητρικής πολυαμίνης. Με δεδομένο το γεγονός αυτό, η ABA-σπερμίνη δεσμεύθηκε ομοιοπολικά, μέσω ακτινοβόλησης, σε 23S rRNA ή 50S ριβοσωματικές υπομονάδες του εντεροβακτηρίου *E. coli*. Εφαρμόζοντας τεχνικές εκλεκτικής επίασης με RNase H και προέκτασης πριμοδοτή, οι θέσεις δέσμευσης της ABA-σπερμίνης στο 23S rRNA ταυτοποιήθηκαν και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες θέσεις δέσμευσης στις 50S ριβοσωματικές υπομονάδες. Για το 23S rRNA, βρέθηκε ότι η ABA-σπερμίνη δεσμεύεται κατά προτίμηση στις περιοχές I, IV και V. Σύζευξη του 23S rRNA με τις αντίστοιχες ριβοσωματικές πρωτεΐνες διευκόλυνε παρά παρεμπόδισε τη δέσμευση του φωτο-ανιχνευτή. Η περιοχή I έχει βρεθεί ότι αποτελεί στόχο υδρολυτικής δράσης διασθενών μετάλλων (Polacek & Barta, 1998, *RNA*, 4:1282-94). Έτσι, ήταν λογικό να υποθέσουμε ότι περιέχει μία γενική θέση δέσμευσης κατιόντων και ότι τα κατιόντα παίζουν σπουδαίο ρόλο στη σωστή αναδίπλωση της περιοχής I στο χώρο. Οι περιοχές IV και V συμμετέχουν στη συγκρότηση του καταλυτικού κέντρου της πεπτιδυλοτρανσφεράσης. Πολλές θέσεις δέσμευσης της σπερμίνης στις περιοχές αυτές βρέθηκε να είναι ίδιες ή σε μικρή απόσταση από θέσεις δέσμευσης του tRNA. Το εύρημα αυτό εισηγείται ότι η σπερμίνη, δεσμευόμενη στις περιοχές IV και V, διεγείρει το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού, είτε διευκολύνοντας την αποκατάσταση μιας κατάλληλης διαμόρφωσης του 23S rRNA, είτε συμμετέχοντας απ' ευθείας στο μηχανισμό της κατάλυσης. Σε συμφωνία μ' αυτό, 70S ριβοσώματα συγκροτημένα από φωτοσημασμένες 50S υπομονάδες και άθικτες 30S υπομονάδες καταλύουν το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού πιο αποτελεσματικά, απ' ότι άθικτα ριβοσώματα.

Ευχαριστήρια αναφορά: Η εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια προγράμματος που έχει επιχορηγηθεί από την ΓΓΕΤ και το Κοινοτικό Ταμείο Στήριξης, καθώς και από το Υπουργείο Υγείας.

INSIGHTS INTO THE MECHANISM OF POLYAMINE ACTION ON PROTEIN SYNTHESIS, USING PHOTO- AFFINITY LABELING TECHNIQUES

Xaplanteri, M., and D.L. Kalpaxis

Laboratory of Biochemistry, School of Medicine, University of Patras, GR-26500 Patras, Greece

The photoreactive analogue of spermine, *N*¹-azidobenzamidino (ABA) - spermine, retains almost all biochemical properties of the parent polyamine. On the basis of this fact, ABA-spermine was covalently attached after irradiation to *E. coli* naked 23S rRNA or 50S ribosomal subunits. By means of RNase H digestion and primer extension, the crosslinking sites of ABA-spermine in naked 23S rRNA were identified and compared to those observed in 50S subunits. Domains I, IV and V in naked 23S rRNA were found to be preferable binding sites for ABA-spermine. Association of 23S rRNA with ribosomal proteins rather facilitated than suppressed its interaction with photoprobe. Domain I has been found to be also efficiently hydrolyzed by several divalent metal ions (Polacek & Barta, 1998, *RNA*, 4:1282-94). Therefore, it is reasonable to suppose that domain I contains a general cation binding site and that cations are important for the correct folding of this region. Domains IV and V comprise the peptidyl transferase center. Many spermine crosslinking sites in these regions were the same or in close proximity to tRNA footprint- or tRNA crosslink-interaction sites. This support the proposal that spermine upon binding to domains IV and V may stimulate the formation of peptide bond, either by facilitating the establishment of an appropriate conformation of 23S rRNA tertiary structure or by participating directly in the mechanism of catalysis. Consistent with this hypothesis is the finding that 70S ribosomes reconstituted from photolabeled 50S subunits and native 30S subunits catalyze peptide-bond formation more efficiently than untreated ribosomes.

Acknowledgements: *This work was supported in part by a grant from the GSRT- Ministry of Development of Greece and the European Social Fund, and by a grant from the Greek Ministry of Health.*

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΕΣ ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΥ ΩΟΘΕΤΗ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*)

Οικονομίδου, Β.Α., Κυριλλή, Μ.Δ., Μπόκαρη, Α.Α., Χαμόδρακας, Σ.Ι.

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα

Η *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*) είναι ένα έντομο επιβλαβές για την ελιά, πλήττοντας τις περισσότερες χώρες της Μεσογείου. Ανήκει στα δίπτερα (*Tephritidae*) και οι λάρβες του τρέφονται αποκλειστικά με καρπούς ελιάς, προκαλώντας στη Μεσόγειο καταστροφή της σοδειάς μεγαλύτερη από 30%. Η καταστροφή του καρπού επιτελείται με την εναπόθεση των αυγών του εντόμου σε αυτόν. Η εναπόθεση γίνεται μέσα από ένα ειδικό, ισχυρό και ανθεκτικό εξάρτημα, τον ωοθέτη, ο οποίος βρίσκεται στο πίσω ακραίο μέρος της κοιλιακής χώρας των θηλυκών εντόμων και αποτελείται από τρία τμήματα, τα δύο από τα οποία είναι συστατά. Χρησιμοποιήσαμε Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης, Περίθλαση ακτίνων-Χ, Φασματοσκοπία ATR FT-IR και Φασματοσκοπία FT-IR, προκειμένου να μελετήσουμε την εξωτερική μορφολογία και τη δομή του ωοθέτη και των συνιστωσών του μορίων. Οι πρώτες ενδείξεις από τα πειραματικά δεδομένα, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το δερμάτιο-κύριο συστατικό του ωοθέτη- αποτελείται από κρυσταλλίτες χιτίνης και πρωτεΐνες με χαρακτηριστική δομή β-πτυχωτών επιφανειών.

PRELIMINARY STRUCTURAL STUDIES OF THE *Bactrocera* *oleae* (*Dacus oleae*) OVIPOSITOR

Iconomidou, V.A., Kyrilli, M.D., Bokari, A.A., and S.J. Hamodrakas

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Athens 157 01

The olive fruit fly *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*) is a serious pest of olives in most of the countries around the Mediterranean sea. It is a *Dipteran* (*Tephritidae*) and its larvae are fed exclusively on olive fruits. The damage is caused by egg laying and by tunneling of larvae in the fruit, which results in about 30 percent loss of the olive crop in Mediterranean countries. So, this insect is also of a great economical importance. The laying of the eggs is achieved by an egg laying apparatus called ovipositor. It is a tough, resilient, elastic and resistant structure located at the tip of a female insect's abdomen, which consists of three (two of them contractile) parts. We have used Scanning Electron Microscopy, X-ray Diffraction, ATR FT-IR Spectroscopy and Transmittance FT-IR Spectroscopy, in order to study the outer morphology and the structure of the ovipositor and of its component molecules. The first indications are that the cuticle -the major part of the ovipositor- is a composite material, which consists of crystalline chitin and of proteins, adopting predominantly a characteristic β-pleated sheet type of structure.

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΚΙΝΗΤΩΝ ΤΗΛΕΦΩΝΩΝ
ΣΤΗΝ ΩΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *Drosophila Melanogaster*****Παναγόπουλος, Δ.Ι. και Α.Χ. Μαργαρίτης**Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα

Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε για να παρατηρήσουμε και να καταγράψουμε, ενδεχόμενη διαφορά στον ρυθμό ωογένεσης στις ωοθήκες νεοεκδυθέντων θηλυκών εντόμων *Drosophila melanogaster*, wild type Oregon R, που εκτέθηκαν σε RF ηλεκτρομαγνητικό πεδίο από κεραία GSM κινητού τηλεφώνου συχνότητας 900MHz, από τον αντίστοιχο ρυθμό σε μη εκτεθειμένα έντομα, (control). Νεοεκκολαφθέντα θηλυκά έντομα κάθε ομάδας, συλλέχθηκαν εντός διαστήματος 30min, ώστε να είναι καλά συγχρονισμένα κατά την ανάπτυξή τους, χωρίστηκαν σε δύο ισάριθμες υποομάδες Α, Β, μετά από ελαφριά νάρκωση και τοποθετήθηκαν σε σωλήνες με τροφή. Η υποομάδα Α, ήταν πάντα τα έντομα που εκτέθηκαν στο πεδίο, ενώ η υποομάδα Β, το αντίστοιχο control. Μετά από παρέλευση ορισμένου αριθμού ωρών για κάθε ομάδα, που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης για τα πρώτα ωοθυλάκια των ωοθηκών τους, όλα τα έντομα της ομάδας, (εκτεθειμένα και μη), ανατέμνονταν, αφαιρούνταν ολόκληρες οι ωοθήκες άθικτες, φωτογραφίζονταν μέσω οπτικού μικροσκοπίου με την ίδια ακριβώς μεγένθυση και συγκρίνονταν κατά μέσο όρο, ως προς το μέγεθός τους. Η έκθεση στο πεδίο έγινε για 6 min ανά 24ωρο, τοποθετώντας την κεραία του κινητού τηλεφώνου σε επαφή εξωτερικά με τον γυάλινο σωλήνα με τα έντομα. Η ωογένεση στη *Drosophila melanogaster* αποτελεί πρότυπο σύστημα κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης, είναι μια καλά μελετημένη διαδικασία και μία ιδιαίτερα ενεργός βιολογική φάση, κατά συνέπεια ευαίσθητη σε εξωγενείς επιδράσεις. Ξεκινάει στα θηλυκά έντομα όταν αυτά βρίσκονται στα τελευταία στάδια χρυσαλίδας ενώ κατά την έκδυσή τους, φέρουν στις ωοθήκες τους τα πρώτα προβιτελλογενετικά ωοθυλάκια. Τα πρώτα ώριμα ωοθυλάκια σταδίου 14B, έχουν σχηματισθεί κατά το τέλος του δεύτερου 24ώρου μετά την έκδυση του τέλειου θηλυκού εντόμου. Ο ρυθμός ανάπτυξης των ωοθηκών κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων 24ώρων ζωής του τέλειου θηλυκού εντόμου, μπορεί να εκτιμηθεί από το ρυθμό ανάπτυξης του πρώτου στη σειρά ωοθυλακίου σε κάθε ωοθηκάριο κάθε ωοθήκης, αφού ο αριθμός ωοθηκαρίων ανά ωοθήκη είναι σταθερός για κάθε συγκεκριμένο είδος του εντόμου και για συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας και επί πλέον επειδή σε κάθε ωοθηκάριο το πρώτο μόνο στη σειρά ωοθυλάκιο αναπτύσσεται εντελώς και μέχρι αυτό να εγκαταλείψει την ωοθήκη, τα επόμενα στη σειρά ωοθυλάκια παραμένουν σε προβιτελλογενετικά ή πρώιμα βιτελλογενετικά στάδια. Στο πείραμα αυτό διαπιστώσαμε ότι το GSM πεδίο από κεραία κινητού τηλεφώνου, προκαλεί καθυστέρηση στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων-ωοθηκών, των εκτεθειμένων θηλυκών εντόμων, δηλαδή επιβραδύνει τη λειτουργία της ωογένεσης στο έντομο *Drosophila melanogaster*. Η διαφορά ανάπτυξης σε σχέση με τις ωοθήκες των control εντόμων, αρχίζει να γίνεται σαφώς ορατή στο τέλος των βιτελλογενετικών σταδίων και γίνεται εντονότερη, κατά τη διάρκεια των χοριογενετικών σταδίων.

Χρηματοδοτήθηκε από τον «Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας» του ΕΚΠΑ

EFFECT OF MOBILE PHONE RADIATION ON THE OOGENESIS OF *Drosophila melanogaster*

Panagopoulos, D.J. and L.H. Margaritis

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimiopolis 157 84 Athens, Greece

This experiment was performed in order to observe and record possible differences in the rate of oogenesis in the ovaries of newly emerged *Drosophila melanogaster*, wild type Oregon R, female flies, that were exposed to RF electromagnetic field from the antenna of a GSM mobile phone with a carrier frequency at 900MHz, compared to the corresponding rate of non-exposed insects, (control). Newly emerged female flies of each group, were selected within 30min in order to be well synchronized during their development, anesthetized lightly, separated in two subgroups A, B and put in glass vials with food. Subgroups A contained always the exposed insects, while subgroups B contained the corresponding control insects. After the lapse of certain hours for each group, corresponding to certain developmental stages for the first follicles in their ovaries, all the insects of the group, (exposed and control), were dissected, their whole ovaries were taken out intact, photographed through an optical microscope with the same magnification and compared according to their size. The insects were irradiated by placing the antenna of the mobile phone, outside of the glass tube, in contact with the glass walls and parallel to the vials axis. The duration of the exposure to the GSM field was 6min per day. The process of oogenesis in *Drosophila melanogaster* is a well-studied model system of cell development and differentiation and a very active biological process, so as to be sensitive enough to external influences. It starts in female insects in the late pupae stages and when adult flies are emerged they carry in their ovaries, follicles at the first pre-vitellogenic stages. The first mature follicles of stage 14B are developed about 45-48h after eclosion. The development rate of the ovaries during the first two days of the adult female fly, can be estimated by the development rate of the first follicle in each ovariole of each ovary, since the number of ovarioles in each ovary is constant for each *Drosophila* species and for certain culture conditions. Also, in each ovariole, only the first follicle develops completely and until this one is laid as a mature egg, the ones behind remain in pre-vitellogenic or early vitellogenic stages. Our experiment showed that the GSM field from a mobile phone antenna causes a delay in follicle and ovary development of the exposed female insects, in other words causes delay in the process of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. The difference in the development in relation to the ovaries of the control insects becomes evident during the late vitellogenic stages and gets even more obvious during the choriogenic stages.

Supported by the "Special Research Account" of Athens University

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ F-ΑΚΤΙΝΗΣ ΑΠΟ ΚΥΤ-
ΤΑΡΑ SERTOLI *IN VITRO* ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ 12-
O-TETRADECANOYLPHORBOL-13-ACETATE (TPA)**

**Παναγοπούλου, Ε.¹, Αλεπόρου, Β.², Τρουγκάκος, Ι.Π.³, Αγγελοπούλου, Β.²,
Κουλούκουσα, Μ.¹, Κίττας, Χ.¹, Μαρίνος, Ε.¹**

¹Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, Παν/μιο Αθηνών, ²Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Παν/μιο Αθηνών, ³Εργαστήριο Μοριακής-Κυτταρικής Γήρανσης, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Το 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) δρα ενεργοποιώντας την πρωτεϊνική κινάση C και αποτελεί ισχυρό συγκαρκινογόνο. Επώαση των κυττάρων με TPA έχει σαν αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση αρκετών πρωτεϊνών του κυττάρων σε κατάλοιπα τυροσίνης μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται και πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού. Η επίδραση του TPA όσον αφορά την κινητική πολυμερισμού/αποπολυμερισμού των ινιδίων ακτίνης δεν έχει αναλυθεί εκτενώς. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται αποτελέσματα που αφορούν την κινητική πολυμερισμού των ινιδίων ακτίνης (F-ακτίνη) σε προεμφυβικά κύτταρα Sertoli *in vitro* μετά την επίδραση του TPA. Τα κύτταρα καλλιεργούνται για 4 ημέρες σε τρυβλία Petri σε συνθετικό καλλιεργητικό υλικό MEM, σε τελική συγκέντρωση 9×10^4 κύτταρα/τρυβλίο. Τις τελευταίες 8hrs της καλλιέργειας προστίθεται TPA σε τελική συγκέντρωση $10^{-7}M$. Η μελέτη βασίζεται σε ειδικά βελτιωμένη μέθοδο απομόνωσης της F-ακτίνης μέσω διαφορικής φυγοκέντρησης που συνδυάζεται με SDS-PAGE και ανοσοσύτρωμα (immunoblotting). Τα αποτελέσματα δείχνουν μείωση της F-ακτίνης στα κύτταρα Sertoli *in vitro*, μετά την επίδραση του συγκαρκινογόνου TPA που πιθανώς σχετίζεται με μηχανισμούς γενικότερης αναδιαμόρφωσης του κυτταροσκελετού. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύονται περαιτέρω από προηγούμενες μελέτες φθορισμού, όπου μετά από επίδραση TPA είναι εμφανής η μεταβολή της διάταξης των ινιδίων ακτίνης.

STUDY OF THE F-ACTIN FRACTION FROM SERTOLI CELLS *IN VITRO* AFTER THE EXPOSURE TO 12-O-TETRADECANOYLPHORBOL-13-ACETATE (TPA)

Panagopoulou, E.¹, Aleporou, B.², Trougakos, I.P.³, Agelopoulou, B.², Kouloukoussa, M.¹, Kittas, Chr.¹, Marinos, E.¹

¹Laboratory of Histology and Embryology, Medical School, University of Athens, ²Department of Genetics and Biotechnology, Biology Department, University of Athens, ³Laboratory of Molecular and Cellular Aging, Institute of Biological Research and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation

12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) is a potent tumor promoter and acts by activating protein kinase C. Incubation of cells with TPA results in the phosphorylation of tyrosine residues of several proteins, among which many proteins that are involved in cytoskeleton arrangement. The action of TPA concerning the actin kinetics has not been yet clarified. In this work results are presented concerning the F-actin kinetics in prepubertal Sertoli cells *in vitro* after the exposure to TPA. The cells are cultured for 4 days in Petri dishes in the presence of MEM synthetic culture medium at a final density of 9×10^4 cells/dish. TPA is added at a final concentration of 10^{-7} M for 8hrs at the end of the culture period. The study is based on a specially developed procedure for F-actin isolation via differential centrifugation combined with SDS-PAGE and immunoblotting. The results show that after the addition of TPA reduction of F-actin level is observed. This is probably related with mechanisms of cytoskeletal rearrangements. These observations are further reinforced by previous fluorescent studies where TPA was shown to promote obvious F-actin redistribution.

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΥ ΔΙΑ-
ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΚΑΙ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ ΟΥΡΙΚΟΥ ΥΑΡΑ****Πανταζοπούλου, Α., Κουκάκη, Μ. και Γ. Διαλλινάς**Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 15781 Πανεπιστημιούπολη, Αθήνα.
E-mail: diallina@biol.uoa.gr

Είναι γνωστό ότι οι μεταφορείς, όπως όλες οι μεμβρανικές ή εκκρινόμενες πρωτεΐνες, ακολουθούν ένα πολύπλοκο και ρυθμιζόμενο ενδοκυτταρικό μονοπάτι τελικής στόχευσης στην πλασματική μεμβράνη (τοπογένεση)(1). Επίσης, η «αποβολή», μέσω ενός αντίστροφου μηχανισμού, από τη μεμβράνη είναι μέρος του φυσιολογικού κύκλου ζωής των πρωτεϊνών αυτών και συχνά ενεργοποιείται μετά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως φωσφορλίωση ή ουβικουιτιδίνωση. Βασικό πρωταρχικό βήμα των μηχανισμών πρωτεϊνικής τοπογένεσης ή έκκρισης είναι η «μετάθεση» των πρωτεϊνών στη μεμβράνη του ΕΔ. Στο βήμα αυτό σημαντικό ρόλο παίζει η αναγνώριση της «νέας» πρωτεΐνης, καθώς εξέρχεται του ριβοσώματος, από το σύμπλοκο μεταθέσης που βρίσκεται στην μεμβράνη του ΕΔ. Ελάχιστα είναι γνωστά για την περαιτέρω μεταφορά των πρωτεϊνών από το ΕΔ, στο Golgi και τελικά μεμβράνη μέσω κυστιδίων. Διάφορες παρατηρήσεις μας συγκλίνουν στη πρωτότυπη υπόθεση ότι συντηρημένες αλληλουχίες-μοτίβα στη 1^ο διαμεμβρανική α-έλικα (TMS1) ίσως λειτουργούν σαν ρυθμιστικά *cis*-στοιχεία στην τοπογένεση των διαφόρων οικογενειών μεταφορέων μέσω επαφών με εξειδικευμένους παράγοντες της μεταθέσης. Βάλαμε τις βάσεις για να εξετάσουμε την υπόθεση αυτή χρησιμοποιώντας σαν μοντέλο το μεταφορέα ουρικού (UarA) του *Aspergillus nidulans* (2). Η προσέγγιση μας είναι διπλή. Πρώτα, κατασκευάσαμε διάφορες μεταλλαγές που αντικαθιστούν ένα απολύτως συντηρημένο αμινοξύ του UarA (Q126) το οποίο βρίσκεται στο μοτίβο του TMS1 όλων των μελών της οικογένειας που ανήκει ο μεταφορέας αυτός (3). Οι μεταλλαγές κατασκευάστηκαν σε κατάλληλο φορέα (4) με κατευθυνόμενη *in vitro* μεταλλαξίγνεση και εισήχθηκαν στον *A. nidulans*. Θα παρουσιασθούν τα αποτελέσματα που αφορούν τους φαινοτύπους των μεταλλαγών αυτών και θα συζητηθεί κατά πόσο οι μεταλλαγές αυτές επηρεάζουν τη τοπογένεση του UarA. Στη δεύτερη προσέγγιση μας αναζητήσαμε *trans*-παράγοντες που πιθανώς αλληλεπιδρούν με το μοτίβο στο TMS1 του UarA. Κατασκευάσαμε φορέα ο οποίος μπορεί να προάγει την υπερέκφραση μιας περιοχής του UarA που αντιστοιχεί στις α-έλικες περιοχή TMS1-TMS2. Εάν η περιοχή αυτή εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις με παράγοντες απαραίτητους για τη τοπογένεση του UarA, μετασχηματισμένα στελέχη αγρίου τύπου που υπερεκφράζουν την περιοχή TMS1-TMS2 ίσως δώσουν φαινοτύπους συμβατούς με ελαττωματική τοπογένεση της πρωτεΐνης UarA. Θα παρουσιασθούν τα αποτελέσματα που αφορούν την υπερέκφραση των TMS1-TMS2 και θα αναπτυχθεί ο σχεδιασμός της χρήσης της τεχνολογίας της Πράσινης Φθορίζουσας Πρωτεΐνης για την περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών τοπογένεσης συγκεκριμένων οικογενειών μεταφορέων.

1. de Koning H, Diallinas G, Mol Membr Biol 2000,17(2):75-94

2. Gorfinkiel L, Diallinas G, Scazzocchio C, J Biol Chem 1993, 268(31):23376-81

3. Valdez-Taubas J, Diallinas G, Scazzocchio C, Rosa AL, Fungal Genet Biol 2000, 30(2):105-13.

4. Argyrou E, Sophianopoulou V, Schultes N, Diallinas G, Plant Cell 2001, 13(4):953-64

INVESTIGATING THE ROLE OF THE FIRST TRANS-MEMBRANE DOMAIN (TMS1) IN UapA TOPOGENESIS OR FUNCTION

Pantazopoulou A., Koukaki, M., and G. Diallinas

Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, 15781 Panepistimioupolis, Athens.
E-mail: diallina@biol.uoa.gr

Transporters follow a complex intracellular pathway to be targeted in the plasma membrane or other cellular membranes (1). In addition, following post-translational modifications, transporters are removed from membranes when not necessary for the cell or as part of their physiological life cycle. Transporter trafficking is a complex process that makes use of several factors of the general secretory pathway of the cell. The first step in transporter topogenesis is insertion into the ER membrane while removal from the membrane seems to be related to phosphorylation and ubiquitination. We have observed that transporter families usually share a highly conserved amino acid sequence motif in their first transmembrane domain (TMS1). This motif is different for each protein family. Here we describe preliminary studies, which intend to investigate the possibility that such a motif might act as a *cis*-acting signal for interaction with a family-specific *trans*-acting factor that will catalyze the integration of the transporter in the plasma membrane. We have chosen to investigate this possibility using the UapA transporter (2), an example of the Nucleobase-Ascorbate Transporter family (NAT), and the Green Fluorescent Protein (GFP) technology (3).

Our approach was dual. First, we investigated the functional role of the motif in TMS1 by constructing, by oligonucleotide directed targeted mutagenesis, *uapA* mutations that alter residue Q126, an absolutely conserved residue in the TMS1 motif of all NAT proteins. Plasmids carrying the different mutations were introduced by genetic transformation into an appropriate *A. nidulans* strain. We will discuss the effect of these mutations in respect to UapA function or topogenesis. In a second approach, we investigated whether TMS1 interacts with a factor necessary for integration of UapA into the membrane. If this was true, over-expression of TMS1 by itself might result in a negative-dominant phenotype (*uapA*⁻) by *titrating out* this *trans*-acting factor from the TMS1 of the UapA protein. We have constructed, using PCR technology and an appropriate expression vector (4), a plasmid for expressing in *A. nidulans* the N-terminal part of UapA, including the cytoplasmic N-tail, TMS1 and TMS2. This plasmid was used to transform a *uapA*⁺ strain of *A. nidulans*. Results concerning the phenotype of the transformants will be presented.

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ
ΟΥΡΑΚΙΛΗΣ ΣΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΖΩΟ *Leishmania
major*****Παπαγεωργίου, Γ.^{1,2}, Διαλλινάς, Γ.¹, Σοφianoπούλου, Β.³ και Κ. Σωτηριάδου²**

¹Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, ²Εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα. Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, 15310 Αθήνα. E-mail: diallina@biol.uoa.gr.

Πολλά είδη πρωτοζώων που ανήκουν στο γένος *Leishmania* είναι παθογόνα για τον άνθρωπο, προκαλώντας δερματικές και σπλαχνικές ασθένειες (λειτουργικές). Μεταδίδονται στα θηλαστικά από το έντομο Φλεβοτόμος με την μορφή προμαστιγωτών, όπου παρασιτούν με την μορφή αμαστιγωτών, κυρίως στα μακροφάγα (1). Στην Ελλάδα, η λειτουργική στους σκύλους αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα.

Παρόμοια με άλλα παθογόνα πρωτόζωα, η *L. major* είναι αυξότροφη για τις πουρίνες και στηρίζεται αποκλειστικά στα αποθέματα πουρινών του ξενιστή της. Παρά το γεγονός ότι για την θεραπεία αυτών των ασθενειών έχουν δοκιμαστεί φάρμακα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των πουρινών, δεν έχει γίνει συστηματική μελέτη των μεταφορέων πουρινών στην *L. major* (2). Εδώ περιγράφεται ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του μεταφορέα ουρακίλης στο παρασιτικό πρωτόζωο *L. major*. Η μεταφορά [³H-ουρακίλης] είναι ταχεία, εμφανίζει κινητική κορεσμού και πραγματοποιείται μέσω ενός μεταφορέα υψηλής συγγένειας με K_m 0,2μM. Η μεταφορά [³H-ουρακίλης] δεν αναστέλλεται από ένα ευρύ φάσμα νουκλεοσιδίων πουρινών και πυριμιδινών καθώς και από νουκλεοτιδικές βάσεις (συγκεντρώσεις μέχρι 1mM), με μοναδική εξαίρεση την 5-φθοροουρακίλη, ένα ισχυρό αντιμικροβιακό και αντικαρκινικό φάρμακο. Ο μεταφορέας ουρακίλης εμφανίζει μικρή ή και καθόλου συγγένεια για άλλα ανάλογα ουρακίλης. Πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν ότι ο μεταφορέας ουρακίλης στην *L. major* παρουσιάζει αναλογία με τον αντίστοιχο μεταφορέα στο Τρυπανόσωμα. Θα παρουσιαστούν τρέχουσες μελέτες που αποσκοπούν 1) στην διερεύνηση του μηχανισμού μεταφοράς ουρακίλης 2) στον λεπτομερή προσδιορισμό της εξειδίκευσης και κινητικής αυτού του μεταφορέα και 3) στην απομόνωση μεταλλαγμένων σειρών *L. major* που έχουν χάσει την ικανότητα να προσλαμβάνουν πουρίνες.

1. Burchmore RJ, Barret MP, Int. J. Parasitol. 2001, 12: 1311-20
2. Landfear SM, Curr. Opin. Microbiol. 2000, 3(4) : 417-21
3. De Koning HP, Jarvis SM, Biochem. Cell Biol. 1998; 76(5) :853-8.

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A URACIL TRANSPORTER IN THE PATHOGENIC PROTOZOON

Leishmania major

Papageorgiou, Y^{1,2}, Diallinas, G.¹, Sophianopoulou, V.³ and K. Soteriadou²

¹Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, 15781 Panepistimioupolis, Athens.

²Molecular Parasitology Laboratory, Hellenic Pasteur Institute, Athens. ³Institute of Biology, NCRS Demokritos, 15310 Athens. E-mail: diallina@biol.uoa.gr

Several species of protozoa belonging to the genus *Leishmania* are pathogenic for humans, causing visceral and cutaneous diseases (*leishmaniasis*). They are transmitted by phlebotomine sandflies as flagellated promastigotes to mammal hosts, where they live as aflagellated amastigotes mainly within macrophages (1). In Greece, leishmaniasis in dogs is a severe emerging problem.

Similar to other pathogenic protozoa, *L. major* is a purine auxotroph and is thus totally dependent on purine salvage from the host. Pharmacological applications include drugs interfering with purine metabolism but no study has systematically addressed the systems responsible for purine uptake (2). Here we describe the biochemical characterization of a transport system specific for uracil in *L. major*. Uptake of [³H]-uracil is rapid and saturable and appeared to be mediated by a single high-affinity transporter with an apparent K_m of 0.2 μ M. [³H]-Uracil uptake was not inhibited by a broad range of purine and pyrimidine nucleosides and nucleobases (concentrations up to 1 mM), with the exception of 5-fluorouracil, a potent antimicrobial and anticancer drug. Other chemical analogues of uracil had little or no affinity for the uracil transporter. Several observations suggest that the *L. major* uracil transporter is very similar to the analogous transporter in Trypanosomes (3). We will describe current efforts to i) investigate the mechanism of uracil transport, ii) define in detail the specificity and kinetics of this novel transporter, and iii) isolate purine uptake mutant lines in *L. major*

1. Burchmore RJ, Barrett MP, Int J Parasitol 2001, 12:1311-20

2. Landfear SM, Curr Opin Microbiol 2000, 3(4):417-21

3. de Koning HP, Jarvis SM, Biochem Cell Biol 1998;76(5):853-8

ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Παπαθανασοπούλου, Α., Η. Ηλιόπουλος

Εργαστήριο Γενετικής, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθήνας, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

Κατά την διάρκεια της εξέλιξης, η τρισδιάστατη δομή πρωτεϊνών διατηρείται σχεδόν αναλλοίωτη για ένα σύνολο οργανισμών παρά την διαφοροποίηση της αμινοξικής τους ακολουθίας. Προσεγγίζοντας δομικές διαφοροποιήσεις της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης αντλούνται πληροφορίες για λειτουργικές διαφοροποιήσεις.

Οι κοινές τρισδιάστατες δομές 3 οικογενειών ενζύμων (DHFR, GAPDH, LDH) μελετήθηκαν με δομική υπέρθεση. Για τους οργανισμούς της κάθε οικογένειας των οποίων η πρωτεϊνική τρισδιάστατη δομή είναι γνωστή, εντοπίστηκαν τα σημεία διαφοροποίησης, με έμφαση το ενεργό κέντρο και τις επιφάνειες διεπαφής συμπλόκων και πολυμερών.

Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι:

- 1) στην γαλακτική αφυδρογονάση (LDH)
 - σε θέσεις δέσμευσης του συνενζύμου NAD στην περιοχή του ενεργού κέντρου, υδρόφοβα αμινοξέα μεταλλάσσονται σε αρνητικά φορτισμένα τροποποιώντας το ηλεκτροστατικό περιβάλλον.
- 2) στην αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής D-γλυκεραλδεΐδης (GAPDH)
 - σε θέση δέσμευσης του συνενζύμου NAD και μόνο για την GAPDH από *Homo sapiens* παρατηρείται μετάλλαξη που προκαλεί αύξηση της ηλεκτραρνητικότητας με αποτέλεσμα την δομική μετατόπιση δευτεροταγών στοιχείων της πρωτεΐνης. Αποτέλεσμα είναι οι υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ συνενζύμου και πρωτεΐνης να γίνονται ισχυρότεροι με πιθανές λειτουργικές συνέπειες.
- 3) στην διϋδροφολική ρεδοκτάση (DHFR)
 - πέραν των γνωστών διαφοροποιήσεων στις θέσεις δέσμευσης του υποστρώματος στην περιοχή του ενεργού κέντρου, που διακρίνουν τα βακτηριακά DHFR από τα ευκαρυωτικά, παρατηρούνται μεταλλάξεις μεταξύ βακτηριακών, αρχαιοβακτηριακών και ευκαρυωτικών DHFR, σε θέσεις δέσμευσης του συνενζύμου NADP, όπου τροποποιούνται υδρόφοβες ή ουδέτερες πολικές περιοχές σε ηλεκτραρνητικές.

EVOLUTIONARY PRESSURE IN STRUCTURE AND FUNCTION OF PROTEINS

Papathanasopoulou, A., Eliopoulos, E.

Genetics Laboratory, Dept. of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens,
75 Iera Odos, 118 55 Athens

During evolution, the three dimensional structural features of proteins are conserved, despite changes in amino acid sequences. The analysis of structural data may extract important functional information.

In the present work, the known three-dimensional structures of three enzyme families (DHFR, GAPDH, LDH), were studied by structural superposition in order to detect structure related functional differences. For every organism that the 3D structure of the protein is known, aminoacid differences in the active center and complex interfaces, were located.

More specifically, it was found that:

- 1) For L-lactate dehydrogenase (LDH)
 - In the binding site of the coenzyme NAD, hydrophobic aminoacid residues change into electronegative ones, modifying the electrostatic environment of the region.
- 2) For D-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH)
 - In the binding site of the coenzyme NAD for the human enzyme, an aminoacid change is observed that increases the negative charge distribution in this area. This mutation has a mild effect in the structural disposition of secondary structure elements, that might affect the strength of hydrogen bonds between coenzyme and protein.
- 3) For Dihydrofolate reductase (DHFR)
 - Further from the known active site mutations that differentiate the bacterial DHFR from eukaryotic, this work revealed a number of mutations on the binding site of the coenzyme NADP, in between archaea, bacteria and eukaryota, which modify hydrophobic or neutral polar regions into negatively charged.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΣΠΑΝΙΩΝ ΦΥΛΩΝ ΒΟΟΕΙΔΩΝ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ**Παπακώστας, Σ.¹, Πλουμή, Κ.², Τριανταφυλλίδης, Α.¹, Δεληγιαννίδης, Π.¹, Τσίγκα, Α.¹, Χριστοδούλου, Βλ.³, Κατσαρές, Β.¹, και Κ. Τριανταφυλλίδης¹**¹Τομέας Γενετικής, Αναπτ. & Μοριακής Βιολογίας, Α.Π.Θ., 54124 Θεσ/νίκη, Τηλ. 0310 998309, E-mail: triant@bio.auth.gr²ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., Σταθμός Γεωργικής Έρευνας Χαλκιδικής, 632 00 Ν. Μουδανιά, τηλ. 03730 91422, E-mail: ploumi@otenet.gr³ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., Ινστιτούτο Κτηνοτροφίας Γιαννιτσών, Τηλ. 03820 31700, E-mail: vladim1@otenet.gr

Η ενασχόληση με την παραδοσιακή κτηνοτροφία ελαττώθηκε τα τελευταία χρόνια με δυσμενείς επιπτώσεις κυρίως στις αυτόχθονες φυλές οικόσιτων ζώων που κινδυνεύουν να εκλείψουν. Στα πλαίσια της διατήρησης της ελληνικής βιοποικιλότητας, άμεση είναι η ανάγκη γενετικού καθορισμού των αυτόχθονων φυλών στα βοοειδή, για λόγους τόσο επιστημονικούς όσο και οικονομικούς. Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η διάκριση μεταξύ δύο αυτόχθονων ελληνικών φυλών βοοειδών, της Βραχυκερατικής και της φυλής Κατερίνης, με την ανάλυση μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP) σε περιοχές του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA). Εξετάστηκαν 56 άτομα σε τρία τμήματα του mtDNA, δύο από τα οποία ανήκαν στην περιοχή του κυτοχρώματος b και ένα στο βρόχο εκτόπισης (D-loop). Σε κάθε τμήμα δοκιμάστηκαν 20 ενδονουκλεάσες περιορισμού για να διαπιστωθεί ποιες από αυτές έχουν θέσεις κοπής. Μετά από πέψεις σε όλα τα άτομα με αυτές που είχαν θέση κοπής δε βρέθηκε πολυμορφισμός σε καμιά από τις περιοχές του κυτοχρώματος b, ενώ σε αυτήν της D-loop βρέθηκε ένα ένζυμο που χαρακτήριζε κάποια άτομα της φυλής Κατερίνης. Επιπλέον, με την ανάλυση της πρωτοδιάταξης του DNA της περιοχής αυτής, διαπιστώθηκε ότι τα άτομα αυτά διέφεραν από τα υπόλοιπα σε μια βάση. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι ένα ένζυμο περιορισμού είναι σε θέση να διακρίνει τις Αφρικάνικες από τις Ευρωπαϊκές φυλές βοοειδών. Μετά από την ανάλυση των περιοριστικών προτύπων προέκυψε ότι όλα τα υπό εξέταση άτομα ανήκουν στην Ευρωπαϊκή φυλή.

Το πρόγραμμα χρηματοδοτήθηκε από το Υπουργείο Γεωργίας.

ANALYSIS OF THE MITOCHONDRIAL GENETIC DIVERSITY OF RARE GREEK BOVINE POPULATIONS

Papakostas, S.¹, Ploumi, K.², Triantafyllidis, A.¹, Deligiannidis, P.¹, Tsigas,
A.¹, Christodoulou, V.³, Katsares, V.¹, and C. Triantaphyllidis¹

¹Department of Genetics, Dev. & Mol. Biology, School of Biology, AUTH, GR 54124 Thessaloniki,
Tel. 0310 998309, E-mail: triant@bio.auth.gr

²NAGREF, Agricultural Research Center of Chalkidiki, 632 00, N. Moudania, Tel. 03730 91422, E-
mail: ploumi@otenet.gr

³NAGREF, Animal Breeding Institution of Giannitsa, Tel. 03820 31700, E-mail: vladim1@otenet.gr

A large-scale population transfer towards the big urban centres, observed in the last decades in Greece, resulted in the gradual desolation of the countryside. Thus, the traditional animal-breeding activities have been diminished, and the native breeds are endangered. Aiming to conserve the Greek biodiversity, a genetic identification of rare, native, bovine populations is eminent from a scientific and financial point of view. The primary objective of this project was the distinguishing between two Greek bovine populations (Vrachykeratiki and Katerini's) using mitochondrial DNA markers. A restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of two cytochrome b segments and one D-loop segment was performed in 56 individuals in total. The analysis did not reveal polymorphism in the two cytochrome b segments, while in the D-loop segment, some individuals from the Katerini's population differed from the overall sample. Moreover, sequence analysis of this D-loop segment revealed a base substitution between these Katerini's samples compared to the rest of the sample. According to literature, a specific restriction enzyme enables the discrimination between the African and the European bovine populations. At the course of this project, the use of this enzyme showed that all analysed samples had the same genetic profile with that of the European population. The genetic analysis of the above-mentioned samples is continued using advance DNA techniques.

Ministry of Agriculture financially supported the project.

ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ DR1: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ

Παπανδρέου, Ν.¹, Ηλιόπουλος, Η.¹, Παπαδόπουλος, Γ.Κ.²

¹Εργαστήριο Γενετικής, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο
Αθήνας, Ιερά Οδός 75, 118 55 Αθήνα

²Εργαστήριο Βιοχημείας και Βιοφυσικής, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τ.Ε.Ι.
Ηπείρου, 47100 Άρτα

Οι πρωτεΐνες ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II προσδένουν αντιγονικά πεπτίδια και τα παρουσιάζουν στους υποδοχείς των Τ λεμφοκυττάρων για αναγνώριση και ενδεχόμενη ανοσοαπόκριση. Η DR1 είναι μία τέτοια πρωτεΐνη. Η επιφάνειά της σχηματίζει μία αύλακα όπου προσδένονται τα πεπτίδια. Η προσομοίωση της αλληλεπίδρασης DR1-πεπτιδίων είναι ο σκοπός αυτής της μελέτης. Η κρυσταλλοδομή του συμπλόκου της DR1 με το πεπτίδιο HA306-318 του ιού της γρίπης χρησιμοποιήθηκε ως βάση για την προσομοίωση του συμπλόκου της DR1 με το πεπτίδιο GAD88-99 της πρωτεΐνης GAD65, που είναι αυτοαντιγόνο του διαβήτη τύπου 1 στον άνθρωπο. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε συνίσταται στην αντικατάσταση του πεπτιδίου HA από το πεπτίδιο GAD κρατώντας σταθερή την γεωμετρία του σκελετού. Στη συνέχεια, η τελική δομή υπολογίστηκε με ελαχιστοποίηση της ενέργειας, με το πεδίο QUANTA-CHARMm. Για μία ρεαλιστικότερη προσέγγιση του περιβάλλοντος της πρόσδεσης, προστέθηκε ένα κέλυφος νερού πάχους 10Å επάνω από το πεπτίδιο, στην περιοχή της αύλακας. Με αυτό το μοντέλο, υπολογίστηκε η ενέργεια πρόσδεσης για το πεπτίδιο GAD, καθώς και για μία σειρά παραλλαγών του, που προκύπτουν από μοναδιαίες μεταλλάξεις. Οι σχετικές σταθερές σύνδεσης που υπολογίστηκαν, ως προς το «φυσικό» πεπτίδιο, βρίσκονται σε συμφωνία με αποτελέσματα πειραματικών εργασιών¹. Συμπεραίνεται ότι είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη η διαλύτης σε προσομοιώσεις αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών MHC με αντιγονικά πεπτίδια.

1. De Oliveira, D., Harfouch-Hammoud, E., Stern, L.J., Otto, H., Papandreou, N.A., Cohen, H., Boehm, B.O., Bach, J.M., Caillat-Zucman, S., Walk, T., Jung, G., Eliopoulos, E., Papadopoulos, G.K., van Endert, P., *Molecular Immunology* 37: 81

SIMULATION OF AUTO-ANTIGEN PEPTIDE BINDING TO CLASS II MHC PROTEIN DR1: THE ROLE OF WATER

Papandreou, N.A.¹, Eliopoulos, E.¹, Papadopoulos, G.K.²

¹Laboratory of Genetics, Department of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens, GR-118 55 Athens, GREECE.

²Laboratory of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Agricultural Technology, T. E. I. of Epirus, GR-47100 Arta, GREECE.

Class II major histocompatibility complex (MHC) proteins bind antigen or auto-antigen peptides and present them to the T cell antigen receptor for recognition and initiation of immune response. DR1 is an MHC class II protein. Its surface forms an open groove, where peptides are bound. The simulation of DR1-peptide interaction is the subject of the present study.

The crystal structure of DR1 in complex with the hemagglutinin peptide HA306-318 was used as a reference to model the structure of the same allele in complex with the peptide epitope 88-99 of the human type-1 diabetes auto-antigen of glutamic acid decarboxylase (GAD) 65. The simulation protocol consisted of substituting the HA peptide with the GAD peptide, while keeping the same backbone geometry. Then, the structure and stability of the new complex was evaluated by energy minimisation techniques, using the QUANTA-CHARMm force field. In order to approach the actual peptide-binding environment *in vivo*, a 10Å thick shell of water molecules was placed above the peptide around the DR1 binding groove. Using this approach, the binding energy was calculated for the GAD peptide, as well as for a series of singly substituted variants. The resulting relative dissociation constants obtained (with respect to the native GAD peptide), compared with experimentally determined values¹, show a good overall agreement. We thus conclude that future simulations of MHC protein-peptide interactions should take into account the effect of solvent as one better approximating experimental conditions.

1. De Oliveira, D., Harfouch-Hammoud, E., Stern, L.J., Otto, H., Papandreou, N.A., Cohen, H., Boehm, B.O., Bach, J.M., Caillat-Zucman, S., Walk, T., Jung, G., Eliopoulos, E., Papadopoulos, G.K., van Endert, P., *Molecular Immunology* 37 : 813-825, 2001.

**ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ ΣΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ: ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΠΟΥ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΝΕΤΑΙ
ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΦΕΡΟΜΟΝΕΣ****Παππά, Κ.Μ. και S.C. Winans**

Department of Microbiology, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA

Έχει γίνει πρόσφατα αντιληπτό ότι τα βακτήρια αντιλαμβάνονται το μέγεθος του πληθυσμού τους και ενεργοποιούν σύνολα γονιδίων σε υψηλές συγκεντρώσεις κυττάρων, φαινόμενο που ονομάζεται 'quorum sensing'. Η επικοινωνία αυτή λαμβάνει χώρα μέσω χημικών ενώσεων που εκλύονται και επαναπροσλαμβάνονται από τα κύτταρα, λειτουργώντας σαν φερομόνες. Στα Gram(-) οι ουσίες αυτές είναι κατά κύριο λόγο ακυλιωμένες λακτόνες ομοσερίνης (AHLs).

Ένας από τους καλύτερα μελετημένους, αυτή τη στιγμή, μεταγραφικούς παράγοντες που ανταποκρίνονται σε AHL-τύπου φερομόνες είναι η πρωτεΐνη TraR του *Agrobacterium tumefaciens*. Στην παρούσα εργασία η TraR υπερεκφράστηκε ποσοτικά για πρώτη φορά σε *E. coli* παρουσία της συγγενέστερης της φερομόνης (λακτόνης της N-3-οξοκτανουΐλ-L-ομοσερίνης) και απομονώθηκε με συνδυασμό συμβατικής και FPLC-χρωματογραφίας. Κρυστάλλωση τόσο της ενδογενούς πρωτεΐνης, όσο και υποκατάστατων της με σεληνιο-μεθειονίνη, οδήγησε στην επίλυση της δομής της, ως συμπλόκου με τη φερομόνη και το DNA-χειριστή, σε διακριτικότητα 1.6 Å (συνεργασία με R-g. Zhang, A. Joachimiak, Structural Biology Center, Argonne National Laboratories, MI). Η TraR είναι διμερής και κάθε μονομερές αποτελείται από μια σφαιρική αμινοτελική υπομονάδα με α/β/α διάταξη δευτεροταγών δομών και μια εξίσου σφαιρική καρβοξυτελική υπομονάδα τεσσάρων α-ελίκων. Οι υπομονάδες συνδέονται μία σχετικά αδιάταχτη αλληλουχία λιγιστών καταλοίπων. Η αμινοτελική υπομονάδα φάνηκε να έχει εγκλωβισμένη στην υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητά της ένα μόριο φερομόνης και ένα ύδατος, ενώ η καρβοξυτελική υπομονάδα φέρει μια κλασική διαμόρφωση έλικας-στροφής-έλικας (H-T-H) για πρόσδεση στο DNA. Το DNA-στόχος της TraR κάμπτεται ελαφρά παρουσία της, γεγονός που αποδείχτηκε και με βιοχημικά πειράματα.

Η TraR ήταν γνωστό ως τώρα ότι μετά από επαγωγή της από την παραπάνω φερομόνη, ενεργοποιεί γονίδια συζευκτικότητας (*tra*) του T_i πλασμιδίου του *A. tumefaciens*, που προκαλεί ογκογένεση στα ανώτερα φυτά. Με την παρούσα εργασία φάνηκε ότι η TraR δρα επί πλέον στον ευρύτερο παρακίνητη του *repABC* συνεργιώματος (*oregon*) αναδιπλασιασμού του T_i, προσδενόμενη σε δύο σημεία-χειριστές. Βιοχημική και γενετική ανάλυση απέδειξε ότι παρουσία του συμπλόκου TraR/φερομόνης, η μεταγραφή των *repABC* γονιδίων ξεκινάει σε τρία καινούργια σημεία, με αποτέλεσμα την ανατροπή της καταστολής τους από τους RepA και RepB καταστολείς και την υπερέκφρασή τους. Η τελευταία οδηγεί στην αύξηση του αριθμού αντιγράφων του T_i, που ακολούθως προκαλεί ορατή αύξηση της ογκογένεσης σε φυτά. Η επίλυση του μηχανισμού αυτού στο αγροβακτήριο επιβεβαιώνει τον κανόνα που φέρει τους quorum-sensing μηχανισμούς να συσχετίζονται άμεσα με τη βακτηριακή παθογένεια.

CELL-CELL COMMUNICATION IN BACTERIA: STRUCTURE AND FUNCTION OF A QUORUM-SENSING DEPENDENT TRANSCRIPTIONAL REGULATOR

Pappas, K.M. and S.C. Winans

Department of Microbiology, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA

It is recently understood that bacteria sense their population size and at high-cell densities turn on genes or whole regulons, a phenomenon referred to as "quorum sensing". This bacterial cell-cell communication is mediated by compounds acting as pheromones, which get synthesized, released and up-taken by the bacterial cells. In Gram negatives these signaling molecules are predominantly acylated homoserine lactones (AHLs).

One of the best characterized quorum-dependent transcription factors, is the *Agrobacterium tumefaciens* activator, TraR. In this work TraR was overexpressed in *E. coli* in the presence of its cognate pheromone, *N*-3-oxooctanoyl-L-homoserine lactone or AAI (*Agrobacterium* autoinducer), and purified through conventional and FPLC chromatography.

Native and Se-Met derivatives of TraR were co-crystallized with target DNA and the structure of the TraR-AAI-DNA complex solved through MAD phasing at a 1.6Å resolution (collaboration with R-g. Zhang, A. Joachimiak, Structural Biology Center, Argonne National Laboratories, MI). TraR is dimeric and each monomer is comprised of an N-terminal domain, which is an $\alpha/\beta/\alpha$ sandwich, and a C-terminal domain, which is a four helix bundle. A flexible random-coiled linker mediates in between the highly structured domains. The N-terminal domain engulfs AAI in its hydrophobic cavity, along with a single water molecule, whereas the C-terminal domain exhibits a typical DNA-binding helix-turn-helix motif. The target DNA is slightly curved in the presence of TraR, a fact further verified by DNA-protein electrophoretic mobility assays.

TraR, upon AAI induction, is known to activate mostly conjugal transfer (*tra*) genes residing on Ti, the oncogenic plasmid of *A. tumefaciens*. In the present study it was found that TraR acts on the Ti *repABC* operon promoter, binding on two upstream operator sites. Biochemical and genetic analysis prove that under TraR/AAI induction, three new *repABC* transcription start sites emerge at the TraR-activation region, resulting in alleviation of the *repABC*-promoter repression by the RepA and RepB gene products and *repABC* gene overexpression. This leads to Ti copy-number increase, which, via crude gene-dosage, ultimately enhances Ti-dependent higher plant tumorigenesis. This resolved mechanism in *Agrobacterium* is highly reminiscent of similar quorum-related pathogenic effects between other bacterial genera and their hosts.

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗΣ ΣΕ ΥΒΡΙΔΙΑΚΕΣ ΖΩΝΕΣ

Παυλίδης, Π., Μπουγιούκος, Κ., Σαλίχος, Λ., Σούρδης, Ι.

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

Πρόσφατες πρόοδοι στην μεθοδολογία γενετικής χαρτογράφησης έκαναν δυνατό τον εντοπισμό γονιδίων ποσοτικών χαρακτήρων που συμβάλουν στην προσαρμογή και την διαφοροποίηση των ειδών. Η πρόοδος αυτή χαρακτηρίζεται κυρίως από την ανάπτυξη μοριακών και στατιστικών τεχνικών προσδιορισμού αυτών των γονιδίων των ποσοτικών χαρακτήρων. Όμως, δεν είναι πάντα δυνατή η εφαρμογή αυτών των μεθόδων σε φυσικούς πληθυσμούς λόγω των δυσκολιών που παρουσιάζονται στην δημιουργία δειγμάτων αρκετών ανασυνδυασμένων ατόμων για χαρτογράφηση των γονιδίων. Οι φυσικές υβριδικές ζώνες παρέχουν μια πιθανή λύση σε μερικά από αυτά τα προβλήματα. Οι φυσικές υβριδικές ζώνες περιέχουν ανασυνδυασμένα άτομα από την επί πολλές γενεές υβριδοποίηση. Εξετάζουμε θεωρητικά τα προβλήματα και τις προοπτικές που συνδέονται με την κατασκευή γενετικών χαρτών γονιδίων ποσοτικών χαρακτήρων σε προσομοιωμένες υβριδικές ζώνες αναλύοντας συσχετίσεις μεταξύ μοριακών σημάνσεων διαφόρων γονιδιωματικών τόπων.

OBSTACLES TO GENETIC MAPPING IN HYBRID ZONES

Pavlidis, P., Bouyioukos, C., Salihos, L., Sourdis, J.

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

Recent advances in genetic mapping methodologies make it possible to localize quantitative trait loci that contribute to adaptation and speciation. Much of this progress can be attributed to the development of molecular and statistical techniques for detecting and mapping quantitative trait loci. However, it has not been possible to employ these methods in many wild species because of difficulties associated of creating recombinant populations of sufficient size for QTL mapping. Natural zones of hybridization provide a possible solution to some of these difficulties. Natural hybrid zones contain recombinant individuals resulting from many generations of hybridization. We explore theoretically the problems and prospects associated with genetic map building and quantitative trait loci analyses in simulated hybrid zones by analyzing correlations among markers of various genomic locations.

ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ ΣΤΟΝ ΙΣΧΑΙΜΙΚΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ, ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Περούλης, Ν., Κουρουνάκη, Α.¹, Αβραμίδης, Ν., Γιάγκου, Μ.,
Χατζηπέτρου, Λ.

Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης, Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ¹Τομέας Φαρμακευτικής
Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,

Σκοπός της συγκεκριμένης έρευνας είναι η συσχέτιση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦς, NSAIDs) –των οποίων η υπολιπιδαιμική δράση ενδέχεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της αθηρωμάτωσης- με την ελάττωση των συνεπειών της ισχαιμίας. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι η αγωγή με NSAIDs ελαττώνει τη βλάβη του εγκεφάλου μετά από ισχαιμία, η οποία μπορεί να προέρχεται από στένωση των αγγείων λόγω αθηρωματικών πλακών.

Εξετάσαμε την ύπαρξη των ενζύμων COX-1 και COX-2, των κυτοκινών IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α καθώς και της IFN-γ σε τομές εγκεφάλου αρουραίων με ή χωρίς αγωγή με αντιφλεγμονώδες φάρμακο (παράγωγο της δικλοφαινάκης) μετά από ισχαιμία 45 λεπτών. Τα ένζυμα COX-1 και COX-2 μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε προϊόντα φλεγμονής όπως οι προσταγλαδίνες. Οι κυτοκίνες TNF-α, IL-1, IL-6 και IFN-γ καλούνται προφλεγμονώδεις κυτοκίνες ενώ η IL-10 δρα ανταγωνιστικά προς αυτές και κυρίως της IFN-γ. Τα κύτταρα που παράγουν αυτές τις κυτοκίνες είτε εδρεύουν στον εγκέφαλο όπως τα μακροφάγα της γλοίας είτε προσέρχονται στον ισχαιμικό εγκέφαλο. Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν 1,5-5 ώρες μετά την ισχαιμία. Με κατάλληλα αντισώματα για κάθε κυτοκίνη προσδιορίστηκαν ανοσοκυτταροχημικά τα κύτταρα που την παράγουν.

Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντικές στα επίπεδα των COX-1, COX-2, TNF-α, IL-10, IL-6 και της IFN-γ στους εγκεφάλους των ισχαιμικών αρουραίων και μάλιστα σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου (κυρίως ιππόκαμπο, υποθάλαμο και παρεγκεφαλίδα) σε αντίθεση με τους εγκεφάλους των φυσιολογικών ζώων, όπου οι παραπάνω κυτοκίνες είτε δεν είναι ανιχνεύσιμες είτε ανιχνεύονται σε πολύ μικρά ποσά. Μεταξύ ισχαιμικών πειραματοζώων και πειραματοζώων ισχαιμικών στα οποία έγινε αγωγή με φάρμακο δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για καμία από τις προς ανίχνευση κυτοκίνες, γεγονός που υποδηλώνει αδυναμία του φαρμάκου να δράσει στη δόση και στο χρονικό διάστημα που επιλέξαμε.

CYTOKINES IN THE ISCHEMIC BRAIN. INFLUENCE OF ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

Peroulis, N., Kourounakis, A.¹, Avramidis, N., Yiangou, M., Hadjipetrou, L.

Dept. of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Faculty of Sciences,
¹Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Aristotelian University of
Thessaloniki, Thessaloniki 54124, GREECE.

Aim of this research is the correlation of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs), the hypolipidemic activity of which may play a significant role in the precense of atherosclerosis, with the prevention of consequences of ischemia. Several studies show that treatment with NSAIDs reduces brain damage after ischemia that may be induced by stenosis of vessels due to atherosclerotic plaques.

We invertigated the presense of enzymes COX-1 and COX-2, cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF-a as well as IFN- γ in rat brain slices with or without treatment with an antiinflammatory drug (a derivative of diclofenac) after 45 min of ischemia. Enzyme COX-1 and COX-2 transform arachidonic acid to inflammatory mediators such as prostaglandins. Cytokines TNF-a, IL-1, IL-6 and IFN- γ are called pro-inflammatory cytokines while IL-10 antagonizes them (especially antagonizes IFN- γ). Cells that produce these cytokines either are located in the brain (e.g. glial macrophages) or migrate towards the ischemic brain.

Experimental animals were sacrificed 1.5-5 h after ischemia. With the use of corresponding antibodies for each cytokine, we determined immunohistochemically the cells that produce them.

Results showed statistically significant differences in the levels of COX-1, COX-2, TNFa, IL-10, IL-6 and IFN- γ in the rat ischemic brain and in particular in specific regions of the brain (mainly the hippocampus, hypothalamus and parencephalitis), compared to the brains of normal animals in which cytokine levels are either not traceable or very low. We did not find however, any significant difference for any cytokine between ischemic animals and those that had previously been treated with the NSAID. This may be due to the inability of this drug to act in the dose and time-frame that was chosen.

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΩΝ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΩΝ ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ
ΣΧΕΣΕΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ-ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΥΠΟΔΕΙΓΜΑ ΑΠΟ
ΤΗΝ ΕΝΤΟΜΟΠΑΝΙΔΑ ΠΕΝΤΕ ΕΙΔΩΝ *HYPERICUM*
(*GUTTIFERALES: HYPERICACEAE*) ΑΠΟ ΤΗΝ ΝΟΤΙΟ ΚΑΙ
ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ**

Πετράκης, Π.Β.¹ και Μ. Κουλάδη²

¹ ΕΘΙΑΓΕ, Ινστιτούτο Μεσογειακών Δασικών Οικοσυστημάτων, Εργαστήριο Εντομολογίας, Τέρμα Αλκμάνος Ιλίσια, 115 28 Αθήνα, Ελλάς, E-mail: pvpetrakis@fria.gr, ² Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τομέας Φαρμακογνωσίας, Πανεπιστημιόπολη, Ζωγράφου, 157 71 Αθήνα Ελλάς, roussis@pharm.uoa.gr.

Η μορφο-ταξινόμική του γένους *Hypericum* δεν φαίνεται να παρουσιάζει ιδιαίτερα προβλήματα όταν πρόκειται για ταξινόμικές κατηγορίες μεταξύ sectio και species. Όταν όμως πρόκειται για υποειδικές κατηγορίες ή ταξινόμική πληθυσμών η προσπάθεια φυλογενετικής αναπαράστασης είναι αντίθετη με όλες τις διατυπωμένες υποθέσεις βιογεωγραφίας του Ελληνικού χώρου και εξέλιξης στο γένος *Hypericum*. Όταν μάλιστα χρειαστεί να ελεγχθούν υποθέσεις μονοφυλίας στο επίπεδο sectio ή species τότε τα μορφολογικά δεδομένα είτε διαψεύδουν τις υπάρχουσες κατηγοριοποιήσεις είτε επικυρώνουν ψευδείς εναλλακτικές υποθέσεις. Σε αυτήν την έρευνα χρησιμοποιώντας 136 πητικούς δευτερογενείς μεταβολίτες (CVM) και αναπτύσσοντας τον "μετασχηματισμό κανονικής διακρίνουσας κατά Sorensen" (Sorensen canonical discriminant transformation) πετύχαμε να αποδώσουμε ένα απόλυτα συμβατό εξελικτικό διάγραμμα του γένους και να θεμελιώσουμε την φυσική οντότητα των sectio *Drosocarpium* (*H. perfoliatum*, *H. rumeliacum*), *Coridium* (*H. empetrifolium*) και *Hypericum* (*H. triquetrifolium*, *H. perfoliatum*). Επιπλέον χρησιμοποιώντας την γωνία ειδών-επιφάνειας σαν εξελικτικό μέτρο διατυπώνουμε υποθέσεις σχετικά με συνεξελικτικά σενάρια του γένους και της ελλιμενιζόμενης εντομοπανίδας. Τέλος παρουσιάζουμε μερική στήριξη στην υπόθεση Cronquist ότι οι CVM κάποτε σε αφθονία έχουν γίνει υπολειμματικοί εφόσον έπεσαν σε αχρηστία και στηρίζουμε την νεοδαρβινική άποψη των Charlseworth-Lande-Slatkin έναντι των υποστηρικτών της στικής εξέλιξης (punctuacionists) με το επιχείρημα ότι αυτό, που φαίνεται σαν μορφολογική στάση (*stasis*) είναι στην ουσία μια βαθμιαία διαφοροποίηση των πληθυσμών ανιχνεύσιμη σε επίπεδο CVM και διαφανή στην μορφοανατομική εξέταση.

ASSESSMENT OF INFORMATIVE CHARACTERS IN THE PHYLOGENETIC RECONSTRUCTION OF INSCET-PLANT THROUGH THE ENTOMOFAUNA OF FIVE *HYPERICUM* SPECIES GROWN IN GREECE

Petrakis, P.V.¹, and M. Couladi²

¹ NAGREF, Mediterranean Forest Research Institute, Laboratory of Entomology, Terma Alkmanos, Ilissia, 115 28 Athens, Greece. ppetrakis@fria.gr

² University of Athens, Dept. of Pharmacognosy and Natural products Chemistry, Panepistemiopolis Zografou, 157 71 Athens, Greece. mkouladi@pharm.uoa.gr

The morphology-based taxonomy of the genus *Hypericum* does not poses particular problems when categories between sectio and species are considered. However, at subspecific taxonomic levels and especially when populations are classified the resulting phylogenetic reconstruction is incongruent to any widely accepted biogeographical hypothesis of the hellenic region or evolutionary scheme within the genus. In the case of testing various hypotheses of monophyly the morphological data either refute the existing categories or corroborate evidently false hypotheses. By using 136 chemical volatile metabolites (CVM) and developing the Sorensen's canonical discriminant transformation we estimated the evolutionary diagram of the genus *Hypericum*. We found also that the existing taxonomic categories -i.e. sectio *Drosocarpium* (*H. perfoliatum*, *H. rumeliacum*), sectio *Coridium* (*H. empetrifolium*) and sectio *Hypericum* (*H. triquetrifolium*, *H. perfoliatum*) are natural evolutionary products and real phylogenetic entities. Moreover, by using the angle of the species-area relation as an evolutionary rate estimator we generate and test hypotheses involving coevolutionary scenarios of the harboured entomofauna. We present partial support to Cronquist' s hypothesis that CVM' s once in abundance are now vestigial characters. We fully support the hypothesis of the neo-Darwinian school (Charlsworth-Lande-Slatkin' s commentary) against punctuationists claim that what seems to be an evolutionary stasis in morphological terms it is actually a gradual differentiation of populations detectable only by CVM' s and transparent to the traditional morpho-anatomical consideration.

Η ΕΠΙΛΟΓΗ ΘΕΣΗΣ ΩΘΘΕΣΙΑΣ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *Phaenops knoteki* (REITTER) (COL., BUPRESTIDAE) ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΛΑΤΗ *Abies cephalonica* LOUDON VAR. *GRAECA* (LIU)

Πετράκης, Π.Β.¹, Κουλάδη, Μ.², Ρούσσης, Β.², Τσίτζουρας, Σ.²

¹ΕΘΙΑΓΕ, Ινστιτούτο Μεσογειακών Δασικών Οικοσυστημάτων, Εργαστήριο Εντομολογίας, Τέρμα Αλκμάνος Ιλίσια, 115 28 Αθήνα, Ελλάς. pvpetrakis@fria.gr

²Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Πανεπιστημιόπολη Ζωγράφου, 157 71 Αθήνα Ελλάς. mkouladi@pharm.uoa.gr

Το φλοιο-καμβιοφάγο έντομο *Phaenops knoteki* (Reitter) (Col., Buprestidae) δεν φαίνεται να είναι από τους πρωτογενείς παράγοντες νέκρωσης της ελάτης (*Abies cephalonica* Loudon var. *graeca* Liu). Συνήθως εποικεί δένδρα, τα οποία ήδη έχουν υποβαθμιστεί από άλλους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Φαίνεται λοιπόν ότι η επιλογή της θέσης ωθεσίας από το ωφόρο θηλυκό είναι καθοριστικής σημασίας για την ανάπτυξη των λαρβών, οι οποίες ολοκληρώνουν την προνυμφική τους ανάπτυξη και νυμφώνονται στον στενό σχεδόν διδίαστατο χώρο μεταξύ του φλοιού και του καμβίου του κορμού της ελάτης. Επιπλέον, η κατανομή του χώρου ωθεσίας σε κάθε μία εκκολαπτόμενη προνύμφη πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε [1] να μεγιστοποιείται η χρήση του περιορισμένου διαθέσιμου χώρου και [2] να αποφεύγεται η επικάλυψη των λαρβικών στοών. Η έρευνά μας διεξάγεται με την προσέγγιση μόρφωμα-διαδικασία. Στο στάδιο του μορφώματος βρέθηκε ότι οι κορυφές του μορφώματος εμφανίζονται σε τέσσερις κλίμακες. [1:~7cm] Στην μικροθέση επί του κορμού, [2:~30cm] στο ύψος επί του κορμού [3:~5m] από την μικροτοποθεσία του δένδρου και [4:~120m] από την τοπογραφία της συστάδας. Η κλίμακα [3] φαίνεται να ελέγχεται από την αποπνεόμενη πτητική κατατομή των δευτερογενών μεταβολιτών της ελάτης. Η κλίμακα [2] εκτιμάται ότι διεκπεριώνεται με σημειοχημικό τρόπο μεταξύ των ωφόρων θηλυκών, ενώ η κλίμακα [1] φαίνεται να είναι καθαρά αποτέλεσμα της ωθετικής συμπεριφοράς του θηλυκού και η τελική κατανομή των λαρβικών στοών διαμορφώνεται πιθανότατα με βιοακουστικό τρόπο.

OVIPOSITION SITE PREFERENCE OF *Phaenops knoteki* (REITTER) ON THE GREEK FIR *Abies cephalonica* LOUDON

Petrakis, P.V.¹, Couladi, M.², Roussis, V.², Tsintzouras, S.²

¹ NAGREF, Mediterranean Forest Research Institute, Laboratory of Entomology, Terma Alkmanos, Ilissia, 115 28 Athens, Greece. pypetrakis@fria.gr

² University of Athens, Dept. of Pharmacognosy and Natural products Chemistry, Panepistemiopolis Zografou, 157 71 Athens, Greece. mkouladi@pharm.uoa.gr

The phloeo-cambiophagous insect *Phaenops Knoteki* (Reitter) (Col., Buprestidae) is by no means a primary factor responsible for the greek fir decline (*Abies cephalonica* Loudon var. *graeca* Liu). It oviposits on trees having already reduced vigour caused by other biotic or abiotic factors. It seems that the selection of the oviposition site by gravid females is decisive for the successful development of offspring. *Phaenops* larvae accomplish their development and pupate within the bi-dimensional space between the bark and the cambium of the fir trunk. Moreover, the distribution of the oviposition should be made in such a way so that [1] the restricted available space is optimized and [2] the overlap of larval galleries is minimized. In our research we adopted the pattern-to-process approach. At the stage of pattern estimation we found that four scales predominate. They roughly correspond to [1:~7cm] the microsite on the bark, [2:~30cm] to the height on the trunk, [3:~5m] to the spot where the tree grows and [4:~120m] to the site topographical specifics. Scale [3] is governed by the emitted volatile profiles of secondary metabolites of the fir tree. Scale [2] can be attributed to the semiochemically mediated spacing behaviour of gravid females while scale [1] is a result of the oviposition behaviour of single gravid females. The final configuration of larval galleries on the trunk is the outcome of larval spacing interaction mediated probably by bioacoustic signals.

ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΡΙΩΝ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΠΕΥΚΟΥ ΣΕ ΤΕΣΣΕΡΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΦΥΤΟΦΑΓΙΑΣ: ΑΠΟΦΥΛΛΩΣΗ, ΜΥΖΗΣΗ ΜΕΣΟΦΥΛΛΟΥ, ΜΥΖΗΣΗ ΦΛΟΙΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΦΛΟΙΟ-ΚΑΜΒΙΟΦΑΓΙΑ

Πετράκης, Π.Β.¹, Ρούσσης, Β.², Βάγιας, Κ.²

¹ ΕΘΙΑΓΕ, Ινστιτούτο Μεσογειακών Δασικών Οικοσυστημάτων, Εργαστήριο Εντομολογίας, Τέρμα Αλκμάνος Ιλίσια, 115 28 Αθήνα, Ελλάς. pvpetrakis@fria.gr

² Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τομέας Φαρμακογνωσίας, Πανεπιστημιόπολις Ζωγράφου, 157 71 Αθήνα Ελλάς, roussis@pharm.uoa.gr

Τα Μεσογειακά δάση ουσιαστικά κυριαρχούνται από είδη του γένους *Pinus*, τα οποία είτε σχηματίζουν αμιγή δάση ή συστάδες ενώ σε διάφορες φάσεις της οικολογικής διαδοχής μπορεί να εμφανίζουν συνεπικράτηση με άλλα είδη της μακκίας. Τα πευκοδάση αυτά ουσιαστικά κυριαρχούνται από Μεσογειακά πεύκα κατά την έννοια της εμφάνισης του συνδρόμου της "Μεσογειακότητας", όπως ορίστηκε από τον W. Klaus. Τελευταία έχει αναγεννηθεί το ενδιαφέρον της εξέτασης της εντομοπανίδας των Μεσογειακών πεύκων. Το ενδιαφέρον είναι διπλό. Εστιάζεται τόσο σε καθαρά θεωρητικά ερωτήματα, που αφορούν στην εξέλιξη των πεύκων, την ανάμιξη του γενετικού υλικού διαφορετικών ειδών και την ύπαρξη ή όχι στοιχείων συνεξέλιξης της εντομοπανίδας τους (δηλ. των ειδών των εντόμων, που χρησιμοποιούν το πεύκο για ξενιστή και τροφικό υπόστρωμα). Σε αυτήν την εργασία εξετάζονται οι χημικές και μορφολογικές αποκρίσεις τριών ειδών πεύκων (*Pinus halepensis*, *P. brutia* και *P. pinea*) σε τέσσερα είδη εντόμων, που χρησιμοποιούν τέσσερα διαφορετικά μέρη του φυτού σαν τροφικό υπόστρωμα. Το είδος *Thaumetopoea pityocampa* Den. & Schiff. (Lep. Thaumetopoeidae) είναι το σοβαρότερο αποφυλλωτικό έντομο της Μεσογείου. Το έντομο *Grypotes staurus* (L.) (Ryn. Cicadellidae, Deltocephalinae) είναι μεσοφυλλοφάγο - μυζητικό και φαίνεται να έχει διαφοροποιηθεί από τα βορειότερα εξαπλωμένα συγγενικά του είδη ώστε παρουσιάζει έντονα στοιχεία συνεξέλιξης με τα μεσογειακά πεύκα. Το έντομο *Marchalina hellenica* Gennadius (Hem. Coccoidea, Margarodidae) είναι βασικό φλοιωματοφάγο - μυζητικό και αν και έχει υποστηριχτεί ότι δεν παρουσιάζει χαρακτηριστικά παρασίτου υπάρχουν βασικά στοιχεία, που συνηγορούν στο ότι το έντομο προσβάλλει χαρακτηριστικά το δένδρο ώστε να παρεμποδίζει την αντίδρασή του σε μελλοντικές προσβολές από καμβιο-φλοιοφάγα κολεόπτερα. Τέλος το είδος *Orthotomicus longicollis* (Gyllenhal) (Col., Scolytidae) συχνότατα αναφερόμενο λανθασμένα σαν *O. erosus* στην Ελληνική δασική βιβλιογραφία αποτελεί σοβαρό παράσιτο του πεύκου με έξαρση στις περιοχές, όπου έχει προηγηθεί η *M. hellenica*.

DIFFERENTIAL RESPONSE OF THREE HELLENIC PINE SPECIES TO FOUR TYPES OF HERBIVORY: DEFOLIATION, MESOPHYL SUCKING, PHLOEM SUCKING AND PHLOEO-CAMBIOPHAGY

Petrakis, P.V.¹, Roussis, V.², Vagias, C.²

¹ NAGREF, Mediterranean Forest Research Institute, Laboratory of Entomology, Terma Alkmanos, Ilissia, 115 28 Athens, Greece. pypetrakis@fria.gr

² University of Athens, Dept. of Pharmacognosy and Natural products Chemistry, Panepistemiopolis Zografou, 157 71 Athens, Greece. mkouladi@pharm.uoa.gr

Mediterranean forests are dominated by species of the genus *Pinus*, which form either pure forest stands or isolated clusters while in various seral stages they are codominant with various maquis shrubs. Pine forests include primarily mediterranean pines in the sense they possess the mediterraneity syndrome defined after W. Klaus. The recently revived interest on the entomofauna of pines is bifid. It focuses in purely theoretical issues concerning the evolution of pines, the introgression between pine species and the eventual coevolution of their entomofauna -i.e. the insect species which use pines either as host or feeding substrate. In this work we examine the chemical and morphoanatomical responses of three pine species (*Pinus halepensis*, *P. brutia* and *P. pinea*) to the feeding damage conferred by four insect species which use four different tree parts as feeding substrate. The pine processionary caterpillar - *Thaumetopoea pityocampa* Den. & Schiff. (Lep. Thaumetopoeidae)- is a serious defoliator in the entire circum-Mediterranean region. The leafhopper *Grypotes staurus* (L.) (Ryn. Cicadellidae, Deltocephalinae) is a mesophyl sucking insect and it seems to have evolved by host shift differentiated by its northern sibling species and it confers very little damage even in very high population densities. The pine Margarodid - *Marchalina hellenica* Gennadius (Hem. Coccoidea, Margarodidae)- is a serious phloem-sucking insect. In previous studies we have shown that though it does not possess the typical features of a parasite it induces certain reactions of the pine tree at a tissue scale that prevents its response to future attacks by phloeo-cambiophagous beetles. Last but not the least important is the scolytid *Orthotomicus longicollis* (Gyllenhal) (Col., Scolytidae) often mistakenly identified as *O. erosus* in the greek forest literature constitutes a serious pest responsible for pine forest decline especially in areas previously harbouring high densities of *M. hellenica*.

ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ p53 ΣΤΟΝ ΜΗ-ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Πετράκου, Ε.¹, Καπράνος, Ν.¹, Αποστολίδου, Α.², Αναστασιάδου, Κ.¹,
Στρατηγός, Α.³, Κόκκα, Ε.¹, Χριστοφίδου, Ε.³, Παγκούνη, Α.³,
Κατσάμπας, Α.³ και Γ. Βουτσινάς²

¹Νοσοκομείο Α. Φλεμινγκ, Τμήμα Παθολογικής Ανατομικής, Εργ. Μοριακής Παθολογικής Ανατομικής, ²Εργ. Περιβαλλοντικής Μεταλλαξιγένεσης και Καρκινογένεσης, Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», ³ Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Δερματολογίας «Α. Συγγρός», Τμήμα Δερματολογίας, Αθήνα

Επιδημιολογικές μελέτες εμπλέκουν την ηλιακή ακτινοβολία στην αιτιολογία του βασεοκυτταρικού (BCC) και ακανθοκυτταρικού (SCC) καρκινώματος του δέρματος, εν μέρει λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο p53. Εξαιτίας της σημαντικής κλινικής εμπλοκής του p53 στον μη μελανωματικό καρκίνο του δέρματος, στόχος της εργασίας αυτής ήταν η ανίχνευση αλλαγών στην αλληλουχία και στην έκφραση του γονιδίου σε επίπεδο πρωτεΐνης. Για τη μελέτη έκφρασης του γονιδίου έγινε ανοσοιστοχημεία έναντι των φυσιολογικών και μεταλλαγμένων μορφών του p53, με τη χρήση του αντισώματος DO7, ενώ για την ανίχνευση μεταλλάξεων χρησιμοποιήθηκε SSCP και ακολούθως αλληλούχιση των προϊόντων της PCR από καρκινικό γονιδιωματικό DNA πρότυπο. Μελετήθηκαν 33 δείγματα μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος (19 BCC και 14 SCC). Ο αριθμός των δειγμάτων στα οποία το p53 εμφανιζόταν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% ήταν 8 στο BCC και 4 στο SCC, ενώ ο συνολικός αριθμός μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν μεταξύ των εξονίων 5 και 8 του γονιδίου ήταν 11/33 (33%). Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η έκφραση του p53 ήταν υψηλή. Ορισμένες από τις μεταλλάξεις που βρέθηκαν (πχ. κωδ. 280 και 179) έχουν ήδη αναφερθεί στον καρκίνο του δέρματος, ενώ άλλες (πχ. κωδ. 167) εντοπίζονται για πρώτη φορά. Η μη ακολουθούμενη από μεταλλάξεις υπερέκφραση του p53 μπορεί να αποδοθεί σε μετα-μεταγραφική σταθεροποίηση του μορίου (εξουδετέρωση του mdm-2) ή εξουδετέρωση άλλων γονιδίων που ενεργοποιούνται από το p53.

p53 MUTATIONS AND EXPRESSION PATTERN IN NON-MELANOMA SKIN CANCER

**Petrakou, E.¹, Kapranos, N.¹, Apostolidou, A.², Anastasiadou, K.¹,
Stratigos, A.³, Kokka, E.¹, Christofidou, E.³, Pagouni, A.³, Katsambas,
A.³, and G. Voutsinas²**

¹Department of Molecular Pathology, A. Fleming Hospital; ²Institute of Biology, NCSR "Demokritos",
³University Hospital of Dermatology "A. Syngros", Athens, Greece.

Epidemiologic studies have implicated sunlight in the etiology of basal cell (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC) of the skin. Mutations in p53 gene, which regulates cell cycle, DNA repair and apoptosis, have been detected in non-melanoma skin cancer. Due to the important clinical implications of p53 status, mutation type and timing of mutational events in skin cancer, the aim of the present study was to investigate p53 gene structural alterations and changes in expression at the protein level. Immunohistochemistry using DO7 antibody against wild type and mutant p53 forms was carried out for the expression study. For mutation detection, SSCP followed by sequencing of PCR products from genomic tumor DNA template was carried out using the big-dye terminator technology. 33 non-melanoma skin tumors were analyzed (19 BCCs and 14 SCCs). The percentage of p53-expressing cells varied from 8.5 to 90 in BCC (>50% in 8 samples) and from 0 to 94 in SCC (>50% in 4 samples). The total number of mutations detected in exons 5 to 8 was 11/33 (33%): 7 mutations were found in exon 5, 2 in exon 6, 1 in exon 7 and 1 in exon 8. The mutations were mainly G to A and C to T transitions. p53 expression was high in the majority of the samples, whereas 11 mutations were detected in the exons analyzed. Some transitions, as the ones in codons 280 and 179 have been reported in skin cancer, whereas others, as the transition in codon 167, as far as we know (p53 somatic mutation database, IARC; HGMD, UK; p53MDB, HGC, Japan) is reported here for the first time. The discrepancy between p53 over-expression and no p53 mutations in a tumor could be attributed to post-translational stabilization (impairment of mdm-2) or impairment of other genes downstream of p53.

ΒΙΟΑΡΧΑΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΥΣΤΕΡΟΕΛΛΑΔΙΚΟΥ ΝΕΚΡΟΤΑΦΕΙΟΥ ΤΗΣ ΑΓΙΑΣ ΤΡΙΑΔΑΣ ΗΛΕΙΑΣ

Πετρουτσά, Ε., Φουντουλάκης, Γ., Βικάτου, Ο.¹ και Σ.Κ. Μανώλης

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

¹ Ζ' Εφορεία Προϊστορικών & Κλασικών Αρχαιοτήτων, Αρχαιολογικό Μουσείο Αρχαίας
Ολυμπίας Ηλείας

Στην εργασία αυτή παρουσιάζονται τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της βιοαρχαιολογικής μελέτης του νεκροταφείου της Αγίας Τριάδας Ηλείας. Το νεκροταφείο έχει χρονολογηθεί στην Υστεροελλαδική, (1450 π.Χ. με 1150 π.Χ.). Από το σύνολο του σκελετικού υλικού που αποκαλύφθηκε, έχει μεταφερθεί στο Εργαστήριο Βιολογικής Ανθρωπολογίας του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, σχεδόν το 50 %. Η εργασία αυτή αποτελεί μέρος ενός ευρύτερου προγράμματος του οποίου στόχος είναι η συνεισφορά στη κατανόηση της επίδρασης των διατροφικών και περιβαλλοντικών παραγόντων καθώς η διερεύνηση του επιπέδου υγείας και παθολογίας των Υστεροελλαδικών πληθυσμών.

Μια βασική διαδικασία αποτελεί η αναγνώριση των ατομικών σκελετών, αφού πρόκειται για πολλαπλές διαταραγμένες ταφές. Ακόμη συλλέχθηκαν δεδομένα σχετικά με τις κατανομές φύλου και ηλικίας (θανάτου) καθώς και ο ελάχιστος αριθμός ατόμων (MNI), ο οποίος υπολογίστηκε στα 453 άτομα. Από το σύνολο αυτό κατορθώσαμε να διακρίνουμε 101 αρσενικά και 75 θηλυκά άτομα, ενώ τα υπόλοιπα δεν κατέστη δυνατόν να προσδιοριστούν, αφού η μεθοδολογία προσδιορισμού εμπλέκει τα κρανιακά οστά καθώς και τα ανώνυμα (πυελική ζώνη), τα οποία συνήθως δεν είναι πλήρη.

Όσον αφορά στον υπολογισμό της ηλικίας θανάτου βρέθηκαν 46 ανήλικα, ενώ τα υπόλοιπα άτομα και των δύο φύλων αντιπροσωπεύουν όλες τις ηλικιακές κλάσεις, με μεγαλύτερο ποσοστό στις ηλικίες από 30 μέχρι 50 χρόνων. Λήφθηκαν μετρήσεις των μηριαίων οστών και υπολογίστηκε το ανάστημα χρησιμοποιώντας το F/S ratio (Feldesman et al. 1992). Βρέθηκε ότι τα θηλυκά είχαν ανάστημα περίπου 158,43 cm και τα αρσενικά 167,94 cm. Οι παθολογικές παρατηρήσεις αφορούν κυρίως σε κάποιες μορφές αρθρίτιδας, που σχετίζονται με άτομα προχωρημένης ηλικίας, λίγα κατάγματα καθώς και ελάχιστες περιπτώσεις πιθανών μολυσματικών νόσων, οι οποίες δεν έχουν αποσαφηνιστεί ακόμη. Γενικά όμως το επίπεδο της υγείας του πληθυσμού ήταν πολύ υψηλό.

Η μελέτη επιχορηγήθηκε από τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας της Επιτροπής Ερευνών του Πανεπιστημίου Αθηνών

BIOARCHAEOLOGICAL STUDY OF THE LATE BRONZE AGE CEMETERY OF AGHIA TRIADA, ILIDA (W. PELOPONNESE)

Petroutsas, E., Foudoulakis, G., Vikatou¹, O., and S.K. Manolis

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

¹ Z' Ephorate of Prehistoric & Classical Antiquities, Archaeological Museum of Ancient Olympia, Ancient Olympia, Ilida

This work presents the preliminary results of the bioarchaeological study of the Aghia Triada cemetery at Ilida. This cemetery has been dated in the Late Bronze Age Era (1450-1150 B.C.). Almost the half of the unearthed skeletal material has been moved at the Laboratory of Biological Anthropology of the Department of Animal & Human Physiology. This work is a part of broader project, which the main object is the contribution in the understanding of the influence of the nutritional and environmental factors as the examination of the health status and pathology of the Late Bronze Age populations.

A basic procedure is the identification of the individual skeletons, since it concerns multiple disturbed burials. We also collect demographic data, concerning sex and age distributions, as the Minimum Number of Individuals (MNI), which is estimated to be 453 individuals. From this total we achieve to discriminate 101 male and 75 female individuals, while the rest is was very difficult to assign, since the methodology used involves cranial and pelvic bones, which usually are not intact.

With reference to the age at death estimation, we found 46 immature individuals, while the remainders of both sexes represent all the age classes, with the highest percentage in the ages between 30 to 50 years. We took measurements of the femur in order to estimate the height by using the F/S ratio (Feldesman et al. 1992). We found that the average stature of the female individuals was 158,43 cm and the stature of the male individuals was 167,94 cm. We observe some cases of arthritis, which are found in mature individuals, some fractures (in ribs) and a few cases of presumably infectious diseases, which are not clarified yet. In general the health status of the population was very high.

The Special Research Account of the University of Athens supported this research.

Η ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HARP ΡΥΘΜΙΖΕΤΑΙ ΚΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΛΑΣΜΙΝΗ

Πολυκράτης, Α.¹, Παπαδημητρίου, Ε.², Courty, J.³, Κατσώρης, Π.¹

¹Εργαστήριο Βιολογίας Κυττάρου, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

²Εργαστ. Μορ. Φαρμακολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

³Εργαστήριο CRRET, Πανεπιστήμιο Paris XII, Γαλλία

Η HARP (Heparin Affin Regulatory Peptide) είναι ένας αυξητικός παράγοντας με μοριακό βάρος περίπου 18 kDa. Έχει μεγάλη συγγένεια με την ηπαρίνη, καθώς και με άλλες πρωτεογλυκάνες. Η ικανότητα της HARP να επάγει την προέκταση των νευριτών είναι αδιαμφισβήτητη, ενώ επιπλέον, η ομάδα μας έχει δείξει ότι η HARP επάγει την αγγειογένεση *in vivo* και *in vitro* και ότι τα δύο άκρα του μορίου εμπλέκονται στη βιολογική της δράση.

Στην παρούσα εργασία βρέθηκε ότι η HARP αποικοδομείται *in vitro* από την πλασμίνη. Από την αποικοδόμηση αυτή προκύπτουν πέντε πεπτίδια, τα οποία μπορούν να διαχωριστούν εύκολα με SDS ηλεκτροφόρηση. Η πέψη αναστέλλεται με την προσθήκη απροτινίνης ή α₂-αντιπλασμίνης, που είναι αναστολείς της αμιδολυτικής δραστηριότητας της πλασμίνης. Δομική ανάλυση έδειξε ότι αυτά τα πεπτίδια αντιστοιχούν σε διάφορες περιοχές του αυξητικού παράγοντα. Η ηπαρίνη, η θειική δερματάνη, η θειική χονδροϊτίνη και η θειική ηπαράνη προστατεύουν μερικώς τη HARP από αποικοδόμηση από την πλασμίνη και η προστατευτική τους δράση επιτυγχάνεται σε διαφορετικές αναλογίες HARP και γλυκοζαμινογλυκανών. Τα μόρια με τη μεγαλύτερη συγγένεια προς τη HARP είναι τα πιο προστατευτικά, με την ηπαρίνη να είναι η πιο αποτελεσματική. Η θειική κερατάνη, η οποία δεν έχει συγγένεια με τη HARP, δεν προστατεύει τον αυξητικό παράγοντα από αποικοδόμηση από την πλασμίνη.

Χρησιμοποιώντας χρωματογραφία στήλης mono-S απομονώσαμε τα πεπτίδια που δημιουργούνται μετά από πέψη της HARP με πλασμίνη και ελέγξαμε διάφορες βιολογικές τους δράσεις σε ενδοθηλιακά κύτταρα από φλέβα ομφάλιου λώρου ανθρώπου (HUVEC), όπως κυτταρικός πολλαπλασιασμός, μετάνάστευση και δημιουργία δικτύου ψευδαγγείων σε υπόστρωμα matrigel. Τα πεπτίδια που ελέγχθηκαν βρέθηκε να έχουν διαφορετική δράση στις λειτουργίες των κυττάρων HUVEC. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το μικροπεριβάλλον των κυττάρων μπορεί να είναι υπεύθυνο για την παρουσία της HARP με διαφορετικές μορφές και επομένως, να ρυθμίζει την αγγειογενετική της δράση *in vivo*.

THE ANGIOGENIC ACTIVITY OF THE GROWTH FACTOR HARP IS MODULATED BY PLASMIN

Polykratis, A.¹, Papadimitriou, E.², Courty, J.³, Katsoris, P.¹

¹ Lab of Cell Biology, Department of Biology, University of Patras

² Lab of Molecular Pharmacology, Department of Pharmacy, University of Patras

³ Lab CRRET, University Paris XII, France

HARP (Heparin Affin Regulatory Peptide) is a growth factor with approximate molecular weight of 18 kDa having high affinity for heparin and various proteoglycans. HARP has an indisputable neurite outgrowth-promoting activity and furthermore, our group has shown that HARP is angiogenic *in vivo* and *in vitro* and that the two termini of the molecule contribute to its activity.

In the present work, we found that HARP can be cleaved -at least *in vitro*- by plasmin. The cleavage is site-specific and five peptides, easily separated by SDS-electrophoresis are generated. The cleavage is inhibited by aprotinin or α_2 -antiplasmin, which are inhibitors of the amidolytic activity of plasmin. Structural analysis indicated that these peptides correspond to various domains of the growth factor. Heparin, dermatan sulfate, chondroitin sulfate and heparan sulfate partially protect HARP from plasmin degradation and their protective effect is achieved at different HARP to glycosaminoglycans ratios. The molecules with the higher affinity to HARP are the more protective, heparin being the most efficient. Keratan sulfate that has no affinity for HARP does not protect the growth factor from degradation by plasmin.

Using mono-S chromatography, we isolated the HARP fragments generated by plasmin and tested their action on several angiogenesis related activities, such as cellular proliferation, migration and tube formation on matrigel, using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The peptides that are produced from proteolytic cleavage of HARP by plasmin have a differential effect upon HUVEC. These results suggest that the microenvironment of the cells may modulate the angiogenic effect of HARP *in vivo*.

**ΜΕΛΕΤΗ ΔΩΔΕΚΑ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙ-
ΣΤΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΗΣ ΘΡΑΚΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΕΠΤΑΝΗΣΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΙΣΣΑΣ *Apis mellifera***

Πορίχη Α.-Ε. και Χαριζάνης Π.

Εργ. Σηροτροφίας-Μελισσοκομίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ι. Οδός 75, 11855 Αθήνα.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν πληθυσμοί μελισσών από δυο γεωγραφικά διαμερίσματα, Θράκης και Επτανήσων, που αντιστοιχούν σε φυλές που υπάρχουν στην Ελλάδα με βάση προηγούμενες μελέτες. Σκοπός της έρευνας ήταν να μελετηθεί η γενετική δομή των πληθυσμών με βάση τη μορφομετρική προσέγγιση, να διαπιστωθεί τυχόν διαφοροποίησή τους και να ερευνηθούν οι φυλογενετικές τους σχέσεις. Το κάθε δείγμα προερχόταν από μία κυψέλη και περιελάμβανε 50-80 εργάτριες μέλισσες που μεταφέρθηκαν ζωντανές στο Εργαστήριο και φυλάχτηκαν στους -20°C. Για τη μέτρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών δημιουργήθηκαν μόνιμα παρασκευάσματα των προς μέτρηση διαφόρων τμημάτων του σώματος της μέλισσας. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που μετρήθηκαν ήταν το μήκος και το πλάτος της πρόσθιας πτέρυγας, το μήκος του κερκιδικού και του δισκοειδούς κυπάρου της πρόσθιας πτέρυγας (ωλενικός δείκτης), το μήκος και το πλάτος της οπίσθιας πτέρυγας, ο αριθμός αγκίστρων, το μήκος του μηρού και της κνήμης, το μήκος και το πλάτος του βασιταρσού και το μήκος της προβοσκίδας. Μεταξύ των πληθυσμών της Θράκης και των Επτανήσων δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε χαρακτηριστικά που αποτελούν αξιόπιστα κριτήρια διαχωρισμού φυλών. Επίσης δεν εμφανίζεται γεωγραφική διαφοροποίηση και ετερογένεια.

**STUDY OF TWELVE MORPHOLOGICAL CHARACTERS IN
GREEK HONEYBEE POPULATIONS *Apis mellifera* OF
THRACE AND EPTANISSA REGIONS**

Porichi, A.-E., and P. Harizanis

Lab. of Sericulture-Apiculture, Agricultural University of Athens, I.Odos 75, 11855 Athens, Greece

In the present study honeybee populations from Thrace and Eptanissa regions, corresponding to different races, were studied. The aim was to study the genetic structure of these populations and examine their phylogenetic relationships based on the morphological approach. Each sample composed of about 50-80 adult workers from each population, taken from different colonies, which were transported to the laboratory alive and stored at -20°C. The morphological characters analyzed in this study were length and width of fore and hind wing, length of a and b fragment of cubital vein, number of hamuli, length of femur and tibia, length and width of basitarsus and length of proboscis. Statistically significant differences were not observed between populations from Thrace and Eptanissa in characters considered as reliable criteria for race discrimination. Moreover, no geographical variation and heterogeneity seem to exist.

**Ο Ζn ΕΠΑΓΕΙ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ pH
ΣΕ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΜΥΔΙΟΥ *Mytilus galloprovincialis*****Ράγια, Β., Καλογιάννη, Μ.**Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας Ζωολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών,
Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη, 54124.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση του Zn^{2+} στην αλλαγή του ενδοκυτταρικού pH (pHi) αιμοκυττάρων που απομονώθηκαν από την αιμόλεμφο του μυδιού *Mytilus galloprovincialis*. Πρόσθεση διαφόρων συγκεντρώσεων $ZnCl_2$ (5μM, 50μM, 200μM) προκάλεσε αύξηση του pHi των αιμοκυττάρων. Σημαντικότερη αύξηση του pHi προκάλεσε η συγκέντρωση $ZnCl_2$ 50μM. Η αύξηση του pHi των κυττάρων αναστάληκε σημαντικά όταν μαζί με 50μM $ZnCl_2$ χρησιμοποιήθηκαν σταυροσπορίνη (20 nM) ή αμιλορίδιο (10μM). Σε μικρότερο βαθμό αναστάληκε η μεταβολή του pHi από το EIPA [5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride] (20 nM) και την προπρανολόλη (10 nM). Χρήση του PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (10 nM), έδειξε μια αύξηση του pHi των αιμοκυττάρων σχεδόν ισότιμη με αυτή του $ZnCl_2$. Με την επίδραση στη συνέχεια φορσκολίνης (0.03 mM), ενεργοποιητή της αδενυλικής κυκλάσης, ή IBMX (isobutyryl - methylxanthine), (0.05 mM), ως αναστολέα της φωσφοδιεστεράσης, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του pHi. Δεδομένου ότι αυτές οι ενώσεις επιδρούν στην αύξηση του cAMP μέσα στο κύτταρο, μπορούμε να υποθέσουμε ότι το cAMP μπορεί να λειτουργεί ως μηνύτορας μεταγωγής του σήματος για την αύξηση του pHi, μετά την επίδραση του Zn^{2+} . Επιπλέον τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο Zn^{2+} μέσω του cAMP και με τη συμμετοχή της πρωτεϊνικής κινάσης C, πιθανά να ενεργοποιεί τον ανταλλάκτη Na^+-H^+ στα αιμοκύτταρα της αιμόλεμφο του μυδιού *Mytilus galloprovincialis*.

**ZINC INDUCES THE INCREASE OF INTRACELLULAR pH
IN HAEMOCYTES OF *Mytilus galloprovincialis*****Ragia, V., Kaloyianni, M.**Laboratory of Animal Physiology, Zoology Department, School of Biology, Aristotle University of
Thessaloniki, Thessaloniki 54124

In the present study the effect of different zinc concentrations on the intracellular pH (pHi) of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes was investigated. 50 μM $ZnCl_2$ induced the most significant pHi increase in relation to the other metal concentrations used. The latter effect on pHi was inhibited in the presence of 20nM staurosporine or 10μM of amiloride together with 50μM $ZnCl_2$. The addition of 20nM EIPA [5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride] or 10nM of propranolole together with 50μM $ZnCl_2$ attenuated the increase of pHi induced by zinc. On the other hand the addition of 10nM of PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) to haemocytes induced pHi increase. Furthermore, 0.03mM of forskolin, an adenylate cyclase activator and 0.05mM isobutyryl-methyl xanthine (IBMX), a phosphodiesterate inhibitor, also caused pHi increase in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. The results show that zinc possibly activates Na^+-H^+ exchanger via cAMP and protein kinase C involvement in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ

Σαλίχος Λ., Μπουγιούκος Κ., Παυλίδης Π., και Ι. Σούρδης

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

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι πληθυσμιακοί γενετιστές είναι ο εντοπισμός και η σωστή ερμηνεία των ιχνών της εξελικτικής ιστορίας που είναι κρυμμένα στα δεδομένα ακολουθιών DNA. Η θεωρία της Ουδετερότητας της Μοριακής Εξέλιξης μας υποδεικνύει τι είναι δυνατόν να αναμένουμε κάτω από την υπόθεση της θεωρίας, περιγράφοντας τον τρόπο με τον οποίο ελέγχεται η εξέλιξη των ακολουθιών DNA από ουδέτερες μεταλλάξεις και την γενετική απόκλιση χωρίς την δράση της επιλογής. Χρησιμοποιώντας στοχαστικά και μη πρότυπα σε μια σειρά πειραμάτων προσομοίωσης προσδιορίζουμε τα όρια αξιοπιστίας διαφόρων δοκιμασιών ελέγχου της ουδέτερης εξέλιξης. Μεταξύ αυτών είναι: Η δοκιμασία Tajima που βασίζεται σε διαφορετικές εκτιμήσεις της παραμέτρου $\theta=4N\mu$ (όπου N το δραστικό μέγεθος και μ η συχνότης μεταλλαγών). Η D^* δοκιμασία των Fu και Li που βασίζεται στις διαφορές των εκτιμητών, του πλήθους των μεταλλαγών, θ_w του πλήθους των πολυμορφικών περιοχών και η δοκιμασία F^* που βασίζεται στις διαφορές των θ_n και θ_π . Η δοκιμασία των Hudson, Kreitman και Aguade η οποία βασίζεται στην συσχέτιση του πολυμορφισμού εντός των ειδών και της απόκλισης μεταξύ των ειδών. Η δοκιμασία των McDonald και Kreitman που βασίζεται στην παρατήρηση ότι σε απουσία επιλογής ο λόγος των μή συνώνυμων προς τις συνώνυμες μεταλλάξεις πρέπει να είναι σταθερός εντός και μεταξύ των ειδών.

ON NEUTRALITY TESTS IN MOLECULAR EVOLUTION

Salihos, L., Bouyioukos, C., Pavlidis, P., Sourdis, J.

Dept. of Agr. Biotechnology, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos, Athens 11855

One of the great challenges facing population geneticists is to identify and accurately interpret the clues to evolutionary history that are hidden within DNA sequence data. The Neutral Theory of Molecular Evolution establishes what to expect under the null hypothesis, by describing the pattern of sequence evolution under the forces of mutation and random genetic drift without the action of selection. Using deterministic and stochastic models in a series of simulation experiments we test recent statistical methods in order to detect molecular adaptation. In these experiments various coalescence algorithms were used to generate neutral genealogies with many random variables. Among the statistical methods are: Tajima's test based on computing different estimates of the parameter $\theta=4N\mu$ (where N is the effective population size, and μ the neutral mutation rate). Fu and Li's D^* test based on the difference of θ_n (the number of singleton mutations) and θ_w (the number of segregating sites) and F^* test based on difference of θ_n and θ_π (the average number of pairwise differences). The Hudson-Kreitman-Aquade test which evaluates the neutral hypothesis that levels of variation within species (polymorphism) and variation between species (divergence) will be correlated. The McDonald-Kreitman test, based on the ratio of non-synonymous (replacement) to synonymous substitutions will be the same within and between species, in the absence of selection.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ

Εμμανουήλ Σαρειδάκης

Εργ/ριο Κρυσταλλογραφίας, Ι.Μ.Β.Β./Ι.Τ.Ε., Τ.Θ. 1527, Βασιλικά Βουτών, 71110 Ηράκλειο Κρήτης

Η κρυστάλλωση ενός βιολογικού μακρομορίου αποτελεί στις περισσότερες περιπτώσεις απαραίτητη προϋπόθεση για τον προσδιορισμό της δομής της σε υψηλή (ατομική) διακριτική ικανότητα. Είναι επίσης το στάδιο με τα χαμηλότερα ποσοστά επιτυχίας στη αλυσίδα που ξεκινά από την κλωνοποίηση των γονιδίων και καταλήγει στην επίλυση των τρισδιάστατων πρωτεϊνικών δομών.

Αυτό συμβαίνει διότι δεν υπάρχει προς το παρόν τρόπος να γνωρίζει κανείς εκ των προτέρων, για ένα δεδομένο μακρομόριο, την περιοχή σε έναν πολυπαραμετρικό χώρο (όπου παράμετροι είναι το είδος και η συγκέντρωση του κατακρημνιστικού παράγοντα και ενδεχομένου προσθέτου μορίου, το pH και το είδος ρυθμιστή, η συγκέντρωση του μακρομορίου, η θερμοκρασία κ.ά.) όπου αυτό θα κρυσταλλωθεί. Έτι δυσκολότερο είναι το πέρασμα από κάποιας μορφής κρυσταλλικό υλικό στην επαναλήψιμη παραγωγή κρυστάλλων υψηλής ποιότητας σκέδασης. Εξ'ού και η σημασία των μεθόδων ορθολογιστικής βελτιστοποίησης των κρυστάλλων.

Αυτό που γνωρίζουμε είναι ότι για να κρυσταλλωθεί ένα μόριο σε διάλυμα, το διάλυμα αυτό πρέπει να οδηγηθεί με ελεγχόμενο τρόπο σε συνθήκες υπερκορεσμού ως προς αυτό το μόριο. Θα αναπτυχθούν τα παραπάνω ζητήματα και θα περιγραφούν κάποιες κοινής χρήσεως τεχνικές για την επίτευξη υπερκορεσμού και παραγωγή κρυστάλλων σε διαλύματα βιολογικών μορίων. Θα περιγραφούν εν συντομία και κάποιες πολύ πρόσφατες πρόοδοι σε τεχνικές βελτιστοποίησης, με χρήση πληροφορίας από διαγράμματα φάσεων και τεχνικές σκέδασης φωτός, καθώς και τον έλεγχο του ετερογενούς σχηματισμού κρυσταλλικών πυρήνων. Θα δοθεί έμφαση σε τεχνικές κρυστάλλωσης πρωτεϊνών που ελαχιστοποιούν τον χρόνο, την προσπάθεια καθώς και τη χρήση βιολογικού υλικού, ούτως ώστε να μπορούν να εφαρμοσθούν και στα πλαίσια προγραμμάτων Δομικής Πρωτεομικής.

TECHNIQUES FOR THE CRYSTALLISATION OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES

Emmanuel Saridakis

Crystallography Laboratory, I.M.B.B./ FO.R.T.H., P.O.Box 1527, Vassilika Vouton,
71110 Heraklion Crete

The crystallization of a biological macromolecule is in most cases a pre-requisite for determining its structure at high (atomic) resolution. It is also the step with the lowest rate of success on the ladder starting from the cloning of the relevant gene to the obtention of the 3-dimensional structure.

This is because there is yet no way of knowing a priori, for a given macromolecule, the region in a multi-parametric space (the parameters being the type and concentration of precipitating agent and possible additive, the pH and type of buffer, the concentration of macromolecule, the temperature and others) where it will crystallize. What is even more difficult is the production of reproducibly well-diffracting crystals once some sort of crystallinity has been achieved. Hence the importance of methods for rational crystal optimisation.

What we do know is that for a molecule to crystallize from solution, the solution needs to be brought, in a controlled manner, in a state of supersaturation with respect to that molecule. The above problems will be discussed and some standard techniques for achieving supersaturation of macromolecular solutions and producing crystals will be described. Some very recent developments in optimization techniques, using information from phase diagrams and light scattering, as well as the control of heterogeneous nucleation, will be briefly introduced. Emphasis will be given on how protein crystallization can be achieved in ways that minimize time, effort and quantity of biological material so that it can be implemented within the framework of Structural Proteomics.

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΑΓΡΙΩΝ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ COXSACKIE A ΩΣ ΠΡΟΣ
ΤΗΝ 5'-ΜΗ ΜΕΤΑΦΡΑΖΟΜΕΝΗ ΠΕΡΙΟΧΗ (5'-UTR) ΤΟΥ
ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥΣ: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ ΤΑ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ
ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ 5'-UTR**

Σιαφάκας, Ν., Μαρκουλάτος, Π.

Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Τμήμα Ιολογίας, Βασιλίσσης Σοφίας 127, Αθήνα 115 21

Η οροτυπική αναγνώριση κλινικών στελεχών, με όλα τα σημαντικά οφέλη της στη βιολογία των εντεροϊών, στην παθογένεσή τους, στην κλινική διάγνωση και στην εξέλιξή τους αποτελεί ένα εξαιρετικά πολύπλοκο θέμα. Οι μοριακές μέθοδοι γενετικού χαρακτηρισμού των εντεροϊών αποτελούν την τρέχουσα τάση στην ταξινόμηση και αναγνώριση των ιών αυτών, βελτιώνοντας σε σημαντικό βαθμό τις βραδείες, χαμηλής ευαισθησίας και ανακριβείς συμβατικές μεθόδους. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η προσπάθεια δημιουργίας μίας μεθόδου για την ακριβή και ταχεία μοριακή ταυτοποίηση προτύπων και αγρίων στελεχών των εντεροϊών Coxsackie A (CAV) με βάση την 5'-Μη Μεταφραζόμενη Περιοχή (5'-UTR) του γενωμάτος τους. Ένας περιορισμός των περισσότερων μεθόδων της αντίστροφης μεταγραφής – αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR) για την ανίχνευση των εντεροϊών που έχουν περιγραφεί έως σήμερα είναι η αδυναμία παροχής πληροφοριών για τον ορότυπο, ή τη γενετική υποομάδα στην οποία ανήκει το απομονωθέν στέλεχος. Συνεπώς, κατά την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RT-PCR σε συνδυασμό με τη μέθοδο ανάλυσης πολυμορφισμού μήκους με ένζυμο περιορισμού (RFLP). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των προϊόντων της RT-PCR με τη μέθοδο RFLP οδήγησαν σε μια ικανοποιητική γενετική διαφοροποίηση των περισσότερων προτύπων στελεχών με τέσσερα ένζυμα περιορισμού (τα HaeIII, HpaII, DdeI και StyI), με την εξαίρεση των προτύπων στελεχών των οροτύπων CAV5, 7, 16 και των CAV15 και 18. Όμως, μόνο δύο από 14 συνολικά κλινικά στέλεχη CAV είχαν το ίδιο προφίλ ανάλυσης με ένζυμο περιορισμού με τα αντίστοιχα πρότυπα στελέχη του ίδιου οροτύπου. Τα πειραματικά αποτελέσματα, επομένως, υπέδειξαν την ύπαρξη σημαντικής ενδο-οροτυπικής γενετικής ποικιλομορφίας στη συγκεκριμένη γενετική περιοχή.

Όμως, ακόμα και όταν αυτή η γενετική ποικιλομορφία στην 5'-UTR περιπλέκει την αναγνώριση κλινικών στελεχών CAV από τη μέθοδο RFLP, η συγκεκριμένη μέθοδος θα μπορούσε να παρέχει σημαντικές βιολογικές και επιδημιολογικές πληροφορίες σχετικά με την κυκλοφορία εντεροϊών στους πληθυσμούς και την εξέλιξή τους. Αυτό απεδείχθη με 16 απομονωθέντα στέλεχη εντεροϊών από ισάριθμες περιπτώσεις άσηπτης μηνιγγίτιδας, τα οποία είχαν το ίδιο προφίλ ανάλυσης με ένζυμο περιορισμού, κάτι το οποίο επέτρεψε τη διεξαγωγή συμπεράσματος σχετικά με την επιδημιολογική συσχέτιση αυτών των στελεχών, σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη απομόνωσή τους και τα παρόμοια κλινικά συμπτώματα για τα οποία ευθυνόντουσαν. Επειδή μπορεί να υπάρχουν περιπτώσεις

κατά τις οποίες στελέχη εντεροϊών που δεν έχουν καμία σχέση μεταξύ τους, παρουσιάζουν παρόμοιο προφίλ ανάλυσης RFLP, όπως έγινε και με τα πρότυπα στελέχη των οροτύπων CAV5, 7, 16 και των CAV15 και 18, η μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμού της χωροδιάταξης μονόκλωνων μορίων γενετικού υλικού (SSCP) είναι ακόμη πιο κατάλληλη για τη συγκριτική χρησιμοποίηση επιδημιολογικών πληροφοριών. Αυτό συμβαίνει γιατί η συγκεκριμένη μέθοδος ανιχνεύει γενετικές διαφορές μεταξύ ολόκληρων των περιοχών του γενετικού υλικού που συγκρίνονται, ενώ τα ένζυμα περιορισμού έχουν το μειονέκτημα ότι αναλύουν ένα μικρό τμήμα αυτών των περιοχών. Η δυνατότητα εφαρμογής αυτής της μεθόδου σε επιδημιολογικές μελέτες απεδείχθη με την ανάλυση των προαναφερθέντων 16 στελεχών από τις αντίστοιχες περιπτώσεις άσηπτης μηνιγγίτιδας, κατά την οποία όλα τα στελέχη είχαν το ίδιο ηλεκτροφορητικό πρότυπο.

Έχει βρεθεί έως σήμερα η νουκλεοτιδική αλληλουχία ολόκληρου του γενώματος μόνο τεσσάρων οροτύπων των εντεροϊών CAV, παρόλο που έχει βρεθεί η αντίστοιχη αλληλουχία πολλών γενωμικών περιοχών από όλους τους ανεγνωρισμένους ορότυπους. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες από ένα μεγάλο τμήμα της 5'-UTR 21 διαφορετικών προτύπων στελεχών CAV για τα οποία δεν υπήρχαν αντίστοιχες πληροφορίες έως σήμερα ευρέθη για πρώτη φορά κατά την παρούσα μελέτη. Τα νέα αυτά δεδομένα προσέθεσαν σημαντικές νέες πληροφορίες σχετικά με την ταξινόμηση των CAV με βάση την 5'-UTR. Ευρέθη ότι οι CAV2-10, 12, 14 και 16 ταξινομούνται μαζί με τους ιούς Coxsackie B, Echo και τους υπόλοιπους εντεροϊούς, ενώ οι CAV1, 11, 13, 15, 17-22 και 24 ταξινομούνται μαζί με τους πολιοϊούς και τον εντεροϊό 70. Με βάση ερευνητικές μελέτες άλλων επιστημόνων η τελευταία ομάδα των CAV ταξινομείται μαζί με τους πολιοϊούς με βάση και τα υπόλοιπα τμήματα του γενετικού τους υλικού, κάτι το οποίο είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον και έρχεται σε αντίθεση με τη γενικώς διακριτή παθογένεια των πολιοϊών.

Η ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών στην παρούσα μελέτη επίσης οδήγησε στη διεξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων σχετικά με τη δευτεροταγή δομή της 5'-UTR των CAV μέσω του φαινομένου της «συμμεταβλητότητας».

Κατά την παρούσα μελέτη έγινε επίσης η προσπάθεια ταυτοποίησης κλινικών στελεχών των CAV με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του τμήματος της 5'-UTR που χρησιμοποιήθηκε και για τις προαναφερθείσες αναλύσεις RFLP και SSCP. Και η αλληλούχηση του γενετικού υλικού, μαζί με τη μέθοδο RFLP, οδήγησε σε ποικιλόμορφα αποτελέσματα όταν έγινε η σύγκριση των αλληλουχιών των κλινικών στελεχών με εκείνες των αντιστοιχών προτύπων στελεχών του ίδιου οροτύπου. Το ίδιο παρατηρήθηκε κατά τη σύγκριση αλληλουχιών από το ίδιο τμήμα της 5'-UTR άλλων κλινικών στελεχών εντεροϊών με τις αλληλουχίες των αντιστοιχών προτύπων στελεχών του ίδιου οροτύπου. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενες ερευνητικές προσπάθειες σχετικά με την ταυτοποίηση εντεροϊών με βάση την 5'-UTR. Το κεντρικό σημείο, όπως απεκαλύφθη στην παρούσα μελέτη, δεν είναι η ύπαρξη μίας γενικής γενετικής ποικιλομορφίας, αλλά η ύπαρξη μίας ενδο-οροτυπικής γενετικής ποικιλομορφίας η οποία οδήγησε στο συμπέρασμα ότι δεν μπορεί να γίνει συσχέτιση μεταξύ της 5'-UTR και του οροτύπου των εντεροϊών. Τέτοιου είδους ποικιλομορφία μπορεί να οφείλεται σε

τυχαία ελάσσονα γενετική μεταβολή, στη στοχαστική διαδικασία των μεταλλάξεων, αλλά επίσης και στην ανταλλαγή μεγάλων τμημάτων της 5'-UTR μέσω γενετικού ανασυνδυασμού. Λόγω αυτού του είδους της γενετικής ποικιλομορφίας, η ανάλυση όλων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών της συγκεκριμένης μεγάλης περιοχής της 5'-UTR που είναι διαθέσιμες, υπέδειξε ότι η ταξινόμηση των CAV και πολλών άλλων προτύπων και αγρίων στελεχών εντεροϊών σε συγκεκριμένες γενετικές ομάδες αποτελεί έναν πιο ρεαλιστικό στόχο, από ότι η προσπάθεια ακριβούς συσχέτισης οποιουδήποτε από τους 65 ανεγνωρισμένους ορότυπους εντεροϊών με τη συγκεκριμένη γενετική περιοχή. Παρά τη γενετική ποικιλομορφία στην 5'-UTR, η οποία δεν επέτρεψε την ακριβή μοριακή ταυτοποίηση των CAV και άλλων εντεροϊών, ήταν δυνατή η αναγνώριση τμημάτων γενετικού υλικού εντός της 5'-UTR τα οποία δεν έδειχναν ενδο-οροτυπική ποικιλομορφία. Η ανάλυση των διαθέσιμων αλληλουχιών οδήγησε στην πρόβλεψη ότι υπάρχουν ένζυμα περιορισμού με περιοχές αναγνώρισης εντός αυτών των τμημάτων που θα μπορούσαν να διαφοροποιήσουν αξιόπιστα πρότυπα και άγρια στελέχη εντεροϊών στις δύο γνωστές γενετικές ομάδες ταξινόμησης με βάση την 5'-UTR.

Αυτό απεδείχθη στην πράξη χρησιμοποιώντας ένα από αυτά τα ένζυμα, το BstOI. Πιο σημαντικά ακόμη ήταν τα συμπεράσματα από την ανάλυση με το ένζυμο περιορισμού HpaII, με το οποίο ήταν δυνατή η ακριβής μοριακή ταξινόμηση προτύπων και αγρίων στελεχών σε 5 διακριτές γενετικές ομάδες, χωρίς καμία ένδειξη ενδο-οροτυπικής ποικιλομορφίας. Η τοποθεσία της περιοχής αναγνώρισης του ενζύμου HpaII στην 5'-UTR των εντεροϊών και η σταθερότητά της σε όλους τους εντεροϊούς (στις περιοχές δευτεροταγούς δομής III και V) και εντός καθεμίας από 4 διαφορετικές γενετικές ομάδες με βάση το ένζυμο HpaII (στην περιοχή δευτεροταγούς δομής IV), προτείνουν έναν πιθανώς σημαντικό βιολογικό ρόλο των συγκεκριμένων περιοχών του γενώματος. Η εξακρίβωση αυτού του ρόλου μπορεί να αποτελεί ένα ενδιαφέρον αντικείμενο για μελλοντικές ερευνητικές προσπάθειες.

Εν κατακλείδι, η πιθανώς πιο σωστή γενετική ταξινόμηση σε διακριτές γενετικές ομάδες και ο προσδιορισμός της σπουδαιότητας αυτής της ταξινόμησης στη βιολογία των εντεροϊών, στην παθογένεια και επιδημιολογία τους, μπορεί να αποτελέσει έναν εναλλακτικό τρόπο αναγνώρισης των εντεροϊών του ανθρώπου, έναντι της συμβατικής αναγνώρισης 65 οροτύπων των ιών αυτών, μία αντίληψη η οποία έχει ήδη αρχίσει να τίθεται σε εφαρμογή με την ταξινόμηση των 65 οροτύπων σε 5 «είδη» (Human Enterovirus Species) με βάση την P1 κωδική περιοχή του γενώματός τους.

MOLECULAR CLASSIFICATION OF COXSACKIE A VIRUS REFERENCE AND WILD TYPE STRAINS ON THE BASIS OF 5'-UTR: STRUCTURAL AND EVOLUTIONARY ASPECTS

Siafakas, N., Markoulatos, P.

Hellenic Pasteur Institute, Department of Virology, 127. Vas. Sofias Ave., Athens 115 21

Serotype-specific identification of clinical strains, with all its extremely important implications in enterovirus biology, pathogenesis, clinical diagnosis and evolution, is an intriguing subject. A molecular means of genotypic characterisation underlies the current trend in enterovirus classification and identification, improving to a significant extent the slow, low-sensitivity and potentially inaccurate conventional methods. During the present study, there was an attempt to elaborate a method for the accurate and rapid molecular typing of reference and wild type Coxsackie A viruses (CAV) on the basis of the 5'-UTR (5'-UnTranslated Region) of their genome for clinical diagnosis and epidemiological studies. A limitation of most RT-PCR methods described so far is the inability to provide information on the serotype, or other sub-classification of enteroviruses, and consequently the RT-PCR assay that was used was supplemented with a Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis assay. The results of the RFLP analysis led to a satisfactory genetic discrimination of the prototype strains with four restriction enzymes (HaeIII, HpaII, DdeI, StyI), with the exception of CAV5-7-16 and CAV15-18. However, only two out of 14 CAV clinical isolates had an identical restriction pattern with the respective prototype strains. The experimental results, therefore, showed the existence of significant intra-serotypic genetic variability at the specific genomic region. Nevertheless, even where genetic variability in the 5'-UTR complicates the identification of CAV isolates by RFLP analysis, this method could provide significant biological and epidemiological information about enterovirus circulation in the populations and their evolution. This was shown with enterovirus isolates from 16 cases of aseptic meningitis, which had identical restriction profiles, something which, allowed the inference of the epidemiological relationship of those isolates, in correlation with the simultaneous time of isolation and the identical clinical symptoms.

Since there may be cases where unrelated strains may share identical RFLP profiles, as was shown with CAV5-CAV7-CAV16 and CAV15-CAV18 reference strains, the Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) method is even more appropriate for the derivation of useful epidemiological information. This is because this method detects differences between whole sequences, whereas restriction enzymes have the disadvantage of analysing a small portion of the compared sequences. The applicability of the method in epidemiological studies was shown with the analysis of 16 isolates from an aseptic meningitis outbreak, which all had the same SSCP electrophoretic pattern.

The genomes of only four CAVs have been completely sequenced to date, although more data are available from various genomic parts of all currently recognised serotypes. The sequences of a large part of the 5'-UTR of 21 different CAV reference strains for which such data did not exist in the past was obtained during the present study. The new data added significantly to the classification of CAVs on the basis of 5'-UTR. It was found that CAV2-10, 12, 14 and 16 are classified along with CBVs, ECVs and the rest of the other enteroviruses, whereas CAV1, 11, 13, 15, 17-22 and 24 are classified together with polioviruses and ENV70. The latter group of CAVs is also classified into the same genetic cluster with polioviruses on the basis of the rest of the genomic regions as well, something which is very interesting in the light of the distinct pathogenicity which is generally exhibited by polioviruses. Analysis of the sequence data in the present study also allowed the derivation of very useful conclusions regarding the secondary structure of the 5'-UTR of CAVs through the model of covariance.

In the present study, there was also an attempt to type clinical isolates by sequencing of the same 5'-UTR part that was used for the RFLP and SSCP analysis. Along with RFLP analysis, sequencing also produced highly variable results when the isolates were compared with their respective prototype strains, since the sequence differences that were observed were not monophyletic within any single serotype. The same was observed when 5'-UTR-derived sequences from other enterovirus wild type strains were compared with the respective sequences of their homotypic, prototype strains. These results conflicted with previous attempts of other scientists in molecular typing of enteroviruses on the basis of 5'-UTR. The central issue, as revealed in the present study, was not the existence of genetic variability in general, but that of intratypic genetic variation which led to the conclusion that no correlation of 5'-UTR with serotype can be made. Such variation can be due to random genetic drift, to the stochastic processes of mutation, but also due to the exchange of large segments of the 5'-UTR through recombination.

Due to this kind of genetic variation, the analysis of the available sequence data from this large part of the 5'-UTR showed that classification of CAVs and many other enterovirus reference and wild type strains into distinct genetic clusters seems a more realistic target than an attempt to strictly correlate any of the 65 enterovirus serotypes with the specific genomic region. Despite this genetic variation in the 5'-UTR, that did not allow precise molecular typing of CAVs and other enteroviruses, sequence sections that did not exhibit intratypic variation were recognised. It was predicted, first of all, that restriction enzymes within these sections could reliably differentiate enterovirus reference and wild type strains into the two clusters on the basis of 5'-UTR classification. This was proved in practice by using one of those enzymes, BstOI. More important still, was the conclusions from the RFLP analysis with the enzyme HpaII, with which it was possible to accurately classify both reference and wild type strains into 5 different genetic clusters without any case of intra-serotypic variation in the HpaII-produced haplotypes. The location of the HpaII restriction sites on the 5'-UTR and their constancy in all enteroviruses (regarding the sites in secondary structure domains III and V) and within each of four different HpaII-

generated clusters (regarding the rest of the sites in secondary structure domain IV) imply a significant biological role of these parts of the genome. The elucidation of this role may constitute an interesting subject for future experimental investigation.

In conclusion, the more likely target of genotypic classification into distinct clusters and the definition of the significance of this kind of classification in enterovirus biology, pathogenesis and epidemiology may constitute an alternative means of enterovirus identification against conventional classification into distinct serotypes, a conceptive that has already started to emerge with the classification of the 65 human enterovirus serotypes into five distinct species (Human Enterovirus Species) on the basis of the P1 coding region of the genome.

**ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΕΝΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ
VL30: ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ
ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΑΣΙΝΗΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ
(GFP) ΣΕ SV40-ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
NIH3T3 ΠΟΝΤΙΚΟΥ**

Σκύρλας, Α., Ευταξία, Σ. και Θ. Τζαβάρας

Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, 45 110 Ιωάννινα

Τα VL30 είναι ρετροϊικά μεταθετά στοιχεία που απαντούν στο γένωμα του ποντικού σε 100-200 αντίγραφα. Έχουν μοριακό μήκος 5-6Kb και ομοιάζουν με ρετροϊούς αλλά χωρίς γονίδιο env, γεγονός που τα καθιστά ελλειματικά σε ρετροϊικό αναπαραγωγικό κύκλο. Μετατίθενται μέσω ενός γενωμικού ενδιάμεσου RNA και την δράση του ρετροϊικού ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση αλλά η ανίχνευση μεταθέσεων είναι αρκετά δύσκολη και επίπονη απαιτώντας μεγάλο πειραματικό χρόνο.

Σκοπός της εργασίας ήταν η κατασκευή ενός σημασμένου στοιχείου VL30 με μία κασσέτα ρετρομετάθεσης GFP^{RT} για την ανίχνευση ρετρομεταθέσεων. Το στοιχείο NVL-3 (1) κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pBluescript KS II μετά από πέψη με BamHI. Η κασσέτα απομονώθηκε από το πλασμίδιο pBSKS-EGFP-INT (2) ως τμήμα NotI/ApaI και κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pGEM-11Zf(-). Στην συνέχεια απομονώθηκε ως τμήμα BamHI και κλωνοποιήθηκε στην μοναδική θέση BglII του NVL-3 σε δύο μεταγραφικές κατευθύνσεις: μη λειτουργική (ως μάρτυρας) και λειτουργική για την ανίχνευση ρετρομεταθετικών γεγονότων. Το γονίδιο GFP οδηγείται από τον υποκινητή του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (CMV IE) αλλά διακόπτεται από ιντρόνιο της γ-σφαιρίνης και εκφράζεται, εκ κατασκευής, αποκλειστικά και μόνο στην περίπτωση γεγονότος ρετρομετάθεσης.

Διαμόλυνση των δύο πλασμιδιακών κατασκευών σε κανονικά κύτταρα NIH3T3 έδειξε ότι δεν ανιχνεύονται ρετρομεταθέσεις. Αντίθετα η διαμόλυνση σε κύτταρα NIH3T3/II2α, μετασχηματισμένα από τον ιό SV40, παράγει ένα πολύ μεγάλο αριθμό ρετρομεταθέσεων μόνο στην αναμενόμενη λειτουργική κατεύθυνση κλωνοποίησης της κασσέτας και σε χρόνο μικρότερο των 4 ημερών.

Τα αποτελέσματά μας αναφέρονται στην κατασκευή και χρήση ενός ανασυνδυασμένου στοιχείου VL30/GFP που ανιχνεύει με επιτυχία, ταχύτητα και ακρίβεια ρετρομεταθέσεις σε πραγματικό χρόνο επιτέλεσης στο κύτταρο μέσω πράσινου φθορίζοντος χρώματος αλλά και κυτταροτοξικών φαινομένων. Επιπλέον δείχνεται ότι το φαινόμενο της ρετρομετάθεσης των VL30 συμβαίνει με αρκετά υψηλή συχνότητα, μετά από διαμόλυνση, σε μετασχηματισμένα κύτταρα NIH3T3 από τον ιό SV40.

1. Adams S. et al., (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 2989-2998.

2. Ostertag E. et al., (2000) Nucleic Acids Res. 28: 1418-1423.

CONSTRUCTION OF A RECOMBINANT VL30 ELEMENT: DETECTION OF RETROTRANSPOSITION EVENTS THROUGH A GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) IN SV40-TRANSFORMED MOUSE NIH3T3 CELLS

Skirlas, A., Eftaxia, S., and Th. Tzavaras

Laboratory of General Biology, Medical School, University of Ioannina, 45 110 Ioannina, Greece

VL30s are viral-like transposable elements present in the genome of mouse at 100-200 copies. They have a molecular size of 5-6Kb and resemble retroviruses lacking the env gene and a retroviral replication life-cycle. They transpose through a genomic intermediate RNA and the action of the retroviral enzyme reverse transcriptase but detection of transpositions is difficult and laborious requiring long experimental time.

The aim of our work was to construct a tagged VL30 element with a retrotransposition cassette GFP^{RT} for detection of retrotranspositions. The element NVL-3 (1) was cloned in plasmid pBluescript KS II after digestion with BamHI. The cassette was isolated from plasmid pBSKS-EGFP-INT (2) as a NotI/ApaI fragment and further cloned in plasmid pGEM-11Zf(-). Then, it was isolated as a BamHI fragment and cloned in the unique BglII site of NVL-3 in two transcription orientations: a non-functional (control) and functional for detection of retrotransposition events. The GFP gene is driven by the human cytomegalovirus promoter (CMV IE) but interrupted by a γ -globin intron and it is expressed, by construction, solely in a case of a retrotransposition event.

Transfection of both plasmid constructions in normal mouse NIH3T3 cells showed no detection of retrotranspositions. In contrast, the respective transfection in cells NIH3T3/II2 α transformed by the SV40 virus produced a very large number of retrotranspositions only in the functional orientation of the cassette, as expected, and in a time-course less than four days.

Our results refer to the construction and use of a VL30/GFP recombinant element which detects fast, successfully and accurately retrotranspositions near real time-occurrence in the cell through green fluorescence and cytotoxicity effects. Furthermore it is shown that the phenomenon of retrotransposition of VL30s occurs in a very high frequency, after transfection, in SV40-transformed NIH3T3 cells.

1. Adams S. et al., (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 2989-2998.
2. Ostertag E. et al., (2000) Nucleic Acids Res. 28: 1418-1423.

**Ο LPS ΚΑΙ *ESCHERICHIA COLI* ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝ ΤΗΝ
ERK ΣΤΑ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ ΜΕΣΩ
ΑΝΑΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ ΚΑΙ
ΣΥΝΑΘΡΟΙΣΗΣ ΤΩΝ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΩΝ**

**Σολδάτος, Α.Ν., Χριστοδούλου, Χ., Λάμπρου, Ε., Μεθενίτη, Α.,
Λαμπροπούλου, Μ. και Β.Ι. Μαρμάρας**

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών,

Σύμφωνα με πρόσφατα πειραματικά μας δεδομένα σε αιμοκύτταρα εντόμων, ο LPS προκαλεί ενεργοποίηση της Ras/MAP οδού ενώ για την κυτταροφαγία βακτηρίων απαιτείται επιπλέον η συμμετοχή των β3 ιντεγκρινών και η ενεργοποίηση του συμπλέγματος FAK/Src. Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε αρχικά αν η ERK ενεργοποιείται κατά την επίδραση LPS, *E. coli*, αντισωμάτων έναντι ιντεγκρινών (anti-β3) ή φιμπρονεκτίνης (Fn), στα αιμοκύτταρα. Διαπιστώσαμε ότι η επίδραση LPS/*E. coli* στα αιμοκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της ERK αρχικά από τον υποδοχέα του LPS και στη συνέχεια από τις ιντεγκρίνες. Επιπλέον, η επαγόμενη από τον LPS, *E. coli*, anti-β3 ή Fn ενεργοποίηση της ERK απαιτεί αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού δεδομένου ότι η κυτταροχαλασίνη D αναστείλει την ενεργοποίηση αυτή. Στη συνέχεια μελετήσαμε την επίδραση του LPS στη συνάθροιση των ιντεγκρινών. Διαπιστώσαμε ότι ο LPS επάγει τη συνάθροιση των ιντεγκρινών γεγονός που αναστέλλεται επίσης από τη χρήση της κυτταροχαλασίνης D. Τέλος η χρήση ενός αναστολέα της ERK, U0126, δεν είχε καμία επίδραση στην επαγόμενη από τον LPS συνάθροιση των ιντεγκρινών, γεγονός που σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση της ERK από ιντεγκρινικά σήματα δείχνει ότι η ERK ενεργοποιείται από τον LPS μέσω συνάθροισης των ιντεγκρινών και ότι για τη διαδικασία αυτή απαιτείται αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού.

**INSECT HEMOCYTES CHALLENGED WITH LPS OR
Escherichia coli ACTIVATE EXTRACELLULAR SIGNAL-
REGULATED KINASE VIA ACTIN REORGANIZATION
AND $\beta 3$ INTEGRIN CLUSTERING**

**Soldatos, A.N., Christodoulou, C.G., Lambrou, I., Metheniti, A.,
Lambropoulou, M., and V.J. Marmaras**

Department of Biology, University of Patras, 26 500 Patras

Recently we demonstrated that lipopolysaccharide (LPS) promotes activation of the Ras/ERK cascade in medfly hemocytes and that phagocytosis of *Escherichia coli* by insect hemocytes is mediated by an integrin-dependant process via the activation of FAK/Src complex. In the current study we initially explored the activation of ERK in medfly hemocytes in response to LPS, *E. coli*, anti- $\beta 3$ and fibronectin (FN). We found that in LPS or *E. coli* stimulated hemocytes, ERK is probably activated initially via LPS receptor followed by $\beta 3$ integrins. Furthermore, we found that cytoskeletal rearrangements are required for the induction of ERK by LPS, *E. coli*, anti- $\beta 3$ and FN, as judged by blockage of ERK phosphorylation by cytochalasin D. To test the above hypothesis we studied the effect of LPS on $\beta 3$ integrin clustering. We found that LPS promotes $\beta 3$ integrin clustering and LPS uptake and that these events are blocked by cytochalasin D. Therefore, cytochalasin D blocks both $\beta 3$ integrin clustering and ERK activation. These results in correlation with the results obtained with MEK1/2 inhibitor U0126 which failed to inhibit integrin clustering as well as the anti- $\beta 3$ and FN-mediated ERK activation indicated that ERK is activated by LPS via $\beta 3$ integrin clustering, a process requiring reorganization of actin cytoskeleton. Therefore, reorganization of actin cytoskeleton upon LPS stimulation is required for both $\beta 3$ integrin clustering and ERK activation after $\beta 3$ integrin clustering. The possible involvement of ERK activation in the process of *E. coli* phagocytosis by insect hemocytes is discussed.

**Η ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA
ΣΤΟΥΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥΣ ΛΑΓΟΥΣ (*Lepus europaeus*)
ΤΗΣ ΚΕΝΤΡΙΚΗΣ ΕΥΡΩΠΗΣ: ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΑ ΑΠΟ
ΤΑ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΑ ΚΑΤΑΦΥΓΙΑ ΤΩΝ ΤΕΛΕΥΤΑΙΩΝ
ΠΑΓΕΤΩΝΩΝ;**

Σταμάτης, Κ.¹, Σφουγγάρης, Α.Ι.², Suchentrunk, F.³, Μαμούρης, Ζ.¹

¹Τμήμα Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας, Πλούτωνος 26, 41221 Λάρισα και ²Τμήμα Γεωπονίας, Φυτόκο, 38334, Βόλος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

³Res. Institute of Wildlife Ecology, University of Veterinary Medicine Vienna, Savoyenstr. 1, A-1160 Vienna, Austria

Οι ευρωπαϊκοί λαγοί απουσίαζαν από την Κεντρική Ευρώπη στη διάρκεια των τελευταίων παγετώνων εξαιτίας, της ακαταλληλότητας των ενδιαιτημάτων. Η κατανομή τους περιοριζόταν πιθανώς σε καταφύγια της Νοτιοανατολικής και ίσως της Νοτιοδυτικής Ευρώπης. Ανεξάρτητη εξέλιξη στα απομονωμένα καταφύγια και επακόλουθη μετανάστευση στο τέλος του Πλειστόκαινου/ αρχές του Ολόκαινου κατέληξε ενδεχομένως σε ανάμιξη των mtDNA σειρών διαφορετικών απλότυπων στους ευρωπαϊκούς λαγούς της Κεντρικής Ευρώπης. Εδώ συγκρίνουμε την ποικιλομορφία του mtDNA σε 797 λαγούς από την Κ. Ευρώπη, την ΝΑ Ευρώπη, την Μ. Ασία και τη Μ. Ανατολή, προκειμένου να εξεταστούν α) η συμβολή των υποτιθέμενων πληθυσμών των καταφυγίων του Πλειστόκαινου στη γενετική δομή των πληθυσμών της Κ. Ευρώπης β) η υπόθεση της μετανάστευσης προς την Κ. Ευρώπη από άλλα καταφύγια και γ) η πιθανή (μητρική) γονιδιακή ροή από την Κ. Ευρώπη προς τα Βαλκάνια στη διάρκεια του Ολόκαινου. PCR-RFLPs του mtDNA (CR/cyt b, COI, 12S/16S rRNA) μετά από πέψεις με 20 ενδονουκλεάσες δημιούργησαν 104 απλότυπους, οι οποίοι ομαδοποιήθηκαν σε τρεις διακριτές απλοομάδες: "Κεντροευρωπαϊκή" (ΚΕ), "Νοτιοανατολική Ευρωπαϊκή" (ΝΑΕ), "Ανατολική" (Α). Οι Α απλότυποι ήταν οι περισσότεροι διαφοροποιημένοι και οι ΝΑΕ απλότυποι διαχωρίζονταν σαφώς από τους ΚΕ απλότυπους. Η γεωγραφική κατανομή των απλότυπων έδειξε μια οριακή γονιδιακή ροή από τα Νότια Βαλκανικά καταφύγια προς την Κ. Ευρώπη, ενώ δεν βρέθηκαν ίχνη γονιδιακής ροής προς την αντίστροφη κατεύθυνση. Αντιθέτως, γονιδιακή ροή ανιχνεύτηκε από την Μ. Ανατολή – Μ. Ασία προς την Νοτιοανατολική Ευρώπη. Η χαμηλή ποικιλομορφία και η αμελητέα φυλογεωγραφική δομή των πληθυσμών της Κ. Ευρώπης υποδεικνύουν πως η Κ. Ευρώπη αποικιήθηκε μετά τους τελευταίους παγετώνες κυρίως από έναν (ανατολικό;) αρχικό πληθυσμό.

MITOCHONDRIAL DNA DIVERSITY OF CENTRAL EUROPEAN BROWN HARES (*Lepus europaeus*): A LEGACY OF LATE GLACIAL MEDITERRANEAN REFUGIA?

Stamatis C.¹, Sfougaris, A.I.², Suchentrunk, F.³, Mamouris, Z.¹

¹Department of Biochemistry and Biotechnology, 26 Ploutonos Str., 41 221 Larissa, Greece

²Dept. of Crop & Animal Science, Fitokou Str. 38 334, Volos, University of Thessaly, Greece

³Res. Institute of Wildlife Ecology, University of Veterinary Medicine Vienna, Savoyenstr. 1, A-1160 Vienna, Austria

Brown hares were absent from central Europe during the Late Glacial because of unsuitable habitats. Their range was probably confined to refugia in eastern, south-eastern, and perhaps also in southern and south-western Europe. Independent evolution in isolated refugia and subsequent Late Pleistocene/Early Holocene immigration might have caused an admixture of mtDNA lineages of distinct haplogroups in central European brown hares. Here, we compare mtDNA variability of 797 brown hares from central Europe, southeastern Europe, Asia Minor, and the Mideast to examine a) the contribution of supposed Pleistocene refuge populations in the southern Balkan and in Asia Minor to central European populations, b) the hypothesis of migration into central Europe from different refugia, and c) the possible (maternal) gene flow from an expanding central European Holocene gene pool into the southern Balkan population. PCR-RFLPs of mtDNA (CR/cyt b, COI, 12S/16S rRNA) using 20 endonucleases yielded 104 haplotypes, which clustered into three distinct haplogroups: "Central European" (CE), "South-Eastern European" (SEE), "Anatolian/Mideast" (AM). While the AM haplotypes were the most separate, the SEE haplotypes were also clearly distinct from the CE haplotypes. The geographical pattern of haplotypes/-groups indicated an only marginal mtDNA gene flow from the southern Balkan refuge to central Europe and no mtDNA gene flow from central Europe to the southern Balkan refuge population. And some mtDNA gene flow occurred over the Late Pleistocene/Early Holocene landbridge from Anatolia to south-eastern Europe. Low diversity and negligible phylogeographical structuring of central European brown hares suggested Postglacial colonization of central Europe predominantly from one (eastern?) source population.

Η ΣΜΙΧΤΟΦΡΥΔΙΑ ΚΑΙ Η ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΦΡΥΔΙΩΝ ΣΕ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΗΣ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΡΑΚΗΣ

Σταματίου, Δ.Γ., Νεοφύτου, Ε.Π., Καλαϊτζής, Σ.Χ., Πέντζου-Δαπόντε, Α.

Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών
Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Τα δυο παραπάνω χαρακτηριστικά κρίθηκε απαραίτητο να μελετηθούν με σκοπό να συγκριθούν τα αποτελέσματα μας με μετρήσεις που έγιναν στον ευρύτερο ευρωπαϊκό χώρο. Στην εργασία μας μελετήθηκαν και για τα δυο χαρακτηριστικά 263 μαθητές της δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης από την ευρύτερη γεωγραφική περιοχή της Μακεδονίας και της Θράκης.

Για το χαρακτηριστικό «πυκνότητα φρυδιών» χρησιμοποιήσαμε 4 διαβαθμίσεις από το 0 έως το 3 με την ακόλουθη κλίμακα:

0: σχεδόν απουσία φρυδιών,

1: αραιά φρύδια,

2: κανονικά φρύδια,

3: πυκνά φρύδια.

Από την μελέτη προέκυψε ότι το 9,9 % των αγοριών εμφανίζουν σχεδόν απουσία φρυδιών (βαθμός 0), το 13,1 % εμφανίζει το χαρακτηριστικό αυτό σε βαθμό 1, 41 % σε βαθμό 2 και το 36 % σε βαθμό 3. Στα κορίτσια τα αντίστοιχα ποσοστά είναι: βαθμός 0: 4,3 %, βαθμός 1: 21,3 %, βαθμός 2: 53,9 % και βαθμός 3: 20,5 %. Συγκρίνοντας τα δυο φύλα διαπιστώνουμε υπεροχή των κοριτσιών στις διαβαθμίσεις 1 και 2 και υπεροχή των αγοριών στις 0 και 3.

Για το χαρακτηριστικό «σμιχτοφρυδιά» η ερευνά μας έδειξε ότι το γνώρισμα αυτό παρατηρείται στα μεν αγόρια σε ποσοστό 24,5%, στα δε κορίτσια δεν υπερβαίνει το 17%. Η διαφορά είναι αξιοσημείωτη.

Στα πλαίσια της παραπάνω έρευνας γίνεται προσπάθεια διερεύνησης των λόγων που μεγάλο ποσοστό του δείγματος παρεμβαίνει στο σχήμα και στο μέγεθος των φρυδιών καθώς και στην σμιχτοφρυδιά, δηλαδή χαρακτηριστικών που είναι φαινοτυπικά εμφανή.

EYEBROW CONNECTION AND THE DENSITY OF THE EYEBROWS IN POPULATION OF MACEDONIA AND THRACE

Stamatiou, D.G., Neophitou, E.P., Kalaitzis, S.C., Pentzou-Daponte, A.

Section of Genetic Development and Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Aristotle University of Thessaloniki

The two characteristics were necessary to study in order to compare our results with studies conducted in the greater European region. We examined both of the characteristics on 263 students of high school from the greater geographical region of Macedonia and Thrace.

For the characteristic eyebrow density we used a 4-scale climax (with scales from 0 to 3). In detail these scales are:

0: almost absence of eyebrows,

1: low density of eyebrows,

2: normal density of eyebrows,

3: high density of eyebrows.

Our research resulted that 9,9 % of the boys show this characteristic at scale 0, 13,1 % at scale 1 41 % at scale 2 and 36 % at climax 3. As we examined the girls we came to following conclusions: 4,3 % show this characteristic at scale 0, 21,3 % at scale 1, 53,9 % at scale 2 and 20,5 % at scale 3. By comparing the results between the two sexes we notice a dominance of the girls at scales 1 and 2 in contradiction to the boys who dominate at scales 0 and 3.

Regarding the other characteristic 24,5% of the boys was having eyebrow connection and only 17% of the girls. The difference is remarkable.

As an association with the characteristic eyebrow connection we tried to study the reason for which a great percentage of the population interfere with the shape and the size of the eyebrows and also with eyebrow connection, which are all phenotypically obvious.

**ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΟΙ ΚΑΙ Η ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥΣ
ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΧΑΡΤΩΝ ΣΤΗ
ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΜΥΓΑ, *Ceratitis capitata***

**Στρατικόπουλος, Η.Ε., Αυγουστίνος, Α.Α., Ματθιόπουλος, Κ.Δ.,
Ζαχαροπούλου, Α.**

Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Πατρών, Πάτρα 26500

Οι μικροδορυφόροι είναι διαδοχικές επαναλήψεις μιας απλής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και αποτελούν κοινό χαρακτηριστικό των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων. Ο μεγάλος αριθμός τους, η τυχαία κατανομή τους στο γονιδίωμα καθώς και ο υψηλός βαθμός πολυμορφισμού που τους χαρακτηρίζει, τους καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμους τόσο στη γενετική ανάλυση όσο και σε πληθυσμιακές μελέτες. Η διαλογή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών της Μεσογειακής μύγας, *Ceratitis capitata*, με ανιχνευτές συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (GT)₁₅ και (CT)₁₅ είχε ως αποτέλεσμα την απομόνωση 93 κλώνων που περιείχαν έναν τουλάχιστον μικροδορυφόρο. Οι κλώνοι αυτοί των οποίων είναι γνωστό ένα μεγάλο μέρος της αλληλουχίας τους μπορούν να αποτελέσουν σημεία εισόδου στο γονιδίωμα του εντόμου (STS: sequence tagged sites). Ακολούθησε *in situ* υβριδοποίηση σε πολυταινικά χρωμοσώματα, με σκοπό την εύρεση της θέσης τους στον φυσικό χάρτη. Εικοσιδύο μικροδορυφορικοί κλώνοι έδειξαν να έχουν μοναδική θέση στο γονιδίωμα ενώ 19 είχαν περισσότερες από μια θέση. Σε πειράματα γενετικής χαρτογράφησης των μικροδορυφόρων, αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι κλώνοι με μοναδική θέση στο γονιδίωμα. Η χαρτογράφηση βασίστηκε στην ανάλυση απογόνων, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), από επαναδιασταυρώσεις θηλυκών ατόμων στελεχών με τους διαθέσιμους μορφολογικούς δείκτες για κάθε ένα από τα χρωμοσώματα του εντόμου. Η γενετική ανάλυση των απογόνων των διασταυρώσεων αυτών συνεχίζεται με στόχο την χαρτογράφηση και των κλώνων των οποίων η θέση στο γονιδίωμα δεν είναι γνωστή με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων λογισμικών πακέτων. Απώτερος στόχος της προσπάθειας αυτής είναι η κατασκευή λεπτομερών γενετικών χαρτών στη Μεσογειακή μύγα.

MICROSATELLITES AND THEIR USE IN THE CONSTRUCTION OF GENETIC MAPS IN THE MEDITERRANEAN FRUIT FLY, *Ceratitis capitata*

**Stratikopoulos, E.E., Augustinos, A.A., Mathiopoulos, K.D.,
and A. Zacharopoulou**

Department of Biology, University of Patras, zacharop@upatras.gr

Microsatellites are tandem arrays of simple sequence repeats that are common in eukaryotic genomes. They are extremely useful both in genetic analysis and also in population analyses due to their large number, random distribution in the genome and high degree of polymorphism. Screening of genomic libraries of the medfly, *Ceratitis capitata*, using as probes the synthetic oligonucleotides (GT)₁₅ and (CT)₁₅ resulted in the isolation of 93 clones containing at least one microsatellite. These clones, whose large part of sequence is known, can be used as entry points in the genome of this insect (STS: sequence tagged sites). Subsequently, their exact position on the physical map was determined by *in situ* hybridization on polytene chromosomes. Twenty two microsatellite clones showed a unique position in the genome whereas 19 were localized on more than one positions. Microsatellite clones with a unique position in the genome were used first in genetic mapping experiments. Genotyping was based on the analysis of the offsprings, through the Polymerase Chain Reaction (PCR), from backcrosses of female strains with the available morphological markers for each of the five autosomes of the insect. The genetic analysis of the offsprings of these strains is in process in order to map the clones, whose exact position in the genome is not yet known, with the use of appropriate software. The goal of this effort is the construction of integrated genetic maps of the Mediterranean fruit fly.

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ENZYMΩΝ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ ΣΤΗΝ *Podarcis peloponnesiaca* (SAURIA: LACERTIDAE)

Σωζόπουλος, Η., Παφίλης, Π., Γαϊτανάκη, Κ. και Ε.Α. Βαλάκος

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθήνας. 157 84,
Πανεπιστημιόπολη Ιλίσια

Η λειτουργία της πέψης επηρεάζεται άμεσα από τις μεταβολές στην θερμοκρασία σώματος (body temperature, Tb), ειδικά σε εξώθερμα ζώα όπως οι σαύρες. Στο εργαστήριο μας έχουμε αποδείξει ότι ο χρόνος διέλευσης της τροφής από τον πεπτικό σωλήνα (gut passage time, GPT) ελαττώνεται σημαντικά με την άνοδο της Tb. Αντίθετα όταν εξετάσαμε την φαινομενική ικανότητα πέψης (apparent digestibility coefficient, ADC) για τα επιμέρους θρεπτικά συστατικά της τροφής (λιπίδια, πρωτεΐνες και σάκχαρα) διαπιστώσαμε ότι οι τιμές ADC σε σχέση με την Tb ποικίλλουν ανάλογα με το θρεπτικό συστατικό.

Για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της πέψης απαιτείται η δράση μιας πληθώρας ενζύμων που ομαδοποιούνται ανάλογα με το θρεπτικό συστατικό-στόχο που καταβολίζουν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: τις λιπάσες, τις πρωτεάσες και τις σακχαριτάσες. Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η προσέγγιση της επίδρασης της θερμοκρασίας στην δραστικότητα αυτών των ενζύμων έτσι ώστε να δοθεί μια πειστική εξήγηση για τις διαφορετικές ADE που βρέθηκαν ανά θρεπτικό συστατικό. Αφαιρέσαμε τον πεπτικό σωλήνα από σαύρες και τον χωρίσαμε στα βασικά του τμήματα: στομάχι, δωδεκαδάκτυλο και έντερο. Η δραστικότητα των ενζύμων εξετάστηκε σε κάθε τμήμα. Το πείραμα εφαρμόστηκε στις ίδιες θερμοκρασίες όπου πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα για την ADE και το GTP στο παρελθόν (20, 25 και 30 C) έτσι ώστε να είναι εφικτή η σύγκριση των αποτελεσμάτων.

Σε όλες τις περιπτώσεις η μέγιστη δραστικότητα παρατηρήθηκε στο δωδεκαδάκτυλο, σε πολύ μικρότερο βαθμό στο στομάχι και σε σχεδόν μηδενική απόδοση στο έντερο. Σε σχέση με τη θερμοκρασία η μέγιστη απόδοση παρατηρήθηκε στους 30 C ενώ η χαμηλότερη στους 20 C.

Η παρούσα εργασία υποστηρίχθηκε από το ΠΕΝΕΔ 99 (99ΕΔ 231) και από τον ΕΛΚΕ του Πανεπιστημίου Αθήνας.

TEMPERATURES' EFFECT ON THE PERFORMANCE OF THE PEPTIC ENZYMES IN *Podarcis peloponnesiaca* (SAURIA: LACERTIDAE)

Sozopoulos, I., Pafilis, P., Gaitanaki, K., and E.D.Valakos

Department of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimioupolis 157 84, Athens, Greece

Body temperature (T_b) has a direct impact on many physiological procedures such as digestion, especially on ectotherms like lizards. Gut-passage time (GPT, the time from feeding to first defecation) is temperature dependent and decreases significantly with increasing temperature as we demonstrated in a previous work. At the same time apparent digestibility coefficient (ADE, the percentage of the ingested energy that is absorbed through the gut) varies in respect to the nutrient component in question (lipids, proteins and sugars) and T_b.

Many different enzymes are involved in the digestion procedure. A widely acceptable classification according to the nutrient components they catabolise is the following: proteases, lipases and saccharitases. In the present study we tried to approach temperatures' effect on the performance of these enzymes so as to explain the differences on ADE for each component.

Digestion truck from lizards was removed and then separated to the main parts, stomach, duodenum and intestine. Enzyme's activity was calculated for each part. The experiment was carried out in the same thermal conditions as in the past (20, 25 and 30 C) in order that we could compare the results.

In all cases the maximum performance was found in the duodenum and in a much lower level in the stomach. The intestine activity was close to zero. The higher performance was observed in the case of 30 C and the lower at 20 C.

This work was supported by grants from the General Secretariat for Research & Technology (PENED 99, project no 231/99ED) and by the Special Research Account of University of Athens

ΑΕΙΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΤΙΣ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΟΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ: Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ Ε.Θ.Π.Ζ.

Τογρίδου, Α.Σ. και Ι.Δ. Παντής

Τομέας Οικολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Π.Τ.Θ. 119,
Τ.Κ. 54124, Θεσσαλονίκη

Το εθνικό Θαλάσσιο Πάρκο Ζακύνθου έχει ως σκοπό τη διαφύλαξη της φυσικής κληρονομιάς και της οικολογικής ισορροπίας της θαλάσσιας και παράκτιας περιοχής, με παράλληλη ανάπτυξη δραστηριοτήτων που εναρμονίζονται με την προστασία της φύσης και του τοπίου.

Οι βασικότερες ανθρώπινες δραστηριότητες στο Ε.Θ.Π.Ζ. αφορούν α) στον τουρισμό, αφού η Ζάκυνθος εμφανίζει περίπου 400.000 αφίξεις τουριστών ετησίως μέσω πτήσεων charters και β) στην γεωργία μια και οι γεωργικές δραστηριότητες πραγματοποιούνται με τυπικές μεθόδους όπως η χρήση λιπασμάτων και ζιζανιοκτόνων, με επιπτώσεις στην λεκάνη απορροής του Κόλπου.

Εξαιτίας των προβλημάτων που προκύπτουν από τις τουριστικές και γεωργικές δραστηριότητες σχεδιάστηκε ολοκληρωμένο πρόγραμμα αειφορικής ανάπτυξης. Στόχος του είναι η ανάπτυξη δραστηριοτήτων με αειφορικά χαρακτηριστικά που αφορούν στην εφαρμογή εναλλακτικών τουριστικών και γεωργικών πρακτικών με οφέλη για την κοινωνία, το περιβάλλον και την οικονομία.

Η τοπική κοινωνία ωφελείται με την ανάδειξη της τοπικής ιδιαιτερότητας του φυσικού περιβάλλοντος και των παραδοσιακών προϊόντων και την ενίσχυση της ανταγωνιστικότητας των αγροτικών προϊόντων της περιοχής.

Η οικονομία ωφελείται με την πιστοποίηση της φιλικότητας ως προς το περιβάλλον των υπαρχόντων τουριστικών μονάδων και των παραγόμενων προϊόντων.

Το Περιβάλλον προστατεύεται με την ευαισθητοποίηση των πολιτών και την διαφύλαξη των παραλιών ωτοκίας, της ορνιθοπανίδας, των οικοτόπων και των αλιευτικών πόρων.

SUSTAINABLE DEVELOPMENT IN PROTECTED AREAS: THE CASE OF NATIONAL MARINE PARK OF ZAKYNTHOS

Togridou, A.S., and J.D. Pantis

Department of Ecology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, U.P.B. 119,
54124 Thessaloniki, Greece

National Marine Park of Zakynthos aims to preserve the natural inheritance and the ecological balance of the marine and the coastal region with the development of activities in accordance with the protection of the nature and the landscape.

There are two basic human activities in N.M.P. of Zakynthos:

- Tourism since Zakynthos has 400.000 tourists arrivals annually with charter flies.
- Agriculture. In the agricultural activities fertilizers and pesticides are used with negative impact.

Due to the problems that arise from agricultural and tourist activities an integrated program of sustainable development was established. It aims to develop activities with sustainable characteristics for alternative touristic and agricultural practices with benefits for society, environment and economy.

Local community benefits from the promotion of the local natural environment, the traditional and agricultural products.

The economy benefits from certifying local touristical infrastructure and agricultural products as environmental friendly.

The environment is protected by increasing public awareness and preserving nesting sites, avifauna, the local habitats and fishing resources.

ANOBASE: ΜΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *ANOPHELES*

Τοπάλης, Π.¹, Κουτσός, Αν.^{1,2}, Λούης, Χ.^{1,2}

¹IMBB-ITE, Βασιλικά Βουτών, P.O. Box 1527, Ηράκλειο Κρήτης

²Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης Βασιλικά Βουτών, P.O.Box 2208, Ηράκλειο Κρήτης

Η βάση δεδομένων AnoBase (<http://www.anodb.gr>) είναι μια βάση δεδομένων που περιέχει βιολογικές και κυρίως γενετικές και γονιδιωματικές πληροφορίες σχετιζόμενες με τα κουνούπια του γένους *Anopheles*. Μέχρι σήμερα, με το όνομα AnoDB συντηρείτο τόσο σε μορφή απλών αρχείων κειμένου όσο και σε μορφή AceDB, ενώ ήδη μεταφέρεται σε μια σχεσιακή βάση δεδομένων (MySQL). Η πρόσβαση των χρηστών γίνεται μέσω του παγκόσμιου ιστού. Τα περιεχόμενα της AnoBase περιλαμβάνουν βιβλιογραφικά δεδομένα, πληροφορίες σχετικές με τις γνωστές ως σήμερα νουκλεοτιδικές και πρωτεϊνικές αλληλουχίες, μικροδορυφορικούς και RAPD δείκτες κ.α.. Επίσης περιλαμβάνονται κυτταρογενετικά δεδομένα και χάρτες με βάση *in situ* υβριδοποιήσεις στα πολυταινικά χρωμοσώματα του *Anopheles gambiae*. Με την ολοκλήρωση της ταυτοποίησης του γονιδιώματος του τελευταίου μια πληθώρα πρόσθετων δεδομένων θα προστεθούν όπως ονόματα γονιδίων, περιγραφή αλληλομόρφων (με φαινότυπους), περιγραφή των μεταθετών στοιχείων, πληροφορίες σχετικές με πληθυσμιακές μελέτες. Τέλος, παρέχεται η δυνατότητα σύγκρισης αλληλουχιών με αυτές του κουνουπιού με την βοήθεια του προγράμματος BLAST.

ANOBASE: AN ANOPHELES DATABASE

Topalis P.¹, Koutsos A.^{1,2}, Louis C.^{1,2}

¹IMBB-FORTH, Vassilika Vouton, P.O. Box 1527, Heraklion Crete

²Dep. of Biology, University of Crete, Vassilika Vouton, P.O. Box 2208, Heraklion Crete

AnoBase is a comprehensive database of genetic and molecular data concerning *Anopheles* sp. Until today AnoBase has been made available as html documents and flat files as well as AceDB-maintained database. Transfer of AnoBase into a relational database (MySQL) is in progress. End users have access to the database via WWW. The scope of AnoBase includes: bibliographical data, pointers to the currently available sequence data, microsatellite and RAPD markers, cytogenetical data and maps. After completion of the *Anopheles gambiae* genome project a plethora of data will be included such as gene names, transposons and populational biology data. Finally, local BLAST searches to the *Anopheles* sequences will be possible.

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

Τριανταφυλλίδης Κ.

Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΑΠΘ

Η κλωνοποίηση αναφέρεται σε πολλά και διαφορετικά φαινόμενα και πειραματικά πρωτόκολλα:

1. Στην **κλωνοποίηση γονιδίων**.
2. Στην **παραγωγή αντιγράφων ζώων** υψηλής γενετικής αξίας. Έστω λοιπόν πως υπάρχει ή μπορεί να δημιουργηθεί αγελάδα με υπεραποδόσεις παραγωγής γάλακτος. Επειδή υπάρχει κίνδυνος να χαθεί ο συνδυασμός των γονιδίων που επιτρέπουν αυτές τις υψηλές αποδόσεις στην λοταρία της αναπαραγωγής, η παραγωγή πιστών αντιγράφων με **κλωνοποίηση θα επιτρέψει τη δημιουργία αγέλης για υψηλούς παραγωγικούς στόχους**.
3. Στην **κλωνοποίηση γενετικώς τροποποιημένων ζώων** ώστε να παραχθούν ουσίες για **θεραπευτικούς σκοπούς**.
4. Στην **κλωνοποίηση γενετικώς τροποποιημένων ζώων** ώστε να παραχθούν ζώα των οποίων ιστοί ή όργανα θα χρησιμοποιηθούν για **ξеноμεταμοσχεύσεις** χωρίς να υπάρχει ο κίνδυνος απόρριψής τους από τους δέκτες-ασθενείς.
5. Στη **θεραπευτική κλωνοποίηση**, με απώτερο στόχο να επιδιορθωθούν οι βλάβες στο σώμα ασθενούς με κύτταρα, ιστούς ή όργανα που ταιριάζουν απόλυτα με τα δικά του. Για τον σκοπό αυτό, παίρνονται κύτταρα από τον ασθενή, μεταφέρεται ο πυρήνας κάθε κυττάρου σε απύρρηνο ωάριο και δημιουργείται κλωνοποιημένο έμβρυο. Ύστερα από λίγες ημέρες διακόπτεται η ανάπτυξή του και παίρνονται τα εμβρυακά βλαστοκύτταρα, που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε ιστό ή όργανο του σώματος. Εναλλακτικά, απομονώνονται από το σώμα ενήλικων ατόμων **πολυδύναμα εμβρυονικά στελεχοκύτταρα**. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να μετατραπούν σε **ολοδύναμα στελεχοκύτταρα**, και χωρίς τη δημιουργία εμβρύου να διεγερθούν ώστε να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε ιστό του σώματος.
6. Στην **αναπαραγωγική κλωνοποίηση**, ώστε να προκύψει άτομο το οποίο θα είναι αντίγραφο ενός ενήλικου.

Στην εισήγηση θα παρουσιαστούν οι λόγοι για τους οποίους δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί η αναπαραγωγική κλωνοποίηση στον άνθρωπο, ενώ αντίθετα, το γιατί πρέπει να χρηματοδοτηθεί και να ενθαρρυνθεί η έρευνα στη θεραπευτική κλωνοποίηση.

ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ ΖΩΙΚΟΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ: ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Τριανταφυλλίδης Κ.

**Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα
Βιολογίας ΑΠΘ, 54124 Θεσσαλονίκη**

Μέχρι το 1990 οι Γ.Τ. τροφές έφθαναν στην κατανάλωση χωρίς να απαιτείται ο προηγούμενος έλεγχος για την ασφάλειά τους. Το 1991 όμως ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας και ο Οργανισμός Γεωργίας και Τροφών πρότεινε εργαστηριακά πρωτόκολλα με τα οποία θα ελεγχόταν η ασφάλεια των τροφών που προέκυπταν από τις νέες μεθοδολογίες της γενετικής μηχανικής. Την ίδια χρονική περίοδο, η Ευρωπαϊκή Ένωση θέσπισε σειρά αναλυτικών εξετάσεων στα ίδια προϊόντα, όπως χημική ανάλυση της σύστασής τους, ελέγχους τοξικότητας, ανοσολογικών ιδιοτήτων και πιθανής καρκινογόνου και αλλεργιογόνου δράσης.

Στην Ελλάδα οι κρατικοί έλεγχοι είναι μάλλον περιορισμένοι. Ως εκ τούτου δεν υπάρχει εγγύηση ότι Γ.Τ. προϊόντα δεν φτάνουν στο τραπέζι μας και δεν εισέρχονται στη διατροφική αλυσίδα μας με άγνωστες συνέπειες για την υγεία μας. Οι καταναλωτές απαιτούν να ενημερωθούν για την καλλιέργεια και κατανάλωση γενετικώς τροποποιημένων προϊόντων και τις πιθανές επιπτώσεις στην υγεία και στο περιβάλλον. Η επιστημονική κοινότητα θεωρεί τα τρόφιμα που προκύπτουν από διαγενετικά ζώα ασφαλή. Η εισαγωγή τους στην εμπορία και την κατανάλωση, ωστόσο, απαιτεί ότι η ασφάλειά τους έχει ελεγχθεί πλήρως και τεκμηριωθεί. Πολλοί καταναλωτές πιστεύουν ότι οι κανονισμοί που πρέπει να διέπουν την καλλιέργεια και την εμπορία των Γ.Τ. προϊόντων θα πρέπει να τείνουν προς τον μηδενικό κίνδυνο.

Άλλα ερωτήματα των καταναλωτών είναι τα ακόλουθα: α) Μήπως η κατανάλωση από τα ζώα Γ.Τ. τροφών έχει ως αποτέλεσμα αρχικά δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία τους και έπειτα μεγάλο ποσοστό προϊόντων ζωικής προέλευσης να περιέχουν Γ.Τ. συστατικά; β) Ποια μέτρα μπορούν να ληφθούν για να μειωθούν οι κίνδυνοι από την εξάπλωση διαγενετικών ζωικών οργανισμών; Τα παραδείγματα αυτά δείχνουν ότι είναι καιρός να υπάρξει διεθνής εναρμόνιση της νομοθεσίας που θα διέπει τα Γ.Τ. προϊόντα. Η νομοθεσία αυτή μόνο πλεονεκτήματα θα παρέχει στους βιομηχάνους, τους γεωργούς, τους εμπόρους και τέλος, τους καταναλωτές.

ΚΡΥΟ-ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΑΝΟΣΟΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ: Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ Tokuyasu

Τρουγκάκος, Ι.Π.¹, και Λ.Χ. Μαργαρίτης²

¹Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών & Βιοτεχνολογίας, Εργ. Μοριακής-Κυτταρικής Γήρανσης, 116 35 Αθήνα

²Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη 157 84 Αθήνα

Οι σύγχρονες μέθοδοι της ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας διακρίνονται κατά κύριο λόγο σε αυτές του pre-embedding και σε αυτές του post-embedding. Στη πρώτη περίπτωση η σήμανση του αντιγόνου με το ειδικό αντίσωμα γίνεται πριν από την έγκλειση του ιστού σε κάποιο μέσο πολυμερισμού (συνήθως ρητίνη), ενώ στη δεύτερη περίπτωση η σήμανση γίνεται σε λεπτές τομές του ήδη εγκλεισμένου ιστού. Πέρα από τα επιμέρους ειδικότερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που χαρακτηρίζουν κάθε κατηγορία, το βασικό μειονέκτημα των μεθόδων pre-embedding αφορά τη διάνοιξη του ιστού πριν την ανοσοσήμανση που μπορεί να καταστρέψει σημαντικά τη δομή των κυττάρων, ενώ στην περίπτωση του post-embedding η έγκλειση του ιστού στο μέσο πολυμερισμού επηρεάζει σημαντικά την πρόσβαση του αντισώματος στο αντιγόνο. Οι τεχνικές ανοσοσήμανσης κρουτομών για ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (και ειδικότερα η μέθοδος των τηγμένων κρουτομών του Tokuyasu) παρακάμπτουν αυτά τα προβλήματα, αφού εκτός από μια αρχική ήπια μονιμοποίηση ο ιστός επεξεργάζεται τόσο κατά τη διάρκεια λήψης των τομών όσο και κατά τη διάρκεια της ανοσοσήμανσης απουσία περαιτέρω χημικών τροποποιήσεων. Η μέθοδος περιλαμβάνει ήπια μονιμοποίηση του ιστού, ψύξη του ιστού και λήψη τομών σε θερμοκρασία υγρού αζώτου και τελικά ανοσοσήμανση των τομών σε θερμοκρασία δωματίου. Η τελική διαφορική χρώση του ιστού με βαριά μέταλλα και η έγκλειση των κρουτομών σε μεθυλική-κυτταρίνη (βελτιώσεις της μεθόδου από τον Tokuyasu), επιτρέπουν την ικανοποιητική διατήρηση της λεπτής δομής που συνδυάζεται με εξαιρετικές δυνατότητες και αναλυτική ικανότητα όσον αφορά την ανοσοσήμανση κυτταρικών αντιγόνων.

CRYO-TECHNIQUES FOR IMMUNOELECTRON MICROSCOPY: THE Tokuyasu THAWED CRYO-SECTION TECHNIQUE

Trougakos, I.P.¹, and L.H. Margaritis²

¹National Hellenic Research Foundation, Institute of Biological Research & Biotechnology, Lab. of Molecular-Cellular Aging, 116 35 Athens

² Department of Cell Biology & Biophysics, Faculty of Biology, School of Sciences, University of Athens, Panepistimiopolis 157 84 Athens - Greece

The currently applied methods for immunoelectron microscopy can be grossly classified into two main categories. To those termed as the pre-embedding methods and to the post-embedding methods. In the former case the antigen is immunostained prior to tissue embedding in a specific medium (usually a resin), while in the later case the antigen is immunolocalized on thin tissue sections of a previously embedded tissue. Beyond the specific advantages or disadvantages that characterize each of these two immunoelectron microscopy versions, the major disadvantage of the pre-embedding methods refer to the necessity of permeabilizing the tissue before immunostaining that may result in fine structure destruction; on the other hand during post-embedding immunostaining the antibody-antigen interaction might be inhibited due to the existence of resin where the tissue has been embedded. The recent development of cryo-techniques for immunoelectron microscopy and particularly the thawed cryosection technique of Tokuyasu can bypass these problems since apart from a mild fixation no other chemical modifications interfere with the tissue antigenicity. The method includes an initial fixation step that is followed by tissue vitrification and sectioning at a liquid nitrogen temperature. Immunostaining of the cryosections is done at room temperature and is followed by uranyl acetate staining and cryosection embedding in methyl-cellulose (modifications introduced by Tokuyasu). The technique provides excellent tissue structure preservation and high sensitivity that allows immunolocalization of rare cellular antigens.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΝΕΩΝ ΜΥΚΟΠΑΡΑΣΙΤΩΝ ΤΩΝ ΣΚΛΗΡΩΤΙΩΝ: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

Τσαπικούνης Φ. και Χ. Χριστιάς

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Ρίο, Πάτρα

Τα μυκοπαράσιτα είναι μύκητες που παρασιτούν φυτοπαθογόνους μύκητες με αποτέλεσμα την μείωση του μολυσματικού δυναμικού των τελευταίων. Για την απομόνωση τους είναι απαραίτητες ειδικές τεχνικές, τέσσερες από τις οποίες αξιολογήθηκαν στη παρούσα μελέτη.

Την διετία 2000-2001 συλλέχθηκαν από την Κρήτη, Πελοπόννησο και Βόρεια Ελλάδα 83 δείγματα εδάφους από βιολογικές καλλιέργειες λαχανικών. Από τα δείγματα αυτά απομονώθηκε ένας μεγάλος αριθμός μυκοπαρασίτων, πολλά από τα οποία έδειξαν μεγάλη παρασιτική δράση εναντίον των σκληρωτίων του φυτοπαθογόνου μύκητα *Sclerotinia sclerotium*.

Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των νέων μυκοπαρασίτων είναι οι ακόλουθες: (1) Διπλό σύστημα μυκοπαρασίτου-ξεμιστή σε αντικειμενοφόρους πλάκες, (2) το ίδιο σύστημα σε άγαρ ύδατος (Water Agar) με την χρήση σκληρωτίων-παγίδων, (3) επίταση σκληρωτίων με σπόρια των μυκοπαρασίτων και (4) Εμβάπτιση σκληρωτίων σε αιώρημα σπορίων και επώαση σε WA ή χύμα.

Από τις παραπάνω τεχνικές επιλέχθηκε η δεύτερη σαν η πιο γρήγορη, απλή και αξιόπιστη. Με την μέθοδο αυτή αξιολογήθηκαν όλα τα στελέχη των νέων μυκοπαρασίτων που απομονώθηκαν άμεσα από τα δείγματα χύματος. Είκοσι από αυτά επιλέχθηκαν για παραπέρα μελέτη γιατί έδειξαν πολύ μεγάλη μυκοπαρασιτική δράση στα σκληρώτια του φυτοπαθογόνου μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*.

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα στελέχη αυτά των νέων μυκοπαρασίτων που απομονώθηκαν σε καθαρές καλλιέργειες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προγράμματα ολοκληρωμένης καταπολέμησης των σκληρωτιογόνων φυτοπαθογόνων μυκήτων και να μειώσουν αντίστοιχα την χρήση μυκητοκτόνων. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα των νέων μυκοπαρασίτων είναι ότι είναι εγγενή στελέχη και γι' αυτό τον λόγο άριστα προσαρμοσμένα στο Ελληνικό περιβάλλον.

EVALUATION OF NEW MYCOPARASITES: COMPARATIVE STUDY OF ISOLATION TECHNIQUES

Tsapikounis, Th., and Chr. Christias

Department of Biology, University of Patras, 26500 RION

Mycoparasites are fungi which attack and parasitise other fungi, including plant pathogenic ones, thus reducing the inoculum potential of the latter in the field. Special techniques are required for the isolation of mycoparasites, four of which were evaluated in this study.

During the years 2000-2001, 83 soil samples were collected from Crete, Peloponnese and Northern Greece from vegetable fields which had not received chemical biocides. From these soil samples more than 200 strains of mycoparasites were isolated, many of which proved to be very aggressive mycoparasites against sclerotia of the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*.

The techniques which were used for the evaluation of the new mycoparasites were: (1) A double system including mycoparasite-host on glass slides, (2) the same mycoparasite-host system on water agar (WA) using sclerotia of *S. sclerotiorum* as baits, (3) Dusting of sclerotia with spores of the candidate mycoparasite, and (4) dipping sclerotia into a spore suspension and subsequent incubation either in water agar or soil.

The second technique was selected of the four mentioned above because it was simple, fast and reliable. All isolated strains of candidate mycoparasites were evaluated using this technique and 20 were selected as the most effective ones in parasitising and destroying sclerotia of *S. sclerotiorum*.

The results obtained hitherto showed that the new strains of sclerotial mycoparasites isolated in pure culture which exhibited great aggressiveness against sclerotia of *S. sclerotiorum* can be used in integrated programs for the control of *S. sclerotiorum* and other sclerotium forming fungi with a concomitant decrease in the use of chemical fungicides. An additional advantage of these new isolated mycoparasites is the fact that they are endemic strains and therefore perfectly adapted to the country's environmental conditions.

ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΚΥΡΙΟ ΛΟΓΟ ΣΤΑ ΡΟΔΟΦΥΚΗ

Τσέκος Ι.

Εργαστήριο Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας Α.Π.Θ., 54 124 Θεσσαλονίκη

Με τον όρο φωτοσύνθεση χαρακτηρίζεται η μετατροπή της ακτινοβόλου ενεργείας σε ελεύθερη χημική ενέργεια, η οποία συντελείται μέσα στα πράσινα φυτικά κύτταρα. Στη διαδικασία αυτή οξειδούται το νερό, οπότε απελευθερώνεται O_2 , το οποίο προκαλεί αναγωγή του CO_2 σε οργανικές χημικές ενώσεις, κατά κύριο λόγο υδατάνθρακες. Το πλέον αξιοπρόσεκτο στοιχείο της δομής του χλωροπλάστη είναι το εκτεταμένο σύστημα των εσωτερικών μεμβρανών, που είναι γνωστές ως **θυλακοειδή**. Όλη η χλωροφύλλη περιέχεται μέσα σε αυτό το μεμβρανικό σύστημα, που είναι η θέση των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσυνθέσεως (**αντιδράσεις στα θυλακοειδή**). Οι αντιδράσεις αναγωγής (ενσωμάτωσης) του άνθρακα (**αντιδράσεις ενσωματώσεως του άνθρακα**), οι οποίες καταλύονται από υδατοδιαλυτά ένζυμα, πραγματοποιούνται στο **στρώμα**, την περιοχή του χλωροπλάστη έξω από τα θυλακοειδή. Στις μεμβράνες των θυλακοειδών εντοπίζονται λειτουργικά αθροίσματα ή σύμπλοκα φωτοσυλλογής που ονομάζονται **φωτοσυνθετικές μονάδες**. Οι φωτοσυνθετικές μονάδες περιέχουν μόρια χλωροφύλλης, φωτοχημικά ενεργά, τα λεγόμενα **κέντρα αντιδράσεως** και μόρια χλωροφύλλης φωτοχημικά ανενεργά γνωστά ως **μόρια-αντέννες**.

Τα πράσινα φυτά και μερικά φωτοσυνθετικά βακτήρια έχουν δύο κέντρα αντιδράσεως, το **φωτοσύστημα I** και το **φωτοσύστημα II**, τα οποία λειτουργούν σε σειρά, συνδεδεμένα με μίαν αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Τα δύο φωτοσυστήματα είναι χωρισμένα στο χώρο: Το φωτοσύστημα I (μέγιστο απορρόφησης στα 700 nm) απαντάται αποκλειστικά στα μη σχηματίζοντα συστοιχίες θυλακοειδή του στρώματος, το φωτοσύστημα II (μέγιστο απορρόφησης στα 680 nm) σχεδόν αποκλειστικά στα θυλακοειδή των grana. Τα φωτοσυστήματα II και I πραγματοποιούν μία μη κυκλική μεταφορά ηλεκτρονίων, οξειδώνουν H_2O προς μοριακό O_2 και ανάγουν το $NADP^+$ σε $NADPH$.

Οι χημικές ενώσεις $NADPH$ και ATP που σχηματίζονται από τις φωτεινές αντιδράσεις των θυλακοειδών μεμβρανών παρέχουν την ενέργεια για την αναγωγή του άνθρακα (κύκλος Calvin).

Οι φωτοσυνθετικοί ευκαρυωτικοί οργανισμοί ανάγουν το CO_2 διαμέσου του κύκλου Calvin, που λαμβάνει χώρα στο στρώμα, ή στη διαλυτή φάση, των χλωροπλάστων. Ο κύκλος Calvin καταναλίσκει δύο μόρια του $NADPH$ και τρία μόρια του ATP για κάθε ένα ενσωματούμενο μόριο CO_2 . Εδώ, CO_2 και H_2O συνδυάζονται με την 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη για να σχηματίσουν δύο μόρια 3-φωσφογλυκεριναλδεΐδης, τα οποία ανάγονται και μετατρέπονται σε υδατάνθρακα.

Τα πλαστίδια των φωτοαυτοτρόφων Ροδοφυκών (Rhodophyta) διασχίζονται από μεμονωμένα θυλακοειδή, τα οποία φέρουν επάνω στην επιφάνειά τους, υδατοδιαλυτές σύμπλοκες μονάδες φωτοσυλλογής (σαν σημαίες), τα **φυκοβιλισώματα**. Τα φυκοβιλισώματα είναι συζευγμένα μόνο με το φωτοσύστημα II και περιέχουν τις φυκοβιλιπρωτεΐνες καθώς και πολυπεπτίδια πρόσδεσης· αυτά δεν συνδέουν τις χρωστικές και θα πρέπει να συμμετέχουν στην πρόσδεση φυκοβιλισωμάτων με το φωτοσύστημα II.

Η χλωροφύλλη *a* και τα καρτενοειδή περιορίζονται μέσα στις μεμβράνες· η χλωροφύλλη *b* δεν εμφανίζεται σε αυτά τα φύκη. Οι φυκοβιλιπρωτεΐνες είναι σύμπλοκα που περιέχουν διατάξεις φυκοβιλινών συζευγμένων με ειδικές πρωτεΐνες. Δύο πρωτεϊνικές υπομονάδες (α και β) είναι η καθεμία συζευγμένη ομοιοπολικά σε μόρια βιλιχρωστικών (φυκοερυθροβιλίνης, φυκοκυανοβιλίνης, ή αλλοφυκοκυανοβιλίνης). Οι φυκοβιλιπρωτεΐνες μπορούν να διαφοροποιηθούν στη βάση των ιδιοτήτων απορρόφησης: Η **φυκοερυθρίνη** (κόκκινη) απορροφά στην περιοχή από 450-570 nm, η **φυκοκυανίνη** (μπλε) από 590-610 nm και η **αλλοφυκοκυανίνη** (μπλε) από 650-670 nm. Κάθε φυκοβιλιπρωτεΐνη είναι οργανωμένη σε ραβδόμορφες δομές.

Φάσματα δράσεως δείχνουν ότι οι βιλιπρωτεΐνες πρέπει να θεωρηθούν ως περιφερειακές χρωστικές αντεννών των χρωστικών αθροισμάτων (σμπλόκων) φωτοσυλλογής στα Ροδοφύκη. Οι χρωμοφόρες ομάδες των μεμονωμένων μορίων αποτίθενται στα φυκοβιλισώματα τόσο πυκνά μεταξύ τους, έτσι ώστε να μπορεί να λάβει χώρα μία αποτελεσματική μεταφορά ενεργείας (> 80% απόδοση) στην κατεύθυνση φυκοερυθρίνη \rightarrow φυκοκυανίνη \rightarrow αλλοφυκοκυανίνη. Η συλληφθείσα κβαντική ενέργεια διαμέσου των βιλιπρωτεϊνών μεταφέρεται προς το κέντρο αντιδράσεως του φωτοσυστήματος II. Αντίθετα, το φωτοσύστημα I συνίσταται από χλωροφύλλη *a* και καρτενοειδή.

STRUCTURE AND FUNCTION OF PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF THE PLANTS AND MAINLY OF RHODOPHYTA

Tsekos I.

Institute of Botany, Aristotle University of Thessaloniki, GR-54 124 Thessaloniki

The term photosynthesis means the conversion of solar activity to free chemical energy, which occurs in green plants. In photosynthesis, the plant uses solar energy to oxidize water, thereby releasing O₂, and to reduce CO₂ into organic compounds, primarily carbohydrates.

The most striking aspect of the structure of the chloroplast is the extensive system of internal membranes known as **thylakoids**. Chlorophyll is contained within this membrane system, which is the site of the light reaction of photosynthesis (**thylakoid reactions**). Carbon reduction reactions (**carbon fixation reactions**) catalyzed by water-soluble, take place in the **stroma**, the region of the chloroplast outside the thylakoids. Light is absorbed mainly in the **antenna complexes**, which comprise of chlorophylls, accessory pigments, and proteins and are located at the thylakoid membranes of the chloroplast. Photosynthetic antenna pigments transfer the energy to a specialized chlorophyll-protein complex known as a **reaction center**. The reaction center contains multiple-subunit complexes and hundreds, or in some organisms, thousands of chlorophylls. The antenna complexes and the reaction centers are integral components of the thylakoid membrane.

The green plants and some photosynthetic prokaryotes have two reaction centers, photosystem I and photosystem II, that function in series bound with an electron transport chain. The two photosystems are spatially separated: Photosystem I (absorption maximum at 700 nm) is found exclusively in the non-stacked stroma membranes, photosystem II (absorption maximum at 680 nm) largely in the stacked grana membranes. Photosystems II and I carry out noncyclic electron transport, oxidize water to molecular oxygen, and reduce NADP⁺ to NADPH.

A portion of the energy of photons is also initially stored as chemical potential energy, largely in the form of a pH difference across the thylakoid membrane. This energy is quickly converted into chemical energy during ATP formation by action of an enzyme complex known as the ATP synthase. NADPH and ATP formed by the light reactions provide the energy for carbon reduction (Calvin cycle).

Photosynthetic eukaryotes reduce CO₂ via the Calvin cycle that takes place in the stroma, or soluble phase, of chloroplasts. Here, CO₂, and H₂O are combined with ribulose-1,5-bisphosphate to form two molecules of 3-phosphoglycerate, which are reduced and converted to carbohydrate.

The plastids of photoautotrophic Rhodophyta are transversed by single thylakoids, which like funs bear on their surface water-soluble complex light-harvesting units known as **phycobilisomes**. Phycobilisomes are associated only with photosystem II

and contain phycobiliproteins as well as linker polypeptides: they do not bind pigments and may be involved in the binding of phycobilisomes to photosystem II.

Chlorophyll *a* and carotenoids are confined within the membranes; chlorophyll *b* is not present in these algae. Phycobiliproteins are complexes containing arrays of phycobilins associated with specific proteins. Two protein subunits (*a* and *b*) are each bound covalently to molecules of bilin pigment (phycoerythrobilin, phycocyanobilin, or allophycocyanobilin). Phycobiliproteins can be differentiated on the basis of their absorbance properties: **Phycoerythrin** (red) absorbs in the 450-570 nm region, **phycocyanin** (blue) in 590-610 nm and **allophycocyanin** (blue) in 650-670 nm. Each phycobiliprotein is organized into rod-like structures.

Action spectra show that biliproteins should be regarded as peripheral antenna pigments of light-harvesting pigment complexes in red algae. O₁ chromatophore groups of isolated molecules are so closely deposited in the phycobilisomes that an effective transport of energy (> 80 yield) in the direction phycoerythrin → phycocyanin → allophycocyanin can take place. The captured quantum energy is transported through biliproteins towards the reaction center of photosystem II. On the contrary, photosystem I is comprised of chlorophyll *a* and carotenoids.

ΛΕΠΤΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΚΑΡΠΟΣΠΟΡΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟ ΡΟΔΟΦΥΚΟΣ *Porphyra leucosticta*

Τσέκος Ι. και Σ.Γ. Δεληβόπουλος

Εργαστήριο Βοτανικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, GR-54 124 Θεσσαλονίκη,
Μακεδονία, Ελλάδα

Μελετήθηκε η λεπτή δομή της καρποσποριογένεσης στο ροδοφύκος *Porphyra leucosticta*. Η καρποσποριογένεση πραγματοποιείται διαμέσου τριών αναπτυξιακών σταδίων. Η πρώτη περικλινής διαίρεση του γονιμοποιημένου καρπογονίου καταλήγει στο σχηματισμό δύο πολύ νεαρών καρποσπορίων. Κάθε νερό καρποσπόριο διαθέτει έναν πυρήνα και ένα μεγάλο έλλοβο πλαστίδιο με πυρηνοειδές, που είναι τοποθετημένο στο κέντρο του καρποσπορίου. Συγκεντρικοί μεμβρανικοί σχηματισμοί βρίσκονται κατανεμημένοι στο κυτόπλασμα. Οι σχηματισμοί αυτοί διαστέλλονται κατά τη διάρκεια της παραγωγής βλέννης μέσα στις μεμβράνες καταλήγοντας στο σχηματισμό βλεννώδων σάκων. Στη συνέχεια οι βλεννώδεις σάκοι αποβάλλουν το περιεχόμενό τους σηματοδοτώντας την έναρξη σχηματισμού του κυτταρικού τοιχώματος του καρποσπορίου. Επιπρόσθετο τοιχωματικό υλικό αποτίθεται από κυστίδια που προέρχονται από τα δικτυοσώματα. Προς το τέλος του σταδίου των νεαρών καρποσπορίων αρχίζει ο σχηματισμός των αμυλοκόκκων. Τα μέσης ηλικίας καρποσπόρια χαρακτηρίζονται από την παρουσία των ινώδων χυμοτοπίων. Τα ινώδη χυμοτόπια σχηματίζονται από τα «συνοδά οργανίδια των ινώδων χυμοτοπίων» και αποβάλλουν τελικά το περιεχόμενό τους. Τα ώριμα καρποσπόρια αναγνωρίζονται από την παρουσία πολυάριθμων εμπύρηνων κυστιδίων. Τα εμπύρηννα κυστίδια είτε ενσωματώνονται στα ινώδη χυμοτόπια είτε αποβάλλουν και αυτά το περιεχόμενό τους. Επίσης, ο αριθμός των αμυλοκόκκων ελαττώνεται βαθμιαία κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης του καρποσπορίου. Τα ώριμα καρποσπόρια παρουσιάζουν ένα μεγάλο χλωροπλάστη με πυρηνοειδές και καλοσχηματισμένα φυκοβιλισώματα, στερούνται όμως αμυλοκόκκων και περιβάλλονται από ένα δίστρωμο κυτταρικό τοίχωμα. Επιπρόσθετα, τα ώριμα καρποσπόρια καλύπτονται από εφυμενίδα που τα προφυλάσσει από τα βακτήρια.

ULTRASTRUCTURE OF CARPOSPOROGENESIS IN *Porphyra leucosticta* (RHODOPHYTA)

Tsekos, I., and S.G. Delivopoulos

Institute of Botany, Aristotle University of Thessaloniki, GR-54 124 Thessaloniki, Macedonia,
Greece

The ultrastructure of carposporogenesis for the red alga *Porphyra leucosticta* was studied. Carposporogenesis proceeds through three developmental stages. The first periclinal division of the fertilized carpogonium results in the production of two very young carpospores. The young carpospore possesses a nucleus and a large centrally-located, lobed plastid with pyrenoid. Concentric membrane structures are scattered throughout the cytoplasm. These structures dilate during mucilage production within the membranes resulting in the formation of mucilage sacs. Subsequently, the mucilage sacs release their contents to initiate the carpospore wall formation. In addition, wall material is deposited by dictyosome-derived vesicles. Meanwhile, formation of starch granules commences during the latter stages of young carpospores. Medium-aged carpospores are recognized by the presence of fibrous vacuoles. The fibrous vacuoles are formed from the "fibrous vacuole associated organelles" (FVAOs) and finally discharge their contents. Mature carpospores are characterized by the presence of copious, dictyosome-derived cored vesicles. The cored vesicles either are incorporated into the fibrous vacuoles or discharge their contents. The number of starch granules is gradually reduced during carpospore differentiation. Mature carpospores exhibit a large chloroplast with pyrenoid and well depicted phycobilisomes, are devoid of starch granules and are surrounded by a two-layered wall. In addition, a cuticle covers the mature carpospore protecting it from bacteria.

ΛΕΠΤΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΗΤΙΚΩΝ ΓΑΜΕΤΟΦΥΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΡΟΔΟΦΥΚΟΥΣ *Porphyra leucosticta* ΚΑΛΔΙΕΡΓΗΘΕΝΤΩΝ ΣΕ ΕΡΥΘΡΟ, ΜΠΛΕ ΚΑΙ ΠΡΑΣΙΝΟ ΦΩΣ

Τσέκος, Ι.¹, Xavier Niell, F.², Aguilera, J.², Figueroa, F.L.² και Σ.Γ. Δεληβόπουλος¹

¹Εργαστήριο Βοτανικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, GR-54 124, Θεσσαλονίκη, Μακεδονία, Ελλάδα. ²Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Malaga, E-29071 Malaga, Spain

Μελετήθηκε η λεπτή δομή των βλαστητικών γαμετοφυτικών κυττάρων του Ροδοφύκου *Porphyra leucosticta*, αναπτυσσομένων στο ερυθρό, μπλε και πράσινο φως τόσο σε υπέρλεπτες τομές όσο και σε εκμαγεία (replicas) ταχέως καταψυχθέντων κυττάρων. Η έντονη λειτουργική δραστηριότητα των δικτυοσωμάτων και ο σχηματισμός βλενωδών σάκκων έχουν ως αποτέλεσμα τη σημαντική ελάττωση της πρωτοπλασματικής περιοχής και το σχηματισμό παχύτερων τοιχωμάτων στα κύτταρα που αναπτύχθηκαν στο ερυθρό φως σε σύγκριση με εκείνα στο μπλε φως και στα δείγματα ελέγχου. Τα φυκοβιλισώματα είναι πολυάριθμα και καλοσχηματισμένα στο μπλε φως, ενώ δεν είναι καλά διαμορφωμένα στο ερυθρό και στο πράσινο φως. Επίσης, υπάρχουν πολλά φυκοβιλισώματα στα θυλακοειδή του πυρηνώδους (pyrenoid) στο μπλε φως, λιγότερα στο πράσινο και καθόλου στο κόκκινο φως και στα δείγματα ελέγχου. Η πρωτοπλασματική όψη (PF) των μεμβρανών των θυλακοειδών παρουσιάζει πολυάριθμα, πυκνά τοποθετημένα αλλά τυχαία κατανεμημένα σωματίδια. Το μέγεθος των σωματιδίων είναι ενιαίο και στους δύο τύπους των όψεων με μέση διάμετρο περίπου 11,5 nm. Στο μπλε φως τα φυκοβιλισώματα και τα σωματίδια της εξωπλασματικής όψης (EF) οργανώνονται σε σειρές με απόσταση 60-70 nm. Τα αποτελέσματα (μεταβολές: 1. στην πρωτοπλασματική περιοχή 2. στο διάστημα μεταξύ των θυλακοειδών 3. στη διάταξη των φυκοβιλισωμάτων 4. στη δομή, το σχήμα και το μέγεθος των φυκοβιλισωμάτων και 5. στη συσσώρευση των πλαστοσφαιριδίων) έδειξαν ότι το μονοχρωματικό φως (μπλε, ερυθρό και πράσινο) επιφέρει σημαντικές αλλαγές στο φαινόμενο διευθέτησης στο χώρο και κατά συνέπεια στην ικανότητα απορρόφησης του φωτός.

**ULTRASTRUCTURE OF THE VEGETATIVE GAMETO-
PHYTIC CELLS OF *Porphyra leucosticta* (RHODOPHYTA)
GROWN IN RED, BLUE AND GREEN LIGHT**

**Tsekos, I.¹, Xavier Niell, F.², Aguilera, J.², Figueroa, F.L.² and S.G.
Delivopoulos¹**

*Institute of Botany, Aristotle University of Thessaloniki, GR-54 124 Thessaloniki, Macedonia, Greece

**Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Malaga E-2907, Malaga, Spain

The ultrastructure of the vegetative gametophytic cells of *Porphyra leucosticta* grown in red, blue and green light both in ultrathin sections and in replicas of rapidly frozen cells was studied. Intense dictyosome activity and mucilage sacs result in an important decrease of the protoplasmic area and in the formation of thicker cell walls in red light in comparison to blue light and the control. Phycobilisomes are numerous and well formed in blue light, while they are not well formed in red and particularly in green light. Many phycobilisomes are present in the intrapyrenoidal thylakoids in blue light, fewer in green light but there are not in red light and in the control. The protoplasmic fracture face (PF) of thylakoid membrane exhibits copious, randomly distributed and tightly packed particles. These particles are uniform in the two types of fracture faces having an average diameter of approximately 11.5 nm. In blue light both the phycobilisomes and exoplasmic fracture face (EF) particles are organized into rows with a spacing of 60-70 nm. The ER appears to be active in red and particularly in blue light, while copious mitochondria are present in blue light. The results (changes 1. in the protoplasmic area; 2. in the spacing of the thylakoids; 3. in phycobilisome arrangement; 4. in the structure, shape and size of phycobilisomes and; 5. in the accumulation of plastoglobuli) reveal that the monochromatic light (blue, red and green) achieves significant changes in the package effect and consequently in the efficiency of light absorption.

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΟΔΟΝΤΙΚΗΣ ΜΥΛΗΣ ΠΡΟΪΣΤΟΡΙΚΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

Τσιλιβάκος, Μ., Μανώλης, Σ.Κ., Παπαγρηγοράκης, Μ.¹, και Κ. Ζαφειράτος

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

¹Τομέας Ορθοδοντικής, Τμήμα Οδοντιατρικό, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Μ. Ασίας 75,
Γουδί, Αθήνα.

Συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά της μύλης και της ρίζας των δοντιών προσφέρουν χρήσιμες πληροφορίες για τη διερεύνηση των γενετικών σχέσεων ανάμεσα σε ανθρώπινους πληθυσμούς με διαφορετικό χρονικό ή γεωγραφικό ορίζοντα. Η εργασία αυτή μελετά τη συχνότητα 10 χαρακτηριστικών της οδοντικής μύλης σε ένα προϊστορικό και ένα σύγχρονο δείγμα από την Ελλάδα. Ειδικότερα καταγράφονται οδοντικά χαρακτηριστικά σε 70 αρχαίες γνάθους (1600-200π.Χ) με μόνιμα δόντια και σε 70 εκμαγεία σύγχρονων Ελλήνων. Αναλυτικά τα οδοντικά χαρακτηριστικά που εξετάζονται είναι: το σχήμα φτυαριού (shovel-shape, double shovel shape) στη γλωσσική και τη χειλική επιφάνεια των άνω κεντρικών τομέων, το φύμα του Carabelli στους άνω πρώτους γομφίους, η γλωσσική αύλακα (**interproximal groove**) στους άνω πλάγιους τομείς, το οδόντωμα (**odontome**) στους άνω και κάτω πρώτους προγόμφιους, η απουσία του τέταρτου φύματος (**hypocone**) στους άνω δεύτερους γομφίους, η ύπαρξη πέμπτου φύματος (**metaconule**) στους άνω πρώτους γομφίους, επίσης πέμπτου φύματος (**hypoconulid**) στους κάτω πρώτους και δεύτερους γομφίους, το επιπλέον 6^ο και 7^ο φύμα στους κάτω πρώτους γομφίους και τέλος το μοντέλο του Δρυοπίθηκου (*Dryopithecus pattern*) στη μασητική επιφάνεια των κάτω δεύτερων γομφίων. Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν και αναλύθηκαν στατιστικά. Γενικά τα δύο πληθυσμιακά δείγματα παρουσίασαν ομοιογένεια ακολουθώντας τα τυπικά χαρακτηριστικά της ευρύτερης ζώνης που ονομάζεται Δυτική Ευρασία. Αξιοσημείωτη διαφορά σημειώθηκε σχετικά με τη συχνότητα του φύματος Carabelli και την απουσία του φύματος hypocone. Στο αρχαίο οδοντικό δείγμα παρατηρήθηκε πολύ μικρότερη συχνότητα του Carabelli και αντίστοιχα υψηλότερη συχνότητα γομφίων με τρία μόνο φύματα (απουσία του hypocone) σε σχέση με το σύγχρονο οδοντικό δείγμα.

Οι καταγραφές της παρούσας εργασίας αναλύθηκαν και έγινε συσχέτιση με στοιχεία από αντίστοιχες έρευνες σε προϊστορικούς και σύγχρονους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Αν και τα αποτελέσματα της πιλοτικής αυτής εργασίας αντιστοιχούν σε ένα μικρό σχετικά δείγμα, τα ευρήματα αποτελούν ερέθισμα για την έρευνα που βρίσκεται σε εξέλιξη και αφορά μεγαλύτερες αρχαιοστολογικές συλλογές και πολύ περισσότερα εκμαγεία ζώντων ανθρώπων.

COMPARATIVE ANALYSIS ON DENTAL CROWN TRAITS IN PREHISTORIC AND MODERN TEETH FROM HELLAS

**Tsilivakos, M.G, Manolis, S.K., Papagrigrakis, M.¹, and C.S.
Zafeiratos**

Dept of Animal & Human Physiology, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis,
157 84 Athens – Greece, E-mail: smanol@biol.uoa.gr

¹ Dept of Orthodontics, Faculty of Dentistry, University of Athens, M. Asias 75, Athens-Greece

Morphological features of the dental crown and roots provide valuable data for determining the genetic affinities and evolutionary adaptedness of human populations. This paper investigates the frequency of 10 dental crown traits in two samples of permanent teeth from the prehistoric and modern Greece. The material of this study consists of 70 ancient jaws with articulated permanent teeth from ancient Greeks (1600-200 BC) and respectively 70 dental casts from contemporary Greeks. Dental traits, such as shovel-shape and double shovel shape in upper central incisor, Carabelli's cusp in upper first molar, interproximal groove in upper second incisor, odontome in upper and lower first premolar, hypocone's absence in second upper molar, metaconule in upper first molar, hypoconulid in lower first and second molar, accessory 6th and 7th cusp in lower first molar as well as Dryopithecus pattern in lower second molar were observed and classified, and the results are given with statistical analysis. Generally, as the results show, both samples appear homogeneity following the typical characteristics of the major region Western Eurasia. Furthermore, notable differences were observed with respect to the incidence of the Carabelli's trait and the absence of hypocone cusp. Ancient molars showed lower frequency of Carabelli's cusp and higher incidence of hypocone's absence than the contemporary teeth.

The existing results are speculated and compared to other prehistoric and modern populations of Europe. Certainly, the results of this pilot study correspond with a small sample, but the existing findings are a stimulus for further research in larger skeletal collections and great number of dental casts.

ΡΥΘΜΙΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΟΥΣΙΑ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΤΩΝ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Τσιλιμπάρη, Ε.Κ.

Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Αγία Παρασκευή 153 10, Αθήνα

Τα κύτταρα αλληλεπιδρούν με το εξωκυττάριο στρώμα κυρίως διά μέσου των διμερών ιντεγκρινικών υποδοχέων, και επάγουν την μετάδοση μηνυμάτων με αποτέλεσμα τις εξειδικευμένες λειτουργίες τους (1). Τα τελευταία 15 χρόνια αποκρυσταλλώθηκαν πολλές λειτουργίες των ιντεγκρινών που σχετίζονται με την διασύνδεση τους με συστατικά του εξωκυτταρίου χώρου. Η ομάδα μας καθώς και ομάδες άλλων ερευνητών έχει περιγράψει τις αλληλεπιδράσεις διαφόρων κυτταρικών τύπων με το κολλαγόνο βασικής μεμβράνης / κολλαγόνο τύπου IV (tIV) (2-3). Περιγράψαμε την ύπαρξη στο tIV θέσεων διασύνδεσης με ιντεγκρίνες σε δύο αλληλουχίες της αλυσσού α1(IV), και την συμμετοχή διαφορετικών ιντεγκρινών στις δύο διαφορετικές αλληλουχίες. Έτσι, είναι προφανές ότι τα κύτταρα αλληλεπιδρούν με tIV με περισσότερα του ενός ιντεγκρινικά διμερή.

Οι ιντεγκρίνες ρυθμίζουν εν μέρει την γονιδιακή έκφραση πρωτεϊνών του εξωκυτταρίου χώρου, όπως π.χ. των αποδιατακτικών ενζύμων, κολλαγονασών (MMPs)/ματριξινών. Οι ιντεγκρίνες που ρυθμίζουν την έκφραση των MMPs διαφέρουν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (4, 5). Διαπιστώσαμε ότι η ιντεγκρίνη α3β1 επάγει την έκφραση και έκκριση της ματριξίνης MMP-2 σε νεφρικά σωληναριακά κύτταρα καθώς και σπειραματικά επιθηλιακά κύτταρα (ποδοκύτταρα), ενώ η ιντεγκρίνη ανβ3 αναστέλλει την έκφραση της ματριξίνης MMP-9 σε νεφρικά σωληναριακά κύτταρα.

Οι ιντεγκρινικοί υποδοχείς ρυθμίζουν πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες, και συνεπώς αλλαγές της έκφρασης ή λειτουργίας τους προκαλούν αλλοιώσεις κυτταρικής λειτουργίας. Ένα παράδειγμα νόσου που εμπλέκει τις ιντεγκρίνες αποτελεί ο Σακχαρώδης Διαβήτης και η Διαβητική Νεφροπάθεια, που αποτελεί συχνή επιπλοκή της νόσου. Έχουμε περιγράψει ότι, αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης οδηγούν σε τροποποίηση της έκφρασης ιντεγκρινών νεφρικών κυττάρων (6), που συνοδεύεται από ελαττωματικές αλληλεπιδράσεις με tIV, και μειωμένη έκφραση των MMPs.

Το αποτέλεσμα οδηγεί σε αύξηση του νεφρικού εξωκυτταρίου ιστού, όπως απαντάται σε διαβητικούς ασθενείς με νεφροπάθεια ή άλλες αγγειακές επιπλοκές. Τροποποίηση της έκφρασης ιντεγκρινών παρατηρήθηκε επίσης σε νεφρικές βιοψίες, καθώς και μονοκύτταρα διαβητικών ασθενών με νεφροπάθεια, ενισχύοντας την υπόθεση ότι η τροποποίηση αυτή πιθανόν οφείλεται σε γενετικά αίτια και θα μπορούσε να χρησιμεύσει για την ανάπτυξη μέσου πρόγνωσης των αγγειακών επιπλοκών του διαβήτη.

Η διασύνδεση ιντεγκρινών με συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας οδηγεί την κυτταρική προσκόλληση, τη συνάθροιση ιντεγκρινών, τον σχηματισμό των εστιακών επαφών, και την κυτταρική πλάτυνση (1). Διαπιστώσαμε ότι η προσκολλητική ιδιότητα των ιντεγκρινών αναστέλλεται από την ποδοκαλκίνη, μια σιαλοπρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας που επάγεται από την λαμίνη. Η παρουσία της ποδοκαλκίνης στα νεφρικά σπειραματικά επιθηλιακά κύτταρα (ποδοκύτταρα) θεωρείται ότι σχετίζεται με το σχηματισμό ή την διατήρηση των ποδοειδών προσεκβολών, που αποτελούν εξειδικεύσεις της βασικής επιφάνειας αυτών των κυττάρων (7). Τα δεδομένα μας ενισχύουν την υπόθεση ότι η έκφραση της ποδοκαλκίνης σε συγκεκριμένες περιοχές της βασικής επιφάνειας των ποδοκυττάρων αναστέλλει την ιντεγκρινο-εξαρτώμενη διασύνδεση με το υπόστρωμα, και προκαλεί έτσι κυτταρικές υπεργέρσεις κατά τόπους, και τον σχηματισμό ποδοειδών προσεκβολών της βασικής επιφάνειας.

Συνοψίζοντας, οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις με το εξωκυττάριο στρώμα εκκινούν αποκρίσεις που δρουν σε συνέργεια, ώστε να εξασφαλίζεται η φυσιολογική κυτταρική λειτουργία. Πληρέστερη κατανόηση αυτών των αλληλεπιδράσεων θα συντελέσει στην εξεύρεση μέσων ελέγχου της κυτταρικής λειτουργίας σε περιπτώσεις διαταραχής της, όπως σε νοσήματα στα οποία ενέχεται η εξωκυττάρια ουσία.

REGULATION OF MATRIX-RELATED CELL INTERACTIONS BY INTEGRIN RECEPTORS

Effie C. Tsilibary

Institute of Biology, National Center for Scientific Research Demokritos, Agia Paraskevi 153 10, Athens, Greece

Cells interact with components of the matrix mainly via the dimeric integrin receptors to transduce signals to the cell interior, and perform specialized functions (1). During the last 15 years, many functions of integrins, triggered by their association with different matrix components were established. Along with other colleagues, we unraveled interactions between basement membrane collagen (collagen IV: collIV) and different cell types (2-3). Our data indicated the existence of more than one integrin binding sites, in distinctive sequences from the $\alpha 1$ (IV) chain, one located in the carboxy-terminal, non-collagenous area, and a second one located close to the amino-terminal area of the molecule. Based on experiments of inhibition of adhesion, and affinity chromatography, it became apparent that different integrins mediated the binding to each different site. Thus, cells apparently interact with collIV with more than one integrin receptors.

One major integrin function is the regulation of matrix-related gene expression, including the expression of the matrix-degrading enzymes metalloproteinases (MMPs)/matrixins. Thus, different integrins have been implicated in the regulation of MMP expression, depending on cell type (4,5). We have obtained data to support the hypothesis that $\alpha 3\beta 1$ integrin was involved in the up-regulation of MMP-2 expression and secretion by both renal tubular and glomerular epithelial cells, and $\alpha v\beta 3$ down-regulated the expression of MMP-9 in renal tubular epithelial cells. We conclude that integrins may regulate matrixin expression in opposite ways, depending on cell type.

Multiple important cell functions are regulated by integrins, and therefore, changes of the expression and/or function of these receptors would be reflected in altered cell functions. Diabetes Mellitus and diabetic nephropathy are among the diseases implicating integrins in the modulation of important cell functions. We demonstrated that increased glucose concentrations resulted in modulation of renal integrin expression: (6). This altered expression was cell-type specific, and was accompanied by altered adhesion to collIV, and decreased expression of MMPs, which could in part explain matrix accumulation in the kidneys of patients with diabetic nephropathy (DN).

Altered renal integrin expression was also observed in renal biopsies and monocytes from patients suffering from DN, or other vascular diabetic complications. Apparently then, altered integrin expression occurs in more than one cell types, in diabetic patients prone to complications, and may be of genetic origin. This feature may help for the development of diagnostic means for the prediction of vascular diabetic complications.

Integrin engagement to matrix components results in cell adhesion, which is followed by integrin clustering, the formation of focal adhesions, and cell spreading (1). This adhesive function of integrins could be competed by podocalyxin, a cell surface sialoprotein, the expression of which was induced by laminin. The presence of this sialoprotein on the surface of glomerular epithelial cells is believed to be associated with the formation or maintenance of foot processes, which represent differentiations of these cells (7). Our data indicate that the expression of podocalyxin on specific areas of the basal cell surface of these cells inhibits integrin-mediated interactions with the underlying matrix, and leads to the generation of non-attached loci of the basal surface, thus forming the foot-like basal processes.

In summary, cell-matrix-interactions trigger a number of different cell responses, which act in concert to ensure normal cell function. The understanding of these interactions at a molecular level will contribute to the development of means to control aberrations of these functions in diseases in which matrix is implicated.

References

1. Giancotti FG, Ruoslahti, E (1999) *Science* 285: 1028-32
2. Kern A, Eble JR, Goblik J, Kühn K (1993) *Eur. J. Biochem* 215: 151-159
3. Setty S, Kim Y, Fields G, O Clegg D, Wayner E, Tsilibary E (1998) *J Biol. Chem* 273: 12244-9
4. Langholz O, Rockel D, Mauch C, Kozłowska E, Bank I, Krieg T, Eckes B (1995) *J Cell Biol* 131: 1903-15
5. DiPersio CM, Shao M, Di Costanzo L, Kreidberg JA, Hynes RO (2000) *J Cell Sci* 113: 2909-21
6. Setty S, Anderson SS, Wayner EA, Kim Y, O Clegg D, Tsilibary E (1995) *Cell Adhesion Commun* (1995) 3:187-200
7. Sawada H., Stukenbrok H., Kerjaschki D., Farquhar M. (1986) *Am J Pathol* 125:309-318

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΦΑΙΝΟΒΑΡΒΙΤΑΛΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΟΡΓΑΝΗ
ΠΥΡΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ (PPiase) ΣΤΟ ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ
ΚΑΙ ΣΠΛΗΝΑ ΕΠΙΜΥΟΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ
*IN VIVO***

Φράγκου-Μασουρίδου Ε., Γκούρτσας, Κ., Κώτσης, Α.

Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Ιατρικού Τμήματος, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης τα κυτταρικά οργανίδια υφίστανται μορφολογικές και βιοχημικές μεταβολές. Το φαινόμενο του κυτταρικού θανάτου επάγεται τόσο από εξωκυττάριους, όσο και από ενδοκυττάριους παράγοντες. Το βουτυρικό νάτριο (NaBu), ως κυτταροτοξική ουσία επάγει το φαινόμενο της διαφοροποίησης και απόπτωσης σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους. Η φαινοβαρβιτάλη (PB) θεωρήθηκε αναστολέας της απόπτωσης. Σε προηγούμενες εργασίες μας βρέθηκε ότι επηρεάζει τη πρωτεολυτική δραστηριότητα στο φυσιολογικό και αναγεννώμενο ήπαρ επίμυος, στο εντερικό επιθήλιο και σπλήνα. Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η δράση της PB στην ανόργανη πυροφωσφατάση (PPiase E.C.3.6.11), στα υποκυτταρικά κλάσματα του εντερικού επιθηλίου και σπλήνα επίμυος, σε συνθήκες απόπτωσης που επάγονταν από το NaBu. Χρησιμοποιήθηκαν άρρενες επίμυες της φυλής Wistar (220-280 gr), οι οποίοι ενέθηκαν με NaCl 9‰ (μάρτυρες), NaBu, PB, και NaBu σε συνδυασμό με PB (εξεταστέο). Τα ζώα θυσιάσθηκαν ύστερα από 24, 48 και 72 ώρες. Οι ιστοί απομακρύνονταν ταχύτατα και τα υποκυτταρικά κλάσματα ελήφθησαν από το ομογενοποίημα αυτών σύμφωνα με τη μέθοδο Nordlie και Lardy. Η δραστηριότητα της ανόργανης PPiase προσδιορίσθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Pynes και Younathan. Βρέθηκε ότι η PB, μόνη της ή σε συνδυασμό με το NaBu, προκαλεί ελάττωση της δραστηριότητας της PPiase στους πυρήνες του εντερικού επιθηλίου και αύξηση στα μιτοχόνδρια του ιστού αυτού, ύστερα από 48 και 72 ώρες. Στο σπλήνα παρατηρήθηκε αυξημένη δραστηριότητα PPiase τόσο στους πυρήνες, όσο και στα μιτοχόνδρια. Από τα πειράματά μας προκύπτει ότι η δράση της PB πρέπει να είναι ανασταλτική ή επανορθωτική εκείνης του NaBu, ειδικά στο σπλήνα, και προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας της PPiase στα μιτοχονδριακά- και μη μιτοχονδριακά-εξαρτώμενα στάδια της απόπτωσης.

**THE ROLE OF PHENOBARBITAL ON INORGANIC
PYROPHOSPHATASE (PPiase) IN RAT INTESTINAL
EPITHELIUM AND SPLEEN AT APOPTOTIC CON-
DITIONS *IN VIVO***

Frangou-Massourides, H., Gourtsas, K., Kotsis, A.

Department of General Biology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, Greece

During apoptosis cell organelles indicates biochemical changes and morphological in their shape. Cell death is induced by extracellular as well as intracellular agents. Sodium butyrate (NaBu) is a cytotoxic substance and produces the phenomenon of differentiation and apoptosis. Phenobarbital (PB) has been characterized as apoptotic inhibitor in some cell types. According to our previous work the proteolytic activity was found increased in rat liver after PB administration. In the present work we try to investigate the action of PB on inorganic pyrophosphatase (PPiase, E.C.3.6.11) in the subcellular fractions of rat intestinal epithelial cells and spleen, at apoptotic conditions.

We used male rats Wistar (220-280 gr), which were injected with NaCl 9‰ (control), NaBu, PB, and NaBu in combination with PB (experimental). The animals were sacrificed 24, 48 and 72 hours later. The tissues were removed and homogenized. The subcellular fractions were taken according to the method of Nordlie and Lardy. The PPiase activity was determined by the method of Pynes and Younathan. Our findings indicated that PB alone or combined with NaBu, reduces PPiase activity in the nuclear fraction of intestinal epithelium. It was enhanced in nuclear and mitochondrial fraction. According to our results PB must inhibits or repair the cytotoxic action of NaBu by enhancing the PPiase activity in the mitochondrial-dependent and non mitochondrial dependent apoptotic steps.

ΝΤΟΠΑ αποκαρβοξυλάση: από την πρωτεΐνη στο γονίδιο

Εμμ. Γ. Φραγκούλης

Εργ. Βιοχημείας, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Η Ντοπα αποκαρβοξυλάση βασικό ένζυμο για την βιοσύνθεση των βιογενών αμινών θεωρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα ως μη ρυθμιζόμενο ένζυμο περιορισμένου ενδιαφέροντος. Τα τελευταία δεκαπέντε χρόνια το συγκεκριμένο ένζυμο έχει συγκεντρώσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον μια και θεωρείται ότι εμπλέκεται εκτός, από την βιοσύνθεση των νευροδιαβιβαστών σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Parkinson σε ψυχικές ασθένειες όπως η σχιζοφρένεια και η κατάθλιψη, αλλά και σε νεοπλασίες όπως το μικροκυτταρικό καρκίνωμα των πνευμόνων το νευροβλάστωμα κ.λπ.

Το ένζυμο έχει καθαρισθεί σε ομογενή μορφή με διάφορα πρωτόκολλα καθαρισμού σε ομογενή μορφή από μια σειρά οργανισμούς και ιστούς. Στο εργαστήριο μας το ένζυμο έχει απομονωθεί και καθαρισθεί από νύμφες διαφόρων σταδίων ανάπτυξης του εντόμου *Ceratitis capitata* αλλά και από ανθρώπινους πτωματικούς νεφρούς. Φαίνεται να υπάρχει συγκλίνουσα άποψη μεταξύ των διαφόρων ερευνητικών ομάδων ως προς το μοριακό βάρος και την συγκρότηση του ενζύμου από υπομονάδες. Ενώ υπάρχουν σοβαρές διαφωνίες ως προς την ειδικότητα του ενζύμου ως προς τα διάφορα υποστρώματα και τους διάφορους παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την ενεργότητα του.

Το ένζυμο έχει εντοπισθεί από το εργαστήριο μας τόσο στο κυτταρόπλασμα πολλές φορές χωρίς ενεργότητα όσο και σε μεμβράνες. Η διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο η ενζυμική πρωτεΐνη είναι διευθετημένη μέσα στην μεμβράνη ευρίσκεται υπό συστηματική μελέτη. Το mRNA που κωδικοποιεί για την ενζυμική πρωτεΐνη φαίνεται να είναι προϊόν εναλλακτικού ματίσματος ο μηχανισμός του οποίου φαίνεται να παρουσιάζει διαφορετική λογική ανάλογα με τον οργανισμό και τους ιστούς. Το cDNA από διάφορους ιστούς και οργανισμούς έχει κλωνοποιηθεί και έχει εκφρασθεί. Στο εργαστήριο μας cDNA από ανθρώπινο ιστό αφού κλωνοποιήθηκε και για πρώτη φορά εντοπίζεται σε μη νευρικό ιστό «νευρικού τύπου» μετάγραφο εκφράσθηκε σε κατάλληλο όχημα, στη συνέχεια απομονώθηκε και καθαρίσθηκε η εκφραζόμενη πρωτεΐνη. Τόσο η ενζυμική ενεργότητα όσο και οι λοιπές ιδιότητες εμφανίζονται να είναι πλήρως όμοιες με εκείνες του φυσικού ενζύμου

FROM THE PURIFIED PROTEIN TO THE CLONING OF THE GENE

Emm. G. Fragoulis

Dept of Biochemistry – Molecular Biology University of Athens

L-Dopa decarboxylase (Ddc) is the main enzyme responsible for the biosynthesis of biogenic amines. Ddc has been regarded for a long time as an unregulated molecule of minimal biological interest. The last few years however, accumulating evidence have revived scientific interest in the study of the enzyme due to its apparent involvement in the pathogenesis of a variety of conditions such as Parkinson's disease, schizophrenia and neoplasias of neuroendocrine origin. The enzyme has been purified from a variety of sources. In our laboratory Ddc has been isolated from different developmental stages of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* as well as post-mortem human kidney. Although there have been extensive studies on the structure of DDC, there is still a considerable amount of dispute relating to substrate specificity and the structure of the enzyme. Today, it is accepted that DDC is a homodimer, binding one PLP molecule, with a subunit molecular weight approximately 50 kDa. Ddc is considered to be located in the cellular soluble fraction, recently however, work from our laboratory has indicated that a population of active DDC molecules are associated with the cellular membrane fraction. The detailed analysis of this alternative cellular topology is under investigation in our laboratory. The employment of two alternative 5' UTRs, is thought to be responsible for tissue-specific expression of Ddc mRNA. Tissue specificity is proposed to be directed by the usage of alternative promoters, followed by alternative splicing. The human cDNA encoding for the enzyme has been cloned in our laboratory. Our studies have shown the expression of a neural type of Ddc cDNA in a nonneural human tissue type. Following the cloning of the human cDNA we have proceeded to the expression of the enzymatically active recombinant protein. The obtained recombinant enzyme specific activity values are in good agreement with the results obtained for the purified enzyme from human kidney.

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ

Χαβάκη, Σ., Κίττας, Χρ. και Ε. Μαρίνος

Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Η σπουδαιότητα της εφαρμογής εξειδικευμένων ανοσοϊστοχημικών μεθόδων στο επίπεδο του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (ΗΜ) στην έρευνα και στη διαγνωστική παθολογία είναι πλέον αδιαμφισβήτητη. Βασικός στόχος κατά την εφαρμογή ανοσοϊστοχημικών μεθόδων στο ΗΜ είναι τόσο η διατήρηση της καλής μορφολογίας του ιστού, όσο και της αντιγονικότητάς του. Στο ΗΜ χρησιμοποιούνται ειδικοί ανοσοϊστοχημικοί δείκτες και ο κολλοειδής ανοσοχρυσός αποτελεί τον πιο έγκυρο και καθιερωμένο δείκτη. Από άποψη μεθοδολογικής προσέγγισης, οι ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι στο ΗΜ χωρίζονται σε αυτές που εφαρμόζονται πριν την έγκλειση του ιστού και σε αυτές που εφαρμόζονται μετά την έγκλεισή του σε ρητίνες. Οι πρώτες εφαρμόζονται συνήθως για την μελέτη επιφανειακών αντιγόνων, καθώς και σε περιπτώσεις όπου το υπό μελέτη αντιγόνο είναι ευαίσθητο και αδρανοποιείται εύκολα λόγω της χημικής επεξεργασίας στην οποία υποβάλλεται ο ιστός. Οι δεύτερες είναι ευρύτερα διαδεδομένες ως μέθοδοι ρουτίνας και χαρακτηρίζονται από τον τρόπο επεξεργασίας του ιστού και το είδος του μέσου έγκλεισης που χρησιμοποιείται. Ειδικότερα, όταν το υπό μελέτη αντιγόνο είναι ανθεκτικό στη χημική μονιμοποίηση, στους οργανικούς διαλύτες και στις υψηλές θερμοκρασίες πολυμερισμού των ρητινών, εφαρμόζεται η κλασική μέθοδος έγκλεισης των ιστών σε εποξικές ρητίνες. Όταν το αντιγόνο είναι ευαίσθητο στους οργανικούς διαλύτες και στις υψηλές θερμοκρασίες, τότε εφαρμόζεται η μέθοδος βαθμιαίας μείωσης της θερμοκρασίας, σύμφωνα με την οποία μετά από ήπια χημική μονιμοποίηση ακολουθεί αφυδάτωση του ιστού, εμπότισή του με ακρυλικές ρητίνες και πολυμερισμός σε χαμηλές θερμοκρασίες αρκετά κάτω του μηδενός. Η παραπάνω διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη διατήρηση τόσο της μορφολογίας, όσο και της αντιγονικότητας του ιστού. Όταν το αντιγόνο είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στη χημική μονιμοποίηση, τότε μονιμοποιείται με ακαριαία ψύξη και στη συνέχεια ακολουθεί η μέθοδος της ψυκτοαντικατάστασης, όπου η αφυδάτωση και ο πολυμερισμός των ακρυλικών ρητινών γίνεται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (-80 μέχρι -90°C). Συμπερασματικά η ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία αποτελεί σημαντικό εργαλείο μελέτης αντιγονικών θέσεων στο υποκυτταρικό επίπεδο. Το είδος του υπό μελέτη αντιγόνου αλλά και η αντοχή του καθορίζουν την επιλογή της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου, ώστε η ανοσοεντόπιση να είναι αξιόπιστη, πράγμα που απαιτείται ιδιαίτερα στη διαγνωστική παθολογία.

IMMUNOELECTRON MICROSCOPY

Havaki, S., Kittas, Chr., and E. Marinos

Laboratory of Histology and Embryology, Athens Medical School

Undoubtedly, the application of specialized immunotechniques at the level of the electron microscope (EM) is invaluable in research and diagnostic pathology. The main purpose of the application of immunolabelling at the EM level is the preservation of tissue morphology and antigenicity. Among other markers, colloidal gold represents the most reliable and commonly used marker in ultrastructural localization techniques. As far as the immunohistochemical procedures are concerned, two protocols have been developed: pre-embedding and post-embedding. The former are applied usually for the localization of surface antigens, as well as in cases where antigens are very sensitive and unstable under tissue chemical fixation. The latter represent routine methods, which are characterized and classified according to the tissue treatment followed in each case and the embedding medium used. In particular, when the antigen resists chemical fixation, dehydration and oven embedding then the epoxy resin embedding method is followed. When the antigen resists chemical fixation but is sensitive to dehydration and oven embedding, then the progressive lowering temperature (PLT) method is applied. According to this method the tissue is lightly fixed, dehydrated, and finally embedded in acrylic resins at low temperatures well below zero. The above mentioned procedure results in better tissue ultrastructural preservation and antigenicity. When the antigen is vulnerable to chemical fixation, the tissue is rapid-frozen and the freeze substitution method is followed, during which dehydration and polymerization of the acrylic resins are carried out at very low temperatures (-80 - -90°C). In conclusion, immunoelectron microscopy is a useful tool of high specificity for the ultrastructural localization of antigenic sites. The immunohistochemical method of choice depends on the antigen sensitivity. The overall procedure has to be reliable enough and this is especially required in diagnostic pathology.

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗΣ ΟΜΑΔΑΣ Η ΣΕ ΠΥΡΗΝΕΣ
ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΟΡΟΓΕΝΩΝ ΔΙΗΘΗΤΙΚΩΝ
ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΜΑΣΤΟΥ ΜΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΤΩΝ
ΜΕΘΟΔΩΝ ΚΟΛΛΟΕΙΔΟΥΣ ΑΝΟΣΟΧΡΥΣΟΥ ΚΑΙ
BERNHARD**

Χαβάκη, Σ.¹, Αρβανίτης, Δ.², Γούτας, Ν.³, Κίττας, Χρ.¹, Μαρίνος, Ε.¹

¹Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Αθηνών, ²Τμήμα Ανατομίας, Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Θεσσαλίας, Λάρισα, ³Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Αθηνών

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, το αντιγόνο Η εντοπίζεται στον πυρήνα καρκινικών κυττάρων πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μαστού. Το επιτόπιο του περιλαμβάνει Ο-συνδεδεμένη Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη, καθώς και τμήμα γειτονικού πρωτεϊνικού μέρους, και έχει βρεθεί ότι το φέρουν η κυτοκερατίνη 8 (Κ8) και άλλα 5 πεππίδια. Στην παρούσα εργασία έγινε συνδυασμένη εφαρμογή της μεθόδου του κολλοειδούς ανοσοχρυσού (διπλή εντόπιση του αντιγόνου Η και της Κ8) με την ιστοχημική μέθοδο Bernhard (εκλεκτική χρώση των ριβονουκλεοπρωτεϊνών (RNPs)), έτσι ώστε να γίνει ακριβής μορφολογική εκτίμηση της ανοσοεντόπισης στον πυρήνα. Μελετήθηκαν 4 πορογενή διηθητικά καρκινώματα μαστού. Από κάθε περίπτωση, μικρά ιστοτεμάχια μονιμοποιήθηκαν, αφυδατώθηκαν, και εγκλείσθηκαν σε μίγμα εποξικών ρητινών. Σε υπέρλεπτες τομές εφαρμόστηκε αρχικά η ανοσοϊστοχημική μέθοδος διπλής εντόπισης ως προς το αντιγόνο Η και την Κ8 με ανοσοχρυσό μεγέθους κόκκων 20nm και 10nm αντίστοιχα. Στη συνέχεια, οι τομές επώασθηκαν με οξικό ουρανύλιο, EDTA και κιτρικό μόλυβδο. Τα αποτελέσματα έδειξαν εντόπιση του αντιγόνου Η κυρίως στην περιοχή της ετεροχρωματίνης, σε διάσπαρτες ινώδεις δομές χρωματίνης, καθώς και στον πυρηνίσκο, τόσο στην κοκκιώδη όσο και στην ινώδη περιοχή. Η εντόπισή του σε περιοχές ριβονουκλεοπρωτεϊνών δεν ήταν τόσο έντονη. Η Κ8 εντοπίστηκε στις ίδιες περιοχές του πυρήνα, αλλά με πιο μειωμένη αντίδραση. Συμπερασματικά, η εντόπιση του αντιγόνου Η στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων δείχνει την ευρεία διάδοση της Ο-Ν-ακετυλογλυκοζυλίωσης στις πυρηνικές πρωτεΐνες, παίζοντας ρυθμιστικό ρόλο στο μεταστατικό δυναμικό του καρκινικού κυττάρου.

**STUDY OF ANTIGEN H IN THE NUCLEI OF CANCER
CELLS OF DUCTAL INFILTRATING BREAST
CARCINOMAS WITH THE COMPINED APPLICATION
OF IMMUNOGOLD AND BERNHARD METHODS**

Havaki, S.¹, Arvanitis, D.², Goutas, N.³, Kittas, Chr.¹, Marinos, E.¹

¹Laboratory of Histology and Embryology, Medical School, University of Athens, ²Department of Anatomy, Histology and Embryology, Medical School of Larissa, University of Thessaly, ³Laboratory of Forensic Medicine and Toxicology, Medical School, University of Athens

According to previous studies, the antigen H is immunolocalized in the nucleus of cancer cells of infiltrating ductal breast carcinomas. Its epitope includes O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc), as well as the neighboring amino acids, and is localized in cytokeratin 8 (K8) and other 5 cellular polypeptides. The purpose of this study was the combination of immunogold double labelling of antigen H and K8 with the Bernhard regressive method for the preferential staining of ribonucleoproteins (RNPs), so that a precise morphological assessment of immunolabelling could be possible. 4 cases of infiltrating ductal breast carcinomas were studied. In each case, small pieces of fresh tissue biopsy were fixed, dehydrated, and embedded in a mixture of epoxy resins. Thin sections were processed for double post-embedding immunolabelling of the antigen H and K8 using immunogold antibodies conjugated with 20nm and 10nm gold particles, respectively. Subsequently, the sections were incubated with uranyl acetate, EDTA, and lead citrate. The results showed antigen H labelling mostly over bleached heterochromatin masses, fibrillar structures of dispersed chromatin, as well as over the fibrillar and granular components of nucleoli. The antigen H labelling over RNPs-containing structures appeared weak. K8 was localized over the same regions as antigen H, but the labelling was weaker than that of antigen H. In conclusion, the immunolocalization of antigen H in the nuclei of cancer cells shows that the O-GlcNAc protein modification is widespread on nucleoproteins, indicating its regulating role in the metastatic potential of the cancer cell.

ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΤΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΒΟΣΚΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΥΡΥΤΕΡΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΩΝ

Χαιριστανίδης, Σ.Ν., Διαμαντόπουλος, Ι.Γ. και Ι.Δ. Παντής

Τομέας Οικολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ., Τ.Κ. 54124, Θεσσαλονίκη

Στην ευρύτερη περιοχή της μείζονος Θεσσαλονίκης παρατηρείται έντονη κτη-νοτροφική δραστηριότητα (συνολικά περίπου 80000 ζωικές μονάδες). Στις πεδινές περιοχές κυριαρχεί η εκτροφή βοοειδών και προβάτων ενώ στις ημι-ορεινές και ορεινές επικρατούν οι αίγες. Σημαντικοί αριθμοί κτηνοτροφικών ζώων υπάρχουν σε οικισμούς πολύ κοντά στο πολεοδομικό συγκρότημα (Πυ-λαία, Ασβεστοχώρι) και σε οικισμούς υψηλής αξίας γης (Πανόραμα, Ωραι-όκαστρο). Για τις ανάγκες της χωρικής ανάλυσης δημιουργήθηκαν πέντε ζώνες ελέγχου πάνω στο χάρτη, γύρω από το πολεοδομικό συγκρότημα της Θεσ/νίκης (1, 2, 3, 5 και 8 km αντίστοιχα) και τέσσερις ζώνες (200, 500, 1000 και 2000 m αντίστοιχα) γύρω από όλους τους οικισμούς της περιοχής και γύρω από τους έξι οικισμούς με το μεγαλύτερο αριθμό αιγών. Σε ολόκληρη την περιοχή κύρια χρήση γης είναι οι γεωργικές καλλιέργειες (44%) ενώ σημαντικές εκτάσεις αποτελούν επίσης οι διαπλάσεις αειφύλλων σκληροφύλλων (ΑΣΔ, κυρίως θαμνολίβαδα *Quercus coccifera*) και τα χορτολίβαδα (24% και 13% αντίστοιχα). Τα δάση καταλαμβάνουν μόνο το 5% της συνολικής έκτασης. Το 39% των ΑΣΔ είναι υπερβοσκημένες, το 34% μέτρια βοσκημένες και μόνο το 27% βόσκονται ελάχιστα έως καθόλου.

Η μελέτη της μεταβολής των ποσοστών των διαφόρων χρήσεων γης με βάση την απόσταση από το πολεοδομικό συγκρότημα της Θεσ/νίκης αποκαλύπτει καταρχήν τη μεγάλη σπουδαιότητα του δάσους του Σείχ Σου, πέρα από το οποίο δεν υπάρχουν άλλες σημαντικές δασώδεις εκτάσεις. Τόσο στις ζώνες ελέγχου γύρω από το πολεοδομικό συγκρότημα όσο και σε αυτές γύρω από όλους τους οικισμούς της περιοχής έρευνας το πρότυπο μεταβολής των ποσοστών χρήσεων γης ακολουθεί το γνωστό μεσογειακό πρότυπο, σύμφωνα με το οποίο οι γεωργικές καλλιέργειες μειώνονται και οι βοσκούμενες εκτάσεις αυξάνονται αυξανόμενης της απόστασης από τον οικισμό. Η υποβάθμιση των ΑΣΔ λόγω της βόσκησης είναι σημαντικά μεγαλύτερη μέχρι την απόσταση των 1000 μέτρων από τους οικισμούς. Ειδικότερα στις ζώνες γύρω από τους οικισμούς με τις περισσότερες αίγες παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό θαμνώνων να είναι μέτρια ή υπερβολικά βοσκημένο. Η ζώνη της μεγαλύτερης βοσκητικής πίεσης σε αυτήν την περίπτωση βρίσκεται στα 200-1000 m, όπου εντοπίζονται κυρίως οι χώροι σταυλισμού (περίπου 850).

SPATIAL PATTERN AND EFFECTS OF GRAZING IN THE RURAL AREA OF THESSALONIKI: A GIS APPROACH

Heristanidis, S.N., Diamantopoulos, J.G., and J.D. Pantis

Department of Ecology, School of Biology, A.U.TH., 54124, Thessaloniki.

Intense husbandry activity occurs in the rural area around Thessaloniki (approximately 80000 animal units). Sheep and cattle breeding are observed mostly in the lowlands while goat breeding is dominant in the hilly areas to the east of the city. Significant numbers of domestic animals have been recorded even in settlements near the urban area (e.g. Pylaia, Asvestohori) and in upper-class areas (e.g. Panorama, Oraikastro). In order to perform the spatial analysis, five buffer zones were created on the map, around the urban area of Thessaloniki (1, 2, 3, 5 and 8 km wide respectively). Moreover, four buffer zones were created around all the inhabited areas (200, 500, 1000 and 2000 m wide respectively) and the same procedure was followed for the six settlements with the higher numbers of domestic goats. Based on the spatial analysis of the land use/cover map, the surface percentages were calculated for each type of land use in the whole area of the map and in the buffer zones.

In the entire region concerned, agricultural land is the dominant land use (44%) with shrublands and grasslands in substantial percentages (24% and 13% respectively). Shrublands in the present study consist of evergreen sclerophyllous formations and are dominated by *Quercus coccifera*. Forest represents only 5% of the whole area. More specifically, 39% of the evergreen sclerophyllous formations are overgrazed, 34% are moderately grazed and only 27% are subgrazed. The percentage of forested area around the city of Thessaloniki is reduced from 19% in the first (nearest) buffer zone to 2% in the last (furthest), displaying the importance of the forest of Seich Sou, which practically is the only one in the entire region. In the buffer zones around the urban area of Thessaloniki, the pattern of the percentages of various land uses is very similar to the Mediterranean pattern; cultivated land is reduced and grazed land increases with increasing distance from the settlement border. From the alteration of the land use percentages in the buffer zones around all settlement areas it is observed that the degradation of the evergreen sclerophyllous formations is significantly greater in the first three zones (up to 1000 m from settlements). Furthermore, the degradation seems to be even bigger when only the six settlements with the highest numbers of goats are concerned. The difference in this occasion is that the zone, where the biggest grazing activity is observed, is delimited between 200-1000 m, where most stockyards are also located (approximately 850).

ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΛΙΠΟΥΣ ΣΕ ΔΥΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ. ΑΙΤΙΕΣ ΤΗΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ

Χατσατριάν, Α. και Α. Πέντζου – Δαπόντε

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,

Ένα από τα σημαντικότερα πεδία έρευνας της Φυσικής Ανθρωπολογίας είναι η μελέτη της ανάπτυξης του ανθρώπινου οργανισμού. Ο ρυθμός της αύξησης ελέγχεται από το πολύπλοκο συνδυασμό εσωτερικών και εξωτερικών παραγόντων. Η προσοχή στην διατροφή και κατά συνέπεια στο βάρος έχει γίνει είδη κοινωνική ανάγκη. Κυριαρχεί πλέον το πρότυπο του λεπτού, λιποδίαιτου, από σωστούς όρους διατροφής χαρακτηριστικού αθλητικού τύπου. Ο σύγχρονος τρόπος ζωής πέρα από τις ανέσεις που μας προσφέρει, έχει και τα αρνητικά του επακόλουθα. Εδώ σημαντικό ρόλο κατέχει η παχυσαρκία. Ο Οργανισμός Παγκόσμιας Υγείας χαρακτηρίζει πλέον την παχυσαρκία σαν «επιδημία». Από την κατάσταση αυτή δεν εξαιρούνται οι ανήλικοι (ένα στα πέντε παιδιά στον ελλαδικό πληθυσμό, δυο στα επτά παιδιά στον αρμενικό πληθυσμό είναι παχύσαρκο). Παρατηρείται ότι ενώ στην παιδική ηλικία η κατανομή του λίπους γίνεται ομοιόμορφα σε ολόκληρο το σώμα και στα δυο φύλα, με την ενηλικίωση και εξαιτίας της σεξουαλικής διαφοροποίησης, στις γυναίκες το λίπος συσσωρεύεται κυρίως στην γλουτομηριαία περιοχή και στους άνδρες στην κοιλιακή χώρα. Ως υλικό για την έρευνά μας χρησίμευσαν 2800 άτομα (1400 γυναίκες και 1400 άντρες) από κάθε πληθυσμό (ελληνικό και αρμενικό), ηλικίας 12 – 30 ετών, από τα οποία πάρθηκαν σωματομετρικά στοιχεία. Συμπληρώθηκαν ερωτηματολόγια με θέματα την ποιότητα και ποσότητα της διατροφής, την κατάσταση της υγείας, την κληρονομικότητα, τις αθλητικές επιδόσεις του κάθε εξεταζόμενου. Ο προσδιορισμός του ποσοστού του λίπους του σώματος έγινε με τον H/Y Futrex – 5000. Το ιδανικό βάρος υπολογίστηκε με τον διεθνή δείκτη Body Mass Index. Αναλύθηκε η επίπτωση της παχυσαρκίας σε μια σειρά από διαταραχές των αρθρώσεων (17% των ασθενών ήταν υπέρβαροι), αρρώστιες καρδιάς και αγγείων (ένας στους τρεις είναι υπέρβαρος), υπέρταση (13.5% υπέρβαροι), εκφύλιση του ήπατος, διαβήτη (ένας στους πέντε είναι υπέρβαρος), εγκεφαλικά και μερικές νέες μορφές καρκίνου. Το χαρακτηριστικό της παχυσαρκίας είναι ότι μπορούν να προσβληθούν τόσο μεμονωμένα όργανα όσο και πολλά μαζί. Τα αποτελέσματα της έρευνας επεξεργάστηκαν στον H/Y, με ειδικό πρόγραμμα για ανθρωπολογικές μελέτες. Συγκρίνονται στατιστικές αναλογίες των δυο πληθυσμών.

**DISTRIBUTION OF FAT IN TWO POPULATIONS.
CAUSES OF OBESITY. THE ROLE OF OBESITY IN
CAUSING DISEASES**

Chatsatrian, L., and A. Pentzou-Daponte

Biology Department, Faculty of Sciences, Aristoteleion University, Thessaloniki

One of the most important fields of Anthropology is the study of the growth of the human body. The rate of growth is controlled by a complex combination of external and internal factors. A flexible body without excess body fat is considered to be an indication consequence. Obesity plays a significant role and is considered as the disease of this century. Children are not exempt from this situation (one in five children in Greek population is obese, two of seven children in Armenian population are obese). It has been observed that although in childhood fat is distributed uniformly over the entire body on both sexes, upon growing older and due to the differentiation of the sexes fat accumulates mainly round the thighs and buttocks in women and the abdomen in men. The research was conducted on a population of 2800 persons from every population (Greek and Armenian), 1400 women and 1400 men, aged 12-30 years old. Information was recorded with respect to their bodily measurements, the quality of their diet and health, hereditary factors and athletic performance. Calculations were made by computer to ascertain their fat ratio Futrex – 5000. The results will be discussed with reference to bibliography from Greece and abroad. The statistical processing of the results will be done computer (special statistical program for anthropological studies). An analysis will be made and we will comment on the growth rate curves, which are derived from the statistical processing. The ratios of the two populations will be compared. As will the role of obesity in causing various diseases.

ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ: ΒΛΑΒΕΣ ΣΤΟ DNA ΚΑΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Χριστόπουλος, Γ.^{1,2}, Μεσσήνη-Νικολάκη, Ν.², Τσιλιμιγκάκη, Σ.¹, Φλεβάρης,
Χ.³ και Σ.Μ. Πιπεράκης¹

¹Εργαστήριο Επιδιορθωτικών Μηχανισμών DNA, Ινστ. Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Αθήνα

²Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

³Β. Παθολογικό Τμήμα, Νοσοκομείο Ελληνικού Ερυθρού Σταυρού, Αθήνα

Η λειτουργία των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA μπορεί να επηρεαστεί από ασθένειες από τις οποίες μπορεί να πάσχει ένα άτομο. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την επίδραση του σακχαρώδη διαβήτη στην ευαισθησία στις DNA βλάβες-επιδιορθωτική ικανότητα λεμφοκυττάρων διαβητικών. Με την τεχνική του «comet assay» μετρήθηκαν οι βλάβες στο DNA που προκαλούνται με επίδραση εξωγενών παραγόντων όπως η γ-ακτινοβολία και το H₂O₂ σε διαβητικούς. Επίσης εξετάσαμε την επιδιορθωτική ικανότητα των λεμφοκυττάρων του υπό μελέτη πληθυσμού. Τέλος μελετήσαμε τη μορφολογία των κυττάρων με χρωστικές (AO+EtBr) για να προσδιορίσουμε τον αριθμό των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων. Με τις χρωστικές αυτές διαχωρίζουμε τρεις σαφείς κατηγορίες κυττάρων. Τα φυσιολογικά που βάφονται πράσινα, τα νεκρωτικά που βάφονται κόκκινα και τα αποπτωτικά που βάφονται πράσινα με τα αποπτωτικά σωμάτια κόκκινα. Από την ανάλυση των πρώτων αποτελεσμάτων διαφαίνεται μία τάση μεγαλύτερης ευαισθησίας του DNA λεμφοκυττάρων από διαβητικούς στην επίδραση εξωγενών παραγόντων.

DIABETES MELLITUS: EFFECTS ON DNA DAMAGE AND REPAIR MECHANISMS

Christopoulos, G.^{1,2}, Messini-Nikolaki, N.², Tsilimigaki, S.¹, Flevaris, C.³, and
S.M. Piperakis¹

¹DNA Repair Laboratory, Institute of Biology, NCSR 'Demokritos', Athens. ²Department of Cell Biology, School of Biology, University of Athens. ³Second Department of Internal Medicine, Red Cross Hospital, Athens.

Various diseases of which a person may be suffering could affect DNA repair mechanisms. In this study we examined the effects of diabetes mellitus on DNA damage-repair of diabetics. With the comet assay technique we estimated the damage on DNA caused by external factors, such as H₂O₂ and γ-radiation on a population of diabetics. The DNA repair efficiency of this population was also examined. Furthermore, we studied apoptosis and necrosis using the morphology of the cells with several stains (AO+EtBr). With the above stains, we distinguished three cells' categories. The normal cells, which are painted green, necrotic ones, which are painted red, and the apoptotic cells, which are painted green with the apoptotic particles, painted red. Our preliminary results indicate that diabetes mellitus possibly affects the function of diabetics' DNA repair mechanisms.

**ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ****Θεόδωρος Κ. Χριστόπουλος**Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Πατρών, Πάτρα 26500. E-mail: tkc@chemistry.upatras.gr

Με την ολοκλήρωση του προσδιορισμού της γονιδιωματικής αλληλουχίας του ανθρώπου και διαφόρων οργανισμών-μοντέλων, εισερχόμαστε σε νέα εποχή όπου στόχος είναι η διαλεύκανση της λειτουργίας κάθε γονιδίου, των μηχανισμών ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και του βιολογικού ρόλου των πρωτεϊνών. Η πρόκληση συνίσταται στην ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών που, αξιοποιώντας τη συσσωρευμένη γενετική πληροφορία, επιτρέπουν τη λειτουργική μελέτη χιλιάδων γονιδίων παράλληλα.

Οι μικροσυστοιχίες DNA (DNA chips), μια ταχύτατα αναπτυσσόμενη τεχνολογία, αποτελούνται από χιλιάδες αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες γονιδίων ακινητοποιημένες σε μικρή, αδρανή επιφάνεια και παρέχουν τη δυνατότητα συγκριτικής εκτίμησης των επιπέδων αφθονίας χιλιάδων διαφορετικών πληθυσμών μορίων mRNA. Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην υβριδοποίηση των μορίων mRNA με αλληλουχίες της μικροσυστοιχίας.

Τα επίπεδα mRNA, αν και παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες, δεν αντανακλούν κατ' ανάγκη τις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών ούτε παρέχουν γνώση για τους μηχανισμούς δράσης και ρύθμισής τους. Γι' αυτό, απαιτείται συνδυασμός δεδομένων από μελέτες mRNA και πρωτεϊνών. Η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-PAGE) αποτελεί κλασσική μέθοδο διαχωρισμού πρωτεϊνών με βάση το φορτίο και το μέγεθός τους. Συνδυασμός της 2D-PAGE με σύγχρονες μεθόδους φασματομετρίας μαζών επιτρέπει την ταχεία ταυτοποίηση πληθώρας πρωτεϊνών μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό. Η περαιτέρω βελτίωση της ανιχνευσιμότητας των τεχνικών αυτών, η δυνατότητα ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνών, η ανίχνευση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων καθώς και η δυνατότητα ανάλυσης πρωτεϊνικών συμπλόκων αποτελούν άμεσους στόχους. Ο συνδυασμός σύγχρονων χρωματογραφικών τεχνικών με φασματομετρία μαζών συμβάλλει προς την κατεύθυνση αυτή.

Κατ' αναλογία προς τα DNA chips, υπάρχει έντονη ερευνητική δραστηριότητα για την ανάπτυξη chips πρωτεϊνών. Αυτά, είτε επιτρέπουν τον ποσοτικό προσδιορισμό πληθώρας πρωτεϊνών παράλληλα ή παρέχουν τη δυνατότητα μελέτης (σε μεγάλη κλίμακα) αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών με άλλα μόρια.

Τέλος, είναι απαραίτητη η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των παραπάνω τεχνικών σε *in vivo* συστήματα. Για το σκοπό αυτό αναπτύσσονται τεχνικές που επιτρέπουν τη συνεχή παρακολούθηση μοριακών αλληλεπιδράσεων *in vivo*, σε πραγματικό χρόνο, χωρίς καταστροφή του κυττάρου.

ADVANCES IN ANALYTICAL TECHNIQUES FOR FUNCTIONAL GENOMICS

Theodore K. Christopoulos

Department of Chemistry, University of Patras, Patras, Greece 26500
E-mail: tkc@chemistry.upatras.gr

The completion of the sequencing of the human genome as well as the genomes of various model organisms sets the stage for a new era with the goal to elucidate the function of each gene, the regulation mechanisms and the biological role of the gene products, the proteins. The challenge now is to develop new analytical techniques that exploit the accumulated genetic data and provide information on the function of thousands of genes in parallel.

DNA microarrays (DNA chips), a rapidly growing technology, consist of several thousands of representative gene sequences immobilized on a small, inert surface. DNA chips allow the comparative estimation of the abundances of a plethora of mRNA molecules in parallel. Quantification is based on the hybridization of mRNA molecules with the immobilized DNA sequences.

Although mRNA levels provide useful information, they do not necessarily reflect protein concentrations, nor do they provide insight on mechanisms of protein function and regulation. Functional genomics requires studies both at the mRNA level and the protein level. Two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) is a classic technique for separating protein molecules based on their charge and size. The combination of 2D-PAGE with modern mass-spectrometry techniques allows for rapid identification of proteins following electrophoretic separation. Current research efforts in this area focus on improving the detectability, providing quantitative data, detecting post-translational modifications as well as analyzing protein complexes. The combination of modern chromatographic techniques with mass spectrometry contributes to this direction.

Another area of intense research activity is centered on the development of protein chips. Protein chips either allow the simultaneous determination of the concentrations of thousands of proteins in a sample (protein profile) or they provide the platform for studying protein interactions in a massively parallel manner.

Finally, any results from *in vitro* functional studies must be confirmed *in vivo*. There is a rapid progress on the development of analytical techniques that allow real time monitoring of protein dynamics and interactions in the living cell.

ΜΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ecNOS ΜΕ ΕΚΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

**Ψαρά, Ε.¹, Στάκος, Γ.¹, Μαραθεύτης, Χ.¹, Ζηρογιάννης, Π.², Τριγώνης, Σ.²,
Δέλτας, Κ.³, Λάμνισου, Κ.¹**

¹ Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

² Νεφρολογική κλινική, Περιφερειακό Νοσοκομείο Αθηνών «Γ. Γεννηματάς»

³ Τμήμα Μοριακής Γενετικής, Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου

Η ενδοθηλιακή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου κωδικοποιείται από το γονίδιο ecNOS που εδράζεται στο χρωμόσωμα 7. Δύο αλληλόμορφα της γενετικής αυτής θέσης έχουν εντοπιστεί στο εσώνιο 4, το μεγαλύτερο αποτελείται από 5 επαναλήψεις 27 βάσεων και ονομάζεται b (NOSb), ενώ το μικρότερο αποτελείται από 4 επαναλήψεις των 27 βάσεων και ονομάζεται a (NOSa). Από τις μέχρι σήμερα μελέτες φαίνεται ότι ο γονότυπος aa είναι σπάνιος και σε κάποιους πληθυσμούς, όπως οι Ιάπωνες, έχει θεωρηθεί ότι σχετίζεται με έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τον πολυμορφισμό του γονιδίου ecNOS4 στον Ελληνικό πληθυσμό σε 105 υγιή άτομα και σε 95 άτομα με νεφρική αναπάρκεια, τα οποία υποβάλλονταν σε αιμοδιάλυση. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι συχνότητες των τριών γονότυπων bb, ba, aa στον Ελληνικό πληθυσμό είναι 0.69, 0.28, 0.03, αντίστοιχα, και συμβαδίζουν με τις συχνότητες που έχουν παρατηρηθεί σε άλλους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς για τον ίδιο πολυμορφισμό. Οι συχνότητες των αντίστοιχων γονότυπων στους ασθενείς είναι 0.674, 0.263, 0.063. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών και των υγιών ατόμων (τεστ ομοιότητας χ^2) στον πληθυσμό μας όσον αφορά τον πολυμορφισμό αυτό. Συμπεραίνουμε ότι, αντίθετα με τα αποτελέσματα που έχουν αναφερθεί από Ασιατικούς πληθυσμούς, στο Ελληνικό πληθυσμό (Καυκάσιοι) η γενετική θέση ecNOSa δεν αποτελεί παράγοντα ρίσκου για έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας.

**LACK OF EVIDENCE FOR ASSOCIATION OF THE ecNOS
GENE POLYMORPHISM IN INTRON 4 AND PROGRESSION
TO END STAGE RENAL DISEASE IN THE GREEK
POPULATION**

**Psara, H.¹, Staikos, G.¹, Maratheftis, C.¹, Ziroyiannis, P.², Trigonis, S.²,
Deltas, C.³, Lamnissou, K.¹**

¹ Division of Genetics, Dept of Biology, University of Athens, ² Dept of Nephrology "G. Gennimatas" Hospital, Athens, ³ Dept of Molecular Genetics, The Cyprus Institute of Neurology & Genetics, Nicosia, Cyprus

Nitric oxide (NO) is thought to be an important factor in the deterioration of renal function. A variable number tandem 27-bp repeat in intron 4 of the endothelial nitric oxide synthase (ecNOS) gene has been found to affect the plasma levels of NO metabolites. Two alleles are of varied frequencies in different populations (a and b). The shorter allele, a, has been associated in Japanese populations with the progression of renal disease. We studied the association of this polymorphism in a Greek population of patients with end stage renal disease (ESRD) by studying the genotypes of 105 healthy subjects and 95 ESRD patients. The frequencies of bb, ab, aa were 0.69, 0.28, 0.03, respectively, in the control group and 0.67, 0.26, 0.06 in the patient group. The data between the two groups were analyzed by chi-square test. Our results from controls show that the frequencies of these three genotypes in Greek population are similar to those observed in some other Caucasian populations. But the results from the patient group showed that the frequency of aa genotype in the patient population was not significantly different than in the control group. This work indicate that ecNOS4 polymorphism do not show any association with the development of end stage renal disease in the studied European population.

**ΤΟ ΜΕΣΟΖΩΟΠΛΑΓΚΤΟ ΣΤΗΝ ΨΥΤΑΛΛΕΙΑ
(ΣΑΡΩΝΙΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ)****Βιτζηλαίου Κ., Διακογεωργάκης Γ., Καμπούρογλου Β., Κούκουρας Σ.,
Ποδιάδης Β., Βερροιάπουλος Γ., Αποστολοπούλου Μ.**

Τομέας Ζωολογίας-Θαλάσσιας Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α., Αθήνα, 15784

Η εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μαθήματος της Πλαγκτονολογίας του Μεταπτυχιακού Ωκεανογραφίας. Σκοπός της ήταν η διερεύνηση της μεταβολής της σύστασης του μεσοζωοπλαγκτού, εξαιτίας της λειτουργίας του σταθμού της Ψυτάλλειας, στην περιοχή απόρριψης των λυμάτων. Αντίστοιχες εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί στα πλαίσια του ίδιου μαθήματος τις χρονιές 1999 και 2000.

Μεθοδολογία. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε το Νοέμβριο 2001 (δίκτυο πλαγκτού WP2, διαγώνια σύρση 50→0m) στο σημείο όπου βρίσκεται η έξοδος του αγωγού του σταθμού της Ψυτάλλειας. Το σημείο δειγματοληψίας θεωρήθηκε αντιπροσωπευτικό του εσωτερικού Σαρωνικού κόλπου. Οι προηγούμενες εργασίες έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στο μεσοζωοπλαγκτό στο εσωτερικό Σαρωνικό κόλπο. Το υλικό της δειγματοληψίας μελετήθηκε σε επίπεδο γένους (Κωπήποδα, Κλαδοκεραιωτά) ή ομάδας (Οστρακώδη, Βυτιοειδή, Κωπηλάτες, Σιφωνοφόρα, Χαιτόγναθοι, Αμφίποδα, Ισόποδα, Σάλπες, Οφιουροειδή και προνύμφες βενθικών οργανισμών). Συλλέχθηκε δείγμα νερού από τα 20 m για μέτρηση χλωροφυλλών, θρεπτικών αλάτων, καροτενοειδών, αιωρούμενης σωματιδιακής ύλης, βιομάζας και οργανικής ύλης μεσοζωοπλαγκτού. Επίσης μετρήθηκε η διαφάνεια.

Αποτελέσματα. Η αιωρούμενη σωματιδιακή ύλη αντιστοιχεί σε 12,9 mg/lit., η οργανική σωματιδιακή ύλη σε 2,3 mg/lit. Η συγκέντρωση των Νιτρικών υπολογίστηκε σε 0,009 mg/lit, των Νιτρικών σε 0,120 mg/lit και των Φωσφορικών σε 0,090 mg/lit. Οι χλωροφύλλες α, β, γ εκτιμήθηκαν σε 0,408, 0,478, 0,978 mg/m³ αντίστοιχα, τα καροτενοειδή σε 0,0646 mg/m³. Η βιομάζα υπολογίστηκε σε 18,52 mg/m³, η οργανική ύλη σε 2,419 mg/m³ και ο αριθμός των ατόμων εκτιμήθηκε σε 3677 άτομα/m³. Τα Κωπήποδα αποτελούσαν το 59,31% του δείγματος με κυρίαρχα γένη τα *Oithona sp* και *Paracalanidae*, ενώ τα Κλαδοκεραιωτά αποτελούσαν το 4,21% με κυρίαρχο γένος το *Penilia sp*. Οι υπόλοιπες ομάδες αντιστοιχούσαν στο 36,48% του δείγματος.

MESOOZOOPLANKTON IN PSITALLIA (SARONIKOS GULF)

Vitzileou K., Diakogeorgakis G., Kampouroglou V., Koukouras S., Podiadis V., Verriopoulos G., Apostolopoulou M.

Dep. Of Zoology – Marine Biology, University of Athens, Athens, 15784

This research is part of the course of Planktonology (Postgraduate Studies in Oceanography). The purpose was to investigate the changes in mesozooplankton 's composition, after the functioning of Psitallia Water purification Station. Equivalent studies took place the years 1999 and 2000.

Methodology. Sampling (WP2 net, diagonal haul 50-0m) was performed in November 2001. The sampling station was situated above the exit of the Psitallia 's pipe. The station was considered to be representative for the inner Saronikos gulf. Previous studies showed that there are not any significant differences in mesozooplankton in inner Saronikos. Mesozooplankton was studied at the genus (copepods, cladocerans) or group level (ostrakods, amphipods, salps, etc). A water sample was taken from 20m depth, in order to estimate chlorophylls, nutrients, suspended matter, zooplankton biomass and organic matter content. Water transparency was also measured.

Results. The suspended inorganic and organic matter was estimated to be 12,9 mg/lit and 2,3 mg/lit respectively. The concentration of the measured parameters were as follows: nitrites 0,009 mg/lit, nitrates 0,120 mg/lit and phosphates 0,090 mg/lit. Chlorophylls α , β , γ were 0,408, 0,478, 0,978 mg/m³ respectively and carotenoids 0,0646 mg/m³. Biomass was 18,52 mg/m³, the organic matter content 2,419 mg/m³ and the number of individuals /m³ was estimated to be 3677. Copepods consist 59,31% of the sample and the dominant genuses are *Oithona sp* and *Paracalanidae*. Cladocerans comprise 4,21% of the sample and the dominant genus is *Penilia sp*. The rest of the groups constitute 36,48 of the sample.

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ, ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ, ΜΑΓΕΙΑ**Γιάννης Γιανναράκης**

Βιολόγος, Διευθυντής της Ιντερνετικής Πύλης in.gr, Δημοσιογραφικός Οργανισμός Λαμπράκη

Στα τέλη του περασμένου αιώνα, στη δεκαετία του 1990, γίναμε μάρτυρες μιας έξαρσης της μελλοντολογίας, της προσπάθειας πρόβλεψης των μελλοντικών εξελίξεων. Η έλευση του 2000 ήταν περισσότερο η αφορμή...

Πολλοί απενίζουν αυτό το μέλλον με φόβο. Η κύρια πηγή του φόβου είναι η ολοένα αυξανόμενη επιτάχυνση των αλλαγών στην περίοδο ανάμεσα στις δύο μεγάλες τεχνολογικές επαναστάσεις της προηγούμενης χιλιετίας: της Βιομηχανικής και της Πληροφορικής. Αυτή η επιτάχυνση είχε οδηγήσει τους επιστήμονες στα τέλη του 20ού αιώνα να υιοθετήσουν ένα παράδειγμα δανεισμένο από την «Αλίκη στη χώρα των θαυμάτων», που έμεινε γνωστό ως το «Φαινόμενο της Κόκκινης Βασίλισσας»: Για να διατηρήσεις τη θέση σου, πρέπει να τρέχεις ολοένα και πιο γρήγορα!

Πολλοί το γέμιζαν με εικόνες από μυθιστορήματα που περιγράφουν την «Τιτανομαχία» μεταξύ ανθρώπων και των μηχανών που ξέφυγαν από τον έλεγχο και απόκτησαν δική τους βούληση. Η πορεία της ανθρωπότητας που περιγράφουν είναι τόσο απαισιόδοξη όσο και η διήγηση του Ησίοδου για τις πέντε πρώτες ανθρώπινες γενιές που καταρρέουν, φθίνοντας ηθικά η μια μετά την άλλη.

Σήμερα ο φόβος για το μέλλον είναι πιο έντονος διότι εστιάζεται στην ενδότερη ουσία της ανθρώπινης ύπαρξης, στη δυνατότητα επέμβασης στο πληροφοριακό σύστημα που δομείται μέσα στο γενετικό υλικό. Ακόμα και πρωτεργάτες της επιστημονικής και τεχνολογικής εξέλιξης, νοιώθουν έναν προμηθεϊκό φόβο μπροστά στο κουτί της σύγχρονης Πανδώρας που εκφράζει ο συνδυασμός της Βιοτεχνολογίας με την Πληροφορική.

Όταν ο Γκόρντον Μουρ διατύπωσε το «νόμο» για το διπλασιασμό της υπολογιστικής ισχύος των επεξεργασιών κάθε δεκαοκτώ μήνες, ελάχιστοι διέκριναν τη σχέση του με τις εξισώσεις ανάπτυξης των βιολογικών σχηματισμών και ακόμα λιγότεροι μπορούσαν να φανταστούν τις επιπτώσεις που θα μπορούσε να έχει, αν άρχιζε να επιδρά σε πολύπλοκα συστήματα, όπως οι ανθρώπινες επικοινωνίες, η διάδοση του λόγου η επιστημονική έρευνα και οι κοινωνίες γενικότερα. Μια μικρή γεύση του τι σημαίνει ταχύτατος πολλαπλασιασμός και εκθετική ανάπτυξη, πήρε η ανθρωπότητα στην τελευταία πενταετία του 20ού αιώνα, όταν αυτό που ξεκίνησε ως «απλή» σύνδεση μεταξύ των ηλεκτρονικών υπολογιστών, ξαφνικά έγινε μια πανίσχυρη δύναμη που μεταμορφώνει το εμπόριο, την επιστήμη, την εκπαίδευση, την ψυχαγωγία, την καταναλωτική συμπεριφορά. Και όπως διαπίστωσε ο Άρθουρ Κλάρκ: «Κάθε επαρκώς προχωρημένη τεχνολογία δεν διακρίνεται από τη μαγεία». Και η μαγεία είναι ιστορικά αποδεδειγμένο ότι έχει τη δυνατότητα να γοητεύει και να φοβίζει στον υπέρτατο βαθμό.

Η απλοϊκή διαπίστωση ότι «Η εξέλιξη των μηχανών είναι πιο γρήγορη από την εξέλιξη των ανθρώπων» έδωσε –για πολλούς– βάση στις προφητείες πως στα μισά του 21^{ου} αιώνα οι αυτόματες μηχανές θα ξεπεράσουν τον άνθρωπο και πιθανά θα γίνουν δυνάστες του. Στις περασμένες δεκαετίες αυτές οι απόψεις έφεραν στο προσκήνιο σοβαρά ηθικά ερωτήματα για τους επιστήμονες και τεχνολόγους. Σήμερα οι προβληματισμοί αποκτούν νέα

διάσταση. Τα ηθικά διλήμματα δεν αφορούν πλέον μόνο την χρήση των αποτελεσμάτων της έρευνας, αλλά βάζουν ερωτηματικά για την ίδια τη σκοπιμότητα της ερευνητικής εργασίας όταν έχει αντικείμενο την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Είναι όμως τα πράγματα τόσο απλά;

Η κοινωνία μας έχει πολλούς λόγους να θεωρεί κάθε ριζοσπαστικό τεχνολογικό επίτευγμα, κάθε επαναστατική επιστημονική μέθοδο σαν κοφτερό μαχαίρι στα χέρια ενός παιδιού. Σαν το μαγικό ραβδί στα χέρια ενός μαθητευομένου μάγου. Που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να κόψει ψωμί αλλά που εξίσου εύκολα μπορεί να προκαλέσει ανεπανόρθωτες καταστροφές στο ίδιο και στους γύρω του. Και επειδή δεν μπορεί να έχει αποδείξεις για την ικανότητα αυτών που κρατούν τα ραβδιά της σύγχρονης μαγείας, εύκολα αντιδρά αρνητικά και βίαια. Κι εδώ χρειάζεται φως, περισσότερο φως, ενημέρωση, εκλαΐκευση και εκπαίδευση, ώστε να γίνουν κατανοητά τα σύγχρονα τεχνολογικά επιτεύγματα και να υπάρχει κοινωνική συναντίληψη γύρω από τα θέματα της επιστημονικής ηθικής και πρακτικής. Μπροστά στην επιστημονική κοινότητα υπάρχει μια νέα πρόκληση, που ίσως αποδειχθεί καταλύτης για τις εξελίξεις του μέλλοντος.

Βρισκόμαστε πραγματικά στην αρχή μιας νέας εποχής όπου η φαντασία του ατομικού νου πολλές φορές ξεπερνιέται από τα δημιουργήματα του *Συλλογικού Νού* της ανθρωπότητας που σαν ένας υπερεγκέφαλος συνενώνει τους «νευρώνες» του με αμέτρητους δίαυλους επικοινωνίας. Ένας υπερεγκέφαλος που ταυτόχρονα εξελίσσει ταχύτατα το πρωτόκολλο των σημάτων του περνώντας από τον προφορικό λόγο στον γραπτό και από τον γραπτό στον «άμεσο», που δεν εξαρτάται από το μέσο ούτε έχει πρακτικό περιορισμό στην ταχύτητα διάδοσης. Το πόσο μπορεί να εξελιχθεί ένας τέτοιος υπερεγκέφαλος, σίγουρα αποτελεί θέμα για ένα ενδιαφέρον μυθιστόρημα επιστημονικής φαντασίας. Ένα μυθιστόρημα που το πρώτο του κεφάλαιο γράφτηκε το 1937 από τον Χέρμπερτ Τζώρτζ Ουέλς, με τίτλο «Ο Παγκόσμιος Εγκέφαλος: Η ιδέα μιας μόνιμης παγκόσμιας εγκυκλοπαίδειας». Αξίζει να θυμόμαστε ένα απόσπασμα: "Δεν υπάρχει πρακτικό εμπόδιο στην δημιουργία ενός εύχρηστου καταλόγου όλης της ανθρώπινης γνώσης, των επιτευγμάτων, των εικόνων και των ιδεών, στην κατασκευή με άλλα λόγια, μιας πλανητικής μνήμης για όλη την ανθρωπότητα. Ίσως μάλιστα να μην είναι απλός κατάλογος αλλά το ίδιο το πράγμα σε μία άλλη μορφή, που θα μπορεί να προσπελαστεί από οποιοδήποτε σημείο της γης. Κάτι τέτοιο θα είναι γεγονός τρομαχτικής σημασίας, μπορεί να προδιαγράψει μια πραγματική διανοητική ενοποίηση όλης της φυλής μας. Όλη η ανθρώπινη μνήμη θα είναι διαθέσιμη σε συντομότερο χρόνο σε κάθε ξεχωριστό άτομο. Και το πιο σημαντικό απ' όλα: ένα τέτοιο αρχείο δεν κινδυνεύει από καμία καταστροφή. Θωρακίζεται απόλυτα, καθώς πρόκειται να υπάρξουν ακριβή αντίγραφα στο Περού, την Κίνα, την Ισλανδία, την Κεντρική Αφρική ή και πουθενά συγκεκριμένα. Θα συγκεντρώνει την οργάνωση του εγκεφάλου ενός ανώτερου θηλαστικού με την αποκεντρωμένη ζωτικότητα της αμοιβάδας."

Αυτό που τότε έμοιαζε μαγικό και αδύνατο, είναι η σημερινή πραγματικότητα του Ιντερνετικά συνδεδεμένου πλανήτη και είναι όντως ένα γεγονός τρομαχτικής σημασίας όπως προέβλεπε ο Ουέλς.

<p>EYPETHPIO INDEX</p>
--

Aguilera, J., 281, 282
Ballesta, J-P. G., 139, 140
Barbanti-Brodano, G., 112, 113
Circolo, A., 169, 170
Courty, J., 241, 242
Figuroa, F.L., 281, 282
Garnier, G., 169, 170
Kaptein, R., 102, 103
Kilpatrick, M., 62, 63
Morelli, C., 112, 113
Ostfold A-C., 68, 69
Pancucci-Παπαδοπούλου, A., 90, 91
Robert-Nicoud, M., 200, 201
Santos, C., 139, 140
Sanz-Ezquerro, J.J., 66, 67
Suchentrunk, F., 258, 259
Tickle, C.A. 66, 67
Tiedtke, A., 54, 55
Wever, R., 155, 156
Winans, S.C., 226, 227
Xavier Niell, F., 281, 282

A

Αβραμίδης Ν., 229, 230
Αγγελίδης Χ., 191, 192
Αγγελοπούλου Β., 52, 53, 68, 69, 214, 215
Αδαμοπούλου Χ., 1, 2
Αθανασόπουλος Α., 3, 4
Αλαχιώτης Σ., 176, 177, 193, 194
Αλεπόρου Β., 52, 53, 68, 69, 214, 215
Ανασοντζής Γ.Ε., 5, 6
Αναστασιάδου Κ., 237, 238
Αντωνάκη Ε., 7, 8
Αντωνέλου Μ.Χ., 9, 10
Αποστολάκος Π., 137, 138
Αποστολίδης Α.Π., 116, 117, 123, 124
Αποστολίδου Α., 237, 238
Αποστολοπούλου Μ., 11,12, 306, 307

Αρβανίτης Δ., 295, 296
Αρσένου Ε., 13, 14, 15, 16, 106, 107, 108, 109, 110, 111
Αυγουστίνος Α., 17, 18, 262, 263

B

Βάγιας Κ., 235, 236
Βαλάκος Ε.Δ., 264, 265
Βασιλάκη Ν., 19, 20
Βασιλάκου Μ., 21, 22
Βασιλόπουλος Α., 23, 24
Βασιλόπουλος Δ.,
Βεζυράκη Π., 92, 93, 191,192
Βεϊνή Μ., 66, 67
Βελέντζας Α.Δ., 25, 26
Βενέτη Ζ., 72, 73
Βερροϊόπουλος Γ., 306, 307
Βικάτου Ο., 239, 240
Βικτωράτος Π., 143, 144
Βιτζηλέου Κ., 305, 306
Βολανάκης Ι., 169, 170
Βοργιάς Κ.Ε., 105
Βοπέας Β., 21, 22
Βουτσάς Ι.Φ., 187, 188
Βουτσινάς Γ., 237, 238

Γ

Γαϊτανάκη Κ., 23, 24, 27, 28, 29, 30, 131, 132, 264, 265
Γαλανοπούλου Ντ., 54, 55
Γαλάτης Β., 137, 138
Γεωργάκα Ε., 33, 34
Γεωργιάδης Χ., 88, 89
Γεωργίου Μ., 35, 36
Γιάγκου Μ., 143, 144, 229, 230
Γιακουμάκη Α., 37
Γιανναράκης Γ. 308, 309
Γιαννάκας Ν., 38, 39

Γιαπιτζάκης Χ., 60, 61
 Γκάνιας Θ.Κ., 31, 32
 Γκόνος Στ., 40, 41
 Γκουντέλα Σ., 42, 43
 Γκουντοπούλου Α., 135, 136
 Γκούρτσα Β., 44, 45
 Γκούρτσας Κ., 289, 290
 Γκριτζάπης Α.Δ., 185, 186, 187, 188
 Γουρδή Μ.Χ., 46, 47
 Γούτας Ν., 295, 296

Δ

Δάβανος Ν., 48, 49
 Δάβαρης Π., 135, 136, 174, 175
 Δαρμογιάννη Α., 50, 51, 56, 57
 Δελη Χ., 52, 53
 Δελη Δ., 54, 55
 Δεληβόπουλος Σ.Γ., 279, 280, 281, 282
 Δεληγιαννίδης Π., 222, 223
 Δέλτας Κ., 21, 22, 304, 305
 Δεμερτζής Μ., 43, 44, 44, 45
 Δεμπονέρα Έ., 50, 51, 56, 57
 Δημοπούλου Κ., 58, 59
 Διακίδη-Κώστα Α., 60, 61
 Διακογεωργάκης Γ., 306, 307
 Διαλλινάς Γ., 42, 43, 74, 75, 141, 142,
 216, 217, 218, 219
 Διαμαντόπουλος Ι.Γ., 297, 298
 Δίππας Α., 106, 107, 108
 Δολαψάκης Ν., 62, 63
 Δρέσιος Ι., 195, 196
 Δροσοπούλου, Γ., 66, 67
 Δροσοπούλου Ε., 17, 18, 64, 65, 121,
 122, 145, 146
 Δρόσος Γ., 68, 69

Ε

Ευαγγέλου Α., 92, 93
 Ευθυμιόπουλος Σ., 67, 68, 70, 71

Ευταξία Σ., 254, 255

Ζ

Ζαγρής Ν., 37
 Ζαμπάλου, Σ. 69, 70, 72, 73
 Ζαρκάδης Ι.Κ., 33, 34, 205, 206
 Ζαφειράτος Κ., 283, 284
 Ζαχαροπούλου Α., 17, 18, 262, 263
 Ζενέτου Α., 90, 91
 Ζερβού Δ., 74, 75
 Ζηρογιάννης Π., 304, 305
 Ζολώτα Ζ., 76, 77, 78, 79
 Ζουγανέλης Γ., 35, 36
 Ζουμπουρλής Β., 80, 81
 Ζωμενή Μ., 82, 83

Η

Ηλιόπουλος Η., 220, 221, 224, 225
 Ηλιόπουλος Κ., 84, 85

Θ

Θεοδωροπούλου Β., 86, 87, 98, 99
 Θεοδώρου Α., 31, 32
 Θεολογίδης Π., 88, 89
 Θεολογίδης Χ., 88, 89
 Θεσσαλού-Λεγάκη Μ., 90, 91
 Θωμάς Χ., 92, 93
 Θωμόπουλος Γ.Ν., 58, 59, 161, 162

Ι

Ιακωβίδου Ζ., 13, 14, 15, 16, 44, 45,
 106, 107, 108, 109, 110, 111

Κ

Καγιάς Κ., 141, 142
 Κάκουλλου Ν., 127, 128

- Καλαϊτζής Σ.Χ., 260, 261
Καλαμβόκη Μ., 94, 95
Καλιάφας Α., 7, 8
Καλλιαμπάκου Κ., 96, 97
Καλμαντή Δ., 86, 87, 98, 99
Καλογεροπούλου Θ., 23, 24
Καλογιάννη Μ., 76, 77, 78, 79, 100, 101, 207, 208, 244
Καλοδήμος Γ.Χ., 102, 103
Καλπαξής Δ.Λ., 209, 210
Καλφακάκου Β., 92, 93
Καμπούρογλου Β., 306, 307
Καναβέτας Π., 104
Κανάρη Ν., 104
Κανδρή Ν., 105
Καπράνος Ν., 237, 238
Καραγιάννη Β., 13, 14, 15, 16, 44, 45, 106, 107, 108, 109, 110, 111
Καραγιάννη Ε., 112, 113, 114, 115
Καραγκούνη Α.Δ., 3, 4, 118, 119, 204
Καραϊσκου Ν., 116, 117
Καραμπάτσου Α., 118, 119
Καραπασχαλίδου Αμαλία Αν., 120
Καρπουχτσής Ι., 64, 65, 121, 122
Κασπαριάν Κ., 21, 22
Κατάκη Α., 60, 61
Κατινάκης Π., 129, 130
Κατσάμπας Α., 237, 238
Κατσαρές Β., 123, 124, 222, 223
Κατσιβέλα Ε., 125, 126
Κατσούλας Χ., 127, 128, 185, 186, 187, 188
Κατσώρης Π., 241, 242
Κατσώρχης, Θ., 88, 89
Κενούτης Χ., 129, 130
Κεραμάρης Κ.Ε., 46, 47
Κεφαλογιάννη Ε., 131, 132
Κίλιας Γ., 176, 177, 193, 194
Κινινής Μ., 133, 134
Κίπας Χ., 214, 215, 293, 294, 295, 296
Κόβαλα-Δεμερτζή Δ., 44, 45
Κοιλιάκου Σ., 135, 136
Κόκκα Ε., 237, 238
Κολιάκος Γ., 76, 77, 78, 79, 100, 101
Κολιάρη Β., 139, 140
Κόμης Γ., 137, 138
Κομητοπούλου Κ., 133, 134, 165, 166
Κουβάτση Α., 116, 117, 123, 124
Κουγιανού-Κουτσούκου Σ., 139, 140
Κουκάκη Μ., 141, 142, 216, 217
Κούκουρας Σ., 306, 307
Κουλάδη Μ., 231, 232, 233, 234
Κουλούκουσα Μ., 214, 215
Κουρκουμέλης Ν., 44, 45
Κουρουνάκη Α., 143, 144, 229, 230
Κουρουνάκης Π., 143, 144
Κουρτίδης Α., 145, 146
Κουσουλάκος Σ., 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154
Κουσουλάκου, Δ., 151, 152, 153, 154
Κουσελίνης Α., 35, 36, 197, 198
Κουσικόπουλος Κ., 31, 32
Κουτσός Αν., 268
Κουτσουρέα Α., 13, 14, 15, 16, 106, 107, 108, 109, 110, 111
Κουφάκη Μ., 23, 24
Κυριλλή Μ.Δ., 211
Κωλέπη Φ., 13, 14, 15, 16
Κωνσταντή Ο., 155, 156, 157, 158
Κωνσταντινίδης Θ., 159, 160
Κωνσταντουλάκης Μ., 60, 61
Κώστα Α., 161, 162
Κωσταρόπουλος Ι., 98, 99
Κώτσης Α., 289, 290
- Λ**
- Λάγια, Α., 163, 164
Λαγός Δ.Ι., 133, 134, 165, 166
Λαγωνικάκος Ν., 109, 110, 111
Λαζαρίδης Ι., 191, 192

Λαζαρίδου-Δημητριάδου Μ., 5, 6
Λάζου Α., 167, 168
Λάμνισου Κ., 21, 22, 304, 305
Λαμπρινουδάκης Β., 35, 36
Λαμπροπούλου Μ., 38, 39, 256, 257
Λάμπρου Ε., 256, 257
Λεγάκις Α., 1, 2
Λεονταρίτης Γ., 54, 55
Λιακόπουλος Θ.Δ., 183, 184
Λιάκος Π., 100, 101
Λιγυδιστιανού Χ., 169, 170
Λούης Κίτσος, 171, 172, 268, 269
Λουμπουρδής Ν., 86,87, 98,99,173
Λυσιώτης Δ., 88, 89

M

Μαζμανιάν Ν., 174, 175
Μαϊστρος Α.Δ., 176, 177
Μακροπούλου Π., 178, 179
Μαλούχου-Γκρίμπα Β., 88, 89
Μαμούρης Ζ., 258, 259
Μανδήλης Δ., 80, 81
Μανιάτης Γ.Μ., 48, 49, 112, 113, 114, 115
Μανώλης Σ.Κ., 84, 85, 163, 164, 239, 240, 283, 284
Μαραθεύτης Χ., 21, 22, 304, 305
Μαργαρίτης Λ.Χ., 9, 10, 25, 26, 46, 47, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 180, 181, 199, 200, 201, 212, 213, 271, 272
Μαργέτης Π., 180, 181
Μαργωμένου Λ., 127, 128
Μαριδάκη Κ., 182
Μαρίνος Ε., 214, 215, 293, 294, 295, 296
Μαρκουλάτος Π., 248, 249, 250, 251, 252, 253
Μαρμάρας Β.Ι., 256, 257
Μαρμάρη Α., 131, 132

Μαθιόπουλος Κ., 17,18, 262,263
Μαυραγάνη-Τσιπίδου Π., 17, 18, 64, 65, 121, 122
Μαυρομαρά Π., 19, 20, 94, 95, 96, 97
Μαχιάς Α., 31, 32
Μεθενίτη Α., 256, 257
Μεϊντάνης Χ., 3, 4
Μεσσήνη-Νικολάκη Ν., 104, 182, 301
Μιόγλου Ε., 13, 14, 15, 16, 44, 45, 106, 107, 108, 109, 110, 111
Μιχαλόπουλος Ν., 135, 136, 174, 175
Μουρελάτος Δ., 13, 14, 15, 16, 44, 45, 106, 107, 108, 109, 110, 111
Μπάγκος Π.Γ., 183, 184
Μπαντέκας Χ., 95, 96, 100, 101
Μπαξεβάνης Κ., 127, 128, 185, 186, 187, 188
Μπάρλας, Π., 48, 49
Μπέης Ι. 29, 30, 131,132
Μπεκρής Σ., 191,192, 127,128, 187, 188
Μπερέτσος Π., 189, 190
Μποζιδης Π., 191, 192
Μπόκαρη Α.Α., 211
Μπουγά Μ., 176, 177, 193, 194
Μπουγιούκος Κ., 228, 245
Μπουζιάνης Π., 195, 196
Μπούρτζης Κ., 72, 73
Μωραϊτης Κ., 197, 198

N

Ναστόπουλος Β., 33, 34
Νέζης Ι.Π., 199, 200, 201
Νεοφύτου Ε.Π., 260, 261
Νικολαΐδης Ν., 121, 122, 145, 146, 161, 162
Νικολαΐδου Α., 202, 203
Νικολακοπούλου Θ., 118, 119, 204
Νικολακοπούλου Κ., 205, 206
Νικολαρόπουλος Σ., 13, 14, 15, 16, 106, 107, 108, 109, 110, 111

Νιγιός Γ., 52, 53, 68, 69
Νταϊλιάνης Σ., 207, 208
Ντόκορου Β., 44, 45

Ξ

Ξαπλαντέρη Μ., 209, 210

Ο

Οικονομίδου Β.Α., 211
Οικονόμου-Αμίλλη Α., 62, 63

Π

Παγκούνη Α., 237, 238
Παναγιώτου Γ., 127, 128
Παναγόπουλος Δ.Ι., 212, 213
Παναγοπούλου Ε., 214, 215
Πανόπουλος Π., 159, 160, 195, 196
Πανταζόπουλος Ν., 21, 22
Πανταζοπούλου Α., 216, 217
Παντής Ι.Δ., 82, 83, 266, 267, 297, 298
Παπαγεωργίου Γ., 218, 219
Παπαγρηγοράκης Μ., 283, 284
Παπαδημητρίου Ε., 241, 242
Παπαδόπουλος Γ.Κ., 224, 225
Παπαευαγγελίου Δ., 80, 81
Παπαζαφείρη Π., 23, 24, 200, 201
Παπαθανασοπούλου Α., 220, 221
Παπακώστας Σ., 222, 223
Παπαμιχαήλ Μ., 127, 128, 185, 186, 187, 188
Παπανδρέου Ν., 224, 225
Παπασάββα Π., 80, 81
Παπασιδέρη Ι.Σ., 9, 10, 180, 181
Παπασπύρου Σ., 90, 91
Παπασωτηρόπουλος Β., 176, 177
Παπαχατζοπούλου Α., 178, 179
Παππά Κ.Μ., 226, 227
Παταργιάς Θ., 52, 53, 68, 69

Πατσούρης Ε., 174, 175
Παυλίδης Π., 228, 245
Παυλικάκη Χ., 72, 73
Παφίλης Π., 264, 265
Πέντζου – Δαπόντε Α., 260, 261, 299, 300
Περούλης Ν., 143, 144, 229, 230
Πεταλά Μ., 5, 6
Πετράκης Π.Β., 231, 232, 233, 234, 235, 236
Πετράκου Ε., 237, 238
Πετρουτσά Ε., 163, 164, 239, 240
Πίντζας Α., 80, 81
Πιπεράκης Σ.Μ., 104, 105, 182, 301
Πλουμή Κ., 222, 223
Ποδιάδης Β., 306, 307
Πολυκράτης Α., 241, 242
Πορίχη Α.-Ε., 243

Ρ

Ράγια Β., 244
Ριζοπούλου Σ., 3, 4, 74, 75
Ρογδάκης Ε., 129, 130
Ρούσσης Β., 233, 234, 235, 236

Σ

Σαέπα Α., 135, 136, 174, 175
Σακελλαρόπουλος Γ.Π., 5, 6
Σαλίχος Λ., 228, 245
Σαμαράς Π., 5, 6
Σαρειδάκης Ε., 246, 247
Σγαρδέλης Σ.Π., 82, 83
Σιαφάκας Ν., 248, 249, 250, 251, 252, 253
Σκούρας Ζ.Γ., 64, 65, 121, 122, 145, 146
Σκύρας Ά., 254, 255
Σολακίδη Σ., 80, 81
Σολδάτος Α.Ν., 38, 39, 256, 257
Σουλιτζή Ν., 37

Σούρδης Ι., 228, 245
 Σοφianoπούλου Β., 218, 219
 Σπάθας Δ.Χ., 48, 49, 112, 113, 114, 115
 Σπηλιοπούλου Χ., 197, 198
 Σταθοπούλου Κ., 29, 30
 Στάικος Γ., 304, 305
 Σταμάτης Κ., 258, 259
 Σταματίου Δ.Γ., 260, 261
 Σταυρίδου, Χ. 29, 30
 Στεφάνου Μ., 143, 144
 Στραβοπόδης Δ., 200, 201
 Στρατηγός Α., 237, 238
 Στρατικόπουλος Η., 17, 18, 262, 263
 Σύμπουρα Ν., 90, 91, 202, 203
 Συνετός Δ., 159, 160, 195, 196
 Σφουγγάρης Α.Ι., 258, 259
 Σωζόπουλος Η., 264, 265
 Σωμαράκης Σ., 31, 32
 Σωτηριάδου Κ., 218, 219

T

Τάφας Τ., 62, 63
 Τζαβάρας Θ., 254, 255
 Τζάλλας Σ., 191, 192
 Τογρίδου Α.Σ., 266, 267
 Τοπάλης Π., 268
 Τουρναβίτη Σ., 141, 142
 Τραχανά Β., 100, 101
 Τριανταφυλλίδης Κ., 116, 117, 123, 124, 222, 223, 269, 270
 Τριανταφυλλίδης Α., 116, 117, 123, 124, 222, 223
 Τριγώνης Σ., 304, 305
 Τρουγκάκος Ι.Π., 214, 215, 271, 272
 Τσαπικούνης Φ., 273, 274
 Τσέκος Ι., 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282
 Τσιατάς Μ., 127, 128
 Τσίγκα Α., 222, 223
 Τσιλιβάκος Μ., 283, 284

Τσιλιμιγκάκη Σ., 104, 105, 182, 301
 Τσιλιμπάρη Ε.Κ., 285, 286, 287, 288
 Τσίντζουρας Σ., 233, 234
 Τσιτσιλώνη Ο., 127, 128, 185, 186, 187, 188

Φ

Φασσέας Κ., 50, 51, 56, 57
 Φιλίππου Μ., 50, 51, 56, 57
 Φλεβάρης Χ., 301
 Φουντουλάκης Γ., 239, 240
 Φουστέρης Μ., 13, 14, 15, 16, 106, 107, 108, 109, 110, 111
 Φραγκούλης Εμμ., 291, 292
 Φράγκου-Μασουρίδου Ε., 289, 290

X

Χαβάκη Σ., 293, 294, 295, 296
 Χαιριστανίδης Σ.Ν., 297, 298
 Χαμόδρακας Σ.Ι., 183, 184, 211
 Χαριζάνης Π., 193, 194, 243
 Χατζή Β., 145, 146
 Χατζηπέτρου Λ., 143, 144, 229, 230
 Χατσατριάν Λ., 299, 300
 Χινηήρογλου, Χ., 82, 83, 145, 146
 Χριστιάς Χ., 273, 274
 Χριστοδούλου Βλ., 222, 223
 Χριστοδούλου Χ., 38, 39, 256, 257
 Χριστόπουλος Γ., 301
 Χριστόπουλος Θ., 302, 303
 Χριστοφίδου Ε., 237, 238
 Χρυσάνθης Γ., 7, 8

Ψ

Ψαρά Ε., 304, 305
 Ψαρίδη Λ., 96, 97
 Ψαρρά, Α-Μ., 58, 59