



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Εργαστήριο Φαρμακολογίας

Διευθυντής: Καθηγητής Νίκος Σακελλαρίδης

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΔΕΥΤΕΡΩΝ ΑΓΓΕΛΙΟΦΟΡΩΝ ΣΤΙΣ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΜΑΘΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΝΗΜΗΣ ΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ.
ΜΟΡΙΑΚΗ – ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ
ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ**

Στυλιανή Κ. Ζησοπούλου

Διδακτορική Διατριβή

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΔΕΥΤΕΡΩΝ ΑΓΓΕΛΙΟΦΟΡΩΝ ΣΤΙΣ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΜΑΘΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΝΗΜΗΣ ΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ.
ΜΟΡΙΑΚΗ – ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ
ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ**

Στυλιανή Κ. Ζησοπούλου, M.D, M.Sc

Ειδική Νευρολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2011

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

Καθηγητής Νίκος Σακελλαρίδης, M.D.,Ph.d

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής
Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή
των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Σακελλαρίδης Νίκος, M.D., Ph.d

Καθηγητής Φαρμακολογίας

Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μάγκουρα Δήμητρα, M.D., Ph.d

Ερευνήτρια Βαθμίδος Α΄

Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Πισίκας Νικόλαος, Ph.d

Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας

Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τα Μέλη της Επταμελούς Επιτροπής Κρίσης της διδακτορικής διατριβής, όπως ορίσθηκαν από τη Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύθεσης του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στην 6^η / 29-06-2011 συνεδρίασή της:

Σακελλαρίδης Νικόλαος
Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μάγκουρα Δήμητρα
Ερευνήτρια Βαθμίδος Α΄
Ινστιτούτο Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Πιτσικας Νικόλαος
Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κουκούλης Γεώργιος
Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παπαδημητρίου Αλέξανδρος
Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τσέζου Ασπασία
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βασιλάκη Άννα
Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πλήρες Βιογραφικό Σημείωμα

Γεννήθηκα στην Αθήνα το Μάιο του 1975.

Τον Ιούνιο του 1993 αποφοίτησα από το 6^ο Γενικό Λύκειο Λάρισας.

Τον Ιούλιο του 2000 έλαβα το **Πτυχίο Ιατρικής** από την *Ιατρική Σχολή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης* με βαθμό «Λίαν Καλώς, 8».

Το Δεκέμβριο του 2004 έλαβα τον **Μεταπτυχιακό Τίτλο Σπουδών στο αντικείμενο «Βασικές Νευροεπιστήμες»** από την *Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης* με βαθμό «Άριστα».

Τον Αύγουστο του 2011 έλαβα τον τίτλο του **Ειδικού Νευρολόγου** από την Γ' Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική του *Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης*.

Διατελώ υποψήφια διδάκτορας στο *Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας* με διευθυντή τον καθηγητή Φαρμακολογίας, κ. Νίκο Σακελλαρίδη.

Διαμένω στη Λάρισα και είμαι παντρεμένη με τον ψυχίατρο Βασίλειο Ντίνα.

Οι δημοσιευμένες εργασίες κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής είναι οι ακόλουθες:

1. Nikolaos Pitsikas, Stavroula Tsitsirigou, Styliani Zisopoulou, Nikolaos Sakellaridis. The 5-HT_{1A} receptor and recognition memory Possible modulation of its behavioral effects by the nitreergic system, *Behavioural Brain Research* 159(2005) 287–293
2. Nikolaos Pitsikas, Styliani Zisopoulou, Nikolaos Sakellaridis. Nitric Oxide Donor Molsidomine Attenuates Psychotomimetic Effects of the NMDA Receptor Antagonist MK-801, *Journal of Neuroscience Research* 84 (2006):299–305
3. Nikolaos Pitsikas, Styliani Zisopoulou, Petros A. Tarantilis, Charalabos D. Kanakis, Moschos G. Polissiou, Nikolaos Sakellaridis. Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins on recognition and spatial rats' memory, *Behavioural Brain Research* 183 (2007) 141–146
4. Nikolaos Pitsikas, Styliani Zisopoulou, Ioannis Pappas, Nikolaos Sakellaridis. The selective 5-HT₆ receptor antagonist Ro 04-6790 attenuates psychotomimetic effects of the NMDA receptor antagonist MK-801, *Behavioural Brain Research* 188 (2008) 304–309

Στον πατέρα μου, για όλα αυτά που μου ενέπνευσε...

Στη μητέρα μου, για όλα αυτά που μου απαγόρευσε...

Στο σύζυγό μου, για όλα αυτά που θα έρθουν...

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΔΕΥΤΕΡΩΝ ΑΓΓΕΛΙΟΦΟΡΩΝ ΣΤΙΣ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΜΝΗΜΗΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ.
ΜΟΡΙΑΚΗ – ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ
ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ**

Στυλιανή Κ. Ζησοπούλου, M.D, M.Sc

Εργαστήριο Φαρμακολογίας

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λάρισα, 2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Γενικό Μέρος

A. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	1
1. Η ΜΝΗΜΗ.....	1
1.1. Τα Είδη Της Μνήμης.....	1
1.1.1. Βραχυπρόθεσμη Μνήμη.....	2
1.1.2. Λειτουργική Μνήμη.....	2
1.1.3. Μακροπρόθεσμη Μνήμη.....	4
1.1.3.1. Μη Δηλωτική Μνήμη.....	4
1.1.3.2. Δηλωτική Μνήμη.....	5
1.1.3.3. Αναγνωριστική Μνήμη.....	7
1.2. Αναγνωριστική Μνήμη Αντικειμένου.....	9
1.3. Ανατομικό Υπόστρωμα Της Μνήμης	11
1.3.1. Ανατομία Της Μη Δηλωτικής Μνήμης.....	11
1.3.2. Ανατομία Της Δηλωτικής Μνήμης.....	11
1.4. Ο Ιππόκαμπος.....	12
1.4.1. Ανατομική Περιγραφή Του Σχηματισμού Του ιππόκαμπου.....	14
1.4.2. Ιππόκαμπος Και Μνήμη.....	16
1.4.2.1. Τα Ενδορρινικά - Ιπποκάμπεια Κυκλώματα Ενισχύουν Την Επιλογή Σημαντικών Πληροφοριών.....	16
1.4.2.2. Φλοιϊκές Και Υποφλοιϊδεις Συνδέσεις Του Ιππόκαμπου Με Τα Αισθητηριακά Κυκλώματα.....	20

1.5. Μακροχρόνια Ενδυνάμωση (LTP).....	22
1.5.1. Χαρακτηριστικά Της Μακροχρόνιας Ενδυνάμωσης.....	23
1.6. Πιθανοί Μοριακοί Μηχανισμοί Που Εμπλέκονται Στις Διαδικασίες Μάθησης Και Μνήμης.....	24
1.6.1. Ευαισθητοποίηση Του αντανακλαστικού Απόσυρσης Του Βραγχίου Στην Aplysia: Μια Βασική Μορφή Αποθήκευσης Της Μη Δηλωτικής Μνήμης	25
1.6.2. Περιγραφή Των Μοριακών Μηχανισμών Της Δηλωτικής Μνήμης.....	32
1.6.2.1. Πως Παράγεται Το LTP.....	32
1.6.3. Συνολική Εκτίμηση Των Μοριακών Μηχανισμών Αποθήκευσης Της Μνήμης.....	36
2. Η ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΚΙΝΑΣΗ C.....	40
2.1. Η Οικογένεια Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C.....	41
2.2. Οι Ισομορφές Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C.....	42
2.3. Δομή Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C.....	45
2.3.1. Η Ρυθμιστική Περιοχή Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C.....	45
2.3.2. Η Περιοχή Του Ψευδοϋποστρώματος.....	47
2.3.3. Η Καταλυτική Περιοχή Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C.....	48
2.3.3.1. Εναρκτήριες Φωσφορυλιώσεις στις PKCs.....	50
2.3.3.2. Φωσφορυλιώσεις Σερίνης/Θρεονίνης στις nPKCs.....	52
2.3.3.3. Τα Υπολείμματα Τυροσίνης Της Καταλυτικής Περιοχής Του Ενζύμου.....	53
2.3.3.4. Τα Χαρακτηριστικά Της Καταλυτικής Περιοχής Τα Οποία Διαφοροποιούν Τις aPKCs Από Τις cPKC/nPKC Ισομορφές.....	53

2.3.4. Η Περιοχή V3 Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C.....	54
2.3.5. Η Περιοχή V3 Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C.....	54
2.4. Ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσης C.....	55
2.4.1. Αλληλεπιδράσεις Πρωτεΐνης – Πρωτεΐνης. Υποδοχείς Για Την Ενεργοποιημένη C Κινάση.....	57
2.5. Πεπτίδια Μετατρεπτικά Της Κατάστασης Ενεργοποίησης Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C.....	62
2.5.1. Ανακάλυψη Των Μετατρεπτικών Πεπτιδίων Της Κατάστασης Ενεργοποίησης Της PKC.....	64
2.5.2. Η Λογική Σχεδιασμού Εκλεκτικών Για Κάθε Ισοένζυμο Ανταγωνιστικών Αναστολέων Της Σηματοδοτικής Οδού Της PKC.....	64
2.5.3. Η λογική Σχεδιασμού Εκλεκτικών Για Κάθε Ισοένζυμο Αλλοστερικών Αγωνιστών Της Σηματοδοτικής Οδού Της PKC.....	66
2.5.4. Το Μεταφορικό Tat Πεπτιδιο. Αναστρέψιμη Σύνδεση Με Τα Μετατρεπτικά Της Κατάσταση Ενεργοποίησης Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Πεπτίδια.....	67
2.5.5. Μετατρεπτικά Της Κατάσταση Ενεργοποίησης Της Ισομορφής ε Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Πεπτίδια.....	69
2.6. Πρωτεϊνική Κινάση C Και Μνήμη.....	71
2.6.1. Η Πρωτεϊνική Κινάση C - Μνήμη Και Διαταραχές Αυτής.....	73
2.6.2. Η Ισομορφή ε Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Και Η Μνήμη.....	77
3. ΤΟ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (NO).....	78
3.1. NO Συνθάση.....	78
3.2. Χημικές Ιδιότητες Του NO Που Σχετίζονται Με Τη Βιολογία Του.....	79

3.3. NO - Μάθηση Και Μνήμη.....	79
3.4. NO Και Ο Ρόλος Του Ως Ανάδρομος Αγγελιοφόρος.....	80
3.5. Ο Ρόλος Του NO Στο LTP.....	81
3.6. Μολισδομίνη.....	83
3.7. Το MK-801 - Εκλεκτικός Ανταγωνιστής Των NMDA Υποδοχέων.....	84
 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
B. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	87
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ.....	87
5. ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	88
6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ C ΚΑΙ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ ΣΤΟΝ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟ ΕΠΙΜΥΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΝΔΟΪΠΠΟΚΑΜΠΕΙΑ ΕΓΧΥΣΗ ΤΟΥ ΜΗ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗ ΡΜΑ.....	92
6.1. Βιοχημικές Τεχνικές – Προετοιμασία Ιστού Για SDS-PAGE Και Ανοσοτυπωση Κατά Western	92
6.1.1. SDS-mPAGE - Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών.....	93
6.1.2. Τεχνική Ανοσοαποτύπωσης Κατά Western.....	95
6.2. Ανοσοϊστοχημικές Μελέτες.....	96
6.2.1. Έλεγχος Της Ορθότητας Τοποθέτησης Των Μικροσωληνίσκων Στην Περιοχή Του Ιππόκαμπου Με Την Τεχνική Χρώσης Νευρώνων Κατά Nissl.....	98
6.2.2. Έλεγχος Της Περιοχής Διάχυσης Των Εγχυόμενων Μέσω Της Κάνουλας Ουσιών Με Ενδοϊπποκάμπια Έγχυση Κυανού του Μεθυλενίου.....	98
6.2.3. Μικροσκοπία.....	100
7. ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	101

7.1. Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.....	101
7.1.1. Πειραματική Διάταξη.....	102
7.1.2. Πειραματική Διαδικασία.....	103
7.1.3. Εξερευνητική Δραστηριότητα Και Παράμετροι Προς Αξιολόγηση.....	104
7.2 Φαρμακολογικοί Παράγοντες.....	105
7.2.1. Έλεγχος Της Επίδρασης Των Μετατρεπτικών Της Κατάστασης Ενεργοποίησης Της Πρωτίνικης Κινάσης C Πεπτιδίων Στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου Σε Επίμυες.....	105
7.2.2. Έλεγχος Της Ικανότητας Του Δότη Μονοξειδίου του Αζώτου, Μολσιδομίνη, Να Ανταγωνίζεται Τα Ελλείμματα Μνήμης Που Προκαλεί Ο Ανταγωνιστής Των NMDA Υποδοχέων, MK-801, Στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου Σε Επίμυες.....	106
7.3. Σχεδιασμός Πειραμάτων.....	106
7.3.1. Έλεγχος Της Επίδρασης Των Μετατρεπτικών Της Κατάστασης Ενεργοποίησης Της Πρωτίνικης Κινάσης C Πεπτιδίων Στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου Σε Επίμυες.....	106
7.3.2. Έλεγχος Της Ικανότητας Του Δότη Μονοξειδίου του Αζώτου, Μολσιδομίνη, Να Ανταγωνίζεται Τα Ελλείμματα Μνήμης Που Προκαλεί Ο Ανταγωνιστής Των NMDA Υποδοχέων, MK-801, Στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου Σε Επίμυες.....	111
7.4. Ανάλυση Αποτελεσμάτων.....	111
7.4.1. Έλεγχος Της Επίδρασης Των Μετατρεπτικών Της Κατάστασης Ενεργοποίησης Της Πρωτίνικης Κινάσης C Πεπτιδίων Στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου Σε Επίμυες.....	111
7.4.2. Έλεγχος Της Ικανότητας Του Δότη Μονοξειδίου του Αζώτου, Μολσιδομίνη, Να Ανταγωνίζεται Τα Ελλείμματα Μνήμης Που Προκαλεί Ο Ανταγωνιστής Των NMDA Υποδοχέων, MK-801, Στη Νέα Δοκιμασία Αναγνώρισης Αντικειμένου Σε Επίμυες.....	113

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	115
8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΕΠΙΜΥΑ.....	115
8.1. Απεικόνιση Της Παρουσίας Των Ισομορφών Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Στον Ιππόκαμπο Επίμυα.....	115
8.1.1. Απεικόνιση Των Ισομορφών Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Στον Ιππόκαμπο Επίμυα Με Χρήση Ανοσοϊστοχημικής Μεθόδου.....	115
8.1.2. Απεικόνιση Με Ανοσοαποτύπωση Κατά Western Των Ισομορφών Της PKC Με Χρήση Της Μεθόδου Της Υποκυτταρικής Κλασμάτωσης Σε Ομογενοποιημένα Ιππόκαμπου Επίμυα.....	117
8.2. Απεικόνιση Της Ενεργοποίησης Της PKC Στον Ιππόκαμπο Επίμυα Ύστερα Από Ετερόπλευρη Ενδοϊπποκάμπεια Έγχυση Του Μη Εκλεκτικού Ενεργοποιητή Της PKC, 4- β PMA.....	124
8.2.1.Ανίχνευση Της Ενεργοποίησης Της PKC Μετά Την Ενδοϊπποκάμπεια Έγχυση Του Μη Εκλεκτικού Ενεργοποιητή 4-β PMA Με Χρήση Ανοσοϊστοχημικής Μεθόδου.....	124
8.2.2.Ανίχνευση Της Ενεργοποίησης Της PKC Μετά Την Ενδοϊπποκάμπεια Έγχυση Του Μη Εκλεκτικού Ενεργοποιητή 4-β PMA Με Χρήση Ανοσοαποτύπωσης Κατά Western Σε Ομογενοποιημένα Ιππόκαμπου Επίμυα Τα Οποία Έχουν Διαχωρισθεί Με Τη Μέθοδο Του Υποκυτταρικού Διαχωρισμού.....	126
9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ.....	129
9.1. Έλεγχος Της Επίδρασης Των Μετατρεπτικών Της Κατάστασης Ενεργοποίησης Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Πεπτιδίων Στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου Σε Επίμυες.....	129
9.1.1.Επίδραση Του Μεταφορικού Πεπτιδίου Tat Στη Συμπεριφορά Των Επίμυων.....	129
9.1.2.Επίδραση Του Ανασταλτικού Της PKCε Πεπτιδίου, εV1-2, Στη Συμπεριφορά Των Επίμυων.....	133
9.1.3. Επίδραση Του Ενεργοποιητικού Της PKCε Πεπτιδίου, ψεRACK, Στη Συμπεριφορά Των Επίμυων.....	138

9.1.4. Επίδραση Της Συγχορήγησης Των Πεπτιδίων εV1-2 Και ψεRACK Στη Συμπεριφορά Των Επίμυων.....	143
9.2. Έλεγχος Της Ικανότητας Του Δότη Μονοξειδίου Του Αζώτου, Μολσιδομίνη, Να Ανταγωνίζεται Τα ελλείμματα Μνήμης Που Προκαλεί Ο Ανταγωνιστής Των NMDA Υποδοχέων, MK-801, Στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου Σε Επίμυες.....	149
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	153
10. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ C ΣΤΟΝ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟ ΕΠΙΜΥΑ.....	153
11. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ C ΚΑΙ ΤΟΥ ΔΟΤΗ ΝΟ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΤΙΚΗ ΜΝΗΜΗ ΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ.....	154
11.1 Ο Ρόλος Της ε Ισομορφής Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Στην Αναγνωριστική Μνήμη Των Επίμυων.....	154
11.2. Ο Ρόλος Του Δότη ΝΟ, Μολσιδομίνη, Στα Ελλείμματα Μνήμης Που Προκαλεί Ο Ανταγωνιστής Των Υποδοχέων NMDA, MK-801.....	163
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	165
Παράρτημα.....	167
Περίληψη.....	169
Abstract.....	171
Συντομογραφίες.....	173
Βιβλιογραφία.....	175

I. Γενικό Μέρος

A. Εισαγωγικά Στοιχεία

1. Η Μνήμη

Ως μνήμη θα μπορούσε να ορισθεί η βιολογική διαδικασία κατά την οποία η γνώση κωδικοποιείται, αποθηκεύεται και στη συνέχεια μπορεί, συνειδητά ή ασυνείδητα, να ανακληθεί.

Η μνήμη είναι μια πολύπλοκη νευρωνική διαδικασία, εξαρτάται από το χρόνο, υπόκειται σε μετατροπές και περιλαμβάνει τόσο λειτουργικές όσο και δομικές αλλαγές των συνάψεων των κυκλωμάτων που χρησιμοποιεί. Το ανατομικό υπόστρωμα της μνήμης είναι ο εγκέφαλος, χωρίς όμως να μπορεί να εντοπισθεί ένα συγκεκριμένο τμήμα ή μια συγκεκριμένη περιοχή.

Η μνήμη είναι το αποτέλεσμα τουλάχιστον τεσσάρων σχετιζόμενων, αλλά ανεξάρτητων, διαδικασιών:

1. της *κωδικοποίησης/απόκτησης (encoding/acquisition)* που αναφέρεται στη διαδικασία με την οποία οι πληροφορίες αποκτούνται και επεξεργάζονται. Για να επιμείνει μια μνήμη θα πρέπει να γίνει σωστή κωδικοποίηση. Αυτό επιτυγχάνεται με το να συνδυάζεται νοηματικά και συστηματικά η πληροφορία με γνώσεις που είναι ήδη ισχυρά εδραιωμένες
2. του *συσχετισμού (consolidation)* που αναφέρεται στη διαδικασία εκείνη κατά την οποία οι προσφάτως αποθηκευμένες και ακόμη ευαίσθητες πληροφορίες αλλάζουν, για να γίνουν πιο σταθερές στην μακροχρόνια αποθήκευση. Εμπλέκει την έκφραση γονιδίων και τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών,
3. της *αποθήκευσης (storage)* που αναφέρεται στο μηχανισμό και στις θέσεις που κρατείται η μνήμη μέσα στο χρόνο και
4. της *ανάκλησης (retrieval)* που αναφέρεται στη διαδικασία ανάκλησης και χρήσης των αποθηκευμένων πληροφοριών.

1.1. Τα Είδη Της Μνήμης

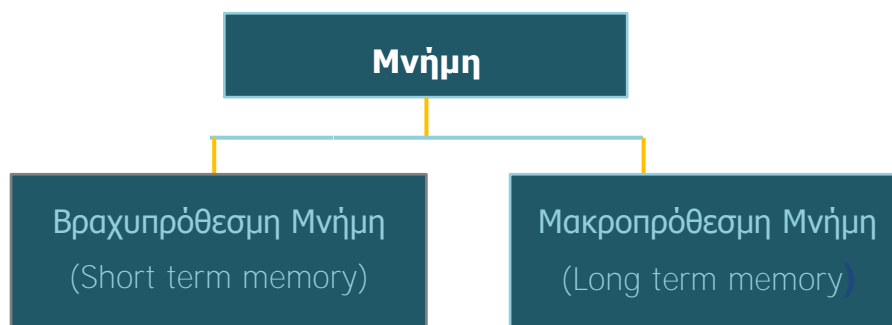
Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι μνήμης, και για κάθε τύπο, διαφορετική περιοχή του εγκεφάλου είναι σημαντική για την αποθήκευσή της. Αδρά, η μνήμη θα μπορούσε να ταξινομηθεί με βάση χρονικά κριτήρια σε *Βραχυπρόθεσμη μνήμη (Short-term memory)* και σε

Μακροπρόθεσμη μνήμη (*Long-term memory*), οι οποίες αποτελούν δύο ανεξάρτητες αλλά αλληλεπικαλυπτόμενες διαδικασίες [1] (Εικόνα 1).

Η διάκρισης της μνήμης σε Βραχυπρόθεσμη και Μακροπρόθεσμη προτάθηκε αρχικά το 1968 από το μοντέλο των Atkinson–Shiffrin ή αλλιώς γνωστό ως το πολύ-αποθηκευτικό μοντέλο (*Atkinson–Shiffrin model* ή το *multi-store model*) [2] σύμφωνα με το οποίο όλες οι μνήμες διέρχονται από μια βραχυπρόθεσμη σε μια μακροπρόθεσμη αποθήκευση ύστερα από λίγο καιρό.

1.1.1. Βραχυπρόθεσμη Μνήμη

Η Βραχυπρόθεσμη Μνήμη (*Short Term Memory*) είναι η δυνατότητα συγκράτησης πληροφοριών για χρονικό διάστημα λίγων ωρών. Η έννοια της βραχυπρόθεσμης μνήμης, υποδηλώνει ένα χρονικά περιορισμένο σύστημα μνήμης όπου τα μνημονικά στοιχεία χάνονται αυθόρμητα μέσα σε δευτερόλεπτα, δηλαδή έχει περιορισμένη χωρητικότητα [1].



Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση της χρονικής ταξινόμησης της μνήμης.

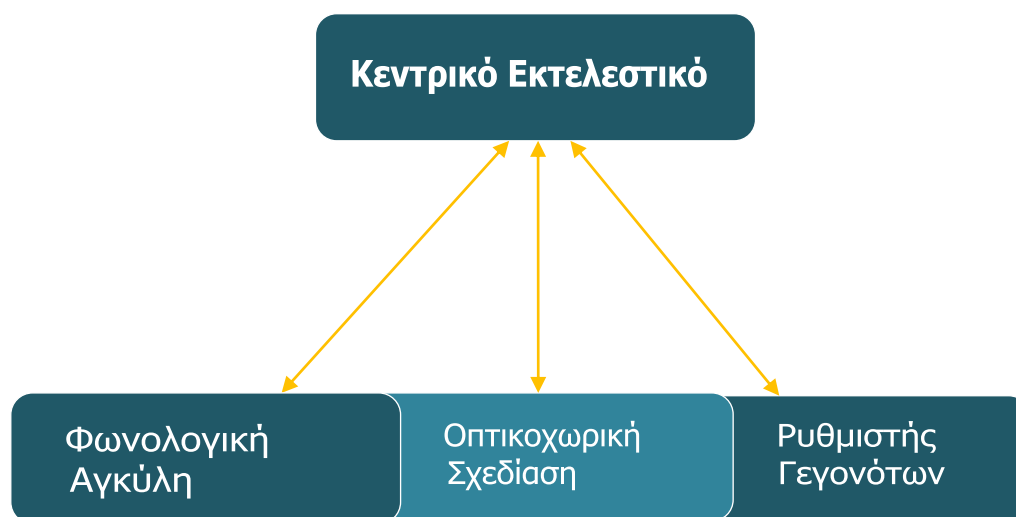
1.1.2. Λειτουργική Μνήμη

Η Λειτουργική Μνήμη (*Working Memory*) αποτελεί ειδική μορφή της Βραχυπρόθεσμης Μνήμης και αφορά τις διεργασίες επεξεργασίας μιας μνημονικής πληροφορίας προκειμένου αυτή να εγχαραχτεί, να γίνει πιο σταθερή και να μετατραπεί σε Μακροπρόθεσμη Μνήμη. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στον λειτουργικό ρόλο της μορφής αυτής μνήμης σε άλλες νοητικές διεργασίες (όπως μάθηση, διαλογισμός, κατανόηση).

Το αρχικό μοντέλο της Λειτουργικής Μνήμης προτάθηκε το έτος 1974 από τους Baddeley και Hitch στην προσπάθεια να περιγράψουν με μεγαλύτερη ακρίβεια την Βραχυπρόθεσμη Μνήμη. Η Λειτουργική μνήμη θεωρείται ότι εμπεριέχει τρία υποσυστήματα [3]:

1. Το σύστημα ελέγχου της προσοχής (ή κεντρικό εκτελεστικό - central executive), το οποίο επικεντρώνει την προσοχή σε συγκεκριμένα γεγονότα στο περιβάλλον. Θεωρείται ότι βρίσκεται στον προμετωπιαίο λοβό και έχει περιορισμένη χωρητικότητα. Το σύστημα ελέγχου της προσοχής λειτουργεί ως το επιβλέπον σύστημα και ρυθμίζει τη ροή των πληροφοριών προς δύο επαναληπτικά συστήματα που θεωρείται ότι διατηρούν τη μνήμη για προσωρινή χρήση (Εικόνα 2). Αυτά είναι:
2. το σύστημα της φωνολογικής ή προφορικής αγκύλης (phonological/ articulatory loop) για τη γλώσσα και
3. το σύστημα του οπτικο-χωρικού σχεδιασμού (*visuospatial sketch pad*) για τις εικόνες και τη δράση. Τα δύο επαναληπτικά συστήματα πιστεύεται ότι βρίσκονται σε διαφορετικές περιοχές των οπίσθιων συνειρμικών φλοιικών περιοχών.

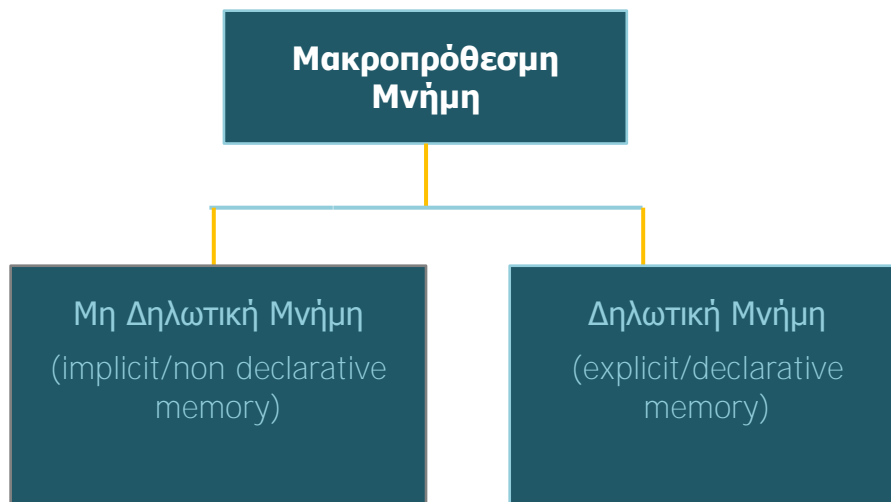
Το έτος 2000, ο Baddeley πρόσθεσε στο μοντέλο του και ένα τέταρτο υποσύστημα, το σύστημα ρυθμιστή των γεγονότων (*episodic buffer*) που έχει ως ρόλο τη σύνδεση των πληροφοριών μεταξύ των περιοχών με στόχο τη δημιουργία ολοκληρωμένων μονάδων οπτικών, χωρικών και λεκτικών πληροφοριών με χρονική αλληλουχία (ή χρονολογική σειρά), όπως για παράδειγμα η μνήμη μιας ιστορίας ή μιας κινηματογραφικής σκηνής. Το σύστημα αυτό θεωρείται ακόμη ότι έχει συνδέσεις με τη Μακροπρόθεσμη Μνήμη και τη σημασιολογική έννοια των γεγονότων [4]. Οι πληροφορίες που επεξεργάζονται σε κάθε ένα από αυτά τα επαναληπτικά συστήματα Λειτουργικής Μνήμης έχουν την ικανότητα να μετατρέπονται σε Μακροπρόθεσμη Μνήμη.



Εικόνα 2. Σχηματική παράσταση των λειτουργικών υποσυστημάτων της Λειτουργικής Μνήμης.

1.1.3. Μακροπρόθεσμη Μνήμη

Η Μακροπρόθεσμη Μνήμη (Long Term Memory) περιγράφει τη δυνατότητα συγκράτησης πληροφοριών για χρονικό διάστημα πολλών ωρών ως και δεκαετιών. Η Μακροπρόθεσμη Μνήμη διακρίνεται σε *μη δηλωτική μνήμη* (implicit ή non declarative memory) και σε *δηλωτική μνήμη* (explicit ή declarative memory) [1,5] (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Σχηματική παράσταση της ταξινόμησης της Μακροπρόθεσμης Μνήμης.

1.1.3.1. Μη Δηλωτική Μνήμη

Η μη δηλωτική μνήμη (implicit memory ή non declarative memory) αναφέρεται σε πληροφορίες σχετικά με το πώς γίνεται κάτι, μια μνήμη που ανακαλείται ασυνείδητα. Είναι αρκετά άκαμπτη και στενά συνδεδεμένη με το αρχικό ερέθισμα που προκάλεσε τη μάθηση. Η μη δηλωτική μνήμη τυπικά εμπλέκεται με εκμάθηση αντανακλαστικών κινήσεων ή αντιληπτικών δεξιοτήτων. Η μνήμη αυτή αποκτάται αργά, με πολλαπλή επανάληψη και εκφράζεται κυρίως με πράξεις, παρά με λόγο. Διαφορετικοί τύποι της μνήμης αυτής αποκτούνται μέσα από διαφορετικές διαδικασίες μάθησης και αποθηκεύονται σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου (Εικόνα 4). Πειραματικά δεδομένα χωρίζουν την μη δηλωτική μνήμη σε:

1. *priming*, η οποία αναφέρεται σε μια διαδικασία κατά την οποία τα υποκείμενα παρουσιάζουν βελτιωμένη ικανότητα για διαδικασίες για τις οποίες έχουν υποσυνείδητα προετοιμασθεί (Παράρτημα 1)
2. *διαδικαστική μνήμη* (procedural memory) που αναφέρεται στην αυτόματη, υποσυνείδητη, ανάκληση καθημερινών διαδικαστικών κινήσεων, π.χ. το δέσιμο από τα κορδόνια

3. *μη σχετιζόμενη μνήμη* (nonassociative memory) που αναφέρεται στη σύνδεση μεταξύ ενός ερεθίσματος και των ιδιοτήτων που αυτό έχει (το υποκείμενο μαθαίνει τις ιδιότητες ενός ερεθίσματος). Η μη σχετιζόμενη μνήμη διακρίνεται με τη σειρά της στην:
 - i. *Εξοικείωση* (Habituation), όπου η απάντηση σε ένα ερέθισμα μειώνεται όταν το ερέθισμα επαναλαμβάνεται συνεχώς και στην
 - ii. *Ευαισθητοποίηση* (Sensitization), όπου παρατηρείται αυξημένη αντίδραση σε μια ποικιλία ερεθισμάτων μετά από την εφαρμογή ενός επώδυνου ερεθίσματος.

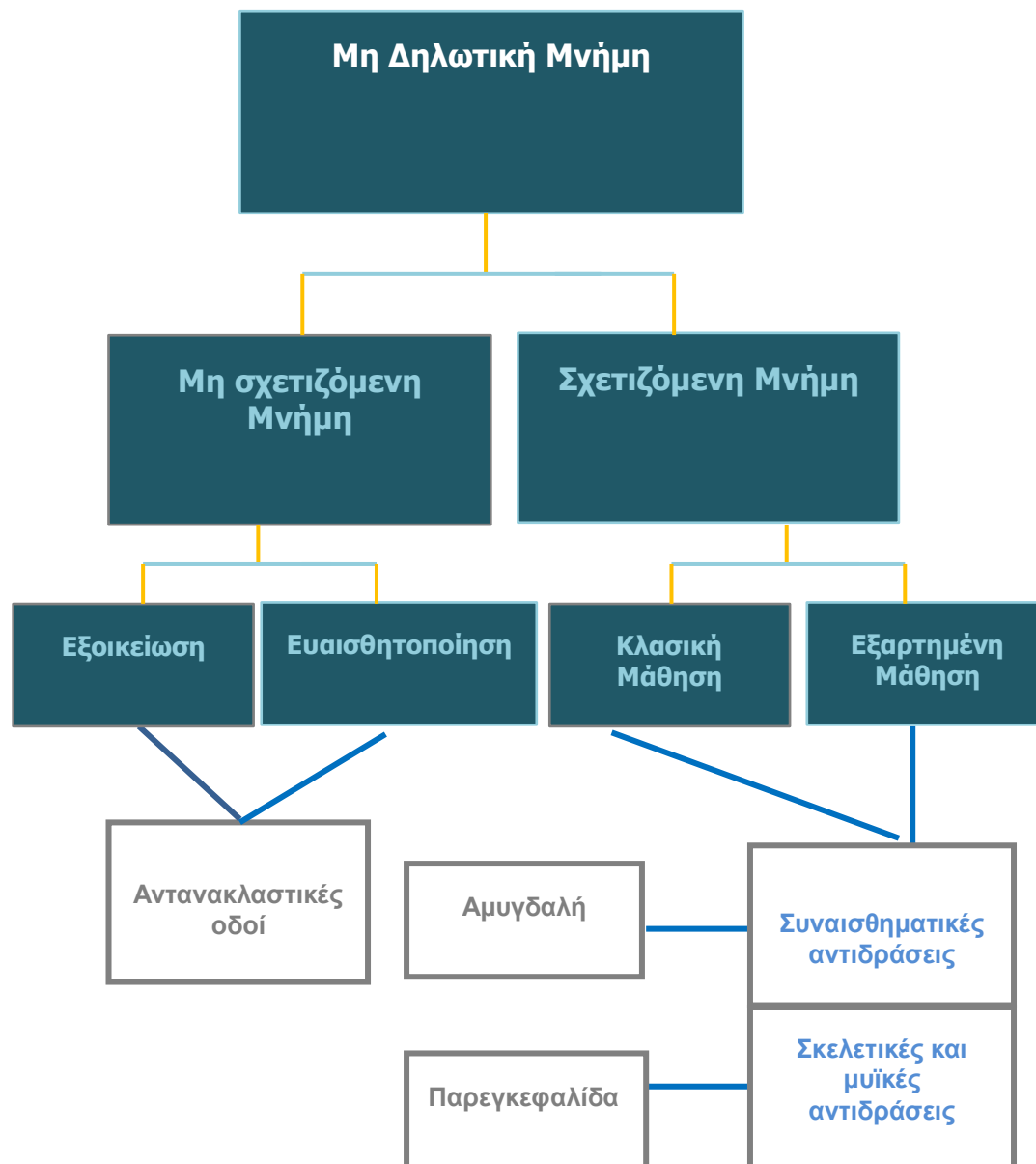
4. *σχετιζόμενη μνήμη* (associative memory) που αναφέρεται στη μάθηση της σχέσης μεταξύ δύο ερεθισμάτων ή στη μάθηση μιας σχέσης μεταξύ ενός ερεθίσματος και μιας συμπεριφοράς. Και η σχετιζόμενη μνήμη διακρίνεται σε δύο τύπους:
 - i. *Κλασσική Μάθηση* (Classical conditioning), που αφορά τη μάθηση της σχέσης μεταξύ δύο ερεθισμάτων και στην
 - ii. *Εξαρτημένη Μάθηση* (Operant conditioning), που αναφέρεται στη μάθηση της σχέσης μεταξύ μιας συμπεριφοράς και των αποτελεσμάτων αυτής.

1.1.3.2. Δηλωτική Μνήμη

Η δηλωτική μνήμη (explicit memory ή declarative memory) αναφέρεται σε πραγματική γνώση ανθρώπων, χώρου και πραγμάτων και στη σημασία αυτών των γεγονότων (τι σημαίνουν τα γεγονότα αυτά). Ανακαλείται με εσκεμμένη, συνειδητή, προσπάθεια. Η δηλωτική μνήμη είναι μια πάρα πολύ ευέλικτη μορφή μνήμης και εμπεριέχει το συνδυασμό πολλαπλών στοιχείων και πληροφοριών. Μπορεί να διακριθεί περαιτέρω σε δύο μορφές μνήμης που είναι οι ακόλουθες (Εικόνα 5):

- *σημασιολογική μνήμη* (semantic memory) που είναι μια μνήμη για δεδομένα. Η σημασιολογική μνήμη περιλαμβάνει την αναζήτηση της γνώσης του κόσμου, μια οργανωμένη συλλογή πληροφοριών σχετικά με τα χαρακτηριστικά του κόσμου, με το περιεχόμενο και τη σημασία της γλώσσας, των κοινωνικών δομών, της γεωγραφίας και εκατομμύρια άλλους τομείς γνώσης.

- *επεισοδική μνήμη* (episodic memory) που είναι μια μνήμη για γεγονότα και προσωπικές εμπειρίες. Η επεισοδική μνήμη αντανάκλα την ικανότητα μνήμης συγκεκριμένων προσωπικών εμπειριών. Οι μνήμες αυτές εμπεριέχουν τη λεπτομερή αλληλουχία των γεγονότων που συνιστούν μια εμπειρία καθώς και το χωρικό και χρονικό πλαίσιο στο οποίο εμφανίσθηκε η εμπειρία αυτή.



Εικόνα 4. Σχηματική παράσταση της ταξινόμησης της μη δηλωτικής μακροπρόθεσμης μνήμης.

(από το σχήμα για λόγους οικονομίας παραλείπονται το priming και η διαδικαστική μνήμη)



Εικόνα 5. Σχηματική παράσταση της ταξινόμησης της δηλωτικής μακροπρόθεσμης μνήμης.

1.1.3.3. Αναγνωριστική Μνήμη

Μια υποκατηγορία της επεισοδικής μνήμης αποτελεί η αναγνωριστική μνήμη. Κλασσικά, η αναγνωριστική μνήμη έχει ορισθεί ως η ικανότητα αξιολόγησης της ύπαρξης ενός ερεθίσματος και σε παρελθούσα στιγμή. Μπορεί να υπάρχει *άμεση ανάκληση*, η οποία είναι η ικανότητα ανάμνησης ενός ερεθίσματος χωρίς την παρουσία του ίδιου του ερεθίσματος. Μπορεί ακόμη να υπάρχουν *συνιστώσες διάκρισης* όπου το υποκείμενο μπορεί να διακρίνει ανάμεσα σε ένα ερέθισμα που έχει προηγουμένως παρουσιασθεί και σε ένα νέο ερέθισμα.

Επικρατεί η άποψη ότι τα χαρακτηριστικά αυτά διαχωρίζουν την αναγνωριστική μνήμη σε δύο στενά συνδεδεμένα συστατικά που έχουν αποδοθεί σε μοναδικά νευρολογικά υποστρώματα.

Το πρώτο αποκαλείται *επανασυλλογή* και περιλαμβάνει την ανάμνηση διακριτών λεπτομερειών σχετικά με μια εμπειρία στην οποία το υποκείμενο έχει προηγουμένως εκτεθεί. Ο ιππόκαμπος είναι η περιοχή του εγκεφάλου που πιστεύεται ότι σχετίζεται με την επανασυλλογή. Το δεύτερο συστατικό είναι η *εξοικείωση*, που περιλαμβάνει την ενσυνείδητη γνώση ότι ένα αντικείμενο έχει γίνει οικείο κατά το παρελθόν αλλά χωρίς την ικανότητα να ανακληθεί οτιδήποτε άλλο σχετικά με αυτό.

Έχει προταθεί ότι οι συμπεριφορές αυτές έχουν την έναρξή τους στον περιρινικό φλοιό. Τόσο ο ιππόκαμπος όσο και ο περιρινικός φλοιός αποτελούν μέρος του μέσου κροταφικού λοβού. Η ανατομική αυτή περιοχή του εγκεφάλου και η συμμετοχή της στις διαδικασίες σχηματισμού της δηλωτικής μνήμης θα αναλυθούν εκτενέστερα στη συνέχεια. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι η βασική διαφορά ανάμεσα στην επανασυλλογή και την εξοικείωση είναι ότι η πρώτη εξαρτάται από το περιεχόμενο ενώ η δεύτερη είναι ανεξάρτητη από αυτό. Μια άλλη διαφορά είναι ότι η εξοικείωση είναι γενικά μια ασυνείδητη ή αυτοματοποιημένη διαδικασία ενώ η επανασυλλογή είναι ενσυνείδητη και απαιτεί προσπάθεια.

Υπάρχει μια διαφωνία στην επιστημονική κοινότητα εάν η εξοικείωση και η επανασυλλογή θα πρέπει να θεωρηθούν ως ξεχωριστές κατηγορίες αναγνωριστικής μνήμης. Αυτή η διάκριση εξοικείωσης - επανασυλλογής αποτελεί αυτό που αποκαλείται *Θεωρία της διπλής διαδικασίας*. Παρά τη δημοτικότητα και την επιρροή των θεωριών της διπλής διαδικασίας για την αναγνωριστική μνήμη, αυτές παραμένουν αντιφατικές λόγω της δυσκολίας να αποκτηθούν ξεχωριστές εμπειρικές εκτιμήσεις της επανασυλλογής και της εξοικείωσης. Μια συχνή κριτική των μοντέλων της διπλής διαδικασίας της αναγνωριστικής μνήμης είναι ότι η επανασυλλογή είναι απλά μια ενισχυμένη (π.χ. πιο λεπτομερειακή ή πιο έντονη) εκδοχή της εξοικείωσης. Έτσι, αντί από το να αποτελείται από δύο ξεχωριστές κατηγορίες, προτάθηκαν τα *μοντέλα απλής διαδικασίας*, που θεωρούν την αναγνωριστική μνήμη σαν μια συνεχόμενη διαβάθμιση από αδύναμες σε πιο ενισχυμένες μνήμες.

Από την άλλη πλευρά, οι θεωρίες διπλής διαδικασίας κάνουν δυνατή τη διάκριση δύο τύπων αναγνώρισης: πρώτον, την αναγνώριση ΟΤΙ κάποιος έχει έρθει σε επαφή με κάποιο αντικείμενο/συμβάν κατά το παρελθόν και δεύτερον, την αναγνώριση του ΤΙ αντικείμενο/συμβάν ήταν αυτό. Έτσι, μπορεί να αναγνωρίζουμε ένα πρόσωπο, αλλά μόνο αργότερα επανασυλλέγουμε σε ποιο άτομο ανήκει αυτό το πρόσωπο.

Μέχρι σήμερα, οι νευροεπιστήμονες δεν έχουν καταφέρει να καταλήξουν σε μια τελική απάντηση σε αυτή τη διαφωνία, αν και φαίνεται ότι τα μοντέλα της διπλής διαδικασίας είναι αυτά που τείνουν να επικρατήσουν. Αν και πολλές μελέτες παρέχουν στοιχεία για αντιπροσώπευση των δύο αυτών διαδικασιών σε διαφορετικές ανατομικές περιοχές του εγκεφάλου, όπως προαναφέρθηκε, άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι υπάρχει νευροανατομική επικάλυψη ανάμεσα στις δύο αυτές διαδικασίες. Παρά το γεγονός ότι η εξοικείωση και η επανασυλλογή μερικές φορές ενεργοποιούν τις ίδιες περιοχές του εγκεφάλου, έχει βρεθεί ότι είναι λειτουργικά διακριτές.

Το ερώτημα εάν η επανασυλλογή και η εξοικείωση υφίστανται ως δύο ανεξάρτητες κατηγορίες ή αποτελούν μια συνεχόμενη διαδικασία ίσως τελικά δεν έχει μεγάλη σημασία. Η ουσία είναι ότι η διάκριση επανασυλλογή - εξοικείωση έχει αποβεί εξαιρετικά χρήσιμη στην κατανόηση των μηχανισμών της αναγνωριστικής μνήμης [6]

1.2. Αναγνωριστική Μνήμη Αντικειμένου

Η αναγνώριση – η κρίση μιας προηγηθείσας εμφάνισης – των αντικειμένων θεωρείται μια σημαντική συνιστώσα της ανθρώπινης δηλωτικής μνήμης.

Είναι αποδεδειγμένο ότι η ικανότητα αναγνώρισης αντικειμένου συχνά επηρεάζεται σε ασθενείς που πάσχουν από νευροεκφυλιστικές παθήσεις ή που έχουν υποστεί εγκεφαλικό τραύμα. Είναι λοιπόν σημαντική η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της ζωτικής αυτής νοητικής διεργασίας.

Η δηλωτική μνήμη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ορίζεται ως η συνειδητή μνήμη για γεγονότα και συμβάντα και διακρίνεται περαιτέρω σε επεισοδική και σημασιολογική μνήμη. Σε αντίθεση με τη μη δηλωτική μνήμη, όπως η διαδικαστική για συνήθειες ή ικανότητες, η οποία συχνά απαιτεί μια παρατεταμένη φάση απόκτησης πληροφοριών (acquisition phase), η δηλωτική μνήμη θεωρείται ότι αποκτάται με λίγες σχετικά εκθέσεις στο προς μάθηση αντικείμενο. Η πλευρά αυτή της δηλωτικής μνήμης αποτελεί και ένα χαρακτηριστικό των πιο κοινών δοκιμασιών αναγνωριστικής μνήμης αντικειμένου. Για αυτόν και για άλλους λόγους, *οι δοκιμασίες αναγνώρισης αντικειμένου χαίρουν ευρείας χρήσης από τους ερευνητές που μελετούν τη νευροβιολογία της δηλωτικής μνήμης των θηλαστικών.*

Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η δηλωτική μνήμη αποτελείται από μια ποικιλία πιθανών νοητικών διαδικασιών απαιτούμενων για την ολοκλήρωση των πολυδύναμων πληροφοριών. Οι διαδικασίες αυτές, για παράδειγμα, μπορεί να περιλαμβάνουν λειτουργίες σχετιζόμενες με την εξοικείωση και την επανασυλλογή, οι οποίες πιθανώς έχουν διαφορετικά νευρικά υποστρώματα. Η αλήθεια είναι ότι η επιτυχής εκτέλεση των δοκιμασιών αναγνώρισης αντικειμένου απαιτεί ίσως μόνο μια υποομάδα από τις νοητικές διαδικασίες που εμπλέκονται στη φυσιολογική δηλωτική μνήμη.

Η αναγνωριστική μνήμη αντικειμένου δεν αποτελεί το μόνο τρόπο εκτίμησης της δηλωτικής μνήμης αλλά θεωρείται ως ένα εξαιρετικό μοντέλο έρευνας των νευρωνικών υποστρωμάτων των διαφόρων πλευρών της μνήμης των θηλαστικών. Οι δοκιμασίες αναγνώρισης αντικειμένου έχουν συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση των μνημονικών λειτουργιών του μέσου κροταφικού λοβού και ιδιαίτερα του περιρινικού φλοιού σε σχέση με την αναγνώριση αντικειμένου, αν και είναι φανερό ότι ένα εκτεταμένο δίκτυο περιοχών του εγκεφάλου συμμετέχει στη δηλωτική μνήμη.

Η αναγνώριση αντικειμένου αποτελεί ένα όλο και πιο πολύτιμο μνημονικό παράδειγμα. Η έρευνα στο πεδίο αυτό είναι πολύ διαδεδομένη και συμπεριλαμβάνει εργασίες με ανθρώπους, μη ανθρώπινα πρωτεύοντα θηλαστικά και τρωκτικά. Η πρακτικότητα των περισσότερων δοκιμασιών αναγνώρισης αντικειμένου, και ιδιαίτερα της Δοκιμασίας

Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου των τρωκτικών, τις καθιστά πολύτιμα εργαλεία στη βασική και προκλινική έρευνα για τη νευροβιολογία της δηλωτικής μνήμης των θηλαστικών.

Δοκιμασίες Αναγνώρισης Αντικειμένου

Η αναγνωριστική μνήμη αντικειμένου σε μη ανθρώπινα πρωτεύοντα ελέγχεται πιο συχνά με την *καθυστερημένη, μη-ταιριαστή-με το δείγμα δοκιμασία* (delayed nonmatching-to-sample task, DNMS) ή με την ομόλογή του δοκιμασία, την *καθυστερημένη, ταιριαστή-με το δείγμα δοκιμασία* (delayed matching-to-sample task, DMS). Μια D(N)MS δοκιμασία αποτελείται από δύο διακριτά στάδια – μια *δοκιμή εκπαίδευσης* (sample trial) που ακολουθείται από μια *δοκιμή επιλογής* (choice trial) – τα οποία διαχωρίζονται από μια περίοδο καθυστέρησης με ποικίλη διάρκεια. Η D(N)MS δοκιμασία έχει προσαρμοσθεί για τον έλεγχο της αναγνωριστικής μνήμης αντικειμένων και οσμών στους επίμυες.

Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου

Μια περαιτέρω εναλλακτική εκδοχή του DNMS παραδείγματος για τα τρωκτικά είναι η απλούστατη, αυθόρμητη Δοκιμασία Αναγνώρισης Αντικειμένου (ΔΑΑ) που εμπνεύστηκαν οι Ennaceur και Delacour το 1988. Πράγματι, η δοκιμασία αυτή έχει γίνει η δοκιμασία επιλογής για την αξιολόγηση της δηλωτικής μνήμης στα τρωκτικά και έχει σημαντικά συνεισφέρει στην μέχρι σήμερα κατανόηση της νευροβιολογικής βάσης της αναγνωριστικής μνήμης αντικειμένου. Η Δοκιμασία Αναγνώρισης Αντικειμένου μελετά την έμφυτη τάση των επίμυων να εξερευνούν κατά προτίμηση νέα ερεθίσματα σε σχέση με οικεία ερεθίσματα. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της Δοκιμασίας Αναγνώρισης Αντικειμένου είναι ότι δεν απαιτεί προ-εκπαίδευση και δεν περιλαμβάνει ανταμοιβή. Η αναγνώριση αντικειμένου μπορεί επομένως να μελετηθεί με έναν σχετικά «αγνό» τρόπο, χωρίς τις πιθανές επιπλοκές ανάλυσης που μπορεί για παράδειγμα να προκαλέσει μια παρατεταμένη φάση εκπαίδευσης ή η ύπαρξη κινήτρων. Η παραπάνω δοκιμασία είναι όμοια με τη DNMS δοκιμασία.

Στη συνέχεια, στην ενότητα της μεθοδολογίας θα περιγραφεί αναλυτικά η Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου (Novel Object Recognition Task), η οποία αποτελεί τη σύγχρονη εκδοχή της Δοκιμασίας Αναγνώρισης Αντικειμένου. Η δοκιμασία αυτή χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ως η δοκιμασία εκλογής για τον έλεγχο της επίδρασης στη δηλωτική μνήμη των επίμυων των μετατρεπτικών της κατάστασης ενεργοποίησης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C ε (εPKC) πεπτιδίων αλλά και για τον έλεγχο της ικανότητας του δότη Μονοξειδίου του Αζώτου, μολσιδομίνη, να αναστρέφει τα ελλείμματα μνήμης των επίμυων που προκαλεί ο ανταγωνιστής των NMDA υποδοχέων, MK-801.

1.3. Ανατομικό Υπόστρωμα Της Μνήμης

Οι δύο τύποι Μακροπρόθεσμης Μνήμης φαίνεται να χρησιμοποιούν διαφορετικά νευρικά κυκλώματα στον εγκέφαλο, τα οποία εντοπίζονται σε ποικίλες ανατομικές περιοχές. Στη συνέχεια θα αναφερθούμε κυρίως στις περιοχές δημιουργίας και αποθήκευσης της δηλωτικής μνήμης.

1.3.1. Ανατομία Της Μη Δηλωτικής Μνήμης

Η μη δηλωτική μνήμη δεν εξαρτάται άμεσα από ενσυνείδητες διαδικασίες ούτε η ανάκλησή της απαιτεί μια συνειδητή αναζήτηση σε μνημονικά δεδομένα. Διαφορετικοί τύποι μη δηλωτικής μνήμης αποκτώνται μέσω διαφορετικών μορφών μάθησης και εμπλέκουν διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου. Για παράδειγμα, μνήμες που αποκτώνται μέσω συνθηκών φόβου, και εμπειρέχουν ένα συναισθηματικό στοιχείο, θεωρείται ότι εμπλέκουν την αμυγδαλή, μνήμες που αποκτώνται μέσω εξαρτημένης μάθησης απαιτούν το ραβδωτό σώμα και την παρεγκεφαλίδα ενώ μνήμες που αποκτώνται μέσω της κλασικής μάθησης, της ευαισθητοποίησης και της εξοικείωσης εμπλέκουν αισθητικά και κινητικά συστήματα [7-12]

Η μη δηλωτική μνήμη μπορεί να μελετηθεί σε μια ποικιλία αντιληπτικών ή αντανακλαστικών συστημάτων τόσο σε σπονδυλωτά όσο και σε ασπόνδυλα. Απλοί, ασπόνδυλοι οργανισμοί παρέχουν χρήσιμα μοντέλα για τη μελέτη των νευρωνικών μηχανισμών της μη δηλωτικής μάθησης.

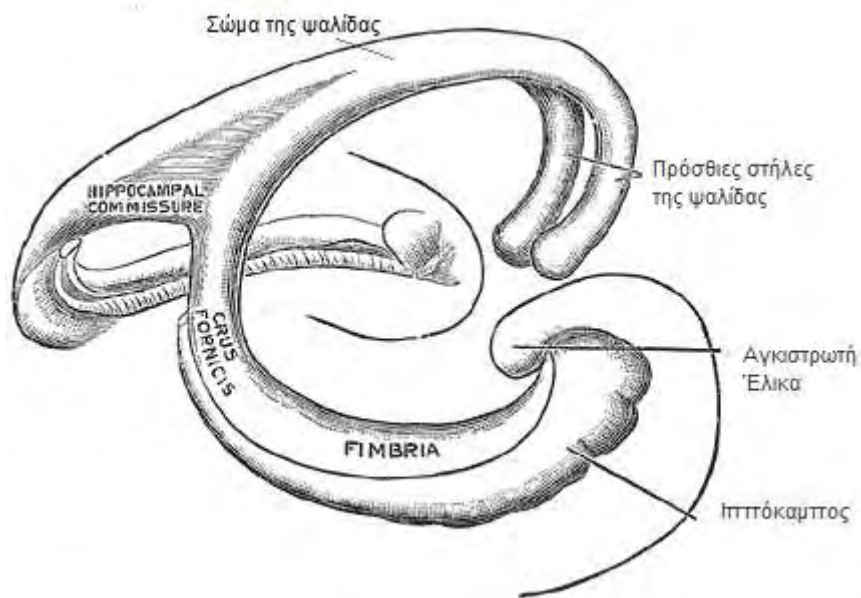
1.3.2. Ανατομία Της Δηλωτικής Μνήμης

Η δηλωτική μνήμη μελετάται κυρίως στα θηλαστικά και σε ό,τι αφορά την ανατομική εντόπισή της, μπορούμε με βεβαιότητα να πούμε ότι δεν υπάρχει μια συγκεκριμένη, όλων των τύπων, περιοχή δημιουργίας και αποθήκευσης της μνήμης στον εγκέφαλο των θηλαστικών. Κάθε στοιχείο γνώσης που αποκτάται έχει πολλαπλές αναπαραστάσεις στον εγκέφαλο, κάθε μία από τις οποίες αντιστοιχεί σε διαφορετικές έννοιες και μπορεί να αποκτηθεί ανεξάρτητα (μέσω οπτικών, λεκτικών ή άλλων αισθητηριακών στοιχείων).

Έχει πράγματι αποδειχθεί, ότι η μακροχρόνια αποθήκευση της σημασιολογικής και επεισοδικής γνώσης θα πραγματοποιηθεί στις μονοδύναμες ή πολυδύναμες συνειρμικές περιοχές του φλοιού που επεξεργάζονται τις αισθητηριακές πληροφορίες, ενώ ένας άλλος ανατομικός σχηματισμός, ο *ιππόκαμπος*, πραγματοποιεί τα αρχικά βήματα της αποθήκευσης της μακροπρόθεσμης μνήμης και την μεταφορά των πληροφοριών στα αποθηκευτικά συστήματα του νεοφλοιού, γεγονός που προτείνει τον ιππόκαμπο να αποτελεί ένα προσωρινό στάδιο για την μακροχρόνια μνήμη.

1.4. Ο Ιππόκαμπος

Ο ιππόκαμπος είναι μέρος της έσω περιοχής των κροταφικών λοβών αμφοτερόπλευρα και μαζί με τις παρακείμενες ανατομικές δομές αποτελεί έναν σχηματισμό, τον *ιπποκάμπειο σχηματισμό*, ο οποίος περιλαμβάνει τον ιππόκαμπο ή κέρασ του Άμμωνος, το υπέρεισμα, την οδοντωτή έλικα, την παραϊπποκάμπεια έλικα και τον ενδορινικό φλοιό (Εικόνα 6). Ο ιππόκαμπος δεν είναι η μόνη ανατομική περιοχή που συμμετέχει σε αυτή τη διαδικασία αλλά σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι δομές του εγκεφάλου που αφορούν κυρίως τον κροταφικό λοβό, την αμυγδαλή καθώς και τις γειτονικές πολυδύναμες συνειρμικές περιοχές του μέσου κροταφικού λοβού, δηλαδή τις ενδορινικές, περιρινικές και παραϊπποκάμπειες περιοχές (Εικόνα 7).



Εικόνα 6. Σχηματική, τρισδιάστατη αναπαράσταση των ιπποκάμπων εγκεφάλου θηλαστικού.

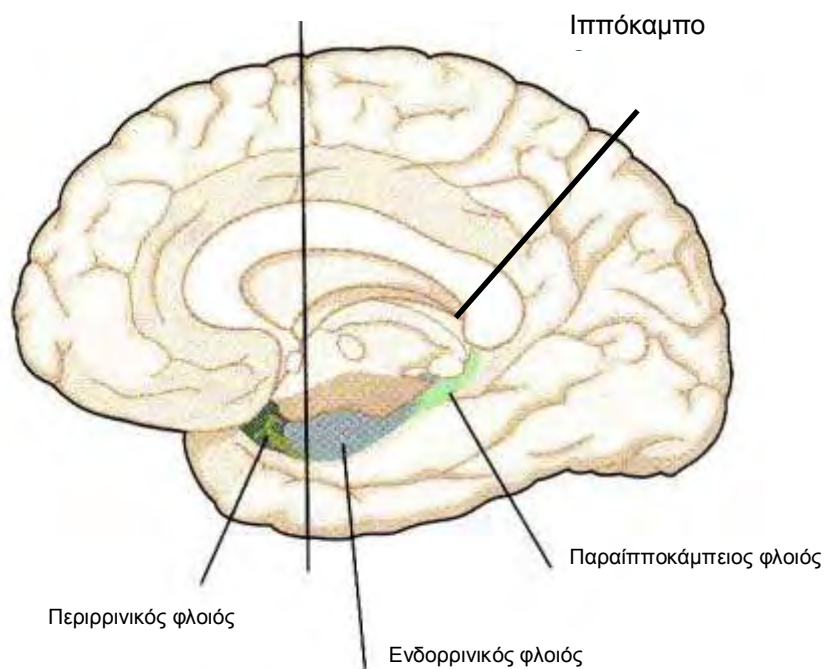
(Για λόγους καλύτερης απεικόνισης έχουν αφαιρεθεί ο φλοιός των ημισφαιρίων καθώς και το κοιλιακό σύστημα)

(Henry Gray, *Anatomy of the Human Body*, 1918. Εικόνα. 747)

Έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς με αμνησία λόγω βλάβης του ιππόκαμπου, έχουν την ικανότητα να θυμούνται την παιδική τους ηλικία, τη ζωή που διήγαν και τις αντικειμενικές γνώσεις που απέκτησαν πριν από την βλάβη του ιππόκαμπου. Ευρέως γνωστή και πολυμελετημένη σε ό,τι αφορά τις μελέτες της μνήμης και της συμμετοχής του ιππόκαμπου, αποτελεί η περίπτωση του ασθενούς HM, ο οποίος το 1953 υποβλήθηκε στο Νευρολογικό Ινστιτούτο του Μόντρεαλ σε νευροχειρουργική επέμβαση αμφοτερόπλευρης εκτομής των μέσων κροταφικών λοβών για την αντιμετώπιση φαρμακοανθεκτικής κροταφικής επιληψίας.

Κατά την μετεγχειρητική αξιολόγησή του, ο ασθενής παρουσίασε διαταραχές μνήμης οι οποίες αφορούσαν την εγγραφή νέων πληροφοριών ενώ οι προγενέστερα αποκτηθείσες μνήμες δεν επηρεάστηκαν. Ήταν ικανός να ανακαλέσει το απώτερο παρελθόν του και γνώσεις για τον κόσμο που απέκτησε 3 χρόνια πριν την επέμβαση, χωρίς να επηρεασθεί η ήδη αποθηκευμένη μακροπρόθεσμη μνήμη και χωρίς να διαταραχθεί η βραχυχρόνια μνήμη [13,14].

Επιμήκης τομή εγκεφάλου επίμυος όπου φαίνεται η περιοχή του μέσου κροταφικού λοβού



Εικόνα 7. Ο ιπποκάμπειος σχηματισμός και οι γειτονικές φλοιϊκές περιοχές.

Επιμήκης τομή εγκεφάλου επίμυα. Απεικονίζεται η έσω επιφάνεια του ημισφαιρίου.

(Kandel ER, Scharzh JH, Jessell TM. *Principles of neural sciences*,2000)

Παρόλα αυτά, οι διαφορετικές περιοχές του μέσου κροταφικού λοβού δεν έχουν ίση συμμετοχή στη μνήμη. Για παράδειγμα, αν και ο ιππόκαμπος είναι σημαντικός για την αναγνώριση αντικειμένων, άλλες περιοχές του μέσου κροταφικού λοβού μπορεί να είναι πιο σημαντικές για το σχηματισμό και την αποθήκευση της μνήμης. Βλάβες στον περιρινικό, παραϊπποκάμπειο και ενδορινικό φλοιό που δεν επηρεάζουν τον υποκείμενο ιππόκαμπο, προκαλούν μεγαλύτερα ελλείμματα στην αποθήκευση της μνήμης, όπως π.χ. στην αναγνώριση αντικειμένου, σε σύγκριση με επιλεγμένες βλάβες του ιππόκαμπου που δεν επηρεάζουν τις υπερκείμενες φλοιϊκές περιοχές.

Από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, γίνεται φανερός ο σημαντικός ρόλος του σχηματισμού του ιππόκαμπου στη διαδικασία σχηματισμού και αποθήκευσης της μνήμης. Για το λόγο αυτό ακριβώς, στη διεθνή βιβλιογραφία συναντάται ένας τεράστιος όγκος πειραματικών δεδομένων που προσπαθούν να περιγράψουν και να ερμηνεύσουν τη λειτουργία και τις συνδέσεις της περιοχής αυτής του εγκεφάλου με την ελπίδα να διευκρινισθεί η πολύπλοκη διαδικασία της μνήμης των θηλαστικών.

1.4.1. Ανατομική Περιγραφή Του Σχηματισμού Του Ιππόκαμπου

Πριν ξεκινήσουμε την ανάλυση της συμμετοχής του ιππόκαμπου στην μνήμη, θα αναφερθούμε περιληπτικά στην ανατομία της δομής αυτής.

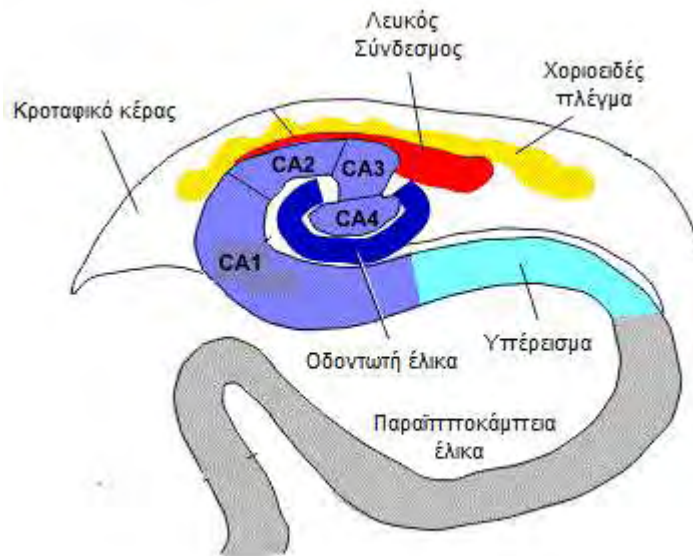
Ο σχηματισμός του ιππόκαμπου αποτελεί μια νευρική δομή στο μέσο κροταφικό λοβό. Το όνομά του το οφείλει στο ξεχωριστό, κυρτό σχήμα του σε μορφή S, που ομοιάζει με το μυθικό θαλάσσιο άλογο της ελληνικής μυθολογίας, τον ιππόκαμπο. Σε γενικές γραμμές, το σχήμα αυτό διατηρείται φυλογενετικά στα θηλαστικά από το μικρό θηλαστικό ακανθόχοιρο μέχρι τον άνθρωπο, αν και με διαφορές στις λεπτομέρειες. Λόγω της τρισδιάστατης διαμόρφωσης της δομής του, οι δυσδιάστατες τομές, που συνήθως απεικονίζονται σε παρασκευάσματα ή εικόνες νευροαπεικόνισης, έχουν ως αποτέλεσμα να προκύπτει ένας αριθμός διαφορετικών σχημάτων, ανάλογα με τη γωνία της τομής.

Τοπογραφικά, αναγνωρίζεται ως μια διόγκωση του έσω τοιχώματος του κροταφικού κέρατος του πλάγιου κοιλιακού συστήματος του εγκεφάλου (Εικόνες 6, 7). Ξεκινώντας από την οδοντωτή έλικα και προχωρώντας προς τα μέσα, κατά μήκος της καμπύλης S του ιππόκαμπου, συναντώνται μια σειρά από στενές ζώνες.

Η πρώτη από αυτές, η οδοντωτή έλικα (σε συντομογραφία αναφέρεται ως DG από την λατινική ονομασία Dentate Gyrus), είναι στην ουσία μια ξεχωριστή δομή, ένα σφικτά δεμένο στρώμα από μικρά κοκκώδη κύτταρα, τυλιγμένα γύρω από την άκρη του ιππόκαμπου (κατά μήκος της έσω και κοίλης επιφάνειάς του), σχηματίζοντας μια αιχμηρή άκρη σε μερικές επιμήκεις τομές ή ένα ημικύκλιο σε άλλες. Η ελεύθερη επιφάνειά της εμφανίζει περίπου 12 με 20 κάθετες σχισμές με άλλες τόσες αντίστοιχες μικρές προεξοχές που προσδίδουν την χαρακτηριστική δαντελωτή όψη. Το πρόσθιο μέρος της οδοντωτής έλικας εφάπτεται με την αγκιστρωτή έλικα ενώ το οπίσθιο τμήμα της καταλήγει στην ψαλίδα και συνεχίζει ως ψαλίδα.

Στη συνέχεια ακολουθούν οι περιοχές του ιππόκαμπου ή αμμωνιακού κέρατος που είναι τέσσερεις και συμβολίζονται ως CA (συντομογραφία από την λατινική ονομασία Cornu Ammonis): πρώτη συναντάται η CA4 περιοχή, μια ελαχίστων διαστάσεων μεταβατική περιοχή μεταξύ ιππόκαμπου και οδοντωτής έλικας, μετά η CA3 περιοχή, μετά μια πολύ μικρή ζώνη που ονομάζεται CA2 περιοχή και τέλος η CA1. Οι CA περιοχές αποτελούνται από πυκνά πυραμιδικά κύτταρα που ομοιάζουν με αυτά του φλοιού.

Μετά την CA1 περιοχή ακολουθεί η περιοχή που ονομάζεται υπέρεισμα ή υπόθεμα. Τέλος, παρατηρείται μια ενδιάμεση, μεταβατική περιοχή ως προς τον φλοιό, η ενδορινική περιοχή ή ενδορινικός φλοιός. Βρίσκεται επί τα εκτός του ιππόκαμπτου, στην περιοχή της παραϊπποκάμπειας έλικας, καταλαμβάνει την έσω επιφάνεια του κροταφικού φλοιού και συνορεύει με τον αμυγδαλοειδή πυρήνα προς τα εμπρός (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Ιπποκάμπειος σχηματισμός.

Στεφανιαία τομή και μεγέθυνση της περιοχής του μέσου κροταφικού λοβού όπου διακρίνονται οι περιοχές CA1, CA3, το υπέρεισμα (υπόθεμα), η οδοντωτή έλικα και ο παραϊπποκάμπειος φλοιός.

(Hesselink JR. *The temporal lobe and the limbic system*).

1.4.2. Ιππόκαμπος Και Μνήμη

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η ικανότητα διατήρησης και ανάκλησης της μνήμης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό στα θηλαστικά από τον ιππόκαμπο [15] και αφαίρεση ή βλάβη του ιππόκαμπου έχει ως αποτέλεσμα αδυναμία μετατροπής νέων πληροφοριών σε Μακροπρόθεσμη Μνήμη [16].

Η πλήρης όμως έκταση της συμμετοχής του ιππόκαμπου περιλαμβάνει και τη σημασιολογική μνήμη. Σήμερα, πολλοί από τους ερευνητές της μνήμης προτείνουν ένα απλό, τριών σταδίων, μοντέλο συνδυασμού της επεισοδικής και σημασιολογικής μνήμης και της δυνατότητας παρεμβολών στη μνήμη [17]. Στο πρώτο στάδιο προτείνεται ότι ο ιππόκαμπος μεσολαβεί στην καταγραφή αλληλένδετων και συγκεκριμένου περιεχομένου πληροφοριών σχετικά με γεγονότα και σύνθετες επεισοδικές μνήμες. Στη συνέχεια, ο ιππόκαμπος έχει τη δυνατότητα να αναγνωρίσει, μεταξύ των επεισοδίων αυτών, κοινά χαρακτηριστικά που θα μπορούσαν να συνδέσουν τα επεισόδια αυτά μεταξύ τους. Τέλος, προτείνεται ότι μια τέτοια πλήρης ομάδα από επεισοδικές - συνδεδεμένες αναπαραστάσεις, συνθέτουν έναν “μνημονικό χώρο”, ο οποίος μπορεί να υποστηρίξει παρεμβολές από τη μνήμη, π.χ. γενικεύσεις βασιζόμενες σε συνδυασμούς πληροφοριών οι οποίες αποκτήθηκαν από ξεχωριστές εμπειρίες [18].

Ο ιππόκαμπος διαδραματίζει λοιπόν έναν κεντρικό ρόλο στη δημιουργία ενός μεγάλου εύρους μνημονικών κυκλωμάτων, με κεντρική οργανωτική αρχή το συσχετισμό των επεισοδικών μνημών βάση κοινών γεγονότων και τόπων και μια συνεπακόλουθη δυνατότητα να μετακινείται μεταξύ συσχετιζόμενων μνημών στο εσωτερικό αυτών των κυκλωμάτων.

Από τα παραπάνω προκύπτει αβίαστα το συμπέρασμα πως ο ιππόκαμπος ανατομικά συνδέεται με πολλαπλές περιοχές του εγκεφάλου μέσω μιας συνεχούς ροής πληροφοριών, είτε προς είτε από αυτόν. Οι συνδέσεις στο εσωτερικό του ιπποκάμπειου σχηματισμού αφορούν τρεις περιοχές: τον *ενδορινικό φλοιό*, που είναι η πύλη εισόδου δεδομένων στο σώμα του ιππόκαμπου, το *σώμα του ιππόκαμπου* και το σύμπλεγμα του *υποθέματος*, που αποτελεί την πύλη εξόδου. Οι οδοί που συνδέουν αυτές τις περιοχές παρουσιάζουν μοναδικά χαρακτηριστικά και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή νέων και/ή σημαντικών πληροφοριών, όπως θα δούμε παρακάτω. Ο ιππόκαμπος συνδέεται ακόμη με φλοιϊκές και υποφλοιώδεις περιοχές που σχετίζονται με αισθητικές λειτουργίες (όραση, ακοή, κ.α.).

1.4.2.1. Τα Ενδορινικά - Ιπποκάμπεια Κυκλώματα Ενισχύουν Την Επιλογή Σημαντικών Πληροφοριών

Η ροή πληροφοριών προς το σχηματισμό του ιππόκαμπου ξεκινά από τον ενδορινικό φλοιό, ο οποίος αποτελεί την μεγαλύτερη πύλη εισόδου προς τον ιππόκαμπο. Ο ενδορινικός

φλοιός διακρίνεται σε μέσες και οπίσθιες περιοχές, κάθε μια από τις οποίες λαμβάνει πολυδύναμες πληροφορίες από τις συνειρμικές περιοχές συμπεριλαμβανομένων των παραϊπποκάμπειων (οπισθορινικών στα τρωκτικά) και περιρινικών φλοιϊκών περιοχών [19,20].

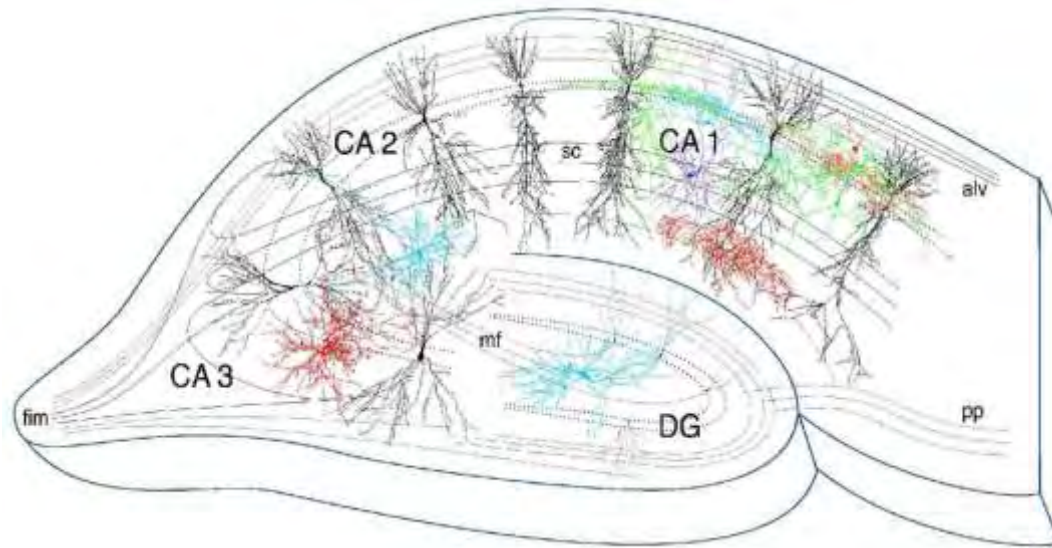
Στο εσωτερικό των μέσων ενδορινικών περιοχών, η οπισθοπλάγια περιοχή αποτελείται από κυβικά, πολυκόρυφα κύτταρα [21,22]. Οι πλάγιες περιοχές πρωτίστως μετατρέπουν μη χωρικές πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένων και οσφρητικών πληροφοριών, από τον περιρινικό φλοιό [23]. Ο ενδορινικός φλοιός παρουσιάζει μια βασική οργάνωση από έξι κυτταρικά επίπεδα (I έως VI) τα οποία επικοινωνούν μεταξύ τους με αξονικές προβολές. Τα επιφανειακά επίπεδα II και III, με ελάχιστες συνδέσεις από τα βαθύτερα στρώματα, στέλνουν πληροφορίες στον ιππόκαμπο και για να συμπληρωθεί το κύκλωμα, τα βαθύτερα στρώματα V και VI λαμβάνουν επεξεργασμένες πληροφορίες από το υπόθεμα – την κύρια δομή εξόδου σημάτων του ιππόκαμπου – πίσω στον ενδορινικό φλοιό [24] (Εικόνα 9).

Οι περιοχές CA3 και CA1 καθώς και η οδοντωτή έλικα λαμβάνουν σήματα από διαφορετικά επίπεδα του ενδορινικού φλοιού. Το επίπεδο III προβάλλει απευθείας στην CA1 περιοχή και στο υπόθεμα μέσω της κροταφο-αμμωνικής οδού (*temporoammonic pathway*) ενώ το επίπεδο II προβάλλει στην οδοντωτή έλικα μέσω της οδού των διαπυραμνοειδών ινών (*perforant pathway*), για το ρόλο της οποίας στη διαδικασία της μνήμης θα αναφερθούμε στη συνέχεια [20]. Οι πληροφορίες που φθάνουν στην οδοντωτή έλικα από το επίπεδο II φθάνουν έμμεσα στην περιοχή CA1 μέσω μιας σειράς διασυνδεδετικών αξονικών οδών, γνωστή ως η *τρισυναπτική αγκύλη* (Εικόνα 9). Η τρισυναπτική αγκύλη περιλαμβάνει:

την *οδό των διαπυραμνοειδών ινών* (στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ως *perforant pathway*), η οποία προβάλλει από τον ενδορινικό φλοιό στα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας,

την *οδό των βρυωδών ινών* (στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ως *mossy fibres pathway*), η οποία περιλαμβάνει τους νευράξονες των κοκκωδών κυττάρων οι οποίοι προβάλλουν στα πυραμοειδή κύτταρα της CA3 περιοχής του ιππόκαμπου και

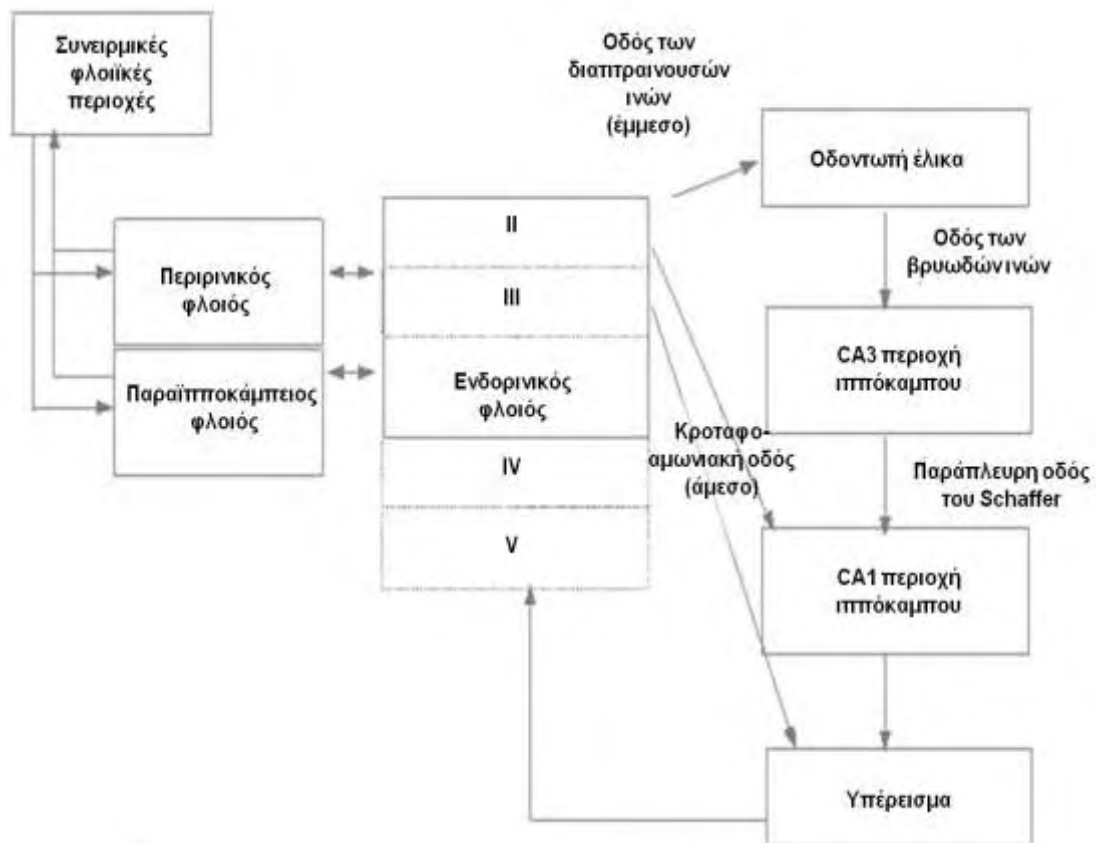
την *παράπλευρη οδό του Schaffer* (στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ως *Schaffer collateral*), η οποία αποτελείται από τις διεγερτικές ίνες των πυραμοειδών κυττάρων της CA3 περιοχής και καταλήγει στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής.



Εικόνα 9. Η τρισυναπτική αγκύλη του ιππόκαμπου.

Οι πληροφορίες που φθάνουν στην οδοντωτή έλικα (Dentate gyrus – DG) από τις συνειρμικές περιοχές του φλοιού, καταλήγουν έμμεσα στην περιοχή CA1 μέσω μιας σειράς διασυνδεδεμένων αξονικών οδών που αποτελούν την *τρिसυναπτική αγκύλη του ιππόκαμπου*. Η πρώτη σύνδεση ονομάζεται *οδός των διαττραινουσών ινών* (perforant pathway - pp) και αποτελείται από νευράξονες από τον ενδορινικό φλοιό στα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας, η δεύτερη ονομάζεται *οδός των βρυωδών ινών* (mossy fibers pathway - mf), η οποία περιλαμβάνει τους νευράξονες των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας οι οποίοι προβάλλουν στα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής του ιππόκαμπου και η τρίτη είναι η *παράπλευρη οδός του Schaffer* (Schaffer collateral pathway), η οποία αποτελείται από τις διεγερτικές ίνες των πυραμοειδών κυττάρων της CA3 περιοχής και καταλήγει στα πυραμοειδή κύτταρα της CA1 περιοχής.

(Από www.stanford.edu/group/maciverlab)



Εικόνα 9. Η ροή πληροφοριών προς και από το σχηματισμό του ιππόκαμπου.

Ο ενδορινικός φλοιός, αποτελεί την μεγαλύτερη πύλη εισόδου προς τον ιππόκαμπο. Λαμβάνει πολυδύναμες πληροφορίες από τις συνειρμικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένων των παραϊπποκάμπειων και περιρινικών φλοιϊκών περιοχών.

Τα επιφανειακά επίπεδα II και III στέλνουν πληροφορίες στον ιππόκαμπο και για να συμπληρωθεί το κύκλωμα, τα βαθύτερα στρώματα V και VI λαμβάνουν επεξεργασμένες πληροφορίες από το υπέρεισμα.

Οι περιοχές CA3 και CA1 καθώς και η οδοντωτή έλικα λαμβάνουν σήματα από διαφορετικά επίπεδα του ενδορινικού φλοιού. Το επίπεδο III προβάλλει απευθείας στην CA1 περιοχή και στο υπέρεισμα μέσω της κροταφο-αμμωνιακής οδού ενώ το επίπεδο II προβάλλει στην οδοντωτή έλικα μέσω της οδού των διαπυραμωδών ινών. Οι πληροφορίες που φθάνουν στην οδοντωτή έλικα από το επίπεδο II φθάνουν έμμεσα στην περιοχή CA1 μέσω μιας σειράς διασυνδεδεμένων αξονικών οδών, γνωστή ως η τρισυναπτική αγκύλη που περιλαμβάνει την οδό των διαπυραμωδών ινών (perforant pathway), την οδό των βρυωδών ινών (mossy fibers) και την παράπλευρη οδό Schaffer (Schaffer collateral).

Βλέπουμε λοιπόν ότι η περιοχή CA1 λαμβάνει πληροφορίες μέσω δύο οδών, μιας άμεσης που ξεκινά από το επίπεδο III του ενδορινικού φλοιού και μιας έμμεσης που ξεκινά από την περιοχή CA3 μέσω της τρισυναπτικής αγκύλης. Η άμεση οδός τερματίζει στα απομακρυσμένα άκρα των κορυφαίων δενδριτών, ενώ η άμεση οδός τερματίζει στους εγγύς δενδρίτες (Εικόνα 10).

Αυτά τα νευροανατομικά χαρακτηριστικά τοποθετούν την περιοχή CA1 σε μια μοναδική θέση για τη σύγκριση πληροφοριών οι οποίες έχουν επεξεργασθεί μέσω της τρισυναπτικής αγκύλης με νέες πληροφορίες που προέρχονται απευθείας από τον φλοιό

1.4.2.2. Φλοιϊκές Και Υποφλοιώδεις Συνδέσεις Του Ιππόκαμπου Με Τα Αισθητηριακά Κυκλώματα

Κάθε ένα από τα αισθητηριακά κυκλώματα στέλνει πληροφορίες στον ιππόκαμπο. Τα χολινεργικά ερεθίσματα φθάνουν στον κροταφικό λοβό μέσω του μέσου διαφραγματικού πυρήνα και της διαγώνιας δέσμης του Broca (Παράρτημα 2) [24], τα νοραδρενεργικά ερεθίσματα ξεκινούν από τον υπομέλαινα τόπο και προβάλλουν κύρια στην οδοντωτή έλικα [25], ενώ τα δοπαμινεργικά ξεκινούν από την κοιλιακή περιοχή της καλύπτρας και προβάλλουν κύρια στην περιοχή CA1 και στον ενδορινικό φλοιό [26-29]. Η διαταραχή στη δραστηριότητα πολλών από αυτών των νευροδιαβαστικών συστημάτων [30-32] έχει εμπλακεί σε μια ποικιλία κλινικών διαταραχών, όπως η σχιζοφρένεια [33-35], η άνοια [36-38] και η νόσος Parkinson [39,40].

Ο ιππόκαμπος στέλνει μεγάλο αριθμό προβολών στον προμετωπιαίο λοβό, αλλά η περιοχή αυτή δεν προβάλλει πίσω στον ιππόκαμπο και έχει λίγες και μη ισχυρές προβολές στον ενδορινικό φλοιό [41]. Η ανατροφοδότηση στον κροταφικό λοβό φαίνεται να γίνεται μέσω του ενωτικού πυρήνα του θαλάμου που συνδέει τον προμετωπιαίο λοβό με τον θάλαμο και αυτές είναι και οι κύριες θαλαμικές προβολές στον ιππόκαμπο [42]. Καθώς ο θάλαμος συμμετέχει στον προσανατολισμό των αισθήσεων αλλά και στην εγρήγορηση [43], η διασύνδεση με τον προμετωπιαίο λοβό τον τοποθετεί σε καίρια θέση για να οδηγήσει διαφορετικές πηγές αισθητηριακών πληροφοριών στον κροταφικό λοβό. Τέλος, η έλικα του προσαγωγού – μια σημαντική εκτελεστική, αισθητηριακή περιοχή – συνδέεται με τον ενδορινικό φλοιό και το υπόθεμα, παρέχοντας ένα πρόσθετο, έμμεσο μονοπάτι μέσω του οποίου ο ιππόκαμπος μπορεί να λαμβάνει αισθητηριακές πληροφορίες [44].

Ο ρόλος της περιρινικής περιοχής και η σημασία της συστημικής και προσεκτικής ανάλυσης των μνημονικών λειτουργιών στην αναγνωριστική μνήμη αντικειμένου

Παρά το γεγονός ότι ο ιππόκαμπος και η αμυγδαλή θεωρούνταν ως βασικοί συμμετέχοντες στην αναγνωριστική μνήμη αντικειμένου, πρόσφατες συστημικές μελέτες αποκάλυψαν την μεγαλύτερη σημασία των περιοχών του κροταφικού λοβού, με ιδιαίτερη έμφαση στην περιρινική περιοχή. Και ενώ ο ιππόκαμπος ξεκάθαρα συνεισφέρει στην απόδοση των ζώων κατά τη διάρκεια των δοκιμασιών αναγνώρισης αντικειμένου, κάτω από συγκεκριμένες, όχι πλήρως κατανοητές συνθήκες, δε φαίνεται να είναι απαραίτητος για τη βασιζόμενη στην εξοικείωση αναγνώριση των πληροφοριών του αντικειμένου αυτού κάθεαυτού.

Ένας μεγάλος αριθμός από μελέτες, όλες υποδεικνύουν την περιρινική περιοχή ως μια σημαντική περιοχή για την αναγνωριστική μνήμη αντικειμένου [45-51]. Επειδή όμως, καμιά νοητική διεργασία ή περιοχή του εγκεφάλου δεν λειτουργεί αυτόνομα, ένα σημαντικό θέμα προς έρευνα θα αποτελεί ο τρόπος με τον οποίο η περιρινική περιοχή αλληλεπιδρά με τις άλλες περιοχές του εγκεφάλου όπως ο ιππόκαμπος και η αμυγδαλή για την ολοκλήρωση των πληροφοριών για το αντικείμενο και έχει προταθεί ότι ο ιππόκαμπος ίσως είναι ιδιαίτερα σημαντικός για τη σύνδεση χωρικών ή συναφών πληροφοριών με συγκεκριμένες πληροφορίες του αντικειμένου που επεξεργάζεται η περιρινική περιοχή. Ακόμη, μια άλλη περιοχή του μέσου κροταφικού λοβού με ισχυρές προβολές στον ιππόκαμπο, ο παραϊπποκάμπειος φλοιός, λαμβάνει ανατομικές εισροές από φλοιϊκές περιοχές που συμμετέχουν σε επεξεργασία οπτικών και χωρικών πληροφοριών. Ο περιρινικός και ο παραϊπποκάμπειος φλοιός προβάλλουν εν παραλλήλω στον ιππόκαμπο.

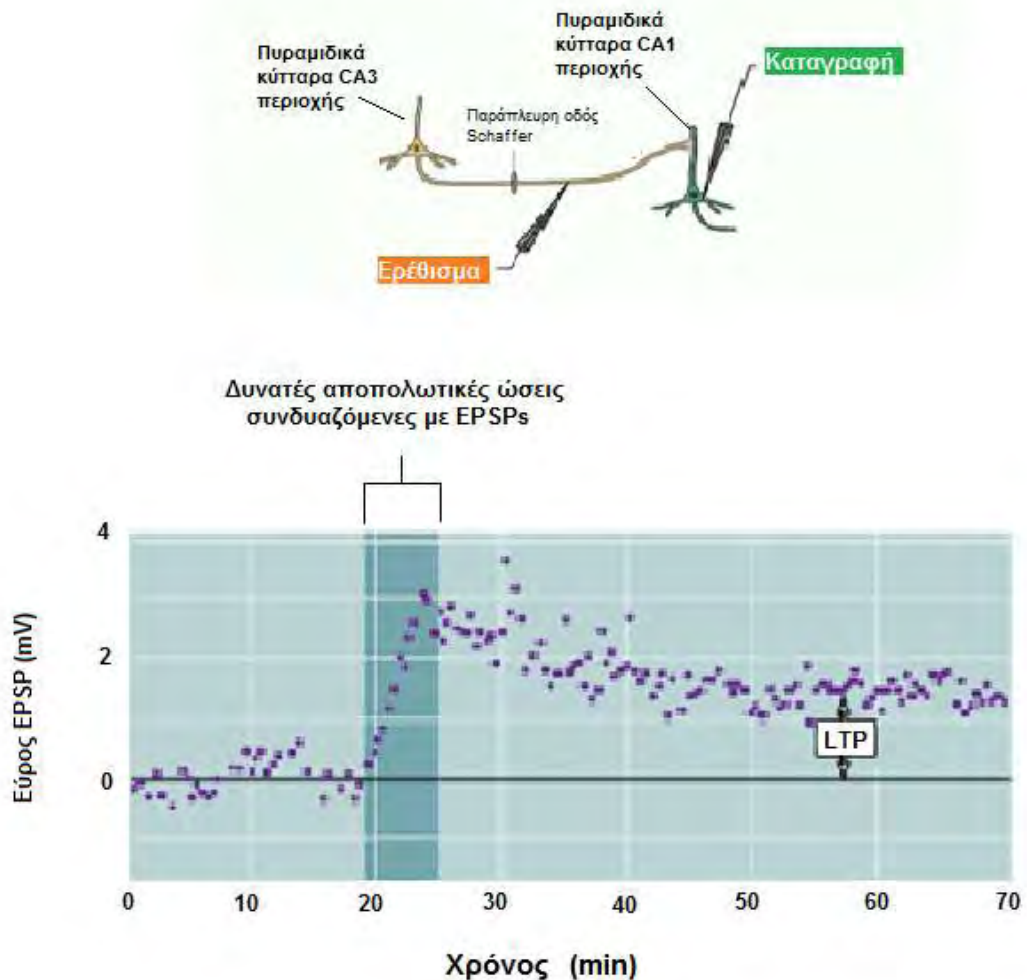
Είναι λοιπόν πολύ πιθανό ότι ο ιππόκαμπος εμπλέκεται στην ολοκλήρωση των πληροφοριών για τα αντικείμενα και των οπτικοχωρικών πληροφοριών που προέρχονται από τον περιρινικό και παραϊπποκάμπειο φλοιό αντίστοιχα και ότι *η ολοκλήρωση αυτή αποτελεί τη βάση του σχηματισμού της πολύπλοκης επεισοδικής μνήμης.*

Μια καλύτερη κατανόηση του τρόπου λειτουργίας των συστατικών ενός τέτοιου μνημονικού δικτύου, τόσο σε ανεξάρτητο επίπεδο όσο και σε επίπεδο αλληλεπίδρασης, θα οδηγήσει σε μια βαθύτερη γνώση της φύσης των φυσιολογικών αλλά και των παθολογικών μνημονικών λειτουργιών [52].

Συμπερασματικά, η γνώση που θα αποθηκευθεί τελικά ως δηλωτική μνήμη, αρχικώς σχηματίζεται μέσω αισθητηριακών διαδικασιών σε μία ή περισσότερες από τις τρεις πολυδύναμες συνειρμικές φλοιϊκές περιοχές τον προμετωπιαίο, τον μεταιχμιακό και τον βρεγματο-ινιακο-κροταφικό φλοιό όπου συνθέτονται οπτικές, ακουστικές και σωματικές πληροφορίες. Στη συνέχεια η πληροφορία μεταβιβάζεται στο σχηματισμό του ιππόκαμπου ο οποίος αποτελεί ένα ενδιάμεσο στάδιο για τη διανομή της πληροφορίας σε διάφορες φλοιϊκές περιοχές, ανάλογα με το είδος της πληροφορίας. Στις φλοιϊκές αυτές περιοχές γίνεται επεξεργασία της, για να επιστρέψει και πάλι πίσω στον ιππόκαμπο. Τελικά η πληροφορία καταλήγει εκεί όπου αρχικά δημιουργήθηκε, στις πολυδύναμες συνειρμικές περιοχές του νεοφλοιού όπου και αποθηκεύεται.

1.5. Μακροχρόνια Ενδυνάμωση (Long-term potentiation - LTP)

Ο ιππόκαμπος παρουσιάζει μια μοναδική ιδιότητα: είναι η εκλεκτική εγκεφαλική περιοχή όπου λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της Μακρόχρονης Ενδυνάμωσης (Long Term Potentiation, LTP). Η Μακροχρόνια Ενδυνάμωση αποτελεί ένα νευροφυσιολογικό πειραματικό μοντέλο μνήμης που περιγράφει έναν συγκεκριμένο τύπο συναπτικής πλαστικότητας που συναντάται μόνο στον ιππόκαμπο



Εικόνα 11. Μακροχρόνια Ενδυνάμωση (Long Term Potentiation – LTP)

Αύξηση του εύρους των διεγερτικών μετασυναπτικών δυναμικών μετά από μια σειρά ερεθισμάτων υψηλής συχνότητας και παραγωγή του LTP.
(EPSP: Excitatory Post Synaptic Potentials)

(Τροποποιημένο από Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science, Fourth Edition, 2000*)

Το 1973 οι Timothy Bliss και Terje Lomo ανακάλυψαν ότι μια σύντομη, υψηλής συχνότητας σειρά ερεθισμάτων (*tetanus*), που εφαρμόζεται σε οποιοδήποτε από τις τρεις συναπτικές οδούς της τρισυναπτικής αγκύλης του ιππόκαμπου, προκαλεί αύξηση του εύρους των διεγερτικών μετασυναπτικών δυναμικών (*excitatory postsynaptic potentials-EPSPs*) στους νευρώνες - στόχους του ιππόκαμπου προκαλώντας μεταβολές της συναπτικής πλαστικότητας. Η διευκόλυνση αυτή της νευρωνικής μεταβίβασης ονομάζεται **μακροχρόνια ενδυνάμωση** [53] (Εικόνα 11).

Είναι δυνατόν να διακριθούν δύο φάσεις του LTP, που μπορούν να αντιστοιχισθούν με τα δύο στάδια της αποθήκευσης της μνήμης, τη βραχυπρόθεσμη και την μακροπρόθεσμη. Ένα μεμονωμένο ερέθισμα παράγει ένα βραχυχρόνιο LTP, που ονομάζεται *πρώιμο LTP* (*early LTP*), διαρκεί 1-3 ώρες και δεν απαιτεί τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Τέσσερα ή περισσότερα ερεθίσματα προκαλούν μια πιο επίμονη φάση του LTP, που ονομάζεται *όψιμο LTP* (*late LTP*), διαρκεί τουλάχιστον 24 ώρες και απαιτεί τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Οι μηχανισμοί που παράγουν το πρώιμο LTP δεν είναι οι ίδιοι στις τρεις οδούς, ενώ οι μηχανισμοί του όψιμου LTP φαίνεται να είναι οι ίδιοι [1].

1.5.1. Χαρακτηριστικά Της Μακροχρόνια Ενδυνάμωσης

Ιδιαίτερα το LTP στην παράπλευρη οδό του Schaffer έχει συγκεκριμένες ιδιότητες που το καθιστούν έναν ελκυστικό νευρωνικό μηχανισμό για τη μελέτη της διαδικασίας αποθήκευσης της μνήμης. Πρώτον, για την πρόκληση του LTP στην οδό αυτή απαιτείται ενεργοποίηση πολλών μαζί αξόνων που κατευθύνονται προς τη CA1 περιοχή, ένα χαρακτηριστικό που καλείται *συνεργικότητα*.

Δεύτερον, στην παράπλευρη οδό του Schaffer απαιτείται *ταυτόχρονη πυροδότηση* τόσο του προσυναπτικού όσο και του μετασυναπτικού νευρώνα για να επιτευχθεί επαρκής εκπόλωση του μετασυναπτικού νευρώνα. Εάν ένα μόνο ερέθισμα στην παράπλευρη οδό του Schaffer, που φυσιολογικά δεν θα προκαλούσε την έκλυση LTP, συνδυάζεται με ισχυρή αποπόλωση του μετασυναπτικού CA1 κυττάρου μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα της τάξης των 100ms, το μέγεθος του EPSP αυξάνεται και παράγεται το LTP. Το τελευταίο χαρακτηριστικό συνάδει με τον κανόνα του Hebb που διατυπώθηκε το 1949 και σύμφωνα με τον οποίο: «Όταν ο άξονας ενός κυττάρου A...διεγείρει ένα κύτταρο B και επανειλημμένως ή συνεχώς παίρνει μέρος στην ενεργοποίησή του, μια αυξητική διεργασία ή μια μεταβολική αλλαγή λαμβάνει χώρα στο ένα ή και στα δύο κύτταρα ώστε η ικανότητα του A κυττάρου να διεγείρει το B κύτταρο να αυξάνεται».

Τέλος, το LTP έχει την ικανότητα της *ειδικότητας του εισερχόμενου ερεθίσματος*: Όταν το LTP παράγεται από τη διέγερση μιας σύναψης, δεν εμφανίζεται σε άλλες ανενεργές συνάψεις που είναι σε επαφή με τον ίδιο νευρώνα. Μπορούμε λοιπόν να πούμε ότι το LTP ενεργοποιεί αυστηρά συνάψεις παρά κύτταρα. Το χαρακτηριστικό αυτό του LTP είναι σύμφωνο με τη συμμετοχή του στο σχηματισμό της μνήμης. Εάν η διέγερση μιας σύναψης

οδηγούσε στη μεταβολή του δυναμικού και άλλων απενεργοποιημένων συνάψεων, θα ήταν δύσκολο να αυξηθεί επιλεκτικά το συναπτικό δυναμικό συγκεκριμένων συνάψεων, όπως αυτό απαιτείται για το σχηματισμό της μνήμης.

1.6. Πιθανοί Μοριακοί Μηχανισμοί Που Εμπλέκονται Στις Διαδικασίες Μάθησης Και Μνήμης

Στον εγκέφαλο των θηλαστικών, οι κυτταρικές και μοριακές αλλαγές που αντιπροσωπεύουν τις δύο μορφές μνήμης, τη μη δηλωτική και τη δηλωτική, είναι δύσκολο να μελετηθούν καθώς τα αποτελέσματα είναι συχνά μικρής έντασης και η συνεισφορά των μεμονωμένων συνάψεων στη διαδικασία της μάθησης δεν είναι ακόμη καθορισμένη. Με σκοπό να υπερνικηθεί το εμπόδιο αυτό, τα πιο απλά νευρικά συστήματα των ανώτερων ασπόνδυλων οργανισμών έχουν αποδειχθεί πολύ χρήσιμα για την ανάλυση των προβλημάτων συμπεριφοράς και έχουν βελτιώσει τις γνώσεις μας σχετικά με τις συναπτικές θέσεις και τους μηχανισμούς που διέπουν πολλούς βασικούς τύπους μάθησης και μνήμης [54-56].

Ένα τέτοιο σύστημα μοντέλο αποτελεί το αντανακλαστικό απόσυρσης του βραγχίου και σιφονίου στο θαλάσσιο ασπόνδυλο οργανισμό *Aplysia californica*. Το αντανακλαστικό αυτό επιδέχεται ποικίλους τύπους μάθησης, συμπεριλαμβανομένης της απευαισθητοποίησης, της ευαισθητοποίησης και της κλασικής μάθησης, οι οποίες έχουν πολλά από τα συμπεριφορικά χαρακτηριστικά της μάθησης των θηλαστικών και προτείνοντας έτσι την πιθανή ύπαρξη κοινών μηχανισμών μεταξύ της *Aplysia* και των θηλαστικών [57-66].

Πρόσφατες μελέτες ποικίλων μνημονικών διαδικασιών, οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλο εύρος στην πολυπλοκότητά τους, από απλές μορφές μη δηλωτικής μνήμης σε ασπόνδυλα μέχρι σε πιο πολύπλοκες μορφές δηλωτικής μνήμης σε θηλαστικά, υποδηλώνουν, ότι οι αλλαγές στη δύναμη και τη δομή των συναπτικών συνδέσεων συνεισφέρουν σημαντικά σε αυτές τις ξεχωριστές μορφές αποθήκευσης της μνήμης [67]. Τόσο για τη μη δηλωτική όσο και για τη δηλωτική μνήμη, έχουν περιγραφεί δύο γενικοί τύποι αποθηκευτικών μηχανισμών: η βραχυπρόθεσμη μνήμη που διαρκεί λεπτά και η μακροπρόθεσμη μνήμη που διαρκεί ημέρες, εβδομάδες ή και περισσότερο. Αυτή η χρονική διάκριση στη συμπεριφορά αντικατοπτρίζεται σε συγκεκριμένους τύπους συναπτικής πλαστικότητας που διέπει κάθε τύπο συμπεριφορικής μνήμης καθώς και σε συγκεκριμένες μοριακές απαιτήσεις για κάθε μια από τις δύο αυτές μορφές συναπτικής πλαστικότητας.

Οι βραχυπρόθεσμες μορφές εμπλέκουν ομοιοπολικές μετατροπές προϋπαρχόντων πρωτεϊνών από μια ποικιλία κινασών και εκφράζονται ως αλλαγές της αποτελεσματικότητας προϋπαρχόντων συνδέσεων. Αντιθέτως, επιπρόσθετα από την παρουσία και ενεργοποίηση των PKA και MAPK, η μακροπρόθεσμη μορφή απαιτεί επίσης έκφραση γονιδίων μέσω της ενεργοποίησης της CREB, νέο mRNA και πρωτεϊνική σύνθεση. Ακόμη, η μακροπρόθεσμη

μορφή συνδέεται συχνά με την ανάπτυξη νέων συνάψεων. Για την αποθήκευση τόσο της μη δηλωτικής όσο και της δηλωτικής μνήμης, η συναπτική ανάπτυξη θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει την τελική και αυτό-υποστηριζόμενη αλλαγή που σταθεροποιεί τη μακροχρόνια διαδικασία.

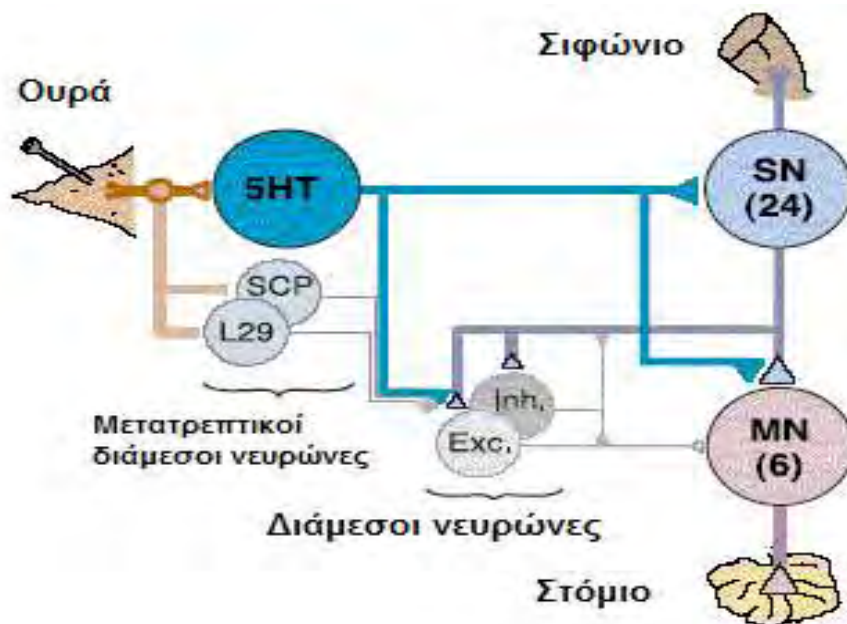
Σε συμπλήρωση της βραχυπρόθεσμης και μακροπρόθεσμης μνήμης, μια οικογένεια ενδιάμεσων διαδικασιών που διαρκούν μία ή περισσότερες ώρες και συχνά απαιτούν διαδικασίες μετάφρασης αλλά όχι μεταγραφής, μπορούν να παραχθούν από διάφορα πρωτόκολλα εκπαίδευσης χρησιμοποιώντας επαναλαμβανόμενο ή παρατεταμένο ερεθισμό.

1.6.1 Ευαισθητοποίηση Του αντανακλαστικού Απόσυρσης Του Βραγχίου Στην Aplysia: Μια Βασική Μορφή Αποθήκευσης Της Μη Δηλωτικής Μνήμης

Το νευρικό σύστημα της Aplysia αποτελείται μόνο από περίπου 20.000 μεγάλα, αναγνωρίσιμα νευρικά κύτταρα, τα οποία συγκεντρώνονται σε 10 κυρίως γάγγλια. Οι μοριακοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην αποθήκευση της μη δηλωτικής μνήμης έχουν εκτεταμένα μελετηθεί κυρίως για το αντανακλαστικό απόσυρσης του βραγχίου και του σιφονίου στην Aplysia [67]. Το νευρικό κύκλωμα του αντανακλαστικού απόσυρσης του βραγχίου εντοπίζεται στο κοιλιακό γάγγλιο και αποτελείται από 24 κεντρικούς αισθητικούς νευρώνες, που περιέχουν μηχανοϋποδοχείς, οι οποίοι νευρώνουν το δέρμα του σιφονίου και σχηματίζουν απευθείας μονοσυναπτικές συνδέσεις με 6 κινητικά κύτταρα του βραγχίου (Εικόνα 12). Οι αισθητικοί νευρώνες επίσης, σχηματίζουν έμμεσες συνδέσεις με κινητικά κύτταρα μέσω μικρών ομάδων διεγερτικών και κατασταλτικών ενδιάμεσων νευρώνων. Η ικανότητα αναγνώρισης μεμονωμένων νευρώνων και καταγραφής της δραστηριότητάς τους, έχει καταστήσει δυνατό τον καθορισμό των κυρίων συστατικών των νευρικών κυκλωμάτων συγκεκριμένων συμπεριφορών αλλά και την διευκρίνιση των σημαντικών σημείων και μηχανισμών που απαιτούνται για την αποθήκευση των μνημονικών αναπαράστασεων.

Όπως και σε άλλους τύπους αμυντικών αντανακλαστικών, το αντανακλαστικό απόσυρσης του βραγχίου μπορεί να τροποποιηθεί από ποικίλους διάφορετικούς τύπους μη δηλωτικής μνήμης. Στην παρούσα μελέτη θα επικεντρωθούμε ενδεικτικά στην ευαισθητοποίηση, μια θεμελιώδη μορφή μη σχετιζόμενης μάθησης κατά την οποία ένα ζώο μαθαίνει σχετικά με τις ιδιότητες ενός μεμονωμένου δυσάρεστου ερεθίσματος και οργανώνει το σχηματισμό μιας μαθημένης απόκρισης φόβου. Όπως και σε άλλους τύπους αμυντικών συμπεριφορών, η μνήμη για την ευαισθητοποίηση του αντανακλαστικού απόσυρσης είναι διαβαθμισμένη και επαναλαμβανόμενα επώδυνα ερεθίσματα στην ουρά οδηγούν σε μακροχρόνια μνήμη. Ένα μεμονωμένο επώδυνο ερέθισμα στην ουρά προκαλεί βραχυχρόνια ευαισθητοποίηση που διαρκεί λεπτά, ενώ επαναλαμβανόμενα επώδυνα ερεθίσματα τα οποία δίνονται με ενδιάμεσα χρονικά διαστήματα παράγουν μακροχρόνια ευαισθητοποίηση που διαρκεί μέχρι και εβδομάδες [68].

Η απλότητα του νευρικού συστήματος που διέπει αυτές τις συμπεριφορικές μεταβολές [69] έχει επιτρέψει την ανάλυση σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο της βραχυχρόνιας και μακροχρόνιας μνήμης για την ευαισθητοποίηση. Αυτή η μονοσυναπτική σύνδεση του αισθητικού με τον κινητικό νευρώνα, που θεωρείται ότι είναι γλουταμινεργική [70-72], μπορεί να επαναδομηθεί σε κυτταρικές καλλιέργειες. Μια σειρά από μελέτες έχουν δείξει ότι το απλοποιημένο αυτό *in vitro* συστηματικό μοντέλο αναπαράγει αυτό που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της συμπεριφορικής εκπαίδευσης εάν τα επώδυνα ερεθίσματα στην ουρά αντικατασταθούν με σύντομες εφαρμογές σεροτονίνης (5-HT), έναν μετατρεπτικό νευροδιαβιβαστή που απελευθερώνεται φυσιολογικά στο ζώο όταν εφαρμοσθεί το ερέθισμα [73-75]. Μια μεμονωμένη σύντομη εφαρμογή 5-HT παράγει μια βραχυχρόνια αλλαγή στη συναπτική αποτελεσματικότητα (βραχυχρόνια διευκόλυνση), ενώ επαναλαμβανόμενες και με ενδιάμεσο διάστημα εφαρμογές παράγουν αλλαγές στη συναπτική πλαστικότητα που μπορεί να διαρκέσουν περισσότερο από μια εβδομάδα (μακροχρόνια διευκόλυνση) [76]. Η διευκόλυνση είναι επίσης μεγαλύτερη και με μακρύτερη διάρκεια εάν ο προσυναπτικός αισθητικός νευρώνας ενεργοποιήσει τα δυναμικά ενεργείας αμέσως πριν την εφαρμογή της σεροτονίνης [77-79].



Εικόνα 12. Σχηματική παρουσίαση των αισθητικών, κινητικών και ενδιάμεσων νευρώνων που εμπλέκονται στο αντανάκλαστικό απόσυρσης στην *Aplysia*.

5HT: σεροτονεργικοί νευρώνες, Exc: διεγερτικοί νευρώνες, Inh: ανασταλτικοί νευρώνες, SN: αισθητικοί νευρώνες, MN: κινητικοί νευρώνες

(Τροποποιημένο από Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science*, Fourth Edition, 2000)

Κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την βραχυχρόνια και ενδιάμεση αποθήκευση της μη δηλωτικής μνήμης

Η Ευαισθητοποίηση αποτελεί μια ετεροσυναπτική διαδικασία. Η αύξηση της συναπτικής δύναμης προκαλείται από ενδιάμεσους νευρώνες. Υπάρχουν τουλάχιστον τρεις ομάδες ενδιάμεσων νευρώνων. Από αυτούς, οι πιο καλά μελετημένοι είναι αυτοί που απελευθερώνουν σεροτονίνη [80]. Οι σεροτονεργικοί και οι υπόλοιποι ενδιάμεσοι νευρώνες σχηματίζουν συνάψεις με τους αισθητικούς νευρώνες (Εικόνες 12). Οι αισθητικοί νευρώνες με τη σειρά τους σχηματίζουν συνάψεις με τα κινητικά κύτταρα.

Μετά από ένα επώδυνο ερέθισμα στην ουρά, απελευθερώνονται από τους ενδιάμεσους νευρώνες σεροτονίνη. Η σεροτονίνη που απελευθερώνεται συνδέεται σε δύο τύπους σεροτονεργικών υποδοχέων στον αισθητικό νευρώνα.

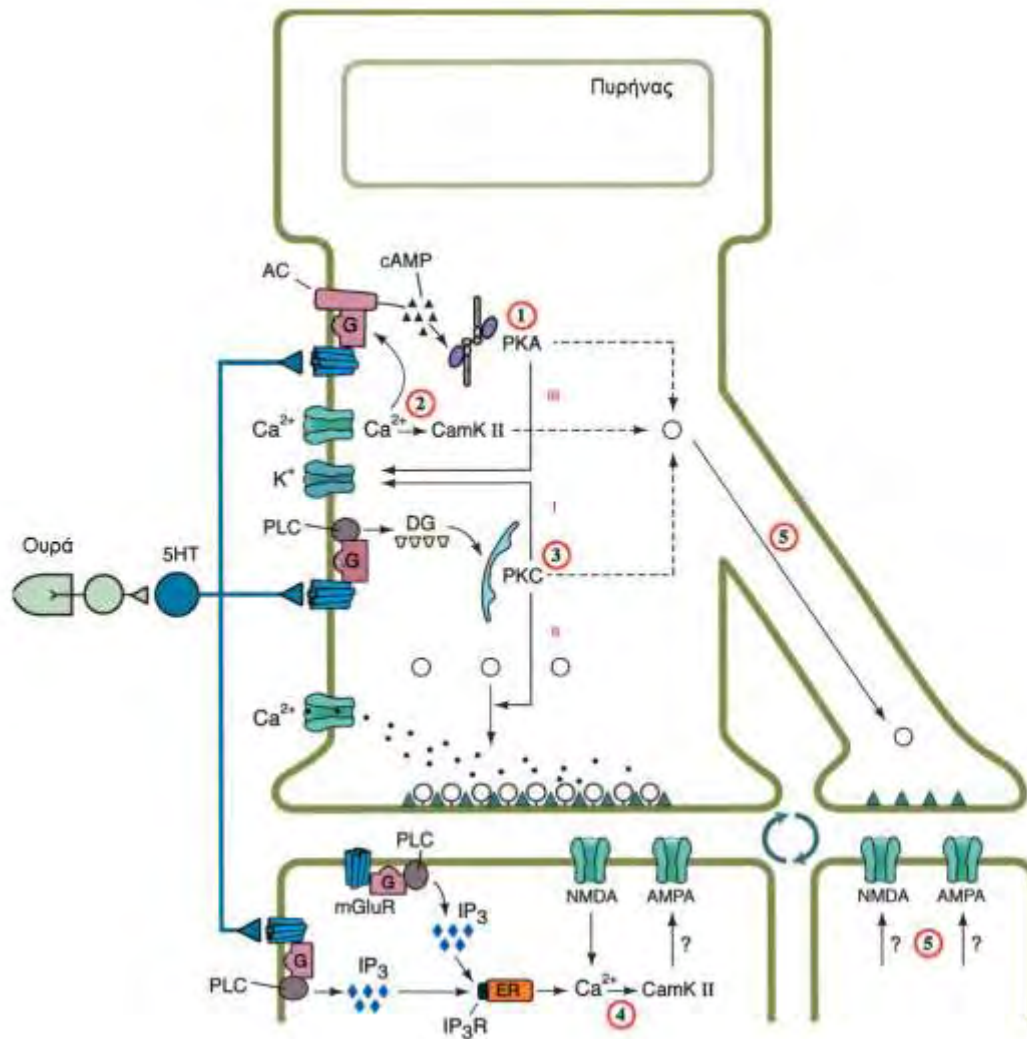
Ο πρώτος από αυτούς τους υποδοχείς συνδέεται με μια G-πρωτεΐνη η οποία αυξάνει τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης. Η αδενυλική κυκλάση με τη σειρά της μετατρέπει το ATP σε cAMP και αυξάνονται με τον τρόπο αυτό τα επίπεδα του cAMP στον αισθητικό νευρώνα. Το cAMP ενεργοποιεί την cAMP εξαρτώμενη κινάση A (PKA) με το να συνδέεται στην ρυθμιστική υπομονάδα και να απελευθερώνει την καταλυτική [81,82]. Η καταλυτική υπομονάδα της PKA δρα με τη σειρά της σε τρεις οδούς (Εικόνα 13):

Στην οδό I, η καταλυτική υπομονάδα φωσφορυλιώνει ιοντικούς διαύλους K^+ και έτσι αυξάνεται το ρεύμα K^+ . Η αύξηση του K^+ παρατείνει το δυναμικό και αυξάνει την είσοδο Ca^{2+} από N-τύπου διαύλους Ca^{2+} .

Στην οδό II, συναπτικά κυστίδια στον αισθητικό νευρώνα που περιέχουν μεταβιβασθή κινητοποιούνται προς την ενεργό ζώνη και αυξάνεται έτσι η ικανότητα εξωκύτωσης.

Στην οδό III η δράση της καταλυτικής υπομονάδας της PKA προκαλεί το άνοιγμα L τύπου διαύλων Ca^{2+} και αυξάνεται έτσι ακόμη περισσότερο η είσοδος Ca^{2+} στον αισθητικό νευρώνα.

Ο δεύτερος υποδοχέας συνδέεται με μια άλλη G-πρωτεΐνη η οποία ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C (PLC) η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί μια διαμεμβρανική διακυλογλυκερόλη με τελική κατάληξη την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) [83,84]. Η PKC εμπλέκεται μαζί με την PKA στις οδούς 2 και 3 (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Μηχανισμοί σχηματισμού της βραχυπρόθεσμης και ενδιάμεσης μνήμης στην Aplysia.

Από τον ενδιάμεσο προσυναπτικό νευρώνα απελευθερώνεται σεροτονίνη η οποία συνδέεται τόσο σε προσυναπτικούς υποδοχείς του αισθητικού νευρώνα όσο και σε μετασυναπτικούς του κινητικού νευρώνα. Διαφορετικοί τύποι βραχυπρόθεσμης και ενδιάμεσης συναπτικής πλαστικότητας που συνεισφέρουν στην μάθηση στην Aplysia εμπλέκουν διαφορετικούς συνδυασμούς προ- και μετασυναπτικών μορίων συμπεριλαμβανομένων (1) προσυναπτική PKA, (2) προσυναπτικά ιόντα ασβεστίου και CamKII, (3) προσυναπτική PKC, (4) μετασυναπτικά ιόντα ασβεστίου και CamKII, and (5) επιστράτευση προ- και πιθανώς και μετασυναπτικών μορίων σε νέες θέσεις.

5-HT: σεροτονίνη, PLC: φωσφολιπάση C, PKC: πρωτεϊνική κινάση C, DG: διακυλογλυκερόλη, IP3: φωσφορική ινοσιτόλη 3, ER: ενδοπλασματικό δίκτυο, CamK II: Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases II, AC: αδενυλική κυκλάση, cAMP: κυκλικό AMP, PKA: πρωτεϊνική κινάση A, mGluR- AMPA-NMDA: υποδοχείς γλουταμικού

(Πηγή: Hawkins RD, Kandel ER, Bailey CH. *Molecular mechanisms of memory storage in Aplysia*. Biol Bull 2006;210:174–91)

Η αλλαγή στα επίπεδα του cAMP και των ιόντων ασβεστίου που πυροδοτείται από την ενεργοποίηση των υποδοχέων σεροτονίνης και των ιοντικών διαύλων ρυθμίζει την ενεργότητα διαφόρων κινασών και φωσφατασών που ελέγχουν τη διάρκεια και τη δύναμη των αλλαγών στη συναπτική ικανότητα. Οι δεύτεροι αυτοί αγγελιοφόροι προκαλούν την παροδική ενίσχυση των συναπτικών συνδέσεων μέσω ομοιολογικών μετατροπών της ενεργοποίησης των διαύλων καθώς και την αύξηση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών στα προσυναπτικά άκρα [67,85] μεταξύ αισθητικού νευρώνα και κινητικού κυττάρου.

Εάν η δράση της σεροτονίνης έχει λίγο μεγαλύτερη διάρκεια, μπορεί να προκαλέσει ενδιάμεση διευκόλυνση της μεταβίβασης, η οποία απαιτεί πρωτεϊνική σύνθεση και εμπλέκει την κινάση MAP καθώς και την PKA ή (κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες) την PKC [86-87].

Όλοι αυτοί οι μηχανισμοί θεωρούνται ότι είναι προσυναπτικοί. Παρόλα αυτά, πρόσφατα δεδομένα προτείνουν ότι η ενδιάμεση διευκόλυνση της μεταβίβασης ίσως εμπλέκει και μετασυναπτικούς μηχανισμούς συμπεριλαμβανομένων της ενδοκυττάριας απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου από τις ενδοκυττάριας αποθήκες, ενεργοποίηση της εξαρτόμενης από τα ιόντα ασβεστίου κινάσης II (CamKII) ή της PKC και την είσοδο των υποδοχέων AMPA [88-91] (Εικόνα 13).

Κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τη μακροχρόνια αποθήκευση της μη δηλωτικής μνήμης

Εάν το επώδυνο ερέθισμα επαναλαμβάνεται τότε η μνήμη γίνεται πιο σταθερή και μετατρέπεται σε μακροπρόθεσμη [92,93]. Είναι σαφές ότι δομικές αλλαγές συνοδεύουν τις αλλαγές στη συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της μακροχρόνιας ευαισθητοποίησης και οι αλλαγές αυτές μπορούν να ανιχνευθούν στο επίπεδο των αναγνωρισμένων συνάψεων που εμπλέκονται ισχυρά στη μάθηση. Η μακροχρόνια συναπτική αποτελεσματικότητα επιτυγχάνεται με αλλαγές στο μέγεθος, στον αριθμό και στην πληρότητα των συναπτικών κυστιδίων των συναπτικών ενεργών ζωνών [94].

Περιγράφεται στη συνέχεια αναλυτικότερα ο πιθανός μηχανισμός της μακροχρόνιας ευαισθητοποίησης στο αντανεκλαστικό απόσπυσης της Aplysia [95]. Ένα επαναλαμβανόμενο ερέθισμα προκαλεί αύξηση των ενδοκυττάριας επιπέδων cAMP που διαρκεί αρκετά λεπτά (Εικόνα 14, 1). Στο μοριακό επίπεδο, αυτός ο ισχυρότερος ερεθισμός προκαλεί την καταλυτική υπομονάδα της PKA να επιστρατεύσει την κινάση p42 MAPK, και οι δύο μαζί στη συνέχεια να μεταφερθούν στον πυρήνα. Εκεί, φωσφορυλιώνουν πυρηνικούς στόχους, συμπεριλαμβανομένων και άλλων κινασών, που με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς παράγοντες και ενεργοποιούν την γονιδιακή έκφραση που απαιτείται για την επαγωγή της μακροχρόνιας μνήμης [96-98].

Συγκεκριμένα στον πυρήνα η PKA και η MAPK (Εικόνα14, 3-6):

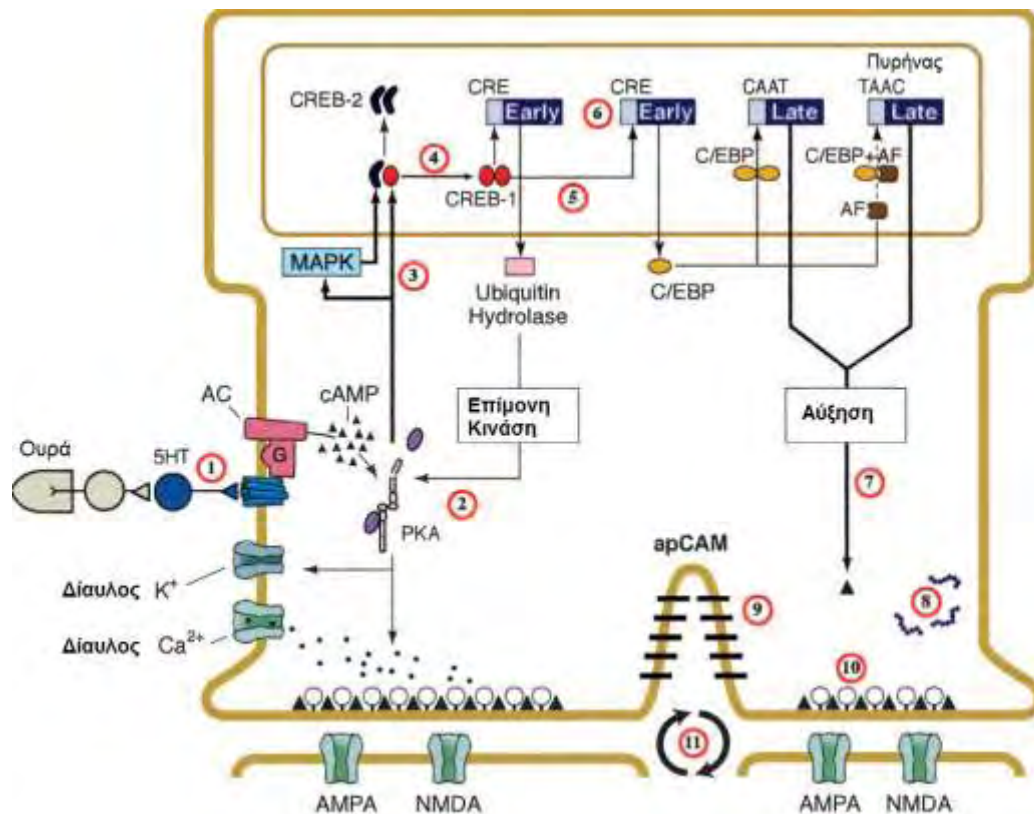
1. φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν την CREB πρωτεΐνη (cAMP-response element binding protein), έναν μεταγραφικό παράγοντα, και

2. αναστέλλουν την κατασταλτική δράση της CREB-2, ενός αναστολέα της CREB-1.

Στα κύτταρα των θηλαστικών, η ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης γίνεται μέσω της φωσφορυλίωσης μεταγραφικών παραγόντων που συνδέονται με το CRE (cAMP-responsive element). Το CRE αποτελεί ένα στοιχείο απόκρισης στο DNA και περιέχεται στην περιοχή ελέγχου του γονιδίου. Η σύνδεση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων σε αυτά τα στοιχεία απόκρισης ρυθμίζει την δραστηριότητα της RNA πολυμεράσης, και επομένως αποφασίζει πότε και σε ποιο επίπεδο θα εκφρασθεί το γονίδιο. Η πρωτεΐνη CREB1, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μεταγραφικούς παράγοντες που αναγνωρίζουν το CRE και η οποία λειτουργεί ως ενεργοποιητής της μεταγραφής μόνο μετά την φωσφορυλίωσή του από τις PKA, MAPK, ή CamK.

Η CREB-1 με τη σειρά της ενεργοποιεί διάφορα γονίδια μεταξύ των οποίων και αυτό που κωδικοποιεί μια γιουμπκουϊτίνη υδρολάση, απαραίτητη για την ελεγχόμενη πρωτεόλυση της καταλυτικής υπομονάδας της PKA. Η αποκοπή της καταλυτικής υπομονάδας της PKA οδηγεί σε συνεχή φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων της PKA (Εικόνα 14, 3). Ένα δεύτερο γονίδιο που ενεργοποιείται από την CREB-1 κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα C/EBP (CCAAT-enhancer-binding proteins), ο οποίος δρα τόσο ως ομοδιμερές όσο και ως ετεροδιμερές με ενεργοποιητικό παράγοντα (AF) για την ενεργοποίηση και άλλων γονιδίων που οδηγούν στο σχηματισμό νέων συνάψεων (Εικόνα 14, 7-10).

Στη μακροπρόθεσμη ευαισθητοποίηση βλέπουμε ότι οι καταλυτικές υπομονάδες συνεχίζουν να φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες σημαντικές για την αύξηση της απελευθέρωση των μεταβιβαστών και να ενισχύουν τις συνάψεις μέσω της CREB-1, για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την επιστροφή του δεύτερου αγγελιοφόρου cAMP στα φυσιολογικά του επίπεδα και ενώ το ερέθισμα παύει να υφίσταται.



Εικόνα 14. Μηχανισμοί σχηματισμού της μακροπρόθεσμης μη δηλωτικής μνήμης στην Aplysia.

Η μακροχρόνια συναπτική πλαστικότητα που συνεισφέρει στη μάθηση εμπλέκει μια σειρά κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών συμπεριλαμβανομένων (1) απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και βραχυχρόνια ενδυνάμωση των συναπτικών συνδέσεων, (2) ισοζύγιο μεταξύ της δραστηριότητας των κινάσων και των φωσφατασών στις συνάψεις, (3) ανάδρομη μεταφορά από τη σύναψη στον πυρήνα, (4) ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων του πυρήνα, (5) εξαρτόμενη από την ενεργοποίηση επαγωγή της έκφρασης γονιδίων, (6) αλλαγές στη χρωματίνη και επιγονικές αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων, (7) συναπτική δέσμευση των νεοπαραχθέντων γονιδιακών παραγόντων, (8) τοπική πρωτεϊνική σύνθεση στις ενεργές συνάψεις, (9) συναπτική αύξηση και σχηματισμό νέων συνάψεων, (10) ενεργοποίηση προϋπαρχόντων σιωπηλών συνάψεων και (11) αυτό-διαιωνιζόμενους μηχανισμούς και τη μοριακή βάση της παραμονής της μνήμης. Ο εντοπισμός αυτών των γεγονότων (τα οποία ίσως δρουν εν μέρει για να σταθεροποιήσουν μερικές από τις αλλαγές που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της βραχυπρόθεσμης και ενδιάμεσης πλαστικότητας), μετακινείται από τη σύναψη (1–2) στον πυρήνα (3–6) και στη συνέχεια πίσω στη σύναψη (7–11).

5HT: σεροτονίνη, AC: αδενυλική κυκλάση, cAMP: κυκλικό AMP, PKA: πρωτεϊνική κινάση A, CRE: cAMP- response elements, CREB: cAMP- response element binding protein, MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase, CCAAT-enhancer-binding proteins, AMPA-NMDA: υποδοχείς γλουταμικού

((Πηγή: Hawkins RD, Kandel ER, Bailey CH. Molecular mechanisms of memory storage in Aplysia. Biol Bull 2006;210:174–91)

1.6.2. Περιγραφή Των Μοριακών Μηχανισμών Της Δηλωτικής Μνήμης

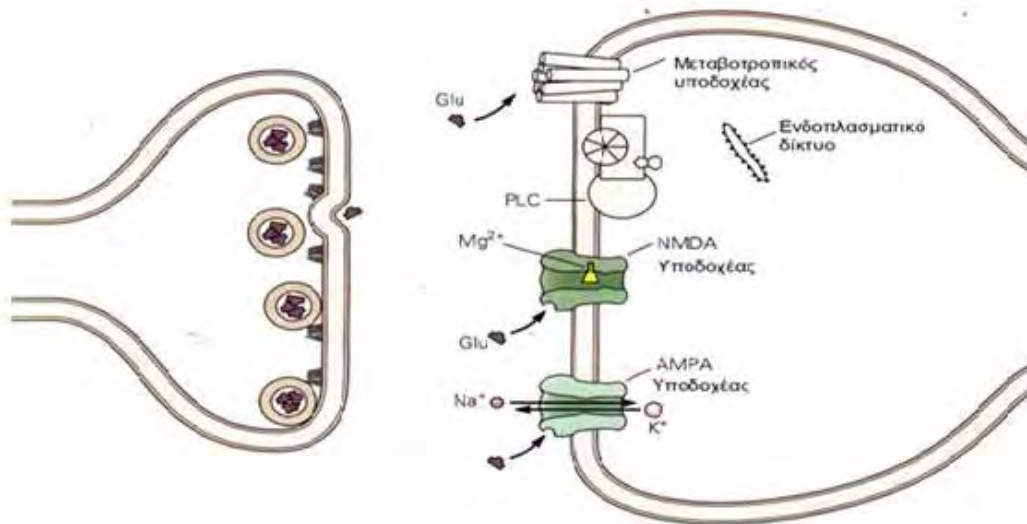
Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο ιππόκαμπος παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της χωρικής μνήμης στα θηλαστικά. Το LTP αποτελεί τη μοριακή βάση αυτής της διαδικασίας. Για το λόγο αυτό οι μελέτες για τη μνήμη έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη του LTP. Στη συνέχεια επιχειρείται μια προσπάθεια περιγραφής των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτό.

1.6.2.1. Πώς Παράγεται Το LTP

Βρέθηκε ότι το γλουταμικό οξύ είναι ο βασικός νευρομεταβιβαστής που εμπλέκεται στο LTP. Το γλουταμικό οξύ δρα σε δύο τύπους υποδοχέων, ιοντοτροπικούς και μεταβοτροπικούς. Κύριο ρόλο μέχρι σήμερα θεωρείται ότι διαδραματίζουν οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς, αν και συνεχώς προκύπτουν νέα στοιχεία για την εμπλοκή και των μεταβοτροπικών υποδοχέων στη συναπτική πλαστικότητα και στο σχηματισμό της μνήμης [99-102].

Πρώιμο LTP

Στη παράπλευρη οδό του Schaffer και στην οδό των διαπυρινοσών ινών, ο μηχανισμός του πρώιμου LTP είναι ο ίδιος. Συνοπτικά μπορούμε να πούμε, ότι η φυσιολογική απάντηση σε ένα ερέθισμα, είναι η απελευθέρωση γλουταμικού οξέος από τους αισθητικούς προσυναπτικούς νευρώνες που δρα τόσο στους non-NMDA (AMPA και μεταβοτροπικούς) όσο και στους NMDA υποδοχείς που αποτελούν ταυτοχρόνως και ιοντικά κανάλια. Ιόντα Na και K εισέρχονται στο κύτταρο από τους non-NMDA υποδοχείς, αλλά όχι και από τους NMDA οι οποίοι στην κατάσταση του δυναμικού ηρεμίας της μεμβράνης φράζονται από ιόντα Mg (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Φυσιολογική συναπτική μεταβίβαση.

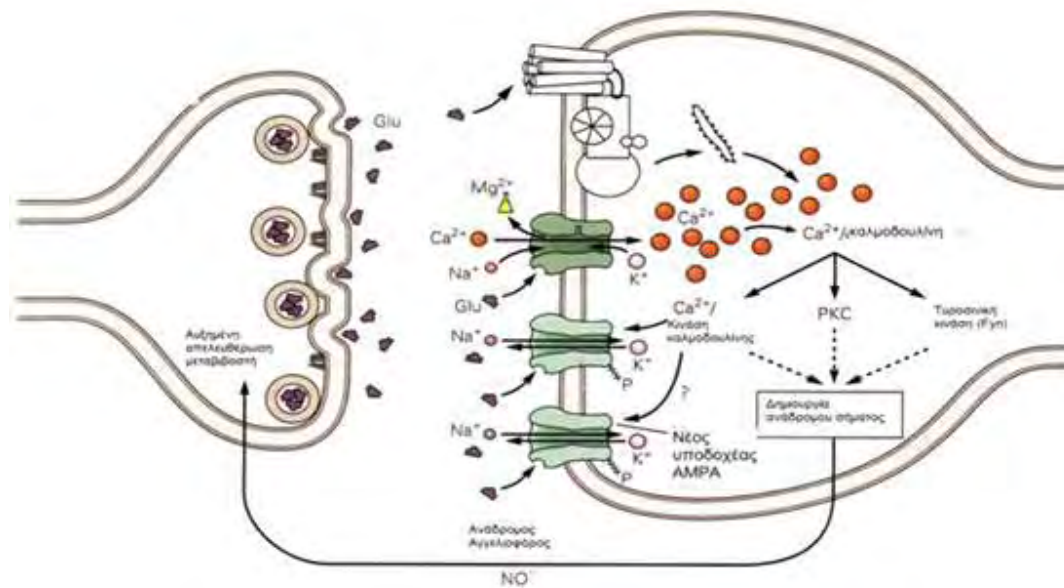
Φυσιολογική, χαμηλής συχνότητας συναπτική μεταβίβαση. Γλουταμικό από το προσυναπτικό άκρο δρα στους υποδοχείς AMPA και στους μεταβοτροπικούς υποδοχείς ενώ οι NMDA φράσσονται από Mg^{2+} .

Glu: γλουταμικό, PLC: φωσφολιπάση C, Mg: Μαγνήσιο

(Τροποποιημένο από Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science, Fourth Edition, 2000*)

Όταν η μετασυναπτική μεμβράνη εκπολώνεται από τη δράση των non-NMDA υποδοχέων, όπως συμβαίνει από μια υψηλής συχνότητας σειρά ερεθισμάτων που παράγει το LTP, η εκπόλωση έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των ιόντων Mg από τους NMDA υποδοχείς. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την είσοδο ιόντων ασβεστίου μέσα από τους NMDA υποδοχείς. Η επακόλουθη αύξηση του ασβεστίου μετασυναπτικά πυροδοτεί τις Ca^{2+} - εξαρτώμενες κινάσες (CaMKII και PKC) καθώς και την τυροσινική κινάση Fyn. Μαζί, οι κινάσες αυτές παράγουν το LTP. Η CaMKII φωσφορυλιώνει τους non-NMDA υποδοχείς και αυξάνει την ευαισθησία τους στο γλουταμικό οξύ αλλά και ενεργοποιεί κάποιους άλλους «σιωπηλούς» ιοντοτροπικούς υποδοχείς. Οι αλλαγές αυτές συμμετέχουν στην διατήρηση του LTP.

Επιπρόσθετα, καθώςον παράγεται το LTP, το μετασυναπτικό κύτταρο θεωρείται ότι απελευθερώνει αγγελιοφόρους που μπορούν να δράσουν ανάδρομα, και ένας εκ των οποίων φαίνεται ότι είναι το μονοξείδιο του αζώτου (Nitric Oxide – NO). Το τελευταίο, δρα στις κινάσες του προσυναπτικού νευρώνα για να προκαλέσει την αύξηση της απελευθέρωσης των μεταβιβαστών η οποία με τη σειρά της συνεισφέρει στο LTP (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Επαγωγή της Μακροχρόνιας Ενδυνάμωσης (LTP).

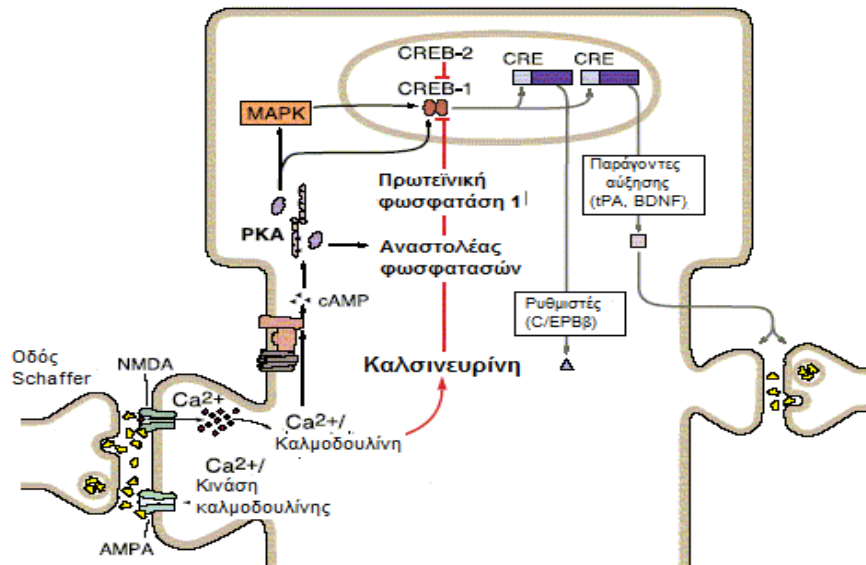
Κατά τη διάρκεια μιας σειράς ερεθισμάτων υψηλής συχνότητας που παράγουν το LTP, η μετασυναπτική μεμβράνη εκπολώνεται από τη δράση των non-NMDA υποδοχέων. Η εκπόλωση της μεμβράνης προκαλεί την απομάκρυνση των Mg^{2+} που φράζουν τους NMDA υποδοχείς. Έτσι Ca^{2+} εισέρχονται και από τους NMDA. Τα αυξημένα επίπεδα Ca^{2+} ενεργοποιούν έναν καταρράκτη βιοχημικών γεγονότων που συνεισφέρει στην διατήρηση του LTP μετασυναπτικά. Επιπρόσθετα, το μετασυναπτικό κύτταρο παράγει ανάδρομους αγγειοφόρους, όπως είναι το μονοξειδίο του αζώτου (NO), που δρύνει στον προσυναπτικό νευρώνα και ενισχύουν την απελευθέρωση του γλουταμικού.

Glu: γλουταμικό, NO: μονοξειδίο του αζώτου

(Τροποποιημένο από Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science, Fourth Edition, 2000*)

Όψιμο LTP

Το όψιμο LTP παράγεται εάν το ερέθισμα που προκαλεί την εμφάνιση του LTP επαναλαμβάνεται. Τότε το ρεύμα των ιόντων ασβεστίου επιστρατεύει την αδενυλική κινάση η οποία ενεργοποιεί μια cAMP- εξαρτώμενη κινάση. Η τελευταία μετακινείται προς τον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνει την CREB. Η CREB με τη σειρά της ενεργοποιεί στόχους που προκαλούν δομικές αλλαγές. Το όψιμο LTP πιστεύεται ότι έχει τους ίδιους μηχανισμούς και στις τρεις οδούς (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Όψιμο LTP.

Με επαναλαμβανόμενα ερεθίσματα το ρεύμα Ca²⁺ επιστρατεύει μια αδενυλική κυκλάση η οποία ενεργοποιεί μια PKA. Η τελευταία μεταφέρεται στον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνει την CREB πρωτεΐνη. Η CREB με τη σειρά της ενεργοποιεί στόχους που πιστεύεται ότι οδηγούν σε δομικές αλλαγές.

PKA: πρωτεϊνική κινάση A, CRE: cAMP- response elements, CREB: cAMP-response element binding protein

(Τροποποιημένο από Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science, Fourth Edition, 2000*)

Στην οδό των βρυωδών ιών βρέθηκε ότι το LTP εξαρτάται από την είσοδο Ca²⁺ στον προσυναπτικό νευρώνα. Το ρεύμα Ca²⁺ φαίνεται ότι ενεργοποιεί μια Ca²⁺ /καλμοδουλίνη εξαρτώμενη αδενυλική κυκλάση η οποία αυξάνει τα επίπεδα του cAMP και ενεργοποιεί την PKA στον προσυναπτικό νευρώνα. Ακόμη, το LTP στην οδό αυτή, μπορεί να ρυθμιστεί από μετατρεπτικά ερεθίσματα. Τα ερεθίσματα αυτά είναι νοραδρενεργικά και εμπλέκουν β-αδρενεργικούς υποδοχείς, οι οποίοι ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση.

Βλέπουμε λοιπόν πως στην αποθήκευση της δηλωτικής μνήμης με συμμετοχή του ιππόκαμπου στα θηλαστικά, οι πρωτεϊνικές κινάσες όπως η PKA και η PKC διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μετατροπή της βραχυπρόθεσμης σε μακροπρόθεσμη μνήμη.

1.6.3. Συνολική Εκτίμηση Των Μοριακών Μηχανισμών Αποθήκευσης Της Μνήμης

Από τα ευρήματα αυτά ανακύπτουν δύο ερωτήματα, με κεντρική θέση στην κατανόηση της σχέσης ανάμεσα στους μηχανισμούς που διέπουν την αποθήκευση της βραχυπρόθεσμης και μακροπρόθεσμης μνήμης:

1. Με ποιόν τρόπο οι ομοιοπολικές μετατροπές των προϋπαρχόντων πρωτεϊνών και οι αλλαγές της δύναμης των προϋπαρχόντων συνδέσεων κατά τη διάρκεια της βραχυπρόθεσμης μνήμης μετατρέπονται στην ανάπτυξη νέων λειτουργικών συναπτικών συνδέσεων και παραμονή της μνήμης κατά τη διάρκεια της μακροπρόθεσμης μορφής;
2. Ποιες είναι οι σχετικές συνεισφορές των προσυναπτικών και μετασυναπτικών νευρώνων σε αυτή τη διαδικασία;

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, οι μακράς διάρκειας μορφές της συναπτικής πλαστικότητας που σχετίζονται με τη μάθηση, συχνά συνδέονται με αλλαγές τόσο στον αριθμό όσο και στη δομή των συνάψεων [103,104]. Μερικές από τις καλύτερες αποδείξεις για τις αλλαγές στον αριθμό των συνάψεων προέρχονται από μελέτες της μακροχρόνιας (ημέρες έως εβδομάδες) πλαστικότητας στην *Aplysia*, ενώ η μακροχρόνια ευαισθητοποίηση *in vivo* και η μακροχρόνια διευκόλυνση *in vitro* συνοδεύονται και οι δύο από αυξήσεις στον αριθμό των προσυναπτικών κυστικών προσεκβολών των αισθητικών νευρώνων [105,106]. Η εμμονή της προκαλούμενης από τη μάθηση ανάπτυξης νέων συναπτικών συνδέσεων στην *Aplysia* είναι παράλληλη τόσο με την συμπεριφορική διάρκεια της μνήμης *in vivo* όσο και με την αύξηση της συναπτικής δύναμης *in vitro*. Σε συν-καλλιέργειες αισθητικών και κινητικών νευρώνων, η συναπτική ανάπτυξη απαιτεί σύνθεση νέων μακρομορίων και είναι συνδεδεμένη με ένα κυτταρικό πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης, τη μετατροπή των σχετιζόμενων με το NCAM μορίων κυτταρικής συνάφειας και την αναδιοργάνωση του προσυναπτικού δικτύου ακτίνης. Η όψιμη (ώρες) φάση του ιπποκάμπειου LTP που εξαρτάται από τη σύνθεση πρωτεϊνών συνοδεύεται επίσης από αυξήσεις τόσο στις μετασυναπτικές [107] όσο και στις προσυναπτικές [108] δομές, γεγονός που συνάδει με την αύξηση του αριθμού των συνάψεων.

Σε αντίθεση, η βραχυχρόνια (έως μια ώρα) πλαστικότητα και οι πρώιμες φάσεις της μακροχρόνιας πλαστικότητας στην *Aplysia* και στον ιππόκαμπο θεωρείται ότι εμπλέκουν έναν τελείως διαφορετικό μηχανισμό — ομοιοπολική μετατροπή προϋπαρχόντων πρωτεϊνών είτε σε προσυναπτικές (*Aplysia*) είτε σε μετασυναπτικές (ιππόκαμπος) δομές [67, 109].

Παρόλα αυτά, η ανακάλυψη ενδιάμεσων (2-3 ώρες) μορφών πλαστικότητας οι οποίες εμπλέκουν στοιχεία από τους βραχυχρόνιους και μακροχρόνιους μηχανισμούς τόσο στην *Aplysia* [86] όσο και στον ιππόκαμπο [110] θέτουν υπό αμφισβήτηση αυτόν τον διχασμό και η πρόκληση ενισχύθηκε πρόσφατα από δύο τύπους αποδείξεων. Πρώτον, τουλάχιστον κάτω

από συγκεκριμένες συνθήκες, οι προ- όσο και οι μετασυναπτικοί μηχανισμοί έχει αποδειχθεί ότι συνεισφέρουν στην όψιμη φάση του LTP στον ιππόκαμπο [110-118] καθώς και σε μια ποικιλία τύπων της βραχυχρόνιας πλαστικότητας στην Aplysia συμπεριλαμβανομένων της ομοσυναπτικής ενδυνάμωσης [119,120], της ετεροσυναπτικής διευκόλυνσης από την 5-HT [90,91], και της συναπτικής πλαστικότητας κατά τη διάρκεια της συμπεριφορικής μάθησης [121,122]. Σε πολλές περιπτώσεις, αναστολές που ενίνονται σε προ- και μετασυναπτικούς νευρώνες έχουν κάτι παραπάνω από προσθετικά αποτελέσματα [79,118,120,121,123], προτείνοντας ότι οι προ- και μετασυναπτικοί μηχανισμοί δεν είναι ανεξάρτητοι αλλά μάλλον δρουν συνεργικά. Ακόμη, σε ορισμένες περιπτώσεις, έχει αποδειχθεί ότι μετασυναπτικοί αναστολές μπορούν να επηρεάσουν προσυναπτικές ιδιότητες, προτείνοντας έτσι την ύπαρξη μιας διασυναπτικής σηματοδοτικής οδού [121].

Δεύτερον, απεικονιστικές μελέτες έχουν δείξει ότι ακόμη και οι πιο πρώιμες φάσεις του ιπποκάμπειου LTP συνοδεύονται από προ- και μετασυναπτικές δομικές αλλαγές. Δέκα λεπτά μετά την επαγωγή του LTP, παρατηρείται μια άνθιση από νέες προ- και μετασυναπτικές διαδικασίες [124-126], ακόμη πιο πρώιμα (λεπτά), υπάρχουν αυξήσεις στο μέγεθος των ακάνθων [127], κλάσματα/συγκεντρώσεις μετασυναπτικών γλουταμινεργικών υποδοχέων [109], και κλάσματα/συγκεντρώσεις προσυναπτικών πρωτεϊνών συνδεδεμένων με κυστίδια καθώς και περιοχές όπου τα προ- και μετασυναπτικά κλάσματα συνεντοπίζονται [128]. Επιπρόσθετα, οι προσυναπτικές αλλαγές φαίνεται να εξαρτώνται σε ανάδρομα σήματα (για παράδειγμα NO) από τα μετασυναπτικά κύτταρα [126,129].

Ομοίως με την κλασμάτωση/συγκέντρωση των συναπτικών πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια του LTP, η ενδιάμεση διευκόλυνση στην Aplysia συνοδεύεται από το γέμισμα των προϋπαρχόντων άδειων προσυναπτικών κυστικών συναπτικών διευρύνσεων με συναπτικά κυστίδια [130]. Ο Kim και οι συνεργάτες του εφάρμοσαν ένα πρωτόκολλο μειωμένης 5-HT το οποίο επιλεκτικά προκαλεί διευκόλυνση στην ενδιάμεση φάση χωρίς όμως να προκαλεί μακροχρόνια διευκόλυνση [131]. Βρήκαν ότι η μεμονωμένη ενδιάμεση διευκόλυνση συνοδεύεται από ανακατανομή και κλασμάτωση των συναπτικών κυστιδιακών πρωτεϊνών στις άδειες κυστικές διευρύνσεις των τελικών απολήξεων των αισθητικών νευρώνων σε διάστημα 0.5 ωρών και 3 ωρών. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν όμοιο με αυτό που εμφανίζονταν όταν η ενδιάμεση και η μακροχρόνια διευκόλυνση προκαλούνταν ταυτόχρονα από το μακροχρόνιο πρωτόκολλο.

Παρόλα αυτά, οι προσυναπτικές δομικές αλλαγές που προκλήθηκαν από το μειωμένο πρωτόκολλο 5-HT διέφεραν από αυτές που προκλήθηκαν από τη μακροχρόνια εκπαίδευση σε δύο τουλάχιστον σημεία. Πρώτον, δεν υπήρχε ανάπτυξη νέων κυστικών διευρύνσεων στις τελικές απολήξεις των αισθητικών νευρώνων κατά τη μεμονωμένη ενδιάμεση φάση. Δεύτερον, σε αντίθεση με το γέμισμα των προϋπαρχόντων άδειων κυστικών διευρύνσεων στις τελικές απολήξεις κατά τη διάρκεια της ενδιάμεσης φάσης που προκλήθηκε από το μακροχρόνιο πρωτόκολλο, οι προσφάτως γεμισμένες κυστικές διευρύνσεις των τελικών απολήξεων δεν

παρέμειναν για 24 ώρες και ήταν ανεπηρέαστες από αναστολείς της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Το γεγονός αυτό προτείνει ότι η δομική αναδιάρθρωση που προκαλείται από το μειωμένο πρωτόκολλο 5-HT εμπλέκει μόνο μια απλή αναδιοργάνωση των προϋπαρχόντων συναπτικών συστατικών. Αυτό μπορεί να αντανakλά μια θεμελιώδης διαφορά στους μοριακούς μηχανισμούς που επιστρατεύονται από τα δύο πρωτόκολλα 5-HT. Αν και τα δύο πρωτόκολλα προκαλούν μια ενδιάμεση φάση διευκόλυνσης, το μακροχρόνιο πρωτόκολλο ίσως ενεργοποιεί επιπρόσθετα μοριακά συμβάντα (συμπεριλαμβανομένου και του μηχανισμού για ενεργοποίηση της μετάφρασης) τα οποία απαιτούνται για το «στήσιμο» της μακροχρόνιας φάσης, ίσως μέσω της σταθεροποίησης της ενδιάμεσης φάσης.

Σε πρόδρομες μελέτες, ο Li και οι συνεργάτες του (2004) [132] ανακάλυψαν ότι το μακροχρόνιο πρωτόκολλο προκαλεί επίσης συγκέντρωση των μετασυναπτικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων και των ομόλογων των υποδοχέων NMDA και AMPA στην Aplysia, μέσα σε διάστημα 12 ωρών. Δεν είναι ακόμη γνωστό εάν η ενδιάμεση διευκόλυνση συνοδεύεται από παρόμοιες μετασυναπτικές αλλαγές.

Ο Jin και οι συνεργάτες του (2003) [133] ξεκίνησαν να ερευνούν εάν υπάρχουν μικροδομικές αλλαγές κατά τη διάρκεια ακόμη πιο πρώιμων φάσεων της σχετιζόμενης με τη μάθηση συναπτικής πλαστικότητας στην Aplysia, χρησιμοποιώντας απεικόνιση των GFP πρωτεϊνών σύμπυξης σε ζώντες νευρώνες. Βρήκαν ότι η ομοσυναπτική ενδυνάμωση που προκαλείται από μέτριας έντασης σειρά ερεθισμάτων στον προσυναπτικό νευρώνα σε κυτταρική καλλιέργεια συνοδεύεται από ταχεία (λιγότερο από 10 λεπτά) συνάθροιση της σχετιζόμενης με τα συναπτικά κυστίδια πρωτεΐνης, συναπτοφυσίνης, σε νέα κλάσματα όπως εμφανίζονται και κατά την πρώιμη φάση του LTP στους ιπποκάμπειους νευρώνες και στην προκαλούμενη από την 5-HT ενδιάμεση διευκόλυνση Aplysia.

Σε συνδυασμό, αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι ακόμη και οι πρώιμες φάσεις της συναπτικής πλαστικότητας που σχετίζονται με τη μάθηση, μπορούν να εμπλέκουν ταχείες και συνεργικές προ- και μετασυναπτικές μικροδομικές αλλαγές οι οποίες ίσως οδηγούν σε (επακόλουθο) σχηματισμό νέων λειτουργικών συνάψεων, όπως εμφανίζεται κατά την συναπτική ανάπτυξη [134]. Η υπόθεση αυτή συνάδει με την ισχύουσα άποψη της διακυτταρικής επικοινωνίας που διέπει τη βιολογία των νευρικών κυττάρων και ειδικότερα της σηματοδοτικής οδού του νευρικού συστήματος, στο ευρύτερο πεδίο της κυτταρικής βιολογίας.

Αν και, μέχρι και δύο δεκαετίες πριν, οι χημικές ενώσεις θεωρούνταν ότι μετέφεραν πληροφορίες μόνο προς μια κατεύθυνση – από τον προσυναπτικό στον μετασυναπτικό νευρώνα – σήμερα είναι ξεκάθαρο ότι η συναπτική μετάδοση αποτελεί μια αμφίδρομη και αυτοδιαμορφούμενη μορφή επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων [135]. Η αμφίδρομη φύση της σηματοδότησης μεταξύ των συνάψεων έχει αποδειχθεί από βιοφυσικές μελέτες της συναπτικής μεταβίβασης και από την συγκέντρωση των συνάψεων τόσο κατά τη διάρκεια της

ανάπτυξης όσο και κατά τη διάρκεια της σχετιζόμενης με τη μάθηση πλαστικότητας των συνάψεων στον ώριμο εγκέφαλο.

Αυτή η νεοεμφανιζόμενη άποψη της σχετικής συνεισφοράς του προ- και μετασυναπτικού νευρώνα και των αμοιβαίων σηματοδοτικών αλληλεπιδράσεων κατά τη διάρκεια της σχετιζόμενης με τη μάθηση συναπτικής πλαστικότητας είναι πολύ πιθανό να συμπληρώνει (παρά να αντικαθιστά) την πιο εδραιωμένη υπόθεση ότι η πρώιμη πλαστικότητα εμπλέκει είτε προ- είτε μετασυναπτικές ομοιοπολικές μετατροπές.

Κατά κάποιον τρόπο, αυτή η νέα εκτίμηση αντιπροσωπεύει ένα παράδειγμα στη σκέψη μας σχετικά με τις κυτταρικές και μοριακές βάσεις της μάθησης και της μνήμης καθώς προτείνει ότι κάποιοι από τους προ- και μετασυναπτικούς μηχανισμούς που διέπουν τόσο τη βραχυπρόθεσμη όσο και τη μακροπρόθεσμη πλαστικότητα ίσως δεν είναι εντελώς διαφορετικοί και ανεξάρτητοι. Αντιθέτως, οι μηχανισμοί αυτοί φαίνεται να έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά κοινά τα οποία ίσως συνεισφέρουν στη μετάβαση ανάμεσα στη βραχυχρόνια και μακροχρόνια αποθήκευση της μνήμης.

2. Η Πρωτεϊνική Κινάση C

Όπως είναι γνωστό, η νευρωνική μεταβίβαση απαιτεί την απελευθέρωση ενός νευρομεταβιβαστή προσυναπτικά και την ενεργοποίηση του αντίστοιχου υποδοχέα μετασυναπτικά. Καθώς η επικοινωνία αυτή μεταξύ των νευρώνων είναι πολύ σύντομη, υπάρχουν μηχανισμοί που εξασφαλίζουν ότι η συγχρονισμένη, προ- και μετά- συναπτική ενεργοποίηση αυτή, θα καταλήξει σε ενισχυμένο και παρατεταμένο απόηχο του σήματος μέσα στο κύκλωμα. Σε συνέχεια με την ιδέα αυτή, που προτάθηκε αρχικά από τον Hebb (1949), η παρατεταμένη ενεργοποίηση του κυκλώματος θα κωδικοποιήσει νέες και σημαντικές πληροφορίες, για παράδειγμα νέα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά, νέες συνδέσεις μεταξύ των ερεθισμάτων, με απώτερη συνέπεια τη δημιουργία ενός μνημονικού ίχνους.

Μεταξύ των παραγόντων που εμπλέκονται σε σημαντικό βαθμό στη διαδικασία της νευρωνικής μεταβίβασης, η αναγνώριση πρωτεϊνικών κινασών και φωσφατασών έχει κινήσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία 30 χρόνια. Καθώς οι κινάσες και οι φωσφατάσες δρουν σε συνέργεια, ανταγωνιζόμενες η μια την άλλη, ένα σημαντικό βήμα στο να κατανοήσουμε το ρόλο τους στη συναπτική πλαστικότητα (που αποτελεί τη βάση της μάθησης και του σχηματισμού της μνήμης) είναι να καθορίσουμε τους μηχανισμούς ενεργοποίησης/αδρανοποίησής τους και να προσδιορίσουμε τους βιοχημικούς καταρράκτες στους οποίους αυτές συμμετέχουν. Ένα άλλο σημείο κλειδί είναι ο καθορισμός των υποστρωμάτων πάνω στα οποία δρουν τα ένζυμα αυτά.

Ένα καινούριο μέλος των πρωτεϊνικών κινασών ανακαλύφθηκε το 1977 από την ομάδα των Y. Nishizuka στο Πανεπιστήμιο του Kobe στην Ιαπωνία [136], που ονομάστηκε «Πρωτεϊνική Κινάση C» (Protein Kinase C, PKC). Μετά την αρχική ανακάλυψη της PKC, ένας πλούτος πληροφοριών σχετικά με την κινάση αυτή έχει συσσωρευτεί μέχρι σήμερα. Βασική γνώση σχετικά με τις κυτταρικές διαδικασίες που ενεργοποιούν την PKC αποκτήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 80 και είχε αποδειχθεί μέχρι το 1986 ο σημαντικός ρόλος της PKC στη μετάδοση των σημάτων μεταξύ των νευρώνων.

Μια μεγάλη εξέλιξη ήταν η παρατήρηση ότι η PKC αποτελεί μια ολόκληρη οικογένεια ενζύμων (σήμερα μετρά 12 μέλη) τα οποία παρουσιάζουν συγκεκριμένη κυτταρική κατανομή και ξεχωριστά χαρακτηριστικά ενεργοποίησης [137-141]. Η έρευνα για νέα μέλη συνεχίζεται καθώς και η έρευνα για πιθανά υποστρώματα. Σήμερα περιγράφονται περισσότερα από 100 υποστρώματα της PKC και η λίστα συνεχώς μεγαλώνει.

Όπως προτείνεται από το γεγονός ότι η ενεργοποίηση της PKC μεταβάλλει μια ποικιλία ενδοκυττάρων διαδικασιών, είναι λογικό ότι η βιοχημική ανάλυσή της θα είναι μάλλον πολύπλοκη. Οι ισομορφές της PKC εντοπίζονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα γεγονός που τους προσδίδει μοναδικά χαρακτηριστικά ενεργοποίησης. Τέτοιες δράσεις

περιλαμβάνουν φωσφορυλίωση υποδοχέων στη συναπτική μεμβράνη καθώς και πυροδότηση άλλων ενζυμικών καταρρακτών που τελικά καταλήγουν στην ενεργοποίηση γονιδίων.

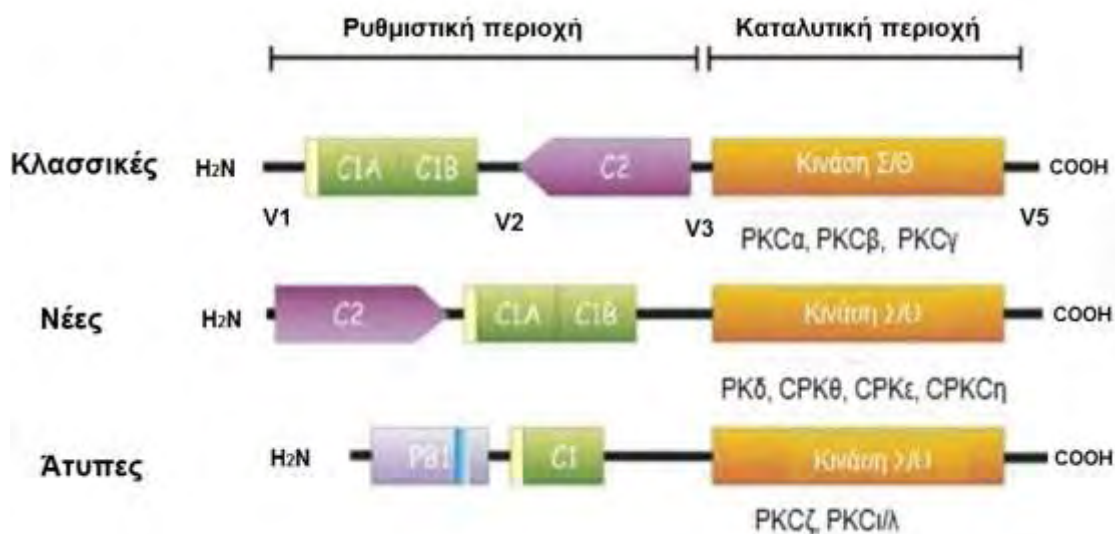
Από όλες τις πιθανές εμπλοκές της PKC στην παρούσα μελέτη θα ασχοληθούμε με τον ρόλο της στη συναπτική πλαστικότητα του εγκεφάλου που αποτελεί έναν πιθανό κυτταρικό μηχανισμό για τη μάθηση και την αποθήκευση της μνήμης.

Στη συνέχεια θα αναφερθούμε αναλυτικά στην οικογένεια της πρωτεϊνικής κινάσης C, στα μέλη της, τη δομή τους και τους μηχανισμούς ενεργοποίησης αυτών με στόχο την καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της μνήμης.

2.1. Η Οικογένεια Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C

Τα ισoenζυμα της PKC είναι μέλη της οικογένειας των AGC πρωτεϊνικών κινασών (δηλαδή των PKA, PKG, PKC) οι οποίες μοιράζονται ορισμένα βασικά δομικά χαρακτηριστικά. Η οικογένεια της Πρωτεϊνικής Κινάσης C ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης και είναι παρούσα σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Κάθε μέλος της οικογένειας αυτής είναι ένα πολυπεπτίδιο που περιέχει μια υψηλά εξελικτικά διατηρούμενη καταλυτική περιοχή, αποτελούμενη από μοτίβα για τη σύνδεση των ATP/υποστρώματος και την κατάλυση αλλά και μια ρυθμιστική περιοχή που διατηρεί το ένζυμο σε μια ανενεργό διαμόρφωση και περιέχει την αυτοανασταλτική περιοχή του ψευδοϋποστρώματος καθώς και δύο διακριτές περιοχές στόχευσης στις μεμβράνες, τις C1 και C2. Οι ρυθμιστικές περιοχές της PKC βρίσκονται στο NH₂ άκρο της πρωτεΐνης (N-άκρο, περίπου 20-40 kDa) ενώ η καταλυτική περιοχή βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο (C-άκρο, περίπου 45 kDa) [142] (Εικόνα 18).

Οι PKC ενεργοποιούνται από τη διακυλογλυκερόλη (diacylglycerol, DAG) και από τα ιόντα ασβεστίου (Ca²⁺). Η DAG αποτελεί έναν δεύτερο αγγελιοφόρο του κυττάρου που παράγεται από την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C (Phospholipase C, PLC) σαν απάντηση σε ποικίλα εξωκυτάρια σήματα που στοχεύουν σε συγκεκριμένους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Η υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, εκτός από την παραγωγή της DAG, προκαλεί την παραγωγή και ενός ακόμη δευτέρου αγγελιοφόρου της 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (inositol 1,4,5-trisphosphate, IP₃). Η IP₃ πυροδοτεί μια επακόλουθη απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες, το ενδοπλασματικό δίκτυο [143-145] (Εικόνα 19). Τόσο η DAG όσο και τα ιόντα ασβεστίου προκαλούν τη μετακίνηση της PKC από το κυτταροπλασματικό στα μεμβρανικά τμήματα του κυττάρου, γεγονός που σηματοδοτεί την ενεργοποίηση του ενζύμου όπως θα περιγραφεί αναλυτικότερα στη συνέχεια.



Εικόνα 18. Σχηματική παρουσίαση της πρωτογενούς δομής των μελών της οικογένειας της πρωτεϊνικής κινάσης C.

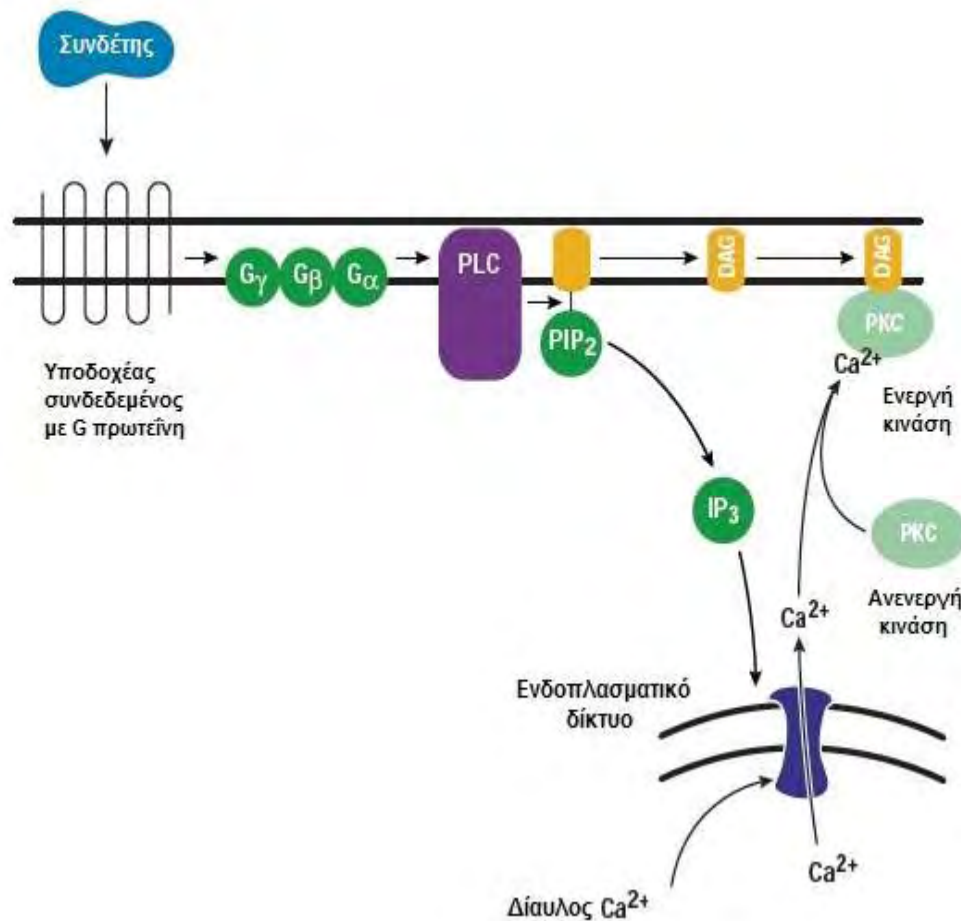
Η οικογένεια αυτή των κινασών μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις υποοικογένειες ανάλογα με τη δομή τους και τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Οι cPKCs ρυθμίζονται από τα Ca^{2+} , τη φωσφατιδυλσερίνη και τη διακυλογλυκερόλη. Οι nPKCs ρυθμίζονται από τη διακυλογλυκερόλη και όξινα φωσφολιπίδια, ανεξάρτητα από τα Ca^{2+} . Οι άτυπες PKCs ρυθμίζονται από όξινα φωσφολιπίδια, κεραμίδια και αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (βλέπε κείμενο).

Η ρυθμιστική περιοχή βρίσκεται στην περιοχή του N-άκρου και περιέχει διάφορες περιοχές, αναλόγως με την ισομορφή. Ψευδοϋπόστρωμα (κίτρινο), περιοχή C1 (πράσινο), περιοχή C2 (μωβ). Σύμφωνα με τον προσανατολισμό των 8 β-αλύσεων που σχηματίζουν την περιοχή, οι cPKCs παρουσιάζουν μια τύπου I τοπολογία της C2 περιοχής με το βέλος να δείχνει προς τα αριστερά, και οι nPKCs παρουσιάζουν μια τύπου II τοπολογία της C2 περιοχής με το βέλος να δείχνει προς τα δεξιά. Η PB1 περιοχή (βιολετί) περιέχει το μοτίβο OPCA (μπλε κουτί). Όλες οι κινάσες περιέχουν ένα διατηρούμενο καταλυτικό πυρήνα (πορτοκαλί) που περιέχει τη θέση σύνδεσης του ATP, τη θέση σύνδεσης του υποστρώματος και τις θέσεις μεταφοράς των φωσφορικών.

2.2. Οι Ισομορφές Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C

Σήμερα, αναγνωρίζονται δώδεκα ισομορφές (ή ισοένζυμα), οι οποίες ταξινομούνται σε τέσσερις υποομάδες ανάλογα με τη δομή της NH2 ρυθμιστικής περιοχής και τον τρόπο ενεργοποίησής τους [142,146]. Κάθε ισομορφή εκφράζεται σε ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών

τύπων και πολλές ισομορφές εκφράζονται ταυτόχρονα σε ένα κύτταρο, γεγονός που προσδίδει στην οικογένεια αυτή των κινασών, εξαιρετική σημασία.



Εικόνα 19. Ενεργοποίηση της PKC.

Ένα εξωτερικό ερέθισμα ενεργοποιεί έναν υποδοχέα που συνδέεται με μια G πρωτεΐνη (G-Protein-Coupled Receptor - GPCR), ο οποίος ενεργοποιεί μια G-πρωτεΐνη. Η G-πρωτεΐνη ενεργοποιεί με τη σειρά της τη φωσφολιπάση C (PLC), η οποία διασπά την φωσφοϊνοσιτόλη-4,5 διφωσφορικό (PIP₂) σε 1,2-διακυλογλυκερόλη και ινοσιτόλη-1,4,5-τριφωσφορικό (IP₃). Η IP₃ αλληλεπιδρά με τους διαύλους ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο, απελευθερώνοντας Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα. Η αύξηση των επιπέδων των Ca²⁺ ενεργοποιεί την PKC, η οποία μετακινείται στη μεμβράνη, προσδένεται στη διακυλογλυκερόλη (DAG) και στη φωσφατιδυλσερίνη. Η ενεργοποιημένη πλέον PKC είναι έτοιμη να φωσφορυλιώσει τα υποστρώματά της.

(Τροποποιημένο από το www.promega.com, Signal Transduction Resource)

Οι ισομορφές της PKC εμπλέκονται στα σηματοδοτικά γεγονότα πολλών σημαντικών ενδοκυττάρων οδών. Αυτές περιλαμβάνουν την κυτταρική ανάπτυξη [147], τη διαφοροποίηση [148], την απόπτωση [149-151], την προσκόλληση [152] και τη μετανάστευση [153]. Τα ισoenζυμα της PKC έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται σε έναν μεγάλο αριθμό παθολογικών καταστάσεων συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου [147,154,155], των καρδιοπνευμονικών παθήσεων [156,157], της εγκεφαλικής ισχαιμίας και του τραύματος επαναδιάχυσης [158] και του σακχαρώδους διαβήτη [159]. Εξαιτίας της έκτασης της παρουσίας τους, τα ισoenζυμα της PKC έχουν επιλεγεί ως στόχοι για διάφορους θεραπευτικούς παράγοντες [160-162]. Δυστυχώς όμως, αν και έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός εκλεκτικών ενεργοποιητών και αναστολέων της PKC, η έλλειψη εξειδίκευσης αποτελεί ένα μεγάλο πρόβλημα στην περαιτέρω ανάπτυξη της χρήσης τους.

Η πρώτη υποομάδα που ανακαλύφθηκε, και η οποία έχει μελετηθεί εκτενέστερα, είναι αυτή των *συμβατικών ή κλασικών ισομορφών* της PKC (conventional PKCs, cPKCs) που είναι οι α , βI , βII και γ . Το γονίδιο PKCb είναι alternatively spliced για την παραγωγή δύο γονιδιακών προϊόντων, βI και βII , τα οποία διαφέρουν μόνο στο καρβοξυτελικό άκρο τους [163]. Οι ισομορφές αυτές διαφέρουν από τις άλλες στο ότι η δράση τους ρυθμίζεται από τα ιόντα ασβεστίου, καθώς η C2 περιοχή τους (θα αναφερθούμε στη συνέχεια) περιέχει θέση σύνδεσης για τα ιόντα αυτά (Εικόνα 18).

Η επόμενη καλά μελετημένη υποομάδα είναι οι *νέες ισομορφές* της PKC (novel PKCs, nPKCs), δηλαδή οι δ , ϵ , η και θ . Αυτά τα ισoenζυμα είναι δομικά όμοια με τις κλασσικές ισομορφές, εκτός από την περιοχή C2, η οποία ενώ διατηρεί δομικά τα υπολείμματα αμινοξέων, δεν περιέχει τις λειτουργικές ομάδες που φαίνεται να πραγματοποιούν τη σύνδεση των ιόντων ασβεστίου. Οι ισομορφές αυτές ανταποκρίνονται μόνο στη διακυκλογλυκερόλη (Εικόνα 18).

Η λιγότερο κατανοητή υποομάδα ισoenζύμων είναι η ομάδα των *άτυπων PKCs* (atypical PKCs, aPKCs), οι ισομορφές ζ και λ (*στον μυ*)/*ι* (*στον άνθρωπο*). Η ομάδα αυτή διαφέρει σημαντικά στη δομή της από τις άλλες δύο, στο ότι δεν είναι παρόντα σημαντικά αμινοξέα που ευθύνονται για το σχηματισμό της αγκύλης της C2 περιοχής (και έτσι στερούνται C2 περιοχής) και στο ότι έχουν μόνο ένα μοντέλο κυστεΐνης-ιστιδίνης (και όχι δύο), δηλαδή μια μόνο C1 περιοχή. Έτσι, οι ισομορφές αυτές δεν είναι ευαίσθητες στα ιόντα ασβεστίου και δεν απαντούν σε φορβολικούς εστέρες *in vivo* ή *in vitro* [164] αλλά είναι ευαίσθητες σε άλλα φωσφολιπίδια καθώς περιέχουν μια PB1 περιοχή τοποθετημένη στο N- άκρο (Εικόνα 18).

Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν άλλες δύο ισομορφές PKC, οι μ και ν , οι οποίες έχουν τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των άτυπων PKCs [165,166].

2.3. Δομή Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C

Η κλωνοποίηση του πρώτου ισοενζύμου στα μέσα της δεκαετίας του 80 αποκάλυψε την ύπαρξη τεσσάρων περιοχών που διατηρούνται φυλογενετικά και οι οποίες ονομάστηκαν *διατηρούμενες περιοχές* (conserved domains). Συμβολίζονται, από το αρχικό γράμμα της λέξης conserved, ως C1–C4 [167,168]. Κάθε μια από αυτές αποτελεί ένα λειτουργικό μοντέλο και πολλές μη συναφείς πρωτεΐνες μπορεί να περιέχουν το ένα ή το άλλο [169]. Η λειτουργία για κάθε μια από αυτές τις περιοχές έχει θεσπισθεί από εκτεταμένες βιοχημικές αναλύσεις και εργασίες με μεταλλάξεις.

Η C1 περιοχή περιλαμβάνει ένα μοντέλο πλούσιο σε κυστεΐνης (Cys), που στις περισσότερες ισομορφές διπλασιάζεται και σχηματίζει τη θέση σύνδεσης της διακυλογλυκερόλης/φορβολικών εστέρων. Η περιοχή αυτή ακολουθείται από μια αυτοανασταλτική αλληλουχία αμινοξέων, την περιοχή του ψευδοϋποστρώματος. Η C2 περιοχή περιέχει τη θέση αναγνώρισης των λιπαρών οξέων και, σε μερικές ισομορφές, τη θέση σύνδεσης των ιόντων ασβεστίου. Οι C3 και C4 περιοχές σχηματίζουν στον πυρήνα της κινάσης τους βρόγχους σύνδεσης του ATP και του υποστρώματος.

Οι περιοχές C1 και C2 σχηματίζουν τη ρυθμιστική περιοχή του ενζύμου και αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένους ενεργοποιητές ενώ οι περιοχές C3 και C4 αποτελούν την καταλυτική περιοχή του ενζύμου που ευθύνεται για ενδομοριακές φωσφορυλιώσεις, για τη δράση κινάσης και για τη σύνδεση του υποστρώματος.

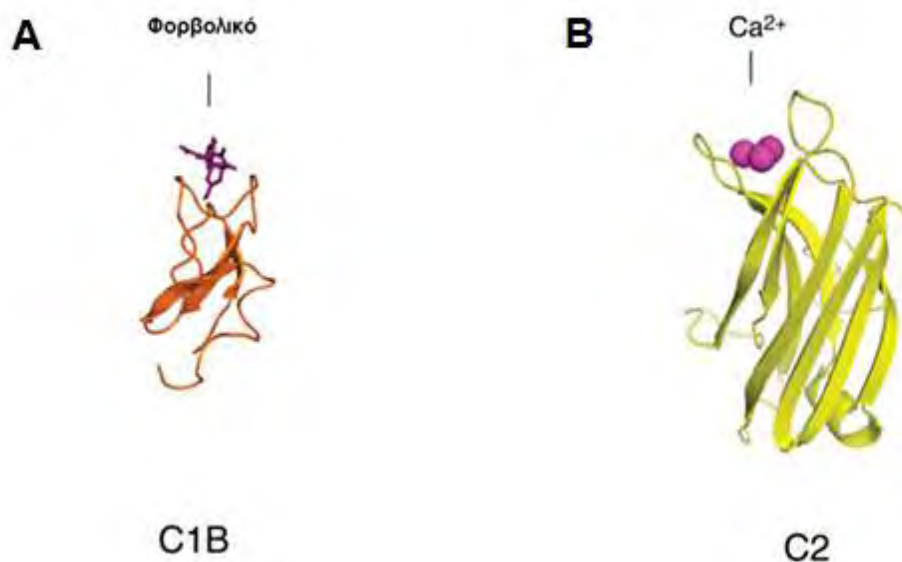
Οι περιοχές C1-C4 διαχωρίζονται μεταξύ τους από πέντε μεταβαλλόμενες περιοχές που συμβολίζονται ως V1–V5 (από την αγγλική ονομασία variable regions).

2.3.1. Η Ρυθμιστική Περιοχή Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C

Η περιοχή C1 είναι μια συμπαγής α/β δομική μονάδα των 50–51 αμινοξέων που περιέχει ένα φυλογενετικά διατηρούμενο μοντέλο υπολειμμάτων κυστεΐνης (Cys) και ιστιδίνης (His) για το σχηματισμό μιας δομικής διαμόρφωσης για τη σύνδεση δύο ιόντων ψευδαργύρου (zinc) ($\text{HisX}_{12}\text{CysX}_2\text{-CysX}_{13/14}\text{CysX}_2\text{CysX}_4\text{HisX}_2\text{CysX}_7\text{Cys}$, όπου X κάθε άλλο αμινοξύ). Το μοντέλο αυτό στις κλασσικές και νέες ισομορφές διπλασιάζεται (συμβολίζεται ως C1A και C1B).

Η C1 περιοχή σχηματίζει τη θέση σύνδεσης της διακυλογλυκερόλης/φορβολικών εστέρων [165] (Εικόνα 20A). Εκτός από τη σύνδεση με τη διακυλογλυκερόλη, η C1 περιοχή εμπλέκεται και στην στόχευση της PKC σε υποκυτταρικές θέσεις μέσω αλληλεπιδράσεων με λιπίδια και πρωτεΐνες. Η C1 περιοχή διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στη μετακίνηση της PKC από το κυτταρόπλασμα και στη στόχευσή της σε μεμβρανικά τμήματα σαν απάντηση στην παραγωγή φορβολικών εστέρων ή DAG κατά την ενεργοποίηση υποδοχέων. Η σύνδεση των λιπιδίων

στη C1 περιοχή αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό βήμα στην αλλοστερική ενεργοποίηση των PKCs και κατά συνέπεια της φωσφορυλίωσης των υποστρωμάτων των PKCs.



Εικόνα 20. Τρισδιάστατη, σχηματική παρουσίαση της δομής των περιοχών C1B, C2 των PKCs.

A. Η περιοχή C1 είναι μια συμπαγής α/β δομική μονάδα των 50–51 αμινοξέων που περιέχει ένα φυλογενετικά διατηρούμενο μοντέλο υπολειμμάτων Cys και His για το σχηματισμό μιας δομικής διαμόρφωσης για τη σύνδεση δύο ιόντων ψευδαργύρου και τη θέση σύνδεσης της διαγλυκερόλης/φορβολικών εστέρων. Το μοντέλο αυτό στις κλασσικές και νέες ισομορφές διπλασιάζεται. Στην εικόνα φαίνεται η C1B περιοχή των κλασσικών PKCs.

B. Η περιοχή C2 αποτελεί την θέση αναγνώρισης των λιπαρών οξέων και στις κλασσικές ισομορφές, τη θέση σύνδεσης των ιόντων ασβεστίου. Ο κύριος ρόλος της C2 περιοχής στις κλασσικές PKCs είναι να λειτουργεί ως το μοντέλο στόχευσης στη μεμβράνη όταν αυτές ενεργοποιούνται από τα ιόντα ασβεστίου. Στην εικόνα φαίνεται η C2 περιοχή των κλασσικών PKCs.

(Πηγή: Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* 2008;88:1341–78)

Οι C2-περιοχές περιγράφηκαν για πρώτη φορά σαν η δεύτερη από τις τέσσερις φυλογενετικά διατηρούμενες λειτουργικές περιοχές των ισομορφών α, β και γ των ασβεστοεξαρτώμενων PKCs στα θηλαστικά [168,170]. Οι C2 περιοχές αποτελούν ανεξάρτητα αναδιπλούμενα μοντέλα από περίπου 130 αμινοξέα, και δομικά ορίζονται ως β πρωτεϊνικά μέλη της C2 υπεροικογένειας των CaLB (Ca²⁺/lipid-binding domains). Η υπεροικογένεια περιλαμβάνει δύο οικογένειες, την τοπολογία τύπου I, στην οποία υπάγονται οι C2 περιοχές

των κλασικών και την τοπολογία τύπου II, στην οποία συμπεριλαμβάνονται οι C2 περιοχές των νέων PKC. Οι τοπολογίες διαφέρουν ως προς τον προσανατολισμό των 8 β αλύσων που συγκροτούν την περιοχή και η παρουσία της μιας ή της άλλης τοπολογίας δεν καθορίζει τη λειτουργία της περιοχής (Εικόνα 18).

Η περιοχή C2 αποτελεί την θέση αναγνώρισης των λιπαρών οξέων και, σε μερικές ισομορφές, τη θέση σύνδεσης των ιόντων ασβεστίου [169]. Ο κύριος ρόλος της C2 περιοχής στις κλασικές PKCs είναι να λειτουργεί ως το μοντέλο στόχευσης στη μεμβράνη όταν αυτές ενεργοποιούνται από τα ιόντα ασβεστίου (Εικόνα 20B). Στις νέες PKC, η C2 περιοχή μπορεί να συνδεθεί με αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια χωρίς να εξαρτάται από τα ιόντα ασβεστίου [171-174] αλλά σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να πραγματοποιήσει αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών [175-177].

Στην περίπτωση των cPKCs, η C2 περιοχή ακολουθεί την C1 περιοχή ενώ στις nPKCs η C2 περιοχή προηγείται της C1 στην πρωτογενή ακολουθία (Εικόνα 18).

Οι άτυπες μορφές των PKCs στερούνται C2 περιοχής και περιέχουν μια περιοχή C1, η οποία δεν είναι ευαίσθητη στην διακυλογλυκερόλη. Αντιθέτως, περιέχουν μια περιοχή PB1, εντοπιζόμενη στο N-άκρο τους. Η περιοχή αυτή εκτείνεται περίπου 85 αμινοξέα και χρησιμεύει για τη σύνδεση με άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν την ίδια περιοχή (π.χ ZIP/p62, Par6 ή MAPK5).

2.3.2. Η Περιοχή Του Ψευδοϋποστρώματος

Αυτοανασταλτικές περιοχές έχουν περιγραφεί και χαρακτηρισθεί για έναν αριθμό πρωτεϊνικών κινάσων και πιστεύεται ότι αναστέλλουν τη βασική δραστηριότητα της κινάσης μέσω αλληλεπίδρασης με στοιχεία της καταλυτικής περιοχής, συμπεριλαμβανομένης και της θέσης σύνδεσης του υποστρώματος.

Οι House και Kemp ανακάλυψαν το 1987 [178] μια αυτοανασταλτική περιοχή δίπλα στο N-άκρο της C1 περιοχής των cPKCs που ονομάστηκε περιοχή του ψευδοϋποστρώματος. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται μια αλληλουχία αμινοξέων που διατηρεί τα χαρακτηριστικά μιας θέσης φωσφορυλίωσης της πρωτεϊνικής κινάσης C, αλλά περιέχει μια αλανίνη στην περιοχή όπου θα υπήρχε κανονικά η θέση φωσφορυλίωσης σερίνης/θρεονίνης. Στην PKCα η περιοχή αυτή βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 19 -36 ενώ μια ανάλογη αλληλουχία διατηρείται σε όλα τα ισοένζυμα και εντοπίζεται στα 13-30 αμινοξέα που προηγούνται την C1 περιοχή.

Αυτή η αλληλουχία ψευδοϋποστρώματος αλληλεπιδρά με την θέση σύνδεσης του υποστρώματος στην καταλυτική περιοχή χωρίς όμως να αποτελεί υπόστρωμα και είναι υπεύθυνη για την ενδομοριακή αναστολή της καταλυτικής δραστηριότητας πριν από τη σύνδεση του ενεργοποιητή [178].

Το ψευδοϋπόστρωμα θεωρείται ότι συμμετέχει ακόμη σε διάφορες άλλες ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Είναι πλούσιο σε βασικά αμινοξέα και βρέθηκε ότι συνδέεται άμεσα με τα όξινα λιπίδια των μεμβρανών [179] για να οδηγήσει την υποκυτταρική μετακίνηση των πρωτεϊνών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και στα υπόλοιπα κυτταροσκελετικά μέρη [180]. Επιπρόσθετα, μπορεί να συνδεθεί σε υποστρώματα της PKC, όπως για παράδειγμα στη ZIP [181]. Έτσι, μόλις το ψευδοϋπόστρωμα απελευθερώνεται από την ενδομοριακή αλληλεπίδραση με την καταλυτική περιοχή, μπορεί να πραγματοποιήσει μια ποικιλία διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, οδηγώντας την κινάση στα κυτταρικά της υποστρώματα. Παρόλα αυτά, καθώς η περιοχή του ψευδοϋποστρώματος σε όλες τις κλασσικές PKC είναι η ίδια και καλά διατηρούμενη και στα υπόλοιπα ισοένζυμα (Arg19-Phe-Ala-Arg-Lys-Gly-Ala25-Leu-Arg-Gln-Lys-Asn-Val-His-Glu-Val-Lys-Asn36), είναι απίθανο ότι η περιοχή του ψευδοϋποστρώματος μπορεί από μόνη της να προσδίδει εξειδίκευση τέτοια που να εξηγεί την ξεχωριστή εντόπιση και λειτουργία του κάθε ισοενζύμου.

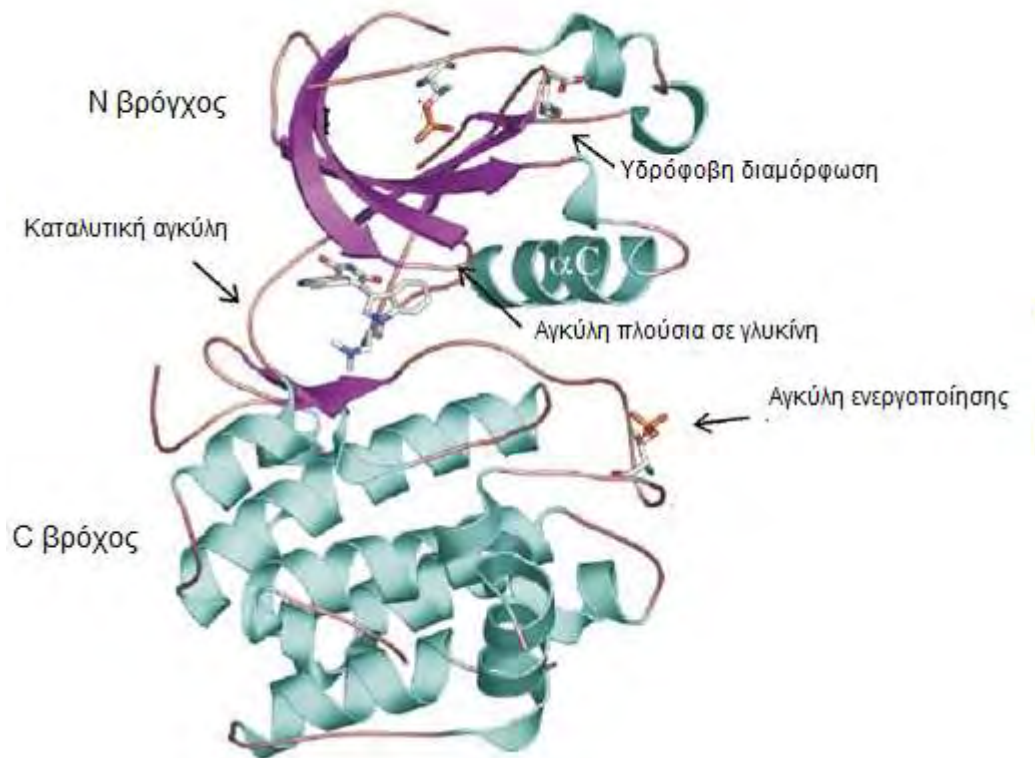
2.3.3. Η Καταλυτική Περιοχή Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C

Η καταλυτική περιοχή των PKCs σχηματίζεται από τις περιοχές C3 και C4 και περιλαμβάνει τη θέση σύνδεσης του ATP και η πλειοψηφία των σημείων φωσφορυλίωσης, αλληλεπιδρά με τα υποστρώματα και είναι υπεύθυνη για τη δράση της μεταφοράς των φωσφορικών. Η περιοχή της κινάσης είναι στενά συσχετιζόμενη στα μέλη της οικογένειας της PKC, και αποτελούν μέρος της υπεροικογένειας των AGC κινασών [182].

Οι πρώτες προσπάθειες για να κατανοηθούν τα δομικά χαρακτηριστικά της δράσης των ισοενζύμων της PKC, βασίσθηκαν σε δεδομένα από κρυσταλλογραφικές μελέτες με ακτίνες X στα μέλη της, στενά σχετιζόμενης με την PKC, οικογένειας των AGC κινασών όπως είναι η PKA ή η AKT [183,184] καθώς οι κρυσταλλικές δομές για τις καταλυτικές περιοχές PKC δεν ήταν διαθέσιμες πριν το 2004. Με τη δημοσίευση της κρυσταλλικής δομής των καταλυτικών περιοχών για τρεις φωσφορυλιωμένες PKC που εκφράζονται σε βακτήρια (PKC β II σύμπλεγμα με 2-methyl-1-Hindol-3yl-BIM-1, PKC θ συνδεδεμένη με σταυροσπορίνη, και PKC γ σύμπλεγμα με BIM-1), ένα ισοένζυμο της PKC αντιπροσωπευτικό από κάθε υποκατηγορία [183,184], έγινε δυνατόν να αξιολογηθούν πολλές από τις υποθέσεις που είχαν μέχρι τότε γίνει.

Οι καταλυτικές περιοχές της PKC μοιράζονται γενικά υψηλή δομική ομοιότητα με την PKA, με το μεγαλύτερο αριθμό υπολειμμάτων, που είναι σταθερός στα μέλη της οικογένειας των AGC κινασών, να συγκεντρώνονται σε θέσεις σύνδεσης νουκλεοτιδίων ή κατάλυσης. Όπως και σε άλλες AGC κινάσες, οι καταλυτικές περιοχές της PKC περιέχουν ένα μικρότερο βρόγχο στο NH₂ άκρο τους, ο οποίος αποτελείται κυρίως από β -φύλλα και περιέχει την χαρακτηριστική *αγκύλη σύνδεσης του ATP*, πλούσια σε γλυκίνη (G) με την αλληλουχία GXGXXG (ένα δομικό σήμα κατατεθέν των πρωτεϊνικών κινασών και των πρωτεϊνών σύνδεσης νουκλεοτιδίων) και μια αμετάβλητη λυσίνη (Lys) η οποία δομεί το ένζυμο για τη

μεταφορά του φωσφόρου. Ο βρόγχος στο COOH άκρο της καταλυτικής περιοχής είναι κυρίως α -έλικα και περιέχει το κομμάτι της *αγκύλης ενεργοποίησης* που προσανατολίζει το μαγνήσιο και τα πεπτιδικά υποστρώματα για την κατάλυση. Ακολουθείται από την V5 περιοχή στο NH2 άκρο (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Τρισδιάστατη, σχηματική απεικόνιση της καταλυτικής περιοχής των PKCs.

Η καταλυτική περιοχή της PKC περιέχει ένα μικρότερο βρόγχο στο NH2 άκρο της, ο οποίος αποτελείται κυρίως από β -φύλλα και περιέχει την χαρακτηριστική *αγκύλη σύνδεσης του ATP*, πλούσια σε γλυκίνη. Ο βρόγχος στο COOH άκρο της καταλυτικής περιοχής είναι κυρίως α -έλικα και περιέχει το κομμάτι της *αγκύλης ενεργοποίησης* που προσανατολίζει το μαγνήσιο και τα πεπτιδικά υποστρώματα για την κατάλυση.

(Πηγή: Steinberg SF. *Structural basis of protein kinase C isoform function. Physiol Rev* 2008;88:1341–78)

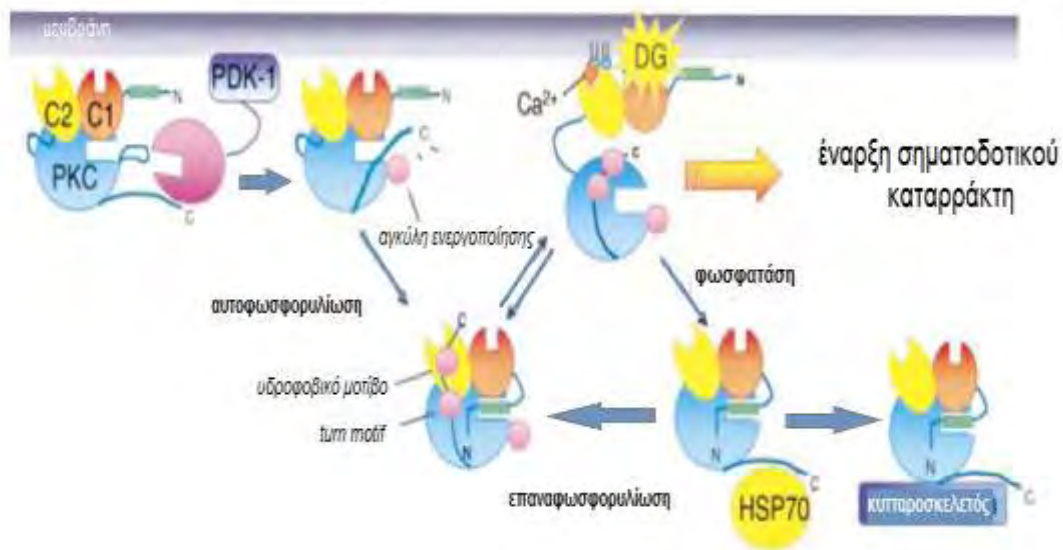
Ένα υπόλειμμα της αλληλουχίας που συνδέει τους δύο βρόγχους του καταλυτικού τμήματος της κινάσης λειτουργεί ως «φύλακας της πύλης» και ελέγχει την πρόσβαση στην αγκύλη σύνδεσης του ATP. Μεταλλάξεις του υπολείμματος - φύλακα αποτελούν τη βάση των χημικών γενετικών προσεγγίσεων που έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή κινασών που

να είναι μοναδικά ευαίσθητες σε ορισμένα μη φυσικά ανασταλτικά ή ενεργοποιητικά ανάλογα του ATP. Παρέχεται έτσι, μια ισχυρή και έξυπνη στρατηγική για την επίλυση των φυσικών υποστρωμάτων των ποικίλων κινασών στα κύτταρα [185]. Ακόμη, υπάρχουν πολλές αποδείξεις ότι το αμινοξύ-φύλακας ίσως παίζει έναν δομικό ρόλο για τον περιορισμό της ευελιξίας και της αυτοκαταλυτικής ενεργοποίησης συγκεκριμένων ενζύμων [186]. Τέλος, η αγκύλη ενεργοποίησης και η V5 περιοχή περιέχουν υψηλά διατηρούμενες ρυθμιστικές θέσεις φωσφορυλίωσης που διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη δομή της καταλυτικής θέσης.

2.3.3.1. Εναρκτήριες Φωσφορυλίώσεις Στις cPKC

Τα παραδοσιακά μοντέλα της ενεργοποίησης της PKC έχουν επικεντρωθεί στην αλλοστερική ενεργοποίηση από τα ιόντα ασβεστίου και τη DAG. Οι «εναρκτήριες» Ser/Thr φωσφορυλίώσεις που κλειδώνουν το ένζυμο σε μια ανοικτή, σταθερή, καταλυτικά ικανή, ανθεκτική στις φωσφατάσες/πρωτεάσες διαμόρφωση έχουν μόλις πρόσφατα γίνει το επίκεντρο της έρευνας [187,188]. Οι PKCs φωσφορυλιώνονται αρχικά σε ένα υπόλειμμα θρεονίνης στην περιοχή της «αγκύλης ενεργοποίησης» (activation loop), μια υψηλής διατήρησης αλληλουχία 20–30 αμινοξέων στη σχισμή της καταλυτικής περιοχής της κινάσης που είναι ευέλικτη (υποθέεται διαφορετικός προσανατολισμός στο ενεργό και ανενεργό ένζυμο) και σχηματίζει μέρος από την επιφάνεια σύνδεσης του πεπτιδικού υποστρώματος (Εικόνα 21). Η φωσφορυλίωση της αγκύλης ενεργοποίησης της PKC προκαλεί ένα αρνητικό φορτίο που ευθυγραμμίζει τα αμινοξέα στην καταλυτική θέση και σταθεροποιεί την ενεργό διαμόρφωση του ενζύμου.

Η φωσφορυλίωση της αγκύλης ενεργοποίησης της PKC γενικά αποδίδεται στην εξαρτώμενη από την 3-φωσφοινοσιτόλη πρωτεϊνική κινάση 1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK-1). Οι νεοπαραγόμενες PKCs πιστεύεται ότι υιοθετούν μια ανοικτή διαμόρφωση που επιτρέπει στην PDK-1 την πρόσβαση στο εκτεθειμένο, μη φωσφορυλιωμένο υδροφοβικό μοντέλο αλληλουχίας αμινοξέων στην περιοχή V5 κοντά στο COOH-άκρο [189-191]. Το επικρατές μοντέλο (που στηρίζεται βασικά σε λεπτομερείς μελέτες στις συναφείς AGC κινάσες) υποστηρίζει ότι η PDK-1 πρέπει να σταθμεύει στην υδροφοβική αλληλουχία, να ενεργοποιείται αυτή και να προσανατολίζεται για τη φωσφορυλίωση της αγκύλης ενεργοποίησης. Μόλις η PDK-1 φωσφορυλιώνει την αγκύλη ενεργοποίησης, η PDK-1 πρέπει να αποδεσμευτεί από το COOH άκρο ώστε να επιτευχθεί η πλήρης ωρίμανση του ενζύμου (καθώς η συνεχιζόμενη σύνδεση της PDK-1 στο COOH άκρο θα παρεμπόδιζε την αυτοφωσφορυλίωση του υδροφοβικού μοτίβου) (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Μοντέλο του κύκλου ζωής της PKC, από τη βιοσύνθεσή της μέχρι την τελική λήξη της δράσης της.

Οι νεοπαράγόμενες PKC συνδέονται με τη μεμβράνη σε μια «ανοικτή» διαμόρφωση στην οποία η περιοχή του ψευδοϋποστρώματος (το πράσινο χρώμα στο μόριο της PKC) απελευθερώνεται από την αγκύλη σύνδεσης του υποστρώματος (στο σχήμα παρουσιάζεται ως ορθογώνιο έλλειμμα στο μόριο της PKC), το C-άκρο εκτίθεται και μπορεί έτσι να συνδεθεί η PDK-1 (το ροζ μόριο στο σχήμα). Η PDK-1 φωσφορυλιώνει τμήμα της αγκύλης ενεργοποίησης και στη συνέχεια αποδεσμεύεται από τη θέση σύνδεσης στο C-άκρο. Το απελευθερωμένο C-άκρο έχει τώρα πρόσβαση στη θέση σύνδεσης του υποστρώματος και αυτοφωσφορυλιώνεται από έναν ενδομοριακό μηχανισμό. Το φωσφορυλιωμένο ένζυμο απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα όπου και παραμένει σε μια ανενεργό διαμόρφωση από το συνδεδεμένο ψευδοϋπόστρωμα. Η παραγωγή ιόντων ασβεστίου και διακυλογλυκερόλης στοχεύει την PKC στη μεμβράνη. Η σύνδεση των περιοχών C1 και C2 στη μεμβράνη παρέχει την ενέργεια για την απελευθέρωση του ψευδοϋποστρώματος από την αγκύλη σύνδεσης του υποστρώματος, επιτρέποντας στην κινάση να ξεκινήσει το σηματοδοτικό της μονοπάτι. Από αυτή την ενεργό διαμόρφωση, η PKC αποφωσφορυλιώνεται ταχέως. Το μοριακό τσαπερόνιο Hsp70 συνδέεται στο αποφωσφορυλιωμένο turn motif και σταθεροποιεί την PKC, επιτρέποντάς της να επαναφωσφορυλιωθεί και να εισέλθει και πάλι στη δεξαμενή των σηματοδοτικά δυνάμενων PKCs.

(Τροποποιημένο από Newton AC., *Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm*, *Biochem. J.* (2003) 370, 361-371)

Οι cPKCs και οι nPKCs στη συνέχεια υφίστανται δύο συμπληρωματικές φωσφορυλιώσεις σε διατηρούμενα μοτίβα στη V5 περιοχή στο COOH-άκρο: σε ένα (γενικά πλούσιο σε προλίνες) διατηρούμενο “turn motif” και σε ένα FXXFS/TF/Y μοτίβο (μια τοποθεσία φωσφορυλίωσης αποτελούμενη από υδρόφοβα αμινοξέα) με 19 αμινοξέα στην COOH πλευρά του “turn motif”. Για τις cPKCs, αυτές αποτελούν αντιδράσεις αυτοφωσφορυλίωσης που προκαλούν σταθερές μετατροπές (π.χ. ολοκληρώνονται κατά τη

διάρκεια της ωρίμανσης του ενζύμου και τυπικά διατηρούνται υπό κανονικές συνθήκες καλλιέργειας), ενώ ο μηχανισμός για τις nPKCs είναι λιγότερο γνωστός (Εικόνα 22).

Και ενώ οι φωσφορυλιώσεις του υδροφοβικού μοτίβου είναι χαρακτηριστικό των cPKCs και των nPKCs, η θέση φωσφορυλίωσης της Ser/Thr αντικαθίσταται από ένα φωσφομιμιτικό αμινοξύ, το γλουταμικό (Glu) στις aPKCs. Η φαινυλαλανίνη (Phe) είναι το αμινοξύ που ακολουθεί αμέσως μετά από το υδροφοβικό μοτίβο S/T στη δομή των cPKC/nPKC. Κρυσταλλογραφικές μελέτες με ακτίνες X της δομής των PKA, AKT και PKC θ αποκαλύπτουν μια αλληλεπίδραση ανάμεσα σε αυτή τη φαινυλαλανίνη και την υδροφοβική αγκύλη, που σταθεροποιεί τη δομή του καταλυτικού πυρήνα σε μια θέση που επιτρέπει την υψηλής συγγένεια αλληλεπίδρασης με το ATP και το υπόστρωμα. Προτείνεται έτσι, ένας μηχανισμός όπου *οι φωσφορυλιώσεις του COOH-άκρου, ρυθμίζουν την καταλυτική δραστηριότητα*. Παρόλα αυτά, οι φωσφορυλιώσεις του COOH άκρου φαίνεται ακόμη να ελέγχουν την ενεργότητα του ενζύμου με το να επηρεάζουν τη θερμική σταθερότητα, τη διαλυτότητα και τη ροπή του σε πρωτεάσες/φωσφατάσες. Επιπρόσθετα, έχουν αναφερθεί ως ευρύτερα αποτελέσματα του υδροφοβικού μοτίβου, ο επηρεασμός της αλληλεπίδρασης της C2 περιοχής με τα ιόντα ασβεστίου [184,192].

Συμπερασματικά, αυτές οι τρεις λειτουργίες του υδροφοβικού μοτίβου, να «δένει» την PDK-1 και έτσι να στηρίζει τη φωσφορυλίωση της αγκύλης ενεργοποίησης, να δομεί την καταλυτική αγκύλη και να συμμετέχει σε μακροχρόνιες αλληλεπιδράσεις με την περιοχή C2, είναι σημαντικές για να παραχθεί ένα πλήρως φωσφορυλιωμένο, καταλυτικά ικανό ένζυμο, που παραμένει σε μια αυτοανασταλτική διαμόρφωση στο κυτταρόπλασμα, έτοιμο να ενεργοποιηθεί από τους δευτέρους αγγελιοφόρους.

Πέρα από το ρόλο τους να διατηρούν το ένζυμο σε μια διαμόρφωση που είναι ευνοϊκή για κατάλυση, οι φωσφορυλιώσεις του COOH-άκρου έχουν εμπλακεί ως μηχανισμοί που ελέγχουν τη σύνδεση της PKC σε πρωτεΐνες ή μεμβράνες. Οι ισομορφές της PKC (και άλλων AGC κινασών, όπως η AKT και η PKA) αλληλεπιδρούν μέσω του COOH άκρου τους τόσο με την PDK-1 όσο και με την πρωτεΐνη του θερμικού σοκ (Heat Shock Protein - HSP70) [193]. Η PDK-1 συνδέεται με μη φωσφορυλιωμένη PKC και οδηγεί στην ωρίμανση του ενζύμου, ενώ η σύνδεση της HSP70 στο αποφωσφορυλιωμένο turn motif προστατεύει την PKC β II από την αποδόμηση.

2.3.3.2. Φωσφορυλιώσεις Σερίνης/Θρεονίνης Στις nPKC

Αν και στις nPKC οι εναρκτήριοι φωσφορυλιώσεις αρχικά θεωρήθηκε ότι ακολουθούν τους μηχανισμούς που περιγράφηκαν για τις cPKC ισομορφές, μια πιο προσεκτική έρευνα ανέδειξε τρεις αξιοσημείωτες διαφορές: 1) Η PKC δ είναι μοναδική ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας της PKC στην ικανότητά της να λειτουργεί ως κινάση ακόμη και χωρίς να φωσφορυλιωθεί η αγκύλη ενεργοποίησης ενώ οι στενά σχετιζόμενη ισομορφή PKC θ και άλλα

ισοένζυμα των cPKC και aPKC είναι καταλυτικά ανενεργή χωρίς αυτή τη φωσφορυλίωση [194]. 2) Μερικές φωσφορυλιώσεις των nPKCs είναι δυναμικά ρυθμιζόμενες (και όχι σταθερές, ανεξάρτητες από τις υπάρχουσες συνθήκες) φωσφορυλιώσεις [195]. 3) Οι φωσφορυλιώσεις στο turn και στο υδρόφοβο μοτίβο των nPKC έχουν χαρακτηριστεί ως αυτοφωσφορυλιωτικοί και διαφωσφορυλιωτικοί μηχανισμοί.

2.3.3.3. Τα Υπολείμματα Τυροσίνης Της Καταλυτικής Περιοχής Του Ενζύμου

Υπάρχει μια περιορισμένη αλλά γενικά αποδεκτή βιβλιογραφία που υποδεικνύει ότι συγκεκριμένα υπολείμματα τυροσίνης της καταλυτικής περιοχής (τα οποία διατηρούνται στα μέλη της οικογένειας των AGC κινασών) επηρεάζουν την ενεργότητα του ενζύμου. Οι αρχικές μελέτες ενέπλεκαν την τυροσίνη204 (Tyr204) στην PKA (που αντιστοιχεί στην Tyr512 της PKCδ) σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που δομούν την καταλυτική θέση για τη μεταφορά των φωσφορικών [196]. Η ιδέα όμως ότι η φωσφορυλίωση της PKC σε υψηλά διατηρούμενα υπολείμματα τυροσίνης στην αγκύλη ενεργοποίησης ίσως συνιστά έναν εναλλακτικό μηχανισμό ενεργοποίησης για ορισμένες ισομορφές της PKC (ειδικότερα για την PKCδ ή τις aPKCs), απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

2.3.3.4. Τα Χαρακτηριστικά Της Καταλυτικής Περιοχής Τα Οποία Διαφοροποιούν Τις aPKCs Από Τις cPKC/nPKC Ισομορφές

Οι aPKC ισομορφές γενικά, διαφέρουν από τις ευαίσθητες σε φορβολικούς εστέρες ισομορφές cPKC και nPKC, στη βάση των C1 περιοχών τους. Παρόλο το γεγονός αυτό, έχουν αναγνωρισθεί τρεις σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις aPKC και στις ευαίσθητες στους φορβολικούς εστέρες ισομορφές cPKC/nPKC. Οι διαφορές αυτές είναι πολύ πιθανό να δημιουργούν δυσκολίες στην ανάπτυξη φαρμακευτικών παραγόντων ειδικών για κάθε ισομορφή της PKC.

1. Οι cPKC και οι nPKC πρέπει να φωσφορυλιωθούν στο υψηλής διατήρησης υδρόφοβο μοτίβο του COOH-άκρου για να αποκτήσουν καταλυτική ικανότητα. Από την άλλη, οι aPKCs περιέχουν ένα φωσφομιμικό Glu στη θέση του ικανού προς φωσφορυλίωση υδρόφοβου μοτίβου της Ser/Thr και δεν απαιτούν αυτό το διαδικαστικό μηχανισμό.

2. Οι aPKCs έχουν μια μάλλον ξεχωριστή δομή της αγκύλης σύνδεσης του νουκλεοτιδίου (P loop). Η μεγαλύτερη πλειοψηφία των πρωτεϊνικών κινασών περιέχουν ένα GXGXXG μοτίβο που παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση και τον προσανατολισμό των μη μεταφερόμενων φωσφορικών του ATP. Μονήρης μετάλλαξη οποιαδήποτε από αυτές τις διατηρούμενες γλυκίνες γενικά, έχει ως αποτέλεσμα βλάβη του ενζύμου. Σε ορισμένες περιπτώσεις αυτό συμβάλει σε νόσους του ανθρώπου όπως για παράδειγμα, η αντικατάσταση της γλυκίνης (Gly) από βαλίνη (Val) στην τρίτη Gly του υποδοχέα της ινσουλίνης οδηγεί σε ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη [197], και μια αντικατάσταση της

Gly από Val στη δεύτερη Gly είναι η βάση για το Ras- V12 ογκογονίδιο [198]. Οι aPKCs περιέχουν μια αλανίνη στη θέση της τρίτης Gly (GRGSYA), το οποίο θεωρείται ότι ευθύνεται για τις κάπως διαφορετικές τους ιδιότητες σύνδεσης του ATP και την κατά 100 περίπου φορές χαμηλότερη συγγενεία τους για το GF109203X (έναν ανταγωνιστικό αναστολέα του ATP που λειτουργεί με το να εκτοπίζει το ATP από την αγκύλη σύνδεσής του), σε σχέση με τα cPKC και nPKC ισοένζυμα [199]. Ένα υπόλειμμα τυροσίνης (GRGSYA) στην αγκύλη σύνδεσης του ATP στις aPKC ισομορφές αντιπροσωπεύει ένα δεύτερο δομικό χαρακτηριστικό που θα μπορούσε να προσδώσει εξειδίκευση στο σηματοδοτικό μονοπάτι.

3. Το αμετάβλητο υπόλειμμα Lys το οποίο γενικά στοχεύεται για να δημιουργήσει μια καταλυτική ανενεργό κινάση, φαίνεται να διαδραματίζει έναν ξεχωριστό ρόλο στις aPKCs, σε σχέση με τις άλλες AGC κινάσες. Μελέτες στην PKA δείχνουν ότι το υπόλειμμα της Lys72 αλληλεπιδρά με τα α -και β -φωσφορικά του ATP για να το προσανατολίσει για κατάλυση [200].

2.3.4. Η Περιοχή V3 Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C

Η V3 περιοχή, που μερικές φορές αναφέρεται ως η περιοχή “μεντεσές”, βρίσκεται μεταξύ της ρυθμιστικής και καταλυτικής περιοχής της PKC και είναι πολύ προσβάσιμη σε πρωτεολυτική διάσπαση από ασβεστοεξαρτώμενες πρωτεάσες (π.χ. καλπαΐνες) κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης και των αλλαγών διαμόρφωσης της PKC. Διάσπαση στην περιοχή V3 έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση μιας συνεχούς καταλυτικής περιοχής η οποία στερείται το ρυθμιστικό αμινοτελικό άκρο. Το γεγονός αυτό προτείνει ότι η πλειοψηφία ή πιθανώς και όλες οι ανασταλτικές ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται μεταξύ της ρυθμιστικής και καταλυτικής περιοχής [201].

Η καταλυτική διάσπαση προκαλεί έτσι, τη γένεση μιας συνεχούς ενεργής μορφής σε όλες τις PKCs που ονομάζεται πρωτεϊνική κινάση M (PKM). Η πρωτεολυτικά παραγόμενη περιοχή της κινάσης, η PKM, ελεύθερη από την αναστολή του ψευδοϋποστρώματος, είναι συνεχώς ενεργή [202]. Μέχρι σήμερα, μόνο η PKMζ έχει περιγραφεί με λεπτομέρειες και η οποία εκφράζεται σταθερά μαζί με την PKCζ ανεξάρτητα από τη δράση των καλπαϊνών και φαίνεται ότι εμπλέκεται στους μοριακούς μηχανισμούς της μνήμης (π.χ. στη διατήρηση της μακροχρόνιας συναπτικής ενδυνάμωσης στον ιππόκαμπο θηλαστικών) [203].

2.3.5. Η Περιοχή V5 Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C

Αν και σχετικά πολύ μικρή (περίπου 50 αμινοξέα) για να θεωρηθεί ως πρωτεϊνική περιοχή, η περιοχή V5 της PKC παίζει ένα σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στη δράση της κινάσης. Η αρχική αποστολή της V5 περιοχής θεωρήθηκε ότι ήταν η λήξη της φυλογενετικά διατηρούμενης αλληλουχίας των PKC α , β και γ στο τέλος της καταλυτικής περιοχής της κινάσης [168]. Η επακόλουθη απόδειξη ότι το γονίδιο PKCb παράγει αντίγραφα που

προκύπτουν με εναλλακτική συναρμολόγηση εξονίων-ιντρονίων και τα οποία ειδικά καλύπτουν την περιοχή αυτή, υπονοεί ότι η περιοχή αυτή φέρει ιδιαίτερες ιδιότητες.

Στην περίπτωση της PKCβI και PKCβII υπάρχουν πολύ καλές αποδείξεις ότι η V5 περιοχή παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη μετακίνηση της κινάσης. Μελέτες στην ανθρώπινη U937 μονοκυτταρική σειρά έχουν δείξει ότι η PKCβI εντοπίζεται στους μικροσωληνίσκους, ενώ η PKCβII εντοπίζεται εν μέρει στα εκκριτικά κυστίδια [204]. Καθώς η μόνη διαφορά μεταξύ αυτών των δύο πρωτεϊνών είναι η V5 περιοχή, φαίνεται ότι αυτή λειτουργεί ως ένα διαφορετικό σήμα εντοπισμού σε αυτούς τους δύο ισοτύπους. Θα μπορούσε να υποθεθεί λοιπόν ότι η V5 περιοχή κάνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, αν και οι πρωτεϊνικοί στόχοι των PKCβI και βII ισομορφών στα U937 κύτταρα δεν έχουν αναγνωρισθεί. Διαφορετική εντόπιση των PKCβI και βII έχει ακόμη παρατηρηθεί στην MOLT-4 T-λεμφοβλαστική κυτταρική σειρά. Εδώ έχει αποδειχθεί ότι PKCβII, αλλά όχι η βI, μετακινείται στα μικροϊνίδια ακτίνης κατά την ενεργοποίηση των κυττάρων με PMA [205]. Σε *in vitro* μελέτες σύνδεσης, η PKCβII φαίνεται να συνδέεται απευθείας με την F-ακτίνη, παρόλα αυτά, δεν συνδέεται με την πολυμερισμένη ακτίνη, προτείνοντας ότι η μετακίνηση στα μικροϊνίδια της ακτίνης *in vivo* ίσως συντελείται σε συνεργασία με άλλα συστατικά του κυτταροσκελετού [146].

Η V5 περιοχή έχει επίσης ρόλο κλειδί σε σχέση με τη φωσφορυλίωσή της. Η φωσφορυλιωμένη V5 περιοχή φαίνεται να αλληλεπιδράει με την κύρια περιοχή της κινάσης, σχηματίζοντας μια κλειστή, σταθερή διαμόρφωση.

2.4. Ενεργοποίηση Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C

Η σηματοδοτική οδός της PKC απαιτεί τρία διαδοχικά βήματα: τη φωσφορυλίωση σε συγκεκριμένα σημεία της κινάσης, την έκθεση της περιοχής του ψευδοποστρώματος και τη μετακίνηση σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις. Η PKC διατηρείται σε μια ανενεργό διαμόρφωση με τη σύνδεση της αλληλουχίας του ψευδοϋποστρώματος στην περιοχή της θέσης σύνδεσης του υποστρώματος. Η παραγωγή της διακυλογλυκερόλης (DAG) και των ιόντων ασβεστίου οδηγεί την PKC στη μεμβράνη με τη σύνδεσή της μέσω των C1 και C2 περιοχών με τη μεμβράνη. Η αλληλεπίδραση αυτή κινάσης - μεμβράνης παρέχει την ενέργεια για την απελευθέρωση του ψευδοϋποστρώματος από τη θέση σύνδεσης του υποστρώματος, επιτρέποντας έτσι τη σύνδεση του υποστρώματος στην PKC και τη φωσφορυλίωσή του. Παρόλα αυτά, πριν μπορέσει να εμφανισθεί αυτή η αλλοστερική ρύθμιση, η PKC πρέπει να υποστεί η ίδια φωσφορυλίωση. Ας τα δούμε όμως όλα αυτά αναλυτικότερα στη συνέχεια.

Το παραδοσιακό μοντέλο της ενεργοποίησης της PKC προέρχεται από μελέτες στην PKCα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων σε ηρεμία. Η PKCα, σε απουσία ασβεστίου ή DAG, αλληλεπιδρά αδύναμα/αντιστρεπτά με τις μεμβράνες. Αγωνιστές που προάγουν την υδρόλυση της διφωσφορικής φωσφοϊνοσιτόλης (PIP2) και την παραγωγή τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3) οδηγούν στην κινητοποίηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου, που λειτουργεί ως

ένας διαλυτός συνδέτης που συνδέεται στην C2 περιοχή και αυξάνει τη συνάφεια της κινάσης για τις μεμβράνες. Αυτή η αρχική ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση της PKC α - C2 περιοχής με τις μεμβράνες είναι σχετικά χαμηλής συγγένειας. Παρόλα αυτά, μόλις αγκυροβολήσει στις μεμβράνες, η PKC α διαχέεται μέσα στη διπλοειδική λιπιδική στιβάδα και συμμετέχει σε μια δευτερεύουσα αλληλεπίδραση της C1A περιοχής με τη DAG (το μεμβρανικά περιορισμένο παράγωγο της υδρόλυσης της PIP2). Η μεμβρανική φωσφατιδυλσερίνη (PS) παίζει ένα σημαντικό ρόλο σε αυτή τη δευτερεύουσα μεμβρανική αλληλεπίδραση, καθώς η PS διασπάει μια ηλεκτροστατική C1A/C2 ενδομοριακή αλληλεπίδραση, ελευθερώνοντας την C1A περιοχή ώστε να μπορέσει να διεισδύσει στη διπλοειδική λιπιδική στιβάδα και να συνδεθεί με τη DAG [206]. Η σύνδεση της C1A με τις μεμβράνες είναι επίσης σχετικά χαμηλής συγγένειας. Παρόλα αυτά, η συνδυασμένη ενέργεια από την ισότιμη σύζευξη της C1/C2 περιοχής με τις μεμβράνες οδηγεί σε μια υψηλής συγγένειας σύνδεση των κλασικών PKC με αυτές και σε μια αλλαγή της διαμόρφωσης που προκαλεί την αποβολή της αυτοανασταλτικής περιοχής του ψευδοϋποστρώματος από την θέση σύνδεσης του υποστρώματος διευκολύνοντας έτσι την ενεργοποίηση της PKC.

Η μετακίνηση της PKC στην κυτταροπλασματική μεμβράνη γενικά έχει θεωρηθεί ως το σήμα κατατεθέν της ενεργοποίησης (και συχνά έχει χρησιμοποιηθεί ως έμμεση μέτρηση της ενεργοποίησης των ισομορφών της PKC στα κύτταρα). Παρόλα αυτά, το απλό αυτό μοντέλο της ενεργοποίησης της PKC δεν επαρκεί για να εξηγήσει τον πολύπλοκο χωροχρονικό έλεγχο της μετακίνησης της PKC στα κύτταρα. Για παράδειγμα, οι cPKCs μετακινούνται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ταχέως/αντιστρεπτά μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει τη συσσωρευμένη DAG που προέρχεται από τη δράση της PLC. Σε άλλα κύτταρα που παρουσιάζουν μια διφασική απόκριση στην DAG, οι PKC α και PKC β II (αλλά όχι η PKC β I) απελευθερώνονται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω μιας ρυθμιζόμενης διαδικασίας που απαιτεί την καταλυτική δράση της PKC και σε ορισμένες περιπτώσεις έχει αποδοθεί σε αυτοφωσφορυλίωση της PKC με μηχανισμό που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα [207,208].

Περαιτέρω αποδείξεις για τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις στις PKCs προτάθηκαν από την ομάδα της Mochly-Rosen και βασίζονται στην ανακάλυψη μια οικογένειας πρωτεϊνών αγκυροβόλησης που ονομάζονται Υποδοχείς Για Την Ενεργοποιημένη C Κινάση (ως συντομογραφία χρησιμοποιείται διεθνώς ο όρος RACKs από τα αρχικά των λέξεων Receptors for Activated C Kinase). Η ομάδα αυτή απέδειξε ότι οι RACKs συνδέονται σε μια περιοχή στην PKC, η οποία εκτίθεται μόνο όταν το ένζυμο έχει ενεργοποιηθεί από τη διακυλογλυκερόλη, τη φωσφατιδυλσερίνη και τα ιόντα ασβεστίου. Τέτοια σύνδεση αυξάνει την καταλυτική δράση της RACK κατά πολλές φορές, προτείνοντας ότι το σύμπλεγμα PKC - RACK μπορεί να αποτελεί την ενεργό μορφή του ενζύμου *in vivo*.

Μετά την ενεργοποίηση της PKC, αναλαμβάνουν δράση στον μοριακό αυτό καταρράκτη, οι φωσφατάσες με το να τερματίζουν το σήμα μέσω αποφωσφορυλίσεων. Η

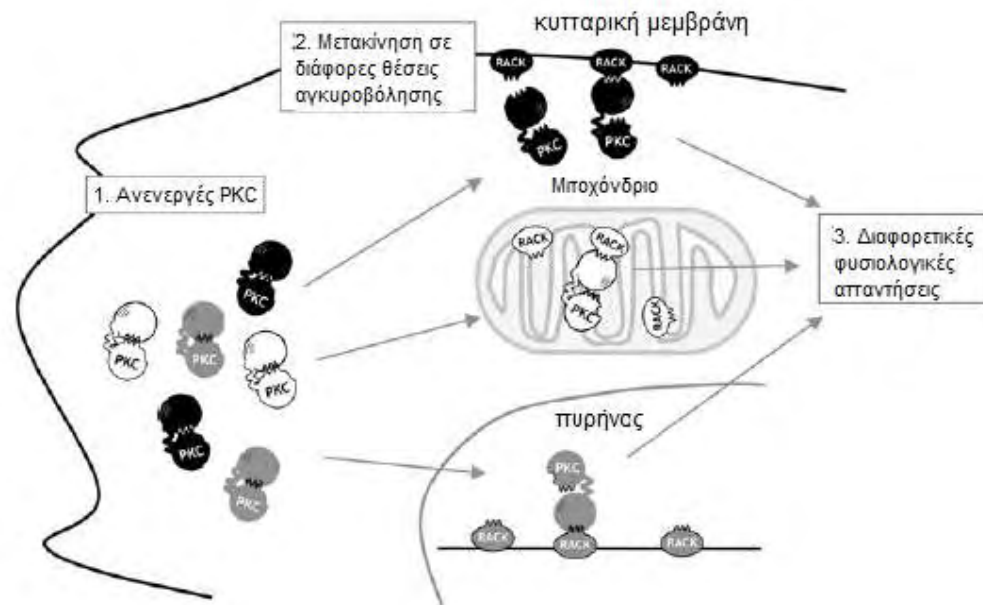
εξάλειψη της απάντησης εξασφαλίζεται στην πραγματικότητα από την αποφωσφορυλίωση των υποστρωμάτων και/ή του ίδιου του ενζύμου. Φαίνεται ότι στην αποφωσφορυλιωμένη κατάσταση η PKC αλληλεπιδρά με τον μοριακό συνοδό, Hsp70. Το Hsp70 σταθεροποιεί την PKC, η οποία μπορεί να ανακυκλωθεί και πάλι σαν ένζυμο έτοιμο προς ενεργοποίηση.

2.4.1. Αλληλεπιδράσεις Πρωτεΐνης – Πρωτεΐνης. Υποδοχείς Για Την Ενεργοποιημένη C Κινάση (Receptors for Activated C Kinase, RACKs)

Μέχρι πρόσφατα πιστεύαμε ότι η ανακατανομή/μετακίνηση της PKC από το ένα υποκυτταρικό διαμέρισμα σε άλλο, οφειλόταν μόνο στην αλληλεπίδρασή της με τα λιπίδια. Παρόλα αυτά, μελέτες πάνω στην ευαισθησία της θρυψίνης, ανέδειξαν και την εμπλοκή των συνδετικών πρωτεϊνών σε αυτή τη διαδικασία, θίγοντας έτσι τη συμπληρωματική σημασία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεΐνης - πρωτεΐνης στον καταρράκτη ενεργοποίησης της PKC [209].

Στην πραγματικότητα ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών μπορούν να συνδεθούν με ανενεργές και ενεργοποιημένες PKCs, διευθύνοντας τη θέση των ενζύμων τόσο σε βασικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες ερεθίσματος [210]. Από αυτή την άποψη, οι Υποδοχείς για την Ενεργοποιημένη C Κινάση κατέχουν ξεχωριστή θέση στην τοποθέτηση των ενεργοποιημένων PKCs κοντά στα κατάλληλα υποστρώματα. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι διαφορετικές και ειδικές για κάθε ισoenζυμο [211]. Αυτή η ειδικότητα ισoenζύμου προϋποθέτει ότι σε κάθε ισoenζυμο υπάρχουν μοναδικές αλληλουχίες αμινοξέων, που περιέχουν τουλάχιστον ένα μέρος από τη θέση αναγνώρισης για το μόριο σύνδεσης, την ειδική για κάθε ισoenζυμο RACKs. Η αλληλουχία αυτή βρίσκεται στην C2 περιοχή που είναι υπεύθυνη για τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Περαιτέρω μελέτες απέδειξαν ότι η λειτουργική ειδικότητα των ισoenζύμων της PKC καθορίζεται εν μέρει από την διαφορετική των ειδικών για κάθε ισoenζυμο RACKs (Εικόνα 23).

Οι RACKs είναι ενδοκυττάρειες συνδετικές πρωτεΐνες που αρχικά περιγράφησαν στην καρδιά επίμυων από την Mochly-Rosen και τους συνεργάτες τη [209]. Οι RACKs ανήκουν σε μια οικογένεια ρύθμισης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μέσω του επαναλαμβανόμενου μοντέλου τρυπτοφάνης - ασπαρτικού 40 (MB 40) που ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης - πρωτεΐνης και είναι ομόλογες με τη β υποομάδα των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών. Η αλληλεπίδραση PKC/RACKs εξαρτάται από την παρουσία ενεργοποιητών της PKC με συγκεκριμένο τρόπο, προτείνοντας τον σημαντικό ρόλο των πρωτεϊνών RACK στο να διευθύνουν την επανατοποθέτηση της PKC μετά την ενεργοποίησή της.



Εικόνα 23. Η θεωρία της RACK πρωτεΐνης σύμφωνα με την οποία καθορίζεται η ειδική μοριακή λειτουργία κάθε ισομορφής των PKCs.

Κατά την ενεργοποίηση, η PKC μετατοπίζεται προς την ειδική για κάθε ισοένζυμο υποκυτταρική τοποθεσία για να φωσφορυλιώσει συγκεκριμένα για τη θέση αυτή υποστρώματα. Η κατεύθυνση της υποκυτταρικής μετατόπισης καθορίζεται από την εντόπιση των πρωτεϊνών RACKs, οι οποίες παρέχουν την ειδική για κάθε ισοένζυμο «άγκυρα» και «σκαλωσιά» για να εκφράσει την καταλυτική του δράση.

(Τροποποιημένη από Budas GR, Koyanagi T, Churchill EN and Mochly-Rosen D. *Biochemical Society Transactions* (2007) Vol 35, part 5)

Μελέτες έχουν αποδείξει μια ενδιάμεση αλληλεπίδραση της PKC με την ακίνη του κυτταροπλασματικού δικτύου, προτείνοντας ότι τουλάχιστον σε μερικά σηματοδοτικά μονοπάτια η PKC μπορεί να μετακινείται μέσω των ινιδίων ακίνης σε διάφορες δεξαμενές RACKs που βρίσκονται σε απομακρυσμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου, οι RACKs μπορεί να συμπεριφέρονται είτε ως προσδέτες (άγκυρες) με την μεμβράνη είτε ως μεταφορικές πρωτεΐνες για την ενεργοποιημένη PKC. Πιστεύεται ότι κάθε ισοένζυμο της PKC έχει τη δική του συγκεκριμένη RACK ή πρωτεΐνη αγκυροβόλησης (σύνδεσης).

Μαζί με τις πρωτεΐνες RACKs, και άλλες πρωτεΐνες αγκυροβόλησης έχουν αναφερθεί να συμμετέχουν στην υποκυτταρική μετακίνηση των PKCs: πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη C κινάση (PICKs, οι PICKs είναι πρωτεΐνες πέριξ του πυρήνα που αλληλεπιδρούν με την

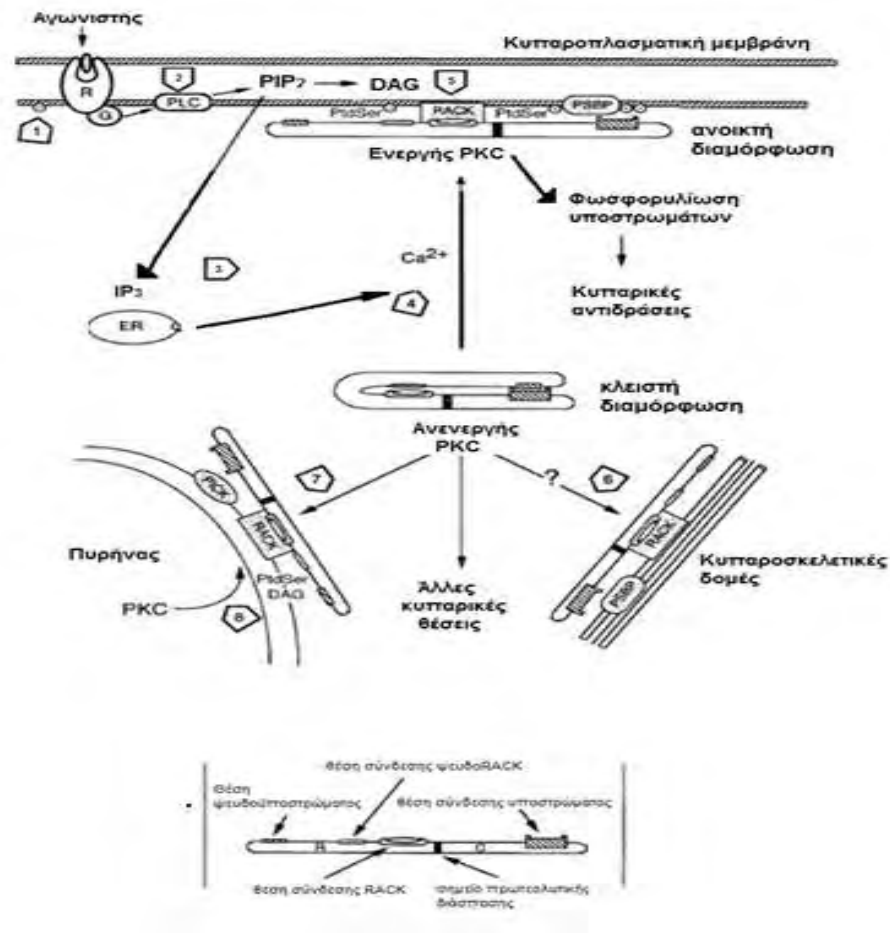
καταλυτική περιοχή της PKC) και υποστρώματα που αλληλεπιδρούν με την C κινάση (STICKs, τα STICKs είναι επίσης υποστρώματα της PKC). Αν και αυτές οι πρωτεΐνες αγκυροβόλησης συνδέονται σε διαφορετικές θέσεις στο μόριο της PKC, η κοινή λειτουργία είναι η μεταφορά (καθοδήγηση) των διαφόρων PKCs στο εσωτερικό συγκεκριμένων σηματοδοτικών δικτύων όπου μπορούν να επηρεάσουν συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες.

Με τη εισαγωγή της θεωρίας των RACKs πρωτεϊνών για την ειδικότητα της εντόπισης και της εξειδίκευσης των ισομορφών της PKC, διαμορφώνεται ένας νέος μηχανισμός ενεργοποίησης των PKCs που παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 24.

Οι πιο καλά μελετημένες RACKs μέχρι σήμερα που έχουν κλωνοποιηθεί είναι η RACK1, που πιθανότατα αποτελεί την εκλεκτική RACK της PKCβII ισομορφής και η εκλεκτική RACK για τη PKCε ισομορφή (εRACK), που στο παρελθόν χαρακτηριζόταν ως β'-COP, μια COPI (coat protein I) coatomer complex protein σημαντική για την ανάπτυξη των Golgi και κυστιδιακή μεταφορά [175].

Η εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης PKC - RACK επιτυγχάνεται από τις περιοχές C2 και V5 της κινάσης. Κάθε C2 περιοχή των PKCs περιέχει ακόμη μια βραχεία αλληλουχία αμινοξέων που είναι ομόλογη με μια αλληλουχία στην, αντίστοιχη για το κάθε ισοένζυμο, πρωτεΐνη RACK. Η αλληλουχία αυτή, μήκους 6–10 αμινοξέα, ονομάστηκε περιοχή ψευδο-RACK (ψεRACK), λόγω της ομολογίας της με τη RACK. Η πρώτη αλληλουχία ψεRACK αναγνωρίστηκε αρχικά μέσω μιας σύγκρισης της αλληλουχίας της PKCβ με την ειδική για την PKCβII RACK, τη RACK1 [97]. Η αλληλουχία SVEIWD στην PKCβ (αμινοξέα 241–246) είναι ομόλογη με την αλληλουχία SIKIWD στη RACK1 (αμινοξέα 234–241). Περιέχει μια σχετικά σπάνια αλληλουχία αμινοξέων WD, αλλά επίσης και μια αλλαγή στο φορτίο (K σε E). Η διαφορά αυτή στο φορτίο δηλώνει μια χαμηλότερη ενδομοριακή συγγένεια της ψεRACK περιοχής για τη θέση σύνδεσης της RACK στο εσωτερικό της PKC σε σύγκριση με τη διαμοριακή συγγένεια της θέσης σύνδεσης της RACK για την ίδια τη RACK [213]. Η χαμηλότερη συγγένεια της ενδομοριακής, αυτοανασταλτικής αλληλεπίδρασης επιτρέπει την διάσπασή της και την επακόλουθη σύνδεση της PKC στη RACK.

Επομένως η περιοχή της ψεRACK συμμετέχει σε μια αυτοανασταλτική αλληλεπίδραση, ίδια με αυτή της περιοχής του ψευδοϋποστρώματος και η ενεργοποίηση του ενζύμου εξαρτάται από τη διάσπαση αυτής της ενδομοριακής αλληλεπίδρασης. Αξίζει να σημειωθεί ότι πεππίδια που ανταποκρίνονται στην αλληλουχία ψεRACK χρησιμοποιούνται ως εκλεκτικοί ενεργοποιητές για κάθε ισομορφή.



Εικόνα 24. Μηχανισμός ενεργοποίησης της PKC λαμβάνοντας υπόψη την εμπλοκή των πρωτεϊνών αγκυροβόλησης για τη μετακίνηση της PKC από το κυταρόπλασμα στις διάφορες υποκυταρικές θέσεις μετά την ενεργοποίησή της.

Η σύνδεση του αγωνιστή στον υποδοχέα (1) προκαλεί την υδρόλυση της PIP₂ της κυταρικής μεμβράνης μέσω της φωσφολιπάσης C (PLC) σε IP₃ και DAG (2). Η IP₃ προκαλεί την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) (3) και την ενεργοποίηση της PKC η οποία βρίσκεται στο κυταρόπλασμα σε μια κλειστή διαμόρφωση (4). Η ενεργοποιημένη PKC υιοθετεί μια ανοικτή διαμόρφωση η οποία αφήνει εκτεθειμένη τη θέση σύνδεσης της RACK για την πρόσδεση της πρωτεΐνης αγκυροβόλησης και τη μετακίνηση της κινάσης στην κυταροπλασματική μεμβράνη (5), στον πυρήνα (7) και στις άλλες κυταροσκελετικές δομές (6).

Στο ένθετο σχήμα παρουσιάζεται η ανοικτή διαμόρφωση της PKC με τις θέσεις ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων και τη θέση αλληλεπίδρασης με τη RACK πρωτεΐνη (R: ρυθμιστική περιοχή, C: καταλυτική περιοχή).

(Battaini F, Pascale A, Paoletti R, Govoni S. The role of anchoring protein RACK1 in PKC activation in the ageing rat brain *Trends Neurosci* 1997; 20: 410–5)

Βρέθηκε ότι η περιοχή V5 της PKCβII περιέχει μια θέση σύνδεσης της RACK και η αναστολή αυτής της αλληλεπίδρασης εμποδίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι της PKCβII [214]. Η θέση σύνδεσης της RACK στην V5 περιοχή πιθανός συμμετέχει σε ανασταλτική ενδομοριακή αλληλεπίδραση με τη θέση της ψεRACK, στη C2 περιοχή, όταν η PKC βρίσκεται στην ανενεργό της διαμόρφωση [215]. Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι η V5 περιοχή αποτελεί έναν καλό στόχο για τον σχεδιασμό ειδικών για κάθε ισομορφή μετατροπών της ενεργοποίησης της PKC [201].

Είναι γνωστό ότι ένας μεγάλος αριθμός μορίων (πρωτεΐνες, λιπίδια και δευτεροί αγγελιοφόροι) μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την PKC μέσω των διαφορετικών περιοχών του ενζύμου και ότι υπάρχουν ποικίλες ρυθμίσιμες ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης - πρωτεΐνης μέσα στην PKC. Πιστεύεται ότι μετατροπείς αυτών των αλληλεπιδράσεων μπορούν να προσφέρουν αποτελεσματικούς εκλεκτικούς ενεργοποιητές και αναστολείς για κάθε ισοένζυμο. Μια διάσπαση ή ένας ανταγωνισμός αυτών των ανασταλτικών ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων, όπως για παράδειγμα μεταξύ των περιοχών C2 και C1 και των περιοχών C2 και V5, φαίνεται να προκαλεί ή να σταθεροποιεί μια αλλαγή της διαμόρφωσης η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση του ενζύμου.

Απόδειξη για την άποψη αυτή υπάρχει ήδη για την ανασταλτική, ενδομοριακή αλληλεπίδραση που συντελείται μεταξύ της θέσης ψεRACK σε όλα τα κλασσικά και νέα ισοένζυμα της PKC. Επώαση της PKC με ένα πεπτίδιο που αντιστοιχεί στην ψεRACK αλληλουχία της C2 περιοχής αυξάνει την ευαισθησία του ενζύμου για πρωτεόλυση *in vitro* και οδηγεί σε εκλεκτική ενεργοποίηση της PKC *in vivo* [212,216,217]. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι η θέση της ψεRACK αλληλεπιδρά με τη θέση σύνδεσης της RACK, πιθανόν στην περιοχή V5 και ότι επώαση του ενζύμου με το πεπτίδιο ψεRACK σταθεροποιεί την «ανοικτή» μορφή του ενζύμου, μετατοπίζοντας το ισοζύγιο προς την ενεργό κατάσταση [218].

Καθώς κάθε ισοένζυμο της PKC περιέχει συγκεκριμένες αλληλουχίες που μετατρέπουν την κατάσταση ενεργοποίησής τους, πεπτίδια που προκύπτουν από τέτοιες ειδικές για κάθε ισοένζυμο θέσεις αλληλεπίδρασης ενεργοποιούν μόνο την ισομορφή εκείνη της PKC από την οποία έχουν σχεδιασθεί. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν οι πρώτοι εκλεκτικοί μετατροπείς της κατάστασης ενεργοποίησης της PKC.

2.5. Πεπτίδια Μετατρεπτικά Της Κατάστασης Ενεργοποίησης Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C

Οι τεχνικοί περιορισμοί που υπήρχαν μέχρι σήμερα για τη μελέτη της εκλεκτικότητας και εξεδίκευσης των ισομορφών της κινάσης, έχουν εν μέρει υπερνικηθεί από την ανάπτυξη πεπτιδικών ενεργοποιητών και αναστολέων για τα ισοένζυμα της PKC. Τα πεπτίδια αυτά ρυθμίζουν την υποκυτταρική μετακίνηση και εντόπιση κάθε ισοενζύμου. Η ανάπτυξή τους βασίστηκε σε μια λογική σχεδιαστική στρατηγική, η οποία χρησιμοποιεί τη μοναδική αλληλεπίδραση μεταξύ κάθε ισοενζύμου της PKC με την ειδική για κάθε ισοένζυμο πρωτεΐνη αγκυροβόλησης, RACK.

Η υπόθεση βασίζεται στο γεγονός ότι πεπτίδια που αντιπροσωπεύουν περιοχές που συμμετέχουν σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις με μια ανασταλτική περιοχή ή σε διαμοριακές αλληλεπιδράσεις με μια ανασταλτική πρωτεΐνη, θα λειτουργούν ως αγωνιστές της PKC καθώς θα διακόπτουν αυτές τις ανασταλτικές αλληλεπιδράσεις. Αντίθετα, πεπτίδια που ανταποκρίνονται στις θέσεις σύνδεσης για ενεργοποιητικές πρωτεΐνες, όπως οι RACKs θα δρουν ως ανταγωνιστές. Τέλος, πεπτίδια που αντιπροσωπεύουν μοναδικές αλληλεπιδράσεις για την PKC θα εμφανίζουν εκλεκτικότητα για τα ισοένζυμα ενώ άλλα πεπτίδια που αντιπροσωπεύουν περιοχές ενδο- ή διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που είναι κοινές για περισσότερα από ένα PKC ισοένζυμα θα επηρεάζουν πολλά PKC ισοένζυμα [219].

Τα πεπτίδια αγωνιστές που προέρχονται από την PKC λειτουργούν ως αλλοστερικοί αγωνιστές με το να εμποδίζουν τις ενδομοριακές ανασταλτικές αλληλεπιδράσεις στο εσωτερικό της PKC, οδηγώντας σε εκλεκτική ενεργοποίηση των ξεχωριστών ισοενζύμων της PKC και καθιστώντας τα έτσι ικανά να συνδεθούν με τα αντίστοιχά τους RACKs. Φυσιολογικά, οι πρωτεΐνες RACKs συνδέονται με το ενεργοποιημένο ισοένζυμο σε μια περιοχή που βρίσκεται κοντά στην περιοχή σύνδεσης του υποστρώματος. Σε μη ενεργοποιημένα ισοένζυμα σχηματίζεται μια ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ της θέσης σύνδεσης της RACK και μιας άλλης θέσης στην PKC, που ονομάζεται ψευδο-RACK (ψεRACK), η οποία ομοιάζει και μιμείται μια αλληλουχία στη RACK. Είναι πιθανό, ότι ακόμη και σε μη ενεργοποιημένα κύτταρα, η PKC μπορεί να υπάρχει τουλάχιστον σε δύο διαμορφώσεις: μια ενεργό, “ανοικτή” διαμόρφωση, στην οποία η θέση σύνδεσης της RACK είναι εκτεθειμένη, και σε μια ανενεργό, “κλειστή” διαμόρφωση, με την θέση αυτή να αδυνατεί να συνδέσει τη RACK. Σε παρουσία ενεργοποιητικών πεπτιδίων, η “ανοικτή” διαμόρφωση θα σταθεροποιηθεί, μετακινώντας το ισοζύγιο των δύο διαμορφώσεων προς την πλευρά της ενεργοποιημένης κατάστασης. Οι πεπτιδικοί αναστολείς εμποδίζουν πλήρως την μετακίνηση και την αλληλεπίδραση της PKC με το αντίστοιχο RACK, εμποδίζοντας την πρόσβαση στα υποστρώματα και επομένως σταματούν το σηματοδοτικό μονοπάτι της. Η δράση και η ειδικότητα αυτών των πεπτιδίων έχει αποδειχθεί σε μεγάλο εύρος συστημάτων, συμπεριλαμβανομένων *in vitro* και *in vivo* μοντέλα του κεντρικού νευρικού συστήματος [220].

Σηματοδοτικά γεγονότα του κυττάρου που υφίστανται μεταβολή από τη δράση εκλεκτικών για κάθε ισομορφή ρυθμιστικών πεπτιδίων				
Ένζυμο Στόχος	Ονομασία Πεπτιδίου	Αλληλουχία	Μοριακή Δράση	Φυσική Αντίδραση
β-PKC	βIV5-3	KLFIMNL	Αναστέλλει την μετακίνηση του β-PKC	Αναστέλλει την υπερτροφία των μυοκαρδιακών κυττάρων
β-PKC	βIIV5-3	QEVRNN	Αναστέλλει τη μετακίνηση της β-PKC	1. Αναστέλλει την υπερτροφία των μυοκαρδιακών κυττάρων 2. Ενεργοποιεί τους διαλύτες K ⁺
γ-PKC	γ V ₁₋₂	CRLVLASC	Εμποδίζει τη μετακίνηση της γ-PKC	Εμποδίζει την αντίδραση πόνου που προκαλεί η φορμαλίνη
δ-PKC	δV1-1	SFNSYELG SL	Αναστέλλει τη μετακίνηση της δ-PKC	1. Προστασία από το τραύμα της καρδιακής ισχαιμίας 2. Προστασία από εγκεφαλικό τραύμα 3. Προστασία από στεφανιαία νόσο 4. Αυξάνει την αύξηση των ινοβλαστών
	ψδRACK	MRAAEDPM	Αυξάνει τη μετακίνηση της δ-PKC	Αυξάνει το τραύμα από την καρδιακή ισχαιμία
ε-PKC	εV ₁₋₂	EAVSLKPT	Αναστέλλει τη μετακίνηση της ε-PKC	1. Αναστρέφει την προστασία που προσφέρει το ψεRACK 2. Μειώνει την αντίδραση πόνου που προκαλεί η φορμαλίνη
	ψεRACK	HDAPIGYD	Αυξάνει τη μετακίνηση της ε-PKC	1. Προστασία από το τραύμα της καρδιακής ισχαιμίας 2. Προστασία από τη στεφανιαία νόσο 3. Ενεργοποιεί τους διαλύτες K ⁺ 4. Αναστέλλει τα ρεύματα Na ⁺
	Peptide 1	FNGLLKIKI	Αυξάνει τη μετακίνηση και τη δραστηριότητα της κίνησης	Προστασία από το τραύμα της καρδιακής ισχαιμίας
	Peptide 2	AVGPRPQT		
	Peptide 3	FLLDPY		
	Peptide 5	SRIGQ		
	Peptide 4	PYIALNVD	Αναστέλλει τη μετακίνηση και τη δραστηριότητα της κίνησης	?

Πίνακας Δεδομένων 1. Μερικά από τα μέχρι σήμερα ανακαλυφθέντα πεπτιδία που μετατρέπουν την κατάσταση ενεργοποίησης της PKC.

(Τροποποιημένος από Budas GR, Koyanagi T, Churchill EN, Mochly-Rosen D. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: part 5)

Στον Πίνακα Δεδομένων 1 παραθέτουμε μια λίστα από τα μέχρι σήμερα, ευρύτερα χρησιμοποιούμενα ανασταλτικά και ενεργοποιητικά πεπτίδια της PKC [158].

Στη συνέχεια θα αναφερθούμε εν τάχει στη λογική με τη οποία η επιστημονική κοινότητα οδηγήθηκε στη δημιουργία των εκλεκτικών αυτών τροποποιητών της κατάστασης ενεργοποίησης των ισομορφών της PKC.

2.5.1. Ανακάλυψη Των Μετατρεπτικών Πεπτιδίων Της Κατάστασης Ενεργοποίησης Της PKC

Η βασική έρευνα που οδήγησε στη δημιουργία των εκλεκτικών πεπτιδίων ξεκίνησε από το εργαστήριο της Daria Mochly – Rosen στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου του Στάνφορντ [221]. Ο αρχικός σκοπός της έρευνας δεν αφορούσε την ανακάλυψη εκλεκτικών ενεργοποιητών και αναστολέων αλλά τους προβληματισμούς που προέκυπταν από την παρατήρηση ότι ενώ πολλαπλά ισοένζυμα συνυπάρχουν στα ίδια κύτταρα και ενεργοποιούνται από τις ίδιες ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και νευρομεταβιβαστές και ενώ τα ισοένζυμα αυτά σε *in vitro* συνθήκες έχουν την ίδια εκλεκτικότητα για τα υποστρώματα [222], παρουσιάζουν διαφορετικούς ρόλους. Μόλις το 1987, ξεκίνησε να εδραιώνεται η άποψη ότι η υποκυτταρική εντόπιση του κάθε ξεχωριστού ισοενζύμου πριν και μετά την ενεργοποίηση είναι μοναδική [223] και προτάθηκε ότι η λειτουργική εκλεκτικότητα των ισοενζύμων καθορίζεται από την υποκυτταρική του εντόπιση. Προτάθηκε ακόμη η ύπαρξη πρωτεϊνών που θα είναι ικανές να αγκυροβολούν κάθε ισοένζυμο σε μοναδικές κυτταρικές θέσεις και οι οποίες ονομάστηκαν RACKs (για τις RACKs έχει γίνει εκτενής αναφορά παραπάνω). Οι RACKs στη συνέχεια απομονώθηκαν [209] και κλωνοποιήθηκαν [175,224].

Η περαιτέρω δημιουργία εκλεκτικών ενεργοποιητών και αναστολέων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του κάθε ισοενζύμου και της αντίστοιχης RACK πρωτεΐνης, επιβεβαίωσε τη σημαντικότητα της αλληλεπίδρασης αυτής.

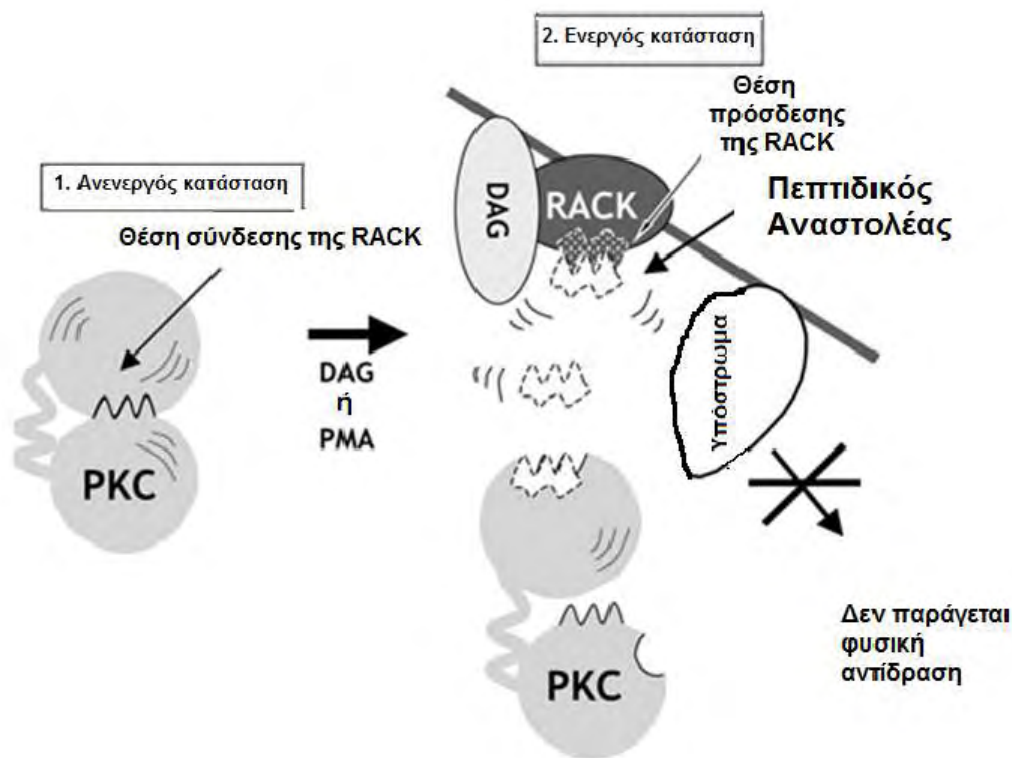
2.5.2. Η Λογική Σχεδιασμού Εκλεκτικών Για Κάθε Ισοένζυμο Ανταγωνιστικών Αναστολέων Της Σηματοδοτικής Οδού Της PKC

Ο Alistair Aitken παρατήρησε ότι η 14-3-3 πρωτεΐνη, μια πρωτεΐνη που αναστέλλει την PKC [225] και η αννεξίνη I, μια πρωτεΐνη που συνδέει την β PKC [209], μοιράζονται μια ομόλογη αλληλουχία 12 αμινοξέων. Λογικά συνεπάγεται ότι αφού αυτές, οι κατά τα άλλα άσχετες πρωτεΐνες, συνδέουν και οι δύο την PKC, ίσως η σύνδεση αυτή να συντελείται από την ομόλογη αυτή αλληλουχία. Στη συνέχεια, η ομάδα της Mochly-Rosen απέδειξε ότι ένα πεπτίδιο (πεππίδιο I) που ανταποκρίνεται σε αυτή την αλληλουχία, αναστέλλει τη σύνδεση της PKC στην απομονωμένη ή κλωνοποιημένη RACK, καθώς και στην αννεξίνη I [164]. Πιο σημαντικό όμως από όλα, είναι το γεγονός ότι το πεππίδιο αυτό αναστέλλει τη λειτουργία της β PKC στα κύτταρα. Προφανώς, η ανακάλυψη ότι ένα γραμμικό πεππίδιο αναστέλλει τις

αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης με πρωτεΐνη *in vitro* και *in vivo* προκάλεσε μεγάλη έκπληξη, καθώς οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών είναι εξαιρετικά δύσκολο να ανασταλούν [226,227]. Η πρώτη επιτυχία με το πεπτίδιο I έδωσε το έναυσμα για περαιτέρω έρευνα προς την κατεύθυνση αυτή, ειδικά μετά την ανεύρεση στην RACK 1 (β IPKC RACK) μιας περιοχής ομόλογης με το πεπτίδιο I και ένα πεπτίδιο που αντιστοιχεί σε αυτή αναστέλλει την αλληλεπίδρασή της με την PKC [212].

Το επόμενο βήμα ήταν η σκέψη ότι πεπτίδια που προέρχονται από την PKC ίσως να αναστέλλουν και αυτά τη σύνδεση της κινάσης στη RACK. Η λογική που επικράτησε στην περίπτωση αυτή ήταν διαφορετική: Υπάρχει ένας αριθμός σηματοδοτικών πρωτεϊνών που «μετακομίζουν» ή μετακινούνται από το κυτταροπλασματικό κλάσμα στο μεμβρανικό κλάσμα του κυττάρου μετά την ενεργοποίηση. Τα ένζυμα αυτά περιλαμβάνουν την φωσφολιπάση C, τη φωσφολιπάση D και ακόμη την ειδική για τα συναπτικά κυστίδια πρωτεΐνη συναπτοταγμίνη (ή αλλιώς $\rho 65$). Όλες αυτές οι πρωτεΐνες έχουν μια περιοχή 150 περίπου αμινοξέων, που είναι ομόλογη με την περιοχή C2 της PKC [163]. Η ερευνητική ομάδα λοιπόν, πρότεινε ότι η περιοχή C2 προσδένει αυτές της μετατοπιστικές πρωτεΐνες κατά την ενεργοποίηση του κυττάρου (την περίοδο εκείνη ήταν ήδη γνωστό ότι οι περιοχές C2 συνδέουν λιπίδια, αλλά δεν είχε μελετηθεί το ενδεχόμενο να συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών). Για να διευκρινισθεί εάν η περιοχή C2 συμμετέχει στην πρόσδεση, χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ανασυνδυασμένες περιοχές C2 συναπτοταγμίνης και αποδείχθηκε ότι μπορούν επίσης να συνδεθούν στη RACK, αν και με περίπου 1/100 της συγγένειας [228]. Πεπτίδια λοιπόν που αντιστοιχούν στις πιο ομόλογες περιοχές μεταξύ της β PKC C2 και της συναπτοταγμίνης C2 ίσως αντιστοιχούν στις θέσεις αλληλεπίδρασης μεταξύ της κάθε πρωτεΐνης και της αναμενόμενης πρωτεΐνης σύνδεσής της. Επακόλουθες μελέτες που χρησιμοποίησαν βραχεία πεπτίδια προερχόμενα από την περιοχή C2, επιβεβαίωσαν αυτά τα ευρήματα [229,230]. Τα πεπτίδια αυτά δρουν ως ανταγωνιστικοί ανταγωνιστές της αλληλεπίδρασης PKC – RACK (Εικόνα 25).

Τα νέα ισόενζυμα της PKC περιέχουν μια περιοχή που ομοιάζει με την C2 και η οποία αρχικά ονομαζόταν περιοχή V1 [231]. Σε δημοσιεύσεις των Sossin και Schwartz [232,233] αναφέρεται ότι η *Aplysia californica*, περιέχει ένα ισόενζυμο της PKC που ομοιάζει με την ισομορφή PKC ϵ και ότι η περιοχή V1 στο ισόενζυμο αυτό είναι ομόλογη με την C2 περιοχή. Επακόλουθες μελέτες απέδειξαν ότι, όπως και στις κλασσικές PKC, η περιοχή που ομοιάζει με την C2 των νέων PKC συμμετέχει επίσης στη σύνδεση αυτών των ισόενζύμων με τις RACKs τους [234]. Συγκρίνοντας τις αλληλουχίες στη C2 περιοχή της *Aplysia* και του επίμυα, οι ερευνητές του εργαστηρίου της Mochly-Rosen κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η πιο προσομοιάζουσες αλληλουχίες είναι αυτές που πιθανώς πραγματοποιούν την αλληλεπίδραση της ϵ PKC με τη RACK της. Και η επιβεβαίωση ήρθε! Δημιουργήθηκε ένα πεπτίδιο το οποίο προέρχεται από τα αμινοξέα 14-21, το ϵ V1-2 πεπτίδιο και το οποίο αποτελεί εκλεκτικό αναστολέα της μετακίνησης και των λειτουργιών της PKC ϵ [234,235].



Εικόνα 25. Ανταγωνιστική αναστολή της μετακίνησης και της λειτουργίας της PKC.

Η πρόσδεση της ενεργοποιημένης PKC στη RACK που της αντιστοιχεί αναστέλλεται από ένα πεπτιδίο που προέρχεται από την PKC και αντιστοιχεί στη θέση σύνδεσης της RACK για τη σύνδεση της συγκεκριμένης RACK. Το γεγονός αυτό εμποδίζει την πρόσβαση του ενεργού ενζύμου στα υποστρώματά του, οδηγώντας σε αναστολή του καταρράκτη των φυσιολογικών αντιδράσεων.

DAG: διακυλογλυκερόλη

(Τροποποιημένος από Budas GR, Koyanagi T, Churchill EN, Mochly-Rosen D. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: part 5)

2.5.3. Η λογική Σχεδιασμού Εκλεκτικών Για Κάθε Ισοένζυμο Αλλοστερικών Αγωνιστών Της Σηματοδοτικής Οδού Της PKC

Η λογική της αναγνώρισης αλλοστερικών αγωνιστικών πεπτιδίων προήρθε από την παρατήρηση των House και Kemp [178] ότι, στην ανενεργό κατάσταση, η PKC εμπλέκεται σε ενδομοριακές αυτοανασταλτικές αλληλεπιδράσεις (για τις οποίες έγινε αναφορά παραπάνω). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές πραγματοποιούνται ανάμεσα στην ενεργό θέση του ενζύμου και μιας αλληλουχίας στη ρυθμιστική περιοχή που μοιάζει με μια θέση φωσφορυλίωσης και για το λόγο αυτό ονομάστηκε θέση ψευδοϋποστρώματος [178]. Η ομάδα της Mochly-Rosen υπέθεσε με βάση τα παραπάνω, ότι όμοια με τη θέση ψευδοϋποστρώματος θα πρέπει να υπάρχει και μια θέση ψευδο-RACK. Η έρευνα για ομόλογες περιοχές μεταξύ της RACK1 και

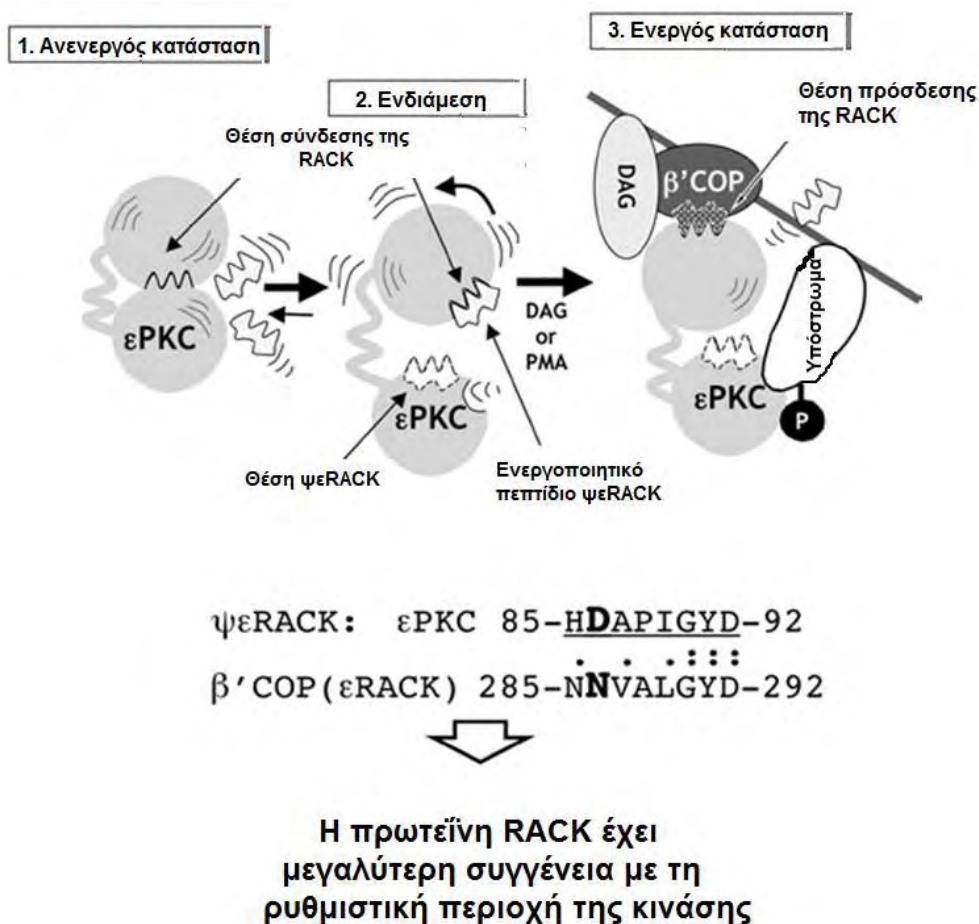
του ισοεζύμου βΙΙΡΚC και μεταξύ της RACK2 και του ισοεζύμου εΡΚC, αποκάλυψε βραχείες αλληλουχίες ομολογίας των έξι και οκτώ αμινοξέων αντίστοιχα ανάμεσα σε κάθε ζευγάρι των μη σχετιζόμενων αυτών γονιδιακών προϊόντων [212,236]. Πεπτίδια που ανταποκρίνονται σε αυτές τις αλληλουχίες είναι εκλεκτικοί ενεργοποιητές της βΙΙΡΚC και της εΡΚC αντίστοιχα [212, 236]. Αυτά τα αλλοστερικά πεπτίδια αγωνιστές και οι αλληλουχίες από τις οποίες προήλθαν (Εικόνα 26), διαφέρουν στο φορτίο από την αντίστοιχη θέση σύνδεσης της ΡΚC πάνω στη RACK (λυσίνη αντί γλουταμικού στον αλλοστερικό ανταγωνιστή του βΙΙΡΚC και ασπαραγίνη αντί ασπαραγικού στον αλλοστερικό αγωνιστή του εΡΚC). Αυτή η διαφορά στο φορτίο είναι σημαντική για να καταστήσει δυνατή τη διακοπή της ενδομοριακής, χαμηλής συγγένειας αλληλεπίδρασης με την διαμοριακή αλληλεπίδραση ανάμεσα στο ισοένζυμο και στη RACK του [213].

Εξήχθη λοιπόν το συμπέρασμα ότι ο αλλοστερικός αγωνιστής σταθεροποιεί μια παροδικά ανοικτού τύπου διαμόρφωση του ενζύμου, στην οποία οι ενδομοριακές αυτοανασταλτικές αλληλεπιδράσεις διακόπτονται και στην οποία η θέση σύνδεσης της RACK πάνω στην κινάση είναι περισσότερο εκτεθειμένη. Ο αγωνιστής πιστεύεται ότι εγκαταλείπει την κινάση μόλις το ένζυμο συνδεθεί με τη [213,236] RACK.

2.5.4. Το Μεταφορικό Tat Πεπτιδιο. Αναστρέψιμη Σύνδεση Με Τα Μετατρεπτικά Της Κατάσταση Ενεργοποίησης Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Πεπτίδια

Το πιο ενδιαφέρον πάντως στην ιστορία της ανακάλυψης των μετατρεπτικών της κατάστασης ενεργοποίησης της ΡΚC πεπτιδίων, είναι η σύνδεση των πεπτιδίων αυτών με το μεταφορικό Tat πεπτιδιο [237]. Το πεπτιδιο Tat αποτελείται από μια αλληλουχία 11 αμινοξέων (YGRKKRRQRRR, υπολλείμματα 47-57) από το NH₂-άκρο της πρωτεϊνικής μεταφορικής περιοχής (protein transduction domain, PTD) της πρωτεΐνης TAT του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας 1 (HIV-1). Το πεπτιδιο αυτό έχει την ικανότητα μεταφοράς μικρομοριακών ουσιών (μεταξύ αυτών και πεπτιδίων) στο εσωτερικό των κυττάρων και η μεταφορά αυτή γίνεται με ένα γρήγορο, εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση τρόπο, που φαίνεται να είναι ανεξάρτητος από υποδοχείς και μεμβρανικούς μεταφορείς και πιστεύεται ότι στοχεύει την διπλοειδική λιπιδική στοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης. Το μεταφορικό Tat πεπτιδιο είναι βιολογικά αδρανές [238].

Τα μετατρεπτικά της κατάστασης ενεργοποίησης της ΡΚC πεπτιδια συνδέονται αντιστρεπτά με το μεταφορικό Tat πεπτιδιο μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ ελεύθερων κυστεϊνών στα αμινοτελικά άκρα τους. Η σύνδεση αυτή είναι αντιστρεπτή καθώς μετά την είσοδο του πεπτιδίου με τη βοήθεια του Tat στο εσωτερικό του κυττάρου, το αναγωγικό κυτταρικό περιβάλλον προκαλεί τη λύση του δισουλφιδικού δεσμού [239,240].



Εικόνα 26. Ενεργοποίηση της εPKC βασιζόμενη στις σχέσεις συνάφειας μεταξύ της κινάσης και της RACK που τις αντιστοιχεί (β' COP).

Κατά την ενεργοποίηση, η ενεργοποιημένη εPKC αλλάζει διαμόρφωση σε μια ενδιάμεση, μεταβατική κατάσταση. Η θέση σύνδεσης της RACK στην ρυθμιστική περιοχή της εPKC μπορεί να συνδέσει είτε το πεπτικό ψεRACK είτε την πρωτεΐνη β' COP (β' coatamer protein). Τα αντίθετα φορτία ανάμεσα στο ασπαρτικό οξύ και την ασπαραγίνη σε αυτές τις αλληλουχίες (κάτω μέρος εικόνας) συνεισφέρει στη διαφορά της συγγένειας της θέσης πρόσδεσης της εRACK στη β' COP και στο πεπτικό ψεRACK. Το πεπτικό ψεRACK σταθεροποιεί την ενδιάμεση κατάσταση της εPKC, αλλά δεν μπορεί να διαταράξει τη σύνδεση εPKC-β' COP εξαιτίας της υψηλότερης συγγένειας της εPKC για τη β' COP.

(Τροποποιημένος από Budas GR, Koyanagi T, Churchill EN, Mochly-Rosen D. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: part 5)

Με τον τρόπο αυτό τα πεπτικά μπορούν εισέλθουν στα κύτταρα και να διανεμηθούν στο εσωτερικό αυτών χωρίς να συνδέονται με το μεταφορικό πεπτικό. Τα μετατρεπτικά της κατάστασης ενεργοποίησης της PKC πεπτικά ανιχνεύονται σε ένα μεγάλο αριθμό ιστών, συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφάλου, μετά την ενδοφλέβια αλλά και ενδοπεριτοναϊκή χορήγησή τους και μπορούν να μετατρέψουν την κατάσταση ενεργοποίησης των διαφόρων ισοενζύμων της PKC *in vivo* και *in vitro* [201,213,220,234,241,242].

Εφεξής, για λόγους συντομίας, όταν αναφερόμαστε στα μετατρεπτικά της κατάστασης ενεργοποίησης της PKC πεπτίδια, θα παραλείπεται η αναφορά στη σύνδεσή τους με το μεταφορικό Tat πεπτίδιο, η οποία και εννοείται καθώς για να εισέλθουν τα πεπτίδια αυτά στα κύτταρα και να πραγματοποιήσουν τη δράση τους απαιτείται η σύνδεσή τους με το μεταφορικό πεπτίδιο.

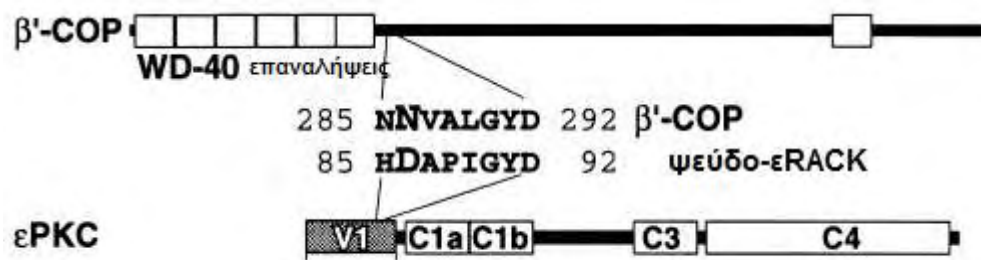
2.5.5. Μετατρεπτικά Της Κατάσταση Ενεργοποίησης Της Ισομορφής ε Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Πεπτίδια

Από την πληθώρα των συνεχώς αναπτυσσόμενων πεπτιδίων για κάθε ισομορφή της PKC θα αναφερθούμε στα πεπτίδια που αναπτύχθηκαν για την PKC ε ισομορφή πρώτον, διότι αποτελούν τα πιο πολυμελετημένα πεπτίδια στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία και δεύτερον, γιατί αποτέλεσαν τον φαρμακολογικό παράγοντα επιλογής για την μελέτη της επίδρασης της ε ισομορφής της PKC στη μνήμη στην παρούσα μελέτη.

Για την εPKC δύο κυρίως πεπτίδια χρησιμοποιούνται ερευνητικά σήμερα: το εV1–2, ένα ανασταλτικό πεπτίδιο της εPKC το οποίο προέρχεται από μια αλληλουχία αμινοξέων της C2 περιοχής που συνδέεται με την πρωτεΐνη αγκυροβόλησης εRACK (β' COP), και το ψεRACK, έναν αλλοστερικό ενεργοποιητή που προέρχεται από μια αλληλουχία που εμπλέκεται σε αυτοανασταλτικές αλληλεπιδράσεις. Και τα δύο πεπτίδια αντιπροσωπεύουν περιοχές στην C2 περιοχή που διατηρούνται φυλογενετικά και διαφέρουν αρκετά από αλληλουχίες σε άλλα ισόενζυμα της PKC (για παράδειγμα, το εV1–2 είναι 88% όμοιο ανάμεσα στην *Aplysia* και τον επίμου, ενώ παρατηρείται μόνο 36% ομοιότητα ανάμεσα στην εPKC και στην δPKC του επίμου) [219].

Το 1996 αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά σε καλλιέργειες μυοκαρδιοκυττάρων, αναστολείς της δράσης της εPKC. Ο αναστολέας αυτός προέρχεται από το τμήμα V1 της εPKC (εV1) και αντιστοιχεί σε ένα πεπτίδιο μήκους 8 αμινοξέων που εκλεκτικά αναστέλλει τη μετακίνηση της εPKC. Το πεπτίδιο αποτελείται από τα αμινοξέα EAVSLKPT και ονομάσθηκε εV1-2, (από την περιοχή εV1 και την αρίθμηση των αμινοξέων, εPKC (14–21). Η V1 περιοχή απαιτείται για την πρόσδεση της ενεργοποιημένης εPKC και η αναστολή της πρόσδεσης από την V1 περιοχή ή από τα αμινοξέα 14–21 (εV1–2) επαρκεί για να αναστείλει τη μετακίνηση και τη δράση της ενεργοποιημένης εPKC στα κύτταρα [234].

Η αλληλουχία της ψευδοRACK στην εPKC, αποτελείται από τα αμινοξέα HDAPIGYD (PKC 85–92), και έχει 75% ομολογία με μια αλληλουχία στην εRACK που αποτελείται από τα αμινοξέα NNVALGYD (RACK 285–292). Από την αλληλουχία αυτή σχεδιάστηκε ένα εκλεκτικό για την εPKC πεπτίδιο αγωνιστής, ψεRACK (ψε-υποδοχέας για την ενεργοποιημένη C-κινάση, ψε-receptor for activated C kinase) (αμινοξέα 85 έως 92 [HDAPIGYD]) (Εικόνα 27) [236].



Εικόνα 27. Σχηματική απεικόνιση της αναγνώρισης της ψεRACK αλληλουχίας.

Οι ομόλογες αλληλουχίες στην εRACK (β'-COP) και στην εPKC που οδήγησαν στην αναγνώριση του ψεRACK πεπτιδίου.

(Τροποποιημένο από Dorn II GW, Souroujon MC, Liron T, Chen CH, Gray MO, Zhou HZ, Csukai M, Wu G, Lorenz JN, Mochly-Rosen D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12798–803)

2.6. Πρωτεϊνική Κινάση C Και Μνήμη

Στην τελευταία δεκαετία έχει γίνει μια αρκετά μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της μνήμης και των διαταραχών αυτής. Ανάμεσα στους παράγοντες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, η ενεργοποίηση των ισομορφών της πρωτεϊνικής κινάσης C αποτελεί σημαντικό βήμα για πολλούς τύπους μάθησης και μνήμης.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η αναστολή της PKC και τα λειτουργικά ελλείμματα αυτής, οδηγούν σε διαταραχή ποικίλλων τύπων μάθησης και μνήμης. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα με δυσλειτουργία της PKC παρουσιάζουν επηρεασμένη ικανότητα μάθησης [243]. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι το νευροτοξικό αμυλοειδές αναστέλλει τη δραστηριότητα της PKC και ότι τα ισοένζυμα της PKC έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην παραγωγή και συσσώρευση του αμυλοειδούς ενώ αναπλήρωση της επηρεασμένης σηματοδοτικής οδού της PKC με φαρμακολογικούς παράγοντες έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη ικανότητα μνήμης, συναπτική αναμόρφωση και δημιουργία νέων συνάψεων [244-248]. Οι ενεργοποιητές της PKC, ιδιαίτερα αυτοί που παρουσιάζουν ειδικότητα για μια ισομορφή, αποτελούν μια νέα κατηγορία υποψήφιων φαρμακευτικών παραγόντων, που ίσως αναπτυχθούν ως οι μελλοντικοί θεραπευτικοί παράγοντες της μνήμης [249,250]. Ας δούμε λοιπόν πιο αναλυτικά τις πληροφορίες που ενισχύουν τη συμμετοχή αυτής της οικογένειας κινασών στη μνήμη.

Είναι γνωστό ότι οι PKCs ενεργοποιούνται από συναπτικά σήματα εισόδου και ενδοκυτταρικά σήματα που εμπλέκονται στις διαδικασίες επεξεργασίας της πληροφορίας για το σχηματισμό μνημονικών εγχαράξεων, συμπεριλαμβανομένων γλουταμινεργικών [251], χολινεργικών [252], σεροτονεργικών [253,254] δοπαμινεργικών [255] σημάτων, την αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου και της διακυκλογλυκερόλης αλλά και ορμονικά σήματα [256]. Οι PKCs ελέγχουν τις ηλεκτρικές ιδιότητες της μεμβράνης [257-258] και μετατρέπουν την λειτουργία των υποδοχέων των νευρομεταβιβαστών [259-261]. Η ενεργοποίηση των PKCs οδηγεί σε αλλαγές σε ζωτικές κυτταρικές απαντήσεις, όπως είναι η ενδυνάμωση των δυναμικών ενεργοποίησης του ασβεστίου, η αύξηση της απελευθέρωσης των νευρομεταβιβαστών [262-264], η μείωση των τασεοελεγχόμενων ρευμάτων Na^+ [252-254] και των τασεοελεγχόμενων ρευμάτων K^+ [265-270] καθώς και των ενεργοποιούμενων από το ασβέστιο ρευμάτων K^+ στον ιππόκαμπο. Όλα τα παραπάνω σχετίζονται με τις διαδικασίες επεξεργασίας της πληροφορίας στη μνήμη. Οι φορβολικοί εστέρες, για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν το μέγεθος της, έτοιμης προς απελευθέρωση, δεξαμενής νευρομεταβιβαστών και το ρυθμό με τον οποίο η δεξαμενή αναπληρώνεται στις γλουταμινεργικές συνάψεις του ιππόκαμπου [262].

Η PKC ρυθμίζει το γλουταμινεργικό, το GABAμινεργικό και το χολινεργικό σύστημα. Η ενεργοποίηση της PKC με το φυσικό ενεργοποιητή των ισομορφών της, το 12-O-tetradecanoylphorbol (σε συντομογραφία χρησιμοποιείται ο όρος TPA), έχει αποδειχθεί ότι μεταβάλλει την κινητικότητα τόσο των AMPA υποδοχέων όσο και των NMDA υποδοχέων του

γλουταμικού και αυξάνει την εξωσυναπτική και συναπτική διάχυση/συγχώνευση [271,272]. Οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμικού (mGluR) που περιέχουν καϊνικό (όπως ο mGluR6) αποτελούν πιθανώς το έναυσμα για την προκαλούμενη από την PKC αναστολή της βραδείας μετά-υπερπόλωσης στους πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής του ιππόκαμπου [273]. Το γλουταμικό ακόμη, απευαισθητοποιεί τους mGluR5a και mGluR5b, μέσω PKC προκαλούμενης φωσφορυλίωσης του mGluR5 σε πολλαπλές θέσεις [274]. Η ενεργοποίηση της PKC παίζει ένα σημαντικό, ρυθμιστικό ρόλο στην GABAμινεργική συναπτική μεταβίβαση [275] και επίσης φαίνεται να πραγματοποιεί μεταβολή της φωσφορυλίωσης και της δραστηριότητας του GABAA υποδοχέα μέσω του προερχόμενου από τον εγκέφαλο νευροτροφικού παράγοντα ή αλλιώς του BDNF (από τον αγγλική ονομασία brain-derived neurotrophic factor) [276]. Η ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης, η οποία συνθέτει ακετυλοχολίνη στους χολινεργικούς νευρώνες, φωσφορυλιώνεται από τα ισοένζυμα της PKC σε τέσσερις σερίνες (Ser-440, -346, -347, -476) και σε μια θρεονίνη (Thr-255), ρυθμίζοντας έτσι την καταλυτική της δράση [277]. Οι λειτουργικές αυτές αλλαγές πολύ πιθανόν να σχετίζονται με μορφολογικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένων της συναπτικής αναδιοργάνωσης και της δημιουργίας νέων συνάψεων, οι οποίες και αυτές προκαλούνται από την ενεργοποίηση της PKC.

Νευροτροφική δραστηριότητα και άλλα ερεθίσματα προκαλούν μια αντιστρεπτή αύξηση των επιπέδων της κυτταρικής διακυλογλυκερόλης, γεγονός που ενεργοποιεί την PKC αλλά και παράγει ορισμένα άλλα αποτελέσματα, ανεξάρτητα από την PKC [278]. Η ενεργοποίηση της PKCα, για παράδειγμα, προάγει την πρωτεϊνική σύνθεση και το σχηματισμό ακάνθων μέσω των νευρωνικών ELAV πρωτεϊνών που αποτελούν σταθεροποιητικές πρωτεΐνες του mRNA [279,280].

Τοπική επαφή μεταξύ νευρώνων και αστροκυττάρων σε κυτταροκαλλιέργειες ενεργοποιεί την PKC μέσω του καταρράκτη του αραχιδονικού οξέος στους νευρώνες, δίνοντας έναυσμα για διεγερτική δημιουργία συνάψεων [281,282]. Ο καταρράκτης αυτός, αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό για συνολική νευρωνική ωρίμανση ως συνέχεια της τοπικής προσκόλλησης των αστροκυττάρων, πιθανώς συμπεριλαμβανομένης και της νευρογένεσης σε ενήλικα (όπως αυτά τα ώριμα ιπποκάμπεια αστροκύτταρα ρυθμίζουν την νευρογένεση με το να δίνουν οδηγίες στα προγονικά αδιαφοροποίητα κύτταρα για να υιοθετήσουν μια νευρωνική μοίρα) [283,284]. Για παράδειγμα, σε καλλιέργειες ιπποκάμπειων νευρώνων, η ενεργοποίηση της PKC προκαλεί ταχεία μορφολογική πλαστικότητα σε δένδριτες και άκανθες [285]. Ο ίδιος τύπος απάντησης έχει επίσης παρατηρηθεί και *in vivo* [286,287].

Σε συμπλήρωση με τα στοιχεία στα μεταβιβατικά συστήματα, τις συνάψεις και τους υποδοχείς/διαύλους, οι PKCs μπορούν επίσης να ρυθμίσουν τη δημιουργία νέων συνάψεων και να αλληλεπιδρούν με μια μεγάλη ποικίλη οικογένεια PKC - αλληλοεπιδρώντων πρωτεϊνών [288-293], όπως η πρωτεΐνη η σχετιζόμενη με την αύξηση (growth associated protein), GAP-43, και οι υποδοχείς για την ενεργοποιημένη C κινάση (RACKs), συμπεριλαμβανομένης και

του MARCKS (myristoylated alanine- rich C kinase substrate). Η GAP-43, της οποίας η έκφραση αυξάνεται κατά τη διάρκεια της χωρικής μάθησης και μνήμης [279], συναντάται αποκλειστικά στον εγκέφαλο [291], εντοπίζεται στις μεμβράνες των αξονικών προεκβολών και δεν βρίσκεται στις μεμβράνες των δενδριτικών προεκβολών [294-296], εκτός από το οσφρητικό σύστημα [297]. Διαγονιδιακοί μύες που υπερεκφράζουν την GAP-43 έχει βρεθεί ότι επιδεικνύουν μια αυξημένη μνημονική ικανότητα σε μια χωρική δοκιμασία λαβυρίνθου [292], ενώ ετερόζυγοι για την πρωτεΐνη B50/GAP-43 knockout μύες επιδεικνύουν αρνητικά επηρεασμένη μνημονική ικανότητα σε δοκιμασίες που εμπλέκουν τον ιππόκαμπο [298]. Η ξεχωριστή εντόπιση των PKCs και των συνδεδεμένων με τη μεμβράνη υποστρωμάτων τους, όπως η B50/GAP-43, αποτελεί στους νευρώνες ένα βασικό βήμα στη διαδικασία ενεργοποίησης της. Η ενεργοποίηση της PKC στη συνδυασμένη μάθηση [265] είναι πράγματι συνδεδεμένη με μια χαρακτηριστική μετακίνηση της PKC από το κυτταρόπλασμα στο μεμβρανικό τμήμα [299,300]. Η μετακίνηση της PKC από το κυτταρόπλασμα στα μεμβρανικά υποκυτταρικά τμήματα των νευρώνων συνδέεται με τη φωσφορυλίωση της B50/GAP-43 στη Ser-41 στους επίμυες, μύες και ανθρώπους και της Ser-42 στα κοτόπουλα καθώς και με την επαγωγή της μακροχρόνιας ενδυνάμωσης (LTP) [301]. Το φαινόμενο της μετακίνησης της PKC εμφανίζεται προσυναπτικά, όπως στην περίπτωση της φωσφορυλίωσης της B50/GAP-43 [286] και του LTP [302], αλλά και μετασυναπτικά, όπως στην περίπτωση της συνδυασμένης μάθησης [303].

Στη μάθηση και στη μνήμη, είναι γενικά αποδεκτό ότι η συχνότητα και η ένταση των αιχμών/κυμάτων του ασβεστίου (calcium spikes/waves) αντιπροσωπεύουν σημαντικά σήματα των γεγονότων που έχουν βιωθεί. Οι PKCs μπορούν να «ανιχνεύσουν» τη συχνότητα και την ένταση των αιχμών του ασβεστίου, και επομένως το σχέδιο και τη συχνότητα των συναπτικών εισροών, σε ένα μοναδικό σχέδιο και κύκλο που περιλαμβάνει την ασβεστοεξαρτώμενη μετακίνησης της κινάσης και την ενεργοποίησή αυτής από τη διακυλογλυκερόλη [304,305]. Οι cPKC δεν ενεργοποιούνται σε απουσία αιχμών ασβεστίου ενώ άλλες, μη εξαρτώμενες από τα ιόντα ασβεστίου ισομορφές της PKC, απαντούν σε σηματοδοτικά γεγονότα χωρίς να συνδέονται με τις αιχμές ασβεστίου.

2.6.1. Η Πρωτεϊνική Κινάση C - Μνήμη Και Διαταραχές Αυτής

Η δράση της PKC εμπλέκεται στη συναπτική πλαστικότητα συμπεριλαμβανομένης της μακροχρόνιας ενδυνάμωσης (LTP) [306-309] και της μακροχρόνιας καταστολής (long-term depression, LTD) [310,311]. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα της PKC στο LTP των γλουταμινεργικών συνάψεων μπορεί να μη σημαίνει απαραίτητως ανάλογα αποτελέσματα στη νόηση. Αποσύνδεση της μνημονικής απόδοσης από το LTP έχει παρατηρηθεί και αναφερθεί [312]. Για παράδειγμα, μύες με ελλείμματα της PKCβ έχει αποδειχθεί ότι επιδεικνύουν φυσιολογική ανατομία του εγκεφάλου, φυσιολογική ιπποκάμπεια συναπτική μεταβίβαση και φυσιολογική παραγωγή του LTP στις γλουταμινεργικές συναπτικές απαντήσεις, αλλά απώλεια

της μάθησης και της μνήμης τόσο σε cued αλλά και σε δοκιμασίες συνδυασμένες με κατάσταση φόβου [312].

Ενδείξεις ότι τα ισοένζυμα της PKC εμπλέκονται στη μάθηση και μνήμη	
PKC	Κύρια ευρήματα
Έκφραση στον εγκέφαλο	Τα υψηλότερα επίπεδα συναντώνται στον ιππόκαμπο και στις συναφείς εγκεφαλικές δομές που σχετίζονται με τη μάθηση και τη μνήμη
Ενεργοποίηση και μάθηση	Η συνδυασμένη μάθηση προκαλεί μετακίνηση της PKC από το κυτταρόπλασματικό στο μεμβρανικό κλάσμα στην περιοχή CA1 του ιππόκαμπου
Ενεργοποιητές της PKC	Η ενεργοποίηση της PKC αυξάνει τη χωρική μάθηση και μνήμη, τη συναπτική αναδόμηση/επιδιόρθωση, τη συναπτογένεση και την πρωτεϊνική σύνθεση. Η αυξημένη δράση της PKC ακόμη μειώνει το σχηματισμό του αμυλοειδούς και αυξάνει τον ρυθμό αποδόμησής του
Αναστολείς της PKC	Οι αναστολείς της PKC βλάπτουν τη μάθηση και τη μνήμη, συμπεριλαμβανομένων της παθητικής αποφυγής και της χωρικής μάθησης και μνήμης
Ελλείμματα της PKC	Διαγονιδιακοί μύες με έλλειμμα για την PKCβ εμφανίζουν απώλεια της ικανότητας μάθησης σε δοκιμασίες με ενδείξεις και σε δοκιμασίες συνδυασμένες με καταστάσεις φόβου. Μειωμένη δραστηριότητα της PKC σε ασθενείς με νόσο Alzheimer

Πίνακας Δεδομένων 2. Ενδείξεις για την εμπλοκή της PKC στις διαδικασίες της μάθησης και μνήμης.

(Τροποποιημένος από Budas GR, Koyanagi T, Churchill EN, Mochly-Rosen D. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: part 5)

Η ενεργοποίηση της PKC παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη μάθηση και τη μνήμη αλλά και στις διαταραχές της μνήμης. Η ενεργοποίηση της PKC εμπλέκεται σε πολλούς τύπους νοητικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένων της μάθησης και μνήμης της eye-blink conditioning [303,313-316], της χωρικής μάθησης και μνήμης [299,317-322], της μάθησης της

οσφρητικής διάκρισης [323], της συνθήκης αποστροφής γεύσης [324], της συνδυασμένης με φόβο μνήμης [325,326], της κοκαΐνοεξαρωτώμενης μνημονικής απόδοσης που εκλύεται από ενδείξεις [327], και τη συνθηκοποιημένη αποφυγή [328]. Μια συνεχής φωσφορυλίωση από την PKM, μια αυτόνομα ενεργή ισομορφή της PKC, έχει αναφερθεί ως σημαντική για τις αποτρεπτικές μακροχρόνιες μνήμες, όπως την χωρική αποφυγή [329] και τη συνθήκη αποστροφής γεύσης [330].

Ο Πίνακας Δεδομένων 2 παρουσιάζει περιληπτικά κάποιες από τις αποδείξεις που ενισχύουν την εμπλοκή της PKC στις διαδικασίες της μάθησης και μνήμης

Η συμμετοχή της ενεργοποίησης της PKC στη μνήμη και στις διαταραχές αυτής βασίζεται σε διάφορα πειραματικά δεδομένα, όπως:

Πρώτον, ο εγκέφαλος, και ειδικά ο ιππόκαμπος και οι συναφείς δομές που διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στη νόσηση, εκφράζουν τα υψηλότερα επίπεδα PKC σε ολόκληρο το σώμα.

Δεύτερον, τα νευρωνικά γεγονότα και οι εισροές ενεργοποίησης που συμβαίνουν κατά τις διαδικασίες μάθησης και μνήμης ενεργοποιούν την PKC. Η συνδυασμένη μάθηση προκαλεί μετακίνηση της δράσης της PKC από το κυτταρόπλασμα στο μεμβρανικό τμήμα των νευρώνων της CA1 περιοχής του ιππόκαμπου [299].

Τρίτον, η ενεργοποίηση της PKC με βρυοστατίνη-1 έχει βρεθεί ότι αυξάνει τη γένεση νέων συναψων, την προσυναπτική δομική εξειδίκευση και την πρωτεϊνική σύνθεση που εμπλέκονται στη χωρική λαβυρινθική μάθηση και μνήμη [286,331].

Τέταρτον, η ενεργοποίηση της PKC προάγει τη χωρική μάθηση και μνήμη. Η βρυοστατίνη-1, ένας ενεργοποιητής της PKC, αυξάνει τη χωρική μνήμη σε επίμυες [332].

Πέμπτον, η αναστολή της PKC και τα λειτουργικά ελλείμματά της, επηρεάζουν αρνητικά τις γνωσιακές λειτουργίες. Η μειωμένη δραστηριότητα της PKC συνδέεται με τη νόσο Alzheimer (AD) [333,334], προτείνοντας ακόμη μια φορά την εμπλοκή της στη νόσηση. Αναφέρεται χαρακτηριστικά ότι τα ελλείμματα χωρικής μνήμης που σχετίζονται με το γήρας συνδέονται με μειωμένες υποκυτταρικές συγκεντρώσεις των κλασικών ισομορφών της PKC και ίσως αυτό είναι ενδεικτικό της ανεπαρκούς μετάδοσης σήματος και της επηρεασμένης νευρωνικής πλαστικότητας του ιπποκάμπειου σχηματισμού. Η συσχέτιση μεταξύ της PKC, της μνήμης και της άνοιας παρουσιάζεται από μειωμένα επίπεδα και μειωμένη δράση των ισομορφών β και ε της PKC στον κροταφικό φλοιό [335,336] χωρίς αλλαγές της ποσότητας του mRNA της PKCβ [337]. Οι μεμβράνες ιππόκαμπου από εγκεφάλους ασθενών με νόσο Alzheimer έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν μειωμένη ρευστότητα μεμβράνης στην περιοχή του υδροκαρβοξυλικού πυρήνα τους [338], ένα διαφοροποιημένο μεμβρανικό περιβάλλον που ίσως επηρεάζει την ενεργοποίηση της PKC. Έχει αποδειχθεί ότι η δράση ενζυμικού

εκχυλίσματος της PKC, καθαρισμένο από ενδογενείς μετατρεπτικούς παράγοντες, δεν είναι επηρεασμένη σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου των ασθενών με AD [339], γεγονός που προτείνει, είτε αλλοιωμένη αποδόμηση των ισομορφών είτε αυξημένη ενδογενή αναστολή της δράσης της PKC στον εγκεφαλο των ασθενών με AD. Μια ακόμη σημαντική διαφορά στον εγκεφαλο των ασθενών με AD είναι στις πρωτεΐνες RACKs. Στους ασθενείς αυτούς έχουν παρατηρηθεί ελλείμματα στα επίπεδα της RACK1 τόσο σε κυτταροπλασματικά όσο και σε μεμβρανικά υποκυτταρικά κλάσματα από το μετωπιαίο φλοιό σε νεκροτομικές μελέτες εγκεφαλικού φλοιού [340].

Υπάρχει μια πληθώρα δεδομένων που υποστηρίζουν ότι η δυσλειτουργία της PKC συνδέεται με την ανάπτυξη της AD και άλλων νευροεκφυλιστικών διαταραχών. Η αναστολή της PKC και η λειτουργική της δυσλειτουργία έχει, σε συμφωνία με τα παραπάνω, αποδειχθεί, ότι σημαντικά επηρεάζει την απόδοση στις νοητικές δοκιμασίες. Ενδοεγκεφαλική έγχυση στο κοιλιακό σύστημα αναστολέων της PKC, για παράδειγμα, προκαλεί μεγάλη διαταραχή της μνήμης στη δοκιμασία παθητικής αποφυγής και στη δοκιμασία του υδάτινου λαβύρινθου [341].

Ο ιππόκαμπος των θηλαστικών εμπλέκεται σε πολλούς τύπους νοητικών διεργασιών καθώς και στη ρύθμιση της διάθεσης [342-345] και διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην επεισοδική, δηλωτική και χωρική μάθηση και μνήμη [346]. Η έκφραση των ισοενζύμων της PKC και οι λειτουργίες τους, ειδικά εκείνων στον ιππόκαμπο και στις συναφείς εγκεφαλικές δομές, εμφανίζουν πλαστικότητα και είναι ευαίσθητα σε ποικίλους παράγοντες, όπως το stress και το νευροτοξικό αμυλοειδές [347,348]. Το β αμυλοειδικό πεπτιδίο περιέχει μια περιοχή ψευδοϋποστρώματος της PKC (Aβ 28-30) και δύναται να αναστείλει άμεσα τα ισοένζυμα της PKC, συμπεριλαμβανομένων των PKCα και εPKC [334,349]. Το Aβ πεπτιδίο επομένως εμποδίζει απευθείας την ενεργοποίηση της PKC, προκαλεί αποδόμηση της PKC (85), μειώνει την προκαλούμενη από την PKC φωσφορυλίωση [350,351], και μειώνει την μετακίνηση της PKC στις μεμβράνες [348]. Ορισμένα από τα νευροπαθολογικά ευρήματα στην AD καθώς και ορισμένες από τις λειτουργικές διαταραχές στη μνήμη, προκαλούνται ίσως από αυτή την αναστολή της PKC από το Aβ πεπτιδίο.

Οι ενεργοποιητές της PKC ίσως μπορούν να έχουν αντιανοϊκή δράση και να παρουσιάσουν φαινόμενα διευκόλυνσης της μνήμης μέσω πολλών οδών. Μια σημαντική αντιανοϊκή δράση της ενεργοποίησης της PKC μπορεί να είναι η διευκόλυνση της μετακίνησής της η οποία έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζεται σε πολλές συνδυασμένες δοκιμασίες [332]. Μια δεύτερη θεραπευτική δράση περιέχει την αποκατάσταση της ενεργοποίησης της PKC. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στην PKC και στο Aβ πεπτιδίο προτείνει ότι η αποκατάσταση της ανεσταλμένης ενεργοποίησης της PKC ίσως έχει ένα άμεσο αποτέλεσμα στη μνήμη. Μια τρίτη, πιθανώς σημαντική αντιανοϊκή δράση της PKC, είναι ο ρόλος της στη ρύθμιση και την τροποποίηση της παραγωγής του αμυλοειδούς. Ενεργοποίηση των PKCα και ε αυξάνει την παραγωγή του APPα [352,353] και έτσι μειώνεται ο σχηματισμός του πεπτιδίου Aβ [354].

Ακόμη, υπερέκφραση της PKCε έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τη δράση του μετατρεπτικού ενζύμου της ενδοθελίνης και μειώνει την παθολογία των αμυλοειδικών πλακών σε διαγονιδιακούς μύες που εκφράζουν την οικογενή μεταλλαγμένη μορφή AD του ανθρώπινου APP [355].

2.6.2 Η Ισομορφή ε Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Και Η Μνήμη

Η εμπλοκή των κλασσικών PKCs, και κυρίως της PKC γ, στους μηχανισμούς της μνήμης έχει εδραιωθεί από τις μέχρι σήμερα μελέτες [243,356,357]. Φτωχά πειραματικά δεδομένα υπάρχουν όμως για τον ακριβή ρόλο των υπολοίπων ισοενζύμων στις μνημονικές διαδικασίες. Η εPKC ανήκει στα καινούρια ισοένζυμα της PKC [358] και η έκφρασή του έχει συνδεθεί με νευρωνική διαφοροποίηση τόσο σε μελέτες *in vitro* [359] όσο και σε μελέτες *in vivo* [360,361]. Η εPKC είναι παρούσα κυρίως στον εγκέφαλο [362,363] (αλλά επίσης βρίσκεται σε αφθονία στον μυοκαρδιακό μύ και στους πνεύμονες) και πρόσφατα, έχει προταθεί η συμμετοχή του στην κατάσταση φωσφορυλίωσης και έκφρασης της B50/GAP43, μιας πρωτεΐνης που συνδέεται με τη νευρωνική πλαστικότητα στον ιππόκαμπο των επίμυων κατά τη διάρκεια μιας δοκιμασίας σε κατάσταση φόβου.

Παρόλα τα δεδομένα ότι

1. οι κλασσικές PKC επλέκονται αποδεδειγμένα στις διαδικασίες της μνήμης, (και ειδικά στο σχηματισμό και την αποθήκευή της, με συμμετοχή του ιπποκάμπου),
2. η PKCε συναντάται σε αφθονία στον ιππόκαμπο των θηλαστικών [362] και
3. η PKCε συμμετέχει σε διαδικασίες νευρωνικής πλαστικότητας [360,361]

που προτείνουν έναν πιθανό ρόλο της εPKC στο σχηματισμό της μνήμης, δεν υπάρχουν αποδείξεις που να επιβεβαιώνουν αυτή την υπόθεση. Και αυτό πιθανότατα οφείλεται στην έλλειψη αξιόπιστων φαρμακολογικών παραγόντων, ικανών να αναστέλουν ή να ενεργοποιούν συγκεκριμένα ισοένζυμα της PKC.

3. Το Μονοξειδίο Του Αζώτου (NO)

Το αέριο μονοξειδίο του αζώτου (Nitric Oxide, NO) είναι μια ελεύθερη ρίζα που διαχέεται διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και επηρεάζει γειτονικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό έχει δράση τόσο ανάδρομου όσο και ορθόδρομου διακυτταρικού παράγοντα. Το NO δρα κυρίως μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα του - στόχου, του διαλυτού ενζύμου γουανιλική κυκλάση (guanylate cyclase, GC), το οποίο, όταν ενεργοποιείται, παράγει τον δεύτερο αγγελιοφόρο μονοφωσφορική κυκλική γουανοσίνη (cyclic-guanosine monophosphate - cGMP).

Το NO συνθέτεται ενδοκυττάρια από το αμινοξύ αργινίνη και από το οξυγόνο με τη συμβολή του ενζύμου συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NO synthase, NOS) [364] με παραγωγή κιτρουλίνης ως παραπροϊόν. Τα ένζυμα NOS καταλύουν την NADPH- και O₂-εξαρτώμενη οξειδωση της L-αργινίνης σε L-κιτρουλλίνη και NO. Η ενζυματική σύνθεση του NO είναι πολύπλοκη και εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των προσθετικών ομάδων και των συνενζύμων όπως το FAD, το FMN, η τετραυδροβιοπτερίνη και η αίμη [365]. Το NO, αφού παραχθεί, έχει έναν μεγάλο αριθμό πιθανών βιολογικών δράσεων. Οι ενδο- και εξω- αγγειακοί χρόνοι ημίσειας ζωής του NO, οι οποίοι έχουν βρεθεί ότι κυμαίνονται από 2 ms μέχρι >2 s, φαίνεται ότι εξαρτώνται από τη διαθεσιμότητα των ενδοκυττάρων αντιδραστηρίων του NO [366].

3.1. NO Συνθάση

Σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί τρεις ξεχωριστές ισομορφές της συνθάσης του NO (NOS), οι οποίες έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά και παράγουν NO με διαφορετικούς ρυθμούς [367].

Η *νευρωνική NOS* (αναφέρεται και ως NOS1 ή nNOS από την αγγλική ονομασία neuronal NOS) είναι συνεχώς παρούσα στους νευρώνες, στους σκελετικούς μύες και στα επιθηλιακά κύτταρα. Είναι και αυτή εξαρτώμενη από τα Ca²⁺ και την καλμοδουλίνη και στον εγκέφαλο ενεργοποιείται από αγωνιστές των NMDA υποδοχέων [367].

Η *επαγόμενη NOS* (αναφέρεται και ως NOS2 ή iNOS από την αγγλική ονομασία inducible NOS), αποτελεί την τελευταία μεγάλη ισομορφή η οποία έχει και τη μεγαλύτερη ικανότητα παραγωγής NO. Η ισομορφή αυτή εκφράζεται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους σαν απάντηση σε ερεθίσματα φλεγμονής όπως αυτά που προκαλούνται από ενδοτοξίνες και κυτοκίνες, π.χ ιντερλευκίνη-1 και -2, παράγοντας νέκρωσης όγκου-α, και ιντερφερόνη-γ [367,368]. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι συνεχώς παρούσα σε ορισμένους ιστούς, όπως το πνευμονικό επιθήλιο.

Η ενδοθηλιακή NOS (αναφέρεται και ως NOS3 ή eNOS από την αγγλική ονομασία endothelium NOS) παράγει τα κατώτερα επίπεδα NO και ανακαλύφθηκε αρχικά στο αγγειακό ενδοθήλιο αλλά ανευρίσκεται ακόμη και στους νευρώνες, στα επιθηλιακά κύτταρα και στα μυοκαρδιακά κύτταρα [369]. Η θέση της στο κύτταρο και η ενεργοποίησή της ρυθμίζεται από τα ιόντα ασβεστίου και την καλμοδουλίνη, καθώς και από μετά-μεταγραφικές μετατροπές όπως φωσφορυλίωση και προσθήκη μυριστούλικών ομάδων [370,371].

Τα ένζυμα NOS ρυθμίζονται από μετα - μεταγραφικές μετατροπές, από την ελεγχόμενη εντόπιση μέσα στο κύτταρο, από τη διαθεσιμότητα υποστρωμάτων και συνενζύμων και από άλλες πρωτεΐνες με τις οποίες σχηματίζουν σταθερά συμπλέγματα [367]. Ο βαθμός στον οποίο τα ρυθμιστικά αυτά χαρακτηριστικά μεταβάλλουν τις βιολογικές δράσεις του NO αποτελεί ένα ενεργό πεδίο έρευνας. Για παράδειγμα, πολλές μελέτες προτείνουν ότι εντοπιζόμενες στα μιτοχόνδρια NOS ή άλλες μορφές NOS διαδραματίζουν συγκεκριμένο ρόλο στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας [372,373].

3.2. Χημικές Ιδιότητες Του NO Που Σχετίζονται Με Τη Βιολογία Του

Μια συχνή λανθασμένη άποψη είναι ότι όλες οι ελεύθερες ρίζες είναι εξορισμού ασταθείς και συμμετέχουν εύκολα σε αντιδράσεις. Σε ό,τι αφορά το NO, είναι χημικά σταθερό και παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά αντίδρασης παρουσία διαφορετικών ελεύθερων ριζών. Βιολογικά αυτό σημαίνει, ότι η μοίρα του NO αλλάζει δραματικά σε παρουσία άλλων ελεύθερων ριζών, όπως το υπεροξειδίο [374-377].

Το NO δε φέρει ηλεκτρικό φορτίο και είναι εξαιρετικά διαλυτό σε υδροφοβικό περιβάλλον. Η ιδιότητά του αυτή ίσως επιτρέπει την ελεύθερη διάχυσή του διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών και τη δυνατότητα να σηματοδοτεί σε απόσταση πολλών κυτταρικών διαμέτρων μακριά από το σημείο παραγωγής του [378,379]. Η ιδέα ότι μια τόσο απλή δομικά, ελεύθερη ρίζα μπορεί να διαδραματίζει ρόλο μορίου δεύτερου αγγελιοφόρου είχε ως αποτέλεσμα μια μεγάλη ανατροπή στο πεδίο της κυτταρικής σηματοδότησης.

3.3. NO - Μάθηση Και Μνήμη

Από την απονομή του Βραβείου Νόμπελ στους R. Furchgott, L. Ignarro και F. Murad για την ανακάλυψη του οξειδίου του NO ως έναν από τους βιολογικούς μεσολαβητές [380-386], ένας συνεχώς αυξανόμενος όγκος δεδομένων υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο του NO στη φυσιολογία του κεντρικού νευρικού συστήματος [387-390].

Έχει αποδειχθεί ότι το NO διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της Μακροχρόνιας Ενδυνάμωσης (LTP) στον ιππόκαμπο των θηλαστικών [391] η οποία αποτελεί, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μια μορφή συναπτικής πλαστικότητας και έναν πιθανό μηχανισμό σχηματισμού της μνήμης στον ιππόκαμπο [392]. Έτσι λοιπόν, είναι ευρέως πλέον αποδεκτό

ότι το NO εμπλέκεται στους μηχανισμούς της συναπτικής πλαστικότητας [393] και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη νόσηση [394].

Πολλαπλές συμπεριφορικές μελέτες σε επίμυες αποδεικνύουν ότι ουσίες που δρουν ως αναστολείς της συνθάσης του NO αναστέλλουν τη μάθηση και/ή τη μνήμη [395-401]. Ομοίως με τη φαρμακολογική αναστολή, η γονιδιακή αναστολή της nNOS σε knockout μύες δείχνει επηρεασμένη χωρική απόδοση στον υδάτινο λαβύρινθο του Morris [402].

Αντίθετα, ουσίες που παράγουν NO (NO δότες) αναστρέφουν τα ελλείμματα μνήμης [403-408]. Ενδιαφέρουσα είναι η ανακάλυψη ότι ο δότης NO, S-νιτροσο-N-ακετυλ πενικιλλαμίνη (ή SNAP από την αγγλική ονομασία S-nitroso-N-acetyl penicillamine) επιτυχώς ανταγωνίζεται τα ελλείμματα απόδοσης που προκαλεί το MK-801 (ένας μη εκλεκτικός ανταγωνιστής των NMDA υποδοχέων) σε μια δοκιμασία χωρικής μάθησης στο μυ [400].

3.4. NO Και Ο Ρόλος Του Ως Ανάδρομος Αγγελιοφόρος

Το NO θεωρείται ότι αποτελεί αγγελιοφόρο στο, εξαρτώμενο από τους NMDA υποδοχείς, LTP. Έχει αποδειχθεί ότι το NO λειτουργεί ως ένας διακυτταρικός αγγελιοφόρος συμμετέχοντας σε έναν μεγάλο αριθμό φυσιολογικών δράσεων συμπεριλαμβανομένων της χαλάρωσης των λείων μυϊκών ινών, της αγγειοδιαστολής και της νευρομεταβίβασης [409]. Επιπρόσθετα, το NO φαίνεται ότι συμμετέχει σε κυτταροτοξικά γεγονότα όπως η καθυστερημένη, ασβεστοεξαρτώμενη, εξωκυτταροτοξική νευρωνική βλάβη που προκαλείται από την ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA στο ΚΝΣ [410,411].

Το ενδιαφέρον για το NO ως αγγελιοφόρος του ΚΝΣ που εμπλέκεται στο LTP πυροδοτήθηκε από την παρατήρηση ότι οι NMDA υποδοχείς προάγουν την ασβεστοεξαρτώμενη απελευθέρωση NO από καλλιέργειες νευρώνων της παρεγκεφαλίδας [412] και από τομές παρεγκεφαλίδας και ιππόκαμπτου [413].

Σύμφωνες με τον προτεινόμενο ρόλο του NO σαν διακυτταρικός αγγελιοφόρος, είναι οι ιδιότητές του να διαχέεται ελεύθερα, να είναι διαπερατό από τις μεμβράνες και να αντιδρά πολύ εύκολα με έναν χρόνο ημίσειας ζωής λίγων δευτερολέπτων [414]. Η σύνθεση του NO εξαρτάται από την αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου και έτσι η παραγωγή του NO θα μπορούσε να θεωρηθεί σαν αντανάκλαση της ενεργοποίησης του κυττάρου. Με βάση τις χημικές ιδιότητες του NO και των συμβάντων που απαιτούνται για την παραγωγή του LTP, ο Gally και οι συνεργάτες του [415] διατύπωσαν την υπόθεση ότι το NO θα μπορούσε να λειτουργήσει ως βασικός ρυθμιστής της συναπτικής δύναμης, βασιζόμενο σε κανόνες που απαιτούν μια συσχέτιση ανάμεσα στη μετασυναπτική εκπόλωση και στα επίπεδα του NO. Επιπρόσθετα, τοπική διάχυση του NO θα μπορούσε να βοηθήσει στο συγχρονισμό της δραστηριότητας των νευρώνων σε έναν όγκο ιστού και να μεταβάλει την αποτελεσματικότητα κάποιων συνάψεων που δεν ενεργοποιούνται άμεσα κατά την επαγωγή του LTP. Μια τέτοια

τοπική διάχυση φαίνεται να έρχεται σε αντίθεση με την συναπτική ειδικότητα του LTP [416,417], έχει όμως την ικανότητα να εξηγήσει την παρατήρηση των Bonhoeffer και συνεργατών [418] ότι οι συνάψεις μέσα σε διάστημα περίπου 150 μm μετά από μια άμεση ενεργοποιημένη σύνδεση επιδεικνύουν ενδυνάμωση που ακολουθεί την επαγωγή του LTP σε καλλιέργειες τομών ιππόκαμπου. Εάν, ένας ελεύθερα διαπερατός, ανάδρομος αγγελιοφόρος εμπλέκεται στο LTP, είναι ίσως αναμενόμενο ότι μερικές μη ενεργοποιημένες συνάψεις θα επιδείξουν ενδυνάμωση εξαρτώμενη από την απόσταση στην οποία διαχέεται ο αγγελιοφόρος.

3.5. Ο Ρόλος Του NO Στο LTP

Στο τέλος του 1991 και στις αρχές του 1992, τέσσερις ομάδες παρουσίασαν δεδομένα τα οποία συμφωνούν με τον ρόλο του NO στην παραγωγή του LTP στην περιοχή CA1 του ιππόκαμπου [398,419,420]. Τα δεδομένα αυτά στηρίζονταν στις παρατηρήσεις πρώτον, ότι οι αναστολείς της NOS (όπως το L-NMMA και το L-NOArg), αναστέλλουν την επαγωγή του LTP αλλά δεν αναστρέφουν το εγκατεστημένο LTP, δεύτερον, ότι η αιμοσφαιρίνη η οποία συνδέει το NO, μπλοκάρει το LTP όταν χορηγείται εξωκυττάρια πριν από τα συνεχόμενα ερεθίσματα ενώ τη δράση της αυτή δεν την μιμείται η μεθαιμοσφαιρίνη, ένας παράγοντα που είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματικός στη σύνδεση με το NO σε σχέση με την αιμοσφαιρίνη και τρίτον, ότι η εφαρμογή του NO παράγει μια APV-μη ευαίσθητη αύξηση στη συχνότητα των αυθόρμητωνελαχίστων διεγερτικών μετασυναπτικών ρευμάτων (miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSCs) σε καλλιέργειες από νευρώνες ιππόκαμπου [393], δράση σύμφωνη με μια προσυναπτική ενίσχυση της απελευθέρωσης του μεταφορέα.

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις προκύπτουν τα ακόλουθα που ενισχύουν τον πιθανό ρόλο του NO ως ανάδρομου αγγελιοφόρου στο LTP της περιοχής CA1: Πρώτον, ο αποκλεισμός του LTP από την αιμοσφαιρίνη προτείνει ότι το NO πρέπει να απελευθερώνεται εξωκυττάρια για να εκδηλώνει τις δράσεις του καθώς η αιμοσφαιρίνη περιορίζεται στον εξωκυττάριο χώρο [398,420]. Δεύτερον, οι αναστολείς της NOS μπλοκάρουν το LTP σε μεμονωμένους νευρώνες όταν εγχύονται στο μετασυναπτικό κύτταρο [393,398]. Αυτό προτείνει ότι το NO που απαιτείται για το LTP σχηματίζεται στους μετασυναπτικούς νευρώνες. Παρόλα αυτά, οι μελέτες αυτές θα πρέπει να αναλύονται με προσοχή καθώς οι αναστολείς της NOS είναι μεμβρανοδιαπερατοί και μπορούν να εκδηλώνουν τις δράσεις τους σε κύτταρα στο τοπικό περιβάλλον. Τρίτον, η ικανότητα του NO να αυξάνει τη συχνότητα των mEPSCs είναι σύμφωνη με την προσυναπτική θέση δράσης του [393].

Στο παρελθόν η αναστολή του LTP από τους αναστολείς της συνθάσης του NO είχε ερμηνευθεί ότι αντανάκλα την απώλεια της σηματοδοτικής οδού του NO κατά τη διάρκεια της επαγωγής του LTP, το οποίο παράγεται όταν ενεργοποιούνται οι NMDA υποδοχείς [421]. Παρόλα αυτά, σήμερα υπάρχουν δεδομένα σύμφωνα με τα οποία το LTP θα μπορούσε να ανασταλεί με τη χορήγηση ενός αναστολέα της συνθάσης του NO, 5 min μετά τη σειρά

ερεθισμάτων, ενώ σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Haley και συνεργατών (1992), η ίδια φαρμακολογική χορήγηση καθυστερημένη έως 15 min μετά τη σειρά των ερεθισμάτων ήταν αναποτελεσματική στην αναστολή του LTP. Αυτό αποδεικνύει ότι είναι απαραίτητη η τονική δραστηριότητα της συνθάσης του NO για το LTP και ακόμη, ότι υπάρχει ένα χρονικό παράθυρο ≤ 15 min μετά τη σειρά των ερεθισμάτων, όταν αυτό απαιτείται. Το ενδογενές NO στην περίοδο προ της σειράς των ερεθισμάτων θεωρείται επίσης σημαντικό. Η αναστολή του LTP με την παρεμπόδιση της σύνθεσης του NO μετά τη σειρά των ερεθισμάτων μπορεί να υποδεικνύει ότι μόνο το τονικό NO απαιτείται για το LTP. Παρόλα αυτά, υπάρχουν αποδείξεις για αυξημένη απελευθέρωση του NO μετά την ενεργοποίηση με μια σειρά ερεθισμάτων [422], και ακόμη ότι μια υψηλότερη συγκέντρωση NO απαιτείται για να διευκολύνει το LTP από ότι για να διατηρηθεί το τονικό NO σε ενεργά επίπεδα. Ακόμη, σε μερικές μελέτες, η αναστολή της συνθάσης του NO έχει βρεθεί ότι μειώνει το πρώιμο LTP κατά τη διάρκεια των πρώτων 20 min μετά τη σειρά των ερεθισμάτων. Η συμβολή του NO στο πρώιμο LTP στην περιοχή CA1 του ιππόκαμπου επίμυων φαίνεται ότι είναι μεγαλύτερη σε χαμηλές θερμοκρασίες (22–24°C) [398,421] από ότι σε θερμοκρασίες 30–32°C [422-424], υποδεικνύοντας ότι το πρώιμο LTP μπορεί να είναι ένα μείγμα από NO-ανεξάρτητες και NO-εξαρτημένες διαδικασίες και ότι ο NO-εξαρτημένος παράγοντας ίσως είναι «μασκαρεμένος», ένα αποτέλεσμα - «ταβάνι» υπαγορευόμενο από τον NO-ανεξάρτητο παράγοντα σε πιο φυσιολογικές θερμοκρασίες. Έτσι, μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι το LTP απαιτεί τόσο ένα τονικό επίπεδο NO όσο και ένα φασικό NO σήμα που προκύπτει από την ενεργοποίηση από τη σειρά των ερεθισμάτων.

Πιθανοί Μηχανισμοί

Η σηματοδοτική οδός του NO στις περισσότερες μορφές συναπτικής πλαστικότητας συντελείται μέσω της ενεργοποίησης του συνδεδεμένου με G πρωτεΐνης υποδοχέα για το NO ($\text{NO}_{\text{GC}}\text{R}$), που οδηγεί στη συσσώρευση cGMP [421,425].

Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η χορήγηση ενός ανταγωνιστή των $\text{NO}_{\text{GC}}\text{R}$, όπως ο ODQ, καταργεί το δυναμικό που παράγεται από τον συνδυασμό του NO με μια σειρά ερεθισμάτων, γεγονός που θέτει την υπόνοια ενός cGMP εξαρτώμενου μηχανισμού. Δεν μπορεί όμως να διαχωρίσει εάν αυτή η οδός συνδέεται με το εξωγενές NO, με το ενδογενές NO, ή και με τα δύο. Υπέρ της πρώτης πιθανότητας είναι δεδομένα που δείχνουν ότι εξωγενή παράγωγα του cGMP μπορούν, όπως και το NO, να παράγουν μια διαρκή ενδυνάμωση της ιπποκάμπειας συναπτικής μετάδοσης εάν συνδυασθούν με μια σειρά ερεθισμάτων [426,427]. Υπέρ της δεύτερης πιθανότητας είναι τα ευρήματα [391] ότι η χορήγηση του ανταγωνιστή των $\text{NO}_{\text{GC}}\text{R}$, ODQ, μετά από τη σειρά των ερεθισμάτων μιμείται το ανασταλτικό στο LTP αποτέλεσμα του L-NIO (ενός μη εκλεκτικού αναστολέα της συνθάσης του NO), όταν και αυτός χορηγείται μετά το ερέθισμα. Συμπερασματικά, τόσο η φασική όσο και η τονική μετάδοση του σήματος από το NO είναι δυνατόν να συντελείται μέσω της οδού $\text{NO}_{\text{GC}}\text{R}$ -cGMP. Σε συμφωνία

με αυτή την πιθανότητα, η συνεχής χορήγηση με ένα ανάλογο του cGMP βρέθηκε ότι αναστρέφει το αποτέλεσμα της αναστολής της συνθάσης του NO στο ιπποκάμπιο LTP [420].

Με σεβασμό στη φασική συνιστώσα, υπάρχουν απευθείας δεδομένα από καλλιέργειες ιπποκάμπου ότι το NO μπορεί να ενδυναμώσει τη συναπτική μετάδοση μέσω ενός προσυναπτικού μηχανισμού που συμπεριλαμβάνει το cGMP και την cGMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση [428]. Την ίδια στιγμή, δεδομένα από τομές ιπποκάμπου, δείχνουν ότι το NO μπορεί να δράσει μετασυναπτικά για να ενδυναμώσει τη νευρομεταβίβαση [424] και ότι η εμπλοκή του αυτή στο όψιμο LTP πραγματοποιείται από την cGMP-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα CREB στους μετασυναπτικούς νευρώνες [429]. Ακόμη, σύμφωνα με την μετασυναπτική θέση δράσης είναι και δεδομένα από *in situ* υβριδισμό από τα οποία προκύπτει ότι ο επικρατητικός υπότυπος του NO_{GC}R που εκφράζεται σε ιπποκάμπειους πυραμιδικούς νευρώνες είναι η α2β1 ισομορφή [430], και αυτή η ισομορφή σχετίζεται με την μετασυναπτική πρωτεΐνη density-95 [431], προσφέροντας το απαραίτητο υπόστρωμα για να δράσει το NO μετασυναπτικά μέσω του cGMP. Έτσι, αν η προσυναπτική δράση μπορεί να ευθύνεται για την οξεία αύξηση της συναπτικής δυνατότητας, η μετασυναπτική δράση μπορεί να συντελεί τις μακροπρόθεσμες αλλαγές.

Η συναπτική πλαστικότητα θεωρείται ευρέως ότι σχετίζεται με τη μάθηση και το σχηματισμό της μνήμης. Εάν αυτό ισχύει και εάν το τονικό NO είναι απαραίτητο για ορισμένους τύπους πλαστικότητας, η διαταραχή της σηματοδοτικής οδού του NO πέραν της φάσης της απόκτησης των πληροφοριών, θα πρέπει να διαταράσσει ορισμένους τύπους μνήμης. Συμπεριφορικές μελέτες σε ποικίλα είδη, συμπεριλαμβανομένων επίμυων [432], μυών [433], πτηνών [434], και θαλάσσιων σαλιγκαριών [435], έδειξαν ότι η παρεμβολή στη σηματοδότηση του NO και/ή του cGMP μετά την ολοκλήρωση της περιόδου εκπαίδευσης διαταράσσει το σχηματισμό της μνήμης.

Το χρονικό παράθυρο που η σηματοδοτική οδός του NO–cGMP απαιτεί για το σχηματισμό της μνήμης είναι μακρύ (5 ώρες μετά την εκπαίδευση) σε ένα θαλάσσιο σαλιγκάρι [435] αλλά είναι βραχύτερο στους επίμυες, στους οποίους η ενδοϊπποκάμπια έγχυση του L-NOArg προκαλεί αμνησία όταν χορηγείται αμέσως μετά την δοκιμασία εκπαίδευσης αλλά όχι όταν χορηγείται 60 αργότερα [432]. Στο ίδιο μοντέλο, η ιπποκάμπια εφαρμογή ενός αναλόγου του cGMP αμέσως μετά την εκπαίδευση, αλλά όχι 180 min αργότερα, αυξάνει τη διάρκεια της μνήμης [391,436,437].

3.6. Μολσιδομίνη

Η μολσιδομίνη αποτελεί ένα πρόδρομο φάρμακο για το σχηματισμού του NO. Μεταβολίζεται στο ήπαρ στον ενεργό μεταβολίτη της, SIN-1. Ο τελευταίος, είναι μια ασταθής ένωση που απελευθερώνει NO καθώς αποδομείται. Λόγω της απελευθέρωσης του NO η μολσιδομίνη χρησιμοποιείται ευρέως ως αγγειοδιασταλτικό.

Η φαρμακοκινητική της μολσιδομίνης χαρακτηρίζεται από ταχεία απορρόφηση και υδρόλυση, ενώ χρειάζεται λίγο χρόνο για την επίτευξη της μέγιστης συστηματικής συγκέντρωσης του ενεργού μεταβολίτη της, SIN-1. Ο χρόνος που χρειάζεται για την επίτευξη της μέγιστης συγκέντρωσης στο πλάσμα (t_{max}) είναι 1 με 2 ώρες. Ο χρόνος ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) του SIN-1 είναι 1 με 2 ώρες. Το 90% της μολσιδομίνης που δεν μεταβολίζεται απεκκρίνεται από τους νεφρούς ενώ η σύνδεσή της με τις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι πολύ χαμηλή (3 με 11%) [438].

Η μολσιδομίνη, λόγω της απελευθέρωσης του NO και της ταχείας σχετικά δράσης της, χρησιμοποιείται ευρέως ως αγγειοδιασταλτικό και βρίσκει κύρια χρήση στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της στεφανιαίας νόσου. Μια ακόμη σημαντική εφαρμογή της ικανότητας της μολσιδομίνης να απελευθερώνει NO, είναι η χρήση της σε συμπεριφορικές μελέτες όπου διερευνάται η εμπλοκή του NO στους μηχανισμούς μάθησης και μνήμης. Έχει αποδειχθεί ότι η μολσιδομίνη μπορεί να αναστρέφει τα ελλείμματα μνήμης σε επίμυες που προκαλεί ο αναστολέας της NOS, L-NAME, τόσο κατά τη φάση της απόκτησης όσο και κατά τη φάση της ανάκλησης των πληροφοριών [401], σε μια δοκιμασία αναγνωριστικής μνήμης αλλά και σε μια δοκιμασία χωρικής μνήμης [404,439]. Ακόμη, η μολσιδομίνη φαίνεται να ανταγωνίζεται τα συμπεριφορικά ελλείμματα που προκαλεί ο αγωνιστής των 5-HT_{1A} υποδοχέων, 8-OH-DPAT στους επίμυες στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου [440]. Ακόμη, η αρνητική επίδραση της σκοπολαμίνης στην αναγνωριστική [405] αλλά και στη χωρική μνήμη [404] των επίμυων μπορεί να αναστραφεί από τη μολσιδομίνη.

3.7. Το MK-801 - Εκλεκτικός Ανταγωνιστής Των NMDA Υποδοχέων

Η διζοκιλίνη (Dizocilpine) ή πιο γνωστή ως MK-801 (5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine), είναι ένας ανταγωνιστής του συμπλόκου του NMDA υποδοχέα του γλουταμικού και εμπλέκεται σε πολλές λειτουργίες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Το φάρμακο επιδεικνύει μια ποικιλία δράσεων όπως αναισθητικές και αντιεπιληπτικές ιδιότητες. Ακόμη, έχει ένα ευρύ φάσμα δράσεων στη συμπεριφορά των τρωκτικών, που συμπεριλαμβάνουν ελλείμματα στη λειτουργική τους μνήμη [441-443], και ένα φάσμα ψυχωσικών αντιδράσεων όπως υπερκινητικότητα [442-444], στερεοτυπίες και αταξία [442,443,445].

Ο μηχανισμός δράσης του MK-801 πραγματοποιείται μέσω της σύνδεσής του στο εσωτερικό του ιοντικού διαύλου του NMDA υποδοχέα, παρεμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό την εισροή των ιόντων, συμπεριλαμβανομένων και των ιόντων ασβεστίου, διαμέσου του διαύλου και εμποδίζοντας την περαιτέρω εκπόλωση του κυττάρου. Το MK-801 φράζει τους υποδοχείς NMDA με έναν χρηστικό- και ηλεκτροεξαρτώμενο τρόπο, καθώς απαιτείται η διάνοιξη του διαύλου για να μπορέσει το φάρμακο να συνδεθεί στο εσωτερικό του.

Η γλουταμινεργική νευρομεταβίβαση διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο σε πολλά συμπεριφορικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένων της κινητικής δραστηριότητας, της μάθησης και της μνήμης. Έχει αποδειχθεί ότι ο ανταγωνιστής των NMDA υποδοχέων του γλουταμικού MK-801, αυξάνει την κινητικότητα, προκαλεί διαταραχές στη συνέργεια των κινήσεων και επηρεάζει αρνητικά τη μάθηση και τη μνήμη σε ποικίλες συμπεριφορικές δοκιμασίες σε επίμυες και μύες.

Η χορήγηση του MK-801 σε επίμυες προκαλεί ένα χαρακτηριστικό συμπεριφορικό ψυχοσεωμιμητικό σύνδρομο με αταξία, στερεοτυπίες και υπερκινητικότητα. Μέρος του συνδρόμου αυτού θεωρείται ότι σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη γλουταμινεργική και τη δοπαμινεργική νευρομεταβίβαση [446]. Ακόμη, έχει προταθεί και η εμπλοκή της σεροτονίνης καθώς χορήγηση αγωνιστών των υποδοχέων της σεροτονίνης μπορεί να αναστρέψει τόσο τα ελλείμματα μνήμης όσο και την υπερκινητικότητα και την αταξία που προκαλεί η χορήγηση του MK-801 σε επίμυες [443]. Ακόμη, έχει την ικανότητα να αναστείλει την επαγωγή του LTP [447].

Τα αποτελέσματα επίσης από τις μελέτες αυτές έδειξαν ότι οι παραπάνω δράσεις στην κινητικότητα και τη μνήμη, μπορούν να διαχωριστούν. Αποδείχθηκε ότι μετά την πάροδο συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος από τη χορήγηση χαμηλών δόσεων MK-801, σε επίμυες, παρατηρείται αναστροφή του ψυχομιμητικού συνδρόμου ενώ η μνημονική ικανότητά τους παραμένει επηρεασμένη [441,442].

Όπως προαναφέρθηκε, τόσο το γλουταμικό όσο και το NO εμπλέκονται ισχυρά στις διαδικασίες της μάθησης και της μνήμης. Επομένως, έχει ενδιαφέρον η διερεύνηση της σχέσης των ανταγωνιστών των υποδοχέων του γλουταμικού με το NO στη συμπεριφορά και τη μνημονική ικανότητα των θηλαστικών. Για το λόγο αυτό, στη διεθνή βιβλιογραφία συναντάμε μια μεγάλη ποικιλία από μελέτες που διαπραγματεύονται την αλληλεπίδραση ουσιών που εμποδίζουν τη γλουταμινεργική μεταβίβαση και ουσιών που δρουν ως δότες NO.

Στην παρούσα μελέτη έγινε μια προσπάθεια προς την κατεύθυνση αυτή χρησιμοποιώντας το δότη του NO, μολσιδομίνη για την αναστροφή των ελλειμμάτων μνήμης που προκαλεί σε επίμυες η χορήγηση του MK-801 στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

II. Ειδικό Μέρος

B. Μεθοδολογία

4. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν αρρενες επίμυες του γένους Wistar, ηλικίας 3 μηνών (Εικόνα 28). Οι επίμυες που έλαβαν μέρος στις συμπεριφορικές δοκιμασίες προέρχονταν από το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ στην Αθήνα ενώ οι επίμυες που χρησιμοποιήθηκαν για τις μοριακές τεχνικές προέρχονταν από το Κέντρο Πειραματικής Χειρουργικής – Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ινστιτούτου Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών . Το βάρος όλων των ζώων κυμαίνονταν μεταξύ των 250-300 g. Οι επίμυες διέμεναν σε κλωβούς Makrolon με διαστάσεις 45 cm μήκοςΧ35 cm ύψοςΧ20 cm πλάτος, τρία ζώα σε κάθε κλωβό, με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Ο κύκλος ημέρας-νύκτας ήταν 12 ώρες (τα φώτα άναβαν στις 07:00 το πρωί), με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (21 ± 1 °C) και σχετικής υγρασίας (50–55%).



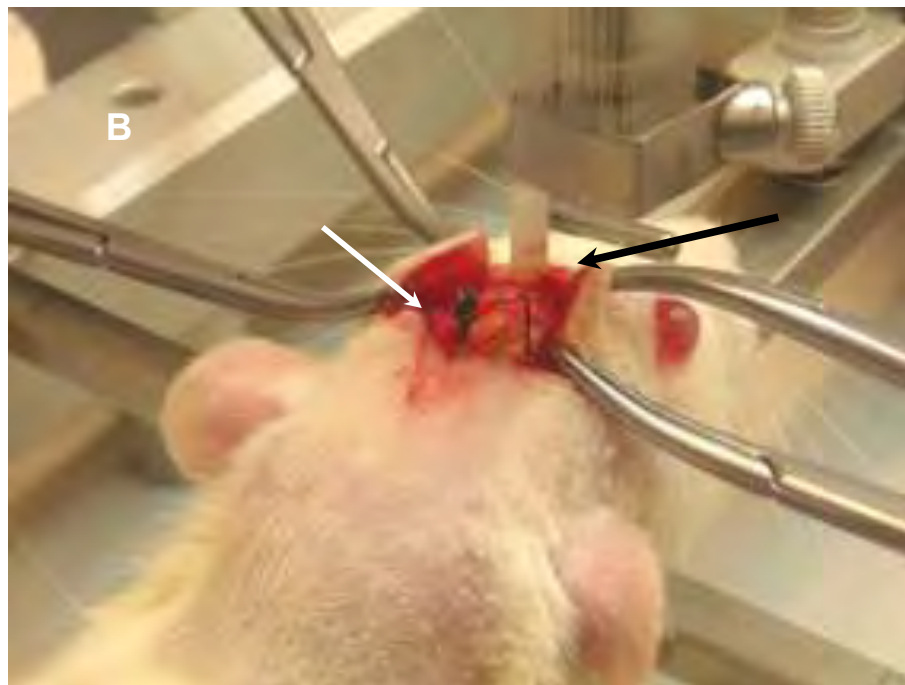
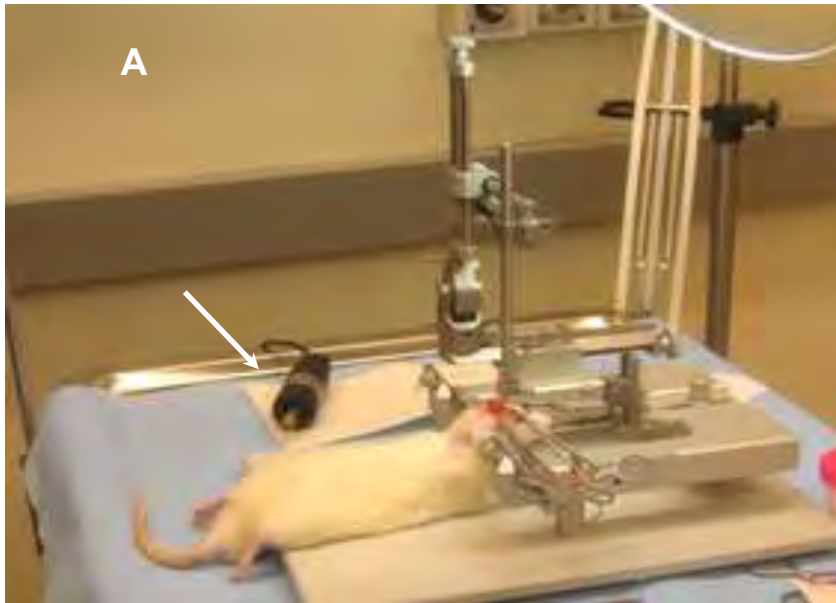
Εικόνα 28. Επίμυς γένους Wistar.

Οι διαδικασίες που αφορούσαν τα ζώα και τη φροντίδα τους έγιναν σύμφωνα με τα διεθνή πρωτόκολλα και σε συμφωνία με τους εθνικούς και διεθνείς νόμους και στρατηγικές (EEC Council Directive 86/609, JL 358, 1, 12 December 1987; NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication no. 85-23, 1985). Στην Ελλάδα, τα πειραματόζωα προστατεύονται από το Προεδρικό Διάταγμα 160/1991 που εναρμονίζει την εθνική μας νομοθεσία με την κοινοτική οδηγία 1986/609 και τον νόμο 2015/2001, ο οποίος ενσωματώνει στο εθνικό δίκαιο την Σύμβαση του Συμβουλίου της Ευρώπης για τα σπονδυλωτά ζώα που χρησιμοποιούνται για ερευνητικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς.

5. Χειρουργικές Τεχνικές

Εμφύτευση ενδοϊπποκάμπειων μικροσωληνίσκων

Η εμφύτευση ενδοϊπποκάμπειων μικροσωληνίσκων (ενδοϊπποκάμπειες κάνουλες) έγινε με στερεοτακτική χειρουργική σύμφωνα με τις διαδικασίες για άσηπτη χειρουργική επιβίωση των πειραματοζώων [448]. Οι επίμυες αναισθητοποιήθηκαν με κεταμίνη (100 mg/kg, ενδομυϊκή χορήγηση), ενώ το επίπεδο της αναισθησίας πριν και κατά την χειρουργική διαδικασία ήταν σε συνεχή παρακολούθηση με έλεγχο της αναπνευστικής λειτουργίας και της καταστολής των αντανακλαστικών. Οι επίμυες τοποθετήθηκαν σε στερεοτάκτορα (Lab Standard™ Stereotaxic Instrument, Stoelting) σύμφωνα με συγκεκριμένες συντεταγμένες (Εικόνα 29A) και αρχικά έγινε τομή του δέρματος κατά μήκος της μέσης γραμμής για την αποκάλυψη του κρανίου. Με ειδικό τρυπάνι μικροχειρουργικής διανοίχθηκαν αμφοτερόπλευρα οπές διαμέτρου 0.9 mm. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν αμφοτερόπλευρα κάνουλες οδηγού από ανοξείδωτο χάλυβα διαμέτρου 26 gauge (C315G, Plastics One Inc., USA) άνωθεν της λειτουργικής περιοχής του πρόσθιου ιπποκάμπου [449-451] (Εικόνα 29B). Οι συντεταγμένες επιλέχθηκαν με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία και σύμφωνα με τις στερεοταξικές συντεταγμένες από τον στερεοτακτικό άτλαντα ανατομίας εγκεφάλου των επίμυων των Paxinos και Watson [452] (-3.8 mm όπισθεν του βρέγματος, ± 1.5 mm πλαγίως της επιμήκους ραφής και -2.5 mm κοιλιακά από την επιφάνεια του κρανίου) (Εικόνα 30). Η κάνουλα οδηγός σταθεροποιήθηκε στην επιφάνεια του κρανίου με τρεις βίδες και οδοντιατρικό τσιμέντο. Για την αποφυγή απόφραξης της κάνουλας οδηγού, τοποθετήθηκε εντός της, σπιλέτο – φραγής από ανοξείδωτο χάλυβα, διαμέτρου 33 gauge (C315DC, Plastics One Inc., USA) το οποίο φέρει πλαστικό κάλυμα. Τοπικά στην περιοχή της τομής εφαρμόστηκε αντιβιοτική αγωγή για την αποφυγή λοιμώξεων. Μετά τη χειρουργική επέμβαση τοποθέτησης της κάνουλας, κάθε ζώο τοποθετήθηκε σε κλωβό μεταφοράς και παρέμεινε για ανάνηψη κάτω από μια λάμπα θέρμανσης ενώ οι ζωτικές του λειτουργίες ήταν συνεχώς υπό παρακολούθηση. Μετά την ανάνηψη τα ζώα επέστρεψαν στο ζωοτροφείο. Οι επίμυες έλαβαν μετεγχειρητική αναλγησία με βουπρενοφίνη (buprenorphine), 0.25mg/kg ενδομυϊκώς, για 24 ώρες ενώ συνέχιζαν καθημερινά να βρίσκονται υπό παρακολούθηση για συμπτώματα μετεγχειρητικού πόνου και στρες π.χ. επιφωνήματα πόνου, επιθετικότητα, ανήσυχη συμπεριφορά, εργώδης αναπνοή, ταχυκαρδία. Μετά τη χειρουργική επέμβαση, τα ζώα παρέμειναν προς ανάρρωση για δύο 24ωρα πριν από τους χειρισμούς εξοικείωσης (handling). Την πέμπτη μετεγχειρητική ημέρα τα ζώα παρουσιάζουν πλήρη ανάρρωση, με φυσιολογική κινητικότητα, συμπεριφορά και πρόσληψη τροφής και νερού (Εικόνα 31).

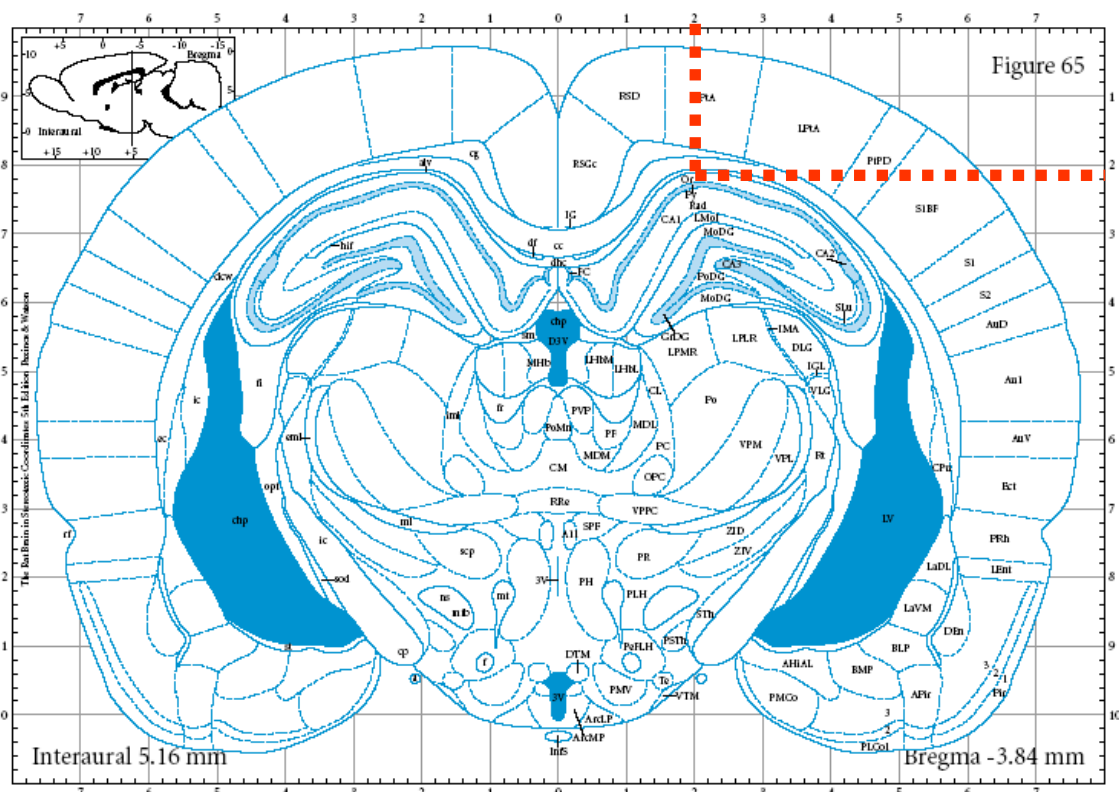


29. Στερεοτακτική χειρουργική για τοποθέτηση ενδοϊπποκάμπειου μικροσωληνίσκου (κάνουλα).

A. Στερεοτακτική συσκευή για την πρόσβαση σε συγκεκριμένες ανατομικές περιοχές του εγκεφάλου μικρών ζώων (μυών, επίμυων). Τοποθέτηση επίμυα στον στερεοτάκτορα. (Λευκό βέλος: τρυπάνι μικροχειρουργικής)

B. Εμφύτευση μικροσωληνίσκου στην περιοχή του ιπποκάμπου όπου διακρίνονται μια εκ των τριών βιδών που χρησιμοποιούνται για τη στήριξη του μικροσωληνίσκου. (Μαύρο βέλος: μικροσωληνίσκος, λευκό βέλος: βίδα στήριξης).

(Κέντρο Πειραματικής Χειρουργικής-Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών)



Εικόνα 30. Συντεταγμένες τοποθέτησης μικροσωληνίσκου στην περιοχή του πρόσθιου ιππόκαμπτου επίμυα.

Συντεταγμένες τοποθέτησης των μικροσωληνίσκων στον ιππόκαμπο επίμυα Wistar, βάρους περίπου 300 gr, σύμφωνα με τον άτλαντα χαρτογράφησης του εγκεφάλου του επίμυα των Paxinos & Watson (5th edition). Οι συντεταγμένες που επιλέχθηκαν είναι: 3.8 mm όπισθεν του βρέγματος, 1.5 mm εκατέρωθεν της επιμήρους ραφής και 2.5 mm κοιλιακά από την επιφάνεια του κρανίου (AP: -3.8, L: \pm 1.5, V: -2.5) και αντιστοιχούν στην λειτουργική περιοχή του πρόσθιου ιππόκαμπτου, μια περιοχή σημαντική στο σχηματισμό της μνήμης στα θηλαστικά.

(Τροποποιημένο από Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates (5th ed.)*. San Diego, CA: Academic Press)

Ενδοϊπποκάμπεια έγχυση φαρμακολογικών παραγόντων

Δύο ημέρες μετά από το χειρουργείο, τα πειραματόζωα υποβάλλονταν καθημερινά σε χειρισμούς εξοικείωσης για 6 λεπτά περίπου. Κατά τη διάρκεια της εξοικείωσης, το σιλέτο φραγής της κάνουλας – οδηγού αφαιρούνταν και επανατοποθετούνταν δύο με τρεις φορές ημερησίως.

Η έγχυση των φαρμακολογικών παραγόντων πραγματοποιήθηκε πέντε ημέρες μετά το χειρουργείο. Την ημέρα της έγχυσης, τα σιλέτα φραγής αφαιρέθηκαν και αντικαταστάθηκαν αμφοτερόπλευρα από κάνουλες έγχυσης από ανοξείδωτο χάλυβα διαμέτρου 33 gauge (C315I, Plastics One Inc., USA) οι οποίες εξείχαν 1.0 mm από την κάνουλα – οδηγό και ήταν

συνδεδεμένες σε σύριγγα Hamilton 5 μl μέσω σωλήνα πολυαιθυλενίου 40 cm (PE50, Plastics One Inc., USA) που επέτρεπε την ελεύθερη κίνηση του επίμυα. Τα πειραματόζωα έλαβαν συνολικό όγκο 3 μl σε κάθε ημισφαίριο με αργό ρυθμό έγχυσης. Το ένα ημισφαίριο χρησίμευε πάντοτε ως μάρτυρας ενώ το έτερο ημισφαίριο ελάμβανε τον φαρμακολογικό παράγοντα. Η επιλογή του ημισφαιρίου που θα ελάμβανε τη δραστική ουσία ήταν τυχαία. Μετά την έγχυση ακολούθησε διάστημα 2 λεπτών περίπου πριν από την αφαίρεση της κάνουλας έγχυσης και την επανατοποθέτηση της κάνουλας φραγής ώστε να επιτευχθεί επαρκής διάχυση του φαρμάκου στους προς μελέτη ιστούς. Σε διάστημα 20 λεπτών μετά την ενδοϊπποκάμπεια έγχυση, τα ζώα υπέστησαν ακαριαία θανάτωση με τη χρήση λαιμητόμου και οι εγκέφαλοι εξαιρέθηκαν άμεσα προς περαιτέρω μελέτη.



Εικόνα 31. Τοποθέτηση ενδοϊπποκάμπειας κάνουλας σε επίμυ Wistar.

Επίμυς με ενδοϊπποκάμπεια εμφύτευση μικροσωληνίσκου (κάνουλα) πέντε ημέρες μετά την επέμβαση. Ο επίμυας έχει αναρρώσει πλήρως και παρουσιάζει φυσιολογική κινητικότητα και συμπεριφορά.

(Κέντρο Πειραματικής Χειρουργικής - Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών)

6. Προσδιορισμός Των Ισομορφών Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Και Περαιτέρω Έλεγχος Της Ενεργοποίησης Των Ισομορφών Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Στον Ιππόκαμπο Επίμυα Μετά Την Ενδοϊπποκάμπεια Έγχυση Του Μη Εκλεκτικού Ενεργοποιητή Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C, PMA.

Ο προσδιορισμός των ισομορφών της Πρωτεϊνικής Κινάσης C στον ιππόκαμπο επίμυα έγινε με τη βοήθεια της τεχνικής της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western (Western blot) καθώς και με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο Στρεπταβινίνης-Υπεροξειδάσης (Streptavidin-Horseradish Peroxidase, SA-HRP) ενώ χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των ισομορφών της PKC (α, β, γ και ε).

Το 4β-phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ή αλλιώς γνωστό ως 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) είναι ένας διεστερικός εστέρας που ομοιάζει χημικά με την διαγλυκερόλη (DAG) που αποτελεί έναν φυσικό ενεργοποιητή των ισομορφών της PKC στο κύτταρο. Το PMA χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία ως ένας μη εκλεκτικός ενεργοποιητής των ισομορφών της Πρωτεϊνικής Κινάσης C και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία προκαλεί την μετακίνηση των ενεργοποιημένων PKCs από το κυτταροπλασματικό προς τα μεμβρανικά τμήματα του κυττάρου [453-454].

Ο έλεγχος της ενεργοποίησης των ισομορφών της Πρωτεϊνικής Κινάσης C στον ιππόκαμπο του επίμυα μετά την ενδοϊπποκάμπεια έγχυση του μη εκλεκτικού ενεργοποιητή της Πρωτεϊνικής Κινάσης C, PMA, έγινε με τη βοήθεια της τεχνικής της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western blot) καθώς και με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο Στρεπταβινίνης-Υπεροξειδάσης (Streptavidin-Horseradish Peroxidase, SA-HRP) ενώ χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των ισομορφών της PKC (α, β, γ και ε) καθώς και αντισώματα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι της κινάσης (p-Erk 1/2 και total Erk) αλλά και πρωτεϊνών που αποτελούν υποστρώματα της ενεργοποιημένης PKC, όπως η φωσφορυλιωμένη MARCKS (p-MARCKS).

6.1. Βιοχημικές Τεχνικές – Προετοιμασία Ιστού Για SDS-PAGE Και Ανοσοαποτύπωση Κατά Western

Τεχνική ομογενοποίησης ιστών – διαχωρισμός ομογενοποιημένου ιπποκάμπειου ιστού με τη μέθοδο της υποκυτταρικής κλασμάτωσης σε κυτταροπλασματικό και μεμβρανικό εκχύλισμα. (subcellular fractionation)

Η τεχνική του υποκυτταρικού διαχωρισμού των κυτταρικών δομών χρησιμοποιείται συχνά για την ταυτοποίηση ενεργοποιημένης μορφής ενδοκυτταρικών μορίων [455-457]. Ο ιστός ιπποκάμπου μετά την απομόνωσή του, τοποθετήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Lysis Buffer) το οποίο περιείχε [20mM Tris-HCl (Sigma), 2mM Ethylene Glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-n-NN,N-TetraAcetic acid (EGTA) (Sigma), pH 7.5, 100ug/ml

PhenylMethylSulfonylFluoride (PMSF), 5mM Dithiothreitol (DTT), 5 mM NaF, 1mM Orthovanadate, 2ug/ml aprotinin, και 10ug/ml leupeptin].

Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν αρχικά με τη βοήθεια υπερήχων και η όλη διαδικασία έλαβε χώρα σε θερμοκρασία 4C°. Το αρχικό αυτό ομογενοποίημα αντανακλά το συνολικό πρωτεϊνικό κλάσμα του ιστού. Στη συνέχεια τα ομογενοποιημένα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 1 ώρα σε 100 000 g, σε θερμοκρασία 4C°. Από το προϊόν της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο εκχύλισμα αντιστοιχεί στο κυτταροπλασματικό κλάσμα ενώ το ίζημα αντιστοιχεί στο ολικό μεμβρανικό κλάσμα. Το τελευταίο επαναδιαλύεται στο αρχικό ρυθμιστικό διάλυμα λύσης με επιπλέον προσθήκη 1% Triton X. Προκύπτουν επομένως συνολικά τρία πρωτεϊνικά κλάσματα: ολικό πρωτεϊνικό κλάσμα (total protein-t), κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό κλάσμα (soluble fraction-s) και μεμβρανικό πρωτεϊνικό κλάσμα (membrane fraction-m) (Εικόνα 32).

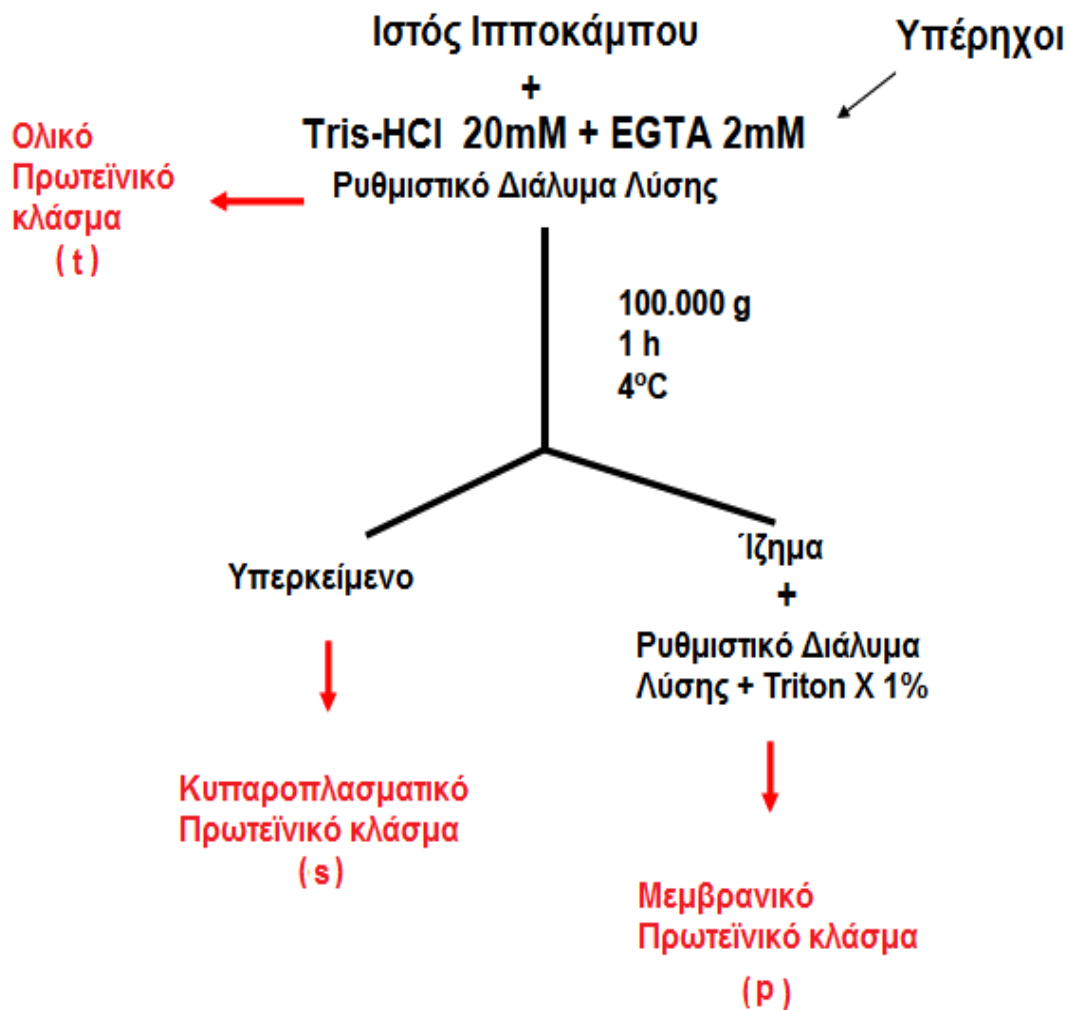
Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών του ομογενοποιημένου, το οποίο προκύπτει κατά τη διαδικασία λήψης του ολικού, μεμβρανικού και κυτταροπλασματικού παρασκευάσματος του ιπποκάμπου, προσδιορίσθηκε με τη μέθοδο Lowry (Lowry, 1951) [458]. Η αρχή της μεθόδου αυτής βασίζεται στην αντίδραση των νιτρεργικών ομάδων των πεπτιδίων με τα δισθενή ιόντα χαλκού υπό αλκαλικές συνθήκες και την επακόλουθη αναγωγή του Folin – Ciocalteay phosphomolybdicphosphotungstic acid σε κυανό του ετεροπολυμολυβδενίου (heteropolymolybdenum blue) μέσω της οξειδωσης των αρωματικών οξέων με την καταλυτική δράση του χαλκού.

Η ποσότητα της πρωτεΐνης στα δείγματα ιπποκάμπου υπολογίστηκε με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης η οποία προκύπτει από την ταυτόχρονη μέτρηση των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης B.S.A.(0, 10, 25 και 50 µg). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε µg πρωτεΐνης ανά ml διαλύματος.

6.1.1. SDS-mPAGE - Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες είναι φορτισμένες θετικά ή αρνητικά εξαιτίας των θετικά ή αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων τους. Όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο μετακινούνται προς τον θετικό ή αρνητικό πόλο ανάλογα με το φορτίο τους. Ο βαθμός μετακίνησης τους εξαρτάται από την πυκνότητα του φορτίου της κάθε πρωτεΐνης, δηλαδή, το λόγο “φορτίο/μάζα”. Η τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε ένα ηλεκτρικό πεδίο ονομάζεται ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 32. Πρωτόκολλο ομογενοποίησης και υποκυτταρικής κλασμάτωσης ιπποκάμπειου ιστού επίμυος.

Ο ιστός του ιπποκάμπου, αφού ξεπλυθεί από λοιπά υπολείμματα ιστού και αιμορραγικά στοιχεία, εμβυθίζεται στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (βλέπε κείμενο). Η ομογενοποίηση του ιστού πραγματοποιείται με υπερήχους και επαναλαμβανόμενες εμβολές σε σύριγγα με βελόνα διαμέτρου 21G. Το ομογενοποιημένο αυτό αποτελεί το ολικό πρωτεϊνικό κλάσμα (t). Στη συνέχεια, το ομογενοποιημένο φυγοκεντρείται σε 100.000g και θερμοκρασία 4°C για 1 ώρα. Μετά τη φυγοκέντρηση, απομονώνεται το υπερκείμενο κλάσμα, το οποίο αντιστοιχεί στο κυταροπλασματικό κλάσμα (s). Το ίζημα που παραμένει επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης στο οποίο έχει προσθεθεί Triton X1%. Έτσι προκύπτει το ολικό μεμβρανικό κλάσμα (p).

(Πρωτόκολλο βασισμένο σε αντίστοιχα πρωτόκολλα όπως παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία 455-457)

Η ηλεκτροφόρηση του ομογενοποιημένου ιπποκάμπειου ιστού επίμυα για τον προσδιορισμό των ισομορφών α,γ και ε της Πρωτεϊνικής κινάσης C, έγινε σε σύστημα ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης, κατά SDS σύμφωνα με τον Laemmli (1970). Το δωδεκακυλοθειικό νάτριο (SDS) είναι ένα απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης ενώ τα ανιόντα του δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών γεγονός που δίνει στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιαταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης. Ως μέσο υποστήριξης χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου, κάτω από συνθήκες αποδιάταξης, η μετακίνηση των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι απολύτως ανάλογη με τον λογάριθμο της μάζας τους.

Στα δείγματα από τον ιππόκαμπο επίμυα (ολικό, κυτταροπλασματικό και μεμβρανικό κλάσμα) προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (Laemmli Buffer), το οποίο περιείχε, [62.5mM Tris-HCl (*Sigma*), pH 6.8 (*Sigma*), 1% SDS (*Sigma*), 5% γλυκερόλη (*Sigma*), 0.001% κυανό της βρωμοφαινόλη (*Sigma*) και 10% μερκαπτοαιθανόλη (*Sigma*)]. Τα δείγματα έβρασαν σε υδατόλουτρο για 3-4 λεπτά στους 100°C για την μετουσίωση των πρωτεϊνών και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια του πηκτώματος επιστίβαξης [30% μείγμα ακρυλαμίδης (30% ακρυλαμίδη, 0.825% N,N μεθυλενο-δις- ακρυλαμίδη, *Sigma*), 1.0 M Tris, pH 6.8, 10% SDS, 10% υπερθειικό αμμώνιο (APS, *Sigma*), N,N,N,N τετρα-μεθυλενο-αιθυλ-διαμίνη (TEMED, *Sigma*)]. Η σύσταση της πηκτής διαχωρισμού ήταν η κατάλληλη για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών μοριακού βάρους 50-120 kD (12% ακρυλαμίδη, 1.5M Tris-HCl, pH 8.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου με σταθερή τάση 180V.

6.1.2. Τεχνική Ανοσοαποτύπωσης Κατά Western (Western blot)

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν κατά την SDS ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE) μεταφέρθηκαν με αποτύπωση σε μεμβράνες νιτροκυταρίνης (Nitrocellulose membranes 0.45μm, *Sigma*) με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος εντάσεως 400mA για 12 ώρες σε θερμοκρασία 4C°. Έπειτα, προστέθηκε αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιέφερε. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες αυτές ήταν πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού ενάντια στο καρβόξυ-τελικό άκρο της p-MARCKS (1:100) (*Santa Cruz*), μονοκλωνικά αντισώματα ποντικίου για PKC α (*Transduction*), PKC β (*Transduction*), PKC ε (*Santa Cruz*), p-Erk ½ (1:1000) (*Santa Cruz*)

Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος ανιχνεύθηκε με την προσθήκη δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο αντίσωμα το οποίο ήταν συναρμοσμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (AP: alkaline phosphatase) [πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών κουνελιού συζευγμένο με AP (1:5000), μονοκλωνικό αντίσωμα αίγας κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών μύς συζευγμένο με AP (1:5000), (*Vector Laboratories*,

Η.Π.Α.]). Στη συνέχεια, το σύμπλοκο ανιχνεύθηκε με προσθήκη υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης

6.2. Ανοσοϊστοχημικές Μελέτες

Παρασκευή ιστού

Οι εγκέφαλοι των επίμυων αμέσως μετά την απομόνωσή τους και την αφαίρεση των μηνίγγων, εμβυθίστηκαν σε 0.1M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών οξέων pH 7.4 (PBS: NaHPO_4 , / K_2HPO_4) για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων αίματος και μονιμοποιήθηκαν στους 4°C για μια έως μιάμιση ώρα σε διάλυμα 0.1M PB, 4% παραφορμαλδεΐδης. Μετά τη μονιμοποίησή τους οι ιστοί επωάστηκαν για 16-18 ώρες σε διάλυμα 0.1M PB, 30% σουκρόζης στους 4°C για την επίτευξη κρυστοπροστασίας. Στη συνέχεια, έγινε ταχεία ψύξη των ιστών, με εμβύθιση τους για ένα λεπτό σε ισοπεντάνιο στους -45°C. Οι ιστοί διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την κοπή τους. Για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, κόπηκαν στεφανιαίες τομές πάχους 30μm σε κρυστόμο και τοποθετήθηκαν σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες, 3 τομές ανά πλάκα, οι οποίες διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

Αντίδραση Streptavidin-Horseradish Peroxidase (SA-HRP)

Για τον εντοπισμό των ισομορφών α, γ και ε της PKC καθώς και της φωσφορυλιωμένης MARCKS (ως έμμεσος δείκτης ενεργοποιημένης PKC) στα νευρικά κύτταρα των CA1 και CA3 περιοχών του ιππόκαμπου εφαρμόστηκε η ανοσοϊστοχημική μέθοδος στρεπταβινίνης-υπεροξειδάσης του αγριοράπανου (SA-HRP).

Η βιοτίνη είναι μια μικρή (Μοριακό Βάρος 24kDa), υδατοδιαλυτή βιταμίνη, που μπορεί να συζευχθεί με ένα ευρύ φάσμα βιολογικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων των αντισωμάτων, ενώ πολλά μόρια βιοτίνης μπορεί να συνδεθούν με ένα μόνο μόριο πρωτεΐνης. Η στρεπταβινίνη είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 60kDa που απομονώθηκε από το βακτήριο *Streptomyces avidinii* και παρουσιάζει μεγάλη συνάφεια για τη βιοτίνη. Η στρεπταβινίνη, λόγω των φυσικών της ιδιοτήτων (δεν συνδέεται ηλεκτροστατικά με τους ιστούς, δεν περιέχει υδατανθρακικές ομάδες ώστε να συνδέεται με τις λεκτίνες των ιστών), έχει υποκαταστήσει την αβιδίνη στις ανοσοϊστοχημικές μεθόδους ενώ έχει τέσσερις θέσεις σύνδεσης για τη βιοτίνη. Η υπεροξειδάση του αγριοράπανου (Horseradish Peroxidase, HRP) αποτελεί ένα ένζυμο που απομονώθηκε από την ρίζα του αγριοράπανου (Horseradish) και έχει μοριακό βάρος 44kDa

Η μέθοδος SA-HRP χρησιμοποιείται ευρέως για ανοσοϊστοχημική χρώση ιστών. Αποτελεί μια έμμεση ανοσοϊστοχημική μέθοδο όπου το προς μελέτη αντιγόνο συνδέεται με ένα πρώτο, μη συζευγμένο αντίσωμα, το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με ένα δεύτερο βιοτινυλιωμένο αντίσωμα, το οποίο έχει παραχθεί ενάντια στις IgG του είδους που έχει αναπτυχθεί το πρώτο αντίσωμα. Στο σύμπλοκο αντιγόνου - πρώτου αντισώματος -

βιοτινυλιωμένου δευτέρου αντισώματος συνδέεται το ενζυμικό σύμπλεγμα στρεπταβινίνης - υπεροξειδάσης. Στη συνέχεια, η υπεροξειδάση θα αντιδράσει με τον χρωμογόνο παράγοντα, π.χ 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) και θα παραχθεί η χρώση του αντιγόνου. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία καθώς επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ενίσχυση του σήματος με μείωση της μη ειδικής χρώσης.

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες αυτές αποτελεί μια ελαφρώς τροποποιημένη μορφή των πρωτοκόλλων που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιβλιογραφία.

Συγκεκριμένα, οι τομές, που αντιστοιχούσαν στην περιοχή του ιπποκάμπου, παρέμειναν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ξεπλύθηκαν αρχικά δύο φορές επί δύο λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M PBS, pH 7.4 και επώασθηκαν για 45 λεπτά σε 0.6% H₂O₂ για απενεργοποίηση των ενδογενών υπεροξειδασών. Στη συνέχεια επώασθηκαν με το διάλυμα δέσμησης (blocking buffer) [0.1M PBS pH 7.4 το οποίο περιείχε 5% φυσιολογικό ορό αιγός (Normal Goat Serum, NGS) και 0.4% Triton X-100] για 45 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του διαλύματος δέσμησης, προστέθηκαν τα αντισώματα (αραιωμένα σε κατάλληλες συγκεντρώσεις σε διάλυμα δέσμησης) έναντι της ισομορφής γ της PKC (Santa Cruz), σε αραιώση 1:3000, έναντι της ισομορφής ε της PKC (Santa Cruz), σε αραιώση 1:1000 και έναντι της φωσφορυλιωμένης MARCKS (p-MARCKS) (Santa Cruz), σε αραιώση 1:3000. Τα αντισώματα παρέμειναν για επώαση περίπου 12 με 16 ώρες σε θερμοκρασία 4°C. Οι τομές ξεπλύθηκαν και πάλι πέντε φορές επί ένα λεπτό με 0.1M PBS. Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος ανιχνεύθηκε με την προσθήκη δευτέρου αντισώματος ειδικού για το πρώτο αντίσωμα το οποίο ήταν συναρμοσμένο με βιοτίνη [πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας κατά των IgG ανοσοσφαιρινών κουνελιού συζευγμένο με βιοτίνη (Alter Chem), μονοκλωνικό αντίσωμα αίγας κατά των IgG ανοσοσφαιρινών μύδς συζευγμένο με βιοτίνη (Alter Chem)] το οποίο επώασθηκε με τις τομές για 60 λεπτά. Στη συνέχεια, οι τομές ξεπλύθηκαν και πάλι πέντε φορές επί ένα λεπτό με 0.1M PBS. Το σύμπλοκο αντιγόνου – αντισώματος - αντισώματος συναρμοσμένου με βιοτίνη, επώασθηκε με υπόστρωμα στρεπταβινίνη - υπεροξειδάσης (Alter Chem) για 90 λεπτά. Οι τομές ξεπλύθηκαν με 50mM Tris, pH 7.6 πέντε φορές επί ένα λεπτό. Τέλος, στις τομές προστέθηκε 0.1% 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) αραιωμένο σε 50mM Tris, pH 7.6 και με προσθήκη 0.1% H₂O₂. Η προσθήκη 50mM Tris, pH 7.6 θέτει το τέλος της αντίδρασης, το οποίο καθορίζεται επισκοπικά με μικροσκοπία από τον πειραματιστή και εφόσον στις τομές έχει επιτευχθεί ικανοποιητική χρώση των προς μελέτη μορίων (συνήθως χρειάζονται 10-20 λεπτά).

Οι τομές παρέμειναν για να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 16 ώρες και καλύφθηκαν με υλικό επικάλυψης (EdellanR neu, Merck) και παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου.

6.2.1. Έλεγχος Της Ορθότητας Τοποθέτησης Των Μικροσωληνίσκων Στην Περιοχή Του Ιππόκαμπου Με Την Τεχνική Χρώσης Νευρώνων Κατά Nissl (Nissl staining)

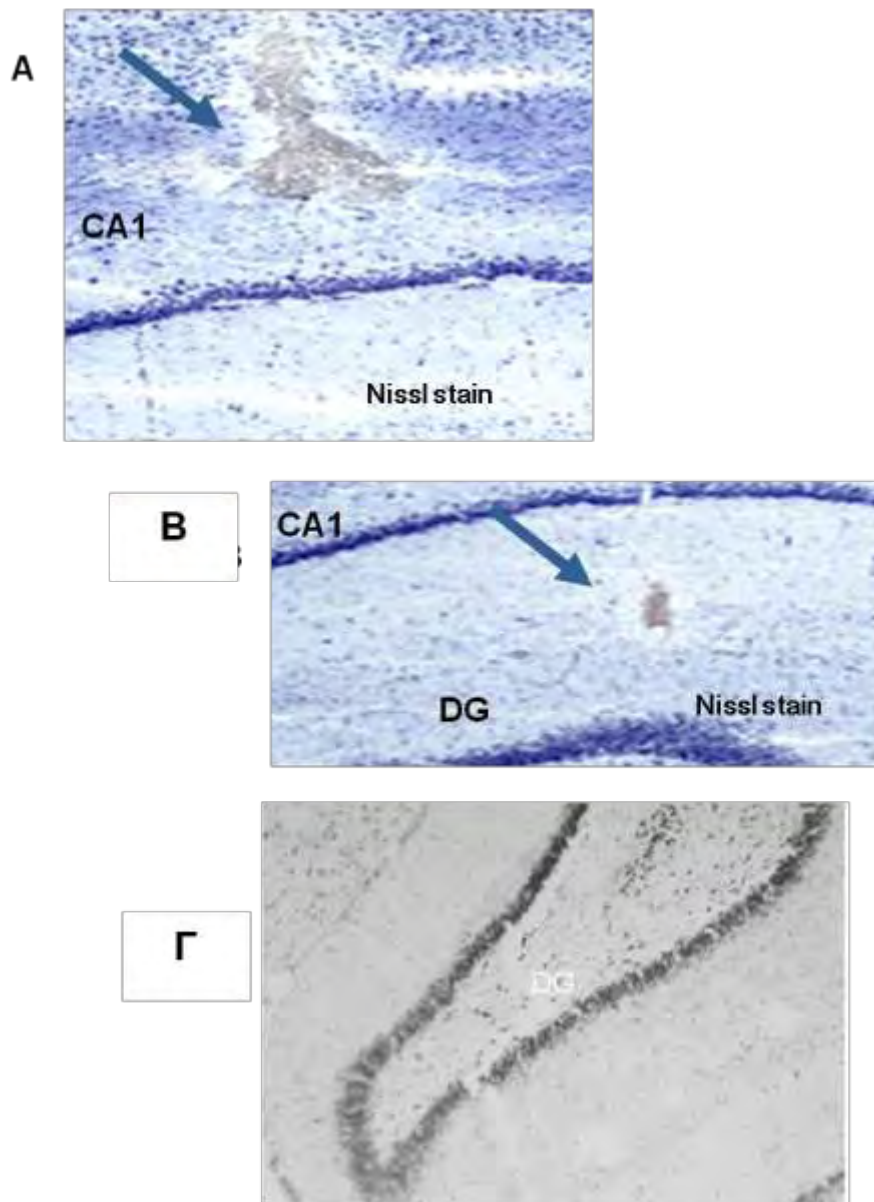
Η χρώση κατά Nissl (Nissl staining) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των σωμάτων Nissl των νευρώνων και αποσκοπεί στην αναγνώριση της βασικής αρχιτεκτονικής του νευρικού ιστού.

Στεφαναϊές τομές πάχους 20μm από εγκεφάλους επίμυων στους οποίους εμφυτεύθηκαν μικροσωληνίσκοι χρωματίστηκαν κατά Nissl. Συγκεκριμένα, οι τομές παρέμειναν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εμβυθίστηκαν διαδοχικά σε βαθμιαία μειούμενες αραιώσεις αιθυλικής αλκοόλης (100%, 90%, 70% και 20%) για 2 λεπτά σε κάθε μια, έτσι ώστε να επιτευχθεί η αφυδάτωση των τομών. Αφού οι τομές ξεπλύθηκαν για 1 λεπτό με απιονισμένο νερό εμβυθίστηκαν σε διάλυμα 0.1% cresyl [cresyl echt violet 0.1g αραιωμένο σε 100ml απιονισμένου νερού και προσθήκη 0.3ml glacial acetic acid αμέσως πριν από τη χρήση] όπου και παρέμειναν για περίπου 5-10 λεπτά αναλόγως την ένταση της χρώσης. Στη συνέχεια, οι τομές ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό και εμβυθίστηκαν διαδοχικά σε βαθμιαία αυξανόμενες αραιώσεις αιθυλικής αλκοόλης (20%, 70%, 90% και 100%) για 2 λεπτά σε κάθε μια. Τέλος, οι τομές εμβυθίστηκαν σε διάλυμα ξυλένης για 5 περίπου λεπτά. Μετά το πέρας της χρώσης, οι τομές παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσουν (Εικόνα 33).

Οι τομές παρατηρήθηκαν με συμβατικό μικροσκόπιο [μικροσκόπιο Zeiss]. Οι τομές στις οποίες τα ίχνη των μικροσωληνίσκων τελείωναν πριν από το Βρέγμα -3,14 και αυτές στις οποίες ξεκινούσαν μετά το Βρέγμα -4,52 αποκλείστηκαν από τις ανοσοϊστοχημικές μελέτες [330].

6.2.2. Έλεγχος Της Περιοχής Διάχυσης Των Εγχυόμενων Μέσω Της Κάνουλας Ουσιών Με Ενδοϊπποκάμπια Έγχυση Κυανού του Μεθυλενίου (Methyl Blue)

Ο έλεγχος της διάχυσης των ουσιών έγινε με έγχυση μέσω της ενδοϊπποκάμπειας κάνουλας της χρωστικής ουσίας Κυανού του Μεθυλενίου χρησιμοποιώντας τους όγκους και ακολουθώντας την τεχνική έγχυσης που περιγράφηκε παραπάνω. Στη συνέχεια, οι τομές των εγκεφάλων παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά και προσδιορίστηκαν τα όρια των συντεταγμένων που διαχέεται η ουσία (Εικόνα 34). Βέβαια, η διάχυση κάθε ουσίας διαφέρει και εξαρτάται από φυσικά χαρακτηριστικά κάθε ουσίας, όπως το ιξώδες της ουσίας, το μοριακό βάρος της, κ.α. Παρόλα αυτά, με την έγχυση της χρωστικής έχουμε μια αδρή εκτίμηση της περιοχής διάχυσης.



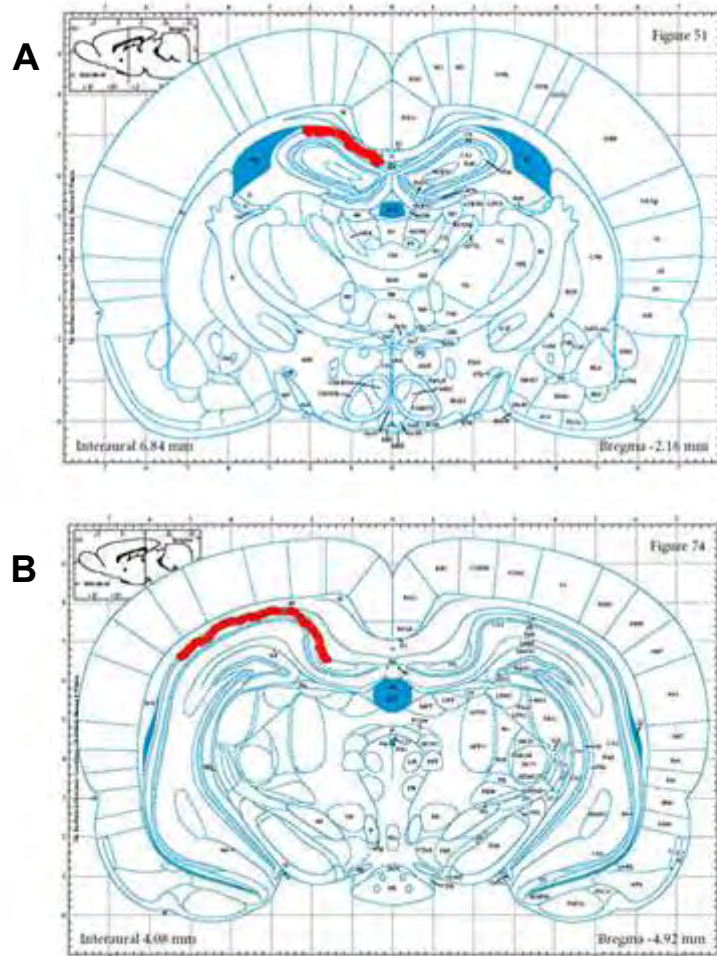
Εικόνα 33. Χρώση Nissl. Τομές ιπποκάμπου επίμυα Wistar στις οποίες διαγράφεται το ίχνος του μικροσωληνίσκου έγχυσης - Απεικόνιση της αρχιτεκτονικής των νευρικών κυττάρων στην περιοχή του ιππόκαμπου.

A. Απεικονίζεται το ίχνος του μικροσωληνίσκου άνωθεν της περιοχής CA1 καθώς και τα πυραμιδικά κύτταρα της περιοχής αυτής. Ανάλυση 1:100. Το βέλος δείχνει το ίχνος της κάνουλας.

B. Ίχνος του μικροσωληνίσκου στην περιοχή της οδοντωτής έλικας και χρώση των νευρώνων της περιοχής (DG: Dentate Gyrus). Ανάλυση 1:100. Το βέλος δείχνει το ίχνος της κάνουλας.

Γ. Αρχιτεκτονική των νευρώνων του ιππόκαμπου στην περιοχή της οδοντωτής έλικας. Ανάλυση 1:10.

Τομές κρουστάτη 20 μm, η χρώση έγινε με Cresyl Echt violet (χρώση Nissl)



Εικόνα 34. Διάχυση κυανού του μεθυλενίου (methyl blue) στον ιππόκαμπο επίμυος μετά από ενδοίπποκάμπεια έγχυση μέσω κάνουλας στην περιοχή CA1.

A. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το ίχνος της χρωστικής στην περιοχή AP: -2.00, όπου μόλις αρχίζει να γίνεται ορατά μακροσκοπικά.

B. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το ίχνος της χρωστικής στην περιοχή AP:-4.90. Πέραν αυτής της περιοχής παύει να γίνεται ορατή.

(Τροποποιημένο από Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates* (5th ed.). San Diego, CA: Academic Press)

6.2.3. Μικροσκοπία

Τα παρασκευάσματα των ιστοχημικών και ανοσοϊστοχημικών μελετών παρατηρήθηκαν σε συμβατικό μικροσκόπιο [μικροσκόπιο Zeiss Axioskop (Zeiss), με φακό Plan-Neofluar x40/ 0.75 και ελαιοκαταδυτικό φακό Plan-Neofluar x100/1.3] και μικροσκόπιο συνεστίασης [συνεστιακό μικροσκόπιο laser, Leica DM RE (Leica), (He/Ne laser) με φακό Plan Fluotar x 40/1.00 και ελαιοκαταδυτικό φακό Plan Apo x 63 / 1.32]. Η επεξεργασία των φωτογραφιών έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Adobe Photoshop 5.0.

7. Συμπεριφορικές Μέθοδοι

7.1. Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου (Novel Object Recognition Task)

Τα τρωκτικά παρουσιάζουν μια φυσική τάση να πλησιάζουν και να εξερευνούν νέα αντικείμενα, τα οποία υποθετικά δεν παρουσιάζουν καμιά φυσική σημασία για το ζώο και τα οποία δεν έχουν συνδυασθεί ποτέ με ένα ανταποδοτικό ερέθισμα [460]. Παρουσιάζουν ακόμη μια έμφυτη προτίμηση για τα νέα από τα ήδη γνωστά αντικείμενα. Τα τρωκτικά πλησιάζουν τα αντικείμενα και εξερευνούν τη φύση αυτών, αγγίζοντάς τα και μυρίζοντάς τα, ακουμπώντας τα και προσπαθώντας να τα διαχειρισθούν με τα μπροσθινά τους άκρα [461]. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί εύκολα να ποσοτικοποιηθεί και να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη απλών μορφών αναγνωριστικής μνήμης καθώς και για πιο πολύπλοκες: χωρική-, χρονική- και επεισοδική- μνήμη στα τρωκτικά. Η τυπική Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου αξιολογεί την αυθόρμητη δραστηριότητα των τρωκτικών και μπορεί έτσι να θεωρηθεί ως “αμιγής” δοκιμασία ελέγχου της επεισοδικής μνήμης, πλήρως απελευθερωμένη από συστατικά αναφορικής μνήμης [462].

Ένα πλεονέκτημα έναντι των υπολοίπων δοκιμασιών (π.χ δοκιμασίες μάθησης με ανταπόδοση τροφής σε λαβύρινθο) είναι το γεγονός ότι δεν απαιτεί στέρηση τροφής ή νερού, εφαρμογή ανταποδοτικού ερεθίσματος (τροφή ή ηλεκτρικό ερέθισμα), μάθηση, διατήρηση και εφαρμογή κανόνων ή μάθηση συνδυασμού απόκρισης-ανταπόδοσης. Αντιθέτως, απαιτεί μικρή εκπαίδευση και ακόμη είναι επί μακράν λιγότερο στρεσογόνα και διεγερτική σε σύγκριση με δοκιμασίες που βασίζονται σε αρνητική ανατροφοδότηση της συμπεριφοράς, όπως η εκδοχή του υδάτινου λαβύρινθου, ή με δοκιμασίες συνθηκών φόβου (fear conditioning), οι οποίες έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της νευροβιολογικής βάσης της μάθησης και της μνήμης στα τρωκτικά. Η Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για τον έλεγχο της επίδραση φαρμακολογικών παραγόντων και γενετικών παρεμβάσεων (π.χ διαγονιδιακά ζώα) στις διαδικασίες μάθησης και μνήμης.

Η Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου μιας δοκιμής τυπικά αποτελείται από μία δοκιμή εκπαίδευσης (διάρκειας συνήθως από 2 έως 10 λεπτά), κατά τη διάρκεια της οποίας οι επίμυες ή οι μύες εξερευνούν τα δύο όμοια αντικείμενα τοποθετημένα σε ένα οικείο περιβάλλον (δοκιμή εκπαίδευσης – sample trial). Την δοκιμή αυτή, ακολουθεί μια δεύτερη (δοκιμή επιλογής – choice trial), στην οποία ένα νέο αντικείμενο είναι παρον μαζί με ένα γνωστό αντικείμενο που ήδη προϋπήρχε από την δοκιμή εκπαίδευσης. Στην κατάσταση αυτή, που εξαρτάται από (α) το μεσοδιάστημα μεταξύ των δοκιμών εκπαίδευσης και επιλογής και (β) από τη διάρκεια της δοκιμής εκπαίδευσης, τα ζώα - μάρτυρες που δεν έχουν λάβει καμιά αγωγή δαπανούν περισσότερο χρόνο στην εξερεύνηση του νέου αντικειμένου, δείχνοντας έμμεσα με τη συμπεριφορά αυτή, ότι αναγνώρισαν το γνωστό αντικείμενο [462,463].

Στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου, χρησιμοποιείται μεσοδιάστημα μεταξύ των δοκιμών (InterTrial, ITI) που ποικίλλει από μερικά λεπτά μέχρι αρκετές ώρες (και μερικές φορές μέχρι και ημέρες). Η απόδοση των ζώων μειώνεται καθώς το διάστημα μεταξύ της δοκιμής εκπαίδευσης και της δοκιμής επιλογής αυξάνεται, π.χ., από 3 σε 24 ώρες [464-466]. *Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ITI μέχρι 3 ώρες δεν προκαλεί ελλείμματα μνήμης σε επίμυες ενώ αντίθετα όταν το χρονικό αυτό διάστημα αγγίζει τις 24 ωρών προκαλεί στους επίμυες φυσική αμνησία [406,467].*

Μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου είναι αυτή της έμφυτης τάσης των ζώων για συγκεκριμένα αντικείμενα ή υλικά. Για τον λόγο αυτό, θα πρέπει να διασφαλίζεται ότι τα αντικείμενα που χρησιμοποιούνται είναι ευκόλως διακριτά και δεν προκαλούν διαφορές προτίμησης στα ζώα. Συνιστάται λοιπόν, να χρησιμοποιούνται διαφορετικά αντικείμενα με διαφορετική υφή επιφάνειας (π.χ γυαλί, πλαστικό, μέταλλο, κεραμικό, πορσελάνη) και τα οποία να διαφέρουν σε ότι αφορά το ύψος, το σχήμα και το χρώμα. Τα αντικείμενα που είναι κατασκευασμένα από το ίδιο υλικό δεν μπορούν να διακριθούν από οσφρητικά στοιχεία.

Σε μελέτες όπου επιθυμείται η αξιολόγηση της συμμετοχής ενός φαρμακολογικού παράγοντα στις διαδικασίες αποθήκευσης των πληροφοριών και σχηματισμού της μνήμης, σημαντικό ρόλο παίζει η χρονική στιγμή χορήγησής του. Σύμφωνα με μελέτες, χορήγηση των φαρμακολογικών παραγόντων πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης επηρεάζει κυρίως τη διαδικασία σχηματισμού της μνήμης ενώ χορήγηση των φαρμακολογικών παραγόντων αμέσως μετά τη δοκιμή εκπαίδευσης εμπλέκεται κυρίως με την αποθήκευση ή/και την ανάκληση των πληροφοριών [406,468].

Συμπερασματικά, η Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου αποτελεί ένα μη ανταποδοτικό παράδειγμα το οποίο βασίζεται στην αυθόρμητη εξερευνητική συμπεριφορά των τρωκτικών, και το οποίο αντανακλάει μη χωρική μνήμη. Η λογική της δοκιμασίας στηρίζεται στη μέτρηση της ικανότητας των τρωκτικών να αναγνωρίζουν ένα αντικείμενο στο οποίο προηγουμένως έχουν εκτεθεί. Η δοκιμασία δίνει πληροφορίες για τη βραχυχρόνια αλλά και για τη μακροχρόνια μνήμη (αναλόγως του χρονικού διαστήματος που μεσολαβεί μεταξύ των δοκιμών) αλλά και για την αμνησιακή ή ευεργετική στη μνήμη δράση ενός φαρμάκου (αναλόγως της χρονικής στιγμής χορήγησής του φαρμακολογικού παράγοντα).

7.1.1. Πειραματική Διάταξη

Η πειραματική διάταξη αποτελείται από ένα ανοικτό πεδίο, κατασκευασμένο από Plexiglas ή ξύλο (στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας το υλικό κατασκευής είναι ξύλο με επένδυση μελαμίνης ώστε να αποφεύγεται η διαβροχή των τοιχωμάτων και να καθαρίζεται χωρίς να παραμένουν οσμές και βιολογικά κατάλοιπα), διαστάσεων 80 cm μήκος επί 50 cm ύψος και 60 cm πλάτος (Εικόνα 35). Ο φωτισμός της διάταξης προέρχεται από μια λάμπα

60W η οποία τοποθετείται σε απόσταση 60 cm άνωθεν της συσκευής, επιτυγχάνοντας έτσι την ίδια ένταση του φωτός σε όλα τα σημεία της. Τα αντικείμενα προς αναγνώριση αποτελούνται από τρία διαφορετικά σχήματα, κύβοι, κώνοι και κύλινδροι και είναι κατασκευασμένα από διαφορετικά υλικά όπως γυαλί, πλαστικό ή μέταλλο. Έχουμε δηλαδή μεταλλικούς κύβους, γυάλινους κώνους και πλαστικούς κυλίνδρους, όλα σε τριάδες. Το ύψος τους είναι περίπου 7 cm και με βάρος που να μην μπορούν να μετατοπισθούν από τους επίμους.



Εικόνα 35. Πειραματική Διάταξη της Νέας Δοκιμασίας Αναγνώρισης Αντικειμένου.

(Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας)

7.1.2. Πειραματική Διαδικασία

Οι συμπεριφορικές δοκιμασίες διεξάγονταν μέσα σε χώρο όπου διέμεναν μόνο τα συγκεκριμένα ζώα, και ελάμβαναν χώρα μεταξύ 09:00 και 13:00 h.

Η Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου πραγματοποιείται σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία [468]. Κατά την εβδομάδα που προηγήθηκε της δοκιμασίας, τα ζώα εξοικειώθηκαν με τον εξεταστή με τη διαδικασία των χειρισμών εξοικείωσης (handling) (δύο

φορές την ημέρα επί τρεις συνεχόμενες ημέρες ο εξεταστής έρχονταν σε φυσική επαφή με τα ζώα προσομοιάζοντας τους χειρισμούς που θα γίνονταν κατά την ημέρα της δοκιμασίας). Ακόμη, για 3 συνεχόμενες ημέρες τα ζώα αφήνονται ελεύθερα να εξερευνήσουν την πειραματική διάταξη για 2 λεπτά με σκοπό την εξοικείωση με το χώρο.

Η δοκιμασία περιλαμβάνει 2 δοκιμές (trials) όπως ήδη αναφέρθηκε, τη δοκιμή εκπαίδευσης (sample trial) και τη δοκιμή επιλογής (choice trial). Η διάρκεια κάθε δοκιμής καθορίζεται στα 2 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής εκπαίδευσης (αναφέρεται ως T1), δύο πανομοιότυπα δείγματα (αντικείμενα) τοποθετούνται εντός της διάταξης σε δύο αντίθετες γωνίες του κουτιού και σε απόσταση 10 cm από τα τοιχώματα (π.χ δύο μεταλλικοί κύβοι ή δύο γυάλινοι κώνοι ή δύο πλαστικοί κύλινδροι). Ο επίμυς τοποθετείται στο μέσον της συσκευής και αφήνεται ελεύθερος να εξερευνήσει το χώρο και τα ευρισκόμενα εντός αυτού όμοια αντικείμενα. Στη συνέχεια μετά το πέρας της T1, το ζώο επιστρέφει στο κλουβί του και παραμένει εκεί για χρονικό διάστημα που καθορίζεται από τον εξεταστή αναλόγως το σχεδιασμό του πειράματος. Το μεσοδιάστημα μεταξύ των δοκιμών συμβολίζεται εδώ ως ITI (InterTrial Interval). Το επόμενο βήμα είναι η δοκιμή επιλογής (αναφέρεται ως T2). Κατά τη διάρκεια της T2, το ένα από τα δύο όμοια αντικείμενα της T1 αντικαθίσταται από ένα νέο. Έτσι τώρα μέσα στη συσκευή υπάρχουν δύο αντικείμενα, ένα ήδη γνωστό στο πειραματόζωο π.χ ένας μεταλλικός κύβος που ήταν παρόν και στην T1 (familiar object, *F*) και ένα νέο που τοποθετήθηκε στην T2 (new object, *N*) και που είναι διαφορετικό σε σχήμα και υφή από εκείνο της T1 (π.χ ένας μεταλλικός κύβος). Τα ζώα επαναεκτίθενται στα δύο αντικείμενα στο γνωστό και στο νέο (Εικόνα 36). Όλοι οι συνδυασμοί αντικειμένων και τοποθεσίας χρησιμοποιούνται με τυχαίο και ισορροπημένο τρόπο προς αποφυγή πιθανής προτίμησης σχήματος, υφής ή τοποθεσίας. Για να αποφευχθεί η παρουσία οσφρητικών υπολειμμάτων, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τις επιλογές των ζώων, η συσκευή και τα αντικείμενα καθαρίζονταν προσεκτικά μετά από κάθε δοκιμή.

7.1.3. Εξερευνητική Δραστηριότητα Και Παράμετροι Προς Αξιολόγηση

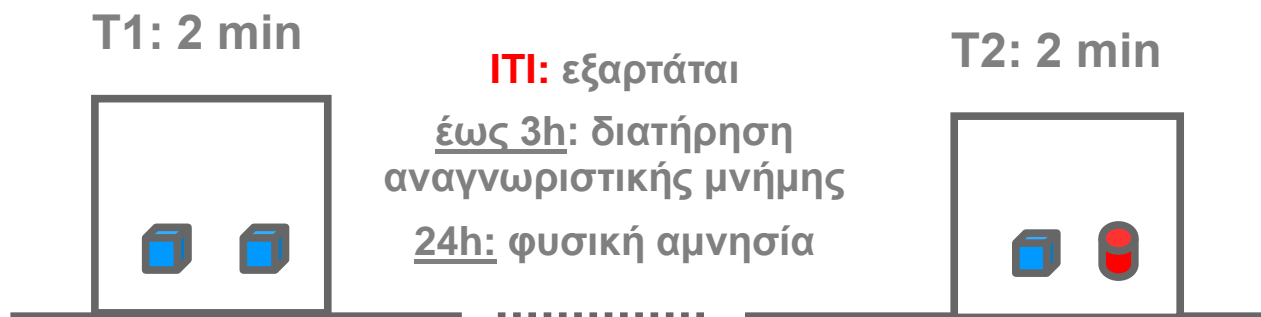
Ως εξερευνητική δραστηριότητα των ζώων θεωρείται η κατεύθυνση της μύτης τους προς το αντικείμενο σε μια απόσταση όχι παραπάνω από 2 cm και/ή όταν αγγίζουν με την μύτη τους το αντικείμενο. Περιστροφή γύρω από το αντικείμενο ή όταν τα ζώα αγκαλιάζουν ή στέκονται με το σώμα τους στο αντικείμενο, δεν θεωρείται εξερευνητική δραστηριότητα. Ο χρόνος που δαπανάει κάθε επίμυς στην εξερεύνηση του κάθε αντικειμένου κατά την T1 και την T2 καταμετράται χειροκίνητα με ένα χρονόμετρο.

Από τις μετρήσεις αυτές μπορούμε να υπολογίσουμε μια σειρά μεταβλητών όπως: τον ολικό χρόνο που δαπανήθηκε για την εξερεύνηση των δύο όμοιων αντικειμένων κατά την T1 και το χρόνο που δαπανήθηκε για την εξερεύνηση των δύο διαφορετικών αντικειμένων, *F* και *N*, κατά την T2. Για να αξιολογηθεί εάν ή όχι σε κάθε ομάδα ζώων, τα ζώα εκδήλωσαν προτίμηση για κάποια θέση ή κάποιο αντικείμενο, οι χρόνοι εξερεύνησης αναλύονται

σύμφωνα με τη φύση των αντικειμένων και τη θέση στη συσκευή. Η διάκριση μεταξύ του F και του N κατά τη διάρκεια της T_2 αξιολογείται συγκρίνοντας το χρόνο που δαπανήθηκε για την εξερεύνηση του F με αυτόν που δαπανήθηκε για την εξερεύνηση του N . Καθώς όμως η απευθείας σύγκριση των απόλυτων χρόνων μπορεί να αμφισβητηθεί λόγω διαφορών στα συνολικά επίπεδα εξερεύνησης [469], εισάγεται ένας Δείκτης Διάκρισης (discrimination index, D) ο οποίος υπολογίζεται ως εξής:

$$D = N - F/N + F$$

όπου D η αναλογία διάκρισης που αναπαριστά τη διαφορά στο χρόνο εξερεύνησης εκφραζόμενη σαν αναλογία του συνολικού χρόνου που δαπανήθηκε για την εξερεύνηση των δύο αντικειμένων στην T_2 [469].



Εικόνα 36. Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

Σχηματική παράσταση της διαδικασίας εκτέλεσης της Νέας Δοκιμασίας Αναγνώρισης Αντικειμένου και της σημασίας του χρονικού διαστήματος που μεσολαβεί μεταξύ των δύο δοκιμών.

7.2. Φαρμακολογικοί Παράγοντες

7.2.1. Έλεγχος Της Επίδρασης Των Μετατρεπτικών Της Κατάστασης Ενεργοποίησης Της Πρωτίνικης Κινάσης C Πεπτιδίων Στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου Σε Επίμυες

Τα πεπτίδια παρασκευάστηκαν στο Biopolymer Laboratory of University of Maryland, Baltimore. Τα πεπτίδια εV1-2 (EAVSLKPT) και ψεRACK (HDAPIGYD) συνδέονται αντιστρεπτά με το μεταφορικό πεπτίδιο Tat (YGRKKRRQRRR) με δισουλφιδικό δεσμό μέσω ελεύθερων κυστεινών που προστέθηκαν στα αμινοτελικά άκρα τους [470,471].

Η χορήγηση των πεπτιδίων έγινε ενδοπεριτοναϊκά (i.p.) και χρησιμοποιήθηκαν δύο δόσεις 0.2 mg/kg και 0.1 mg/kg [472,473]. Ο όγκος χορήγησης σε όλα τα πειράματα ήταν 1 ml/kg.

Οι δόσεις των πεπτιδίων και οι χρόνοι χορήγησης επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενες μελέτες σύμφωνα με τις οποίες, όταν τα πεπτίδια χορηγούνται συστηματικά σε επίμους μπορούν να φθάσουν σε όλο το σώμα χωρίς να προκαλούν ανεπιθύμητες ενέργειες [236,239,474,475].

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικός ορός (NaCl 0.9%).

7.2.2. Έλεγχος Της Ικανότητας Του Δότη NO, Μολσιδομίνη, Να Ανταγωνίζεται Τα Ελλείμματα Μνήμης Που Προκαλεί Ο Ανταγωνιστής Των NMDA Υποδοχέων, MK-801, Στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου Σε Επίμους

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί επίμους Wistar, ηλικίας 3 μηνών με βάρος 250-300g. Η χορήγηση των φαρμάκων έγινε ενδοπεριτοναϊκά (i.p.). Ο όγκος χορήγησης σε όλα τα πειράματα ήταν 1 ml/kg.

Το (+)-MK-801 maleate (Sigma, St. Louis, MO), διαλύθηκε σε NaCl 0.9 % και χορηγήθηκε σε δόση 0.1 mg/kg . Η δόση του MK-801 επιλέχθηκε με βάση προηγούμενη μελέτη [442] στην οποία το MK-801 προκαλεί ελλείμματα μνήμης στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου σε επίμους χωρίς να προκαλεί ανεπιθύμητες ενέργειες.

Η Μολσιδομίνη διαλύθηκε σε NaCl 0.9 % και χορηγήθηκε σε δύο δόσεις, 2 mg/kg και 4 mg/kg. Οι δόσεις της μολσιδομίνης επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενες μελέτες στις οποίες ήταν αποτελεσματικές στο να αναστρέφουν διαταραχές μάθησης χωρίς να προκαλούν παρενέργειες (υπόταση, αισθητηριοκινητικά ελλείμματα) [44,52].

Τα ζώα – μάρτυρες (vehicle) έλαβαν ίσους όγκους NaCl 0.9 %.

7.3. Σχεδιασμός Πειραμάτων

7.3.1. Έλεγχος Της Επίδρασης Των Μετατρεπτικών Της Κατάστασης Ενεργοποίησης Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Πεπτιδίων Στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου Σε Επίμους

Στόχος της παρούσης μελέτης είναι να διερευνήσει το ρόλο της Πρωτεϊνικής Κινάσης C έψιλον στις διάφορες φάσεις δημιουργίας της μνήμης και κυρίως στο σχηματισμό της μνήμης και στην αποθήκευση ή/και ανάκληση της μνήμης.

Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκαν για κάθε ένα από τα μετατρεπτικά της κατάστασης ενεργοποίησης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C πεπτίδια, δύο πειραματικά μοντέλα. Στο πρώτο, η χορήγηση των πεπτιδίων έγινε πριν την δοκιμή εκπαίδευσης (T1) με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου τους στο σχηματισμό της μνήμης (Σχήμα 1A) και στο δεύτερο η χορήγηση έγινε αμέσως μετά την T1 με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου των πεπτιδίων στην αποθήκευση της μνήμης (Σχήμα 1B).

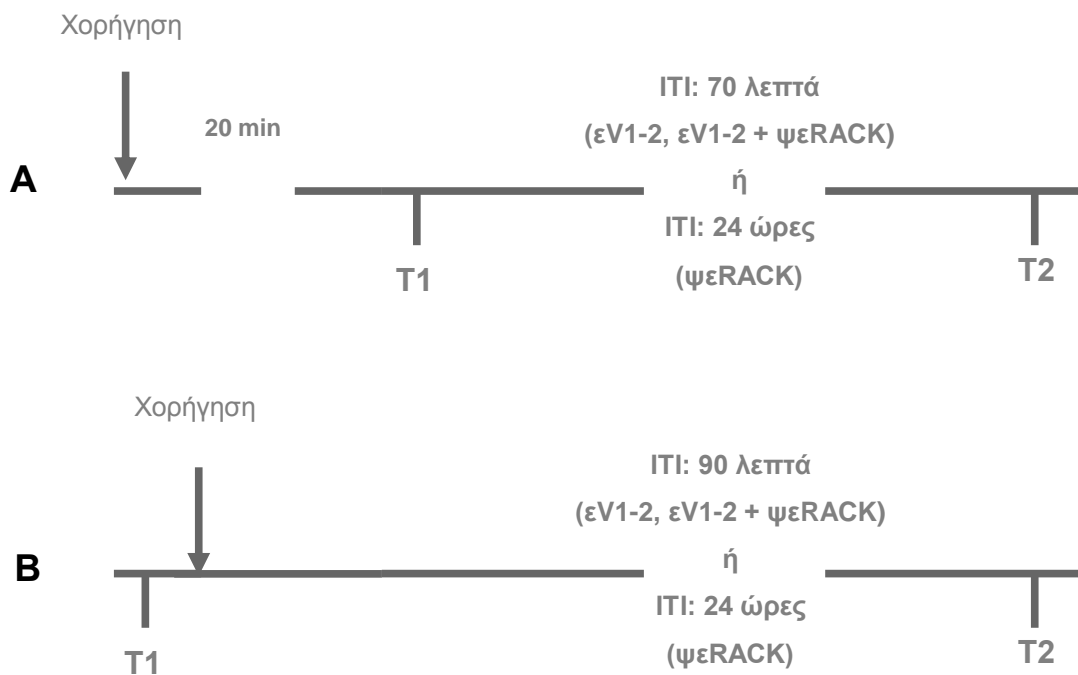
Για το ανασταλτικό της ενεργοποίησης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C πεπτίδιο, εV1-2, το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε από τη στιγμή της χορήγησης μέχρι τη δοκιμή εκπαίδευσης είναι τα 90 λεπτά. Στο χρονικό αυτό διάστημα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [239], το πεπτίδιο που χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά έχει διέλθει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, έχει περάσει στον εγκέφαλο του επίμυα και πλέον δεν ανιχνεύεται στο περιφερικό αίμα και στον εγκέφαλο του επίμυα, ενώ το διάστημα αυτό επιτρέπει τη διατήρηση των πληροφοριών και το σχηματισμό της μνήμης.

Για το ενεργοποιητικό της ενεργοποίησης της Πρωτεϊνικής Κινάσης C πεπτίδιο, ψεRACK, το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε από τη στιγμή της χορήγησης μέχρι τη δοκιμή εκπαίδευσης είναι 24 ώρες. Στο χρονικό αυτό διάστημα, το πεπτίδιο που χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά έχει διέλθει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, έχει περάσει στον εγκέφαλο του επίμυα και πλέον δεν ανιχνεύεται στο περιφερικό αίμα και στον εγκέφαλο του επίμυα, ενώ το διάστημα αυτό επιφέρει στους επίμυες φυσική αμνησία.

Καθώς τα πεπτίδια είναι συνδεδεμένα με το Tat μεταφορικό πεπτίδιο για την είσοδό τους στα κύτταρα, θα πρέπει να αποδείξουμε ότι το Tat μεταφορικό πεπτίδιο είναι βιολογικά ανενεργό και δεν επηρεάζει τη συμπεριφορά των επίμυων. Έτσι σχεδιάσαμε αρχικά τέσσερα πειράματα στα οποία συγκρίναμε την επίδραση του Tat πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου σε σχέση με επίμυες - μάρτυρες που έλαβαν φυσιολογικό ορό (NaCl 0.9%).

Πείραμα 1: Έλεγχος της επίδρασης του Tat πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται πριν από την δοκιμή εκπαίδευσης και με χρονικό διάστημα τα 90 λεπτά από τη στιγμή της χορήγησης.

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε δύο πειραματικές ομάδες: μάρτυρες (14 ζώα) και Tat 0.2 mg/kg (18 ζώα). Φυσιολογικός ορός και Tat πεπτίδιο, χορηγήθηκαν 20 λεπτά πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης ώστε να ελεγχθεί εάν το πεπτίδιο επηρεάζει την απόκτηση των πληροφοριών κατά τη διαδικασία σχηματισμού της μνήμης.



Σχήμα 1. Πειραματικά μοντέλα της Νέας Δοκιμασίας Αναγνώρισης Αντικειμένου για τον έλεγχο της επίδρασης των μετατρεπτικών της κατάστασης ενεργοποίησης της PKC πεπτιδίων .

A. Χορήγηση των πεπτιδίων πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης (T1) επηρεάζει κυρίως τις διαδικασίες σχηματισμού της μνήμης. Η χορήγηση των πεπτιδίων έγινε 20 λεπτά πριν την T1.

B. Χορήγηση των πεπτιδίων αμέσως μετά από τη δοκιμή επιλογής επηρεάζει κυρίως την αποθήκευση και/ή την ανάκληση των πληροφοριών.

Και στα δύο μοντέλα το χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο δοκιμών εξαρτάται από το πεπτίδιο που χορηγούμε. Έτσι η χορήγηση του ενεργοποιητικού πεπτιδίου απαιτεί μεσοδιάστημα 24 ωρών, δηλαδή διάστημα ικανό να προκαλέσει φυσική αμνησία στα ζώα και επομένως να αξιολογηθεί η ικανότητα του πεπτιδίου για αναστροφή της. Η χορήγηση του ανασταλτικού πεπτιδίου γίνεται με μεσοδιάστημα τα 70 λεπτά, χρόνος ικανός για διατήρηση της μνημονικής ικανότητας στα ζώα-μάρτυρες.

Πείραμα 2: Έλεγχος της επίδρασης του Tat πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται αμέσως μετά από την δοκιμή εκπαίδευσης και με χρονικό διάστημα τα 90 λεπτά από τη στιγμή της χορήγησης.

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε δύο πειραματικές ομάδες: μάρτυρες (14 ζώα) και Tat 0.2 mg/kg (12 ζώα). Τόσο ο φυσιολογικός ορός όσο και το Tat πεπτίδιο, χορηγήθηκαν αμέσως μετά από τη δοκιμή εκπαίδευσης ώστε να ελεχθεί εάν το πεπτίδιο επηρεάζει την αποθήκευση ή/και την ανάκληση των πληροφοριών.

Πείραμα 3: Έλεγχος της επίδρασης του Tat πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται πριν από την δοκιμή εκπαίδευσης και με χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο δοκιμών 24 ώρες.

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε δύο πειραματικές ομάδες: μάρτυρες (10 ζώα) και Tat 0.2 mg/kg (9 ζώα). Φυσιολογικός ορός και Tat πεπτίδιο, χορηγήθηκαν 20 λεπτά πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης ώστε να ελεχθεί εάν το πεπτίδιο επηρεάζει την απόκτηση των πληροφοριών κατά τη διαδικασία σχηματισμού της μνήμης.

Πείραμα 4: Έλεγχος της επίδρασης του Tat πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται αμέσως μετά από την δοκιμή εκπαίδευσης και με χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο δοκιμών τις 24 ώρες.

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε δύο πειραματικές ομάδες: μάρτυρες (10 ζώα) και Tat 0.2 mg/kg (11 ζώα). Τόσο ο φυσιολογικός ορός όσο και το Tat πεπτίδιο, χορηγήθηκαν αμέσως μετά από τη δοκιμή εκπαίδευσης ώστε να ελεχθεί εάν το πεπτίδιο επηρεάζει την αποθήκευση ή/και την ανάκληση των πληροφοριών.

Πείραμα 5: Έλεγχος της επίδρασης διαφορετικών δόσεων του εV1-2 πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται πριν από την δοκιμή εκπαίδευσης.

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε τρεις πειραματικές ομάδες: ζώα - μάρτυρες (14 ζώα), επίμυες που έλαβαν το πεπτίδιο εV1-2 σε δόση 0.1mg/kg (14 ζώα) και επίμυες που έλαβαν το πεπτίδιο εV1-2 σε δόση 0.2mg/kg (12 ζώα). Φυσιολογικός ορός και εV1-2 πεπτίδιο, χορηγήθηκαν 20 λεπτά πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης ώστε να ελεχθεί εάν το πεπτίδιο επηρεάζει την απόκτηση των πληροφοριών κατά τη διαδικασία σχηματισμού της μνήμης.

Πείραμα 6: Έλεγχος της επίδρασης διαφορετικών δόσεων του εV1-2 πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται αμέσως μετά από τη δοκιμή εκπαίδευσης.

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε τρεις πειραματικές ομάδες: ζώα - μάρτυρες (14 ζώα), επίμυες που έλαβαν το πεπτίδιο εV1-2 σε δόση 0.1mg/kg (11 ζώα) και επίμυες που έλαβαν το πεπτίδιο εV1-2 σε δόση 0.2mg/kg (11 ζώα). Για να εκτιμηθεί η επίδραση του εV1-2 πεπτιδίου στις διαδικασίες αποθήκευσης ή/και ανάκλησης της μνήμης, όλοι οι φαρμακολογικοί παράγοντες χορηγήθηκαν χορηγήθηκαν αμέσως μετά από τη δοκιμή εκπαίδευσης.

Πείραμα 7: Έλεγχος της επίδρασης διαφορετικών δόσεων του ψεRACK πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται πριν από την δοκιμή εκπαίδευσης.

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε τρεις πειραματικές ομάδες: ζώα - μάρτυρες (10 ζώα), επίμυες που έλαβαν το πεπτίδιο ψεRACK σε δόση 0.1mg/kg (9 ζώα) και επίμυες που έλαβαν το πεπτίδιο ψεRACK σε δόση 0.2mg/kg (9 ζώα). Φυσιολογικός ορός και ψεRACK πεπτίδιο, χορηγήθηκαν 20 λεπτά πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης ώστε να ελεχθεί εάν το πεπτίδιο επηρεάζει την απόκτηση των πληροφοριών κατά τη διαδικασία σχηματισμού της μνήμης.

Πείραμα 8: Έλεγχος της επίδρασης διαφορετικών δόσεων του ψεRACK πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται αμέσως μετά από τη δοκιμή εκπαίδευσης.

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε τρεις πειραματικές ομάδες: ζώα - μάρτυρες (10 ζώα), επίμυες που έλαβαν το πεπτίδιο ψεRACK σε δόση 0.1mg/kg (12 ζώα) και επίμυες που έλαβαν το πεπτίδιο ψεRACK σε δόση 0.2mg/kg (10 ζώα). Για να εκτιμηθεί η επίδραση του ψεRACK πεπτιδίου στις διαδικασίες αποθήκευσης ή/και ανάκλησης της μνήμης, όλοι οι φαρμακολογικοί παράγοντες χορηγήθηκαν αμέσως μετά από τη δοκιμή εκπαίδευσης.

Πείραμα 9: Έλεγχος της ικανότητας του πεπτιδίου ψεRACK να αναστρέφει τα ελλείμματα απόδοσης των επίμυων που προκαλεί το εV1-2 πεπτίδο κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου, όταν αυτά συγχωρηγούνται πριν από την δοκιμή εκπαίδευσης.

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε τέσσερις πειραματικές ομάδες (12 ζώα σε κάθε ομάδα) και σε κάθε ομάδα χορηγήθηκαν διαδοχικά με δύο διαφορετικές εγχύσεις, δύο φαρμακολογικοί παράγοντες. Έτσι προέκυψαν οι ακόλουθες ομάδες επίμυων: η ομάδα των επίμυων - μαρτύρων, που έλαβε φυσιολογικό ορό και φυσιολογικό ορό, η ομάδα των επίμυων - ψεRACK που έλαβε φυσιολογικό ορό και το πεπτίδιο ψεRACK σε δόση 0.2mg/kg, η ομάδα των επίμυων - εV1-2 που έλαβε φυσιολογικό ορό και το πεπτίδιο εV1-2 σε δόση 0.2mg/kg και η ομάδα των επίμυων - ψεRACK και εV1-2 που έλαβε συγχρόνως τα πεπτίδια ψεRACK και εV1-2 σε δόση 0.2mg/kg το κάθε ένα. Όλοι οι φαρμακολογικοί παράγοντες, χορηγήθηκαν 20 λεπτά πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης ώστε να ελεχθεί εάν επιδρούν στην απόκτηση των πληροφοριών κατά τη διαδικασία σχηματισμού της μνήμης.

Πείραμα 10: Έλεγχος της ικανότητας του πεπτιδίου ψεRACK να αναστρέφει τα ελλείμματα απόδοσης των επίμυων που προκαλεί το εV1-2 πεπτίδο κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου, όταν αυτά συγχωρηγούνται αμέσως μετά από την δοκιμή εκπαίδευσης.

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε τέσσερις πειραματικές ομάδες (14 ζώα σε κάθε ομάδα) και σε κάθε ομάδα χορηγήθηκαν διαδοχικά με δύο διαφορετικές εγχύσεις, δύο φαρμακολογικοί παράγοντες. Έτσι προέκυψαν οι ακόλουθες ομάδες επίμυων: η ομάδα των επίμυων - μαρτύρων, που έλαβε φυσιολογικό ορό και φυσιολογικό ορό, η ομάδα των επίμυων - ψεRACK που έλαβε φυσιολογικό ορό και το πεπτίδιο ψεRACK σε δόση 0.2mg/kg, η ομάδα των επίμυων - εV1-2 που έλαβε φυσιολογικό ορό και το πεπτίδιο εV1-2 σε δόση 0.2mg/kg και η ομάδα των επίμυων - ψεRACK και εV1-2 που έλαβε τα πεπτίδια ψεRACK και εV1-2 σε δόση 0.2mg/kg το κάθε ένα. Για να εκτιμηθεί η επίδραση των πεπτιδίων στις διαδικασίες αποθήκευσης ή/και ανάκλησης της μνήμης, όλοι οι φαρμακολογικοί παράγοντες χορηγήθηκαν αμέσως μετά από τη δοκιμή εκπαίδευσης.

7.3.2. Έλεγχος Της Ικανότητας Του Δότη NO, Μολσιδομίνη, Να Ανταγωνίζεται Τα Ελλείμματα Μνήμης Που Προκαλεί Ο Ανταγωνιστής Των NMDA Υποδοχέων, MK-801, Στη Νέα Δοκιμασία Αναγνώρισης Αντικειμένου Σε Επίμυες

Στόχος του πειράματος αυτού όπως ήδη αναφέρθηκε, αποτελεί η διευκρίνιση της σχέσης μεταξύ του NO και της υπολειτουργίας των υποδοχέων NMDA. Αποφασίσαμε να διερευνήσουμε το ρόλο του δότη NO, μολσιδομίνη, στα συμπεριφορικά ελλείμματα που προκαλεί ο ανταγωνιστής των υποδοχέων NMDA, MK-801, κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου. Ως χρονικό διάστημα (ITI) μεταξύ των δύο δοκιμών χρησιμοποιήσαμε τις τρεις ώρες, διάστημα που δεν προκαλεί ελλείμματα μνήμης σε επίμυες – μάρτυρες [406]. Επιπλέον, οι ψυχομιμητικές ιδιότητες του MK-801 (υπερκινητικότητα, στερεοτυπίες, αταξία) έχουν παρέλθει 3 ώρες μετά τη χορήγησή του [442,443].

Πείραμα 11: Έλεγχος της ικανότητας του δότη NO, μολσιδομίνη, να αναστρέφει τα ελλείμματα μνήμης που προκαλεί ο MK-801 στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου, όταν αυτά χορηγούνται αμέσως μετά από την δοκιμή εκπαίδευσης.

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε έξι πειραματικές ομάδες (10 ζώα σε κάθε ομάδα) και σε κάθε ομάδα χορηγήθηκαν διαδοχικά με δύο διαφορετικές εγχύσεις, δύο φαρμακολογικοί παράγοντες. Έτσι προέκυψαν οι ακόλουθες ομάδες επίμυων: η ομάδα των επίμυων - μαρτύρων, που έλαβε φυσιολογικό ορό συν φυσιολογικό ορό, η ομάδα των επίμυων - μολσιδομίνη 2, που έλαβε φυσιολογικό ορό συν μολσιδομίνη σε δόση 2mg/kg, η ομάδα των επίμυων - μολσιδομίνη 4, που έλαβε φυσιολογικό ορό συν μολσιδομίνη σε δόση 4mg/kg, η ομάδα των επίμυων - MK-801, που έλαβε φυσιολογικό ορό συν MK-801 σε δόση 0.1mg/kg, η ομάδα των επίμυων -μολσιδομίνη 2-MK-801 που έλαβε μολσιδομίνη σε δόση 2mg/kg συν MK-801 σε δόση 0.1mg/kg και τέλος η ομάδα των επίμυων -μολσιδομίνη 4-MK-801 που έλαβε μολσιδομίνη σε δόση 4mg/kg συν MK-801 σε δόση 0.1mg/kg.

7.4. Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με ανάλυση διακύμανσης (analysis of variance, ANOVA) με διαφορετικό αριθμό παραγόντων κάθε φορά για την αξιολόγηση της κάθε παραμέτρου της κάθε συμπεριφορικής διαδικασίας. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα Sigma Stat.

7.4.1. Έλεγχος Της Επίδρασης Των Μετατρεπτικών Της Κατάστασης Ενεργοποίησης Της Πρωτίνικης Κινάσης C Πεπτιδίων Στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου Σε Επίμυες

Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή±στατιστικό λάθος (mean±SEM). Η τιμή του $P < 0.05$ θεωρείται ως στατιστικά σημαντική.

Στα Πειράματα 1 και 3, οι συνολικοί χρόνοι εξερεύνησης κατά τη διάρκεια της T1 και της T2 δοκιμής υπολογίσθηκαν χρησιμοποιώντας ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA). Τα δεδομένα του Δείκτη Διάκρισης D υπολογίσθηκαν με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα (one-way ANOVA).

Στα Πειράματα 2 και 4, οι συνολικοί χρόνοι εξερεύνησης κατά τη διάρκεια της T2 δοκιμής καθώς και τα δεδομένα του Δείκτη Διακρίσης D αναλύθηκαν με ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα (one-way ANOVA).

Στο Πείραμα 5, οι συνολικοί χρόνοι εξερεύνησης κατά τη διάρκεια της T1 και της T2 δοκιμής υπολογίσθηκαν χρησιμοποιώντας ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων με σχεδιασμό split-plot (two way ANOVA with a split-plot design) (μεταξύ-ανάμεσα στα υποκείμενα). Ο μεταξύ παράγοντας ήταν το πεπτικό εV1-2 (δύο επίπεδα) και ο ανάμεσα παράγοντας ήταν οι δοκιμές (δύο επίπεδα). Οι συγκρίσεις Post-hoc έγιναν με τη χρήση του Tukey's post hoc test. Τα δεδομένα για τον Δείκτη Διάκρισης D υπολογίσθηκαν με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα (one-way ANOVA). Ο παράγοντας ήταν το πεπτικό εV1-2 (δύο επίπεδα). Οι συγκρίσεις Post hoc έγιναν με τη χρήση του Duncan's test.

Στο Πείραμα 6, οι συνολικοί χρόνοι εξερεύνησης κατά τη διάρκεια της T2 και τα δεδομένα για τον Δείκτη Διάκρισης D αναλύθηκαν με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα (one-way ANOVA) και με περαιτέρω επεξεργασία από το Duncan's post-hoc test. Ο παράγοντας ήταν το πεπτικό εV1-2 (δύο επίπεδα).

Στο Πείραμα 7, οι συνολικοί χρόνοι εξερεύνησης κατά τη διάρκεια της T1 και της T2 δοκιμής υπολογίσθηκαν χρησιμοποιώντας ανάλυση διακύμανσης με δύο παράγοντες και σχεδιασμό split-plot (two-way ANOVA with a split-plot design) (μεταξύ-ανάμεσα στα υποκείμενα). Ο μεταξύ παράγοντας ήταν το πεπτικό ψεRACK (δύο επίπεδα) και ο ανάμεσα παράγοντας ήταν οι δοκιμές (δύο επίπεδα). Οι συγκρίσεις Post-hoc έγιναν με τη χρήση του Tukey's post hoc test. Τα δεδομένα για τον Δείκτη Διάκρισης D υπολογίσθηκαν με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα (one-way ANOVA). Ο παράγοντας ήταν το πεπτικό ψεRACK (δύο επίπεδα). Οι συγκρίσεις Post hoc έγιναν με τη χρήση του Duncan's test.

Στο Πείραμα 8, οι συνολικοί χρόνοι εξερεύνησης κατά τη διάρκεια της T2 δοκιμασίας και τα δεδομένα για τον Δείκτη Διάκρισης D αναλύθηκαν με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα (one-way ANOVA) και με περαιτέρω επεξεργασία από το Duncan's post-hoc test. Ο παράγοντας ήταν το πεπτικό ψεRACK (δύο επίπεδα).

Στο Πείραμα 9, οι συνολικοί χρόνοι εξερεύνησης κατά τη διάρκεια της T1 and T2 δοκιμασίας υπολογίσθηκαν με ανάλυση διακύμανσης τριών παραγόντων (three-way ANOVA) (δύο μεταξύ, ένας ανάμεσα στα υποκείμενα). Ο πρώτος μεταξύ παράγοντας ήταν το πεπτικό εV1-2 και ο δεύτερος ήταν το πεπτικό ψεRACK. Οι δοκιμές ήταν ο ανάμεσα παράγοντας.

Επακολούθως, οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εV1-2 και ψεRACK αναλύθηκαν ξεχωριστά συγκρίνοντας τις μέσες τιμές των ομάδων για τις δύο δοκιμές, με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA). Οι συγκρίσεις Post-hoc έγιναν με το Tukey's test. Τα δεδομένα για τον Δείκτη Διάκρισης D αναλύθηκαν με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA). Οι παράγοντες ήταν το πεππίδιο εV1-2 (δύο επίπεδα) και το πεππίδιο ψεRACK (δύο επίπεδα). Οι συγκρίσεις Post-hoc έγιναν με το Duncan's test.

Στο Πείραμα 10, οι συνολικοί χρόνοι εξερεύνησης κατά την T2 δοκιμή και τα δεδομένα για τον Δείκτη Διάκρισης D αναλύθηκαν με ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA) και ακολούθησε το Tukey's post hoc test και το Duncan's test αντίστοιχα. Οι παράγοντες ήταν το πεππίδιο εV1-2 (δύο επίπεδα) και το πεππίδιο ψεRACK (δύο επίπεδα).

7.4.2. Έλεγχος Της Ικανότητας Του Δότη NO, Μολισδομίνη, Να Ανταγωνίζεται Τα Ελλείμματα Μνήμης Που Προκαλεί Ο Ανταγωνιστής Των NMDA Υποδοχέων, MK-801, Στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου Σε Επίμυες

Στο Πείραμα 11, τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή±σταθερή απόκλιση (mean±SEM). Η κινητική δραστηριότητα, οι συνολικοί χρόνοι εξερεύνησης κατά την T2 δοκιμή και τα δεδομένα για τον Δείκτη Διάκρισης D αναλύθηκαν με ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA). Οι παράγοντες ήταν το MK-801 (τρία επίπεδα) και η μολισδομίνη (τρία επίπεδα). Οι συγκρίσεις Post-hoc έγιναν με το Tukey's test.

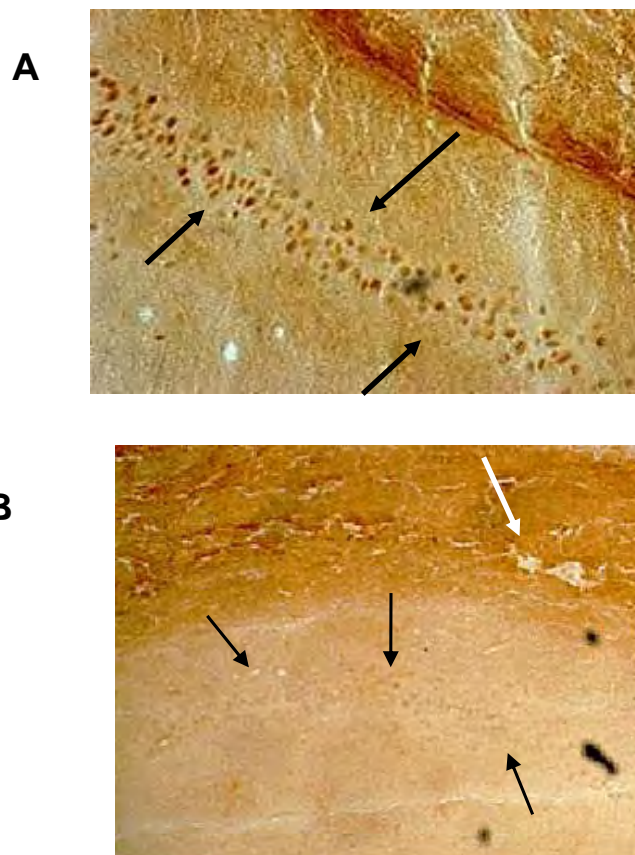
Γ. Αποτελέσματα

8. Αποτελέσματα Βιοχημικής Ανάλυσης Ιππόκαμπου Επίμυα

8.1. Απεικόνιση Της Παρουσίας Των Ισομορφών Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Στον Ιππόκαμπο Επίμυα

8.1.1. Απεικόνιση Των Ισομορφών Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Στον Ιππόκαμπο Επίμυα Με Χρήση Ανοσοϊστοχημικής Μεθόδου

Με τη χρήση της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου SA-HRP σε τομές ιπποκάμπου επίμυος 30 μm απεικονίσθηκαν κύτταρα θετικά για τις ισομορφές α και γ της PKC στην περιοχή CA1 (Εικόνα 37A και 37B).

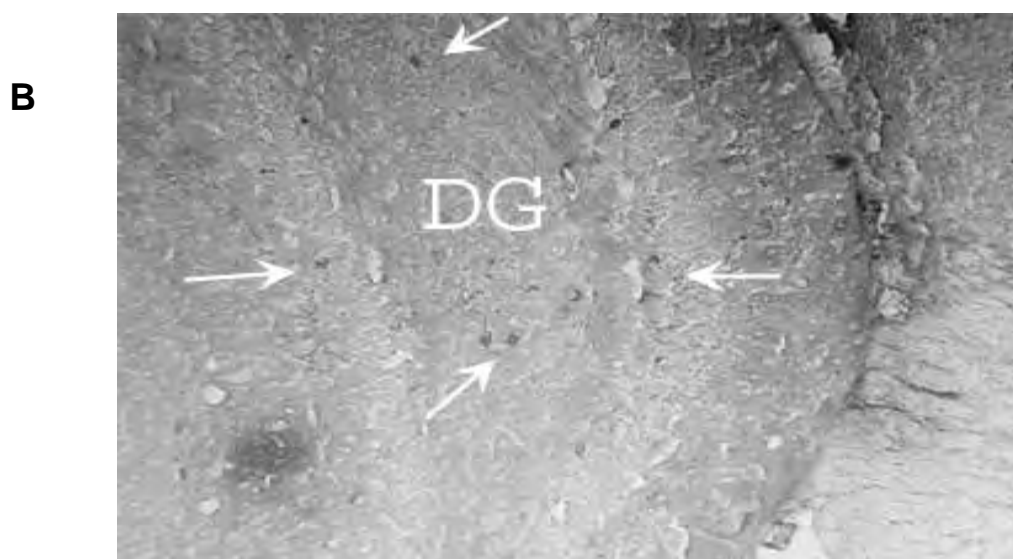
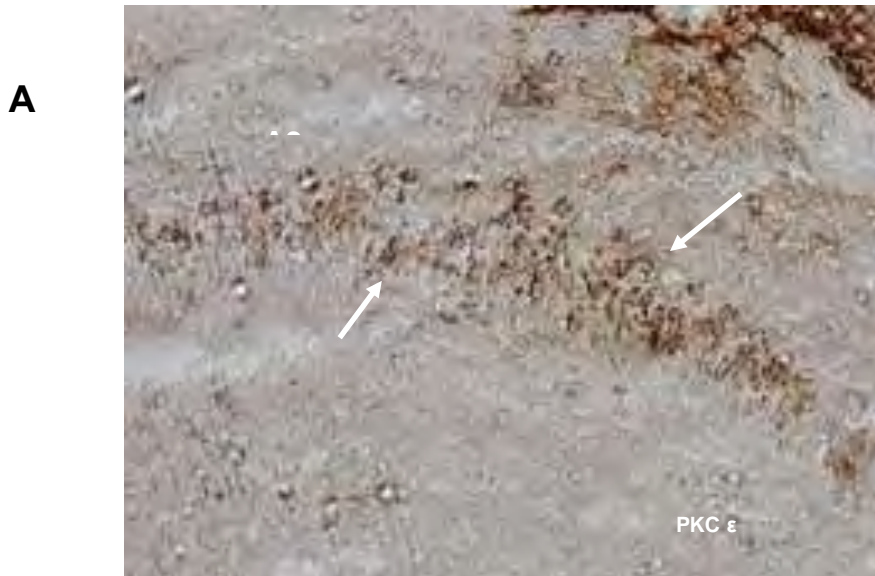


Εικόνα 37. Τομές ιπποκάμπου επίμυα πάχους 30μm στις οποίες έγινε χρώση με ανοσοϊστοχημική μέθοδο (SA-HRP).

A. Τομή ιπποκάμπου της περιοχής CA1 στην οποία απεικονίζονται κύτταρα θετικά για την ισομορφή α της PKC (βέλη). Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της PKCα (1:1000). Ανάλυση 100x.

B. Τομή ιπποκάμπου όπου απεικονίζεται η περιοχή CA1. Με το λευκό βέλος υποδεικνύεται το ίχνος της κάνουλας – οδηγού, πάνω ακριβώς από τα νευρικά κύτταρα της υπό μελέτη περιοχής. Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν τα πυραμιδικά κύτταρα που είναι θετικά για την ισομορφή γ της PKC. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της PKCγ (1:1000). Μεγέθυνση 10x.

Με τη χρήση της ίδιας τεχνικής απεικονίσαμε κύτταρα θετικά για την ισομορφή ϵ της PKC στις περιοχές του ιππόκαμπου CA3 και στην οδοντωτή έλικα (Εικόνα 38Α και 38Β). Όπως έχει ήδη προαναφερθεί στις περιοχές αυτές του ιπποκάμπου οι τρεις αυτές ισομορφές της PKC, α , γ και ϵ βρίσκονται σε αφθονία .



Εικόνα 38. Τομές ιππόκαμπου επίμυα πάχους 30 μ m στις οποίες έγινε χρώση με ανοσοϊστοχημική μέθοδο (SA-HPR).

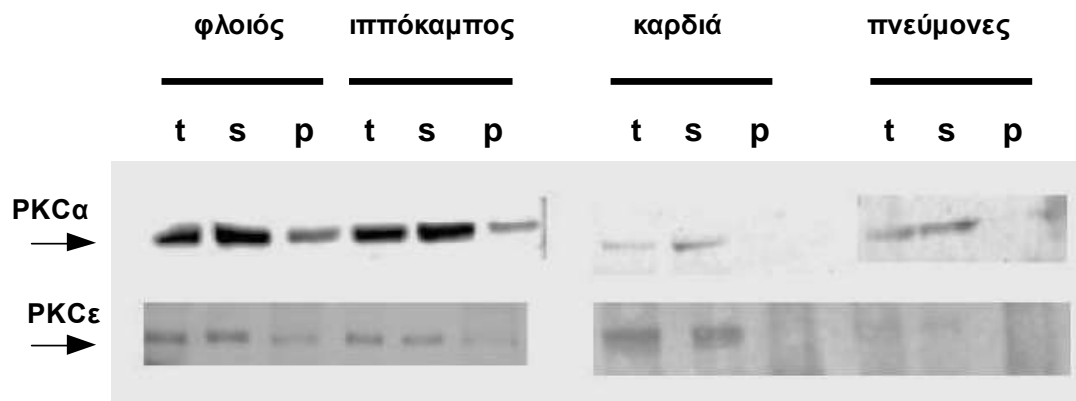
A. Τομή ιππόκαμπου όπου απεικονίζεται η περιοχή CA3. Στην εικόνα μπορούμε να διακρίνουμε θετικά για την ισομορφή ϵ της PKC πυραμιδικά κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι PKC ϵ (1:5000, SantaCruz). Τα βέλη υποδεικνύουν κύτταρα θετικά για PKC ϵ (100x).

B. Τομή ιππόκαμπου όπου απεικονίζεται η περιοχή της οδοντωτής έλικας (DG: Dentate Gyrus) χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα για την PKC ϵ (1:5000). Τα βέλη υποδεικνύουν κύτταρα θετικά για PKC ϵ (10x).

8.1.2. Απεικόνιση Με Ανοσοαποτύπωση Κατά Western Των Ισομορφών Της PKC Με Χρήση Της Μεθόδου Της Υποκυτταρικής Κλασμάτωσης Σε Ομογενοποιηήματα Ιππόκαμπου Επίμυα

Με τη μέθοδο της υποκυτταρικής κλασμάτωσης διαχωρίσθηκε το κυτταροπλασματικό από το μεμβρανικό κλάσμα σε ομογενοποιηήματα από διάφορους ιστούς επίμυα. Στα τρία κλάσματα που προέκυψαν, το ολικό, το κυτταροπλασματικό και το ολικό μεμβρανικό, ακολούθησε η ανίχνευση των ισομορφών της PKC με χρήση SDS PAGE και ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα Image J.

Αρχικά σε ομογενοποίημα από ιστό εγκεφαλικού φλοιού, ιππόκαμπου, μυοκαρδιακού μύος και πνευμονικού παρεγχύματος επίμυα, ανιχνεύθηκαν οι ισομορφές α και ε της PKC στα τρία υποκυτταρικά κλάσματα (Εικόνα 39). Παρατηρούμε ότι και οι δύο ισομορφές βρίσκονται σε αφθονία και στους τέσσερεις αυτούς ιστούς. Η παρουσία των ισομορφών α και ε στους ιστούς αυτούς είναι πιο έντονη στο ολικό και κυτταροπλασματικό κλάσμα, γεγονός που συνάδει με τη βιβλιογραφία αφού τα ζώα δεν έλαβαν καμία φαρμακολογική ή συμπεριφορική αγωγή που να προκαλέσει ενεργοποίηση των ισομορφών της PKC και επομένως τη μετακίνησή τους στο μεμβρανικό κλάσμα.



Εικόνα 39. Πρωτεϊνική Κινάση (PKC) α και ε. Υποκυτταρική κλασμάτωση .

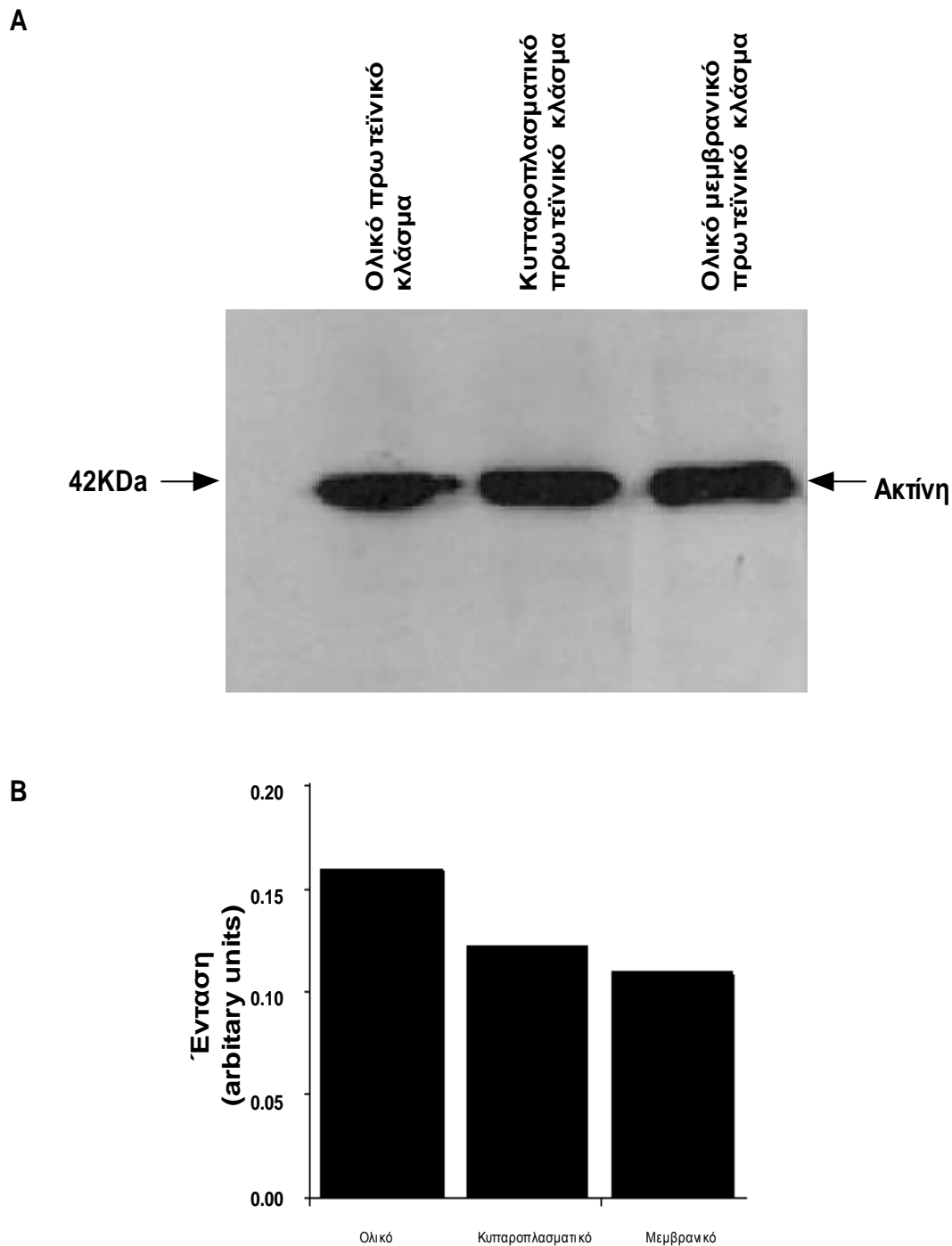
Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τις ισομορφές α και ε της PKC σε ομογενοποιηήματα εγκεφαλικού φλοιού, ιππόκαμπου, μυοκαρδίου και πνευμονικού ιστού επίμυα τα οποία έχουν διαχωρισθεί σε τρία υποκυτταρικά κλάσματα.

(t: ολικό πρωτεϊνικό κλάσμα, s: κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό κλάσμα και p: ολικό μεμβρανικό κλάσμα)

Η αραίωση των αντισωμάτων ήταν 1:1000 και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής φωσφατάσης.

Στη συνέχεια προχωρήσαμε με τη διαδικασία SDS PAGE και ανοσοανούπωση κατά Western σε ανίχνευση των ισομορφών α , β , γ και ϵ σε ομογενοποιημένα από ιππόκαμπο επίμους και στην απεικόνισή τους στα τρία υποκυτταρικά κλάσματα. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης ποσοτικοποιήθηκαν. Τα δείγματα προέρχονται από επίμους που δεν έχουν λάβει καμία φαρμακολογική αγωγή αλλά ούτε έχουν υποβληθεί σε συμπεριφορική δοκιμασία. Πρωτίστως, ελέγχθηκε η ορθότητα της τεχνικής της υποκυτταρικής κλασμάτωσης με απεικόνιση στα τρία κλάσματα της πρωτεΐνης ακτίνης. Η ακτίνη (42 kDa) είναι μια δομική πρωτεΐνη που συναντάται τόσο στο κυτταρόπλασματικό όσο και στο μεμβρανικό κλάσμα, δεν μεταβάλλεται η κατανομή της με ενεργοποίηση των κυττάρων και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ως δείκτης της ορθότητας της τεχνικής της υποκυτταρικής κλασμάτωσης. Όπως γίνεται εμφανές στην Εικόνα 40, η ακτίνη έχει την ίδια περίπου κατανομή στα δύο κλάσματα (κυτταροπλασματικό και ολικό μεμβρανικό).

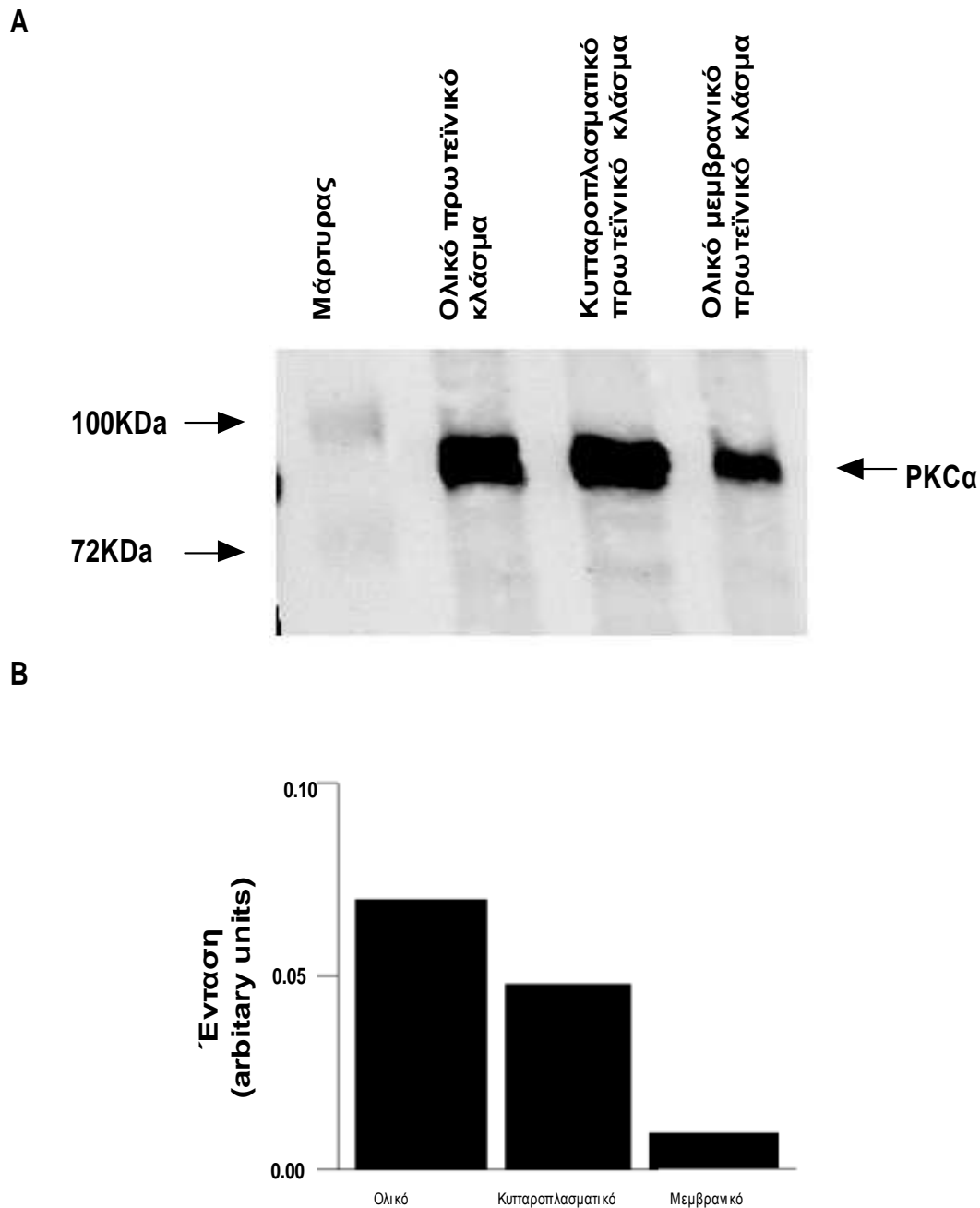
Στην Εικόνα 41 απεικονίζεται η κατανομή της ισομορφής α της PKC (82 kDa) στα τρία κλάσματα καθώς και η ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτών. Ομοίως, οι Εικόνες 42, 43 και 44 απεικονίζουν τις ισομορφές PKC β (80 kDa), PKC γ (80 kDa) και PKC ϵ (92 kDa) αντιστοίχως. Για όλες τις ισομορφές, όπως ήταν αναμενόμενο, η ποσότητα της πρωτεΐνης που ανιχνεύεται στο κυτταροπλασματικό κλάσμα είναι μεγαλύτερη από αυτή στο μεμβρανικό. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το γεγονός αυτό αποδεικνύει την παρουσία των ισομορφών της PKC στο κυτταρόπλασμα σε κατάσταση μη ενεργοποίησής τους.



Εικόνα 40. Ακτίνη. Υποκυτταρική κλασμάτωση και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε ιστό ιππόκαμπου επίμυα.

A. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την ακτίνη (MB 42KDa) σε ομογενοποιημένο ιστό ιππόκαμπου επίμυα ο οποίος έχει διαχωρισθεί σε υποκυτταρικά κλάσματα με τη μέθοδο της υποκυτταρικής κλασμάτωσης. Η αραίωση του αντισώματος ήταν 1:1000 και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής φωσφατάσης.

B. Συγκριτική αναπαράσταση της ποσοτικής κατανομής της ακτίνης στα υποκυτταρικά κλάσματα. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης για την ακτίνη με πυκνόμετρηση. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Image J. Ποσότητα πρωτεΐνης 15 µgr.

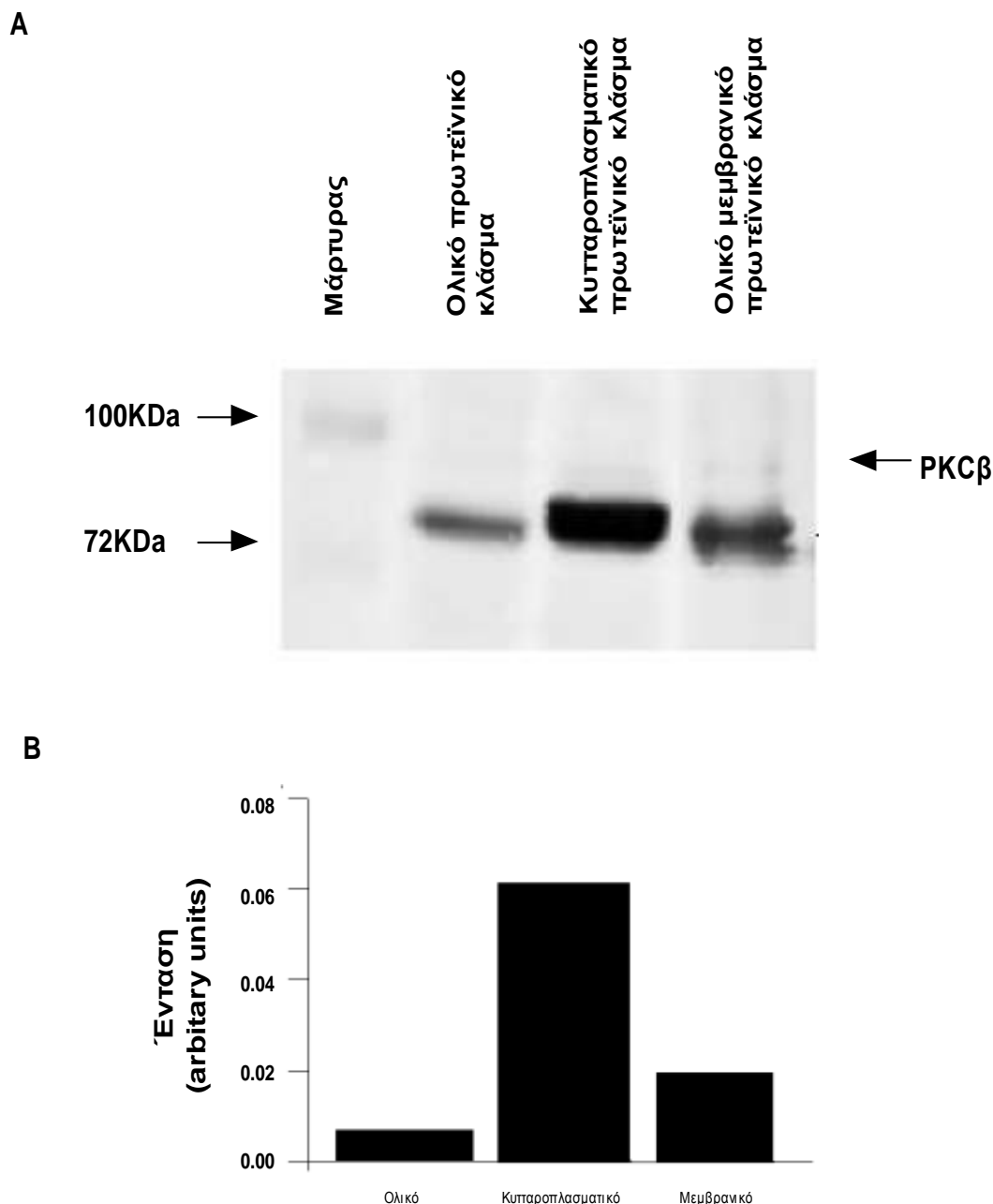


Εικόνα 41. Πρωτεϊνική Κινάση α (PKCα). Υποκυτταρική κλασμάτωση και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε ιστό ιπποκάμπτου επίμυα.

A. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την PKCα (MB 82KDa) σε ομογενοποιημένα ιπποκάμπτου ιστού επίμυα το οποίο έχει διαχωρισθεί σε υποκυτταρικά κλάσματα (ολικό πρωτεϊνικό κλάσμα, κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό κλάσμα και ολικό μεμβρανικό κλάσμα) με τη μέθοδο της υποκυτταρικής κλασμάτωσης.

Η αραίωση του αντισώματος ήταν 1:1000 και χρησιμοποιήθηκε ECL ως μέθοδος απεικόνισης.

B. Συγκριτική αναπαράσταση της ποσοτικής κατανομής της PKCα στα υποκυτταρικά κλάσματα. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης με πυκνόμετρηση. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Image J. Ποσότητα πρωτεΐνης 15 μgr.

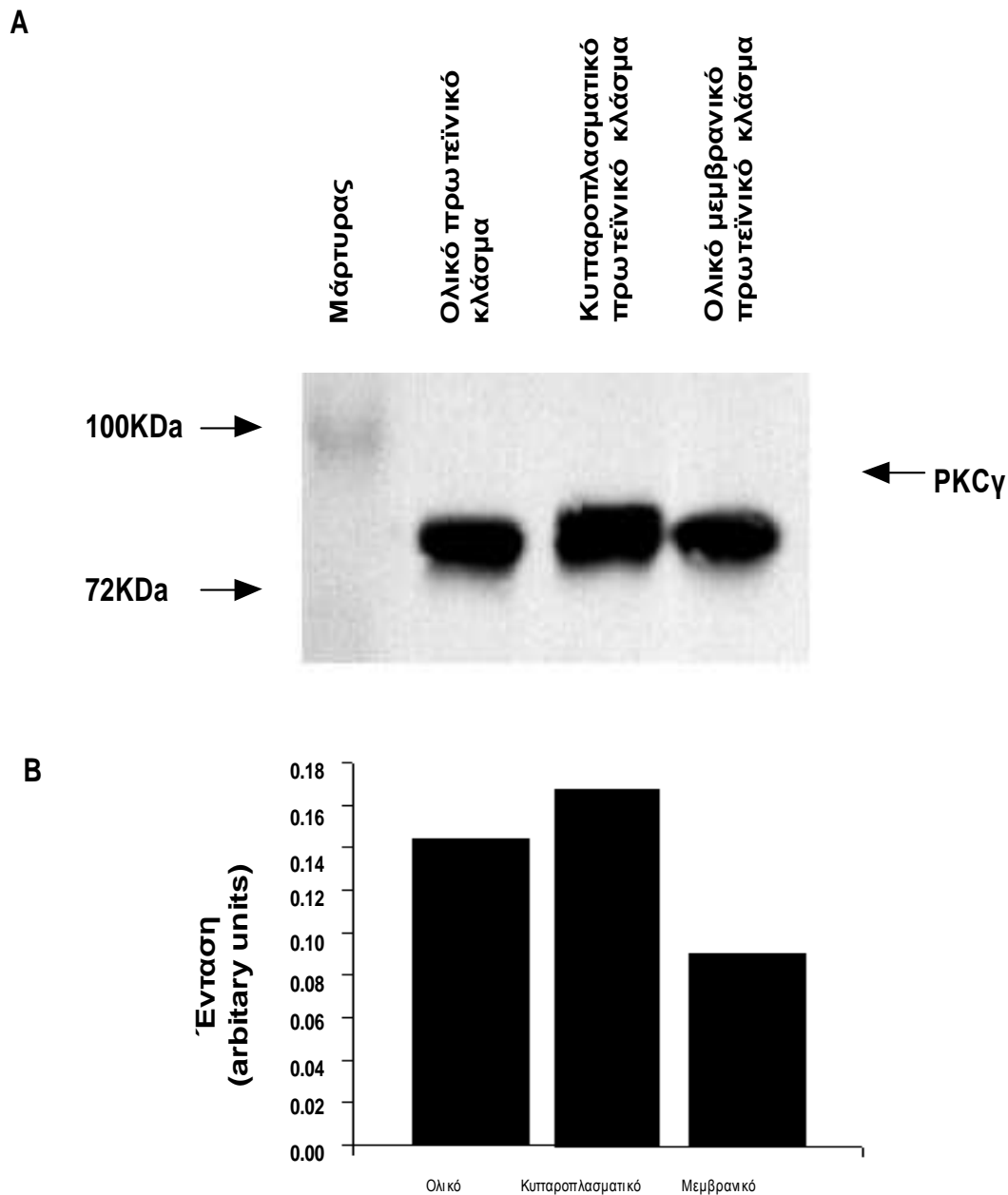


Εικόνα 42. Πρωτεϊνική Κινάση β (PKCβ). Υποκυτταρική κλασμάτωση και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε ιστό ιππόκαμπου επίμυα.

A. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την PKCβ (MW 80KDa) σε ομογενοποιημένο ιπποκάμπειο ιστό επίμυα το οποίο έχει διαχωρισθεί σε υποκυτταρικά κλάσματα (ολικό πρωτεϊνικό κλάσμα, κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό κλάσμα και ολικό μεμβρανικό κλάσμα) με τη μέθοδο της υποκυτταρικής κλασμάτωσης.

Η αραίωση για το αντίσωμα ήταν 1:1000 και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής φωσφατάσης.

B. Συγκριτική αναπαράσταση της ποσοτικής κατανομής της PKCβ στα υποκυτταρικά κλάσματα. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης με πυκνομέτρηση και χρήση του προγράμματος Image J. Ποσότητα πρωτεΐνης 30μg

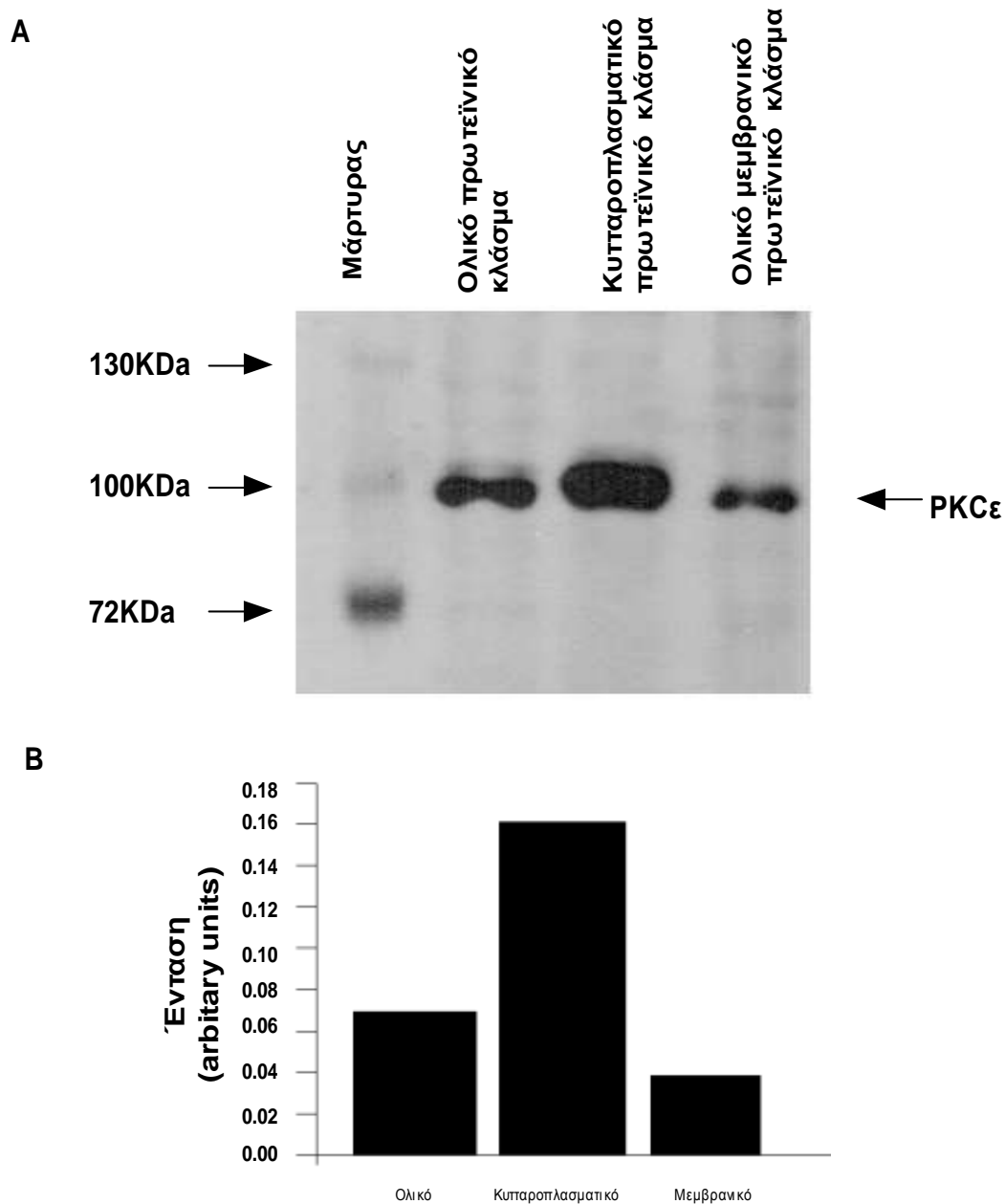


Εικόνα 43. Πρωτεϊνική Κινάση γ (PKCγ). Υποκυτταρική κλασμάτωση και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε ιστό ιππόκαμπου επίμουα.

A. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την PKCγ (MB 80KDa) σε ομογενοποιημένο ιπποκάμπειο ιστό επίμουα το οποίο έχει διαχωρισθεί σε υποκυτταρικά κλάσματα (ολικό πρωτεϊνικό κλάσμα, κυταροπλασματικό πρωτεϊνικό κλάσμα και ολικό μεμβρανικό κλάσμα) με τη μέθοδο της υποκυτταρικής κλασμάτωσης.

Η αραιώση για το αντίσωμα ήταν 1:1000 και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής φωσφατάσης.

B. Συγκριτική αναπαράσταση της ποσοτικής κατανομής της πρωτεϊνικής κινάσης γ στα υποκυτταρικά κλάσματα. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης για την PKCγ με πυκνομέτρηση με χρήση του προγράμματος Image J. Ποσότητα πρωτεΐνης 15μgr.



Εικόνα 44. Πρωτεϊνική Κινάση ε (PKCε). Υποκυτταρική κλασμάτωση και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε ιστό ιππόκαμπου επίμυα.

A. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την PKCε (MW 92KDa) σε ομογενοποιημένο ιπποκάμπειο ιστό επίμυα το οποίο έχει διαχωρισθεί σε υποκυτταρικά κλάσματα (ολικό πρωτεϊνικό κλάσμα, κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό κλάσμα και ολικό μεμβρανικό κλάσμα) με τη μέθοδο της υποκυτταρικής κλασμάτωσης.

Η αραίωση για το αντίσωμα ήταν 1:1000 και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ECL.

B. Συγκριτική αναπαράσταση της ποσοτικής κατανομής της πρωτεϊνικής κινάσης ε στα υποκυτταρικά κλάσματα. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης για την PKCε με πυκνομέτρηση με χρήση του προγράμματος Image J. Ποσότητα πρωτεΐνης 15μg.

8.2. Απεικόνιση Της Ενεργοποίησης Της PKC Στον Ιππόκαμπο Επίμυα Ύστερα Από Ετερόπλευρη Ενδοϊπποκάμπεια Έγχυση Του Μη Εκλεκτικού Ενεργοποιητή Της PKC, 4-β PMA.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και όπως προελέχθηκε, ο 4-β PMA (4-β phorbol 12 myristate 13 acetate) προκαλεί μη ειδική ενεργοποίηση όλων των ισομορφών της PKC. Οι φορβολικοί εστέρες όπως ο PMA, επηρεάζουν τις PKCs μιμούμενοι το φυσικό ενεργοποιητή, τη διακυλογλυκερόλη. Ένα συχνά χρησιμοποιούμενο όνομα για τον PMA είναι το 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA). Η ενεργοποίηση των PKCs από το PMA προκαλεί τη μετακίνησή τους από το κυτταροπλασματικό προς τα μεμβρανικά τμήματα του κυττάρου.

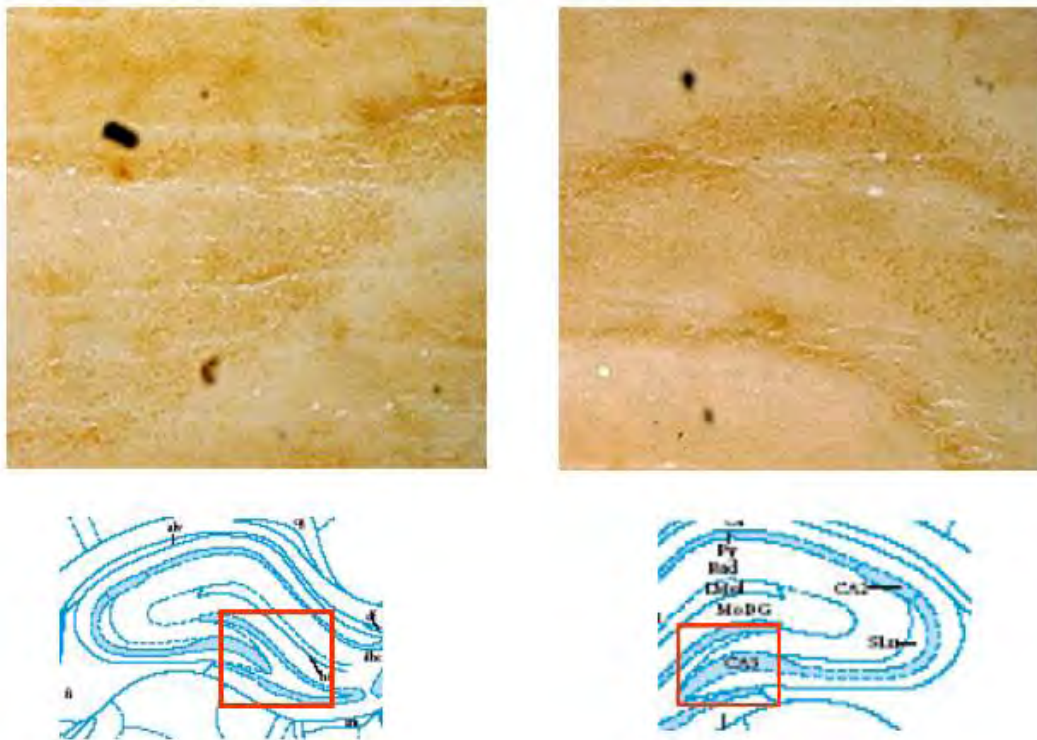
Έτσι, σε αρσενικούς επίμυες Wistar, βάρους περίπου 300 mg και ενώ βρίσκονταν σε βαθιά αναισθησία με κεταμίνη-ξυλαζίνη, τοποθετήθηκαν αμφοτερόπλευρα ενδοϊπποκάμπειες κάνουλες (C315I, C315IDC, C315G, PlasticOne, USA) στις συντεταγμένες AP:-3.8, L:±2, V:2.2 σύμφωνα με τον άτλαντα των Paxinos & Watson (5η έκδοση). Τα ζώα παρουσίασαν ομαλή μετεγχειρητική πορεία και ανάρρωσαν πλήρως. Την πέμπτη μετεγχειρητική ημέρα έγινε η έγχυση 3μl 4-β PMA σε συγκέντρωση $10^{-6}M$, ετερόπλευρα στον ιππόκαμπο του ενός ημισφαιρίου. Το έτερο ημισφαίριο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και έγινε έγχυση ίσου όγκου τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού (η παραπάνω τεχνική περιγράφεται εκτενώς στο κεφάλαιο της μεθοδολογίας). Μετά την πάροδο 20 λεπτών, τα ζώα υπέστησαν ακαριαία θανάτωση με αποκεφαλισμό και στα μισά από αυτά ο εγκέφαλος παρασκευάστηκε και κόπηκε σε τομές πάχους 30 μm για ανοσοϊστοχημική ανάλυση ενώ στα υπόλοιπα ζώα απομονώθηκε ο ιππόκαμπος για να ακολουθήσει ομογενοποίηση και διαχωρισμός σε υποκυτταρικά κλάσματα.

8.2.1. Ανίχνευση Της Ενεργοποίησης Της PKC Μετά Την Ενδοϊπποκάμπεια Έγχυση Του Μη Εκλεκτικού Ενεργοποιητή 4-β PMA Με Χρήση Ανοσοϊστοχημικής Μεθόδου

Με τη χρήση ανοσοϊστοχημικής μεθόδου είναι δυνατή η απεικόνιση του αποτελέσματος της ενεργοποίησης σε συγκεκριμένες ανατομικές δομές του εγκεφάλου, όπως ο ιππόκαμπος που είναι στην περίπτωση αυτή η υπό μελέτη περιοχή. Καθώς η ανίχνευση των ενεργοποιημένων ισοενζύμων της PKC δεν καθίσταται δυνατή λόγω περιορισμένων αντισωμάτων, αποφασίσαμε να αποδείξουμε με έμμεσο τρόπο την ενεργοποίηση της PKC μέσω της φωσφορυλίωσης των υποστρωμάτων της.

Η πρωτεΐνη MARCKS είναι μια ευρέως διαδεδομένη πρωτεΐνη στο κύτταρο που συνδέεται με τα ινίδια ακτίνης. Κατά την ενεργοποίηση της PKC, η MARCKS φωσφορυλιώνεται σε υπολλείμματα σερίνης. Έτσι, η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη MARCKS (p-MARCKS) που αποτελεί υπόστρωμα της ενεργοποιημένης PKC, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση τόσο της ενεργοποίησης όσο και της αναστολής της PKC.

Με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της p-MARCKS σε αραιώση 1:1000 χρωματίστηκαν τομές ιππόκαμπου 30 μm . Στο ημισφαίριο του εγκεφάλου που έλαβε τον μη εκλεκτικό ενεργοποιητή της PKC, PMA, απεικονίσθηκαν τα θετικά για p-MARCKS κύτταρα στην περιοχή του ιππόκαμπου ενώ στο αντίπλευρο ημισφαίριο – μάρτυρα δεν απεικονίζονται με την ίδια πυκνότητα (Εικόνα 45). Τα ευρήματα αυτά είναι έμμεση απόδειξη της ενεργοποίησης της PKC μετά την ενδοϊπποκάμπεια έγχυση του 4 β PMA.



Εικόνα 45. Απεικόνιση της p-MARCKS σε τομές ιππόκαμπου επίμυα μετά από ενδοϊπποκάμπεια έγχυση PMA 10^{-6} M.

A. Απεικόνιση της p-MARCKS στον ιππόκαμπο του ημισφαιρίου στο οποίο έγινε έγχυση τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού (aCSF).

B. Απεικόνιση της p-MARCKS στην περιοχή του πρόσθιου ιππόκαμπου του ημισφαιρίου όπου έγινε έγχυση PMA σε συγκέντρωση 10^{-6} M.

Στο ημισφαίριο που έγινε η έγχυση του PMA παρατηρείται αύξηση της ανοσοδραστικότητας της πρωτεΐνης σε σύγκριση με το αντίπλευρο ημισφαίριο στο οποίο εγχύθηκε aCSF και το οποίο χρησίμευσε ως μάρτυρας. Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί την τοπική ενεργοποίηση της PKC.

Η θανάτωση του ζώου επήλθε μετά από 20 λεπτά από τη στιγμή της έγχυσης.

Χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της p-MARCKS (1:1000).

Ανάλυση 100x.

Τομές πάχους 30 μm στις οποίες έγινε χρώση με ανοσοϊστοχημική μέθοδο (SA-HPR).

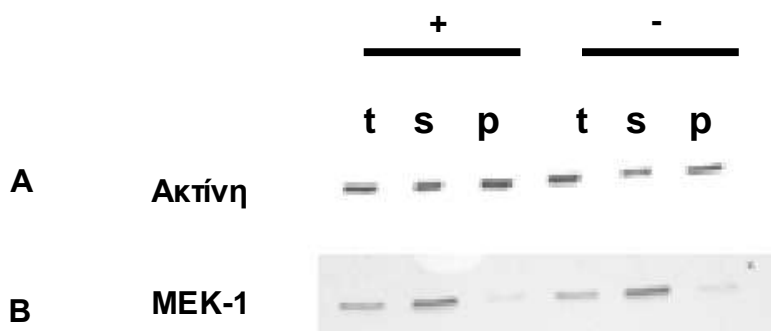
(DG: οδοντωτή έλικα)

8.2.2. Ανίχνευση Της Ενεργοποίησης Της PKC Μετά Την Ενδοϊπποκάμπεια Έγχυση Του Μη Εκλεκτικού Ενεργοποιητή 4-β PMA Με Χρήση Ανοσοαποτύπωσης Κατά Western Σε Ομογενοποιημένα Ιππόκαμπου Επίμια Τα Οποία Έχουν Διαχωρισθεί Με Τη Μέθοδο Του Υποκυτταρικού Διαχωρισμού

Με τη διαδικασία SDS-PAGE και της ανοσοαποτύπωσης κατά Western έγινε προσπάθεια ανίχνευσης της ενεργοποίησης της PKC στον ιππόκαμπο που έλαβε τον μη εκλεκτικό ενεργοποιητή σε σύγκριση με τον αντίπλευρο ιππόκαμπο. Κατά την ενεργοποίηση της PKC, οι ενεργοποιημένες ισομορφές της PKC μετακινούνται από το κυτταρόπλασμα στα μεμβρανικά τμήματα του κυττάρου. Ακόμη, προκαλείται ενεργοποίηση των πρωτεϊνών που λαμβάνουν μέρος στο σηματοδοτικό μονοπάτι της PKC. Επομένως, η μεταβολή της ποσοτικής κατανομής της PKC στα τρία υποκυτταρικά κλάσματα καθώς και η ανίχνευση ενεργοποιημένων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σηματοδοτική οδό της κινάσης, αποτελούν δείκτες της ενεργοποίησης της PKC.

Αρχικά για την πιστοποίηση της ορθότητας της τεχνικής απεικονίζουμε την πρωτεΐνη ακτίνη στους δύο ιππόκαμπους, στα τρία υποκυτταρικά κλάσματα (Εικόνα 46A). Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα για ακτίνη σε αραίωση 1:4000. Παρατηρούμε ότι η ποσότητα της ακτίνης δεν μεταβάλλεται, ανεξάρτητα από την έγχυση ή όχι του PMA και ανεξάρτητα από το υποκυτταρικό κλάσμα. Στη συνέχεια αποτυπώσαμε την πρωτεΐνη MEK-1, η οποία είναι μια αποκλειστικά κυτταροπλασματική πρωτεΐνη. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα σε αραίωση 1:1000 (Εικόνα 46B). Η αποκλειστική παρουσία της πρωτεΐνης αυτής στο κυτταροπλασματικό κλάσμα τόσο στα δείγματα που προέρχονται από ιππόκαμπο που έλαβε PMA όσο και από τον ιππόκαμπο-μάρτυρα αποτελεί ακόμη μια πιστοποίηση της ορθότητας του διαχωρισμού.

Τέλος, απεικονίσαμε την ποσοτική κατανομή των ισοενζύμων α , γ και ϵ της PKC στα υποκυτταρικά κλάσματα από ομογενοποιημένα ιππόκαμπου που έλαβαν PMA και από τον αντίπλευρο ιππόκαμπο - μάρτυρα. Στην Εικόνα 47 φαίνεται η μεταβολή της ποσοτικής κατανομής των ισοενζύμων ανάμεσα στο κυτταροπλασματικό και στο ολικό μεμβρανικό κλάσμα. Στον ιππόκαμπο - μάρτυρα όλα τα ισοένζυμα φαίνεται να υπερέχουν ποσοτικά στο κυτταροπλασματικό κλάσμα ενώ στον ιππόκαμπο που έγινε η έγχυση του ενεργοποιητή παρατηρείται μια μεταβολή της ποσότητας της πρωτεΐνης υπέρ του ολικού μεμβρανικού κλάσματος. Το γεγονός αντικατοπτρίζει την μετακίνηση των ενεργοποιημένων PKCs από το κυτταρόπλασμα προς τα μεμβρανικά διαμερίσματα.



Εικόνα 46. Ενδοϊπποκάμπεια ετερόπλευρη έγχυση PMA 10^{-6} M σε εγκέφαλο επίμυος. Έλεγχος της ορθότητας της τεχνικής της υποκυτταρικής κλασμάτωσης με απεικόνιση της ακτίνης και της πρωτεΐνης MEK-1 στα τρία υποκυτταρικά κλάσματα με χρήση της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την ακτίνη σε αραιώση 1:4000 και για την MEK-1 σε αραιώση 1:1000. Μπορεί να διακριθεί η ισότιμη ανίχνευση της ακτίνης και στα τρία υποκυτταρικά κλάσματα τόσο στο ημισφαίριο που έλαβε το PMA όσο και στο ημισφαίριο-μάρτυρας ενώ η πρωτεΐνη MEK-1 εντοπίζεται μόνο στο ολικό και κυτταροπλασματικό κλάσμα και στα δύο ημισφαίρια, ανεξάρτητα από την έγχυση του PMA.

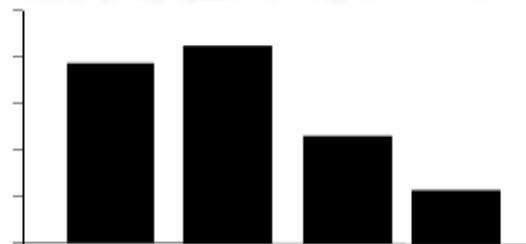
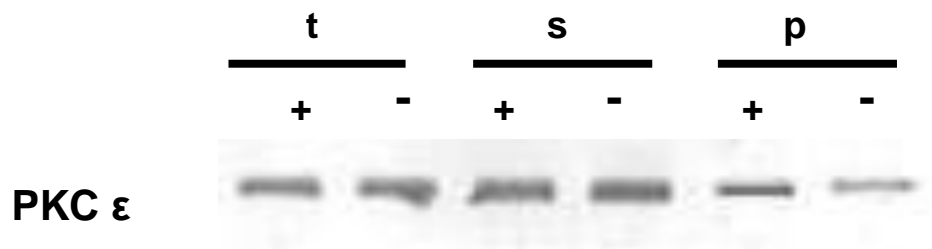
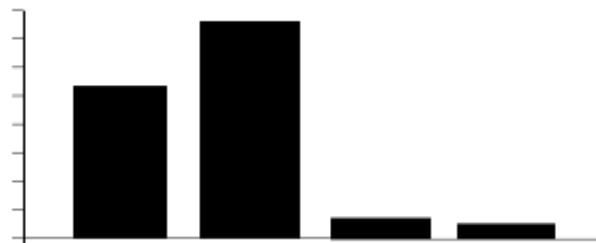
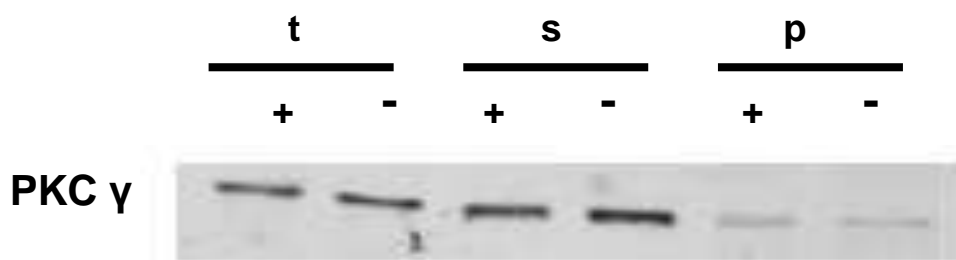
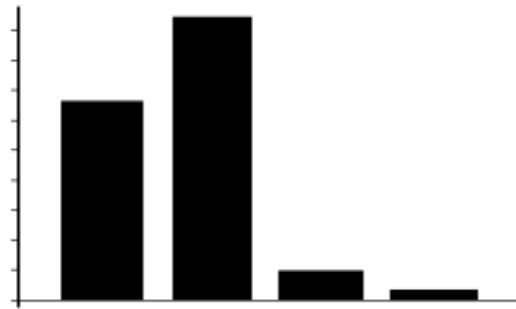
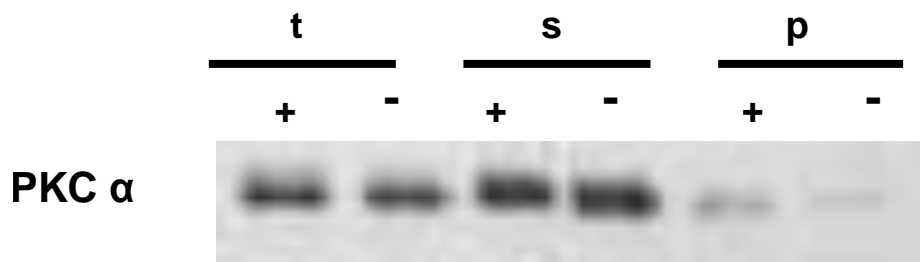
Η ποσότητα όλων των δειγμάτων ήταν 15μgr πρωτεΐνης.

(+: δείγματα που προέρχονται από το ημισφαίριο όπου έγινε η έγχυση του TPA, t: ολικό πρωτεϊνικό κλάσμα, s: κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό κλάσμα και p: ολικό μεμβρανικό κλάσμα)

Εικόνα 47. (Απέναντι σελίδα) Ενδοϊπποκάμπεια ετερόπλευρη έγχυση PMA 10^{-6} M σε εγκέφαλο επίμυα. Έλεγχος της ενεργοποίησης των ισομορφών α, γ και ε της πρωτεϊνικής κινάσης C. Υποκυτταρική κλασμάτωση και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων .

Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τις ισομορφές α, γ και ε της πρωτεϊνικής κινάσης C σε αραιώση 1:1000 στα τρία υποκυτταρικά κλάσματα. Συγκριτική αναπαράσταση της ποσοτικής κατανομής των ισομορφών. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης για τις ισομορφές με πυκνομέτρηση με χρήση του προγράμματος Image J.

Η ποσότητα της πρωτεΐνης κάθε δείγματος ήταν 15μgr. (+: δείγματα που προέρχονται από το ημισφαίριο που έγινε η ενδοϊπποκάμπεια έγχυση, t: ολικό πρωτεϊνικό κλάσμα, s: κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό κλάσμα p: ολικό μεμβρανικό κλάσμα) με τη μέθοδο της υποκυτταρικής κλασμάτωσης.



9. Αποτελέσματα Συμπεριφορικών Δοκιμασιών

Όταν οι χρόνοι εξερεύνησης μεταξύ των διαφόρων ομάδων των επίμυων συγκρίθηκαν σχετικά με ό,τι αφορά τη φύση των αντικειμένων (κύβοι, πυραμίδες ή κύλινδροι) και την τοποθεσία αυτών (αριστερά ή δεξιά) μέσα στην πειραματική συσκευή, δεν διαπιστώθηκε καμία διαφορά κατά την διάρκεια της δοκιμής εκπαίδευσης (T1) σε όλα τα συμπεριφορικά πειράματα που έλαβαν χώρα.

9.1. Έλεγχος Της Επίδρασης Των Μετατρεπτικών Της Κατάστασης Ενεργοποίησης Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Πεπτιδίων Στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου Σε Επίμυες

9.1.1. Επίδραση Του Μεταφορικού Πεπτιδίου Tat Στη Συμπεριφορά Των Επίμυων

Πείραμα 1: Έλεγχος της επίδρασης του Tat πεπτιδίου στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται πριν από την δοκιμή εκπαίδευσης (T1) και με χρονικό διάστημα τα 90 λεπτά από τη στιγμή της χορήγησης.

Η συνολική ανάλυση του συνολικού χρόνου εξερεύνησης δεν ανέδειξε διαφορές στα επίπεδα των συνολικών χρόνων εξερεύνησης μεταξύ των διαφόρων ομάδων και μεταξύ των δοκιμών [$F(1, 60)=2.823, P=0.098$, μη σημαντικό, μ.σ.]. Η αξιολόγηση του Δείκτη Διάκρισης D, δεν ανέδειξε διαφορές μεταξύ της ομάδας των μαρτύρων και της ομάδας των επίμυων που έλαβαν το Tat πεπτίδιο [$F(1, 30)=0.00782, P=0.930$, μ.σ.] (Πίνακας 1).

Όλα τα ζώα διέκριναν το νέο (N) από το γνωστό αντικείμενο (F).

Πείραμα 2: Έλεγχος της επίδρασης του Tat πεπτιδίου στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται αμέσως μετά από την δοκιμή εκπαίδευσης (T1) και με χρονικό διάστημα τα 90 λεπτά από τη στιγμή της χορήγησης.

Η συνολική ανάλυση του συνολικού χρόνου εξερεύνησης δεν ανέδειξε διαφορές στα επίπεδα των συνολικών χρόνων εξερεύνησης μεταξύ των διαφόρων ομάδων κατά την δοκιμή επιλογής (T2) [$F(1, 24)=0.0200, P=0.889$, μ.σ.]. Η αξιολόγηση του Δείκτη Διάκρισης D, δεν ανέδειξε διαφορές μεταξύ της ομάδας των μαρτύρων και της ομάδας των επίμυων που έλαβαν το Tat πεπτίδιο [$F(1, 24)=0.00853, P=0.927$, μ.σ.] (Πίνακας 2).

Όλα τα ζώα διέκριναν το νέο (N) από το γνωστό αντικείμενο (F).

Πείραμα 3: Έλεγχος της επίδρασης του Tat πεπτιδίου στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται πριν από την δοκιμή εκπαίδευσης και με χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο δοκιμών τις 24 ώρες.

Η συνολική ανάλυση του συνολικού χρόνου εξερεύνησης δεν ανέδειξε διαφορές στα επίπεδα των συνολικών χρόνων εξερεύνησης μεταξύ των διαφόρων ομάδων και μεταξύ των

δοκιμών [$F(1, 37)=0.005$, $P=0.942$, μ.σ.]. Η αξιολόγηση του Δείκτη Διάκρισης D, δεν ανέδειξε διαφορές μεταξύ της ομάδας των μαρτύρων και της ομάδας των επίμυων που έλαβαν το Tat πεπτίδιο [$F(1, 18)=0.64$, $P=0.435$, μ.σ.] (Πίνακας 3).

Όλα τα ζώα διέκριναν το νέο (N) από το γνωστό αντικείμενο (F).

Πείραμα 4: Έλεγχος της επίδρασης του Tat πεπτιδίου στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται αμέσως μετά από την δοκιμή εκπαίδευσης και με χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο δοκιμών τις 24 ώρες.

Η συνολική ανάλυση του συνολικού χρόνου εξερεύνησης δεν ανέδειξε διαφορές στα επίπεδα των συνολικών χρόνων εξερεύνησης μεταξύ των διαφόρων ομάδων κατά τη δοκιμή επιλογής [$F(1, 20)=0.827$, $P=0.375$, μ.σ.]. Η αξιολόγηση του Δείκτη Διάκρισης D, δεν ανέδειξε διαφορές μεταξύ της ομάδας των μαρτύρων και της ομάδας των επίμυων που έλαβαν το Tat πεπτίδιο [$F(1, 20)=0.306$, $P=0.587$, μ.σ.] (Πίνακας 4).

Όλα τα ζώα διέκριναν το νέο (N) από το γνωστό αντικείμενο (F).

Παρατηρούμε λοιπόν πως, όπως έχει ήδη αποδειχθεί, το μεταφορικό πεπτίδιο Tat δεν έχει κανέναν βιολογικό ρόλο και δεν επηρεάζει τη συμπεριφορά των ζώων.

Στην παρούσα μελέτη, στα πειράματα για τον έλεγχο της επίδρασης των μετατρεπτικών της κατάσταση ενεργοποίησης της PKC ε πεπτιδίων που είναι συζευγμένα με το μεταφορικό Tat πεπτίδιο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μόνο ομάδες ζώων που έλαβαν φυσιολογικό ορό (NaCl 0.9%). Ο παράγοντας Tat θεωρήθηκε ότι δεν επηρεάζει τη μνήμη των επίμυων καθώς τα πειράματα 1, 2, 3 και 4 απέδειξαν πως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες των ζώων που έλαβαν φυσιολογικό ορό και στις ομάδες των ζώων που έλαβαν το πεπτίδιο Tat σε δόση 0.2 mg/kg τόσο στην συνολική κινητικότητα όσο και στον δείκτη Διάκρισης και ανεξάρτητα από τη χρονική στιγμή χορήγησης και το χρονικό διάστημα μεταξύ των δοκιμών.

Πίνακας 1.
Επίδραση της χορήγησης του Tat πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Αντικειμένου όταν χορηγείται 20 λεπτά πριν από την δοκιμή εκπαίδευσης και με χρονικό διάστημα μεταξύ των δοκιμών τα 70 λεπτά.

Πειραματικές Ομάδες	Ολικός χρόνος	Εξερεύνησης (s.)	Δείκτης Διάκρισης D	n
	T1	T2	T2	
Μάρτυρες (φυσιολογικός ορός)	11.21±1.04	13.86±1.04	0.39±0.07	14
Πεπτιδίο Tat (0.2 mg/kg)	14.00±0.92	12.33±0.92	0.38±0.07	18

Τα δεδομένα εκφράζονται σε μέση τιμή±σταθερή απόκλιση (means ± SEM). n: αριθμός επίμυων ανά πειραματική ομάδα.

Πίνακας 2.
Επίδραση της χορήγησης του Tat πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Αντικειμένου όταν χορηγείται αμέσως μετά από την δοκιμή εκπαίδευσης και με χρονικό διάστημα μεταξύ των δοκιμών τα 90 λεπτά.

Πειραματικές Ομάδες	Ολικός χρόνος	Εξερεύνησης (s)	Δείκτης Διάκρισης D	n
		T2	T2	
Μάρτυρες (φυσιολογικός ορός)		13.86±2.05	0.39±0.07	14
Πεπτιδίο Tat (0.2 mg/kg)		13.50±1.30	0.39±0.05	12

Τα δεδομένα εκφράζονται σε μέση τιμή±σταθερή απόκλιση (means ± SEM). n: αριθμός επίμυων ανά πειραματική ομάδα.

Πίνακας 3.

Επίδραση της χορήγησης του Tat πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Αντικειμένου όταν χορηγείται 20 λεπτά πριν από την δοκιμή εκπαίδευσης και με χρονικό διάστημα μεταξύ των δοκιμών τις 24 ώρες.

Πειραματικές Ομάδες	Ολικός χρόνος	Εξερεύνησης (s.)	Δείκτης Διάκρισης D	n
	T1	T2	T2	
Μάρτυρες (φυσιολογικός ορός)	11.8±0.32	11.70±1.20	0.13±0.07	10
Πεπτίδιο Tat (0.2 mg/kg)	13.67±1.93	13.56±1.90	0.07±0.02	9

Τα δεδομένα εκφράζονται σε μέση τιμή±σταθερή απόκλιση (means ± SEM). n: αριθμός επίμυων ανά πειραματική ομάδα.

Πίνακας 4.

Επίδραση της χορήγησης του Tat πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Αντικειμένου όταν χορηγείται αμέσως μετά από την δοκιμή εκπαίδευσης και με χρονικό διάστημα μεταξύ των δοκιμών τις 24 ώρες.

Πειραματικές Ομάδες	Ολικός χρόνος	Εξερεύνησης (s)	Δείκτης Διάκρισης D	n
		T2	T2	
Μάρτυρες (φυσιολογικός ορός)		11.20±1.25	0.13±0.09	10
Πεπτίδιο Tat (0.2 mg/kg)		13.09±1.62	0.09±0.02	11

Τα δεδομένα εκφράζονται σε μέση τιμή±σταθερή απόκλιση (means ± SEM). n: αριθμός επίμυων ανά πειραματική ομάδα.

9.1.2. Επίδραση Του Ανασταλτικού Της ΡΚCε Πεπτιδίου, εV1-2, Στη Συμπεριφορά Των Επίμυων

Πείραμα 5: Έλεγχος της επίδρασης διαφορετικών δόσεων του εV1-2 πεπτιδίου στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται πριν από την δοκιμή εκπαίδευσης.

Η ανάλυση των συνολικών χρόνων εξερεύνησης έδειξε μια σημαντική επίδραση των δοκιμών [$F(1, 37)=4.7, P=0.037$], αλλά δεν έδειξε επίδραση του εV1-2 πεπτιδίου [$F(2, 37)=1.7, P=0.33, \mu.σ.$] ή σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του εV1-2 πεπτιδίου και των δοκιμών [$F(2, 37)=0.1, P=0.9, \mu.σ., \text{Γραφ. Παράσταση 1A}$]. Τα αποτελέσματα του Δείκτη Διάκρισης D έδειξαν ότι τα ζώα που έλαβαν το πεπτίδιο εV1-2 δεν ήταν ικανά να διακρίνουν το νέο (N) από το γνωστό (F) αντικείμενο κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής ($T2$) σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες [$F(2, 37)=15.01, P<0.001$; Duncan's post hoc test; $P<0.05$ έναντι των ομάδων εV1-2 0.1 και 0.2 mg/kg, Γραφ. Παράσταση 1B].

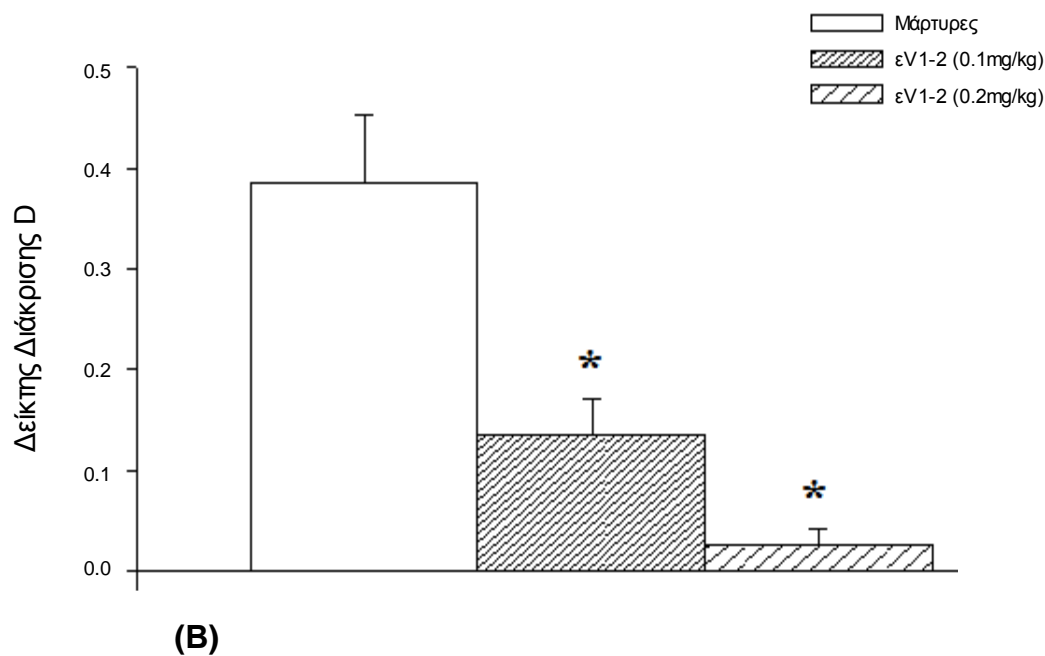
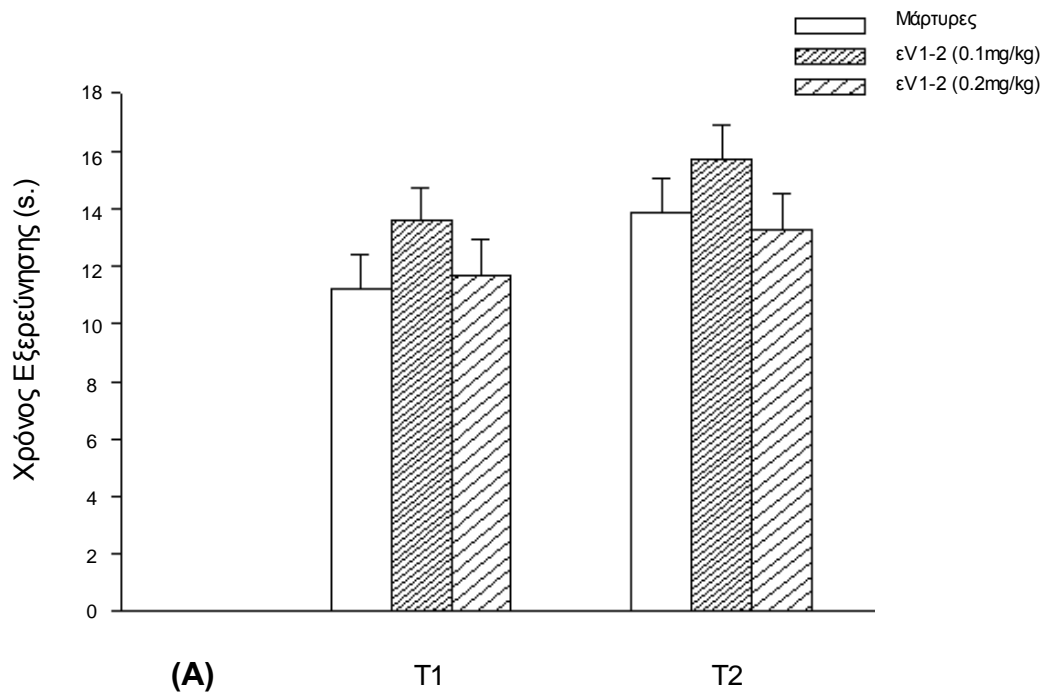
Παρατηρούμε από τα παραπάνω ότι το πεπτίδιο εV1-2 όταν χορηγείται πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης (και στις δύο δόσεις, 0.2 και 0.1 mg/kg) προκαλεί ελλείματα στην μνημονική ικανότητα των επίμυων σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων χωρίς όμως να προκαλεί διαφορές στη συνολική εξερευνητική δραστηριότητα αυτών.

Πείραμα 6: Έλεγχος της επίδρασης διαφορετικών δόσεων του εV1-2 πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται αμέσως μετά από τη δοκιμή εκπαίδευσης.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής ($T2$), τα συνολικά επίπεδα εξερεύνησης δεν διέφεραν μεταξύ των τριών πειραματικών ομάδων [$F(2, 33)=2.73, P=0.08, \text{Γραφ. Παράσταση 2A}$]. Τα δεδομένα για τον δείκτη D έδειξαν μια σημαντική επίδραση του πεπτιδίου [$F(2, 33)=7.52, P=0.002, \text{Γραφ. Παράσταση 2B}$]. Οι συγκρίσεις Post-hoc αποδεικνύουν ότι τα ζώα που έλαβαν το εV1-2 πεπτίδιο δεν μπόρεσαν να διακρίνουν το νέο (N) από το γνωστό (F) αντικείμενο κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής ($T2$) σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες ($P<0.05$).

Παρατηρούμε από τα παραπάνω ότι το πεπτίδιο εV1-2 όταν χορηγείται αμέσως μετά από τη δοκιμή εκπαίδευσης (και στις δύο δόσεις, 0.2 και 0.1 mg/kg) προκαλεί ελλείματα στην μνημονική ικανότητα των επίμυων σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων χωρίς όμως να προκαλεί διαφορές στη συνολική εξερευνητική δραστηριότητα αυτών.

Γραφική Παράσταση 1



Γραφική Παράσταση 1 (Α, Β) Επίδραση διαφορετικών δόσεων του εV1-2 πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται πριν από την δοκιμή εκπαίδευσης (T1).

Όλοι οι φαρμακολογικοί παράγοντες χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά, 20 λεπτά πριν τη δοκιμή εκπαίδευσης (T1).

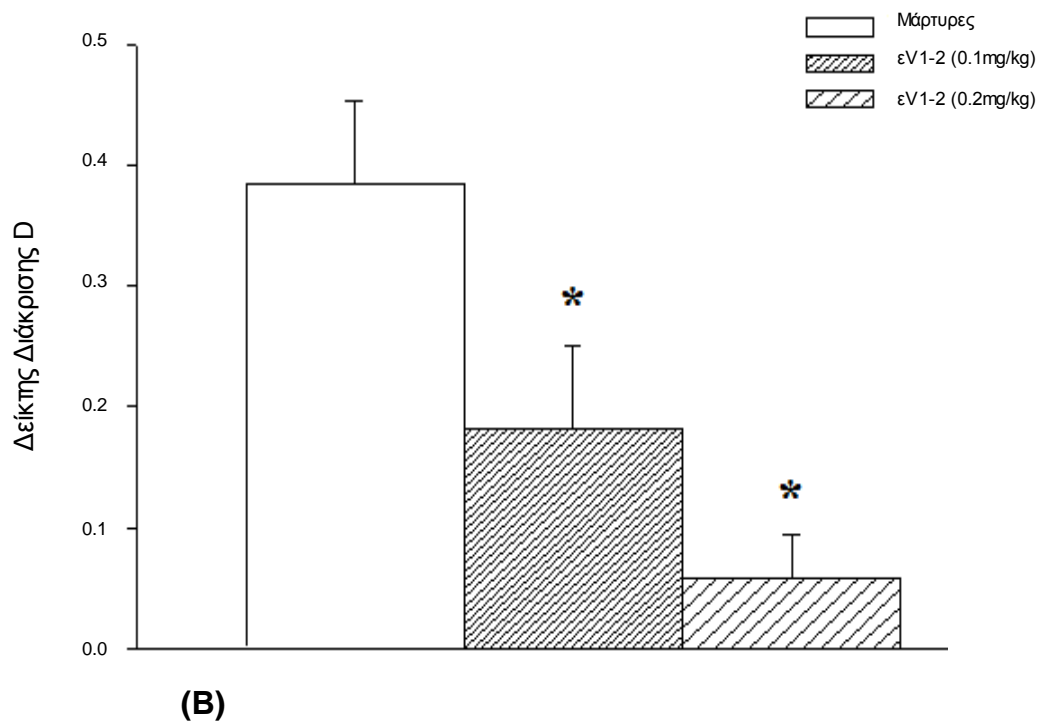
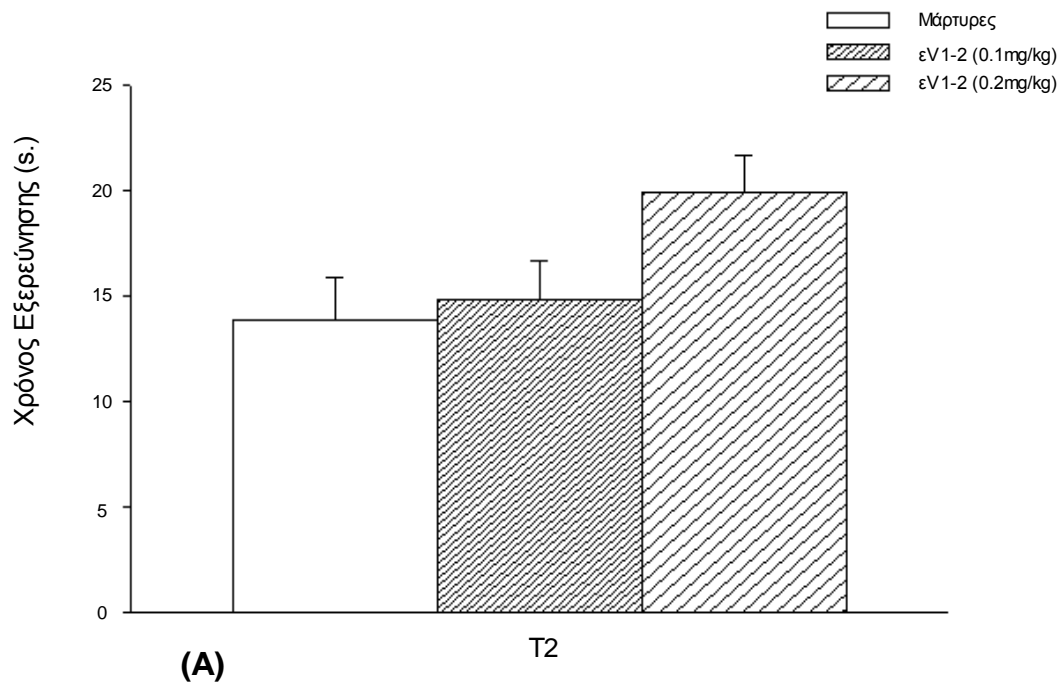
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι±τυπικά σφάλματα (mean±S.E.M).

A. Συνολικός χρόνος εξερεύνησης των τριών ομάδων επίμυων κατά τη διάρκεια των δοκιμών εκπαίδευσης (T1) και επιλογής (T2) στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

B. Δείκτης Διάκρισης D των τριών ομάδων επίμυων κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής (T2) στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

* $P < 0.05$ έναντι της ομάδας των μαρτύρων

Γραφική Παράσταση 2



Γραφική Παράσταση 2 (Α, Β) Επίδραση διαφορετικών δόσεων του εV1-2 πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται πριν από την δοκιμή εκπαίδευσης (T1).

Όλοι οι φαρμακολογικοί παράγοντες χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά, αμέσως μετά τη δοκιμή εκπαίδευσης (T1).

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι±τυπικά σφάλματα (mean±S.E.M).

A. Συνολικός χρόνος εξερεύνησης των τριών ομάδων επίμυων κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής (T2) στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

B. Δείκτης Διάκρισης D των τριών ομάδων επίμυων κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής (T2) στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

* $P < 0.05$ έναντι της ομάδας των μαρτύρων.

9.1.3. Επίδραση Του Ενεργοποιητικού Της ΡΚCε Πεπτιδίου, ψεRACK, Στη Συμπεριφορά Των Επίμυων

Πείραμα 7: Έλεγχος της επίδρασης διαφορετικών δόσεων του ψεRACK πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης.

Η ανάλυση των συνολικών χρόνων εξερεύνησης δεν έδειξε σημαντική επίδραση των δοκιμών [$F(1, 55)=0,184, P=0.672, \mu.σ.$], ή επίδραση του ψεRACK πεπτιδίου [$F(2, 55)=2,504, P=0.102, \mu.σ.$] ή σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του ψεRACK πεπτιδίου και των δοκιμών [$F(2, 55)= 2,647, P=0.091, \mu.σ.$, Γραφ. Παράσταση 3A]. Τα αποτελέσματα του Δείκτη Διάκρισης D έδειξαν ότι τα ζώα που έλαβαν το πεπτίδιο ψεRACK ήταν ικανά να διακρίνουν το νέο (N) από το γνωστό (F) αντικείμενο κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής (T2) σε αντίθεση με τα ζώα μάρτυρες [$F(2, 27)=6,590, P=0.005, \text{Duncan's post hoc test; } P<0.05$ έναντι των ομάδων ψεRACK 0.1 και 0.2 mg/kg, Γραφ. Παράσταση 3B].

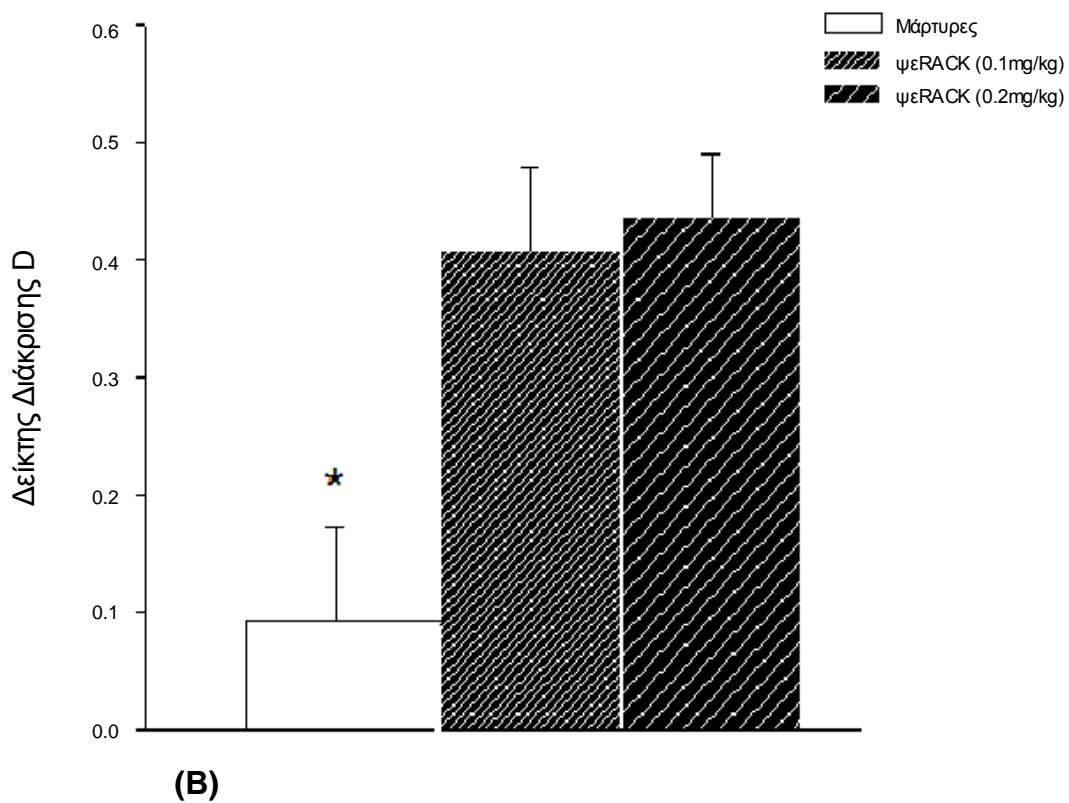
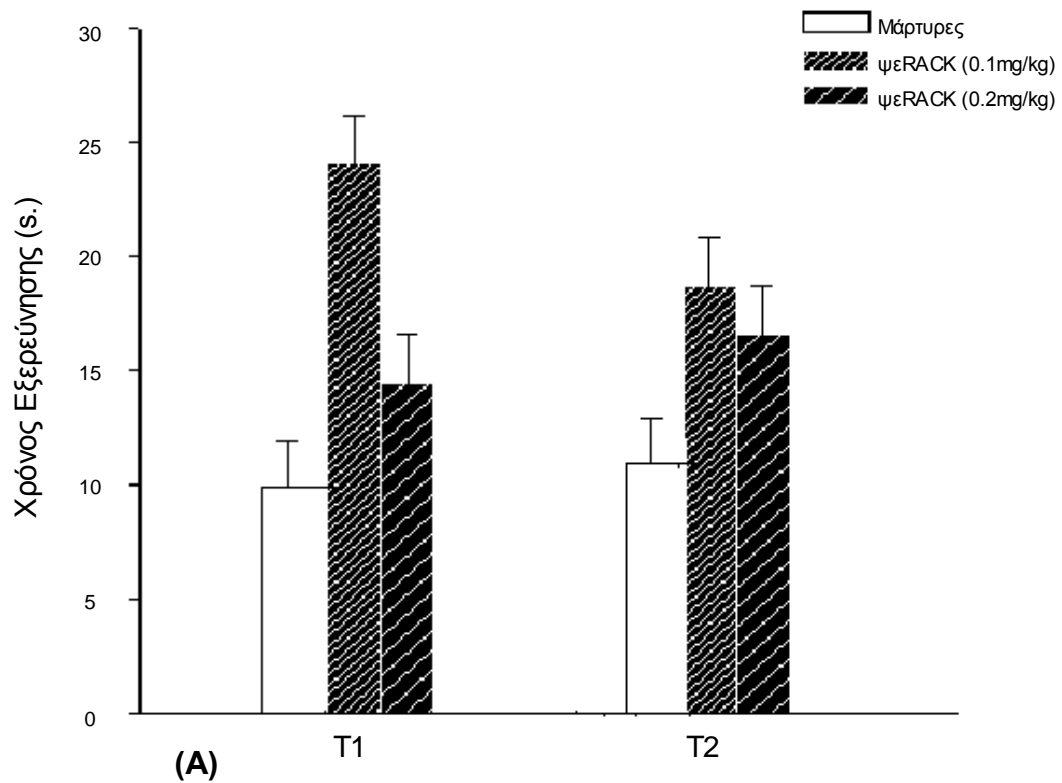
Παρατηρούμε ότι οι ομάδες των επίμυων που έλαβαν το πεπτίδιο ψεRACK πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης, μπορούν να διακρίνουν το νέο από το γνωστό αντικείμενο κατά τη δοκιμή επιλογής μετά την πάροδο 24 ωρών, σε αντίθεση με την ομάδα των μαρτύρων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το πεπτίδιο μπορεί να αναστρέψει τα ελλείμματα μνήμης που φυσιολογικά παρατηρούνται μετά από διάστημα 24 ωρών στη συμπεριφορική αυτή δοκιμασία.

Πείραμα 8: Έλεγχος της επίδρασης διαφορετικών δόσεων του ψεRACK πεπτιδίου στην απόδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται αμέσως μετά από τη δοκιμή εκπαίδευσης.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής (T2), τα συνολικά επίπεδα εξερεύνησης δεν διέφεραν μεταξύ των τριών πειραματικών ομάδων [$F(2, 31)=1,810, P=0,182, \mu.σ.$, Γραφ. Παράσταση 4A]. Τα δεδομένα για τον δείκτη D δεν αναδεικνύουν σημαντική επίδραση του ψεRACK πεπτιδίου [$F(2, 31)=0,489, P=0.618, \mu.σ.$, Γραφ. Παράσταση 4B]. Τα ζώα που έλαβαν το ψεRACK πεπτίδιο δεν μπόρεσαν να διακρίνουν το νέο (N) από το γνωστό (F) αντικείμενο κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής (T2) όπως ισχύει και για τα ζώα μάρτυρες.

Στο πείραμα 8 παρατηρούμε ότι το πεπτίδιο ψεRACK δεν ασκεί καμία βιολογική δράση στους επίμυες όταν χορηγείται αμέσως μετά τη δοκιμή εκπαίδευσης. Τα ζώα - μάρτυρες παρουσιάζουν την ίδια ακριβώς συμπεριφορά με τα ζώα που έλαβαν το πεπτίδιο. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το πεπτίδιο ψεRACK όταν χορηγείται μετά από τη δοκιμή εκπαίδευσης δεν μπορεί να αναστρέψει τη φυσική αμνησία κατά τη δοκιμή επιλογής μετά τη πάροδο των 24 ωρών.

Γραφική Παράσταση 3



Γραφική Παράσταση 3 (Α, Β) Επίδραση διαφορετικών δόσεων του ψεRACK πεπτιδίου στην επίδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται πριν από την δοκιμή εκπαίδευσης (T1).

Όλοι οι φαρμακολογικοί παράγοντες χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά, 20 λεπτά πριν τη δοκιμή εκπαίδευσης (T1).

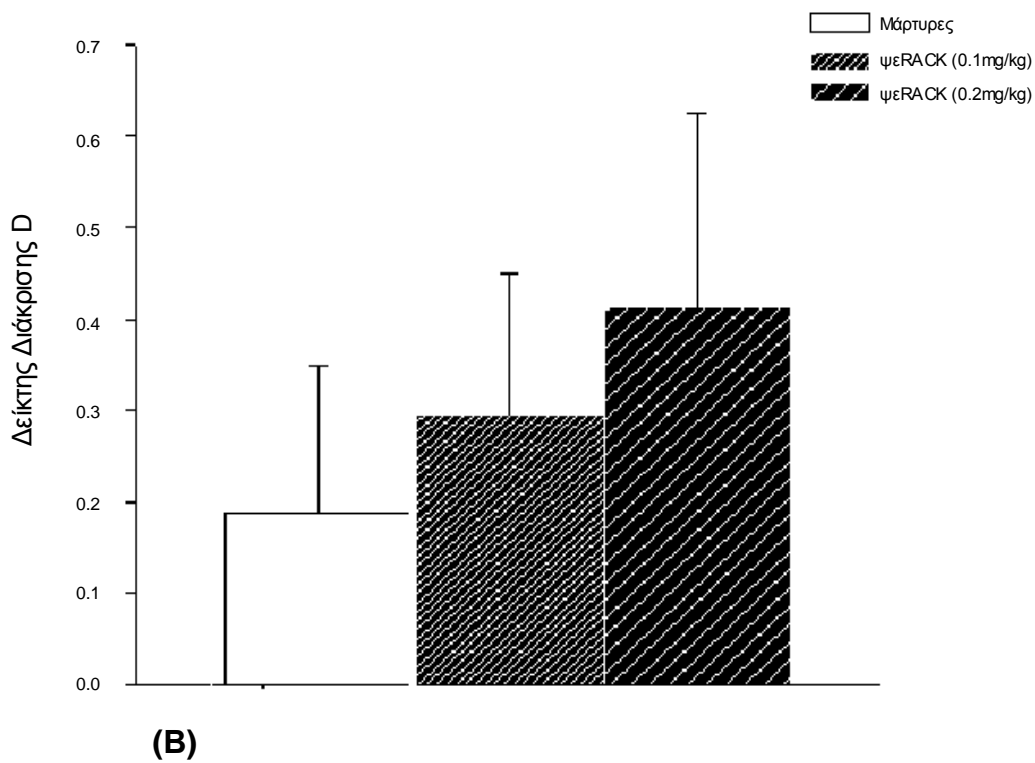
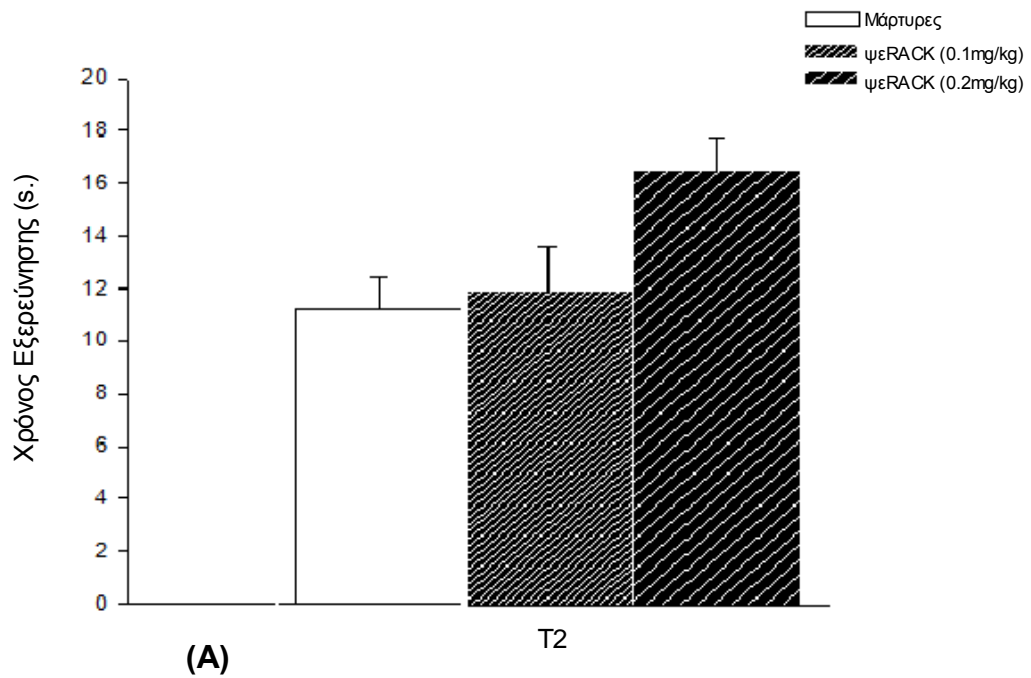
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι±τυπικά σφάλματα (mean±S.E.M).

A. Συνολικός χρόνος εξερεύνησης των τριών ομάδων επίμυων κατά τη διάρκεια των δοκιμών εκπαίδευσης (T1) και επιλογής (T2) στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

B. Δείκτης Διάκρισης D των τριών ομάδων επίμυων κατά τη διάρκεια των δοκιμών εκπαίδευσης (T1) και επιλογής (T2) στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

* $P<0.05$ έναντι όλων των άλλων ομάδων.

Γραφική Παράσταση 4



Γραφική Παράσταση 4 (Α, Β) Επίδραση διαφορετικών δόσεων του ψεRACK πεπτιδίου στην επίδοση των επίμυων κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν χορηγείται αμέσως μετά την δοκιμή εκπαίδευσης (T1).

Όλοι οι φαρμακολογικοί παράγοντες χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά, αμέσως μετά την δοκιμή εκπαίδευσης (T1).

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι±τυπικά σφάλματα (mean±S.E.M).

A. Συνολικός χρόνος εξερεύνησης των τριών ομάδων επίμυων κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής (T2) στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

B. Δείκτης Διάκρισης D των τριών ομάδων επίμυων κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής (T2) στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

* $P < 0.05$ έναντι όλων των άλλων ομάδων.

9.1.4. Επίδραση Της Συγχορήγησης Των Πεπτιδίων εV1-2 Και ψεRACK Στη Συμπεριφορά Των Επίμυων

Πείραμα 9: Έλεγχος της ικανότητας του πεπτιδίου ψεRACK να αναστρέφει τα ελλείμματα απόδοσης των επίμυων που προκαλεί το εV1-2 πεπτίδιο κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου, όταν αυτά συγχορηγούνται πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης.

Η συνολική ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για τα επίπεδα εξερεύνησης έδειξε μια μη στατιστικά σημαντική τριών - παραγόντων εV1-2 x ψεRACK x δοκιμές αλληλεπίδραση [$F(1, 88)=1.20, P=0.275, \mu.σ.$], μια μη σημαντική δύο - παραγόντων αλληλεπίδραση μεταξύ των πεπτιδίων εV1-2 και ψεRACK [$F(1, 88)=2.82, P=0.097, \mu.σ.$] και μεταξύ του πεπτιδίου εV1-2 και των δοκιμών [$F(1, 88) =0.95, P=0.34, \mu.σ.$]. Φανερό είναι η σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στο πεπτίδιο ψεRACK και στις δοκιμές [$F(1, 88)=5.69, P=0.019$]. Οι Post-hoc συγκρίσεις ανέδειξαν ότι η ομάδα των ζώων που έλαβαν το πεπτίδιο ψεRACK μαζί με φυσιολογικό ορό, εξερεύνησαν λιγότερο κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής (T2) σε σύγκριση με την απόδοση της ίδιας ομάδας κατά την δοκιμή εκπαίδευσης (T1) ($P<0.05$, Γραφ. Παράσταση 5A). Οι δείκτες D ανέδειξαν μια σημαντική κύρια επίδραση τόσο του πεπτιδίου εV1-2 [$F(1, 44)=23.36, P<0.001$] όσο και του πεπτιδίου ψεRACK [$F(1, 44)=12.19, P=0.001$] και μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των πεπτιδίων εV1-2 και ψεRACK [$F(1, 44)=6.04, P=0.018$]. Όλοι οι επίμυες, με εξαίρεση αυτούς της ομάδας στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός μαζί με το πεπτίδιο εV1-2, διάκριναν με στατιστικά σημαντική διαφορά καλύτερα το νέο (N) από το γνωστό (F) αντικείμενο [Duncan's post-hoc test; $P<0.05$, έναντι της ομάδας μάρτυρες συν πεπτίδιο εV1-2, Γραφ. Παράσταση 5B].

Όπως γίνεται εμφανές από την παραπάνω στατιστική ανάλυση των δεδομένων, το ενεργοποιητικό πεπτίδιο της PKCε, ψεRACK, αναστρέφει τα ελλείμματα μνήμης που προκαλεί το ανασταλτικό πεπτίδιο εV1-2 όταν αυτά συγχορηγούνται 20 λεπτά πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης (T1).

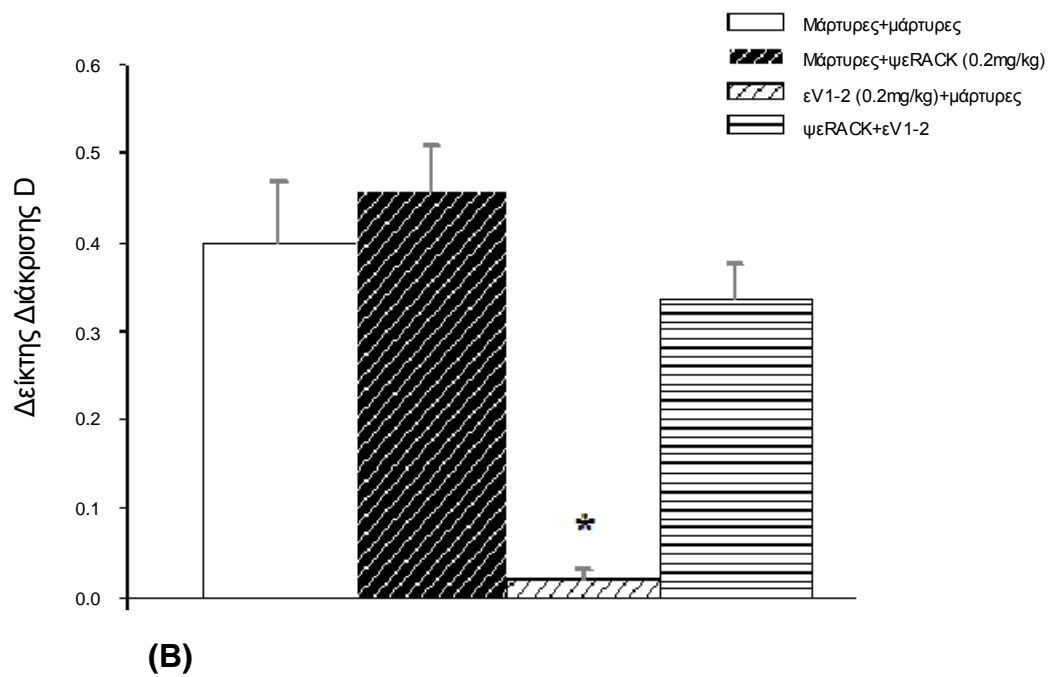
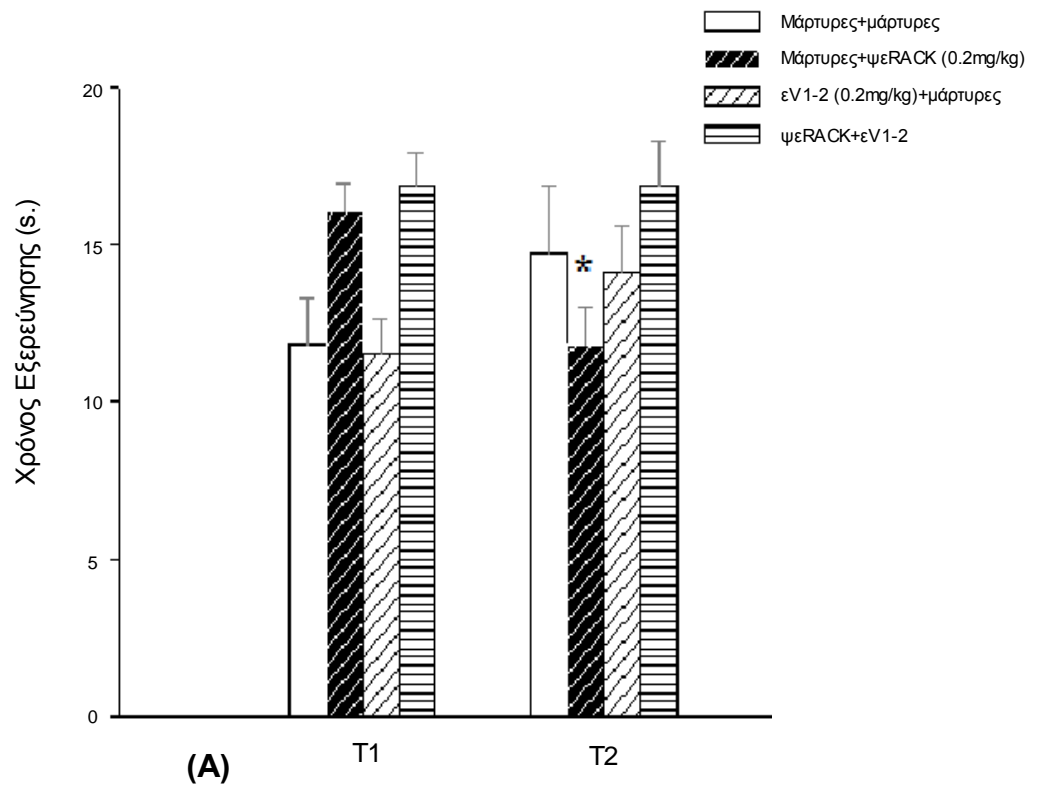
Πείραμα 10: Έλεγχος της ικανότητας του πεπτιδίου ψεRACK να αναστρέφει τα ελλείμματα απόδοσης των επίμυων που προκαλεί το εV1-2 πεπτίδιο κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου, όταν αυτά συγχορηγούνται αμέσως μετά από την δοκιμή εκπαίδευσης.

Τα επίπεδα των συνολικών χρόνων εξερεύνησης των πειραματικών ομάδων εμφανίζονται στη Γραφική Παράσταση 6A. Η ανάλυση των συνολικών χρόνων εξερεύνησης με χρήση ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων, έδειξε μια σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στα πεπτίδια εV1-2 και ψεRACK [$F(1, 52)=4.16, P<0.05$] καθώς και μια κύρια επίδραση του πεπτιδίου ψεRACK [$F(1, 52)=12.46, P<0.001$] αλλά όχι του πεπτιδίου εV1-2 [$F(1, 52)=2.5, P=0.12, \mu.σ.$]. Οι επίμυες που έλαβαν το πεπτίδιο εV1-2 παρουσίασαν μεγαλύτερη εξερευνητική δραστηριότητα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες [Tukey's post-hoc test; $P <0.05$ έναντι της ομάδας μάρτυρες συν πεπτίδιο εV1-2]. Τα

δεδομένα του Δείκτη Διάκρισης D, έδειξαν μια σημαντική κύρια επίδραση τόσο του πεπτιδίου εV1-2 [$F(1, 52)=15.28, P<0.001$] όσο και του πεπτιδίου ψεRACK [$F(1, 52)=16.04, P<0.001$] αντιστοίχως και μια σημαντική δύο - παραγόντων αλληλεπίδραση ανάμεσα στα πεπτίδια εV1-2 και ψεRACK [$F(1, 52)=9.34, P=0.004$]. Όλοι οι επίμυες, με εξαίρεση αυτούς της ομάδας στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός μαζί με το πεπτίδιο εV1-2, διάκριναν με στατιστικά σημαντική διαφορά καλύτερα το νέο (*N*) από το γνωστό (*F*) αντικείμενο [Duncan's post-hoc test; $P<0.05$ έναντι της ομάδας μάρτυρες συν πεπτίδιο εV1-2, Γραφ. Παράσταση 6B].

Το ενεργοποιητικό πεπτίδιο της PKCε, ψεRACK, αναστρέφει τα ελλείμματα μνήμης που προκαλεί το ανασταλτικό πεπτίδιο εV1-2 όταν αυτά συγχωρηγούνται αμέσως μετά από τη δοκιμή εκπαίδευσης (T1).

Γραφική Παράσταση 5



Γραφική Παράσταση 5 (A, B) Επίδραση του ψεRACK πεπτιδίου στο να αναστρέφει τα ελλείμματα απόδοσης που προκαλεί το εV1-2 πεπτίδιο κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν συγχωρηγούνται πριν από την δοκιμασία εκπαίδευσης (T1).

Οι φαρμακολογικοί παράγοντες χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά, 20 λεπτά πριν τη δοκιμασία εκπαίδευσης (T1).

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι±τυπικά σφάλματα (mean±S.E.M).

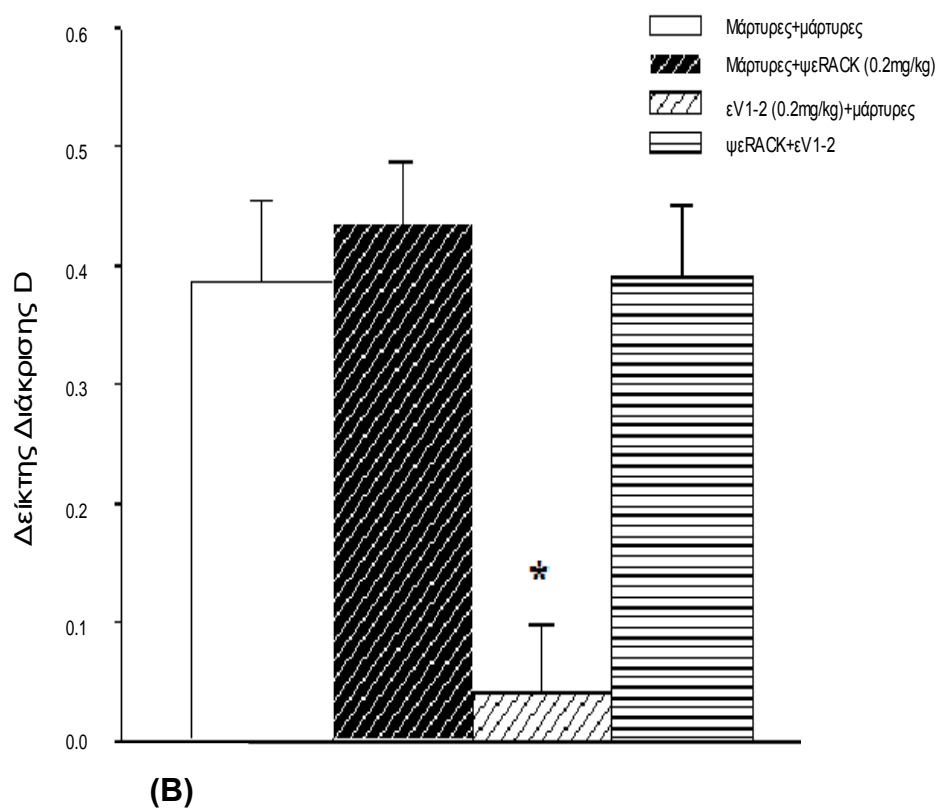
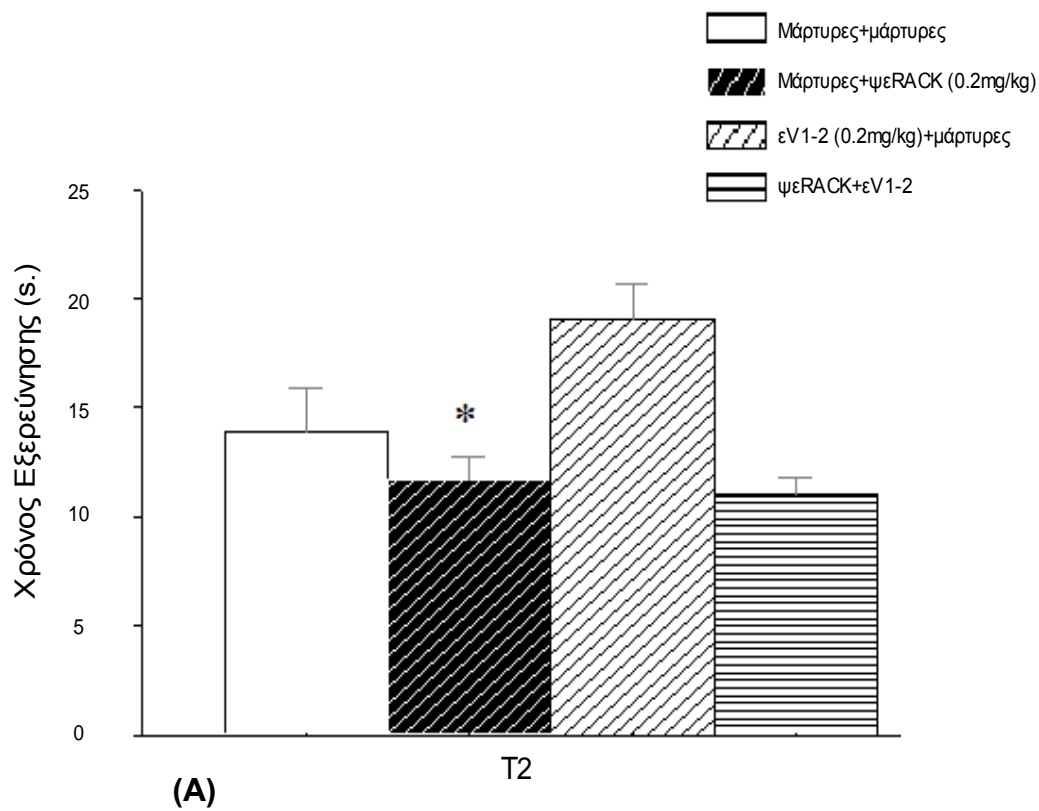
A. Συνολικός χρόνος εξερεύνησης των τεσσάρων ομάδων επίμυων κατά τη διάρκεια των δοκιμασιών εκπαίδευσης (T1) και επιλογής (T2) στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

* $P<0.05$ έναντι της ομάδας ψεRACK κατά τη διάρκεια της T1.

B. Δείκτης Διάκρισης D των τεσσάρων ομάδων επίμυων κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής (T2) στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

* $P<0.05$ έναντι όλων των άλλων ομάδων.

Γραφική Παράσταση 6



Γραφική Παράσταση 6 (A, B). Επίδραση του ψεRACK πεπτιδίου στο να αναστρέφει τα ελλείμματα απόδοσης που προκαλεί το εV1-2 πεπτίδιο κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου όταν συγχωρηγούνται αμέσως μετά την δοκιμασία εκπαίδευσης (T1).

Οι φαρμακολογικοί παράγοντες χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά, αμέσως μετά τη δοκιμασία εκπαίδευσης (T1).

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι±τυπικά σφάλματα (mean±S.E.M).

A. Συνολικός χρόνος εξερεύνησης των τεσσάρων ομάδων επίμυων κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής (T2) στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

* $P<0.05$ έναντι όλων των άλλων ομάδων.

B. Δείκτης Διάκρισης D των τεσσάρων ομάδων επίμυων κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής (T2) στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

* $P<0.05$ έναντι όλων των άλλων ομάδων.

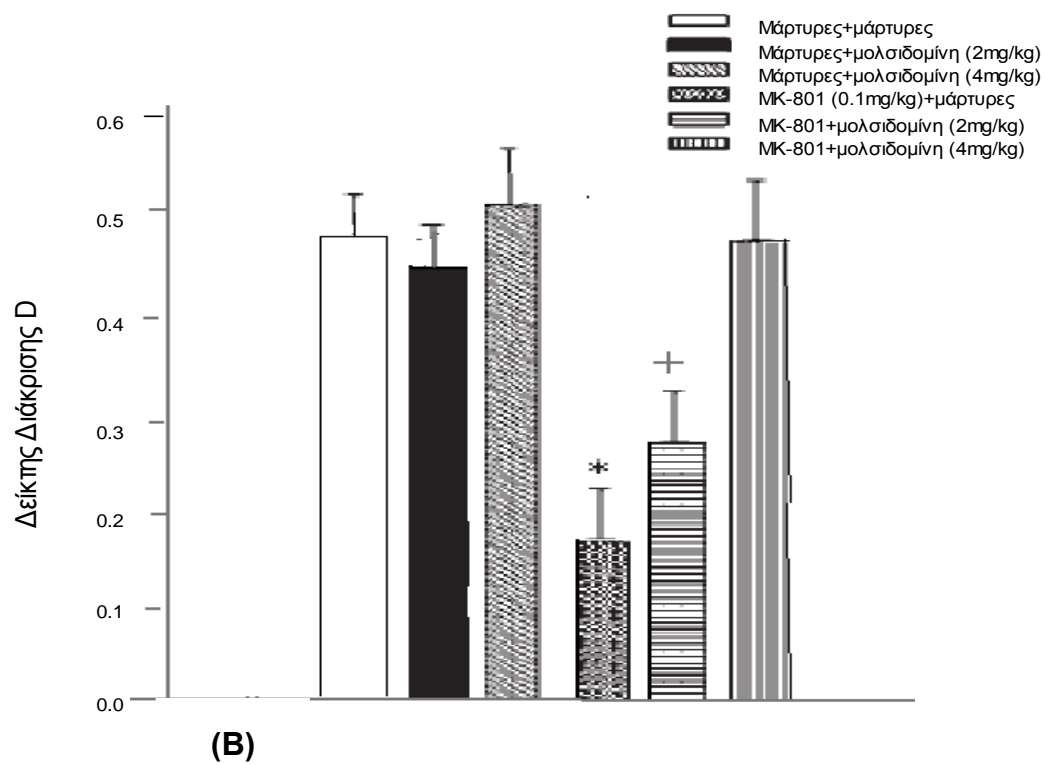
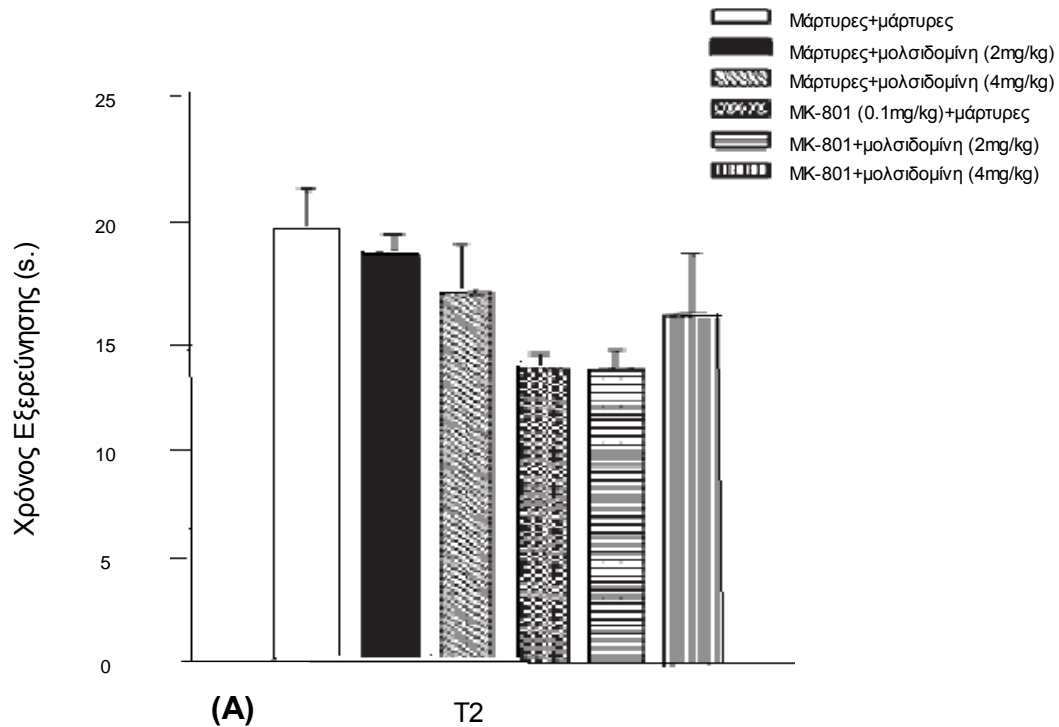
9.2. Έλεγχος Της Ικανότητας Του Δότη NO, Μολισδομίνη, Να Ανταγωνίζεται Τα ελλείμματα Μνήμης Που Προκαλεί Ο Ανταγωνιστής Των NMDA Υποδοχέων, MK-801, Στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου Σε Επίμυες

Πείραμα 11: Έλεγχος της ικανότητας του δότη NO, μολισδομίνη, να αναστρέφει τα ελλείμματα απόδοσης των επίμυων που προκαλεί ο MK-801 στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου, όταν αυτά χορηγούνται αμέσως μετά από την δοκιμή εκπαίδευσης.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της κινητικής δραστηριότητας έδειξε ότι τα συνολικά επίπεδα εξερεύνησης δεν διέφεραν μεταξύ των διαφόρων πειραματικών ομάδων. Η συνολική ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) δεν έδειξε σημαντική επίδραση τόσο του MK-801 [$F(5,54)=1.8$, $P=0.1$, μ.σ.] όσο και της μολισδομίνης [$F(5,54)=0.12$, $P=0.9$, μ.σ.] ή μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του MK-801 και της μολισδομίνης [$F(5,54)=0.7$, $P=0.5$, μ.σ.] (Γραφ. Παράσταση 7A). Τα δεδομένα για τον Δείκτη Διάκρισης D δείχνουν μια σημαντική κύρια επίδραση του MK-801 [$F(5,54)=12.1$, $P<0.01$] και της μολισδομίνης [$F(5,54)=3.4$, $P<0.05$] αλλά όχι σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του MK-801 και της μολισδομίνης [$F(5,54)=2.2$, $P=0.1$, μ.σ.]. Οι συγκρίσεις Post hoc έδειξαν ότι τα ζώα που έλαβαν μάρτυρες συν MK-801 δεν μπόρεσαν να διακρίνουν το νέο από το γνωστό αντικείμενο σε σχέση με τα ζώα που έλαβαν μάρτυρα συν μάρτυρα, και τα ζώα που έλαβαν MK-801 συν μολισδομίνη 4 mg/kg ($P < 0.05$). Ακόμη, η απόδοση των επίμυων που έλαβαν MK-801 συν μολισδομίνη 4 mg/kg δεν διέφερε από αυτή που είχαν τα ζώα στα οποία χορηγήθηκε μάρτυρες συν μολισδομίνης 4 mg/kg, και ήταν σημαντικά καλύτερη από την απόδοση που παρουσίασαν τα ζώα που έλαβαν MK-801 συν μολισδομίνη 2 mg/kg ($P < 0.05$). Επιπροσθέτως, η χαμηλότερη δόση της μολισδομίνης δεν προσφέρει καμία προστασία στα ζώα που έλαβαν το MK-801 (MK-801+μολισδομίνη 2 mg/kg έναντι MK-801+μάρτυρες, μ.σ; MK-801 έναντι μολισδομίνη 2 mg/kg έναντι μάρτυρα έναντι μολισδομίνη 2 mg/kg, $P < 0.05$, Γραφ. Παράσταση 7B).

Παρατηρούμε ότι ο δότης NO, μολισδομίνη, μπορεί να αναστρέφει τα ελλείμματα μνήμης που προκαλεί ο εκλεκτικός αγωνιστής των NMDA υποδοχέων, MK-801. Η ικανότητα αυτή φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενη, με τη μεγαλύτερη δόση της μολισδομίνης (4 mg/kg) να προκαλεί καλύτερη επίδοση των επίμυων σε σχέση με τα ζώα που έλαβαν τη μικρότερη δόση (2mg/kg), όταν αυτή συγχρηγείται με το MK-801

Γραφική Παράσταση 7



Γραφική Παράσταση 7 (Α, Β, Γ). Έλεγχος της ικανότητας της μολσιδομίνης να ανταγωνίζεται τα ελλείμματα μνήμης που προκαλεί το MK-801 κατά τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου σε επίμυες.

Το MK-801 και η μολσιδομίνη χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά, αμέσως μετά την δοκιμή εκπαίδευσης (T1).

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι±τυπικά σφάλματα (mean±S.E.M).

Α. Συνολική κινητικότητα των έξι ομάδων επίμυων κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής (T2) στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

* $P<0.05$ μάρτυρες+μάρτυρες έναντι MK-801+μάρτυρες, μάρτυρες+μολσιδομίνη 2 mg/kg έναντι. MK-801+μολσιδομίνη 2 mg/kg και μάρτυρες+μολσιδομίνη 4 mg/kg έναντι. MK-801+μολσιδομίνη 4 mg/kg.

Β. Συνολικός χρόνος εξερεύνησης των έξι ομάδων επίμυων κατά τη διάρκεια της T2 στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

Γ. Δείκτης Διάκρισης D της απόδοσης των έξι ομάδων επίμυων κατά τη διάρκεια της δοκιμής επιλογής (T2) στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου. * $P<0.05$ έναντι της ομάδας μάρτυρες+μάρτυρες και της ομάδας MK-801+μολσιδομίνη 4 mg/kg,

+ $P<0.05$ έναντι της ομάδας μάρτυρες+μολσιδομίνη 2 mg/kg και της ομάδας MK-801+μολσιδομίνη 4 mg/kg

(Pitsikas N, Zisopoulou S, Sakellaris N. Nitric oxide donor molsidomine attenuates psychotomimetic effects of theNMDA receptor antagonist MK-801. J Neurosci Res 2006;84:299–305)

Συζήτηση

10. Διερεύνηση Της Παρουσίας Και Της Ενεργοποίησης Των Ισομορφών Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Στον Ιππόκαμπο Επίμυα

Με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων σε τομές ιππόκαμπου επίμυα απεικονίσθηκαν κύτταρα θετικά για τις ισομορφές α και γ της PKC στην περιοχή CA1 καθώς και κύτταρα θετικά για την ισομορφή ε της PKC στις περιοχές CA3 και στην οδοντωτή έλικα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τον όγκο των δεδομένων της διεθνούς βιβλιογραφίας που υποστηρίζει ότι στις περιοχές αυτές του ιπποκάμπου οι τρεις αυτές ισομορφές της PKC, βρίσκονται σε αφθονία [270,299,317,362,363,456].

Με το πρωτόκολλο υποκυτταρικής κλασμάτωσης που αναπτύξαμε για ομογενοποιημένους ιστούς επίμυα, μπορέσαμε με την μέθοδο της ανοσοανοτύπωσης κατά Western, να διαχωρίσουμε την παρουσία των ισομορφών της PKC στα τρία βασικά υποκυτταρικά κλάσματα, το ολικό, το κυτταροπλασματικό και το μεμβρανικό καθώς και να ποσοτικοποιήσουμε την παρουσία αυτή. Όπως προέκυψε από ομογενοποιημένα εγκεφαλικού φλοιού, ιππόκαμπου, μυοκαρδιακού μυός και πνευμονικού παρεγχύματος, οι ισομορφές α και ε βρίσκονται σε αφθονία στους ιστούς αυτούς, γεγονός που συμφωνεί με τα μέχρι σήμερα δεδομένα. Ακόμη, παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωσή τους στο κυτταροπλασματικό κλάσμα σε σχέση με το μεμβρανικό, γεγονός που συνάδει με τη γνώση ότι η PKC σε κατάσταση ηρεμίας βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα [239].

Αφού επιβεβαιώσαμε την παρουσία της εPKC σε αφθονία στον εγκέφαλο και ιδιαίτερα στον ιπποκάμπειο σχηματισμό του επίμυα, αποδείξαμε ότι η ενδοϊπποκάμπεια έγχυση του μη ειδικού ενεργοποιητή της PKC, 4-β PMA προκαλεί μη ειδική ενεργοποίηση όλων των ισομορφών της PKC και επομένως τη μετακίνησή τους από το κυτταροπλασματικό προς τα μεμβρανικά τμήματα του κυττάρου.

Με χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων έγινε δυνατή η απεικόνιση του αποτελέσματος της ενεργοποίησης της PKC σε συγκεκριμένες ανατομικές δομές του εγκεφάλου, όπως ο ιπποκάμπειος σχηματισμός. Καθώς η ανίχνευση των ενεργοποιημένων ισοενζύμων της PKC είναι αρκετά δύσχερης λόγω του μικρού αριθμού των εξειδικευμένων για τις ενεργοποιημένες ισομορφές της PKC αντισωμάτων, αποφασίσαμε να αποδείξουμε με έμμεσο τρόπο την ενεργοποίηση της PKC μέσω της φωσφορυλίωσης ενός εκ των υποστρωμάτων της, της πρωτεΐνης MARCKS. Η ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης MARCKS (p-MARCKS) στις τομές εκείνες ιππόκαμπου που ήταν θετικές σε PMA είναι μια έμμεση απόδειξη της ενεργοποίησης της PKC.

Με χρήση της μεθόδου ανοσοανοτύπωσης κατά Western ανιχνεύθηκε η μεταβολή της ποσοτικής κατανομής των ισομορφών α, γ και ε της PKC υπέρ του μεμβρανικού κλάσματος

από ιππόκαμπο επίμυα που έλαβε PMA σε σύγκριση με τον ετερόπλευρο ιππόκαμπο που δεν έλαβε καμία φαρμακευτική χορήγηση. Το αποτέλεσμα μας αυτό συμφωνεί με την υπόθεση ότι κατά την ενεργοποίηση της PKC, οι ενεργοποιημένες ισομορφές της PKC μετακινούνται από το κυτταρόπλασμα στα μεμβρανικά τμήματα του κυττάρου [456].

11. Διερεύνηση Της Επίδρασης Των Ρυθμιστικών Της Κατάστασης Ενεργοποίησης Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Και Του Δότη NO Στην Αναγνωριστική Μνήμη Των Επίμυων

11.1 Ο Ρόλος Της ε Ισομορφής Της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Στην Αναγνωριστική Μνήμη Των Επίμυων

Στην πρώτη σειρά πειραμάτων προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε την επίδραση της ισομορφής ε της Πρωτεϊνικής Κινάσης C στην απόδοση των επίμυων σε μια συμπεριφορική δοκιμασία αναγνωριστικής μνήμης, τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

Τα ισοένζυμα της PKC συναντώνται σε αφθονία στον εγκέφαλο των θηλαστικών, ειδικά στον ιππόκαμπο μια σημαντική περιοχή για το σχηματισμό της μνήμης, όπως αναλύθηκε μέχρι τώρα. Η PKC εμπλέκεται σε διαδικασίες νευρωνικής πλαστικότητας και στις μεταβολές των νευρωνικών συνάψεων που συντελούνται κατά το σχηματισμό της μνήμης καθώς και στην επαγωγή και διατήρηση της μακροχρόνιας ενδυνάμωσης (LTP). Έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση αναστολέων της PKC βλάπτουν τη μνήμη ενώ η χορήγηση ενεργοποιητών της PKC διευκολύνουν το σχηματισμό της μνήμης.

Η εμπλοκή κλασικών PKCs, όπως π.χ PKC γ, στους μνημονικούς μηχανισμούς είναι καλά εδραιωμένη [320,346,245], ενώ υπάρχουν περιορισμένα πειραματικά δεδομένα για τα υπόλοιπα ισοένζυμα (λόγω κυρίως έλλειψης εκλεκτικών αναστολέων – ενεργοποιητών). Η εPKC είναι παρούσα κυρίως στον εγκέφαλο, στην καρδιά, στους πνεύμονες, αλλά και σε άλλα όργανα όπως το ήπαρ, κ.α. Η έκφραση της εPKC έχει συνδεθεί με νευρωνική διαφοροποίηση σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες. Ακόμη έχει προτάθει η συμμετοχή της στις αλλαγές της κατάστασης φωσφορλίωσης και έκφρασης του B50/GAP43.

Στη μελέτη αυτή αποφασίσαμε να ελέγξουμε εάν η εPKC, μια νέα ισομορφή της PKC που εκφράζεται σε μεγάλο ποσοστό στον εγκέφαλο και τους νευρώνες, διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη λειτουργική μνήμη των επίμυων χρησιμοποιώντας τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου. Για να το επιτύχουμε αυτό, χρησιμοποιήσαμε ως φαρμακολογικούς παράγοντες δύο πεππίδια που έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να μεταβάλλουν την κατάσταση ενεργοποίησης της PKCε τόσο *in vitro* (σε καλλιέργειες μυκαρδιακών, νευρικών κυττάρων) όσο και *in vivo* εάν χορηγηθούν συστηματικά (ενδοπεριτοναϊκή ή ενδαγγειακή) σε τρωκτικά ή χοίρους. Συγκεκριμένα, για να επιτύχουμε αναστολή της ενεργοποίησης της PKCε χρησιμοποιήσαμε το εκλεκτικό της εPKC ανασταλτικό πεππίδιο εV1-2 ενώ για την διευκόλυνση

της ενεργοποίησης της ισομορφής αυτής χρησιμοποιήσαμε το εκλεκτικό της εPKC ενεργοποιητικό πεπτιδίο, ψεRACK. Και τα δύο πεπτιδία, για να γίνει δυνατή η είσοδό τους στο κύτταρο διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, συνδέθηκαν αντιστρεπτά μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού με το μεταφορικό πεπτιδίο Tat. Τα πεπτιδία αυτά έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αλλάξουν τη δράση της εPKC στον εγκέφαλο των τρωκτικών μετά από συστηματική ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση [239,473].

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του Tat πεπτιδίου (πριν και μετά τη δοκιμή εκπαίδευσης), δεν έχει καμιά επίδραση στην εξερευνητική συμπεριφορά (χρόνο εξερεύνησης) των επίμυων αλλά και στην ικανότητά τους για διάκριση του νέου αντικειμένου τόσο στη φάση της απόκτησης όσο και στη φάση του συσχετισμού της λειτουργικής μνήμης σε σχέση με τις αντίστοιχες πειραματικές ομάδες των μαρτύρων που έλαβαν ανάλογο όγκο φυσιολογικού ορού. Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με προηγηθείσες μελέτες σύμφωνα με τις οποίες το πεπτιδίο Tat δεν έχει καμία βιολογική δράση όταν χορηγείται τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* [237,239].

Σύμφωνα με τα παραπάνω, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα αποτελέσματα της δράσης των μετατρεπτικών της κατάστασης ενεργοποίησης της εPKC πεπτιδίων στις συμπεριφορικές δοκιμασίες δεν επηρεάζονται από τη δράση του Tat πεπτιδίου, καθώς αυτό μετά από τη λύση του δισουλφιδικού δεσμού στο αναγωγικό ενδοκυττάριο περιβάλλον, απελευθερώνεται και δεν ασκεί καμία βιολογική δράση.

Ακόμη, για το λόγο αυτό, σε όλα τα πειράματα που αφορούν τη δράση των εV1-2 και ψεRACK πεπτιδίων (τα οποία είναι συνδεδεμένα με το Tat μεταφορικό πεπτιδίο) στην αναγνωριστική μνήμη των επίμυων, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες μόνο ομάδες ζώων που έλαβαν φυσιολογικό ορό και όχι και ομάδες με Tat πεπτιδίο.

Η δόση επιλογής για όλα τα πεπτιδία ήταν 0.2 mg/kg σύμφωνα με προηγούμενες εργασίες [239,473,474]. Ακόμη για τη δόση αυτή έχουν γίνει μελέτες φαρμακοκινητικής και βιοδιαθεσιμότητας στις οποίες βασίσθηκε ο σχεδιασμός των πειραμάτων μας. Στη μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε για λόγους σύγκρισης και τη δόση των 0.1 mg/kg.

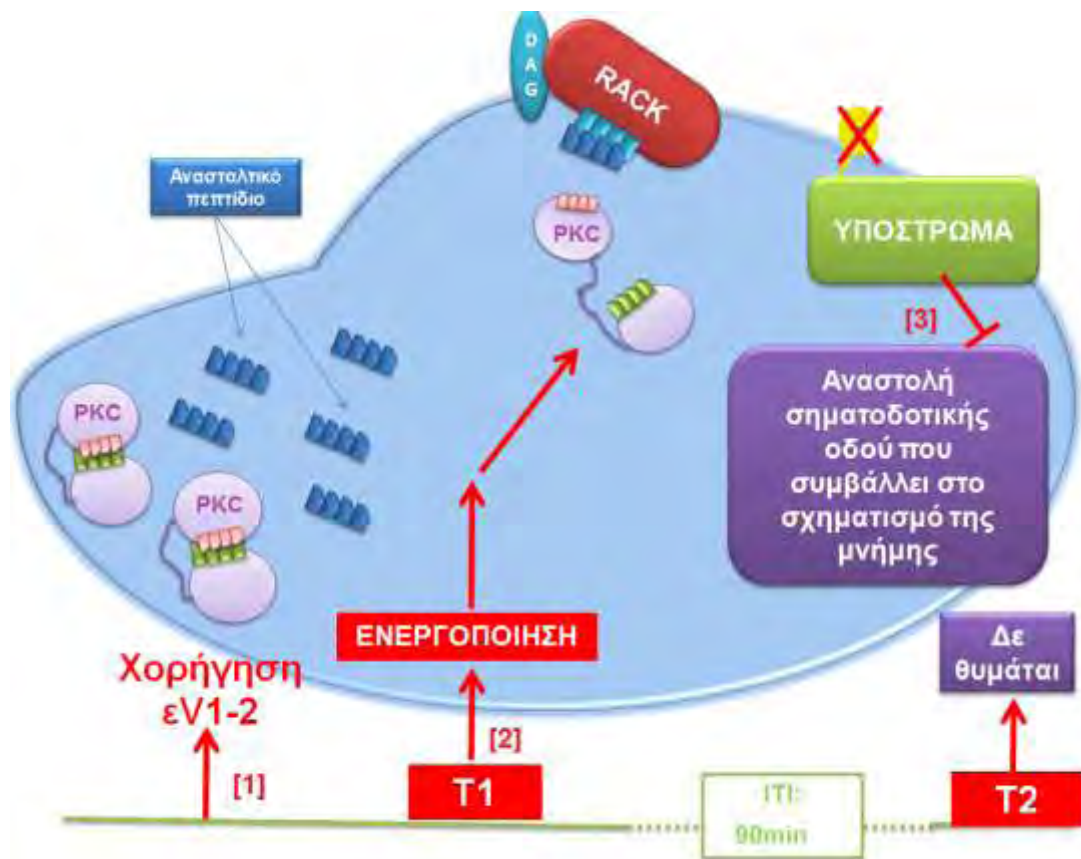
Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, για τη μελέτη της επίδρασης του εPKC ανασταλτικού πεπτιδίου, εV1-2, επιλέχθηκε ως χρονικό διάστημα από τη χορήγηση του πεπτιδίου μέχρι τη δοκιμή επιλογής τα 90 min. Στη χρονική αυτή στιγμή, σύμφωνα με προηγηθείσες μελέτες [239,473], τα πεπτιδία δεν ανιχνεύονται πλέον στους ιστούς και επομένως θεωρούμε ότι κατά τη στιγμή έναρξης της δοκιμής επιλογής η επίδραση του ανασταλτικού πεπτιδίου δεν υφίσταται πλέον στον εγκέφαλο των επίμυων. Στα πειράματα που ελέγχουν τη φάση της απόκτησης των πληροφοριών, η χορήγηση του ανασταλτικού όσο και του ενεργοποιητικού πεπτιδίου έγινε 20 min πριν τη δοκιμή εκπαίδευσης, καθώς σύμφωνα

με τη βιβλιογραφία, ο χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθεί η μέγιστη δράση των πεπτιδίων στον εγκέφαλο των τρωκτικών είναι μετά τα 10 min [239,473].

Η συστηματική χορήγηση των πεπτιδίων εV1-2 και ψεRACK που υιοθετήθηκε στα πειράματα δεν αποκλείει την πιθανότητα τα πεπτίδια αυτά να επηρεάζουν μη-ειδικές παραμέτρους της απόδοσης των επίμυων (π.χ, παράμετρος προσοχή ή αισθητικοκινητικούς παράγοντες). Η πιθανότητα αυτή, παρόλα αυτά, θα μπορούσε πιθανώς να αποκλεισθεί καθώς οι ουσίες αυτές δεν επηρεάζουν τα επίπεδα εξερεύνησης των τρωκτικών στη διαδικασία αναγνώρισης αντικειμένου. Είναι επίσης απίθανο τα αποτελέσματα των πεπτιδίων στη μνήμη των επίμυων να οφείλονται σε υπολειμματική παρουσία των φαρμάκων στην περιφερική κυκλοφορία, αφού σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [473], η συγκέντρωση των πεπτιδίων στο πλάσμα των τρωκτικών, ένα λεπτό μετά την ενδοφλέβια χορήγησή τους, μειώνεται κατά 99.99%. Ακόμη, ποικίλες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η συστηματική χορήγηση των ρυθμιστικών πεπτιδίων της εPKC δεν είναι τοξική για τα τρωκτικά [234,242,473].

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του εPKC ανασταλτικού πεπτιδίου και στις δύο συγκεντρώσεις (0.1 και 0.2 mg/kg), εV1-2, επηρεάζει αρνητικά την αναγνωριστική μνήμη στους επίμυες. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται είτε όταν το πεπτίδιο χορηγείται πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης είτε και όταν χορηγείται αμέσως μετά. Ο μηχανισμός με τον οποίο το εV1-2 πεπτίδιο προκαλεί τα ελλείμματα μνήμης στους επίμυες κατά τη δοκιμασία της αναγνώρισης αντικειμένου, δεν είναι γνωστός.

Βασιζόμενοι όμως στον προτεινόμενο από τους Budas και συνεργάτες [241] μηχανισμό δράσης του ανασταλτικού πεπτιδίου (Εικόνα 25), θα μπορούσαμε να προτείνουμε τα ακόλουθα: Θεωρούμε τη δοκιμή εκπαίδευσης ως τον παράγοντα ενεργοποίησης. Σε κατάσταση ηρεμίας, η εPKC βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα στην «κλειστή», ανενεργό διαμόρφωση. Το ανασταλτικό πεπτίδιο, όταν χορηγείται πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης (T1) συνδέεται στη θέση αγκυροβόλησης της εPKC πάνω στην πρωτεΐνη RACK (Εικόνα 48, 1). Κατά τη διάρκεια της δοκιμής εκπαίδευσης η εPKC ενεργοποιείται και βρίσκεται πλέον στο κυτταρόπλασμα στην «ανοικτή» διαμόρφωση. Στη διαμόρφωση αυτή η θέση σύνδεσης στη RACK αποκαλύπτεται, καθιστώντας την κινάση ικανή να συνδεθεί με τη RACK για να επιτελέσει τη φυσιολογική της δράση, στην περίπτωση μας το σχηματισμό της μνήμης. Το γεγονός αυτό αναστέλλεται από την κατάληψη της θέσης αγκυροβόλησης της RACK από το πεπτίδιο εV1-2 (Εικόνα 48, 2). Το αποτέλεσμα είναι η μη σύνδεση της εPKC στη RACK και η αναστολή της σηματοδοτικής οδού που συμβάλλει στο σχηματισμό της μνήμης (Εικόνα 48, 3).



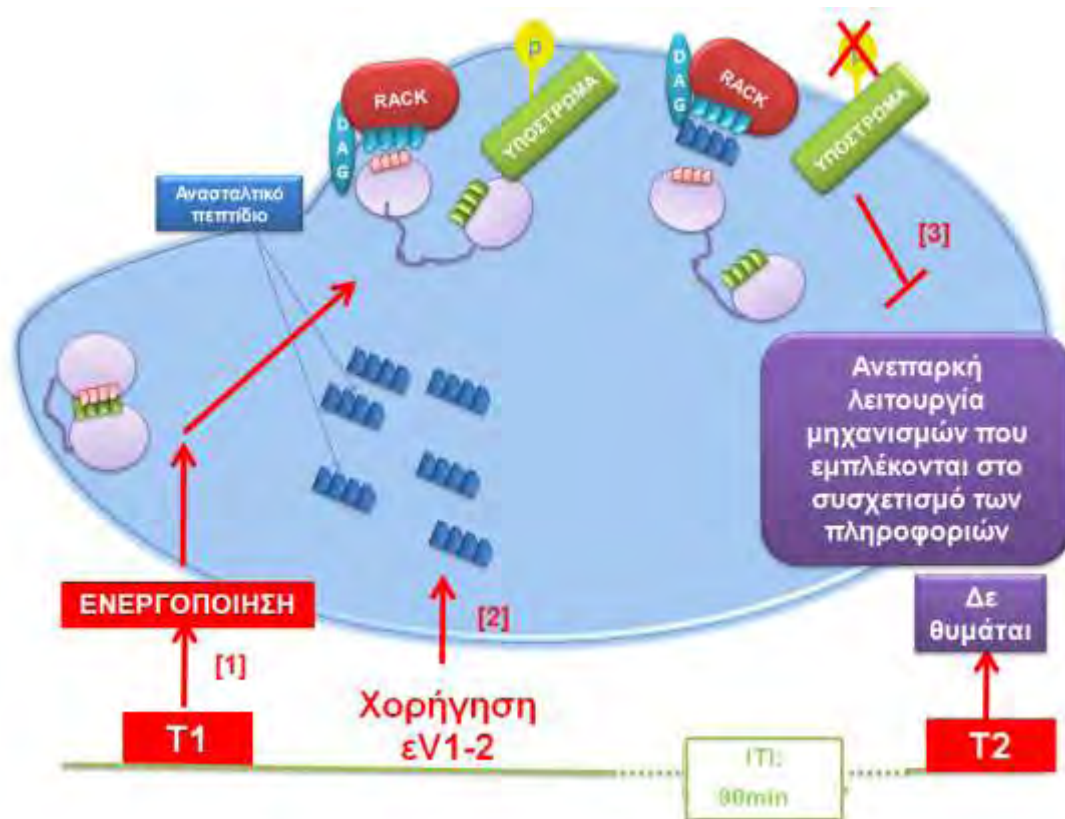
Εικόνα 48. Πιθανός μηχανισμός δράσης του ανασταλτικού πεπτιδίου εV1-2 όταν χορηγείται πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης (T1) – (φάση απόκτησης μνημονικών πληροφοριών).

[1] Πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης (T1), η ePKC βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα στην «κλειστή», ανενεργό διαμόρφωση. Όταν λοιπόν χορηγείται το ανασταλτικό πεπτιδίο, συνδέεται στη θέση αγκυροβόλησης της ePKC πάνω στην πρωτεΐνη RACK.

[2] Κατά τη διάρκεια της δοκιμής εκπαίδευσης η ePKC ενεργοποιείται και βρίσκεται πλέον στο κυτταρόπλασμα στην «ανοικτή» διαμόρφωση. Στη διαμόρφωση αυτή η θέση σύνδεσης στη RACK αποκαλύπτεται, καθιστώντας την κινάση ικανή να συνδεθεί με τη RACK για να επιτελέσει τη φυσιολογική της δράση, στην περίπτωση μας το σχηματισμό της μνήμης.

[3] Η σύνδεση της κινάσης με τη RACK αναστέλλεται από την κατάληψη της θέσης αγκυροβόλησης της RACK από το πεπτιδίο εV1-2. Το αποτέλεσμα είναι η μη σύνδεση της ePKC στη RACK και η αναστολή της σηματοδοτικής οδού που συμβάλλει στο σχηματισμό της μνήμης.

(Απλοποιημένη σχηματική παρουσίαση της ενεργοποίησης της ePKC. Έχει παραλειφθεί για λόγους απλούστευσης η DAG.)



Εικόνα 49. Πιθανός μηχανισμός δράσης του ανασταλτικού πεπτιδίου εV1-2 όταν χορηγείται αμέσως μετά από τη δοκιμή εκπαίδευσης (T1) - (φάση συσχετισμού της αναγνωριστικής μνήμης).

[1] Κατά τη διάρκεια της δοκιμής εκπαίδευσης (T1), η εPKC ενεργοποιείται και συνδέεται στην αντίστοιχη RACK πρωτεΐνη της για φωσφορυλιώσει τα κατάλληλα υποστρώματα και να ξεκινήσει η σηματοδοτική οδός που θα οδηγήσει στο σχηματισμό της μνήμης.

[2] Η χορήγηση του ανασταλτικού πεπτιδίου αμέσως μετά την δοκιμή εκπαίδευσης, έχει ως αποτέλεσμα κάποιες από τις RACK να καταληφθούν από το ανασταλτικό πεπτιδίο με αποτέλεσμα την μειωμένη σύνδεση των ενεργοποιημένων PKCs στις RACKs

[3] Το γεγονός αυτό προκαλεί την ανεπαρκή λειτουργία των μηχανισμών που εμπλέκονται στο συσχετισμό των πληροφοριών

(Απλοποιημένη σχηματική παρουσίαση της ενεργοποίησης της εPKC. Έχει παραλειφθεί για λόγους απλούστευσης η DAG.)

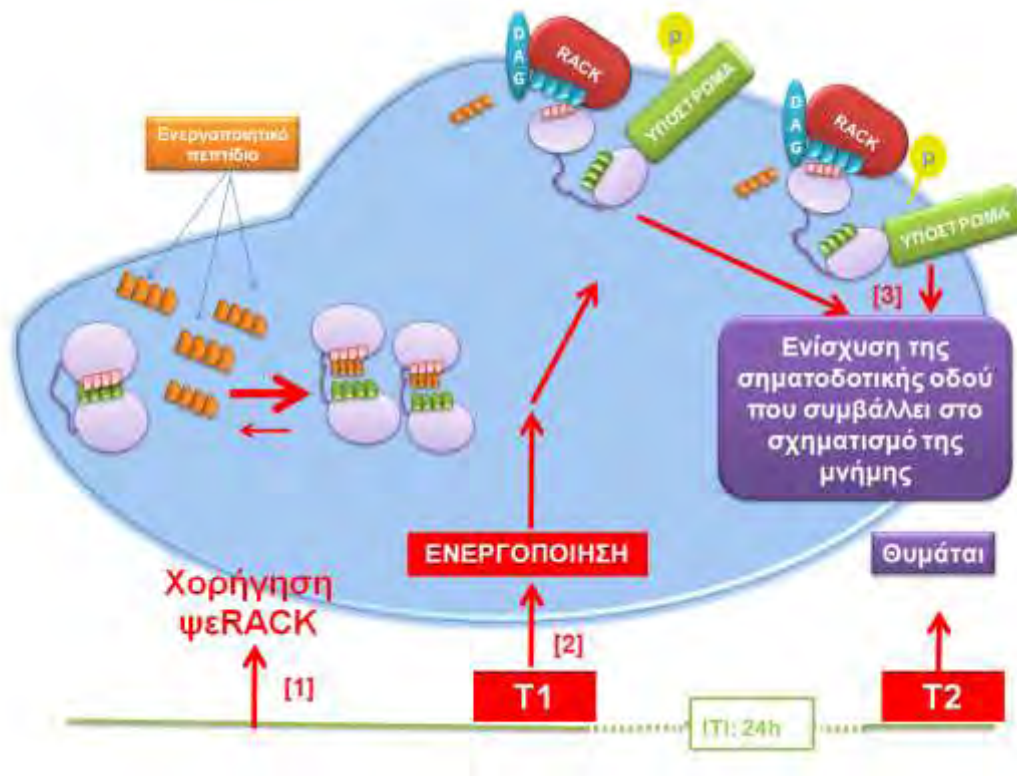
Στην περίπτωση που η χορήγηση του ανασταλτικού πεπτιδίου γίνεται αμέσως μετά τη δοκιμή εκπαίδευσης, η κατάσταση είναι διαφορετική. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής εκπαίδευσης (T1), η εPKC ενεργοποιείται και ξεκινάει η σύνδεσή της στις αντίστοιχες RACK πρωτεΐνες για τη φωσφορυλίωση των κατάλληλων υποστρωμάτων και την έναρξη της σηματοδοτικής οδού που θα οδηγήσει στο σχηματισμό της μνήμης (Εικόνα 49, 1). Η χορήγηση του εV1-2 πεπτιδίου αμέσως μετά την δοκιμή εκπαίδευσης, έχει ως αποτέλεσμα κάποιες από τις RACK να καταληφθούν από το ανασταλτικό πεπτιδίο με αποτέλεσμα την

μειωμένη σύνδεση των ενεργοποιημένων εPKCs στις RACKs (Εικόνα 49, 2). Το γεγονός αυτό συμβάλλει στην ανεπαρκή λειτουργία των μηχανισμών που εμπλέκονται στο συσχετισμό των πληροφοριών και επηρεάζει έτσι τη φάση αποθήκευσης και/ή ανάκλησης των μνημονικών πληροφοριών (Εικόνα 49, 3).

Η μελέτη αυτή παρέχει αποδείξεις για τη δράση του εV1-2 στην απόκτηση της μνήμης (acquisition). Δεν είναι ικανή όμως, να διακρίνει εάν το πεππίδιο αυτό επηρεάζει την αποθήκευση και/ή την ανάκληση της μνήμης. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν το σημαντικό ρόλο των ενεργοποιημένων ισομορφών της PKC στους μηχανισμούς σχηματισμού της μνήμης [346].

Σε ό, τι αφορά το εPKC ενεργοποιητικό πεππίδιο, ψεRACK, τα αποτελέσματά μας έδειξαν, ότι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγησή του, επηρεάζει θετικά την αναγνωριστική μνήμη στους επίμυες όταν το πεππίδιο χορηγείται πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης, δηλαδή στη φάση της απόκτησης των πληροφοριών. Οι επίμυες μπορούν και διακρίνουν καλύτερα, σε σχέση με τα αντίστοιχα ζώα – μάρτυρες, το νέο αντικείμενο μετά από χρονικό διάστημα 24 ωρών. Αντίθετα, όταν το πεππίδιο ψεRACK χορηγείται αμέσως μετά τη δοκιμή εκπαίδευσης και στις δύο δόσεις, δε φαίνεται να βελτιώνει την απόδοση των επίμυων στη δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου.

Βασιζόμενοι στον προτεινόμενο από τους Budas και συνεργάτες [241] μηχανισμό δράσης του ενεργοποιητικού πεπτιδίου, όπου το πεππίδιο ψεRACK σταθεροποιεί την ενδιάμεση κατάσταση της εPKC, χωρίς να διαταράσσει τη σύνδεσή της με την πρωτεΐνη RACK (Εικόνα 26), μπορούμε να υποθέσουμε έναν πιθανό μηχανισμό με τον οποίο το ψεRACK βελτιώνει την απόδοση των επίμυων όταν χορηγείται πριν τη δοκιμή εκπαίδευσης ενώ δεν έχει καμία επίδραση στη μνημονική τους ικανότητα όταν χορηγείται αμέσως μετά. Και στην περίπτωση αυτή θεωρούμε τη δοκιμή εκπαίδευσης ως τον παράγοντα ενεργοποίησης. Πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης (T1), η εPKC βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα στην «κλειστή», ανενεργό διαμόρφωση. Η χορήγηση του ενεργοποιητικού πεπτιδίου τη χρονική αυτή περίοδο δεν προκαλεί ενεργοποίηση της κινάσης αλλά αυξάνει τον αριθμό των μορίων που βρίσκονται στην ενδιάμεση κατάσταση, κάνοντας έτσι την PKC πιο «δεκτική» στην ενεργοποίηση (Εικόνα 50, 1). Κατά τη διάρκεια της δοκιμής εκπαίδευσης, πιο πολλά μόρια της εPKC ενεργοποιούνται και βρίσκονται πλέον στο κυτταρόπλασμα στην «ανοικτή» διαμόρφωση. Σε παρουσία ενεργοποιητικών πεπτιδίων, η «ανοικτή» διαμόρφωση σταθεροποιείται, μετακινώντας το ισοζύγιο των δύο διαμορφώσεων προς την πλευρά της ενεργοποιημένης κατάστασης. Το πεππίδιο εγκαταλείπει την κινάση μόλις το ένζυμο συνδεθεί με τη RACK. Η αύξηση του αριθμού των ενεργοποιημένων μορίων της εPKC φαίνεται πως έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση μεγαλύτερου αριθμού υποστρωμάτων (Εικόνα 50, 2). Συνέπεια όλων των παραπάνω είναι η ενίσχυση των μηχανισμών απόκτησης των μνημονικών πληροφοριών, που οδηγούν σε μια πιο σταθερή στο χρόνο μνημονική ικανότητα (Εικόνα 50, 3).



Εικόνα 50. Πιθανός μηχανισμός δράσης του ενεργοποιητικού πεπτιδίου ψεRACK όταν χορηγείται αμέσως πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης (T1) - (φάση απόκτησης μνημονικών πληροφοριών).

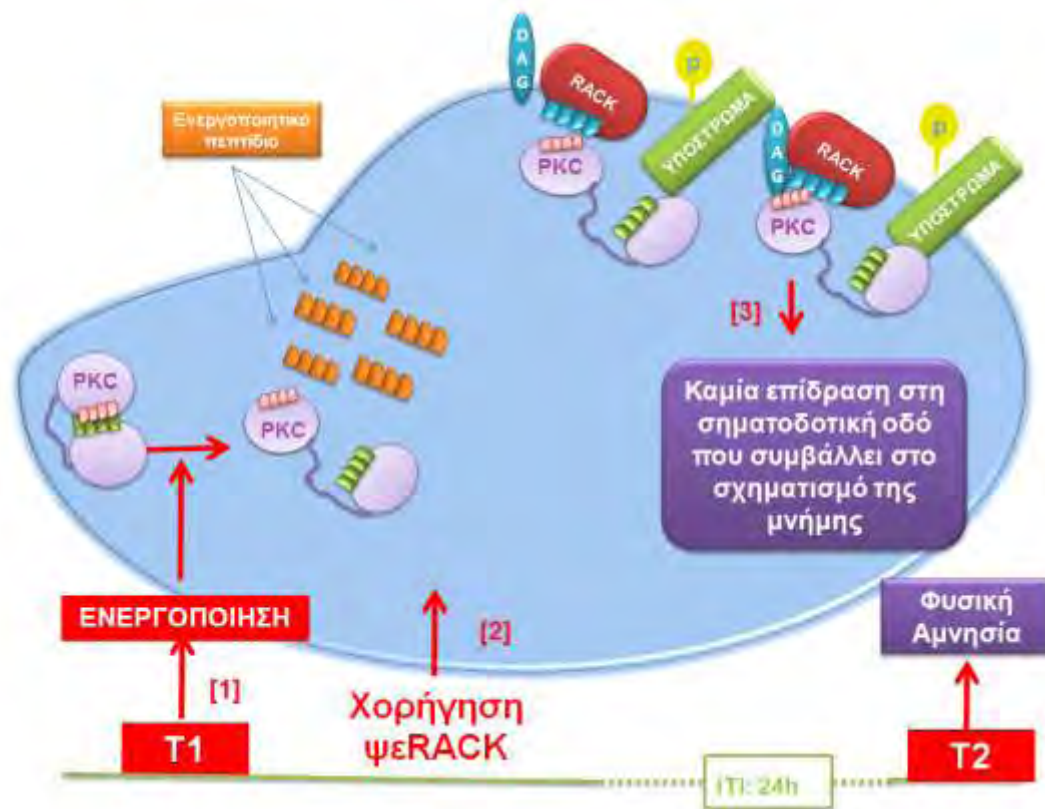
[1] Πριν από τη δοκιμή εκπαίδευσης (T1), η εPKC βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα στην «κλειστή», ανενεργή διαμόρφωση. Η χορήγηση του ενεργοποιητικού πεπτιδίου τη χρονική αυτή περίοδο δεν προκαλεί ενεργοποίηση της κινάσης αλλά αυξάνει τον αριθμό των μορίων που βρίσκονται στην ενδιάμεση κατάσταση ενεργοποίησης.

[2] Κατά τη διάρκεια της δοκιμής εκπαίδευσης, η εPKC ενεργοποιείται και βρίσκεται πλέον στο κυτταρόπλασμα στην «ανοικτή» διαμόρφωση. Το πεπτίδιο ψεRACK, σταθεροποιεί την κατάσταση αυτή, αυξάνοντας τον αριθμό των ενεργοποιημένων μορίων της εPKC. Η αύξηση αυτή, φαίνεται πως έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση μεγαλύτερου αριθμού υποστρωμάτων.

[3] Συνέπεια όλων των παραπάνω είναι η ενίσχυση των μηχανισμών απόκτησης των μνημονικών πληροφοριών που οδηγούν σε μια πιο σταθερή στο χρόνο μνημονική ικανότητα.

(Απλοποιημένη σχηματική παρουσίαση της ενεργοποίησης της εPKC. Έχει παραλειφθεί για λόγους απλούστευσης η DAG.)

Όταν το ψεRACK χορηγείται αμέσως μετά τη δοκιμή εκπαίδευσης, η εPKC έχει ήδη επιτελέσει τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων και δεν βρίσκεται πλέον στην ενδιάμεση κατάσταση. Φαίνεται πως το πεπτιδίιο δεν μπορεί να επηρεάσει τους μηχανισμούς αποθήκευσης και/ή ανάκλησης των μνημονικών πληροφοριών (Εικόνα 51).



Εικόνα 51. Πιθανός μηχανισμός δράσης του ενεργοποιητικού πεπτιδίου ψεRACK όταν χορηγείται αμέσως μετά από τη δοκιμή εκπαίδευσης (T1) - (φάση συσχετισμού της αναγνωριστικής μνήμης).

[1] Κατά τη διάρκεια της δοκιμής εκπαίδευσης (T1), η εPKC ενεργοποιείται, συνδέεται στην αντίστοιχη RACK πρωτεΐνη της και φωσφορυλιώνει τα κατάλληλα υποστρώματα για να ξεκινήσει η σηματοδοτική οδός που θα οδηγήσει στο σχηματισμό της μνήμης.

[2] Όταν το ψεRACK χορηγείται αμέσως μετά τη δοκιμή εκπαίδευσης, η εPKC έχει ήδη επιτελέσει τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων και δεν επηρεάζεται από την παρουσία ενδιάμεσων μορφών ενεργοποίησης της εPKC. Φαίνεται πως το πεπτιδίιο δεν μπορεί να επηρεάσει τους μηχανισμούς αποθήκευσης και/ή ανάκλησης των μνημονικών πληροφοριών.

(Απλοποιημένη σχηματική παρουσίαση της ενεργοποίησης της εPKC. Έχει παραλειφθεί για λόγους απλούστευσης η DAG.)

Τέλος, η συστηματική, ταυτόχρονη, χορήγηση των δύο πεπτιδίων έδειξε ότι το ενεργοποιητικό πεππίδιο της εPKC, ψεRACK στη μεγαλύτερη δόση, αναστρέφει σημαντικά τα ελλείμματα απόδοσης που προκαλεί το ανασταλτικό πεππίδιο εV1-2. Η βελτίωση της απόδοσης των επίμυων παρατηρείται τόσο στην εκδοχή της απόκτησης όσο και στην εκδοχή του συσχετισμού της δοκιμασίας αναγνώρισης αντικειμένου. Μια προσπάθεια ερμηνείας των πιθανών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ταυτόχρονη δράση των πεπτιδίων θα ήταν μάλλον παρακινδυνευμένη καθώς στην περίπτωση αυτή οι διαδικασίες είναι πολυπλοκότερες και πολλοί παράγοντες θα πρέπει να συναξιολογηθούν. Σίγουρα, απαιτείται περαιτέρω μελέτη των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τόσο το ρόλο της εPKC στη μνήμη όσο και τον τρόπο δράσης των ρυθμιστικών της κατάστασης ενεργοποίησης της εPKC πεπτιδίων.

Στη διεθνή βιβλιογραφία, αν και ο όγκος των δεδομένων για την εμπλοκή των κλασικών PKCs στις διαδικασίες μάθησης και μνήμης είναι τεράστιος, ελάχιστα αναφέρονται στο ρόλο της ισομορφής ε. Η παρούσα μελέτη αποτελεί, από όσο γνωρίζουμε μέχρι σήμερα, την πρώτη συμπεριφορική προσέγγιση των αποτελεσμάτων της ενεργοποίησης και της αναστολής της PKC ε στην αναγνωριστική μνήμη των επίμυων.

Αξίζει να σημειωθεί ακόμη, ότι η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη προσπάθεια αξιολόγησης της συστηματικής χορήγησης των ρυθμιστικών πεπτιδίων της PKC ε, εV1-2 και ψεRACK, σε συμπεριφορικές μελέτες. Αποδείξαμε ότι τα πεππίδια γίνονται καλώς ανεκτά από τα πειραματόζωα χωρίς ανεπιθύμητες ενέργειες και χωρίς να επηρεάζουν την κινητικότητα των τρωκτικών μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγησή τους σε μια συμπεριφορική δοκιμασία αναγνωριστικής μνήμης.

Το γεγονός ότι, με τη βοήθεια των εκλεκτικών για την PKC ε ρυθμιστικών πεπτιδίων, μπορέσαμε να μελετήσουμε εκλεκτικά τη συμβολή της PKC ε στους μηχανισμούς μάθησης και μνήμης, θέτει τις βάσεις για χρήση και άλλων εκλεκτικών για τις διάφορες ισομορφές της PKC πεπτιδίων σε συμπεριφορικές μελέτες ελέγχου της μνημονικής ικανότητας.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ελλείμματα στη σηματοδοτική οδό της PKC θεωρούνται ένας κοινός βασικός μηχανισμός στην φυσιολογική και παθολογική γήρανση του εγκεφάλου [249,340]. Ακόμη, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ένα συνεχώς εξελισσόμενο πεδίο έρευνας αποτελεί η διερεύνηση της εμπλοκής της PKC, και ιδιαίτερα της ισομορφής ε, στην παθοφυσιολογία της νόσου Alzheimer [210,476,477] και ο προστατευτικός ρόλος που διαδραματίζει η ενεργοποίησή της έναντι της συναπτικής απώλειας που είναι και η πρώτη αλλαγή που παρατηρείται σε κυτταρικό επίπεδο [474]. Πρόσφατα αποτελέσματα από διαγονιδιακά για τη νόσο Alzheimer μοντέλα μυών δείχνουν ότι τα μνημονικά ελλείμματα που προκαλεί αυτή η συναπτική απώλεια εξαρτάται από την ισορροπία ανάμεσα στην β αμυλοειδική πρωτεΐνη και στις ισομορφές α και ε της PKC [475]. Η ανακάλυψη ενός τρόπου που να μπορεί να προστατεύει από την απώλεια των συνάψεων, αποτελεί έναν σημαντικό θεραπευτικό στόχο για τη νόσο Alzheimer.

Οι ενεργοποιητές της PKCε έχουν επιδείξει νευροπροστατευτικό ρόλο σε ζωικά μοντέλα της νόσου [245,476]. Θα μπορούσε λοιπόν, η ελεγχόμενη ενεργοποίηση της ισομορφής αυτής με τη χρησιμοποίηση ενός ενεργοποιητικού πεπτιδίου εκλεκτικού της PKC ε να αποτελέσει μια πιθανή θεραπευτική παρέμβαση για τη νόσο αυτή [245]. Σήμερα ήδη, ένα εκλεκτικό ανασταλτικό πεππίδιο για τη δ ισομορφή της PKC (KAI-9803, KAI pharmaceuticals, San Francisco) σχεδιασμένο να χρησιμοποιείται ως συμπληρωματική θεραπεία για τον περιορισμό του μυοκαρδιακού τραύματος σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, βρίσκεται σε Φάση 2β κλινικής δοκιμής [478,479]. Ακόμη ένα εκλεκτικό για την PKC ε ανασταλτικό πεππίδιο (KAI-1678, KAI pharmaceuticals, San Francisco), σχεδιασμένο για τη θεραπεία του νευροπαθητικού πόνου, βρίσκεται σε Φάση 2α κλινικής δοκιμής.

11.2. Ο Ρόλος Του Δότη NO, Μολσιδομίνη, Στα Ελλείμματα Μνήμης Που Προκαλεί Ο Ανταγωνιστής Των Υποδοχέων NMDA, MK-801

Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων, ο σκοπός ήταν να διευκρινισθεί η σχέση μεταξύ του NO και της υπολειτουργίας των υποδοχέων NMDA. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε ο ρόλος του δότη NO, μολσιδομίνη, στα γνωσιακά ελλείμματα που προκαλεί ο ανταγωνιστής των υποδοχέων NMDA, MK-801, κατά τη διάρκεια μιας δοκιμασίας ελέγχου της αναγνωριστικής μνήμης, τη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου.

Παρατηρήθηκε ότι ο συνολικός χρόνος εξερεύνησης κατά τη δοκιμή επιλογής (T2) δεν διέφερε μεταξύ των διαφόρων πειραματικών ομάδων. Η ομάδα των ζώων που έλαβε μάρτυρα+MK-801 απέτυχε να διακρίνει το νέο (*N*) από το γνωστό (*F*) αντικείμενο σε σύγκριση με την ομάδα των ζώων που έλαβε μάρτυρα+μάρτυρα και την ομάδα που έλαβε MK-801+μολσιδομίνη 4 mg/kg. Κατά την T2, η απόδοση των ζώων που έλαβαν MK-801+μολσιδομίνη 4 mg/kg δεν διέφερε από αυτή της ομάδας των ζώων στα οποία χορηγήθηκε μάρτυρας+μολσιδομίνη 4 mg/kg. Ακόμη, οι επίμυες που έλαβαν MK-801+μολσιδομίνη 4 mg/kg είχαν σημαντικά καλύτερη απόδοση από αυτή των ζώων στα οποία συγχρηγήθηκε το MK-801 με τη χαμηλότερη δόση μολσιδομίνης (2 mg/kg). Συγκεκριμένα, η μικρότερη δόση της μολσιδομίνης δεν έφερε καμιά προστασία στα ζώα που έλαβαν MK-801.

Τα ευρήματά μας είναι σε συμφωνία με μια προηγούμενη μελέτη όπου η συστηματική χορήγηση του MK-801 σε δόση 0.1 mg/kg επηρέασε την απόδοση των επίμυων στη δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου [442]. Η χορήγηση μολσιδομίνης σε δόση 4 mg/kg, αλλά όχι σε 2 mg/kg, μετά τη δοκιμασία εκπαίδευσης, αναστρέφει τα ελλείμματα απόδοσης που προκαλεί η χορήγηση του MK-801 σε αυτή τη δοκιμασία αναγνωριστικής μνήμης. Το γεγονός ότι το MK-801 και η μολσιδομίνη επηρεάζουν την απόδοση των επίμυων κατά τη φάση της ανάκλησης των πληροφοριών, αντανάκλα μια μεταβολή στις μνημονικές διαδικασίες που διαδραματίζονται μετά τη δοκιμή εκπαίδευσης (αποθήκευση ή ανάκληση πληροφοριών). Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με άλλες συμπεριφορικές μελέτες σε ποικίλα είδη, συμπεριλαμβανομένων επίμυων [432], μύων [433], πτηνών [434], και θαλάσσιων

σαλιγκαριών [309], που έδειξαν ότι η παρεμβολή στη σηματοδότηση του NO και/ή του cGMP μετά την ολοκλήρωση της περιόδου εκπαίδευσης διαταράσσει το σχηματισμό της μνήμης.

Το MK-801 και η μολσιδομίνη χορηγήθηκαν συστηματικά, έτσι δεν μπορεί να αποκλεισθεί η πιθανότητα ότι μη ειδικοί παράγοντες (προσήλωση προσοχής, αισθητικοκινητικοί παράγοντες) ίσως επηρέασαν την απόδοση των ζώων. Όλα τα ζώα που έλαβαν MK-801 δεν παρουσίασαν διαφορές στο συνολικό χρόνο εξερεύνησης κατά τη διάρκεια της T2, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ζώα-μάρτυρες. Παρατηρούμε ότι η χορήγηση του δότη του NO, μολσιδομίνη, σε δόση 4 mg/kg μπορεί με επιτυχία να αναστρέψει τα ελλείμματα μνήμης που προκαλεί το MK-801 στους επίμους. Το γεγονός αυτό υπονοεί ότι τα αποτελέσματα των ουσιών αυτών στην μνημονική απόδοση των επίμους δεν σχετίζονται με την επίδρασή τους στην κινητικότητά τους.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η μολσιδομίνη, και κατά επέκταση το NO, ανταγωνίζεται τα ελλείμματα μνήμης που προκαλεί το MK-801 χρειάζεται να διερευνηθεί περαιτέρω. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει καμία πληροφορία που θα ενίσχυε την υπόθεση ότι οι δότες NO αυξάνουν την μνημονική ικανότητα μέσω της βελτίωσης της εγκεφαλικής αιματικής ροής. Μεταξύ των πιθανών μηχανισμών, έχει προταθεί ότι οι δότες NO ασκούν μια κεντρική, διεγερτική δράση στις γλουταμινεργικές [400], χολινεργικές [404,480] και GABAμινεργικές λειτουργίες [407,481,482] με αποτέλεσμα την διευκόλυνση της μακροπρόθεσμης ενδυνάμωσης [483].

Ένας ενδιαφέρον ακόμη τομέας έρευνας θα ήταν η διερεύνηση της σχέσης του NO με τις διάφορες ισομορφές της PKC. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, οι μορφολογικές και μαθησιακές αλλαγές που προκαλεί το χρόνιο stress σε επίμους συνοδεύονται από αλλαγές τόσο στην δραστηριότητα όσο και στην έκφραση των ισομορφών των NOS και των PKC ενζύμων. Συγκεκριμένα, το χρόνιο stress προκάλεσε μνημονικά ελλείμματα που συνδυάζονται με μειωμένη παραγωγή NO από την nNOS, η οποία συσχετίζεται με την αύξηση των ισοενζύμων της PKC στον ιππόκαμπο [484].

Ε. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η παρούσα διδακτορική διατριβή κατέληξε στα εξής:

1. Στον ιππόκαμπο των επίμυων ανιχνεύεται η παρουσία της Πρωτεϊνικής Κινάσης C και η παρουσία αυτή αφορά τόσο τις κλασικές όσο και τις νέες ισομορφές της κινάσης αυτής.
2. Η τοπική χορήγηση στον ιππόκαμπο επίμυα του μη εκλεκτικού ενεργοποιητή της Πρωτεϊνικής Κινάσης C, PMA, προκαλεί την ενεργοποίηση της κινάσης όπως διαπιστώνεται από τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων αλλά και από τη μετακίνησή της κινάσης από το κυτταροπλασματικό στο μεμβρανικό κυτταρικό διαμέρισμα.
3. Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση εκλεκτικών πεπτιδίων Πρωτεϊνικής Κινάσης C συνδεδεμένων με το μεταφορικό πεπτίδιο Tat σε επίμυες γίνεται καλώς ανεκτό, χωρίς να προκαλεί συστηματικές παρενέργειες στα πειραματόζωα κατά τη διάρκεια συμπεριφορικών δοκιμασιών.
4. Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του ανασταλτικού για την ε ισομορφή της Πρωτεϊνικής Κινάσης C πεπτιδίου, εV1-2, διαταράσσει τόσο το σχηματισμό όσο και την ανάκληση/αποθήκευση της μνήμης σε μια δοκιμασία αναγνωριστικής μνήμης σε επίμυες.
5. Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του ενεργοποιητικού για την ε ισομορφή της Πρωτεϊνικής Κινάσης C πεπτιδίου, ψεRACK βελτιώνει τη μνημονική ικανότητα των επίμυων σε ό,τι αφορά το σχηματισμό της μνήμης, ενώ δε φαίνεται να έχει καμία επίδραση στην ανάκληση/αποθήκευση των πληροφοριών όταν αυτό χρησιμοποιείται σε μια δοκιμασία αναγνωριστικής μνήμης σε επίμυες.
6. Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του ενεργοποιητικού για την ε ισομορφή της Πρωτεϊνικής Κινάσης C πεπτιδίου, ψεRACK, μπορεί να αναστρέψει τα ελλείμματα μνήμης που προκαλεί το αντίστοιχο ανασταλτικό πεπτίδιο, εV1-2, τόσο στη δημιουργία όσο και στην ανάκληση/αποθήκευση των μνημονικών πληροφοριών σε μια δοκιμασία αναγνωριστικής μνήμης σε επίμυες.
7. Ο δότης του NO, μολσιδομίνη, μπορεί να αναστρέψει τα ελλείμματα μνήμης που προκαλεί ο ανταγωνιστής των NMDA υποδοχέων, MK-801, κατά την ανάκληση/αποθήκευση των πληροφοριών σε μια δοκιμασία αναγνωριστικής μνήμης σε επίμυες.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Ο όρος «priming», που συχνά συναντάται δίπλα στον όρο framing και στη θεωρία της agenda-setting (η μάζα και οι ειδήσεις από τα μέσα έχουν μεγάλη επίδραση στο κοινό σχετικά με την επιλογή των πιο γεγονότων να θεωρήσουν ότι είναι αξιοπρόσεκτα και πόσο χώρο και προτεραιότητα να δώσουν σε αυτά), αποτελεί μια νοητική διαδικασία κατά την οποία οι πληροφορίες που αποκτώνται μέσω των μέσων (primes) αυξάνουν χρονικά την προσβασιμότητα των μονάδων γνώσης στην μνήμη ενός ατόμου, το οποίο το κάνει πιο πιθανό ότι οι μονάδες αυτές γνώσεις θα χρησιμοποιηθούν για την υποδοχή, ανάλυση και κρίση των εξωτερικών πληροφοριών που θα ακολουθήσουν.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Η διαγώνια δέσμη του **Broca** σχηματίζει το μεσαίο όριο της πρόσθιας ουσίας (anterior perforated substance). Αποτελεί μια χολινεργική δέσμη νευρικών ινών πίσω από την anterior perforated substance. Διασυνδέει την paraterminal gyrus στην περιοχή του διαφράγματος (septal area) με τον ιππόκαμπο και την πλάγια οσφρητική περιοχή. Μαζί με το διαφανές διάφραγμα και τον μέσο διαφραγματικό πυρήνα, η διαγώνια δέσμη του Broca θεωρείται ότι εμπλέκεται στη δημιουργία των κυμάτων θ του ιππόκαμπου.

Περίληψη

Ο ιππόκαμπος διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες μάθησης και μνήμης στα θηλαστικά. Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), μια κινάση της οποίας τα ισοένζυμα απαντώνται σε αφθονία στον ιππόκαμπο, εμπλέκεται στο σχηματισμό της μνήμης τόσο στα ασπόνδυλα όσο και στα θηλαστικά. Λίγα στοιχεία όμως υπάρχουν για τον ακριβή ρόλο της κάθε ισομορφής σε αυτή τη διαδικασία. Είναι ακόμη γνωστό ότι ο μη συναγωνιστικός ανταγωνιστής των NMDA υποδοχέων, MK-801, βλάπτει τη μνήμη, ενώ οι δότες μονοξειδίου του αζώτου βελτιώνουν τη μνήμη σε πολλά ζωικά πειραματικά μοντέλα μνήμης. Όμως, τα μέχρι σήμερα δεδομένα για τη σχέση του μονοξειδίου του αζώτου και της υπολειτουργίας των NMDA υποδοχέων στη μάθηση και τη μνήμη είναι αντικρουόμενα.

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης είναι τρεις. Αρχικά, επιδιώξαμε να δείξουμε την παρουσία των ισομορφών της PKC στον ιππόκαμπο του επίμυα και την ενεργοποίησή τους μετά την ενδοίπποκάμπεια έγχυση του TPA, ενός μη εκλεκτικού ενεργοποιητή της PKC, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της υποκυτταρικής κλασμάτωσης σε ομογενοποιημένα ιπποκάμπειου ιστού και ανοσοϊστοχημεία. Στη συνέχεια διερευνήσαμε τον πιθανό ρόλο της ισομορφής ϵ της PKC (ϵ PKC) στην αναγνωριστική μνήμη των επίμυων στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου, χρησιμοποιώντας εκλεκτικά ανασταλτικά και ενεργοποιητικά για την ισομορφή ϵ πεπτιδία, αναστρέψιμα συνδεδεμένα με το TAT₄₇₋₅₇ μεταφορικό πεπτιδίο. Τέλος, μελετήσαμε την ικανότητα του δότη μονοξειδίου του αζώτου, μολσιδομίνη, να ανταγωνίζεται τα ελλείμματα μνήμης που προκαλεί το MK-801 στον επίμυα στην ίδια συμπεριφορική δοκιμασία.

Τα αποτελέσματά μας ήταν τα ακόλουθα: Πρωτίστως, αποδείξαμε την παρουσία και την ενεργοποίηση τόσο των κλασικών όσο και των νέων ισομορφών της PKC στον ιππόκαμπο επίμυα μετά την ενδοίπποκάμπεια χορήγηση του TPA. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα για την ϵ PKC προτείνουν ότι ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του ανασταλτικού για την ϵ PKC πεπτιδίου, ϵ V1-2, επιδεινώνει την αναγνωριστική μνήμη στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου στους επίμυες. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του ενεργοποιητικού για την ϵ PKC πεπτιδίου, ψ RACK, βελτιώνει τη μνημονική ικανότητα των επίμυων μόνο όταν χορηγείται πριν τη δοκιμή εκπαίδευσης, αλλά δεν έχει καμία επίδραση στην επίδοση των επίμυων όταν το πεπτιδίο χορηγείται μετά τη δοκιμή εκπαίδευσης. Επίσης δείξαμε ότι το αμνησιακό αποτέλεσμα του ϵ V1-2 μπορεί να εξαιρεθεί όταν συγχρηγείται μαζί με το ψ RACK πεπτιδίο. Τέλος, αποδείξαμε ότι ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της μολσιδομίνης μετά τη δοκιμή εκπαίδευσης (σε δόση 4 αλλά όχι 2 mg/kg) επιτυχώς ανταγωνίζεται τα ελλείμματα μνήμης που προκαλεί το MK-801 στη Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου στους επίμυες.

Τα αποτελέσματά προτείνουν ότι (α) οι ισομορφές της PKC είναι παρούσες στον ιππόκαμπο του επίμυα και μπορούν να ενεργοποιηθούν μετά την τοπική έγχυση του TPA, (β) η ϵ PKC

εμπλέκεται στην αναγνωριστική μνήμη των επίμυων και καταδεικνύει τη συστηματική χορήγηση των ρυθμιστικών της PKC πεπτιδίων ως πιθανούς θεραπευτικούς παράγοντες στις διαταραχές μνήμης και (γ) το μονοξειδίο του αζώτου μεταβάλλει την επίδραση της υπολειτουργίας των NMDA υποδοχέων στη μάθηση και τη μνήμη.

Abstract

Hippocampus plays a crucial role in learning and memory. Protein kinase C (PKC), a kinase whose isoforms are abundant in hippocampus, has been also implicated in memory formation both in invertebrates and mammalian models, but few is known about the exact role of specific PKC isoenzymes in this process. It is also known that the non competitive NMDA receptor antagonist, MK-801 impairs memory while the nitric oxide (NO) donors facilitate memory in various animal models. The experimental evidence about the relationship between NO and NMDA receptor hypofunction in learning and memory is controversial.

The present study had three purposes: first, to show the presence and the activation of PKC isoenzymes in rat hippocampus after intrahippocampal administration of TPA, a non selective PKC activator, using subcellular fractionation in hippocampal tissue and immunohistochemistry, second, to investigated the putative role of ϵ PKC isoenzyme in recognition memory in the object recognition test in rats, using isoenzyme-specific inhibitory and activating peptides reversibly conjugated to the TAT₄₇₋₅₇ carrier peptide and finally, to investigate the efficacy of the nitric oxide donor, molsidomine, in counteracting the MK-801-induced memory effects in rat, using the same behavioural test.

First, we demonstrated the presence and the activation of classic and novel PKC isoforms in rats hippocampus after intrahippocampal infusion of TPA. Second, the results for ϵ PKC suggest that, intraperitoneal injection of the ϵ PKC inhibitory peptide, ϵ V1-2, impairs recognition memory in the object recognition test in rats. Interestingly, intraperitoneal administration of the ϵ PKC activator peptide, $\psi\epsilon$ RACK, improves memory only when the peptide is injected prior to training, but has no effect in rats' performance when the peptide is administered post training. We also demonstrated that the amnesiac effect of ϵ V1-2 can be eliminated when $\psi\epsilon$ RACK is co administered. Finally, we showed that post-training administration of molsidomine (at 4 but not 2 mg/kg) successfully antagonize MK-801-induced performance deficits in the object recognition memory test.

Our findings indicate that (a) PKC isoforms are present in rat hippocampus and can be activated by local infusion of TPA, (b) ϵ PKC is implicated in recognition memory in rats and points towards the use of systematically administered PKC regulating peptides as putative therapeutic agents for memory disorders and (c) a nitric oxide component modulates the effects of NMDA receptor hypofunction on learning and memory.

Επεξηγήσεις Συντομογραφιών

AMPA ή AMPAR: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor, ένας μη NMDA τύπου ιονοτροπικός διαμεμβρανικός υποδοχέας για το γλουταμικό

ATP: adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

C/EBP: CCAAT-enhancer-binding proteins

CA: cornu Ammonis, κέρας του Αμμώνιου (περιοχή του ιππόκαμπου)

CaLB: Ca²⁺/lipid-binding domains, περιοχές σύνδεσης ιόντων Ca/λιπιδίων

CaMKII: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases ή CaM kinases, κινάση που εξαρτάται από τα ιόντα Ca/καλμοδουλίνη

cAMP: cyclic adenosine monophosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη

cGMP: cyclic-guanosine monophosphate, μονοφωσφορική κυκλική γουανοσίνη

CREB: cAMP response element-binding protein, συνδεδεμένη πρωτεΐνη που απαντά στο cAMP

DAG: diacylglycerol, διακυλογλυκερόλη

DG: dentate gyrus, οδοντωτή έλικα

ELAV proteins: embryonic lethal abnormal vision proteins

EPSPs: excitatory postsynaptic potentials, διεγερτικά μετασυναπτικά δυναμικά

FAD: flavin adenine dinucleotide

GAP-43: growth associated protein 43

GC: guanylate cyclase, γουανιλική κυκλάση

Hsp70: Heat shock protein 70

IP3: inositol 1,4,5-trisphosphate, 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη

LTD: long-term depression, μακροχρόνια καταστολή

LTP: long term potentiation, μακρόχρονη ενδυνάμωση

MAPK: mitogen-activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από το μιτογόνο

MARCKS: myristoylated alanine- rich C kinase substrate

mEPSCs: miniature excitatory postsynaptic currents

mGluR: metabotropic glutamate receptor, μεταβοτροπικός υποδοχέας του γλουταμικού

min: λεπτό

NMDA ή NMDAR: *N*-methyl *D*-aspartate receptor, ιονοτροπικός υποδοχέας για το γλουταμικό

NO: nitric oxide, μονοξείδιο του αζώτου

PKC-1: 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, εξαρτώμενη από την 3-φωσφοινοσιτόλη πρωτεϊνική κινάση 1

PKA: protein kinase A, πρωτεϊνική κινάση A

PKC: protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C

PLC: phospholipase C, φωσφολιπάση C

PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate

PTD: protein transduction domain

RACKs: receptors for activated C kinase, υποδοχείς για την ενεργοποιημένη C κινάση

sec: δευτερόλεπτο

SNAP: S-nitroso-N-acetyl penicillamine, S-νιτροσο-N-ακετυλ πενικιλλαμίνη

TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

ZIP: zeta interacting protein

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Kandel ER, Scharz JH, Jessell TM. Principles of neural sciences,2000
- [2] Atkinson RC; Shiffrin RM. Human memory: A proposed system and its control processes. In Spence KW; Spence JT. The psychology of learning and motivation. Academic Press, New York 1968;Vol 2:89–195.
- [3] Baddeley AD, Hitch GJL. Working Memory. In Bower GA. The psychology of learning and motivation: advances in research and theory. Academic Press, New York 1974;Vol 8:47-89.
- [4] Baddeley, AD. The episodic buffer: a new component of working memory? Trends Cognit Science 2000;4:417-23.
- [5] Tulving E. Episodic and semantic memory. In: Tulving E, Donaldson W, editors. Organization of Memory. New York: Academic Press; 1972.
- [6] Diana RA, Reder LM, Arndt J, Park H. Models of recognition: A review of arguments in favor of a dualprocess account Psychon Bull Rev 2006;13:1–21.
- [7] Maren S. Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. An emerging physiology of fear conditioning circuits. Mol Neurobiol 1996;13:1-22.
- [8] Pape C, Denis P. Plastic Synaptic Networks of the Amygdala for the Acquisition, Expression, and Extinction of Conditioned Fear. Physiol Rev 2010;90:419–63.
- [9] Salamone JD, Correa M. Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. Behav Brain Res 2002;137:3-25.
- [10] Hollerman JR, Tremblay L, Schultz W. Involvement of basal ganglia and orbitofrontal cortex in goal-directed behavior. Prog Brain Res 2000;126:193-215.
- [11] Burguière E, Arabo A, Jarlier F, De Zeeuw CI, Rondi-Reig L. Role of the cerebellar cortex in conditioned goal-directed behavior. J Neurosci 2010;30:13265-71.
- [12] Raymond JL, Lisberger SG, Mauk MD. The cerebellum: a neuronal learning machine? Science 1996;272:1126-31.
- [13] Penfield W, Jasper H. Epilepsy and the functional anatomy of the human brain. Little Brown & Co. Oxford England 1954;xv:896.

[14] Penfield W. Functional localization in temporal and deep sylvian areas. *Res Publ Assoc Res Ment Dis* 1958;36:210-26]

[15] Vargha-Khadem F, Gadin DG, Watkins KE, Connelly A, Van Paesschen W, Mishkin M. Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Science* 1997;277:376–80.

[16] Squire LR, Zola SM. Episodic memory, semantic memory and amnesia. *Hippocampus* 1998;8:205–11.

[17] Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H. The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or memory space? *Neuron* 1999;23:1–20.

[18] Eichenbaum H. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behav Brain Res* 2001;127:199–207.

[19] Witter MP. A survey of the anatomy of the hippocampal formation, with emphasis on the septotemporal organization of its intrinsic and extrinsic connections. *Adv Exp Med Biol* 1986;203:67–82.

[20] Witter MP, Amaral DG. Hippocampal formation. In: Paxinos G, editor. *The Rat Nervous System*. San Diego, CA: Academic Press;2004.

[21] Fyhn M, Molden S, Witter MP, Moser EI, Moser MB. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 2004;305:1258–64.

[22] Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 2005;436:801-6.

[23] Burwell RD. The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Ann N Y Acad Sci* 2000;911:25–42.

[24] Witter MP, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH, Lohman AH. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol* 1989;33:161–253.

[25] Haring JH, Davis JN. Differential distribution of locus coeruleus projections to the hippocampal formation: anatomical and biochemical evidence. *Brain Res* 1985;325:366–9.

[26] Gasbarri A, Packard MG, Campana E, Pacitti C. Anterograde and retrograde tracing of projections from the ventral tegmental area to the hippocampal formation in the rat. *Brain Res Bull* 1994;33:445–52.

[27] Gasbarri A, Sulli A, Innocenzi R, Pacitti C, Brioni JD. Spatial memory impairment induced by lesion of the mesohippocampal dopaminergic system in the rat. *Neuroscience* 1996;74:1037–44.

[28] Gasbarri A, Sulli A, Packard MG. The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1997;21:1–22.

[29] Lisman JE, Grace AA. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron* 2005; 46:703–13.

[30] Clark CR, Geffen GM, Geffen LB. Catecholamines and attention. I: Animal and clinical studies. *Neurosci Biobehav Rev* 1987;11:341–52.

[31] Politis A, Lykouras L, Mourtzouchou P & Christodoulou GN. Attentional disturbances in patients with unipolar psychotic depression: a selective and sustained attention study. *Compr Psychiatry* 2004;45:452–9.

[32] Martin LF, Freedman R. Schizophrenia and the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Int Rev Neurobiol* 2007; 78:225–46.

[33] Sigurdsson T, Stark KL, Karayiorgou M, Gogos JA, Gordon JA. Impaired hippocampal-prefrontal synchrony in a genetic mouse model of schizophrenia. *Nature* 2010;464:763-7.

[34] Grace AA. Dopamine system dysregulation by the ventral subiculum as the common pathophysiological basis for schizophrenia psychosis, psychostimulant abuse, and stress. *Neurotox Res* 2010;18:367-76.

[35] Miller EJ, Saint Marie LR, Breier MR, Swerdlow NR. Pathways from the ventral hippocampus and caudal amygdala to forebrain regions that regulate sensorimotor gating in the rat. *Neuroscience* 2010;165:601-11.

[36] Duerson K, Woltjer RL, Mookherjee P, Leverenz JB, Montine TJ, Bird TD, Pow DV, Rauen T, Cook DG. Detergent-insoluble EAAC1/EAAT3 aberrantly accumulates in hippocampal neurons of Alzheimer's disease patients. *Brain Pathol* 2009;19:267-78.

[37] Halbach OB. Involvement of BDNF in age-dependent alterations in the hippocampus. *Front Aging Neurosci* 2010;2: 36.

[38] Poulin B, Butcher A, McWilliams P, Bourgognon JM, Pawlak R, Kong KC, Bottrill A, Mistry S, Wess J, Rosethorne EM, Charlton SJ, Tobin AB. The M3-muscarinic receptor

regulates learning and memory in a receptor phosphorylation/arrestin-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:9440-5.]

[39] Navailles S, Benazzouz A, Bioulac B, Gross C, De Deurwaerdère P. High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus and L-3,4-dihydroxyphenylalanine inhibit in vivo serotonin release in the prefrontal cortex and hippocampus in a rat model of Parkinson's disease. *J neurosci* 2010;30:2356-64.

[40] Bohnen NI, Gedela S, Herath P, Constantine GM, Moore RY. Selective hyposmia in Parkinson disease: association with hippocampal dopamine activity. *Neurosci Lett* 2008;447:12-6.

[41] Swanson LW. A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Res* 1981;217:150-4.

[42] Vertes RP, Hoover WB, Szigeti-Buck K, Leranath C. Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Res Bull* 2007; 71:601-9.

[43] Schiff ND. Central thalamic contributions to arousal regulation and neurological disorders of consciousness. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1129:105-18.

[44] Jones BF, Witter MP. Cingulate cortex projections to the parahippocampal region and hippocampal formation in the rat. *Hippocampus* 2007; 17:957-76.

[45] Tang Y, Mishkin M, Aigner TG. Effects of muscarinic blockade in perirhinal cortex during visual recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:12667-9.

[46] Bachevalier J, Nemanic S. Memory for spatial location and object-place associations are differently processed by the hippocampal formation, parahippocampal areas TH/TF and perirhinal cortex. *Hippocampus* 2008;18:64-80.

[47] Wan H, Aggleton JP, Brown MW. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J Neurosci* 1999;19:1142-8.

[48] Yanike M, Wirth S, Smith AC, Brown EN, Suzuki WA. Comparison of associative learning-related signals in the macaque perirhinal cortex and hippocampus. *Cereb Cortex* 2009;19:1064-78.

[49] Düzel E, Habib R, Rotte M, Guderian S, Tulving E, Heinze HJ. Human hippocampal and parahippocampal activity during visual associative recognition memory for spatial and nonspatial stimulus configurations. *J Neurosci* 2003;23:9439-44.

[50] Buffalo EA, Ramus SJ, Squire LR, Zola SM. Perception and recognition memory in monkeys following lesions of area TE and perirhinal cortex. *Learn Mem* 2000;7:375-82.

[51] Rauchs G, Blaizot X, Giffard C, Baron JC, Insausti R, Chavoix C. Imaging visual recognition memory network by PET in the baboon: perirhinal cortex heterogeneity and plasticity after perirhinal lesion. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:301.

[52] Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32:1055-70.

[53] Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973;232:331-56.

[54] Carew TJ, Sahley CL. Invertebrate learning and memory: from behavior to molecules. *Annu Rev Neurosci* 1986;9:435-87.

[55] Byrne J. 1987. Cellular analysis of associative learning. *Physiol Rev* 1987;6:329-439.

[56] Hawkins RD, Kandel ER, Siegelbaum SA. Learning to modulate transmitter release: themes and variations in synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 1993;16:625-65.

[57] Hawkins RD, Carew TJ, Kandel ER. Effects of interstimulus interval and contingency on classical conditioning of the *Aplysia* siphon withdrawal reflex. *J Neurosci* 1986;6:1695-701.

[58] Hawkins RD, Lalevic N, Clark GA, Kandel ER. Classical conditioning of the *Aplysia* siphon-withdrawal reflex exhibits response specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7620-4.

[59] Hawkins RD, Greene W, Kandel ER. Classical conditioning, differential conditioning, and second-order conditioning of the *Aplysia* gill-withdrawal reflex in a simplified mantle organ preparation. *Behav Neurosci* 1998;112:636-45.

[60] Pinsker H, Kupfermann I, Castellucci V, Kandel ER. Habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 1970;167:1740-2.

[61] Carew TJ, Castellucci VF, Kandel ER. An analysis of dishabituation and sensitization of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Int J Neurosci* 1971;2:79-98.

[62] Carew TJ, Walters ET, Kandel ER. Classical conditioning in a simple withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *J Neurosci* 1981;1:1426–37.

[63] Carew TJ, Hawkins RD, Kandel ER. Differential classical conditioning of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *Science* 1983;219:397–400.

[64] Colwill RM, Absher RA, Roberts ML. Context US learning in *Aplysia californica*. *J Neurosci* 1988;8:4434–9.

[65] Colwill RM, Absher RA, Roberts ML. Conditional discrimination learning in *Aplysia californica*. *J Neurosci* 1988;8:4440–4.

[66] Walters ET. Transformation of siphon responses during conditioning of *Aplysia* suggests a model of primitive stimulus-response association. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7616–9.

[67] Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 2001;294:1030–8.

[68] Castellucci VF, Frost WN, Goelet P, Montarolo PG, Schacher S, Morgan JA, Blumenfeld H, Kandel ER. Cell and molecular analysis of long-term sensitization in *Aplysia*. *J Physiol* 1986;81:349–57.

[69] Castellucci V, Pinsker H, Kupfermann I, Kandel ER. Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gillwithdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 1970;167:1745–8.

[70] Dale N, Kandel ER. L-glutamate may be the fast excitatory transmitter of *Aplysia* sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7163–7.

[71] Trudeau LE, Castellucci VF. Excitatory amino acid neurotransmission of sensory-motor and interneuronal synapses of *Aplysia californica*. *J Neurophysiol* 1993;70:1221–30.

[72] Conrad P, Wu F, Schacher S. Changes in functional glutamate receptors on a postsynaptic neuron accompany formation and maturation of an identified synapse. *J Neurobiol* 1999;39:237–48.

[73] Glanzman DL, Mackey SL, Hawkins RD, Dyke AM, Lloyd PE, Kandel ER. Depletion of serotonin in the nervous system of *Aplysia* reduces the behavioral enhancement of gill withdrawal as well as the heterosynaptic facilitation produced by tail shock. *J Neurosci* 1989;9:4200–13.

[74] Mackey SL, Kandel ER, Hawkins RD. Identified serotonergic neurons LCB1 and RCB1 in the cerebral ganglia of *Aplysia* produce presynaptic facilitation of siphon sensory neurons. *J Neurosci* 1989;9:4227–35.

[75] Marinesco S, Carew TJ. Serotonin release evoked by tail nerve stimulation in the CNS of *Aplysia*: characterization and relationship to heterosynaptic plasticity. *J Neurosci* 2002;22:2299–312.

[76] Montarolo PG, Goelet P, Castellucci VF, Morgan J, Kandel ER, Schacher S. A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* 1986;234:1249–54.

[77] Eliot LS, Hawkins RD, Kandel ER, Schacher S. Pairing-specific, activity-dependent presynaptic facilitation at *Aplysia* sensory-motor neuron synapses in isolated cell cultures. *J Neurosci* 1994;14:368–83.

[78] Schacher S, Wu F, Sun Z-Y. Pathway-specific synaptic plasticity: activity-dependent enhancement and suppression of longterm heterosynaptic facilitation at converging inputs on a single target. *J Neurosci* 1997;17:597–606.

[79] Bao J-X, Kandel ER, Hawkins RD. Involvement of presynaptic and postsynaptic mechanisms in a cellular analog of classical conditioning at *Aplysia* sensory-motor neuron synapses in isolated cell culture. *J Neurosci* 1998;18:458–66.

[80] Barbas D, DesGroseillers L, Castellucci VF, Carew TJ, Marinesco S. Multiple serotonergic mechanisms contributing to sensitization in *aplysia*: evidence of diverse serotonin receptor subtypes. *Learn Mem* 2003;10:373-86.

[81] Greenberg SM, Bernier L, Schwartz JH. Distribution of cAMP and cAMP-dependent protein kinases in *Aplysia* sensory neurons. *J Neurosci* 1987;7:291-301.

[82] Walters ET, Byrne JH, Carew TJ, Kandel ER. Mechanoafferent neurons innervating tail of *Aplysia*. I. Response properties and synaptic connections. *J Neurophysiol* 1983;50: 1522-42.

[83] Sossin WS, Diaz-Arrastia R, Schwartz JH. Characterization of two isoforms of protein kinase C in the nervous system of *Aplysia californica*. *J Biol Chem* 1993;268:5763–8.

[84] Sossin WS, Sacktor TC, Schwartz JH. Persistent activation of protein kinase C during the development of long-term facilitation in *Aplysia*. *Learn Mem* 1994;1:189 –202.

[85] Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:649–711.

[86] Ghirardi M, Montarolo PG, Kandel ER. A novel intermediate stage in the transition between short- and long-term facilitation in the sensory to motor neuron synapse of *Aplysia*. *Neuron* 1995;14:413–20.

[87] Sutton MA, Carew TJ. Parallel molecular pathways mediate expression of distinct forms of intermediate-term facilitation at tail sensory-motor synapses in *Aplysia*. *Neuron* 2000;26:219–31.

[88] Chitwood RA, Li Q, Glanzman DL. Serotonin facilitates AMPA-type responses in isolated siphon motor neurons of *Aplysia* in culture. *J Physiol* 2001;534:501–10.

[89] Roberts AC, Glanzman DL. Learning in *Aplysia*: looking at synaptic plasticity from both sides. *Trends Neurosci* 2003;26:662–70.

[90] Jin I, Kandel ER, Hawkins RD. Pre- and postsynaptic mechanisms of facilitation at *Aplysia* sensory-motor synapses: time and state dependence revisited. *Soc Neurosci Abstr* 2004;515.4 [Online].

[91] Li Q, Roberts AC, Glanzman DL. Synaptic facilitation and behavioral dishabituation in *Aplysia*: dependence on release of Ca²⁺ from postsynaptic intracellular stores, postsynaptic exocytosis, and modulation of postsynaptic AMPA receptor efficacy. *J Neurosci* 2005;25:5623–37.

[92] Pinsker HM, Hening WA, Carew TJ, Kandel ER. Long-term sensitization of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 1973;182:1039-42.

[93] O'Leary FA, Byrne JH, Cleary LJ. Long-term structural remodeling in *Aplysia* sensory neurons requires de novo protein synthesis during a critical time period. *J Neurosci* 1995;15:3519-25.

[94] Bailey CH, Chen M. Morphological Basis of Long-Term Habituation and Sensitization in *Aplysia*. *Science* 1983;220:91-3.

[95] Greenberg SM, Castellucci VF, Bayley H, Schwartz JH. A molecular mechanism for long-term sensitization in *Aplysia*. *Nature* 1987;329:62-5.

[96] Bacsikai BJ, Hochner B, Mahaut-Smith M, Adams SR, Kaang BK, Kandel ER, Tsien RY. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science* 1993;260:222–6.

[97] Martin KC, Michael D, Rose JC, Barad M, Casadio A, Zhu H, Kandel ER. MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron* 1997;18:899–912.

[98] Purcell AL, Sharma SK, Bagnall MW, Sutton MA, Carew TJ. Activation of a tyrosine kinase-MAPK cascade enhances the induction of long-term synaptic facilitation and long-term memory in *Aplysia*. *Neuron* 2003;37:473–84.

[99] Coan EJ, Collingridge GL. Characterization of an N-methyl-D-aspartate receptor component of synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 1987;22:1–8.

[100] Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* 1983;334:33–46.

[101] Riedel G, Manahan-Vaughan D, Kozikowski AP, Reymann KG. Metabotropic glutamate receptor agonist trans-azetidine-2,4-dicarboxylic acid facilitates maintenance of LTP in the dentate gyrus in vivo. *Neuropharmacology* 1995;34:1107–9.

[102] Riedel G, Wetzel W, Reymann KG. Metabotropic glutamate receptors in spatial and nonspatial learning in rats studied by means of agonist and antagonist application. *Learn Mem* 1995;2:243–65

[103] Bailey CH, Kandel ER. Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* 1993;55:397–426.

[104] Lamprecht R, LeDoux J. Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:45–54.

[105] Bailey CH, Chen M. Long-term sensitization in *Aplysia* increases the number of presynaptic contacts onto the identified gill motor neuron L7. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9356–9.

[106] Glanzman DL, Kandel ER, Schacher S. Targetdependent structural changes accompanying long-term synaptic facilitation in *Aplysia* neurons. *Science* 1990;249:799–802.

[107] Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 1999;402:421–5.

[108] Bozdagi O, Shan W, Tanaka H, Benson DL, Huntley GW. Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron* 2000;28:245–59.

[109] Malinow R, Malenka RC. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 2002;25:103–26.

[110] Winder DG, Mansuy IM, Osman M, Moallem TM, Kandel ER. Genetic and pharmacological evidence for a novel, intermediate phase of long-term potentiation suppressed by calcineurin. *Cell* 1998;92:25–37.

[111] Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD. Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3', 5'-cyclic cGMP in cultured hippocampal neurons. *Nature* 1995;376:74–80.

[112] Arancio O, Kiebler M, Lee CJ, Lev-Ram V, Tsien RY, Kandel ER, Hawkins RD. Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell* 1996;87:1025–35.

[113] Arancio O, Antonova I, Gambaryan S, Lohmann SM, Wood JS, Lawrence DS, Hawkins RD. Presynaptic role of cGMP-dependent protein kinase during long-lasting potentiation. *J Neurosci* 2001;21:143–9.

[114] Ninan I, Arancio O. Presynaptic CamkII is necessary for synaptic plasticity in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 2004;42:129–41.

[115] Malgaroli A, Ting AE, Wendland B, Bergamaschi A, Villa A, Tsien RW, Scheller RH. Presynaptic component of long-term potentiation visualized at individual hippocampal synapses. *Science* 1995;268:1624–8.

[116] Ryan TA, Ziv NE, Smith SJ. Potentiation of evoked vesicle turnover at individually resolved synaptic boutons. *Neuron* 1996;17:125–34.

[117] Zakharenko SS, Patterson SL, Dragatsis I, Zeitlin SO, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A. Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not a postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses. *Neuron* 2003;39:975–90.

[118] Lu F-M, Hawkins RD. Presynaptic and postsynaptic Ca²⁺ and CamKII contribute to LTP at synapses between individual CA3 neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:4264–9.

[119] Bao J-X, Kandel ER, Hawkins RD. Involvement of pre- and postsynaptic mechanisms in posttetanic potentiation at Aplysia synapses. *Science* 1997;275:969–73.

[120] Jin I, Hawkins RD. Presynaptic and postsynaptic mechanisms of a novel form of homosynaptic potentiation at Aplysia sensory-motor neuron synapses. *J Neurosci* 2003;23:7288–97.

[121] Antonov I, Antonova I, Kandel ER, Hawkins RD. Activity-dependent presynaptic facilitation and Hebbian LTP are both required and interact during classical conditioning in Aplysia. *Neuron* 2003;37:135–47.

[122] Antonov I, Kandel ER, Hawkins RD. Tests of pre- and postsynaptic mechanisms contributing to simple forms of learning in Aplysia. *Soc Neurosci Abstr* 2004;778.17 [Online].

[123] Bao J-X, Kandel ER, Hawkins RD. Involvement of pre- and postsynaptic mechanisms in posttetanic potentiation at Aplysia synapses. *Science* 1997;275:969–73

[124] Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 1999;283:1923–7.

[125] Engert F, Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 1999;399:66–70.

[126] Nikonenko I, Jourdain P, Muller D. Presynaptic remodeling contributes to activity-dependent synaptogenesis. *J Neurosci* 2003;24:8498–505.

[127] Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR, Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 2004;429:761–6.

[128] Antonova I, Arancio O, Trillat A-C, Wang H-G, Zablow L, Udo L, Kandel ER, Hawkins RD. Rapid increase in clusters of presynaptic proteins at onset of long-lasting potentiation. *Science* 2001;294:1547–50.

[129] Wang HG, Lu F-M, Jin I, Udo H, Kandel ER, de Vente J, Walter U, Lohmann SM, Hawkins RD, Antonova I. Presynaptic and postsynaptic roles of NO, cGK, and RhoA in longlasting potentiation and aggregation of synaptic proteins. *Neuron* 2005;45:389–403.

[130] Kim JH, Udo H, Li HL, Youn TY, Chen M, Kandel ER, Bailey CH. Presynaptic activation of silent synapses and growth of new synapses contribute to intermediate and long-term facilitation in Aplysia. *Neuron* 2003;40:151–65.

[131] Ghirardi M, Montarolo PG, Kandel ER. A novel intermediate stage in the transition between short- and long-term facilitation in the sensory to motor neuron synapse of *Aplysia*. *Neuron* 1995;14:413–20.

[132] Li H, Huang BSH, Kandel ER. Innervation-dependent clustering of glutamate receptors during regeneration and plasticity-associated synaptogenesis in *Aplysia*. *Soc Neurosci Abstr* 2004;614.18 [Online].

[133] Jin, I, Udo H, Kandel ER, Hawkins RD. Rapid increase in synaptophysin puncta at onset of homosynaptic potentiation in *Aplysia*. *Soc Neurosci Abstr* 2003;291.22 [Online].

[134] Cohen-Cory S. The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science* 2002;298:770–6.

[135] Jessell TM, Kandel ER. Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell* 1993;72(Suppl.): 1–30.

[136] Kishimoto A, Takai Y, Nishizuka Y. Activation of glycogen phosphorylase kinase by a calcium-activated, cyclic nucleotide-independent protein kinase system. *J Biol Chem* 1977;252:7449-52.

[137] Nishizuka Y. Isolation and characterization of delta-subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1592-6.

[138] Koide H, Ogita K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Isolation and characterization of the epsilon subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:1149-53.

[139] Huang KP, Nakabayashi H, Huang FL Isozymic forms of rat brain Ca²⁺-activated and phospholipid-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:8535-9.

[140] Huang FL, Yoshida Y, Nakabayashi H, Knopf JL, Young WS 3rd, Huang KP. Immunochemical identification of protein kinase C isozymes as products of discrete genes. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;149:946-52.

[141] Coussens L, Parker PJ, Rhee L, Yang-Feng TL, Chen E, Waterfield MD, Francke U, Ullrich A. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* 1986;233:859-66.

[142] Parker PJ, Coussens L, Totty N, Rhee L, Young S, Chen E, Stabel S, Waterfield MD, Ullrich A. The complete primary structure of protein kinase C--the major phorbol ester receptor. *Science*. 1986;233:853-9.

[143] Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992;258:607-14.

[144] Asaoka Y, Nakamura S, Yoshida K, Nishizuka Y. Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends Biochem Sci* 1992;17:414-7.

[145] Nishizuka Y. Membrane phospholipid degradation and protein kinase C for cell signalling. *Neurosci Res* 1992;15:3-5.]

[146] Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 1998;332:281-92.

[147] Wouters MM, Roeder JL, Tharayil VS, Stanich JE, Strega PR, Lei S, Bardsley MR, Ordog T, Gibbons SJ, Farrugia G. Protein kinase C $\{\gamma\}$ mediates regulation of proliferation by the serotonin 5-hydroxytryptamine receptor 2B. *J Biol Chem* 2009;284:21177-84.

[148] Denning MF. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1141–6.

[149] Gutcher I, Webb PR, Anderson NG. The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1061–70.

[150] Martelli AM, Mazzotti G, Capitani S. Nuclear protein kinase C isoforms and apoptosis. *Eur J Histochem* 2004;48:89–94.

[151] Gavrielides MV, Frijhoff AF, Conti CJ, Kazanietz MG. Protein kinase C and prostate carcinogenesis: targeting the cell cycle and apoptotic mechanisms. *Curr Drug Targets* 2004;5:431–43.

[152] Kitajima Y, Aoyama Y, Seishima M. Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell– cell detachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999;4:137–44.

[153] Jiang Y, Berk M, Singh LS, Tan H, Yin L, Powell CT, Xu Y. KiSS1 suppresses metastasis in human ovarian cancer via inhibition of protein kinase C alpha. *Clin Exp Metastasis* 2005;22:369–76.

[154] Fields AP, Gustafson WC. Protein kinase C in disease: cancer. *Methods Mol Biol* 2003;233:519–37.

[155] Koivunen J, Aaltonen V, Peltonen J. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Lett* 2005;235:1-10.

[156] Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:429–38.

[157] Murphy S, Frishman WH. Protein kinase C in cardiac disease and as a potential therapeutic target. *Cardiol Rev* 2005;13:3–12.

[158] Bright R, Mochly-Rosen D. The role of protein kinase C in cerebral ischemic and reperfusion injury. *Stroke* 2005;36:2781–90.

[159] Curtis TM, Scholfield CN. The role of lipids and protein kinase Cs in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev* 2004;20:28–43.

[160] Parker PJ. Inhibition of protein kinase C—Do we, can we, and should we? *Pharmacol Ther* 1999;82:263–7.

[161] Goekjian PG, Jirousek MR. Protein kinase C inhibitors as novel anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10:2117–40.

[162] Swannie HC, Kaye HB. Protein kinase C inhibitors. *Curr Oncol Rep* 2002;4:37–46.

[163] Coussens L, Rhee L, Parker PJ, Ullrich A. Alternative splicing increases the diversity of the human protein kinase C family. *DNA* 1987;6: 389-94.

[164] Nishizuka Y. Protein Kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 1995; 9:484–96.

[165] Bell RM, Burns DJ. Lipid activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 1991; 266:4661–4.

[166] Newton AC. Interaction of proteins with lipid headgroups: lessons from protein kinase C. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1993;22:1–25.

[167] Newton AC. Protein Kinase C: Structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 1995;270:28495–8.

[168] Coussens L, Parker PJ, Rhee L, Yang-Feng T L, Chen E, Waterfield MD, Francke U, Ullrich A. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* 1986; 233:859–66

[169] Newton AC. Protein kinase C. Seeing two domains. *Curr Biol* 1995; 5:973–6.

[170] Knopf JL, Lee MH, Sultzman LA, Kriz RW, Loomis CR, Hewick RM, Bell RM. Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell* 1986;46:491–502.

[171] Medkova M, Cho W. Differential membrane-binding and activation mechanisms of protein kinase C- α and ϵ . *Biochemistry* 1998;37:4892–4900.

[172] Garcia-Garcia J, Gomez-Fernandez J, Corbalan-Garcia S. Structural characterization of the C2 domain of novel protein kinase C ϵ . *Eur J Biochem* 2001;268:1107–17.

[173] Corbalan-Garcia S, Sanchez-Carrillo S, Garcia-Garcia J, Gomez-Fernandez J. Characterization of the membrane binding mode of the C2 domain of PKC ϵ . *Biochemistry* 2003;42:11661–68.

[174] Lopez-Andreo M, Gomez-Fernandez J, Corbalan-Garcia S. The simultaneous production of phosphatidic acid and diacylglycerol is essential for the translocation of protein kinase C ϵ to the plasma membrane in RBL-2H3 cells. *Mol Biol Cell* 2003;14:4885–95.

[175] Csukai M, Chen CH, De Matteis MA, Mochly-Rosen D. The coatamer protein beta-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase C ϵ . *J Biol Chem* 1997;272:29200–6.

[176] Besson A, Wilson TL, Yong VW. The anchoring protein RACK1 links protein kinase C ϵ to integrin β chains. Requirements for adhesion and motility. *J Biol Chem* 2002;277:22073–84.

[177] Benes CH, Wu N, Elia AEH, Dharia T, Cantley LC, Soltoff SP. The C2 domain of PKC δ is a phosphotyrosine binding domain. *Cell* 2005;121:271–80.

[178] House C, Kemp BE. Protein kinase C contains a pseudosubstrate in its regulatory domain. *Science* 1987;238:1726–8.

[179] Mosior M, McLaughlin S. Peptides that mimic the pseudosubstrate region of protein kinase C bind to acidic lipids in membranes. *Biophys J* 1991;60:149–59.

[180] Lehel C, Olah Z, Jakab G, et al. Protein kinase C epsilon subcellular localization domains and proteolytic degradation sites. A model for protein kinase C conformational changes. *J Biol Chem* 1995;270:19651–8.

[181] Liao L, Hyatt SL, Chapline C, Jaken S. Protein kinase C domains involved in interactions with other proteins. *Biochemistry* 1994;33:1229–33.

[182] Newton AC. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: Protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* 2003;370:361–71.

[183] Messerschmidt A, Macieira S, Velarde M, Badeker M, Benda C, Jestel A, Brandstetter H, Neufeind T, Blaesse M. Crystal structure of the catalytic domain of human atypical protein kinase C γ reveals interaction mode of phosphorylation site in turn motif. *J Mol Biol* 2005;352:918–31.

[184] Xu ZB, Chaudhary D, Olland S, Wolfrom S, Czerwinski R, Malakian K, Lin L, Stahl ML, Joseph-McCarthy D, Benander C, Fitz L, Greco R, Somers WS, Mosyak L. Catalytic domain crystal structure of protein kinase C θ . *J Biol Chem* 2004;279:50401–9.

[185] Denzel A, Hare KJ, Zhang C, Shokat K, Jenkinson EJ, Anderson G, Hayday A. Cutting edge: a chemical genetic system for the analysis of kinases regulating T cell development. *J Immunol* 2003;171:519–23.

[186] Emrick MA, Lee T, Starkey PJ, Mumby MC, Resing KA, Ahn NG. The gatekeeper residue controls autoactivation of ERK2 via a pathway of intramolecular connectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:18101–6.

[187] Newton AC, Johnson JE. Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim Biophys Acta* 1998;1376:155–72.

[188] Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* 2000;19:496–503.

[189] Dutil EM, Toker A, Newton AC. Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1. *Curr Biol* 1998;8:1366–75.

[190] Gao T, Toker A, Newton AC. The carboxyl terminus of protein kinase C provides a switch to regulate its interaction with the phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1. *J Biol Chem* 2001;276:19588–96.

[191] Sonnenburg ED, Gao T, Newton AC. The phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1, phosphorylates conventional protein kinase C isozymes by a mechanism that is independent of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 2001;276:45289–97.

[192] Edwards AS, Newton AC. Phosphorylation at conserved carboxyl-terminal hydrophobic motif regulates the catalytic and regulatory domains of protein kinase C. *J Biol Chem* 1997;272:18382–90.

[193] Gao T, Newton AC. The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of Hsp70 to protein kinase C. *J Biol Chem* 2002;277:31585–92.

[194] Liu Y, Graham C, Li A, Fisher RJ, Shaw S. Phosphorylation of the protein kinase C- θ activation loop and hydrophobic motif regulates its kinase activity, but only activation loop phosphorylation is critical to in vivo nuclear-factor- κ B induction. *Biochem J* 2002;361:255–65.

[195] Rybin VO, Sabri A, Short J, Braz JC, Molkentin JD, Steinberg SF. Cross regulation of nPKC isoform function in cardiomyocytes: role of PKC δ in activation loop phosphorylations and PKC ϵ in hydrophobic motif phosphorylations. *J Biol Chem* 2003;278:14555–64.

[196] Yang J, Garrod SM, Deal MS, Anand GS, Woods VL Jr, Taylor S. Allosteric network of cAMPdependent protein kinase revealed by mutation of Tyr204 in the P+1 loop. *J Mol Biol* 2005;346:191–201.

[197] Odawara M, Kadowaki T, Yamamoto R, Shibasaki Y, Tobe K, Accili D, Bevins C, Mikami Y, Matsuura N, Akanuma Y. Human diabetes associated with a mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. *Science* 1989;245:66–8.

[198] Taparowsky E, Suard Y, Fasano O, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M. Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 1982;300:762–5.

[199] Grodsky N, Li Y, Bouzida D, Love R, Jensen J, Nodes B, Nonomiya J, Grant S. Structure of the catalytic domain of human protein kinase C β II complexed with a bisindolylmaleimide inhibitor. *Biochemistry* 2006;45:13970–81.

[200] Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* 2008;88:1341–78.

[201] Kheifets V, Mochly-Rosen D. Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: Design of specific modulators of kinase function. *Pharmacol Res* 2007;55: 467–76.

[202] Inoue M, Kishimoto A, Takai Y, Nishizuka Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem* 1977;252:7610–6.

[203] Hernandez AI, Blace N, Crary JF, Serrano PA, Leitges M, Libien JM, Weinstein G, Tcherapanov A, Sacktor TC. Protein kinase M zeta synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C zeta catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory. *J Biol Chem* 2003;278:40305–16.

[204] Kiley SC, Parker PJ. Differential localization of protein kinase C isozymes in U937 cells: evidence for distinct isozyme functions during monocyte differentiation. *J Cell Sci* 1995;108:1003-16.

[205] Blobe GC, Stribling DS, Fabbro D, Stabel S, Hannun YA. Protein kinase C beta II specifically binds to and is activated by F-actin. *J Biol Chem* 1996;271:15823-30.

[206] Stahelin RV, Wang J, Blatner NR, Rafter JD, Murray D, Cho W. The origin of C1A-C2 interdomain interactions in protein kinase C α . *J Biol Chem* 2005;280:52–63.

[207] Feng X, Becker KP, Stribling SD, Peters KG, Hannun YA. Regulation of receptor-mediated protein kinase C membrane trafficking by autophosphorylation. *J Biol Chem* 2000;275:17024–34.

[208] Feng X, Hannun YA. An essential role for autophosphorylation in the dissociation of activated protein kinase C from the plasma membrane. *J Biol Chem* 1998;273:26870–874.

[209] Mochly-Rosen D, Khaner H, Lopez J. Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3997–4000.

[210] Pascale A, Amadio M, Govoni S, Battaini F. The aging brain, a key target for the future: The protein kinase C involvement. *Pharmacol Res* 2007;55:560-9.

[211] Mochly-Rosen D. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 1995;268:247–51.

[212] Ron D, Mochly-Rosen D. An autoregulatory region in protein kinase C: the pseudoanchoring site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:492–6.

[213] Souroujon MC, Mochly-Rosen D. Peptide modulators of protein–protein interactions in intracellular signaling. *Nat Biotechnol* 1998;16:919–24.

[214] Stebbins EG, Mochly-Rosen D. Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of beta II protein kinase C. *J Biol Chem* 2001;276:29644–50.

[215] Banci L, Cavallaro G, Kheifets V, Mochly-Rosen D. Molecular dynamics characterization of the C2 domain of protein kinase Cbeta. *J Biol Chem* 2002;277:12988–97.

[216] Schechtman D, Craske ML, Kheifets V, Meyer T, Schechtman J, Mochly-Rosen D. A critical intramolecular interaction for protein kinase Cepsilon translocation. *J Biol Chem* 2004;279:15831–40.

[217] Chen L, Hahn H, Wu G, Chen CH, Liron T, Schechtman D, Cavallaro G, Banci L, Guo Y, Bolli R, Dorn GW 2nd, Mochly-Rosen D. Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11114–9.

[218] Mochly-Rosen D, Gordon AS. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J* 1998;12:35–42.

[219] Brandman R, Disatnik MH, Churchill E, Mochly-Rosen D. Peptides derived from the C2 Domain of Protein Kinase C (PKC) modulate PKC activity and identify potential protein-protein interaction surfaces. *J Biol Chem* 2007;282:4113–23.

[220] Bright R, Raval AP, Dembner JM, Perez-Pinzon MA, Steinberg GK, Yenari MA, Mochly-Rosen D. Protein kinase C delta mediates cerebral reperfusion injury in vivo. *J Neurosci*. 2004;24:6880–8

[221] Mochly-Rosen D, Basbaum AI, Koshland DE Jr. Distinct cellular and regional localization of immunoreactive protein kinase C in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:4660-4.

[222] Dekker LV, Parker PJ. Protein kinase C-a question of specificity. *Trends Biochem Sci* 1994;19:73–7.

[223] Mochly-Rosen D, Henrich CJ, Cheever L, Khaner H, Simpson PC. A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. *Cell Regul* 1990;1:693–706.

[224] Ron D, Chen CH, Caldwell J, Jamieson L, Orr E, Mochly-Rosen D. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:839–43.

[225] Aitken A, Ellis CA, Harris A, Sellers LA, Toker A. Kinase and neurotransmitters. *Nature* 1990;344:594.

[226] Mochly-Rosen D, Khaner H, Lopez J, Smith BL. Intracellular receptors for activated protein kinase C. Identification of a binding site for the enzyme. *J Biol Chem* 1991;266:14866–8.

[227] Fotouhi N, Graves B. Small molecule inhibitors of p53/MDM2 interaction. *Curr Top Med Chem* 2005; 5:159–165.

[228] Mochly-Rosen D, Miller KG, Scheller RH, Khaner H, Lopez J, Smith BL. p65 fragments, homologous to the C2 region of protein kinase C, bind to the intracellular receptors for protein kinase C. *Biochemistry* 1992;31:8120–4.

[229] Ron D, Luo J, Mochly-Rosen D. C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of beta protein kinase C in vivo. *J Biol Chem* 1995;270:24180–7.

[230] Bommert K, Charlton MP, DeBello WM, Chin GJ, Betz H, Augustine GJ. Inhibition of neurotransmitter release by C2-domain peptides implicates synaptotagmin in exocytosis. *Nature* 1993;363:163–5.

[231] Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. Identification of three additional members of rat protein kinase C family: delta-, epsilon- and zeta- subspecies. *FEBS Lett* 1987;226:125–8.

[232] Sossin WS, Diaz-Arrastia R, Schwartz JH. Characterization of two isoforms of protein kinase C in the nervous system of *Aplysia californica*. *J Biol Chem* 1993;268:5763–8.

[233] Sossin WS, Schwartz JH. Ca(2+)-independent protein kinase Cs contain an amino-terminal domain similar to the C2 consensus sequence. *Trends Biochem Sci* 1993;18:207–8.

[234] Johnson JA, Gray MO, Chen CH, Mochly-Rosen D. A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme-selective antagonist of cardiac function. *J Biol Chem* 1996;271: 24962–6.

[235] Gray MO, Karliner JS, Mochly-Rosen D. A selective epsilon-protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death. *J Biol Chem* 1997;272:30945–51.

[236] Dorn GW 2nd, Souroujon MC, Liron T, Chen CH, Gray MO, Zhou HZ, Csukai M, Wu G, Lorenz JN, Mochly-Rosen D. Sustained in vivo cardiac protection by a rationally

designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12798–803.

[237] Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In vivo protein transduction: Delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 1999;285:1569-72.

[238] Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, Barsoum J. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:664-8.

[239] Begley R, Liron T, Baryza J, Mochly-Rosen D. Biodistribution of intracellularly acting peptides conjugated reversibly to Tat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:949–54.

[240] Chen L, Wright LR, Chen CH, Oliver SF, Wender PA, Mochly-Rosen D. Molecular transporters for peptides: delivery of a cardioprotective epsilon PKC agonist peptide into cells and intact ischemic heart using a transport system. *Chem Biol* 2001;8:1123-9.

[241] Budas GR, Koyanagi T, Churchill EN, Mochly-Rosen D. Competitive inhibitors and allosteric activators of protein kinase C isoenzymes: a personal account and progress report on transferring academic discoveries to the clinic. *Biochem Soc Trans* 2007;35: 1021-6.

[242] Smith BL, Mochly-Rosen D. Inhibition of protein kinase C function by injection of intracellular receptors for the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188: 1235–40.

[243] Abeliovich A, Paylor R, Chen C, Kim JJ, Wehner JM, Tonegawa S. PKC γ mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. *Cell* 1993;75:1263–71.

[244] Hongpaisan J, Sun MK, Alkon DL. PKC ϵ activation prevents synaptic loss, A β elevation, and cognitive deficits in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Neurosci* 2011;31:630-43.

[245] Nelson TJ, Cui C, Luo Y, Alkon DL. Reduction of beta-amyloid levels by novel protein kinase C(epsilon) activators. *J Biol Chem* 2009;284:34514-21.

[246] Ji L, Chauhan A, Chauhan V. Upregulation of cytoplasmic gelsolin, an amyloid-beta-binding protein, under oxidative stress conditions: involvement of protein kinase C. *J Alzheimers Dis* 2010;19:829-38.

[247] Khan TK, Nelson TJ, Verma VA, Wender PA, Alkon DL. A cellular model of Alzheimer's disease therapeutic efficacy: PKC activation reverses Abeta-induced biomarker abnormality on cultured fibroblasts. *Neurobiol Dis* 2009;34:332-9.

[248] Alkon DL, Sun MK, Nelson TJ. PKC signaling deficits: a mechanistic hypothesis for the origins of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:51-60.

[249] Sun MK, Alkon DL. Pharmacology of protein kinase C activators: Cognition-enhancing and antidementic therapeutics. *Pharmacol Ther* 2010;127:66-77.

[250] Sun MK, Alkon DL. Protein kinase C activators as synaptogenic and memory therapeutics. *Arch Pharm Chem Life Sci* 2009;342:689-98.

[251] Hasham MI, Pelech SL, Krieger C. Glutamate-mediated activation of protein kinase C in hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 1997;228:115-8.

[252] Chen Y, Cantrell AR, Messing RO, Scheuer T, Catterall WA. Specific modulation of Na⁺ channels in hippocampal neurons by protein kinase C epsilon. *J Neurosci* 2005;25:507-13.

[253] Carr DB, Cooper DC, Ulrich SL, Spruston N, Surmeier DJ. Serotonin receptor activation inhibits sodium current and dendritic excitability in prefrontal cortex via a protein kinase C-dependent mechanism. *J Neurosci* 2002;22:6846-55.

[254] Carr DB, Day M, Cantrell AR, Held J, Scheuer T, Catterall WA, Surmeier DJ. Transmitter modulation of slow, activity-dependent alterations in sodium channel availability endows neurons with a novel form of cellular plasticity. *Neuron* 2003;39:793-806.

[255] Maurice N, Tkatch T, Meisler M, Sprunger LK, Surmeier DJ. D1/D5 dopamine receptor activation differentially modulates rapidly inactivating and persistent sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurosci* 2001;21:2268-77.

[256] Sato T, Tanaka K, Teramoto T, Ohnishi Y, Ohnishi Y, Hirate K, Irifune M, Nishikawa T. Facilitative effect of a novel AVP fragment analog, NC-1900, on memory retention and recall in mice. *Peptides* 2004;25:1139-46.

[257] Hoffman DA, Johnston D. Downregulation of transient K⁺ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC. *J Neurosci* 1998;18:3521-8.

[258] Manseau F, Sossin WS, Castellucci VF. Long-term changes in excitability induced by protein kinase C activation in *Aplysia* sensory neurons. *J Neurophysiol* 1998;79:1210-8.

[259] Roche KW, O'Brien RJ, Mammen AL, Bernhardt J, Huganir RL. Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* 1996;16:1179–88.

[260] Macek TA, Schaffhauser H, Conn PJ. Activation of PKC disrupts presynaptic inhibition by group II and group III metabotropic glutamate receptors and uncouples the receptor from GTP-binding proteins. *J Neurosci* 1998;18:6138–46.

[261] Suen PC, Wu K, Xu JL, Lin SY, Levine ES, Black IB. NMDA receptor subunits in the postsynaptic density of rat brain: expression and phosphorylation by endogenous protein kinases. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;59:215–28.

[262] Stevens CF, Sullivan JM. Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. *Neuron* 1998;21:885–93.

[263] Malenka RC, Madison DV, Nicoll RA. Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature* 1986;321:175–7.

[264] Nicolls DG. Presynaptic modulation of glutamate release. *Prog Brain Res* 1998;116:15–22.

[265] Alkon DL, Kubota M, Neary JT, Naito S, Coulter D, Rasmussen H. C-kinase activation prolongs Ca²⁺-dependent inactivation of K⁺ currents. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;134:1245–53.

[266] Farley J, Auerbach S. Protein kinase C activation induces conductance changes in *Hermissenda* photoreceptors like those seen in associative learning. *Nature* 1986;319:220–3.

[267] De Zeeuw CI, Hansel C, Bian F, Koekkoek SK, van Alphen AM, Linden DJ, Oberdick J. Expression of a protein kinase C inhibitor in Purkinje cells blocks cerebellar LTD and adaptation of the vestibulo-ocular reflex. *Neuron* 1998;20:495–508.

[268] Grega DS, Werz MA, MacDonald RL. Forskolin and phorbol esters reduce the same potassium conductance of mouse neurons in culture. *Science* 1987;235:345–8.

[269] Doerner D, Pitler TA, Alger BE. Protein kinase C activators block specific calcium and potassium current components in isolated hippocampal neurons. *J Neurosci* 1988;8 ;4069–78.

[270] Linden DJ, Smeyne M, Sun SC, Connor JA. An electrophysiological correlate of protein kinase C isozyme distribution in cultured cerebellar neurons. *J Neurosci* 1992;12:3601–8.

[271] Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B, Choquet D. Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 2004;7:695–6.

[272] Boehm J, Kang MG, Johnson RC, Esteban J, Huganir RL, Malinow R. Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron* 2006;51:213–25.

[273] Melyan Z, Wheal HV, Lancaster B. Metabotropic-mediated kainate receptor regulation of IsAHP and excitability in pyramidal cells. *Neuron* 2002;34:107–14.

[274] Gereau IV RW, Heinemann SF. Role of protein kinase C phosphorylation in rapid desensitization of metabotropic glutamate receptor 5. *Neuron* 1998;20:143–51.

[275] Okada M, Zhu G, Yoshida S, Hirose S, Kaneko S. Protein kinase associated with gating and closing transmission mechanisms in temporoammonic pathway. *Neuropharmacology* 2004;47:485–504.

[276] Jovanovic JN, Thomas P, Kittler JT, Smart TG, Moss SJ. Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABA(A) receptor phosphorylation, activity and cell-surface stability. *J Neurosci* 2004;24:522–30.

[277] Dobransky T, Doherty-Kirby A, Kim A, Brewer D, Lajoie G, Rylett RJ. Protein kinase C isoforms differentially phosphorylate human choline acetyltransferase regulating its catalytic activity. *J Biol Chem* 2004;279:52059–68.

[278] Andoh T, Itoh H, Higashi T, Saito Y, Ishiwa D, Kamiya Y, Yamada Y. PKC-independent inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by diacylglycerol. *Brain Res* 2004;1013:125–33.

[279] Pascale A, Gusev PA, Amadio M, Dottorini T, Govoni S, Alkon DL, Quattrone A. Increase of the RNA-binding protein HuD and posttranscriptional up-regulation of the GAP-43 gene during spatial memory. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:1217–22.

[280] Pascale A, Amadio M, Scapagnini G, Lanni C, Racchi M, Provenzani A, Govoni S, Alkon DL, Quattrone A. Neuronal ELAV proteins enhance mRNA stability by a PKCalpha dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:12065–70.

[281] Hama H, Hara C, Yamaguchi K, Miyawaki A. PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron* 2004;41:405–15.

[282] Stevens B. Neuron-astrocyte signaling in the development and plasticity of neural circuits. *Neurosignals* 2008;16:278–88.

[283] Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 2002;417:39–44.

[284] Song H, Stevens CF, Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci* 2002;5:438–45.

[285] Pilpel Y, Segal M. The role of LPA1 in formation of synapses among cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 2004;19:3151–64.

[286] Hongpaisan J, Alkon DL. A structural basis for enhancement of long-term associative memory in single dendritic spines regulated by PKC. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:19571–6.

[287] Sun Mk, Hongpaisan J, Nelson TJ, Alkon DL. Poststroke neuronal rescue and synaptogenesis mediated in vivo by protein kinase C in adult brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:13620–5.

[288] Poole AW, Pula G, Hers I, Crosby D, Jones ML. PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:528–35.

[289] Ron D, Kazanietz MG. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J* 1999;13:1658–76.

[290] Newton AC. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 2001;101:2353–64.

[291] Melchers BPS, DeGraan PNE, Schrama LH, Wadman WJ, et al. In: P. W. Landfield PW, Deadwyler SA, editors. *A Long – Term Potentiation: From Biophysics to Behavior*. Alan R. Liss, New York 1988:307–27.

[292] Routtenberg A, Cantalops I, Zaffuto S, Serrano P, Namgung U. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7657–62.

[293] Skene JH, Jacobson RD, Snipes GJ, McGuire CB, Norden JJ, Freeman JA. A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes. *Science* 1986;233:783–6.

[294] Jacobson RD, Virag I, Skene JH. A protein associated with axon growth, GAP-43, is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS. *J Neurosci* 1986;6:1843–55.

[295] Benowitz LI, Apostolides PJ, Perronne-Bizzozero N, Finklestein SP, Zwiers H. Anatomical distribution of the growth-associated GAP-43/B-50 in the adult rat brain. *J Neurosci* 1988;8:339–52.

[296] Goslin K, Schreyer DJ, Skene JH, Banker G. Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature* 1988;336:672–4.

[297] Verhaagen J, Oestreicher AB, Gispen WH, Margolis FL. The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *J Neurosci* 1989;9:683–91.

[298] Rekart JL, Meiri K, Routtenberg A. Hippocampal-dependent memory is impaired in heterozygous GAP-43 knockout mice. *Hippocampus* 2005;15:1–7.

[299] Olds JL, Anderson ML, McPhie DL, Alkon DL. Imaging of memory-specific changes in the distribution of protein kinase C in the hippocampus. *Science* 1989;245:866–9.

[300] McPhie DL, Matzel LD, Olds JL, Lester DS, Kuzirian AM, Alkon DL. Cell specificity of molecular changes during memory storage. *J Neurochem* 1993;60:646–51.

[301] Akers RF, Routtenberg A. Calcium-promoted translocation of protein kinase C to synaptic membranes: relation to the phosphorylation of an endogenous substrate (protein F1) involved in synaptic plasticity. *J Neurosci* 1987;7:3976–83.

[302] Akers RF, Lovinger DM, Colley PA, Linden DJ, Routtenberg A. Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation. *Science* 1986;231:587–9.

[303] [193] Schreurs BG, Tomsic D, Gusev PA, Alkon DL. Dendritic excitability microzones and occluded long-term depression after classical conditioning of the rabbit's nictitating membrane response. *J Neurophysiol* 1997;77:86–92.

[304] Alkon DL, Rasmussen H. A spatial-temporal model of cell activation. *Science* 1988;239:998–1005.

[305] Oancea E, Meyer T. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals, *Cell* 1998;95:307–18.

[306] Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA, Waxham MN. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* 1989;340:554–7.

[307] Malinow R, Schulman H, Tsien RW. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 1989;245:862–6.

[308] Malenka RC, Kauer LA, Perkel DJ, Nicoll RA. The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission-its role in long-term potentiation. *Trends eurosci* 1989;12:444–50.

[309] Zalutsky RA, Nicoll RA. Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science* 1990;248:1619–24.

[310] G. M. Ramakers, K. Heinen, W. H. Gispen, P. N. de Graan, Long term depression in the CA1 field is associated with a transient decrease in pre- and postsynaptic PKC substrate phosphorylation. *J Biol Chem* 2000;275:28682–7.

[311] van Dam EJ, Ruiter B, Kamal A, Ramakers GM, Gispen WH, de Graan PN. N-methyl-D-aspartate-induced long-term depression is associated with a decrease in postsynaptic protein kinase C substrate phosphorylation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 2002;320:129–32.

[312] Weeber EJ, Atkins CM, Selcher JC, Varga AW, Mirnikjoo B, Paylor R, Leitges M, Sweatt JD. A role for the beta isoform of protein kinase C in fear conditioning. *J Neurosci* 2000;20:5906–14.

[313] Bank B, DeWeer A, Kuzirian AM, Rasmussen H, Alkon DL. Classical conditioning induces long-term translocation of protein kinase C in rabbit hippocampal CA1 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1988–92.

[314] Alkon DL, Nelson TJ, Zhao W, Cavallaro S. Time domains of neuronal Ca²⁺ signalling and associative memory: steps through a calyculin, ryanodine receptor, K⁺ channel cascade. *Trends Neurosci* 1998;21:529–37.

[315] Schreurs BG, Oh MM, Alkon DL. Pairing-specific long-term depression of Purkinje cell excitatory postsynaptic potentials results from a classical conditioning procedure in the rabbit cerebellar slice. *J Neurophysiol* 1996;75:1051–60.

[316] Van der Zee Ea, Kronforst-Collins MA, Maizels ET, Hunzicker-Dunn M, Disterhoft JF. Gamma Isoform-selective changes in PKC immunoreactivity after trace eyeblink conditioning in the rabbit hippocampus. *Hippocampus* 1997;7:271–85.

[317] Olds JL, Golski S, McPhie DL, Olton D, Mishkin M, Alkon DL. Discrimination learning alters the distribution of protein kinase C in the hippocampus of rats. *J Neurosci* 1990;10:3707–13.

[318] Paylor R, Rudy JW, Wehner JM. Acute phorbol ester treatment improves spatial learning performance in rats. *Behav Brain Res* 1991;45:189–93.

[319] Paylor R, Morrison SK, Rudy JW, Waltrip LT, Wehner JM. Brief exposure to an enriched environment improves performance on the Morris water task and increases hippocampal cytosolic protein kinase C activity in young rats. *Behav Brain Res* 1992; 52:49–59.

[320] Colombo PJ, Wetsel WC, Gallagher M. Spatial memory is related to hippocampal subcellular concentrations of calcium-dependent protein kinase C isoforms in young and aged rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14195–9.

[321] Vazquez A, Pena de Ortiz S. Lead (Pb(+2)) impairs long-term memory and blocks learning-induced increases in hippocampal protein kinase C activity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;200:27–39.

[322] Bonini JS, Da Silva WC, Bevilaqua LRM, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Neuroscience* 2007;147:37–45.

[323] Olds JL, Bhalla US, McPhie DL, Lester DS, Bower JM, Alkon DL. Lateralization of membrane-associated protein kinase C in rat piriform cortex: specific to operant training cues in the olfactory modality. *Behav Brain Res* 1994;61:37–46.

[324] Yasoshima Y, Yamamoto T. Rat gustatory memory requires protein kinase C activity in the amygdale and cortical gustatory area. *Neuroreport* 1997;8:1363–7.

[325] Ahi J, Radulovic J, Spiess J. The role of hippocampal signaling cascades in consolidation of fear memory. *Behav Brain Res* 2004;149:17–31.

[326] Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 2004;279:40545–59.

[327] Lai Yt, Fan HY, Cherng CG, Chiang CY, Kao GS, Yu L. Activation of amygdaloid PKX pathway is necessary for conditioned cues-provoked cocaine memory performance. *Neurobiol Learn Mem* 2008;90:164–170.

[328] Jerusalinsky D, Quillfeldt JA, Walz R, Da Silva RC, Medina JH, Izquierdo I. Post-training intrahippocampal infusion of protein kinase C inhibitors causes amnesia in rats. *Behav Neural Biol* 1994;61:107–9.

[329] Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sactor TC. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 2006;313:1141–4.

[330] Shema R, Sacktor TC, Dudai Y. Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science* 2007;317:951–3.

[331] Alkon DL, Epstein H, Kuzirian A, Bennett MC, Nelson TJ. Protein synthesis required for long-term memory is induced by PKC activation on days before associative learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16432–7.

[332] Sun MK, Alkon DL. Dual effects of bryostatin-1 on spatial memory and depression. *Eur J Pharmacol* 2005;512:43–51.

[333] Cole G, Dobkins KR, Hansen LA, Terry RD, Saitoh T. Decreased levels of protein kinase C in Alzheimer brain. *Brain Res* 1988;452:165–74.

[334] Favit A, Grimaldi M, Nelson TJ, Alkon DL. Alzheimer's-specific effects of soluble beta-amyloid on protein kinase C-alpha and -gamma degradation in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5562–7.

[335] Matsushima H, Shimohama S, Chachin M, Taniguchi T, Kimura J. Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent protein kinase C changes in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1996;67:317–23.

[336] Kurumatani T, Fastbom J, Bonkale WL, Bogdanovic N, Winblad B, Ohm TG, Cowburn RF. Loss of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor sites and decreased PKC levels correlate with staging of Alzheimer's disease neurofibrillary pathology. *Brain Res* 1998;796:209–21.

[337] Chachin M, Shimohama S, Kunugi YU, Taniguchi T. Assessment of protein kinase C mRNA levels in Alzheimer's disease brains. *Jpn J Pharmacol* 1996;71:175–7.

[338] Eckert GP, Cairns NJ, Naras A, Gattaz WF, Muller WE. Cholesterol modulates the membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides in the hippocampus: specific changes in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2000;11:181–6.

[339] Lanius RA, Wagey R, Sahl B, Beattie BL. Protein kinase C activity and protein levels in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1997;764:75–80.

[340] Battaini F, Pascale A, Lucchi L, Pasinetti GM, Govoni S. Protein kinase C anchoring deficit in postmortem brains of Alzheimer's disease patients. *Exp. Neurol* 1999;159:559–64.

[341] Takashima A, Yokota T, Maeda Y, Itoh S. Pretreatment with caerulein protects against memory impairment induced by protein kinase C inhibitors in the rat. *Peptides* 1991;12:699–703.

[342] Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3908–13.

[343] Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* 2000;157:115–8.

[344] Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:238–45.

[345] Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 2004;305:96–9.

[346] Riedel G, Micheau J, Lam AG, Roloff EV, Martin SJ, Bridge H, de Hoz L, Poeschel B, McCulloch J, Morris RG. Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci* 1999;2:898–905.

[347] Wang HY, Pisano MR, Friedman E. Attenuated protein kinase C activity and translocation in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* 1994;15:293–8.

[348] Pakaski M, Balaspiri L, Checler F, Kasa P. Human amyloid-beta causes changes in the levels of endothelial protein kinase C and its alpha isoform in vitro. *Neurochem Int* 2002;41:409–14.

[349] Lee W, Boo JH, Jung MW, Park SD, Kim YH, Kim SU, Mook-Jung I. Amyloid beta peptide directly inhibits PKC activation. *Mol Cell Neurosci* 2004;26:222–31.

[350] Chauhan A, Chauhan VP, Brockerhoff H, Wisniewski HM. Action of amyloid beta-protein on protein kinase C activity. *Life Sci* 1991;49:1555–62.

[351] Govoni S, Bergamaschi S, Racchi M, Battaini F, Binetti G, Bianchetti A, Trabucchi M. Cytosol protein kinase C downregulation in fibroblasts from Alzheimer's disease patients. *Neurology* 1993;43:2581–6.

[352] Kinouchi T, Sorimachi H, Maruyama K, Mizuno K, Ohno S, Ishiura S, Suzuki K. Conventional protein kinase C (PKC)-alpha and novel PKC epsilon, but not -delta, increase the secretion of an N-terminal fragment of Alzheimer's disease amyloid precursor protein from PKC cDNA transfected 3Y1 fibroblasts. *FEBS Lett* 1995;364:203–6.

[353] Yeon SW, Jung MW, Ha MJ, Kim SU, Huh K, Savage MJ, Masliah E, Mook-Jung I. Blockade of PKC epsilon activation attenuates phorbol ester-induced increase of alpha-secretase-derived secreted form of amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:782–7.

[354] Zhu G, Wang D, Lin YH, McMahon T, Koo EH, Messing RO. Protein kinase C epsilon suppresses Aβ production and promotes activation of alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:997–1006.

[355] Choi DS, Wang D, Yu GQ, Zhu G, Kharazia VN, Paredes JP, Chang WS, Deitchman JK, Mucke L, Messing RO. PKCepsilon increases endothelin converting enzyme activity and reduces amyloid plaque pathology in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:8215–20.

[356] Alvarez-Jaimes L, Betancourt E, Centeno-Gonzalez M, Feliciano-Rivera MZ, Rodriguez D, De Ortiz SP, Maldonado-Vlaar CS. Spatial learning in rats is impaired by microinfusions of protein kinase C-gamma antisense oligodeoxynucleotide within the nucleus accumbens. *Neurobiol Learn Mem* 2004;81:120-36.

[357] Riedel G, Micheau J. Introduction: molecular mechanisms of memory formation--from receptor activation to synaptic changes. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:521-4.

[358] Akita Y. Protein kinase C-epsilon (PKC-epsilon): its unique structure and function. *J Biochem* 2002;132:847-52.

[359] Fagerström S, Pahlman S, Gestblom C, Nanberg E. Protein kinase C-epsilon is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ* 1996;7:775-85.

[360] Mangoura D, Dawson G. Opioid peptides activate phospholipase D and protein kinase C-epsilon in chicken embryo neuron cultures. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:2915-9.

[361] Mangoura D, Sogos V, Dawson G. Protein kinase C-epsilon is a developmentally regulated, neuronal isoform in the chick embryo central nervous system. *J Neurosci Res* 1993;35:488-98.

[362] Craig AM, Olds JL, Schreurs BG, Scharenberg AM, Alkon DL. Quantitative distribution of protein kinase C alpha, beta, gamma, and epsilon mRNAs in the hippocampus of control and nictitating membrane conditioned rabbits. *Brain Res Mol Brain Mol* 1993;19:269-76.

[363] Wetsel WC, Khan WA, Merchenthaler I, Rivera H, Halpern AE, Phung HM, NegroVilar A, Hannun YA. Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J Cell Biol* 1992;117:121-33.

[364] Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.

[365] Li H, Poulos TL. Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem* 2005;99:293-305.

[366] Thomas DD, Liu X, Kantrow SP, Lancaster JR Jr. The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:355-60.

[367] Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am Physiol Renal Physiol* 2003;285:F178-90.

[368] Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 2004;500:255-66.

[369] Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res* 2007;75:247-60.

[370] Oess S, Icking A, Fulton D, Govers R, Müller-Ester W. Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. *Biochem J* 2006;396:401-9.

[371] Sessa WC. eNOS at a glance. *J Cell Sci* 2004;117:2427-9.

[372] Finocchietto PV, Franco MC, Holod S, Gonzalez AS, Converso DP, Arciuch VG, Serra MP, Poderoso JJ, Carreras MC. Mitochondrial nitric oxide synthase: a masterpiece of metabolic adaptation, cell growth, transformation, and death. *Exp Biol Med* 2009;234:1020–8.

[373] Kato K, Giulivi C. Critical overview of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Front Biosci* 2006;11:2725–38.

[374] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315–424.

[375] Trujillo M, Ferrer-Sueta G, Radi R. Kinetic studies on peroxynitrite reduction by peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:1607–20.

[376] Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:662–80.

[377] Beckman JS. Understanding peroxynitrite biochemistry and its potential for treating human diseases. *Arch Biochem Biophys* 2009;484:114–6.

[378] Lancaster JR Jr. NO parkin in Parkinson's disease. *Science* 2004;304:1905 (Author Reply 1905).

[379] Lancaster JR Jr. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide* 1997;1:18–30.

[380] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373–6.

[381] Furchgott RF. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiol Scand* 1990;139:257–70.

[382] Ignarro LJ: Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1990;30:535–60.

[383] Ignarro LJ. Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. *Blood Vessels* 1991;28:67–73.

[384] Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9265–9.

[385] Murad F, Ishii K, Forstermann U, Gorsky L, Kerwin JF, Pollock J, Heller M. EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1990;24:441–8.

[386] Nakane M, Schmidt HHHW, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993;316:175–80.

[387] Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 2009;20:223–30.

[388] Kang YC, Kim PK, Choi BM, Chung HT, Ha KS, Kwon YG, Kim YM. Regulation of programmed cell death in neuronal cells by nitric oxide. *In Vivo* 2004;18:367–76.

[389] Moncada S, Bolapos JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem* 2006;97:1676–89.

[390] Garthwaite J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* 2008;27:2783–2802.

[391] Bon CL, Garthwaite J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 2003;23:1941–8.

[392] Blackshaw S, Eliasson MJ, Sawa A, Watkins CC, Krug D, Gupta A, Arai T, Ferrante RJ, Snyder SH. Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity. *Neuroscience* 2003;119:979–90.

[393] O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. Tests of the role of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:11285–9.

[394] Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* 2001;64:51–68.

[395] Bohme GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud M, Piot O, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9191–4.

[396] Rickard NS, Gibbs ME. Effects of nitric oxide inhibition on avoidance learning in the chick are lateralized and localized. *Neurobiol Learn Mem* 2003;79:252–6.

[397] Koylu EO, Kanit L, Taskiran D, Dagci T, Balkan B, Pogun S. Effects of nitric oxide synthase inhibition on spatial discrimination learning and central DA2 and mACh receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;81:32–40.

[398] Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intracellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 1991;254:1503–6.

[399] Chapman PF, Atkins CM, Allen MT, Haley JE, Steinmetz JE. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Neuroreport* 1992;3:567–70.

[400] Yamada K, Noda Y, Hasegawa T, Komori Y, Nikai T, Sugihara H, Nabeshima T. The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;276:460–6.

[401] Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Muller EE. Molsidomine attenuates No-nitro-L-arginine ethylester-induced deficits in a memory task in the rat. *Eur J Pharmacol* 2002;452:83–6.

[402] Weitzdoerfer R, Hoeger H, Engidawork E, Engelmann M, Singewald N, Lubec G, Lubec B. Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performance. *Nitric oxide* 2004;10:130–40.

[403] Fin C, Cunha CA, Bromberg E, Schmitz PK, Bianchin M, Medina JH, Izquierdo L. Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes. *Neurobiol Learn Mem* 1995;63:113–5.

[404] Pitsikas N. The nitric oxide (NO) donor molsidomine antagonizes scopolamine and L-NAME-induced performance deficits in a spatial memory task in the rat. *Behav Brain Res* 2009;200:160-4.

[405] Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Locatelli V, Sala ME, Muller EE. Effects of molsidomine on scopolamine-induced amnesia and hypermotility in the rat. *Eur J Pharmacol* 2001;426:193–200.

[406] Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Muller EE. Effects of the nitric oxide donor molsidomine on different memory components as assessed in the object-recognition task in the rat. *Psychopharmacology* 2002;162:239–45.

[407] Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Muller EE. The GABAB receptor and recognition memory: possible modulation of its behavioral effects by the nitrenergic system. *Neuroscience* 2003;118:1121–7.

[408] Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Sakellaris N, Muller EE. The nitric oxide donor molsidomine antagonizes age-related memory deficits in the rat. *Neurobiol Aging* 2005;26:259–64.

[409] Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992;8:3-11.

[410] Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 6368-71.

[411] Izumi Y, Benz AM, Clifford DB, Zorumski CF. Nitric oxide inhibitors attenuate N-methyl-aspartate excitotoxicity in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 1992;135:227-30.

[412] Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988;336:385-8.

[413] East SJ, Garthwaite J. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci Lett* 1991;123:17-9.

[414] Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.

[415] Gaily JA, Montague PR, Reeke GN Jr, Edelman GM. The NO hypothesis: Possible effects of a shortlived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3547-51.

[416] Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361:31-9.

[417] Kuba K, Kumamoto E. Long-term potentiation in vertebrate synapses: A variety of cascades with common subprocesses. *Prog Neurobiol* 1990;34:197-269.

[418] Bonhoeffer T, Staiger V, Aertsen A. Synaptic plasticity in rat hippocampal slice cultures: Local “Hebbian” conjunction of pre- and postsynaptic stimulation leads to distributed synaptic enhancement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8113-7.

[419] Bohme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* 1991;199:379-81.

[420] Haley JE, Wilcox GL, Chapman PF. The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 1992;8:211-6.

[421] Hawkins RD, Son H, Arancio O. Nitric oxide as a retrograde Messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res* 1998;118:155-72.

[422] Chetkovich DM, Klann E, Sweatt JD. Nitric oxide synthase-independent long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. *Neuroreport* 1993;4:919-22.

[423] Boulton CL, Southam E, Garthwaite J. Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience* 1995;63:699-703.

[424] Ko GY, Kelly PT. Nitric oxide acts as a postsynaptic signaling molecule in calcium/calmodulin-induced synaptic potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 1999;19:6784-94.

[425] Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:683-706.

[426] Zhuo M, Hu Y, Schultz C, Kandel ER, Hawkins RD. Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature* 1994;368:635-9.

[427] Zhuo M, Kandel ER, Hawkins RD. Nitric oxide and cGMP can produce either synaptic depression or potentiation depending on the frequency of presynaptic stimulation in the hippocampus. *NeuroReport* 1994;5:1033-6.

[428] Arancio O, Antonova I, Gambaryan S, Lohmann SM, Wood JS, Lawrence DS, Hawkins RD. Presynaptic role of cGMP-dependent protein kinase during long-lasting potentiation. *J Neurosci* 2001;21:143-9.

[429] Lu YF, Kandel ER, Hawkins RD. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurosci* 1999;19:10250-61.

[430] Gibb BJ, Garthwaite J. Subunits of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, expressed in rat brain. *Eur J Neurosci* 2001;13:539-44.

[431] Russwurm M, Wittau N, Koesling D. Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the NO-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem* 2001;276:44647-52.

[432] Bernabeu R, de Stein ML, Fin C, Izquierdo I, Medina JH. Role of hippocampal NO in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. *NeuroReport* 1995;6:1498–1500.

[433] Baratti CM, Kopf SR. A nitric oxide synthase inhibitor impairs memory storage in mice. *Neurobiol Learn Mem* 1996;65:197–201.

[434] Edwards TM, Rickard NS, Ng KT. Inhibition of guanylate cyclase and protein kinase G impairs retention for the passive avoidance task in the day-old chick. *Neurobiol Learn Mem* 2002;77:313–26.

[435] Kemenes I, Kemenes G, Andrew RJ, Benjamin PR, O'Shea M. Critical time-window for NO-cGMP-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *J Neurosci* 2002;22:1414–25.

[436] Bernabeu R, Schmitz P, Faillace MP, Izquierdo I, Medina JH. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *NeuroReport* 1996;7:585–8.

[437] Prickaerts J, de Vente J, Honig W, Steinbusch HW, Blokland A. cGMP, but not cAMP, in rat hippocampus is involved in early stages of object memory consolidation. *Eur J Pharmacol* 2002;436:83–7.

[438] Rosenkranz B, Winkelmann BR, Parnham MJ. Clinical pharmacokinetics of molsidomine. *Clin Pharmacokinet* 1996;30:372-84.

[439] Pitsikas N, Rigamonti AE, Bonomo SM, Cella SG, Muller EE. Molsidomine antagonizes L-NAME-induced acquisition deficits in a recognition memory task in the rat. *Pharmacol Res* 2003;47:311-5.

[440] Pitsikas N, Tsitsirigou S, Zisopoulou S, Sakellaridis N. The 5-HT_{1A} receptor and recognition memory. Possible modulation of its behavioral effects by the nitrenergic system. *Behav Brain Res* 2005;159:287-93.

[441] De Lima MNM, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schroder N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res* 2005;156:139–43.

[442] Pitsikas N, Zisopoulou S, Sakellaridis N. Nitric oxide donor molsidomine attenuates psychotomimetic effects of the NMDA receptor antagonist MK-801. *J Neurosci Res* 2006;84:299–305.

[443] Pitsikas N, Zisopoulou S, Pappas I, Sakellaridis N. The selective 5-HT₆ receptor antagonist Ro 04-6790 attenuates psychotomimetic effects of the NMDA receptor antagonist MK-801 *Behav Brain Res* 2008; 188: 304–9

[444] Willetts J, Balster RL, Leander JD. The behavioral pharmacology of NMDA receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1990;11:423–8.

[445] Tricklebank MD, Singh L, Oles RJ, Preston C, Iversen SD. The behavioral effects of MK-801: a comparison with antagonists acting noncompetitively and competitively at the NMDA receptor. *Eur J Pharmacol* 1989;167:127–35.

[446] Verna A, Moghaddam B. NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine. *J Neurosci* 1996;16:373–9.

[447] Coan EJ, Saywood W, Collingridge GL. MK-801 blocks NMDA receptor-mediated synaptic transmission and long term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 1987;80:111–4.

[448] Rollin B, Kesel M L. *The experimental animal in biomedical research.* 1990 (Vol. 1, Ed.). Boca Raton: CRC Press.

[449] Countryman RA, Kaban NL, Colombo PJ. Hippocampal c-fos is necessary for long-term memory of a socially transmitted food preference. *Neurobiol Learn Mem* 2005;84:175-83.

[450] Meilandt WJ, Barea-Rodriguez E, Harvey SA, Martinez JL Jr. Role of hippocampal CA3 μ -opioid receptor in spatial learning and memory. *J Neurosci* 2004;24:2953-62.

[451] Colombo PJ, Brightwell JJ, Countryman RA. Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. *J Neurosci* 2003;23:3547-54.

[452] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates* (5th ed.). San Diego, CA: Academic Press.

[453] Saitoh T, Dobkins KR. Protein kinase C in human brain and its inhibition by calmodulin. *Brain Res* 1986;379:196-9.

[454] Mochly-Rosen D, Henrich CJ, Cheever L, Khaner H, Simpson PC. A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. *Cell Regul* 1990;1:693-706.

[455] Spieler K, Schoch P, Martin JR, Haefely W. Environmental stimulation promotes changes in the distribution of phorbol ester receptor. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;46:553-60.

[456] McNamara R, Wees E, Lenox R. Differential subcellular redistribution of protein kinase C isozymes in the rat hippocampus induced by kainic acid. *J Neurochem* 1999;72:1735-43.

[457] England K, Rumsby MG. Changes in protein kinase C epsilon phosphorylation status and intracellular localization as 3T3 and 3T6 fibroblasts grow to confluency and quiescence: a role for phosphorylation at ser-729? *Biochem J* 2000;352:19-26.

[458] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.].

[459] Countryman RA, Kaban NL, Colombo PJ. Hippocampal c-fos is necessary for long-term memory of a socially transmitted food preference. *Neurobiol Learn Mem* 2005;84:175-83.

[460] Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31:673–704.

[461] Aggleton JP. One-trial object recognition by rats. *Q J Exp Psychol* 1985;37:279–94.

[462] Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988;31:47–59.

[463] Dix, S.L., Aggleton, J.P., 1999. Extending the spontaneous preference test of recognition, evidence of object–location and object–context recognition. *Behavioural Brain Research* 99, 191–200.

[464] Bertaina-Anglade, V., Enjuanes, E., Morillon, D., Drieu la Rochelle, C., 2006. The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 54, 99–105.

[465] Obinu, M.C., Reibaud, M., Miquet, J.M., Pasquet, M., Rooney, T., 2002. Brain-selective stimulation of nicotinic receptors by TC-1734 enhances ACh transmission from frontoparietal cortex and memory in rodents. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 26, 913–918

[466] Schiapparelli, L., Simon, A.M., Del Rio, J., Frechilla, D., 2006. Opposing effects of AMPA and 5-HT_{1A} receptor blockade on passive avoidance and object recognition performance, correlation with AMPA receptor subunit expression in rat hippocampus. *Neuropharmacology* 50, 897–907.

[467] Bartolini L, Casamenti F, Pepeu G. Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine and nucleus basalis lesions. *Pharmacol Biochem Behav* 1996, 53:277–283.

[468] Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1. Behavioral data. *Behav Brain Res* 1998;31: 47–59.

[469] Cavoy A, Delacour J. Spatial but not object recognition is impaired by aging in rats. *Physiol Behav* 1993;53:527–30.

[470] Begley R, Liron T, Baryza J, Mochly-Rosen D. Biodistribution of intracellularly acting peptides conjugated reversibly to Tat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:949-54.

[471] Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 1999;285:1569-72.

[472] Bright R, Steinberg GK, Mochly-Rosen D. DeltaPKC mediates microcerebrovascular dysfunction in acute ischemia and in chronic hypertensive stress in vivo. *Brain Res* 2007;1144:146-55.

[473] Inagaki K, Begley R, Ikeno F, Mochly-Rosen D. Cardioprotection by epsilon-protein kinase C activation from ischemia: continuous delivery and antiarrhythmic effect of an epsilon-protein kinase C-activating peptide. *Circulation* 2005;111:44-50.

[474] Scheff SW, Price D A, Schmitt F A, Mufson EJ. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2006;27:1372–84.

[475] Hongpaisan J, Sun MK, Alkon DL. PKC ϵ activation prevents synaptic loss, A β elevation, and cognitive deficits in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Neurosci* 2011;31:630-43.

[476] Etcheberrigaray R, Tan M, Dewachter I, Kuiperi C, Van der Auwera I, Wera S, Qiao L, Bank B, Nelson TJ, Kozikowski AP, Van Leuven F, Alkon DL. Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:11141-6.

[477] Patel SV. Pharmacotherapy of cognitive impairment in Alzheimer's disease: a review. *J Geriatr Psychiatr Neurol* 1995;8:81-95.

[478] Bates E, Bode C, Costa M, Gibson CM, Granger C, Green C, Grimes K, Harrington R, Huber K, Kleiman N, Mochly-Rosen D, Roe M, Sadowski Z, Solomon S, Widimsky P. Intracoronary KAI-9803 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Circulation* 2008;117:886-96.

[479] Bright R, Raval AP, Dembner JM, Pérez-Pinzón MA, Steinberg GK, Yenari MA, Mochly-Rosen D. Protein kinase C delta mediates cerebral reperfusion injury in vivo. *J Neurosci* 2004;24:6880-8.

[480] Prast H, Philippu A. Nitric oxide releases acetylcholine in the basal forebrain. *Eur J Pharmacol* 1992;216:139-40.

[481] Segovia G, Porrás A, Mora F. Effects of a nitric oxide donor on glutamate and GABA release in striatum and hippocampus of the conscious rat. *Neuroreport* 1994;5:1937-40.

[482] Segovia G, Mora F. Role of the nitric oxide in modulating the release of dopamine, glutamate, and GABA in striatum of the freely moving rat. *Brain Res Bull* 1998;45:275-9.

[483] Arancio O, Kiebler M, Lee CJ, Lev-Ram V, Tsien RY, Kandel ER. Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce longterm potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell* 1996;87:1025-35.

[484] Palumbo ML, Fosser NS, Rios H, Zorrilla Zubilete MA, Guelman LR, Cremaschi GA, Genaro NA. Loss of hippocampal neuronal nitric oxide synthase contributes to the stress-related deficit in learning and memory. *J Neurochem* 2007;102:261-74.