Αναφορά Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

Μέρος Α: Μέτρηση του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης σε κυτταροειδικό και ιστοειδικό επίπεδο, σε ζωντανούς νηματώδεις *Caenorhabditis elegans*

Μέρος Β: Λειτουργικός χαρακτηρισμός ενός μέλους της οικογένειας των DEG/ENaCs, στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans*

Νίκος Κούρτης

Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Νηματωδών

Υπεύθυνος Ερευνητής: Νεκτάριος Ταβερναράκης

Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας

Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας

Ηράκλειο 2007

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια απόκτησης του μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης “Μοριακή Βιολογία-Βιοϊατρική”, στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Νηματωδών υπό την επίβλεψη του Ερευνητή Β’, Νεκτάριου Ταβερναράκη, στο Ίνστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (ΙΜΒΒ) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ).

Πρωταρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον μέντορά μου Νεκτάριο Ταβερναράκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ ερευνητικά στο εργαστήριό του, την εμπιστοσύνη και τη συνεχή επιστημονική και γενικότερη καθοδήγησή του. Τον ευχαριστώ πραγματικά για την προσπάθεια που κάνει να ανταπεξέλθει στο δύσκολο και υπεύθυνο ρόλο του διδασκάλου και καθοδηγητή.

Στη συνέχεια, θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Γιάννη Βόγγλη για την προθυμία που έδειξε να με βοηθήσει, ιδιαίτερα κατά τον πρώτο καιρό παραμονής μου στο εργαστήριο. Εκτός από πολύτιμη βοήθεια, υπήρξε και εξαιρετικός φίλος και μέσα από την παρέα του ο χρόνος στο εργαστήριο ήταν πιο ευχάριστος (ειδικά τις μεταμεσονύκτιες ώρες…). Ευχαριστώ ιδιαίτερα το Μανώλη Βλάχο για τη φιλία που αναπτύξαμε, τη βοήθειά του και την ευχάριστη παρέα του. Αισθάνομαι υποχρεωμένος στην Αγγέλα Πασπαράκη για την άψογη τεχνική υποστήριξη και την ιδιαίτερη οργάνωση του εργαστηρίου. Ακόμη ευχαριστώ, τη Χρύσα Σαμαρά, τη Δάφνη Μπαζοπούλου, την Κωστούλα Τρουλινάκη, την Μαρκέλλα Κατίδου, τον Matthias Rieckher, την Marta Artal-Sanz και το Γίωργο Μουντουφάρη για την φιλική ατμόσφαιρα που δημιουργούν στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τους γονείς μου, για την αγάπη και την εμπιστοσύνη που μου έχουν δείξει όλα αυτά τα χρόνια, την πολύπλευρη στήριξή τους καθώς και για τον καθημερινό τους αγώνα να μου εξασφαλίσουν ένα καλύτερο μέλλον.

Τους αφιερώνω την παρούσα εργασία…

Μέρος Α

Μέτρηση του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης σε κυτταροειδικό και ιστοειδικό επίπεδο, σε ζωντανούς νηματώδεις *Caenorhabditis elegans*

Περιεχόμενα

1.Περίληψη……4

2.Summary……5

3.Εισαγωγή……6

4.Πειραματική διαδικασία-Αποτελέσματα……..8

4.1 Προετοιμασία διαγονιδιακών στελεχών……8

4.2 Συντήρηση και καλλιέργεια νηματωδών……...8

4.3 Φωτο-απενεργοποίηση του φθορίζοντα μάρτυρα (photobleaching) και ανάκτηση του σήματος φθορισμού (recovery)……....8

4.4 Ποσοτικοποίηση της εκπομπής φθορισμού και υπολογισμός του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης. ……..….9

4.5 Μέτρηση ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης σε νηματώδεις με έλλειψη στο γονίδιο *ife-2*……..9

5.Συζήτηση……..13

6.Βιβλιογραφία……33

1.Περίληψη

Οι διαθέσιμες μεθοδολογίες για τη μέτρηση του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης στηρίζονται στην ενσωμάτωση ραδιοσημασμένων αμινοξέων στις νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Η χρήση αυτής της μεθόδου έχει αρκετούς περιορισμούς και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταγραφή της πρωτεϊνοσύνθεσης σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς, σε ζωντανούς οργανισμούς. Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να ξεπεράσουμε τις παραπάνω δυσκολίες και καθιερώσαμε μια νέα μέθοδο για τη μέτρηση της πρωτεϊνοσύνθεσης σε επιλεγμένα κύτταρα και ιστούς ζωντανών νηματωδών *C. elegans*. Φθορίζουσες πρωτεΐνες όπως η GFP εκφράζονται με τη χρήση κατάλληλων υποκινητών σε κύτταρα/ιστούς που μας ενδιαφέρουν ή ακόμα και σε ολόκληρο το σώμα του ζώου. Η καταγραφή του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης στηρίζεται στην αναγέννηση του φθορισμού ύστερα από φωτο-απενεργοποίηση της GFP με τη χρήση φωτός υψηλής ενέργειας και κατάλληλου μήκους κύματος (Fluorescence Recovery After Photobleaching - FRAP). Για την αξιολόγηση της δυναμικής της μεθόδου μελετήσαμε τους ρυθμούς πρωτεϊνοσύνθεσης σε διαφόρους κυτταρικούς τύπους του νηματώδους. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την καταγραφή του ρυθμού παραγωγής πρωτεϊνών, σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς ζωντανών δειγμάτων που παρουσιάζουν διαφορετικό ενδογενή ρυθμό πρωτεϊνοσύνθεσης.

2.Summary

Currently available methodologies for measuring protein synthesis rates rely on metabolic labeling by incorporation of radioactive amino acids into nascent polypeptides. These approaches are hampered by several limitations and cannot be applied to monitor protein synthesis in specific cells or tissues, in live specimens. During this thesis we tried to overcome the above limitations and we established a novel method for monitoring protein synthesis in specific cells and tissues of live *Caenorhabditis elegans* animals. Fluorescent reporter proteins such as GFP are expressed in specific cells and tissues of interest or throughout animals using appropriate promoters. Protein synthesis rates are assessed by following fluorescence recovery after partial photobleaching of the fluorophore at targeted sites. We evaluated the method by examining protein synthesis rates in diverse cell types of the nematode. Because it is non-invasive, our approach allows monitoring of protein synthesis in single cells or tissues with intrinsically different protein synthesis rates.

3.Εισαγωγή

Η ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης είναι σημαντική για την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο. Η σύνθεση πρωτεϊνών απαιτεί μια σειρά σύνθετων αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών καθώς και μεταξύ RNA και πρωτεϊνών, που καταλήγει στο σχηματισμό πεπτιδικών δεσμών μεταξύ των αμινοξέων. Ο ρυθμός μετάφρασης του mRNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα καθορίζεται από μια πλειάδα μεταφραστικών παραγόντων (Kapp and Lorsch, 2004). Απορρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης έχει εμπλακεί σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος αλλά και κατά τη γήρανση (Bjornsti and Houghton, 2004; Syntichaki et al., 2007). Μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τη μέτρηση της πρωτεϊνοσύνθεσης, είναι η καταγραφή της ενσωμάτωσης ραδιενεργών αμινοξέων στις νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες (metabolic labeling) (Rennie et al., 1994). Παράλληλα, η μελέτη της κατάστασης των πολυσωμάτων (polysomal profiling), προσδίδει μια εικόνα για το ποσοστό του mRNA που συνδέεται με ενεργά πολυριβοσώματα. Οι παραπάνω μεθοδολογίες είναι χρήσιμες για την ανάλυση της πρωτεϊνοσύνθεσης σε κυτταροκαλλιέργιες και σε σχετικά ομογενείς απομονωμένους ιστούς.

Τόσο η καταγραφή της ενσωμάτωσης της ραδιενέργειας, όσο και η μελέτη των πολυσωμάτων εμφανίζουν αρκετά μειονεκτήματα. Συγκεκριμένα, οι προσεγγίσεις αυτές απαιτούν σχετικά μεγάλες ποσότητες βιολογικού υλικού (κύτταρα ή ιστό) και δεν επιτρέπουν την καταγραφή της πρωτεϊνοσύνθεσης σε συγκεκριμένους κυτταρικούς υποπληθυσμούς ή μοναδικά κύτταρα. Επιπλέον, σχετίζονται με τεχνικές δυσκολίες οι οποίες περιορίζουν τη χρησιμότητά τους. Για παράδειγμα, χρήση της τεχνικής της ραδιοσήμανσης σε απλούς οργανισμούς όπως ο νηματώδης *C. elegans* ή σε ιστούς θηλαστικών εμφανίζει δυσκολίες εξαιτίας της περιορισμένης πρόσληψης και μη ελεγχόμενης ή ασύμμετρης κατανομής της ραδιενέργειας στο ζώο ή τον ιστό. Μια άλλη αιτία ποικιλομορφίας προκύπτει λόγω των διαφορετικών ενδογενών ρυθμών πρωτεϊνοσύνθεσης στους διαφορετικούς ιστούς και κυτταρικούς τύπους. Έτσι, μεταβολές στην πρωτεϊνοσύνθεση σε συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς που αποτελούν μικρό ποσοστό της μάζας του ζώου (όπως το νευρικό σύστημα), μπορεί να επισκιάζονται από πιο εκτεταμένους ιστούς (όπως το έντερο και το μυϊκό σύστημα). Επιπλέον ούτε η μέθοδος του metabolic labeling άλλα ούτε και του polysomal profiling μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε ζωντανούς οργανισμούς.

Για να ξεπεράσουμε τις παραπάνω δυσκολίες, αναπτύξαμε μια καινούργια μέθοδο για την καταγραφή του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς, που στηρίζεται στην φωτο-απενεργοποίηση της GFP με τη χρήση φωτός υψηλής ενέργειας και κατάλληλου μήκους κύματος (Fluorescence Recovery After Photobleaching - FRAP). Η μέθοδος αυτή παρακάμπτει τα μειονεκτήματα που σχετίζονται με τις βιοχημικές μεθόδους και επιτρέπει την καταγραφή της πρωτεϊνοσύνθεσης σε συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς, σε ζωντανά ζώα. Η μέθοδος αυτή μπορεί να προσαρμοστεί για εφαρμογή και σε άλλους οργανισμούς πέρα του *C. elegans*. Η πειραματική προσέγγιση στηρίζεται στην έκφραση φθοριζόντων πρωτεϊνών, όπως η GFP και η DsRED, σε κύτταρα και ιστούς που μας

ενδιαφέρουν ή και σε ολόκληρα διαγονιδιακά ζώα. Στη συνέχεια, ο φθορισμός απενεργοποιείται, μέσω ακτινοβόλησης κυττάρων, ιστών ή ολόκληρων ζώων με ισχυρή πηγή φωτός. Επανεμφάνιση του φθορισμού, ενδεικτικό νέας πρωτεϊνοσύνθεσης, καταγράφεται στα επιλεγμένα κύτταρα ή ιστούς.

Οι εφαρμογές της μεθόδου FRAP περιλαμβάνουν συνήθως φωτο-απενεργοποίηση του φθορισμού σε καθορισμένες υποκυτταρικές περιοχές ή διαμερίσματα, μέσω δέσμης laser, σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Gribbon and Hardingham, 1998; Jacobson et al., 1991). Στόχος είναι η μελέτη της πλευρικής μετακίνησης ή διάχυσης πρωτεϊνών στη σκοτεινή, φωτο-απενεργοποιημένη περιοχή, από γειτονικές περιοχές (Lippincott-Schwartz and Patterson, 2003; Reits and Neefjes, 2001). Η ανάλυση αυτή μπορεί ακόμα να προσδώσει έμμεση πληροφορία σχετικά με τη συνέχεια του οργανιδίου και την κίνηση των πρωτεϊνών. Για το σκοπό της καταγραφής του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης, οι φθορίζουσες πρωτεΐνες ακτινοβολούνται σε όλο το μήκος του κυττάρου ή ιστού, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η επανεμφάνιση του φθορισμού προκύπτει από *de novo* πρωτεϊνοσύνθεση και όχι από απλή μετακίνηση πρωτεϊνών. Το αντιβιοτικό cycloheximide, ένας ειδικός αναστολέας της μετάφρασης του mRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση της συμμετοχής της νέας πρωτεϊνοσύνθεσης και της διάχυσης πρωτεϊνών στην επανεμφάνισης του φθορισμού μετά την απενεργοποίηση.

4.Πειραματική διαδικασία-Αποτελέσματα

4.1 Προετοιμασία διαγονιδιακών στελεχών

Για την εφαρμογή της μεθόδου που περιγράφουμε, είναι αναγκαία η δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών *C. elegans*, τα οποία εκφράζουν φθορίζουσες πρωτεΐνες της επιλογής μας στα κύτταρα ή τους ιστούς που θέλουμε να μελετήσουμε. Η τεχνική που ακολουθήσαμε είναι η μικροένεση των κατάλληλων πλασμιδιακών κατασκευών στο συγκίτιο της γονάδας ερμαφρόδιτων ατόμων (Fire, 1986; Mello et al., 1991; Stinchcomb et al., 1985). Η έκφραση του φθορίζον μάρτυρα στα επιθυμητά κύτταρα ή τους ιστούς γίνεται με χρήση των κατάλληλων υποκινητών. Πληροφορίες σχετικά με υποκινητές που οδηγούν την έκφραση γονιδίων σε συγκεκριμένα υποσύνολα κυττάρων στον *C. elegans* μπορεί να βρεθούν από τη βάση δεδομένων National Bioresource Project (NBRP, Japan; http://shigen.lab.nig.ac.jp/c.elegans/promoter). Συγκεκριμένα, για τους διάφορους τύπους νευρικών κυττάρων, μια εκτενής λίστα ενημερώνεται από τους Oliver Hobert και Shawn Lockery (http://chinook.uoregon.edu/index.html).

4.2 Συντήρηση και καλλιέργεια νηματωδών

Ο χειρισμός και συντήρηση διαγονιδιακών και μη στελεχών γίνεται σύμφωνα με τις κλασικές διαδικασίες (Brenner, 1974). Διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν την πρωτεΐνη-μάρτυρα στα κύτταρα ή τους ιστούς που μας ενδιαφέρουν αναπτύσσονται σε πιάτα 60mm, στρωμένα με το στέλεχος της *E. coli*, OP50 σε θερμοκρασία 20°C ή σε άλλη κατάλληλη θερμοκρασία ανάλογα με την πιθανή ευαισθησία των υπό εξέταση στελεχών.

4.3 Φωτο-απενεργοποίηση του φθορίζοντα μάρτυρα (photobleaching) και ανάκτηση του σήματος φθορισμού (recovery)

Για την ανάλυση χρησιμοποιούνται ζώα κατάλληλου αναπτυξιακού σταδίου ανάλογα με τους επιθυμητούς στόχους. Ζωντανοί νηματώδεις υποβάλλονται σε FRAP με τη χρήση μικροσκοπίου επιφθορισμού. Φθορίζοντα κύτταρα ή ιστοί φωτογραφίζονται χρησιμοποιώντας κατάλληλα φίλτρα. Ανάλογα με την εφαρμογή, τα ζώα μπορεί είτε να κινούνται, είτε να είναι αναισθητοποιημένα. Μια εναλλακτική στρατηγική είναι η χρήση μεταλλαγμένων στελεχών με περιορισμένη κινητικότητα. Χρήσιμο επίσης είναι να γίνεται χρήση του επικρατούς αλληλομόρφου *rol-6(su1006)*, ως μάρτυρα μετασχηματισμού κατά τη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων. Το αλληλόμορφο αυτό αναγκάζει το ζώο να κινείται γύρω από τον εαυτό του (rolling), παρά να κινείται ημιτονοειδώς, περιορίζοντας έτσι την κίνηση σε μια μικρή περιοχή του πιάτου. Ήπια αναισθητικά, τα οποία δεν παρεμβάλλονται στις μεταβολικές

διαδικασίες, όπως η levamisole μπορεί να χρησιμοποιηθούν. Τα ζώα φωτογραφίζονται πριν την έναρξη της ακτινοβόλησης, με χρήση κατάλληλης κάμερας προσαρμοσμένης στο μικροσκόπιο. Στη συνέχεια, τα ζώα ακτινοβολούνται χρησιμοποιώντας πηγή φωτός υψηλής ενέργειας και κατάλληλου μήκους κύματος, ανάλογα με το φάσμα διέγερσης της εκάστοτε φθορίζουσας πρωτεΐνης. Ασκώντας φωτο-απενεργοποίηση διαφορετικής έκτασης, εντοπίζουμε τα επίπεδα εκείνα τα οποία μειώνουν την εκπομπή φθορισμού στο 20-30% της αρχικής εκπομπής, χωρίς να προκαλούν βλάβη στον οργανισμό. Η πιθανή τοξικότητα που μπορεί να προκαλέσει η ακτινοβόληση, ελέγχεται με παρατήρηση της συμπεριφοράς του ζώου (κίνηση, εναπόθεση αυγών, πρόσληψη τροφής, ρυθμική κίνηση του φάρυγγα, απόκριση στο άγγιγμα) και της αναπαραγωγικής ικανότητας. Ζώα τα οποία εμφανίζουν σημάδια βλάβης μετά την ακτινοβόληση, εξαιρούνται από περαιτέρω ανάλυση. Ζώα στα οποία η μετάφραση του mRNA παρεμποδίζεται με τη χρήση cycloheximide, χρησιμοποιούνται ως controls. Μετά την ακτινοβόληση, τα ζώα ανακάμπτουν σε πιάτα με τροφή. Η καταγραφή της ανάκαμψης του φθορισμού γίνεται φωτογραφίζοντας τα ζώα σε διάφορες χρονικές στιγμές.

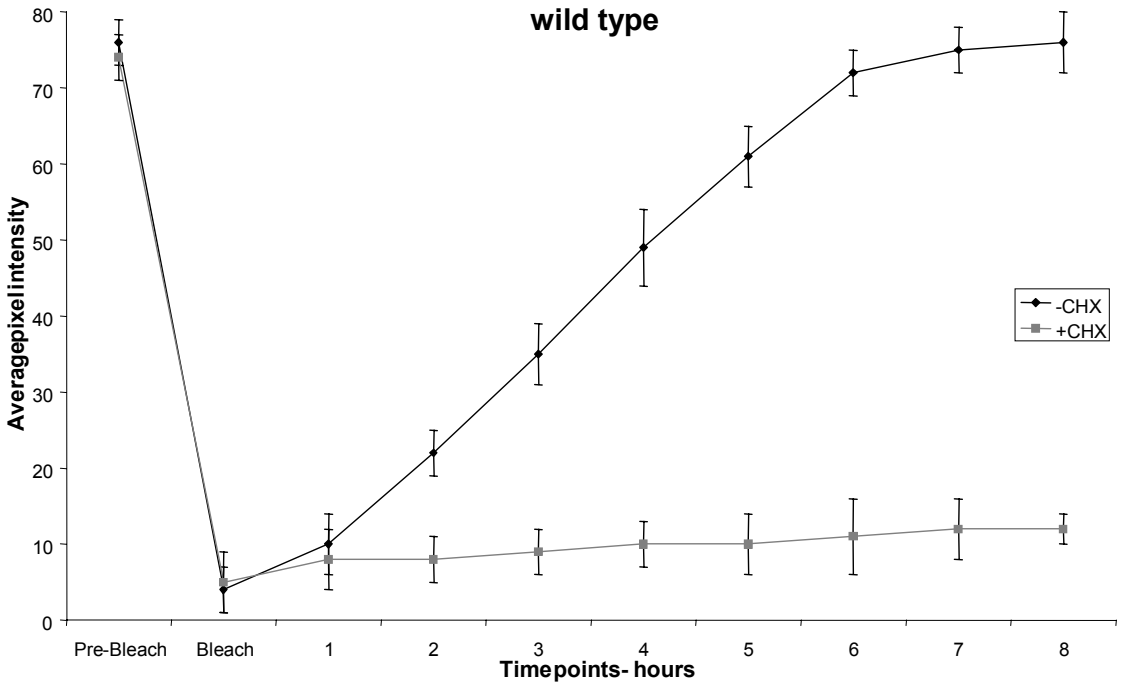
4.4 Ποσοτικοποίηση της εκπομπής φθορισμού και υπολογισμός του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης

Οι φωτογραφίες που συλλέγονται τόσο πριν την έναρξη του FRAP, αμέσως μετά και κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων ανάκαμψης αναλύονται με το πρόγραμμα ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://rsb.info.nih.gov/ij/, 1997-2006) και η μέση και μέγιστη φωτεινότητα καταγράφονται. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το Prism software package (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

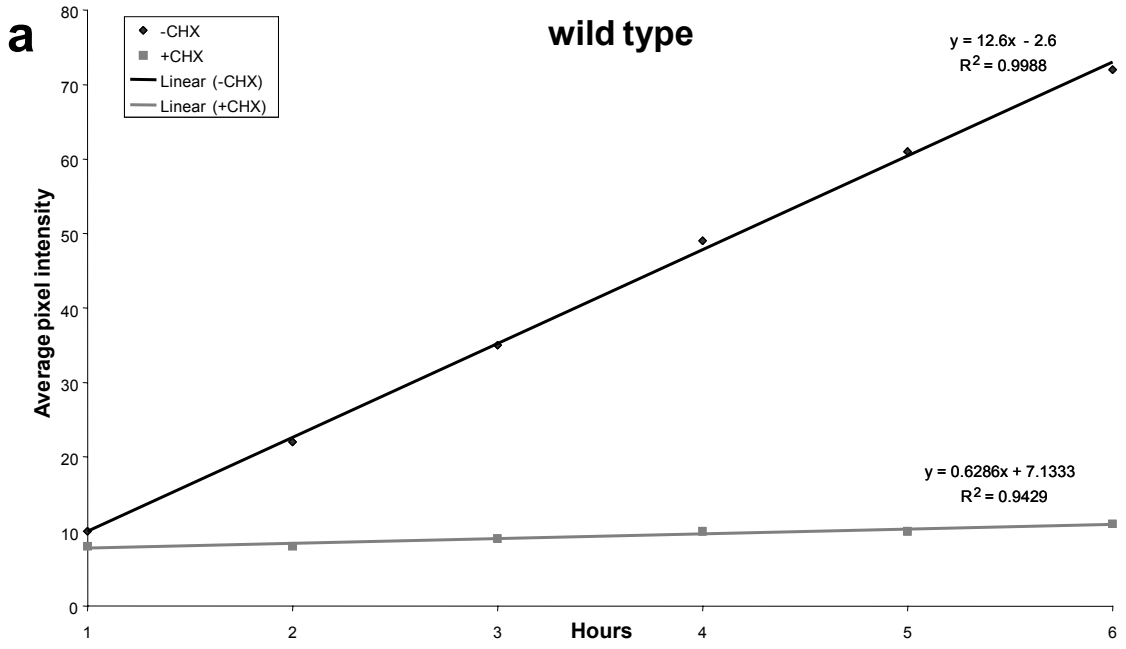
4.5 Μέτρηση ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης σε νηματώδεις με έλλειψη στο γονίδιο *ife-2*

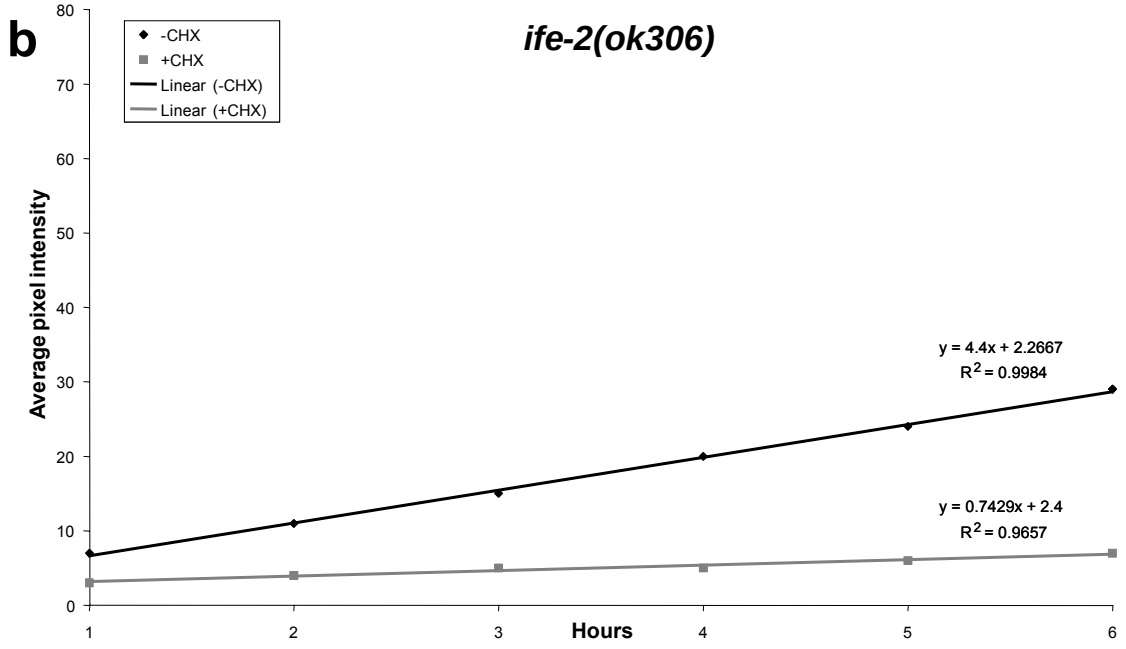
Η παραπάνω μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή της πρωτεϊνοσύνθεσης σε ζωντανούς νηματώδεις *C. elegans* με έλλειψη στο γονίδιο *ife-2* που κωδικοποιεί για μια από τις πέντε ισομορφές του eIF4E στους σωματικούς ιστούς (Keiper et al., 2000; Syntichaki et al., 2007). Ο eIF4E είναι ένας βασικός παράγοντας έναρξης της μετάφρασης του mRNA ο οποίος προσδένεται στην 7-μέθυλο-γουανοσίνη, στο 5' άκρο όλων των πυρηνικών mRNA και καθορίζει το ρυθμό της πρωτεϊνοσύνθεσης (Gingras et al., 1999). Μετά τη φωτοαπενεργοποίηση, η ανάκαμψη του φθορισμού καταγράφεται σε διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν GFP σε όλους τους σωματικούς ιστούς (**Εικ. 1**). Η περιγραφή της φάσης ανάκαμψης γίνεται με ανάλυση παλινδρόμησης (**Εικ. 2)**. Η κλίση της ευθείας αποτελεί μέτρο του ρυθμού ανάκαμψης. Τα αποτελέσματα από τη χρήση της μεθόδου αυτής προσομοιάζουν αποτελέσματα από τη μέτρηση της πρωτεϊνοσύνθεσης με τη χρήση ραδιενέργειας (δεν περιλαμβάνονται στην παρούσα αναφορά). Η ανάκαμψη του φθορισμού είναι περιορισμένη

σε ζώα με έλλειψη στο *ife-2* γονίδιο και σε ζώα μετά από επώαση σε cycloheximide (**Εικ. 2** και **3**).

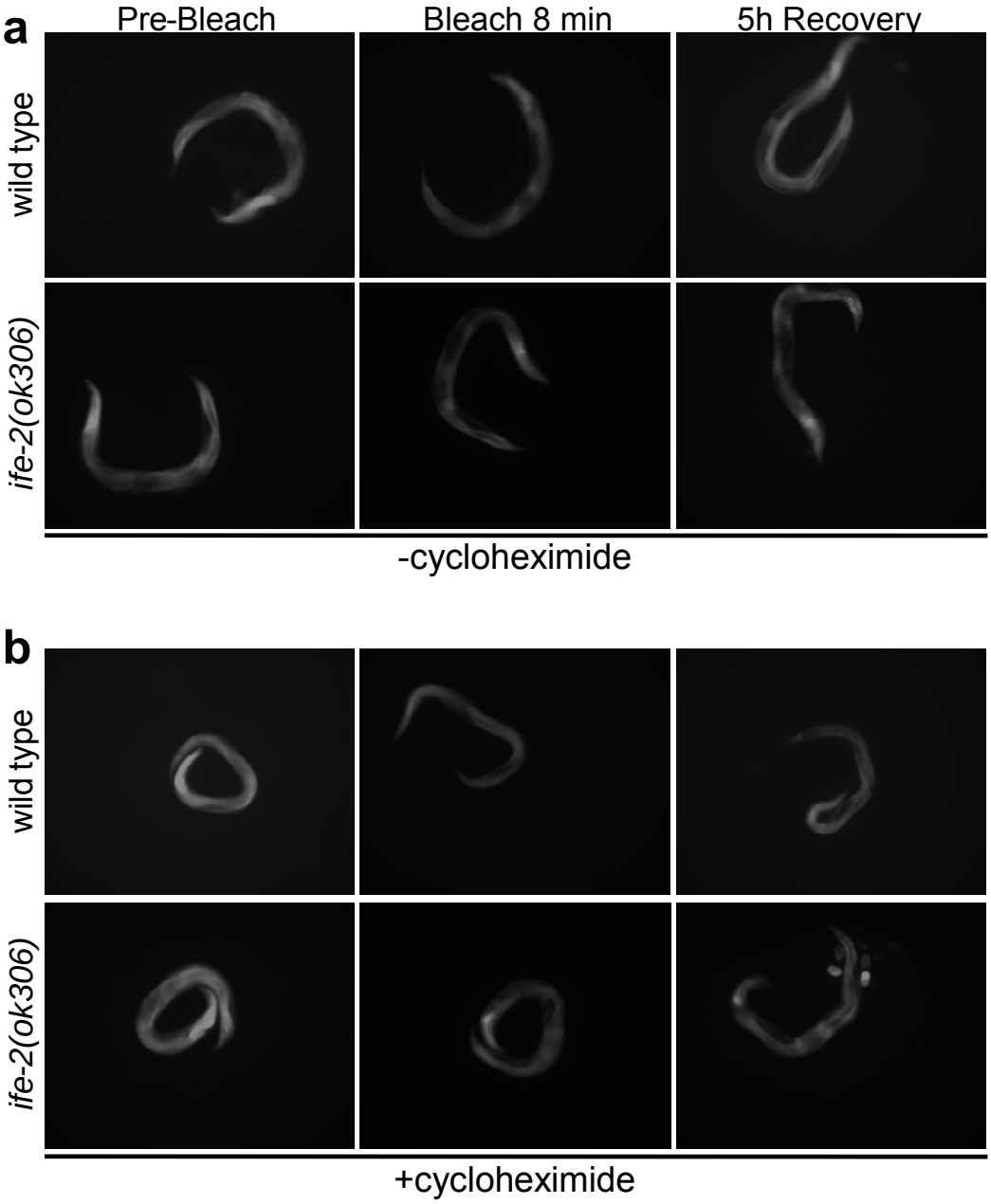


Εικόνα 1. Διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *ife-2* (p_{ife-2}GFP), σε όλους τους σωματικούς ιστούς, υπόκεινται σε φωτο-απενεργοποίηση σε επίπεδο ολόκληρου ζώου, μειώνοντας το επίπεδο φθορισμού περίπου στο 10% της αρχικής έντασης (μαύρη γραμμή). Το επίπεδο φθορισμού υπολογίζεται τόσο πριν την απενεργοποίηση (Pre-Bleach) καθώς και αμέσως μετά (Bleach). Η ανάκαμψη των επιπέδων φθορισμού καταγράφεται με μέτρηση της μέσης φωτεινότητας, σε μεσοδιαστήματα μιας ώρας. Οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν το SEM (τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα, 10 ζώα υπό εξέταση σε κάθε πείραμα). Επώαση των ζώων παρουσία του ειδικού αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης cycloheximide (CHX), παρεμποδίζει την ανάκαμψη του φθορισμού (γκρι γραμμή).





Εικόνα 2. Ανάλυση παλινδρόμησης της ανάκαμψης του φθορισμού τόσο σε ζώα αγρίου τύπου, όσο και σε ζώα με έλλειψη του IFE-2, τα οποία εκφράζουν GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *ife-2* (p_{ife-2}GFP), σε όλους τους σωματικούς ιστούς. Οι ευθείες καλύτερης προσαρμογής (best-fit lines) υπολογίζονται σύμφωνα με τις τιμές που προκύπτουν από την ανάλυση των διαφόρων φάσεων ανάκαμψης στα αντίστοιχα γενετικά υπόβαθρα (**a,** αγρίου τύπου και **b,** *ife-2(ok306)*, μαύρη γραμμή). Επίσης απεικονίζονται οι αντίστοιχες εξισώσεις που περιγράφουν τις γραμμές best-fit καθώς και οι τιμές R^2 για κάθε γραμμή. Η κλίση αντιστοιχεί στην πρώτη παράγωγο της μεταβολής του φθορισμού στη μονάδα του χρόνου (Δf/dt), το οποίο είναι ένα μέτρο του ρυθμού ανάκαμψης. Επώαση των ζώων με cycloheximide (CHX) οδηγεί σε αμελητέα ανάκαμψη του φθορισμού (γκρι γραμμή).



Εικόνα 3. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες διαγονιδιακών ζώων (φέρουν το μάρτυρα μετασχηματισμού *rol-6*, ο οποίος κάνει τα ζώα να γυρίζουν γύρω από τον επιμήκη άξονά τους) που εκφράζουν $p_{ife\text{-}2}$GFP σε όλους τους σωματικούς ιστούς, πριν την έναρξη απενεργοποίησης, αμέσως μετά από περίοδο ακτινοβόλησης όλου του ζώου για 8 λεπτά καθώς και μετά από περίοδο ανάκαμψης 5 ωρών, απουσία (**a**) και παρουσία (**b**) cycloheximide.

5. Συζήτηση

Η μέθοδος που περιγράφεται στην παρούσα εργασία επιτρέπει την παρακολούθηση της πρωτεϊνοσύνθεσης σε μοναδικά κύτταρα ή ιστούς με ενδογενώς διαφορετικούς ρυθμούς πρωτεϊνοσύνθεσης (για παράδειγμα νευρικά κύτταρα έναντι μυϊκών ή επιθηλιακών κυττάρων), σε ζωντανούς οργανισμούς. Κάτι τέτοιο δεν είναι δυνατό με τις υπάρχουσες μεθοδολογίες. Ο ρόλος συγκεκριμένων μεταφραστικών παραγόντων στη ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ή ειδικά αναπτυξιακά στάδια, μπορεί να μελετηθεί ελέγχοντας τους ρυθμούς ανάκαμψης του φθορισμού σε ζώα που φέρουν μεταλλαγές για τα αντίστοιχα γονίδια, ή σε ζώα αγρίου τύπου τα οποία υπόκεινται σε RNAi.

Για την εφαρμογή της μεθόδου, χρησιμοποιήσαμε δυο διαφορετικούς τρόπους για να παρέμβουμε ειδικά στην πρωτεϊνοσύνθεση. Πρώτον, με μεταλλαγές στο γονίδιο *ife-2*, που κωδικοποιεί για μια ισομορφή του μεταφραστικού παράγοντα eIF4E (Keiper et al., 2000) και δεύτερον χρησιμοποιώντας τον αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης, cycloheximide. Και οι δυο αυτοί χειρισμοί δεν επηρεάζουν τα επίπεδα του mRNA των πρωτεϊνών-μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν.

Ανάλογα με τον ιστό και τον τύπο κυττάρου που εξετάζουμε και το γενετικό υπόβαθρο των διαγονιδιακών ζώων, οι ρυθμοί ανάκαμψης του φθορισμού μπορεί να διαφέρουν σημαντικά. Για παράδειγμα, ο φθορισμός στους έξι νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για την αντίληψη του ήπιου αγγίγματος, επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα μετά από 5 ώρες. Αντίθετα, η ανάκαμψη του φθορισμού σε μυϊκά κύτταρα του φάρυγγα στο ίδιο χρονικό διάστημα είναι αμελητέα (τα αποτελέσματα δε συμπεριλαμβάνονται στην παρούσα αναφορά).

Η μέθοδος αυτή μπορεί να προσαρμοστεί όχι μόνο για τη μελέτη του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης, αλλά με κατάλληλες τροποποιήσεις μπορεί να καταγράψει και άλλες φάσεις της γονιδιακής έκφρασης, όπως η αντιγραφή του DNA , το μάτισμα του RNA και η μεταφορά και ανακύκλωση του mRNA. Για παράδειγμα, η επίδραση διαφόρων γενετικών ή φαρμακολογικών χειρισμών που στοχεύουν τις διαδικασίες αυτές, μπορεί να αξιολογηθεί με τη μέθοδο αυτή. Έτσι, εξαιτίας της απλότητας και της ευελιξίας, η μέθοδος αυτή μπορεί να βρει εφαρμογή σε ένα μεγάλο εύρος βιολογικών μελετών, σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα και οργανισμούς.

Μέρος Β

Λειτουργικός χαρακτηρισμός ενός μέλους της οικογένειας των DEG/ENaCs, στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans*

Περιεχόμενα

1.Περίληψη……..16

2.Summary……....17

3.Εισαγωγή……18
3.1. Ο οργανισμός μοντέλο *Caenorhabditis elegans*……..18
3.2 Η οικογένεια των Degenerins……20

4.Πειραματική διαδικασία – Αποτελέσματα……...22
4.1 Χαρακτηρισμός του προτύπου έκφρασης του γονιδίου T28B8.5…….22
4.1.1 Dye filling…….22
4.2 Χαρακτηρισμός των μεταλλαγών που φέρουν τα αλληλόμορφα *ok1014* και *tm717*……..24
4.3 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των στελεχών T28B8.5(*tm717*) και T28B8.5(*ok1014*)……26
4.4 Δοκιμασία χημειοτακτισμού σε υδατοδιαλυτές ελκτικές ενώσεις…….27
4.5 Δοκιμασία αντίδρασης στην παρουσία πτητικής απωθητικής ουσίας……29

5. Συζήτηση……..31

6.Βιβλιογραφία……...33

1.Περίληψη

Κοινό χαρακτηριστικό οργανισμών με μεγάλη μεταξύ τους φυλογενετική απόσταση όπως ο άνθρωπος, το σκουλήκι, η μύγα, ο αχινός και η ύδρα, είναι η ύπαρξη πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια των Degenerins, και σχηματίζουν πόρους στην κυτταρική μεμβράνη για το πέρασμα ιόντων νατρίου. Μέλη της οικογένειας αυτής συμμετέχουν σε ποικίλες λειτουργίες όπως η αντίληψη πρωτονίων (ASICs), η μηχανοαίσθηση (DEGs), η ενεργοποίηση από νευροπεπτίδια (FaNaChs) και στη ρύθμιση της ομοιόστασης του νατρίου (ENaCs).

Στη διάρκεια της παρούσης εργασίας επιχειρήθηκε ο χαρακτηρισμός ενός μέλους της οικογένειας των Degenerins και συγκεκριμένα του γονιδίου T28B8.5. Ο χαρακτηρισμός του προτύπου έκφρασης, έδειξε ότι το γονίδιο αυτό εκφράζεται σε νευρώνες υπεύθυνους για την αντίληψη χημικών ερεθισμάτων καθώς και σε νευρώνες άγνωστης λειτουργίας. Στη συνέχεια, στελέχη ομόζυγα για μεταλλαγές στο παραπάνω γονίδιο, εξετάστηκαν σε πειράματα συμπεριφοράς, με στόχο το λειτουργικό χαρακτηρισμό του γονιδίου .

2.Summary

Proteins of the Degenerin family form pores in cell membranes for the passage of sodium ions, in organisms as diverse as worms, flies, hydras, sea urchins and humans. Members of this family participate in various functions like, sensing of proton gradients (ASICs), mechanosensation (DEGs), activation by peptide neurotransmitters (FaNaChs) and regulation of sodium homeostasis (ENaCs).

During the present thesis we attempted the characterization of one member of the Degenerin family, namely the T28B8.5. Characterization of the expression pattern showed that this gene is expressed in neurons responsible for chemosensation, as well as in neurons with unknown function. In order to proceed to the functional characterization of this gene, we tested worms mutated for the T28B8.5 gene, in behavioral assays.

3.Εισαγωγή

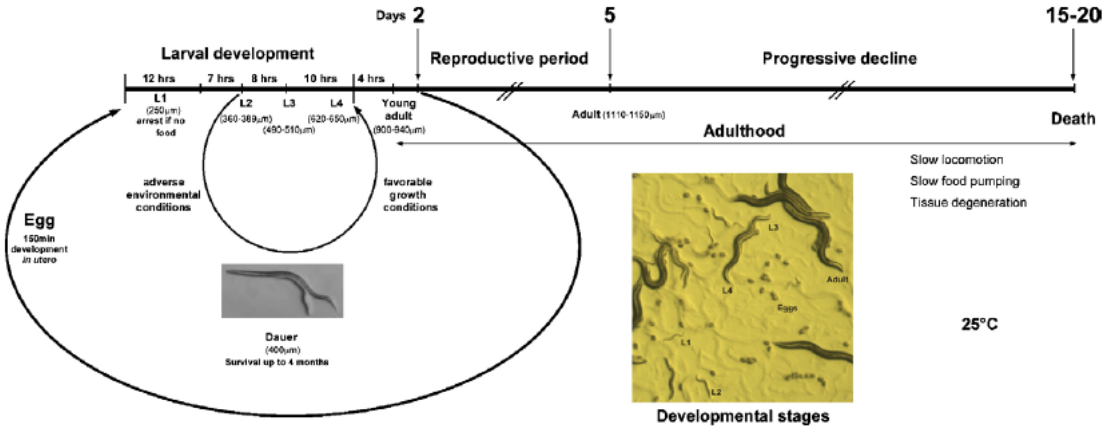
3.1. Ο οργανισμός μοντέλο *Caenorhabditis elegans*

Ο *C. elegans* είναι ένας μικρός (περίπου 1.3 mm σε μήκος και 100 μm σε διάμετρο), νηματώδης που ζει στο χώμα. Από την ανακάλυψή του ως ερευνητική πλατφόρμα από τον Sydney Brenner το 1974, μέχρι σήμερα, ο *C. elegans* έχει αποτελέσει ένα πολύτιμο εργαλείο για την βιοιατρική έρευνα (Brenner, 1974). Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα του *C. elegans* ως οργανισμού μοντέλου είναι η εκτεταμένη γενετική ανάλυση που μπορεί να πραγματοποιηθεί με αυτόν. Το μικρό του μέγεθος και οι απλές διατροφικές του απαιτήσεις (τρέφεται σε στρώμα βακτηρίων *Echerichia coli* σε τρυβλία petri ή σε υγρές καλλιέργειες), επιτρέπουν την εύκολη και φθηνή συντήρηση του οργανισμού στο εργαστήριο. Το σκουλήκι συμπληρώνει τον αναπαραγωγικό του κύκλο σε 2.5 ημέρες στους 25°C, περνώντας από το γονιμοποιημένο έμβρυο, μέσω τεσσάρων σταδίων λάρβας, στο ενήλικο ερμαφρόδιτο που αποτελείται από 959 κύτταρα και ζει περίπου 2-3 εβδομάδες (**Εικ. 1**). Κάτω από μη ευνοϊκές συνθήκες, όπως πείνα και στρες, η λάρβα μπορεί να εισέλθει σε ένα ειδικό, ανθεκτικό στάδιο που ονομάζεται dauer larva, κατά το οποίο το ζώο κινείται, αλλά δεν τρέφεται. Σε αυτή την ανθεκτική μορφή, τα ζώα επιζούν για βδομάδες, ακόμα και μήνες (Klass and Hirsh, 1976). Όταν μια dauer λάρβα συναντήσει ξανά ευνοϊκές συνθήκες, ξαναμπαίνει και συνεχίζει τον κύκλο ζωής στο στάδιο της τέταρτης λάρβας. Η ικανότητα του οργανισμού να αυτογονιμοποιείται οδηγεί σε γονοτυπικά ομογενείς πληθυσμούς. Γονείς που έχουν υποστεί μετάλλαξη, δίνουν στην F2 γενιά ομόζυγους μεταλλαγμένους απογόνους, χωρίς την παρεμβολή επιπρόσθετων γενετικών διασταυρώσεων. Αρσενικά άτομα που εμφανίζονται με μικρή συχνότητα στον πληθυσμό (περίπου 0.1%), μπορεί να διασταυρωθούν με ερμαφρόδιτα άτομα, διευκολύνοντας έτσι τους γενετικούς χειρισμούς. Γρήγορη και ακριβής γενετική χαρτογράφηση μπορεί να επιτευχθεί με χρήση του αναλυτικού χάρτη πολυμορφισμών (Jakubowski and Kornfeld, 1999).

Η αλληλούχιση του γονιδιώματος του *C. elegans*, το οποίο οργανώνεται σε έξι χρωμοσώματα (πέντε αυτοσώματα και ένα φυλετικό χρωμόσωμα Χ), έχει ολοκληρωθεί (http://www.wormbase.org) (Consortium, 1998). Επιπλέον, προσπάθειες για την απόκτηση Expressed Sequence Tags (ESTs) και Open reading frame Sequence Tags (OSTs) για όλα τα γονίδια του *C. elegans*, έχουν αποδώσει αξιόλογη πληροφορία (Maeda et al., 2001; Reboul et al., 2001). Το προφίλ έκφρασης των 20,000 περίπου ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs), έχει αναλυθεί χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (Blumenthal et al., 2002; Kim et al., 2001).

Ο *C. elegans* είναι ιδιαίτερα αποδοτικός στη χρήση τεχνικών αντίστροφης γενετικής (Edgley et al., 2002). Η αποσιώπηση μέσω χρήσης δίκλωνων μορίων RNA (dsRNAi), επιτρέπει τη γρήγορη μελέτη της επίδρασης της απώλειας λειτουργίας επιθυμητών γονιδίων

(Fire et al., 1998; Tavernarakis et al., 2000). Προσπάθειες για καταστολή μέσω RNAi και των 20,000 ORFs έχουν ήδη δημοσιευτεί (Kamath and Ahringer, 2003; Simmer et al., 2003). Διαγονιδιακά ζώα για λειτουργική και γενετική ανάλυση, μπορεί να παραχθούν με μικροένεση γενετικού υλικού που έχει τροποποιηθεί *in vitro*, στη γονάδα ενήλικων ερμαφρόδιτων ζώων (Mello and Fire, 1995). Η χρήση γονιδίων μαρτύρων όπως η β-galactosidase της *E. coli* και η GFP της *A. Victoria*, επιτρέπουν τη σήμανση συγκεκριμένων κυττάρων ή ιστών σε ζωντανούς οργανισμούς (Chalfie et al., 1994; Fire et al., 1990; Miller et al., 1999).



Εικόνα 1. Ο κύκλος ζωής του *C. elegans* στους 25°C. Μετά την εκκόλαψη των αυγών, τα σκουλήκια προχωρούν μέσα από τέσσερα στάδια λάρβας, φτάνουν την ενηλικίωση και συμπληρώνουν τον αναπαραγωγικό τους κύκλο σε δυο μέρες περίπου, με συνολικό προσδόκιμο ζωής μεταξύ 15 και 20 ημέρες. Όταν η L2 λάρβα συναντήσει συνθήκες στρες όπως υψηλή θερμοκρασία, έλλειψη τροφής ή υψηλή πυκνότητα πληθυσμού, εισέρχεται σε ένα διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο, την dauer λάρβα. Όταν οι συνθήκες ξαναγίνουν ευνοϊκές, τα ζώα ξαναμπαίνουν στον φυσιολογικό κύκλο στο στάδιο L4 και ολοκληρώνουν το υπόλοιπο της ανάπτυξής τους. Καθώς τα ζώα γερνούν, οι μεταβολικοί ρυθμοί επιβραδύνονται και οι ιστοί εκφυλίζονται. Η διάρκεια κάθε σταδίου απεικονίζεται σε ώρες. Το κατά προσέγγιση μήκος κάθε σταδίου δίνεται σε παρενθέσεις (Kourtis and Tavernarakis, 2007).

Κατά τη διάρκεια της ιστορίας του σαν μοντέλο οργανισμός, ο *C. elegans* χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για τη μελέτη βασικών βιολογικών φαινομένων. Η απλή αρχιτεκτονική δομή του σώματος, το διαφανές αυγό και η επιδερμίδα και το καθορισμένο αναπτυξιακό του πρόγραμμα, έχουν επιτρέψει το λεπτομερή αναπτυξιακό και ανατομικό χαρακτηρισμό του ζώου (Wormatlas: http://www.wormatlas.org). Το απλό νευρικό σύστημα του ζώου αποτελείται από 302 νευρώνες. Το πρότυπο των συναπτικών συνδέσεων όλων των νευρώνων έχει χαρακτηριστεί (Bargmann and Kaplan, 1998; White et al., 1976). Μεμονωμένα κύτταρα ή και ομάδες κυττάρων μπορεί να καταστούν λειτουργικά ανενεργά με τη χρήση laser ή τη στοχευμένη έκφραση τοξικών γονιδίων (Bargmann and Avery, 1995; Harbinder et al., 1997).

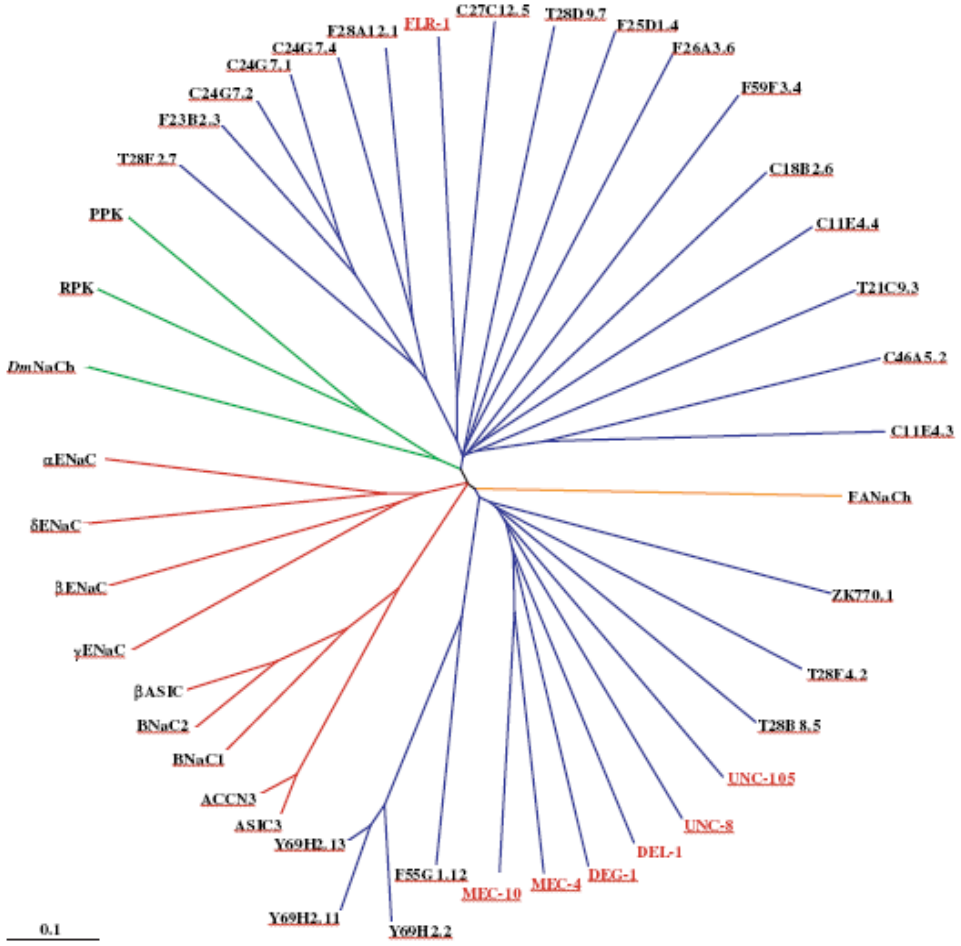
Τα γονίδια του νηματώδη και τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια παρουσιάζουν υψηλή συντήρηση κατά την εξέλιξη και περισσότερα από 50% των γονιδίων του *C. elegans* έχουν ομόλογα στον άνθρωπο. Παράλληλα, ο *C. elegans* έχει χρησιμοποιηθεί για τη μοντελοποίηση ανθρώπινων ασθενειών όπως νευροεκφυλιστικές ασθένειες, καρκίνος, γήρανση και σχετιζόμενες ασθένειες (Baumeister and Ge, 2002; Poulin et al., 2004). Συστηματική καταγραφή γονιδιακών αλληλεπιδράσεων και σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται σε ανθρώπινες ασθένειες, στον *C. elegans*, έχει οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση σύνθετων ασθενειών (Bussey et al., 2006). Επιπρόσθετα, η ευκολία ελέγχου πιθανών φαρμάκων, σε συνδυασμό με την ευκολία διεξαγωγής γενετικών screens στο *C. elegans*, έχει καθιερώσει τον οργανισμό αυτό ως χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση νέων φαρμάκων και φαρμακευτικών στόχων, με στόχο την καταπολέμηση ανθρώπινων παθολογικών καταστάσεων (Kaletta and Hengartner, 2006).

3.2 Η οικογένεια των Degenerins

Οι Degenerins αποτελούν μια οικογένεια γονιδίων που κωδικοποιούν κανάλια ιόντων νατρίου και εντοπίζονται σε οργανισμούς όπως ο άνθρωπος, το σκουλήκι, η μύγα, η ύδρα και ο αχινός. Όλες οι Degenerins μοιράζονται κοινά δομικά χαρακτηριστικά όπως δυο διαμεμβρανικές περιοχές, κοντά αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα προς την πλευρά του κυτταροπλάσματος και μια εκτεταμένη εξωκυττάρια περιοχή (Kellenberger and Schild, 2002). Παρόλο που η αμινοξική αλληλουχία ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων Degenerins, η εξωκυττάρια περιοχή περιέχει πάντα αμινοξέα κυστείνης σε συγκεκριμένες θέσεις. Επιπλέον, η αμινοξική αλληλουχία της δεύτερης διαμεμβρανικής περιοχής –ένα αναγκαίο στοιχείο του πόρου μέσω του οποίου περνούν τα ιόντα– είναι εξαιρετικά συντηρημένη σε όλες τις Degenerins. Η εξελικτική συντήρηση της δεύτερης διαμεμβρανικής περιοχής κάνει τα κανάλια αυτά ειδικά για ιόντα νατρίου. Παρά τις δομικές ομοιότητες μεταξύ των Degenerins, τα κανάλια αυτά έχουν ποικίλες λειτουργίες και τρόπους ενεργοποίησης. Κανάλια της ASIC1 υποκατηγορίας, έχουν βρεθεί σε νευρώνες ανώτερων σπονδυλωτών, όπου ανοίγουν σε απόκριση εξωκυττάριων ιόντων υδρογόνου (πρωτόνια, H^+) (Waldmann et al., 1997). Οι Degenerins MEC-4 και MEC-10 στον *C. elegans* είναι μηχανοϋποδοχείς –ελαφρά μηχανική διέγερση στην επιφάνεια του σώματος του ζώου ενεργοποιεί τους υπεύθυνους για τη μηχανοαίσθηση νευρώνες (Chelur et al., 2002). Οι νευρώνες στο σαλιγκάρι *Helix aspersa* εκφράζουν μια Degenerin που ενεργοποιείται από πεπτίδιο (Lingueglia et al., 1995). Ένα άλλο μέλος της οικογένειας είναι οι ENaCs, κανάλια νατρίου που απαντώνται σε όργανα όπως ο νεφρός και οι πνεύμονες (Canessa et al., 1994). Μια ποικιλία από ιόντα, τοξίνες και μικρά μόρια έχουν βρεθεί να προσδένονται στην εξωκυτταρική περιοχή των Degenerins και να επηρεάζουν τις ιδιότητες των καναλιών.

Σήμερα, η οικογένεια των Degenerins περιλαμβάνει 30 μέλη, από τα οποία έχουν μελετηθεί και χαρακτηριστεί λειτουργικά τα 7. Παρόλο που η κατηγοριοποίηση αυτή στηρίζεται

στην αμινοξική ομολογία, η ποικιλομορφία στη λειτουργία απαιτεί την ανάλυση κάθε μέλους ξεχωριστά (**Εικ. 2**).



Εικόνα 2. Φυλογενετική σχέση μεταξύ των μελών της οικογένειας των Degenerins. Οι Degenerins του *C. elegans* απεικονίζονται με μπλε γραμμές. Οι εφτά γενετικά χαρακτηρισμένες Degenerins (DEG-1, DEL-1, FLR-1, MEC-4, MEC-10, UNC-8 and UNC-105) δίνονται με κόκκινο χρώμα. Επίσης συμπεριλαμβάνονται αντιπροσωπευτικές DEG/ENaC πρωτεΐνες από ποικιλία οργανισμών, από το σαλιγκάρι μέχρι τον άνθρωπο (θηλαστικά: κόκκινες γραμμές, μύγα: πράσινες γραμμές, σαλιγκάρι: πορτοκαλί γραμμές) (Tavernarakis and Driscoll, 1997).

4.Πειραματική διαδικασία – Αποτελέσματα

4.1 Χαρακτηρισμός του προτύπου έκφρασης του γονιδίου T28B8.5

Προκειμένου να συσχετίσουμε το γονίδιο T28B8.5 με κάποια πιθανή λειτουργία, ξεκινήσαμε με το χαρακτηρισμό του προτύπου έκφρασης. Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκε πλασμιδιακή κατασκευή στην οποία το γονίδιο της GFP εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου T28B8.5. Με την πλασμιδιακή αυτή κατασκευή γίνεται δυνατή η μελέτη του χωρο-χρονικού προτύπου έκφρασης του γονιδίου που μας ενδιαφέρει. Συγκεκριμένα, μια περιοχή περίπου 2 kb πριν το κωδικονίο έναρξης, ενισχύθηκε με τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), από γενωμικό DNA. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια τα οποία φέρουν στα άκρα τους τις θέσεις περιορισμού της *Hind*III και *Kpn*I. Οι θέσεις αυτές ενσωματώνονται στο προϊόν της αντίδρασης PCR. Ακολούθησε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Hind*III και *Kpn*I τόσο του προϊόντος της αντίδρασης PCR, όσο και του πλασμιδιακού φορέα pPD95.77 και στη συνέχεια αντίδραση λιγάσης κατά την οποία ο υποκινητής του γονιδίου T28B8.5 υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pPD95.77, δίνοντας την τελική κατασκευή pPD95.77$p_{T28B8.5}$GFP.

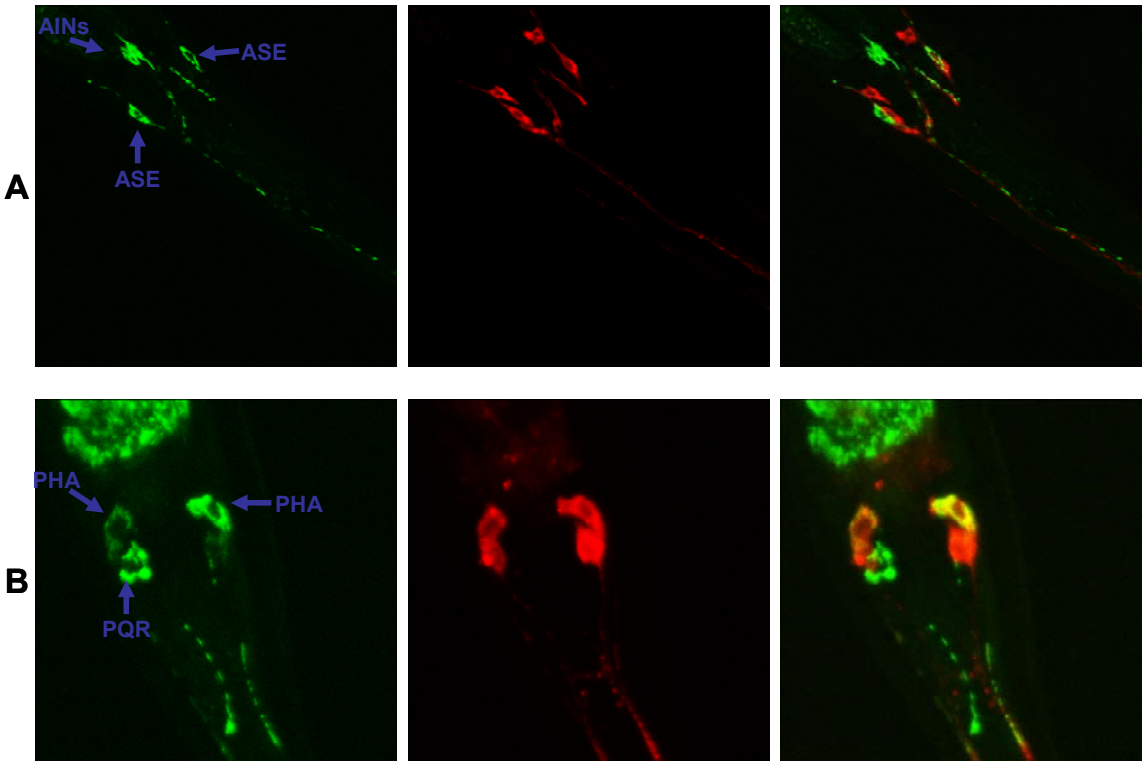
Στη συνέχεια, η πλασμιδιακή κατασκευή pPD95.77$p_{T28B8.5}$GFP ενέθηκε στη γονάδα ζώων αγρίου τύπου. Τα διαγονιδιακά ζώα που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία, φανέρωσαν ότι το γονίδιο T28B8.5 έχει ισχυρή νευρική έκφραση. Συγκεκριμένα εκφράζεται σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του ζώου σε δυο ζεύγη νευρώνων στο κεφάλι καθώς και ένα ζεύγος νευρώνων και έναν ασύμμετρο νευρώνα στην ουρά. Καθώς η πυκνότητα των νευρώνων στις περιοχές αυτές (κεφάλι και ουρά) είναι πολύ μεγάλη, δεν ήταν δυνατό με απλή παρατήρηση να ταυτοποιηθούν οι νευρώνες. Για το λόγο αυτό κάναμε χρήση της μεθόδου Dye filling όπως αναλύεται παρακάτω.

4.1.1 Dye filling

Στον *C. elegans*, 6 ζεύγη χημειο-αισθητήριων νευρώνων που βρίσκονται στο πρόσθιο τμήμα του οργανισμού (amphids) και 2 ζεύγη στην ουρά του (phasmids), διαθέτουν δενδρίτες που προεκβάλουν στο εξωτερικό περιβάλλον μέσω πόρου που σχηματίζουν τα κύτταρα υποστήριξης shocket και sheath cells, ενώ οι απολήξεις τους εμφανίζονται πεπλατυσμένες πιθανότατα για την καλύτερη αίσθηση των χημικών ερεθισμάτων. Σε αυτή τη μορφολογική και τοπολογική ιδιότητα των νευρώνων χημειοϋποδοχέων βασίζεται η χρώση με λιπόφιλες φθορίζουσες χρωστικές. Συγκεκριμένα, άτομα του νηματώδη εμβαπτίζονται σε διάλυμα της λιπόφιλης χρωστικής και καθώς οι παραπάνω νευρώνες έρχονται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον προκύπτει σήμανση των μεμβρανών τους. Επίσης, εκτεταμένη χρώση παρατηρείται και στους μύες του φάρυγγα του οργανισμού αλλά και στο έντερο, τα οποία επίσης έρχονται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον, οπότε καθίσταται αναγκαία η

εκτεταμένη επώαση των σκουληκιών απουσία χρωστικής, ώστε να μειωθεί ο θόρυβος. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία αυτή ποικίλουν σε σχέση με τις ιδιότητές τους όπως το μήκος κύματος απορρόφησης και εκπομπής φθορίζουσας ακτινοβολίας. Εδώ έγινε χρήση της χρωστικής DiI (Molecular probes, D-384, D-3911) η οποία έχει μέγιστο απορρόφησης στα 549 nm και μέγιστο εκπομπής στα 565 nm. Με τον τρόπο αυτό γίνεται δυνατή η ταυτόχρονη παρακολούθηση νευρώνων οι οποίοι έχουν σημανθεί με DiI αλλά εκφράζουν και το φθορίζοντα μάρτυρα της GFP.

Παρατήρηση των νηματωδών που φέρουν το διαγονίδιο pPD95.77$p_{T28B8.5}$GFP και έχουν υποστεί επώαση με DiI σε μικροσκόπιο με χρήση κατάλληλων φίλτρων, έδειξε απουσία συνεντοπισμού των κεφαλικών νευρώνων όπου εκφράζεται το T28B8.5 με τους πρόσθιους νευρώνες που σημαίνονται με τη χρωστική DiI (ASK R/L, ADL R/L, ASI R/L, AWB R/L, ASH R/L, ASJ R/L). Συγκρίνοντας τη θέση των άγνωστων νευρώνων, με τις θέσεις των γνωστών οι οποίοι βάφονται με DiI και με τη βοήθεια του άτλαντα των κυττάρων του σκουληκιού (http://www.wormatlas.org/), ταυτοποιήσαμε τους νευρώνες όπου εκφράζεται το T28B8.5. Έτσι κεφαλικά έχουμε τους χημειοϋποδοχείς ASE R/L και τους ενδιάμεσους νευρώνες AIN R/L, ενώ στην ουρά έχουμε τους χημειοϋποδοχείς PHA R/L και τον ασύμμετρο νευρώνα PQR (**Εικ. 3**).

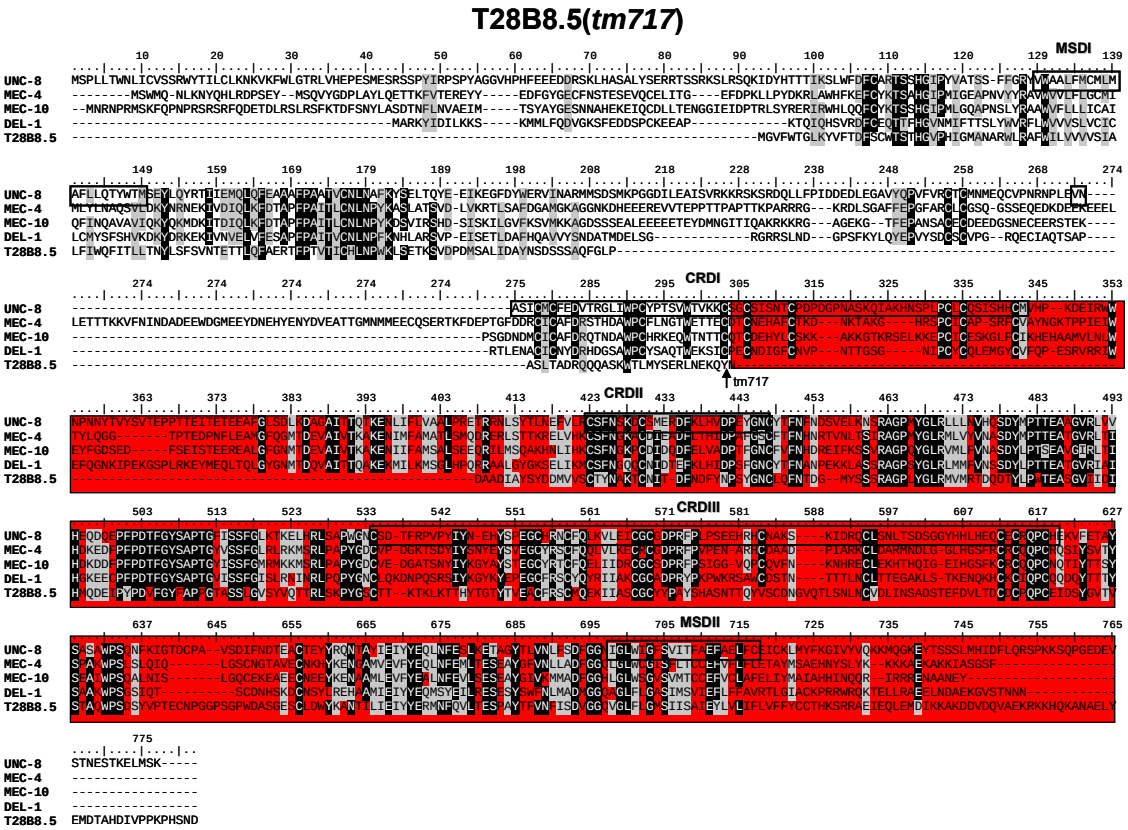


Εικόνα 3. Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου T28B8.5, στο πρόσθιο Α και οπίσθιο Β τμήμα του *C. elegans*. Α. Απουσία συνεντοπισμού των νευρώνων όπου εκφράζεται το T28B8.5 με τους νευρώνες που βάφονται από τη DiI. Η θέση και η μορφολογία των νευρώνων συνηγορούν στο ότι πρόκειται για τους νευρώνες ASE R/L και τους ενδιάμεσους νευρώνες AIN R/L. **Β.** Συνεντοπισμός μεταξύ των νευρώνων που βάφονται από τη DiI (PHA) και των ουραίων νευρώνων όπου εκφράζεται το T28B8.5. Επίσης, έχουμε έκφραση και στον ασύμμετρο νευρώνα PQR.

Το πρότυπο έκφρασης μας ώθησε να ελέγξουμε στελέχη που φέρουν μεταλλαγμένα αλληλόμορφα (βλέπε παρακάτω) για το γονίδιο T28B8.5, ως προς συμπεριφορές που αποδίδονται στους συγκεκριμένους νευρώνες. Ο PQR νευρώνας μαζί με τους AQR, URX και AUA ρυθμίζουν το λεγόμενο *social feeding* του *C. elegans*, δηλαδή τη συσσωμάτωση των σκουληκιών στο στρώμα των βακτηρίων. Αυτό γίνεται μέσω του NPR-1, ενός G-protein-coupled neuropeptide receptor. Είναι πιθανό, δυσλειτουργία του νευρώνα λόγω του μεταλλαγμένου γονιδίου T28B8.5, δηλαδή ενός μη λειτουργικού καναλιού ιόντων νατρίου, να επηρεάζει την ομοιόσταση του PQR και κατά συνέπεια του *social feeding*. Από την παρατήρηση των στελεχών με τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα για το T28B8.5 δε διαπιστώθηκε κάποιο πρόβλημα στην εκδήλωση της παραπάνω συμπεριφοράς. Επίσης, στους ενδιάμεσους νευρώνες AINs όπου παρατηρείται έκφραση του T28B8.5, δεν έχει αποδοθεί κάποιος ιδιαίτερος λειτουργικός ρόλος, οπότε πιθανή συμμετοχή του T28B8.5 στη λειτουργία αυτού του νευρώνα δεν μπορεί προς το παρόν να αξιολογηθεί. Για τους παραπάνω λόγους, η προσοχή μας επικεντρώθηκε στο χαρακτηρισμό της λειτουργίας του T28B8.5 στους χημειοϋποδοχείς ASE και PHA.

4.2 Χαρακτηρισμός των μεταλλαγών που φέρουν τα αλληλόμορφα *ok1014* και *tm717*

Για τον χαρακτηρισμό του γονιδίου T28B8.5 χρησιμοποιήθηκε το μεταλλαγμένο στέλεχος T28B8.5*(tm717)* το οποίο παραχωρήθηκε από το National Bioresource Project (http://shigen.lab.nig.ac.jp/c.elegans/index.jsp?lang=english#contents8), καθώς και το μεταλλαγμένο στέλεχος T28B8.5*(ok1014)* οποίο παραχωρήθηκε από το Caenorhabditis Genetics Center (http://www.cbs.umn.edu/CGC/). Το γονίδιο T28B8.5 περιλαμβάνει 12 εξόνια και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μήκους 527 αμινοξέων. Τόσο για το αλληλόμορφο *tm717*, όσο και για το *ok1014*, υπήρχε η πληροφορία ότι φέρουν ελλείψεις μήκους 900 περίπου βάσεων. Για την ανάλυση των συγκεκριμένων μεταλλαγών έγινε αλληλούχηση με στόχο την οριοθέτηση των ελλείψεων στο γονίδιο. Έτσι, βρέθηκε ότι εξαιτίας της έλλειψης που φέρει το αλληλόμορφο *tm717*, το πλαίσιο ανάγνωσης μεταβάλλεται και εμφανίζεται πολύ νωρίς κωδικόνιο λήξης. Για να αξιολογήσουμε την επίδραση της έλλειψης, προχωρήσαμε σε *in silico* ανάλυση και συγκεκριμένα σε πολλαπλή στοίχιση (multiple alignment) του T28B8.5 με άλλα χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας των Degenerins (**Εικ. 4**). Όπως προέκυψε από την ανάλυση, πρόκειται για μηδενική (null) μεταλλαγή, καθώς το mRNA που μεταγράφεται είναι πολύ μικρό (αντιστοιχεί στο αμινοτελικό άκρο, την πρώτη διαμεμβρανική περιοχή και ένα μικρό τμήμα της εξωκυττάριας περιοχής) και πιθανότατα καταστρέφεται.

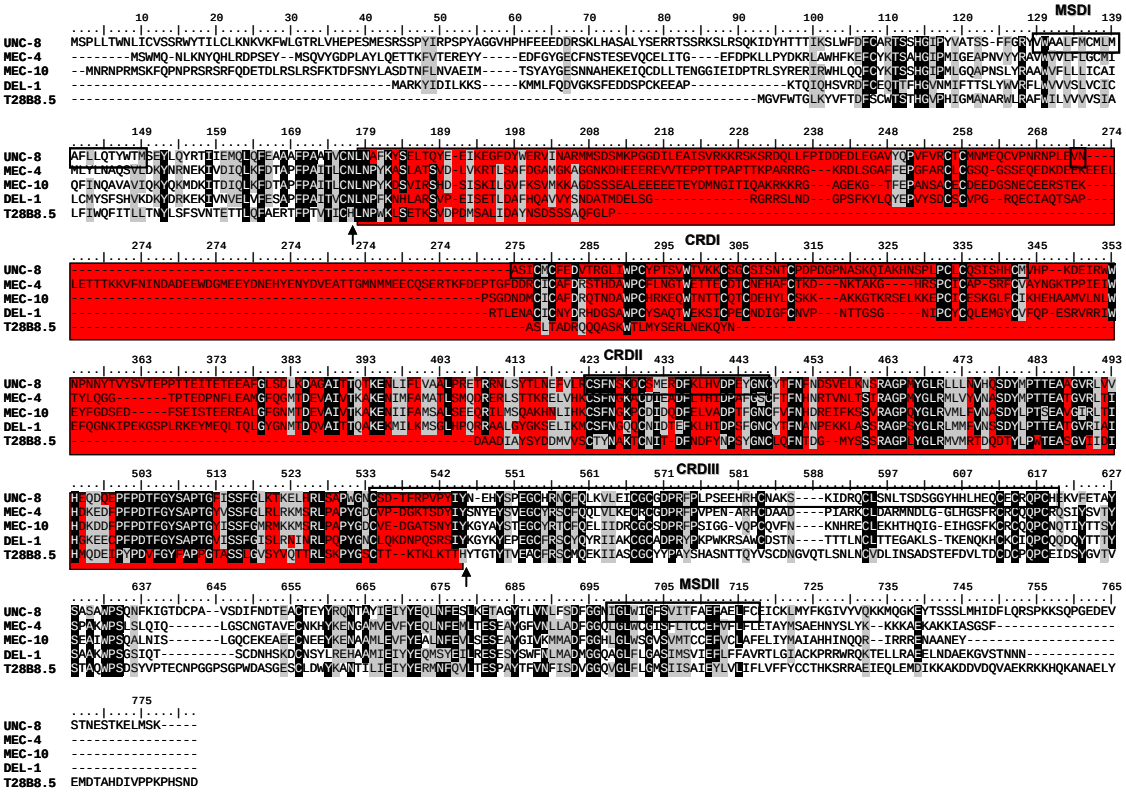


Εικόνα 4. Πολλαπλή στοίχιση του T28B8.5 με χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας των Degenerins, για την αξιολόγηση του αλληλομόρφου *tm717*. Για τη στοίχιση χρησιμοποιήθηκαν τα χαρακτηρισμένα μέλη UNC-8, MEC-4, MEC-10 και DEL-1. Απεικονίζονται οι χαρακτηριστικές για τις Degenerins περιοχές (μαύρο πλαίσιο): MSDI,II οι δυο διαμεμβρανικές περιοχές, CRDI,II,III οι τρεις περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη. Σε κόκκινο φόντο απεικονίζεται η περιοχή που απομακρύνεται εξαιτίας της έλλειψης που φέρει το *tm717* αλληλόμορφο.

Στη συνέχεια χαρακτηρίσαμε την έλλειψη που φέρει το αλληλόμορφο *ok1014*. Το αλληλόμορφο αυτό φέρει έλλειψη 920 bp, χωρίς να μεταβάλλει το πλαίσιο ανάγνωσης. Και πάλι η πολλαπλή στοίχιση μας επέτρεψε να αξιολογήσουμε το είδος της μεταλλαγής (**Εικ. 5**). Όπως φαίνεται και από την εικόνα, το μεγαλύτερο μέρος της εξωκυτταρικής περιοχής απομακρύνεται. Πρόσφατα, δημοσιεύτηκε η δομή του καναλιού ASIC-1 στο κοτόπουλο (Jasti et al., 2007). Η κρυσταλλογραφική δομή επισήμανε τη σημασία της εξωκυτταρικής περιοχής, όχι μόνο στην πρόσληψη εξωκυττάριων σημάτων (αντίληψη πρωτονίων) αλλά και στις πολλαπλές επαφές μεταξύ των τριών υπομονάδων που απαιτούνται για τη δημιουργία του καναλιού. Εξαιτίας της απώλειας σχεδόν όλης της εξωκυττάριας περιοχής και σύμφωνα με τα παραπάνω, θεωρούμε ότι και το *ok1014* αλληλόμορφο φέρει και αυτό null μεταλλαγή.

.

T28B8.5(*ok1014*)



Εικόνα 5. Πολλαπλή στοίχιση του T28B8.5 με χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας των Degenerins, για την αξιολόγηση του αλληλομόρφου *ok1014*. Για τη στοίχιση χρησιμοποιήθηκαν τα χαρακτηρισμένα μέλη UNC-8, MEC-4, MEC-10 και DEL-1. Απεικονίζονται οι χαρακτηριστικές για τις Degenerins περιοχές (μαύρο πλαίσιο): MSDI,II οι δυο διαμεμβρανικές περιοχές, CRDI,II,III οι τρεις περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη. Σε κόκκινο φόντο απεικονίζεται η περιοχή που απομακρύνεται εξαιτίας της έλλειψης που φέρει το *ok1014* αλληλόμορφο.

4.3 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των στελεχών T28B8.5(*tm717*) και T28B8.5(*ok1014*)

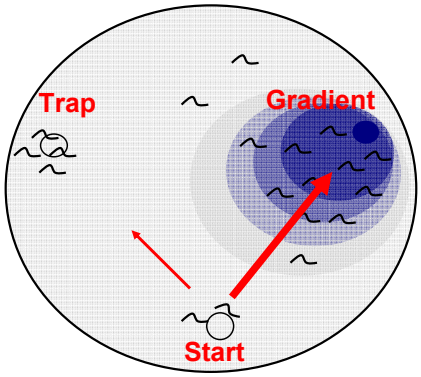
Αρχικά, έγιναν απλές παρατηρήσεις και στα δυο στελέχη, όπως είναι το μέγεθος, το σχήμα, χαρακτηριστικά της κίνησης, καθώς και έλεγχος της απόκρισης των στελεχών αυτών σε μηχανικά ερεθίσματα. Παρόλο που το στέλεχος με το αλληλόμορφο *ok1014* συμπεριφερόταν φυσιολογικά σε όλους τους ελέγχους, το στέλεχος με το αλληλόμορφο *tm717* εμφάνιζε προβληματική συμπεριφορά σε πλήθος παραμέτρων όπως η κίνηση, η απόκριση στο άγγιγμα διαφόρων τύπων (ήπιο, δυνατό, παρουσία εμποδίου στο πρόσθιο μέρος του ζώου) και η απόκριση σε πτητικά και υδατοδιαλυτά χημικά. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τον τρόπο μεταλλαξογένεσης (TMP-UV) που χρησιμοποιήθηκε για την απόκτηση του στελέχους, μας οδήγησαν στην υπόθεση ότι η πολυποίκιλη αυτή συμπεριφορά, οφείλεται πιθανότατα στη μετάλλαξη επιπρόσθετων γονιδίων, εκτός του επιθυμητού. Στην περίπτωση αυτή ακολουθήσαμε διαδοχικές διασταυρώσεις με αρσενικά άτομα αγρίου τύπου (out-crossing), επιλέγοντας κάθε φορά για σκουλήκια ομόζυγα για τη μεταλλαγή του *tm717*. Πράγματι, μετά το 3° out-crossing πολλά χαρακτηριστικά όπως η κίνηση και η απόκριση σε μηχανικά

ερεθίσματα επανήλθαν σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα, ενώ άλλες συμπεριφορές, όπως η απόκριση σε χημικά ερεθίσματα παρουσίασαν σαφή βελτίωση (βλέπε παρακάτω).

Για τη διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου του γονιδίου T28B8.5 και λαμβάνοντας υπόψη την έκφραση του γονιδίου σε νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για την αντίληψη χημικών ερεθισμάτων εστιαστήκαμε σε συγκεκριμένες συμπεριφορές.

4.4 Δοκιμασία χημειοτακτισμού σε υδατοδιαλυτές ελκτικές ενώσεις

Όπως αναφέραμε και προηγούμενα, το γονίδιο T28B8.5 έχει ισχυρή έκφραση στους νευρώνες ASE. Οι νευρώνες αυτοί, έχει δειχθεί με πειράματα απενεργοποίησης με laser, ότι είναι υπεύθυνοι για το χημειοτακτισμό των σκουληκιών προς ιόντα Na^+ και Cl^-. Θελήσαμε λοιπόν να δούμε, κατά πόσον οι νευρώνες των μεταλλαγμένων για το T28B8.5 ζώων ανταποκρίνονται στο ελκτικό γι' αυτά NaCl. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε μια δοκιμασία που περιγράφεται αναλυτικά από τους Bargmann και Horvitz (Bargmann and Horvitz, 1991). Συνοπτικά, τα ζώα αφήνονται να κινηθούν ελεύθερα σε πιάτο όπου υπάρχουν αντιδιαμετρικά δυο σημεία. Στο ένα υπάρχει πηγή χημικού (στην περίπτωσή μας NaCl), το οποίο δημιουργεί μια κλίση συγκέντρωσης, ενώ το άλλο σημείο αποτελεί σημείο αναφοράς, όπου τα ζώα μπορεί να κινηθούν στοχαστικά. Με βάση κατάλληλη χημική εξίσωση υπολογίζεται ο δείκτης χημειόταξης για το εκάστοτε στέλεχος (**Εικ. 6**)

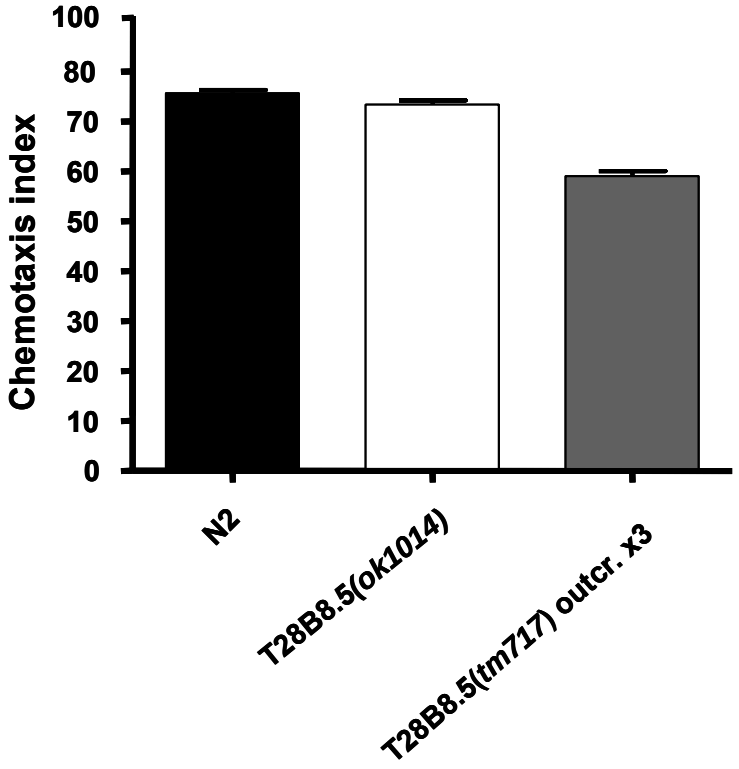


$$\text{Chemotaxis Index} = \frac{N_{(gradient)} - N_{(trap)}}{N_{(total)}}$$

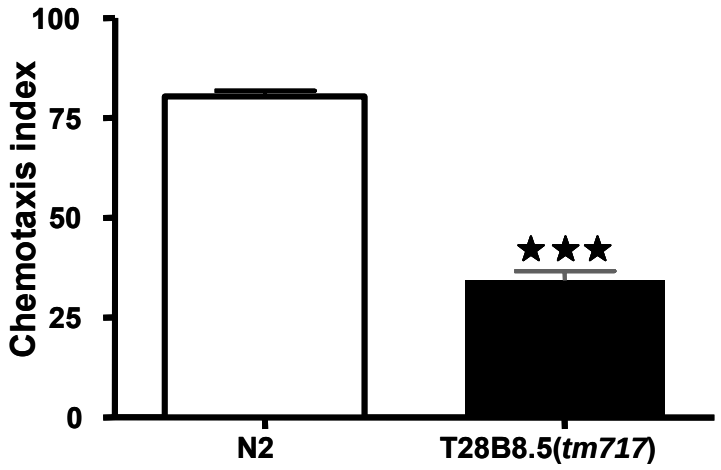
Bargmann and Horvitz, 1991

Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της δοκιμασίας της χημειόταξης. Απεικονίζεται η κατανομή του πληθυσμού του αγρίου τύπου μετά από δοκιμασία για μια ελκτική χημική ένωση. Επίσης, φαίνεται η μαθηματική εξίσωση με την οποία υπολογίζεται ο δείκτης χημειόταξης (Προσαρμοσμένο από Διδακτορική Διατριβή Βόγγλη Ιωάννη).

Η απόκριση στο NaCl τόσο στα άτομα αγρίου τύπου (N2), όσο και στα στελέχη που φέρουν το αλληλόμορφο *ok1014*, κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα, ενώ στα στελέχη που φέρουν το αλληλόμορφο *tm717*, εμφανίζεται ελαφρώς μικρότερη (**Εικ. 7**). Ο ισχυρισμός μας ότι ο πολλαπλός φαινότυπος που εμφανίζει το στέλεχος με το αλληλόμορφο *tm717*, οφείλεται στη βαριά μεταλλαξογένεση, ενισχύεται από το γεγονός ότι μετά από τρία out-crossings, τα T28B8.5(*tm717*) σκουλήκια εμφανίζουν σαφώς καλύτερη απόκριση στο NaCl σε σχέση με τα σκουλήκια που δεν έχουν υποστεί τη διαδικασία του out-crossing (σύγκριση **Εικ. 7** με **Εικ.8**).



Εικόνα 7. Χημειόταξη προς την ελκτική υδατοδιαλυτή ουσία NaCl. Τόσο τα ζώα αγρίου τύπου, όσο και τα ζώα που φέρουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *ok1014* αποκρίνονται φυσιολογικά στην ουσία. Τα ζώα που φέρουν το αλληλόμορφο *tm717* (και έχουν υποστεί τρεις φορές τη διαδικασία του out-crossing) εμφανίζουν ελαφρώς χαμηλότερα επίπεδα χημειόταξης. Κάθε στήλη αναπαριστά το μέσο όρο των τιμών από τουλάχιστον 4 διαφορετικές δοκιμασίες. Σε κάθε συνθήκη ελέγχθηκαν συνολικά 750 άτομα από κάθε στέλεχος.



Εικόνα 8. Χημειόταξη μεταλλαγμένων ζώων που φέρουν το αλληλόμορφο *tm717* και τα οποία δεν έχουν υποστεί τη διαδικασία του out-crossing. Τα ζώα που φέρουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *tm717*, εμφανίζουν σημαντική μείωση στην απόκριση στο NaCl. Ταυτόχρονα, όμως, τα ζώα αυτά εμφανίζουν ανώμαλη συμπεριφορά σε σειρά δοκιμασιών όπως χημειόταξη σε πτητικές ουσίες, κίνηση και αίσθηση μηχανικών ερεθισμάτων (τα αποτελέσματα παραλείπονται), γεγονός που υπογραμμίζει τη βλάβη γονιδίων εκτός του στόχου κατά τη μεταλλαξογένεση.

4.5 Δοκιμασία αντίδρασης στην παρουσία πτητικής απωθητικής ουσίας.

Η έκφραση του T28B8.5 στους PHA χημειοϋποδοχείς νευρώνες, μας ώθησε στην εξέταση της λειτουργικότητας των νευρώνων αυτών στα στελέχη με τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα *ok1014* και *tm717*. Είναι γνωστό ότι οι νευρώνες PHA και PHB συμμετέχουν στην αντίληψη χημικών απωθητικών ουσιών, με το να ελέγχουν αρνητικά την απωθητική κίνηση των σκουληκιών (Hilliard et al., 2002). Πειράματα απενεργοποίηση με laser έδειξαν ότι σήματα από τους πρόσθιους και τους οπίσθιους χημειοϋποδοχείς δρουν ανταγωνιστικά, μέσω ενός δικτύου ενδιάμεσων νευρώνων προκειμένου να ελέγξουν την απωθητική αντίδραση, στην παρουσία αποτρεπτικής ουσίας.

Θελήσαμε λοιπόν να διαπιστώσουμε εάν τα μεταλλαγμένα μας στελέχη εμφανίζουν φυσιολογική ή εντονότερη (λόγω δυσλειτουργίας των PHA νευρώνων και κατά συνέπεια μειωμένης ανταγωνιστικής δράσης) απώθηση προς τη χημική ουσία 1-octanol (γίνεται αντιληπτή από τον πρόσθιο νευρώνα ASH). Για την ποσοτικοποίηση αυτού του φαινοτύπου, μετρήσαμε το μέσο χρόνο που χρειάζεται κάθε στέλεχος για να ξεκινήσει οπισθοδρομική κίνηση, σε απόκριση προς την παρουσία μιας βλεφαρίδας (προσαρτημένη σε οδοντογλυφίδα) βυθισμένης στο απωθητικό 1-octanol. Τα αποτελέσματα περιγράφονται στον **Πίνακα 1**. Από τις αποκρίσεις αυτές φαίνεται ότι η λειτουργία και κατά συνέπεια η αρνητική ρύθμιση του νευρώνα PHA των μεταλλαγμένων για το γονίδιο T28B8.5 στελεχών, είναι φυσιολογική.

Γονότυπος	**Χρόνος απόκρισης σε sec**
N2 (αγρίου τύπου)	1.9 ± 0.8
T28B8.5(tm717)	1.7±0.9
T28B8.5(ok1014)	2.0±0.7

Πίνακας 1. Απωθητική αντίδραση στην παρουσία της πτητικής ουσίας 1-octanol. Η δοκιμασία επαναλήφθηκε δέκα φορές με τουλάχιστον δέκα ζώα για κάθε στέλεχος, ανά δοκιμασία. Ο μέσος όρος των μετρήσεων και το τυπικό σφάλμα απεικονίζονται.

5. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να χαρακτηρίσουμε λειτουργικά ένα μέλος της οικογένειας των Degenerins και συγκεκριμένα το γονίδιο T28B8.5. Το γονίδιο αυτό εμφανίζει υψηλή ομολογία με ήδη χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας αυτής, ενώ η ανάλυση της τοπολογίας της πρωτεΐνης με ειδικό αλγόριθμο (http://phobius.cgb.ki.se/) επιβεβαιώνει τη χαρακτηριστική δομή των μελών της οικογένειας των Degenerins.

Η ποικιλομορφία των διεργασιών όπου συμμετέχουν τα μέλη της οικογένειας αυτής (μηχανοαίσθηση, μηχανισμοί μνήμης και μάθησης, ρύθμιση συγκέντρωσης νατρίου κ.α) μας ώθησαν στην αναζήτηση του ρόλου του συγκεκριμένου καναλιού. Για να αποκτήσουμε μια πρώτη ένδειξη σχετικά με την πιθανή λειτουργία του T28B8.5, ταυτοποιήσαμε το κύτταρα όπου εκφράζεται το συγκεκριμένο γονίδιο. Αυτό πραγματοποιήθηκε τόσο με χρήση της τεχνικής Dye Filling, όσο και με λεπτομερή παρατήρηση και σύγκριση των κυττάρων με τα ήδη χαρτογραφημένα κύτταρα του *C. elegans*. Έτσι, καταλήξαμε στο ότι το T28B8.5 γονίδιο εκφράζεται στους νευρώνες-χημειοϋποδοχείς ASE R/L και PHA R/L, στον ενδιάμεσο νευρώνα AIN R/L καθώς και σε ένα μοναδιαίο νευρώνα της ουράς, τον PQR. Οι λειτουργίες τόσο του ενδιάμεσου νευρώνα AIN, όσο και του ουραίου PQR παραμένουν άγνωστες. Αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η γενική παρατήρηση και η υποβολή των μεταλλαγμένων για το γονίδιο αυτό ζώων σε σειρά δοκιμασιών δεν έδωσε εμφανή αποτελέσματα, δε μας επιτρέπει προς το παρόν να αξιολογήσουμε την επίδραση του T28B8.5 καναλιού στη λειτουργία των παραπάνω νευρώνων. Για το λόγο αυτό, εστιαστήκαμε στους νευρώνες-χημειοϋποδοχείς ASE και PHA.

Οι ASE είναι υπεύθυνοι για την αντίληψη του NaCl, οπότε και υποβάλαμε στελέχη που φέρουν μεταλλαγμένα αλληλόμορφα για το T28B8.5 σε ομοζυγωτία, σε δοκιμασία χημειόταξης στο συγκεκριμένο χημικό. Τα αλληλόμορφα που έχουμε στη διάθεσή μας (*ok1014* και *tm717*), φέρουν χαρακτηρισμένες ελλείψεις. Έτσι το αλληλόμορφο *tm717* προκαλεί πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης, ενώ το *ok1014* προκαλεί απώλεια σχεδόν του συνόλου της εξωκυτταρικής περιοχής της πρωτεΐνης. Λόγω της σημασίας της εξωκυτταρικής περιοχής για τη λειτουργία του καναλιού, όπως μαρτυρά και η πρόσφατη ανάλυση της δομής ενός μέλους της οικογένειας των Degenerins (Jasti et al., 2007), θεωρούμε ότι και τα δυο αλληλόμορφα φέρουν μηδενικές (null) μεταλλαγές. Θα αναμέναμε, ότι απώλεια της λειτουργίας ενός καναλιού ιόντων νατρίου, όπως συμβαίνει στην περίπτωσή μας, θα επηρέαζε τη λειτουργία του νευρώνα. Παρόλα αυτά, τα μεταλλαγμένα για το γονίδιο αυτό σκουλήκια εμφανίζουν σχεδόν φυσιολογική χημειόταξη προς το NaCl. Η ελαφριά μείωση της απόκρισης των στελεχών που φέρουν το *tm717* αλληλόμορφο, φαίνεται ότι οφείλεται στη μετάλλαξη επιπρόσθετων γονιδίων κατά τη μεταλλαξογένεση, καθώς με τη διαδικασία του out-crossing η χημειόταξη επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Βέβαια, είναι πιθανό η έλλειψη του καναλιού T28B8.5 να επηρεάζει άλλες λειτουργίες του ASE, όπως η αναγνώριση της βιοτίνης, του cAMP, η απώθηση λόγω ιόντων Cd^{+2} και Cu^{+2} ή κάποια λειτουργία που δεν είναι ανιχνεύσιμη στο εργαστήριο. Είναι ακόμη γνωστό ότι αρκετοί νευρώνες, κυρίως

χημειοϋποδοχείς στο πρόσθιο μέρος, δρουν συνεργατικά για την εκδήλωση μιας συμπεριφοράς, οπότε είναι πιθανό η μετάλλαξη του T28B8.5 να προκαλεί κάποια δυσλειτουργία η εμφάνιση της οποίας παρεμποδίζεται λόγω συμπληρωματικής δράσης κάποιου άλλου νευρώνα.

Παράλληλα, εξετάσαμε την επίδραση του καναλιού T28B8.5 στους νευρώνες PHA. Έχει βρεθεί ότι οι νευρώνες αυτοί ελέγχουν αρνητικά την κίνηση αποφυγής που εκτελεί το σκουλήκι όταν αυτό αντιληφθεί κάποιο απωθητικό χημικό από νευρώνες που βρίσκονται στο πρόσθιο μέρος του. Αναμένουμε ότι δυσλειτουργία των νευρώνων αυτών οδηγεί σε απώλεια του αρνητικού ελέγχου που ασκείται στο κύκλωμα αντίληψης του απωθητικού χημικού και κατά συνέπεια σε αυξημένη αντίδραση αποφυγής σε παρουσία χημικού. Κάτι τέτοιο, όμως δεν παρατηρήθηκε κατά την εξέταση νηματωδών με μεταλλαγμένα για το T28B8.5 αλληλόμορφα. Είναι πιθανό η απώλεια των καναλιών αυτών να αντισταθμίζεται από άλλα κανάλια νατρίου, ή ακόμα να προκαλεί στους νευρώνες δυσλειτουργίες οι οποίες δεν μπορούν να ανιχνευτούν με τις δοκιμασίες χημειοτακτισμού όπου υποβάλαμε τα σκουλήκια. Μπορεί για παράδειγμα, λόγω της απώλειας των καναλιών αυτών νατρίου να υπάρχει μια καθυστέρηση στην ενεργοποίηση του νευρώνα, η οποία όμως δε γίνεται αντιληπτή μέσα από τη διαδικασία που χρησιμοποιήσαμε.

Μια άλλη πιθανότητα, η οποία είναι υπό εξέταση, είναι η ενεργοποίηση του T28B8.5 από πρωτόνια. Οι ASICs είναι μέλη της οικογένειας των Degenerins τα οποία ενεργοποιούνται από ιόντα υδρογόνου. Το T28B8.5 εμφανίζει αρκετά υψηλή ομολογία με κάποια μέλη της ομάδας αυτής. Είναι λοιπόν δόκιμο να εξετάσουμε τη συμπεριφορά μεταλλαγμένων για το T288.5 στελεχών σε κλίση συγκέντρωσης πρωτονίων.

Η λειτουργική ανάλυση των μελών της οικογένειας των Degenerins θα αποδώσει περισσότερες πληροφορίες για τη σημασία των καναλιών αυτών με την πολυποίκιλη δράση και την υψηλή εξελικτική συντήρηση.

6.Βιβλιογραφία

Bargmann, C. I., and Avery, L. (1995). Laser killing of cells in *Caenorhabditis elegans*. Methods Cell Biol **48**, 225-250.

Bargmann, C. I., and Horvitz, H. R. (1991). Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. Neuron **7**, 729-742.

Bargmann, C. I., and Kaplan, J. M. (1998). Signal transduction in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. Annu Rev Neurosci **21**, 279-308.

Baumeister, R., and Ge, L. (2002). The worm in us - *Caenorhabditis elegans* as a model of human disease. Trends Biotechnol **20**, 147-148.

Bjornsti, M. A., and Houghton, P. J. (2004). Lost in translation: dysregulation of cap-dependent translation and cancer. Cancer Cell **5**, 519-523.

Blumenthal, T., Evans, D., Link, C. D., Guffanti, A., Lawson, D., Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., Chiu, W. L., Duke, K., Kiraly, M., and Kim, S. K. (2002). A global analysis of *Caenorhabditis elegans* operons. Nature **417**, 851-854.

Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics **77**, 71-94.

Bussey, H., Andrews, B., and Boone, C. (2006). From worm genetic networks to complex human diseases. Nat Genet **38**, 862-863.

Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D., and Rossier, B. C. (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na+ channel is made of three homologous subunits. Nature **367**, 463-467.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science **263**, 802-805.

Chelur, D. S., Ernstrom, G. G., Goodman, M. B., Yao, C. A., Chen, L., R, O. H., and Chalfie, M. (2002). The mechanosensory protein MEC-6 is a subunit of the *C. elegans* touch-cell degenerin channel. Nature **420**, 669-673.

Consortium, T. C. e. S. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. Science **282**, 2012-2018.

Edgley, M., D'Souza, A., Moulder, G., McKay, S., Shen, B., Gilchrist, E., Moerman, D., and Barstead, R. (2002). Improved detection of small deletions in complex pools of DNA. Nucleic Acids Res **30**, e52.

Fire, A. (1986). Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. Embo J **5**, 2673-2680.

Fire, A., Harrison, S. W., and Dixon, D. (1990). A modular set of lacZ fusion vectors for studying gene expression in *Caenorhabditis elegans*. Gene **93**, 189-198.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature **391**, 806-811.

Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. Annu Rev Biochem **68**, 913-963.

Gribbon, P., and Hardingham, T. E. (1998). Macromolecular diffusion of biological polymers measured by confocal fluorescence recovery after photobleaching. Biophys J **75**, 1032-1039.

Harbinder, S., Tavernarakis, N., Herndon, L. A., Kinnell, M., Xu, S. Q., Fire, A., and Driscoll, M. (1997). Genetically targeted cell disruption in *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A **94**, 13128-13133.

Hilliard, M. A., Bargmann, C. I., and Bazzicalupo, P. (2002). *C. elegans* responds to chemical repellents by integrating sensory inputs from the head and the tail. Curr Biol **12**, 730-734.

Jacobson, K., Zhang, F., and Tsay, T. T. (1991). Fluorescence recovery after photobleaching techniques to measure translational mobility in microscopic samples. Scanning Microsc **5**, 357-361.

Jakubowski, J., and Kornfeld, K. (1999). A local, high-density, single-nucleotide polymorphism map used to clone *Caenorhabditis elegans* cdf-1. Genetics **153**, 743-752.

Jasti, J., Furukawa, H., Gonzales, E. B., and Gouaux, E. (2007). Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 A resolution and low pH. Nature **449**, 316-323.

Kaletta, T., and Hengartner, M. O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. Nat Rev Drug Discov **5**, 387-398.

Kamath, R. S., and Ahringer, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. Methods **30**, 313-321.

Kapp, L. D., and Lorsch, J. R. (2004). The molecular mechanics of eukaryotic translation. Annu Rev Biochem **73**, 657-704.

Keiper, B. D., Lamphear, B. J., Deshpande, A. M., Jankowska-Anyszka, M., Aamodt, E. J., Blumenthal, T., and Rhoads, R. E. (2000). Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem **275**, 10590-10596.

Kellenberger, S., and Schild, L. (2002). Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. Physiol Rev **82**, 735-767.

Kim, S. K., Lund, J., Kiraly, M., Duke, K., Jiang, M., Stuart, J. M., Eizinger, A., Wylie, B. N., and Davidson, G. S. (2001). A gene expression map for *Caenorhabditis elegans*. Science **293**, 2087-2092.

Klass, M., and Hirsh, D. (1976). Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*. Nature **260**, 523-525.

Kourtis, N., and Tavernarakis, N. (2007). Non-developmentally programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. Semin Cancer Biol **17**, 122-133.

Lingueglia, E., Champigny, G., Lazdunski, M., and Barbry, P. (1995). Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel. Nature **378**, 730-733.

Lippincott-Schwartz, J., and Patterson, G. H. (2003). Development and use of fluorescent protein markers in living cells. Science **300**, 87-91.

Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M., and Sugimoto, A. (2001). Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. Curr Biol **11**, 171-176.

Mello, C., and Fire, A. (1995). DNA transformation. Methods Cell Biol **48**, 451-482.

Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D., and Ambros, V. (1991). Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. Embo J **10**, 3959-3970.

Miller, D. M., 3rd, Desai, N. S., Hardin, D. C., Piston, D. W., Patterson, G. H., Fleenor, J., Xu, S., and Fire, A. (1999). Two-color GFP expression system for *C. elegans*. Biotechniques **26**, 914-918.

Poulin, G., Nandakumar, R., and Ahringer, J. (2004). Genome-wide RNAi screens in *Caenorhabditis elegans*: impact on cancer research. Oncogene **23**, 8340-8345.

Reboul, J., Vaglio, P., Tzellas, N., Thierry-Mieg, N., Moore, T., Jackson, C., Shin-i, T., Kohara, Y., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J.*, et al.* (2001). Open-reading-frame sequence tags (OSTs) support the existence of at least 17,300 genes in *C. elegans*. Nat Genet **27**, 332-336.

Reits, E. A., and Neefjes, J. J. (2001). From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. Nat Cell Biol **3**.

Rennie, M. J., Smith, K., and Watt, P. W. (1994). Measurement of human tissue protein synthesis: an optimal approach. Am J Physiol **266**, E298-307.

Simmer, F., Moorman, C., van der Linden, A. M., Kuijk, E., van den Berghe, P. V., Kamath, R. S., Fraser, A. G., Ahringer, J., and Plasterk, R. H. (2003). Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. PLoS Biol **1**.

Stinchcomb, D. T., Shaw, J. E., Carr, S. H., and Hirsh, D. (1985). Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*. Mol Cell Biol **5**, 3484-3496.

Syntichaki, P., Troulinaki, K., and Tavernarakis, N. (2007). eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*. Nature **445**, 922-926.

Tavernarakis, N., and Driscoll, M. (1997). Molecular modeling of mechanotransduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Annu Rev Physiol **59**, 659-689.

Tavernarakis, N., Wang, S. L., Dorovkov, M., Ryazanov, A., and Driscoll, M. (2000). Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. Nat Genet **24**, 180-183.

Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997). A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. Nature **386**, 173-177.

White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., and Brenner, S. (1976). The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **275**, 327-348.