

Πανεπιστήμιο Κρήτης

**Τμήμα Βιολογίας &
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας**



**«Μελέτη μοριακών μηχανισμών νευροεκφυλισμού
και γήρανσης στο νηματώδη *Caenorhabditis
elegans*»**

Βλάχος Εμμανουήλ

Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Νηματωδών

Επιβλέπων Ερευνητής: **Ταβερναράκης Νεκτάριος**

Υπεύθυνα μέλη ΔΕΠ Τμήματος Βιολογίας Π.Κ: **Αλεξανδράκη Δέσποινα
Καλαντίδης Κρίτων**

Ηράκλειο 2010

Ευχαριστίες

Μέσα από αυτά τα λόγια θα ήθελα να ευχαριστήσω μια σειρά από ανθρώπους που με βοήθησαν κατά την ενασχόλησή μου στον ερευνητικό χώρο της Βιολογίας.

Αρχικά ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Νεκτάριο Ταβερναράκη. Με δέχτηκε στο εργαστήριό του όντας ακόμα προπτυχιακός φοιτητής για να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία και ακολούθησε μια συνεργασία που είχε ως αποκορύφωμα την επιτέλεση της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Πέρα από την συμβουλευτική του υποστήριξη στα θέματα της δουλειάς και τη βοήθειά του, στάθηκε και σαν πραγματικός άνθρωπος απέναντί μου. Σε όλες μας τις συζητήσεις και ιδιαίτερα στις τελευταίες μού στάθηκε πραγματικά σαν Άνθρωπος στους προβληματισμούς και στις αποφάσεις μου και τον ευχαριστώ. Νεκτάριε, ειλικρινά ευχαριστώ.

Μέσα στο εργαστήριο συνεργάστηκα με αρκετά άτομα. Με μερικά με συνδέει κάτι παραπάνω από την έννοια της απλής συνεργασίας αλλά και της λέξης φιλίας. Για την Αγγέλα («πεθερούλα») τι να πω. Μου πρόσφερε πάρα πολλά και η λέξη ευχαριστώ ίσως και να είναι λίγη. Για το Νίκο: Φίλος, αδερφός, με βοήθησε αρκετά και τον ευχαριστώ για όλα. Όσον αφορά την Κωστούλα, πραγματικοί φίλοι. Όταν τελείωνε τα «δικά» της από το εργαστήριο φορτώθηκα εγώ τα «ψυχολογικά» της (όπως λέει κι αυτή...τι τράβηξα...γέλια...)...όταν τελείωνα εγώ...αντιστράφηκαν οι ρόλοι (όχι που θα γλύτωνε....). Μοιραζόμαστε πολλά και δεν χρειάζεται να μιλάω εδώ γι'αυτά.

Ευχαριστώ και τα υπόλοιπα παιδιά του εργαστηρίου, και με τα οποία συνεργάστηκα και πέρασα αρκετές στιγμές εντός κι εκτός εργαστηρίου: τη Δάφνη, τη Μαρκέλα, τη Μαίρη, τον Matthias, την Άρτεμι, την Ευγενία, τη Νάντια, τη Mandy, την Κατερίνα και όλα τα παιδιά (συγχωρέστε με αν ξεχνάω κανένα...). Τον μικρό ξέχασα...Καλή τύχη τρελομικρέ, θα πας ψηλά το ξέρεις (μόνο το μυαλό μες στο κεφάλι να χεις..).

Εκτός από τα άτομα του εργαστηρίου, χαίρομαι που γνώρισα αρκετά άτομα μέσα στον χώρο του IMBB. Ευχαριστώ τους επιβλέποντες αυτής της διατριβής θερμά. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Δέσποινα Αλεξανδράκη με την οποία συνεργάστηκα αλλά και μοιράστηκα κάποια από τα θέματα που με απασχολούσαν. Πέραν από συμφοιτητές μου μέσα στο χώρο με τους οποίους είχα καθημερινή επαφή γνώρισα και άτομα που με συμβούλεψαν αρκετά μέσα από συζητήσεις μας και μου ξεδιάλυναν το μυαλό όταν ήταν κάπως «θολωμένο» από προσωπικές σκέψεις: Μπάμπη, ευχαριστώ πολύ.

Τέλος για επίλογο θα αφήσω μερικές προσωπικές μου σκέψεις: Όταν ξεκινάς μια πορεία, ποτέ δεν ξέρεις μέχρι που θα σε οδηγήσει το ταξίδι. Θεωρώ τον εαυτό μου τυχερό που ασχολήθηκα μέχρι αυτό το σημείο με το χώρο της Βιολογίας (χωρίς να αποκλείω τίποτα για το μέλλον..). Δεν θεωρώ τον εαυτό μου χαμένο. Αντίθετα, κερδισμένο. Έμαθα πολλά που τα συναντάω κάθε μέρα μπροστά μου. Απλά μερικές φορές το ένστικτο μπορεί να σε ωθεί να ακολουθήσεις κάτι άλλο. Κι έτσι νιώθω...Μακάρι να μην διαψευστώ...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΠΑΝΩ ΑΠΟ ΟΛΑ...ΕΚΤΙΜΩ ΤΟ ΔΙΚΟ ΤΟΥΣ ΤΟ ΑΓΧΟΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ ΜΟΥ...ΚΑΙ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΠΟΥ ΜΕ ΣΤΗΡΙΖΟΥΝ...ΤΕΛΟΣ, ΣΕ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ...ΠΟΥ ΕΙΣΑΙ ΔΙΠΛΑ ΜΟΥ.....ΞΕΡΕΙΣ ΕΣΥ....

Περιεχόμενα

<u>1. Περίληψη</u>	5
<u>2. Εισαγωγή στο 1^ο τμήμα της ερευνητικής μελέτης</u>	7
2.1 Ο οργανισμός-μοντέλο <i>Caenorhabditis elegans</i>	7
2.2 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου στον <i>C. elegans</i>	9
2.2.1 Η απόπτωση στον <i>C. elegans</i>	10
2.2.2 Η νέκρωση στον <i>C. elegans</i>	13
2.3. Μηχανισμοί γήρανσης στο νηματώδη <i>C. elegans</i>	21
2.3.1 Το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης/IGF-1.....	23
2.3.2 Διαιτητικός περιορισμός και γήρανση.....	26
2.3.3 Ελαχιστοποίηση πρωτεϊνικής σύνθεσης (απενεργοποίηση IFE-2) στα σωματικά κύτταρα και γήρανση.....	27
<u>3. Αποτελέσματα 1^{ου} τμήματος ερευνητικής μελέτης</u>	30
3.1 Ανάλυση των επιδράσεων μεταλλαγών που αυξάνουν τη διάρκεια ζωής, στη νέκρωση στον <i>C. elegans</i>	30
3.2 Ανάλυση των επιδράσεων μεταλλαγών που ελέγχουν το μηχανισμό της νέκρωσης, στη γήρανση στον <i>C. elegans</i>	36
<u>4. Εισαγωγή στο 2^ο τμήμα της ερευνητικής μελέτης</u>	48
4.1 Μοντελοποίηση της ασθένειας του Parkinson στον <i>C. elegans</i>	48
4.1.1 Το σύστημα ντοπαμίνης στον <i>C. elegans</i>	49
4.1.2 Βιοσύνθεση και σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης στον <i>C. elegans</i>	50
4.1.3 Μοντέλα επαγωγής εκφυλισμού ντοπαμινεργικών νευρώνων στον <i>C.</i> <i>elegans</i>	51
4.1.4 Ο ρόλος της α-συνουκλεΐνης στον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων στον <i>C. elegans</i>	53
4.2 Η ενδονουκλεάση G και η λειτουργία της στον <i>C. elegans</i>	54
<u>5. Αποτελέσματα 2^{ου} τμήματος ερευνητικής μελέτης</u>	56
5.1 Διερεύνηση του ρόλου της ενδονουκλεάσης G στη συσσωμάτωση της α- συνουκλεΐνης (στους μύες) του <i>C. elegans</i>	56
5.2 Διερεύνηση του ρόλου της ενδονουκλεάσης G στο νευροεκφυλισμό που επάγεται από την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης στον <i>C. elegans</i>	59
5.3 Διερεύνηση του ρόλου της σπερμιδίνης στη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης	63

(στους μύες) του <i>C. elegans</i>	
5.4 Διερεύνηση του ρόλου της σπερμιδίνης στο νευροεκφυλισμό που επάγεται από την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης στον <i>C. elegans</i>	65
6. Σύνοψη των αποτελεσμάτων – Συζήτηση	67
7. Υλικά και μέθοδοι	72
7.1 Συντήρηση και καλλιέργεια στελεχών του νηματώδους.....	72
7.2 Πάγωμα, αποθήκευση και ανάκτηση στελεχών του νηματώδους.....	73
7.3 Γενετικές διασταυρώσεις.....	75
7.3.1 Αρσενικά άτομα.....	75
7.3.2 Γενετικές διασταυρώσεις.....	76
7.3.2.1 <i>daf-2(e1370)III; mec-4(u231)X, daf-2(e1368)III; mec-4(u231)X, daf-2(e1370)III; deg-3(u662)V</i>	77
7.3.2.2 <i>eat-2(ad465)II; mec-4(u231)X</i>	81
7.3.2.3 <i>ife-2(ok306)X; mec-4(u231)X</i>	83
7.3.2.4 <i>cps-6(ok1718)I; baln11[p_{dat-1}::α-Syn, p_{dat-1}::GFP]</i>	85
7.4 Προετοιμασία δείγματος για παρατήρηση και μέτρηση νεκρωτικών κυττάρων.....	88
7.5 RNAi στον <i>C. elegans</i>	90
7.6 Απαλλαγή των νηματωδών από βακτηριακές μολύνσεις / συγχρονισμός πληθυσμών με τη μέθοδο του bleaching.....	95
7.7 Ανάλυση διάρκειας ζωής (Lifespan Assays).....	96
7.8 Gentle body touch.....	97
7.9 Single Worm PCR.....	98
7.10 Προετοιμασία δειγμάτων για τις μελέτες συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης στους μύες καθώς και για το νευροεκφυλισμό που επάγεται από την α-συνουκλεΐνη.....	99
7.11 Assay για τη διερεύνηση των επιδράσεων της σπερμιδίνης στη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης στους μύες του σωματικού τοιχώματος καθώς και για το νευροεκφυλισμό που επάγεται από την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης στον <i>C. elegans</i>	100
7.12 Ανάλυση συσσωματωμάτων της α-συνουκλεΐνης στους μύες του σωματικού τοιχώματος του <i>C. elegans</i>	101
7.13 Ανάλυση εκφυλισμού ντοπαμινεργικών νευρώνων που επάγεται από την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης.....	101

7.14 Άλλες Πληροφορίες.....	102
<u>8. Βιβλιογραφία</u>	104

1. Περίληψη

Η ηλικιο-εξαρτώμενη κατάπτωση της υγείας επιβαρύνει με μεγάλο κόστος την κοινωνία. Παρόλο που έχει σημειωθεί αρκετή πρόοδος στη διάγνωση και θεραπεία διαταραχών που σχετίζονται με τους ηλικιωμένους, οι γνώσεις μας γύρω από τους βασικούς μηχανισμούς της γήρανσης και της συνεισφοράς τους στην ανάπτυξη και εξέλιξη ηλικιο-εξαρτώμενων διαταραχών είναι πολύ λίγες. Ανάμεσα στις πιο χαρακτηριστικές παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με τη μεγάλη ηλικία είναι αρκετές νευροεκφυλιστικές ασθένειες (νόσος Alzheimer's, Parkinson's και Huntington's) που μαζί με τα εγκεφαλικά επεισόδια, οδηγούν στην απώλεια νευρικών κυττάρων και συμβάλλουν στην ακόμα μεγαλύτερη εξασθένηση και μείωση της δραστηριότητας ηλικιωμένων ατόμων. Μελέτες σε οργανισμούς-μοντέλα όπως ο *Caenorhabditis elegans* και η *Drosophila melanogaster* που προσφέρουν τη δυνατότητα γενετικών προσεγγίσεων, έχουν αποκαλύψει σημαντικές πληροφορίες γύρω από τους μοριακούς μηχανισμούς που υπόκεινται των φυσιολογικών διαδικασιών της γήρανσης και του νευροεκφυλισμού. Αυτές οι εξελίξεις είναι αρκετά υποσχόμενες ότι ο σύνδεσμος μεταξύ της γήρανσης και της εκδήλωσης των νευροεκφυλιστικών ασθενειών θα αποκαλυφθεί και θα απαντηθούν ερωτήματα όπως τα παρακάτω: i) Πώς η γήρανση επάγει ή ρυθμίζει τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες που επικρατούν μεταξύ των ηλικιωμένων ατόμων; ii) Συναντώνται οι μοριακοί μηχανισμοί της γήρανσης και των νευροεκφυλιστικών ασθενειών σε κάποιο σημείο; iii) Ποιοι είναι οι κοινοί παρονομαστές-καθοριστές των μηχανισμών;

Σε αυτή τη μελέτη προσπαθήσαμε μέσω δύο παράλληλων προσεγγίσεων να αναζητήσουμε κοινά μόρια-καθοριστές μεταξύ του νευροεκφυλισμού και της γήρανσης στον *C. elegans*. Η πρώτη προσέγγιση περιλαμβάνει τη διερεύνηση του ρόλου μεταλλαγών που

είναι γνωστό ότι οδηγούν σε αύξηση της διάρκειας ζωής του *C. elegans* (και αφορούν 3 μονοπάτια ελέγχου της γήρανσης: insulin/IGF μονοπάτι, διαιτητικός περιορισμός και πρωτεϊνική σύνθεση) στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Παράλληλα, η δεύτερη προσέγγιση περιλαμβάνει τη διερεύνηση του ρόλου μεταλλαγών που εμπλέκονται στο μηχανισμό του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου στον *C. elegans*, στη γήρανση του οργανισμού.

Επίσης, σε ένα άλλο τμήμα της ερευνητικής μας μελέτης διερευνήσαμε αν καθοριστές της μιτοχονδριακής λειτουργίας θα μπορούσαν να αποτελούν τμήμα του μηχανισμού νευροεκφυλισμού που επάγεται από την α-συνουκλεΐνη (έγκλειστες δομές της α-συνουκλεΐνης είναι ένα κοινό παθολογικό χαρακτηριστικό τόσο σποραδικών όσο και οικογενών περιπτώσεων της ασθένειας του Parkinson). Για αυτό το λόγο εξετάστηκε ο ρόλος του ομόλογου της ενδονουκλεάσης G στη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης στους μύες καθώς και στο νευροεκφυλισμό. Επίσης, διερευνήθηκε αν η σπερμιδίνη μέσω του γνωστού ρόλου της στην επαγωγή της αυτοφαγίας (Eisenberg et al., 2009) μπορεί να καταστείλει τη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης. Εκτός από αυτό, διερευνήθηκε και η επίδρασή της στο νευροεκφυλισμό (που επάγεται από την α-συνουκλεΐνη στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες).

2. Εισαγωγή στο 1^ο τμήμα της ερευνητικής μελέτης

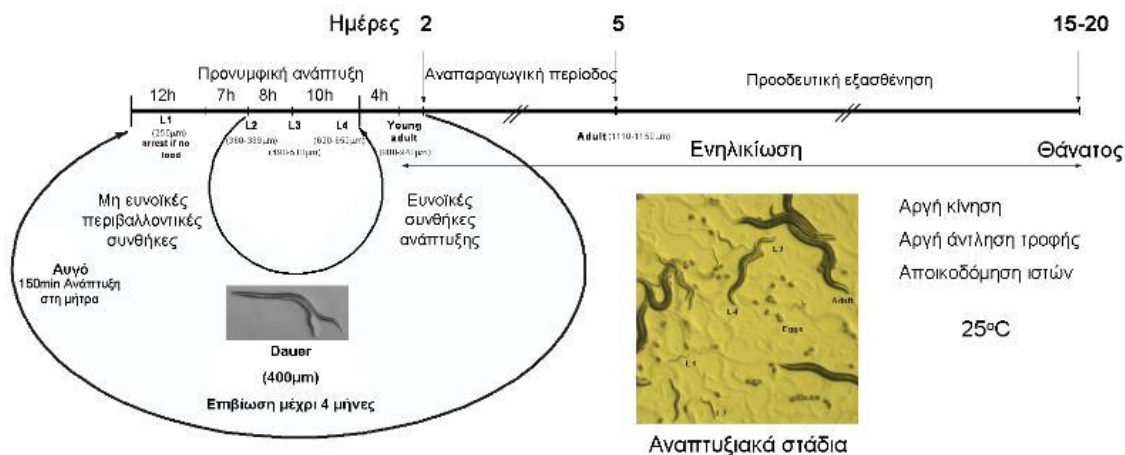
2.1 Ο οργανισμός-μοντέλο *Caenorhabditis elegans*

Ο οργανισμός *Caenorhabditis elegans* είναι ένα ερμαφρόδιτο νηματώδες σκουλήκι μήκους ~1mm το οποίο στη φύση ζει στο χώμα και τρέφεται κυρίως με βακτήρια. Ο Sydney Brenner το 1974 ανακάλυψε την αξία του *C. elegans* ως ερευνητική πλατφόρμα και από τότε ο οργανισμός έχει χρησθεί εργαλείο εκτεταμένης βιολογικής έρευνας (Brenner, 1974). Ο κύκλος ζωής του (σε θερμοκρασία 25°C) φαίνεται στην **εικόνα 1**. Όπως φαίνεται και από την σχηματική απεικόνιση της **εικόνας 1**, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η ανάπτυξη ξεκινά από το γονιμοποιημένο αυγό και διαδοχικά μέσα από τέσσερα στάδια προνύμφης (larval stages L1, L2, L3 και L4) φθάνει στο ενήλικο στάδιο οπότε και ζει για 2-3 εβδομάδες (Brenner, 1974). Ο αναπαραγωγικός κύκλος μπορεί να ολοκληρωθεί σε χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από 2.5 ημέρες (25°C) έως 4.5 (15°C) (η θερμοκρασία παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της διάρκειάς του). Η ύπαρξη μη-ευνοϊκών συνθηκών ανάπτυξης (πείνα, ακραίες θερμοκρασίες, overcrowding) οδηγεί τον οργανισμό κατά το L2 προνυμφικό στάδιο να ακολουθήσει ένα εναλλακτικό μονοπάτι (dauer stage) (Klass, 1976). Σε αυτή την ανθεκτική μορφή, τα ζώα επιζούν για εβδομάδες, ακόμα και μήνες. Η αποκατάσταση ευνοϊκών περιβαλλοντικών συνθηκών μπορεί να τον οδηγήσει πάλι στην συνέχιση της ανάπτυξής του από το L4 στάδιο (Golden, 1984).

Η μεταλλαξόγνευση ερμαφρόδιτων γονέων οδηγεί σε ομόζυγους μεταλλαγμένους απογόνους χωρίς την ανάγκη κάποιας γενετικής διασταύρωσης. Το γονιδίωμα του *C. elegans* έχει αλληλουχηθεί πλήρως ενώ για τη χαρτογράφηση μεταλλαγμένων αλληλομόρφων μπορούν να χρησιμοποιηθούν τεχνικές κλασσικής γενετικής, που διευκολύνονται από την

ανάπτυξη ενός πλήρους χάρτη πολυπληθών SNPs (Wicks et al., 2001). Επιπλέον, τα αμερόληπτα γενετικά screens, οι τεχνικές αντίστροφης γενετικής (όπως το RNAi) (Fire et al., 1998; Maeda et al., 2001), η εύκολη και ταχύτατη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων (με μικρο-ένεση του επιθυμητού γενετικού υλικού στην γονάδα του ενήλικου ατόμου) (Mello, 1991) και η χρήση γονιδιακών συντήξεων με φθορίζοντες μάρτυρες (όπως συντήξεις με την GFP) για την παρατήρηση κυττάρων και υποκυτταρικών δομών, αποτελούν μερικές από τις τεχνικές στις οποίες υπόκειται ο οργανισμός. Ένα βασικό πλεονέκτημα του οργανισμού είναι η διαφάνειά του (σε όλα τα στάδια της ζωής του), κι έτσι ατομικοί πυρήνες μπορεί να παρατηρηθούν με τη χρήση μικροσκοπίας αντίθεσης διαφορικής συμβολής (differential interference contrast). Αυτό έχει βοηθήσει στην παρατήρηση της πλήρους αλληλουχίας των σωματικών κυτταρικών διαιρέσεων από το γονιμοποιημένο έμβρυο ως τον ενήλικο οργανισμό (των 959 κυττάρων). Αυτός ο χάρτης (lineage map) έχει δώσει πληροφορίες για το ποια κύτταρα πεθαίνουν, και το πότε και που πεθαίνουν.

Από τα 959 κύτταρα του ερμαφρόδιτου ατόμου, τα 302 αποτελούν νευρικά κύτταρα, κι έχει χαρακτηριστεί πλήρως το σύνολο των συναπτικών συνδέσεων όλων των νευρικών κυττάρων μεταξύ τους (White, 1976; White, 1986). Τέλος, η ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων του *C. elegans* που έχουν ομόλογά τους στον άνθρωπο και η συντήρηση αρκετών σηματοδοτικών μονοπατιών αυξάνουν την πειραματική αξία του *C. elegans*.



Εικόνα 1. Ο κύκλος ζωής του *C. elegans* (στους 25°C) (Kourtis and Tavernarakis, 2007)

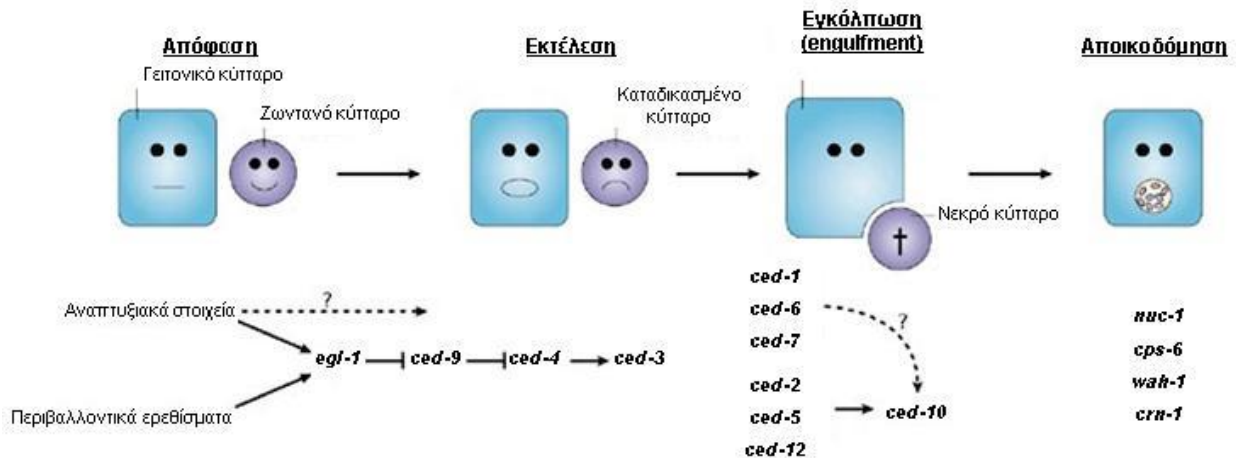
2.2 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου στον *C. elegans*

Όπως προαναφέρθηκε, ο *C. elegans* έχει παίξει σημαντικό ρόλο στη μελέτη της διαδικασίας του κυτταρικού θανάτου. Πιο συγκεκριμένα, ο νηματώδης έχει αποδειχτεί χρήσιμος και καθοριστικός στην αποκρυπτογράφηση αρκετών πληροφοριών γύρω από τους μοριακούς μηχανισμούς του αποπτωτικού καθώς και τύπων μη-αποπτωτικού θανάτου (Lettre and Hengartner, 2006; Rolland and Conradt, 2006; Vlachos and Tavernarakis, 2010). Έχει πραγματοποιηθεί η ταυτοποίηση πολλών μεταλλαγμάτων με προβλήματα τόσο στον αποπτωτικό όσο και στον μη-αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Τα μεταλλάγματα αυτά χρησιμοποιούνται για τη μελέτη και την αποκάλυψη των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στους δύο τύπους θανάτου. Δεδομένου ότι πολλές από τις πρωτεΐνες που λαμβάνουν μέρος στους μοριακούς μηχανισμούς των δύο τύπων θανάτου, φαίνεται να είναι συντηρημένες, η στρατηγική αυτή μπορεί να οδηγήσει στην εύρεση νέων θεραπευτικών στόχων στον άνθρωπο.

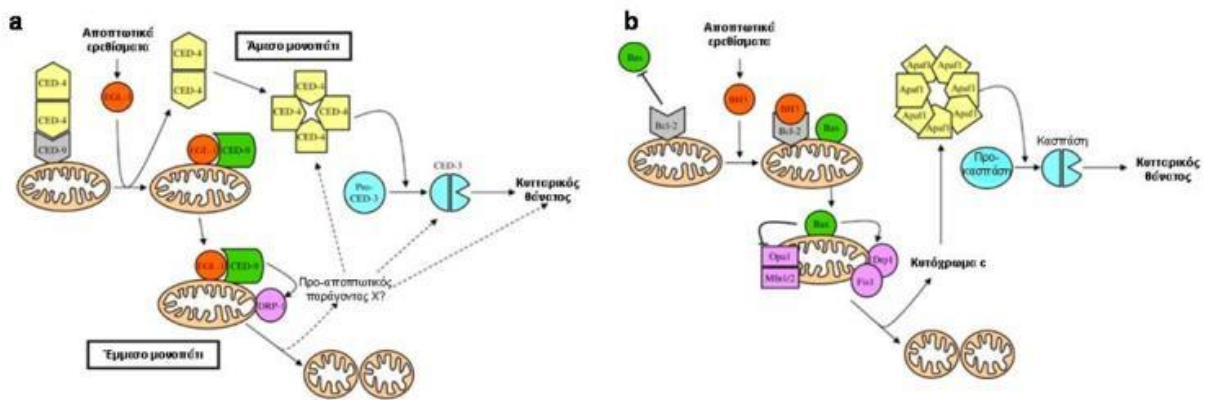
2.2.1 Η απόπτωση στον *C. elegans*

Η απόπτωση στον *C. elegans* είναι στενά συνδεδεμένη με την ανάπτυξή του, αφού κατά την μετάβαση του οργανισμού από το έμβρυο στο ενήλικο άτομο, από τα 1090 κύτταρα που θα συγκροτούσαν το ενήλικο ερμαφρόδιτο άτομο, τα 131 είναι προγραμματισμένα να πεθάνουν (στην πλειονότητά τους είναι νευρικά και σε λιγότερα ποσοστό μυϊκά, υποδερμικά και φαρυγγικά). 131 σωματικά κύτταρα πεθαίνουν προγραμματισμένα κατά την διάρκεια εμβρυϊκών, και 18 κατά την διάρκεια μετα-εμβρυϊκών σταδίων (Sulston and Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983). Επιπρόσθετα αυτών των δύο κυμάτων προγραμματισμένου αναπτυξιακού κυτταρικού θανάτου, υπάρχει ένα τρίτο κύμα κυτταρικού θανάτου που συμβαίνει εντός της γαμετικής σειράς του ενήλικου ερμαφρόδιτου ατόμου και οδηγεί στο θάνατο του ~50% των γαμετικών κυττάρων (Gumienny et al., 1999). Με εξαίρεση τον θάνατο του συνδεδεμένου κυττάρου (που ακολουθεί ένα ξεχωριστό πρότυπο θανάτου), όλα αυτά τα συμβάντα θανάτου είναι αποπτωτικά (Lettre and Hengartner, 2006; Blum et al., 2008). Εκτός από τη συσχέτιση του αποπτωτικού θανάτου με την ανάπτυξη, υπάρχουν και περιπτώσεις όπου εξωγενείς παράγοντες μπορούν να επάγουν αποπτωτικά χαρακτηριστικά θανάτου νευρικών κυττάρων στον *C. elegans* χωρίς ωστόσο μερικές φορές να εμπλέκεται κάποιο από τα καθοριστικά γονίδια (αυτά που κωδικοποιούν κασπάσες) του μονοπατιού της απόπτωσης στο μηχανισμό θανάτου. Τα πιο σημαντικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποπτωτικών κυττάρων αποτελούν η συμπαγής, υψηλά ανακλώμενη μορφή κουμπιού, η πυρηνική συμπύκνωση, ο χρωματινικός κατακερματισμός και η φυσιολογική εμφάνιση των κυτταροπλασματικών οργανιδίων (Sulston and Horvitz, 1977) **(εικόνα 2)**.

Οι μοριακοί μηχανισμοί και τα διάφορα στάδια της απόπτωσης στον *C. elegans*, καθώς και οι ομοιότητές τους με τα θηλαστικά φαίνονται στις **εικόνες 3 και 4**.



Εικόνα 3. Τα στάδια του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (Lettre and Hengartner, 2006). Η επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου *egl-1* που κωδικοποιεί μια BH3-only πρωτεΐνη, είτε μέσω αναπτυξιακών στοιχείων ή εξωτερικών ερεθισμάτων, είναι κλειδί στην απόφαση ενός κυττάρου να ακολουθήσει το αποπτωτικό μονοπάτι στον *C. elegans*. Το *ced-9* γονίδιο (που κωδικοποιεί πρωτεΐνη όμοια με την ανθρώπινη BCL-2) κάτω από φυσιολογικές συνθήκες μπλοκάρει την απόπτωση μέσω αναστολής της ενεργότητας του *ced-4*. Ωστόσο όταν ενεργοποιηθεί το *egl-1*, αναστέλλει το αντι-αποπτωτικό γονίδιο *ced-9*, επιτρέποντας στα γονίδια *ced-4* (κωδικοποιεί πρωτεΐνη όμοια με τον ανθρώπινο ενεργοποιητικό παράγοντα των αποπτωτικών πρωτεασών Araf-1) και *ced-3* (κωδικοποιεί μια κασπάση) να αλληλεπιδράσουν και να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο. Έπειτα ακολουθεί η αναγνώριση και εγκόλπωση του νεκρού κυττάρου από ένα γειτονικό κύτταρο και η αποικοδόμηση του νεκρού κυττάρου εντός του γειτονικού του. Τα κύρια γονίδια που παίζουν ρόλο σε όλα τα στάδια της διαδικασίας του κυτταρικού θανάτου φαίνονται στην εικόνα.



Εικόνα 4. Ομοιότητα των μονοπατιών επαγωγής της απόπτωσης μεταξύ θηλαστικών και *C. elegans*

(Rolland and Conrardt, 2006). a. *C. elegans*: Στα υγιή κύτταρα, η πρωτεΐνη CED-9 μπλοκάρει την ικανότητα του CED-4 να συγκροτηθεί σε ένα ενεργό αποπτώσωμα και να προωθήσει την επεξεργασία της προκασπάσης CED-3 και την ενεργοποίησή της. Σε απόκριση αποπτωτικών ερεθισμάτων, η πρωτεΐνη EGL-1 προσδένεται στο σύμπλοκο των CED-9 - CED-4, απελευθερώνει τον CED-4, βοηθάει στην συγκρότηση του αποπτωσώματος, και σε κάποια ενεργοποίηση του CED-3 (άμεσο μονοπάτι). Η πρόσδεση του EGL-1 στον CED-9 επάγει επίσης μια δομική και λειτουργική αλλαγή στον CED-9, οδηγώντας πιθανότητα στον DRP-1-μεσολαβούμενο μιτοχονδριακό κατακερματισμό που προωθεί την επαγωγή της απόπτωσης μέσω ενίσχυσης της ενεργότητας του αποπτωσώματος ή της CED-3, η μέσω δράσης παράλληλης με το αποπτώσωμα και την CED-3 (έμμεσο μονοπάτι). Απομένει να διευκυνθεί αν η προ-αποπτωτική ενεργότητα της DRP-1 σχετίζεται με τον ρόλο της στη μιτοχονδριακή σχάση. b. Θηλαστικά: Στα υγιή κύτταρα, η Bcl-2 μπλοκάρει την δράση του Bax. Σε απόκριση σε αποπτωτικά ερεθίσματα, BH3-only πρωτεΐνες προσδένονται στην Bcl-2, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του Bax, την μετατόπισή του στον εξωτερικό μιτοχονδριακό χώρο, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, την συγκρότηση του αποπτωσώματος και την ενεργοποίηση των κασπασών. Η ενεργοποίηση του Bax επίσης οδηγεί στον μιτοχονδριακό κατακερματισμό. Ο μιτοχονδριακός κατακερματισμός προωθεί την επαγωγή της απόπτωσης μέσω διευκόλυνσης της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c. Απομένει να διευκυνθεί αν η προ-αποπτωτική ενεργότητα των Drp1 και Fis1 και η αντι-αποπτωτική ενεργότητα των Ora1, Mfn1 και Mfn2 σχετίζεται με τον ρόλο τους στη μιτοχονδριακή σχάση και σύντηξη.

Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος έχει βρεθεί ότι δεν είναι απαραίτητος για την επιβίωση του *C. elegans*. Στελέχη ομόζυγα για μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας στα κεντρικά γονίδια του μονοπατιού της απόπτωσης (*egl-1*, *ced-4*, *ced-3*) παρουσιάζουν φυσιολογική κινητικότητα και μέγεθος σώματος ενώ τα κύτταρα που προστατεύονται από τον θάνατο σε αυτά τα άτομα έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης και λειτουργίας (Metzstein et

al., 1998). Από την άλλη πλευρά, μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του αντι-αποπτωτικού παράγοντα CED-9 είναι ικανές να οδηγήσουν σε πρόωρο θάνατο.

2.2.2 Η νέκρωση στον *C. elegans*

Εκτός από την απόπτωση, ο *C. elegans* έχει παίξει σημαντικό ρόλο στη μελέτη και αποκρυπτογράφηση πληροφοριών γύρω κι από τύπους μη-αποπτωτικού θανάτου. Η νέκρωση αποτελεί τον σημαντικότερο τύπο μη-αποπτωτικού θανάτου που έχει αποκαλυφθεί και μελετηθεί εκτενώς στον *C. elegans*.

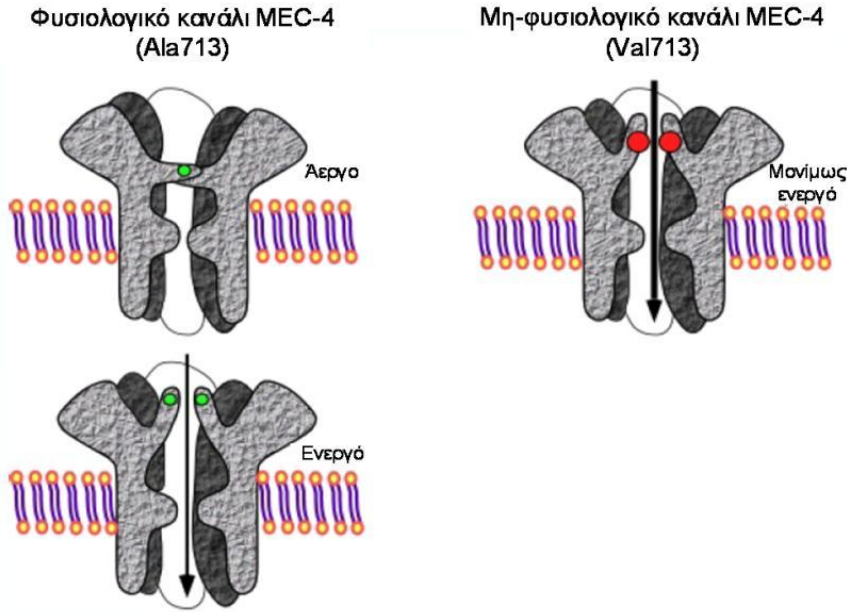
Η νέκρωση είναι ένας τύπος κυτταρικού θανάτου που επάγεται από ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες ή γενετικούς παράγοντες (Walker et al., 1988). Στους ανθρώπους, αλλαγές σε φυσιολογικές συνθήκες (όπως η οξεία ενεργειακή έλλειψη, η υποξία, η ισχαιμία, η έκθεση σε τοξίνες, οι ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου ή οι ακραίες αλλαγές στην θερμοκρασία) μπορούν να επάγουν τη νέκρωση (Walker et al., 1988; Nicotera et al., 1999). Η νέκρωση είναι ο τύπος θανάτου που υπόκειται πολλών ανθρώπινων παθολογικών καταστάσεων και νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Syntichaki and Tavernarakis, 2003).

Παρά τις αρχικές πεποιθήσεις ότι η νέκρωση είναι μια χασοκή και ανεξέλεγκτη διαδικασία, πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι συντηρημένοι και καλά ελεγχόμενοι μηχανισμοί υπόκεινται της κυτταρικής καταστροφής κατά τη διάρκεια του νεκρωτικού θανάτου (Syntichaki and Tavernarakis, 2002).

Πολλά παραδείγματα νεκρωτικού θανάτου έχουν αναγνωρισθεί και χαρακτηριστεί στον *C. elegans*. Gain-of-function μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν κανάλια ιόντων της υπεροικογένειας DEG/ENaC (προέλευση ονόματος από τα κανάλια degenerins στον *C.*

elegans και από τα επιθηλιακά κανάλια ιόντων νατρίου στα θηλαστικά) οδηγούν σε νεκρωτικό θάνατο τα κύτταρα στα οποία εκφράζονται (Syntichaki and Tavernarakis, 2003).

Για παράδειγμα, επικρατή αλληλόμορφα (d από το dominant) δύο γονιδίων που



Εικόνα 5. Η μεταλλαγή Ala713->Val713 οδηγεί σε ένα υπερενεργό κανάλι όπου εισέρχονται συνεχώς, μέσω αυτού, ιόντα Na⁺ και Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα οδηγώντας σε νεκρωτικό θάνατο (Syntichaki and Tavernarakis, 2004).

κωδικοποιούν degenerins (*deg-1(d)* και *mec-4(d)*)

επάγουν εκφυλισμό συγκεκριμένων ενδιάμεσων νευρώνων του οπίσθιου κυκλώματος αίσθησης αφής

και 6 νευρώνων που απαιτούνται για την αίσθηση ελαφρών μηχανικών ερεθισμάτων αντίστοιχα

(Chalfie and Wolinsky, 1990; Driscoll and Chalfie, 1991).

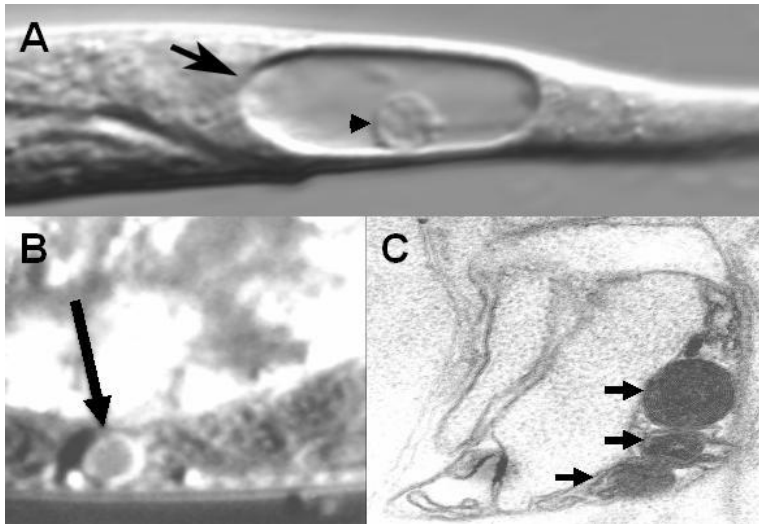
Πιο συγκεκριμένα, το

αλληλόμορφο *mec-4(d)* προκαλεί το νεκρωτικό θάνατο των νευρώνων ALML/R, AVM, PLML/R, και PVM. Το αλληλόμορφο *deg-3(d)* οδηγεί στην έκφραση ενός υπερενεργού καναλιού ιόντων ασβεστίου (νικοτινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης) κυρίως σε ενδιάμεσους (PVCs και AVG) και αισθητικούς (ALMs, PLMs, PVDs και IL1s) νευρώνες (Chalfie and Wolinsky, 1990; Treinin and Chalfie, 1995). Το αλληλόμορφο *as(gf)* κωδικοποιεί τριμερείς G-πρωτεΐνες με συστατικά ενεργή υπομονάδα α, με αποτέλεσμα τη νέκρωση ορισμένων ενδιάμεσων (AVA, AVB, AVD, AVE και PVC) και κινητικών νευρώνων (Maricq et al., 1995; Korswagen et al., 1997; Berger et al., 1998). Οι συγκεκριμένες επικρατείς μεταλλαγές

αφορούν αντικατάσταση ενός αμινοξέος που καταλαμβάνει μικρό χώρο στο εξωκυτταρικό τμήμα της πρωτεΐνης (και κοντά στην διαμεμβρανική περιοχή που συμμετέχει στο σχηματισμό της δομής του πόρου) από ένα άλλο αμινοξύ που καταλαμβάνει μεγαλύτερο χώρο. Αυτό οδηγεί στην παρεμπόδιση κλεισίματος του πόρου και στην αυξημένη είσοδο ιόντων στο κυτταρόπλασμα του νευρώνα. Όσον αφορά το *mec-4(d)*, η επικρατής μεταλλαγή οδηγεί στην αντικατάσταση μιας Ala στον πόρο του καναλιού από μια Val, οδηγώντας στην ανεξέλεγκτη είσοδο Na⁺ και Ca²⁺ (Bianchi et al., 2004) **(εικόνα 5)**.

Η εκκίνηση του νευροεκφυλισμού σχετίζεται με την εκκίνηση έκφρασης της *degenerin*, και η σοβαρότητα των επιπτώσεων εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασης του καναλιού (Hall et al., 1997). Και άλλα γονίδια *degenerins* μπορούν να επάγουν νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο (όταν φέρουν ανάλογες μεταλλαγές με τις παραπάνω) και είναι τα *mec-10*, *unc-8* και *unc-105* (Syntichaki and Tavernarakis, 2004). Ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος που επάγεται από υπερενεργά κανάλια *degenerins* στα σκουλήκια παρουσιάζει μηχανιστικές και μορφολογικές ομοιότητες με τον κυτταρικό θάνατο από υπερβολική διέγερση στα θηλαστικά (Choi, 1992).

Σε κυτταρικό επίπεδο, το κύριο μορφολογικό χαρακτηριστικό της νέκρωσης είναι η εμφάνιση αναδιπλώσεων περιοχών της πλασματικής μεμβράνης οι οποίες εσωτερικεύονται κι μοιάζουν να συγχωνεύονται σε ηλεκτρονιακά -πυκνές μεμβρανικές σπείρες (Hall et al., 1997).



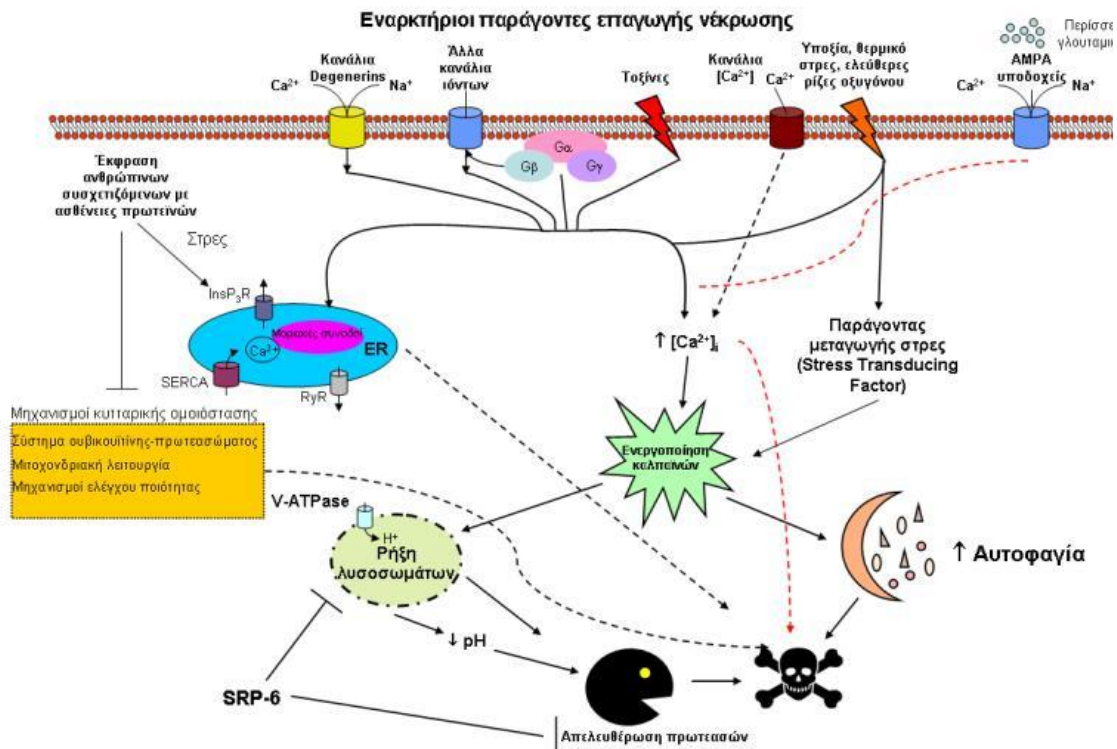
Εικόνα 2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά του κυτταρικού θανάτου στον *C. elegans*. A. Νεκρωτικός θάνατος νευρικού κυττάρου (βέλος) του νηματώδους ως αποτέλεσμα έκφρασης ενός υπερενεργού καναλιού ιόντων της οικογένειας των *degenerins*. Το εκφυλιζόμενο κύτταρο διογκώνεται ενώ ο πυρήνας παρουσιάζει παραμορφωμένη και «φουσκωμένη» εικόνα (μικροσκοπία αντίθεσης διαφορικής συμβολής). B. Αποπτωτικός θάνατος νευρικού κυττάρου. Η μορφή του κυττάρου είναι χαρακτηριστική, διαθλαστική, συμπαγής σε μέγεθος, και μοιάζει με κουμπί. C. Διακριτές, ηλεκτρονιακά-πυκνές περιελίξεις (βέλη) που συνοδεύουν το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο (ηλεκτρονική μικροσκοπία).

Αυτές οι σπείρες είναι παρόμοιες με ανάλογες μεμβρανικές δομές που παρατηρούνται σε μοντέλα ποντικών της σκλήρυνσης κατά πλάκας (amyotrophic lateral sclerosis) (Blondet et al., 2002) και της νευρικής κηροειδούς λιποφουσίωσης (neuronal ceroid lipofuscinosis) (Cooper et al., 1999). Παρατηρούνται επίσης η παραμόρφωση του πυρήνα και η συμπύκνωση της χρωματίνης. Κατά την διάρκεια της διαδικασίας του θανάτου, το κύτταρο διογκώνεται αρκετές φορές πάνω από την φυσιολογική του

διάμετρο (**εικόνα 2**). Μετά την αποικοδόμηση των εσωτερικών περιεχομένων του κυττάρου, το κυτταρικό πτώμα απομακρύνεται μέσω εγκόλπωσης από γειτονικά κύτταρα. Αυτή η διαδικασία ρυθμίζεται από γονίδια τα οποία είναι κοινά με τα αντίστοιχα της ίδιας διαδικασίας στην απόπτωση (*ced-2*, *ced-5* και *ced-10*) (Chung et al., 2000).

Gain-of-function μεταλλαγές και σε άλλα γονίδια εκτός αυτών που κωδικοποιούν *degenerins* μπορούν επίσης να προκαλέσουν νέκρωση συγκεκριμένων νευρώνων. Τέτοια αφορούν επικρατή αλληλόμορφα του γονιδίου *deg-3* που κωδικοποιεί την α-υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης καθώς και γονιδίων που κωδικοποιούν υπερενεργοποιημένες α-υπομονάδες G πρωτεϊνών (Treinin and Chalfie, 1995; Korswagen et al., 1997; Berger et al., 1998; Korswagen et al., 1998).

Μέσω γενετικών screens και φαρμακολογικών χειρισμών έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά γονίδια που απαιτούνται για το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο που επάγεται από υπερενεργά κανάλια ιόντων. Ο κρίσιμος ρόλος των ιόντων Ca^{2+} και της ομοιόστασής τους έχει δείχθει μέσα από πολλές μελέτες. Μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν ρυθμιστές των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{2+} και φαρμακολογικοί χειρισμοί που ρυθμίζουν την απελευθέρωση Ca^{2+} από ενδοκυτταρικές αποθήκες επηρεάζουν δραματικά την εκκίνηση και εξέλιξη της νεκρωτικής διαδικασίας (Xu et al., 2001). Η υπέρμετρη αύξηση των κυτταροπλασματικών Ca^{2+} συνοδεύεται από την ενεργοποίηση των Ca^{2+} -εξαρτώμενων καλπαϊνών (πρωτεασών) που οδηγεί σε καταστροφή ή ρήξη της λυσοσωμικής μεμβράνης και οδηγεί στην απελευθέρωση των όξινων περιεχομένων των λυσοσωμάτων, συμπεριλαμβανομένων και των καθεψινών πρωτεασών. Δύο συγκεκριμένες καλπαΐνες (TRA-3 και CLP-1) και δύο καθεψίνες (ASP-3 και ASP-4) απαιτούνται για το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο που επάγεται από μια πλειάδα ερεθισμάτων στον *C. elegans* (Syntichaki et al., 2002).



Εικόνα 6. Μηχανισμοί νεκρωτικού θανάτου στον *C. elegans*. Διάφορα ερεθίσματα (είτε γενετικά είτε περιβαλλοντικά) οδηγούν σε αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση $[Ca^{2+}]_i$. Η επακόλουθη ενεργοποίηση των καλπαϊνών (πρωτεασών) προκαλεί τη ρήξη της λυσοσωμικής μεμβράνης και την απελευθέρωση των λυσοσωμικών περιεχομένων στο κυτταρόπλασμα. Η συνεπακόλουθη απελευθέρωση των λυσοσωμικών πρωτεολυτικών ενζύμων, σε συνδυασμό με την κυτταροπλασματική οξίνιση διαμεσολαβεί την κυτταρική καταστροφή. Η θετική ρύθμιση της αυτοφαγίας (είτε άμεσα μετά την επαγωγή της νέκρωσης είτε μέσω της ενεργοποίησης των καλπαϊνών) μπορεί να συνεργαστεί με τα λυσοσωμικά πρωτεολυτικά ένζυμα και να διευκολύνει τον κυτταρικό θάνατο. Ένα βασικό μονοπάτι απόκρισης στο στρες, ρυθμιζόμενο από τον αναστολέα πεπτιδασών SRP-6, επηρεάζει τη νέκρωση που επάγεται από διάφορα ερεθίσματα. Η κύρια δράση του SRP-6 είναι η προστασία από κυτταρική βλάβη, επηρεάζοντας τη λυσοσωμική ρήξη και τις συνέπειές της. Η κυτταροτοξικότητα ως αποτέλεσμα υπερδιέγερσης από το Glu φαίνεται να περιλαμβάνει παρόμοιους μηχανισμούς. Η έκφραση πρωτεϊνών σχετικών με ανθρώπινες ασθένειες διαταράσσει επίσης κυτταρικούς ομοιοστατικούς μηχανισμούς και επάγει στρες, που μετά από ένα όριο μπορεί να αποδειχτεί καταστροφικό για το κύτταρο. $[Ca^{2+}]_i$, ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου; ER, ενδοπλασματικό δίκτυο; InsP₃R, υποδοχέας τριφωσφορικής ινοσιτόλης; RyR, υποδοχέας ρυανοδίνης; SERCA, Ca^{2+} -ATPάση σαρκο-ενδοπλασματικού δικτύου; V-ATPase, κυστιδιακή H^+ -ATPάση; SRP-6, αναστολέας σερινοπρωτεασών; AMPA, υποδοχέας α-αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλ-4-ισοξαζολ—προπιονικού οξέος.

Η ενδοκυτταρική ομοιόσταση του pH μαζί με τη λυσοσωμική βιογένεση και λειτουργία παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη νέκρωση (Syntichaki et al., 2005; Artal-Sanz et al., 2006). Η ενεργότητα των καθεψινών αυξάνεται σημαντικά υπό όξινες συνθήκες (Ishidoh and Kominami, 2002; Goll et al., 2003). Τέτοιες όξινες συνθήκες παρουσιάζονται εντός των λυσοσωμάτων όπου δρουν τέτοια ένζυμα. Υπεύθυνες πρωτεΐνες για την οξίνιση των λυσοσωμάτων (καθώς και των ενδοσωμάτων και των συναπτικών κυστιδίων) είναι η αντλία πρωτονίων, V-ATPase (vacuolar ATPase). Ο ρόλος τους αφορά στη μεταφορά πρωτονίων αντίθετα από την κλίση συγκέντρωσής τους (στο εσωτερικό των παραπάνω οργανιδίων), καταναλώνοντας ενέργεια (υπό μορφή ATP). Κατά τη διάρκεια της νέκρωσης η V-ATPase συμβάλλει στην οξίνιση του κυτταροπλάσματος που διευκολύνει τη δράση των λυσοσωμικών ενζύμων που έχουν απελευθερωθεί μετά τη λύση των κυτταρικών οργανιδίων. Η δομή της V-ATPase θα περιγραφεί παρακάτω πιο εκτενώς. Μεταλλαγές ή φαρμακολογικοί χειρισμοί που παρεμποδίζουν τη λυσοσωμική βιογένεση ή οξίνιση καταστέλλουν τη νέκρωση, ενώ μεταλλαγές που αυξάνουν τον αριθμό των λυσοσωμάτων ενισχύουν την κυτταρική καταστροφή. Ο μηχανισμός αυτός είναι όμοιος με μελέτες σε Πρώτιστα όπου ένας ανάλογος άξονας καλπαϊνών-καθεψινών εμπλέκεται στην εκτέλεση της νέκρωσης που συνοδεύει ισχαιμικά επεισόδια και εγκεφαλικά (Yamashima, 2000; Yamashima, 2004).

Πρόσφατες μελέτες εμπλέκουν την αυτοφαγία (την κύρια διαδικασία για ανακύκλωση πρωτεϊνών και οργανιδίων) στη νέκρωση στον *C. elegans* (Toth et al., 2007; Vellai et al., 2007; Samara et al., 2008). Υπέρμετρη αύξηση αυτοφαγοσωμάτων παρατηρείται νωρίς κατά τη νέκρωση και ελαττώνεται σε μετέπειτα στάδια της κυτταρικής καταστροφής. Απενεργοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στην αυτοφαγική διαδικασία ή φαρμακολογική παρεμπόδιση της καταστέλλει μερικώς τη νέκρωση που επάγεται από υπερενεργά κανάλια ιόντων ή από υπερενεργοποιημένες α-υπομονάδες G πρωτεϊνών. Η αυτοφαγική διαδικασία

συνεργάζεται με τα λυσοσωμικά πρωτεολυτικά μονοπάτια για να διευκολύνει τη νεκρωτική διαδικασία όπως φαίνεται και στην **εικόνα 6**. Η νέκρωση ενισχύεται κάτω από συνθήκες αύξησης της αυτοφαγίας (καταστολή του αρνητικού ρυθμιστή της – κινάση TOR- , ή κάτω από συνθήκες έλλειψης τροφής).

Η αποικοδόμηση συστατικών του συμπλόκου του πυρηνικού πόρου (NPC) και οι συνεπακόλουθες αλλαγές στην πυρηνική διαπερατότητα έχουν παρατηρηθεί στο νεκρωτικό θάνατο που προκαλείται από επικρατή αλληλόμορφα του γονιδίου *deg-3* καθώς και από υψηλές συναπτικές συγκεντρώσεις Glu σε ένα μοντέλο υπερδιέγερσης στον *C. elegans* (Bano et al., 2009). Οι αλλαγές στην πυρηνική διαπερατότητα προκαλούνται από την υπέρμετρη αύξηση των κυτταροπλασματικών Ca^{2+} και τις Ca^{2+} -εξαρτώμενες καλπαΐνες στους εκφυλιζόμενους νευρώνες, και επιτρέπουν τη μη φυσιολογική διαπερατότητα πρωτεϊνών από την εκάστοτε πλευρά (κυτταρόπλασμα ή πυρήνας) προς την άλλη. Αυτό μπορεί να χρησιμεύει ως ένας μηχανισμός πολλαπλασιασμού του σήματος θανάτου οδηγώντας στην κυτταρική αποδόμηση.

Ένα μοντέλο υπερδιέγερσης μετασυναπτικών νευρώνων από υπερβολικές συναπτικές συγκεντρώσεις Glu που οδηγεί στο νεκρωτικό τους θάνατο έχει περιγραφεί στον *C. elegans* (Mano and Driscoll, 2009). Μεταλλαγές στο γονίδιο *glt-3* που κωδικοποιεί ένα μεταφορέα Glu, σε συνδυασμό με την συστατική έκφραση της α -υπομονάδας μιας G-πρωτεΐνης, προκαλούν εκτεταμένο νεκρωτικό θάνατο κεφαλικών ενδιάμεσων νευρώνων. Οι νεκρωτικές επιδράσεις μεσολαβούνται μέσω του Ca^{2+} -προσπελάσιμου AMPA-υποδοχέα Glu.

Εκτός από την επαγωγή της νέκρωσης από γενετικά ερεθίσματα, υπάρχει και μια πλειάδα περιβαλλοντικών ερεθισμάτων που μπορούν να οδηγήσουν σε νεκρωτικό θάνατο στον *C. elegans*. Τέτοια περιβαλλοντικά ερεθίσματα αποτελούν οι συνθήκες υποξίας (νέκρωση φαρυγγικών, μυικών, νευρικών, γαμετικών κυττάρων και τελικά θάνατος ολόκληρου

του οργανισμού) (Scott et al., 2002; Anderson et al., 2009), οι συνθήκες ανοξίας (νέκρωση σε όλους τους ιστούς) (Menuz et al., 2009), η μόλυνση με βακτηριακά παθογόνα (νέκρωση σε εντερικά, επιδερμικά και γαμετικά κύτταρα) (Wong et al., 2007), καθώς και το υποτονικό σοκ (Luke et al., 2007). Μεταλλαγμένα στελέχη που δεν διαθέτουν το *spr-6* γονίδιο (κωδικοποιεί ένα ενδοκυτταρικό αναστολέα πρωτεασών σερίνης) κάτω από συνθήκες υποτονικού σοκ, πεθαίνουν ραγδαία και παρουσιάζουν αξιοσημείωτη αύξηση της νέκρωσης στο εντερικό επιθήλιο. Επιπρόσθετα του υποτονικού σοκ, τα *spr-6* μεταλλάγματα είναι ευάλωτα και σε άλλα ερεθίσματα όπως το θερμικό και το οξειδωτικό στρες, η υποξία και η υπερενεργότητα καναλιών (παρουσιάζοντας αυξημένα ποσοστά νέκρωσης).

2.3 Μηχανισμοί γήρανσης στο νηματώδη *C. elegans*

Η γήρανση αποτελεί ένα οικουμενικό φαινόμενο που επηρεάζει σχεδόν όλους τους οργανισμούς. Αποτελεί μια φυσιολογική διαδικασία αποδόμησης, που έχει δραματικές επιπτώσεις πάνω στην ποιότητα της ανθρώπινης ζωής αφού σχετίζεται με χαμηλή νοητική, φυσική και συναισθηματική λειτουργικότητα (Kirkwood and Austad, 2000). Η διαδικασία της γήρανσης αναφέρεται στη φθορά και την σταδιακή μείωση της γονιμότητας με το πέρασμα του χρόνου σε ένα οργανισμό και προκαλείται από βλάβες στα βιολογικά μακρομόρια των κυττάρων (π.χ. υπεροξειδωση λιπιδίων, καρβονυλίωση πρωτεϊνών, τροποποιήσεις στο DNA κ.α.). Οι βλάβες αυτές έχουν γενικότερες επιπτώσεις σε κύριες λειτουργίες οργανιδίων, όπως τα μιτοχόνδρια, οδηγώντας στη δυσλειτουργία τους. Επίσης, μπορούν να οδηγήσουν ακόμα και σε κυτταρικό θάνατο –είτε νεκρωτικό είτε αποπτωτικό- προκαλώντας προβλήματα στη γενικότερη λειτουργία διαφόρων ιστών. Η γήρανση δεν είναι προγραμματισμένη διαδικασία, με την έννοια ότι δεν υπάρχουν γονίδια που έχουν εξελιχθεί ειδικά για να προκαλούν βλάβες

στα κύτταρα. Οι μοριακοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στη διαδικασία της γήρανσης είναι φυσιολογικοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και το μεταβολισμό των κυττάρων και όπως έχει δειχθεί είναι συντηρημένοι μεταξύ των οργανισμών.

Από βιοϊατρικής πλευράς, η γήρανση συχνά σχετίζεται με υψηλή πιθανότητα ηλικιακά-εξαρτώμενων ασθενειών και ανικανοτήτων, χαμηλή φυσική και νοητική λειτουργική ικανότητα και αυξημένη πιθανότητα θανάτου. Πιο συγκεκριμένα, η γήρανση του νευρικού συστήματος πιστεύεται ότι συνδέεται με νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer's, Parkinson's και Huntington's) που συνοδεύονται από κινητικές και γνωστικές διαταραχές ως αποτέλεσμα εκφυλισμού των υπεύθυνων νευρικών κυκλωμάτων που ελέγχουν τη διαδικασία της κίνησης και της μνήμης (Morrison and Hof, 1997; Burke and Barnes, 2006).

Η γενετική της γήρανσης είναι ένα συναρπαστικό πεδίο έρευνας και οι προσπάθειες για κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτήν προέρχονται από μελέτες σε απλούς οργανισμούς όπως η *Drosophila melanogaster*, ο *Saccharomyces cerevisiae* και ο *Caenorhabditis elegans* (Bishop and Guarente, 2007).

Ο *C. elegans* εμφανίζει ευδιάκριτα σημάδια γήρανσης, γεγονός που καθιστά ευκολότερη τη διάκριση των γερασμένων ατόμων από τον υπόλοιπο πληθυσμό. Επειδή όμως τα άτομα αυτά αποτελούν ένα πολύ μικρό ποσοστό του πληθυσμού σε συνηθισμένες μεικτές καλλιέργειες σκουληκιών, χρησιμοποιούνται συγχρονισμένες καλλιέργειες κατά την πειραματική μελέτη.

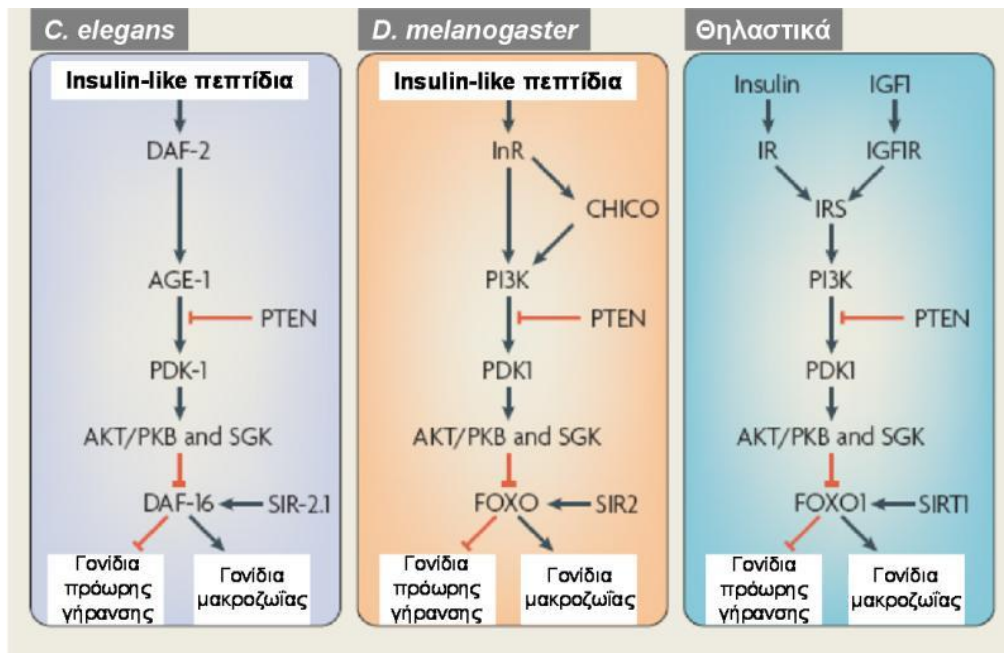
Οι κυριότερες παρατηρήσεις για τα γηρασμένα άτομα αφορούν την ελαττωμένη κινητικότητα και τους μειωμένους ρυθμούς αφόδευσης και φαρυγγικών παλμών (άντληση τροφής) σε σύγκριση με τα νεαρά ζώα. Με την γήρανση, το μυϊκό σύστημα του οργανισμού καταρρέει και η δομή του εξασθενεί (διατάραξη μυϊκών ινών και μορφολογίας πυρήνων στα

μυϊκά κύτταρα) (Antebi, 2007). Προς το τέλος της ζωής τους, τα σκουλήκια παρουσιάζουν έντονα σημάδια ωχρότητας της εμφάνισής τους, πλαδαρότητας και μιας γενικής εξασθένησης.

Παρακάτω θα αναφερθούν λεπτομέρειες γύρω από τα 3 κεντρικότερα μονοπάτια που αυξάνουν τη διάρκεια ζωής στον *C. elegans* και τα γονίδια που έχουν ανακαλυφθεί να συμμετέχουν σ'αυτά: α) Το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης/IGF-1, β) Ο διαιτητικός περιορισμός, και γ) η ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης.

2.3.1 Το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης/IGF-1

Το insulin/IGF-1 σηματοδοτικό μονοπάτι αποτελεί το πιο δημοφιλές και μελετημένο μονοπάτι, το οποίο φαίνεται να επηρεάζει τη γήρανση πληθώρας οργανισμών, όπως των θηλαστικών, των εντόμων και των νηματωδών (Tatar et al., 2003) **(εικόνα 7)**. Αρχικά ανακαλύφθηκε λόγω του ρόλου του στον σχηματισμό του εναλλακτικού σταδίου dauer στον *C. elegans*. Το συγκεκριμένο εναλλακτικό στάδιο αφορά μια μορφή που μπορούν να εισέλθουν προνύμφες του L2 σταδίου όταν συναντήσουν αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (υψηλή θερμοκρασία, πείνα ή υπερπληθυσμιακές συνθήκες καλλιέργειας). Το κύριο χαρακτηριστικό αυτής της ανθεκτικής μορφής είναι ότι τα σκουλήκια δεν τρέφονται παρόλο που παρουσιάζουν φυσιολογικά πρότυπα κινητικότητας. Η χρονική διάρκεια ζωής ατόμων αυτού του σταδίου μπορεί να κυμανθεί από εβδομάδες έως και μήνες (πολύ περισσότερο από τη φυσιολογική διάρκεια ζωής των σκουληκιών) (Klass, 1976). Με την αποκατάσταση ευνοϊκών συνθηκών τα άτομα εισέρχονται φυσιολογικά στο L4 στάδιο ολοκληρώνοντας κανονικά τον αναπαραγωγικό τους κύκλο και συνεχίζοντας φυσιολογικά τη ζωή τους.



Εικόνα 7. Τα κεντρικά μέρη του insulin/IGF-1 μονοπατιού στον *C. elegans*, τη *D. melanogaster* και τα θηλαστικά (Russell and Kahn, 2007).

Η σύνδεση αυτού του σηματοδοτικού μονοπατιού με τη γήρανση πραγματοποιήθηκε όταν διάφορα μεταλλάγματα του γονιδίου *daf-2* (abnormal dauer formation) ανακαλύφθηκαν ότι διπλασιάζουν τη διάρκεια ζωής του *C. elegans* (Kenyon et al., 1993). Το γονίδιο *daf-2* κωδικοποιεί τον ορθόλογο διαμεμβρανικό υποδοχέα ινσουλίνης στον *C. elegans* (δράση κινάσης τυροσίνης).

Μετά την πρόσδεση πεπτιδίων όμοιων με την ινσουλίνη στον DAF-2, αυτός φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί ένα καταρράκτη αντιδράσεων. Αρχικά ενεργοποιείται η κινάση AGE-1 (phosphatidylinositol 3-kinase). Εν συνεχεία, η κινάση αυτή οδηγεί στην παραγωγή 3-φωσφο-ϊνοσιπιδίων (PtdIns-3,4-P2 και PtdIns-3,4,5-P3) που παίζουν το ρόλο δευτερογενών μηνυματοφόρων μορίων και οδηγούν στην ενεργοποίηση και άλλων κινάσων σερίνης-θρεονίνης (PDK-1, AKT-1 και AKT-2). Αυτές οδηγούν στη ρύθμιση της μεταγραφής του FOXO-μεταγραφικού παράγοντα DAF-16. Η φωσφορυλίωση αυτού του παράγοντα από

τις κινάσες αυτές οδηγεί στην παραμονή του στο κυτταρόπλασμα (όπου βρίσκεται σε ανενεργή μορφή). Ο παράγοντας αυτός ανήκει στην οικογένεια των FOXO-μεταγραφικών παραγόντων και όταν φωσφορυλιωθεί εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα όπου και παραμένει ανενεργός κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Κάτω από συνθήκες στρες (άνοδος θερμοκρασίας, έλλειψη τροφής, υπερπληθυσμιακές συνθήκες) ή απουσίας πεπτιδίων όμοιων με την ινσουλίνη (δεν ενεργοποιούνται οι κινάσες), ο DAF-16 (όντας μη-φωσφορυλιωμένος) εισέρχεται στον πυρήνα και επιτελεί τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες και συνεργάζονται για να ρυθμίσουν τη διάρκεια ζωής του οργανισμού (Houthoofd and Vanfleteren, 2007). Οι κύριες διαδικασίες που εμπλέκονται αυτά τα γονιδιακά προϊόντα αφορούν την άμυνα απέναντι στο στρες, το μεταβολισμό, την παραγωγή ενέργειας, την έμφυτη ανοσία κ.α (Murphy et al., 2003; Antebi, 2007).

Καθίσταται λοιπόν κατανοητό ότι ο DAF-16 και η δράση του ως μεταγραφικός παράγοντας μιας πλειάδας γονιδίων είναι καθοριστικά για την αύξηση της διάρκειας ζωής του οργανισμού. Ισχυρές μεταλλαγές στο γονίδιο *age-1* και σε άλλα που ρυθμίζονται θετικά από το *daf-2* οδηγούν σε είσοδο στο dauer στάδιο. Μεταλλαγές που οδηγούν σε ηπιότερη μείωση στη σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού οδηγούν σε αύξηση της διάρκειας ζωής. Όταν τα ευαίσθητα στη θερμοκρασία μεταλλάγματα *daf-2* και *age-1* μεγαλώσουν στην επιτρεπτή θερμοκρασία μέχρις ότου περάσουν το σημείο από το οποίο μπορούν να μεταπέσουν στο dauer στάδιο και μετά μεταφερθούν σε υψηλότερες θερμοκρασίες, τότε παρουσιάζουν σημαντική αύξηση της διάρκειας ζωής τους που εξαρτάται από τον παράγοντα DAF-16.

Δύο πρωτεΐνες που απαιτούνται για την επέκταση της διάρκειας ζωής των *daf-2* μεταλλαγμάτων (παράλληλα με τον DAF-16) είναι ο HSF-1 (Heat Shock Factor) (Hsu et al., 2003; Morley and Morimoto, 2004) και η AAK-2 (καταλυτική υπομονάδα κινάσης ενεργοποιούμενης από AMP) (Kenyon, 2005).

2.3.2 Διαιτητικός περιορισμός και γήρανση

Ο διαιτητικός περιορισμός (dietary or caloric restriction), ως έννοια, αναφέρεται στη μείωση πρόσληψης τροφής χωρίς όμως να φτάνει στα όρια του υποσιτισμού. Η διαδικασία αυτή έχει βρεθεί ότι οδηγεί σε αύξηση της διάρκειας ζωής διαφόρων οργανισμών (*S. cerevisiae* έως θηλαστικά) οδηγώντας στην πεποίθηση περί εξελικτικά συντηρημένων μηχανισμών που την ελέγχουν.

Η επίτευξη του διαιτητικού περιορισμού μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους στον *C. elegans*: α) μέσω μείωσης της ποσότητας βακτηρίων σε υγρή καλλιέργεια (Klass, 1976), β) μέσω υγρής συνθετικής καλλιέργειας χωρίς *E. coli* (axenic media) (Houthoofd et al., 2003), γ) μέσω μεταφοράς ενήλικων ζώων σε πιάτα με άγαρ χωρίς καθόλου βακτήρια (Kaeberlein et al., 2006), δ) ή μέσω περιορισμένης πρόσληψης τροφής σε τροφικά μεταλλάγματα (Eat: μη φυσιολογικό φαρυγγικό rumping) (Lakowski and Hekimi, 1998). Μεταλλαγές στο γονίδιο *eat-2* (κωδικοποιεί υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης) έχει ως συνέπεια τη μείωση του ρυθμού άντλησης της τροφής λόγω μείωσης του ρυθμού με τον οποίο πάλλεται ο φάρυγγας.

Για το πώς ο διαιτητικός περιορισμός στον *C. elegans* προκαλεί αύξηση της διάρκειας ζωής έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες. Η αρχική πεποίθηση ήταν ότι ο διαιτητικός περιορισμός προκαλεί μείωση του επιπέδου και των ρυθμών μεταβολισμού που είχε ως συνέπεια τη μείωση της παραγωγής των ενεργών ριζών οξυγόνου (Lakowski and Hekimi, 1998; Houthoofd et al., 2002a; Houthoofd et al., 2002b). Όμως μέσω πειραματικών μετρήσεων του ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου τα πειραματικά δεδομένα δεν υποστήριζαν αυτή την υπόθεση (Houthoofd et al., 2002a; Houthoofd et al., 2002b)

Όσον αφορά κάποια δεδομένα γύρω από τον μοριακό μηχανισμό με τον οποίο ο διαιτητικός περιορισμός αυξάνει τη διάρκεια ζωής στον *C. elegans* αυτά παρατίθενται παρακάτω. Ο μεταγραφικός παράγοντας DAF-16 δεν απαιτείται για την αύξηση της διάρκειας ζωής μέσω του διαιτητικού περιορισμού (Lakowski and Hekimi, 1998; Kaeberlein et al., 2006; Lee et al., 2006; Panowski et al., 2007) δείχνοντας ότι το insulin/IGF-1 μονοπάτι είναι ανεξάρτητο από το μονοπάτι του διαιτητικού περιορισμού όσον αφορά την αύξηση της διάρκειας ζωής. Επίσης, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *daf-2* δρουν συνεργατικά με το διαιτητικό περιορισμό στην αύξηση της διάρκειας ζωής (Lakowski and Hekimi, 1998; Houthoofd et al., 2003; Houthoofd et al., 2004a; Houthoofd et al., 2004b; Houthoofd et al., 2005a; Houthoofd et al., 2005b; Houthoofd et al., 2005c). Οι μεταγραφικοί παράγοντες PHA-4/FOXA1 και SKN-1/NRF είναι απαραίτητοι για την αύξηση της διάρκειας ζωής μέσω του διαιτητικού περιορισμού (Bishop and Guarente, 2007; Panowski et al., 2007).

2.3.3 Ελαχιστοποίηση πρωτεϊνικής σύνθεσης (απενεργοποίηση IFE-2) στα σωματικά κύτταρα και γήρανση

Η ομοιόσταση και σωστή λειτουργία των κυττάρων απαιτεί τη διαρκή και ακριβή σύνθεση και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Η πρωτεϊνική σύνθεση αποτελεί μια πολύ καθοριστική διαδικασία για το σύνολο των βιολογικών λειτουργιών του οργανισμού και φαίνεται να συσχετίζεται και να επηρεάζεται από τη διαδικασία της γήρανσης. Οι μηχανισμοί ρύθμισης της πρωτεϊνικής σύνθεσης είναι η μεταγραφή και η μετάφραση. Η διαδικασία της γήρανσης σε πολλούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων, συνοδεύεται από αξιοσημείωτες αλλαγές στην σύνθεση τόσο γενικών όσο και ειδικών πρωτεϊνών (Ward, 2000).

Έχει δειχτεί ότι μείωση της ενεργότητας του γονιδίου *ife-2* (με την τεχνική του RNAi), προκαλεί αξιοσημείωτη αύξηση της διάρκειας ζωής του *C. elegans* (Syntichaki et al., 2007). Το γονίδιο *ife-2* κωδικοποιεί για μια ισομορφή του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E στον *C. elegans*. Ο IFE-2 αποτελεί κύριο ρυθμιστή της πρωτεϊνικής σύνθεσης λόγω της λειτουργίας του που αποτελεί η αναγνώριση και πρόσδεση του καλύμματος (cap) του 5' άκρου των περισσοτέρων μορίων mRNA μέσα στο κύτταρο, στρατολογώντας τη 40S ριβοσωμική υπομονάδα να αναζητήσει για το κωδικόνιο έναρξης (Gingras et al., 1999). Έχει βρεθεί ότι το γονιδίωμα του *Caenorhabditis elegans* κωδικοποιεί 5 διαφορετικές ισομορφές του παράγοντα eIF4E (IFE-1 - IFE-5) (Keiper et al., 2000) **(εικόνα 8)**. Οι παράγοντες IFE-1, IFE-3 και IFE-5 εκφράζονται στα γαμετικά κύτταρα του οργανισμού, ενώ οι παράγοντες IFE-2 και IFE-4 εκφράζονται μόνο στα σωματικά κύτταρα. Οι IFE-3 και IFE-4 παράγοντες αναγνωρίζουν και δεσμεύουν μόνο μονομεθυλιωμένα (7-monomethyl guanosine) καλύμματα ενώ οι IFE-1, IFE-2 και IFE-5 μπορούν να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν μονομεθυλιωμένα (7-monomethyl guanosine) αλλά και τριμεθυλιωμένα (2,2,7-trimethyl guanosine) καλύμματα (Jankowska-Anyszka et al., 1998). Στο νηματώδη ωστόσο, η πλειονότητα των mRNAs αποκτούν τριμεθυλιωμένα καλύμματα μέσω της διαδικασίας του trans-splicing (Van Doren and Hirsh, 1990).

<u>Ισομορφή</u>	<u>Κάλυμμα - στόχος</u>	<u>Κατανομή έκφρασης</u>	<u>Φαινότυπος RNAi</u>	<u>Στέλεχος</u>
IFE-1 (F53A2.6)	Μονο-μεθυλιωμένα Τρι-μεθυλιωμένα	Γαμετικά κύτταρα	Επιβιώνουν (Προβλήματα σπερματογένεσης)	
IFE-2 (R04A9.4)	Μονο-μεθυλιωμένα Τρι-μεθυλιωμένα	Σωματικά κύτταρα	Επιβιώνουν	RB579 KX15 <i>ife-2(ok306)</i>
IFE-3 (B0348.6)	Μονο-μεθυλιωμένα	Γαμετικά κύτταρα	Απαραίτητος για επιβίωση (θάνατος εμβρύου)	
IFE-4 (C05D9.5)	Μονο-μεθυλιωμένα	Σωματικά κύτταρα	Επιβιώνουν (Προβλήματα ωοτοκίας)	KX17 <i>ife-4(ok320)</i>
IFE-5 (Y57A10A.30)	Μονο-μεθυλιωμένα Τρι-μεθυλιωμένα	Γαμετικά κύτταρα	Επιβιώνουν	

Εικόνα 8. Οι διάφορες ισομορφές του eIF4E στον *C. elegans* και βασικές πληροφορίες γύρω από την κάθε μία.

Μείωση της ενεργότητας των υπολοίπων ισομορφών δεν προκαλεί αύξηση της διάρκειας ζωής (Syntichaki et al., 2007). Η ελαχιστοποίηση της πρωτεϊνικής σύνθεσης στα σωματικά κύτταρα ευθύνεται για την εμφάνιση της μακροζωίας. Η προηγούμενη υπόθεση υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι σε μεταλλάγματα που στερούνται γαμετικά κύτταρα, η απενεργοποίηση του *ife-2* εξακολουθεί να προκαλεί αύξηση της διάρκειας ζωής (Syntichaki et al., 2007). Το μονοπάτι επιμήκυνσης της διάρκειας της ζωής μέσω μείωσης της ενεργότητας του IFE-2 είναι ανεξάρτητο από το insulin/IGF-1 μονοπάτι, αφού μεταλλάξεις σε γονίδια του insulin/IGF-1 μονοπατιού (*age-1* και *daf-2*) δρουν συνεργατικά με τις μεταλλαγές στο γονίδιο *ife-2*. Επιπλέον, ο μεταγραφικός παράγοντας DAF-16 δεν είναι απαραίτητος για την επέκταση διάρκειας ζωής που προκαλεί η απενεργοποίηση του *ife-2* γονιδίου. Επιπρόσθετα, το

μονοπάτι που συμμετέχει ο IFE-2, είναι ανεξάρτητο από το μονοπάτι της TOR κινάσης, το μιτοχονδριακό μονοπάτι (clk μεταλλαγές) καθώς και από τον διαιτητικό περιορισμό.

3. Αποτελέσματα 1^{ου} τμήματος ερευνητικής μελέτης

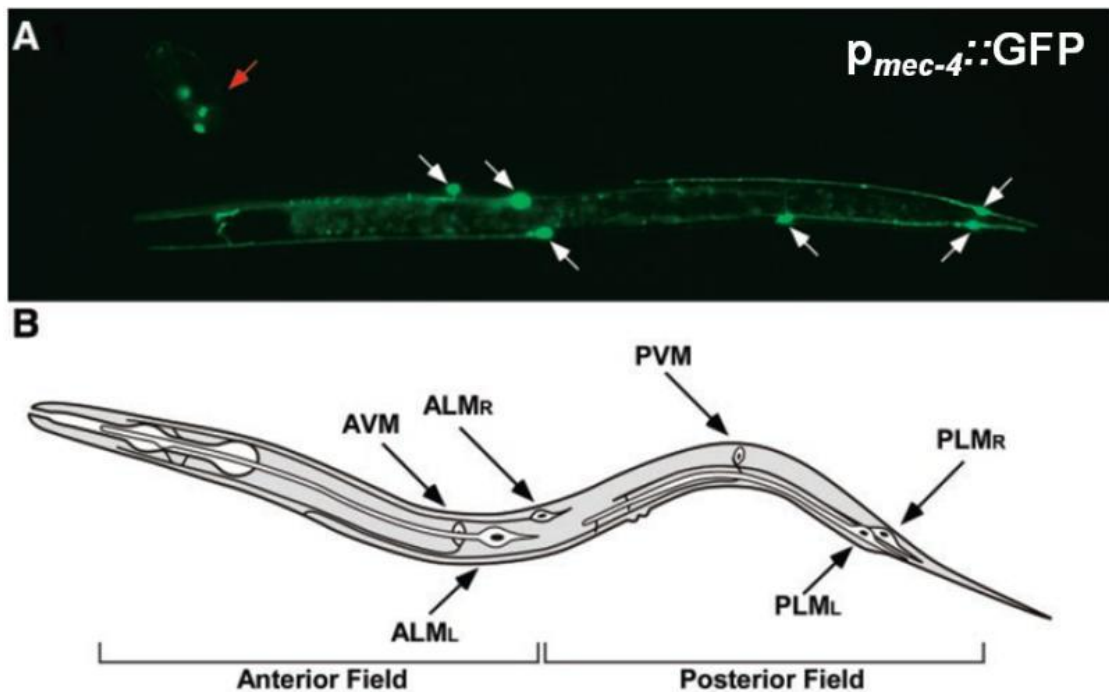
3.1. Ανάλυση των επιδράσεων μεταλλαγών που αυξάνουν τη διάρκεια ζωής, στη νέκρωση στον *C. elegans*

Όπως προαναφέρθηκε, η πρώτη προσέγγιση αφορούσε τη διερεύνηση του ρόλου μεταλλαγών που είναι γνωστό ότι οδηγούν σε αύξηση της διάρκειας ζωής του *C. elegans*, στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν μεταλλαγές που οδηγούν σε αύξηση της διάρκειας ζωής στον *C. elegans* μέσω των 3 κύριων μονοπατιών που περιγράφηκαν παραπάνω (insulin/IGF σηματοδοτικό μονοπάτι, διαιτητικός περιορισμός και πρωτεϊνική σύνθεση). Οι μεταλλαγές που επιλέχθηκαν προκαλούσαν τη μεγαλύτερη αύξηση της διάρκειας ζωής μεταξύ των μεταλλαγών που εξετάστηκαν στις αρχικές πειραματικές μελέτες. Οι επιδράσεις τους αναλύθηκαν στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο που επάγεται από υπερενεργά κανάλια ιόντων (degenerins). Η αρχική μας υπόθεση ήταν ότι μεταλλαγές που επεκτείνουν τη διάρκεια ζωής στον *C. elegans* θα μπορούσαν να προστατεύσουν από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο που αποτελεί τον τύπο θανάτου που υπόκειται νευροεκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με τη διαδικασία της γήρανσης.

Όσον αφορά το insulin/IGF σηματοδοτικό μονοπάτι, επιλέχθηκαν δύο διαφορετικά αλληλόμορφα του *daf-2* γονιδίου: το *e1370* και το *e1368* (Kenyon et al., 1993; Tissenbaum and Ruvkun, 1998). Το *e1370* αλληλόμορφο αφορά μια missense μεταλλαγή (P1465S) στο

domain της κινάσης, ενώ το αλληλόμορφο *e1368* αφορά μια missense μεταλλαγή (S573L) στο domain πρόσδεσης του ligand-μορίου. Και οι δύο μεταλλαγές επεκτείνουν σημαντικά τη διάρκεια ζωής του νηματώδους.

Όσον αφορά μεταλλαγές που έχουν σχέση με το διαιτητικό περιορισμό, επιλέχθηκε το αλληλόμορφο *ad465* του γονιδίου *eat-2* (Lakowski and Hekimi, 1998; Walker et al., 2005). Το γονίδιο *eat-2* κωδικοποιεί μια υπομονάδα ενός ligand-gated καναλιού ιόντων που είναι πολύ στενά σχετιζόμενο με τις μη-άλφα υπομονάδες των νικοτινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνης. Το συγκεκριμένο αλληλόμορφο αφορά μια μηδενική μεταλλαγή που οδηγεί σε μερική πείνα τον οργανισμό μέσω παρεμβολής με την λειτουργία του φάρυγγα (αποτελεί το κύριο όργανο



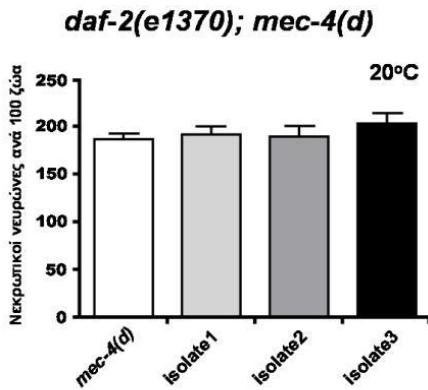
Εικόνα 9. A. Το πρότυπο έκφρασης της πλασμιδιακής κατασκευής $p_{mec-4}::GFP$. Διακρίνονται τα κυτταρικά σώματα (με βέλη) των 6 αισθητήριων νευρώνων αφής (touch receptor neurons) ((ALML/R, AVM, PLML/R, και PVM) που η τοπολογία τους στο σώμα του οργανισμού παρουσιάζεται στο B.

θρέψης). Η μεταλλαγή αυτή μεταξύ ενός screen που οδήγησε στην αποκάλυψη παρόμοιων

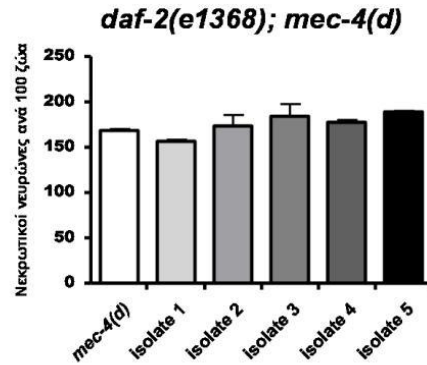
μεταλλαγών, είναι από τις δύο αποτελεσματικότερες όσον αφορά την επέκταση της διάρκειας ζωής.

Σχετικά με το μονοπάτι της πρωτεϊνικής σύνθεσης, το αλληλόμορφο που χρησιμοποιήθηκε είναι το *ok306* του γονιδίου *ife-2* που κωδικοποιεί την υπομονάδα πρόσδεσης του καλύμματος (του 5' mRNA) του εναρκτήριου παράγοντα της μετάφρασης eIF4E (Syntichaki et al., 2007). Η συγκεκριμένη μεταλλαγή είναι μια knock-out μεταλλαγή της ισομορφής του eIF4E στον *C. elegans* οδηγεί στην ελαχιστοποίηση της ενεργότητας του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης στα σωματικά κύτταρα του οργανισμού. Η μείωση της πρωτεϊνικής σύνθεσης στα σωματικά κύτταρα οδηγεί σε σημαντική επέκταση της διάρκειας ζωής του *C. elegans*.

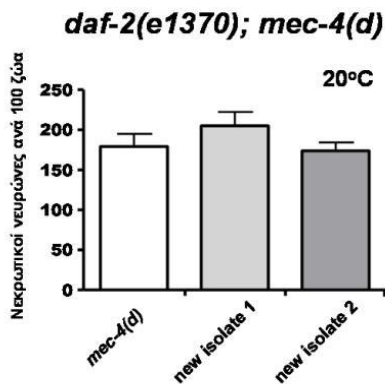
Στελέχη του *C. elegans* που έφεραν τις παραπάνω μεταλλαγές διασταυρώθηκαν με το στέλεχος που φέρει το αλληλόμορφο *u231* (ή *dominant* λόγω του επικρατούς χαρακτήρα της μεταλλαγής) στο γονίδιο *mec-4* που κωδικοποιεί για το MEC-4 κανάλι ιόντων (και οδηγεί σε νεκρωτικό θάνατο των 6 αισθητήριων νευρώνων αφής του *C. elegans*) (**εικόνα 9**). Έπειτα, προσδιορίστηκαν τα ποσοστά νέκρωσης των διπλών μεταλλαγμάτων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα απλά μεταλλαγμένα στελέχη που φέρουν το αλληλόμορφο *mec-4(d)*, προκειμένου να προσδιοριστούν οι πιθανές επιδράσεις των μεταλλαγών στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Τα αποτελέσματα φαίνονται στις παρακάτω εικόνες.



Στέλεχος	Νεκρωτικοί νευρώνες ανά 100 ζώα (Mean ± SEM)
<i>mec-4(d)</i>	186.5 ± 5.815
<i>daf-2(e1370); mec-4(d) isolate 1</i>	191.4 ± 8.600
<i>daf-2(e1370); mec-4(d) isolate 2</i>	189.2 ± 11.15
<i>daf-2(e1370); mec-4(d) isolate 3</i>	202.8 ± 11.00

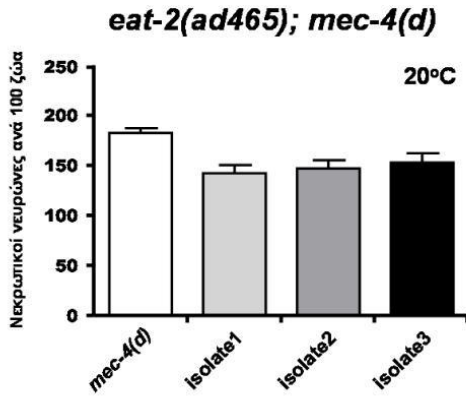


Στέλεχος	Νεκρωτικοί νευρώνες ανά 100 ζώα (Mean ± SEM)
<i>mec-4(d)</i>	168.3 ± 1.665
<i>daf-2(e1368); mec-4(d) isolate 1</i>	156.6 ± 1.795
<i>daf-2(e1368); mec-4(d) isolate 2</i>	173.4 ± 12.08
<i>daf-2(e1368); mec-4(d) isolate 3</i>	184.2 ± 13.41
<i>daf-2(e1368); mec-4(d) isolate 4</i>	177.5 ± 2.500
<i>daf-2(e1368); mec-4(d) isolate 5</i>	189.1 ± 0.940



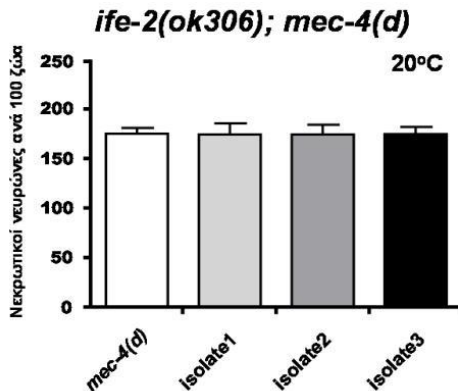
Στέλεχος	Νεκρωτικοί νευρώνες ανά 100 ζώα (Mean ± SEM)
<i>mec-4(d)</i>	179.3 ± 15.65
<i>daf-2(e1370); mec-4(d) new isolate 1</i>	205.1 ± 17.30
<i>daf-2(e1370); mec-4(d) new isolate 2</i>	173.8 ± 10.42

Εικόνα 10. Μεταλλαγές στον ορθόλογο υποδοχέα (DAF-2) της ινσουλίνης/IGF-1 (που αυξάνουν τη ζωή στον *C. elegans*) δεν επηρεάζουν το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Αριθμός νεκρωτικών νευρώνων στο προνυμφικό στάδιο L1, ανά 100 ζώα, που φέρουν την τοξική μεταλλαγή *mec-4(d)* σε συνδυασμό με μεταλλαγή στο γονίδιο *daf-2* (*e1370* και *e1368* αλληλόμορφα). Με τον όρο isolate αναφέρονται διπλά μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί ανεξάρτητα μεταξύ τους από τη διαδικασία της διασταύρωσης. Οι γραμμές σφάλματος συμβολίζουν τον SEM ενώ για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 1way ANOVA ($P < 0.05$).



Στέλεχος	Νεκρωτικοί νευρώνες ανά 100 ζώα (Mean ± SEM)
<i>mec-4(d)</i>	182.7 ± 4.492
<i>eat-2(ad465); mec-4(d) isolate 1</i>	142.2 ± 8.238
<i>eat-2(ad465); mec-4(d) isolate 2</i>	146.9 ± 8.442
<i>eat-2(ad465); mec-4(d) isolate 3</i>	152.9 ± 9.288

Εικόνα 11. Μεταλλαγές σε γονίδια που οδηγούν στο φαινότυπο Eat και που αυξάνουν τη ζωή στον *C. elegans* καταστέλλουν οριακά το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Αριθμός νεκρωτικών νευρώνων στο προνομφικό στάδιο L1, ανά 100 ζώα, που φέρουν την τοξική μεταλλαγή *mec-4(d)* σε συνδυασμό με μεταλλαγή στο γονίδιο *eat-2* (*ad465* αλληλόμορφο). Με τον όρο isolate αναφέρονται διπλά μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί ανεξάρτητα μεταξύ τους από την διαδικασία της διασταύρωσης. Οι γραμμές σφάλματος συμβολίζουν τον SEM ενώ για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 1way ANOVA ($P < 0.05$).



Στέλεχος	Νεκρωτικοί νευρώνες ανά 100 ζώα (Mean ± SEM)
<i>mec-4(d)</i>	175.2 ± 5.840
<i>ife-2(ok306); mec-4(d) isolate 1</i>	174.2 ± 11.40
<i>ife-2(ok306); mec-4(d) isolate 2</i>	174.2 ± 9.919
<i>ife-2(ok306); mec-4(d) isolate 3</i>	174.7 ± 7.277

Εικόνα 12. Μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E (IFE-2) και αυξάνουν τη ζωή στον *C. elegans* δεν επηρεάζουν το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Αριθμός νεκρωτικών νευρώνων στο προνομφικό στάδιο L1, ανά 100 ζώα, που φέρουν την τοξική μεταλλαγή *mec-4(d)* σε συνδυασμό με μεταλλαγή στο γονίδιο *ife-2* (*ok306* αλληλόμορφο). Με τον όρο isolate αναφέρονται διπλά μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί ανεξάρτητα μεταξύ τους από την διαδικασία της διασταύρωσης. Οι γραμμές σφάλματος συμβολίζουν τον SEM ενώ για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 1way ANOVA ($P < 0.05$).

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα, οι μεταλλαγές (και τα 2 αλληλόμορφα) στον DAF-2 υποδοχέα που επεκτείνουν τη διάρκεια ζωής δεν προστατεύουν από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο σε γενετικό υπόβαθρο *mec-4(d)* (**εικόνα 10**). Εκτός από το συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο, κατασκευάστηκε διπλό μετάλλαγμα που έφερε το αλληλόμορφο *e1370* του γονιδίου *daf-2* σε γενετικό υπόβαθρο *deg-3(u662)* (ή dominant λόγω του επικρατούς χαρακτήρα της μεταλλαγής), όμως και σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρήθηκε καμιά αξιοσημείωτη προστατευτική επίδραση στη νέκρωση [*deg-3(d)*: 182.47 ± 12, *daf-2(e1370); deg-3(d)*: 200 ± 10].

Επίσης, η έλλειψη της ισομορφής (IFE-2) του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης που είναι γνωστό ότι επεκτείνει τη διάρκεια ζωής του *C. elegans* δεν προστατεύει από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο σε γενετικό υπόβαθρο *mec-4(d)* (**εικόνα 11**).

Όσον αφορά τον διαιτητικό περιορισμό και τις μεταλλαγές *eat* που προκαλούν περιορισμένη πρόσληψη τροφής λόγω παρεμπόδισης σωστής λειτουργίας του φάρυγγα, αυτές φαίνεται να προστατεύουν οριακά από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο σε γενετικό υπόβαθρο *mec-4(d)*, όπως φάνηκε από διπλά μεταλλάγματα που φέρουν το αλληλόμορφο *ad465* στο γονίδιο *eat-2* (**εικόνα 12**). Ο προστατευτικός ρόλος των μεταλλαγών *Eat* στη νέκρωση μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η παρεμπόδιση της λειτουργίας του φάρυγγα μπορεί να οδηγήσει σε μερική κατάσταση πείνας τα ζώα. Οι συνθήκες πείνας έχει δείχτει ότι προστατεύουν από τη νέκρωση (σε απόγονους πεινασμένων ζώων) καθώς κάτω από αυτές τις συνθήκες η ενεργότητα των καθεψινών έχει δείχτει ότι ελαττώνεται κατά 5-10% σε σχέση με την αντίστοιχη των καλά τρεφόμενων νηματωδών (Hawdon et al., 1989; Syntichaki et al., 2002).

3.2 Ανάλυση των επιδράσεων μεταλλαγών που ελέγχουν το μηχανισμό της νέκρωσης, στη γήρανση στον *C. elegans*

Η δεύτερη προσέγγιση αφορούσε τη διερεύνηση του ρόλου της απενεργοποίησης γονιδίων καθώς και μεταλλαγών που είναι γνωστό ότι προστατεύουν από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, στη γήρανση στον *C. elegans*. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν γονίδια που σχετίζονται με τη λυσοσωμική βιογένεση και λειτουργία και έχει δειχθεί ότι μεταλλαγές σε αυτά ή απενεργοποίησή τους με την τεχνική του RNAi μπορεί να προστατεύσει από τη νέκρωση (ή στην περίπτωση του γονιδίου *cup-5* να αυξήσει τα ποσοστά νεκρωτικού θανάτου).

Το σύστημα των λυσοσωμάτων περιλαμβάνει ένα σύνολο όξινων ενδοκυτταρικών οργανιδίων (ώριμα ενδοσώματα, λυσοσώματα και κυστίδια που προέρχονται από το σύστημα Golgi). Οι ενδο-οργανιδιακές συνθήκες είναι όξινες και επιτυγχάνονται μέσω ρύθμισης της πυκνότητας και της ενεργότητας των V-ATPασών, που υπάρχουν στις μεμβράνες τους (Stevens and Forgac, 1997). Το 1949 ο Christian De Duve ανακάλυψε κάποια κυτταρικά σώματα στα οποία πραγματοποιείται πέψη και τα αποκάλεσε λυσοσώματα, επειδή περιείχαν μείγματα λυτικών ενζύμων.

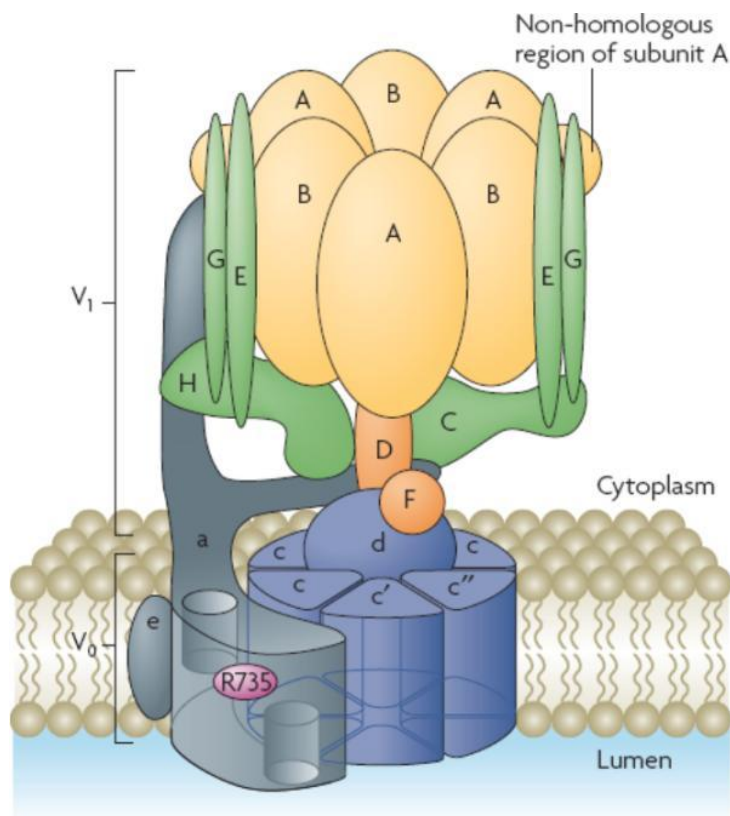
Η αποικοδομητική τους δράση είναι ευρεία αφού περιλαμβάνουν όξινες φωσφατάσες, πρωτεάσες, πεπτιδάσες, λιπάσες, νουκλεάσες, γλυκοσιδάσες και σουλφατάσες (Kroemer and Jaattela, 2005). Στα περισσότερα θηλαστικά, η πλειονότητα αυτών των υδρολυτικών ενζύμων μεταφέρεται στα λυσοσώματα μέσω του άμεσου μονοπατιού της φωσφορικής μαννόζης, ενώ οι περισσότερες λυσοσωμικές μεμβρανικές πρωτεΐνες χρησιμοποιούν και το άμεσο αλλά και το έμμεσο μονοπάτι (μέσω της πλασματικής μεμβράνης) για να μεταφερθούν στα λυσοσώματα. Από το σύνολο των υδρολυτικών ενζύμων, τα πιο καλά μελετημένα είναι οι καθεψίνες (πρωτεάσες ασπαρτικού) που εμφανίζουν μέγιστα επίπεδα ενεργότητας σε όξινο

pH (~4 – 5) ενώ μπορούν να δράσουν και σε μεγαλύτερο pH (και εκτός λυσοσωμάτων) αλλά με μικρότερη ενεργότητα και διαφορετική ειδικότητα.

Στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{2+} οδηγεί στην ενεργοποίηση των κυτταροπλασματικών Ca^{2+} -εξαρτώμενων πρωτεασών που ονομάζονται καλπαΐνες. Οι καλπαΐνες στοχεύουν την λυσοσωμική μεμβράνη και τη διαρρηγνύουν (Yamashima, 2004) γεγονός που οδηγεί στην απελευθέρωση των υδρολυτικών ενζύμων των λυσοσωμάτων, και πιο συγκεκριμένα στην απελευθέρωση των καθεψινών. Οι

καθεψίνες D και E έχει δείχτει ότι επιτελούν την καταστροφή κυτταρικών συστατικών και οργανιδίων συμμετέχοντας στο μηχανισμό εκτέλεσης του νεκρωτικού θανάτου (Syntichaki et al., 2002).

Κατά την διάρκεια του νεκρωτικού θανάτου η V-ATPase συμβάλλει στην οξίνιση του κυτταροπλάσματος που διευκολύνει την δράση των λυσοσωμικών ενζύμων που έχουν απελευθερωθεί μετά τη λυσοσωμική λύση (Syntichaki et al., 2005; Artal-Sanz et al., 2006). Η V-



Εικόνα 13. Η δομή της V-ATPάσης (Forgacs, 2007).

ATPase αποτελεί μια αντλία η οποία μεταφέρει πρωτόνια αντίθετα από την κλίση της συγκέντρωσής τους, καταναλώνοντας ενέργεια (υπό τη μορφή ATP). Στα λυσοσώματα, εντοπίζεται στην μεμβράνη τους, και συμβάλλει στη διατήρηση όξινων συνθηκών σε αυτά,

που είναι απαραίτητες για τη λειτουργία των ενζύμων που περιέχουν. Η κύρια δομή της αντλίας περιλαμβάνει μια κυτταροπλασματική περιοχή (V1) στην οποία επιτελείται η υδρόλυση του ATP, και μια διαμεμβρανική περιοχή (V0) μέσω της οποίας επιτελείται η μεταφορά των πρωτονίων (Forgacs, 2007) **(εικόνα 13)**. Στον *C. elegans* έχουν ανιχνευθεί 17 γονίδια, που κωδικοποιούν υπομονάδες της V-ATPase (Oka et al., 1997; Oka et al., 1998; Oka et al., 2001; Rujol et al., 2001). Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του οργανισμού, και μεταλλάξεις που οδηγούν σε δυσλειτουργία των υπομονάδων που κωδικοποιούν, μπορούν να οδηγήσουν σε θνησιμότητα σε εμβρυϊκό ή προνυμφικό στάδιο.

Χορήγηση των αντιβιοτικών bafilomycin A1 ή filomicin, που αναστέλλουν ειδικά τη λειτουργία της V-ATPάσης (Bowman et al., 1988; Oka and Futai, 2000), προστατεύει από τη νέκρωση σε γενετικό υπόβαθρο *mec-4(d)* (Syntichaki et al., 2005). Μεταλλάξεις στα γονίδια *spe-5* και *vha-12*, τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές της υπομονάδας B, ή στο *unc-32*, που κωδικοποιεί την υπομονάδα a της V-ATPάσης, προστατεύουν από τη νέκρωση σε γενετικό υπόβαθρο *mec-4(d)*. Καταστολή των επιπέδων της νέκρωσης παρατηρήθηκε επίσης και κατά την απενεργοποίηση της ενεργότητας των γονιδίων *vha-2*, *vha-10* και *vha-12* με την τεχνική του RNAi. Το γονίδιο *vha-2* κωδικοποιεί μία ισομορφή της υπομονάδας c, ενώ το γονίδιο *vha-10* κωδικοποιεί την υπομονάδα G της V-ATPάσης. Τα επίπεδα καταστολής δεν ήταν ολοκληρωτικά αλλά μερικά λόγω πιθανότατα της ατελούς απενεργοποίησης των γονιδίων (η πλήρης απενεργοποίηση οδηγεί σε θνησιμότητα ή στειρότητα λόγω της απαραίτητης για την ανάπτυξη ενεργότητας των γονιδίων). Μεταλλάξεις στα γονίδια *unc-32* και *vha-12* προστάτευσαν από τη νέκρωση σε στελέχη *deg-3(d)* και *as(gf)* καθώς και από υποξικό θάνατο (επαγωγή με τη χρήση NaN_3). Η δημιουργία όξινων συνθηκών στο κυτταρόπλασμα μέσω της δραστηριότητας των V-ATPασών συμβάλλει πιθανά στη

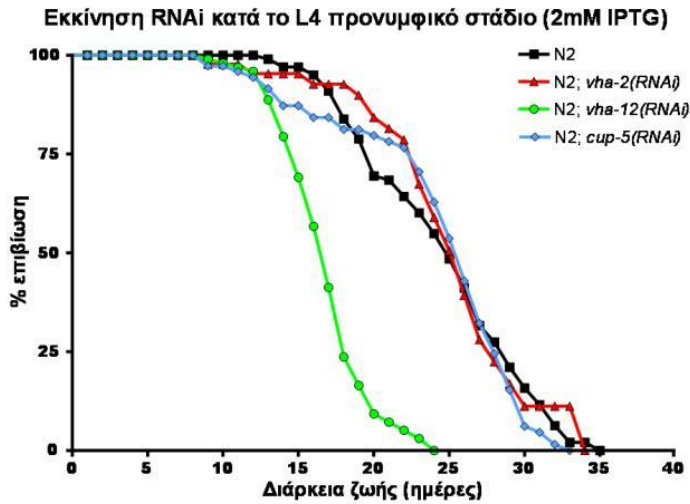
δημιουργία συνθηκών πιο ιδανικών για την αποικοδομητική δράση υδρολυτικών ενζύμων που απελευθερώνονται από τα λυσοσώματα κατά τη νέκρωση.

Όσον αφορά το ρόλο των λυσοσωμάτων στη νέκρωση, διερευνήθηκαν οι επιδράσεις μεταλλαγών σε γονίδια, τα οποία συμμετέχουν στη βιογένεσή τους. Το γονίδιο *cup-5* στον *C. elegans* είναι ομόλογο με το γονίδιο του ανθρώπου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Mucolipin-1 (Fares and Greenwald, 2001). Η πρωτεΐνη Mucolipin-1 κωδικοποιεί ένα μη-ειδικό κανάλι κατιόντων και έχει συσχετισθεί με την ασθένεια Mucolipidosis τύπου IV. Η ενεργότητα του γονιδίου *cup-5* απαιτείται για την ομαλή βιογένεση των λυσοσωμάτων στον *C. elegans* (Schaheen et al., 2006). Στελέχη με το υπομορφικό αλληλόμορφο *ar465* του γονιδίου *cup-5* παρουσιάζουν αύξηση στον αριθμό και το μέγεθος των λυσοσωμάτων (Fares and Greenwald, 2001). Στελέχη που έφεραν το υπομορφικό αλληλόμορφο του γονιδίου *cup-5* σε γενετικό υπόβαθρο *mec-4(d)* (καθώς και *deg-3(d)*) παρουσίαζαν αυξημένα ποσοστά νέκρωσης (Artal-Sanz et al., 2006). Επίσης, ήταν πιο ευαίσθητα σε υποξικό θάνατο (επαγωγή με τη χρήση NaN_3). Μείωση της ενεργότητας του γονιδίου *cup-5* με RNAi έδωσε αποτελέσματα αντίστοιχα με αυτά των μεταλλαγών σε γενετικό υπόβαθρο *mec-4(d)*. Μείωση της δράσης της V-ATPase (μέσω μείωσης της ενεργότητας του *vha-2* γονιδίου με RNAi) προστάτευσε από τη νέκρωση τα διπλά μεταλλάγματα *cup-5(ar465); mec-4(d)*. Εκτός από το γονίδιο *cup-5*, διερευνήθηκαν τα ποσοστά της νέκρωσης σε στελέχη που έφεραν μεταλλαγές στο γονίδιο *glo-1* (Artal-Sanz et al., 2006). Το γονίδιο *glo-1* κωδικοποιεί μία Rab GTPάση, η λειτουργία της οποίας είναι απαραίτητη για τη βιογένεση οργανιδίων σχετικών με λυσοσώματα στο έντερο (Hermann et al., 2005). Μεταλλαγές που οδηγούν σε απώλεια ενεργότητας του γονιδίου *glo-1* (αλληλόμορφα *zu391*, *kx92* και *zu437*) προστατεύουν από τη νέκρωση σε γενετικό υπόβαθρο *mec-4(d)*.

Γονίδιο	Λειτουργία γονιδιακού προϊόντος	Φαινότυπος δυσλειτουργίας (μεταλλαγή ή RNAi)	Πρότυπο έκφρασης
<i>vha-2</i>	c υπομονάδα (V0 domain) της V-ATPάσης	Εμβρυϊκός θάνατος	Εκκριτικό κύτταρο, ορθό, δύο μετα-πρωκτικά κύτταρα
<i>vha-10</i>	G υπομονάδα (V1 domain) της V-ATPάσης	Εμβρυϊκός θάνατος	Εκκριτικό κύτταρο, μυϊκά κύτταρα, νευρικά κύτταρα, έντερο
<i>vha-12</i>	B υπομονάδα (V1 domain) της V-ATPάσης	Εμβρυϊκός θάνατος, μη συντονισμένη κίνηση (αλληλόμορφο <i>n29 f5</i>)	Έκφραση (προνυμφικό στάδιο): φάρυγγας, έντερο, εκκριτικό κύτταρο Έκφραση (ενήλικο στάδιο): φάρυγγας, εκκριτικό κύτταρο
<i>unc-32</i>	a υπομονάδα (V1 domain) της V-ATPάσης	Εμβρυϊκός θάνατος, ανώμαλη κίνηση (αλληλόμορφο <i>e189</i>)	Έντερο, γονάδα, νευρικά κύτταρα
<i>cup-5</i>	Ορθόλογο της ανθρώπινης Muscolipin-1,	Μεγάλα κυστίδια στα coelomocytes, θετική ρύθμιση ενδοκυτταρικής πρόσληψης ουσιών από το ψευδοκυλιωματικό υγρό (RNAi, αλληλόμορφο <i>ar465</i>)	Coelomocytes, κυτταροπλασματικά κυστίδια και δομές κοντινές στην πλασματική μεμβράνη στους νευρώνες, Έκφραση (προνυμφικό στάδιο): νευρικά κύτταρα, φάρυγγας, έντερο, μυϊκά κύτταρα, υποδερμίδα, μη-ταυτοποιημένα κύτταρα κεφαλής Έκφραση (ενήλικο στάδιο): νευρικά κύτταρα, φάρυγγας, μυϊκά κύτταρα, αναπαραγωγικό σύστημα, μη-ταυτοποιημένα κύτταρα κεφαλής
<i>asp-3</i>	Καθεψίνη	-	Έντερο, μυϊκά κύτταρα, υποδερμίδα, νευρικά κύτταρα, μήτρα
<i>asp-4</i>	Καθεψίνη	-	Έντερο, μυϊκά κύτταρα, υποδερμίδα, νευρικά κύτταρα, μήτρα
<i>clp-1</i>	Καλπαΐνη	-	Έκφραση (προνυμφικό στάδιο): φάρυγγας, νευρικά κύτταρα Έκφραση (ενήλικο στάδιο): φάρυγγας, μυϊκά κύτταρα, νευρικά κύτταρα

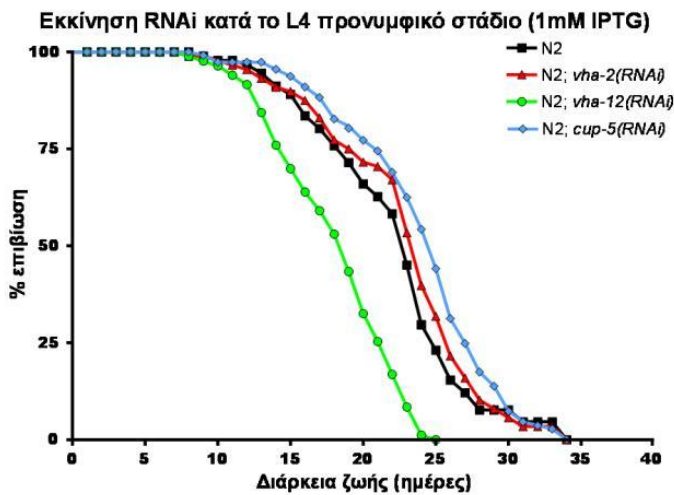
Πίνακας 1. Το σύνολο των γονιδίων που σχετίζονται με τη λυσοσωμική βιογένεση και λειτουργία (εμπλέκονται στους μηχανισμούς του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου σε νευρικά κύτταρα) και εξετάστηκαν για το ρόλο τους στη γήρανση στον *C. elegans*.

Το σύνολο των γονιδίων που σχετίζονται με τη λυσοσωμική βιογένεση και λειτουργία (και παίζουν ρόλο στους μηχανισμούς της νέκρωσης στον *C. elegans*) και εξετάστηκαν για το ρόλο τους στη γήρανση του *C. elegans* απεικονίζονται στον **πίνακα 1**. Πραγματοποιήθηκε μια σειρά από πειράματα γήρανσης σε διάφορες συνθήκες που αναγράφονται πάνω από το κάθε γράφημα.



	N2	N2; <i>vha-2</i> (RNAi)	N2; <i>vha-12</i> (RNAi)	N2; <i>cup-5</i> (RNAi)
Στατιστικά μέση επιβίωση (Ημέρες)	25	26	17	26
Μέγιστη επιβίωση (Ημέρες)	35	34	24	33

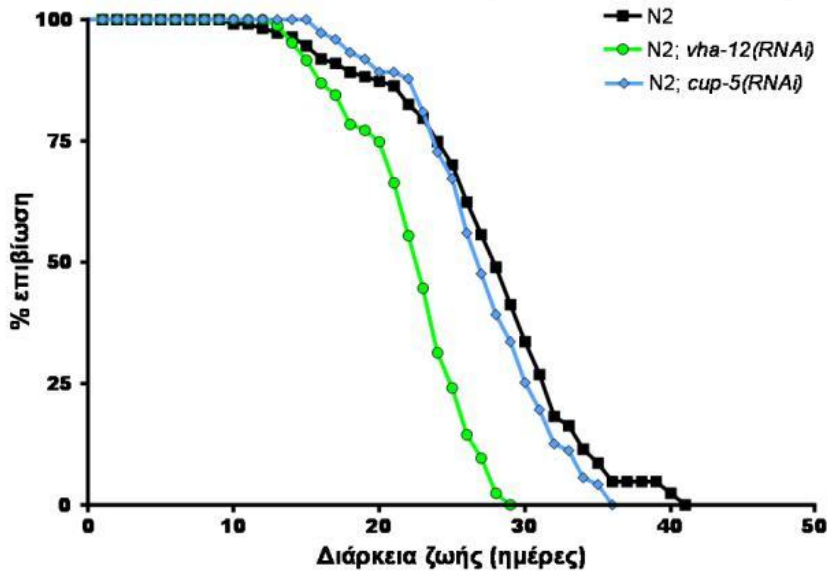
EXP1. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *vha-12* με RNAi μειώνει τη διάρκεια ζωής του N2 στελέχους. Η απενεργοποίηση των γονιδίων *vha-2* και *cup-5* με RNAi δεν επηρεάζει τη διάρκεια ζωής του N2 στελέχους. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 20°C.



	N2	N2; <i>vha-2</i> (RNAi)	N2; <i>vha-12</i> (RNAi)	N2; <i>cup-5</i> (RNAi)
Στατιστικά μέση επιβίωση (Ημέρες)	23	24	19	25
Μέγιστη επιβίωση (Ημέρες)	34	34	25	34

EXP2. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *vha-12* με RNAi μειώνει τη διάρκεια ζωής του N2 στελέχους. Η απενεργοποίηση των γονιδίων *vha-2* και *cup-5* με RNAi δεν επηρεάζει τη διάρκεια ζωής του N2 στελέχους. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 20°C.

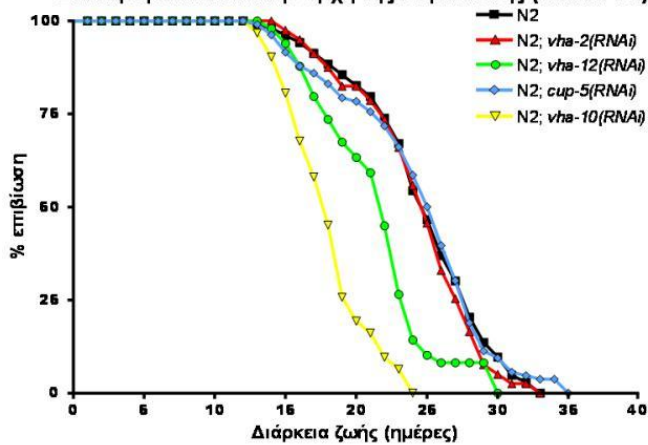
Εκκίνηση RNAi κατά το L4 προνυμφικό στάδιο (1mM IPTG)



	N2	N2; <i>vha-12</i>(RNAi)	N2; <i>cup-5</i>(RNAi)
Στατιστικά μέση επιβίωση (Ημέρες)	28	23	27
Μέγιστη επιβίωση (Ημέρες)	41	29	36

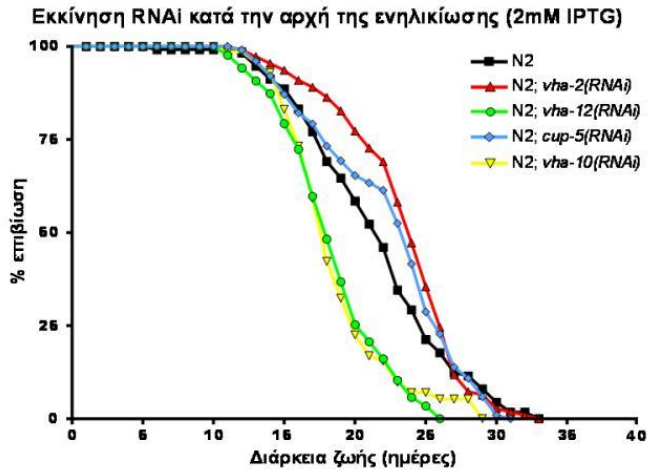
EXP3. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *vha-12* με RNAi μειώνει τη διάρκεια ζωής του N2 στελέχους. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *cup-5* με RNAi δεν επηρεάζει τη διάρκεια ζωής του N2 στελέχους. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 20°C.

Εκκίνηση RNAi κατά την αρχή της ενηλικίωσης (2mM IPTG)



	N2	N2; <i>vha-2</i>(RNAi)	N2; <i>vha-10</i>(RNAi)	N2; <i>vha-12</i>(RNAi)	N2; <i>cup-5</i>(RNAi)
Στατιστικά μέση επιβίωση (Ημέρες)	25	25	18	22	26
Μέγιστη επιβίωση (Ημέρες)	33	33	24	30	35

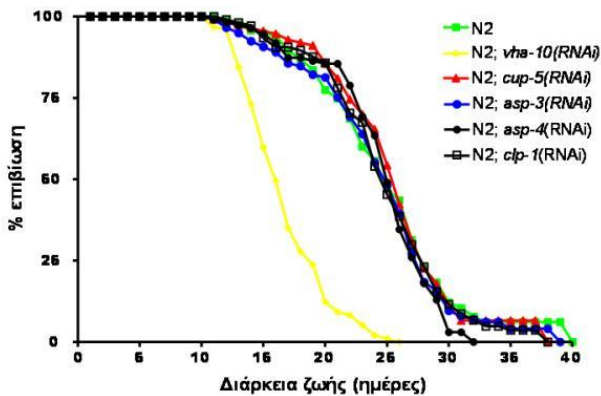
EXP4. Η απενεργοποίηση των γονιδίων *vha-10* και *vha-12* με RNAi μειώνει τη διάρκεια ζωής του N2 στελέχους. Η απενεργοποίηση των γονιδίων *vha-2* και *cup-5* με RNAi δεν επηρεάζει τη διάρκεια ζωής του N2 στελέχους. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 20°C.



	N2	N2; <i>vha-2</i> (RNAi)	N2; <i>vha-10</i> (RNAi)	N2; <i>vha-12</i> (RNAi)	N2; <i>cup-5</i> (RNAi)
Στατιστικά μέση επιβίωση (Ημέρες)	22	24	18	18	24
Μέγιστη επιβίωση (Ημέρες)	33	33	29	36	31

EXP5. Η απενεργοποίηση των γονιδίων *vha-10* και *vha-12* με RNAi μειώνει τη διάρκεια ζωής του N2 στελέχους. Η απενεργοποίηση των γονιδίων *vha-2* και *cup-5* με RNAi δεν επηρεάζει τη διάρκεια ζωής του N2 στελέχους. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 20°C.

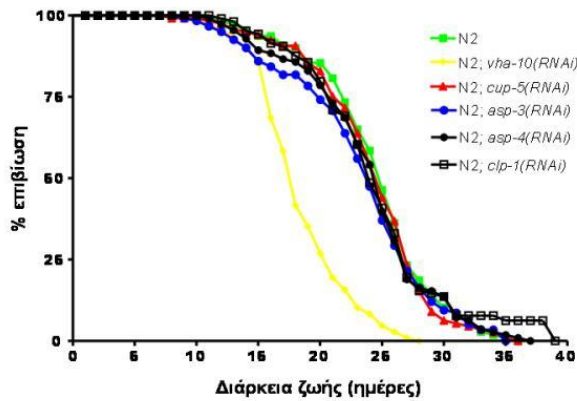
Εκκίνηση RNAi κατά την αρχή της ενηλικίωσης (2mM IPTG)



	N2	N2; <i>vha-10</i> (RNAi)	N2; <i>cup-5</i> (RNAi)	N2; <i>asp-3</i> (RNAi)	N2; <i>asp-4</i> (RNAi)	N2; <i>clp-1</i> (RNAi)
Στατιστικά μέση επιβίωση (Ημέρες)	25	16	26	25	25	25
Μέγιστη επιβίωση (Ημέρες)	40	26	38	39	32	38

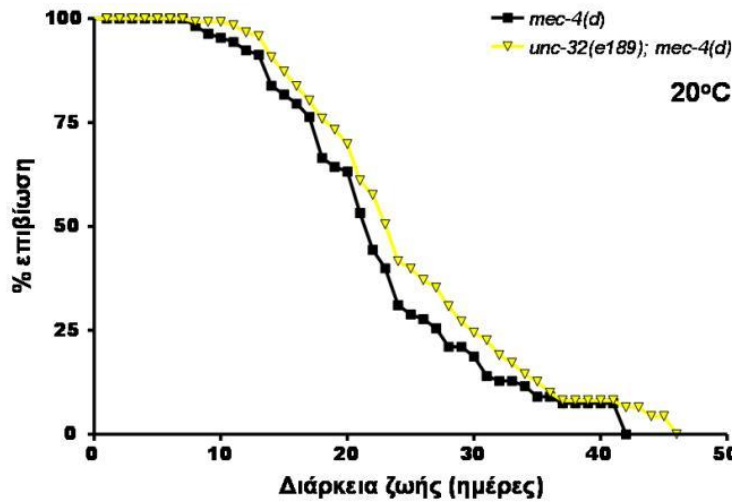
EXP6. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *vha-10* μειώνει τη διάρκεια ζωής του N2 στελέχους. Η απενεργοποίηση των γονιδίων *cup-5*, *asp-3*, *asp-4* και *clp-1* με RNAi δεν επηρεάζει τη διάρκεια ζωής του N2 στελέχους. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 20°C.

Εκκίνηση RNAi κατά την αρχή της ενηλικίωσης (1mM IPTG)



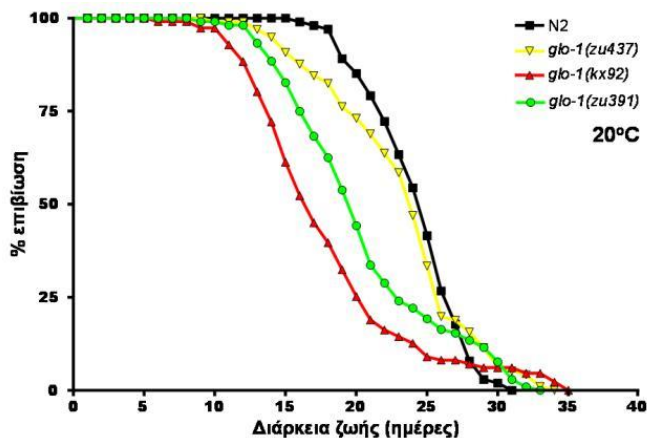
	N2	N2; <i>vha-10</i> (RNAi)	N2; <i>cup-5</i> (RNAi)	N2; <i>asp-3</i> (RNAi)	N2; <i>asp-4</i> (RNAi)	N2; <i>clp-1</i> (RNAi)
Στατιστικά μέση επιβίωση (Ημέρες)	25	18	25	24	25	24
Μέγιστη επιβίωση (Ημέρες)	36	28	36	35	37	39

EXP7. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *vha-10* μειώνει τη διάρκεια ζωής του N2 στελέχους. Η απενεργοποίηση των γονιδίων *cup-5*, *asp-3*, *asp-4* και *clp-1* με RNAi δεν επηρεάζει τη διάρκεια ζωής του N2 στελέχους. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 20°C.



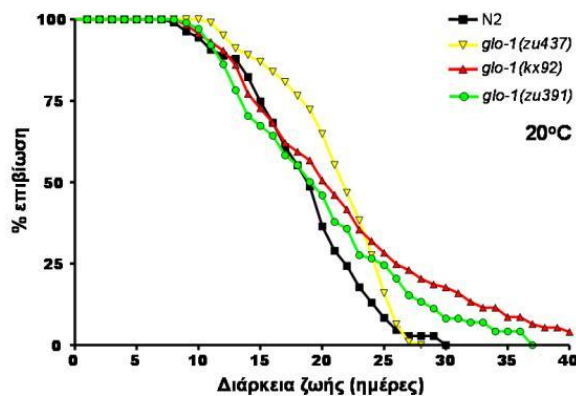
	<i>mec-4(d)</i>	<i>unc-32(e189); mec-4(d)</i>
Στατιστικά μέση επιβίωση (Ημέρες)	22	24
Μέγιστη επιβίωση (Ημέρες)	42	46

EXP8. Μεταλλαγές στο γονίδιο *unc-32* (*e189* αλληλόμορφο) δεν επηρεάζουν την διάρκεια ζωής (σε γενετικό background τοξικών μεταλλαγών του *mec-4* γονιδίου). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 20°C (και η έναρξη μέτρησης της διάρκειας ζωής ήταν στο L4 στάδιο).



	N2	<i>glo-1(zu437)</i>	<i>glo-1(kx92)</i>	<i>glo-1(zu391)</i>
Στατιστικά μέση επιβίωση (Ημέρες)	25	24	17	20
Μέγιστη επιβίωση (Ημέρες)	31	34	35	33

EXP9. Διάρκεια ζωής στελεχών που φέρουν μεταλλαγές στο γονίδιο *glo-1* (ελαττωματικά στη βιογένεση ανάλογων με λυσοσώματα εντερικών κοκκίων) (αλληλόμορφα *zu437*, *kx92*, *zu391*). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 20°C (και η έναρξη μέτρησης της διάρκειας ζωής ήταν στο L4 στάδιο).



	N2	<i>glo-1(zu437)</i>	<i>glo-1(kx92)</i>	<i>glo-1(zu391)</i>
Στατιστικά μέση επιβίωση (Ημέρες)	19	22	21	20
Μέγιστη επιβίωση (Ημέρες)	31	28	43	37

EXP10. Διάρκεια ζωής στελεχών που φέρουν μεταλλαγές στο γονίδιο *glo-1* (ελαττωματικά στην βιογένεση ανάλογων με λυσοσώματα εντερικών κοκκίων) (αλληλόμορφα *zu437*, *kx92*, *zu391*). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 20°C (και η έναρξη μέτρησης της διάρκειας ζωής ήταν στο L4 στάδιο).

Από τα παραπάνω πειράματα γίνεται αντιληπτό ότι η μείωση της ενεργότητας των γονιδίων *vha-10* και *vha-12* μέσω RNAi επηρεάζει αρνητικά τη διάρκεια ζωής του *C. elegans* (μείωση) ενώ η μείωση της ενεργότητας των γονιδίων *vha-2*, *cup-5*, *asp-3*, *asp-4* και *clp-1* δεν επηρεάζει σημαντικά τη ζωή του *C. elegans* όσον αφορά τη διάρκειά της. Η μείωση της

ενεργότητας των γονιδίων ξεκίνησε από το L4 στάδιο λόγω του ότι τα περισσότερα από τα γονίδια που εξετάστηκαν είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του οργανισμού (η απενεργοποίησή τους από το τελευταίο προνυμφικό στάδιο επιτρέπει την ολοκλήρωση της ανάπτυξης του οργανισμού φυσιολογικά, και την εξέταση της διάρκειας της ζωής του οργανισμού χωρίς πιθανές αρνητικές αναπτυξιακές επιρροές λόγω της απενεργοποίησης των γονιδίων). Σε μετέπειτα πειράματα (**EXP4-7**) εξετάστηκε ο ρόλος των γονιδίων αυτών μέσω απενεργοποίησής τους από την αρχή της ενηλικίωσης προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα τυχόν αναπτυξιακές επιρροές λόγω της μείωσης της ενεργότητάς τους να επηρεάζουν αρνητικά την διάρκεια ζωής. Εκτός από το στάδιο ζωής από το οποίο ξεκίνησε το RNAi, μια άλλη παράμετρος που άλλαξε ήταν η συγκέντρωση του IPTG με το οποίο επάγεται η T7 RNA πολυμεράση για την παραγωγή του dsRNA. Έχει δειχτεί ότι αλλαγή της συγκέντρωσης της καλλιέργειας του πλασμιδιακού φορέα που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του dsRNA (Rea et al., 2007) ή αλλαγή της συγκέντρωσης του IPTG που μπορεί να οδηγήσει σε ήπια, μέτρια και ισχυρή απενεργοποίηση του γονιδίου μπορεί να έχει εντελώς αντίθετες επιδράσεις ως προς τη διάρκεια ζωής του οργανισμού. Έτσι θελήσαμε να δούμε και αν οι αρνητικές επιδράσεις της απενεργοποίησης ορισμένων γονιδίων θα μπορούσαν να αντιστραφούν μετά από ηπιότερη απενεργοποίησή τους με το RNAi. Ανεξαρτήτως της αλλαγής αυτών των παραμέτρων το αποτέλεσμα όσον αφορά τα γονίδια *vha-10* και *vha-12* ήταν το ίδιο: Η απενεργοποίησή τους μέσω RNAi επηρεάζει αρνητικά τη διάρκεια ζωής του *C. elegans*, ενώ τα υπόλοιπα γονίδια δεν φάνηκε να επηρεάζουν σημαντικά την διάρκεια ζωής του *C. elegans* ούτε και με τις διαφοροποιημένες παραμέτρους. Το ίδιο συμπέρασμα βγαίνει και από τα μεταλλάγματα για τα γονίδια *unc-32* και *glo-1*: δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά τη διάρκεια ζωής του *C. elegans*. Όσον αφορά το αλληλόμορφο *kx92* του γονιδίου *glo-1* στο πείραμα 9 φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τη διάρκεια ζωής ενώ στο πείραμα 10

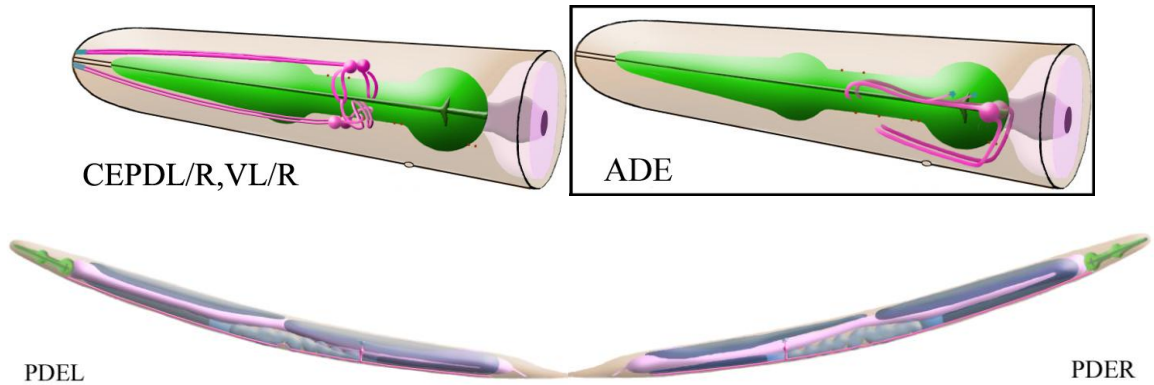
δεν φαίνεται κάτι αντίστοιχο. Πιθανότατα να οφείλεται η διαφορά αυτή στην διαφορετικότητα μεταξύ των ατόμων όσον αφορά τη μορφογένεσή τους, που προκαλείται από το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (μεγαλόσωμα ζώα ζούσαν λιγότερο, ενώ κοντόχοντρα ενήλικα ζώα ζούσαν περισσότερο κατά την παρατήρηση τους στα πιάτα κατά την επιτέλεση του πειράματος).

4. Εισαγωγή στο 2^ο τμήμα της ερευνητικής μελέτης

4.1 Μοντελοποίηση της ασθένειας του Parkinson στον *C. elegans*

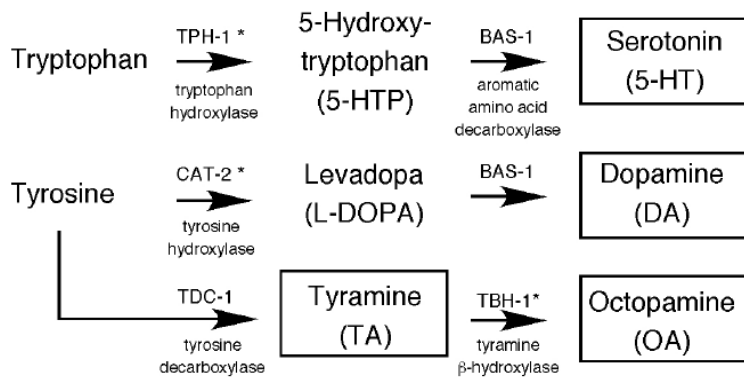
Η ασθένεια του Parkinson είναι μια αρκετά διαδεδομένη νευροεκφυλιστική ασθένεια παγκοσμίως. Το κύριο χαρακτηριστικό της αποτελεί η σταδιακή απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων σε μια περιοχή της κεφαλής που αποκαλείται Substantia Nigra pars compacta. Τα κύρια χαρακτηριστικά των ασθενών που πάσχουν από την ασθένεια του Parkinson περιλαμβάνουν ρίγος (σε κατάσταση ηρεμίας), σπαστικότητα και ανικανότητα έναρξης κίνησης. Ο εκφυλισμός των ντοπαμινεργικών νευρώνων χαρακτηρίζεται από την συσσώρευση πρωτεϊνών σε έγκλειστες δομές που αποκαλούνται σώματα Lewy και παρατηρούνται τόσο σε σποραδικές όσο και σε οικογενείς περιπτώσεις της ασθένειας. Οι γενετικές μορφές της νόσου καταλαμβάνουν ποσοστό 5-10% όλων των γνωστών περιπτώσεων. Ενώ στις σποραδικές περιπτώσεις πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο, στις οικογενείς περιπτώσεις έχουν ανακαλυφθεί αρκετά γονίδια (κυρίως εμπλέκονται στη ρύθμιση της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης και του οξειδωτικού στρες) τα οποία συνδέονται με τους μηχανισμούς της νόσου (Dawson and Dawson, 2003).

4.1.1 Το σύστημα ντοπαμίνης στον *C. elegans*



Εικόνα 14. Οι τρεις τάξεις ντοπαμινεργικών νευρώνων του *C. elegans* στο ερμαφρόδιτο άτομο (www.wormatlas.org).

Όπως προαναφέρθηκε, το κύριο χαρακτηριστικό της ασθένειας του Parkinson είναι ο



εκφυλισμός των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην περιοχή Substantia Nigra pars Compacta του εγκεφάλου.

Στο ερμαφρόδιτο άτομο υπάρχουν συνολικά 8 νευρώνες που

Εικόνα 15. Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των βιογενικών αμινών. Η λειτουργία που επιτελούν τα προϊόντα των γονιδίων *cat-2*, *cat-4* και *bas-1* φαίνεται στο σχήμα και περιγράφεται. Τα ένζυμα τα οποία έχουν σημειωθεί με αστερίσκο, για να λειτουργήσουν απαιτούν ένα συμπαράγοντα του οποίου η σύνθεση απαιτεί την GTP κυκλο-υδρολάση I που κωδικοποιείται από το γονίδιο *cat-4* (Chase, 2007) .

συνθέτουν ντοπαμίνη ενώ στο αρσενικό 14 (Sulston, 1975). Στο ερμαφρόδιτο άτομο οι 6 από τους 8 νευρώνες εντοπίζονται στο πρόσθιο τμήμα του ζώου (στην περιοχή της

κεφαλής) (**εικόνα 14**) και χωρίζονται σε 2 τάξεις : α) τους CEPs (ένα ζεύγος ραχιαίων

αμφίπλευρα συμμετρικών –CEPDL/R - και ένα ζεύγος κοιλιακών αμφίπλευρα συμμετρικών – CEPVL/R) και β) τους ADEs (ένα ζεύγος αμφίπλευρα συμμετρικών –ADEL/R). Το ζεύγος των δύο εναπομεινάντων νευρώνων του ερμαφρόδιτου εντοπίζεται στο μέσο του σώματος και αποτελεί την τάξη των PDEs (ένα ζεύγος αμφίπλευρα συμμετρικών νευρώνων). Στο αρσενικό οι επιπλέον έξι νευρώνες εντοπίζονται στην περιοχή της ουράς (ρόλος στη σύζευξη).

4.1.2 Βιοσύνθεση και σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης στον *C. elegans*

Το μονοπάτι βιοσύνθεσης της ντοπαμίνης στον *C. elegans* φαίνεται στην **εικόνα 15** (φαίνονται και τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των άλλων βιογενικών αμινών). Το γονίδιο *cat-2* κωδικοποιεί μια υδροξυλάση τυροσίνης που ρυθμίζει τη βιοσύνθεση της ντοπαμίνης (Lints, 1999). Το γονίδιο *bas-1* κωδικοποιεί μια αποκαρβοξυλάση αρωματικών αμινοξέων που εμπλέκεται στα βιοσυνθετικά μονοπάτια τόσο της σεροτονίνης όσο και της ντοπαμίνης (Loer, 1993) ενώ το γονίδιο *cat-4* (Sulston, 1975; Loer, 1993) κωδικοποιεί μια GTP κυκλοϋδρολάση I που εμπλέκεται στη σύνθεση ενός συμπαραγόντα ο οποίος ρυθμίζει τα βιοσυνθετικά μονοπάτια της ντοπαμίνης και της σεροτονίνης (και μιας άλλης βιογενικής αμίνης, της οκτοπαμίνης).

Μια γενική περιγραφή της πορείας της ντοπαμίνης μετά την σύνθεσή της αφορά το φόρτωμά της στα συναπτικά κυστίδια μέσω του μεταφορέα CAT-1 (όχι αποκλειστικός ρόλος για την ντοπαμίνη, αλλά μεταφέρει επίσης και σεροτονίνη) (Duerr, 1999). Απαραίτητη προϋπόθεση αυτής της διαδικασίας είναι η ύπαρξη μιας διαβάθμισης πρωτονίων που δημιουργείται από τη δράση της V-ATPάσης (εντοπισμός στην μεμβράνη των συναπτικών κυστιδίων) (Pujol, 2001).

Κατά τη νευροδιαβίβαση τα συναπτικά κυστίδια συντήκονται με τη μεμβράνη της προσυναπτικής περιοχής και απελευθερώνεται ο νευροδιαβιβαστής. Ο νευροδιαβιβαστής έπειτα είτε α) αποικοδομείται στον εξωκυττάριο χώρο (προς ομοβαλινικό οξύ) (Wintle R.F. , 2001), είτε β) επανακτάται στον προσυναπτικό νευρώνα μέσω του μεταφορέα DAT-1 (Nass, 2005), είτε γ) προσδένεται σε μετασυναπτικούς υποδοχείς του ρυθμίζοντας τα επίπεδα του κυκλικού cAMP εμμέσως μέσω ρύθμισης της αδενυλικής κυκλάσης (η ρύθμιση αυτή ρυθμίζει περαιτέρω downstream μόρια που επηρεάζουν την ενεργότητα του μετασυναπτικού νευρώνα) (Perez, 2006). Στον *C. elegans* αυτοί οι υποδοχείς είναι οι DOP-1, DOP-2, DOP-3 και DOP-4. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς ανήκουν, όπως και όλοι οι υποδοχείς ντοπαμίνης (Missale, 1998), στην οικογένεια των υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors) και εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια για την ντοπαμίνη. Ο DOP-1 εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με τους D1-like υποδοχείς των θηλαστικών, και οι DOP-2, DOP-3 με τους D2-like αντίστοιχα (Suo, 2002; Suo, 2003).

4.1.3 Μοντέλα επαγωγής εκφυλισμού ντοπαμινεργικών νευρώνων στον *C. elegans*

Στον *C. elegans* έχουν εγκαθιδρυθεί και μοντελοποιηθεί διάφορες πτυχές της ασθένειας του Parkinson. Η έκθεση στις επιδράσεις νευροτοξινών όπως η 6-OHDA (6-υδροξυ-ντοπαμίνη) οδηγεί σε ειδικό εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Nass et al., 2002). Οι εκφυλιζόμενοι νευρώνες παρουσιάζουν στικτές (blebbed) διαδικασίες, στρογγυλεμένα κυτταρικά σώματα και πολλοί από αυτούς μπορούν ακόμα και να εξαφανιστούν μετά από παρατεταμένη έκθεση. Παρατήρηση των εκφυλιζόμενων κυττάρων με ηλεκτρονική μικροσκοπία δείχνει ότι δεν παρουσιάζουν χαρακτηριστικά νεκρωτικού θανάτου (μεμβρανικές σπείρες, διογκωμένα οργανίδια ή σώματα) αλλά παρουσιάζουν σκούρα και στρογγυλεμένα

σώματα, σκούρους πυρήνες, χρωματινική συμπύκνωση και δενδριτικές διαδικασίες που περιέχουν κενοτόπια ή απουσιάζουν τελείως. Οι μοριακοί μηχανισμοί του κυτταρικού θανάτου είναι ανεξάρτητοι από τα κύρια μόρια της απόπτωσης (CED-3, CED-4) αλλά εξαρτώνται από τον προσυναπτικό μεταφορέα ντοπαμίνης DAT-1 (μεσολάβηση στη συσσώρευση της νευροτοξίνης στο νευρώνα). Η χρήση αυτού του μοντέλου έχει χρησιμεύσει στην εύρεση πολλών μορίων που παίζουν ρόλο στο νευροεκφυλισμό όπως η AAA+ ATPase Torsin A (μέσω αρνητικής ρύθμισης της ενεργότητας του DAT-1) (Cao et al., 2005), χημικών ουσιών (όπως το acetaminophen) που προστατεύουν από το νευροεκφυλισμό (Locke et al., 2008) και δύο αγωνιστών των D2-τύπου υποδοχέων (Marvanova and Nichols, 2007).

Εκτός από την 6-OHDA, και το MPP⁺ έχει χρησιμοποιηθεί για την επαγωγή του εκφυλισμού των ντοπαμινεργικών νευρώνων στον *C. elegans* (Braungart et al., 2004). Το MPP⁺ είναι ένα μεταβολικό προϊόν της ένωσης MPTP (1-μεθυλ-4-φαινυλ-1, 2, 3, 6-τετραϋδροπυριδίνη). Έκθεση στην MPTP ή στο MPP⁺ προκαλεί μειωμένη κινητικότητα, αυξημένη θνησιμότητα και τον ειδικό εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων (δενδριτική ή/και σωματική απώλεια, στικτές διαδικασίες). Ο εκφυλισμός είναι ανεξάρτητος από μόρια που συμμετέχουν στην απόπτωση (CED-4 και CED-13), εξαρτάται από την ενεργότητα του DAT-1 και την ενεργότητα του *vha-12* γονιδίου (που κωδικοποιεί για μια υπομονάδα της V-ATPase και απαιτείται για τη νέκρωση) (Pu and Le, 2008).

Ένας από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ασθένεια του Parkinson είναι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Scharira, 2008). Αυτοσωμικά επικρατείς μεταλλαγές στην LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) έχουν συσχετιστεί τόσο με οικογενείς όσο και με σποραδικές περιπτώσεις της ασθένειας. Η έκφραση της ανθρώπινης μεταλλαγμένης μορφής της LRRK2 στον *C. elegans* οδηγεί σε εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Saha et al., 2009). Η έκφραση της αγρίου τύπου μορφής έχει ηπιότερες επιπτώσεις στον εκφυλισμό.

Επίσης, μεταλλαγές στο γονίδιο *Irk-1* που κωδικοποιεί την ορθόλογη πρωτεΐνη της ανθρώπινης LRRK2, ευαισθητοποιεί επίσης τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες στο μιτοχονδριακό στρες και οδηγεί σε νευροεκφυλισμό.

4.1.4 Ο ρόλος της α-συνουκλεΐνης στον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων στον *C. elegans*

Έγκλειστες δομές της α-συνουκλεΐνης είναι ένα κοινό παθολογικό χαρακτηριστικό τόσο σποραδικών όσο και οικογενών περιπτώσεων της ασθένειας του Parkinson. Η α-συνουκλεΐνη είναι ένα κύριο συστατικό των σωμάτων Lewy που εντοπίζονται στους εκφυλιζόμενους ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Spillantini et al., 1997). Μεταλλαγές στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης ή πολλαπλασιασμοί του γονιδιακού τόπου της α-συνουκλεΐνης έχουν επίσης συσχετιστεί με κάποιες αυτοσωμικά επικρατείς οικογενείς περιπτώσεις της ασθένειας (Polymeropoulos et al., 1997; Singleton et al., 2003; Chartier-Harlin et al., 2004). Στον *C. elegans* έχουν εγκαθιδρυθεί μοντέλα υπερέκφρασης τόσο της αγρίου τύπου όσο και της μεταλλαγμένης μορφής της α-συνουκλεΐνης, σε όλο το νευρικό σύστημα ή ειδικά στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Lakso et al., 2003; Cao et al., 2005; Cooper et al., 2006; Kuwahara et al., 2006; Qiao et al., 2008).

Η υπερέκφραση της ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης (αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένης) είτε σε όλους τους νευρώνες ή σε συγκεκριμένους κινητήριους νευρώνες, προκαλεί κινητικά προβλήματα (Lakso et al., 2003). Έγκλειστα σωμάτια ή συσσωματώματα της α-συνουκλεΐνης δεν παρατηρούνται, ενώ ενδοκυτταρικά έγκλειστα παρατηρούνται σπάνια σε αυτά τα διαγονιδιακά ζώα. Η υπερέκφραση της ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης (αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένης) ειδικά στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες προκαλεί τον εκφυλισμό τους που

γίνεται πιο έντονος με την πάροδο του χρόνου (γήρανση των ζώων) (Cao et al., 2005; Cooper et al., 2006; Kuwahara et al., 2006).

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, διάφορες βλάβες στο σύστημα ουβικουϊίνης-πρωτεασώματος, η παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο έχουν συσχετιστεί με την παθογένεση της ασθένειας του Parkinson (Dauer and Przedborski, 2003). Η συσσώρευση της α-συνουκλεϊνης μπλοκάρει τη διαδικασία μεταφοράς από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) στο σύμπλεγμα Golgi στον *S. cerevisiae*. Η υπερέκφραση συγκεκριμένων Rab GTPασών που ξεπερνούν το μπλοκάρισμα και προωθούν την διαδικασία μεταφοράς από το ER στο Golgi έχει δείχτει ότι προστατεύουν από εκφυλισμό τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες σε διάφορους οργανισμούς, και στον *C. elegans* (Cooper et al., 2006; Gitler et al., 2008).

Τα μοντέλα επαγωγής εκφυλισμού των ντοπαμινεργικών νευρώνων από την α-συνουκλεϊνη έχουν χρησιμοποιηθεί για την εύρεση καταστολέων του εκφυλισμού. Ανάμεσα στα μόρια που έχουν βρεθεί είναι η AAA+ ATPase Torsin A (Cao et al., 2005), η λυσοσωμική καθεψίνη D (Qiao et al., 2008) καθώς και μια πλειάδα μορίων που σχετίζονται με την αυτοφαγία, τη λυσοσωμική λειτουργία, τη διαδικασία μεταφοράς και τη σηματοδότηση μέσω G-πρωτεϊνών (Hamamichi et al., 2008).

4.2 Η ενδονουκλεάση G και η λειτουργία της στον *C. elegans*

Στα θηλαστικά, τα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου. Πιο συγκεκριμένα, στο εσωτερικό μιτοχονδριακό αποπρωτικό μονοπάτι, οι ενεργές μορφές των Bax και Bak παραγόντων προσδένονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και επάγουν την αύξηση της διαπερατότητάς της. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η

απελευθέρωση μιας ομάδας προ-αποπτωτικών παραγόντων στο κυτταρόπλασμα. Ο πιο γνωστός παράγοντας είναι το κυτόχρωμα c που προσδένεται στον Araf-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor) και μαζί με την κασπάση-9 σχηματίζουν το αποπτώσωμα (Li et al., 1997).

Στον *C. elegans*, σειρά δεδομένων συνηγορεί κατά του ρόλου του κυτοχρώματος c στον σχηματισμό του αποπτωσώματος (απώλεια περιοχών πρόσδεσης του κυτοχρώματος c στο μόριο CED-4 που είναι όμοιο με τον Araf-1, και ενεργοποίηση της κεντρικής κασπάσης CED-3 in vitro χρησιμοποιώντας μόνο τα μόρια EGL-1, CED-4, CED-9 και CED-3) (Hu et al., 1998; Srinivasula et al., 1998; Yan et al., 2005).

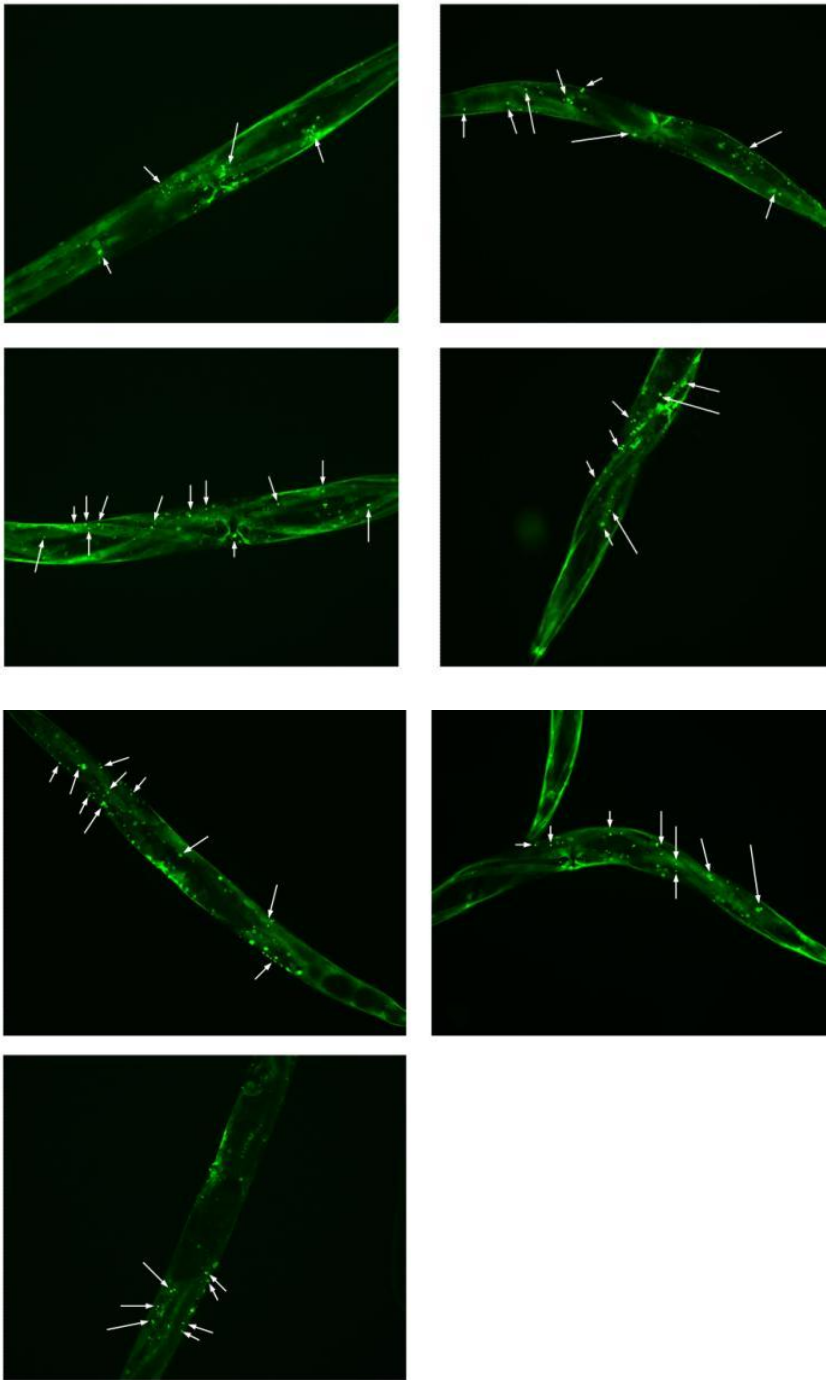
Ωστόσο μια σειρά άλλων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών έχειδειχτεί ότι συμμετέχουν στην απόπτωση στον *C. elegans*. Δύο από αυτές είναι η CPS-6 (CED-3 protease suppressor-6) και η WAH-1 (Worm AIF homologue-1) που είναι τα ομόλογα της ενδονουκλεάσης G και του παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης AIF αντίστοιχα. Μετά την ενεργοποίηση της απόπτωσης από την πρωτεΐνη EGL-1, οι μιτοχονδριακές αυτές πρωτεΐνες απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια και συνεργάζονται προκειμένου να επιτελέσουν την αποικοδόμηση του DNA στο κύτταρο που πεθαίνει (Parrish et al., 2001; Wang et al., 2002). Επίσης δείχτηκε σε αυτές τις μελέτες ότι αυτές οι πρωτεΐνες δρουν συνεργατικά προκειμένου να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο υποδεικνύοντας ότι η αποικοδόμηση του DNA, παρά το ότι αποτελεί το τελευταίο βήμα της απόπτωσης, μπορεί να επηρεάσει την εκτέλεση του κυτταρικού θανάτου.

5. Αποτελέσματα 2^{ου} τμήματος ερευνητικής μελέτης

5.1 Διερεύνηση του ρόλου της ενδονουκλεάσης G στη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης (στους μύες) του *C. elegans*

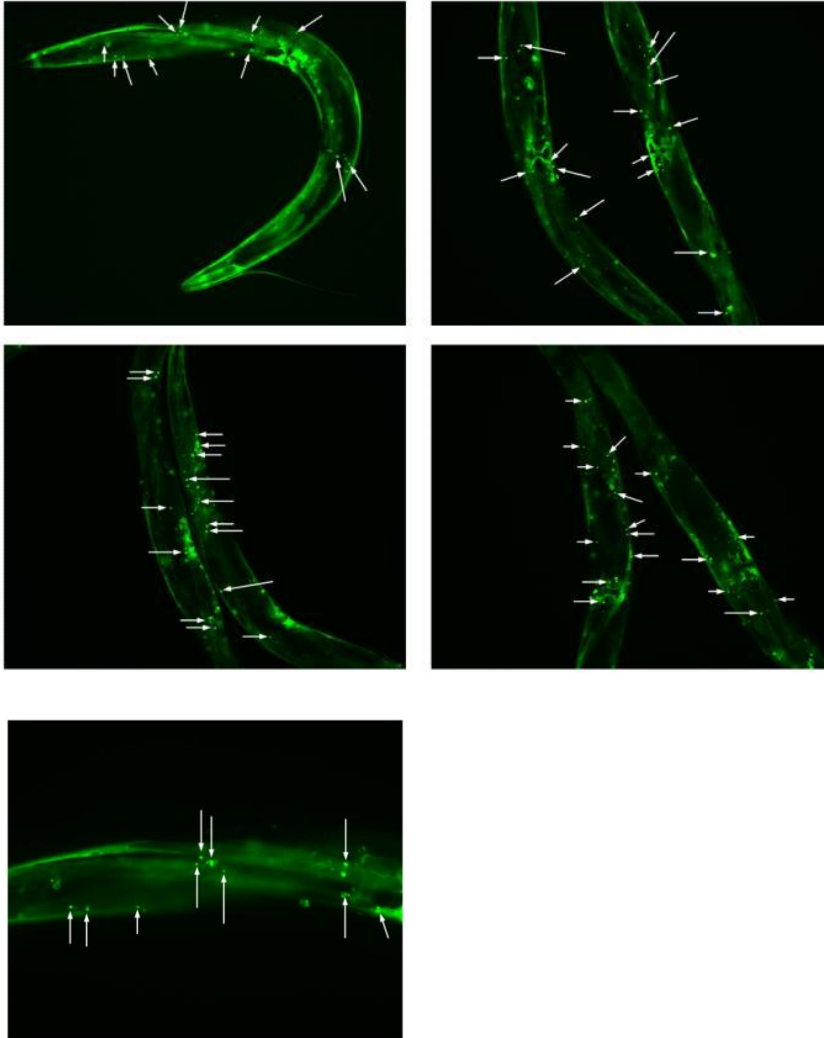
Για να διερευνηθεί ο ρόλος της ενδονουκλεάσης G στη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης τα άτομα παρατηρήθηκαν κατά την 7^η ημέρα της ενηλικίωσής τους όπως είχε περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (Cao et al., 2005; Qiao et al., 2008), αφού στα control ζώα η συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης στους μύες παρουσιάζει τα μέγιστα επίπεδα αυτή την ημέρα. Το control στέλεχος υπερεκφράζει την α-συνουκλεΐνη στους μύες του σωματικού τοιχώματος του ζώου (στέλεχος UA49), ενώ κατασκευάστηκε και το διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος που φέρει και το αλληλόμορφο *ok1718* του γονιδίου *crs-6* που κωδικοποιεί την ομόλογη πρωτεΐνη της ενδονουκλεάσης G.

UA49: *baln12*[*p_{unc-54}::α-Syn::GFP, pRF4*]



Εικόνα 16. Παρατήρηση συσσωματωμάτων της ασυνουκλείνης στους μύες του σωματικού τοιχώματος του *C. elegans*. Με βέλη υποδεικνύονται ενδεικτικά συσσωματώματα στους μύες (σε όλη την έκταση του σώματος του ζώου).

***cps-6(ok1718)*; *baln12*[*p_{unc-54}::α-Syn::GFP, pRF4*]**



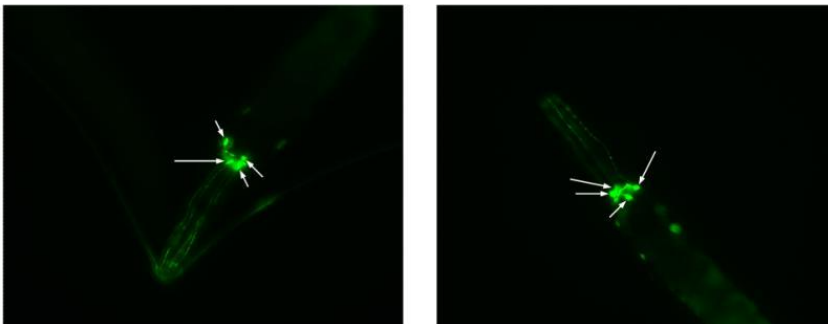
Εικόνα 17. Μεταλλαγές στο γονίδιο *cps-6* που κωδικοποιεί την ενδονουκλεάση G στον *C. elegans* (αλληλόμορφο *ok1718*) δεν καταστέλλουν την συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης στους μύες του σωματικού τοιχώματος του οργανισμού. Με βέλη υποδεικνύονται ενδεικτικά συσσωματώματα στους μύες (σε όλη την έκταση του σώματος του ζώου).

Η παρατήρηση των συσσωματωμάτων της α-συνουκλεΐνης στους μύες του σωματικού τοιχώματος του *C. elegans* έδειξε ότι η έλλειψη της ενδονουκλεάσης G δεν επηρεάζει τη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης και ο αριθμός των συσσωματωμάτων με απλή παρατήρηση δεν έδειξε να διαφέρει μεταξύ των control και των διπλά μεταλλαγμένων στελεχών (εικόνες 16 και 17).

5.2 Διερεύνηση του ρόλου της ενδονουκλεάσης G στο νευροεκφυλισμό που επάγεται από την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης στον *C. elegans*

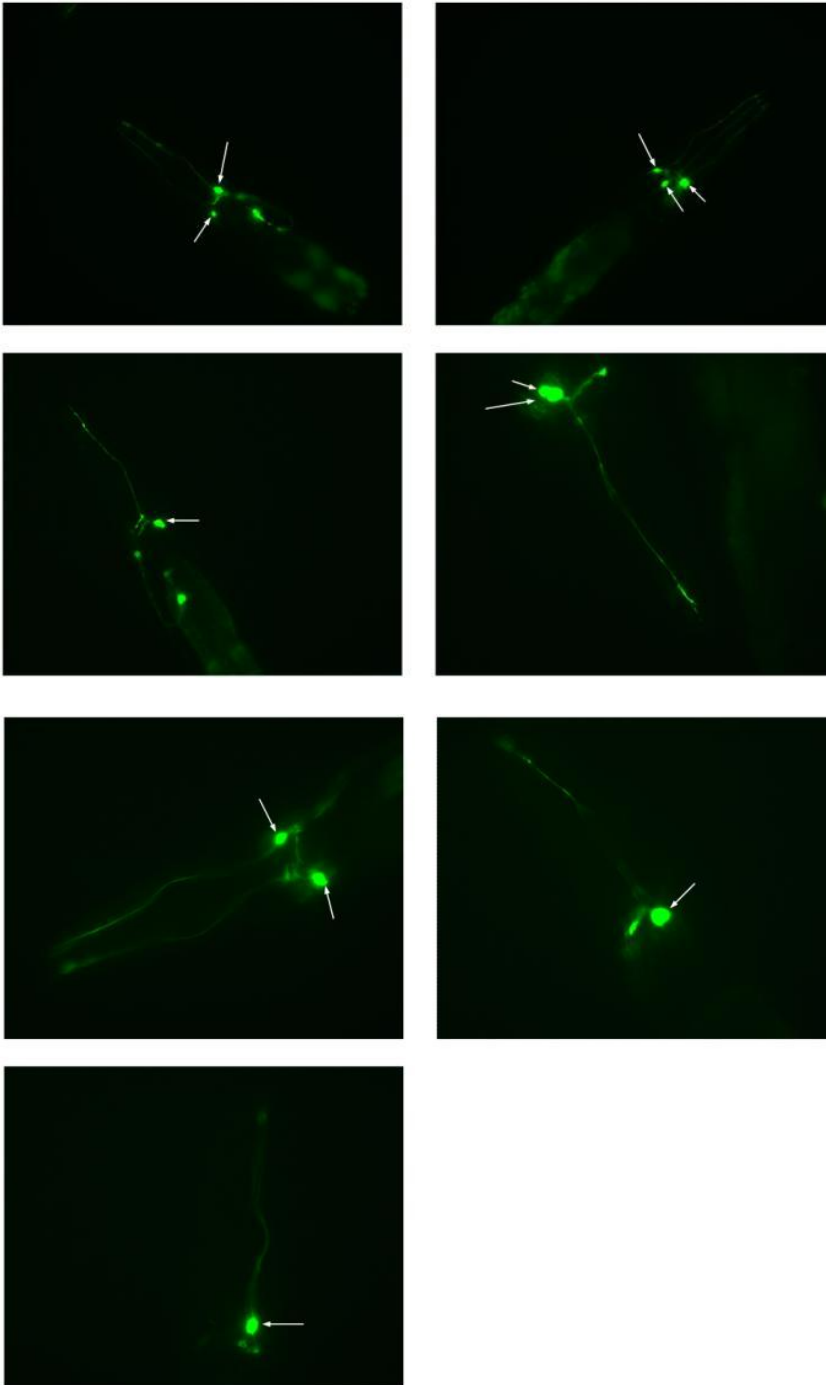
Για να διερευνηθεί ο ρόλος της ενδονουκλεάσης G στο εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων που επάγεται από την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης τα άτομα παρατηρήθηκαν κατά την 7^η ημέρα της ενηλικίωσής τους όπως είχε περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (Cao et al., 2005; Qiao et al., 2008), αφού στα control ζώα τα ποσοστά νευροεκφυλισμού είναι τα μέγιστα αυτή την ημέρα (επιβεβαιώθηκε και από παρατηρήσεις μας στα control άτομα). Το control στέλεχος υπερεκφράζει την α-συνουκλεΐνη στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του οργανισμού (στέλεχος UA44), ενώ κατασκευάστηκε και το διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος που φέρει και το αλληλόμορφο *ok1718* του γονιδίου *cps-6* που κωδικοποιεί το ομόλογο της ενδονουκλεάσης G. Χρησιμοποιήθηκε επίσης το στέλεχος BZ555 που κατευθύνει την έκφραση μόνο της GFP στους 8 ντοπαμινεργικούς νευρώνες του *C. elegans* (εικόνα 18). Οι παρατηρήσεις μας και οι μετρήσεις νευροεκφυλισμού εστιάστηκαν στους 4 CEP ντοπαμινεργικούς νευρώνες της κεφαλής (αναλυτική περιγραφή στο υποκεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι».)

BZ555: *egls1*[*p_{dat-1}::GFP*]



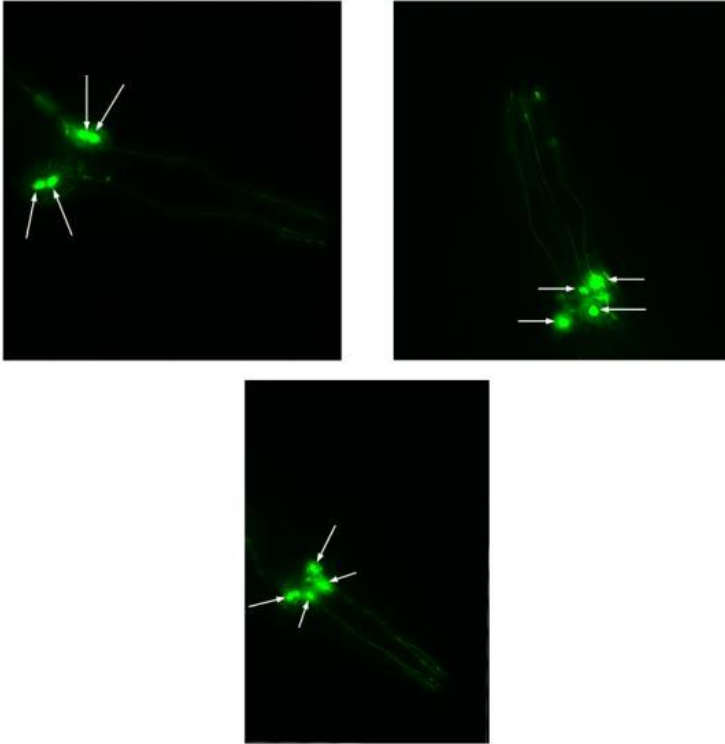
Εικόνα 18. Παρατήρηση του προτύπου έκφρασης της GFP στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της κεφαλής. Με βέλη υποδεικνύονται τα σώματα των 4 CEPs (cephalic neurons) στους οποίους στηρίχτηκε η μελέτη μας ενώ είναι εμφανείς οι δενδριτικές τους απολήξεις που καταλήγουν στο πρόσθιο μέρος της κεφαλής.

UA44: *baln11*[*p_{dat-1}::α-Syn, p_{dat-1}::GFP*]



Εικόνα 19. Υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες προκαλεί νευροεκφυλισμό. Παραδείγματα ζώων όπου η ειδική υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, προκαλεί το νευροεκφυλισμό τους (απώλεια νευρικών κυτταρικών σωμάτων και διαδικασιών). Από το σύνολο των 4 CEPs όπου υπάρχουν στα φυσιολογικά wt ζώα, παρατηρείται απώλεια 1-3 νευρώνων. Τα βέλη υποδεικνύουν τα κυτταρικά σώματα των CEPs.

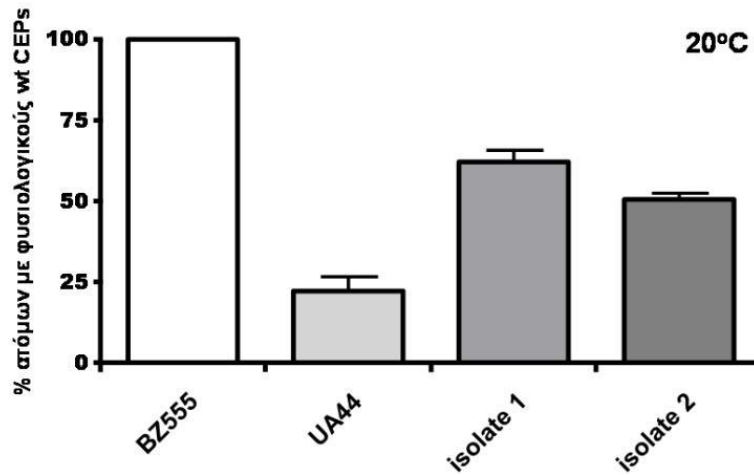
cps-6(ok1718)I; baln11[p_{dat-1}::α-Syn, p_{dat-1}::GFP]



Εικόνα 20. Μεταλλαγές στο γονίδιο *cps-6* που κωδικοποιεί την ενδονουκλεάση G στον *C. elegans* (αλληλόμορφο *ok1718*) καταστέλλουν το νευροεκφυλισμό που προκαλείται από την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του οργανισμού. Με βέλη υποδεικνύονται κυτταρικά σώματα των CEPs.

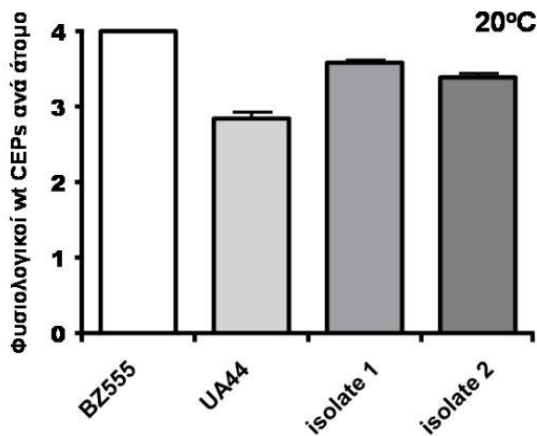
Στις παραπάνω εικόνες φαίνεται το φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης της GFP στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της κεφαλής (CEPs) (**εικόνα 18**), τα πρότυπα νευροεκφυλισμού που παρουσιάζουν τα άτομα του στελέχους UA44 ως αποτέλεσμα υπερέκφρασης της α-συνουκλεΐνης στους ντοπαμινεργικούς τους νευρώνες (**εικόνα 19**), καθώς και ο προστατευτικός ρόλος της ενδονουκλεάσης G στο νευροεκφυλισμό των CEPs που επάγεται από την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης (**εικόνα 20**).

cps-6(ok1718)l; baln11[p_{dat-1}::α-Syn, p_{dat-1}::GFP]



Εικόνα 21. Το ποσοστό των ατόμων με μη εκφυλισμένους CEPs (λόγω υπερέκφρασης της α-συνουκλείνης) αυξάνεται ως αποτέλεσμα απώλειας της ενδονουκλεάσης G. Με τον όρο isolate αναφέρονται διπλά μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί ανεξάρτητα μεταξύ τους από την διαδικασία της διασταύρωσης. Οι γραμμές σφάλματος συμβολίζουν τον SEM ενώ για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 1way ANOVA (P<0.001).

cps-6(ok1718)l; baln11[p_{dat-1}::α-Syn, p_{dat-1}::GFP]



Εικόνα 22. Μεταλλαγές στο γονίδιο *cps-6* που κωδικοποιεί την ενδονουκλεάση G στον *C. elegans* (αλληλόμορφο *ok1718*) καταστέλλουν το νευροεκφυλισμό που προκαλείται από την υπερέκφραση της α-συνουκλείνης στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του οργανισμού. Με τον όρο isolate αναφέρονται διπλά μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί ανεξάρτητα μεταξύ τους από την διαδικασία της διασταύρωσης. Οι γραμμές σφάλματος συμβολίζουν τον SEM ενώ για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 1way ANOVA (P<0.001).

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω γραφήματα, μεταλλαγές στο γονίδιο *cps-6* που κωδικοποιεί την ενδονουκλεάση G προστατεύουν από εκφυλισμό τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες (CEPs). Όσον αφορά τα ποσοστά των ατόμων με φυσιολογικούς wt CEPs (επί του συνόλου των ατόμων που εξετάστηκαν για κάθε στέλεχος) αυτά είναι: BZ555 (100%), UA44 (22.24% ± 4.42%), isolate 1 (62.15% ± 3.63%), isolate 2 (50.56% ± 1.91%). Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα, η έλλειψη της CPS-6 ελαττώνει τα ποσοστά του νευροεκφυλισμού κατά 39.9% (isolate 1) και 28.3% (isolate 2) σε σχέση με το UA44 στέλεχος. Σε αριθμό φυσιολογικών CEPs ανά άτομο: BZ555 (4), UA44 (2.84 ± 0.08), isolate 1 (3.58 ± 0.03), isolate 2 (3.39 ± 0.05). Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα, η έλλειψη της CPS-6 αυξάνει τον αριθμό των φυσιολογικών wt CEP νευρώνων ανά άτομο κατά 0.73 (isolate 1) και 0.54 (isolate 2) σε σχέση με το UA44 στέλεχος.

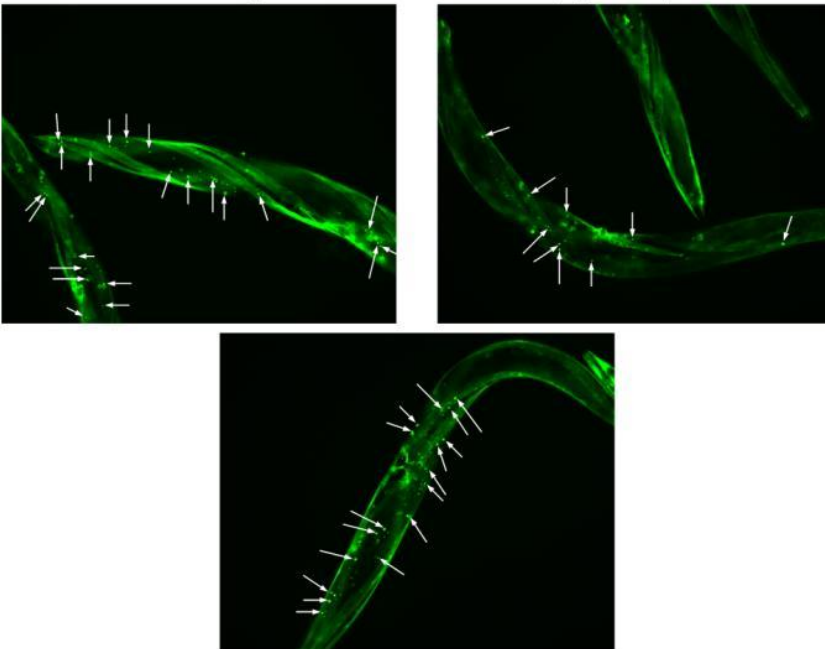
5.3 Διερεύνηση του ρόλου της σπερμιδίνης στη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης (στους μύες) του *C. elegans*

Η σπερμιδίνη αποτελεί μια φυσική πολυαμίνη που η ενδοκυτταρική της συγκέντρωση μειώνεται κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης γήρανσης. Η χορήγηση της σπερμιδίνης αξιοσημείωτα αυξάνει τη διάρκεια ζωής του *S. cerevisiae*, της *D. melanogaster*, του *C. elegans*, και η διαδικασία της αυτοφαγίας (η σπερμιδίνη αυξάνει τα επίπεδα της αυτοφαγίας) απαιτείται για τις επιδράσεις της σπερμιδίνης στη διάρκεια ζωής του οργανισμού (Eisenberg et al., 2009).

Για να διερευνηθούν οι επιδράσεις της σπερμιδίνης στη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης τα άτομα παρατηρήθηκαν κατά την 7^η ημέρα της ενηλικίωσής τους όπως είχε περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (Cao et al., 2005; Qiao et al., 2008), αφού στα control

ζώα η συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης στους μύες παρουσιάζει τα μέγιστα επίπεδα αυτή την ημέρα (επιβεβαιώθηκε και από τις παρατηρήσεις μας). Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε υπερεκφράζει την α-συνουκλεΐνη στους μύες του σωματικού τοιχώματος του ζώου (στέλεχος UA49). Η συγκέντρωση σπερμιδίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.2mM καθώς σε αυτή την συγκέντρωση έχει παρατηρηθεί η μέγιστη επαγωγή αυτοφαγίας στον *C. elegans* (Eisenberg et al., 2009).

**UA49: *baln12*[*p_{unc-54}::α-Syn::GFP, pRF4*]
εκτιθέμενα σε 0.2mM σπερμιδίνη**



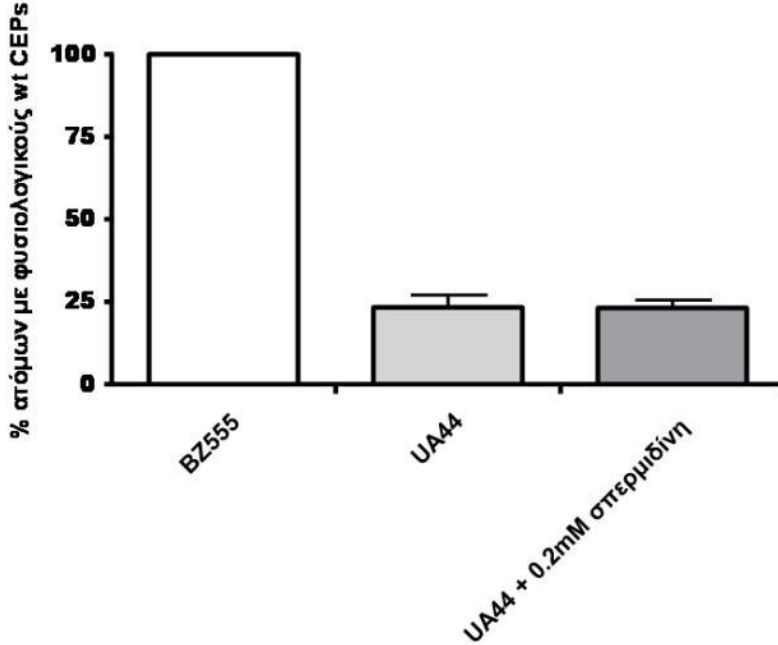
Εικόνα 23. Η έκθεση σε σπερμιδίνη δεν καταστέλλει την συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης στους μύες του σωματικού τοιχώματος του *C. elegans*. Με βέλη υποδεικνύονται ενδεικτικά συσσωματώματα στους μύες (σε όλη την έκταση του σώματος του ζώου).

Με απλή παρατήρηση των ζώων η έκθεση σε σπερμιδίνη φάνηκε ότι δεν καταστέλλει την συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης στους μύες του σωματικού τοιχώματος των ζώων (η σύγκριση μπορεί να γίνει με τα συσσωματώματα της **εικόνας 23**).

5.4 Διερεύνηση του ρόλου της σπερμιδίνης στο νευροεκφυλισμό που επάγεται από την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης στον *C. elegans*

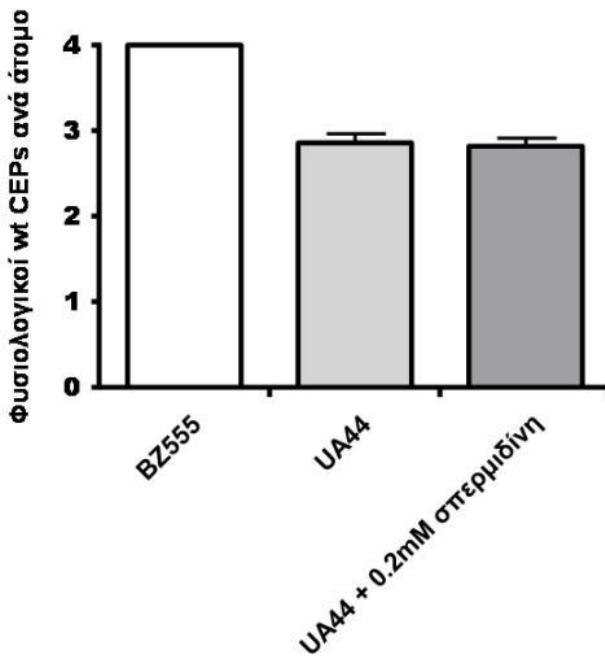
Για να διερευνηθούν οι επιδράσεις της σπερμιδίνης στο εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων που επάγεται από την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης τα άτομα παρατηρήθηκαν κατά την 7^η ημέρα της ενηλικίωσής τους όπως είχε περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (Cao et al., 2005; Qiao et al., 2008), αφού στα control ζώα τα ποσοστά νευροεκφυλισμού είναι τα μέγιστα αυτή την ημέρα (επιβεβαιώθηκε και από παρατηρήσεις μας στα control άτομα). Το control στέλεχος υπερεκφράζει την α-συνουκλεΐνη στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του οργανισμού (στέλεχος UA44). Χρησιμοποιήθηκε επίσης το στέλεχος BZ555 που κατευθύνει την έκφραση μόνο της GFP στους 8 ντοπαμινεργικούς νευρώνες του *C. elegans*. Οι παρατηρήσεις μας και οι μετρήσεις νευροεκφυλισμού εστιάστηκαν στους 4 CEP ντοπαμινεργικούς νευρώνες της κεφαλής (όπως και στο υποκεφάλαιο 8.3.2).

**UA49: *balnl2*[*p_{unc-54}::α-Syn::GFP, pRF4*]
ΕΚΤΙΘΕΜΕΝΑ ΣΕ 0.2mM ΣΠΕΡΜΙΔΙΝΗ**



Εικόνα 24. Η έκθεση σε σπερμιδίνη δεν καταστέλλει το νευροεκφυλισμό που επάγει η υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του *C. elegans*. Το ποσοστό των ατόμων με μη εκφυλισμένους CEPs (λόγω υπερέκφρασης της α-συνουκλεΐνης) δεν αυξάνεται ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε σπερμιδίνη. Οι γραμμές σφάλματος συμβολίζουν τον SEM ενώ για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 1way ANOVA ($P > 0.05$).

**UA49: *balnl2*[*p_{unc-54}::α-Syn::GFP, pRF4*]
ΕΚΤΙΘΕΜΕΝΑ ΣΕ 0.2mM ΣΠΕΡΜΙΔΙΝΗ**



Εικόνα 25. Η έκθεση σε σπερμιδίνη δεν καταστέλλει το νευροεκφυλισμό που επάγει η υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του *C. elegans*. Ο αριθμός των μη εκφυλισμένων CEPs ανά άτομο (λόγω υπερέκφρασης της α-συνουκλεΐνης) δεν αυξάνεται ως αποτέλεσμα έκθεσης σε σπερμιδίνη. Οι γραμμές σφάλματος συμβολίζουν τον SEM ενώ για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 1way ANOVA ($P > 0.05$).

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω γραφήματα (**εικόνες 24 και 25**), η έκθεση σε σπερμιδίνη δεν προστατεύει από εκφυλισμό τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες (CEPs). Όσον αφορά τα ποσοστά των ατόμων με φυσιολογικούς wt CEPs (επί του συνόλου των ατόμων που εξετάστηκαν για κάθε στέλεχος) αυτά είναι: BZ555 (100%), UA44 (23.33% ± 3.68%), UA44 + 0.2mM spermidine (23.12% ± 2.39%). Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα, η έκθεση σε σπερμιδίνη δεν προστατεύει από το νευροεκφυλισμό. Σε αριθμό φυσιολογικών CEPs ανά άτομο: BZ555 (4), UA44 (2.86 ± 0.11), UA44 + 0.2mM spermidine (2.82 ± 0.1). Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα, η έκθεση σε σπερμιδίνη δεν αυξάνει τον αριθμό των φυσιολογικών wt CEP νευρώνων ανά άτομο σε σχέση με το UA44 στέλεχος που δεν έχει εκτεθεί σε σπερμιδίνη.

6. Σύνοψη των αποτελεσμάτων-Συζήτηση

Στο πρώτο τμήμα της ερευνητικής μας μελέτης διερευνήθηκε ο ρόλος μεταλλαγών που είναι γνωστό ότι οδηγούν σε αύξηση της διάρκειας ζωής του *C. elegans*, στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχτηκαν μεταλλαγές που οδηγούν σε αύξηση της διάρκειας ζωής στον *C. elegans* μέσω 3 κύριων μονοπατιών. Αυτές οι μεταλλαγές ήταν α) μεταλλαγές του insulin/IGF σηματοδοτικού μονοπατιού, β) μεταλλαγές που οδηγούν σε επιπτώσεις όμοιες με το διαιτητικό περιορισμό και γ) μεταλλαγές που οδηγούν σε μειωμένη πρωτεϊνική σύνθεση στα σωματικά κύτταρα του οργανισμού. Όσον αφορά τις επιδράσεις αυτών των μεταλλαγών στην αύξηση της διάρκειας ζωής, αυτές ήταν οι μέγιστες μεταξύ μεταλλαγών που αφορούσαν το ίδιο μονοπάτι (όπως έχει περιγραφεί στις αρχικές μελέτες). Οι επιδράσεις τους αναλύθηκαν στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο που επάγεται από υπερενεργά

κανάλια ιόντων (degenerins) και πιο συγκεκριμένα από το MEC-4(D) και το DEG-3(D). Η αρχική μας υπόθεση ήταν ότι μεταλλαγές που επεκτείνουν τη διάρκεια ζωής στον *C. elegans* θα μπορούσαν να προστατεύσουν από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο που αποτελεί τον τύπο θανάτου που υπόκειται νευροεκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με τη διαδικασία της γήρανσης.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι μεταλλαγές (αλληλόμορφα *e1368* και *e1370*) στον DAF-2 υποδοχέα που επεκτείνουν αξιοσημείωτα τη διάρκεια ζωής δεν προστατεύουν από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο σε γενετικό υπόβαθρο *mec-4(d)*. Διερευνήθηκε επίσης ο ρόλος του αλληλομόρφου *e1370* σε γενετικό υπόβαθρο *deg-3(d)*. Και σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρήθηκε καμιά επίδραση στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Έτσι, με βάση τις μεταλλαγές που εξετάστηκαν, φαίνεται ότι το insulin/IGF σηματοδοτικό μονοπάτι και μεταλλαγές που αυξάνουν τη διάρκεια ζωής μέσω μείωσης της ενεργότητάς του δεν προστατεύουν από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο.

Επίσης, το μονοπάτι της πρωτεϊνοσύνθεσης δεν φαίνεται να προστατεύει από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από το *mec-4(d)*. Η έλλειψη της ισομορφής (IFE-2) του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης (null αλληλόμορφο *ok306*) που είναι γνωστό ότι επεκτείνει τη διάρκεια ζωής του *C. elegans* δεν προστατεύει από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο σε γενετικό υπόβαθρο *mec-4(d)*.

Όσον αφορά τις μεταλλαγές που οδηγούν σε επιπτώσεις όμοιες με το διαιτητικό περιορισμό (μεταλλαγές *Eat*) προκαλώντας περιορισμένη πρόσληψη τροφής λόγω παρεμπόδισης σωστής λειτουργίας του φάρυγγα, αυτές φαίνεται να προστατεύουν οριακά από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο σε γενετικό υπόβαθρο *mec-4(d)*, όπως φάνηκε από διπλά μεταλλάγματα που φέρουν το αλληλόμορφο *ad465* στο γονίδιο *eat-2*. Ο προστατευτικός ρόλος των μεταλλαγών *Eat* στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο μπορεί να

εξηγηθεί από το γεγονός ότι η παρεμπόδιση της λειτουργίας του φάρυγγα μπορεί να οδηγήσει σε μερική κατάσταση πείνας τα ζώα. Οι συνθήκες πείνας έχει δείχτει ότι προστατεύουν από τη νέκρωση (σε απόγονους πεινασμένων ζώων) καθώς κάτω από αυτές τις συνθήκες η ενεργότητα των καθεψινών έχει δείχτει ότι ελαττώνεται κατά 5-10% σε σχέση με την αντίστοιχη των καλά τρεφόμενων νηματωδών (Hawdon et al., 1989; Syntichaki et al., 2002).

Στο δεύτερο τμήμα της ερευνητικής μας μελέτης, διερευνήθηκε ο ρόλος της απενεργοποίησης γονιδίων καθώς και μεταλλαγών που είναι γνωστό ότι προστατεύουν από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, στη γήρανση στον *C. elegans*. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν γονίδια που σχετίζονται με τη λυσοσωμική βιογένεση και λειτουργία και έχει δείχθει ότι μεταλλαγές σε αυτά ή απενεργοποίησή τους με RNAi μπορεί να προστατεύσει από τη νέκρωση (ή στην περίπτωση του γονιδίου *cup-5* να ενισχύσει τα ποσοστά της νέκρωσης).

Από τα πειράματα γήρανσης που πραγματοποιήθηκαν γίνεται αντιληπτό ότι η μείωση της ενεργότητας των γονιδίων *vha-10* και *vha-12* μέσω RNAi επηρεάζει αρνητικά τη διάρκεια ζωής του *C. elegans* (μείωση) ενώ η μείωση της ενεργότητας των γονιδίων *vha-2*, *cup-5*, *asp-3*, *asp-4* και *clp-1* δεν επηρεάζει σημαντικά την ζωή του *C. elegans* όσον αφορά τη διάρκειά της. Η μείωση της ενεργότητας των γονιδίων ξεκίνησε από το L4 στάδιο λόγω του ότι τα περισσότερα από τα γονίδια που εξετάστηκαν είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του οργανισμού (η απενεργοποίησή τους από το τελευταίο προνυμφικό στάδιο επιτρέπει την ολοκλήρωση της ανάπτυξης του οργανισμού φυσιολογικά, και την εξέταση της διάρκειας της ζωής του οργανισμού χωρίς πιθανές αρνητικές αναπτυξιακές επιρροές λόγω της απενεργοποίησης των γονιδίων). Σε μετέπειτα πειράματα **(4-7)** εξετάστηκε ο ρόλος των γονιδίων αυτών μέσω απενεργοποίησής τους από την αρχή της ενηλικίωσης προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα τυχόν αναπτυξιακές επιρροές λόγω της μείωσης της ενεργότητάς τους να επηρεάζουν αρνητικά τη διάρκεια ζωής. Εκτός από το στάδιο ζωής από το οποίο

ξεκίνησε το RNAi, μια άλλη παράμετρος που άλλαξε ήταν η συγκέντρωση του IPTG με το οποίο επάγεται η T7 RNA πολυμεράση για την παραγωγή του dsRNA. Έχει δειχτεί ότι αλλαγή της συγκέντρωσης της καλλιέργειας του πλασμιδιακού φορέα που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του dsRNA (Rea et al., 2007) ή αλλαγή της συγκέντρωσης του IPTG που μπορεί να οδηγήσει σε ήπια, μέτρια και ισχυρή απενεργοποίηση του γονιδίου μπορεί να έχει εντελώς αντίθετες επιδράσεις ως προς τη διάρκεια ζωής του οργανισμού. Έτσι θελήσαμε να δούμε και αν οι αρνητικές επιδράσεις της απενεργοποίησης ορισμένων γονιδίων θα μπορούσαν να αντιστραφούν μετά από ηπιότερη απενεργοποίησή τους με το RNAi. Ανεξαρτήτως της αλλαγής αυτών των παραμέτρων το αποτέλεσμα όσον αφορά τα γονίδια *vha-10* και *vha-12* ήταν το ίδιο: Η απενεργοποίησή τους μέσω RNAi επηρεάζει αρνητικά τη διάρκεια ζωής του *C. elegans*, ενώ τα υπόλοιπα γονίδια δεν φάνηκε να επηρεάζουν σημαντικά τη διάρκεια ζωής του *C. elegans* ούτε και με τις διαφοροποιημένες παραμέτρους. Το ίδιο συμπέρασμα βγαίνει και από τα μεταλλάγματα για τα γονίδια *unc-32* και *glo-1*: δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά τη διάρκεια ζωής του *C. elegans*.

Στο τρίτο τμήμα της ερευνητικής μας μελέτης, εξετάστηκε αν καθοριστές της μιτοχονδριακής λειτουργίας θα μπορούσαν να αποτελούν τμήμα του μηχανισμού νευροεκφυλισμού που επάγεται από την α-συνουκλεΐνη (έγκλειστες δομές της α-συνουκλεΐνης είναι ένα κοινό παθολογικό χαρακτηριστικό τόσο σποραδικών όσο και οικογενών περιπτώσεων της ασθένειας του Parkinson). Για αυτό το λόγο εξετάστηκε ο ρόλος του ομόλογου της ενδονουκλεάσης G στην συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης στους μύες καθώς και στο νευροεκφυλισμό. Επίσης, διερευνήθηκε αν η σπερμιδίνη μέσω του γνωστού ρόλου της στην επαγωγή της αυτοφαγίας (Eisenberg et al., 2009) μπορεί να καταστείλει τη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης. Εκτός από αυτό, διερευνήθηκε και η επίδρασή της στο νευροεκφυλισμό (που επάγεται από την α-συνουκλεΐνη στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες).

Η παρατήρηση των συσσωματωμάτων της α-συνουκλεΐνης στους μύες του σωματικού τοιχώματος του *C. elegans* έδειξε ότι η έλλειψη της ενδονουκλεάσης G δεν επηρεάζει τη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης και ο αριθμός των συσσωματωμάτων με απλή παρατήρηση δεν έδειξε να διαφέρει μεταξύ των control και των διπλά μεταλλαγμένων στελεχών που παρουσίαζαν έλλειψη της ενδονουκλεάσης G.

Όσον αφορά το νευροεκφυλισμό, μεταλλαγές στο γονίδιο *cps-6* που κωδικοποιεί την ενδονουκλεάση G προστατεύουν από εκφυλισμό τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες (CEPs) υποδεικνύοντας την ενδονουκλεάση G ως βασικό εκτελεστή του εκφυλισμού των ντοπαμινεργικών νευρώνων που επάγεται από την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης.

Η σπερμιδίνη αποτελεί μια φυσική πολυαμίνη που η ενδοκυτταρική της συγκέντρωση μειώνεται κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης γήρανσης. Η χορήγηση της σπερμιδίνης αξιοσημείωτα αυξάνει τη διάρκεια ζωής του *S. cerevisiae*, της *D. melanogaster*, του *C. elegans*, και η διαδικασία της αυτοφαγίας (η σπερμιδίνη αυξάνει τα επίπεδα της αυτοφαγίας) απαιτείται για τις επιδράσεις της σπερμιδίνης στη διάρκεια ζωής του οργανισμού (Eisenberg et al., 2009).

Με απλή παρατήρηση των ζώων η έκθεση σε σπερμιδίνη φάνηκε ότι δεν καταστέλλει την συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης στους μύες του σωματικού τοιχώματος των ζώων ενώ παράλληλα δεν προστατεύει και από εκφυλισμό τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες (CEPs). Έτσι, η σπερμιδίνη μέσω του γνωστού της ρόλου στην επαγωγή της αυτοφαγίας δεν φαίνεται να καταστέλλει την συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης στους μύες, αλλά και τον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων.

7.Υλικά και μέθοδοι

7.1 Συντήρηση και καλλιέργεια στελεχών του νηματώδους

Η καλλιέργεια στελεχών του νηματώδους (είτε διαγονιδιακών είτε μη) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κλασικές προσεγγίσεις (Brenner, 1974). Τα διάφορα στελέχη του νηματώδους καλλιεργούνταν σε NGM (Nematode Growth Medium) πιάτα (διαμέτρου 6cm) που ήταν επιστρωμένα με βακτήρια του στελέχους OP50 της *E. coli* κάτω από μη υπερπληθυσμιακές συνθήκες σε θερμοκρασία 20°C ή σε άλλη θερμοκρασία (15-25°C) ανάλογα με την πιθανή ευαισθησία των υπό εξέταση στελεχών.

NGM (Nematode Growth Medium) (για 1lt)

- 3g NaCl
- 2.5g bactopectone
- 0.2g streptomycin
 - 17g agar
 - 1ml CaCl₂ 1M
 - 1ml MgSO₄ 1M
- 1ml cholesterol (5mg/ml διαλυμένη σε 100% αιθανόλη)
- 1ml nystatin (100mg/ml διαλυμένη σε 70% αιθανόλη)
 - 25ml K·PO₄ 1M, pH 6.5

Τα διαλύματα CaCl₂, MgSO₄, και K·PO₄ προϋπάρχουν αποστειρωμένα και προστίθενται στο διάλυμα μετά από την αποστείρωσή του. Το ίδιο γίνεται και με τη cholesterol και τη nystatin (τα οποία δεν αποστειρώνονται λόγω του ότι είναι διαλυμένα σε αιθανόλη).

7.2 Πάγωμα, αποθήκευση και ανάκτηση στελεχών του νηματώδους

Ο *C. elegans* μπορεί να καταψυχθεί και να αποθηκευτεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (-80°C ή ακόμη και -196°C στο υγρό άζωτο) (Brenner, 1974). Η διατήρηση στελεχών του νηματώδους επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλων διαλυμάτων που περιέχουν γλυκερόλη (freezing solution). Οι παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψιν προκειμένου να επιτευχθεί ένα καλό πάγωμα αφορούν την καλή κατάσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται αλλά προπαντός την κατάλληλη κατάσταση των ζώων που πρόκειται να παγωθούν (αναπτυξιακό στάδιο). Έτσι, λάρβες 1^{ου} και 2^{ου} προνυμφικού σταδίου επιβιώνουν καλύτερα μετά το πάγωμα σε αντίθεση με άτομα των υπόλοιπων αναπτυξιακών σταδίων.

Η ανάκτηση στελεχών του νηματώδους που έχουν παγωθεί σε υγρό άζωτο (-196°C) μπορεί να κυμαίνεται από 35-45%, ποσοστό το οποίο μπορεί να μειωθεί ελαφρά μετά το πέρασμα κάποιων χρόνων. Η απόδοση επιβίωσης στελεχών μετά από πάγωμα και μόνιμη αποθήκευση στους -80°C είναι λίγο μικρότερη ωστόσο αυτή η προσέγγιση είναι πολύ καλή και ασφαλής για την αποθήκευση στελεχών του νηματώδους για κάποια χρόνια.

Υλικά

<u>M9 buffer</u>	<u>Freezing Solution</u>
<ul style="list-style-type: none"> • 3g KH_2PO_4 • 6g Na_2HPO_4 • 5g NaCl • 1ml 1M MgSO_4 • x ml ddH₂O up to $V_{\text{TEΛ}}=1\text{lt}$ 	<ul style="list-style-type: none"> • 5.85g NaCl • 50ml 1M KPO_4 (pH 6.0) • 300g (~200ml) glycerol • x ml ddH₂O up to $V_{\text{TEΛ}}=1\text{lt}$

Το pH του M9 buffer πρέπει να είναι 7.0.

- Λήψη 5 NGM πιάτων επιστρωμένων με φαγητό (OP50) (τα πιάτα φροντίζονται να είναι πρόσφατα επιστρωμένα με «φρέσκο» φαγητό).
- Τοποθέτηση 5 ατόμων L4 προνυμφικού σταδίου σε κάθε ένα από αυτά (ο αριθμός ατόμων μπορεί να ποικίλλει και να είναι μεγαλύτερος ανάλογα με το αναπαραγωγικό δυναμικό του κάθε στελέχους).
- Επώαση των καλλιιεργειών στους 20°C.
- Παρατήρηση των πιάτων. Η επιθυμητή κατάσταση στην οποία πρέπει να βρίσκονται οι καλλιέργειες των πληθυσμών είναι να έχουν προχωρήσει 2 γενιές. Δηλαδή οι απόγονοι στην F1 γενιά να έχουν δώσει με την σειρά τους απογόνους (F2 γενιά) οι οποίοι να βρίσκονται στο L1-L2 προνυμφικό στάδιο.
- Προετοιμασία 10 cryovials και τοποθέτησή τους στον πάγο (επίσης λήψη ενός falcon 15ml και τοποθέτησή του στον πάγο).
- Συλλογή των σκουληκιών με 9ml M9 buffer (με τη χρήση γυάλινης πιπέτας) («ξέπλυμα πιάτων») και μεταφορά τους στο falcon.
- Μετά την μεταφορά στο falcon, ο όγκος διαλύματος έχει μειωθεί σε ~7.5ml.
- Προσθήκη ίσου όγκου freezing solution και καλή ανάδευση.
- Διαμοιρασμός στα 10 cryovials.
- Τοποθέτηση των cryovials στους -80°C.
- Μετά το πέρασμα κάποιου χρονικού διαστήματος (>2 εβδομάδες) πραγματοποιείται παρατήρηση της βιωσιμότητας του εκάστοτε στελέχους προκειμένου να εξετασθεί η αποτελεσματικότητα του παγώματος. Αυτό που πρέπει να παρατηρείται είναι η ανάκτηση μεγάλου αριθμού ατόμων L1-L2 προνυμφικού σταδίου. Αν δεν παρατηρείται μεγάλο ποσοστό ανακτώμενων ζωντανών ατόμων αυτών των σταδίων, τότε πραγματοποιείται εξ αρχής νέο πάγωμα του στελέχους.

7.3 Γενετικές διασταυρώσεις

Για το σχηματισμό διπλά μεταλλαγμένων στελεχών αλλά και την παρατήρηση μετασχηματισμένων ατόμων σε μεταλλαγμένο γενετικό υπόβαθρο πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις ανάμεσα στα αντίστοιχα στελέχη ή στελέχη και διαγονιδιακά άτομα (Ward, 1979; Loer, 1993; Liu, 1995). Η επιλογή του στελέχους απ' όπου θα χρησιμοποιηθούν αρσενικά άτομα γίνεται με βάση την ικανότητα ζευγαρώματος (mating). Από τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν κανένα δεν παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα ζευγαρώματος. Η πειραματική διαδικασία των διασταυρώσεων καθώς και οι φαινότυποι πάνω στους οποίους στηρίχτηκε η επιτέλεσή τους περιγράφεται αναλυτικά για το κάθε στέλεχος παρακάτω.

7.3.1 Αρσενικά άτομα

Τα αρσενικά άτομα έχουν γονότυπο ΧΟ και προκύπτουν από το μη αποχωρισμό των φυλετικών αδελφών χρωματίδων κατά τις μειωτικές διαιρέσεις των γαμετικών κυττάρων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η συχνότητα εμφάνισής τους είναι περίπου 1‰ ενώ το ποσοστό αυτό αυξάνεται υπό συνθήκες στρες. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Λήψη 5 NGM πιάτων επιστρωμένων με φαγητό (OP50) (τα πιάτα φροντίζονται να είναι πρόσφατα επιστρωμένα με «φρέσκο» φαγητό).
- Τοποθέτηση 5 ερμαφρόδιτων ατόμων L4 προνυμφικού σταδίου σε κάθε ένα από αυτά (ο αριθμός ατόμων μπορεί να ποικίλλει και να είναι μεγαλύτερος ανάλογα με το αναπαραγωγικό δυναμικό του κάθε στελέχους).
- Επώαση των καλλιέργειών στους 34°C για 5 ώρες.

- Τοποθέτηση των πιάτων σε φυσιολογική θερμοκρασία (15-25°C) ανάλογα με το εκάστοτε στέλεχος.
- Εύρεση και λήψη αρσενικών ατόμων από τους απογόνους των αρχικών ατόμων.

Για τη συντήρηση καλλιεργειών αρσενικών ατόμων του εκάστοτε στελέχους, λαμβάνονται αρσενικά και θηλυκά άτομα του στελέχους (η αναλογία των αρσενικών προς τα ερμαφρόδιτα άτομα είναι 3:1 όπως συνήθως και στις διασταυρώσεις) και αφήνονται τα πιάτα στους 15°C όπου και διασταυρώνονται αρσενικά με ερμαφρόδιτα άτομα του ίδιου στελέχους και προέρχονται αρσενικοί απόγονοι (ο αριθμός τους είναι μεγάλος μέσα στο πιάτο).

Όσον αφορά τις γενετικές διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν στις πειραματικές μας μελέτες, δημιουργήθηκαν αρσενικά άτομα των στελεχών *mec-4(d)*, *deg-3(d)* και *cps-6(ok1718)*.

7.3.2 Γενετικές διασταυρώσεις

Κάθε διασταύρωση πραγματοποιήθηκε σε πιάτα όπου μια μικρή μόνο επιφάνειά της ήταν καλυμμένη με βακτήρια ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα συνεύρεσης των ατόμων. Εκεί τοποθετήθηκαν αρσενικά και ερμαφρόδιτα άτομα σε αναλογία (3/8). Για να θεωρηθεί μια διασταύρωση επιτυχημένη παρατηρούνται τα άτομα της γενιάς F1 στα οποία το ποσοστό των αρσενικών ατόμων πρέπει να είναι περίπου 50%. Από την γενιά F1 παίρνουμε 5 ερμαφρόδιτα άτομα και τα τοποθετούμε ξεχωριστά σε νέα πιάτα όπου και αφήνουν αυγά. Τα άτομα αυτά θα πρέπει να είναι όλα ετερόζυγα για την κάθε μεταλλαγή και στην περίπτωση που αυτές είναι υποτελείς θα πρέπει να έχουν φαινότυπο αγρίου τύπου. Από τα άτομα της γενιάς F2 τα ομόζυγα και για τις δυο μεταλλαγές προκύπτουν σε αναλογία 1/16 καθώς η κληρονομικότητα

ακολουθεί Μεντελιανό πρότυπο. Ο έλεγχος για την εκάστοτε μεταλλαγή γίνεται είτε μέσω του φαινοτύπου είτε μέσω αντίδρασης PCR όταν η μεταλλαγή είναι μια έλλειψη που δεν προκαλεί μορφολογικές ή ανατομικές ανωμαλίες. Όσον αφορά τον φαινότυπο του στελέχους *mec-4(d)* αυτός αφορά την απόκριση του στελέχους σε gentle body touch (περιγραφή παρακάτω). Όσον αφορά το *deg-3(d)* στέλεχος, αυτό φαινοτυπικά σέρνει την ουρά του (η μεγάλη πλειοψηφία των ατόμων, όπως έχει προκύψει από πειραματικές παρατηρήσεις). Στην περίπτωση διασταυρώσεων με διαγονιδιακά άτομα η επιλογή γίνεται με βάση το δείκτη μετασχηματισμού (cotransformation marker).

Αναλυτικά οι διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν περιγράφονται παρακάτω.

7.3.2.1 *daf-2(e1370)III; mec-4(u231)X, daf-2(e1368)III; mec-4(u231)X, daf-2(e1370)III; deg-3(u662)V*

Ο φαινότυπος στον οποίο θα στηριχτούμε για τα *daf-2* μεταλλαγμένα στελέχη (*e1368* και *e1370* αλληλόμορφα) κατά την διασταύρωσή τους με το *mec-4(u231)X* και με το *deg-3(u662)V* στέλεχος είναι ο σχηματισμός dauer μορφών. Με βάση την βιβλιογραφία η επώαση αυγών και προνυμφών μικρών σταδίων L1 και L2 των *daf-2* μεταλλαγμένων στελεχών στους 25°C οδηγεί όλα τα άτομα (penetrance φαινοτύπου=100%) στο να ακολουθήσουν το dauer εναλλακτικό μονοπάτι (στους 20°C, θεωρητικά, το 15% ακολουθεί το dauer μονοπάτι). Για να το τσεκάρουμε αυτό και να το συγκρίνουμε με το N2, το *mec-4(d)* και το *deg-3(d)* μεταλλαγμένο στέλεχος πραγματοποιήσαμε την εξής διαδικασία:

- Λήψη 10 gravid adult ατόμων από τους 15°C (ή από τους 20°C για τα άλλα δύο στελέχη)
- Τοποθέτησή τους για 4 ώρες στους 20°C προκειμένου να αφήσουν αυγά.

- Αφαίρεση των ενήλικων ατόμων από τα πιάτα.
- Τοποθέτηση των πιάτων με τα αυγά στους 25°C (Day 0).
- Κατά την 3^η ημέρα μετά την τοποθέτηση των πιάτων με τα αυγά στους 25°C, τα πιάτα εξετάζονται για να διαπιστωθεί το ποσοστό του συνόλου των ατόμων που έχουν γίνει dauers.

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε για τα στελέχη N2, *mec-4(u231)X*, *daf-2(e1370)III*, *deg-3(u662)V*. Όσον αφορά τα στελέχη N2, *mec-4(u231)X*, και *deg-3(u662)V* το σύνολο των ατόμων βρισκόταν στο ενήλικο στάδιο (N=50-60), ενώ όσον αφορά το *daf-2* μεταλλαγμένο στέλεχος, όλα τα άτομα είχαν γίνει dauers (N=53).

daf-2(e1370)III; mec-4(u231)X

- 1) Cross με την χρήση 8 ♂ ατόμων του *mec-4(u231)X* στελέχους και 3 ♀ L4 ατόμων του *daf-2(e1370)III* στελέχους (20°C).
- 2) Όταν τα ερμαφρόδιτα άτομα αρχίσουν να αφήνουν αυγά, αφαιρούμε τα αρσενικά άτομα από το πιάτο της διασταύρωσης.
- 3) Σηκώνουμε 5-6 F1 άτομα και τοποθέτηση ατομικά σε πιάτα (θεωρητικά πρέπει να είναι ετερόζυγα για τα δύο γονίδια αν έχει πραγματοποιηθεί η διασταύρωση). Βλέπουμε την ύπαρξη αρσενικών ατόμων στο πιάτο.
- 4) Αφήνουμε να δώσουν όλους τους απογόνους τους.
- 5) Από τα πιάτα με τους F2 απογόνους σηκώνω 35-40 young adult άτομα (1/16 θεωρητικά είναι ομόζυγος διπλά μεταλλαγμένος με βάση τον κλασσικό διϋβριδισμό) τα οποία είναι insensitive (με τρίχα) και τα βάζω ατομικά σε πιάτα. Αφήνω τα F2 άτομα να δώσουν όλους τους απογόνους τους.
- 6) Όταν γίνουν τα F3 άτομα young adult ελέγχουμε με τρίχα για touch sensitivity (ελέγχουμε όλα τα σκουλήκια, και κυρίως αυτά που βρίσκονται έξω από το στρώμα των βακτηρίων).

- 7) Τα πιατάκια που θα έχω δει όλα να είναι touch insensitive, τα κρατάω σαν υποψήφια MEC (υποθέτω ότι το F2 άτομο που άφησα να δώσει τους F3 απογόνους ήταν ομόζυγο *mec-4(d)*).
- 8) Από το κάθε πιατάκι που είναι υποψήφιο ομόζυγο *mec-4(d)* σηκώνω 2 απογόνους (αν έχω 6-7 υποψήφια) και τους βάζω single σε πιάτα όπου θα τους αφήσω να δώσουν την F4 γενιά. Θα τσεκάρω την F4 γενιά για touch sensitivity με τρίχα και αφού βεβαιωθώ ότι όλα είναι insensitive, θα πάρω young adult άτομα (εναλλακτικά μπορώ να πάρω F4 αυγά ~15 σε κάθε πιάτο και επώαση στους 25°C) και θα τα βάλω στους 25°C να αφήσουν αυγά. Τα πιάτα που όλα θα γίνουν dauers (F5 γενιά) είναι υποψήφια ομόζυγα και για τα δύο μεταλλαγμένα αλληλόμορφα (προέρχονται από ομόζυγο άτομο για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του *daf-2* γονιδίου και είναι και υποψήφια MEC) (υποψήφια MEC+DAF).
- 9) Συνεπώς θα καταλήξω σε κάποια που είναι υποψήφια MEC+DAF.
- 10) Για να είμαστε σίγουροι ότι είναι MEC, θα πάρω 15 άτομα (single) και θα τα αφήσω να δώσουν απογόνους. Πρέπει και από τα 15 πιατάκια να βρω έστω και 1 σκουλήκι με vacuoles για να είναι το αρχικό ομόζυγο MEC.

daf-2(e1368)III; mec-4(u231)X

Η ίδια διαδικασία με την παραπάνω ακολουθήθηκε και για την δημιουργία του διπλά μεταλλαγμένου στελέχους *daf-2(e1368)III; mec-4(u231)X*.

daf-2(e1370)III; deg-3(u662)V

- 1) Cross με την χρήση 16 ♂ ατόμων του *deg-3(u662)V* στελέχους και 4 ♀ L4 ατόμων του *daf-2(e1370)III* στελέχους (20°C).
- 2) Όταν τα ερμαφρόδιτα άτομα αρχίσουν να αφήνουν αυγά, αφαιρούμε τα αρσενικά άτομα από το πιάτο της διασταύρωσης.

- 3) Σηκώνουμε 5-6 F1 άτομα και τοποθέτηση ατομικά σε πιάτα (θεωρητικά πρέπει να είναι ετερόζυγα για τα δύο γονίδια αν έχει πραγματοποιηθεί η διασταύρωση). Βλέπουμε την ύπαρξη αρσενικών ατόμων στο πιάτο.
- 4) Αφήνουμε να δώσουν όλους τους απογόνους τους.
- 5) Από τα πιάτα με τους F2 απογόνους σηκώνω 35-40 young adult άτομα (1/16 θεωρητικά είναι ομόζυγος διπλά μεταλλαγμένος με βάση τον κλασσικό διύβριδισμό) τα οποία σέρνουν την ουρά τους και τα βάζω ατομικά σε πιάτα. Αφήνω τα F2 άτομα να δώσουν όλους τους απογόνους τους.
- 6) Όταν γίνουν τα F3 άτομα young adult ελέγχουμε όλα τα σκουλήκια μέσα στο πιάτο για το αν σέρνουν την ουρά τους (ελέγχουμε όλα τα σκουλήκια, και κυρίως αυτά που βρίσκονται έξω από το στρώμα των βακτηρίων).
- 7) Τα πιατάκια που θα έχω δει όλα να σέρνουν την ουρά τους (δύσκολο γιατί ο φαινότυπος δεν είναι 100% penetrant), τα κρατάω σαν υποψήφια DEG (υποθέτω ότι το F2 άτομο που άφησα να δώσει τους F3 απογόνους ήταν ομόζυγο *deg-3(d)*).
- 8) Από το κάθε πιατάκι που είναι υποψήφιο ομόζυγο *deg-3(d)* σηκώνω 10-15 F3 απογόνους από τα πιο καλά μου πιάτα με φαινότυπο DEG και τους βάζω ατομικώς σε πιάτα όπου θα τους αφήσω να δώσουν αυγά (σήκωσα 10 single άτομα). Όταν τα ζώα αφήσουν λίγα αυγά, θα σηκώσω L1 άτομα και θα τα τσεκάρω για vacuoles. Τα ζώα που από όλα τα πιάτα έχω δει έστω κι ένα άτομο σε κάθε πιάτο να έχει vacuoles είναι υποψήφια DEG. Έπειτα επιστρέφω στο αρχικό πιάτο με τα F3 ζώα και θα σηκώσω ανάλογα με τον αριθμό των υποψήφιων DEG, single young adult άτομα (τα πιο νεαρά που θα μου δώσουν έτσι σημαντικό αριθμό αυγών). Θα τσεκάρω την F4 γενιά για σύρσιμο ουράς ενώ παράλληλα θα έχω πάρει 10-15 αυγά από το κάθε πιάτο για να δω από ποιο πιάτο θα γίνουν όλα dauers. Αυτά που θα γίνουν όλα dauers είναι υποψήφια DAF και DEG. Θα αφήσω τα αρχικά πιάτα από τα οποία πήρα τα αυγά να προχωρήσουν και αφού βεβαιωθώ ότι όλα σέρνουν την ουρά τους, θα πάρω young adult

άτομα (single) και θα τα αφήσω να δώσουν απογόνους. Πρέπει και από τα 15 πιατάκια να βρω έστω και 1 σκουλήκι με vacuoles για να είναι το αρχικό ομόζυγο DEG.

9) Συνεπώς θα καταλήξω σε κάποια που είναι DEG+DAF.

7.3.2.2 *eat-2(ad465)II; mec-4(u231)X*

Ο φαινότυπος στον οποίο θα στηριχτούμε για το *eat-2* μεταλλαγμένο στέλεχος κατά την διασταύρωσή του με το *mec-4(u231)X* στέλεχος είναι το pharyngeal rumping. Με βάση την βιβλιογραφία τα Eat μεταλλάγματα παρουσιάζουν προβλήματα στην λειτουργία του φάρυγγα. Το *eat-2(ad465)* μεταλλαγμένο στέλεχος, παρουσιάζει ελαττωμένο αλλά φυσιολογικό pharyngeal rumping και παρατηρώντας πιάτα καλλιέργειών είναι εμφανής η λιγότερη ποσότητα τροφής που καταναλώνει το στέλεχος, ενώ η εμφάνισή του είναι σαν starved. Για να το τσεκάρουμε αυτό και να το συγκρίνουμε με το N2 και το *mec-4(d)* μεταλλαγμένο στέλεχος πραγματοποιήσαμε την εξής διαδικασία:

- Λήψη 10-20 gravid adult ατόμων από τα φυσιολογικά πιάτα καλλιέργειών στους 20°C (ή από συγχρονισμένες καλλιέργειες).
- Μεταφορά σε νέα NGM πιάτα με OP50.
- Τα αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου (22-24°C) για περίπου 10-20min.
- Παρατήρηση κάτω από το στερεοσκόπιο και μέτρηση των παλμών του φάρυγγα για 10sec (έπειτα υπολογισμός με αναγωγή στο 1min). Πραγματοποίηση 4-5 μετρήσεων για κάθε άτομο.

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε για τα στελέχη N2, *mec-4(u231)X* και *eat-2(ad465)*. Όσον αφορά τα στελέχη N2 και *mec-4 (u231)X*, οι παλμοί του φάρυγγα κατά την παρατήρηση των ατόμων ήταν πάνω από 30/10sec και δεν ήταν δυνατή η μέτρησή τους με

απλή παρατήρηση κάτω από το στερεοσκόπιο λόγω της ταχύτητάς τους. Αντίθετα το *eat-2(ad465)* παρουσιάζει κατά μέσο όρο pharyngeal pumping με ρυθμό περίπου 10 παλμούς/10sec. Επίσης, θα πρέπει η παρατήρηση των ζώων να γίνεται πολύ προσεκτικά και για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

eat-2(ad465)II; mec-4(u231)X

- 1) Cross με την χρήση 16 ♂ ατόμων του *mec-4(u231)X* στελέχους και 4 ♀ L4 ατόμων του *eat-2(ad465)* στελέχους (20°C).
- 2) Όταν τα ερμαφρόδιτα άτομα αρχίσουν να αφήνουν αυγά, αφαιρούμε τα αρσενικά άτομα από το πιάτο της διασταύρωσης.
- 3) Σηκώνουμε 5-6 F1 άτομα και τοποθέτηση ατομικά σε πιάτα (θεωρητικά πρέπει να είναι ετερόζυγα για τα δύο γονίδια αν έχει πραγματοποιηθεί η διασταύρωση). Βλέπουμε την ύπαρξη αρσενικών ατόμων στο πιάτο.
- 4) Αφήνουμε να δώσουν όλους τους απογόνους τους.
- 5) Από τα πιάτα με τους F2 απογόνους σηκώνω 35-40 young adult άτομα (1/16 θεωρητικά είναι ομόζυγος διπλά μεταλλαγμένος με βάση τον κλασσικό διϋβριδισμό) τα οποία είναι insensitive (με τρίχα) και τα βάζω ατομικά σε πιάτα. Αφήνω τα F2 άτομα να δώσουν όλους τους απογόνους τους.
- 6) Όταν γίνουν τα F3 άτομα young adult ελέγχουμε με τρίχα για touch sensitivity (ελέγχουμε όλα τα σκουλήκια, και κυρίως αυτά που βρίσκονται έξω από το στρώμα των βακτηρίων).
- 7) Τα πιατάκια που θα έχω δει όλα να είναι touch insensitive, τα κρατάω σαν υποψήφια MEC (υποθέτω ότι το F2 άτομο που άφησα να δώσει τους F3 απογόνους ήταν ομόζυγο *mec-4(d)*).
- 8) Από το κάθε πιατάκι που είναι υποψήφιο ομόζυγο *mec-4(d)* σηκώνω 2 απογόνους οι οποίοι παρουσιάζουν ταυτόχρονα και αργό pharyngeal pumping (αν έχω 6-7 υποψήφια) και τους βάζω single σε πιάτα όπου θα τα αφήσω να δώσουν την F4 γενιά. Θα τσεκάρω την F4 γενιά

για touch sensitivity με τρίχα αλλά και για slow pharyngeal pumping και θα βεβαιωθώ ότι όλα είναι insensitive και παρουσιάζουν slow pharyngeal pumping.

- 9) Συνεπώς θα καταλήξω σε κάποια που είναι υποψήφια MEC+EAT.
- 10) Για να είμαστε σίγουροι ότι είναι MEC, θα πάρω 15 άτομα (single) και θα τα αφήσω να δώσουν απογόνους (F5). Πρέπει και από τα 15 πιατάκια να βρω έστω και 1 σκουλήκι με vacuoles για να είναι το αρχικό ομόζυγο MEC.

7.3.2.3 *ife-2(ok306)X; mec-4(u231)X*

Ο φαινότυπος στον οποίο θα στηριχτούμε για το *ife-2* μεταλλαγμένο στέλεχος κατά την διασταύρωσή του με το *mec-4(u231)X* είναι η εμβρυϊκή θνησιμότητα (embryonic lethality). Με βάση την βιβλιογραφία (Syntichaki et al., 2007) το *ife-2* μεταλλαγμένο στέλεχος παρουσιάζει υψηλό ποσοστό εμβρυϊκής θνησιμότητας στους 25°C (ποσοστό μεγαλύτερο από 90% των αυγών που αφήνει ένα άτομο κατά την συνεχή επώαση του στους 25°C –η οποία ξεκινάει από το L1 προνυμφικό στάδιο- αποτυγχάνουν να εκκολαφθούν και πεθαίνουν). Για να τσεκάρουμε αυτόν τον φαινότυπο και να τον συγκρίνουμε με το N2 και το *mec-4(d)* μεταλλαγμένο στέλεχος πραγματοποιήσαμε την εξής διαδικασία. Αυτό που κάναμε ήταν να αντί να μετρήσουμε τον αριθμό των αυγών που αποτυγχάνουν να εκκολαφθούν, μετρήσαμε τον αριθμό των απογόνων που αφήνει ένα άτομο στο πιάτο και οι οποίοι αναπτύσσονται. Η διαδικασία που ακολουθήσαμε ήταν η εξής:

- Λήψη 1 L1 ατόμου από το εκάστοτε στέλεχος και μεταφορά σε ένα πιάτο NGM με OP50 (Day=0)
- Συνεχής επώαση στους 25°C
- Μέτρηση κατά την 4^η ή 5^η μέρα του αριθμών των απογόνων που έχουν επιβιώσει και αναπτυχθεί

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε για τα στελέχη N2, *mec-4(u231)X* και KX15 *ife-2(ok306)X*.

ife-2(ok306)X; mec-4(u231)X

- 1) Cross με την χρήση 16 ♂ ατόμων του *mec-4(u231) X* στελέχους και 4 ♀ L4 ατόμων του KX15 *ife-2(ok306) X* στελέχους (20°C).
- 2) Όταν τα ερμαφρόδιτα άτομα αρχίσουν να αφήνουν αυγά, αφαιρούμε τα αρσενικά άτομα από το πιάτο της διασταύρωσης.
- 3) Σηκώνουμε 5-6 F1 άτομα και τοποθέτηση ατομικά σε πιάτα (θεωρητικά πρέπει να είναι ετερόζυγα για τα δύο γονίδια αν έχει πραγματοποιηθεί η διασταύρωση). Βλέπουμε την ύπαρξη αρσενικών ατόμων στο πιάτο.
- 4) Αφήνουμε να δώσουν όλους τους απογόνους τους.
- 5) Από τα πιάτα με τους F2 απογόνους σηκώνω 50-60 young adult άτομα (<1/16 στους θεωρητικά είναι ομόζυγος διπλά μεταλλαγμένος με βάση τον κλασσικό διυβριδισμό λόγω του ότι τα δύο γονίδια βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα –έχουμε ελέγξει την μεταξύ τους απόσταση στον γενετικό χάρτη και είναι ~44cM οπότε θεωρούμε ότι δρουν ως ανεξάρτητα και ότι δεν θα υπάρχει πρόβλημα) τα οποία είναι insensitive (με τρίχα) και τα βάζω single σε πιάτα. Αφήνω τα F2 άτομα να δώσουν όλους τους απογόνους τους
- 6) Όταν γίνουν τα F3 άτομα young adult ελέγχουμε με τρίχα για touch sensitivity (ελέγχουμε όλα τα σκουλήκια, και κυρίως αυτά που βρίσκονται έξω από το στρώμα των βακτηρίων)
- 7) Τα πιατάκια που θα έχω δει όλα να είναι touch insensitive, τα κρατάω σαν υποψήφια MEC (υποθέτω ότι το F2 άτομο που άφησα να δώσει τους F3 απογόνους ήταν ομόζυγο *mec-4(d)*)
- 8) Από το κάθε πιατάκι που είναι υποψήφιο ομόζυγο *mec-4(d)* σηκώνω 2 απογόνους (αν έχω 6-7 υποψήφια) και τους βάζω single σε πιάτα όπου θα τους αφήσω να δώσουν την F4 γενιά. Θα τσεκάρω την F4 γενιά για touch sensitivity με τρίχα και αφού βεβαιωθώ ότι όλα είναι

insensitive, θα πάρω L1 άτομα (1-2 άτομα) και θα τα βάλω στους 25°C να αφήσουν αυγά. Τα πιάτα που θα αφήσουν πολύ λίγους απογόνους λόγω του μεγάλου ποσοστού εμβρυϊκής θνησιμότητας που χαρακτηρίζει το στέλεχος (F5 γενιά) είναι υποψήφια ομόζυγα και για τα δύο μεταλλαγμένα αλληλόμορφα (προέρχονται από ομόζυγο άτομο για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του *ife-2* γονιδίου και είναι και υποψήφια MEC) (υποψήφια MEC+IFE)

- 9) Συνεπώς θα καταλήξω σε κάποια που είναι υποψήφια MEC+IFE
- 10) Για να είμαστε σίγουροι ότι είναι MEC, θα πάρω 15 άτομα (single) και θα τα αφήσω να δώσουν απογόνους. Πρέπει και από τα 15 πιατάκια να βρω έστω και 1 σκουλήκι με vacuoles για να είναι το αρχικό ομόζυγο MEC

7.3.2.4 *cps-6(ok1718)I; baln11[p_{dat-1}::α-Syn, p_{dat-1}::GFP], cps-6(ok1718)I, baln12[p_{unc-54}::α-Syn::GFP, rol-6(su1006)]*

Το αλληλόμορφο *ok1718* του γονιδίου *cps-6* περιλαμβάνει μια έλλειψη (deletion) 676bp. Για αυτό το σκοπό ο έλεγχος για να δείχτεί αν το διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος είναι ομόζυγο θα στηριχτεί σε PCR (κι όχι σε κάποιο φαινότυπο) για τη διαπίστωση της ομοζυγωτίας της έλλειψης. Το σετ των primers που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω:

***cps-6 ok1718del* FW: 5' CGCGATAAGTGGGAATGATTTGG 3' (forward)**
***cps-6 ok1718del* RV: 5' AGCTGTTGCTGAGGAGAAAG 3' (reverse)**

Το αγρίου τύπου PCR προϊόν έχει μήκος 1117bp, ενώ το προϊόν που φέρει την έλλειψη έχει μήκος 441bp αντίστοιχα.

Οι συνθήκες του προγράμματος PCR (single worm PCR) που εφαρμόστηκαν για τον εντοπισμό της έλλειψης στο αλληλόμορφο *ok1718* του γονιδίου *cps-6* περιγράφονται παρακάτω:

<i>cps-6(ok1718) deletion</i>
1) 94°C για 2min
2) 94°C για 30sec
3) 62°C για 45sec
4) 72°C για 1min 30sec
5) 2 cycles of steps 2,3,4
6) 94°C για 20sec
7) 60°C για 45sec
8) 72°C για 1min 30sec
9) 2 cycles of steps 6,7,8
10) 94°C για 20sec
11) 58°C για 45sec
12) 72°C για 1min 45sec
13) 29 cycles of steps 10,11,12
14) 72°C για 10min

cps-6(ok1718)I; baln11[p_{dat-1}::α-Syn, p_{dat-1}::GFP]

- 1) Cross με την χρήση 8 ♂ ατόμων του VC1253 *cps-6(ok1718)I* στελέχους και 3 L4 ατόμων του UA44 *baln11[p_{dat-1}::α-Syn, p_{dat-1}::GFP]* στελέχους (20°C).
- 2) Όταν τα ερμαφρόδιτα άτομα αρχίσουν να αφήνουν αυγά, αφαιρούμε τα αρσενικά άτομα από το πιάτο της διασταύρωσης.
- 3) Σηκώνουμε 5-6 F₁ άτομα των οποίων οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες φθορίζουν, και τοποθέτηση ως singles σε πιάτα. Τα άτομα αυτά είναι είτε ομόζυγα είτε ετερόζυγα για το transgene που

εκφράζει την GFP και την α -synuclein στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Βλέπουμε την ύπαρξη αρσενικών ατόμων στο αρχικό πιάτο της διασταύρωσης για να δούμε αν έχει παίξει το cross.

- 4) Αφήνουμε τα F_1 άτομα να δώσουν όλους τους απογόνους τους (F_2).
- 5) Από τα πιάτα με τους F_2 απογόνους σηκώνω ~40 young adult άτομα των οποίων οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες φθορίζουν (είναι είτε ομόζυγα είτε ετερόζυγα για το transgene). Τα βάζω single σε πιάτα και αφήνω να δώσουν αριθμό αυγών.
- 6) Όταν γίνει αυτό, τα παίρνω (τις μητέρες) και κάνω single worm PCR για να δω αν είναι ομόζυγα για το deletion του αλληλομόρφου *ok1718* στο γονίδιο *cps-6*.
- 7) Για όποια από τα πιάτα οι μητέρες είναι ομόζυγες για το deletion στο *cps-6* γονίδιο, τα κρατάω. Αυτό που έκανα εγώ ήταν ότι θεώρησα ότι τα αρχικά άτομα που φθόριζαν ήταν ομόζυγα για το integrated transgene, ενώ η GFP είναι dominant marker. Συνεπώς στην πραγματικότητα ήταν είτε ετερόζυγα είτε ομόζυγα, γι' αυτό έβλεπα και άτομα που δεν έκφραζαν GFP στους ντοπαμινεργικούς τους νευρώνες. Από τα πιάτα που κράτησα και θεώρησα ότι είναι ομόζυγα για το deletion του *cps-6*, πήρα 5-10 άτομα και τα τσέκαρα για το deletion. Έτσι επιβεβαίωσα ότι ήταν ομόζυγα γι' αυτό.
- 8) Από τις ανανεώσεις των πιάτων όπου είχα επιλέξει και δει ότι παίρνοντας 5-10 άτομα από αυτά ήταν ομόζυγα για το deletion με single worm PCR (αλλά δεν φθόριζαν όλα λόγω της ετεροζυγωτίας) πήρα 40 άτομα και τα έβαλα single σε πιάτα. Τα άφησα να δώσουν τους απογόνους τους, και τσέκαρα να δω σε ποια από τα πιάτα φθόριζαν όλα τα άτομα. Επέλεξα 5 isolates (από αυτά χρησιμοποίησα τα δύο πρώτα στα πειράματα), τα οποία και επανέλεγα για να δω αν είναι ομόζυγα για το deletion του *cps-6* (πήρα άτομα και έκανα single worm PCR). Την διαδικασία αυτή την ακολούθησα για δύο γενιές ούτως ώστε να επιβεβαιώσω ότι ήταν διπλά ομόζυγα για το deletion του *cps-6* και για το integrated transgene.

cps-6(ok1718)I, balnI2[p_{unc-54}::α-Syn::GFP, rol-6(su1006)]

- 1) Cross με την χρήση 8 ♂ ατόμων του VC1253 *cps-6(ok1718)I* στελέχους και 3 L₄ ατόμων του UA49 *balnI2[p_{unc-54}::α-Syn::GFP, rol-6 (su1006)]* στελέχους (20°C).
- 2) Όταν τα ερμαφρόδιτα άτομα αρχίσουν να αφήνουν αυγά, αφαιρούμε τα αρσενικά άτομα από το πιάτο της διασταύρωσης
- 3) Σηκώνουμε 5-6 F₁ άτομα τα οποία είναι rollers και φθορίζουν στους μύες τους και τοποθέτηση ως singles σε πιάτα. Βλέπουμε την ύπαρξη αρσενικών ατόμων στο αρχικό πιάτο της διασταύρωσης για να δούμε αν έχει παίξει το cross.
- 4) Αφήνουμε τα F₁ άτομα να δώσουν όλους τους απογόνους τους (F₂).
- 5) Από τα πιάτα με τους F₂ απογόνους σηκώνω ~40 young adult άτομα τα οποία είναι rollers και φθορίζουν στους μύες τους. Τα βάζω single σε πιάτα και αφήνω να δώσουν αριθμό αυγών.
- 6) Όταν γίνει αυτό, τα παίρνω (τις μητέρες) και κάνω single worm PCR για να δω αν είναι ομόζυγα για το deletion του *cps-6(ok1718)I*.
- 7) Για όποια από τα πιάτα οι μητέρες είναι ομόζυγες για το deletion στο *cps-6* γονίδιο, τα κρατάω.
- 8) Παρατήρησα τα πιάτα από αυτά που οι μητέρες ήταν ομόζυγες για το deletion (και αφού είχα σηκώσει 10 άτομα από το κάθε πιάτο και είχα τσεκάρει με PCR ότι ήταν ομόζυγα για το deletion του *cps-6*), είδα ότι σε ένα πιάτο όλα τα άτομα φθόριζαν στους μύες τους. Έτσι, πιθανόν αυτό το isolate να είναι το επιθυμητό διπλά ομόζυγο για το transgene και για το deletion του *cps-6*. Το επιβεβαίωσα ακολουθώντας την ίδια διαδικασία (single worm PCR και παρατήρηση στο UV) για άλλη μια γενιά.

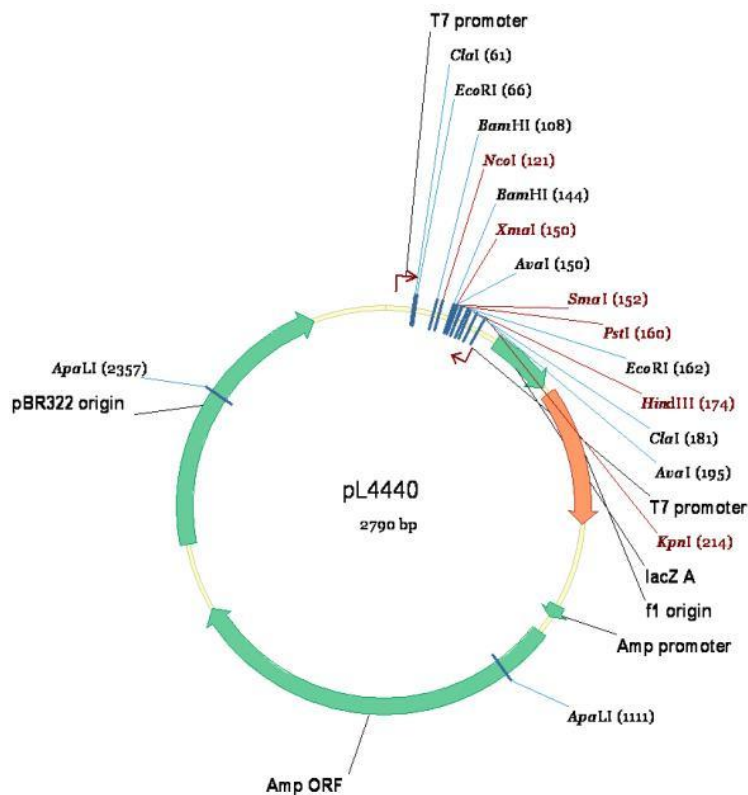
7.4 Προετοιμασία δείγματος για παρατήρηση και μέτρηση νεκρωτικών κυττάρων

- 1) Από φυσιολογικά πιάτα καλλιέργειών, λήψη 40-50 ενήλικων ατόμων (μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τον αριθμό αυγών που αποθέτει το κάθε στέλεχος) και τοποθέτησή τους σε νέα πιάτα προκειμένου να αφήσουν αυγά.

- 2) Όταν την επόμενη μέρα το πιάτο έχει σημαντικό αριθμό αυγών, ξεπλύνουμε με 1ml ddH₂O προκειμένου να απομακρυνθούν τα ενήλικα άτομα και τυχόν L1-L2 αν έχουν σκάσει ήδη κάποια αυγά
 - 3) Ο μέγιστος χρόνος που αφήνω τα αυγά να σκάσουν είναι 3.5-4 ώρες, αλλά εγώ φροντίζω να δω το δείγμα μου μετά από 2-2.5 ώρες
 - 4) Όταν δω ότι στο πιάτο έχει σκάσει ένας σημαντικός αριθμός αυγών ξεπλύνω το πιάτο καλά με 1ml ddH₂O ή M9
 - 5) Μεταφορά σε eppendorf
 - 6) Κάνω 3 γρήγορα spins μέχρι 6000rpm
 - 7) Αφήνω περίπου ~200-250μl ddH₂O στο eppendorf και προσθέτω 100μl 20mM NaN₃
 - 8) Ανακινώ καλά το δείγμα
 - 9) Κάνω 3 γρήγορα spins μέχρι 6000rpm
 - 10) Παίρνω 14.8μl με πιπέττα από το δείγμα
 - 11) Καλυπτρίδα και παρατήρηση του δείγματος με μικροσκοπία αντιθέσεως διαφορικής συμβολής (Differential Interference Contrast, Nomarski)
-
- ❖ Ο τρόπος με τον οποίο μετρώνται τα ποσοστά της νέκρωσης αφορά τη μέτρηση του αριθμού των διογκωμένων νευρώνων ως αποτέλεσμα της νέκρωσης.
 - ❖ Η παρατήρηση και μέτρηση των ποσοστών της νέκρωσης γίνεται στο L1 προνομφικό στάδιο κι αυτό διότι το γονίδιο *mec-4(d)* (και το *deg-3(d)*) παρουσιάζουν το μέγιστο της έκφρασής τους σε αυτό το στάδιο.
 - ❖ Για να θεωρηθούν τα αποτελέσματα αξιόπιστα το πείραμα επαναλαμβάνονταν για 3-4 φορές και κάθε φορά εξετάζονταν τουλάχιστον 100 άτομα.

7.5 RNAi στον *C. elegans*

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων RNAi, χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακές κατασκευές που υπήρχαν ήδη στο εργαστήριο. Πληροφορίες γύρω από την κάθε πλασμιδιακή κατασκευή περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω ενώ παρατίθενται και οι χάρτες τους. Η γενική δομή των πλασμιδιακών κατασκευών που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση του RNAi στηρίζεται στον πλασμιδιακό φορέα pL4440 (**εικόνα 26**) ο οποίος περιέχει δυο αντιπαράλληλες αλληλουχίες του υποκινητή της T7 πολυμεράσης. Αφού πραγματοποιείται απομόνωση και πολλαπλασιασμός μέρους της αλληλουχίας του εκάστοτε γονιδίου (τουλάχιστον 500bp) με PCR από γενωμικό DNA αγρίου τύπου σκουληκιών (N2) και την ένθεσή του ανάμεσα στους T7 υποκινητές του pL4440 πλασμιδιακού φορέα. Η διάταξη αυτή επιτρέπει τη σύνθεση dsRNA. Για τον έλεγχο και τον πολλαπλασιασμό των νέων πλασμιδιακών κατασκευών χρησιμοποιούνται επιδεικτικά βακτήρια προς μετασχηματισμό του στελέχους XL-1 blue της *E. coli*, ενώ για τα πειράματα RNAi απαιτείται η μεταφορά της πλασμιδιακής κατασκευής σε βακτηριακά κύτταρα HT115(DE3). Τα βακτήρια αυτά διαθέτουν άλλο ένα πλασμίδιο με το γονίδιο της T7 πολυμεράσης, το οποίο βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο ενός υποκινητή που επάγεται από το IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Μετά από χρήση IPTG επάγεται η σύνθεση dsRNA. Η απουσία της RNase-E από τα HT115 κύτταρα καθιστά δυνατή την παραγωγή μορίων dsRNA που απελευθερώνονται από τα βακτήρια μετά την λύση τους στο έντερο των ζώων και στοχεύουν τα ενδογενή συμπληρωματικά μετάγραφα (Kamath et al., 2001). Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:



Εικόνα 26. Ο πλασμιδιακός φορέας pL4440.

- Επιμόλυνση θρεπτικού μέσου LB + Amp (50μg/ml) + Tet (10μg/ml) όγκου 5ml με μια αποικία βακτηρίων HT115 που περιέχουν το κατάλληλο πλασμίδιο και επώαση αυτών για 16-18h στους 37°C με ανάδευση.
- Μεταφορά ~250μl από αυτή την καλλιέργεια σε 5ml LB + Amp και επώαση για 4-5h στους 37°C με ανάδευση, ώστε η νέα καλλιέργεια να φτάσει σε εκθετική φάση αύξησης.
- Τοποθέτηση 100μl μείγματος από την καλλιέργεια αυτή με IPTG σε τελική συγκέντρωση 1-4mM σε πιάτο NGM και επώαση για 16-18h στους 25°C.
- Μεταφορά νηματωδών στο πιάτο, αφού προηγουμένως έχουν μείνει σε άδεια NGM πιάτα για ~30min, ώστε να απαλλαχθούν από τα βακτήρια που βρίσκονται προσκολλημένα στο σώμα τους.
- Επώαση για 1 ή 2 γενιές στους 15 ή 20°C.

Όσον αφορά το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για τα πιάτα όπου επιστρώνονται τα βακτήρια για το RNAi, η σύστασή του είναι η ίδια όπως στα NGM πιάτα με μόνη διαφορά ότι το αντιβιοτικό streptomycin δεν προστίθεται γιατί παρεμποδίζεται η ανάπτυξη του HT115 βακτηριακού στελέχους HT115. Αντί της streptomycin, προστίθεται μετά την αποστείρωση το αντιβιοτικό ampicillin (500μl από διάλυμα 100mg/ml στο 1lt).

Η σύσταση για το LB θρεπτικό μέσο είναι η παρακάτω:

LB broth (Luria-Bertani medium) (για 1lt)

10g bacto-tryptone

5g yeast extract

10g NaCl

Για την παρασκευή στερεών καλλιεργειών σε τρυβλία απαιτείται ακόμα η προσθήκη 15g agar.

Για την διερεύνηση του ρόλου της απενεργοποίησης ενός γονιδίου στη νέκρωση συγκρίνονται πάντα τα αποτελέσματα με control συνθήκες όπου χρησιμοποιούνται πιάτα με άτομα του ίδιου στελέχους και σταδίου τα οποία τρέφονται με βακτήρια μετασχηματισμένα με άδειο πλασμιδιακό φορέα (pL4440). Τα σκουλήκια αυτά αναπτύσσονται για το ίδιο χρονικό διάστημα και κάτω από τις ίδιες συνθήκες (δηλαδή ταυτόχρονα) με αυτά που τρέφονται με τα RNAi βακτήρια.

Πληροφορίες γύρω από τις πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω. Οι συγκεκριμένες πλασμιδιακές κατασκευές προϋπήρχαν στο εργαστήριο και είχαν κατασκευαστεί από προηγούμενα μέλη.

clp-1 RNAi

Απομονώθηκε αλληλουχία μήκους 1360bp, που περιείχε τα εξώνια 4-8 του *clp-1* γονιδίου, από γενωμικό DNA αγρίου τύπου σκουληκιών (N2) με τη χρήση των παρακάτω ολιγονουκλεοτιδίων:

5'-CCCAAGCTTAGGCGGAGGTGGTAACTCC-3'

5'-GCTCTAGACCTCTCATCATCATTTGC-3'

Η αλληλουχία αυτή κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pL4440 ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις HindIII-XbaI.

vha-2 RNAi

Απομονώθηκε αλληλουχία μήκους 476bp, που περιείχε ολόκληρη την αλληλουχία του *vha-2* γονιδίου, από γενωμικό DNA αγρίου τύπου σκουληκιών (N2) με τη χρήση των παρακάτω ολιγονουκλεοτιδίων:

5'-CGGGATCCTAAATCGTCTTCTTATCTTCCA-3'

5'-CCCAAGCTTCAACGGCGAATGATTTATTCTC-3'

Η αλληλουχία αυτή κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pL4440 ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις BamHI-HindIII.

asp-3 RNAi

Απομονώθηκε αλληλουχία μήκους ~1300 bp, από γενωμικό DNA αγρίου τύπου σκουληκιών (N2) που περιελάμβανε σχεδόν ολόκληρο το ORF του γονιδίου *asp-3*.

Η αλληλουχία αυτή κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pL4440 ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις XbaI-XhoI.

asp-4 RNAi

Απομονώθηκε αλληλουχία μήκους 1540 bp, από γενωμικό DNA αγρίου τύπου σκουληκιών (N2) που περιελάμβανε σχεδόν ολόκληρο το ORF του γονιδίου *asp-4*.

Η αλληλουχία αυτή κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pL4440 ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις HindIII-XbaI.

cup-5 RNAi

Απομονώθηκε αλληλουχία μήκους 1500 bp, από γενωμικό DNA αγρίου τύπου σκουληκιών (N2) που περιελάμβανε τα εξώνια 2-4 του γονιδίου *cup-5*, με τη χρήση των παρακάτω ολιγονουκλεοτιδίων:

5'-GGGGTACCCCATGATTTTCAGATGTCTCGC-3'

5'-GGGGTACCCCGAATGCAAAGAATGAGAACG-3'

Η αλληλουχία αυτή κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pL4440 στη θέση περιορισμού KpnI.

vha-10 RNAi

Απομονώθηκε αλληλουχία μήκους 889 bp, που περιελάμβανε ολόκληρο το ORF του γονιδίου *vha-10*, από γενωμικό DNA αγρίου τύπου σκουληκιών (N2).

Η αλληλουχία αυτή κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pL4440 ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις BamHI-HindIII.

vha-12 RNAi

Απομονώθηκε αλληλουχία μήκους~1500 bp, που περιελάμβανε ολόκληρο το ORF του γονιδίου *vha-12*, από γενωμικό DNA αγρίου τύπου σκουληκιών (N2) με τη χρήση των παρακάτω ολιγονουκλεοτιδίων:

5'-GCTCTAGAATGGCTGCCGTTGACGTC-3'

5'-CCCAAGCTTGGGTGATGAAGTTCTTC-3'

Η αλληλουχία αυτή κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pL4440 ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις XbaI-HindIII.

7.6 Απαλλαγή των νηματωδών από βακτηριακές μολύνσεις / συγχρονισμός πληθυσμών με τη μέθοδο του bleaching

Σε περιπτώσεις όπου καλλιέργειες σκουληκιών σε πιάτα υποστούν βακτηριακές ή μυκητιακές μολύνσεις καθώς και σε περιπτώσεις όπου επιθυμείται ο συγχρονισμός πληθυσμών (στο αναπτυξιακό στάδιο των αυγών), ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Συλλογή ενήλικων ατόμων (gravid adults) από πιάτα καλλιέργειών (τα οποία περιέχουν πληθώρα ατόμων τέτοιου σταδίου) με διάλυμα M9.
- Τοποθέτηση σε erpendorf.
- Ξέπλυμα 2-3 φορές με διάλυμα M9 για την απαλλαγή τους από όσα το δυνατόν περισσότερα βακτήρια.
- Αφαίρεση M9 διαλύματος και προσθήκη 2.5 όγκων από το bleaching solution (το οποίο πρέπει να έχει παρασκευαστεί την ίδια ημέρα με τη χρήση του) και τα σκουλήκια αναδεύονται συνεχώς.
- Φυγοκέντρηση (10000rpm x 1min) και κατακρήμνιση αυγών.
- Ξέπλυμα 3 φορές με διάλυμα M9.
- Τοποθέτηση σε πιάτα NGM που περιέχουν τροφή (OP50) και αφήνονται να εκκολαφθούν στην επιθυμητή θερμοκρασία.

Bleaching solution

1ml 5N NaOH

2ml NaOCl

7ml ddH₂O

Η δράση του διαλύματος προκαλεί την καταστροφή όλων των ιστών των ζώων και την ολοκληρωτική διάλυσή τους. Το μόνο τμήμα των ζώων που δεν καταστρέφεται από την δράση του διαλύματος είναι τα αυγά που είναι πιο ανθεκτικά εξαιτίας του περιβλήματος που διαθέτουν. Κατά την έκθεση των ζώων στο bleaching solution, είναι σημαντικό τα ζώα να παρακολουθούνται τακτικά στο στερεοσκόπιο (αλλά και με γυμνό μάτι) και όταν διαλυθούν και μείνουν τα αυγά, αυτά να κατακρημνιστούν αμέσως με φυγοκέντρηση και να ξεπλυθούν γιατί η παρατεταμένη παραμονή τους στο διάλυμα μπορεί να τα οδηγήσει σε θάνατο.

7.7 Ανάλυση διάρκειας ζωής (Lifespan Assays)

Για τα πειράματα ανάλυσης της διάρκειας ζωής χρησιμοποιούνται συγχρονισμένοι πληθυσμοί σκουληκιών. Αρχικά, αφήνονταν 30-40 ενήλικα ερμαφρόδιτα να γεννήσουν αυγά για 2-3h σε ένα πιάτο NGM επιστρωμένο με OP50 βακτήρια (ημέρα 0 του πειράματος). Τα ενήλικα στη συνέχεια απομακρύνονταν και οι απόγονοι αφήνονταν να μεγαλώσουν στους 20°C (ή στην κατάλληλη θερμοκρασία κάθε στελέχους). Στο προνομφικό στάδιο L4 επιλέγονταν 100-120 άτομα που αποτελούσαν τον πληθυσμό του πειράματος.

Για τα πειράματα lifespan όπου πραγματοποιούνταν RNAi για την σίγηση των γονιδίων, τα ζώα τοποθετούνταν σε NGM πιάτα που περιείχαν 1-2mM IPTG αναμειγμένο στην καλλιέργεια HT115(DE3) βακτηρίων (που έφεραν είτε τον control πλασμιδιακό φορέα ή φορέα μαζί με την αντίστοιχη περιοχή του γονιδίου προς σίγηση). Οι απόγονοι μεγάλωναν σε τέτοια πιάτα στους 20°C και ανά 2 μέρες μεταφέρονταν σε φρέσκα πιάτα με άφθονη τροφή (μετά την παύση της ωτοκίας των ζώων το χρονικό διάστημα μεταφοράς ήταν μεγαλύτερο). Το κάθε πείραμα περιείχε 100-120 άτομα χωρισμένα σε 3-4 πιάτα. Οι μεταφορές γίνονταν τακτικά και προσεκτικά ώστε τα πιάτα να μην μολυνθούν από βακτήρια άλλου στελέχους ή μύκητες που

μπορεί να επηρεάζαν το πείραμα αλλά και οι αρχικοί πληθυσμοί να μην αναμιχθούν με τους απογόνους τους.

Τα ζώα εξετάζονταν κάθε μέρα για την ικανότητα τους να κινούνται και να τρέφονται μέχρι και το θάνατο τους. Στα τελευταία στάδια όπου η κινητικότητά τους έχει ελαχιστοποιηθεί, τα ζώα ελέγχονταν για την ικανότητα απόκρισης σε κάποιο μηχανικό ερέθισμα (συνήθως με το rick μεταφοράς).

7.8 Gentle body touch

Ο νηματώδης αντιλαμβάνεται και αποκρίνεται σε μικρής έντασης μηχανικά ερεθίσματα τα οποία φτάνουν κατά μήκος του σώματός του σε μια συμπεριφορά η οποία ονομάζεται gentle body touch. Για την αντίληψη των ερεθισμάτων αυτών ευθύνονται 6 νευρώνες-μηχανοϋποδοχείς (touch receptor neurons) οι οποίοι τοποθετούνται κατά μήκος του σώματος του οργανισμού. Μηχανικά ερεθίσματα που φτάνουν στο οπίσθιο μέρος του σώματος επάγουν την πρόσθια κίνηση του νηματώδη, ενώ όταν αυτά φτάνουν στο πρόσθιο μέρος (μέχρι και πριν το φάρυγγα του ζώου) επάγουν την οπίσθια κίνηση (Tavernarakis and Driscoll, 1997).

Για τη μέτρηση του φαινοτύπου χρησιμοποιούνται ενήλικα και εύρωστα άτομα τα οποία μεταφέρονται σε καλλιέργεια με άφθονη τροφή όπου και αφήνονται σε ηρεμία για τουλάχιστον 2h. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται μια πολύ λεπτή τρίχα η οποία είναι στερεωμένη σε οδοντογλυφίδα. Μέσω της τρίχας ασκούνται διαδοχικά ερεθίσματα στον οργανισμό τόσο στο οπίσθιο, όσο και στο πρόσθιο τμήμα του και παρατηρούνται οι αντιδράσεις του οργανισμού. Ένα άτομο που έχει αντιδράσει από ένα μηχανικό ερέθισμα στην ουρά και κινείται σε πρόσθια κατεύθυνση διακόπτει την κίνησή του πηγαίνοντας σε αντίθετη κατεύθυνση όταν ένα επόμενο

ερέθισμα φτάσει στο πρόσθιο τμήμα του σώματος. Για το στέλεχος του αγρίου τύπου, το ποσοστό των ατόμων που εκδηλώνουν αντίδραση σε άσκηση ήπιου μηχανικού ερεθίσματος κυμαίνεται στο 95%.

Ο συγκεκριμένος φαινότυπος μπορεί να επηρεαστεί ισχυρά όταν η τρίχα δεν είναι αρκετά λεπτή ή αρκετά ενυδατωμένη. Επίσης, τα μηχανικά ερεθίσματα παύουν να γίνονται αντιληπτά μετά από διαδοχικές δοκιμές λόγω του φαινομένου του habituation.

Το *mec-4(d)* στέλεχος παρουσιάζει προβλήματα στην αντίληψη του gentle body touch λόγω εκφυλισμού των touch receptor neurons.

7.9 Single Worm PCR

Για την πραγματοποίηση του single worm PCR (στην περίπτωση διάγνωσης της ελλείψεως στο αλληλόμορφο *ok1718* του γονιδίου *cps-6* στις μελέτες μας), πραγματοποιήθηκε αρχικά λύση των σκουληκιών. Η σύσταση του διαλύματος λύσης είναι η παρακάτω:

Worm Lysis Buffer	Lysis program
50mM KCl	1)65°C για 1h
10mM Tris pH 8.3	2)95°C για 5min
2.5mM MgCl ₂	3)-80°C για >30min
0.45% NP-40	
0.45% Tween-20	
(0.01% gelatin)	

Αρχικά φτιάχνεται mix διάλυμα που

περιέχει 100μl worm lysis buffer και 1μl proteinase K (stock 20mg/ml). Κάθε σκουλήκι συλλέγεται με πιπέττα από το πιάτο της καλλιέργειας (young adults) και τοποθετείται σε σωληνάκι για PCR. Έπειτα ακολουθεί το πρόγραμμα που βρίσκεται στην δεξιά στήλη και στη συνέχεια πραγματοποιείται το PCR με τις συνθήκες που περιγράφηκαν στην αντίστοιχη διασταύρωση.

7.10 Προετοιμασία δειγμάτων για τις μελέτες συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης στους μύες καθώς και για το νευροεκφυλισμό που επάγεται από την α-συνουκλεΐνη

Ενήλικα άτομα 7 ημερών χρησιμοποιούνται για τις μελέτες αυτές όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (Cao et al., 2005; Qiao et al., 2008).

Αρχικά, άτομα L4 προνυμφικού σταδίου μεταφέρονται φρέσκα πιάτα NGM (με OP50). Έπειτα, πραγματοποιείται μεταφορά τους σε φρέσκα πιάτα NGM (με OP50) μέχρι την ημέρα παρατήρησής τους κάτω από το μικροσκόπιο.

Για την παρατήρηση, τα σκουλήκια ξεπλένονται από τα πιάτα με M9 διάλυμα και μεταφέρονται σε σωληνάκια erpendorf 1.5ml. Μετά από ξέπλυμα με M9 διάλυμα (2-3 φορές), αναισθητοποιούνται με 10mM αζίδιο (NaN₃) (Sigma, Munich Germany). Μια σταγόνα 13μl σκουληκιών αναισθητοποιημένων τοποθετείται στην αντικειμενοφόρο. Μετά την προσθήκη καλυπτρίδας (18x18mm) στην κορυφή της σταγόνας το δείγμα σφραγίζεται με μανό νυχιών. Περίπου 50 σκουλήκια ~50 worms εξετάστηκαν κάτω από ένα epifluorescent, compound light microscope Zeiss Axioskop 2 Plus (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.). Οι εικόνες τραβήχτηκαν με

μια AxioCam HR camera (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) καθοδηγούμενη από το AxioVision3.1 software (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.).

7.11 Assay για τη διερεύνηση των επιδράσεων της σπερμιδίνης στη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης στους μύες του σωματικού τοιχώματος καθώς και για το νευροεκφυλισμό που επάγεται από την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης στον *C. elegans*

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή τη μελέτη είναι το BZ555: *egIs1*[$p_{dat-1}::GFP$], το UA44: *baln11*[$p_{dat-1}::\alpha\text{-Syn}$, $p_{dat-1}::GFP$] και το UA49: *baln12*[$p_{unc-54}::\alpha\text{-Syn}::GFP$, p_{RF4}]. Για τη διερεύνηση των επιδράσεων της σπερμιδίνης, η παρακάτω διαδικασία ακολουθήθηκε, όπως έχει περιγραφεί (Eisenberg et al., 2009). Stock διαλύματα σπερμιδίνης (Sigma, Munich Germany) –διαλυμένα σε ddH₂O- ετοιμάστηκαν (συγκέντρωση 100mM). Κατά την πρώτη ημέρα, φρέσκα πιάτα NGM (7ml) με OP50 ετοιμάζονταν. Κατά την δεύτερη ημέρα, βακτήρια OP50 σκοτώνονταν με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία για 10 min (0.5 J) χρησιμοποιώντας ένα UV crosslinker (BIO-LINK – BLX-E365, Vilber Lourmat). Έπειτα, η σπερμιδίνη εφαρμόστηκε στην κορυφή του θρεπτικού μέσου του πιάτου. Στη συνέχεια, τα πιάτα ανακινούνταν ήπια ούτως ώστε να απλωθεί η ουσία σε όλη την επιφάνεια του θρεπτικού μέσου. Η τελική συγκέντρωση σπερμιδίνης που χρησιμοποιήθηκε για την επιτέλεση των πειραμάτων ήταν 0.2mM. Πανομοιότυπος τρόπος ακολουθούνταν για τα control πιάτα στα οποία απλωνόταν ddH₂O. Τα πιάτα επιτρέπονταν μετά να στεγνώσουν overnight. Τα άτομα που εξετάζονταν ήταν ενήλικα (7^η ημέρα ενηλικίωσης). Άτομα L4 προνυμφικού σταδίου μεταφέρονταν σε φρέσκα πιάτα NGM όπως περιγράφεται παραπάνω. Η διαδικασία με τη σπερμιδίνη επαναλαμβάνονταν κάθε φορά που τα σκουλήκια μεταφέρονταν

σε φρέσκα πιάτα (κάθε δύο μέρες). Η ετοιμασία των δειγμάτων για την μικροσκοπική ανάλυση περιγράφεται παραπάνω (υποκεφάλαιο 9)

7.12 Ανάλυση συσσωματωμάτων της α-συνουκλεΐνης στους μύες του σωματικού τοιχώματος του *C. elegans*

Δύο στελέχη χρησιμοποιήθηκαν για αυτή την ανάλυση: το UA49: *baln12*[*p_{unc-54}::α-Syn::GFP, pRF4*] και το *cps-6(ok1718)l; baln12*[*p_{unc-54}::α-Syn::GFP, pRF4*]. Το UA49 στέλεχος εκφράζει την ανθρώπινη α-συνουκλεΐνη συντηγμένη με την GFP (κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή *unc-54*) στους μύες του σωματικού τοιχώματος του *C. elegans* (Qiao et al., 2008). Ένα διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος κατασκευάστηκε (ένα isolate απομονώθηκε από τις διασταυρώσεις μας μεταξύ του UA49 με το VC1253 στέλεχος) και αναλύθηκε για τις επιδράσεις της μεταλλαγής στο *cps-6* γονίδιο στην συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης στους μύες.

7.13 Ανάλυση εκφυλισμού ντοπαμινεργικών νευρώνων που επάγεται από την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης

Τρία στελέχη χρησιμοποιήθηκαν για αυτή την ανάλυση: το BZ555: *egls1*[*p_{dat-1}::GFP*], το UA44: *baln11*[*p_{dat-1}::α-Syn, p_{dat-1}::GFP*] και το *cps-6(ok1718)l; baln11*[*p_{dat-1}::α-Syn, p_{dat-1}::GFP*]. Το BZ555 στέλεχος κατευθύνει την έκφραση της GFP στους 8 ντοπαμινεργικούς νευρώνες του οργανισμού. Το UA44 στέλεχος κατευθύνει την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες προκαλώντας αξιοσημείωτο νευροεκφυλισμό (όπως φαίνεται στα αποτελέσματα). Δύο isolates του διπλά μεταλλαγμένου

στελέχους (μετά τη γενετική διασταύρωση μεταξύ του UA44 και του VC1253 στελέχους) αναλύθηκαν για τις επιδράσεις της μεταλλαγής στο γονίδιο *cps-6* στο νευροεκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων που επάγεται από την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης.

Για την ανάλυση, μόνο οι 4 CEPs αναλύθηκαν και καταμετρήθηκαν όπως έχει περιγραφεί (Cao et al., 2005). Δύο παράλληλες προσεγγίσεις της ανάλυσης πραγματοποιήθηκαν.

Στην πρώτη προσέγγιση ένα σκουλήκι καταμετρούνταν ως αγρίου τύπου, όταν διατηρούσε και τα 4 κυτταρικά σώματα των CEPs ανεξάρτητα από την μορφολογία των δενδριτών. Τα σκουλήκια που απουσίαζε η έκφραση της GFP έστω κι από ένα κυτταρικό σώμα των CEPs καταμετρούνταν ως σκουλήκια με εκφυλισμένους νευρώνες (Cao et al., 2005). Με αυτή την προσέγγιση υπολογίσαμε το ποσοστό των ατόμων που παρουσίαζαν εκφυλισμένους CEPs για κάθε ένα από τα στελέχη που εξετάστηκαν.

Στην δεύτερη προσέγγιση, ο συνολικός αριθμός των κυτταρικών σωμάτων των CEPs (από τα ζώα που παρατηρούνταν) μετρήθηκε για κάθε στέλεχος και ο μέσος όρος των κυτταρικών σωμάτων ανά σκουλήκι υπολογίστηκε.

7.14 Άλλες Πληροφορίες

Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR και αλληλούχησης παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας).

Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις εταιρείες New England Biolabs (NEB) και Minotech.

Τα χημικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι προϊόντα των εταιρειών: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Qiagen (California, CA, USA), Invitrogen (Carlsbad, USA), και Roche.

Τα ειδικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις εταιρείες: Genomic DNA purification kit (Macherey-Nagel, NucleoSpin Tissue).

Η στατιστική ανάλυση όλων των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν έγινε με το Prism software package (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

8. Βιβλιογραφία

- Anderson LL, Mao X, Scott BA, Crowder CM. 2009. Survival from hypoxia in *C. elegans* by inactivation of aminoacyl-tRNA synthetases. *Science* 323:630-633.
- Antebi A. 2007. Genetics of aging in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 3:1565-1571.
- Artal-Sanz M, Samara C, Syntichaki P, Tavernarakis N. 2006. Lysosomal biogenesis and function is critical for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 173:231-239.
- Bano D, Dinsdale D, Cabrera-Socorro A, Maida S, Lambacher N, McColl B, Ferrando-May E, Hengartner MO, Nicotera P. 2009. Alteration of the nuclear pore complex in Ca(2+)-mediated cell death. *Cell Death Differ*.
- Berger AJ, Hart AC, Kaplan JM. 1998. G alphas-induced neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 18:2871-2880.
- Bianchi L, Gerstbrein B, Frokjaer-Jensen C, Royal DC, Mukherjee G, Royal MA, Xue J, Schafer WR, Driscoll M. 2004. The neurotoxic MEC-4(d) DEG/ENaC sodium channel conducts calcium: implications for necrosis initiation. *Nat Neurosci* 7:1337-1344.
- Bishop NA, Guarente L. 2007. Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nat Rev Genet* 8:835-844.
- Blondet B, Carpentier G, Ait-Ikhlef A, Murawsky M, Rieger F. 2002. Motoneuron morphological alterations before and after the onset of the disease in the wobbler mouse. *Brain Res* 930:53-57.
- Blum ES, Driscoll M, Shaham S. 2008. Noncanonical cell death programs in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ* 15:1124-1131.
- Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K. 1988. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7972-7976.
- Braungart E, Gerlach M, Riederer P, Baumeister R, Hoener MC. 2004. *Caenorhabditis elegans* MPP+ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. *Neurodegener Dis* 1:175-183.
- Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71-94.
- Burke SN, Barnes CA. 2006. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 7:30-40.
- Cao S, Gelwix CC, Caldwell KA, Caldwell GA. 2005. Torsin-mediated protection from cellular stress in the dopaminergic neurons of *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 25:3801-3812.
- Chalfie M, Wolinsky E. 1990. The identification and suppression of inherited neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 345:410-416.
- Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destee A. 2004. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1167-1169.
- Chase DL, Koelle, M. R. . 2007. Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*.
- Choi DW. 1992. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261-1276.
- Chung S, Gumienny TL, Hengartner MO, Driscoll M. 2000. A common set of engulfment genes mediates removal of both apoptotic and necrotic cell corpses in *C. elegans*. *Nat Cell Biol* 2:931-937.
- Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, Liu K, Xu K, Strathearn KE, Liu F, Cao S, Caldwell KA, Caldwell GA, Marsischky G, Kolodner RD, Labaer J, Rochet JC, Bonini NM, Lindquist S. 2006. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 313:324-328.

- Cooper JD, Messer A, Feng AK, Chua-Couzens J, Mobley WC. 1999. Apparent loss and hypertrophy of interneurons in a mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis: evidence for partial response to insulin-like growth factor-1 treatment. *J Neurosci* 19:2556-2567.
- Dauer W, Przedborski S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
- Dawson TM, Dawson VL. 2003. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302:819-822.
- Driscoll M, Chalfie M. 1991. The *mec-4* gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature* 349:588-593.
- Duerr JS, Frisby, D.L., Gaskin, J., Duke, A., Asermely, K., Huddleston, D., Eiden, L.E., and Rand, J.B. 1999. The *cat-1* gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a vesicular monoamine transporter required for specific monoamine-dependent behaviors. *J Neurosci* 19:72-84.
- Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Buttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, Fussi H, Deszcz L, Hartl R, Schraml E, Criollo A, Megalou E, Weiskopf D, Laun P, Heeren G, Breitenbach M, Grubeck-Loebenstien B, Herker E, Fahrenkrog B, Frohlich KU, Sinner F, Tavernarakis N, Minois N, Kroemer G, Madeo F. 2009. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* 11:1305-1314.
- Fares H, Greenwald I. 2001. Regulation of endocytosis by CUP-5, the *Caenorhabditis elegans* mucolipin-1 homolog. *Nat Genet* 28:64-68.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Forgac M. 2007. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:917-929.
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68:913-963.
- Gitler AD, Bevis BJ, Shorter J, Strathearn KE, Hamamichi S, Su LJ, Caldwell KA, Caldwell GA, Rochet JC, McCaffery JM, Barlowe C, Lindquist S. 2008. The Parkinson's disease protein alpha-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:145-150.
- Golden JW, and Riddle, D.L. 1984. The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Developmental biology* 102:368-378.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. 2003. The calpain system. *Physiol Rev* 83:731-801.
- Gumienny TL, Lambie E, Hartweg E, Horvitz HR, Hengartner MO. 1999. Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* 126:1011-1022.
- Hall DH, Gu G, Garcia-Anoveros J, Gong L, Chalfie M, Driscoll M. 1997. Neuropathology of degenerative cell death in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 17:1033-1045.
- Hamamichi S, Rivas RN, Knight AL, Cao S, Caldwell KA, Caldwell GA. 2008. Hypothesis-based RNAi screening identifies neuroprotective genes in a Parkinson's disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:728-733.
- Hawdon JM, Emmons SW, Jacobson LA. 1989. Regulation of proteinase levels in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Preferential depression by acute or chronic starvation. *Biochem J* 264:161-165.
- Hermann GJ, Schroeder LK, Hieb CA, Kershner AM, Rabbitts BM, Fonarev P, Grant BD, Priess JR. 2005. Genetic analysis of lysosomal trafficking in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 16:3273-3288.
- Houthoofd K, Braeckman BP, Johnson TE, Vanfleteren JR. 2003. Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signalling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* 38:947-954.

- Houthoofd K, Braeckman BP, Johnson TE, Vanfleteren JR. 2004a. Extending life-span in *C. elegans*. *Science* 305:1238-1239.
- Houthoofd K, Braeckman BP, Lenaerts I, Brys K, De Vreese A, Van Eygen S, Vanfleteren JR. 2002a. Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* 37:1371-1378.
- Houthoofd K, Braeckman BP, Lenaerts I, Brys K, De Vreese A, Van Eygen S, Vanfleteren JR. 2002b. No reduction of metabolic rate in food restricted *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* 37:1359-1369.
- Houthoofd K, Braeckman BP, Lenaerts I, Brys K, Matthijssens F, De Vreese A, Van Eygen S, Vanfleteren JR. 2005a. DAF-2 pathway mutations and food restriction in aging *Caenorhabditis elegans* differentially affect metabolism. *Neurobiol Aging* 26:689-696.
- Houthoofd K, Braeckman BP, Vanfleteren JR. 2004b. The hunt for the record life span in *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59:408-410.
- Houthoofd K, Fidalgo MA, Hoogewijs D, Braeckman BP, Lenaerts I, Brys K, Matthijssens F, De Vreese A, Van Eygen S, Munoz MJ, Vanfleteren JR. 2005b. Metabolism, physiology and stress defense in three aging Ins/IGF-1 mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 4:87-95.
- Houthoofd K, Johnson TE, Vanfleteren JR. 2005c. Dietary restriction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60:1125-1131.
- Houthoofd K, Vanfleteren JR. 2007. Public and private mechanisms of life extension in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Genet Genomics* 277:601-617.
- Hsu AL, Murphy CT, Kenyon C. 2003. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300:1142-1145.
- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G. 1998. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4386-4391.
- Ishidoh K, Kominami E. 2002. Processing and activation of lysosomal proteinases. *Biol Chem* 383:1827-1831.
- Jankowska-Anyszka M, Lamphear BJ, Aamodt EJ, Harrington T, Darzynkiewicz E, Stolarski R, Rhoads RE. 1998. Multiple isoforms of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in *Caenorhabditis elegans* can distinguish between mono- and trimethylated mRNA cap structures. *J Biol Chem* 273:10538-10542.
- Kaeberlein TL, Smith ED, Tsuchiya M, Welton KL, Thomas JH, Fields S, Kennedy BK, Kaeberlein M. 2006. Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by complete removal of food. *Aging Cell* 5:487-494.
- Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG, Ahringer J. 2001. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* 2:RESEARCH0002.
- Keiper BD, Lamphear BJ, Deshpande AM, Jankowska-Anyszka M, Aamodt EJ, Blumenthal T, Rhoads RE. 2000. Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 275:10590-10596.
- Kenyon C. 2005. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 120:449-460.
- Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. 1993. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366:461-464.
- Kirkwood TB, Austad SN. 2000. Why do we age? *Nature* 408:233-238.
- Klass M, and Hirsh, D. 1976. Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 260:523-525.

- Korswagen HC, Park JH, Ohshima Y, Plasterk RH. 1997. An activating mutation in a *Caenorhabditis elegans* Gs protein induces neural degeneration. *Genes Dev* 11:1493-1503.
- Korswagen HC, van der Linden AM, Plasterk RH. 1998. G protein hyperactivation of the *Caenorhabditis elegans* adenylyl cyclase SGS-1 induces neuronal degeneration. *Embo J* 17:5059-5065.
- Kourtis N, Tavernarakis N. 2007. Non-developmentally programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Semin Cancer Biol* 17:122-133.
- Kroemer G, Jaattela M. 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 5:886-897.
- Kuwahara T, Koyama A, Gengyo-Ando K, Masuda M, Kowa H, Tsunoda M, Mitani S, Iwatsubo T. 2006. Familial Parkinson mutant alpha-synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 281:334-340.
- Lakowski B, Hekimi S. 1998. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13091-13096.
- Lakso M, Vartiainen S, Moilanen AM, Sirvio J, Thomas JH, Nass R, Blakely RD, Wong G. 2003. Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. *J Neurochem* 86:165-172.
- Lee GD, Wilson MA, Zhu M, Wolkow CA, de Cabo R, Ingram DK, Zou S. 2006. Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5:515-524.
- Lettre G, Hengartner MO. 2006. Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:97-108.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
- Lints R, and Emmons, S., W. 1999. Patterning of dopaminergic neurotransmitter identity among *Caenorhabditis elegans* ray sensory neurons by a TGFβ family signaling pathway and a Hox gene. *Development* 126:5819-5831.
- Liu KS, and Sternberg, P.W. 1995. Sensory regulation of male mating behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* 14:79-89.
- Locke CJ, Fox SA, Caldwell GA, Caldwell KA. 2008. Acetaminophen attenuates dopamine neuron degeneration in animal models of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 439:129-133.
- Loer C, M., and Kenyon, C., J. 1993. Serotonin-deficient mutants and male mating behavior in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 13:5407-5417.
- Luke CJ, Pak SC, Askew YS, Naviglia TL, Askew DJ, Nobar SM, Vetica AC, Long OS, Watkins SC, Stolz DB, Barstead RJ, Moulder GL, Bromme D, Silverman GA. 2007. An intracellular serpin regulates necrosis by inhibiting the induction and sequelae of lysosomal injury. *Cell* 130:1108-1119.
- Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, Sugimoto A. 2001. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol* 11:171-176.
- Mano I, Driscoll M. 2009. *Caenorhabditis elegans* glutamate transporter deletion induces AMPA-receptor/adenylyl cyclase 9-dependent excitotoxicity. *J Neurochem* 108:1373-1384.
- Maricq AV, Peckol E, Driscoll M, Bargmann CI. 1995. Mechanosensory signalling in *C. elegans* mediated by the GLR-1 glutamate receptor. *Nature* 378:78-81.
- Marvanova M, Nichols CD. 2007. Identification of neuroprotective compounds of *caenorhabditis elegans* dopaminergic neurons against 6-OHDA. *J Mol Neurosci* 31:127-137.

- Mello CC, 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.
- Menuz V, Howell KS, Gentina S, Epstein S, Riezman I, Fornallaz-Mulhauser M, Hengartner MO, Gomez M, Riezman H, Martinou JC. 2009. Protection of *C. elegans* from anoxia by HYL-2 ceramide synthase. *Science* 324:381-384.
- Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR. 1998. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet* 14:410-416.
- Missale C, Nash,S.,R., Robinson,S.,W., Jaber,M., and Caron,M.,G. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev* 78:189-225.
- Morley JF, Morimoto RI. 2004. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell* 15:657-664.
- Morrison JH, Hof PR. 1997. Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278:412-419.
- Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, Ahringer J, Li H, Kenyon C. 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424:277-283.
- Nass R, Hahn, M.K., Jessen, T., McDonald, P.W., Carvelli, L., and Blakely, R.D. 2005. A genetic screen in *Caenorhabditis elegans* for dopamine neuron insensitivity to 6-hydroxydopamine identifies dopamine transporter mutants impacting transporter biosynthesis and trafficking. *Journal of neurochemistry* 94:774-785.
- Nass R, Hall DH, Miller DM, 3rd, Blakely RD. 2002. Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3264-3269.
- Nicotera P, Leist M, Manzo L. 1999. Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol Sci* 20:46-51.
- Oka T, Futai M. 2000. Requirement of V-ATPase for ovulation and embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 275:29556-29561.
- Oka T, Toyomura T, Honjo K, Wada Y, Futai M. 2001. Four subunit a isoforms of *Caenorhabditis elegans* vacuolar H⁺-ATPase. Cell-specific expression during development. *J Biol Chem* 276:33079-33085.
- Oka T, Yamamoto R, Futai M. 1997. Three vha genes encode proteolipids of *Caenorhabditis elegans* vacuolar-type ATPase. Gene structures and preferential expression in an H-shaped excretory cell and rectal cells. *J Biol Chem* 272:24387-24392.
- Oka T, Yamamoto R, Futai M. 1998. Multiple genes for vacuolar-type ATPase proteolipids in *Caenorhabditis elegans*. A new gene, vha-3, has a distinct cell-specific distribution. *J Biol Chem* 273:22570-22576.
- Panowski SH, Wolff S, Aguilaniu H, Durieux J, Dillin A. 2007. PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans*. *Nature* 447:550-555.
- Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D. 2001. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 412:90-94.
- Perez MF, White, F.J., and Hu, X.T. 2006. Dopamine D(2) receptor modulation of K(+) channel activity regulates excitability of nucleus accumbens neurons at different membrane potentials. *Journal of neurophysiology* 96:2217-2228.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047.

- Pu P, Le W. 2008. Dopamine neuron degeneration induced by MPP⁺ is independent of CED-4 pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Res* 18:978-981.
- Pujol N, Bonnerot C, Ewbank JJ, Kohara Y, Thierry-Mieg D. 2001. The *Caenorhabditis elegans unc-32* gene encodes alternative forms of a vacuolar ATPase a subunit. *J Biol Chem* 276:11913-11921.
- Pujol N, Bonnerot, C., Ewbank, J.J., Kohara, Y., and Thierry-Mieg, D. 2001. The *Caenorhabditis elegans unc-32* gene encodes alternative forms of a vacuolar ATPase a subunit. *The Journal of biological chemistry* 276:11913-11921.
- Qiao L, Hamamichi S, Caldwell KA, Caldwell GA, Yacoubian TA, Wilson S, Xie ZL, Speake LD, Parks R, Crabtree D, Liang Q, Crimmins S, Schneider L, Uchiyama Y, Iwatsubo T, Zhou Y, Peng L, Lu Y, Standaert DG, Walls KC, Shacka JJ, Roth KA, Zhang J. 2008. Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alpha-synuclein aggregation and toxicity. *Mol Brain* 1:17.
- Rea SL, Ventura N, Johnson TE. 2007. Relationship between mitochondrial electron transport chain dysfunction, development, and life extension in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* 5:e259.
- Rolland S, Conradt B. 2006. The role of mitochondria in apoptosis induction in *Caenorhabditis elegans*: more than just innocent bystanders? *Cell Death Differ* 13:1281-1286.
- Russell SJ, Kahn CR. 2007. Endocrine regulation of ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:681-691.
- Saha S, Guillily MD, Ferree A, Lanceta J, Chan D, Ghosh J, Hsu CH, Segal L, Raghavan K, Matsumoto K, Hisamoto N, Kuwahara T, Iwatsubo T, Moore L, Goldstein L, Cookson M, Wolozin B. 2009. LRRK2 modulates vulnerability to mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 29:9210-9218.
- Samara C, Syntichaki P, Tavernarakis N. 2008. Autophagy is required for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ* 15:105-112.
- Schaheen L, Patton G, Fares H. 2006. Suppression of the cup-5 mucopolipidosis type IV-related lysosomal dysfunction by the inactivation of an ABC transporter in *C. elegans*. *Development* 133:3939-3948.
- Schapira AH. 2008. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 7:97-109.
- Scott BA, Avidan MS, Crowder CM. 2002. Regulation of hypoxic death in *C. elegans* by the insulin/IGF receptor homolog DAF-2. *Science* 296:2388-2391.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. 2003. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302:841.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388:839-840.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 1998. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1:949-957.
- Stevens TH, Forgac M. 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:779-808.
- Sulston J, Dew, M., and Brenner, S. 1975. Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Comp. Neurol.* 163:215-226.
- Sulston JE, Horvitz HR. 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56:110-156.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100:64-119.
- Suo S, Sasagawa, N., and Ishiura, S. 2002. Cloning and characterization of a *Caenorhabditis elegans* D2-like dopamine receptor. *Neurosci. Lett.* 319:13-16.

- Suo S, Sasagawa N., and Ishiura S. 2003. Cloning and characterization of a *Caenorhabditis elegans* D2-like dopamine receptor. *J. Neurochem.* 86:869-878.
- Syntichaki P, Samara C, Tavernarakis N. 2005. The vacuolar H⁺-ATPase mediates intracellular acidification required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Curr Biol* 15:1249-1254.
- Syntichaki P, Tavernarakis N. 2002. Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Rep* 3:604-609.
- Syntichaki P, Tavernarakis N. 2003. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci* 4:672-684.
- Syntichaki P, Tavernarakis N. 2004. Genetic models of mechanotransduction: the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Physiol Rev* 84:1097-1153.
- Syntichaki P, Troulinaki K, Tavernarakis N. 2007. eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 445:922-926.
- Syntichaki P, Xu K, Driscoll M, Tavernarakis N. 2002. Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature* 419:939-944.
- Tatar M, Bartke A, Antebi A. 2003. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299:1346-1351.
- Tavernarakis N, Driscoll M. 1997. Molecular modeling of mechanotransduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Physiol* 59:659-689.
- Tissenbaum HA, Ruvkun G. 1998. An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 148:703-717.
- Toth ML, Simon P, Kovacs AL, Vellai T. 2007. Influence of autophagy genes on ion-channel-dependent neuronal degeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* 120:1134-1141.
- Treinin M, Chalfie M. 1995. A mutated acetylcholine receptor subunit causes neuronal degeneration in *C. elegans*. *Neuron* 14:871-877.
- Van Doren K, Hirsh D. 1990. mRNAs that mature through trans-splicing in *Caenorhabditis elegans* have a trimethylguanosine cap at their 5' termini. *Mol Cell Biol* 10:1769-1772.
- Vellai T, Toth ML, Kovacs AL. 2007. Janus-faced autophagy: a dual role of cellular self-eating in neurodegeneration? *Autophagy* 3:461-463.
- Vlachos M, Tavernarakis N. 2010. Non-apoptotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Dyn* 239:1337-1351.
- Walker G, Houthoofd K, Vanfleteren JR, Gems D. 2005. Dietary restriction in *C. elegans*: from rate-of-living effects to nutrient sensing pathways. *Mech Ageing Dev* 126:929-937.
- Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF. 1988. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 13:18-54.
- Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D. 2002. Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 298:1587-1592.
- Ward S, and Carrel, J.S. 1979. Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 73:304-321.
- Ward WF. 2000. The relentless effects of the aging process on protein turnover. *Biogerontology* 1:195-199.
- White JG, Southgate, E., Thomson, J. N., Brenner, S. 1986. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond (B)* 314:1-340.
- White JG, 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.
- Wicks SR, Yeh RT, Gish WR, Waterston RH, Plasterk RH. 2001. Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nat Genet* 28:160-164.

- Wintle R.F. VTHHM. 2001. Dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*-potential for parkinsonism research. *Parkinsonism & Related Disorders* 7:177-183.
- Wong D, Bazopoulou D, Pujol N, Tavernarakis N, Ewbank JJ. 2007. Genome-wide investigation reveals pathogen-specific and shared signatures in the response of *Caenorhabditis elegans* to infection. *Genome Biol* 8:R194.
- Xu K, Tavernarakis N, Driscoll M. 2001. Necrotic cell death in *C. elegans* requires the function of calreticulin and regulators of Ca(2+) release from the endoplasmic reticulum. *Neuron* 31:957-971.
- Yamashima T. 2000. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol* 62:273-295.
- Yamashima T. 2004. Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium* 36:285-293.
- Yan N, Chai J, Lee ES, Gu L, Liu Q, He J, Wu JW, Kokel D, Li H, Hao Q, Xue D, Shi Y. 2005. Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 437:831-837.