

**Αναφορά Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης**

**Λειτουργικός χαρακτηρισμός γονιδίων της οικογένειας των  
DEG/ENaCs, στον οργανισμό *Caenorhabditis elegans***

**Γιάννης Βόγγλης**

**Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας  
Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας**

**Εργαστήριο μοριακής γενετικής Νηματωδών  
Υπεύθυνος Ερευνητής Νεκτάριος Ταβερναράκης**

**Ηράκλειο 2003**

## Περιεχόμενα

<b>1.i) Abstract</b>		σελ 02
<b>ii) Περίληψη</b>		# 03
<b>2. Εισαγωγή</b>		
i) Ο <i>Caenorhabditis elegans</i> σαν μοντέλο μελέτης του νευρικού συστήματος		# 04
ii) Οι Degenerins		# 06
iii) Το φαινόμενο του RNAi		# 07
<b>3. Πειραματική διαδικασία</b>		
i) Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων έκφρασης		# 09
ii) Εφαρμογή του RNAi και φαινοτυπικός προσδιορισμός των στελεχών		# 13
iii) Καθορισμός του χωρο-χρονικού προτύπου έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων		# 14
iv) Φαινοτυπικός έλεγχος μεταλλαγμένων στελεχών για την ικανότητα απόκρισης σε μηχανικά ερεθίσματα		# 16
v) Μελέτη της ικανότητας απόκρισης σε υψηλά οσμωτικά ερεθίσματα		# 17
vi) Μελέτη της ικανότητας χημειοτακτισμού		# 18
vii) Μελέτη της ικανότητας για θερμόταξη		# 21
viii) Κατασκευή μετασχηματισμένων στελεχών για της διάσωση του φαινοτύπου		# 22
<b>4. Συμπεράσματα – Συζήτηση</b>		# 25
<b>5. Μελλοντικές κατευθύνσεις</b>		# 26
<b>6. Βιβλιογραφία</b>		# 27

### 1.i) Abstract

The family of nematode DEG/ENaC (degenerin/epithelial Na<sup>+</sup> channel) proteins comprises 30 members, 7 of which have been studied genetically. Previously characterized degenerins have been implicated in a variety of functions such as mechanosensation, proprioception and regulation of ultradian rhythms. Neuronally expressed members of the family can mutate to induce late-onset degenerative cell death, featuring landmarks of excitotoxic neuron demise, which follows stroke, in mammals. Despite the importance of these channels in signal transduction, little is understood about their gating mechanisms and regulation. Moreover, the function of the additional 23 DEG/ENaC proteins encoded in the *C. elegans* genome remains a mystery. We embarked on a systematic study of these previously uncharacterized family members, in an effort to elucidate their role in animal physiology. This line of investigation revealed that DEG/ENaC genes show only limited overlap in their spatiotemporal expression patterns, and function in a variety of cell types ranging from neurons to muscles and epithelia. Using RNAi, we found that DEG/ENaC proteins are required for the normal manifestation of diverse animal behaviours such as the nose touch responses, chemosensation, egg-laying, mating, excretory canal function, feeding and defecation. In a complementary approach, we are analyzing putative null alleles, obtained by screening deletion libraries. Remarkably, specific degenerins, which are highly expressed in head sensory neurons and interneurons, are required for conditioning to several chemical attractants, while they are dispensable for chemotaxis. Consistently, preliminary results implicate these degenerins in the process of associating the presence of food with the rearing temperature. Such observations indicate that degenerins contribute to the capacity of the animal for associative learning. This is an exciting working hypothesis in light of similar findings in mice, supporting the involvement of the related in sequence, acid-sensing ion channel (ASIC) in synaptic plasticity, learning, and memory (Wemmie J.A. et al., Neuron, 34: 463-77). Hence, DEG/ENaC roles in associative learning and memory might be conserved from nematodes to mammals, thus, rendering *C. elegans* an attractive model in which to dissect the relevant mechanisms.

## 1.ii) Περίληψη

Κατά την διάρκεια του μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης, επιχειρήθηκε ο λειτουργικός χαρακτηρισμός μιας ομάδας γονιδίων, στον οργανισμό *Caenorhabditis elegans*. Τα γονίδια που μελετήθηκαν ανήκουν στην οικογένεια των Degenerins. Η λειτουργία και ο ρόλος συγκεκριμένων γονιδίων είναι δυνατό να μελετηθεί μέσα από διάφορες προσεγγίσεις. Συχνή τακτική αποτελεί η απενεργοποίηση του υπό μελέτη γονιδίου και η ανίχνευση των φαινοτυπικών και μοριακών επιπτώσεων στον οργανισμό. Η απενεργοποίηση αυτή είναι δυνατό να γίνει είτε σε επίπεδο γονιδίου (π.χ. μεταλλαξογένεση), είτε σε επίπεδο γονιδιακού προϊόντος. Έτσι, για τα παραπάνω γονίδια έγινε χρήση στελεχών με ομόζυγες μεταλλάξεις για κάποιο από αυτά. Παράλληλα, έγινε ειδική καταστολή της έκφρασης για κάθε ένα από τα υπό μελέτη γονίδια. Αυτό έγινε μετά από εφαρμογή του φαινομένου του RNA interference (RNAi). Τόσο για τα μεταλλαγμένα στελέχη, όσο και για τα άτομα που εφαρμόστηκε το φαινόμενο του RNAi έγινε φαινοτυπικός χαρακτηρισμός. Για τον λόγο αυτό μελετήθηκε η ικανότητα των στελεχών να αποκρίνονται σε μια σειρά από διαφορετικά ερεθίσματα. Από την μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι δυο γονίδια των Degenerins συμμετέχουν σε διαφορετικές συμπεριφορές του οργανισμού. Το γονίδιο T28F4.2 έχει σημαντικό ρόλο στην αίσθηση από τον *C. elegans* διαλυτών αλλά και πτητικών χημικών ενώσεων. Το γονίδιο ZK770.1 φάνηκε ότι είναι σημαντικό προκειμένου ο οργανισμός να συνδυάζει διαφορετικά ερεθίσματα και να αλλάζει την συμπεριφορά του με βάση αυτά. Πρόκειται δηλαδή για την εκδήλωση του φαινομένου της μνήμης.

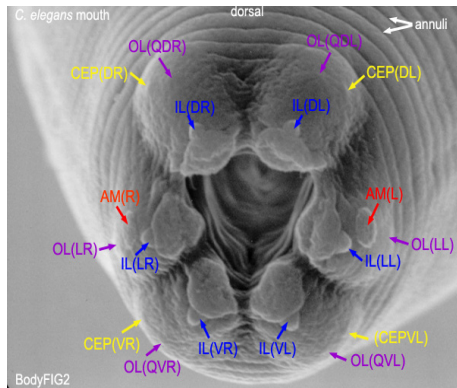
## 2. Εισαγωγή

i) Ο *C. elegans* είναι ένας οργανισμός μοντέλο που έχει μελετηθεί σε βάθος, κυρίως σε σχέση με το νευρικό του σύστημα. Είναι γνωστές όλες οι κυτταρικές διαιρέσεις που οδηγούν στην συγκρότηση του οργανισμού από 958 νευρικά, μυϊκά και επιθηλιακά κύτταρα. Σχετικά με το νευρικό του σύστημα είναι γνωστό ότι αποτελείται από 302 νευρώνες. Για αυτούς έχουν περιγραφεί όλες οι κυτταρικές διαιρέσεις που οδηγούν στον σχηματισμό τους, ενώ είναι γνωστό και το χωρο-χρονικό αναπτυξιακό τους πρότυπο. Έτσι, για κάθε νευρώνα ξεχωριστά είναι γνωστή η ακριβής θέση που φέρει στον οργανισμό, αλλά και το αναπτυξιακό στάδιο κατά το οποίο προήλθε.

Ο μεγάλος όγκος μελέτης που έχει πραγματοποιηθεί σε σχέση με το νευρικό σύστημα έχει οδηγήσει στον χαρακτηρισμό της λειτουργίας σχεδόν κάθε νευρικού κυττάρου. Κάθε νευρώνας είναι υπεύθυνος για μια ή περισσότερες λειτουργίες. Ανάλογα με τον ρόλο που επιτελεί κάθε νευρώνας, αυτοί χωρίζονται σε αισθητήριους (πρόσληψη ερεθισμάτων), ενδιάμεσους (επεξεργασία και προώθηση του σήματος στον κατάλληλο νευρώνα) και κινητικούς (μετάδοση του σήματος στους κατάλληλους μύες) (Hobert et al., 1998). Ανάλογα με την θέση τους στον οργανισμό, οι παραπάνω νευρώνες χωρίζονται σε 118 κλάσεις. Τα ονόματα των κυττάρων αυτών έχουν προέλθει από την θέση τους αυτή και από το αρχικό κύτταρο από το οποίο προέκυψαν μετά από διαδοχικές μιτωτικές διαιρέσεις. Επιπρόσθετα έχει χαρακτηριστεί το σύνολο των νευρικών συνάψεων που πραγματοποιεί κάθε μεμονωμένος νευρώνας του *C. elegans*. Είναι γνωστό ότι σχηματίζονται συνάψεις με επαφή (gap junctions), που είναι κυρίως νευρομυϊκές και μεταξύ γειτονικών νευρώνων. Η πλειονότητα των συνάψεων ωστόσο είναι χημικές, δηλαδή γίνονται με την μεσολάβηση νευροδιαβιβαστών (Bargmann and Kaplan, 1998). Στον νηματώδη συναντώνται νευροδιαβιβαστικά μόρια που είναι όμοια με εκείνα των σπονδυλωτών. Τέτοια είναι η ακετυλοχολίνη, η ντοπαμίνη, η σεροτονίνη, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ κ.α..

Ο νηματώδης έχει την ικανότητα να αντιλαμβάνεται μια σειρά από ερεθίσματα, όπως χημικά, μηχανικά ή θερμικά. Η κάθε αίσθηση που διαθέτει οφείλεται σε μια σειρά από διαφορετικούς και πολύ συγκεκριμένους αισθητήριους νευρώνες. Στους νευρώνες αυτούς φέρει υποδοχείς οι οποίοι είναι στις περισσότερες των περιπτώσεων κανάλια ιόντων (Mori, 1999). Η πλειονότητα των αισθητήριων νευρώνων βρίσκεται στο εμπρόσθιο άκρο του οργανισμού (κεφάλι). Πολλοί από τους νευρώνες αυτούς είναι μέρος εξειδικευμένων αισθητήριων οργάνων που καλούνται *sensilla*. Όταν οι δομές αυτές έρχονται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον λέγονται αμφίδια (amphids) ή φασμίδια (phasmids), για το κεφάλι και την ουρά αντίστοιχα (Sengupta, 2002). Κάθε τέτοιο όργανο περιλαμβάνει μια σειρά από απολήξεις αισθητήριων νευρώνων και δυο τύπους μη νευρικών κυττάρων (socket και sheath). Το ένα (socket) σχηματίζει μια κάψα συνδέοντας το όργανο με την υποδερμίδα και το άλλο

(sheath) παρεμβάλλεται μεταξύ sensillum και περιβάλλοντος, καλύπτοντας τις απολήξεις που προεκβάλλουν (εικ. 1).



**Εικόνα 1:** Μορφολογία του sensillum (εξειδικευμένο αισθητηρίου οργάνου). Φαίνονται οι δυο τύποι μη νευρικών κυττάρων (socket και sheath cells) και οι απολήξεις των αισθητήριων νευρικών κυττάρων (ILs, OLs) (*C. elegans* www.server)

Σε σχέση με την αίσθηση χημικών ενώσεων, ο *C. elegans* αντιλαμβάνεται πάνω από 40 διαφορετικά πτητικά υδατοδιαλυτά μόρια. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω συγκεκριμένων ομάδων νευρικών κυττάρων. Στους νευρώνες αυτούς υπάρχουν υποδοχείς οι οποίοι, είτε είναι ειδικοί για την πρόσληψη κάποιου μορίου, είτε είναι γενικοί υποδοχείς. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο νηματώδης έχει την δυνατότητα διάκρισης διαφορετικών χημικών μορίων, ανάλογα με την συγκέντρωσή τους στο περιβάλλον. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως χημειόταξη (chemo taxis) (Bargmann and Horvitz, 1991), (de Bono et al., 2002).

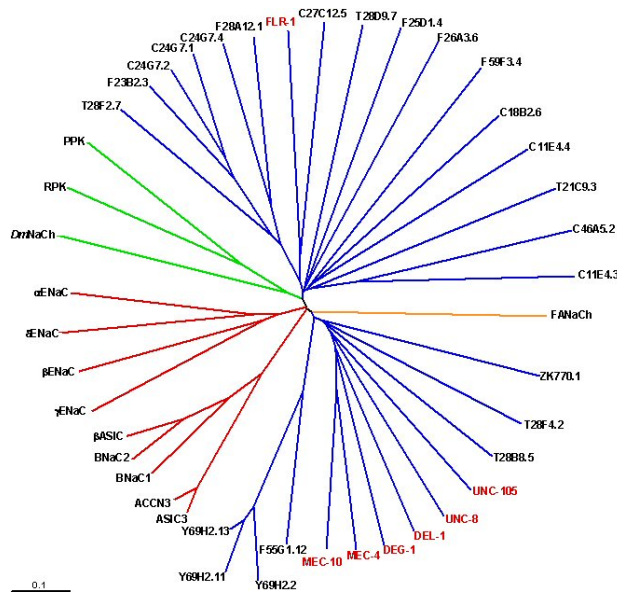
Όμως, ο *C. elegans* έχει και την δυνατότητα αίσθησης μηχανικών ερεθισμάτων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσα από έξι νευρώνες οι οποίοι είναι καταμεμημένοι κατά μήκος του σώματος και δίνουν την δυνατότητα αίσθησης ήπιων ή ισχυρών μηχανικών ερεθισμάτων. Και πάλι διαφορετικοί υποδοχείς (μηχανοϋποδοχείς) στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών προσλαμβάνουν ήπια και ισχυρά μηχανικά ερεθίσματα (Tavernarakis and Driscoll, 1997). Έτσι, ο νηματώδης μπορεί να αντιλαμβάνεται την ύπαρξη ενός εμποδίου και οπισθοχωρώντας να επαναπροσδιορίζει την κατεύθυνσή του. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως απόκριση από μηχανική πίεση στην μύτη ή “nose touch response”. Αν το μηχανικό ερέθισμα ασκηθεί στην περιοχή της ουράς του, τότε επιταχύνει προς τα εμπρός. Τέλος φέρει κατάλληλους υποδοχείς για την αίσθηση της οσμωτικής πίεσης του περιβάλλοντος.

Καθώς το θερμοκρασιακό εύρος στο οποίο ζει ο νηματώδης κυμαίνεται μεταξύ 14<sup>0</sup>C και 26<sup>0</sup>C, αυτός μπορεί να αισθάνεται την περιβαλλοντική θερμοκρασία. Το φαινόμενο αίσθησης της θερμοκρασίας λέγεται θερμότηταξη (thermo taxis). Οι αισθητήριοι νευρώνες και οι υποδοχείς στους οποίους οφείλεται αυτή η ικανότητα του *C. elegans* έχουν χαρακτηριστεί και μελετηθεί (Mori and Ohshima, 1995).

Χαρακτηριστικό του νευρικού συστήματος του *C. elegans*, το οποίο συναντάται και σε πολυπλοκότερους οργανισμούς, είναι ο “εκφυλισμός” (adaptation), η ευαισθητοποίηση (sensitization) και η μικρής και μακράς διάρκειας μνήμη (habituation και associative learning respectively). Με την έκθεση του νηματώδη σε ένα ερέθισμα, αρχικά παρατηρείται αυξημένη ικανότητα απόκρισης σε αυτό (sensitization). Αν το ερέθισμα εξακολουθεί να επιδρά, τότε παρατηρείται μείωση της ικανότητας απόκρισης (adaptation) (Colbert and Bargmann, 1995). Αν η μειωμένη απόκριση διαρκεί για μικρό χρονικό διάστημα, εξαιτίας ενός ερεθίσματος, το φαινόμενο καλείται μη συνδεδεμένη μνήμη (habituation). Εντούτοις ο νηματώδης έχει την δυνατότητα συνδυασμού της ύπαρξης δυο διαφορετικών ερεθισμάτων και απόκρισης με βάση αυτά (associative learning). Έτσι ο *C. elegans* συνδυάζει την περιβαλλοντική θερμοκρασία με την ύπαρξη, ή την απουσία, τροφής από αυτό. Αν βρεθεί σε διαφορετικό περιβάλλον προσπαθεί να βρει την θερμοκρασία την οποία έχει συνδυάσει με την ύπαρξη τροφής.

ii) Οι Degenerins αποτελούν μια οικογένεια γονιδίων που κωδικοποιούν κανάλια ιόντων νατρίου. Τα κανάλια αυτά έχει δείχτει ότι παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην διαδικασία της αίσθησης μηχανικών ερεθισμάτων από τους παραπάνω νευρώνες. Τα πρώτα μέλη της οικογένειας που χαρακτηρίστηκαν ήταν τα γονίδια DEG-1 και MEC-4. Και τα δυο αυτά γονίδια δείχθηκε ότι εκφράζονται σε αισθητήριους νευρώνες οι οποίοι εμπλέκονται στην αίσθηση μηχανικών ερεθισμάτων (touch receptor neurons). Η ονομασία τους (Degenerins) προήλθε από το φαινοτυπικό αποτέλεσμα που είχαν επικρατείς μεταλλαγές των γονιδίων αυτών. Συγκεκριμένα προκαλούσαν τον θάνατο των αισθητήριων νευρώνων στους οποίους εκφράζονταν. Επίσης, εκτοπική έκφρασή τους σε νέους νευρώνες οδηγούσε και πάλι στον θάνατο των νευρώνων αυτών (neurodegeneration). Τα γονίδια MEC-4 και MEC-10 αποτελούν τον πυρήνα των καναλιών ιόντων που είναι υπεύθυνα για το mechanotransduction, καθώς κωδικοποιούν υπομονάδες των καναλιών αυτών. Άλλα γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια των Degenerins είναι το UNC-8 και το UNC-105, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ημιτονοειδή κίνηση που χαρακτηρίζει τον *C. elegans* (locomotion). Συγκεκριμένα, τα μόρια αυτά ευθύνονται για την διαδοχική κάμψη και χαλάρωση των μυών που εξασφαλίζουν την κίνηση στον οργανισμό.

Σήμερα, η οικογένεια των Degenerins περιλαμβάνει 31 μέλη (εικ. 2), από τα οποία έχουν μελετηθεί και χαρακτηριστεί για την λειτουργία τους τα 7. Το σύνολο των γονιδίων αυτών έχουν ομαδοποιηθεί με βάση την ομοιότητα στην αλληλουχία τους με τις αρχικές Degenerins. Το γεγονός αυτό δεν προϋποθέτει κοινή λειτουργία για όλα τα γονίδια της οικογένειας. Για τον λόγο αυτό απαιτείται η μονομερής μελέτη του ρόλου τους.



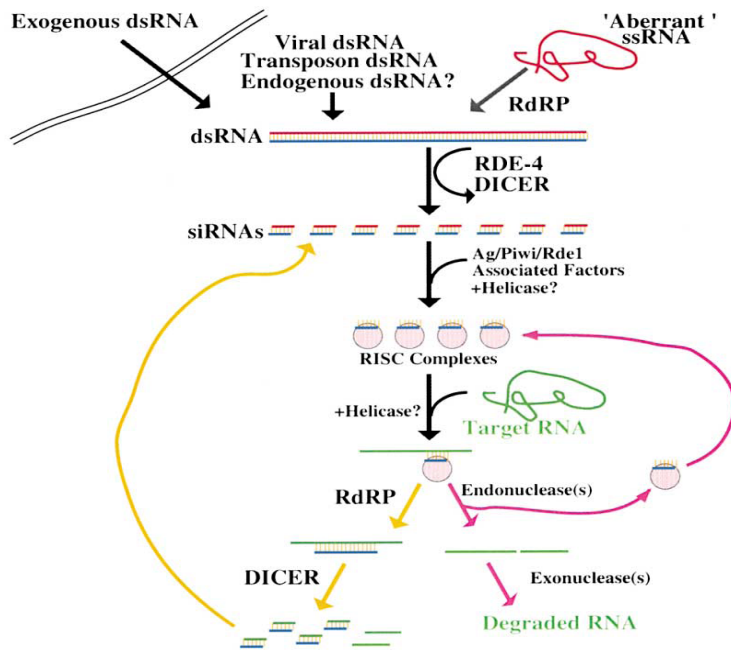
**Εικόνα 2:** Δενδρόγραμμα των DEG/ENaCs. Στον *C. elegans* απεικονίζονται με μπλε γραμμές, όπου τα ονόματα των γονιδίων που έχουν χαρακτηριστεί είναι με κόκκινα γράμματα. Στο σχήμα περιλαμβάνονται επίσης γονίδια θηλαστικών αλλά και της *D. melanogaster*. (Tavernarakis and Driscoll, 1997)

iii) Το RNAi είναι ένα φαινόμενο καταστολής της έκφρασης γονιδίων, που αρχικά περιγράφηκε στον *C. elegans*. Η εισαγωγή στον οργανισμό δίκλωνου RNA (dsRNA), το οποίο να αντιστοιχεί στο παραγόμενο mRNA ενός γονιδίου, οδηγεί στον ισχυρό και ειδικό κατακερματισμό του mRNA και συνεπώς στην καταστολή της έκφρασης του γονιδίου-στόχου. Για το μονοπάτι εκδήλωσης του φαινομένου του RNAi, έχουν διατυπωθεί διαφορετικές θεωρίες. Σύμφωνα με την επικρατέστερη πιστεύεται ότι αρχικά το δίκλωνο μόριο RNA κόβεται σε μικρά τμήματα 21-25nt (siRNAs) από την RNAάση τύπου III που λέγεται DICER. Τα μικρά τμήματα RNA που προκύπτουν έτσι, αναγνωρίζουν το ομόλογο m-RNA με την βοήθεια του συμπλόκου RISC. Αποτέλεσμα της υβριδοποίησης αυτής είναι δυο γεγονότα. Το ενδογενές mRNA υπόκειται σε πέψη από κατάλληλες RNAασες και έτσι καταστέλλεται η έκφρασή του. Από την άλλη, τα ολιγομερή siRNA υβριδοποιούνται με το mRNA το οποίο και ενισχύεται από μια RNA πολυμεράση (RdRP). Στην συνέχεια τα δίκλινα μόρια που παράγονται, πέπτονται και πάλι από την DICER, με αποτέλεσμα την συνεχή παραγωγή και ανακύκλωση ολιγομερών μορίων RNA. Η συνεχής παραγωγή και ανακύκλωση των μορίων αυτών οδηγεί στην δραστική πέψη του παραγόμενου mRNA και τελικά στην καταστολή της έκφρασης του γονιδίου-στόχου (εικ 3).

Η συγκεκριμένη μέθοδος καταστολής γονιδίων είναι ικανοποιητικά αποτελεσματική και χρησιμοποιείται κατά κόρον εξαιτίας της ευκολίας στην εφαρμογή της. Η εισαγωγή του δίκλωνου RNA μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με μικροένεση του dsRNA, είτε μέσω της τροφής του οργανισμού. Στην πρώτη περίπτωση, τα κύτταρα του οργανισμού



«κατακλύζονται» από δίκλινα μόρια RNA με αποτέλεσμα την εισαγωγή τους στο εσωτερικό του κυττάρου. Στην δεύτερη περίπτωση, ο οργανισμός ταΐζεται με βακτήρια τα οποία παράγουν δίκλινο RNA. Η μέθοδος αυτή αν και είναι όσο αποτελεσματική είναι η μέθοδος της μικροένεσης, φέρει διακριτά πλεονεκτήματα. Σημαντικότερο όλων είναι το γεγονός ότι το φαινόμενο του RNAi εφαρμόζεται ταυτόχρονα σε ολόκληρο τον πληθυσμό της καλλιέργειας και όχι σε περιορισμένο αριθμό ατόμων όπως κατά την ένεση dsRNA.



**Εικόνα 3:** Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού μετα-μεταγραφικής καταστολής γονιδίων (RNAi). (Sijen et al., 2001)

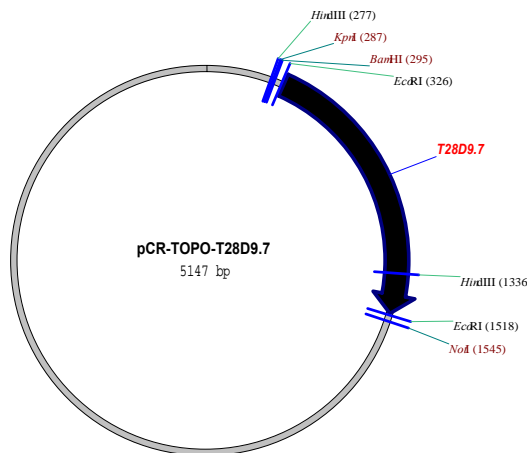
## 1. Πειραματική διαδικασία

i) Από την οικογένεια των Degenerins επιλέχθηκαν για καταστολή, μέσω RNAi, τα παρακάτω γονίδια. Επίσης, τα μήκη των τμημάτων που υποκλωνοποιήθηκαν έχουν ως εξής:

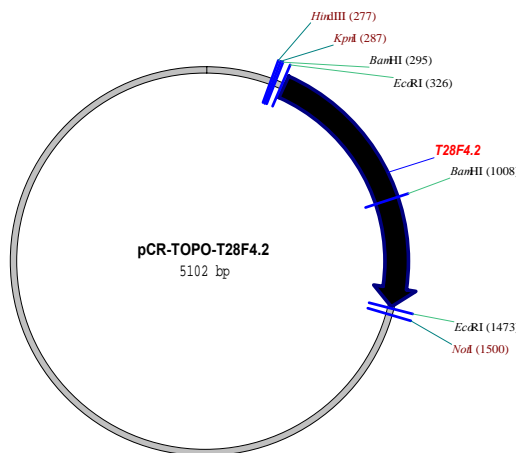
1. C24G7.2 (1520 bp)
2. F28A12.1 (750 bp)
3. T28D9.7 (1258 bp)
4. T28F4.2 (1213 bp)
5. ZK770.1 (1576 bp)

Για τα γονίδια αυτά ένα τμήμα του ORF είχε ήδη υποκλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pCR-TOPO. Οι χάρτες των κατασκευών αυτών φαίνονται για το κάθε γονίδιο (εικ 4α-ε):

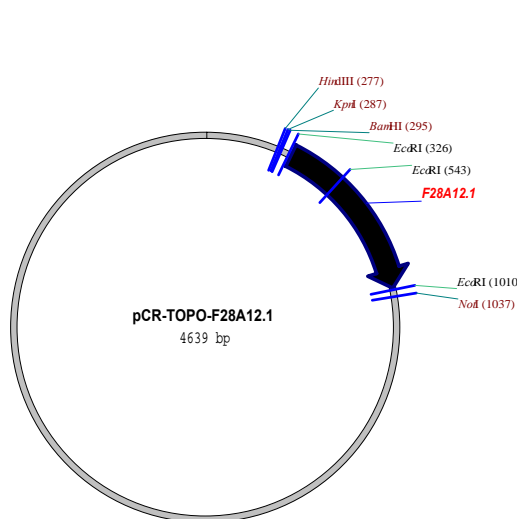
**Εικόνα 4α:**



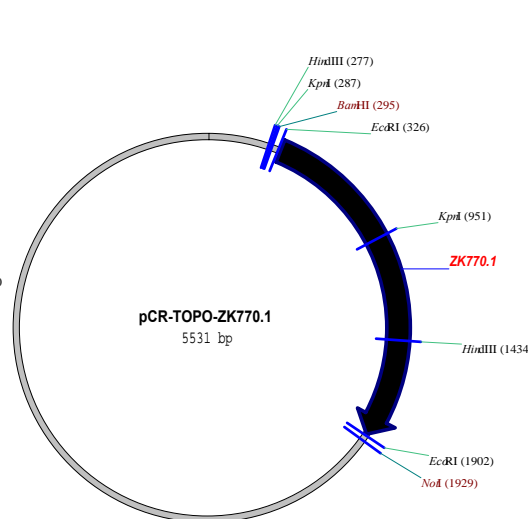
**Εικόνα 4β:**

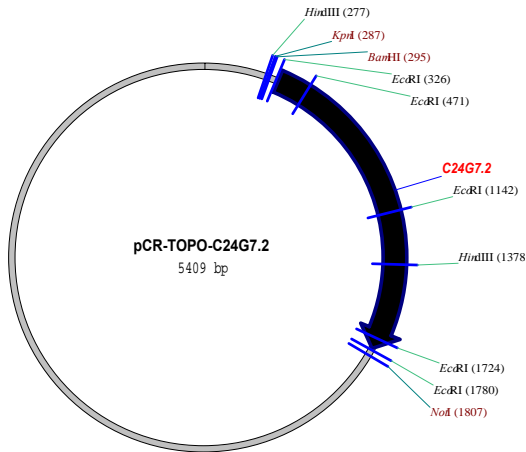


**Εικόνα 4γ:**

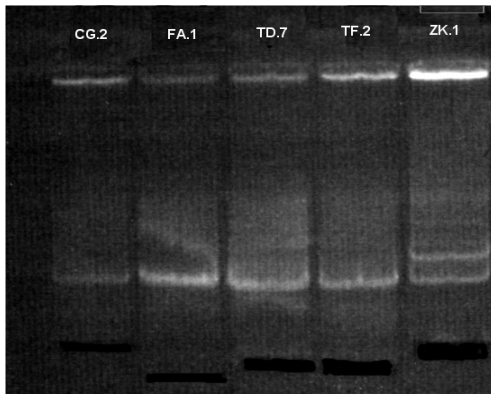


**Εικόνα 4δ:**



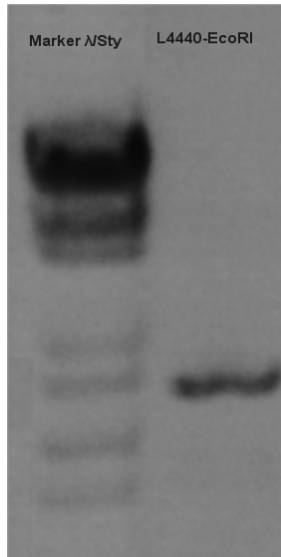
**Εικόνα 4ε**

Στην συνέχεια έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA για κάθε δείγμα. Ακολούθησε πέψη του DNA με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, ώστε να απομονωθεί το εκάστοτε ένθεμα. Για όλα τα δείγματα η πέψη έγινε με τα ένζυμα KpnI και NotI. Εξέρεση αποτελεί το ένθεμα ZK7770.1, το οποίο απομονώθηκε μετά από πέψη με το ένζυμο EcoRI. Τα προϊόντα των παραπάνω πέψεων φορτώθηκαν σε gel Αγαρόζης 1%, από όπου και απομονώθηκε η ζώνη που αντιστοιχεί στο DNA του κάθε ενθέματος (εικ 5).



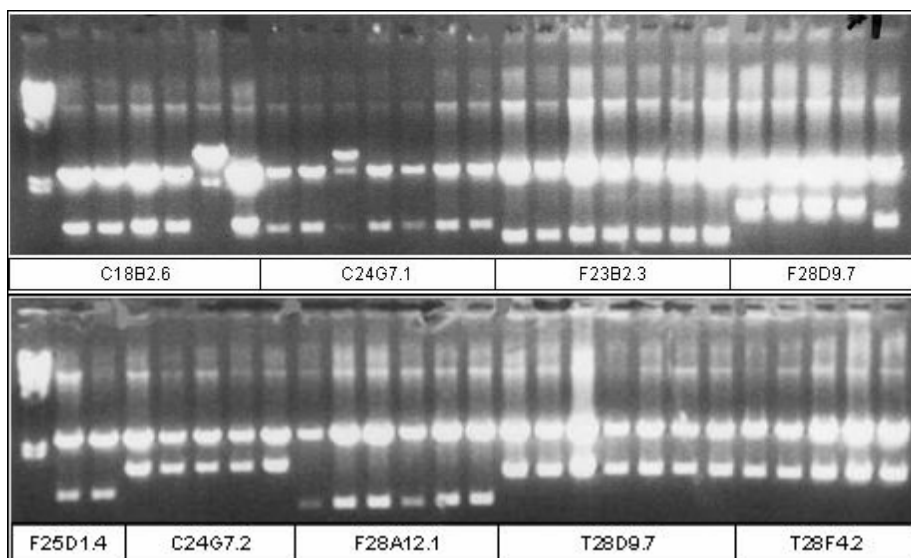
**Εικόνα 5:** Φωτογραφία από gel στο οποίο έχουν φορτωθεί τα προϊόντα της πέψης των παραπάνω φορέων με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Στην φωτογραφία διακρίνονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στο πλασμιδιακό DNA, αλλά και τα κενά απ' όπου απομονώθηκε το DNA που αντιστοιχεί στα ενθέματα του φορέα (pCR-TOPO).

Το DNA από τις παραπάνω ζώνες, απομονώθηκε με την χρήση κολώνας Qiagen. Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε DNA του φορέα pL4440 στο οποίο είχε γίνει πέψη με τα ένζυμα KpnI και NotI, για την κλωνοποίηση των τεσσάρων πρώτων δειγμάτων. Για την κλωνοποίηση του ZK770.1 έγινε πέψη με το ένζυμο EcoRI (εικ 6). Ο φορέας pL4440 χρησιμοποιείται για την παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA. Φέρει τον υποκινητή της T7 πολυμεράσης σε δυο αντίθετες κατευθύνσεις που περικλείουν την περιοχή κλωνοποίησης (polylinker). Αποτέλεσμα αυτής της δομής του φορέα είναι κάθε φορά που παράγεται πολυμεράση T7 να μεταγράφει το ένθεμα και προς τις δυο κατευθύνσεις, παράγοντας δίκλωνο RNA. Η έκφραση της T7 πολυμεράσης εξασφαλίζεται μετά από επαγωγή με IPTG του υποκινητή από τον οποίο ελέγχεται.



**Εικόνα 6:** Πέψη του φορέα έκφρασης pL4440 με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI

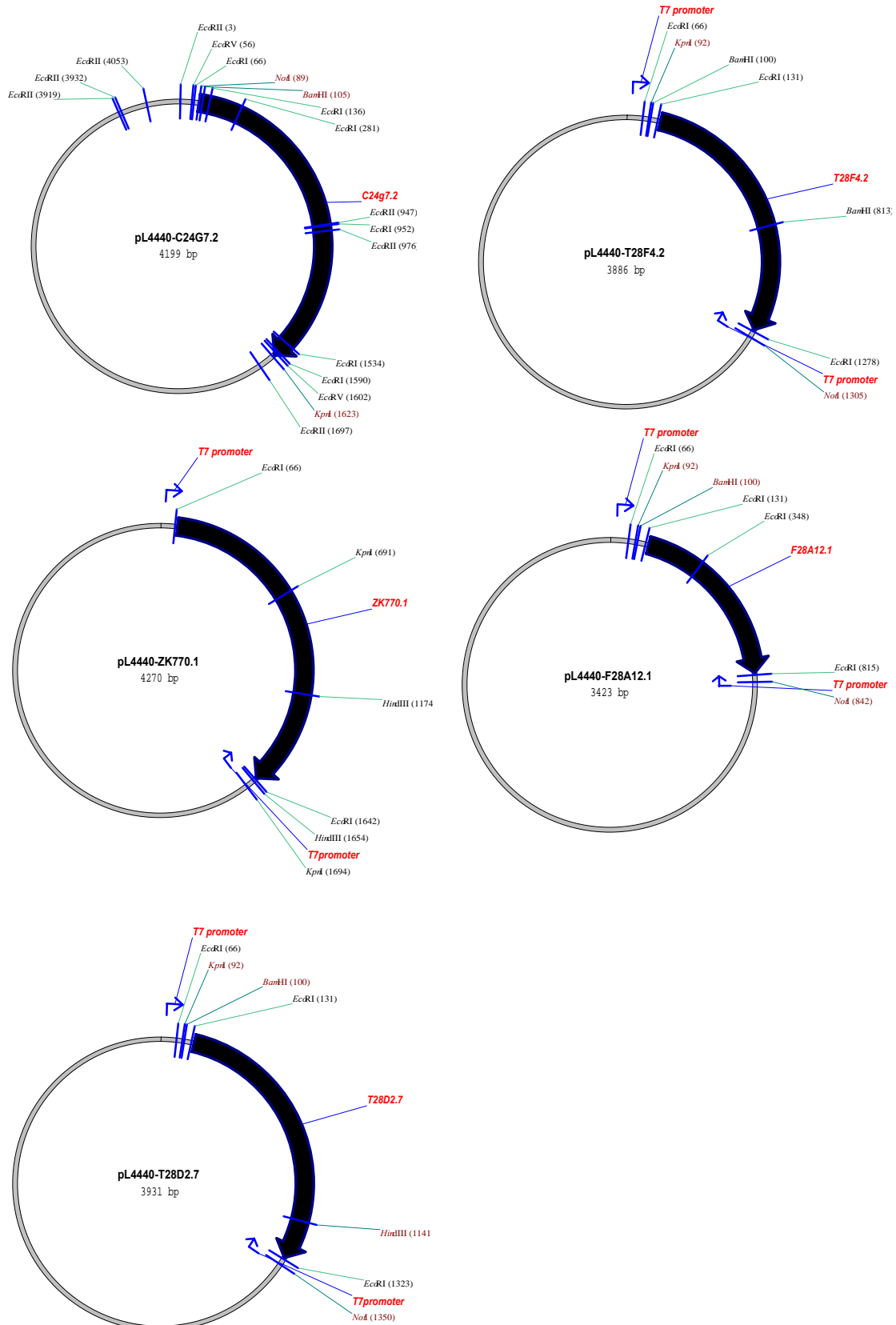
Ακολούθησε αντίδραση λιγάσης (ligation) για την ένθεση των τμημάτων DNA στον φορέα έκφρασης pL4440. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων XL-1 blue. Από τις αποικίες που προέκυψαν από μονώθηκε πλασμιδιακό DNA. Για την διαπίστωση της ορθής ένθεσης των παραπάνω τμημάτων στον φορέα έγιναν διαγνωστικές πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα KpnI και NotI για όλα τα δείγματα (και προϋπάρχοντα), ενώ για το ZK770.1 έγινε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Η εικόνα που προέκυψε δείχνει τα αναμενόμενα μεγέθη DNA που αντιστοιχούν στα μεγέθη των ενθεμάτων (εικ 7).



**Εικόνα 7:** Φαίνονται οι ζώνες στις οποίες αντιστοιχούν τα μεγέθη του ενθεμένου DNA στον φορέα pL4440, για το κάθε δείγμα.

Οι χάρτες των πλασμιδιακών κατασκευών απεικονίζονται γραφικά στις εικόνες 8α-ε. Στις εικόνες αυτές απεικονίζεται το τμήμα του DNA που έχει εντεθεί ανάμεσα στους υποκινητές της T7 πολυμεράσης. Οι υποκινητές αυτοί έχουν αντίθετη φορά και φαίνονται ως μπλε βέλη.

**Εικόνες 8α-ε**



Το πλασμιδιακό DNA που περιλαμβάνει σε κάθε περίπτωση το κατάλληλο ένθεμα χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων HT115 (Mello et al., 1991). Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τα δεκτικά κύτταρα XL-1 blue είναι εξαιτίας της μεγάλης αποτελεσματικότητάς τους στον μετασχηματισμό. Τα δεκτικά κύτταρα HT115 χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση πειραμάτων RNAi. Η χαμηλή αποτελεσματικότητα στον μετασχηματισμό ξεπερνάται επειδή χρησιμοποιείται υπερελικωμένο DNA από τα κύτταρα XL-1. Επίσης το συγκεκριμένο στέλεχος φέρει ένα επίσωμα με το γονίδιο της πολυμεράσης T7 κάτω από τον υποκινητή LacZ (IPTG επαγόμενη έκφραση της πολυμεράσης T7), ενώ έχει μεταλλαγές σε RNAases τύπου III, αποφεύγοντας έτσι την πέψη του παραγόμενου δίκλωνου RNA εντός των βακτηριακών κυττάρων.

ii) Οι παραπάνω κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν για το τσίσμα ατόμων *C. elegans* και την καταστολή συγκεκριμένου κάθε φορά γονιδίου. Τα στελέχη που ελέγχθησαν ήταν αγρίου τύπου (N2), αλλά και δυο ακόμα στελέχη που ελέγχονται για μεγαλύτερη αποδοτικότητα στο RNAi (*nre-1*, *nre-2*). Κι αυτό διότι πρόκειται για δυο στελέχη με μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν RNAases οι οποίες πέπτουν το δίκλωνο RNA μειώνοντας την αποτελεσματικότητα του RNAi. Οι φαινότυποι που ελέγχθηκαν και τα αποτελέσματα των πειραμάτων με RNAi φαίνονται στους πίνακες 1 και 2.

**Πίνακας 1:**

Στέλεχη-RNAi	Αριθμός Ατόμων	Κίνηση	Τροφή	Αριθμός Αυγών	Αριθμός Ωαρίων	Σχήμα Αυγών	Νέα Άτομα
<i>nre1-L4440</i>	11	v	v	+	-	OK	++
<i>nre1-C18B2.6</i>	10	v	v	++	-	OK	+
<i>nre1-F28A12.1</i>	10	v	v	+	-	OK	+/-
<i>nre1-F23B2.3</i>	9	v	v	+	-	OK	+/-
<i>nre1-T28D9.7</i>	9	v	v	+/-	-	OK	+/-
<i>nre1-T28F2.7</i>	10	v	v	+	+/-	OK	+
<i>rf3-L4440</i>	10	v	v	+/-	+	OK	++
<i>rf3-C18B2.6</i>	9	v	v	+/-	+	OK	+
<i>rf3-F28A12.1</i>	11	v	v	+/-	++	OK	+/-
<i>rf3-F23B2.3</i>	11	v	v	+/-	++	OK	+
<i>rf3-T28D9.7</i>	9	v	v	+/-	++	OK	+
<i>rf3-T28F2.7</i>	11	v	v	+/-	++	OK	+/-
<i>nre2-L4440</i>	11	v	v	++	-	OK	+++
<i>nre2-C18B2.6</i>	11	v	v	++	-	OK	+++
<i>nre2-F28A12.1</i>	11	v	v	++	-	OK	++
<i>nre2-F23B2.3</i>	9	v	v	++	-	OK	+++
<i>nre2-T28D9.7</i>	10	v	v	+	-	OK	++
<i>nre2-T28F2.7</i>	10	v	v	++	-	OK	+++
N2- L4440	11	v	v	++	-	OK	+++
N2- C18B2.6	12	v	v	++	-	OK	+++
N2- F28A12.1	99	v	v	++	-	OK	+++
N2- F23B2.3	99	v	v	+	-+	OK	++
N2- T28D9.7	11	v	v	+	-+	OK	+++
N2- T28F2.7	12	v	v	++	-	OK	+++

Πίνακας 2:

Στελέχη-RNAi	Αριθμός Ατόμων	Κίνηση	Τροφή	Αριθμός Αυγών	Αριθμός Ωαρίων	Σχήμα Αυγών	Νέα Άτομα
nre1-L 4440	12	Ημιτονοειδής με κανονική ταχύτητα	Σταθερός ρυθμός	+	-	κανονικά	?
nre1-C24G7.1	10	-//-	-//-	+++	-+	Λίγα σφαιρικά	+
nre1-C24G7.2	9	-//-	-//-	+	-		+
nre1-F 25D1.4	10	-//-	-//-	+	++	κανονικά	+
nre1-T28F4.2	10	-//-	-//-	++	-	-//-	+
nre1-ZK770.1	9	-//-	-//-	+++	?	-//-	-+
pf3-L4440	12	-//-	-//-	+++	++	-//-	+
pf3-C24G7.1	9	-//-	-//-	++	+/-	-//-	-
pf3-C24G7.2	10	-//-	-//-	+	++	Λίγα κανονικά	-
pf3-F25D1.4	10	-//-	-//-	++	+++		-+
pf3-T28F4.2	10	-//-	-//-	+	-+	-//-	-
pf3-ZK770.1	9	-//-	-//-	+	-	-//-	-
nre2-L 4440	11	-//-	-//-	++	-	-//-	+++
nre2-C24G7.1	10	-//-	-//-	+++	-	-//-	+++
nre2-C24G7.2	9	-//-	-//-	++	-	-//-	++
nre2-F 25D1.4	12	-//-	-//-	+	-+	-//-	+
nre2-T28F4.2	10	-//-	-//-	++	-	-//-	++
nre2-ZK770.1	10	-//-	-//-	++	-	Σφαιρικά	++
N2- L4440	10	-//-	-//-	+++	-	Κανονικά	+
N2-C24G7.1	12	-//-	-//-	++	-	-//-	++
N2-C24G7.2	9	-//- (εκτός ενός)	-//-	+++	-	-//-	+
N2-F25D1.4	11	-//-	-//-	++	-	-//-	++++
N2-T28F4.2	11	Μικρή ταχύτητα	-//-	++	-	-//-	++
N2-ZK770.1	9	Μικρή ταχύτητα	-//-	+++	-	-//-	++ <sup>1</sup>

<sup>1</sup> +++ = πολλά (αυγά, ωάρια, κ.τ.λ.)

++ = αρκετά

+ = λίγα

-+ = ελάχιστα

- = καθόλου

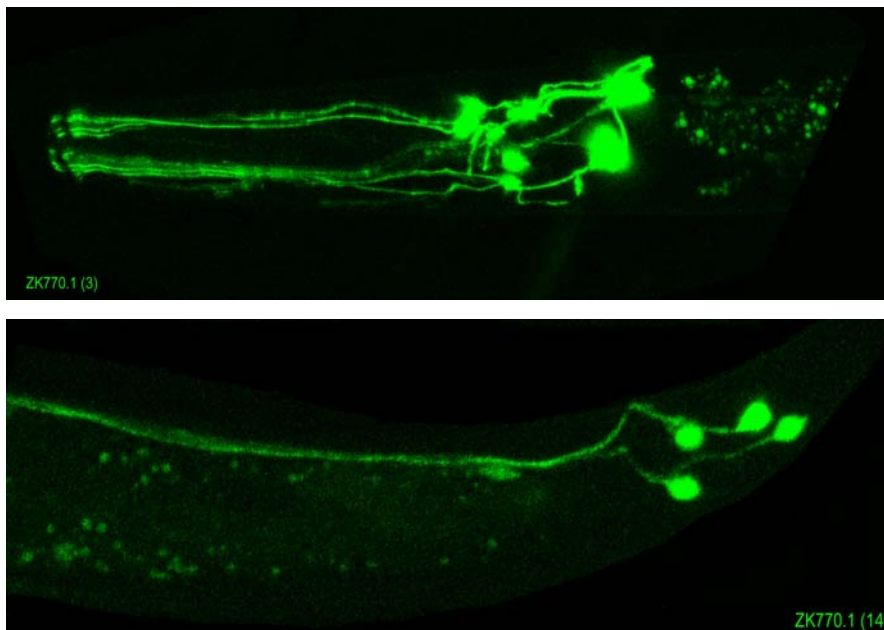
Στα παραπάνω πειράματα έγινε έλεγχος για φαινοτυπικά μειονεκτήματα σε μια σειρά από διαφορετικά πειράματα RNAi. Οι φαινότυποι οι οποίοι ελέγχθηκαν σχετίζονται με την ικανότητα απόθεσης αυγών (egg laying), την γονιμότητα (fertility), την ημιτονοειδή κίνηση (locomotion) και την κίνηση του φάρυγγα (pharyngeal rumping) των ατόμων. Από τα πειράματα αυτά υπήρξαν μικρές φαινοτυπικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με τα άτομα αγρίου τύπου (κυρίως σε σχέση με την απόθεση αυγών). Παρά ταύτα όμως οι σχετικά περιορισμένης έκτασης προβληματικοί φαινότυποι δεν αποτελούν ισχυρή απόδειξη που να δικαιολογεί ένα φαινοτυπικό μειονέκτημα εξαιτίας του RNAi. Εντούτοις θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα δεδομένα αποτελέσματα είναι δυνατό να οφείλονται είτε στο γεγονός ότι το RNAi δεν είχε πλήρη εφαρμογή στα στελέχη (variable efficiency), είτε διότι τα γονίδια που μελετώνται δεν εμπλέκονται στην εμφάνιση κάποιων από τους παραπάνω φαινοτύπους.

iii) Καθώς η ποικίλη εκδήλωση του φαινομένου του RNAi είναι γεγονός, για περαιτέρω παρατηρήσεις χρησιμοποιήθηκαν στελέχη που ανασύρθηκαν μετά από σάρωση βιβλιοθηκών μεταλλαξογένεσης. Εν προκειμένω χρησιμοποιήθηκαν δυο στελέχη, κάθε ένα από τα οποία ήταν ομόζυγο για μια μεταλλαγή (έλλειψη) σε συγκεκριμένη *Degenerin*. Από τα στελέχη αυτά το ένα είχε μεταλλαγή στο αλληλόμορφο OK289 του γονιδίου T28F4.2 και το άλλο στο αλληλόμορφο OK415 του γονιδίου ZK770.1. Και για τα δυο αυτά γονίδια καθορίστηκε το χρωροχρονικό πρότυπο έκφρασης. Το μοτίβο έκφρασης των γονιδίων είναι συχνά πληροφοριακό για την λειτουργία τους ενώ παραπέμπει σε ένα επόμενο επίπεδο, την συμμετοχή κάποιας ομάδας ή μεμονωμένων κυττάρων στην εκδήλωση ενός φαινοτύπου. Μεγάλος αριθμός μεμονωμένων κυττάρων έχει μελετηθεί και ομαδοποιηθεί ανάλογα με την λειτουργία που επιτελεί. Στον *C. elegans* είναι χαρακτηριστικό γεγονός η εκδήλωση ενός φαινοτύπου να οφείλεται στην δράση πολύ συγκεκριμένων νευρώνων. Παράλληλα, έχουν χαρακτηριστεί συγκεκριμένα γονίδια, τα οποία εκφράζονται σε συγκεκριμένους νευρώνες όπου και επιτελούν συγκεκριμένη λειτουργία. Το γεγονός ότι υπάρχει περιορισμένη επικάλυψη στην λειτουργία των διαφορετικών νευρώνων, κάνει δυνατή την συσχέτιση μιας ομάδας κυττάρων με συγκεκριμένη λειτουργία. Για να γίνει εφικτή η παρατήρηση της έκφρασης ενός μεμονωμένου γονιδίου, θα χρειαστεί ένα στέλεχος αγρίου τύπου (N2 Bristol) να μετασχηματιστεί με μια πλασμιδιακή κατασκευή, με μικροένεση (Mello et al., 1991). Η κατασκευή αυτή φέρει το γονίδιο που μελετάται (ORF) σε σύνδεση με έναν γονίδιο μάρτυρα. Το γονίδιο-μάρτυρας κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη (GFP) η οποία όταν εκτεθεί σε μπλε ακτινοβολία (450nm) εκπέμπει μέρος της ενέργειας που δέχεται σε διαφορετικό μήκος κύματος (περιοχή του πράσινου ~517nm). Ο μάρτυρας αυτός είναι δυνατό να παρατηρηθεί με την χρήση μικροσκοπίου φθορισμού, οπότε και απεικονίζεται το μοτίβο έκφρασης του γονιδίου. Κατά τον μετασχηματισμό χρησιμοποιείται και ένας μάρτυρας γνωστού φαινοτύπου (π.χ. *gol-6*). Πρόκειται για ένα γονίδιο που φέρει μια επικρατή μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας. Μέσω του μάρτυρα αυτού ελέγχεται η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού και επιτρέπεται η φαινοτυπική επιλογή των στελεχών χωρίς την χρήση ακτινοβολίας, δεδομένου ότι η τελευταία προκαλεί ποικίλες βλάβες στα εκτιθέμενα άτομα (συνήθως στειρότητα). Οι νευρώνες στους οποίους εκφράζονται τα δυο γονίδια φαίνονται στις παρακάτω εικόνες (εικ 9α-γ).





**Εικόνα 9α** Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου T28F4.2, όπως απεικονίζεται σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Παρατηρείται ότι το συγκεκριμένο γονίδιο εκφράζεται σε νευρικά κύτταρα τα οποία εντοπίζονται στην περιοχή του νευρικού δακτυλίου (nerve ring)



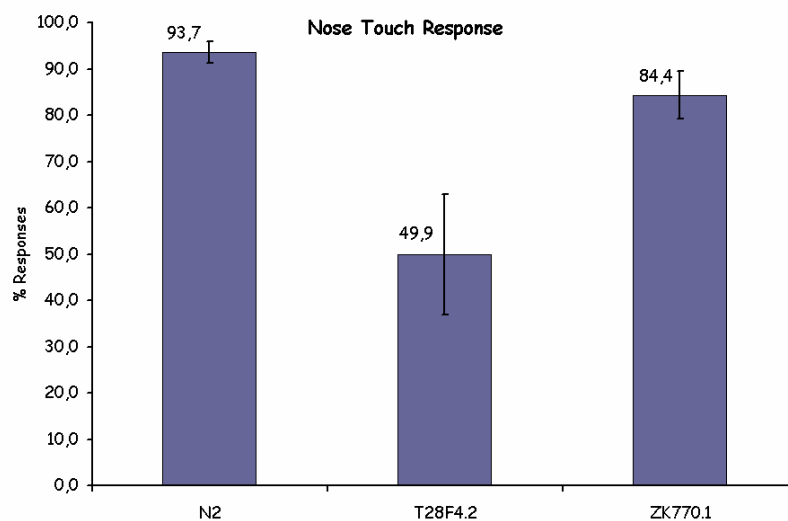
**Εικόνα 9β-γ** Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου ZK770.1, όπως απεικονίζεται σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Παρατηρείται ότι το συγκεκριμένο γονίδιο εκφράζεται τόσο σε νευρικά κύτταρα που εντοπίζονται στην περιοχή του νευρικού δακτυλίου (nerve ring), όσο και σε νευρώνες που εκτείνονται σε όλο το μήκος του σώματος του οργανισμού.

Τα παραπάνω πρότυπα έκφρασης δείχνουν ότι τα γονίδια που μελετήθηκαν εκφράζονται σε ένα σύνολο διαφορετικών νευρώνων. Σε αυτούς περιλαμβάνονται αισθητήριοι, ενδιάμεσοι και κινητικοί νευρώνες. Οι υποψήφιοι αισθητήριοι νευρώνες περιλαμβάνουν νευρικά κύτταρα που έχουν χαρακτηριστεί να συμμετέχουν στην αναγνώριση χημικών και μηχανικών ερεθισμάτων. Οι ενδιάμεσοι νευρώνες έχουν κυρίως ρόλο επεξεργασίας σημάτων (τις περισσότερες φορές διαφορετικά μεταξύ τους) και τα μεταδίδουν στους κινητικούς ή τα ασκούν ρυθμιστική δράση στους αισθητήριοις. Από τα γονίδια που

μελετήθηκαν φάνηκε ότι δεν διαδραματίζουν κάποιον αναπτυξιακό ρόλο, καθώς δεν παρατηρήθηκαν αναπτυξιακές ανωμαλίες εξαιτίας της έλλειψης των συγκεκριμένων γονιδίων. Ο ακριβής καθορισμός και η ταυτοποίηση του νευρώνα στον οποίο εκφράζεται το κάθε γονίδιο οφείλει να εξακριβωθεί με περαιτέρω μελέτη και πειραματικές προσεγγίσεις.

iv) Τα δυο παραπάνω στελέχη ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αποκρίνονται σε μια σειρά από ερεθίσματα. Τα γονίδια αυτά είναι μέλη της οικογένειας των Degenerins όπου τα γνωστά μέλη συμμετέχουν, εκτός των άλλων, στην αίσθηση μηχανικών ερεθισμάτων. Για τον λόγο αυτό έγινε έλεγχος των στελεχών για την ικανότητά τους να προσλαμβάνουν και να μεταδίδουν μηχανικά ερεθίσματα. Καθώς είναι γνωστό, ο *C. elegans* φέρει έξι νευρώνες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αίσθηση και την μετάδοση μηχανικών ερεθισμάτων. Οι μηχανοευαίσθητοι αυτοί νευρώνες φέρουν μηχανοϋποδοχείς οι οποίοι προσλαμβάνουν μηχανικά ερεθίσματα. Την αίσθηση των μηχανικών αυτών ερεθισμάτων ακολουθεί η εκπόλωση του νευρώνα. Η εκπόλωση αυτή οφείλεται στην είσοδο ιόντων νατρίου (mechanotransduction) από αντίστοιχα κανάλια ιόντων νατρίου, τα οποία συγκροτούν κάποια από τα μέλη της οικογένειας των Degenerins (MEC-4, MEC-10).

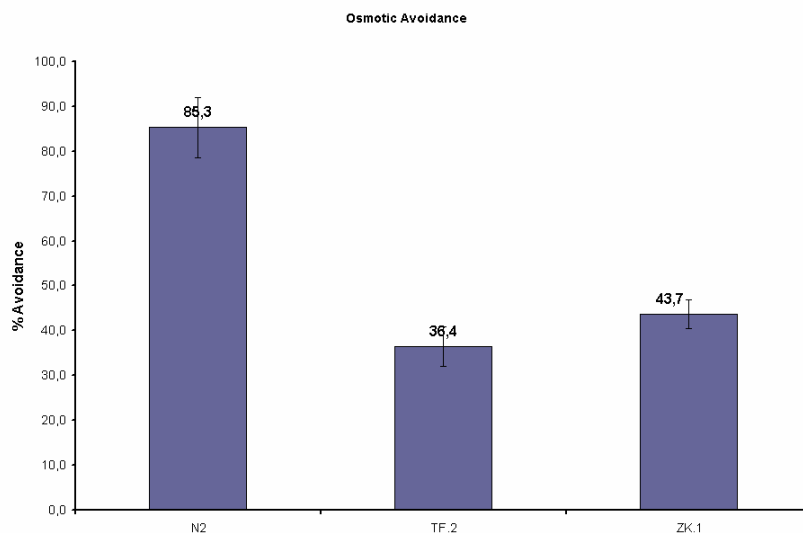
Προκειμένου να ελεγχθεί η συμμετοχή των μελετούμενων γονιδίων στην διαδικασία του mechanotransduction, τα στελέχη OK289 και OK415 υποβλήθηκαν σε πειράματα που είναι ενδεικτικά για προβλήματα στην αίσθηση μηχανικών ερεθισμάτων. Μια από τις συμπεριφορές που ελέγχθηκαν είναι το 'nose touch response'. Πρόκειται για την ιδιότητα του *C. elegans* να οπισθοχωρεί και να αλλάζει κατεύθυνση στην πορεία του όταν συναντήσει κάποιο εμπόδιο. Η συμπεριφορά αυτή οφείλεται στην αίσθηση μηχανικού ερεθίσματος (από την πρόσκρουση στο εμπόδιο) από τους νευρώνες ASH, FLP και OLQ (Colbert et al., 1997). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων για τα παραπάνω στελέχη φαίνονται στο διάγραμμα 1.



**Διάγραμμα 1** Παρατηρείται η μειωμένη ικανότητα απόκρισης του στελέχους ΔΤ28F4.2 (OK289) μετά από μηχανικό ερέθισμα στο εμπρόσθιο άκρο του οργανισμού (anterior end)

Εδώ φαίνεται ότι η μεταλλαγή (έλλειψη) στο γονίδιο T28F4.2 μειώνει την ικανότητα του ατόμου να αποκρίνεται σε μηχανικά ερεθίσματα στο πρόσθιο άκρο του σώματος. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχο φαινοτυπικό μειονέκτημα για μηχανικά ερεθίσματα που ασκούνται στα υπόλοιπα μέρη του σώματος. Πρόκειται δηλαδή για ερεθίσματα τα οποία όταν ασκούνται στο οπίσθιο άκρο του σώματος προκαλούν την επιτάχυνση του ατόμου προς τα εμπρός, ενώ όταν ασκηθούν στο μέσο του σώματος προκαλούν την οπισθοπορεία του ατόμου. Τέλος, η έλλειψη του γονιδίου ZK770.1 δεν προκάλεσε κανένα φαινοτυπικό μειονέκτημα το οποίο να σχετίζεται με την αίσθηση και την απόκριση σε μηχανικά ερεθίσματα.

v) Στην συνέχεια έγινε έλεγχος της ικανότητας απόκρισης των στελεχών OK289 και OK415 σε υψηλό οσμωτικό στρες. Καθώς είναι γνωστό ο *C. elegans* έχει την δυνατότητα να αισθάνεται και να αποφεύγει περιβάλλοντα υψηλής οσμωτικής συγκέντρωσης, γεγονός που είναι απαραίτητο για την επιβίωσή του, καθώς φυσιολογικά ζει και αναπτύσσεται στο χώμα. Οι νευρώνες από τους οποίους κυρίως επιτελείται η διαδικασία αυτή της αποφυγής υψηλού οσμωτικού στρες (osmotic avoidance) είναι οι ASH. Από το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων T28F4.2 και ZK770.1 φαίνεται ότι αυτά είναι πιθανό να εκφράζονται στους συγκεκριμένους νευρώνες (ASH). Για τον λόγο αυτό ελέγχθηκε η ικανότητα απόκρισης των στελεχών OK289 και OK415 σε υψηλό οσμωτικό περιβάλλον. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 2.



**Διάγραμμα 2** Παρατηρείται η μειωμένη ικανότητα απόκρισης των στελεχών Δ T28F4.2 (OK289) και Δ ZK770.1 (OK415) σε συνθήκες έντονης οσμωτικής πίεσης

Εδώ παρατηρήθηκε ότι και τα δυο γονίδια (T28F4.2 και ZK770.1) συμμετέχουν στην διαδικασία αίσθησης και απόκρισης σε υψηλό οσμωτικό στρες, διακρίνοντας έτσι μία από τις λειτουργίες στις οποίες μπορεί να εμπλέκονται οι συγκεκριμένες Degenerins στον *C. elegans*.

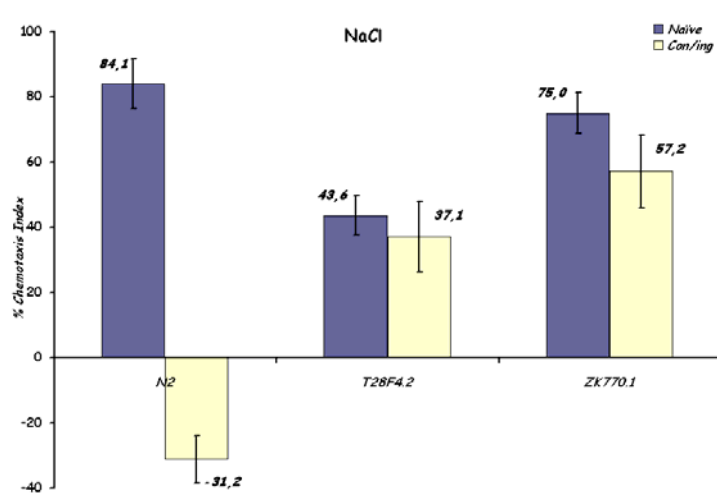
vi) Για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των συγκεκριμένων Degenerins έγιναν επιπλέον πειραματικοί έλεγχοι, για την συμμετοχή τους σε νέες λειτουργίες στον οργανισμό. Στα

πλαίσια αυτής της προσέγγισης μελετήθηκε η ικανότητα των στελεχών OK289 και OK415 να αισθάνονται μια σειρά από διαφορετικές χημικές ενώσεις, διαλυτές ή πτητικές. Η απόκριση αυτή που καλείται χημειόταξη, είναι χαρακτηριστική για τον οργανισμό, καθώς και πολύ ανεπτυγμένη. Όπως έχει αναφερθεί, ο *C. elegans* μπορεί να αισθάνεται περισσότερες από 40 διαφορετικές χημικές ενώσεις αλλά και να διακρίνει διαφορετικές συγκεντρώσεις των ενώσεων αυτών. Αυτό επιτυγχάνεται μέσα από ένα ευρύτερο σύνολο αισθητήριων νευρώνων και γονιδίων. Οι νευρώνες αυτοί εκτείνονται στο πρόσθιο ή το οπίσθιο άκρο του οργανισμού όπου και έρχονται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον. Είναι δηλαδή εντοπισμένοι σαν απολήξεις στο εμπρόσθιο ή το οπίσθιο άκρο και συγκροτούν τα αμφίδια και τα φασμίδια αντίστοιχα. Για την αίσθηση διαφορετικών χημικών ενώσεων είναι υπεύθυνοι και διαφορετικοί νευρώνες. Επίσης, παρατηρείται σχετικά μικρή επικάλυψη των λειτουργιών ανάμεσα σε διαφορετικούς νευρώνες. Με τον τρόπο αυτό ο *C. elegans* έχει την δυνατότητα, όχι μόνο να αισθάνεται, αλλά και να διακρίνει διαφορετικές χημικές ενώσεις, ακόμα και όταν οι διαφορές στην συγκέντρωσή τους είναι μικρές. Τα γονίδια που έχουν χαρακτηριστεί ως υπεύθυνα για την λειτουργία της χημειόταξης είναι ειδικό ή γενικό υποδοχείς των διάφορων χημικών ενώσεων ή συμμετέχουν στην μετάδοση του ερεθίσματος στους ενδιάμεσους και κινητικούς νευρώνες.

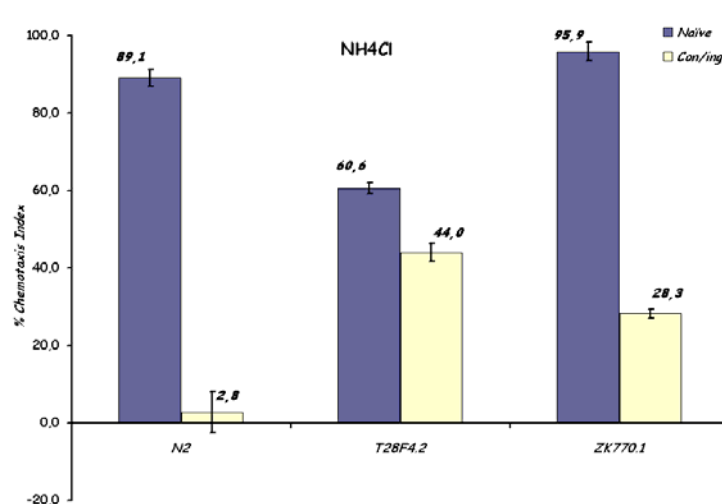
Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του οργανισμού που σχετίζεται με την χημειόταξη είναι η ικανότητα αποθήκευσης της προγενέστερης πληροφορίας και η τροποποίηση της συμπεριφοράς του με βάση αυτήν. Συγκεκριμένα ο *C. elegans* μπορεί να συνδυάζει την ύπαρξη μιας χημικής ένωσης με την παρουσία ή την έλλειψη τροφής στο περιβάλλον. Με τον τρόπο αυτό, όταν ο οργανισμός έχει αναπτυχθεί σε περιβάλλον με πλούσια θρεπτικά, παρουσία μιας χημικής ένωσης, επιλέγει να κινηθεί προς την ίδια χημική ένωση, ακόμα και όταν στο περιβάλλον δεν υπάρχει πλέον τροφή. Κι αυτό, διότι η ύπαρξη τροφής έχει συσχετιστεί με την παρουσία της δεδομένης χημικής ένωσης. Αντίθετα, ο συνδυασμός απώλειας τροφής με την ύπαρξη δεδομένης χημικής ένωσης, απωθεί τον οργανισμό από την ένωση αυτή. Κι αυτό γιατί η συγκεκριμένη ένωση υποδεικνύει δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, δηλαδή έλλειψη τροφής. Η ικανότητα αποθήκευσης προγενέστερης πληροφορίας και ο συσχετισμός διαφορετικών τέτοιων ερεθισμάτων καλείται *associative learning and memory*. Η αλλαγή της συμπεριφοράς αναλόγως με το είδος των ερεθισμάτων που έχει αντιληφθεί ο οργανισμός, καλείται *neural plasticity*.

Η ικανότητα του οργανισμού να αισθάνεται τις διάφορες χημικές ενώσεις, αλλά και η ικανότητά του να συνδυάζει διαφορετικά ερεθίσματα, ελέγχθηκαν πειραματικά. Για τον σκοπό αυτό άτομα που είχαν αναπτυχθεί είτε παρουσία είτε απουσία τροφής τοποθετήθηκαν σε ένα περιβάλλον κλίσης συγκέντρωσης για κάποια χημική ένωση. Η προτίμηση απέναντι στην ένωση αυτή ή όχι υπολογίζεται ως ένας δείκτης (δείκτης χημειόταξης). Ανάλογα με το αν τα άτομα είχαν μεγαλώσει παρουσία ή απουσία τροφής εξάγεται και διαφορετικό συμπέρασμα. Ο δείκτης χημειοτακτισμού παρουσία τροφής, υποδεικνύει την ικανότητα αίσθησης κάποιας

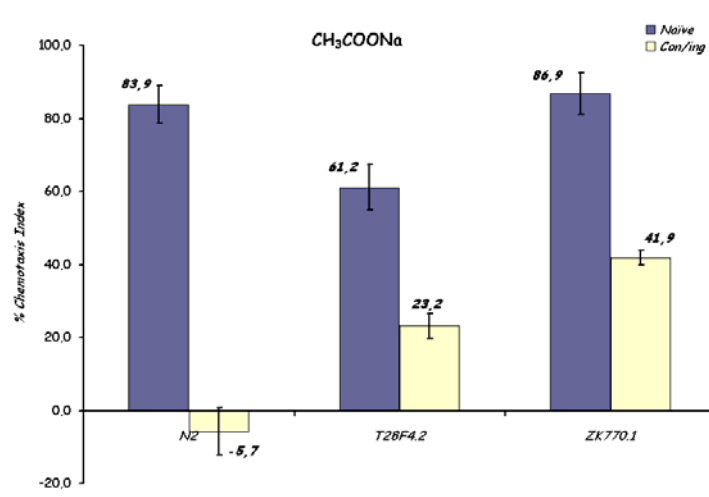
χημικής ένωσης (χημειόταξη). Ο δείκτης χημειοτακτισμού απουσία τροφής, υποδεικνύει την ικανότητα συνδυασμού της ύπαρξης της χημικής ένωσης και της απουσίας τροφής (associative learning and memory). Τα πειράματα αυτά εκδηλώθηκαν για τρεις διαφορετικές διαλυτές χημικές ενώσεις (NaCl, AcNa, NH<sub>4</sub>Cl) και μια πτητική (ισοαμιλική αλκοόλη). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα (3α-δ)



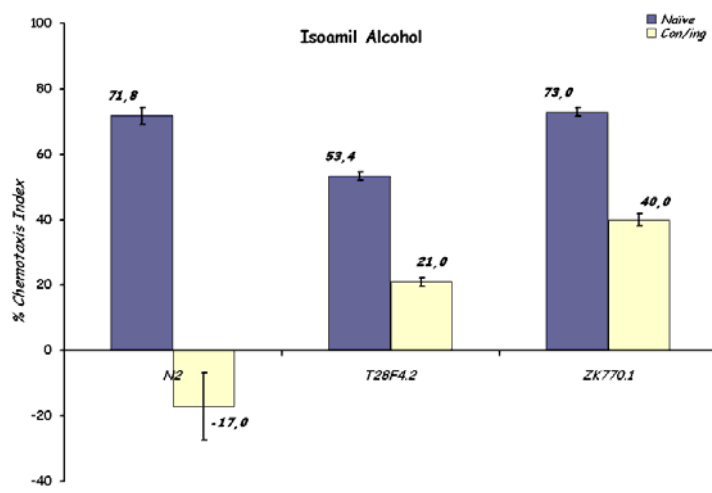
**Διάγραμμα 3α** Παρατηρείται η μειωμένη ικανότητα αίσθησης του NaCl από τα στελέχη ΔΤ28F4.2 (OK289) και η αδυναμία των στελεχών ΔΖΚ770.1 (OK415) συνδυασμού του NaCl με την έλλειψη τροφής



**Διάγραμμα 3β** Παρατηρείται η μειωμένη ικανότητα αίσθησης του NH<sub>4</sub>Cl από τα στελέχη ΔΤ28F4.2 (OK289) και η αδυναμία των στελεχών ΔΖΚ770.1 (OK415) συνδυασμού του NH<sub>4</sub>Cl με την έλλειψη τροφής



**Διάγραμμα 3γ** Παρατηρείται η μειωμένη ικανότητα αίσθησης του AcNa από τα στελέχη ΔΤ28F4.2 (OK289) και η αδυναμία των στελεχών ΔΖΚ770.1 (OK415) συνδυασμού του AcNa με την έλλειψη τροφής



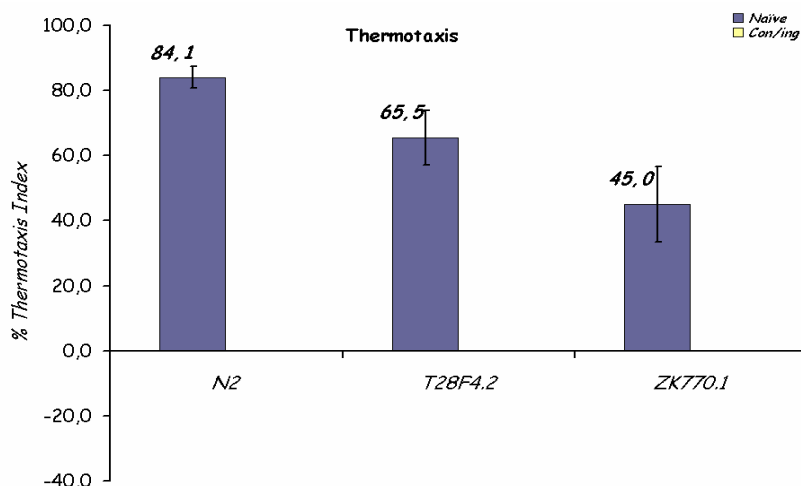
**Διάγραμμα 3δ** Παρατηρείται η μειωμένη ικανότητα αίσθησης της ισοαμιλικής αλκοόλης από τα στελέχη ΔΤ28F4.2 (OK289) και η αδυναμία των στελεχών ΔΖΚ770.1 (OK415) συνδυασμού της ισοαμιλικής με την έλλειψη τροφής

Από τα παραπάνω πειράματα φάνηκε ότι η έλλειψη του γονιδίου T28F4.2 στο στέλεχος OK289 προκαλεί μειωμένη ικανότητα αίσθησης χημικών ενώσεων. Αυτό το φαινοτυπικό μειονέκτημα δεν περιορίζεται σε κάποια συγκεκριμένη χημική ένωση, αλλά ούτε ανάλογα με το αν αυτή είναι διαλυτή ή πηκτική. Αντίθετα, παρατηρείται ένα γενικότερο μειονέκτημα αίσθησης χημικών ενώσεων, το οποίο εκτείνεται σε ένα μεγάλο εύρος ενώσεων. Αυτό κάνει πολύ πιθανό, το γονίδιο T28F4.2 να μην κωδικοποιεί κάποιο συγκεκριμένο χημειούποδοχέα, αλλά για ένα μόριο που συμμετέχει στην μετάδοση ή την μετατροπή του χημικού ερεθίσματος σε σήμα, σε μοριακό επίπεδο. Το γεγονός ότι το στέλεχος OK289 παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα συσχέτισμού του κάθε ερεθίσματος με την έλλειψη τροφής,

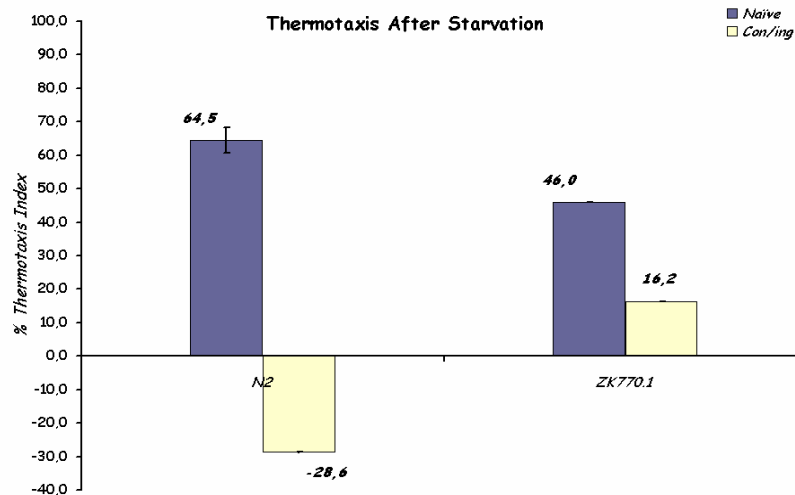
οφείλεται στην μειωμένη ικανότητα αίσθησης. Η αδυναμία αντίληψης ενός ερεθίσματος επάγει και την μειωμένη δυνατότητα αποθήκευσης και συσχετισμού του ερεθίσματος αυτού με άλλα.

Επίσης, φάνηκε ότι το γονίδιο ZK770.1 σχετίζεται με την μνήμη του οργανισμού. Κι αυτό διότι όπως φάνηκε από τα παραπάνω πειράματα, ενώ το στέλεχος OK415 έχει την ικανότητα αίσθησης όλων των χημικών μορίων που ελέγχθηκαν, αδυνατεί να τα συνδυάσει με την απουσία τροφής από το περιβάλλον. Πρόκειται δηλαδή για φαινοτυπικό μειονέκτημα που σχετίζεται με το associative learning and memory.

vii) Για την περαιτέρω διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου των δυο αυτών γονιδίων διερευνήθηκε η ικανότητα των στελεχών OK289 και OK415 για θερμόταξη. Με τον όρο αυτό περιγράφεται η ικανότητα του *C. elegans* να επιλέγει ή να αποφεύγει μια δεδομένη περιβαλλοντική θερμοκρασία, ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι τροφής στο περιβάλλον. Κατά αντίστοιχο τρόπο με την διαδικασία της χημειόταξης, ο *C. elegans*, κατά την θερμόταξη παρουσιάζει το φαινόμενο του neural plasticity. Κι εδώ δηλαδή παρατηρείται το φαινόμενο της επιλογής ή της αποφυγής στην μετακίνηση προς μια θερμοκρασία ανάλογα με το αν η θερμοκρασία αυτή έχει προηγουμένως συσχετιστεί με την ύπαρξη ή όχι τροφής στο περιβάλλον. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, ανεξάρτητα αν ο οργανισμός έχει αναπτυχθεί σε συνθήκες επάρκειας ή έλλειψης τροφής, με τον υπολογισμό του δείκτη θερμόταξης απεικονίζεται η ικανότητα μνήμης της θερμοκρασίας (διάγραμμα 4α-β). Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει την δημιουργία γραμμικής θερμοκρασιακής κλίσης (linear temperature gradient) και τον έλεγχο της ικανότητας των στελεχών για θερμόταξη. Τα άτομα που εξετάζονται έχουν αναπτυχθεί είτε παρουσία είτε απουσία τροφής σε σταθερή θερμοκρασία περιβάλλοντος.



**Διάγραμμα 4α** Παρατηρείται ότι το στέλεχος ΔZK770.1 (OK415) παρουσιάζει μειωμένη δυνατότητα μνήμης της περιβαλλοντικής θερμοκρασίας, καθώς δεν μεταβαίνει προς την θερμοκρασία αυτή.



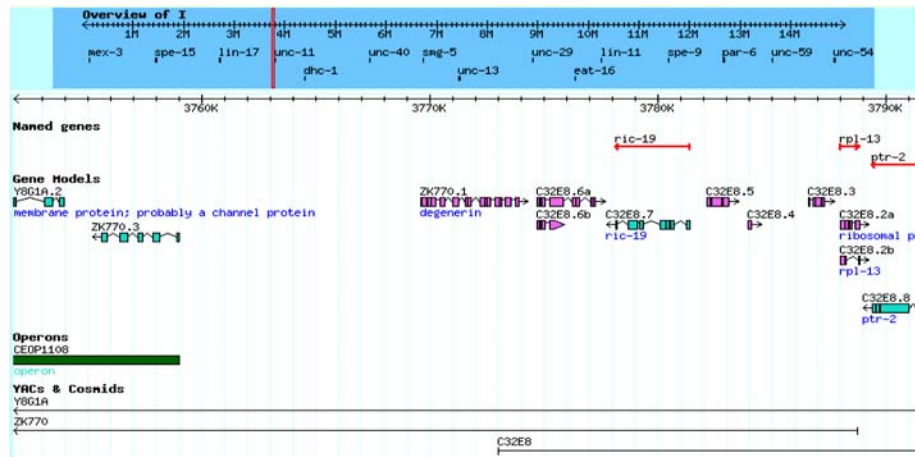
**Διάγραμμα 4β** Παρατηρείται ότι το στέλεχος ΔΖΚ770.1 (ΟΚ415) παρουσιάζει μειωμένη δυνατότητα μνήμης καθώς δεν αποφεύγει την μετάβαση προς την θερμοκρασία στην οποία είχε αναπτυχθεί απουσία τροφής

Από τα παραπάνω πειράματα φαίνεται ότι το στέλεχος ΟΚ415 φέρει σαφές μειονέκτημα στον συσχετισμό της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος και της παρουσίας τροφής σε αυτό. Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με τα προηγούμενα, δείχνουν ότι το γονίδιο ZK770.1 εμπλέκεται στην διαδικασία της μνήμης κατά έναν γενικότερο τρόπο και όχι μεμονωμένα σε σχέση με χημικά ή θερμοκρασιακά ερεθίσματα. Τέτοια γονίδια συνήθως εκφράζονται και δρουν σε ενδιάμεσους νευρώνες, δηλαδή σε κομβικά σημεία του νευρικού συστήματος, όπου και γίνεται η πρόσληψη, η επεξεργασία και η μετάδοση διαφορετικών ερεθισμάτων.

viii) Τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν αναφέρονται σε φαινοτύπους βάσει των οποίων είναι δυνατό να περιγράψει και να καθοριστεί ο ρόλος του κάθε γονιδίου που μελετάται στον οργανισμό. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τον σκοπό αυτό είναι ομόζυγα για μια μεταλλαγή (έλλειψη) σε κάθε τέτοιο γονίδιο. Όλες οι μέχρι τώρα παρατηρήσεις σχετίζονται και ερμηνεύονται με βάση την απουσία του εκάστοτε γονιδίου. Εντούτοις, ο τρόπος σχηματισμού τέτοιων μεταλλαγμένων στελεχών περιλαμβάνει την πιθανότητα ύπαρξης και άλλων μεταλλαγών στο γένωμα του οργανισμού. Οι συνθήκες μεταλλαξογένεσης δεν αποκλείεται να έχουν προκαλέσει επιμέρους μεταλλαγές οι οποίες να μην έχουν ορατό φαινοτυπικό αποτέλεσμα. Τέτοιες μεταλλαγές όμως είναι δυνατόν να προκαλούν την εμφάνιση των φαινοτυπικών ιδιομορφιών που έχουν ως τώρα παρατηρηθεί. Επίσης, είναι πιθανό οι παρατηρούμενοι φαινότυποι να μην σχετίζονται με την έλλειψη του μελετούμενου γονιδίου, αλλά με κάποια τυχαία μεταλλαγή σε άγνωστο γονίδιο. Για την πρόληψη τέτοιων γεγονότων έχει αρχικά γίνει το καλούμενο “out crossing”. Πρόκειται δηλαδή για τον «καθαρισμό» του μεταλλαγμένου στελέχους μετά από επτά διαδοχικές διασταυρώσεις με άτομα αγρίου τύπου. Κατά τις αλληπάλληλες αυτές διασταυρώσεις γίνεται «αντικατάσταση» των χρωμοσωμάτων που φέρουν ανεπιθύμητες μεταλλαγές με



χρωμοσώματα αγρίου τύπου. Τυχαίες μεταλλάξεις που βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα με αυτό που φέρει την επιθυμητή μεταλλαγή απομακρύνονται κατά την διαδικασία του ανασυνδυασμού. Εντούτοις, παραμένει ο κίνδυνος της ύπαρξης τυχαίας μεταλλαγής σε γενετικό τόπο ο οποίος βρίσκεται κοντά στον γενετικό τόπο του μελετούμενου γονιδίου. Σε μια τέτοια περίπτωση η πιθανότητα ανασυνδυασμού και εξάλειψης της τυχαίας μεταλλαγής είναι μηδαμινή (εικ 10).



**Εικόνα 10** Απεικονίζεται ο γενετικός χάρτης του χρωμοσώματος I και ο γενετικός τόπος του γονιδίου ZK770.1. Παράλληλα, φαίνεται ότι ο τελευταίος χάρτης περιγράφει το κοσμίδιο ZK770 στο οποίο και βρίσκεται το γονίδιο ZK770.1, αλλά και τα «γεγονικά» σε αυτό γονίδια.

Για τους λόγους αυτούς και προκειμένου να γίνει επιβεβαίωση ότι τα παρατηρούμενα αποτελέσματα οφείλονται αποκλειστικά στην έλλειψη συγκεκριμένου γονιδίου, γίνεται το πείραμα της διάσωσης του φαινοτύπου. Κατά την διαδικασία αυτή γίνεται μετασχηματισμός του μεταλλαγμένου στελέχους (OK415 ή T28F4.2) με ένα τμήμα γενωμικού DNA αγρίου τύπου. Το τμήμα αυτό του γενωμικού DNA περιλαμβάνει εξολοκλήρου το φυσιολογικό γονίδιο, το οποίο πρόκειται να συμπληρώσει το αντίστοιχο μεταλλαγμένο. Τα μετασχηματισμένα στελέχη σε αυτήν την περίπτωση αναμένεται να παρουσιάσουν αναστροφή του ως τώρα παρατηρούμενου φαινοτύπου. Δηλαδή, η ύπαρξη του εξωχρωμοσωμικού DNA συμπληρώνει τον μεταλλαγμένο φαινότυπο.

Για την πραγματοποίηση του πειράματος αυτού ενισχύθηκε το τμήμα DNA που αντιστοιχεί στο γονίδιο ZK770.1 (μήκους 5,8kb) με την αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Το προϊόν της αντίδρασης ενέθηκε σε άτομα του στελέχους ZK770.1, τα οποία και μετασχηματίστηκαν. Τα μετασχηματισμένα αυτά στελέχη πρόκειται να ελεγχθούν σε όλα τα παραπάνω πειράματα. Αν το εξωχρωμοσωμικό DNA που φέρουν τα μετασχηματισμένα στελέχη συμπληρώνει την μεταλλαγή του γονιδίου ZK770.1, τότε ο φαινότυπος αναμένεται να είναι αγρίου τύπου.

#### 4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Για την λειτουργική ανάλυση της οικογένειας των Degenerins πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από πειραματικοί έλεγχοι σχετικά με ορισμένους φαινοτύπους στον *C. elegans*. Για την αρχική ανίχνευση ανωμαλιών που οφείλονται στην έλλειψη των μελετούμενων γονιδίων, πραγματοποιήθηκε καταστολή της έκφρασής τους με την μέθοδο του RNAi. Από την πειραματική αυτή διαδικασία δεν παρατηρήθηκε κάποιος φαινότυπος που να σχετίζεται με την βιωσιμότητα, την αναπαραγωγή, την κίνηση, την παραγωγή ωαρίων και αυγών. Στην συνέχεια οι μελέτη επικεντρώθηκε στην ανίχνευση του ρόλου δυο γονιδίων (T28F4.2 και ZK770.1).

Με την χρησιμοποίηση ομόζυγα μεταλλαγμένων στελεχών (OK289 και OK415) έγιναν φαινοτυπικές παρατηρήσεις που σχετίζονται με την μετάδοση μηχανικών ερεθισμάτων. Για το στέλεχος OK289 παρατηρήθηκε ότι έχει περιορισμένη ικανότητα απόκρισης σε υψηλό οσμωτικό περιβάλλον αλλά και σε χημικά και μηχανικά ερεθίσματα (nose touch response). Αντίθετα, το στέλεχος OK415 έχει μειωμένη ικανότητα απόκρισης σε περιβάλλον υψηλής οσμωτικής πίεσης, αλλά φυσιολογική απόκριση σε μηχανικά ερεθίσματα.

Παρατηρήσεις που έγιναν στην συνέχεια και σχετίζονται με την ικανότητα χημειοτακτισμού και θερμοτάξης οδήγησαν σε διαφορετικά συμπεράσματα για το κάθε στέλεχος. Το στέλεχος OK289 παρουσιάζει ένα σαφές μειονέκτημα στην αίσθηση χημικών ερεθισμάτων, ανεξάρτητα αν αυτά είναι διαλυτές ή πηχτικές χημικές ενώσεις. Αντίθετα, εμφανίζει σχεδόν φυσιολογική απόκριση όταν πρόκειται για την ανίχνευση της περιβαλλοντικής θερμοκρασίας και τον συσχετισμό της με την ύπαρξη τροφής στο περιβάλλον αυτό.

Το στέλεχος OK415 δεν εμφανίζει καμία αδυναμία στην αίσθηση χημικών ερεθισμάτων, όμως παρουσιάζει σαφές μειονέκτημα στον συσχετισμό του εκάστοτε χημικού ερεθίσματος με την απουσία τροφής από το περιβάλλον του. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται όταν το ερέθισμα δεν είναι χημικό, αλλά θερμικό (θερμοκρασία περιβάλλοντος). Δηλαδή, γίνεται σαφές ότι η απουσία του γονιδίου ZK770.1 από το στέλεχος OK415 προκαλεί αδυναμία μνήμης και συσχετισμού διαφορετικών ερεθισμάτων (χημικό ή θερμικό ερέθισμα και τροφή). Το γεγονός ότι οι παρατηρήσεις αυτές για το στέλεχος OK415 επαληθεύονται με διαφορετικά ερεθίσματα, υποδηλώνει ότι το συγκεκριμένο γονίδιο διαδραματίζει έναν κομβικό, παρά περιφερειακό ρόλο στην διαδικασία της μνήμης.

## 5.Μελλοντικές κατευθύνσεις

Το σύνολο των παραπάνω αποτελεσμάτων δείχνουν ότι οι Degenerins συγκροτούν μια οικογένεια πρωτεϊνών ο ρόλος των περισσότερων από τις οποίες μένει να εξακριβωθεί. Φάνηκε ότι τα νέα μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας που συνεχώς μελετώνται, έχουν ρόλους οι οποίοι δεν σχετίζονται αυστηρά με τον ρόλο των πρώτων μορίων που ερευνήθηκαν, δηλαδή το mechanotransduction και το neurodegeneration. Οι παραπάνω παρατηρήσεις δείχνουν ότι δυο από τις Degenerins έχουν λειτουργικό ρόλο στην χημειόταξη και την μνήμη αντίστοιχα. Τις παρατηρήσεις αυτές οφείλουν να υποστηρίξουν και να συμπληρώσουν επιπλέον πειραματικά δεδομένα.

Η παρατήρηση της «διάσωσης του φαινοτύπου» πρόκειται να υποδείξει αν οι παραπάνω φαινότυποι προέκυψαν από μεταλλαγή στο γονίδιο που ερευνάται ή από τυχαία μεταλλαγή σε άγνωστο γονίδιο. Επίσης, για το στέλεχος OK415 μπορεί να γίνει επιβεβαίωση των υπάρχοντων αποτελεσμάτων με επιπλέον πειραματικές διατάξεις, όπως ο έλεγχος της μνήμης σε μηχανικό ερέθισμα, αλλά και με ένα εναλλακτικό πείραμα συσχέτισμού της περιβαλλοντικής θερμοκρασίας με την ύπαρξη ή όχι τροφής. Σύμφωνα με την πειραματική αυτή διάταξη που καλείται ‘single worm thermotaxis assay’ ένα άτομο κάθε φορά εξετάζεται. Συγκεκριμένα, έχει αρχικά σχηματιστεί κυκλική θερμοκρασιακή κλίση (radial gradient) με αποτέλεσμα την ύπαρξη διαδοχικών ομόκεντρων και ισόθερμων κύκλων. Πάνω στους κύκλους αυτούς αφήνεται ένα άτομο, το οποίο εν συνεχεία επιλέγει και κινείται στην ισόθερμη που αντιστοιχεί στην θερμοκρασία στην οποία είχε αναπτυχθεί. Με τον τρόπο αυτό διαγράφεται ένας κύκλος εξαιτίας της κίνησής του, συμπεριφορά που είναι κατεξοχήν ενδεικτική του φαινομένου της μνήμης.

Το ερώτημα που ακολουθεί τις παραπάνω παρατηρήσεις σχετίζεται με τους μοριακούς μηχανισμούς, στους οποίους εμπλέκονται τα γονίδια T28F4.2 και ZK770.1 και από τους οποίους προκύπτουν οι παραπάνω φαινότυποι. Σημαντική πληροφορία, η οποία και θα καθοδηγήσει τις περαιτέρω μελέτες, πρόκειται να προκύψει από τον ακριβή καθορισμό του μοτίβου έκφρασης των γονιδίων που μελετούνται. Μέχρι τώρα έχει διαπιστωθεί ότι κάθε ένα από τα γονίδια αυτά εκφράζεται σε μια ομάδα νευρώνων, των οποίων η ακριβής ταυτότητα μένει να διαπιστωθεί. Ένας τρόπος να συμβεί αυτό είναι η χρώση μιας ομάδας νευρώνων με την χρήση κατάλληλης χρωστικής. Η πειραματική διάταξη που ακολουθείται σε αυτήν την περίπτωση καλείται ‘dye filling assay’. Σύμφωνα με αυτήν γίνεται χρώση των ‘amphid neurons’ οι οποίοι έρχονται σε επαφή με το περιβάλλον. Καθώς η χρωστική που χρησιμοποιείται εκπέμπει την προσπίπτουσα ακτινοβολία σε διαφορετικό μήκος κύματος από το GFP (το οποίο και εκφράζουν τα στελέχη) είναι δυνατός ο συνεντοπισμός χρωστικής με GFP. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να ταυτοποιηθεί η έκφραση κάποιου γονιδίου σε συγκεκριμένους νευρώνες.

Κατά αντίστοιχο τρόπο είναι δυνατό να γίνει συνεντοπισμός του μάρτυρα GFP με έναν δεύτερο μάρτυρα (ο οποίος εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος) όπως είναι ο YFP. Σε αυτήν την περίπτωση, ο δεύτερος μάρτυρας βρίσκεται υπό τον έλεγχο υποκινητή ο οποίος εκφράζεται ειδικά σε κάποιον / ους νευρώνα / ες. Με τον τρόπο αυτό η ταυτοποίηση των νευρώνων στους οποίους εκφράζεται το γονίδιο που μελετάται είναι περισσότερο ακριβής. Για την μελέτη της λειτουργίας γονιδίων του νευρικού συστήματος γίνεται φανερό ότι σημαντικό ρόλο κατέχει η κατανόηση του μοτίβου έκφρασης. Το μοτίβο έκφρασης δεν θα ήταν τόσο πληροφοριακό αν η εκδήλωση συγκεκριμένων φαινοτύπων δεν οφειλόταν σε πολύ συγκεκριμένους νευρώνες. Επίσης, στις περισσότερες των περιπτώσεων, υπάρχουν συγκεκριμένα γονίδια που εκφράζονται σε μια μικρή ομάδα νευρικών κυττάρων και τα οποία με την δράση τους χαρακτηρίζουν τους νευρώνες αυτούς.

Σε ένα επόμενο στάδιο μελέτης οφείλει να πραγματοποιηθεί ο τοπολογικός εντοπισμός του υπό μελέτη γονιδίου, εντός του κυττάρου στο οποίο εκφράζεται. Με τον τρόπο αυτό θα γίνει γνωστό αν η συμμετοχή του στην εκδήλωση των παραπάνω φαινοτύπων οφείλεται στην δράση του ως υποδοχέας ή αν μεσολαβεί στην μετάδοση του εκάστοτε σήματος. Εδώ θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι η ομοιότητα στην αλληλουχία των γονιδίων T28F4.2 και ZK770.1 με γνωστά κανάλια ιόντων νατρίου δεν προϋποθέτει ανάλογη λειτουργία για τα μόρια αυτά. Είναι δηλαδή πολύ πιθανό να επιτελούν τελείως διαφορετικό ρόλο σε σχέση με προηγούμενα μέλη της οικογένειας.

Εφόσον γίνει γνωστό το ακριβές μοτίβο έκφρασης των παραπάνω γονιδίων, είναι δυνατό στην συνέχεια να γίνει ανάλυση επίστασης με άλλα γονίδια, τα οποία είτε εκφράζονται στους ίδιους νευρώνες είτε εμπλέκονται σε κοινές λειτουργίες. Η μελέτη αυτή πρόκειται να γίνει με την χρησιμοποίηση διπλά μεταλλαγμένων στελεχών και παρατήρηση της συμπεριφοράς τους σε διαδικασίες όπως η χημειόταξη και η θερμότητα. Με τον τρόπο αυτό θα καθοριστούν οι μοριακοί συσχετισμοί των υπό μελέτη μορίων με άλλα, ήδη γνωστά. Επιπρόσθετα, κάτω από το πρίσμα της συγκεκριμένης ανάλυσης διακρίνονται νέοι στόχοι για περαιτέρω μελέτη σε βιοχημικό επίπεδο, όπως είναι για παράδειγμα η μελέτη πιθανών αλληλεπιδράσεων των παραπάνω μορίων.

Ομόλογες πρωτεΐνες των Degenerins στα θηλαστικά (ENaCs) έχει αποδεχθεί να εμπλέκονται σε σημαντικές λειτουργίες, αλλά και σε ασθένειες (Liddle syndrome, non syndromic deafness), γεγονός που αναδεικνύει την σημασία της κατανόησης του ρόλου τους. Με την παραπάνω μελέτη φάνηκε ότι μετά το neurodegeneration και το mechanotransduction, οι Degenerins έχουν σημαντικό ρόλο και σε νέες διαδικασίες αίσθησης. Εκείνο που αναμένεται να κατοχυρώσει τις μέχρι τώρα παρατηρήσεις είναι η διαλεύκανση του τύπου με τον οποίο δρουν τα συγκεκριμένα μόρια. Ο τρόπος με τον οποίο ρυθμίζονται, το μονοπάτι μεταγωγής σήματος, αλλά και η σχέση τους με άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στις διαδικασίες αυτές είναι μελλοντικοί στόχοι. Μέσα από τέτοιες προσεγγίσεις αναμένεται να

κατανοηθεί ο τρόπος με τον οποίο συμβάλουν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες στην διαδικασία της αίσθησης χημικών ερεθισμάτων και της μνήμης.

## 6.Βιβλιογραφία

1. Bargmann, C. I., and Horvitz, H. R. (1991). Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron* **7**, 729-742.
2. Bargmann, C. I., and Kaplan, J. M. (1998). Signal transduction in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Annu Rev Neurosci* **21**, 279-308.
3. Colbert, H. A., and Bargmann, C. I. (1995). Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. elegans*. *Neuron* **14**, 803-812.
4. Colbert, H. A., Smith, T. L., and Bargmann, C. I. (1997). OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **17**, 8259-8269.
5. de Bono, M., Tobin, D. M., Davis, M. W., Avery, L., and Bargmann, C. I. (2002). Social feeding in *Caenorhabditis elegans* is induced by neurons that detect aversive stimuli. *Nature* **419**, 899-903.
6. Hobert, O., D'Alberti, T., Liu, Y., and Ruvkun, G. (1998). Control of neural development and function in a thermoregulatory network by the LIM homeobox gene *lin-11*. *J Neurosci* **18**, 2084-2096.
7. Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D., and Ambros, V. (1991). Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *Embo J* **10**, 3959-3970.
8. Mori, I. (1999). Genetics of chemotaxis and thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Genet* **33**, 399-422.
9. Mori, I., and Ohshima, Y. (1995). Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **376**, 344-348.
10. Sengupta, P. (2002). Chemosensation: tasting with the tail. *Curr Biol* **12**, R386-388.
11. Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H., and Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**, 465-476.
12. Tavernarakis, N., and Driscoll, M. (1997). Molecular modeling of mechanotransduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Physiol* **59**, 659-689.