ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΝΕΚΡΩΤΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΣΤΟ ΝΗΜΑΤΩΔΗ *Caenorhabditis elegans*

ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΣΑΜΑΡΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΙΟΥΛΙΟΣ 2007

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του ερευνητή Ν. Ταβερναράκη του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, που στεγάζεται στο Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας στο Ηράκλειο Κρήτης, στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος Μοριακής Βιολογίας-Βιοϊατρικής.

Επιβλέπων Ερευνητής: Ν. ΤΑΒΕΡΝΑΡΑΚΗΣ, Ερευνητής Β΄ (ΙΜΒΒ)

Υπεύθυνη Καθηγήτρια για το Τμήμα Βιολογίας: Δ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Δ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Χ. ΔΕΛΙΔΑΚΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Ν. ΤΑΒΕΡΝΑΡΑΚΗΣ, Ερευνητής Β΄ (ΙΜΒΒ)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Δ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Α. ΓΡΑΒΑΝΗΣ, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Χ. ΔΕΛΙΔΑΚΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Δ. ΚΑΡΑΓΩΓΕΩΣ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Δ. ΜΠΟΥΜΠΑΣ, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ι. ΠΑΠΑΜΑΤΘΑΙΑΚΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Ν. ΤΑΒΕΡΝΑΡΑΚΗΣ, Ερευνητής Β΄ (ΙΜΒΒ)

Ευχαριστίες...

Η περίοδος εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε για ’μένα περίοδο διαρκούς αναζήτησης κι έντονου προβληματισμού. Η καθημερινότητα ταλανιζόταν αλλά και διανθιζόταν από σκέψεις που αφορούσαν στον τρόπο προσέγγισης βιολογικών ερωτημάτων και στην επίλυση τεχνικών προβλημάτων στο εργαστήριο, αγωνία για την έκβαση των πειραμάτων και προβληματισμό για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, από το διαρκή αναπροσδιορισμό των διαπροσωπικών σχέσεων στον επαγγελματικό χώρο, προκειμένου να επιτευχθεί όσο το δυνατόν πιο ομαλή και δημιουργική συνεργασία, καθώς και από συζητήσεις σχετικά με την πρόοδο της βιολογικης έρευνας, τη σταδιοδρομία και την ποιότητα ζωής ενός ερευνητή. Τελειώνοντας λοιπόν, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συμμερίστηκαν αυτές τις ανησυχίες και με βοήθησαν, καθένας με το δικό του τρόπο, στη διεκπεραίωση αυτής της διατριβής και κυρίως στην αναζήτηση των προσωπικών μου απαντήσεων.

Καταρχήν, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα ερευνητή του διδακτορικού μου, Νεκτάριο Ταβερναράκη, ο οποίος με υποστήριξε, με καθοδήγησε και με ενθάρρυνε καθόλη τη διάρκεια της διατριβής, βοηθώντας να εξοικειωθώ με το χειρισμό του νηματώδους, προτείνοντας πειράματα και λύσεις για την αντιμετώπιση των δυσκολιών, αλλά κι επισημαίνοντας λάθη. Πολύ σημαντική ήταν επίσης η εμπιστοσύνη που μου έδειξε, υποστηρίζοντας την ενεργό συμμετοχή μου σε διεθνή, ευρωπαϊκά και τοπικά συνέδρια, η οποία αποτελεί ανεκτίμητη πηγή εμπειριών. Αξιοσημείωτη ήταν ακόμα η επιμονή και υπομονή του προκειμένου για την προβολή της δουλειάς, ακόμα και όταν, λόγω συγκυριών, η δημοσίευση των αποτελεσμάτων είχε καταστεί πολύ δύσκολη. Δε θα ήταν υπερβολή να γράψω ότι σε πολλές περιπτώσεις μου φέρθηκε σα δεύτερος πατέρας (άλλοτε λιγότερο κι άλλοτε περισσότερο αυστηρός), υποδεικνύοντάς μου μέσα από εκτενείς συζητήσεις μια διαφορετική πλευρά των πραγμάτων. Για όλα αυτά του είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων...

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Πόπη Συντιχάκη, η οποία με εισήγαγε στις τεχνικές του εργαστηρίου, μου εμπιστεύτηκε μέρος της δουλειάς που διεξήγαγε και με την οποία εξακολούθησα να συνεργάζομαι καθόλη σχεδόν τη διάρκεια της διατριβής. Της εύχομαι καλή αρχή στον καινούριο της χώρο!

Είναι αδύνατο να μην αναφερθώ στα άτομα του εργαστηρίου, καθένα από τα οποία είχε κάτι ξεχωριστό να δώσει και να μοιραστεί. Η Αγγέλα βοήθησε στην επιτέλεση των πειραμάτων, όχι μόνο οργανώνοντας το εργαστήριο κι αναλαμβάνοντας την προμήθεια με πιατάκια και ό,τι άλλο χρειαζόταν, αλλά και με τις αξεπέραστες ικανότητές της στη

ζαχαροπλαστική. Η γλυκόζη αποτελεί εξάλλου τη βασική πηγή ενέργειας του εγκεφάλου, του πιο χρήσιμου οργάνου κάθε διδακτορικού... Στάθηκε επιπλέον φίλη-σύμβουλος, πρόθυμη να ακούσει, να συζητήσει και να καταθέσει την προσωπική της γνώμη. Παρόμοια και η Δάφνη, η οποία ποτέ δεν αρνήθηκε να εξυπηρετήσει και να βοηθήσει όποτε της το ζήτησα. Η Marta μου έδωσε επιπλέον την δυνατότητα να συζητήσω θέματα που άπτονταν άμεσα της ερευνητικής μου εργασίας, δεδομένου ότι μας απασχόλησαν κοινά ερωτήματα. Με το Γιάννη, όντας οι πρώτοι διδακτορικοί του εργαστηρίου, βιώσαμε παρόμοιες εμπειρίες και μοιραστήκαμε ανησυχίες, είτε προσπαθώντας να κατανοήσουμε το ερευνητικό αντικείμενο, να αντιμετωπίσουμε τεχνικές δυσκολίες και να καλλιεργήσουμε τις ερευνητικές μας δεξιότητες, είτε σε μια προσπάθεια άσκησης αυτοκριτικής και αλληλοσυμπαράστασης. Και βέβαια τι να πω για την Κωστούλα; Οι ώρες που περάσαμε αναλύοντας πράγματα και καταστάσεις και η άλλοτε χαρωπή, άλλοτε καυστική της διάθεση είναι από τα στοιχεία που πραγματικά θα μου λείψουν φεύγοντας. Υπήρξε άλλωστε πραγματική φίλη, πάντα παρούσα στις δυσκολίες, για να με στηρίξει και να με εμψυχώσει. Η παρουσία καθενός από αυτούς τους ανθρώπους υπήρξε σίγουρα καταλυτική για την εξέλιξη και την πορεία μου στο συγκεκριμένο εργαστήριο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλους εκείνους που βρέθηκαν ή βρίσκονται στο εργαστήριο συμβάλλοντας στη δημιουργία μίας ευχάριστης ατμόσφαιρας, όπως τη Μαρκέλλα, τον Τάσο, την Αναστασία, τη Μαριάννα, το Νίκο, το Μανώλη... Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Εύα, με την οποία είχα μια αποδοτική συνεργασία, το Γιώργο και το Matthias (Vielen Dank an Matthias!), που με την παρέα τους έκαναν πολύ πιο ενδιαφέρουσα κι ευχάριστη την παραμονή μου στο εργαστήριο τους τελευταίους μήνες και φυσικά τον Andreas (Andreas, vielen vielen Dank!!!), με τον οποίο συνεργαστήκαμε κι επικοινωνήσαμε άψογα σε μια εξαιρετικά φορτισμένη και απαιτητική (από πλευράς παραγωγικότητας στο εργαστήριο) περίοδο. Τον ευχαριστώ γιατί με τις πολύ ενδιαφέρουσες συζητήσεις και τη θετική του στάση συντέλεσε στο να ζήσω την πιο δημιουργική και όμορφη φάση του διδακτορικού μου.

Δε θα ξεχάσω και τους φίλους μου εκτός εργαστηρίου, η παρουσία των οποίων αποτελούσε πάντα ένα ευχάριστο αλλά και απαραίτητο (κάποτε και διδακτικό) διάλειμμα. Ο Νίκος, η Τζένη, η Ειρήνη, η Κική, η Λένα και η Κάκια, η Έλσα, η Μαρία, ο Μιχάλης, ο Μανώλης, η Κατερίνα, η Βιβή και ο Μάκης είναι μερικοί από αυτούς. Ανάμεσα σε όλους θα ξεχωρίσω την Αντιγόνη, με την οποία περάσαμε πολύ όμορφες και συγκινητικές στιγμές, την Ιωάννα, που ήταν πάντα κοντά στις δυσκολίες, τη Μάγδα, η οποία αν και από μακριά ήταν πάντα δίπλα μου, τη Ναταλία, τη φίλη της διπλανής πόρτας, την πάντα πρόσχαρη Καλλιόπη, τη Φοίβη και τη Μαρία. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Paul, ο οποίος μου συμπαραστάθηκε και με ενθάρρυνε να συνεχίσω και να ολοκληρώσω το διδακτορικό κατά

τους πολύ δύσκολους τελευταίους μήνες της συγγραφής (Thanks a lot!!!), και βέβαια τους γονείς μου. Στους γονείς μου αφιερώνω και αυτή τη διατριβή, αφού θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί χωρίς την υλική και ηθική τους υποστήριξη.

Δε θα μπορούσα να μην αναφέρω ακόμα την κα Στέλλα και την κα Κατερίνα στην κουζίνα, οι οποίες έκαναν τη ζωή στο εργαστήριο πολύ πιο απλή κι εύκολη με τις υπηρεσίες τους, καθώς και τον Αλέκο, τον υπεύθυνο του Confocal, που ήταν πρόθυμος να με βοηθήσει όποτε χρειάστηκε. Τελειώνοντας, οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής Δέσποινα Αλεξανδράκη και Χρήστο Δελιδάκη, οι οποίοι παρακολούθησαν την πορεία μου καθόλη τη διάρκεια του διδακτορικού και ήταν εκεί για να συμβουλέψουν και επισημάνουν πιθανές ελλείψεις, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς μου επιτροπής. Συγκεκριμένα ευχαριστώ την κα Δόμνα Καραγωγέως και τον κο Αχιλλέα Γραβάνη για τα ενδιαφέροντα σχόλιά του, καθώς και τον κο Δημήτριο Μπούμπα, ο οποίος αν και δε μπόρεσε να παραβρεθεί την ημέρα της εξέτασης, προθυμοποιήθηκε να μελετήσει τη διατριβή και να μου γνωστοποιήσει τις παρατηρήσεις του.

Προτού κλείσω αυτήν την ενότητα των ευχαριστιών, θα ήθελα να σημειώσω ότι οι περίοδος εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής περιελάμβανε επίσης πολλές στιγμές απογοήτευσης και θλίψης, περιόδους όπου οι επαγγελματικές μου σχέσεις είχαν καταστεί εξαιρετικά ψυχοφθόρες, ακόμα και στιγμές που σκέφτηκα αν άξιζε τον κόπο η όλη προσπάθεια και αν έπρεπε να συνεχίσω. Ολοκληρώνοντάς την ωστόσο εκτιμώ ότι τελικά τόσο οι καλές όσο και οι κακές στιγμές με βοήθησαν να ωριμάσω επαγγελματικά και κοινωνικά και τα διδάγματα αυτά είναι που θα ήθελα να πάρω μαζί μου φεύγοντας...

Ευχαριστώ πολύ!

Στους γονείς μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ 1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 4
SUMMARY 6
Ευρετήριο & συντμήσεις αγγλικών όρων 8

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 11
I. Εισαγωγή στη Βιολογία του Νηματώδους *Caenorhabditis elegans* 12
II. Μηχανισμοί Κυτταρικού Θανάτου 16
II.α. Αποπτωτικοί μηχανισμοί στο *C. elegans* 17
II.β. Ειδικές μορφές προγραματισμένου κυτταρικού θανάτου στο *C. elegans* 199
II.γ. Οι νηματώδεις ως μοντέλα ασθενειών του ανθρώπου 20
II.δ. Νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος 211
II.δ1. Η νέκρωση σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα 222
II.δ2. Η νέκρωση στο *C. elegans* 266
II.ε. Αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών μηχανισμών κυτταρικού θανάτου 311
III. Μηχανισμοί Ομοιόστασης του pH στα Κύτταρα 344
III.α. Κυστιδιακές ATPάσες πρωτονίων 344
III.β. Κανάλια ανταλλαγής ιόντων Na^+/H^+ 388
IV. Λυσοσώματα 40
V. Αυτοφαγία, Νηματώδεις και Κυτταρικός Θάνατος 411
V.α. Μηχανισμοί αυτοφαγίας 411
V.β. Η φυσιολογική σημασία της αυτοφαγίας 466
V.γ. Η αυτοφαγία στο *C. elegans* 488
V.δ. Αυτοφαγία & κυτταρικός θάνατος 522

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ 588
Στελέχη νηματωδών 59
Βακτηριακά στελέχη 63
Θρεπτικά μέσα και διαλύματα 63
Κατασκευή πλασμιδίων για την έκφραση πρωτεϊνών στο *C. elegans* 64
Κατασκευή πλασμιδίων για την καταστολή της έκφρασης γονιδίων με την τεχνική του RNAi. 67
Ανάπτυξη και διατήρηση στελεχών *C. elegans* 72

Συγχρονισμός πληθυσμού νηματωδών και καθαρισμός από μολύνσεις. 73
Δημιουργία αρσενικών ζώων *C. elegans*.. 73
Γενετικές διασταυρώσεις νηματωδών. 74
Δημιουργία διαγονιδιακών σειρών *C. elegans*.. 75
Προσδιορισμός νεκρωτικού θανάτου. 76
Επώαση νηματωδών παρουσία χημικών ή φαρμακευτικών παραγόντων. 78
Καταστολή της έκφρασης γονιδίων με την τεχνική του RNAi. 78
Απομόνωση γενωμικού DNA από νηματώδεις. 79
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) 80
Τεχνικές μικροσκοπίας 81
Προσδιορισμός μεταβολών του ενδοκυτταρικού pH 82
↳ Προσδιορισμός του αριθμού των αυτοφαγοσωμάτων σε νευρώνες 83
↳ Παρατήρηση και φωτογράφιση ενδοκυτταρικών οργανιδίων 83
↳ Χρώση πυρήνων με DAPI 84
↳ Χρώση νεκρωτικών κυττάρων με Acridine orange 84
Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων 84

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 85
Υποσημείωση 86
Α. Η Ομοιόσταση του pH στο Νεκρωτικό Θάνατο 87
Α1. Η λειτουργία της κυστιδιακής ΑΤΡάσης είναι απαραίτητη για τη νέκρωση στο *C. elegans* 87
Α2. Αύξηση του pH ενδοσωμάτων και λυσοσωμάτων προστατεύει τα κύτταρα από το νεκρωτικό θάνατο 90
Α3. Προσδιορισμός των μεταβολών του ενδοκυτταρικού pH κατά τη νέκρωση 91
Α4. Συσχέτιση της δράσης των V-ΑΤΡασών με το μονοπάτι καλπαϊνών-καθεψινών κατά το νευροεκφυλισμό 92
Α5. Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών μηχανισμών ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού pH στη νέκρωση 93
Β. Τα Λυσοσώματα στο Νεκρωτικό Θάνατο 95
Β1. Επίδραση αλληλομόρφων, που επηρεάζουν τη βιογένεση των λυσοσωμάτων, στους μηχανισμούς νέκρωσης 95
Β2. Αλλαγές στην κατανομή και μορφολογία των λυσοσωμάτων κατά τη διάρκεια της νέκρωσης 97
Γ. Η Συμβολή της Αυτοφαγίας στο Νεκρωτικό Θάνατο 101
Γ1. Η κινάση UNC-51 απαιτείται για τη νέκρωση στο *C. elegans*. 101
Γ2. Πιθανοί μηχανισμοί δράσης της UNC-51 κατά τη νέκρωση 104

Γ3. Διερεύνηση της συμμετοχής λοιπών αυτοφαγικών μορίων στο νεκρωτικό θάνατο 106
Γ4. Χημική αναστολή της αυτοφαγίας προστατεύει από το νεκρωτικό θάνατο 111
Γ5. Υπερέκφραση αυτοφαγικών πρωτεϊνών σε νηματώδεις 112
Γ6. Διερεύνηση του ρόλου της κινάσης TOR κατά τη νέκρωση 113
Γ7. Ενεργοποίηση της αυτοφαγίας σε πρώιμα στάδια της νέκρωσης 115
Γ8. Διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ αυτοφαγίας και νέκρωσης σε στελέχη *cup-5(ar465)* 117
Γ9 Κατανομή των αυτοφαγοσωμάτων κατά τη νέκρωση 118
Γ10. Συνεργασία της αυτοφαγίας με το μονοπάτι καλπαϊνών-καθεψινών στα πλαίσια του νεκρωτικού θανάτου 120

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 123
Α. Η Ομοιόσταση του pH στο Νεκρωτικό Θάνατο 124
Α1. Απορρύθμιση της ομοιόστασης του pH κατά τη νέκρωση 124
Α2. Η σημασία της μείωσης του pH στο νευροεκφυλισμό 126
Β. Τα Λυσοσώματα στο Νεκρωτικό Θάνατο 129
Β1. Συσσώρευση και αποσταθεροποίηση λυσοσωμάτων και άλλων ενδοκυτταρικών οργανιδίων κατά τη νέκρωση 129
Β2. Το λυσοσωμικό σύστημα σε εκφυλιστικές-παθολογικές καταστάσεις 132
Γ. Η Συμβολή της Αυτοφαγίας στο Νεκρωτικό Θάνατο 134
Γ1. Αυτοφαγία και νέκρωση 134
Γ2. Η συμβολή της κινάσης UNC-51 στο νεκρωτικό θάνατο 137
Γ3. Επιπτώσεις δυσλειτουργίας της κινάσης TOR στο νευροεκφυλισμό 139
Δ. Μηχανισμοί Νεκρωτικού Θανάτου· Αναπάντητα Ερωτήματα 141

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 143
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ 162

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος ευθύνεται για την εκτεταμένη απώλεια κυττάρων υπό ακραίες συνθήκες και συντελείται συνήθως κατά τη διάρκεια έντονων εκφυλιστικών επεισοδίων, όπως τα εγκεφαλικά και οι ισχαιμίες, καθώς και σε νευροεκφυλιστικές παθολογικές καταστάσεις του ανθρώπου (Martin, 2001; Syntichaki and Tavernarakis, 2002). Ανάλογο πρότυπο κυτταρικού θανάτου είναι δυνατόν να επαχθεί στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans* λόγω υπερενεργοποίησης ιοντικών καναλιών ή χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου (Driscoll and Chalfie, 1991; Scott et al., 2002). Μελέτες τόσο σε νηματώδεις όσο και σε θηλαστικά έχουν δείξει ότι η νεκρωτική καταστροφή των κυττάρων πραγματοποιείται με τη συμμετοχή καλπαϊνών και πρωτεασών ασπαρτικού (Syntichaki and Tavernarakis, 2002; Yoshida et al., 2002). Η μέγιστη ενεργότητα των τελευταίων επιτυγχάνεται υπό όξινες συνθήκες (Goll et al., 2003; Ishidoh and Kominami, 2002). Ωστόσο, οι παράγοντες που προκαλούν μη φυσιολογική και υπερβολική ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων κατά τη νέκρωση δεν είναι γνωστοί.

Δεδομένα που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή υποδεικνύουν ότι η λειτουργία των κυστιδιακών ΑΤΡασών πρωτονίων, που συμβάλλουν στην οξίνιση ενδοσωμικών και λυσοσωμικών διαμερισμάτων του κυττάρου, απαιτείται για τη νέκρωση στο νηματώδη *C. elegans*. Παρεμπόδιση της δραστηριότητάς τους κατέστειλε σημαντικά το νεκρωτικό θάνατο. Τα επίπεδα νέκρωσης μειώθηκαν επίσης μετά από επώαση ζώων σε διαλύματα ασθενών βάσεων, που προκαλούν αύξηση στο pH φυσιολογικά όξινων ενδοκυτταρικών οργανιδίων. Η παρακολούθηση των μεταβολών του pH, με τη χρήση μορφών της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP ευαίσθητων στις συνθήκες οξύτητας, αποκάλυψε ότι συμβαίνει οξίνιση του κυτταροπλάσματος σε εκφυλιζόμενα κύτταρα υπό την προϋπόθεση ότι εκφράζουν λειτουργικές κυστιδιακές ΑΤΡάσες. Η δυσλειτουργία αυτών ενίσχυσε επιπλέον την καταστολή της νέκρωσης σε νηματώδεις με δυσλειτουργικές πρωτεάσες ασπαρτικού. Δεν παρατηρήθηκε ωστόσο περαιτέρω αύξηση του κυτταρικού θανάτου σε ζώα με μειωμένη ενεργότητα καλπαϊνών. Συμπερασματικά, το ενδοκυτταρικό pH παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της νέκρωσης στο *C. elegans*. Προτείνεται ότι η δράση των κυστιδιακών ΑΤΡασών απαιτείται για τη δημιουργία όξινων συνθηκών που προωθούν το νεκρωτικό θάνατο, αυξάνοντας πιθανά την ενεργότητα εκτελεστικών πρωτεασών ασπαρτικού στα εκφυλιζόμενα κύτταρα.

Ωστόσο, η αιτία της μείωσης του κυτταροπλασματικού pH κατά τη νέκρωση παρέμεινε ασαφής. Μεταλλαγές σε γονίδια, που συμμετέχουν στη βιογένεση και τη λειτουργικότητα των λυσοσωμάτων, επηρέασαν σημαντικά τα επίπεδα νεκρωτικού

εκφυλισμού. Παρακολούθηση της τύχης των λυσοσωμάτων κατά το νευροεκφυλισμό σε ζωντανούς νηματώδεις, με τη χρήση ειδικών φθοριζόντων δεικτών, έδειξε ότι τα λυσοσώματα συντήκονται και τοποθετούνται γύρω από το διογκωμένο πυρήνα των νευρώνων. Σε πιο προχωρημένα στάδια η εκπομπή φθορισμού από λυσοσωμικές μεμβράνες μειώθηκε, υποδηλώνοντας διάρρηξη των λυσοσωμάτων. Σε συνδυασμό με την επίδραση της χορήγησης ασθενών βάσεων, το σύνολο των αποτελεσμάτων υποδεικνύει ότι τα λυσοσώματα έχουν κυρίαρχο ρόλο στην καταστροφή των κυττάρων κατά τη νέκρωση και συμβάλλουν στη μείωση του pH, απελευθερώνοντας το όξινο περιεχόμενό τους. Παρόμοιοι μηχανισμοί συντελούν πιθανά και στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο κατά τη διάρκεια εγκεφαλικών επεισοδίων σε ανθρώπους, όπου η δημιουργία όξινων συνθηκών αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό.

Το λυσοσωμικό σύστημα συμμετέχει επίσης στην αποδόμηση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών και οργανιδίων, που μεταφέρονται μέσω της αυτοφαγικής διαδικασίας. Δυσλειτουργία της αυτοφαγίας, εξαιτίας απενεργοποίησης αυτοφαγικών γονιδίων ή χορήγησης φαρμακευτικών αναστολέων, κατέστειλε τη νέκρωση, υποδηλώνοντας ότι η αυτοφαγία απαιτείται για το νεκρωτικό θάνατο στο *C. elegans*. Επιπλέον, παρατηρήθηκε υπερβολική αύξηση του αριθμού των αυτοφαγοσωμάτων σε πρώιμα στάδια νευροεκφυλισμού, ενώ σε πιο προχωρημένα στάδια τα αυτοφαγοσώματα συγκεντρώθηκαν στην περιφέρεια του πυρήνα των εκφυλιζόμενων νευρώνων, όπου εμφάνισαν μερικό ή ολικό συνεντοπισμό με λυσοσώματα και μιτοχόνδρια. Διαπιστώθηκε επίσης ότι η επαγωγή της αυτοφαγίας έπεται της ενεργοποίησης καλπαϊνών και συμμετέχει στην επιτέλεση του κυτταρικού θανάτου σε συνεργασία με λυσοσωμικούς καταβολικούς μηχανισμούς. Συμπερασματικά, η αυτοφαγία συντελεί στην καταστροφή των κυττάρων κατά τη νέκρωση σε νηματώδεις. Κατά συνέπεια, η παρεμπόδισή της είναι πιθανό να προσφέρει προστασία έναντι του νεκρωτικού θανάτου και στον άνθρωπο.

SUMMARY

Necrotic cell death underlies extensive neuronal loss in acute degenerative episodes, such as ischemic stroke, and in devastating human pathologies, like neurodegenerative diseases (Martin, 2001; Syntichaki and Tavernarakis, 2002). In the nematode *Caenorhabditis elegans*, hyperactivation of specific ion channels or hypoxia evoke an analogous pattern of neuronal death (Driscoll and Chalfie, 1991; Scott et al., 2002). Investigations in both nematodes and mammals implicate specific calpains and aspartyl proteases in the execution of necrotic cell death (Syntichaki and Tavernarakis, 2002; Yoshida et al., 2002). Aspartyl proteases achieve full activity under acidic conditions (Goll et al., 2003; Ishidoh and Kominami, 2002). However, the factors that induce aberrant activation of these otherwise benign enzymes during necrosis have been largely unknown.

In this thesis we show that the function of the vacuolar H^+-ATPase, a pump that acidifies endosomal and lysosomal compartments, is essential for the execution of necrotic cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Indeed, impairment of the vacuolar H^+-ATPase function or alkalization of normally acidic intracellular organelles by weak bases protected against necrosis. The use of pH-sensitive green fluorescent protein (GFP)-molecules revealed reduction of cytoplasmic pH in dying cells. Intracellular acidification required the vacuolar H^+-ATPase function. Suppression of necrosis by aspartyl protease but not calpain deficiency was further enhanced by conditions that perturbed intracellular acidification. Thus, intracellular pH is an important modulator of necrosis in *C. elegans*. We propose that the vacuolar H^+-ATPase activity is required to establish necrosis-promoting acidic intracellular conditions that augment the function of executioner aspartyl proteases in degenerating cells.

However, the origin of cytoplasmic acidification remained obscure. Mutations in genes that affect lysosomal biogenesis and function had a significant impact on necrotic death levels. By using a genetically encoded fluorescent marker to monitor lysosomal fate during necrosis *in vivo*, we found that lysosomes fuse and localize around a swollen nucleus. However, in advanced stages of cell death GFP–labeled lysosomal membranes faded, indicating lysosomal rupture. In conjunction with the effect of endocytic oganelle alkalization on necrotic death, the sum of our data suggests that lysosomes have a prominent role in cellular destruction during necrosis and facilitate pH reduction by releasing their acidic content. Similar mechanisms may contribute to necrotic cell death that follows extreme acidosis—for example, during stroke—in humans.

The lysosomal system participates via the autophagic process to the degradation of

intracellular proteins and organelles. We checked the involvement of autophagy in necrosis and found that it is required for necrotic death in *C. elegans*. Impairment of autophagy by genetic inactivation of autophagy genes or by pharmacological treatment suppressed necrosis. Excessive autophagosome formation was induced early during neurodegeneration. At more pronounced stages autophagosomes accumulated in the nucleus periphery, where they exhibited partial or complete colocalization with lysosomes and mitochondria. Autophagy induction was preceded by calpain activation and synergized with lysosomal catabolic mechanisms to facilitate cell death. These findings demonstrate that autophagy contributes to cellular destruction during necrosis. Thus, interfering with the autophagic process may protect neurons against necrotic damage in humans.

Ευρετήριο & συντμήσεις αγγλικών όρων

Στο σημείο αυτό αναγράφονται αγγλικοί όροι που απαντούν στο κείμενο, οι συντμήσεις αυτών, καθώς και οι αντίστοιχοι ελληνικοί. Δεδομένου ότι είναι γνωστοί και χρησιμοποιούνται στην ευρύτερη επιστημονική κοινότητα με την αγγλική ονομασία, αυτή θεωρήθηκε και η πλέον κατάλληλη για τη διευκόλυνση της ροής και συνεπώς της ανάγνωσης του κειμένου. Επιπλέον, αναφέρονται και τα πλήρη ονόματα συντμήσεων, η γνώση των οποίων θεωρήθηκε ότι εξυπηρετεί την καλύτερη κατανόηση των περιγραφόμενων μοριακών διαδικασιών.

- ALM, Anterior Lateral Motorneuron: πρόσθιος πλευρικός κινητικός νευρώνας
- AMPAR, alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor: υποδοχέας γλουταμινικού
- A.O., Acridine Orange: πορτοκαλί της ακριδίνης
- Atg, Autophagy-related genes: γονίδια που σχετίζονται με την αυτοφαγία
- ATP, Adenosine triphosphatase: τριφωσφορική αδενοσίνη
- AVM, Anterior Ventral Motorneuron: πρόσθιος κοιλιακός κινητικός νευρώνας
- Bcl-2, B-cell leukaemia/lymphoma 2: οικογένεια αποπτωτικών πρωτεϊνών
- BLAST, Basic Local Allignment Search Tool: πρόγραμμα για την αναζήτηση ομοιοτήτων μεταξύ νουκλεοτιδικών ή αμινοξικών αλληλουχιών
- cAMP, cyclic adenosine monophosphatase: κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
- CMA, Chaperone-Mediated Autophagy: τύπος αυτοφαγίας με τη μεσολάβηση chaperones
- Cvt, Cytoplasm to vacuole targeting: μοριακό μονοπάτι στόχευσης πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στο μοναδικό λυσόσωμα των ζυμών
- (*d*), *dominant allele*: επικρατές αλληλόμορφο
- DEG, Degenerins: οικογένεια ιοντικών καναλιών
- DIC, Differential Interference Contrast: μικροσκοπία διαφορικής συμβολής
- DNA, Desoxyribonucleic acid: δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ

- FADD, Fas-Associated Death Domain: περιοχές "θανάτου" συνδεόμενες με τον υποδοχέα Fas
- $GABA_AR$, γ-aminobutyric acid receptor: υποδοχέας γ-αμινοβουτυρικού οξέος
- GABARAP, GABA-Receptor Associated Protein: πρωτεΐνη που συνδέεται με τον υποδοχέα του νευροδιαβιβαστή γ-αμινοβουτυρικό
- GATE-16, Golgi-associated ATPase enhancer of 16kD: πρωτεΐνη που συνδέεται με το σύστημα Golgi
- (*gf*), *gain-of-function allele*: αλληλόμορφο που οδηγεί σε προϊόν με αυξημένη ενεργότητα
- GFP, Green Fluorescent Protein: πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
- GTP, guanosine triphosphate: τριφωσφορική γουανοσίνη
- HIV, Human Immunodeficiency Virus: ιός ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου
- JNK, Jun N-terminal Kinase: τύπος κινάσης
- LAMP, Lysosome-Associated Membrane Protein: πρωτεΐνη που συνδέεται με λυσοσώματα
- 3-MA, 3-methyladenine: μεθυλαδενίνη-3
- MEC, mechanosensory abnormality: ανωμαλία στην αντίληψη μηχανικών ερεθισμάτων
- MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: νευροτοξίνη
- MPP+, 1-methyl-4-phenylpyridine: νευροτοξίνη
- mRNA, messenger RNA: αγγελιαφόρο RNA
- NMDAR, *N*-methyl-D-aspartate receptor: υποδοχέας γλουταμινικού
- NCX, Na^+/Ca^{2+} exchanger: κανάλια ανταλλαγής ιόντων νατρίου/ασβεστίου
- NGM, Nematode Growth Media: θρεπτικό μέσο για νηματώδεις
- NHE & NHX, Na^+/H^+ exchanger: κανάλια ανταλλαγής ιόντων νατρίου/πρωτονίων
- 6-OHDA, 6-hydroxydopamine: νευροτοξίνη
- ORF, Open Reading Frame: ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης
- PCR, Polymerase Chain Reaction: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- PI3-K, Phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase: κινάσες φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης
- PLM, Posterior Lateral Motorneuron: οπίσθιος πλευρικός κινητικός νευρώνας
- PVM, Posterior Ventral Motorneuron: οπίσθιος κοιλιακός κινητικός νευρώνας

- RFP, Red Fluorescence Protein: κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
- RIP, Receptor-Interacting Protein: κινάση με πλειοτροπική δράση, που ενεργοποιείται από σύμπλοκα που σηματοδοτούν την επαγωγή κυτταρικού θανάτου και μεταξύ άλλων μπορεί να οδηγήσει σε νέκρωση
- RNA, Ribonucleic acid: ριβονουκλεϊκό οξύ
- RNAi, RNA interference: παρέμβαση ή παρεμβολή δίκλωνων μορίων RNA
- ROS, Reactive Oxygen Species: ενεργές ρίζες οξυγόνου
- SNARE, SNAP receptors: πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε διαδικασίες σύντηξης μεμβρανών
- TNF, Tumor Necrosis Factor: φλεγμονώδης κυτοκίνη, που μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο επιδρώντας σε υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων
- TOR, Target Of Rapamycin: κινάση σερίνης/θρεονίνης
- TRADD, TNF Receptor-Associated Death Domain protein: πρωτεΐνη που συνδέεται με τον υποδοχέα του TNF και φέρει περιοχές "θανάτου"
- TRAF, TNF Receptor-Associated Factor: πρωτεΐνη που συνδέεται με τον υποδοχέα του TNF
- TRAILR, TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Receptor: τύπος υποδοχέα, η ενεργοποίηση του οποίου επάγει κυτταρικό θάνατο (υποδοχέας "θανάτου", death receptor)
- Unc, Uncoordinated: φαινότυπος μη συντονισμένης κίνησης σε νηματώδεις
- V-ATPase, Vacuolar proton ATPase: κυστιδιακή ATPάση πρωτονίων
- VPS, Vacuolar Protein-Sorting: σύμπλοκο καταμερισμού κυστιδιακών πρωτεϊνών
- Wt, Wild type: άγριος τύπος

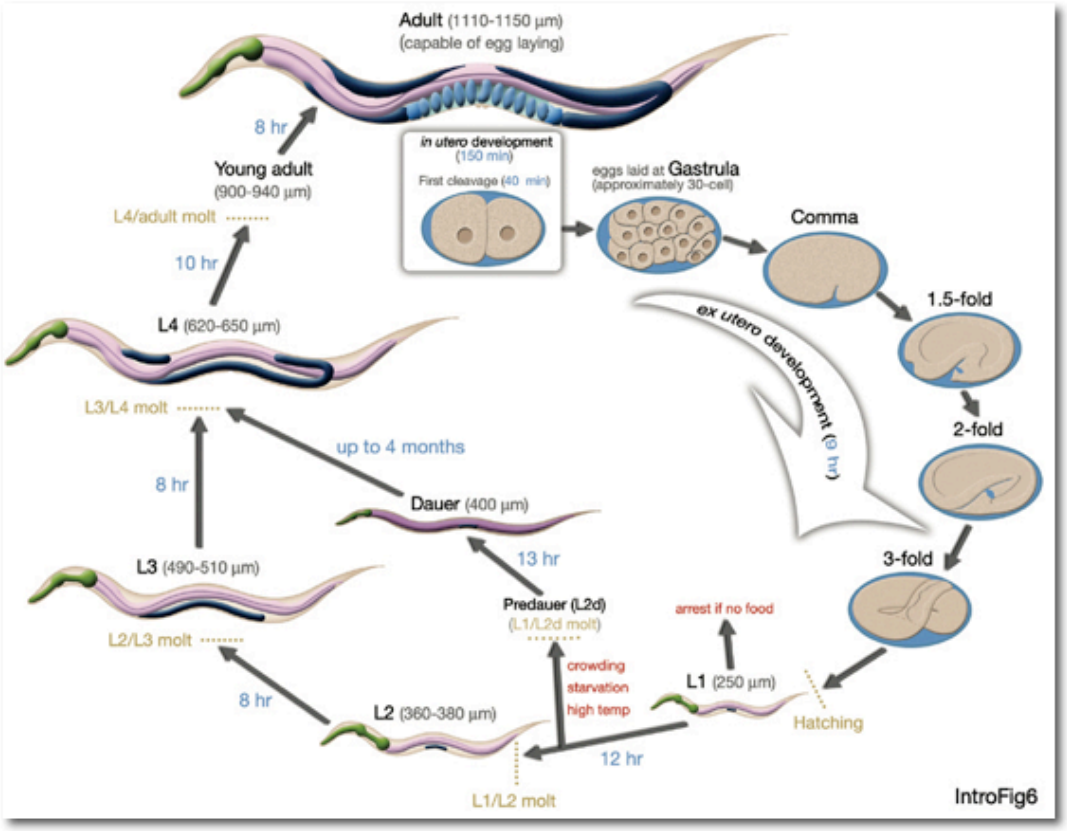
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. Εισαγωγή στη Βιολογία του Νηματώδους *Caenorhabditis elegans*

Η χρήση του νηματώδους στο πεδίο της βιολογικής έρευνας προτάθηκε από το Sydney Brenner το 1974 (Brenner, 1974). Έκτοτε, μεγάλο μέρος της γενετικής και της φυσιολογίας αυτού του οργανισμού έχει διαλευκανθεί, καθιστώντας τον ισχυρό πειραματικό μοντέλο, με ανεκτίμητη συνεισφορά στην πρόοδο της βιοϊατρικής έρευνας.

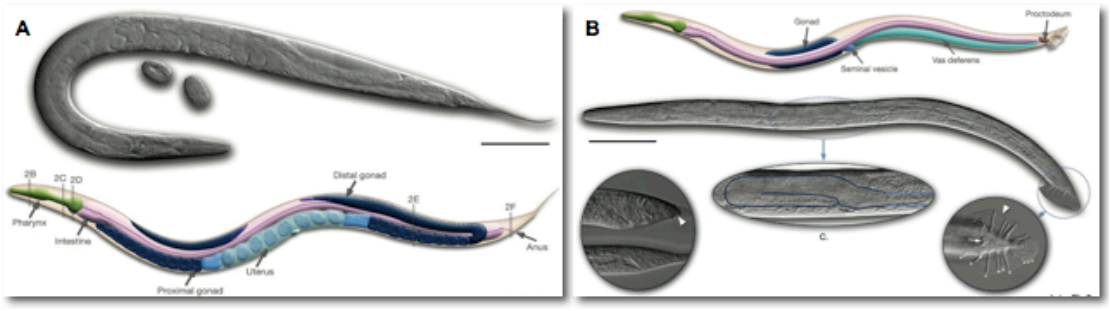
Ο *C. elegans* είναι ένα ελεύθερο (μη παρασιτικό) είδος νηματώδους, που ζει στο έδαφος (Riddle, 1997). Το μέγεθός του είναι πολύ μικρό· τα ενήλικα άτομα έχουν μήκος περίπου 1.3mm και διάμετρο 100μm. Η ανάπτυξή του στο εργαστήριο πραγματοποιείται σε στερεά ή υγρά θρεπτικά μέσα και ως τροφή χρησιμοποιείται το αργά αναπτυσσόμενο στέλεχος του βακτηρίου *Escherichia coli*, OP50. Η συντήρηση νηματωδών στο εργαστήριο είναι συνεπώς οικονομική και δεν απαιτεί χρόνο. Διευκολύνεται επίσης από τη δυνατότητα διατήρησης παγωμένων στελεχών στους -80ºC ή σε υγρό άζωτο. Οι προνύμφες 1^{ου} σταδίου (L1) είναι οι πλέον ανθεκτικές κατά το πάγωμα. Επιπλέον, οι προνύμφες L1 και οι ανθεκτικές προνυμφικές μορφές dauers μπορούν να επιβιώσουν για μερικούς μήνες χωρίς τροφή σε θερμοκρασία 15ºC.

Ο αναπαραγωγικός κύκλος του *C. elegans* διαρκεί περίπου 2.5 μέρες στους 25ºC, ενώ τα ζώα ζουν συνολικά 2-3 εβδομάδες. Ο σχετικά μικρός χρόνος ζωής αποτελεί πλεονέκτημα για γενετικές μελέτες, ειδικά στον τομέα της γήρανσης. Η ανάπτυξη ξεκινά από τη γονιμοποίηση του ωοκυττάρου. Μέρος της εμβρυϊκής αύξησης πραγματοποιείται στο εσωτερικό της γονάδας του ενήλικου ζώου. Από την εκκόλαψη των αυγών προκύπτουν προνύμφες 1^{ου} σταδίου (L1), οι οποίες διέρχονται από τέσσερα διαδοχικά προνυμφικά στάδια (L1-L4), για να δημιουργηθούν τελικά σεξουαλικά ώριμα ενήλικα ζώα, ικανά να παράγουν γενετικά κύτταρα και να αποθέτουν αυγά (Εικ. **1**). Κάθε ζώο αποθέτει περίπου 300 αυγά σε διάστημα τριών ημερών. Η ανάπτυξη είναι ευαίσθητη στις συνθήκες του περιβάλλοντος. Σε μη ευνοϊκές συνθήκες, όπως η υψηλή θερμοκρασία, η έλλειψη τροφής και ο υπερπληθυσμός, οι προνύμφες L1 διακόπτουν την ανάπτυξή τους, ενώ ζώα 2^{ου} προνυμφικού σταδίου (L2) μεταμορφώνονται σε ανθεκτικούς τύπους διάπαυσης, που ονομάζονται "dauers" (Klass and Hirsh, 1976). Οι προνύμφες dauers έχουν πιο επίμηκες και λεπτό σώμα, σκληρό επιδερμίδιο, υψηλά επίπεδα αποθηκευμένου λίπους, δεν τρέφονται και κινούνται συνεχώς. Η ιστολογία και συμπεριφορά τους εξυπηρετούν την αντοχή σε αντίξοο περιβάλλον και την εξερεύνηση του χώρου, προκειμένου να ανιχνευτούν θώκοι με ευνοϊκές συνθήκες. Επανέρχονται τότε στο "φυσιολογικό" κύκλο ανάπτυξης ως προνύμφες 4^{ου} σταδίου (L4).



Εικόνα 1. Ο κύκλος ζωής του *C. elegans* στους 25°C (www.wormbase.org)

Οι νηματώδεις του είδους *C. elegans* είναι διπλοειδείς ερμαφρόδιτοι οργανισμοί και παράγουν με αυτογονιμοποίηση γονοτυπικά ομοιογενείς πληθυσμούς. Ωστόσο, ανωμαλίες στο διαχωρισμό των δύο φυλετικών χρωμοσωμάτων Χ κατά τη μείωση είναι δυνατόν να οδηγήσουν στη δημιουργία αρσενικών ατόμων χρωμοσωμικής σύστασης ΧΟ (Εικ. **2**). Αν και η συχνότητα των αρσενικών ζώων στη φύση είναι πολύ χαμηλή, η επίδραση θερμικού σοκ σε προνύμφες L4 αυξάνει την πιθανότητα μη σωστού διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων και κατά συνέπεια τα ποσοστά αρσενικών ατόμων. Αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε γενετικές διασταυρώσεις για τη μεταφορά αλληλομόρφων και χρωμοσωμικών αλληλουχιών. Οι πληθυσμοί των νηματωδών που χρησιμοποιούνται ευρύτερα στο εργαστήριο προέρχονται από ένα κοινό πρόγονο (στέλεχος Bristol N2), με συνέπεια να είναι γενετικά πανομοιότυποι. Η ομοιομορφία αυτή καθιστά δυνατή την εξαγωγή συγκρίσιμων αποτελεσμάτων από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες (Gems and Riddle, 2000).



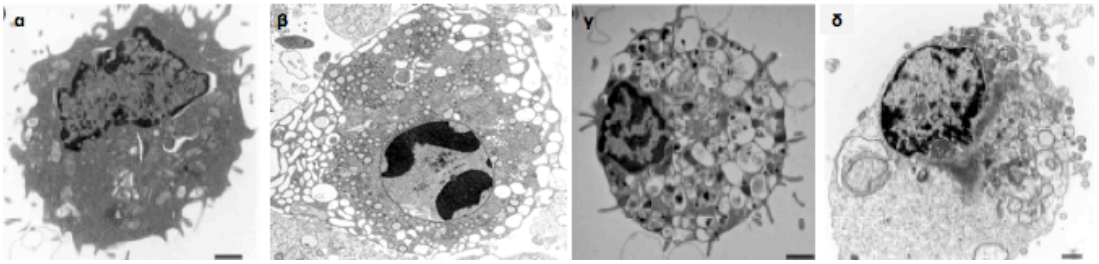
Εικόνα 2. Φωτογραφίες μικροσκοπίου διαφορικής συμβολής και σχηματικές αναπαραστάσεις ερμαφρόδιτων (A) και αρσενικών ζώων *C. elegans* (B) (www.wormbase.org). Είναι εμφανείς οι διαφορές στη γονάδα και το οπίσθιο τμήμα των νηματωδών (B).

Το γονιδίωμα του *C. elegans* έχει αλληλουχηθεί πλήρως και περιλαμβάνει περίπου 20000 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORFs), κατανεμημένα σε πέντε ζεύγη αυτοσωμάτων κι ένα ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων (1998). Εκτός από το γενετικό, είναι διαθέσιμος και φυσικός χάρτης, που αποτελείται από αλληλοεπικαλυπτόμενους κλώνους DNA (κοσμίδια και τεχνητά χρωμοσώματα ζυμομυκήτων, Yeast Artificial Chromosomes-YACs) και καλύπτει ολόκληρο σχεδόν το γονιδίωμα (Coulson et al., 1988; Waterston and Sulston, 1995). Αξιοποίηση αυτής της πληροφορίας σε ευρείας κλίμακας μεθόδους, όπως οι μικροσυστοιχίες DNA και η παρεμβολή RNA (RNAi), έχει οδηγήσει στην παραγωγή πληθώρας δεδομένων, που αφορούν σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, στην έκφραση και στη λειτουργία γονιδίων (Blumenthal et al., 2002; Boulton et al., 2002; Kamath et al., 2003; Kim et al., 2001; Maeda et al., 2001; Matthews et al., 2001; Walhout et al., 2000). Η παρεμβολή RNA είναι μία μέθοδος αντίστροφης γενετικής, η οποία επιτρέπει γρήγορη καταστολή της έκφρασης γονιδίων σε διαφορετικά επίπεδα και σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια (Fire et al., 1998; Tavernarakis et al., 2000). Αν κι έχει το μειονέκτημα ότι δεν είναι ιδιαίτερα αποδοτική σε νευρικά κύτταρα, η ανακάλυψη στελεχών με αυξημένη ευαισθησία στο RNAi (στελέχη με τις μεταλλαγές *eri-1(mg366)*, *lin-35(n745)* ή *rrf-3(pk1426)*), την έχει καταστήσει πιο αποτελεσματική (Kennedy et al., 2004; Lehner et al., 2006; Simmer et al., 2003; Timmons, 2004). Οι γενετικές μελέτες στους νηματώδεις προάγονται ακόμα από την ευκολία δημιουργίας διαγονιδιακών στελεχών με μικρο-ενέσεις αλληλουχιών DNA στις γονάδες των ζώων (Mello and Fire, 1995). Για την κατασκευή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών είναι διαθέσιμοι κατάλληλοι πλασμιδιακοί φορείς, ειδικοί για το *C. elegans*. Η εφαρμογή μεθόδων κλασσικής γενετικής πραγματοποιείται επίσης με ευκολία. Αρωγό στη χαρτογράφηση μεταλλαγών αποτελεί η διαθεσιμότητα ενός ιδιαίτερα πλούσιου χάρτη μοναδικών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) (Wicks et al., 2001).

Η χρήση του *C. elegans* ως πειραματικού μοντέλου έχει συμβάλλει ιδιαίτερα στη διερεύνηση των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου κατά την ανάπτυξη. Χαρακτηριστικά, όπως η διαφάνεια του σώματος και η πανομοιότυπη κυτταρική του σύσταση, έχουν αποτελέσει πλεονεκτήματα σε αυτήν την προσπάθεια. Το σώμα κάθε ερμαφρόδιτου ενήλικου ζώου αποτελείται από 959 κύτταρα, που προκύπτουν μετά από συγκεκριμένες κυτταρικές διαιρέσεις και το θάνατο ακριβώς 131 κυττάρων (Sulston and Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983). Ο εντοπισμός των κυττάρων που πεθαίνουν πραγματοποιείται εύκολα με τη χρήση μικροσκοπίου διαφορικής συμβολής (DIC, Nomarski). Η θέση κάθε κυττάρου και η σειρά των κυτταρικών διαιρέσεων, που οδηγούν στο σχηματισμό του, είναι ήδη γνωστά. Με τη βοήθεια ηλεκτρονικών μικροφωτογραφιών έχουν ανιχνευτεί επίσης οι νευρικές και νευρομυϊκές συνάψεις κι έχει κατασκευαστεί το διάγραμμα των διασυνδέσεων μεταξύ των 302 νευρώνων του νηματώδους (Bargmann and Kaplan, 1998; White et al., 1976). Η καταστροφή κι εξάλειψη συγκεκριμένων κυττάρων του *C. elegans* μπορεί να επιτευχθεί με έκφραση τοξικών πρωτεϊνών υπό την καθοδήγηση κατάλληλων υποκινητών ή με χρήση ακτινοβολίας laser (Bargmann and Avery, 1995; Harbinder et al., 1997). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και μέθοδοι πρωτογενών καλλιεργειών κυττάρων του *C. elegans* για μελέτες *ex vivo* (Christensen et al., 2002).

II. Μηχανισμοί Κυτταρικού Θανάτου

Ο κυτταρικός θάνατος περιγράφηκε για πρώτη φορά από το Virchow στα 1871 και χαρακτηρίστηκε με το γενικό όρο "νέκρωση" (Kumar and Rothman, 2007). Η έννοια του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου εισήχθη το 1964 από το Lockhsin και τους συνεργάτες του, μετά από μελέτες της προκαθορισμένης καταστροφής συγκεκριμένων κυττάρων κατά την ανάπτυξη εντόμων (Bredesen et al., 2006). Δύο χρόνια αργότερα διαπιστώθηκε ότι ο μηχανισμός αυτός απαιτεί τη σύνθεση πρωτεϊνών και το 1972 οι JFR Kerr, AH Wyllie και AR Currie πρότειναν, βάσει μορφολογικών κριτηρίων, τη διάκριση δύο κατηγοριών κυτταρικού θανάτου: τη "νέκρωση", που περιγράφει την ακαριαία, βίαιη και παθητική καταστροφή του κυττάρου και την "απόπτωση" ή προγραμματισμένο ενεργητικό θάνατο, που συμβαίνει είτε φυσιολογικά είτε σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις (Kerr et al., 1972). Έκτοτε, έχουν διακριθεί τρεις βασικοί τύποι κυτταρικού θανάτου σε κύτταρα θηλαστικών· η απόπτωση, ο αυτοφαγικός θάνατος και η νέκρωση (Εικ. **3**). Αν και η Κοινότητα των Τοξικολόγων-Παθολόγων (Society of Toxicologic Pathologists) έχει προτείνει τη χρήση του όρου "νέκρωση" γενικά για την περιγραφή νεκρών κυττάρων σε τομές ιστών και τη χρήση του όρου "όγκωση" (oncosis) για τον προσδιορισμό εκείνου του τύπου κυτταρικού θανάτου, που περιλαμβάνει διόγκωση του κυτταροπλάσματος, η πρόταση αυτή δεν έχει εφαρμοστεί στις περισσότερες περιπτώσεις (Levin et al., 1999). Έτσι και στη συγκεκριμένη διατριβή, θα χρησιμοποιηθεί ο όρος "νέκρωση", για να χαρακτηρίσει μία διαφορετική μορφή θανάτου.



Εικόνα 3. Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες φυσιολογικού κυττάρου (α) και κυττάρων που υφίστανται αποπτωτικό (β), αυτοφαγικό (γ) και νεκρωτικό (δ) θάνατο (α, γ, δ: (Edinger and Thompson, 2004), β: www.med.upenn.edu).

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος τύπου Ι χαρακτηρίζεται από συμπύκνωση και κατακερματισμό της χρωματίνης, συρρίκνωση του κυττάρου και σχηματισμό αποπτωτικών σωμάτων, τα οποία εγκολπώνονται από φαγοκύτταρα (Edinger and Thompson, 2004). Η εμφάνιση μεγάλου αριθμού αυτοφαγικών κυστιδίων στο

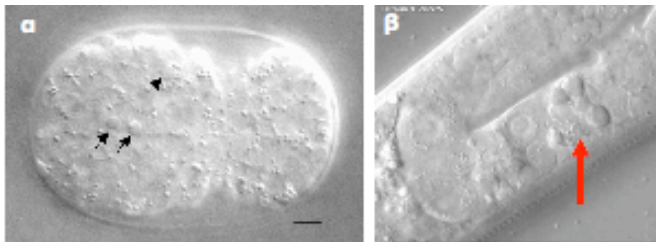
κυτταρόπλασμα είναι το βασικό γνώρισμα του αυτοφαγικού θανάτου ή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου τύπου ΙΙ. Ο σχηματισμός αυτών των κυστιδίων προηγείται της εκδήλωσης συμπτωμάτων στον πυρήνα (πύκνωση και στη συνέχεια διάλυση) και απαιτεί διατήρηση του κυτταροσκελετού, καθώς και παρουσία σχετικά μικρού αριθμού λειτουργικών μιτοχονδρίων για την παραγωγή ενέργειας (Bursch, 2001). Ο όρος "νέκρωση" χρησιμοποιήθηκε αρχικά για οποιαδήποτε μορφή θανάτου διαφορετική από απόπτωση ή αυτοφαγία και συνδέθηκε με παθολογικές καταστάσεις (Golstein and Kroemer, 2007). Μελέτες σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα οδήγησαν στη συνέχεια στη διαπίστωση στερεότυπων χαρακτηριστικών, όπως διόγκωση ενδοκυτταρικών οργανιδίων, κυρίως μιτοχονδρίων, και διάρρηξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης σε πολύ πρώιμο στάδιο. Βασική συνέπεια αυτού είναι η διάχυση ενδοκυτταρικών συστατικών στο μεσοκυττάριο χώρο και η επαγωγή φλεγμονωδών αποκρίσεων. Παρατηρήθηκαν επιπλέον και μορφές προγραμματισμένου θανάτου με χαρακτηριστικά νέκρωσης, οι οποίες χαρακτηρίζονται από διόγκωση του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) και των μιτοχονδρίων και αναφέρονται ως κυτταροπλασματικός ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος τυπου ΙΙΙ (Bredesen et al., 2006).

Οι μελέτες στους νηματώδεις έχουν εστιαστεί κυρίως στη διαλεύκανση των αποπτωτικών και νεκρωτικών μοριακών μονοπατιών, ενώ πρόσφατα ξεκίνησε και διερεύνηση της συμβολής της αυτοφαγίας στην καταστροφή κυττάρων του *C. elegans*. Ακολουθεί σύντομη περιγραφή της απόπτωσης και των λοιπών τύπων θανάτου, ενώ οι μηχανισμοί της νέκρωσης θα περιγραφούν πιο διεξοδικά, δεδομένου ότι η διερεύνησή τους αποτελεί και κύριο στόχο αυτής της διατριβής.

ΙΙ.α. Αποπτωτικοί μηχανισμοί στο *C. elegans*

Η απόπτωση είναι ο πλέον μελετημένος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου στους νηματώδεις. Η ανίχνευση αποπτωτικών κυττάρων πραγματοποιείται εύκολα σε μικροσκόπιο Nomarski, όπου έχουν τη μορφή κυκλικού εξογκώματος (Εικ. **4**). Η ενεργοποίηση της απόπτωσης σε συγκεκριμένους ιστούς και σε ορισμένα αναπτυξιακά στάδια του νηματώδους είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη και τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Κατά την εμβρυϊκή αύξηση και κατά το 2^{o} προνυμφικό στάδιο (L2) ενός ερμαφρόδιτου ζώου 131 κύτταρα καταστρέφονται μέσω απόπτωσης (Kimble and Hirsh, 1979; Sulston and Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983). Πρόκειται κυρίως για νευρώνες και μυϊκά κύτταρα, καθώς και κύτταρα της υποδερμίδας και του φάρυγγα. Επιπλέον, περίπου το 50% των ωοκυττάρων που παράγονται στις γονάδες υφίστανται αποπτωτικό θάνατο (Gumienny et al., 1999). Η καταστροφή αυτών εξασφαλίζει θρεπτικά συστατικά, που

χρησιμοποιούνται από τα υπόλοιπα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα. Απόπτωση επάγεται όμως και σε περίπτωση παθολογικών καταστάσεων. Ενεργοποιείται στη γαμετική σειρά ως μηχανισμός φυσικής ανοσίας μετά από εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών, καθώς και ως απόκριση σε βλάβες του γενετικού υλικού (van Haaften et al., 2006).

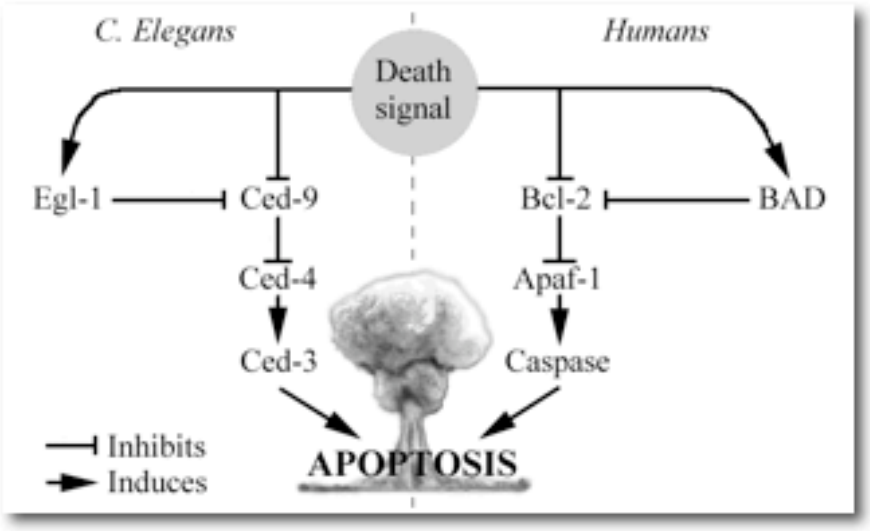


Εικόνα 4. Αποπτωτικά πτώματα (βέλη) σε έμβρυο (α) (www.wormbook.org) και στη γαμετική σειρά ενήλικου ατόμου (β) (www.dundee.ac.uk/lifesciences/gartner), όπως φαίνονται σε μικροσκόπιο διαφορικής συμβολής.

Τόσο σε σωματικά όσο και σε γαμετικά κύτταρα, τα οποία έχουν υποστεί την επίδραση γενοτοξικών παραγόντων, η επαγωγή απόπτωσης στηρίζεται στην ενεργοποίηση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης EGL-1 (Lettre and Hengartner, 2006). Η EGL-1 προσδένεται στον αντι-αποπτωτικό παράγοντα CED-9 (ορθόλογου της πρωτεΐνης Bcl-2 των θηλαστικών), ο οποίος σχηματίζει σύμπλοκο με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη CED-4 στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων. Το αποτέλεσμα της πρόσδεσης της EGL-1 είναι η απελευθέρωση της CED-4, που συμμετέχει ακολούθως στο σχηματισμό ολιγομερών συμπλόκων, των αποπτωσωμάτων, κοντά στην εξωτερική επιφάνεια του πυρήνα (Lettre and Hengartner, 2006; Tzur et al., 2006). Στα αποπτωσώματα συντελείται η ενεργοποίηση της κασπάσης CED-3, η οποία σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα, όπως οι νουκλεάσες CPS-6, CRN-1 και NUC-1, συμβάλλει στην αποδόμηση κυτταρικών συστατικών (Parrish et al., 2001; Parrish et al., 2003; Wang et al., 2002; Wu et al., 2000). Το ίδιο βασικό μοριακό μονοπάτι ενεργοποιείται και στην περίπτωση του φυσιολογικού θανάτου ωοκυττάρων, ανεξάρτητα όμως από τη δράση της EGL-1.

Η έναρξη του αποπτωτικού προγράμματος ενεργοποιεί παράλληλα και τη διαδικασία απομάκρυνσης των καταστρεφόμενων κυττάρων μέσω εγκόλπωσης από γειτονικά ή ειδικά επιθηλιακά κύτταρα (Kinchen and Hengartner, 2005). Η φαγοκύτωση επιτελείται με την ενεργοποίηση δύο διαφορετικών μοριακών μονοπατιών· το ένα περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες CED-7, CED-1, CED-6 και DYN-1, ενώ το άλλο τα μόρια UNC-73, MIG-2, CED-12, CED-5 και CED-2 (Shaham, 2006; Yu et al., 2006). Και τα δύο μονοπάτια συγκλίνουν στη μικρή GTPάση CED-10, η οποία προκαλεί κυτταροσκελετικές ανακατατάξεις στα φαγοκύτταρα.

Οι αποπτωτικοί μηχανισμοί έχουν συντηρηθεί σημαντικά κατά την εξέλιξη (Ellis and Horvitz, 1986). Για τις περισσότερες από τις αποπτωτικές πρωτεΐνες του *C. elegans* έχουν περιγραφεί ορθόλογα σε θηλαστικά (Εικ. **5**), αν και στα τελευταία η όλη διαδικασία είναι πιο σύνθετη, με μεγαλύτερη ποικιλία εμπλεκόμενων παραγόντων και περίπλοκη ρύθμιση. Ωστόσο, γενετικές μελέτες σε νηματώδεις έχουν συνεισφέρει σημαντικά στη διαλεύκανση των μηχανισμών απόπτωσης κι εξακολουθούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες.



Εικόνα 5. Συντηρημένοι μηχανισμοί απόπτωσης από το *C. elegans* ως τον άνθρωπο (http://herkules.oulou.fi)**.**

ΙΙ.β. Ειδικές μορφές προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στο *C. elegans*

Εκτός από την απόπτωση, έχει περιγραφεί κατά την ανάπτυξη του *C. elegans* ένας ξεχωριστός τύπος κυτταρικού θανάτου, ο οποίος αφορά στην εξάλειψη του "συνδετικού" κυττάρου κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά από τη μεταμόρφωση μίας προνύμφης τελικού σταδίου L4 σε ενήλικο ζώο (Abraham et al., 2007). Η καταστροφή του συγκεκριμένου κυττάρου είναι απαραίτητη, προκειμένου να σχηματιστεί φυσιολογικά η αρσενική γονάδα και συμβαίνει ανεξάρτητα από την ενεργότητα αποπτωτικών ή νεκρωτικών παραγόντων. Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες του εκφυλιζόμενου κυττάρου αποκαλύπτουν μεγάλο αριθμό κυτταροπλασματικών κυστιδίων και διογκωμένων μιτοχονδρίων. Τα τελευταία εντοπίζονται συχνά στο εσωτερικό πολυ-μεμβρανικών δομών. Αν και οι δομές αυτές θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν αυτοφαγοσώματα, υποδηλώνοντας μια μορφή αυτοφαγικού θανάτου στους νηματώδεις, διαπιστώθηκε ότι η δυσλειτουργία γονιδίων της αυτοφαγίας δεν έχει καμιά επίδραση στην απώλεια του "συνδετικού" κυττάρου. Εξάλλου, παρατηρήθηκε αμυδρή μόνο αύξηση του αριθμού αυτοφαγοσωμάτων στο κυτταρόπλασμα αυτού.

ΙΙ.γ. Οι νηματώδεις ως μοντέλα ασθενειών του ανθρώπου

Ο νηματώδης *C. elegans* έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως μοντέλο για τη μελέτη της παθογένεσης ανθρώπινων ασθενειών, όπως η νόσος του Parkinson, του Alzheimer, του Huntington και η μυϊκή δυστροφία (Carre-Pierrat et al., 2006; Driscoll and Gerstbrein, 2003; Parker et al., 2004). Σε αυτές τις ασθένειες έχουν παρατηρηθεί γνωρίσματα και των τριών βασικών μορφών κυτταρικού θανάτου. Οι μελέτες στους νηματώδεις έχουν εστιαστεί κυρίως στη διερεύνηση των μηχανισμών εκφυλισμού νευρικών και μυϊκών κυττάρων σε ζωα που έχουν υποστεί επίδραση νευροτοξικών ουσιών, σε στελέχη με μεταλλαγές σε γονίδια που σχετίζονται με τις συγκεκριμένες νόσους και σε διαγονιδιακά ζώα, τα οποία εκφράζουν τοξικά μόρια θηλαστικών.

Οι νευροτοξίνες MPTP, MPP+ και 6-OHDA πιθανολογείται ότι ευθύνονται για την εκδήλωση της νόσου του Parkinson (Kourtis and Tavernarakis, 2007). Χορήγησή τους σε νηματώδεις επιδρά ειδικά στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, τα κύτταρα δηλαδή που επηρεάζονται και κατά την αντίστοιχη ασθένεια στον άνθρωπο (Braungart et al., 2004; Cao et al., 2005; Nass et al., 2002). Σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί μορφολογικά γνωρίσματα απόπτωσης. Όσον αφορά στις ανθρώπινες πρωτεΐνες που έχουν υπερ-εκφραστεί στο *C. elegans*, περιλαμβάνονται μεταξύ αυτών άγριου τύπου και μεταλλαγμένες μορφές της α-synuclein και της συνδεόμενης με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνης tau, το πεπτίδιο Αβ1-42 και αμινο-τελικά τμήματα της huntingtin, που φέρουν πολυ-γλουταμινικές αλληλουχίες (Boyd-Kimball et al., 2006; Kraemer et al., 2003; Kuwahara et al., 2006; Lakso et al., 2003; Link, 2005; Miyasaka et al., 2005; Vartiainen et al., 2006). Η α-synuclein είναι μια προσυναπτική πρωτεΐνη και αποτελεί κύριο συστατικό των ενδοκυτταρικών έγκλειστων σωματίων Lewy, που σχηματίζονται κατά τον παρκινσονισμό (Spillantini et al., 1997). Μεταλλαγές αυτής έχουν συνδεθεί επίσης με σπάνιες οικογενείς περιπτώσεις της νόσου του Parkinson (Polymeropoulos et al., 1997). Υπερ-φωσφορυλιωμένες μορφές της πρωτεΐνης tau απαντούν σε ινώδεις ενδοκυτταρικούς σχηματισμούς σε νευρώνες ασθενών με Alzheimer, ενώ τα πεπτίδια Αβ σχηματίζουν αμυλοειδείς πλάκες στο εξωτερικό των νευρικών κυττάρων (Goedert, 1993; Kang et al., 1987). Επικρατείς μεταλλαγές, που επιφέρουν τη δημιουργία μακριών αλυσίδων γλουταμίνης στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης huntingtin, οδηγούν στο σχηματισμό ινών και τελικά συσσωματωμάτων, τα οποία είναι χαρακτηριστικά της νόσου του Huntington (Faber et al., 1999). Έκφραση των παραπάνω μορίων σε νηματώδεις προκαλεί προοδευτικό κυτταρικό εκφυλισμό, προσομοιώνοντας τις αντίστοιχες παθολογικές καταστάσεις στον άνθρωπο. Επιπλέον, δυσλειτουργία της δυστροφίνης DYS-1 σε συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο προκαλεί προοδευτική απώλεια σωματικών μυών με επακόλουθες ανωμαλίες στην κίνηση των νηματωδών (Carre-Pierrat et al., 2006; Parker et al., 2004). Παρόμοια συμπτώματα εκδηλώνονται σε μυϊκές δυστροφίες. Τα παραπάνω

μοντέλα των νηματωδών είναι ιδιαίτερα χρήσιμα σε ευρείας κλίμακας μελέτες για την ανίχνευση φαρμακευτικών ουσιών, προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι αντίστοιχες νευρομυϊκές διαταραχές (Gaud et al., 2004; Parker et al., 2004).

ΙΙ.δ. Νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος

Οι μηχανισμοί νεκρωτικού θανάτου ενεργοποιούνται συνήθως στα κύτταρα ως συνέπεια της επίδρασης ακραίων ερεθισμάτων (Syntichaki and Tavernarakis, 2002). Στον άνθρωπο νέκρωση επάγεται μετά από έκθεση σε τοξίνες, ενεργές ρίζες οξυγόνου και ακραίες θερμοκρασίες, υπό συνθήκες υποξίας και υπογλυκαιμίας, που δημιουργούνται λόγω ισχαιμίας κατά τη διάρκεια εγκεφαλικών επεισοδίων ή γενικότερα απόφραξης αρτηριών, καθώς και μετά από τραυματισμούς. Γνωρίσματα νέκρωσης έχουν περιγραφεί επίσης σε νευροεκφυλιστικά σύνδρομα, όπως η επιληψία, η σκλήρυνση κατά πλάκας και οι ασθένειες του Parkinson, του Alzheimer και του Huntington, σε παρεγκεφαλιδικές αταξίες και σε σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες. Ενώ η απόπτωση είναι μια ενεργός διαδικασία, που απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας και τη σύνθεση πρωτεϊνών που συμμετέχουν αποκλειστικά σε αυτή, η νέκρωση εθεωρείτο έως πρόσφατα μία παθητική χαοτική κατάσταση του κυττάρου, για την οποία υπήρχε περιορισμένος αριθμός δεδομένων. Η ανάγκη για αναθεώρηση αυτής της άποψης προέκυψε κυρίως από μελέτες σε οργανισμούς, όπως νηματώδεις και θηλαστικά, που αποκάλυψαν ομοιότητες στην απόκριση διαφορετικών ιστών σε νεκρωτικά ερεθίσματα, παρέχοντας ενδείξεις για την ύπαρξη ενός κοινού-συντηρημένου μονοπατιού νέκρωσης.

Πρόσφατα, οι ερευνητές Pierre Golstein και Guido Kroemer διατύπωσαν την άποψη ότι ο νεκρωτικός θάνατος μπορεί να είναι προγραμματισμένος, τόσο ως προς την επαγωγή όσο και ως προς το μηχανισμό του (Golstein and Kroemer, 2007). Η συγκεκριμένη θεώρηση στηρίχθηκε σε δεδομένα που περιλαμβάνουν α) τη συμβολή της νέκρωσης στην ομοιόσταση του εντερικού επιθηλίου και στην καταστροφή χονδροκυττάρων κατά την επιμήκυνση των οστών, β) τη συμμετοχή συγκεκριμένων μορίων στην επιτέλεσή της και γ) την ευαισθησία της σε γενετικούς και επιγενετικούς παράγοντες, όπως η ηλικία και ο τύπος του ιστού. Επιπλέον, ως ένδειξη της ύπαρξης προγραμματισμένου νεκρωτικού θανάτου αναφέρεται η επαγωγή νέκρωσης αφενός μέσω ενεργοποίησης μοριακών σηματοδοτικών διαδικασιών, που ξεκινούν από μεμβρανικούς υποδοχείς και αφετέρου, ως εναλλακτικού τρόπου καταστροφής κυττάρων, όταν τόσο η απόπτωση όσο και η αυτοφαγία είναι ελαττωματικές. Εξάλλου, από μία εξελικτική προσέγγιση των διαδικασιών κυτταρικού θανάτου, είναι πιθανό ότι η νέκρωση αποτελεί ένα πρωτόγονο μηχανισμό εκφυλισμού, που δύναται να ενεργοποιηθεί όταν πιο εκλεπτυσμένοι μηχανισμοί δεν είναι πλέον διαθέσιμοι.

ΙΙ.δ1. Η νέκρωση σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα

Νεκρωτικός θάνατος έχει παρατηρηθεί σε ποικίλα πειραματικά μοντέλα μετά από επίδραση διαφορετικών ερεθισμάτων (Golstein and Kroemer, 2007). Καταρχάς, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, νέκρωση είναι δυνατόν να ενεργοποιηθεί σε κύτταρα που δε διαθέτουν άλλους μηχανισμούς θανάτου. Για παράδειγμα, η καταστολή προ-αποπτωτικών παραγόντων ή η υπερ-έκφραση αντι-αποπτωτικών μορίων σε ηπατικά επιθηλιακά κύτταρα υπό συνθήκες υποξίας, οδηγεί σε προγραμματισμένο θάνατο τύπου ΙΙ. Παρεμπόδιση και της αυτοφαγίας στο ίδιο σύστημα επάγει νέκρωση. Παρόμοια, η χορήγηση της ουσίας etoposide σε εμβρυϊκά ινοκύτταρα ποντικού (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs), στα οποία τόσο αποπτωτικά όσο και αυτοφαγικά μονοπάτια έχουν ανασταλεί, οδηγεί σε νεκρωτικό θάνατο. Σε άλλες περιπτώσεις, παρεμπόδιση απλά και μόνο της απόπτωσης είναι δυνατόν να επάγει νέκρωση. Αυτό συμβαίνει κατά την ανάπτυξη των άκρων ποντικών, όπου καταστροφή κυττάρων απαιτείται για τη διαμόρφωση των μεσοδακτύλιων διαστημάτων, καθώς και σε καταστάσεις στις οποίες είναι αδύνατη η ενεργοποίηση κασπασών, λόγω μεγάλης απώλειας ATP ή εξαιτίας της παρουσίας του αναστολέα κασπασών, οξείδιο του αζώτου.

Στο πρώτιστο *Dictyostelium discoideum* αρκεί η παρεμπόδιση της αυτοφαγίας, για να προκληθεί νέκρωση. Κύτταρα του *D. discoideum* υφίστανται νεκρωτική καταστροφή κυρίως μετά από επίδραση αναπτυξιακών ερεθισμάτων σε γενετικό υπόβαθρο όπου η διαδικασία της αυτοφαγίας είναι ελαττωματική. Η χορήγηση του μορφογόνου DIF (Differentiation Inducing Factor) σε καλλιέργειες κυττάρων από στελέχη *D. discoideum* χωρίς λειτουργική αυτοφαγική πρωτεΐνη Atg1, απουσία θρεπτικών συστατικών προκαλεί συγκέντρωση του πυρήνα, μιτοχονδρίων και άλλων κυτταρικών οργανιδίων σε μια κεντρική περιοχή των κυττάρων (Kosta et al., 2004). Τα κύτταρα διογκώνονται και ο θάνατός τους χαρακτηρίζεται από έλλειψη ATP, αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και ακαριαία διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία είναι δυνατόν να καθυστερήσει με προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο (Laporte et al., 2007).

Επιπλέον, σημαντικός αριθμός μελετών όσον αφορά στη νέκρωση έχει διεξαχθεί σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών. Η ενεργοποίηση υποδοχέων θανάτου σε αυτές είναι δυνατόν να επάγει μία μορφή νεκρωτικού θανάτου, που καλείται "νεκρόπτωση" (Yuan, 2006). Οι υποδοχείς θανάτου των οικογενειών Fas και TNF σχηματίζουν διαφορετικά σύμπλοκα, η ενεργοποίηση των οποίων έχει και διαφορετικές επιπτώσεις. Ενεργοποίηση του συμπλόκου Ι, που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες TNF-R1, TRADD, TRAF2 και RIP1 προωθεί την επιβίωση του κυττάρου μέσω της δράσης του παράγοντα NF-κB. Ενεργοποίηση του συμπλόκου ΙΙ των μορίων TRADD, FADD και TRAF2 ενεργοποιεί τις κασπάσες-8 και -10, οι οποίες πρωτεολύουν την πρωτεΐνη RIP1. Αναστέλλεται έτσι η δράση του NF-κB και επάγεται απόπτωση. Παρουσία αναστολέων κασπασών όμως, η δράση της κινάσης της RIP1 προκαλεί

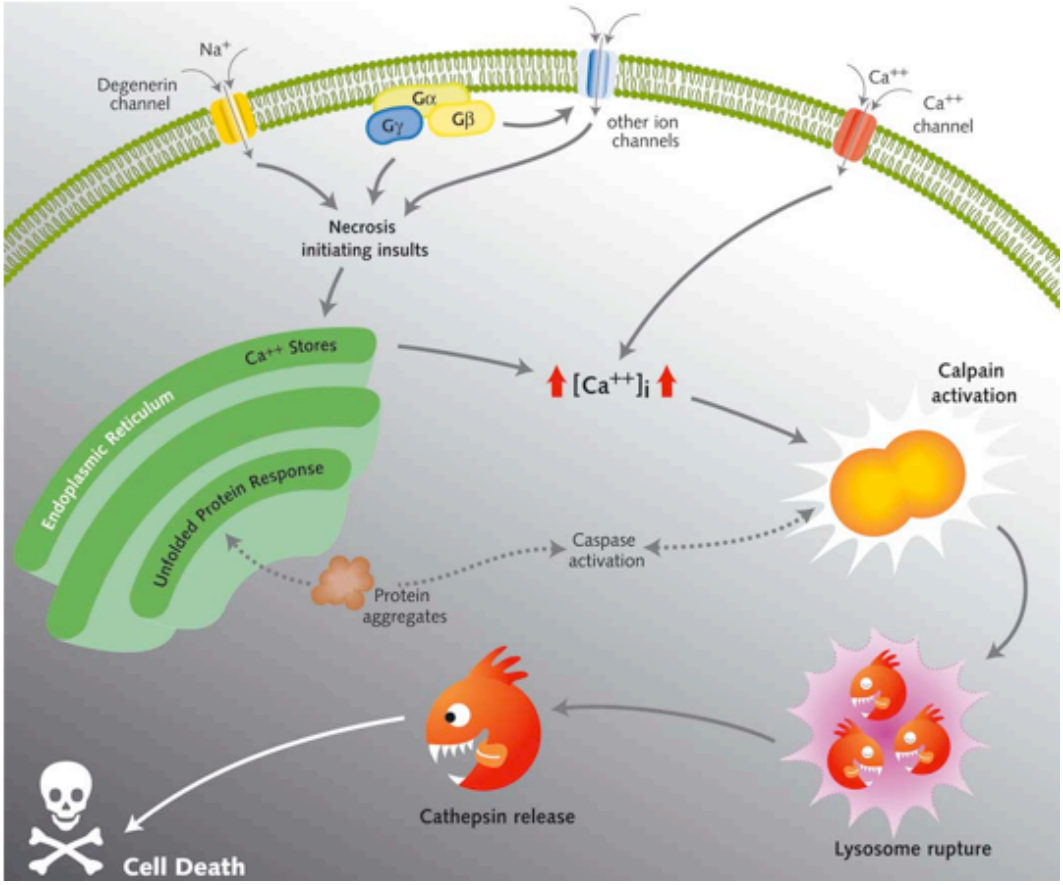
νεκρόπτωση (Degterev et al., 2005). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η επίδραση του παράγοντα TNFα σε ινομυϊκά κύτταρα ποντικού, η οποία οδηγεί σε γενική δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και τελικά νέκρωση (Golstein and Kroemer, 2007). Τα συμπτώματα αυτά αμβλύνονται παρουσία αντιοξειδωτικών ή ροτενόνης, η οποία αναστέλλει τη λειτουργία του συμπλόκου Ι της αναπνευστικής αλυσίδας. Προστατευτική δράση έχει και ο αντι-αποπτωτικός παράγοντας Bcl-2, πιθανά μέσω της γενικότερης επίδρασης του στα μιτοχόνδρια. Η ενεργοποίηση της νέκρωσης από τον TNFα πραγματοποιείται μέσω της επαγώμενης ενδοκύτωσης του υποδοχέα TNF-R1 και της αλληλεπίδρασής του με αλληλουχίες "θανάτου" FADD και απαιτεί τη δράση της κινάσης RIP1. Η RIP1 εμπλέκεται επίσης στη νέκρωση που επάγεται μετά από ενεργοποίηση του μονοπατιού Fas/TNF-R/TRAIL-R ή της πολυμεράσης PARP (Poly (ADP-Ribose) Polymerase), λόγω βλαβών στο DNA (Goll et al., 2003; Ishidoh and Kominami, 2002). Στην τελευταία περίπτωση η RIP1 επιδρά στη δομή και λειτουργία της μεμβράνης των μιτοχονδρίων μέσω ενεργοποίησης της κινάσης JNK. Πρόσφατα διαπιστώθηκε εξάλλου ότι χημική καταστολή της JNK παρεμποδίζει την εκδήλωση χαρακτηριστικών νέκρωσης (παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{2+}) σε μοντέλα υπερδιέγερσης μετασυναπτικών υποδοχέων *in vitro* (Arthur et al., 2007). Άλλα παραδείγματα νεκρόπτωσης αποτελούν η χορήγηση αντιμυκίνης Α σε ηπατικά κύτταρα κουνελιού και αντι-Fas ή άλλων παραγόντων σε σειρές Τ λεμφοκυττάρων ανθρώπου (Golstein and Kroemer, 2007). Χαρακτηριστικό αυτών είναι η απώλεια ATP, ενώ στην περίπτωση των ηπατοκυττάρων παρατηρείται και αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου με επακόλουθη ενεργοποίηση καλπαϊνών. Αυτά τα γεγονότα είναι κοινά στο νεκρωτικό θάνατο κυττάρων του νηματώδους και νευρώνων πρωτευόντων, τα οποία έχουν υποστεί ισχαιμικά επεισόδια.

Μελέτες τόσο σε κυτταρικές σειρές όσο και σε ζωικά μοντέλα *in vivo* υποδεικνύουν επίσης τη συμμετοχή της πρωτεΐνης κυκλοφιλίνη D (cyclophilin D, CypD) σε νεκρωτικούς μηχανισμούς (Baines et al., 2005; Nakagawa et al., 2005). Πρόκειται για μία προπυλ-ισομεράση, που βρίσκεται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων και αλληλεπιδρά με μόρια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, όπως οι μεταφορείς νουκλεοτιδίων. Η CypD απαιτείται για τη νέκρωση που επάγεται από αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ασβεστίου ή ενεργών ριζών οξυγόνου σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων και ινοβλαστών (Baines et al., 2005). Επιπλέον, στελέχη ποντικιών που δε διαθέτουν αυτήν την ενεργότητα είναι πιο ανθεκτικά στα παραπάνω ερεθίσματα, σε τοπικά εγκεφαλικά ισχαιμικά επεισόδια και σε καρδιακό τραυματισμό μετά από ισχαιμία (Nakagawa et al., 2005). Αντίθετα, η έκφραση της CypD σε ποντίκια αρκεί για να προκαλέσει τυχαίο κυτταρικό θάνατο, που συνοδεύεται από διόγκωση των μιτοχονδρίων. Φαίνεται ότι η CypD παίζει ρόλο στην αύξηση

της διαπερατότητας καναλιών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, συμβάλλοντας έτσι στη διατάραξη της διαφοράς δυναμικού σε αυτήν. Στις περισσότερες περιπτώσεις η δράση της είναι ειδική στη νέκρωση, αν και έχει αναφερθεί συμμετοχή της CypD και σε γεγονότα απόπτωσης (Golstein and Kroemer, 2007).

Ο νεκρωτικός θάνατος σε κύτταρα του *C. elegans*, όπως περιγράφεται στη συνέχεια, παρουσιάζει μορφολογικές και μηχανιστικές ομοιότητες με τον πειραματικά επαγώμενο θάνατο λόγω υπερδιέγερσης νευρώνων (excitotoxicity) σε θηλαστικά (Syntichaki and Tavernarakis, 2003). Υπερδιέγερση νευρώνων στον άνθρωπο συμβαίνει κατά τη διάρκεια επιληπτικών κρίσεων ή μετά από ισχαιμικά επεισόδια και τραυματισμό του εγκεφάλου. Η επακόλουθη μείωση των επιπέδων γλυκόζης και οξυγόνου στον εγκέφαλο οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή ενέργειας. Το μεγαλύτερο ποσοστό του ATP που παράγεται στον εγκέφαλο χρησιμοποιείται για τη δημιουργία και διατήρηση συγκεκριμένης κλίσης ιόντων κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης των νευρικών κυττάρων· τα επίπεδα καλίου είναι περίπου 30 φορές υψηλότερα στο εσωτερικό του κυττάρου, ενώ αυτά του νατρίου και του χλωρίου περίπου 7 φορές. Αντίθετα ο μεσοκυττάριος χώρος φέρει περίπου 10000 φορές υψηλότερη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου (Kristian, 2004). Υπό συνθήκες έλλειψης ενέργειας οι αντλίες της προσυναπτικής μεμβράνης, που είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της ιοντικής ισορροπίας, υπολειτουργούν με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη εκπόλωση του νευρικού κυττάρου και την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή. Η απώλεια ενέργειας επιδρά επίσης στην ικανότητα των προσυναπτικών νευρώνων και των γειτονικών κυττάρων γλοίας να επαναπροσλαμβάνουν και να απομακρύνουν το νευροδιαβιβαστή από το συναπτικό χάσμα. Η παρατεταμένη παραμονή νευροδιαβιβαστών μπορεί να προκαλέσει υπερ-διέγερση υποδοχέων της μετα-συναπτικής μεμβράνης. Το γλουταμινικό οξύ είναι ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής στο κεντρικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών. Αυξημένη συγκέντρωσή του στο συναπτικό χάσμα προκαλεί ενεργοποίηση μετα-συναπτικών υποδοχέων NMDA και AMPA, με άμεση συνέπεια την αύξηση της διαπερατότητας της μετασυναπτικής μεμβράνης σε ιόντα νατρίου, χλωρίου και ασβεστίου (Sattler and Tymianski, 2000). Δευτερογενώς αυξάνεται και η διαπερατότητα τασεο-ελεγχόμενων καναλιών ασβεστίου (Choi, 1992). Η επακόλουθη ενεργοποίηση καλπαϊνών από ιόντα Ca^{2+} συμβάλλει στην περαιτέρω αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης αυτών, μέσω πρωτεολυτικής τροποποίησης μεμβρανικών υποδοχέων γλουταμινικού (Xu et al., 2007). Η διατάραξη της ομοιόστασης του ασβεστίου επηρεάζει ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες και είναι τοξική. Μάλιστα, φαίνεται ότι παίζει ρόλο σε διαφορετικές μορφές θανάτου. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι αντλίες ανταλλαγής ιόντων Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) διασπώνται από κασπάσες σε νευρώνες που υφίστανται αποπτωτικό θάνατο (Bano et al., 2007).

Μελέτες του θανάτου νευρώνων ιπποκάμπου πρωτευόντων μετά από πρόκληση γενικευμένων ισχαιμικών επεισοδίων έχουν οδηγήσει στη διατύπωση της "υπόθεσης καλπαϊνών-καθεψινών", προκειμένου να ερμηνευτούν οι μηχανισμοί της νέκρωσης (Εικ. **6**) (Yamashima, 2000). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η άνοδος των επιπέδων του ενδοκυτταρικού ασβεστίου επάγει την ενεργοποίηση καλπαϊνών τύπου "μ", με αποτέλεσμα την πρόσδεσή τους στη μεμβράνη των λυσοσωμάτων. Η παρατεταμένη δράση των καλπαϊνών σε συνδυασμό με την αυξημένη συγκέντρωση ενεργών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) οδηγούν πιθανά σε εκτεταμένη διάρρηξη της λυσοσωμικής μεμβράνης. Άμεση συνέπεια είναι η απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων και η ανεξέλεγκτη αποδόμηση κυτταρικών συστατικών, η οποία θεωρείται η βασική αιτία καταστροφής των κυττάρων. Οι λυσοσωμικές υδρολάσες μπορούν να ενεργοποιήσουν δευτερογενώς και άλλα αποδομητικά ένζυμα, όπως οι κασπάσες (Syntichaki and Tavernarakis, 2002).



Εικόνα 6. Μοντέλο νεκρωτικού θανάτου με βάση την υπόθεση "καλπαϊνών-καθεψινών" (Syntichaki and Tavernarakis, 2003).

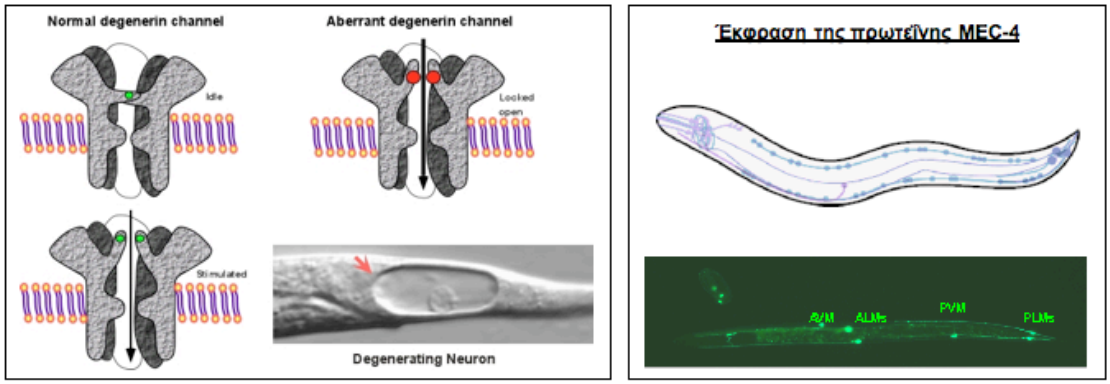
Η "υπόθεση καλπαϊνών-καθεψινών" επιβεβαιώνεται από πληθώρα παρατηρήσεων (Yamashima, 2000; Yoshida et al., 2002). Η επίδραση υποξίας και υπογλυκαιμίας σε τομές ιπποκάμπου καθώς και η υπερενεργοποίηση υποδοχέων NMDA, προκαλούν άνοδο των ενδοκυτταρικών επιπέδων ασβεστίου. Γενικευμένη εγκεφαλική ισχαιμία σε πιθήκους οδηγεί σε ενεργοποίηση καλπαϊνών-μ ειδικά σε νευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου, ενώ περίπου 72 ώρες αργότερα διαπιστώνεται απελευθέρωση καθεψινών B και L στο κυτταρόπλασμα. Οι καλπαΐνες εντοπίζονται τότε σε μεμβράνες ακέραιων ή διερρηγμένων λυσοσωμάτων. Σχετικά δεδομένα έχουν προκύψει και από πειράματα σε νηματώδεις. Η εμπλοκή του οξειδωτικού σοκ στη νέκρωση έχει δειχθεί κατά την επαγωγή υποξίας-ισχαιμίας σε νεογέννητους χοίρους (Martin et al., 2000). Στο μοντέλο αυτό παρατηρείται μείωση των επιπέδων γλουταθιόνης σε πολύ πρώιμα στάδια, με αποτέλεσμα την οξείδωση μεμβρανών, κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων και την πρόκληση βλαβών στα περισσότερα κυτταρικά οργανίδια (λυσοσώματα, σύστημα Golgi, αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και μιτοχόνδρια). Η ακόλουθη καταστροφή νευρώνων του ραβδωτού παρουσιάζει μορφολογικά χαρακτηριστικά νέκρωσης.

Συνοπτικά λοιπόν, ο νεκρωτικός θάνατος περιλαμβάνει γνωρίσματα, όπως πρώιμη απώλεια λειτουργίας των μιτοχονδρίων με συνέπεια την παραγωγή ROS και τη μείωση των ενεργειακών επιπέδων του κυττάρου, διατάραξη της ομοιόστασης του ασβεστίου, συγκέντρωση οργανιδίων γύρω από τον πυρήνα, ενεργοποίηση πρωτεασών ανάμεσα στις οποίες κεντρικό ρόλο έχουν οι καλπαΐνες και οι καθεψίνες, διάρρηξη των λυσοσωμάτων και τελικά της πλασματικής μεμβράνης. Τα περισσότερα από αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν παρατηρηθεί και μελετηθεί διεξοδικά κατά τη νέκρωση κυττάρων του *C. elegans*.

ΙΙ.δ2. Η νέκρωση στο *C. elegans*

Νέκρωση είναι δυνατόν να επαχθεί σε νηματώδεις από ποικίλα γενετικά και περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Η υπερ-ενεργοποίηση ιοντικών καναλιών της οικογένειας "Degenerin" (DEG) αποτελούν ένα από τα κύρια γενετικά ερεθίσματα (Εικ. **7**) (Syntichaki and Tavernarakis, 2003). Οι αμινοξικές αλληλουχίες των μελών αυτής της οικογένειες εμφανίζουν ομοιότητες με τις πρωτεΐνες Ripped Pocket (RPK) και Pick Pocket (PPK) της Drosophila και με υπομονάδες καναλιών νατρίου, ευαίσθητων στην ουσία amiloride (epithelial sodium channels, ENaCs), σε επιθηλιακά κύτταρα θηλαστικών (Tavernarakis and Driscoll, 2001). Αντικατάσταση ενός αμινοξέος μικρού όγκου στην περιοχή του πόρου του καναλιού από ένα αμινοξύ με μεγαλύτερη πλευρική αλυσίδα παρεμποδίζει το αποτελεσματικό κλείσιμο του καναλιού, με αποτέλεσμα να παραμένει συνεχώς ανοιχτό, διαταράσσοντας την ιοντική ισορροπία του κυττάρου. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα

του γονιδίου *mec-4*, που κωδικοποιεί μία υπομονάδα ενός καναλιού Degenerin (Driscoll and Chalfie, 1991). Συμμετέχει στην αντίληψη μηχανικών ερεθισμάτων κι εκφράζεται σε έξι αισθητήριους νευρώνες του *C. elegans*· στους δύο PLMs και τον PVM στην ουρά και στους δύο ALMs και τον AVM προς το κέντρο του σώματος (Εικ. **7**). Επικρατής μεταλλαγή που οδηγεί σε αντικατάσταση μίας βαλίνης στον πόρο του καναλιού από αλανίνη (V173A), προκαλεί ανεξέλεγκτη εισροή ιόντων Na^+ και Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα και τελικά το θάνατο των συγκεκριμένων κυττάρων (Bianchi et al., 2004). Οι νευρώνες της ουράς είναι πιο ευαίσθητοι δεδομένου ότι εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα της τοξικής πρωτεΐνης. Ανάλογα, το επικρατές αλληλόμορφο *u38* του γονιδίου που κωδικοποιεί το μεμβρανικό υποδοχέα DEG-1 επάγει καθυστερημένο εκφυλισμό ορισμένων ενδιάμεσων νευρώνων στο οπίσθιο τμήμα των ζώων (Chalfie and Wolinsky, 1990), ενώ ημι-επικρατείς μεταλλαγές στα γονίδια *unc-8* και *unc-105* οδηγούν αντίστοιχα σε δυσλειτουργία της κοιλιακής νευρικής χορδής και σε υπερβολική σύσπαση των σωματικών μυών (Tavernarakis et al., 1997). Τοξικά αλληλόμορφα έχουν περιγραφεί επίσης για το γονίδιο *mec-10*, που ανήκει στην ίδια οικογένεια (Huang and Chalfie, 1994). Μεταλλαγές που επηρεάζουν την έκφραση ή λειτουργία των Degenerins, όπως αυτή στο γονίδιο *mec-6*, έχει δειχθεί ότι καταστέλλουν και το νεκρωτικό θάνατο που επάγεται από τις Degenerins (Chalfie and Wolinsky, 1990). Η MEC-6 είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τη MEC-4, ρυθμίζοντας πιθανότατα τη λειτουργία της τελευταίας. Παρόμοια με ό,τι συμβαίνει σε νηματώδεις, εκφυλισμός επάγεται και σε ωοκύτταρα *Xenopus* ή σε ηπατικά κύτταρα hamster που εκφράζουν υπερενεργές πρωτεΐνες θηλαστικών ομόλογες με τις Degenerins (Waldmann et al., 1996).



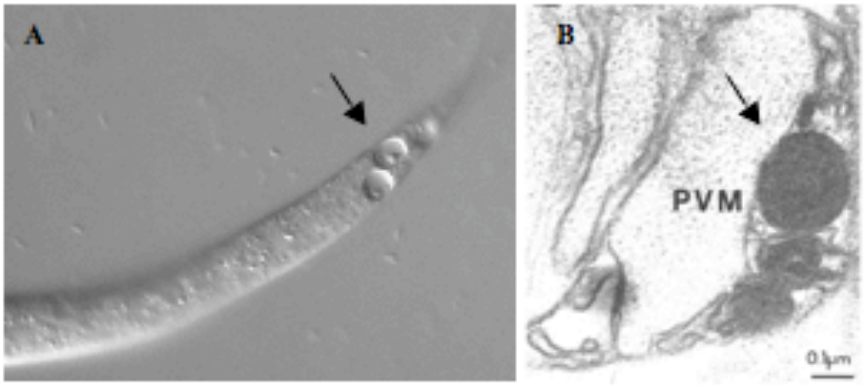
Εικόνα 7. Ιοντικά κανάλια και νευροεκφυλισμός στο *C. elegans*

(www.imbb.forth.gr/worms, www.wormbase.org).

Νέκρωση μπορεί να προκληθεί ακόμα από τη συνεχή δραστηριότητα καναλιών, τα οποία δεν ανήκουν στην οικογένεια των Degenerins. Ένα από αυτά είναι και το κανάλι ασβεστίου, το οποίο σχηματίζεται από τις υπομονάδες DEG-3 και DES-2 σε ορισμένους ενδιάμεσους κι αισθητήριους νευρώνες (Treinin and Chalfie, 1995). Πρόκειται για ένα νικοτινικό υποδοχέα ακετυλοχολίνης και η DEG-3 είναι η υπομονάδα α αυτού. Το επικρατές αλληλόμορφο *deg-3(u662)* οδηγεί σε δημιουργία καναλιών που παραμένουν διαρκώς ανοιχτά, με αποτέλεσμα την υπερβολική είσοδο ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα και την επαγωγή νέκρωσης. Ταυτόχρονη δυσλειτουργία της υπομονάδας DES-2 προστατεύει μερικώς τα κύτταρα. Οι ετεροτριμερείς πρωτεΐνες G εδράζονται στην κυτταρική μεμβράνη και μεταξύ άλλων συμμετέχουν στη ρύθμιση της δραστηριότητας καναλιών ιόντων. Αποτελούνται από τις υπομονάδες “α”, “β” και “γ”. Η υπομονάδα α διαθέτει ενεργότητα GTPάσης και στο *C. elegans* κωδικοποιείται από το γονίδιο *gsa-1*. Μεταλλαγές που παρεμποδίζουν την υδρόλυση και αποδέσμευση του GTP από αυτή καθιστούν τις πρωτεΐνες G υπερ-ενεργές. Η έκφραση υπερ-ενεργών μορφών της υπομονάδας α, που προέρχονται είτε από το *C. elegans* ή από αρουραίους, σε νηματώδεις προκαλεί νέκρωση των κυττάρων που τις εκφράζουν (Berger et al., 1998; Korswagen et al., 1997). Ο θάνατος σε αυτήν την περίπτωση απαιτεί τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης ACY-1, που παράγει και χρησιμοποιεί κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) ως σηματοδοτικό μόριο. Πιθανότατα το μόριο cAMP ρυθμίζει τη δραστηριότητα καναλιών και μεταφορέων ιόντων. Επιπλέον, μορφολογία νεκρωτικού θανάτου σε νηματώδεις έχει παρατηρηθεί μετά από έκφραση μορφών του ιοντο-τροπικού υποδοχέα γλουταμινικού GLR-2, οι οποίες φέρουν μία αργινίνη στην περιοχή του πόρου (GLR-2(R)) (Aronoff et al., 2004). Αυτές συνδυάζονται με μορφές άγριου τύπου (GLR-2(Q)), που φέρουν γλουταμίνη στην αντίστοιχη περιοχή, σχηματίζοντας υβριδικά κανάλια (GLR-2(Q/R)) με μειωμένη διαπερατότητα σε ιόντα ασβεστίου.

Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες νευρώνων από στελέχη *mec-4(d)* αποκαλύπτουν μια σειρά μορφολογικών αλλαγών κατά τη νέκρωση (Hall et al., 1997). Το σώμα του νευρώνα παραμορφώνεται. Στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης σχηματίζονται μικρές πυκνές μεμβρανικές δίνες άγνωστης σύστασης και προέλευσης, οι οποίες στη συνέχεια συντήκονται κι εσωτερικεύονται, δημιουργώντας ηλεκτρονιόπυκνες δομές κοντά στην πυρηνική μεμβράνη (Εικ. **8**). Παρόμοιες σπειροειδείς δομές έχουν παρατηρηθεί και στα στελέχη ποντικιών MND (Motor Neuron Degeneration) και wobbler (*wr*/*wr*). Το στέλεχος *mnd/mnd* παρουσάζει παθολογία πολύ όμοια με την ασθένεια neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs) στον άνθρωπο, ενώ το στέλεχος wobbler εκδηλώνει εκφυλισμό των κινητικών νευρώνων της σπονδυλικής στήλης, όπως οι ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας (Blondet et al., 2002; Cooper et al., 1999). Επιπλέον, κατά τη νέκρωση στο *C. elegans* εμφανίζονται κυστίδια στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων, ενώ στον πυρήνα η χρωματίνη δημιουργεί

συσσωματώματα (Hall et al., 1997). Προοδευτικά επέρχεται λύση ενδοκυτταρικών οργανιδίων και διόγκωση του κυτταροπλάσματος.



Εικόνα 8. (A) Φωτογραφία προνύμφης L1 στελέχους mec-4(d), στην οποία τα νεκρωτικά πτώματα των νευρώνων PVM και PLM της ουράς φαίνονται σαν κενά κυστίδια-κενοτόπια (βέλος). (B) Ηλεκτρονική μικροφωτογραφία νευρικού κυττάρου σε πρώιμα στάδια νέκρωσης (Hall et al., 1997). Μεμβρανικές δίνες (βέλος) σχηματίζονται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης.

Πειραματικές μελέτες σε νηματώδεις έχουν οδηγήσει στην αποκάλυψη ποικίλων παραγόντων που συντελούν στη νέκρωση. Κεντρικό γεγονός αποτελεί η αύξηση των επιπέδων του κυτταροπλασματικού ασβεστίου. Τα ιόντα Ca^{2+} προέρχονται είτε από τον εξωκυτταρικό χώρο μέσω τασεο-ελεγχόμενων καναλιών και καναλιών ανταλλαγής ιόντων Ca^{2+}/Na^{+}, ή από ενδοκυτταρικές αποθήκες, κύρια από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) αλλά και από τα μιτοχόνδρια (Xu et al., 2001). Ο ρόλος του ΕΔ έχει δειχθεί σε στελέχη με μεταλλαγές στα γονίδια *unc-68*, *itr-1* ή *crt-1* και σε ζώα, στα οποία έχει κατασταλεί το γονίδιο *cnx-1*. Τα *unc-68* και *itr-1* κωδικοποιούν τον υποδοχέα ρυανοδίνης (Ryanodine Receptor, RyR) και τριφωσφορικής ινοσιτόλης (inositol-1,4,5-triphosphate receptor, $Ins(1,4,5)P_3R$) αντίστοιχα, που σχηματίζουν κανάλια υπεύθυνα για την έξοδο ασβεστίου από το ΕΔ. Τα *cnx-1* και *crt-1* κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες-chaperones, calnexin και calreticulin αντίστοιχα, που προσδένουν και συγκρατούν ιόντα Ca^{2+} στο ΕΔ. Δυσλειτουργία αυτών των μορίων προσφέρει ανθεκτικότητα στη νέκρωση (Xu et al., 2001). Αν και οι calnexin και calreticulin είναι πιθανό να επηρεάζουν την αναδίπλωση και στερεοδιάταξη της MEC-4, είναι γνωστό ότι η calreticulin έχει επίσης ρόλο κεντρικού ρυθμιστή της ομοιόστασης του ασβεστίου στο ΕΔ. Η είσοδος ιόντων Ca^{2+} στο ΕΔ παρεμποδίζεται από τη χημική ουσία thapsigargin, που αναστέλλει τη δράση της αντλίας SERCA (Sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase). Χορήγηση thapsigargin σε νηματώδεις επάγει νεκρωτικό θάνατο, προκαλώντας αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού ασβεστίου. Η έξοδος

ιόντων Ca^{2+} από το ΕΔ έχει θεωρηθεί ως η βασική αιτία καταστροφής νευρικών κυττάρων που εκφράζουν τους υβριδικούς υποδοχείς GLR-2(Q/R) (Aronoff et al., 2004).

Το μοριακό σηματοδοτικό μονοπάτι νέκρωσης, που ξεκινά από την αύξηση των επιπέδων του κυτταροπλασματικού Ca^{2+}, περιλαμβάνει τη δράση πρωτεασών, όπως οι καλπαΐνες και οι πρωτεάσες ασπαρτικού. Στο *C. elegans* έχει δειχθεί συγκεκριμένα η συμμετοχή των καλπαϊνών CLP-1 και TRA-3 και των πρωτεασών ασπαρτικού ASP-3 και ASP-4 (Syntichaki et al., 2002). Οι πρωτεάσες ασπαρτικού είναι υδρολυτικά ένζυμα που μπορούν δράσουν εσωτερικά κι εξωτερικά του κυττάρου και περιλαμβάνουν χυμοσίνες, πεψίνες, ρενίνες και τις καθεψίνες D και E (Samara and Tavernarakis, 2003). Η δράση τους κατά τη νέκρωση έπεται αυτής των καλπαϊνών (Syntichaki et al., 2002). Λυσοσωμικά υδρολυτικά ένζυμα, όπως οι μη ειδικές πρωτεάσες "καθεψίνες" συμμετέχουν επίσης στην καταστροφή καρδιακών κι εγκεφαλικών κυττάρων μετά από τραυματικά ισχαιμικά επεισόδια (Adamec et al., 2000). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο νευροεκφυλισμός που επάγεται από το αλληλόμορφο *mec-4(d)* δεν εξαρτάται από τη δράση αποπτωτικών πρωτεασών, όπως η κασπάση CED-3, αλλά ούτε και από άλλους παράγοντες απόπτωσης, όπως ο CED-4 (Chung et al., 2000).

Νέκρωση είναι δυνατόν να επαχθεί και από περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως η χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου (Scott et al., 2002). Συνθήκες υποξίας σε νηματώδεις μπορούν να δημιουργηθούν με επώασή τους είτε σε θαλάμους διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) ή σε διαλύματα αναστολέων της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Για παράδειγμα, το αζίδιο του νατρίου (NaN_3) εμποδίζει την ενεργότητα της κυτοχρωμικής οξειδάσης c. Η επακόλουθη μείωση των επιπέδων του ενεργειακού μορίου ATP επηρεάζει τη βιωσιμότητα των ζώων. Μορφολογία νέκρωσης παρατηρείται κυρίως στο φάρυγγα, στους μύες του σωματικού τοιχώματος και στις γονάδες. Η ευαισθησία σε συνθήκες υποξίας επηρεάζεται από τη λειτουργία του υποδοχέα ινσουλίνης DAF-2, των κινασών AKT-1 και PDK-1 και του μεταγραφικού παράγοντα DAF-16. Τα μόρια αυτά δρουν στο ίδιο μοριακό μονοπάτι. Έτσι, στελέχη νηματωδών με μεταλλαγές στην περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη ή στην ενδοκυτταρική περιοχή του DAF-2, η οποία διαθέτει ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, είναι πιο ανθεκτικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Η ανθεκτικότητα των νηματωδών στην υποξία ελέγχεται ακόμα από τα κανάλια καλίου (K^+) SLO-2, τα οποία ενεργοποιούνται από ιόντα νατρίου (Yan et al., 2006). Μεταλλαγές σε αυτά αυξάνουν την ευαισθησία στην υποξία.

Μεγάλος αριθμός κενοτοπίων-κυστιδίων έχει παρατηρηθεί σε γονάδες μετά από έκθεση των πολυδύναμων πρόδρομων κυττάρων τους (VPCs, vulva precursor cells) σε ιονίζουσα ακτινοβολία (Weidhaas et al., 2006). Αυτά τα κενοτόπια αντιπροσωπεύουν πιθανότατα υπολείμματα των μετα-μιτωτικών πρόδρομων κυττάρων της γονάδας, που έχουν εκφυλιστεί με νέκρωση. Εξάλλου, έχει διαπιστωθεί ότι ο κυτταρικός θάνατος σε αυτήν την

περίπτωση δε συντελείται με απόπτωση. Επιπλέον, επιδεινώνεται σε ζώα στα οποία ο μηχανισμός απόκρισης σε βλάβες του DNA είναι ελαττωματικός. Έχει προταθεί η χρήση αυτού του πειραματικού μοντέλου (το οποίο έχει ονομαστεί "Radelegans") για τη μελέτη *in vivo* των μηχανισμών κυτταροτοξικότητας και του τρόπου απόκρισης των ιστών, μετά από επίδραση ακτινοβολίας, η οποία χρησιμοποιείται ως θεραπευτικό μέσο για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

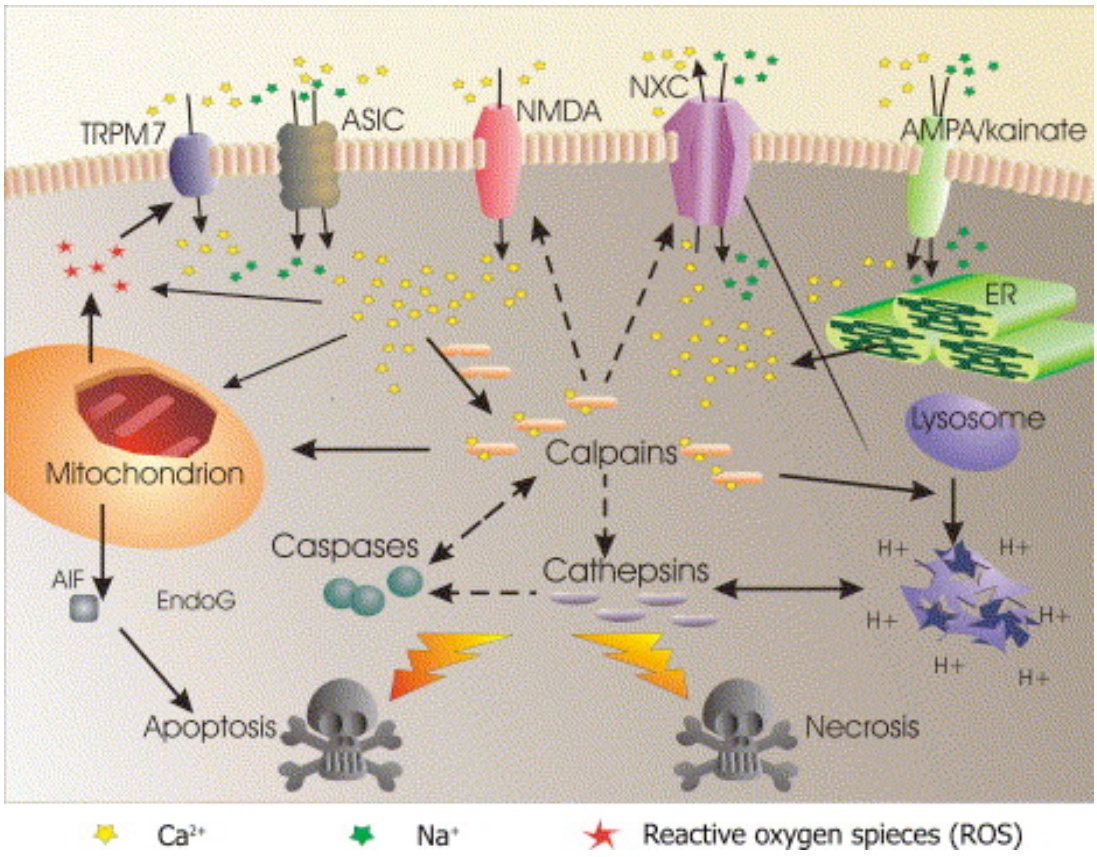
ΙΙ.ε. Αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών μηχανισμών κυτταρικού θανάτου

Αν και η διάκριση των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου σε τρεις κύριες μορφές διευκολύνει τόσο την περιγραφή όσο και τη μελέτη των διαδικασιών κυτταροτοξικότητας, ωστόσο δεν είναι πάντα σαφής. Υπάρχουν καταστάσεις, στις οποίες η κατηγοριοποίηση "απόπτωση-αυτοφαγία-νέκρωση" δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί, είτε γιατί δεν εμφανίζουν κανένα από τα βασικά γνωρίσματα που αναφέρθηκαν, είτε επειδή παρουσιάζουν ανάμικτα χαρακτηριστικά. Ο θάνατος του "συνδετικού" κυττάρου στο *C. elegans* αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα, αφού δεν εξαρτάται από μόρια που έχουν θεωρηθεί απαραίτητα για την επιτέλεση των γνωστών τύπων θανάτου. Σε άλλες περιπτώσεις παρατηρείται ανάμιξη γνωρισμάτων νέκρωσης, απόπτωσης και αυτοφαγίας. Η "παράπτωση", που έχει περιγραφεί κατά τη σκλήρυνση κατά πλάκας, χαρακτηρίζεται από την παρουσία κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα και την ενεργοποίηση αποπτωτικών διαδικασιών, χωρίς ωστόσο συμπύκνωση χρωματίνης (Yamashima, 2004). Συνδυασμός μορφολογικών χαρακτηριστικών εκδηλώνεται επίσης σε αρουραίους, που έχουν υποστεί ισχαιμία του εγκεφαλικού φλοιού, καθώς και σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων αρουραίων υπό συνθήκες υποξίας ή περίσσειας γλουταμινικού οξέος (Niquet et al., 2006a; Niquet et al., 2006b; Wei et al., 2004). Ερεθίσματα που προκαλούν υπερ-διέγερση μετα-συναπτικών υποδοχέων είναι ικανά να επάγουν όλες τις κύριες μορφές κυτταρικού θανάτου. Ένα συνεχές φάσμα χαρακτηριστικών μεταξύ απόπτωσης-νέκρωσης και απόπτωσης-αυτοφαγικού θανάτου εκδηλώνεται μετά από χορήγηση καϊνικού οξέος στον πρόσθιο εγκέφαλο νεογέννητων αρουραίων ή περίσσειας γλουταμικού στο ραβδωτό σώμα ενήλικων ζώων και σε οργανοτυπικές καλλιέργειες κινητικών νευρώνων της σπονδυλικής τους στήλης (Matyja et al., 2005; Portera-Cailliau et al., 1997). Επιπλέον, παροδική ισχαιμία στο ραβδωτό σώμα αυτών των ζώων επάγει νέκρωση στον πυρήνα της περιοχής όπου έχει επιδράσει το ερέθισμα, προγραμματισμένο θάνατο τύπου ΙΙ στο χώρο που περιβάλλει την ισχαιμική "εστία" και απόπτωση στην περιφέρεια (Aggoun-Zouaoui et al., 1998). Παρόμοιο πρότυπο, με νεκρωτικό θάνατο στον ισχαιμικό πυρήνα και καθυστερημένη απόπτωση στην περιφέρεια, έχει διαπιστωθεί και στο ήπαρ αρουραίων (Eum et al., 2007). Σε επεισόδια ολικής ισχαιμίας η έναρξη του αποπτωτικού προγράμματος στα κύτταρα ακολουθείται πιθανά από επαγωγή δευτερογενούς νέκρωσης

(Kristian, 2004). Γενικότερα, θεωρείται ότι όταν τα επίπεδα ενέργειας μειώνονται σημαντικά, κύτταρα που έχουν ήδη ενεργοποιήσει αποπτωτικές διαδικασίες υφίστανται τελικά νέκρωση. Έτσι, είναι δυνατόν να επαχθεί νέκρωση από τυπικά αποπτωτικά ερεθίσματα. Η ένταση του ερεθίσματος παίζει συχνά σημαντικό ρόλο. Τα ιόντα Zn^{2+}, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους, μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση ή νέκρωση σε καλλιέργειες νευρώνων και κυττάρων γλοίας ποντικού (Lobner et al., 2000). Άλλο παράδειγμα συνιστά η επίδραση ολιγομυκίνης Α σε καλλιέργειες κυττάρων εντόμων. Το αντιβιοτικό αυτό αναστέλλει τη δράση της μιτοχονδριακής συνθετάσης ATP, επάγοντας ποικιλία κυτταρικών αποκρίσεων, όπως υπερβολική αυτοφαγία, απόπτωση ή όγκωση, η οποία χαρακτηρίζεται από διόγκωση του κυττάρου, σχηματισμό κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα και αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης (Tettamanti et al., 2006).

Η έλλειψη σαφούς διαχωρισμού μεταξύ των μορφών θανάτου μπορεί να αποδοθεί στην εκτεταμένη αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων διαφόρων μονοπατιών (Εικ. **9**). Έτσι, οι κασπάσες μπορούν να επηρεάσουν την ομοιόσταση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου, διασπώντας μεμβρανικές αντλίες ασβεστίου όπως τα κανάλια ανταλλαγής ιόντων Na^+/Ca^{2+} NCX, ενώ η κασπάση-3 επάγει έμμεσα ενεργοποίηση καλπαϊνών καταστέλλοντας τη δράση ενός αναστολέα αυτών, της καλπαστατίνης (Bano et al., 2007; Yamashima, 2004). Η κασπάση-3 μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί από καθεψίνες. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι ενεργοποιημένη κασπάση-9 μπορεί να προκαλέσει αύξηση της διαπερατότητας της λυσοσωμικής μεμβράνης κι επακόλουθη απελευθέρωση καθεψινών σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού μετά από χορήγηση του παράγοντα TNF (Gyrd-Hansen et al., 2006). Και η διάρρηξη των λυσοσωμάτων όμως είναι δυνατόν να οδηγήσει σε απόπτωση ή νέκρωση ανάλογα με την ένταση του ερεθίσματος και το βαθμό απελευθέρωσης υδρολυτικών ενζύμων. Η δράση της καθεψίνης D μπορεί να συμβάλλει στην ενεργοποίηση κασπασών και στην αλλαγή της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, όπως συμβαίνει μετά από επίδραση οξειδωτικού στρες σε παγκρεατικά και νευρικά βλαστικά κύτταρα (Baumgartner et al., 2007; Castino et al., 2007).

Είναι λοιπόν φανερό ότι δεν υπάρχει απόλυτη διάκριση μεταξύ μορφών κυτταρικού θανάτου και ο διαχωρισμός τους αποτελεί στην πραγματικότητα σύμβαση, προκειμένου να διευκολυνθουν οι ερευνητικές προσπάθειες. Ο ακριβής τρόπος καταστροφής κάθε κυττάρου εξαρτάται από τον τύπο του ιστού, τη φυσιολογική και μεταβολική κατάσταση του κυττάρου τη στιγμή που δέχεται το ερέθισμα, το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται, καθώς και από το είδος, την ένταση και το συνδυασμό των ερεθισμάτων. Έχει διατυπωθεί μάλιστα η άποψη ότι υπάρχει ένα βασικό πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου που περιλαμβάνει διάφορα μοριακά μονοπάτια-υποπρογράμματα και η επιλογή των εκτελεστικών διαδικασιών είναι αυτή που καθορίζει τη μορφολογική έκφανση σε κάθε περίπτωση (Nicotera et al., 1999).



Εικόνα 9. Αλληλεπίδραση μεταξύ αποπτωτικών και νεκρωτικών μηχανισμών (www.imbb.forth.gr/worms)**.**

III. Μηχανισμοί Ομοιόστασης του pH στα Κύτταρα

Η ευαισθησία ποικίλων κυτταρικών αντιδράσεων και διαδικασιών στις συνθήκες οξύτητας του μικρο-περιβάλλοντος όπου επιτελούνται, καθιστά απαραίτητη την ύπαρξη μηχανισμών ρύθμισης της ομοιόστασης του pH στα κύτταρα. Με τη δράση αυτών επιτυγχάνεται η διατήρηση ενός σχετικά ουδέτερου περιβάλλοντος στο κυτταρόπλασμα (pH περίπου 7.2), στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο μεγαλύτερο μέρος του συστήματος Golgi, ενώ δημιουργούνται και διατηρούνται όξινες συνθήκες στο εσωτερικό συγκεκριμένων οργανιδίων, όπως ώριμα ενδοσώματα και λυσοσώματα (Stevens and Forgac, 1997). Οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί είναι κυρίως παθητικοί, αλλά ενισχύονται από μηχανισμούς που καταναλώνουν ενέργεια. Παθητική ρύθμιση επιτελείται μέσω δέσμευσης και αποδέσμευσης πρωτονίων από ρυθμιστικά μόρια (Lodish, 2000). Αυτά περιλαμβάνουν ανόργανες χημικές ουσίες, όπως το φωσφορικό οξύ (H_3PO_4) και το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) και οργανικές. Οργανικές ενώσεις με ρυθμιστικές ικανότητες είναι τα ελεύθερα αμινοξέα, αμινοξέα πολυπεπτιδικών αλυσίδων με βασικές (λυσίνη, αργινίνη, ιστιδίνη) ή όξινες (γλουταμινικό, ασπαρτικό) πλευρικές αλυσίδες και προϊόντα μεταβολικών αντιδράσεων, όπως το γαλακτικό, το οξικό και το κιτρικό οξύ (Syntichaki and Tavernarakis, 2003). Η ενεργητική ρύθμιση του pH στηρίζεται στη λειτουργία μεμβρανικών αντλιών-καναλιών, που συνδυάζουν τη μεταφορά πρωτονίων είτε με τη διάσπαση ATP (κυστιδιακές ATPάσες πρωτονίων), είτε με την αντίθετη μεταφορά ιόντων Na^+ ή/και K^+ (κανάλια NHX σε νηματώδεις ή NHE σε θηλαστικά) (Putney et al., 2002; Stevens and Forgac, 1997). Εξαρτώμενη από Na^+ είναι επίσης η ανταλλαγή των ρυθμιστικών ιόντων HCO_3^- και Cl^-. Τόσο σε ασπόνδυλα όσο και σε θηλαστικά συμβαίνει έξοδος ιόντων χλωρίου, που συνοδεύεται από συνδυασμένη είσοδο ιόντων νατρίου και όξινων ανθρακικών ανιόντων (L'Allemain et al., 1985).

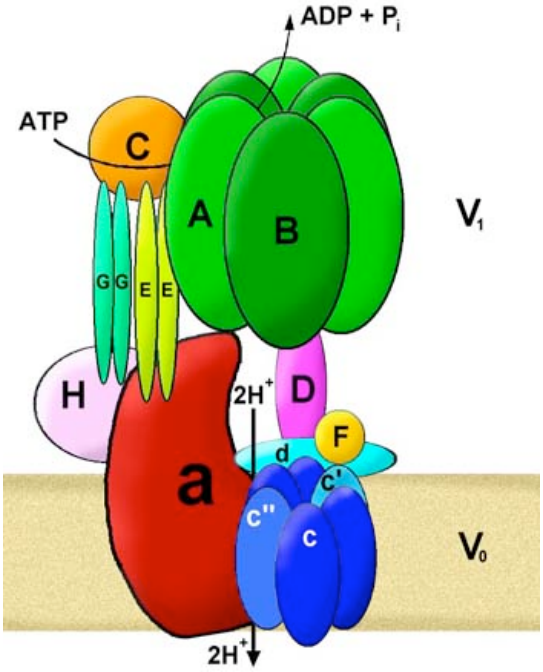
Η συμμετοχή των ενεργητικών μηχανισμών ομοιόστασης του pH στο νεκρωτικό θάνατο αποτέλεσε αντικείμενο διερεύνησης στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Θεωρήθηκε συνεπώς απαραίτητη η αναφορά ορισμένων στοιχείων σχετικά με τη λειτουργία των V-ATPασών και των καναλιών NHX, με στόχο την πληρέστερη κατανόηση των πειραματικών προσεγγίσεων που εφαρμόστηκαν, καθώς και της ερμηνείας των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν.

III.α. Κυστιδιακές ATPάσες πρωτονίων

Οι κυστιδιακές ATPάσες πρωτονίων (vacuolar (H^+)-ATPases ή V-ATPases) είναι αντλίες, οι οποίες χρησιμοποιούν την ενέργεια που απελευθερώνεται από την υδρόλυση ATP, για να μεταφέρουν πρωτόνια αντίθετα από την κλίση συγκέντρωσής τους (Stevens and Forgac, 1997). Ανιχνεύθηκαν αρχικά στην επιφάνεια συναπτικών κυστιδίων, γεγονός στο

οποίο οφείλεται και ο χαρακτηρισμός τους ως "κυστιδιακές". Εντοπίζονται ωστόσο και σε άλλες ενδοκυτταρικές μεμβράνες, όπως κυστίδια που περιβάλλονται από κλαθρίνη, ενδοσώματα, λυσοσώματα, κυστίδια προερχόμενα από το σύστημα Golgi, πολυμεμβρανικά σωμάτια, κεντρικά κενοτόπια ζυμών και χυμοτόπια φυτικών κυττάρων, καθώς και στην πλασματική μεμβράνη συγκεκριμένων κυττάρων. Οι ενδοκυτταρικές V-ATPάσες συμμετέχουν σε διαδικασίες ενδοκύτωσης με τη μεσολάβηση υποδοχέων, στη μεταφορά ενζύμων από το σύστημα Golgi στα λυσοσώματα και στη μετακίνηση πρωτεϊνών μέσω του εκκριτικού μονοπατιού. Οι V-ATPάσες των συναπτικών κυστιδίων χρησιμεύουν στην πρόσληψη νευροδιαβιβαστή, ενώ αυτές των λυσοσωμάτων, χυμοτοπίων και φαγοσωμάτων δημιουργούν τις όξινες συνθήκες που απαιτούνται για τη δράση υδρολυτικών ενζύμων. Οι αντλίες της πλασματικής μεμβράνης εξυπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες ανάλογα με τον ιστό όπου εκφράζονται. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η διατήρηση της ομοιόστασης του pH στο κυτταρόπλασμα μακροφάγων και ουδετερόφιλων, η δημιουργία όξινων συνθηκών στο χώρο που περιβάλλει οστεοκλάστες, ώστε να πραγματοποιηθεί οστική αναδόμηση, καθώς και η διείσδυση καρκινικών κυττάρων σε ιστούς. Η λειτουργία των V-ATPασών συνδέεται συχνά με τη δράση ενός καναλιού ιόντων χλωρίου, ώστε να αντισταθμίζεται η διαφορά δυναμικού που δημιουργεί στη μεμβράνη η μεταφορά πρωτονίων.

Οι περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη δομή και τη λειτουργία των V-ATPασών προέρχονται απο μελέτες στη ζύμη, καθώς και από σύγκριση με τη συνθάση ATP των μιτοχονδρίων F-ATPάση, η οποία χρησιμοποιεί την ενέργεια της ροής πρωτονίων από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, για να συνθέσει ATP (Stevens and Forgac, 1997). Η V-ATPάση αποτελείται από μία περιφερειακή κυτταροπλασματική περιοχή V1, υπεύθυνη για την υδρόλυση ATP και από μία διαμεμβρανική περιοχή V0, μέσω της οποίας πραγματοποιείται η μεταφορά πρωτονίων (Εικ. **10**). Η περιοχή V1 περιλαμβάνει 5-8 υπομονάδες A-H, που σχηματίζουν ένα διαλυτό σύμπλοκο μοριακού βάρους 500-600 kDa. Το σύμπλοκο αυτό βρίσκεται προς το κυτταρόπλασμα και συνδέεται με την περιοχή V0 μέσω των υπομονάδων C, D, E, F και G. Η αλληλεπίδραση των υπομονάδων C και E εξασφαλίζει σταθερότητα και μέγιστη ενεργότητα στη V-ATPάση, ενώ η D πιθανά συνδέει την υδρόλυση ATP -το οποίο προσδένεται στις υπομονάδες A και B- με τη μετατόπιση πρωτονίων. Η περιοχή V0 έχει βάρος 250-300 kDa και περιέχει 3-5 υπομονάδες, τις a, d, c, c΄ και c΄΄. Οι υπομονάδες c, c΄ και c΄΄ είναι ισχυρά υδρόφοβες με μάζα περίπου 17 kDa για τις δύο πρώτες και 23 kDa για τη c΄΄. Φέρουν διαμεμβράνικες έλικες και πιστεύεται ότι διατάσσονται σε ένα δακτύλιο, μέσω του οποίου γίνεται η μετατόπιση πρωτονίων. Επιπλέον, η c συμμετέχει στο σχηματισμό χασμοσυνδέσμων μεταξύ κυττάρων. Η συγκρότηση της περιοχής V0 προαπαιτείται για τη φυσιολογική τοποθέτηση της περιοχής V1 στη μεμβράνη και κατά συνέπεια για τη συγκρότηση της αντλίας.



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση των υπομονάδων και περιοχών της V-ATPάσης (biochemistry.utoronto.ca/ manolson/bch.html).

Γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες της V-ATPάσης έχουν ανιχνευτεί επίσης στο γονιδίωμα του *C. elegans* (πίνακας 1). Η δυσλειτουργία τους προκαλεί στις περισσότερες περιπτώσεις θνησιμότητα σε εμβρυϊκό ή προνυμφικό στάδιο, καταδεικνύοντας τη σημασία της λειτουργίας αυτών των αντλιών κατά την ανάπτυξη. Είναι καταρχάς απαραίτητες για την ωρίμανση των ωοκυττάρων, όπως υποδεικνύουν οι ανωμαλίες στην ωογένεση και η εμβρυϊκή θνησιμότητα, που προκύπτουν μετά από καταστολή της έκφρασης της υπομονάδας C (Oka and Futai, 2000). Μείωση της έκφρασης του γονιδίου *vha-8*, που κωδικοποιεί την υπομονάδα E, επηρεάζει έμβρυα αλλά και προνύμφες, δημιουργώντας προβλήματα στη διαδικασία ενδοκύτωσης με τη μεσολάβηση υποδοχέων (Choi et al., 2003). Η βιωσιμότητα εμβρύων και προνυμφών ελαττώνεται ακόμα μετά από καταστολή της λειτουργικότητας του γονιδίου *unc-32* ή μείωση της έκφρασης των *vha-5* και *vha-6* (Oka et al., 2001; Pujol et al., 2001). Τα γονίδια αυτά, όπως και το *vha-7*, κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές της υπομονάδας a κι έχουν ιστοειδική έκφραση (Oka et al., 2001). Το *vha-5* εκφράζεται πιο έντονα στο εκκριτικό κύτταρο, το *vha-6* στο έντερο, το *vha-7* στον ωαγωγό και την υποδερμίδα, ενώ το *unc-32* στον ωαγωγό και σε νευρικά κύτταρα. Το *unc-32* συμμετέχει στην πρόσληψη ή έκκριση νευροδιαβιβαστή από συναπτικά κυστίδια χολινεργικών νευρώνων, με αποτέλεσμα συγκεκριμένες μεταλλαγές αυτού (για παράδειγμα το αλληλόμορφο *e189*) να προκαλούν έλλειψη συντονισμού στην κίνηση (φαινότυπος Unc) (Pujol et al., 2001).

	Γονίδιο στο *C. elegans*	Υπομονάδα V-ATPάσης	Πρότυπο έκφρασης	Φαινότυπος δυσλειτουργίας	Βιβλιογραφική αναφορά
Περιοχή V1	*vha-13*	A	-	Εμβρυϊκός θάνατος	[1, 2]
	spe-5	B	-	Ελαττωματική σπερματογένεση	[3, 4]
	vha-12	B	-	Εμβρυϊκός θάνατος, μη συντονισμένη κίνηση (αλληλόμορφο *n2915*)	[1, 2, 5]
	vha-11	C	Εκκριτικό κύτταρο, πεπτικός σωλήνας	Εμβρυϊκός θάνατος, στειρότητα	[6, 7, 2]
	vha-14	D	-	Εμβρυϊκός θάνατος	[8]
	vha-8	E	Εκκριτικό κύτταρο, υποδερμίδα	Εμβρυϊκός θάνατος	[9, 10]
	vha-9	F	-	Εμβρυϊκός θάνατος	[2]
	vha-10	G	Εκκριτικό κύτταρο, νευρικά και μυϊκά κύτταρα, πεπτικός σωλήνας	Εμβρυϊκός θάνατος	[11, 12]
	vha-15	H	-	Εμβρυϊκός θάνατος	[1, 13]
Περιοχή V0	*unc-32*	a	Πεπτικός σωλήνας, γονάδα, νευρικά κύτταρα	Εμβρυϊκός θάνατος, ανώμαλη κίνηση (αλληλόμορφο *e189*)	[14, 15, 1, 2, 8]
	vha-5	a	Εκκριτικό κύτταρο, φάρυγγας, υποδερμικά κύτταρα	Προνυμφικός θάνατος	[14, 15, 2]
	vha-6	a	Πεπτικός σωλήνας	Προνυμφικός θάνατος	[14, 15, 2]
	vha-7	a	Υποδερμίδα, μήτρα, πρωιμα ωοκύτταρα, σπερματοθήκη	Φυσιολογικά ζώα	[14, 15, 13]
	vha-1	c	Εκκριτικό κύτταρο, ορθό, δύο μετα-πρωκτικα κύτταρα	Εμβρυϊκός θάνατος	[16, 1]

Πίνακας 1. Γονίδια V-ATPάσης στο *C. elegans.*

Στον πίνακα αναγράφονται γονίδια νηματωδών που κωδικοποιούν υπομονάδες της περιφερειακής και μεμβρανικής περιοχής της V-ATPάσης. Αναφέρονται επίσης το πρότυπο έκφρασής τους καθώς και ο ισχυρότερος φαινότυπος που προκύπτει από τη δυσλειτουργία αυτών, συνήθως μετά από στόχευσή τους με RNAi. Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις προκαλείται θνησιμότητα, γεγονός που φανερώνει την ιδιαίτερη σημασία της λειτουργίας των V-ATPασών κατά την ανάπτυξη. Η σκίαση στον πίνακα υποδηλώνει τα γονίδια, που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη μελέτη. Emb: εμβρυϊκός θάνατος, Lvl: προνυμφικός θάνατος, Unc: έλλειψη συντονισμού στην κίνηση. [1] {Kamath, 2003 #261}, [2] (Simmer et al., 2003), [3] (Machaca and L'Hernault, 1997), [4] P.D. Hartley, G.-d. Zhu, & S.W. L' Hernault, Emory University, προσωπική επικοινωνία με το Ν. Ταβερναράκη, [5] R. Weimer & E. Jorgensen, University of Utah, προσωπική επικοινωνία με το Ν. Ταβερναράκη, [6] (Oka and Futai, 2000), [7] (Oka et al., 1998), [8] (Gonczy et al., 2000), [9] (Choi et al., 2003), [10] (Hope et al., 1996), [11] (Fraser et al., 2000), [12] (Syntichaki et al., 2005), [13] (Maeda et al., 2001), [14] (Oka et al., 2001), [15] (Pujol et al., 2001), [16] (Oka et al., 1997), [17] (Nishi and Forgac, 2002), [18] (Merzendorfer et al., 1999).

ΙΙΙ.β. Κανάλια ανταλλαγής ιόντων Na^+/H^+

Κανάλια ανταλλαγής ιόντων Na^+/H^+ υπάρχουν σε όλους τους οργανισμούς, από τα βακτήρια μέχρι τα ζώα και τα φυτά (Nehrke and Melvin, 2002). Στα βακτήρια για κάθε ιόν νατρίου που εξέρχεται, εισέρχονται στο κύτταρο δύο πρωτόνια. Στις ζύμες, εκτός από νάτριο μπορεί να εξέλθει και κάλιο, ενώ ένας τύπος αυτών των καναλιών εντοπίζεται σε ενδοσώματα. Σε ασπόνδυλα όπως και στα θηλαστικά δύο εξωκυτταρικά ιόντα νατρίου ανταλλάσσονται με ένα ενδοκυτταρικό πρωτόνιο. Τα κανάλια ανταλλαγής ιόντων Na^+/H^+ συμμετέχουν γενικά στη ρύθμιση του όγκου του κυτταρου, στην έκκριση και απορρόφηση υγρών και στη ρύθμιση της ομοιόστασης του pH (Nehrke and Melvin, 2002).

Η οικογένεια των ανταλλακτών Na^+/H^+ (NHE) στα θηλαστικά περιλαμβάνει οχτώ μέλη (Nehrke, 2003). Καθένα αποτελείται από δώδεκα διαμεμβρανικές α-έλικες, που σχηματίζουν τον πόρο του καναλιού, και από μία καρβοξυ-τελική κυτταροπλασματική περιοχή με ρυθμιστικό ρόλο (Putney et al., 2002). Φωσφορυλίωση αυτής ή πρόσδεση άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών επηρεάζει τη συγγένεια του καναλιού για ιόντα. Οι ισομορφές NHE1 και NHE5 εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη, ενώ τα κανάλια NHE6 και NHE7 είναι ενδοκυτταρικά (Nehrke and Melvin, 2002). Η NHE1 ανιχνεύεται γενικά σε όλα τα κύτταρα. Σε ερυθροκύτταρα ενεργοποιείται μετά από επίδραση ινσουλίνης μέσω της δράσης κινασών φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (Sauvage et al., 2000). Προσδένεται στην ακτίνη του κυτταροσκελετού και συμμετέχει στην κυτταρική διαίρεση, στη μετανάστευση και στην επαφή μεταξύ γειτονικών κυττάρων (Putney et al., 2002).

Το γονιδίωμα του *C. elegans* περιέχει εννέα γονίδια, που κωδικοποιούν κανάλια ανταλλαγής Na^+/H^+, για τα οποία χρησιμοποιείται το ακρωνύμιο "*nhx*" (πίνακας 2). Κωδικοποιούν πρωτεΐνες 480-750 αμινοξέων, που φέρουν 10-12 διαμεμβρανικές περιοχές και μία μεγάλη κυτταροπλασματική καρβξυ-τελική "ουρά". Το κανάλι NHX-2 του *C. elegans* εντοπίζεται στην κορυφαία πλευρά της μεμβράνης επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου (Nehrke, 2003). Συμβάλλει στην επαναφορά του pH σε φυσιολογικά επίπεδα μετά από απορρόφηση διπεπτιδίων, η οποία συνοδεύεται από ταυτόχρονη είσοδο πρωτονίων στο κύτταρο. Τα κανάλια NHX-1, -4, -6 και -7, εντοπίζονται επίσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ τα υπόλοιπα (NHX-3, -5, -8 και -9) σε μεμβράνες ενδοκυτταρικών οργανιδίων (Nehrke and Melvin, 2002). Το NHX-5 εκφράζεται σε όλο το νευρικό σύστημα, ενώ το NHX-9 στο μεγάλο εκκριτικό κύτταρο του νηματώδους, το οποίο έχει σχήμα "Η". Το NHX-4 εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα και σε κάθε είδος ιστού. Ετερόλογη έκφραση της ισομορφής a του NHX-4 σε κυτταρικές σειρές που δε διαθέτουν ανταλλάκτες Na^+/H^+, επιτρέπει την επαναφορά του pH σε φυσιολογικά επίπεδα μετά από οξίνιση των κυττάρων (Nehrke and Melvin, 2002).

Κανάλι ανταλλαγής Na^+/H^+ του *C. elegans*	**Πρότυπο έκφρασης**
NHX-1	Επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, υποδερμίδα, μυϊκά κύτταρα, πιο έντονα στο έβρυο
NHX-2	Κορυφαία μεμβράνη επιθηλιακών κυττάρων εντέρου
NHX-3	Υποδερμίδα, κύτταρα μήτρας πλησίον της γονάδας, εκκριτικός πόρος, κύτταρα γλοίας (socket cells)
NHX-4	Όλα τα κύτταρα
NHX-5	Νευρώνες, κύτταρο πόρου γονάδας vulC, εκκριτικό κύτταρο
NHX-6	Επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου
NHX-7	Βασοπλευρική μεμβράνη επιθηλιακών κυττάρων εντέρου
NHX-8	Υποδερμικά κύτταρα ραφής, μυς φάρυγγα, πόρος γονάδας, βαλβίδες εντέρου
NHX-9	Εκκριτικό κύτταρο

Πίνακας 2. Κανάλια Ανταλλαγής ιόντων Na^+/H^+ στο *C. elegans*.

Εννέα διαφορετικές αντλίες ανταλλαγής ιόντων Na^+/H^+ κωδικοποιούνται στο γονιδίωμα του νηματώδους. Εκτός από το πρότυπο ιστολογικής έκφρασης διαφέρουν και ως προς την υποκυτταρική τους τοποθέτηση· τα κανάλια NHX-3, -5, -8 και -9 εντοπίζονται σε μεμβράνες ενδοκυτταρικών οργανιδίων, ενώ τα υπόλοιπα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Nehrke and Melvin, 2002). Οι αντλίες NHX-4, -5 και -9 χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση του ρόλου αυτών στη νέκρωση.

IV. Λυσοσώματα

Το λυσοσωμικό σύστημα αποτελείται από ένα σύνολο όξινων ενδοκυτταρικών οργανιδίων, που περιλαμβάνει λυσοσώματα, ώριμα ενδοσώματα, κυστίδια που προέρχονται από το σύστημα Golgi και περιέχουν νεοσυντιθέμενες υδρολάσες και σωματίδια με μη διασπώμενα συστατικά, όπως η λιποφουσκίνη (Adamec et al., 2000). Η οξύτητα αυτών των οργανιδίων ελέγχεται αυστηρά κυρίως μέσω ρύθμισης της πυκνότητας και της ενεργότητας των V-ATPασών, που υπάρχουν στις μεμβράνες τους (Stevens and Forgac, 1997).

Τα λυσοσώματα χαρακτηρίστηκαν το 1955 από τον Christian de Duve ως κυτταροπλασματικοί σάκκοι, που περιβάλλονται από μεμβράνη και περιέχουν όξινες φωσφατάσες. Σήμερα είναι γνωστό ότι είναι ικανά να αποδομήσουν κάθε κυτταρικό συστατικό, εφόσον περιέχουν ακόμα πρωτεάσες, πεπτιδάσες, λιπάσες, νουκλεάσες, γλυκοσιδάσες και σουλφατάσες (Kroemer and Jaattela, 2005). Στα περισσότερα από αυτά τα ένζυμα πραγματοποιείται, μετά τη σύνθεσή τους, τροποποίηση ορισμένων σακχάρων σε μαννόζη-6-φωσφορικό στο δίκτυο cis-Golgi. Σημαίνονται με αυτόν τον τρόπο, ώστε από το δίκτυο trans-Golgi να μεταφερθούν μέσω ενδοσωμάτων στα λυσοσώματα. Τα τελευταία περιέχουν περισσότερες από 80 διαφορετικές υδρολάσες (Adamec et al., 2000). Από τις πλέον μελετημένες είναι οι καθεψίνες, που διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το αμινοξύ του ενεργού τους κέντρου: τις καθεψίνες ασπαρτικού (D και E), κυστεΐνης (B, C, H, F, K, L, O, S, V, W και X/Z) και την καθεψίνη σερίνης G (Adamec et al., 2000; Kroemer and Jaattela, 2005). Παρόλο που εμφανίζουν μέγιστη ενεργότητα σε χαμηλό pH, περίπου 4-5, μπορούν να δράσουν και σε πιο ουδέτερο περιβάλλον έξω από τα λυσοσώματα με μικρότερη αποδοτικότητα ή διαφορετική ειδικότητα.

Τα λυσοσώματα είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση και ανακύκλωση εξωκυτταρικών κι ενδοκυτταρικών συστατικών. Η διάσπαση εξωγενούς υλικού, που προέρχεται από διαδικασίες ενδοκύτωσης ή φαγοκύτωσης, αναφέρεται συχνά ως "ετεροφαγία", σε αντίθεση με την "αυτοφαγία¨, που σχετίζεται με αποδόμηση μορίων του ίδιου του κυττάρου (Kroemer and Jaattela, 2005; Martinez-Vicente and Cuervo, 2007). Τα προϊόντα της διάσπασης μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα μέσω μεταφορέων της λυσοσωμικής μεμβράνης, ή εκκρίνονται από το κύτταρο με εξωκύτωση (Kroemer and Jaattela, 2005).

Οι πρωτεάσες των λυσοσωμάτων και η δυσλειτουργία αυτών των οργανιδίων έχουν συνδεθεί με εκφυλιστικές καταστάσεις (Adamec et al., 2000). Η συμμετοχή τους σε διαδικασίες νέκρωσης έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες παραγράφους. Στα πλαίσια αυτής της διατριβής έγινε προσπάθεια να διασαφηνιστεί ο ρόλος και η συμπεριφορά τους κατά το νεκρωτικό θάνατο.

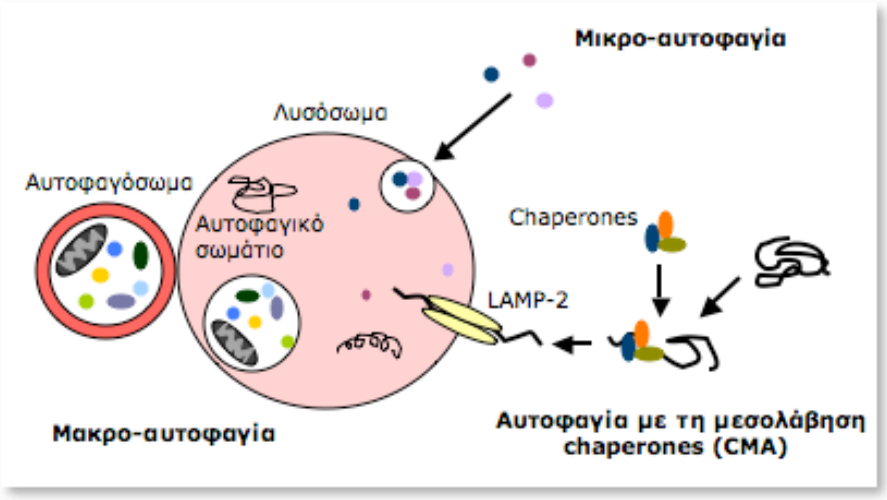
V. Αυτοφαγία, Νηματώδεις και Κυτταρικός Θάνατος

Η διερεύνηση του ρόλου της αυτοφαγίας κατά τη νέκρωση στους νηματώδεις αποτέλεσε έναν από τους βασικότερους στόχους αυτής της διατριβής. Θεωρήθηκε λοιπόν αναγκαίο να αναφερθούν κάποια στοιχεία σχετικά με τους μηχανισμούς και τη φυσιολογική σημασία της αυτοφαγικής διαδικασίας γενικά και στο *C. elegans* ειδικότερα, καθώς και για τη συμμετοχή της σε μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου.

V.α. Μηχανισμοί αυτοφαγίας

Οι βασικές κυτταρικές διαδικασίες για την αποδόμηση κυτταρικών συστατικών είναι η αυτοφαγία και η διάσπαση στα πρωτεοσώματα. Το σύστημα των πρωτεοσωμάτων είναι υπεύθυνο για την αποδόμηση ενδοκυτταρικών και μεμβρανικών πρωτεϊνών με μικρό χρόνο ημιζωής, καθώς και μη σωστά αναδιπλωμένων ή κατεστραμμένων πρωτεϊνών (Larsen and Sulzer, 2002). Η διάσπαση πραγματοποιείται σε ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών 26S, μετά από προσθήκη μορίων ουμπικουιτίνης στο υπόστρωμα. Ο όρος "αυτοφαγία" περιγράφει την κυτταρική διαδικασία για την αποδόμηση και ανακύκλωση οργανιδίων και πρωτεϊνών με μεγάλη διάρκεια ημιζωής (Jentsch and Ulrich, 1998). Όπως προκύπτει και από την ανάλυση του όρου στα συνθετικά του, πρόκειται για το μηχανισμό με τον οποίο το κύτταρο "τρώει" τον εαυτό του.

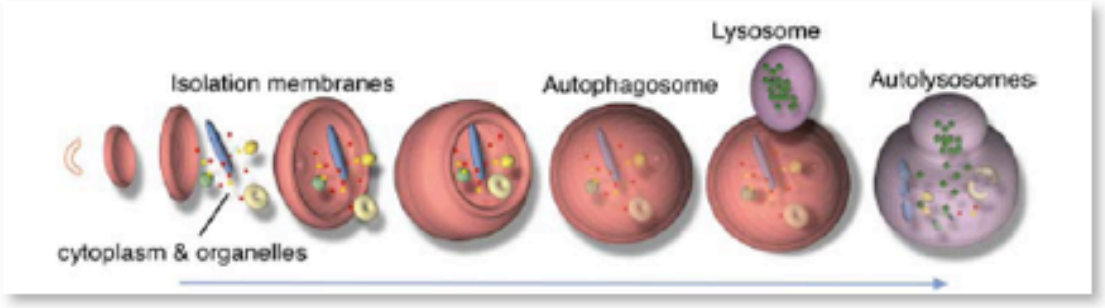
Έχουν διακριθεί τρεις διαφορετικοί τύποι: η μικρο-αυτοφαγία, η αυτοφαγία με τη μεσολάβηση chaperones (chaperone-mediated autophagy, CMA) και η μακρο-αυτοφαγία (Εικ. **11**) (Klionsky and Emr, 2000; Larsen and Sulzer, 2002). Η μικρο-αυτοφαγία πραγματοποιείται με εγκολπώσεις της λυσοσωμικής μεμβράνης, που έχουν ως αποτέλεσμα την πρόσληψη τμημάτων του κυτταροπλάσματος ή του πυρήνα στο εσωτερικό του λυσοσώματος (Chu, 2006). Συμμετέχει επίσης στην επιλεκτική απομάκρυνση οργανιδίων, όταν δεν είναι πια χρήσιμα και είναι συνεχώς ενεργή στα κύτταρα (Larsen and Sulzer, 2002). Λίγα δεδομένα υπάρχουν σχετικά με αυτήν τη διαδικασία. Κατά τη CMA, διαλυτές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που φέρουν την αμινοξική αλληλουχία KFERQ, στοχεύονται ειδικά στο λυσόσωμα με τη βοήθεια κυτταροπλασματικών και λυσοσωμικών πρωτεϊνών chaperones, όπως η κυτταροπλασματική και λυσοσωμική hsc-73, καθώς και της πρωτεΐνης LAMP2 της λυσοσωμικής μεμβράνης. Στο εσωτερικό του λυσοσώματος υφίστανται έντονη πρωτεόλυση. Η CMA είναι συνεχώς ενεργή σε χαμηλά επίπεδα στους περισσότερους ιστούς, αλλά εμφανίζει μέγιστη ενεργότητα σε καταστάσεις στρες (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007). Το λυσόσωμα είναι και ο τελικός προορισμός του "φορτίου" που μεταφέρεται μέσω της μακρο-αυτοφαγίας. Αυτή αποτελεί και τον καλύτερα μελετημένο μηχανισμό μεταξύ των τριών μορφών.



Εικόνα 11. Σχηματικό διάγραμμα των τριών τύπων αυτοφαγίας.

Κατά τη μακρο-αυτοφαγία σχηματίζονται με προέκταση μιας διπλής κυτταροπλασματικής μεμβράνης, που καλείται "φαγοφόρο", κυστίδια που ονομάζονται "αυτοφαγοσώματα" στις ζύμες ή "αυτοφαγικά κυστίδια" σε κύτταρα θηλαστικών, χωρίς ωστόσο αυτός ο διαχωρισμός να είναι απόλυτα αυστηρός (Klionsky and Emr, 2000). Η προέλευση-πηγή του φαγοφόρου δεν είναι ακόμα σαφής. Είναι πιθανό ότι πρόκειται για μία προ-αυτοφαγοσωμική δομή (pre-autophagosomal structure, PAS), που βρίσκεται κοντά στο λυσόσωμα στις ζύμες, ενώ στα θηλαστικά το ρόλο αυτό ίσως παίζει το δίκτυο trans Golgi ή το αδρό ΕΔ (Mizushima et al., 2002; Wang and Klionsky, 2003). Τα αυτοφαγοσώματα εγκολπώνουν μεγάλα τμήματα κυτταροπλάσματος και το μεταφέρουν στα λυσοσώματα (Εικ. **12**). Η εξωτερική μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος συντήκεται με τη λυσοσωμική και το υπολειπόμενο αυτοφαγικό σωμάτιο απελευθερώνεται στον αυλό του λυσοσώματος. Σε κύτταρα θηλαστικών η σύντηξη με το λυσόσωμα αποτελεί το τελικό βήμα διαδοχικών συντήξεων αυτοφαγοσωμάτων με πρώιμα ενδοσώματα, για να σχηματιστούν σωματίδια που ονομάζονται "αμφισώματα" (Kroemer and Jaattela, 2005; Mizushima et al., 2002). Κατά τη διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σταδιακά οξίνιση, ενώ χάνεται και η εσωτερική μεμβράνη των αυτοφαγοσωμάτων. Συχνά, με τη συμμετοχή και των μεμβρανών των οργανιδίων που έχουν εγκολπωθεί, σχηματίζονται πολυμεμβρανικές δομές, εμφανείς κυρίως στο τελικό στάδιο των αυτο-λυσοσωμάτων. "Αυτο-λυσόσωμα" καλείται το προϊόν σύντηξης με το λυσόσωμα. Ο όρος "αυτοφαγικά κυστίδια" χρησιμοποιείται στην περίπτωση αυτή για να περιγράψει το σύνολο των δομών από τα πρώιμα αυτοφαγοσώματα με τη διπλή μεμβράνη στα ώριμα αυτο-λυσοσώματα (Chu, 2006). Έχουν παρατηρηθεί ακόμα και εξειδικευμένες μορφές μακρο-αυτοφαγίας, που εξυπηρετούν την αποδόμηση υπεροξεισωμάτων, μιτοχονδρίων ή τμημάτων του ενδοπλασματικού δικτύου και για τις οποίες χρησιμοποιούνται αντίστοιχα οι αγγλικοί όροι "pexophagy", "mitophagy" και "ER-phagy" (Bernales et al.,

2006). Στο τμήμα του κειμένου που ακολουθεί για λόγους απλότητας ο όρος "αυτοφαγία" θα χρησιμοποιηθεί ως συνώνυμος του όρου "μακρο-αυτοφαγία".



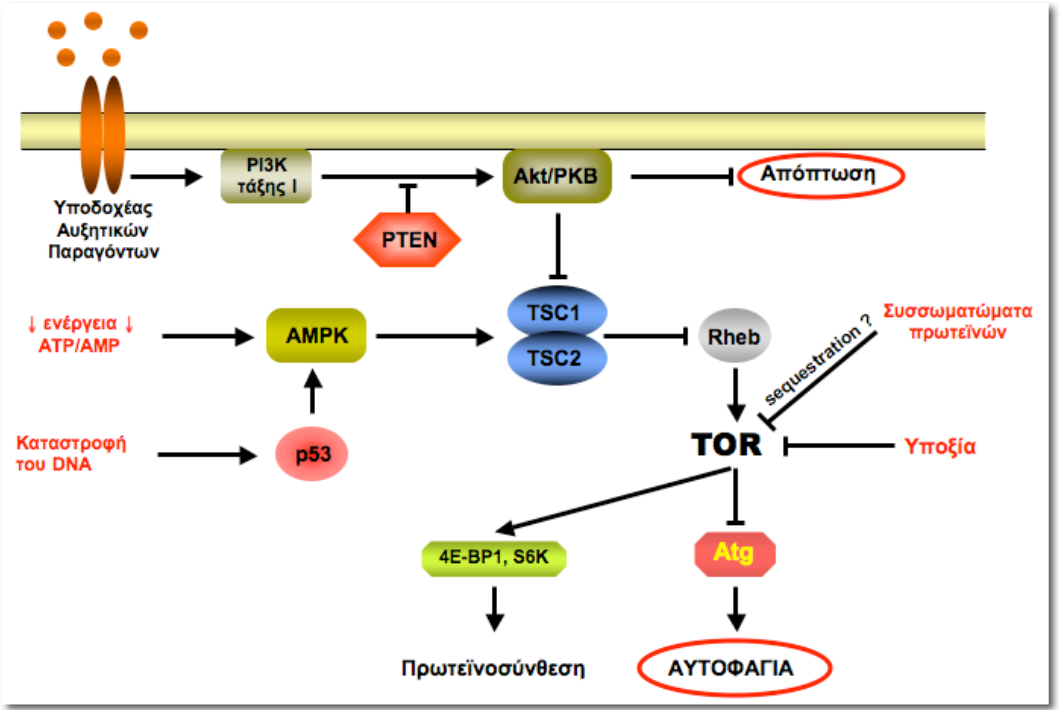
Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση της αυτοφαγικής διαδικασίας (Yoshimori, 2004)**.**

Οι πρώτες μελέτες της αυτοφαγίας πραγματοποιήθηκαν με αναλύσεις ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και διαχωρισμό κυτταρικών οργανιδίων από ηπατοκύτταρα αρουραίων το 1960 από τον de Duve (Boland and Nixon, 2006). Η διερεύνηση ωστόσο των μοριακών μονοπατιών αυτής ξεκίνησε περίπου 20 χρόνια αργότερα στη ζύμη (Huang and Klionsky, 2002). Η ενεργοποίηση της αυτοφαγικής διαδικασίας υπό συνθήκες πείνας αποτέλεσε τη βάση για την ανακάλυψη αυτοφαγικών γονιδίων. Στελέχη ζύμης με μεταλλαγές στα γονίδια "apg" δεν εμφάνιζαν συσσώρευση αυτοφαγοσωμάτων, ενώ μεταλλαγές στα γονίδια "aut" επέτρεπαν την ανίχνευση κυτταροπλασματικών δεικτών, όπως η συνθάση λιπαρών οξέων σε συνθήκες πείνας. Στις ζύμες πολλά αυτοφαγικά γονίδια χρησιμοποιούνται επίσης κατά την πρωτεολυτική επεξεργασία της υδρολάσης αμινοπεπτιδάση Ι, μέσω του μονοπατιού στόχευσης από το κυτταρόπλασμα στο μοναδικό λυσόσωμά τους (cytoplasm to vacuole targeting, Cvt) (Klionsky and Emr, 2000). Μεταλλαγές στα γονίδια "cvt" καθιστούσαν αδύνατη τη σύνθεση της αμινοπεπτιδάσης Ι. Περισσότερα γονίδια ανακαλύφθηκαν μέσω της αλληλεπίδρασης των προϊόντων τους με ήδη γνωστές αυτοφαγικές πρωτεΐνες. Για την περιγραφή του συνόλου των αυτοφαγικών μορίων χρησιμοποιείται πλέον το ακρωνύμιο "Atg" (Autophagy-Related Genes) (Klionsky et al., 2003). Υποψήφια ορθόλογα αυτών έχουν βρεθεί σε φυτά, νηματώδεις, έντομα και θηλαστικά, υποδηλώνοντας ότι ο μηχανισμός της αυτοφαγίας είναι πολύ συντηρημένος.

Ο βασικός μοριακός μηχανισμός της αυτοφαγίας περιλαμβάνει την επαγωγή, το σχηματισμό και την ωρίμανση των αυτοφαγοσωμάτων, τη σύντηξή τους με το λυσόσωμα και τη διάσπαση του αυτοφαγικού σωματιδίου (Εικ. **14**) (Klionsky and Emr, 2000).

Η επαγωγή της αυτοφαγίας μπορεί να είναι αποτέλεσμα περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, όπως έλλειψη θρεπτικών, υψηλή θερμοκρασία, χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου

και ορμονική διέγερση, ή ενδοκυτταρικού στρες, που προκύπτει από την παρουσία κατεστραμμένων οργανιδίων ή μεταλλαγμένων πρωτεϊνών και την εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών (Levine, 2007). Μόρια που εμπλέκονται στον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης, στην επιδιόρθωση βλαβών στο DNA, στην απόπτωση και σε μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος ανώτερων οργανισμών ρυθμίζουν επίσης την έναρξη αυτοφαγικών διαδικασιών. Οι μηχανισμοί αυτοί ωστόσο δεν είναι ακόμα απολύτως γνωστοί και φαίνεται να εξαρτώνται από τον τύπο του κυττάρου ή ιστού και το βαθμό διαφοροποίησής του (Chu, 2006). Η παρουσία αμινοξέων (κυρίως της λευκίνης) και σε θηλαστικά η δράση της ινσουλίνης ή αυξητικών παραγόντων αναστέλλουν την αυτοφαγία μέσω διαφορετικών μοριακών μονοπατιών, εξαρτώμενων ή μη από την κινάση TOR (Εικ. **13**).



Εικόνα 13. Ρύθμιση της αυτοφαγίας από την κινάση TOR.

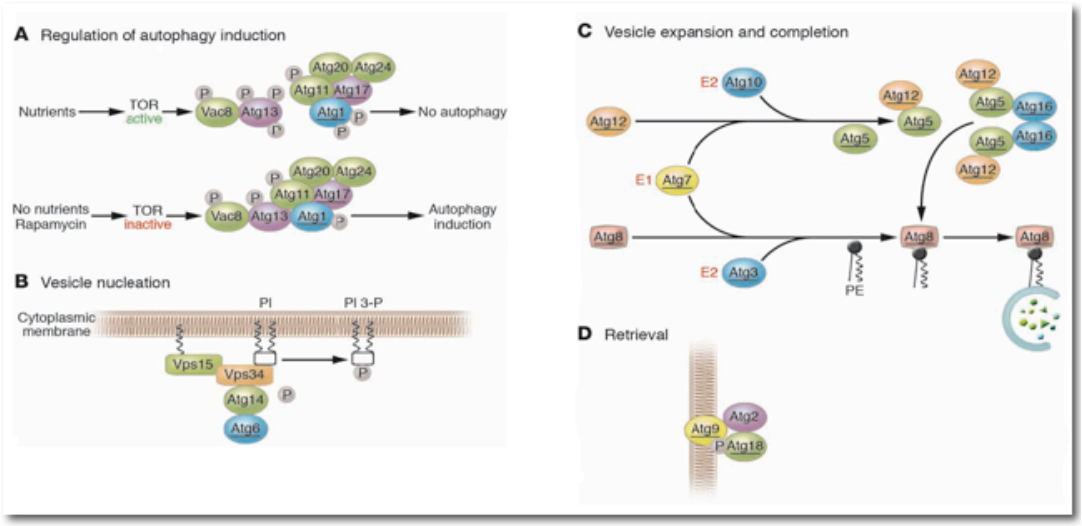
Η TOR είναι μία κινάση σερίνης/θρεονίνης, που συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου και του οργανισμού, ρυθμίζοντας διαδικασίες όπως η πρωεϊνοσύνθεση και η μετακίνηση μεμβρανών μέσω ενδοκύτωσης ή αυτοφαγίας, κι ελέγχοντας γενικότερα τις φυσιολογικές αποκρίσεις στη διαθεσιμότητα θρεπτικών (Arsham and Neufeld, 2006). Η ενεργός κινάση TOR αναστέλλει την αυτοφαγία μέσω ενεργοποίησης κινασών φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης PI3K (Phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase) τάξης I και καταστολής της κινάσης ATG1 (Codogno and Meijer, 2005). Όταν η TOR είναι ενεργοποιημένη στη ζύμη, η αυτοφαγική πρωτεΐνη Atg13 βρίσκεται σε υπερ-

φωσφορυλιωμένη μορφή και συνδέεται ασθενώς με την Atg1 (Klionsky and Emr, 2000). Επιπλέον, η κινάση TOR είναι πιθανό να επηρεάζει την έκφραση αυτοφαγικών πρωτεϊνών, όπως η ATG8 (Codogno and Meijer, 2005). Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι η αποτελεσματική επαγωγή της αυτοφαγίας μετά από αναστολή της απαιτεί τη δράση της κινάσης S6K, η οποία όμως ενεργοποιείται από την TOR (Scott et al., 2004). Ίσως με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται καλύτερη ρύθμιση της αυτοφαγίας, ώστε αφενός να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα παρουσία θρεπτικών και αφετέρου, σε παρατεταμένη απουσία αυτών, να μην ενεργοποιείται τόσο ώστε να γίνεται τοξική (Codogno and Meijer, 2005). Η TOR των θηλαστικών είναι πιθανό να δρα και στο επίπεδο ωρίμανσης των αυτοφαγοσωμάτων, δεδομένου ότι έχει συνεντοπιστεί σε κυτταροκαλλιέργειες με ενδοσωμικές και αυτοφαγοσωμικές πρωτεΐνες (Mavrakis et al., 2007).

Σημαντικό ρόλο στην έναρξη του σχηματισμού αυτοφαγοσωμάτων παίζει το σύμπλοκο PI3K τάξης III, το οποίο στις ζύμες περιλαμβάνει την κινάση Vps34 και τις πρωτεΐνες Vps15, Atg6 (Beclin1 στα θηλαστικά) και Atg14, που συνδέονται και συμμετέχουν στην τοποθέτηση του συμπλόκου Atg12/Atg5 σε δομές πρώιμων αυτοφαγοσωμάτων (Εικ. **14**). Η σύνδεση της πρωτεΐνης Atg12 με την Atg5 πραγματοποιείται μέσω διαδοχικών αλληλεπιδράσεων της πρώτης με τα ένζυμα Atg7 και Atg10 και απαιτεί κατανάλωση ενέργειας (Mizushima et al., 1998). Σύμπλοκα Atg12/Atg5 σχηματίζονται συνεχώς στο κύτταρα. Μαζί με την Atg16 προσδένονται στην εξωτερική μεμβράνη των αυτοφαγοσωμάτων, συμβάλλουν στην ωρίμανσή τους και απομακρύνονται μετά την ολοκλήρωση αυτής (Gozuacik and Kimchi, 2004). Η παρουσία του συμπλόκου Atg12/Atg5/Atg16 στην αυτοφαγοσωμική μεμβράνη επάγει επίσης την έναρξη ενός μοριακού μονοπατιού, που οδηγεί στη σύνδεση της πρωτεΐνης Atg8 με μόρια φωσφατιδυλ-αιθανολαμίνης της μεμβράνης των αυτοφαγοσωμάτων (Huang and Klionsky, 2002). Η σύνδεση αυτή προϋποθέτει διάσπαση ATP και πραγματοποιείται με τη δράση των ενζύμων Atg7 και Atg3 (Εικ. **14**). Απαραίτητη είναι και η λειτουργία του μορίου Atg4, που πρωτεολύει το καρβοξυτελικό άκρο της Atg8 στο αρχικό και τελικό στάδιο αυτού του μονοπατιού (Ohsumi, 2001). Ο σχηματισμός των αυτοφαγοσωμάτων στη ζύμη περιλαμβάνει ακόμα την πρόσδεση των πρωτεϊνών Atg9, Atg2 και Atg18 στην αυτοφαγοσωμική μεμβράνη, τα οποία παίζουν ρόλο στην ανάκτηση και ανακύκλωση των αυτοφαγικών μορίων (Εικ. **14**).

Η σύντηξη με το λυσόσωμα απαιτεί τη δράση αφενός των V-ATPασών, που οξινίζουν ενδοκυτταρικά οργανίδια, και αφετέρου την παρουσία λειτουργικών μικρσωληνίσκων. Οι διαδικασίες σύντηξης πραγματοποιούνται μέσω των συμπλόκων t-SNARE και v-SNARE, της λειτουργίας των πρωτεϊνών Vam3, Vti1, Ykt6 και Nyv1, της GTPάσης Ypt7 της οικογένειας Rab και πρωτεϊνών του συμπλόκου καταμερισμού

κυστιδιακών πρωτεϊνών (Vacuolar Protein-Sorting, VPS) (Huang and Klionsky, 2002). Για την αποδόμηση των αυτοφαγικών σωματιδίων στο εσωτερικό του λυσοσώματος, εκτός από όξινες συνθήκες, είναι απαραίτητη η δράση ενζύμων, όπως η πρωτεϊνάση B, Prb1, η λιπάση Atg15 και άλλων μορίων, όπως η Atg22 (Klionsky, 2005).



Εικόνα 14. Μοριακοί μηχανισμοί αυτοφαγίας (Levine and Yuan, 2005)**.**

V.β. Η φυσιολογική σημασία της αυτοφαγίας

Η φυσιολογική σημασία της αυτοφαγίας βρίσκεται ακόμη υπό διερεύνηση. Στα περισσότερα κύτταρα λειτουργεί συνεχώς σε χαμηλούς ρυθμούς και είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση κατεστραμμένων οργανιδίων και πρωτεϊνών με μεγάλο χρόνο ημιζωής (Larsen and Sulzer, 2002). Υπό συγκεκριμένες συνθήκες όμως ενεργοποιείται και συμβάλλει άλλοτε στην επιβίωση και άλλοτε στην καταστροφή των κυττάρων. Συνήθως επάγεται ως απόκριση σε καταστάσεις στρες, το οποίο μπορεί να είναι ενδοκυτταρικό και να αφορά στη συσσώρευση κατεστραμμένων μορίων ή/και οργανιδίων, ή να προκαλείται από συνθήκες, όπως έλλειψη θρεπτικών, υποξία, αύξηση της θερμοκρασίας και υπερπληθυσμός.

Η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας ως απόκριση σε καταστάσεις πείνας έχει ιδιαίτερη φυσιολογική σημασία κυρίως σε κατώτερους οργανισμούς. Συχνά οδηγεί σε σπορίωση στο σακχαρομύκητα, στο σχηματισμό ώριμων σωματιδίων, των "fruiting bodies", που φέρουν σπόρια στην αμοιβάδα *Dictyostelium discoideum*, στη δημιουργία προνυμφών dauers στους νηματώδεις και σε χλώρωση, γήρανση των κοτυληδόνων ή άλλες αποκρίσεις στα φυτά (Levine and Klionsky, 2004). Σε πολυκύτταρους οργανισμούς με πιο πολύπλοκη οργάνωση σώματος, η ρύθμιση της αυτοφαγίας διαφέρει ανάλογα με τον ιστό (Chu, 2006). Σήματα που

σχετίζονται με το μοριακό μονοπάτι της ινσουλίνης και την παρουσία ή όχι θρεπτικών, επιδρούν πρωταρχικά σε ιστούς όπως το ήπαρ αλλά όχι στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών (Chu, 2006). Για παράδειγμα, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών σε νεογέννητα ποντίκια αυξάνει παροδικά τα επίπεδα αυτοφαγίας κυρίως στο ήπαρ και σε μυϊκά κύτταρα. Αντίθετα, στους νευρώνες του εγκεφάλου η αυτοφαγία είναι συνεχώς ενεργή σε χαμηλά επίπεδα και ακόμα και σε καταστάσεις έντονης πείνας δεν έχει παρατηρηθεί επαγωγή της στο φλοιό του εγκεφάλου ποντικών (Boland and Nixon, 2006). Εξάλλου, η παροχή θρεπτικών συστατικών στον εγκέφαλο είναι αυστηρά ελεγχόμενη. Ευαίσθητοι νευρώνες του υποθαλάμου μπορούν να αντιλαμβάνονται χαμηλές ή υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών και ανάλογα να ρυθμίζουν τα επίπεδα αυτοφαγίας σε περιφερειακούς ιστούς, όπως το ήπαρ, οι μύες και ο λιπώδης ιστός, ώστε τελικά η προμήθεια του κεντρικού νευρικού συστήματος σε θρεπτικά να είναι επαρκής (Boland and Nixon, 2006).

Η διαδικασία της αυτοφαγίας συμβάλλει ακόμη σε αποκρίσεις ειδικής ή μη ανοσίας, συμμετέχοντας στην επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και διευκολύνοντας την καταστροφή παθογόνων εισβολέων (Shintani and Klionsky, 2004). Ορισμένοι ιοί ωστόσο, όπως ο HSV-1 (Herpes Simplex Virus-1), παράγουν μόρια που την παρεμποδίζουν (Larsen and Sulzer, 2002). Επιπλέον, τα αυτοφαγοσώματα μπορούν να αποτελέσουν καταφύγιο για βακτήρια, τα οποία είναι ικανά να αναστείλλουν την ωρίμανσή τους (Cuervo, 2004).

Η αυτοφαγία παίζει επίσης ρόλο στην αναμόρφωση ιστών στα πλαίσια φυσιολογικών διαδικασιών ανάπτυξης. Συνήθως οδηγεί σε μαζική απώλεια κυττάρων, ενώ η δυσλειτουργία της δημιουργεί αναπτυξιακά προβλήματα στους περισσότερους οργανισμούς (Levine and Klionsky, 2004). Ο ρόλος της κατά την ανάπτυξη των εντόμων έχει μελετηθεί διεξοδικά. Συμμετέχει στην εξάλειψη του λιπαρού σωματίου και κυττάρων των σιελογόνων αδένων και του μεσεντέρου κατά τη μεταμόρφωση στη *Drosophila melanogaster* (Codogno and Meijer, 2005), καθώς και συγκεκριμένων κυττάρων κατά την ωογένεση στη *Drosophila virilis*. (Velentzas et al., 2007). Αυτοφαγική μορφολογία αναπτύσσεται ακόμη κατά την αποσύνθεση του επιθηλίου των σιελογόνων αδένων στις μέλισσες (υμενόπτερα του είδους Apis mellifera), καθώς μεταβαίνουν από το 5ο προνυμφικό στάδιο στο στάδιο της νύμφης (Silva-Zacarin et al., 2007). Με αυτοφαγία καταστρέφονται πιθανά οι νευρώνες Rohon-Beard της νευρικής χορδής στο Xenopus, κινητικοί νευρώνες της ουράς γυρίνων και ισθμο-οπτικοί νευρώνες κοτόπουλου (Chu, 2006; Klionsky and Emr, 2000). Σε θηλαστικά απαιτείται για το κλείσιμο του επιθηλίου της υπερώας και συμμετέχει στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων της επίφυσης, αναστέλλοντας πιθανά αποπτωτικές διαδικασίες (Bohensky et al., 2007; Mizushima et al., 2002). Προγραμματισμένος αναπτυξιακός αυτοφαγικός θάνατος έχει παρατηρηθεί ακόμα κατά την εξάλειψη του αγωγού του Müller στα πλαίσια της σεξουαλικής

ωρίμανσης αρσενικών ατόμων, κατά το σχηματισμό της κοιλότητας του κεντρικού εντέρου και σε ατροφικές καταστάσεις του προστάτη (Gozuacik and Kimchi, 2004).

Η αυτοφαγία έχει συσχετιστεί επιπλέον με παθολογικές καταστάσεις, μεταξύ των οποίων εκφυλιστικές νόσους του νευρικού και μυϊκού συστήματος, καθώς και με τη δημιουργία όγκων (Mizushima et al., 2002). Ο ρόλος της σε αυτές τις περιπτώσεις περιγράφεται σε επόμενη παράγραφο.

V.γ. Η αυτοφαγία στο *C. elegans*

Τα περισσότερα γονίδια Atg έχουν ομόλογα σε ανώτερους οργανισμούς και η διαδικασία της αυτοφαγίας φαίνεται να έχει συντηρηθεί κατά την εξέλιξη. Προσπάθειες διερεύνησης ομοιοτήτων μεταξύ πρωτεϊνικών αλληλουχιών από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες έχουν οδηγήσει στην ανίχνευση αυτοφαγικών μορίων στο νηματώδη (πίνακας 3). Εκτός από ομοιότητες στην αμινοξική αλληλουχία, υπάρχουν έμμεσες ενδείξεις για τη συμμετοχή τους στη διαδικασία της αυτοφαγίας. Για παράδειγμα, το γονίδιο *bec-1* μπορεί να υποκαταστήσει λειτουργικά το ομόλογό του, Atg6, στη ζύμη (Melendez et al., 2003). Επίσης, δυσλειτουργία των γονιδίων *bec-1*, *lgg-1*, *atgr-7*, *atgr-18* και *unc-51* παρεμποδίζει την επαγωγή αυτοφαγίας κατά τη δημιουργία προνυμφών dauers.

Συγκριτικά με τους ζυμομύκητες, μερικά από τα "αυτοφαγικά" γονίδια των νηματωδών φαίνεται ότι επιτελούν επιπρόσθετες λειτουργίες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο *unc-51*, που κωδικοποιεί μία κινάση σερίνης/θρεονίνης. Η UNC-51 εκφράζεται στους περισσότερους νευρώνες καθ' όλα τα αναπτυξιακά στάδια και η περιοχή της κινάσης αυτής εμφανίζει υψηλή ομοιότητα (52.7%) με την αντίστοιχη περιοχή της πρωτεΐνης Atg1 στη ζύμη (Ogura et al., 1994). Έλλειψη της Atg1 παρεμποδίζει τη δημιουργία αυτοφαγοσωμάτων και μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων ζύμης σε συνθήκες πείνας (Matsuura et al., 1997). Στο *C. elegans*, η UNC-51 συνεργάζεται με την πρωτεΐνη UNC-14 για τη ρύθμιση του σχηματισμού της γονάδας ερμαφρόδιτων ζώων, συμμετέχοντας στη μετανάστευση μυοβλαστών αυτής (Branda and Stern, 2000). Οι UNC-51 και UNC-14 ελέγχουν ακόμα την τοποθέτηση του υποδοχέα νετρίνης UNC-5 σε νευρικά κύτταρα (Ogura and Goshima, 2006). Η λειτουργία αυτή δε σχετίζεται με την αυτοφαγία, αφού κατά πρώτον, δεν επηρεάζεται από αλλαγή της έκφρασης ή της λειτουργίας άλλων αυτοφαγικών γονιδίων και κατά δεύτερον, ο υποδοχεάς UNC-5 δεν έχει ανιχνευθεί σε αυτοφαγοσώματα. Η UNC-51 συμμετέχει ακόμα στην αύξηση και τη μετανάστευση νευραξόνων, αλληλεπιδρώντας και φωσφορυλιώνοντας την πρωτεΐνη VAB-8 και/ή την UNC-14 (Lai and Garriga, 2004). Οι άξονες στελεχών με μεταλλαγές στο *unc-51* εμφανίζουν άτυπα μεμβρανικά κυστίδια, αν και

δεν είναι γνωστό αν αυτά αντιπροσωπεύουν αυτοφαγοσώματα (McIntire et al., 1992). Το σύνολο των παρατηρήσεων υποδεικνύει ότι η UNC-51 εμπλέκεται στη δυναμική μεμβρανών.

Γονίδια Αυτοφαγίας		**Ρόλος στην Αυτοφαγία**	**Ομόλογα στο *C. elegans***
Γονίδια Ζύμης	**Γονίδια Θηλαστικών**		
Ρύθμιση της Έναρξης της Αυτοφαγίας			
TOR1/ TOR2	*Hs FRAP1*	Ευαίσθητη σε ραπαμυκίνη πρωτεϊνική κινάση Ser/Thr	*let-363*
ATG1	*Hs ULK2/ Mm Unc51.2*	Πρωτεϊνική κινάση Ser/Thr	*unc-51*
Έναρξη Σχηματισμού Αυτοφαγοσωμάτων			
ATG6	*Mm beclin 1*	Συστατικό του συμπλόκου των φωσφατιδυλκινασών (PI3-kinase) τάξης III	*bec-1*
VPS34	*Hs* PI3-kinase, class III	Φωσφατιδυλ-κινάση τάξης III	*vps-34*
Ωρίμανση Αυτοφαγοσωμάτων			
ATG3	*Hs ATG3/ Mm Apg3*	Ένζυμο που μοιάζει με E2˙ συνδέει την Atg8 με φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE)	Y55F3AM.4
ATG4	*Hs ATG4/ Mm autophagin 1*	Πρωτεάση Cys˙ αποσπά το καρβοξυ-τελικό άκρο της Atg8 από τη PE	Y87G2A.3
ATG5	*Hs ATG5/ Autophagy 5*-like	Συνδέεται στην Atg12 μέσω μιας εσωτερικής λυσίνης	*atgr-5*
ATG7	*Hs ATG7/ Mm APG7*	Ένζυμο που μοιάζει με E1˙ συνδέει την Atg12 με την Atg10	*atgr-7*
ATG8	*Hs GABARAP/ Mm GABARAP*-like 1	Πρωτεΐνη που μοιάζει με ουβικιτίνη και συνδέεται σε PE	*lgg-1*
ATG10	*Hs/ Mm ATG10*	Ένζυμο που μοιάζει με E2˙ συνδέει την Atg12 στην Atg5	D2085.2
ATG12	*Hs APG12*-like	Πρωτεΐνη που μοιάζει με ουβικιτίνη και συνδέεται στην Atg5	*lgg-3*
ATG16	*Hs APG16*-like isoform 2	Συστατικό του συμπλόκου Atg12-Atg5	K06A1.5
Ανάκτηση Πρωτεϊνών Αυτοφαγίας			
ATG9	*Hs/ Mm APG9*-like 1	Μεμβρανική πρωτεΐνη	*atgr-9*
ATG18	*Sc* ATG18/ Hs AAQ96867	Τοποθέτηση της Atg2	*atgr-18*

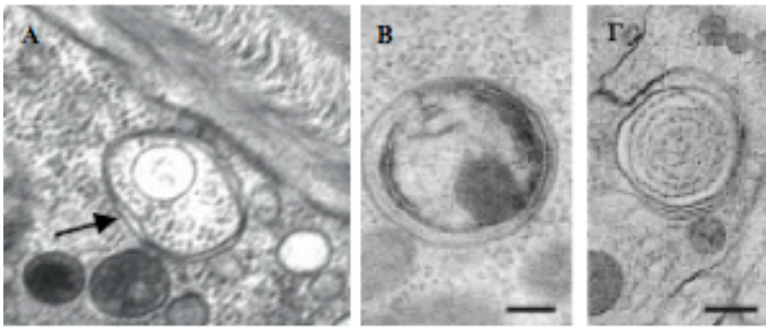
Πίνακας 3. Γονίδια Αυτοφαγίας στο *C. elegans*.

Στον πίνακα αναγράφονται αυτοφαγικά γονίδια της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, του ανθρώπου (*Homo sapiens* ή *Hs*) και του ποντικού (*Mus Musculus* ή *Mm*), καθώς και τα ομόλογα αυτών στο νηματώδη *C. elegans*, όπως προέκυψαν μετά από χρήση του προγράμματος BLAST και σύγκριση των αποτελεσμάτων με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία. Αναφέρεται επίσης η σχετική με την αυτοφαγία λειτουργία των κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών. Σημειώνονται με σκίαση τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση του ρόλου της αυτοφαγίας στη νέκρωση.

Η συμμετοχή ομολόγων του Atg1 σε μονοπάτια μετακίνησης ενδοκυτταρικών μεμβρανών αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ νηματωδών και θηλαστικών. Το ομόλογο

του ποντικού Unc51.1 πιστεύεται ότι συμβάλλει στην αύξηση νευραξόνων μέσω διαδικασιών ενδοκύτωσης (Tomoda et al., 2004). Το ομόλογο του ανθρώπου ULK1 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες GABARAP (GABA-receptor associated protein) και GATE-16 (Golgi-associated ATPase enhancer of 16kD) (Okazaki et al., 2000). Οι ULK1 και GABARAP συνεντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, όπως το σύστημα Golgi και το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, και συμμετέχουν πιθανά στην μετακίνηση του υποδοχέα γ-αμινοβουτυρικού $GABA_A$. Η πρωτεΐνη GATE-16 εμπλέκεται στη μεταφορά μορίων στο σύστημα Golgi.

Τόσο στους νηματώδεις όσο και στα θηλαστικά η διαδικασία της αυτοφαγίας φαίνεται να συγκλίνει με μονοπάτια της ενδοκύτωσης. Στελέχη *C. elegans*, στα οποία η διαδικασία της ενδοκύτωσης με μεσολάβηση υποδοχέα είναι ελαττωματική, έχουν επίσης προβλήματα στην επιτέλεση της αυτοφαγίας. Η πρωτεΐνη *Ce*VPS-27 είναι ορθόλογη της Vps27p του ζυμομύκητα, η οποία εντοπίζεται σε ενδοσωμικές μεμβράνες και ελέγχει το σχηματισμό συμπλόκων ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Roudier et al., 2005). Μείωση της λειτουργίας της *Ce*VPS-27 δεν οδηγεί μόνο σε προβλήματα ενδοκύτωσης, όπως η συσσώρευση ενδοσωμάτων μεγάλου μεγέθους και οι ανωμαλίες στη μεταφορά χοληστερόλης και στη μετακίνηση του μεμβρανικού υποδοχέα LPR-1 (lipoprotein receptor-1), αλλά και στη συσσώρευση αυτοφαγοσωμάτων στην επιδερμίδα των νηματωδών.



Εικόνα 15. Αυτοφαγοσώματα σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης στα κύτταρα "ραφής" της υποδερμίδας του *C. elegans* κατά το σχηματισμό προνυμφών dauers (A: www.grc.org, B και Γ: (Melendez et al., 2003)).

Μελέτες σε νηματώδεις έχουν οδηγήσει επίσης σε νέα δεδομένα σχετικά με τη συμβολή της αυτοφαγίας σε αναπτυξιακές διαδικασίες και στην αναμόρφωση ιστών. Ζώα που εκφράζουν μεταλλαγμένα αλληλόμορφα του *bec-1* εμφανίζουν εμβρυϊκή θνησιμότητα ή σταματούν να αναπτύσσονται σε συγκεκριμένα προνυμφικά στάδια (Melendez et al., 2003). Επιπλέον, η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας είναι απαραίτητη για τη στένωση του σώματος και το σχηματισμό της επιδερμικής άλεος κατά τη δημιουργία προνυμφών dauers (Εικ. **15**).

Άλλωστε η αυτοφαγία επάγεται γενικότερα ως απόκριση σε καταστάσεις ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού στρες, όπως η συσσώρευση μη λειτουργικών-κατεστραμμένων συστατικών του κυτταροπλάσματος και η έλλειψη θρεπτικών, ανάλογες με αυτές που προκαλούν και το σχηματισμό προνυμφών dauers.

Μεγάλο είναι το πλήθος των ενδείξεων για την εμπλοκή της αυτοφαγίας σε διαδικασίες γήρανσης νηματωδών. Φαίνεται μάλιστα ότι συσχετίζεται θετικά με τη διάρκεια ζωής. Καταρχήν, το μοριακό μονοπάτι που ξεκινά από τον παράγοντα IGF-1 (insulin-like growth factor-1), η ενεργοποίηση του οποίου μειώνει το χρόνο ζωής, συνδέεται με την κινάση TOR, που είναι αρνητικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας (Houthoofd et al., 2007). Η TOR αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Raptor (DAF-15 στο *C. elegans*) και το σύμπλοκο που σχηματίζουν παίζει ρόλο στην αντίληψη της διαθεσιμότητας αμινοξέων και τον έλεγχο, βάσει αυτής, της μεταγραφής και της μετάφρασης (Jia et al., 2004). Στελέχη νηματωδών με μεταλλαγές στα γονίδια *daf-15* ή *let-363*, που κωδικοποιούν τη Raptor και τη *Ce*TOR αντίστοιχα, ζουν περισσότερο από στελέχη άγριου τύπου (Vellai et al., 2003). Όσον αφορά στη *Ce*TOR, το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται στην ατροφία του εντέρου, την οποία προκαλεί η έλλειψή της (Long et al., 2002). Εξάλλου, επιμήκυνση του χρόνου ζωής έχει διαπιστωθεί και σε στελέχη με πρόβλημα στην πρόσληψη τροφής και αποδίδεται σε μείωση των προσλαμβανόμενων θερμίδων (Lakowski and Hekimi, 1998). Τα ίδια ζώα εμφανίζουν και αυξημένα επίπεδα αυτοφαγίας, συνδέοντας έτσι την αυτοφαγία με την αυξημένη βιωσιμότητα (Morck and Pilon, 2006). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, μείωση της έκφρασης των αυτοφαγικών γονιδίων *bec-1*, *atgr-7* και *atgr-12* οδηγεί σε ελάττωση της διάρκειας ζωής (Hars et al., 2007). Καταστολή της έκφρασης του *bec-1* επηρεάζει ακόμα τη βιωσιμότητα των προνυμφών dauers (Melendez et al., 2003). Η συμβολή της αυτοφαγίας στη γήρανση έχει δειχθεί και σε άλλα πειραματικά μοντέλα, όπως η Drosophila και οι καλλιέργειες ανθρώπινων ινοβλαστών (Codogno and Meijer, 2005; Kapahi et al., 2004).

Πρόσφατες μελέτες στο *C. elegans* έχουν αποκαλύψει τη συμμετοχή της αυτοφαγίας στη ρύθμιση της ενδυνάμωσης ανασταλτικών συνάψεων και συνεπώς της ισορροπίας μεταξύ διεγερτικών και ανασταλτικών προσλαμβανόμενων ερεθισμάτων (Bamber and Rowland, 2006; Rowland et al., 2006). Απώλεια νεύρωσης των ραχιαίων μυών επηρεάζει τη σταθερότητα μετασυναπτικών υποδοχέων $GABA_A$, προκαλώντας την ενδοκύτωση και μεταφορά αυτών σε αυτοφαγοσώματα, για να αποδομηθούν. Υποδοχείς $GABA_A$ εντοπίζονται σε αυτοφαγοσώματα και σε μύες με φυσιολογική νεύρωση, αν και σε πολύ μικρότερο βαθμό. Παρόλο που η απουσία συναπτικής επαφής επηρεάζει επίσης την τοποθέτηση υποδοχέων ακετυλοχολίνης στις μετασυναπτικές μεμβράνες, δεν οδηγεί ωστόσο σε μεταφορά τους σε αυτοφαγοσώματα, υποδεικνύοντας ότι η αυτοφαγία μπορεί να δρα και επιλεκτικά για ορισμένα διαλυτά κυτταροπλασματικά υποστρώματα.

V.δ. Αυτοφαγία & κυτταρικός θάνατος

Η αυτοφαγία έχει συσχετιστεί άμεσα με μονοπάτια κυτταρικού θανάτου. Η παρουσία μεγάλου αριθμού αυτοφαγικών κυστιδίων αποτελεί άλλωστε το βασικό χαρακτηριστικό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου τύπου ΙΙ ή αυτοφαγικού θανάτου. Υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν τόσο τον προστατευτικό όσο και τον καταστρεπτικό ρόλο της αυτοφαγίας κατά την καταστροφή των κυττάρων (Baehrecke, 2005; Cuervo, 2004; Shintani and Klionsky, 2004). Η συμμετοχή της αυτοφαγίας στη μαζική απώλεια ιστών κατά την ανάπτυξη έχει συζητηθεί σε προηγούμενη παράγραφο. Στο κείμενο που ακολουθεί γίνεται προσπάθεια να παρουσιαστούν δεδομένα που τη συνδέουν με συγκεκριμένους μηχανισμούς κυτταρικού εκφυλισμού, όπως η απόπτωση, καθώς και με παθολογικές εκφυλιστικές καταστάσεις. Έμφαση δίνεται σε στοιχεία που έχουν προκύψει από μελέτες στο *C. elegans*.

Η σχέση μεταξύ απόπτωσης και αυτοφαγίας είναι αρκετά περίπλοκη (Levine, 2007). Οι δύο διαδικασίες έχουν κοινά εκτελεστικά και ρυθμιστικά μόρια και συχνά ενεργοποιούνται παράλληλα στα ίδια κύτταρα. Σε κάποιες περιπτώσεις η αυτοφαγία καθυστερεί την έναρξη της απόπτωσης (π.χ. σε έλλειψη θρεπτικών ή μετά από την επίδραση παραγόντων που βλάπτουν το γενετικό υλικό), ενώ σε άλλες απαιτείται για την επιτέλεσή της (π.χ. μετά από μόλυνση από τον ιό ανοσοανεπάρκειας HIV), ή για την απομάκρυνση των αποπτωτικών σωματιδίων.

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν τη συμμετοχή της αυτοφαγίας στη ρύθμιση αποπτωτικών διαδικασιών. Καταρχάς, έχουν διαπιστωθεί αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτοφαγικών και αποπτωτικών μορίων. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 ή Bcl-X_L του ΕΔ καταστέλλουν την αυτοφαγία, που επάγεται από υψηλές συγκεντρώσεις κυτταροπλασματικού ασβεστίου σε κυτταροκαλλιέργειες θηλαστικών, συχνά μέσω αλληλεπίδρασης με την περιοχή BH3 (Bcl-2 homology 3) της πρωτεΐνης Beclin1 (Criollo et al., 2007; Hoyer-Hansen et al., 2007; Oberstein et al., 2007). Η σύνδεση αυτή παρεμποδίζεται πιθανά από την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bad, ενεργοποιώντας την αυτοφαγική διαδικασία σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων (Maiuri et al., 2007). Παρομοίως, στο *C. elegans* η BEC-1 σχηματίζει σύμπλοκο με τη CED-9, που είναι ορθόλογη της Bcl-2 στους νηματώδεις (Takacs-Vellai et al., 2005). Η έλλειψή της επάγει αποπτωτικούς μηχανισμούς, προκαλώντας υψηλό ποσοστό εμβρυϊκής θνησιμότητας. Σε αναλογία επίσης με τη δράση της Bad, η αυτοφαγία στους νηματώδεις φαίνεται να εξαρτάται από την EGL-1, το μοναδικό μόριο που φέρει αποκλειστικά περιοχές BH3 σε αυτόν τον οργανισμό (Maiuri et al., 2007). Η συσχέτιση μεταξύ ελαττωματικών μηχανισμών αυτοφαγίας και αυξημένης απόπτωσης διαφαίνεται και σε στελέχη *C. elegans* με μεταλλαγές στο γονίδιο *cup-5*. Αυτό είναι ομόλογο του γονιδίου mucolipin-1 του ανθρώπου, το οποίο κωδικοποιεί ένα μη εκλεκτικό κανάλι κατιόντων και μεταλλαγές του προκαλούν την ασθένεια Mucolipidosis τύπου IV, που σχετίζεται με

δυσλειτουργία των λυσοσωμάτων. Το *cup-5* του *C. elegans* απαιτείται για τη ομαλή βιογένεση των λυσοσωμάτων, με αποτέλεσμα η δυσλειτουργία του να επηρεάζει αρνητικά και την ολοκλήρωση της αυτοφαγίας (Schaheen et al., 2006). Τα έμβρυα αυτών των στελεχών βρίσκονται υπό συνθήκες πείνας και η αδυναμία να τις αντιμετωπίσουν μέσω επαγωγής αυτοφαγικών μονοπατιών, οδηγεί τελικά στο θάνατο λόγω υπερβολικής απόπτωσης. Ανάλογη είναι η κατάσταση στην ασθένεια Mucolipidosis τύπου IV, όπου απόπτωση επάγεται ως συνέπεια της αδυναμίας αυτοφαγικής αποδόμησης ελαττωματικών μιτοχονδρίων (Jennings et al., 2006). Οι παρατηρήσεις αυτές καταδεικνύουν τον προστατευτικό ρόλο της αυτοφαγίας έναντι της απόπτωσης.

Πολύ συχνά ωστόσο, η λειτουργία αυτοφαγικών γονιδίων φαίνεται να είναι απαραίτητη για το θάνατο κυττάρων, στα οποία οι αποπτωτικοί μηχανισμοί δεν είναι ενεργοί. Τέτοια κύτταρα είναι οι ώριμοι νευρώνες και συχνά τα καρκινικά κύτταρα. Οι αποκρίσεις των ώριμων νευρικών κυττάρων διαφέρουν από την κλασσική απόπτωση των αναπτυσσόμενων νευρώνων, όταν και οι δύο τύποι εκτίθενται σε όμοια ερεθίσματα (Chu, 2006). Η διαφορά οφείλεται πιθανά σε παρουσία αναστολέων της απόπτωσης στους ώριμους νευρώνες. Έτσι, κλασσικά αποπτωτικά ερεθίσματα ενεργοποιούν την αυτοφαγία σε συμπαθητικούς νευρώνες. Όσον αφορά στα καρκινικά κύτταρα, η δημιουργία τους οφείλεται συχνά σε μεταλλαγές που μπλοκάρουν την απόπτωση. Η αυτοφαγία εμποδίζει πιθανά την καρκινογένεση μέσω της πρόκλησης κυτταρικού θανάτου, της απομάκρυνσης πηγών οξειδωτικού στρες, που προκαλεί βλάβες στο DNA ή αναστέλλοντας την κυτταρική αύξηση (Levine, 2007). Από την άλλη πλευρά, η αυτοφαγία μπορεί να συμβάλλει στην επιβίωση καρκινικών κυττάρων στο εσωτερικό όγκων, όπου δεν υπάρχει πρόσβαση σε θρεπτικά που μεταφέρονται με την κυκλοφορία του αίματος, ή να παρεμποδίζει το θάνατό τους από μεταλλαγές που προκαλούν οξειδωτικό στρες ή μετά από χημειοθεραπεία (Cuervo, 2004). Άλλωστε, πολλοί από τους παράγοντες που χρησιμοποιούνται σε χημειοθεραπείες επάγουν την αυτοφαγία.

Γενικότερα, ο ρόλος της αυτοφαγίας σε παθολογικές καταστάσεις μπορεί να είναι προστατευτικός ή καταστρεπτικός ανάλογα με το στάδιο της νόσου, το κυτταρικό περιβάλλον και συχνά το είδος της θεραπευτικής παρέμβασης (Cuervo, 2004). Η περίπτωση της καρκινογένεσης που αναφέρθηκε προηγουμένως αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα. Πρόσφατες μελέτες σχετικά με την παθογένεση νευροεκφυλιστικών ασθενειών δείχνουν ότι η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας και γενικότερα του λυσοσωμικού συστήματος είναι επίσης πιθανό να λειτουργεί προστατευτικά, τουλάχιστον σε αρχικά στάδια (Butler et al., 2006; Komatsu et al., 2007). Διευκολύνοντας την απομάκρυνση ολιγομερών και πρωτεϊνών, που τείνουν να δημιουργούν συσσωματώματα, η αυτοφαγία παρεμποδίζει την απόθεση συσσωματωμάτων. Όσο οι αλλαγμένες ή μη λειτουργικές πρωτεΐνες δεν έχουν ακόμα

αναδιπλωθεί, η απομάκρυνσή τους πραγματοποιείται επιλεκτικά μέσω των πρωτεοσωμάτων και της αυτοφαγίας με τη μεσολάβηση chaperones (CMA). Τα ολιγομερή όμως και οι ινώδεις δομές είναι δυνατόν να διασπαστούν μόνο μέσω του λυσοσωμικού συστήματος, για παράδειγμα με αυτοφαγία (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007).

Υπάρχει σωρία πειραματικών δεδομένων που επιβεβαιώνει το προηγούμενο μοντέλο. Καταρχάς, αυξημένος αριθμός αυτοφαγοσωμάτων έχει παρατηρηθεί στον εγκέφαλο και τους λεμφοβλάστες ασθενών με νόσο του Huntington (Larsen and Sulzer, 2002; Rubinsztein et al., 2005). Γιγαντιαία και ποικίλου μεγέθους αυτοφαγοσώματα εμφανίζονται επίσης σε απολήξεις νευραξόνων ασθενών που πάσχουν από Creutzfeld Jacobs και άλλες νόσους που προκαλούνται από πρωτεΐνες prions. Ο αριθμός αυτοφαγοσωμάτων είναι αυξημένος στη μέλαινα ουσία ατόμων που πάσχουν από τη νόσο του Parkinson και γενικά σε ασθένειες που σχετίζονται με σχηματισμό σωματιδίων Lewy (Anglade et al., 1997; Chu, 2006). Περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη παρόμοια νόσο, αύξηση της ενεργότητας του λυσοσωμικού και αυτοφαγικού συστήματος έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς και πειραματικά μοντέλα της νόσου του Alzheimer.

Ο μηχανισμός ενεργοποίησης της αυτοφαγίας στις παραπάνω περιπτώσεις δεν είναι απόλυτα σαφής. Είναι πιθανό να οφείλεται στη αναστολή της δράσης των πρωτεοσωμάτων και της CMA, ή στη δέσμευση κυτταρικών αναστολέων της αυτοφαγίας σε συσσωματώματα (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007). Δυσλειτουργία πρωτεοσωμάτων έχει διαπιστωθεί σε διαγονιδιακές σειρές νηματωδών, που εκφράζουν μορφές της Ataxin-3 με ποικίλα μεγέθη πολυ-γλουταμινικών αλληλουχιών στο νευρικό σύστημα (Khan et al., 2006). Η μειωμένη λειτουργικότητά τους σε μεταλλαγμένα στελέχη Drosophila ή σε διαγονιδιακά στελέχη-μοντέλα της νευροεκφυλιστικής ασθένειας Spinobulbar muscular atrophy, προκαλεί νευροεκφυλισμό και παράλληλη ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, που εξαρτάται από την απακετυλάση ιστονών HDAC6 (Histone Deacetylase 6) (Pandey et al., 2007). Έκφραση μάλιστα αυτού του ενζύμου προστατεύει από το νευροεκφυλισμό, υπό την προϋπόθεση ότι ο μηχανισμός αυτοφαγίας είναι λειτουργικός. Επιπλέον, η αναστολή της δράσης των πρωτεοσωμάτων επάγει την αυτοφαγία σε καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων αρουραίου (Rideout et al., 2004).

Η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας σε πρώιμα στάδια είναι πιθανό να ευνοεί την επιβίωση των κυττάρων, αποδομώντας παράγοντες που μπορούν να επάγουν απόπτωση, όπως τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια (Rubinsztein, 2006). Επιπλέον, μέσω αυτοφαγίας απομακρύνονται μεταλλαγμένες μορφές της huntingtin και της ataxin 3 με μακριές πολυ-γλουταμινικές αλυσίδες, μεταλλαγμένες μορφές συνουκλεΐνης-α και διάφορες μορφές της tau, που τείνουν να σχηματίζουν ολιγομερή ή συσσωματώματα (Qin et al., 2003; Rubinsztein, 2006; Sarkar et al., 2007). Μείωση της έκφρασης αυτοφαγικών γονιδίων σε διαγονιδιακούς

νηματώδεις, που εκφράζουν πολυ-γλουταμινικές αλληλουχίες, προκαλεί πιο γρήγορη και αυξημένη συσσώρευση συσσωματωμάτων κι ενισχύει την τοξικότητά τους (Jia et al., 2007). Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει σε ποντίκια και μύγες (Ravikumar et al., 2004).

Η γήρανση ή/και οι συσσωρευόμενες ενεργές ρίζες οξυγόνου φαίνεται ότι ελαττώνουν την ενεργότητα του αυτοφαγικού-λυσοσωμικού συστήματος (Nixon et al., 2000). Η αδυναμία της αυτοφαγίας να διατηρήσει ένα απαραίτητο επίπεδο πρωτεόλυσης προκαλεί ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής και απομάκρυνσης μη λειτουργικών μορίων, οδηγώντας σε συσσώρευση τοξικών προϊόντων και καταστροφή των νευρώνων σε προχωρημένα στάδια νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Σε συμφωνία με την υπόθεση ότι η δυσλειτουργία της αυτοφαγικής αποδόμησης συμβάλλει στην ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών ασθενειών, έχει παρατηρηθεί προοδευτικός νευροεκφυλισμός σε περιπτώσεις όπου η ολοκλήρωση της αυτοφαγίας δεν είναι εφικτή, για παράδειγμα σε στελέχη ποντικών που δεν εκφράζουν τις καθεψίνες B και L ή την καθεψίνη D (Boland and Nixon, 2006). Έχει διαπιστωθεί ακόμα ότι η σύντηξη αυτοφαγοσωμάτων με λυσοσώματα μειώνεται κατά τη γήρανση, προσφέροντας έτσι μια εξήγηση για τη συχνή εμφάνιση εκφυλιστικών καταστάσεων σε μεγάλες ηλικίες. Παράγοντες όπως μεταλλαγές στην πρεσενιλίνη και η απολιποπρωτεΐνη ApoE4, που προδιαθέτουν για την εκδήλωση της νόσου του Alzheimer, είναι δυνατόν να προωθούν ακριβώς τη δυσλειτουργία της αυτοφαγίας. Χαρακτηριστικό είναι και το παράδειγμα της ασθένειας Juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis, που οδηγεί σε πνευματική καθυστέρηση, αμνησία και εκτεταμένο νευροεκφυλισμό. Προκαλείται από μεταλλαγές στη μεμβρανική πρωτεΐνη CLN3, η οποία εντοπίζεται σε ενδοσώματα και λυσοσώματα. Ο νευροεκφυλισμός συνοδεύεται από αύξηση του αριθμού αυτοφαγοσωμάτων, που οφείλεται πιθανότατα σε επαγωγή της αυτοφαγίας και ταυτόχρονη ανικανότητα διάσπασης των αυτοφαγικών κυστιδίων σε λυσοσώματα.

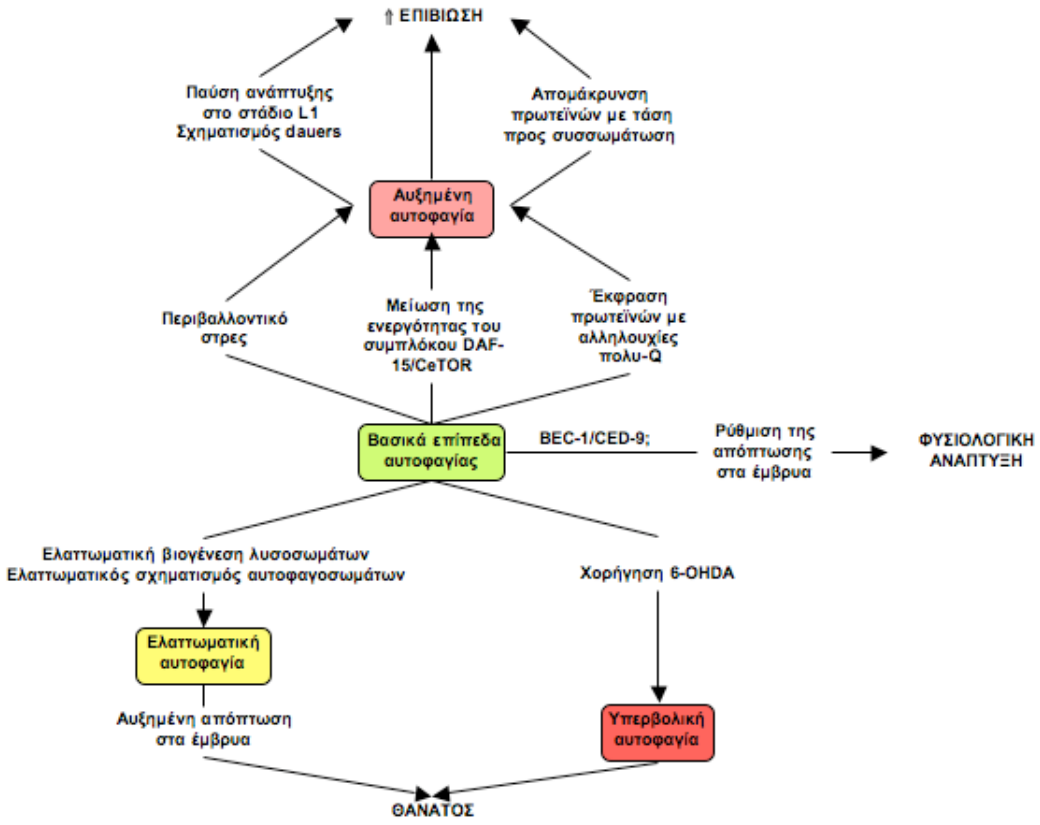
Υπάρχουν ωστόσο και δεδομένα που υποστηρίζουν ενεργό συμμετοχή της αυτοφαγίας στον κυτταρικό θάνατο. Τα αυτοφαγοσώματα που συσσωρεύινται σε δυστροφικούς νευρίτες κατά τη νόσο του Alzheimer συγκεντρώνουν υδρολυτικά ένζυμα, η απελευθέρωση των οποίων είναι δυνατό να ενεργοποιήσει αποπτωτικές ή νεκρωτικές διαδικασίες (Rubinsztein et al., 2005). Επιπλέον, περιέχουν APP (Amyloid Precursor Protein), πεπτίδια Αβ και πρωτεάσες, όπως BASE και πρεσενιλίνες, και συμβάλλουν πιθανότατα στην παραγωγή των τοξικών πεπτιδίων Αβ (Yu et al., 2005; Zheng et al., 2006). Μελέτες σε νηματώδεις έχουν δείξει ότι τα αυτοφαγικά γονίδια *bec-1* και *unc-51* απαιτούνται για το θάνατο ντοπαμινεργικών νευρώνων μετά από έκθεση ζώων στη νευροτοξίνη 6-OHDA (Toth et al., 2007). Η ενεργοποίηση του λυσοσωμικού-αυτοφαγικού συστήματος (αύξηση των επιπέδων καθεψίνης L στα λυσοσώματα και εμφάνιση αυτοφαγοσωμάτων) φαίνεται ότι

συμβάλλει επίσης στο θάνατο κοκκιωδών εγκεφαλικών νευρώνων αρουραίων, όταν καλλιεργούνται απουσία ορού και καλίου (Kaasik et al., 2005).

Μελέτες σε διάφορα πειραματικά μοντέλα παρέχουν αντικρουόμενες ενδείξεις σχετικά με το ρόλο της αυτοφαγίας στον κυτταρικό θάνατο. Η δυσλειτουργία της στο *C. elegans* προκαλεί υπερβολική απόπτωση, οδηγώντας σε εμβρυϊκό θάνατο και επιταχύνει τη γήρανση, ενώ η επαγωγή της διευκολύνει την απομάκρυνση τοξικών πρωτεϊνών και βοηθά στην επιβίωση (Εικ. **16**) (Jia et al., 2007; Melendez et al., 2003; Schaheen et al., 2006; Vellai et al., 2003). Η παροδική ενεργοποίηση της αυτοφαγίας σε συγκεκριμένους ιστούς είναι απαραίτητη για την επιβίωση νεογέννητων ποντικιών (Kuma et al., 2004). Ένα βασικό επίπεδο αυτοφαγίας απαιτείται επίσης στο νευρικό σύστημα ενήλικων ποντικιών, για να αποτρέψει τη συσσώρευση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και μη αποδομήσιμων έγκλειστων σωματιδίων, που προκαλούν νευρικό εκφυλισμό (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006). Η διαδικασία της αυτοφαγίας συμβάλλει ακόμη σε αποκρίσεις ειδικής ή μη ανοσίας, συμμετέχοντας στην παρουσίαση αντισωμάτων και διευκολύνοντας την καταστροφή παθογόνων εισβολέων αντίστοιχα (Cuervo, 2004; Shintani and Klionsky, 2004). Από την άλλη πλευρά, καταστολή της αυτοφαγίας σε νηματώδεις προστατεύει τα νευρικά κύτταρα από την επίδραση της νευροτοξίνης 6-OHDA (Εικ. **16**) (Toth et al., 2007). Η ενεργός συμβολή της αυτοφαγίας στην καταστροφή κυττάρων έχει δειχθεί ακόμη σε κύτταρα με ελαττωματικούς μηχανισμούς απόπτωσης, μετά από υπρέκφραση Atg1 ή Beclin 1, η οποία δε μπορεί να προσδεθεί σε Bcl-2, αλλά και ως απόκριση σε IFN-γ (ιντερφερόνη-γ), σε σήματα που παράγονται μετά από μόλυνση με τον ιό HIV και σε ποικίλα αποπτωτικά ερεθίσματα (Pattingre et al., 2005; Scott et al., 2007; Yoshimori, 2007). Το αυτοφαγικό γονίδιο Atg5 μπορεί να αλληλεπιδρά με τους παράγοντες FADD ή Bcl-x_L, σε συγκεκριμένα μονοπάτια κυτταρικού θανάτου (Pyo et al., 2005). Ο διπλός ρόλος της αυτοφαγίας γίνεται επίσης ιδιαίτερα εμφανής σε ό,τι αφορά στη λειτουργία του Beclin 1 σε καρκινικά κύτταρα (Hoyer-Hansen et al., 2005). Παρόλο που η υπερέκφρασή του ευαισθητοποιεί καρκινικά κύτταρα MCF-7 (human breast adenocarcinoma cell line 7) σε αυτοφαγικό θάνατο μετά από χορήγηση του αναλόγου της βιταμίνης D EB1089, απώλεια του γονιδίου αναστέλλει την αύξηση και μειώνει τη σύνθεση DNA.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η αυτοφαγία παίζει πρωταρχικά προστατευτικό ρόλο, αποδομώντας κατεστραμμένα συστατικά του κυττάρου ή παρέχοντας ενέργεια, όταν η διαθεσιμότητα άλλων ενεργειακών πηγών είναι χαμηλή. Διευκολύνει έτσι την επιβίωση σε μη ευνοϊκές συνθήκες, παρέχοντας στα κύτταρα το χρόνο που χρειάζονται, για να προσαρμοστούν σε αυτά τα περιβάλλοντα χωρίς να ενεργοποιήσουν μηχανισμούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ωστόσο, τόσο η καταστολή όσο και η υπερβολική ενεργοποίησή της επάγουν μία μορφή "αυτοφαγικού στρες", με δυσμενείς συνέπειες για τα

ευαίσθητα κύτταρα (Chu, 2006). Αφενός, η μείωση της αυτοφαγίας επιτρέπει την παραμονή καταστρεπτικών γι΄αυτά μορίων, αφετέρου η υπερ-ενεργοποίησή της είναι δυνατόν να προκαλέσει ανεξέλεγκτη αποδόμηση χρήσιμων κυτταρικών συστατικών.



Εικόνα 16. Λειτουργίες της αυτοφαγίας που προωθούν την επιβίωση ή το θάνατο του νηματώδους. Η αυτοφαγία απαιτείται για τη φυσιολογική ανάπτυξη του *C. elegans* και η δυσλειτουργία της προκαλεί υπερβολική απόπτωση σε έμβρυο, οδηγώντας στο θάνατο αυτών. Διευκολύνει ωστόσο και την επιβίωση υπό αντίξοες συνθήκες, συμβάλλοντας στο σχηματισμό ανθεκτικών προνυμφών dauers, ή αποδομώντας πρωτεΐνες που τείνουν να δημιουργούν συσσωματώματα. Επιπλέον, η αύξηση των επιπέδων αυτοφαγίας αυξάνει τη διάρκεια ζωής του νηματώδους. Η ενεργοποίησή της όμως μετά από έκθεση ζώων στη νευροτοξίνη 6-OHDA επάγει το θάνατο νευρικών κυττάρων.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο κείμενο που ακολουθεί περιγράφονται αναλυτικά τα στελέχη των οργανισμών και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και οι πειραματικές τεχνικές οι οποίες εφαρμόστηκαν, προκειμένου να διερευνηθούν τα ερευνητικά ερωτήματα, που τέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Στελέχη νηματωδών

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω στελέχη του νηματώδους *Caenorhabditis elegans*:

Στελέχη άγριου τύπου:

- N2 Bristol

Μεταλλαγμένα στελέχη:

- GS1912: *arIs37*[p_{myo-3}ssGFP]*I;dpy-20(e1282)IV,* το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας σε πειράματα με το στέλεχος GS2643,
- *arIs37*[p_{myo-3}ssGFP]*I;dpy-20(e1282)IV;mec-4(u231)X,*
- GS2643: *arIs37*[p_{myo-3}ssGFP]*I;cup-5(ar465)III;dpy-20(e1282)IV,* το οποίο αναφέρεται στο κείμενο απλά ως *cup-5(ar465)*,
- *arIs37*[p_{myo-3}ssGFP]*I;cup-5(ar465)III;dpy-20(e1282)IV;deg-3(u662)V*,
- *arIs37*[p_{myo-3}ssGFP]*I;cup-5(ar465)III;dpy-20(e1282)IV;mec-4(u231)X*,
- VC517: *bec-1(ok691)IV/nT1[qIs51](IV;V),*
- *cad-1(j1)II,*
- *cad-1(j1)II;mec-4(u231)X*,
- *clp-1(tm858)III,*
- *clp-1(tm858)III;mec-4(d)X,*
- *clp-1(tm858)III;unc-51(e369)V;mec-4(d)X,*
- TU1747: *deg-3(u662)V*, το οποίο στο κείμενο αναφέρεται ως *deg-3(d)*,
- *deg-3(u662)unc-51(e369)V*,
- *deg-3(u662)V;vha-12(n2915)X,*
- *dpy-5(e61)I;mec-4(d)X,*
- KR1577: *dpy-5(e61)unc-13(e450)I;szDp1(I;X;f),*
- *dpy-5(e61)unc-13(e450)I;mec-4(d)X,*
- KR1440: *dpy-5(e61)vps-34(h797)unc-13(e450)I;sDp2(I;f),*
- *dpy-5(e61)vps-34(h797)unc-13(e450)I;mec-4(d)X;sDp2(I;f),*
- GR1373: *eri-1(mg366)IV,*
- *eri-1(mg366)IV;mec-4(u231)X*,
- *glo-1(kx92)X*,
- JJ1271: *glo-1(zu391)X*,

- *glo-1(zu437)X,*
- *glo-1(kx92)mec-4(u231)X,*
- *glo-1(zu391)mec-4(u231)X*,
- *glo-1(zu437)mec-4(u231)X,*
- KR344: *let-363(h98)dpy-5(e61)unc-13(e450)I;sDp2(I;f),*
- *let-363(h98)dpy-5(e61)unc-13(e450)I;mec-4(d)X;sDp2(I;f),*
- *let-363(h98)dpy-5(e61)unc-13(e450)I;zdIs4*[p_{mec-4}GFP]IV*;sDp2(I;f),*
- *MT10430: lin-35(n745)I*,
- *lin-35(n745)I;mec-4(u231)X,*
- *mec-4(u231)X*, το οποίο στο κείμενο αναφέρεται ως *mec-4(d),*
- KP137: *nuIs5*[p_{glr-1}Gα_s(Q227L)p_{glr-1}GFP], το οποίο στο κείμενο αναφέρεται ως α_s*(gf)*
- NL2099:*rrf-3(pk1426)II*,
- *rrf-3(pk1426)II;mec-4(u231)X*,
- BA763: *spe-5(hc93)I;sDp2(I;f)*,
- *spe-5(hc93)I;mec-4(u231)X*,
- CB57*: unc-14(e57)I,*
- *unc-14(e57)I;mec-4(d),*
- CB189: *unc-32(e189)III,*
- *unc-32(e189)III;deg-3(u662)V,*
- *unc-32(e189)III;mec-4(u231)X,*
- *unc-32(e189)III;nuIs5*[p_{glr-1}Gα_s(Q227L)p_{glr-1}GFP],
- CB369: *unc-51(e369)V*,
- CB1189: *unc-51(e1189)V*,
- *unc-51(e369)V;mec-4(u231)X*,
- *unc-51(e1189)V;mec-4(u231)X*,
- *unc-51(e1189)V; nuIs5*[p_{glr-1}Gα_s(Q227L)p_{glr-1}GFP],
- *vab-8(gm99)V;mec-4(d)X*,
- *vab-8(gm107)V;mec-4(d)X*,
- MT7907: *vha-12(n2915)X,*
- *vha-12(n2915)mec-4(u231)X,*
- *vha-12(n2915)X;nuIs5*[p_{glr-1}Gα_s(Q227L)p_{glr-1}GFP],
- SK4005: *zdIs5*[p_{mec-4}GFP]I,
- *zdIs5*[p_{mec-4}GFP]I*;mec-4(u231)X*,
- *zdIs5*[p_{mec-4}GFP]I*;unc-32(e189)III;mec-4(u231)X*,
- *zdIs5*[p_{mec-4}GFP]I*;unc-51(e369)V*,
- *zdIs5*[p_{mec-4}GFP]I*;unc-51(e369)V;mec-4(u231)X*.

↳ Στελέχη που φέρουν εξωχρωμοσωμικές αλληλουχίες:

- N2*;Ex*[p$_{lgg-1}$DsRED::LGG-1],
- *zdIs5* [p$_{mec-4}$GFP]I;*Ex*[p$_{lgg-1}$DsRED::LGG-1],
- *zdIs5* [p$_{mec-4}$GFP]I*;mec-4(u231)X;Ex*[p$_{lgg-1}$DsRED::LGG-1],

- N2;*Ex*[p$_{lgg-1}$DsRED::LGG-1;p$_{mec-7}$mitoGFP],
- *mec-4(u231)X;Ex*[p$_{lgg-1}$DsRED::LGG-1;p$_{mec-7}$mitoGFP],

- N2;*Ex*[p$_{lgg-1}$DsRED::LGG-1;p$_{mec-17}$LMP-1::GFP],
- *mec-4(u231)X;Ex*[p$_{lgg-1}$DsRED::LGG-1;p$_{mec-17}$LMP-1::GFP],

- N2*;Ex*[p$_{mec-4}$MEC-4::GFP],
- *let-363(h98)dpy-5(e61)unc-13(e450)I;sDp2(I;f);Ex*[p$_{mec-4}$MEC-4::GFP],
- *unc-32(e189)III;Ex*[p$_{mec-4}$MEC-4::GFP],
- *unc-51(e1189)V;Ex*[p$_{mec-4}$MEC-4::GFP],

- N2*;Ex*[p$_{mec-7}$GFP::LGG-1],
- *arIs37*[p$_{myo-3}$ssGFP]*I;cup-5(ar465)III;Ex*[p$_{mec-7}$GFP::LGG-1],
- *mec-4(u231)X;Ex*[p$_{mec-7}$GFP::LGG-1],
- *vha-12(n2915)X;Ex*[p$_{mec-7}$GFP::LGG-1],
- *vha-12(n2915)mec-4(u231)X;Ex*[p$_{mec-7}$GFP::LGG-1],

- N2*;Ex*[p$_{mec-7}$RmpHluorin],
- *mec-4(u231)X;Ex*[p$_{mec-7}$RmpHluorin],
- *vha-12(n2915)mec-4(u231)X;Ex*[p$_{mec-7}$RmpHluorin],

- N2*;Ex*[p$_{mec-7}$SepHluorin],
- *mec-4(u231)X;Ex*[p$_{mec-7}$SepHluorin],
- *vha-12(n2915)mec-4(u231)X;Ex*[p$_{mec-7}$SepHluorin],

- *N2;Ex*[p$_{mec-17}$BEC-1::GFP],
- *mec-4(u231)X;Ex*[p$_{mec-17}$BEC-1::GFP],

- *N2;Ex*[p$_{mec-17}$LMP-1::GFP],
- *cad-1(j1)II;mec-4(u231)X;Ex*[p$_{mec-17}$LMP-1::GFP],
- *cup-5(ar465)III;mec-4(u231)X;Ex*[p$_{mec-17}$LMP-1::GFP],
- *glo-1(zu391)mec-4(u231)X;Ex*[p$_{mec-17}$LMP-1::GFP],

• *mec-4(u231)X;Ex*[p_{mec-17}LMP-1::GFP].

Τα περισσότερα στελέχη προέρχονται από το Γενετικό Κέντρο για το νηματώδη *Caenorhabditis* (*Caenorhabditis* Genetics Center ή CGC), που εδράζεται στο Πανεπιστήμιο της Minnesota. Το στέλεχος *clp-1(tm858)III* προέρχεται από το Center for Genetic Resource Information του Εθνικού Ινστιτούτου Γενετικής της πόλης Mishima στην Ιαπωνία. Το στέλεχος *vha-12(n2915)X* χορηγήθηκε από τον Erik Jorgensen (Department of Biology, University of Utah, Salt Lake City, USA), ενώ τα αλληλόμορφα *kx97* και *zu437* του γονιδίου *glo-1* από τον G. Hermann (Lewis and Clark College, Portland, OR).

Θα αναφερθούν στη συνέχεια ειδικές περιπτώσεις στελεχών-αλληλομόρφων και ορισμένες τεχνικές λεπτομέρειες σχετικά με το χειρισμό τους.

➪ KR1440: *dpy-5(e61)vps-34(h797)unc-13(e450)I;sDp2(I;f),*

➪ KR344: *let-363(h98)dpy-5(e61)unc-13(e450)I;sDp2(I;f)* και

➪ BA763: *spe-5(hc93)I;sDp2(I;f)*:

Ζώα ομόζυγα για τα αλληλόμορφα *vps-34(h797)* και *let-363(h98)* σταματούν να αναπτύσσονται σε ενδιάμεσο και προχωρημένο προνυμφικό στάδιο αντίστοιχα (www.wormbase.org). Ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο *spe-5(hc93)* προκαλεί στειρότητα εξαιτίας ανωμαλιών στη διαδικασία σπερματογένεσης (Machaca and L'Hernault, 1997). Τα στελέχη αυτά διατηρούνται παρουσία του εξωχρωμικού διπλασιασμένου τμήματος του χρωμοσώματος I, *sDp2(I;f)*, που φέρει τα αλληλόμορφα άγριου τύπου για τα γονίδια *dpy-5*, *let-363*, *spe-5* και *vps-34*. Η αλληλουχία *sDp2(I;f)* είναι ασταθής κατά τη μίτωση και χάνεται περίπου στο 70% των απογόνων νηματωδών που φέρουν το διπλασιασμό *sDp2(I;f)*. Για τις διασταυρώσεις των στελεχών KR1440, KR344 και BA763 χρησιμοποιήθηκαν βιώσιμοι και γόνιμοι νηματώδεις που έφεραν την αλληλουχία *sDp2(I;f)*. Σε πειράματα προσδιορισμού των επιδράσεων στη νέκρωση χρησιμοποιήθηκαν, όπου ήταν δυνατό (στην περίπτωση του *spe-5(hc93)* από το Ν. Ταβερναράκη), ζώα που είχαν χάσει τον εξωχρωμοσωμικό διπλασιασμό.

➪ VC517: *bec-1(ok691)IV/nT1[qIs51](IV;V)*:

Νηματώδεις ομόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *bec-1(ok691)* δεν είναι συνήθως ικανοί να ολοκληρώσουν την προνυμφική τους ανάπτυξη και τα λίγα άτομα που καταφέρνουν να φτάσουν στην ενηλικίωση είναι στείρα (www.wormbase.org, προσωπική παρατήρηση). Το αλληλόμορφο *ok691* διατηρείται λοιπόν στα ετερόζυγα στελέχη VC517, όπου τμήμα του χρωμοσώματος IV με το αλληλόμορφο άγριου τύπου του *bec-1* και την κωδική αλληλουχία της GFP έχει μετατοπιστεί στο χρωμόσωμα V. Οι ομόζυγοι για το αλληλόμορφο *ok691* απόγονοι αυτού του στελέχους μπορούν συνεπώς να διακριθούν, επειδή είναι οι μόνοι που δεν εκφράζουν GFP.

➪ GS2643: *arIs37*[p_{myo-3}ssGFP]*I;cup-5(ar465)III;dpy-20(e1282)IV*:

Οι νηματώδεις που φέρουν την αλληλουχία *arIs37[Pmyo-3::ssGFP]* παράγουν στους μύες του σωματικού τοιχώματος φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP, η οποία εκκρίνεται στο ψευδοκοίλωμα (Fares and Greenwald, 2001). Στη συνέχεια ενδοκυτώνεται κυρίως από ειδικά κύτταρα του ψευδοκοιλώματος, τα "coelomocytes", και αποδομείται στα λυσοσώματά τους. Η διάσπασή της ωστόσο δεν πραγματοποιείται σε ζώα ομόζυγα για το αλληλόμορφο *cup-5(ar465)*, τα οποία έχουν πρόβλημα στη βιογένεση των λυσοσωμάτων, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση GFP στα coelomocytes. Σε αυτόν το φαινότυπο βασίστηκε η διάκριση του στελέχους GS2643.

- **Βακτηριακά στελέχη**

Αναγράφονται τα βακτηριακά στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και οι γενότυποί τους:

↳ XL1-Blue (Stratagene) με γενότυπο: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F΄ *proAB lacI*qZΔ*M15* Tn*10* (Tetr)].

↳ HT115 (DE3) (CGC) με γενότυπο: *F⁻, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE), lambdα⁻, rnc14::Tn10(DE3 lysogen: lacUV5 promoter-T7 polymerase)* (Timmons and Fire, 1998).

↳ OP50 (Ewbank's lab): στέλεχος αυξοτροφικό σε ουρακίλη (Brenner, 1974).

- **Θρεπτικά μέσα και διαλύματα**

Για την ανάπτυξη και το χειρισμό των νηματωδών χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα θρεπτικά μέσα:

↳ NGM (Nematode Growth Media) (1lt):

- 3g NaCl
- 2.5g bactopeptone
- 0.2g streptomycin
- 17g agar
- 1 ml $CaCl_2$ 1M
- 1 ml $MgSO_4$ 1M
- 1 ml cholesterol (5mg/ml σε 100% αιθανόλη)
- 1 ml nystatin (100mg/ml σε 70% αιθανόλη)
- 25 ml $K{\cdot}PO_4$* 1M, pH 6

Τα διαλύματα $CaCl_2$, $MgSO_4$, $K{\cdot}PO_4$, cholesterol και nystatin προστίθενται μετά την αποστείρωση.

Αν το θρεπτικό προορίζεται για πειράματα RNAi δεν προστίθεται streptomycin. Αντί αυτής, προστίθενται μετά την αποστείρωση 500ml ampicillin 100mg/ml.

↳ Υδατικό διάλυμα M9 (1lt):

- 3gr KH_2PO_4
- 6gr Na_2HPO_4
- 5g NaCl
- 1 ml $MgSO_4$ 1M.

↳ Διάλυμα ψύξης νηματωδών (1lt):

- 5,85g NaCl
- 50 ml $K{\cdot}PO_4$* 1M, pH 6
- ~200ml glycerol
- 3 ml $MgSO_4$ 1M (Προστίθεται μετά την αποστείρωση.)

* Το διάλυμα του $K{\cdot}PO_4$ περιέχει 204.4gr KH_2PO_4 και 114.12gr K_2HPO_4 σε τελικό όγκο νερού 2000ml.

Για την ανάπτυξη των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα θρεπτικά μέσα:

↳ LB broth (Luria-Bertani medium) (1lt):

- 10g bacto-tryptone
- 5g yeast extract
- 10g NaCl
- (15g bacto-agar για στερεές καλλιέργειες σε τρυβλία)

↳ LB + ampicillin:

Το αντιβιοτικό ampicillin προστίθεται στο LB, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 50μg/ml.

↳ LB + tetracycline:

Το αντιβιοτικό tetracycline προστίθεται στο LB, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 10μg/ml.

- **Κατασκευή πλασμιδίων για την έκφραση πρωτεϊνών στο *C. elegans***

Για την κατασκευή των πλασμιδίων που περιγράφονται στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν οι συνηθισμένες τεχνικές κλωνοποίησης και υποκλωνοποίησης, όπως αναγράφονται αναλυτικά στη δικτυακή σελίδα www.MolecularCloning.com. Όλοι οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν και για τους οποίους δεν αναφέρεται προέλευση, προέρχονται από Fire Lab Vector Kit (A.Fire, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA), που περιέχει φορείς ειδικούς για έκφραση γονιδίων στο νηματώδη. Τα ένζυμα

που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις εταιρίες New England Biolabs και Minotech, ενώ όλα τα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μικροχημείας του IMBB. Για τον πολλαπλασιασμό των πλασμιδιακών φορέων και κατασκευών, πραγματοποιήθηκαν μετασχηματισμοί σε επιδεκτικά κύτταρα XL1-Blue.

p_{lgg-1}DsRED::LGG-1**

Τμήμα DNA μήκους 750bp που περιείχε την κωδική αλληλουχία του γονιδίου *lgg-1* απομονώθηκε και πολλαπλασιάστηκε με PCR από το γονιδίωμα του νηματώδους, με τα ακόλουθα ολιγονουκλεοτίδια:

5΄-GGAATTCGAAGTGGGCTTACAAGGAGGA-3′ και

5΄-GGAATTCGTCTTCTTCGTTTATTCATG-3′. Η αλληλουχία αυτή εντέθηκε σε πλασμίδιο που περιείχε την αλληλουχία p_{col-12}RFP (J.J. Ewbank, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Université de la Méditerranée, France), μεταξύ θέσεων περιορισμού EcoRI και στο καρβοξυ-τελικό άκρο του RFP, ώστε να μην καταστρέφεται το πλαίσιο ανάγνωσης. Στη συνέχεια, ο υποκινητής του γονιδίου *col-12* αντικαταστάθηκε από αυτόν του γονιδίου *lgg-1*, μεταξύ των θέσεων περιορισμού SphI και KpnI. Για την απομόνωση του υποκινητή p_{lgg-1}, πολλαπλασιάστηκε με PCR αλληλουχία μήκους 1934 bp πριν από το 5΄-άκρο του γονιδίου, με τα εξής ολιγονουκλεοτίδια:

5΄-ACATGCATGCGCACTTTCAAGGCGACAGTA-3′ και

5΄-GGGGTACCTCCTCCTTGTAAGCCCACTT-3′.

p_{mec-7}GFP::LGG-1**

Αλληλουχία που περιείχε τον υποκινητή του γονιδίου *mec-7* και την κωδική αλληλουχία της πρωτεΐνης GFP απομονώθηκε από το πλασμίδιο pPD117.01 με τα περιοριστικά ένζυμα SphI και EcoRI και εντέθηκε στις αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις του πλασμιδίου pUC-19 (New England Biolabs). Η κωδική αλληλουχία της LGG-1 μήκους περίπου 700 bp απομονώθηκε με PCR από το γονιδίωμα του νηματώδους με τα ολιγονουκλεοτίδια:

5΄-GGAATTCAAGTGGGCTTACAAGGAG-3′ και

5΄-GGAATTCAAGTGGGCTTACAAGGAG-3′, και εντέθηκε στη θέση EcoRI του πλασμιδίου pUC-19, που έφερε την αλληλουχία p_{mec-7}GFP.

Το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε από την Πόπη Συντιχάκη.

** Και η δύο πλασμιδιακές κατασκευές για την έκφραση της LGG-1 (p_{lgg-1}DsRED::LGG-1 και p_{mec-7}GFP::LGG-1) κατασκευάστηκαν έτσι ώστε το αμινο-τελικό άκρο της LGG-1 να συνδέεται με το καρβοξυ-τελικό άκρο της DsRED ή της GFP. Αυτό ήταν απαραίτητο προκειμένου να γίνει φυσιολογικά η τοποθέτηση της LGG-1 σε αυτοφαγοσώματα (για την

ανίχνευση των οποίων χρησιμοποιήθηκαν άλλωστε τα συγκεκριμένα πλασμίδια), δεδομένου το καρβοξυ-τελικό άκρο της ομολόγου της LGG-1 στα θηλαστικά, MAP-1 LC3, υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία στα πλαίσια σχηματισμού ώριμων αυτοφαγοσωμάτων (Kabeya et al., 2000).

p_{mec-7}mitoGFP

Τμήμα DNA που περιείχε την κωδική περιοχή της πρωτεΐνης GFP σε σύνδεση με μία αμινο-τελική αλληλουχία για την τοποθέτηση σε μιτοχόνδρια, απομονώθηκε μετά από πέψη του πλασμιδίου pPD96.32 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI-BamHI. Το τμήμα αυτό εντέθηκε μεταξύ των θέσεων EcoRI-BglII του πλασμιδίου pPD96.41, ώστε να εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *mec-7*.

p_{mec-7}RmpHluorin***

Τμήμα DNA μήκους 761 bp, που περιείχε την κωδική περιοχή της Ratiometric pHluorin απομονώθηκε με PCR από τον πλασμιδιακό φορέα pGEX-2T (Pharmacia) (Miesenbock et al., 1998), χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα ολιγονουκλεοτίδια:
5΄-CCGCTCGAGATGGGATCCACCGGTGGAAG-3′ και
5΄-GAAGATCTCTAGAATTCACCGGTTTTG-3′. Στη συνέχεια εντέθηκε στο πλασμίδιο pPD96.41, μεταξύ των θέσεων BamHI-EcoRI, ώστε να εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *mec-7*.
Κατασκευάστηκε σε συνεργασία με την Πόπη Συντιχάκη.

p_{mec-7}SepHluorin***

Τμήμα DNA μήκους 761 bp, που περιείχε την κωδική περιοχή της SuperEcliptic pHluorin απομονώθηκε με PCR από τον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T2 (Pharmacia) (Sankaranarayanan et al., 2000), χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα ολιγονουκλεοτίδια:
5΄-CCGCTCGAGATGGGATCCACCGGTGGAAG-3′ και
5΄-GAAGATCTCTAGAATTCACCGGTTTTG-3′. Στη συνέχεια εντέθηκε στο πλασμίδιο pPD96.41, μεταξύ των θέσεων BamHI-EcoRI, ώστε να εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *mec-7*.
Κατασκευάστηκε σε συνεργασία με την Πόπη Συντιχάκη.

***Τα πλασμίδια pGEX-2T και pGEX-4T2 με τις κωδικές αλληλουχίες των pHluorins χορηγήθηκαν από τον JE Rothman (Department of Physiology and Cellular Biophysics, Columbia University, New York, USA).

p_{mec-17}BEC-1::GFP

Τμήμα DNA μήκους ~3000 bp, που περιείχε την κωδική περιοχή του γονιδίου *bec-1*, απομονώθηκε με PCR από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:
5΄-CGGGATCCATGACGACCCAACGAAG-3′ και
5΄-CGGGATCCAATAGGCGATCTGAGAGC-3′ και εντέθηκε σε πλασμιδιακό φορέα που περιείχε την αλληλουχία p_{mec-17}GFP (Artal-Sanz et al., 2006), στη θέση περιορισμού BamHI. Το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε από την Πόπη Συντιχάκη.

p_{mec-17}LMP-1::GFP

Αρχικά, αλληλουχία μήκους ~1900 bp, που περιείχε τον υποκινητή του γονιδίου *mec-17*, απομονώθηκε με PCR από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:
5′-CGGGATCCGAATCGTCTCACAACTGATCC-3′ και
5′-AACTGCAGGTGACTACTTGAGACCTG-3′, και υποκλωνοποιήθηκε μεταξύ των θέσεων PstI–BamHI στον πλασμιδιακό φορέα pPD95.77, ο οποίος φέρει την κωδική αλληλουχία της πρωτεΐνης GFP. Στη θέση BamHI του πλασμιδίου που κατασκευάστηκε, εντέθηκε η κωδική αλληλουχία της πρωτεΐνης LMP-1 χωρίς το κωδικόνιο λήξης, αφού απομονώθηκε από το γενωμικό DNA του νηματώδους με τα ολιγονουκλεοτίδια:
5′-CGGGATCCGACGCTGGCATATCCTTGTCTC-3′ και
5′-CGGGATCCAATTGAACTATGTTGAAATCG-3′. Η ένθεση έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε το καρβοξυ-τελικό άκρο της LMP-1 να συνδέεται με το αμινο-τελικό της GFP, ενώ μεταξύ αυτών παρεμβάλλεται η αμινοξική αλληλουχία Gly-Ser-Ser-Pro-Gly-Leu-Ala-Lys-Gly-Pro-Lys-Gly. Έκφραση αυτής της χίμαιρας οδηγεί σε τοποθέτηση του μορίου GFP στην εξωτερική επιφάνεια των λυσοσωμάτων, ώστε να μην μειώνεται η ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας εξαιτίας των όξινων συνθηκών του εσωτερικού των λυσοσωμάτων.
Κατασκευάστηκε από τη Marta Artal-Sanz.

- **Κατασκευή πλασμιδίων για την καταστολή της έκφρασης γονιδίων με την τεχνική του RNAi**

Η διαδικασία που εφαρμόστηκε για τη δημιουργία των συγκεκριμένων πλασμιδιακών κατασκευών περιελάμβανε απομόνωση αλληλουχίας του εκάστοτε γονιδίου από το γονιδίωμα ατόμων *C. elegans* άγριου τύπου, και ένθεση αυτής μεταξύ των δύο αντιπαράλληλων αλληλουχιών του υποκινητή της πολυμεράσης T7 στο πλασμίδιο pL4440 (Timmons et al., 2001). Το πλασμίδιο αυτό επιτρέπει τη σύνθεση δίκλωνων μορίων RNA. Έλεγχος και πολλαπλασιασμός του νέου πλασμιδίου γινόταν μετά από μετασχηματισμό σε επιδεκτικά κύτταρα XL1-Blue. Από αυτά πραγματοποιούταν στη συνέχεια απομόνωση της

πλασμιδιακής κατασκευής και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων HT115 (DE3), τα οποία και χρησιμοποιούνταν σε πειράματα RNAi.

Ακολουθεί αναφορά των αλληλουχιών που απομονώθηκαν σε κάθε περίπτωση, καθώς και των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν γι' αυτόν το σκοπό.

asp-3

Αλληλουχία μήκους ~1300 bp, που περιελάμβανε σχεδόν ολόκληρο το ORF του γονιδίου *asp-3*, υποκλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού XbaI-XhoI Το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε από την Πόπη Συντιχάκη (Syntichaki et al., 2002).

asp-4

Αλληλουχία μήκους 1540 bp, που περιελάμβανε σχεδόν ολόκληρο το ORF του γονιδίου *asp-4*, υποκλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού HindIII-XbaI. Το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε από την Πόπη Συντιχάκη (Syntichaki et al., 2002).

atgr-5

Αλληλουχία μήκους ~1485bp, που περιελάμβανε τα εξώνια 1 και 2 του γονιδίου *atgr-5*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:
5΄-GCTCTAGAAATAATCGTCGTTCCCCGT-3′ και
5΄-CGGGATCCAGTCAGAAAACTCCCATAC-3′ και εντέθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού XbaI- BamHI.

atgr-7

Αλληλουχία μήκους 1764bp, που περιελάμβανε τα εξώνια 1-5 του γονιδίου *atgr-7*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:
5΄-ATGGCCACGTTTGTTCCCT-3′ και 5΄-TCACAGTGCACTGTTGGTCCA-3′ και εντέθηκε στο πλασμίδιο pL4440 στη θέση περιορισμού EcoRI.

atgr-9

Αλληλουχία μήκους ~1767bp, που περιελάμβανε τα εξώνια 6-8 του γονιδίου *atgr-9*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:
5΄-GCTCTAGAAGTTTTTGTCTCCGGTAACG-3′ και
5΄-CGGGATCCGATTCCAGTTTTACCTTCCAA-3′ και εντέθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού XbaI- BamHI.

atgr-18

Αλληλουχία μήκους 1560 bp, που περιελάμβανε σχεδόν ολόκληρο το ORF του γονιδίου *atgr-18*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:

5΄-AACTGCAGAGAATCCCGACTCGATCAAC-3′ και

5΄-GCTCTAGAGGTGTGGCTCATTGGTGGG-3′ και υποκλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού PstI -XbaI.

Κατασκευάστηκε από την Πόπη Συντιχάκη.

bec-1

Αλληλουχία μήκους 1616 bp, που περιελάμβανε τα εξώνια 2-~6 του γονιδίου *bec-1*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:

5΄-GCTCTAGAGTTATCACAGAAGCTCTG-3′ και

5΄-CGGGATCCGTCCATACAATGCGTACG-3′ και εντέθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού XbaI- BamHI.

Κατασκευάστηκε από την Πόπη Συντιχάκη.

clp-1

Αλληλουχία μήκους 1360 bp, που περιελάμβανε τα εξώνια 4-~8 του γονιδίου *clp-1*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:

5΄-CCCAAGCTTAGGCGGAGGTGGTAACTAC-3′ και

5΄-GCTCTAGACCTCTCATCATCATTTGC-3′ και υποκλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού HindIII-XbaI.

Το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε από την Πόπη Συντιχάκη (Syntichaki et al., 2002).

cup-5

Αλληλουχία μήκους 1500 bp, που περιελάμβανε τα εξώνια 2-4 του γονιδίου *cup-5*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:

5΄-GGGGTACCCCATGATTTCAGATGTCTCGC-3′ και

5΄-GGGGTACCCCGAATGCAAAGAATGAGAACG-3′ και υποκλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pL4440 στη θέση περιορισμού KpnI.

Κατασκευάστηκε από τη Marta Artal-Sanz.

lgg-1

Αλληλουχία μήκους ~700 bp, που περιελάμβανε σχεδόν ολόκληρο το ORF του γονιδίου *lgg-1*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:

5΄-GGAATTCAAGTGGGCTTACAAGGAG-3′ και

5΄-GGAATTCGTCTTCTTCGTTTATTCATG-3′ και εντέθηκε στο πλασμίδιο pL4440 στη θέση περιορισμού EcoRI.

Κατασκευάστηκε από την Πόπη Συντιχάκη.

lgg-3

Αλληλουχία μήκους 443bp, που περιελάμβανε ολόκληρο το ORF του γονιδίου *lgg-3*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:

5΄-GGAATTCAGAAACCGCCACAACTCCA-3′ και

5΄-GGAATTCCGGTGTAATGCTGTACTGA-3′ και εντέθηκε στο πλασμίδιο pL4440 στη θέση περιορισμού EcoRI.

let-363

Αλληλουχία μήκους ~1250 bp, που περιελάμβανε τα εξώνια 1-5 του γονιδίου *let-363*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:

5΄-AACTGCAGCTCCAACAACACGGAATTAG-3′ και

5΄-GCTCTAGACAAGCCATTCAACACC-3′ και υποκλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού PstI -XbaI.

Το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε από την Πόπη Συντιχάκη.

nhx-4

Αλληλουχία μήκους ~1700 bp, που περιελάμβανε τα εξώνια 4-11 του γονιδίου *nhx-4*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:

5΄-GCTCTAGACTCTTCACTGGCCTGT-3′ και

5΄-CCGCTCGAGATCAGTATGACTGCG-3′ και εντέθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού XbaI-XhoI.

Κατασκευάστηκε σε συνεργασία με την Πόπη Συντιχάκη.

nhx-5

Αλληλουχία μήκους ~1600 bp, που περιελάμβανε τα εξώνια 1-9 του γονιδίου *nhx-5*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:

5΄-AACTGCAGTTATGGACGATATCAAC-3′ και

5΄-CCGCTCGAGCCACAAACTTCAGCCAC-3′ και εντέθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού PstI-XhoI.

Κατασκευάστηκε σε συνεργασία με την Πόπη Συντιχάκη.

nhx-9

Αλληλουχία μήκους ~1500 bp, που περιελάμβανε ολόκληρο το ORF του γονιδίου *nhx-9*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:

5΄-GCTCTAGATGGTGTCCTGACTCTTC-3′ και

5΄-CCGCTCGAGCTTCCACTCCAGACATC-3′ και εντέθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού XbaI-XhoI.
Κατασκευάστηκε σε συνεργασία με την Πόπη Συντιχάκη.

nhx-9/4

Αλληλουχία του γονιδίου *nhx-4* απομονώθηκε από το πλασμίδιο pL4440-*nhx-4*(RNAi) και εντέθηκε στο πλασμίδιο pL4440-*nhx-9*(RNAi) μεταξύ των θέσεων περιορισμού BglII-XbaI.
Κατασκευάστηκε σε συνεργασία με την Πόπη Συντιχάκη.

nhx-9/4/5

Αλληλουχία μήκους ~676 bp από το πλασμίδιο pL4440-*nhx-5*(RNAi) και εντέθηκε στο πλασμίδιο pL4440-*nhx-9/4*(RNAi) μεταξύ των θέσεων περιορισμού XhoI-KpnI.
Κατασκευάστηκε σε συνεργασία με την Πόπη Συντιχάκη.

pmr-1

Αλληλουχία μήκους ~1600 bp, που περιελάμβανε τα εξώνια 1-9 του γονιδίου *pmr-1*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:
5′-AACTGCAGATTGAAACACTGACATC-3′ και
5′-CCGCTCGAGTACCTGAAACATTCCG-3′ και εντέθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού PstI-XhoI.
Κατασκευάστηκε σε συνεργασία με την Πόπη Συντιχάκη.

unc-51

Αλληλουχία μήκους ~1850bp, που περιελάμβανε τα εξώνια 3 και 4 του γονιδίου *unc-51* (κωδικοποιούν την καταλυτική περιοχή της κινάσης UNC-51), απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:
5΄-CATGCCATGGTAAGCCCGAATCAAGCCCTT-3′ και
5΄-AACTGCAGGGACCAAAGGACCTAAGGAA-3′ και εντέθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού NcoI-PstI.

vha-2

Αλληλουχία μήκους 476 bp, που περιελάμβανε ολόκληρο το ORF του γονιδίου *vha-2*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:
5′-CGGGATCCTAAATCGTCTTCTTATCTTCCA-3′ και
5′-CCCAAGCTTCAACGGCGAATGATTTATTCTC-3′ και εντέθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού BamHI-HindIII.
Κατασκευάστηκε από την Πόπη Συντιχάκη.

vha-10

Αλληλουχία μήκους 889 bp, που περιελάμβανε ολόκληρο το ORF του γονιδίου *vha-10*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* και υποκλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού BamHI-HindIII, όπως περιγράφεται στην αναφορά (Nature *408*, 325–330). Κατασκευάστηκε από την Πόπη Συντιχάκη.

vha-12

Αλληλουχία μήκους~1500 bp, που περιελάμβανε ολόκληρο το ORF του γονιδίου *vha-12*, απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *C. elegans* με τα ολιγονουκλεοτίδια:
5′-GCTCTAGAATGGCTGCCGTTGACGTC-3′ και
5′-CCCAAGCTTGGGTGATGAAGTTCTTC-3′ και εντέθηκε στο πλασμίδιο pL4440 μεταξύ των θέσεων περιορισμού XbaI-HindIII.
Κατασκευάστηκε από την Πόπη Συντιχάκη.

- **Ανάπτυξη και διατήρηση στελεχών *C. elegans***

Η ανάπτυξη των νηματωδών έγινε σε τρυβλία NGM επιστρωμένα με λεπτό στρώμα βακτηρίων OP50, και σε θερμοκρασίες 15, 20 ή 25°C. Όπου απαιτήθηκαν υγρές καλλιέργειες, βακτήρια OP50 που είχαν αναπτυχθεί αρχικά σε LB, ξεπλύθηκαν με M9 ώστε να απομακρυνθούν ίχνη LB (δεδομένου ότι δεν ευνοεί την αύξηση των νηματωδών) και επαναιωρήθηκαν σε M9.

Για τη διατήρηση αποθεμάτων νηματωδών συγκεκριμένης γονοτυπικής σύστασης, εφαρμόστηκαν δύο μέθοδοι·

↳ <u>Διατήρηση στους 15°C:</u>

Στη θερμοκρασία των 15°C η ανάπτυξη των νηματωδών γίνεται με χαμηλούς ρυθμούς και είναι δυνατόν να διατηρηθούν στη μορφή των dauers σε τρυβλία NGM για 3 μήνες περίπου.

↳ <u>Διατήρηση στους -80°C:</u>

Νηματώδεις αναπτυξιακών σταδίων L1-L2 είναι δυνατόν να επιβιώσουν για χρόνια σε καταψύκτες στους -80°C ή σε υγρό άζωτο στους-196°C. Η διαδικασία που εφαρμόστηκε για την κατάψυξη των νηματωδών ήταν η εξής:

- Συλλογή ζώων με διάλυμα M9 (θερμοκρασίας 4°C) από 5-6 τρυβλία NGM, στα οποία μόλις έχει εξαντληθεί η τροφή και φέρουν πολλές προνύμφες L1-L2, και τοποθέτηση σε δοκιμαστικό σωλήνα σε πάγο.
- Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος ψύξης νηματωδών (θερμοκρασίας 4°C) και ανάδευση.

- Μεταφορά του εναιωρήματος σε 10 τουλάχιστον ειδικά δοχεία των 2ml, όπου έχουν αναγραφεί τα χαρακτηριστικά του στελέχους, και τοποθέτηση αυτών στους -80°C.
- Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της κατάψυξης με απόψυξη ενός από τα δοχεία αφού περάσει χρονικό διάστημα 3-4 ημερών. Η απόψυξη πραγματοποιήθηκε με παραμονή του δοχείου σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) ώσπου να λιώσει ο πάγος και κατόπιν μεταφορά σε τρυβλία NGM, επώαση στους 15-20°C κι έλεγχο της βιωσιμότητας των ζώων.

Συγχρονισμός πληθυσμού νηματωδών και καθαρισμός από μολύνσεις

Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε τόσο για την απαλλαγή από βακτηριακές και μυκητιακές μολύνσεις, όσο και για το σχετικό συγχρονισμό πληθυσμών, ξεκινώντας από τρυβλία που περιέχουν μόνο αυγά.

Ενήλικα ζώα που περιείχαν αυγά μεταφέρονταν σε διάλυμα M9 και ξεπλένονταν ~2 φορές. Στο τελικό εναιώρημα προστίθεντο 2,5 φορές μεγαλύτερος όγκος φρέσκου διαλύματος με την ακόλουθη σύσταση:

1ml NaOH 5N

2ml NaOCl 5%

7ml ddH2O.

Το διάλυμα αυτό διαλύει ολόκληρο το ζώο, εισχωρεί όμως πιο δύσκολα στα αυγά. Ακολουθούσε συνεχής ανάδευση και τακτική παρατήρηση στο στερεοσκόπιο. Αμέσως μετά τη διάλυση της πλειοψηφίας των ζώων, κατακρημνίζονταν τα αυγά με φυγοκέντρηση για 1min σε 10000rpm και ξεπλένονταν ~3 φορές με M9. Το εναιώρημα των αυγών τοποθετούνταν σε καθαρά τρυβλία NGM.

Με τη μέθοδο αυτή απομακρύνονταν πιο αποτελεσματικά βακτηριακές μολύνσεις. Επίσης, ο πληθυσμός που προέκυπτε δεν ήταν απόλυτα συγχρονισμένος, δεδομένου ότι το τελικό εναιώρημα περιείχε αυγά διαφόρων σταδίων.

Δημιουργία αρσενικών ζώων *C. elegans*

Η συχνότητα των αρσενικών ατόμων σε ένα πληθυσμό νηματωδών είναι πολύ μικρή (περίπου 0.2%) και προκύπτουν από τυχαία απώλεια του ενός φυλετικού χρωμοσώματος X (Ian A., 1999). Συνεπώς, έχουν χρωμοσωμική σύσταση XO, σε αντίθεση με τα ερμαφρόδιτα ζώα με χρωμοσωμική σύσταση XX. Ωστόσο, είναι απαραίτητα για τη δημιουργία στελεχών *C. elegans* μέσω γενετικών διασταυρώσεων. Για τη δημιουργία αρσενικών ζώων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι:

↳ Θερμικό σοκ:

- Μεταφορά 10-15 ερμαφρόδιτων ζώων σταδίου L4 σε τρυβλίο NGM.
- Επώαση για 5-6h στους 32°C.
- Μεταφορά του τρυβλίου στους 20°C κι έλεγχος των απογόνων για παρουσία αρσενικών ατόμων.

Το θερμικό σοκ αυξάνει την πιθανότητα μη σωστού διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση και συνεπώς της απώλειας του ενός χρωμοσώματος X.

↳ Γενετικές διασταυρώσεις:

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο ότι το 50% των απογόνων μίας επιτυχούς διασταύρωσης αποτελείται από αρσενικά άτομα. Χρησιμοποιήθηκε στις ακόλουθες περιπτώσεις:

i. Για τη δημιουργία αρσενικών ατόμων στελεχών με φυλοσύνδετα αλληλόμορφα, πραγματοποιήθηκε διασταύρωση με αρσενικά άγριου τύπου (ή γενικότερα στελεχών με άγριου τύπου αλληλόμορφα στα σωματικά χρωμοσώματα).

ii. Για τη δημιουργία αρσενικών διαγονιδικών ζώων, πραγματοποιήθηκε διασταύρωση των αντίστοιχων ερμαφρόδιτων διαγονιδικών ζώων με αρσενικά άγριου τύπου (ή γενικότερα στελεχών με άγριου τύπου αλληλόμορφα στα σωματικά χρωμοσώματα).

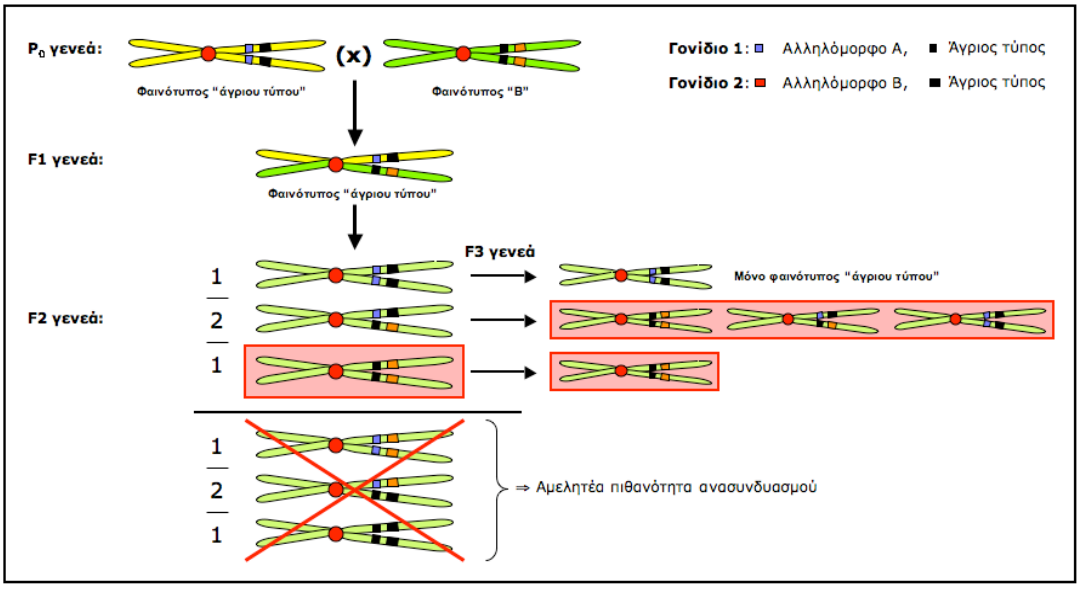
iii. Για τη διατήρηση αποθέματος αρσενικών ζώων συγκεκριμένου στελέχους, πραγματοποιούνταν τακτικά διασταύρωση μεταξύ ατόμων του αυτού γονοτύπου.

Στις περιπτώσεις i και ii αξιοποιήθηκε το γεγονός ότι οι αρσενικοί απόγονοι μιας διασταύρωσης κληρονομούν το μοναδικό τους χρωμόσωμα X (και άρα τα χαρακτηριστικά αυτού) από τους ερμαφρόδιτους μόνο προγόνους.

Γενετικές διασταυρώσεις νηματωδών

Σε τρυβλίο NGM με μικρή ποσότητα τροφής (honey-moon plate) μεταφέρονταν 4-5 ερμαφρόδιτους νηματώδεις αναπτυξιακού σταδίου L3-L4 και 15-20 αρσενικά ζώα αντίστοιχου σταδίου ανάπτυξης. Ακολουθούσε επώαση στους 15°C και τακτική παρατήρηση. Μετά την παραγωγή των πρώτων απογόνων, απομακρύνονταν όλα τα αρσενικά άτομα πατρικής γενιάς, ώστε να παρεμποδιστεί γονιμοποίηση από αυτά των απογόνων της $1^{ης}$ θυγατρικής γενιάς (F1). Η διασταύρωση θεωρούνταν επιτυχής όταν η συχνότητα αρσενικών ζώων μεταξύ των απογόνων F1 ήταν υψηλή, οπότε 4-5 ετερόζυγοι απόγονοι F1 μεταφέρονταν σε ξεχωριστά τρυβλία NGM. Ένα από τα τρυβλία αυτά χρησιμοποιούνταν συνήθως για την επιλογή των επιθυμητών ομόζυγων ατόμων μεταξύ των ατόμων $2^{ης}$ θυγατρικής γενιάς (F2).

Η επιλογή ζώων κατάλληλου γονοτύπου στηριζόταν σε φαινοτυπικές παρατηρήσεις στην περίπτωση που το επιθυμητό αλληλόμορφο είχε εμφανή φαινότυπο, ή στο μέγεθος των προϊόντων αντιδράσεων PCR, εάν το αλληλόμορφο περιείχε κάποια έλλειψη νουκλεοτιδίων, με μέγεθος ικανό να ανιχνευτεί σε πήκτωμα αγαρόζης. Σε περιπτώσεις που δεν ήταν δυνατή η χρήση καμίας από τις προηγούμενες μεθόδους, εφαρμόστηκε μία τεχνική "αποκλεισμού" αλληλομόρφων ("kick out"). Νηματώδεις με το επιθυμητό αλληλόμορφο (έστω A) διασταυρώνονταν με ζώα, στο γενετικό υπόβαθρο των οποίων υπήρχε μεταλλαγή (έστω B) με εμφανή φαινότυπο σε γονίδιο που βρίσκεται σε πολύ κοντινή απόσταση με το προς μελέτη γονίδιο στο γενετικό χάρτη (Εικ. **17**). Η μικρή γενετική απόσταση ήταν απαραίτητη προκειμένου να μειωθεί στο ελάχιστο η πιθανότητα ανασυνδυασμού, που θα οδηγούσε σε σύνδεση των δύο αλληλομόρφων. Η διάκριση νηματωδών κατάλληλου γονοτύπου στηριζόταν στο αποκλεισμό ζώων, ο φαινότυπος των οποίων υποδήλωνε την παρουσία της μεταλλαγής με τον εμφανή φαινότυπο (αλληλόμορφο B).



Εικόνα 17. Γενετικές διασταυρώσεις με τη μέθοδο "kick out".

Δημιουργία διαγονιδιακών σειρών *C. elegans*

Για τη διαμόλυνση νηματωδών με πλασμιδιακές κατασκευές πραγματοποιήθηκαν ενέσεις των αντίστοιχων κατασκευών στο συγκυτιακό τμήμα των γονάδων ζώων άγριου τύπου. Ως δείκτης διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε στις περισσότερες περιπτώσεις το πλασμίδιο pRF4, το οποίο φέρει το επικρατές αλληλόμορφο *rol-6(su1006)*. Η έκφραση αυτού του αλληλομόρφου επηρεάζει την δομή του κολλαγόνου, με αποτέλεσμα η κίνηση των ζώων να είναι περιστροφική. Μόνο στην περίπτωση της κατασκευής p_{lgg-1}DsRED::LGG-1 χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης διαμόλυνσης πλασμίδιο pPD122.11 με την αλληλουχία p_{myo-}

$_2$GFP, που οδηγεί στην έκφραση GFP στο φάρυγγα των ζώων. Για τις ενέσεις χρησιμοποιήθηκε μίγμα ίσων συγκεντρώσεων (50μg/ml) από το πλασμίδιο-δείκτη διαμόλυνσης και το προς μελέτη πλασμίδιο. Προκειμένου να εξασφαλιστεί DNA υψηλής καθαρότητας, τα πλασμίδια απομονώθηκαν με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης από τα αντίστοιχα βακτήρια ξενιστές και στη συνέχεια καθαρίστηκαν με στήλη QIAGEN-tip 20 (QIAGEN plasmid purification).

Η διαδικασία των ενέσεων στους νηματώδεις είχε συνοπτικά ως εξής:

- Φυγοκέντρηση του προς ένεση μίγματος για 20-30min, ώστε να κατακρημνισθούν μεγάλα σωματίδια που πιθανά να περιέχει.
- Μεταφορά μίγματος σε κατάλληλη βελόνα, τοποθέτηση αυτής σε κατάλληλη υποδοχή και διάνοιξη.
- Ακινητοποίηση ζώων σε φιλμ αγαρόζης 2% παρουσία halocarbon oil.
- Μεταφορά σε μικροσκόπιο διαφορικής συμβολής (Nomarski) κι ένεση στα δύο σκέλη των γονάδων.
- Προσθήκη διαλύματος M9 στα ζώα και μεταφορά σε τρυβλίο NGM στους 20°C, ώστε να ανακάμψουν.
- Παρατήρηση των απογόνων για την ανίχνευση αυτών που φέρουν το δείκτης διαμόλυνσης και μεταφορά αυτών σε ξεχωριστά τρυβλία.

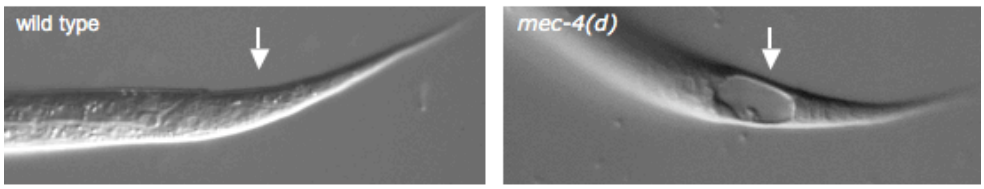
Όταν τα κυκλικά πλασμίδια εντίθεται στις γονάδες των νηματωδών πραγματοποιείται διάσπαση σε τυχαίες θέσεις (Ian A., 1999). Οι γραμμικές πλέον αλληλουχίες συνδέονται μεταξύ τους, οδηγώντας στο σχηματισμό εξωχρωμοσωμικών αλληλουχιών DNA. Οι τελευταίες, ανάλογα με το μήκος τους κυρίως, κληρονομούνται με συχνότητα 5-95%. Συνεπώς, τα διαγονιδιακά ζώα που προκύπτουν είναι μωσαϊκά και για τη συντήρησή τους απαιτείται τακτική επιλογή με βάση το φαινότυπο του δείκτη διαμόλυνσης.

Προσδιορισμός νεκρωτικού θανάτου

Για την επαγωγή νεκρωτικού θανάτου στο *C. elegans* χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά ερεθίσματα: τα αλληλόμορφα *mec-(d)*, *deg-3(d)* και α_s*(gf)*, καθώς και συνθήκες υποξίας. Ακολουθεί αναφορά της μεθόδου προσδιορισμού της νέκρωσης σε κάθε περίπτωση.

Κατά νεκρωτικό θάνατο στο νηματώδη *C. elegans* παρατηρείται διόγκωση του κυτταροπλάσματος, με αποτέλεσμα το κύτταρο να είναι ορατό σε μικροσκόπιο διαφορικής συμβολής (DIC, Differential Interference Contrast-Nomarski), ως ένα μεγάλο κενοτόπιο ή κυστίδιο (Εικ. **18**). Αυτό το μορφολογικό χαρακτηριστικό χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αριθμού των εκφυλιζόμενων κυττάρων στα στελέχη ***mec-(d)*** και ***deg-3(d)***.Τρυβλία με ικανό αριθμό εύρρωστων ενήλικων ατόμων ξεπλένονταν με νερό, ώστε μόνο τα αυγά να παραμείνουν στο τρυβλίο. Ακολουθούσε παρατήρηση και μέτρηση των

νευρώνων-κενοτοπίων αμέσως μετά την εκκόλαψη των αυγών, σε προνύμφες σταδίου L1, όπου παρατηρούνται και τα μέγιστα ποσοστά νέκρωσης. Στο στέλεχος *mec-(d)* παρατηρήθηκαν οι 6 αισθητικοί νευρώνες AVM, ALMR, ALML, PVM, PLMR και PLML, ενώ στο στέλεχος *deg-3(d)*, ο αισθητικός νευρώνας IL1 της κεφαλής και οι ενδιάμεσοι νευρώνες PVC της ουράς. Πρέπει να σημειωθεί ότι η έκφραση των τοξικών γονιδίων δεν οδηγεί απαραίτητα στο θάνατο των κυττάρων που τα εκφράζουν. Η πιθανότητα θανάτου σχετίζεται κυρίως με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης. Έτσι, στην περίπτωση του γονιδίου *mec-(d)*, η διαπίστωση νέκρωσης είναι πιο συχνή στους νευρώνες PLMs και ALMs (Hall et al., 1997).



Εικόνα 18: Νεκρωτικό πτώμα (άσπρο βέλος δεξιά) νευρώνα στην ουρά ζώου με τη μεταλλαγή *mec-4(d),* όπως φαίνεται με μικροσκόπιο διαφορικής συμβολής.

Στο στέλεχος **α_s*(gf)*** τα επίπεδα του νεκρωτικού θανάτου προσδιορίστηκαν με μέτρηση του αριθμού των νευρώνων PVC που επιβιώνουν και άρα εκφράζουν GFP. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε παρατήρηση ενήλικων ατόμων με μικροσκόπιο φθορισμού.

Για την επαγωγή νεκρωτικού θανάτου υπό συνθήκες **υποξίας**, άτομα προνυμφικού σταδίου L4 ξεπλένονταν 2-3 φορές με 1ml διαλύματος M9 και στη συνέχεια επωάζονταν για 30-40min στους 20°C σε φρέσκο διάλυμα αζιδίου του νατρίου NaN_3 (Sigma, Munich Germany) 0.5M σε M9 (πρωτόκολλο τροποποιημένο από (Scott et al., 2002)). Ακολουθούσε ξέπλυμα των ζώων με M9 2-3 φορές και τοποθέτηση σε τρυβλίο με NGM, για να ανακάμψουν. Μετά από επώαση για 12-18h στους 20°C προσδιοριζόταν το ποσοστό των ζώων που επιβίωναν.

Προκειμένου να θεωρηθεί το αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό, γινόταν παρατήρηση 100 τουλάχιστον ατόμων σε κάθε πείραμα.

- **Επώαση νηματωδών παρουσία χημικών ή φαρμακευτικών παραγόντων**

↳ Χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl), acridine orange και 3-methyladenine (3-MA)

Οι ουσίες NH_4Cl και acridine orange έχουν την ιδιότητα να συγκεντρώνονται σε όξινα οργανίδια του κυττάρου και σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν αύξηση του pH αυτών. Η 3-methyladenine (3-MA) αναστέλλει τη δράση των φωσφατιδυλ-ινοσιτολ-κινασών (PI3-kinases) και κατά συνέπεια το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων στα κύτταρα.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδρασή τους στο νεκρωτικό θάνατο κυττάρων του νηματώδους, νεαρά ενήλικα άτομα τοποθετούνταν σε υγρές καλλιέργειες (OP50 σε M9), που περιείχαν NH_4Cl 5mM ή acridine orange 40-150μM (Sigma-Aldrich) ή 3-MA 10mM (Sigma, Munich Germany). Μετά από επώαση για 12h (NH_4Cl και acridine orange) ή 15-20h (3-MA) στους 20°C με ανάδευση, προσδιοριζόταν το ποσοστό νευροεκφυλισμού στους απογόνους σταδίου L1 αυτών των ατόμων.

↳ Bafilomycin A1 και filomycin

Τα αντιβιοτικά bafilomycin A1 και filomycin είναι ειδικοί αναστολείς της λειτουργίας των αντλιών πρωτονίων που είναι γνωστές ως V-ATPases. Προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδρασή τους στη νέκρωση, πραγματοποιήθηκε ένεση διαλύματος bafilomycin A1 50μM (LC Laboratories, Woburn, Massachusetts) ή filomycin 30μM (Sigma, Munich, Germany) στη σωματική κοιλότητα εύρωστων ενήλικων ατόμων και μετρήθηκε το ποσοστό των κενοτοπίων-νευρώνων στους απογόνους σταδίου L1 αυτών. Δεδομένου ότι ως διαλύτης αυτών των αντιβιοτικών χρησιμοποιήθηκε dimethyl sulfoxide (DMSO), στα πειράματα ελέγχου πραγματοποιήθηκε ένεση διαλυμάτων με την αντίστοιχη συγκέντρωση DMSO. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν από τον Νεκτάριο Ταβερναράκη.

- **Καταστολή της έκφρασης γονιδίων με την τεχνική του RNAi**

Πλασμίδια pL4440 τα οποία περιείχαν αλληλουχία του γονιδίου-στόχου μεταξύ αντιπαράλληλων υποκινητών της πολυμεράσης T7, χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό βακτηρίων *Escherichia coli* του στελέχους HT115(DE3). Η απουσία RNase-E από το συγκεκριμένο στέλεχος, καθιστά δυνατή την παραγωγή σταθερών δίκλωνων μορίων RNA. Τα βακτήρια αυτά χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια ως τροφή για τους νηματώδεις, σύμφωνα με μέθοδο που περιγράφεται στην αναφορά (Kamath et al., 2001).

Πιο αναλυτικά, εφαρμόστηκε το εξής πρωτόκολλο:

- Διαμόλυνση θρεπτικού διαλύματος LB+amp+tet όγκου 5ml με αποικία των κατάλληλων βακτηρίων κι επώαση για 16-18h στους 37°C

- Μεταφορά ~150μl από την προηγούμενη καλλιέργεια σε 5ml LB+amp κι επώαση για 5-6h στους 37°C, ώσπου η νέα καλλιέργεια να προσεγγίσει την εκθετική φάση αύξησης
- Τοποθέτηση σε τρυβλίο NGM 100μl τελικής καλλιέργειας με 2mM IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) κι επώαση για 16-18h στους 25°C
- Μεταφορά στα τρυβλία αυγών ή νηματωδών απαλλαγμένων από άλλα στελέχη βακτηρίων
- Επώαση για 1 ή 2 γενιές στους 15 ή 20°C

Σε κάθε περίπτωση ως πειράματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με ισάριθμα ζώα του ίδιου στελέχους και σταδίου, που αναπτύσσονταν για το ίδιο χρονικό διάστημα και κάτω από τις ίδιες συνθήκες σε βακτήρια μετασχηματισμένα με τον κενό φορέα pL4440 (χωρίς οποιοδήποτε ένθεμα). Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποτελεσματικότητας της μεθόδου για το εκάστοτε γονίδιο, με προσδιορισμό της έκφρασης χιμαιρικής πρωτεΐνης GFP σε σύνδεση με την πρωτεΐνη-προϊόν του γονιδίου-στόχου.

Απομόνωση γενωμικού DNA από νηματώδεις

Απομόνωση γενωμικού DNA από 1 ζώο για πολλαπλές χρήσεις:

- Τοποθέτηση ενός ζώου σε 2,5μl διαλύματος λύσης νηματωδών (worm lysis buffer), στο οποίο είχε προστεθεί πρωτεϊνάση Proteinase K σε τελική συγκέντρωση 200μg/ml. Η πρωτεϊνάση προστίθεται στο διάλυμα λύσης ακριβώς πριν από τη χρήση αυτού.
- Επώαση για 1,5h στους -80°C. Η απότομη εναλλαγή θερμοκρασίας από τους -80°C στους 65°C (βλέπε επόμενο στάδιο) διευκολύνει τη διάρρηξη του επιδερμιδίου των ζώων.
- Επώαση για 1h στους 65°C με τακτική ανάδευση. Στη θερμοκρασία αυτή δρα η πρωτεϊνάση.
- Επώαση για 15min στους 95-100°C. Στο στάδιο αυτό επιτυγχάνεται απενεργοποίηση της πρωτεϊνάσης.
- Αραίωση με προσθήκη ddH2O.
- Αποθήκευση στους -80°C.

Το διάλυμα λύσης νηματωδών που χρησιμοποιήθηκε είχε την εξής σύσταση:
50 mM KCl
10 mM Tris pH 8.3
2.5 mM MgCl2
0.45% NP-40 (IGEPAL)
0.45% Tween-20

↳ Απομόνωση γενωμικού DNA από πληθυσμό ζώων:

- Εύρρωστος πληθυσμός νηματωδών από 5 τουλάχιστον τρυβλία, στα οποία η τροφή είχε σχεδόν εξαντληθεί, ξεπλύθηκε 3-4 φορές με ddH2O, ώστε να απομακρυνθούν τα βακτήρια
- Κατακρήμνιση ζώων με φυγοκέντρηση
- Επαναιώρηση ζώων σε ddH2O και προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος λύσης νηματωδών (worm lysis buffer), στο οποίο είχε προστεθεί proteinase K σε τελική συγκέντρωση 200μg/ml.
- Επώαση για 30min στους -80°C.
- Επώαση για 1h στους 65°C με τακτική ανάδευση, ώσπου το εναιώρημα να γίνει διαυγές.
- Επώαση για 15min στους 95-100°C.
- Αποθήκευση στους -80°C.

Η σύσταση του διαλύματος λύσης στην περίπτωση αυτή είχε ως εξής:

0,1M Tris pH 8.5

0,1M NaCl

5mM NaEDTA

1 % SDS

↳ Απομόνωση γενωμικού DNA υψηλής καθαρότητας από πληθυσμό ζώων:

- Εύρρωστος πληθυσμός νηματωδών από 10 τουλάχιστον τρυβλία, στα οποία η τροφή είχε σχεδόν εξαντληθεί, ξεπλύθηκε 4-5 φορές με ddH2O, ώστε να απομακρυνθούν τα βακτήρια.
- Κατακρήμνιση ζώων με φυγοκέντρηση.
- Απομόνωση και καθαρισμός DNA με χρήση του Nucleospin® Tissue (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany). Προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου (παραλαβή της μέγιστης δυνατής συγκέντρωσης DNA), το τελικό στάδιο της έκλουσης πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια αντί ενός, με χρήση υποδιπλάσιου όγκου διαλύματος έκλουσης σε καθένα από αυτά.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA. Οι περισσότερες αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε συνολικό όγκο 20μl διαλύματος με την παρακάτω σύσταση:

1pg-1μg υποστρώματος DNA,

1μM από κάθε εκκινητή,

0.25mM καθενός από τα τέσσερα dNTPs,

1-5 Units πολυμεράσης Taq του DNA,

Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης Taq (1.5mM $MgCl_2$, 50mM KCl), και

dH_2O ως τα 20μl.

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν διέφεραν ανάλογα με το μέγεθος της πολλαπλασιαζόμενης αλληλουχίας και τις θερμοδυναμικές ιδιότητες των εκκινητών. Συνήθως περιελάμβαναν τα ακόλουθα στάδια:

1) 3 min στους 94°C, ώστε να αποδιαταχθεί πλήρως το υπόστρωμα DNA,
2) 30 sec 92°C, για την αποδιάταξη δίκλωνων αλυσίδων DNA,
3) 30 sec σε θερμοκρασία 2-5°C χαμηλότερη από την Tm των εκκινητών, για να πραγματοποιηθεί υβριδοποίηση των εκκινητών με συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA,
4) 71°C για χρόνο που εξαρτάται από το μέγεθος της πολλαπλασιαζόμενης αλληλουχίας (1min/ 1000bp), ώστε να δράση η πολυμεράση,
5) επανάληψη των σταδίων 2-4 για 35 κύκλους,
6) 15 min στους 70°C, για την ολοκλήρωση των αντιδράσεων αντιγραφής του DNA,
7) λήξη της αντίδρασης και παραμονή στους 4-10°C.

Τεχνικές μικροσκοπίας

Σε όλες τις περιπτώσεις (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά) για την προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ξέπλυμα των ζώων με διάλυμα M9 και αναισθητοποίηση αυτών σε διάλυμα NaN_3 10mM σε M9 ή αγαρόζη 2%. Η παρατήρηση και φωτογράφηση έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).

Για τη λήψη εικόνων από μικροσκόπιο διαφορικής συμβολής (Nomarski), έγινε:

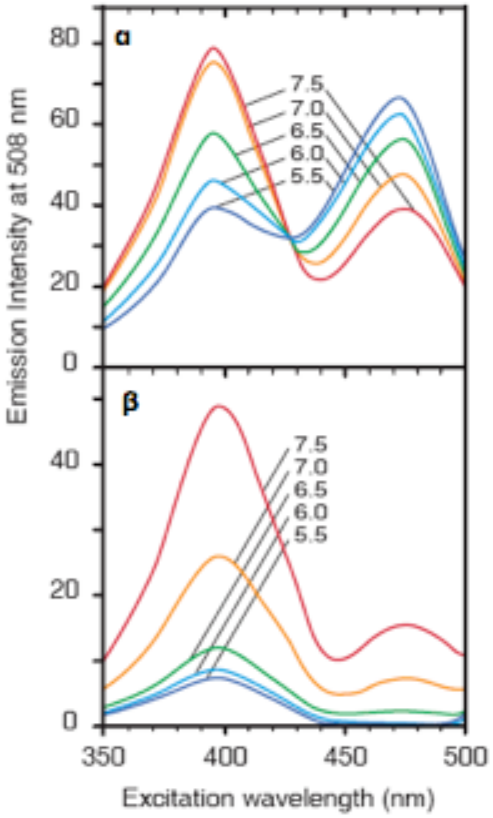
- με κάμερα MCCamera (Motic China Group Co., Ltd.), η οποία προσαρμόστηκε σε μικροσκόπιο Zeiss Axiovert και το πρόγραμμα Motic Images Plus 2.0, ή
- από μικροσκόπιο Zeiss Axioscop 2 (μετά από τοποθέτηση των απαραίτητων φίλτρων για την πόλωση του φωτός), είτε με κάμερα AxioCam (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) και το πρόγραμμα AxioVision3.1 (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.), είτε με το πρόγραμμα Laser Sharp 2000 (Bio-Rad Laboratories).

Οι φωτογραφήσεις που απαιτούσαν σάρωση του δείγματος, πραγματοποιήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Zeiss Axioscop 2 plus με κεφαλή σάρωσης Bio-Rad Radiance 2100, BioRad, Hercules, USA) με το πρόγραμμα Laser Sharp 2000. Η φωτογράφηση από απλό μικροσκόπιο φθορισμού έγινε με το πρόγραμμα AxioVision3.1 από κάμερα AxioCam. Η επεξεργασία και τροποποίηση των εικόνων, όπου χρειάστηκε, πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Photoshop (version 7.0.1; Adobe). Για τον προσδιορισμό της έντασης του φθορισμού με μέτρηση της φωτεινότητας των pixels από επιλεγμένη περιοχή, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα Excel του πακέτου της Microsoft Office 2003 (Microsoft Corporation, Redmond Washington USA).

Στη συνέχεια αναγράφονται πιο αναλυτικά οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν σε κάποιες ειδικές περιπτώσεις.

↳Προσδιορισμός μεταβολών του ενδοκυτταρικού pH

Η μέτρηση των απόλυτων τιμών του ενδοκυτταρικού pH σε ολόκληρους νηματώδεις δεν ήταν δυνατή· η τοποθέτηση των εκφυλιζόμενων νευρώνες του στελέχους *mec-4(d)* (που χρησιμοποιήθηκε γι' αυτόν το σκοπό) στην υποδερμίδα, παρεμποδίζει την άμεση πρόσβαση αυτών σε ρυθμιστικά διαλύματα. Έτσι, οι μεταβολές στην οξύτητα των κυττάρων κατά τη νέκρωση, προσδιορίστηκαν έμμεσα, μέσω των διαφορών στην ένταση εκπομπής των ευαίσθητων στο pH φθοριζόντων μορίων superecliptic και ratiometric pHluorin (Εικ. **19**) (Miesenbock et al., 1998; Sankaranarayanan et al., 2000).



Εικόνα 19. Φάσμα εκπομπής της ratiometric (α) και της superecliptic pHluorin (β) μετά από διέγερση με ακτινοβολία μήκους κύματος 508 nm. Μείωση του pH από 7.5 στην τιμή 5.5 προκαλεί αύξηση της εκπομπής της ratiometric pHluorin στα 475 nm, ενώ η εκπομπή της superecliptic pHluorin στο ίδιο μήκος κύματος ελαττώνεται (Miesenbock et al., 1998).

Οι pHluorins εκφράστηκαν στους έξι ευαίσθητους σε μηχανικά ερεθίσματα νευρώνες του νηματώδους, υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *mec-7*, και δημιουργήθηκαν διαγονιδιακές σειρές άγριου τύπου, *mec-4(d)* και *vha-12mec-4(d)*. Συγχρονισμένοι πληθυσμοί σταδίου L1 από κάθε σειρά παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Διατηρώντας σταθερές όλες τις παραμέτρους (ένταση laser, μεγέθυνση 2000x (40x10x5), ανάλυση 512x512) και φωτογραφήθηκαν ανεξάρτητοι νευρώνες PLM (άγριου τύπου ή εκφυλιζόμενοι). Η σάρωση πραγματοποιήθηκε με ακτινοβολία laser μήκους κύματος 478 nm, ενώ συλλέχθηκε με κατάλληλο φίλτρο (HQ515/30) εκπεμπόμενη ακτινοβολία εύρους 515±15

nm. Για κάθε νευρώνα πραγματοποιήθηκε σάρωση κατάλληλου αριθμού επιπέδων, ώστε να καλύπτεται όλο το πάχος του κυττάρου, και δημιουργήθηκε μία εικόνα από τη μέγιστη προβολή όλων των επιπέδων. Με το πρόγραμμα ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/) μετρήθηκε η μέγιστη και μέση ένταση των pixels ανά νευρώνα, από εικόνες των 8 bit στην κλίμακα του γκρι.

Για κάθε διαγονιδιακή σειρά πραγματοποιήθηκε επεξεργασία τουλάχιστον 150 νευρώνων σε 3 ανεξάρτητα πειράματα.

↳Προσδιορισμός του αριθμού των αυτοφαγοσωμάτων σε νευρώνες

Ως δείκτης αυτοφαγοσωμάτων χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη LGG-1 συνδεδεμένη με το καρβοξυ-τελικό άκρο φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP. Η χίμαιρα GFP::LGG-1 εκφράστηκε ειδικά στους νευρώνες που αντιλαμβάνονται μηχανικά ερεθίσματα υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *mec-7*. Ζώα προνυμφικού σταδίου L1-L2 παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο με καταδυτικό φακό (63x, Zeiss Plan-Neofluar; numerical aperture1.4; Carl Zeiss, Jena, Germany) και μετρήθηκε ο αριθμός των φθοριζόντων κουκκίδων σε κάθε νευρώνα PLM και ALM. Φωτογράφηση ανεξάρτητων νευρώνων πραγματοποιήθηκε μετά από σάρωση με ακτίνα laser μήκους κύματος 488nm και συλλογή εκπεμπόμενης ακτινοβολίας εύρους 515±15 nm.

Για κάθε διαγονιδιακή σειρά πραγματοποιήθηκε επεξεργασία τουλάχιστον 150 νευρώνων σε τρία ανεξάρτητα πειράματα.

↳Παρατήρηση και φωτογράφηση ενδοκυτταρικών οργανιδίων

Αυτοφαγοσώματα

Για την απλή παρατήρηση και φωτογράφηση αυτοφαγοσωμάτων, καθώς και τη συσχέτισή τους με άλλα ενδοκυτταρικά οργανίδια, χρησιμοποιήθηκε η χιμαιρική πρωτεΐνη DsRED::LGG-1. Πραγματοποιήθηκε φωτογράφηση νευρώνων μετά από σάρωση με ακτινοβολία laser μήκους κύματος 543 nm, και φωτογράφηση με συλλογή εκπεμπόμενης ακτινοβολίας εύρους 600±25 nm.

Λυσοσώματα, μιτοχόνδρια

Ως δείκτης λυσοσωμάτων χρησιμοποιήθηκε η χιμαιρική πρωτεΐνη LMP-1::GFP, ενώ ως δείκτης μιτοχονδρίων, η φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP στο αμινο-τελικό άκρο της οποίας είχε προστεθεί σηματοδοτική αλληλουχία για την τοποθέτηση σε μιτοχόνδρια (mitoGFP). Και στις δύο περιπτώσεις, ελήφθησαν φωτογραφίες από ζώα προνυμφικού σταδίου L1-L2, μετά από σάρωση με ακτίνα laser 488nm και συλλογή εκπεμπόμενης ακτινοβολίας εύρους 515 ± 15nm και με αντικειμενικό φακό 40x Plan-Neofluar, NA 0.75.

↳Χρώση πυρήνων με DAPI

Ζώα προνυμφικού σταδίου L1 μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη και στη συνέχεια επωάστηκαν για 15min σε διάλυμα της χρωστικής DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole hydrochloride) συγκέντρωσης 1μg/ml. Ακολούθησε παρατήρηση και φωτογράφηση με αντικειμενικό φακό 40x (Plan-Neofluar, Carl Zeiss MicroImaging Inc., NA 0.75, 365 ± 12nm band-pass excitation/397nm longpass emission filter set) σε μικροσκόπιο φθορισμού.

↳Χρώση νεκρωτικών κυττάρων με acridine orange

Η χρώση εκφυλιζόμενων νευρώνων του στελέχους *mec-4(d)* έγινε με επώαση ζώων προνυμφικού σταδίου L1 σε διάλυμα acridine orange 1μM για 20min. Πραγματοποιήθηκε σάρωση σε συνεστιακό μικροσκόπιο με ακτινοβολία laser μήκους κύματος 543 nm, και φωτογράφηση με συλλογή εκπεμπόμενης ακτινοβολίας εύρους 590 ± 35 nm.

Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων, που ελήφθησαν από τις μετρήσεις των ποσοστών νεκρωτικού θανάτου, του αριθμού αυτοφαγοσωμάτων και από τον προσδιορισμό των εντάσεων φθορισμού, πραγματοποιήθηκε με το υπολογιστικό πρόγραμμα Microsoft Office 2003 Excel software package (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Τουλάχιστον τρία πειράματα, αντιπροσωπευτικά της πλειοψηφίας των πειραματικών αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική επεξεργασία σε κάθε περίπτωση. Προσδιορίστηκε το τυπικό σφάλμα ή η τυπική απόκλιση, που απεικονίζονται ως κατακόρυφες γραμμές σε κάθε διάγραμμα. Για το έλεγχο της στατιστικής σημασίας των αποκλίσεων των τιμών, πραγματοποιήθηκε unpaired t-test και θεωρήθηκαν σημαντικές οι διαφορές με p-value<0.01 ή <0.05

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υποσημείωση: Στο κείμενο που ακολουθεί περιγράφονται τα αποτελέσματα των πειραματικών προσεγγίσεων που εφαρμόστηκαν προκειμένου να διερευνηθούν οι μηχανισμοί νεκρωτικού θανάτου στους νηματώδεις. Με στόχο να καταστούν κατανοητά τα εξαγόμενα συμπεράσματα, παρατίθενται επίσης δεδομένα που ελήφθησαν από τον ερευνητή Νεκτάριο Ταβερναράκη και τις μετα-διδακτορικούς Πόπη Συντιχάκη και Marta Artal-Sanz, με τις οποίες συνεργάστηκα στα πλαίσια της διδακτορικής μου διατριβής. Τα αρχικά των ονομάτων τους αναγράφονται εντός παρενθέσεων, τουλάχιστον στις περιπτώσεις όπου τα αποτελέσματα προέκυψαν σχεδόν αποκλειστικά από προσωπική τους προσπάθεια.

Α. Η Ομοιόσταση του pH στο Νεκρωτικό Θάνατο

Προηγούμενες μελέτες σε νηματώδεις έδειξαν ότι η δράση υδρολυτικών ενζύμων, όπως οι πρωτεάσες ασπαρτικού ASP-3 και ASP-4, είναι απαραίτητη για την επιτέλεση του νεκρωτικού θανάτου (Syntichaki et al., 2002). Η ενεργότητα αυτών των υδρολασών αυξάνεται σημαντικά υπό όξινες συνθήκες (Goll et al., 2003; Ishidoh and Kominami, 2002). Όξινο είναι άλλωστε το εσωτερικό των λυσοσωμάτων, όπου δρα η πελιοψηφία των συγκεκριμένων ενζύμων. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στη συνέχεια αναφέρονται σε μεταβολές του ενδοκυτταρικού pH και στη σημασία αυτών κατά τη διάρκεια της νέκρωσης, καθώς και σε πιθανούς μηχανισμούς με τους οποίους πραγματοποιούνται.

Α1. Η λειτουργία της κυστιδιακής ΑΤΡάσης είναι απαραίτητη για τη νέκρωση στο *C. elegans*

Οι κυστιδιακές ΑΤΡάσες (V-ΑΤΡάσες) είναι πολυπρωτεϊνικά διαμεμβρανικά σύμπλοκα, που καταναλώνουν ενέργεια, για να μεταφέρουν πρωτόνια αντίθετα προς την κλίση συγκέντρωσής τους (Nishi and Forgac, 2002). Εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη και κυρίως στην περιφέρεια όξινων οργανιδίων, όπως λυσοσώματα και συναπτικά κυστίδια. Με τη λειτουργία τους συμβάλλουν στη ρύθμιση του pH του κυττάρου κι ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων. Στο *C. elegans* έχουν ανιχνευθεί 17 γονίδια, που κωδικοποιούν υπομονάδες της αντλίας πρωτονίων (Oka et al., 2001; Oka et al., 1997; Oka et al., 1998; Pujol et al., 2001, P.D. Hartley, G.-d. Zhu & S.W. L' Hernault, Emory University και R. Weimer & E. Jorgensen, University of Utah, προσωπική επικοινωνία με το Ν. Ταβερναράκη). Τα γονίδια αυτά, η έκφρασή τους, καθώς και οι συνέπειες της δυσλειτουργίας τους απεικονίζονται στον πίνακα 1 (*ΕΙΣΑΓΩΓΗ*). Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος των κυστιδιακών ΑΤΡασών κατά τη νέκρωση στους νηματώδεις, διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις της δυσλειτουργίας υπομονάδων τόσο της περιφερειακής (V1) όσο και της διαμεμβρανικής (V0) περιοχής των αντλιών. Κριτήρια για την επιλογή των γονιδίων-στόχων αποτέλεσαν α) η διαθεσιμότητα βιώσιμων μεταλλαγμένων στελεχών και β) η έκφραση σε νευρικά κύτταρα. Το τελευταίο κριτήριο δεν εφαρμόστηκε απόλυτα και αφορούσε κύρια στις περιπτώσεις, όπου η επαγωγή νεκρωτικού θανάτου βασίστηκε σε γενετικά ερεθίσματα, που επιδρούν σε νευρώνες.

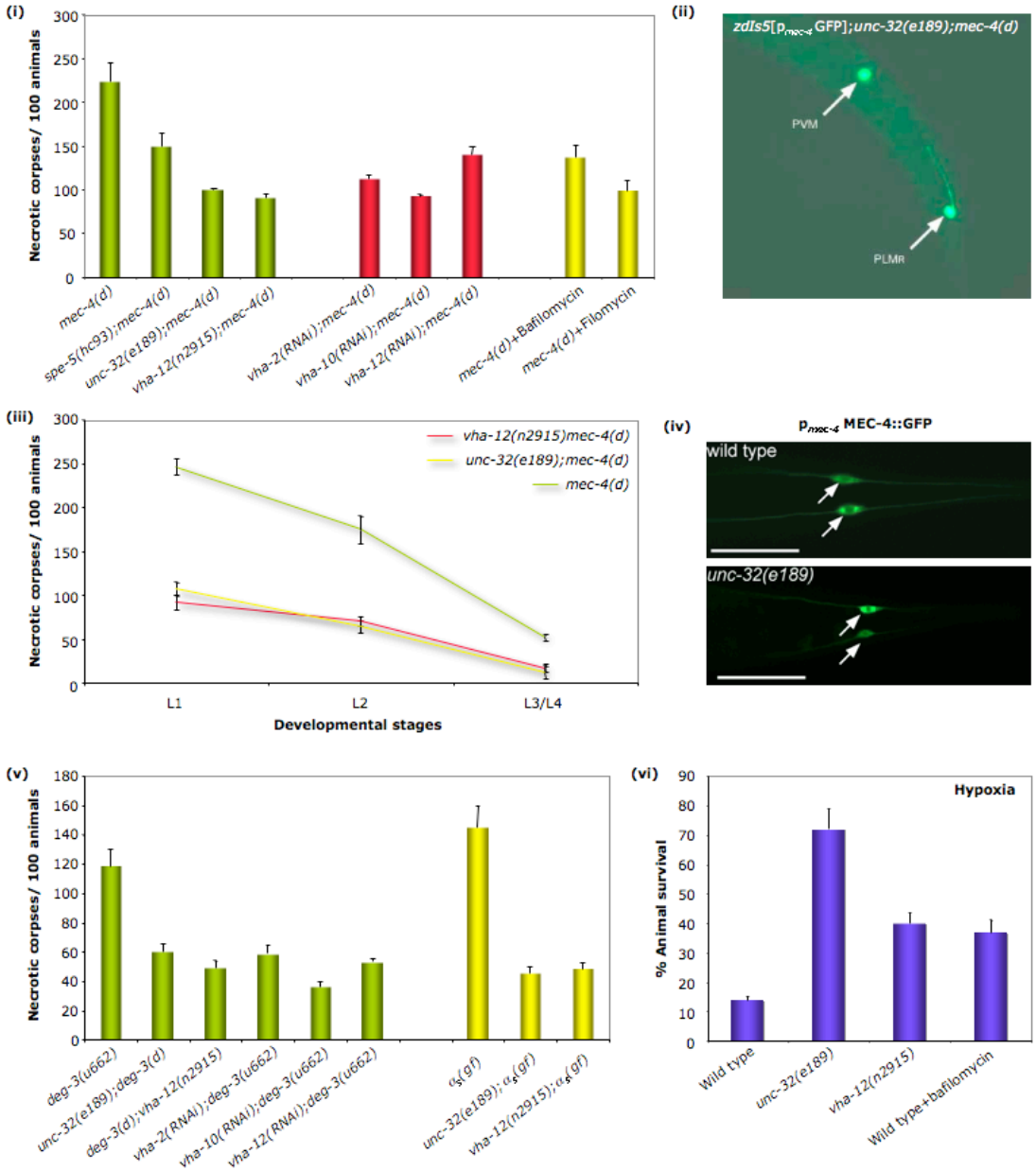
Καταρχάς, διερευνήθηκε η επίδραση της δυσλειτουργίας των V-ΑΤΡασών σε στελέχη *mec-4(d)*. Το επικρατές αλληλόμορφο *u231* του γονιδίου *mec-4* προκαλεί νέκρωση στους έξι νευρώνες του νηματώδους, που ευθύνονται για την αντίληψη μηχανικών ερεθισμάτων (ALM-R, ALM-L, AVM, PLM-R, PLM-L και PVM). Χορήγηση των αντιβιοτικών bafilomycin A1 ή filomycin, που αναστέλλουν ειδικά τη λειτουργία της V-

ΑΤΡάσης (Bowman et al., 1988; Oka and Futai, 2000), είχε προστατευτική επίδραση σε στελέχη *mec-4(d)* (Εικ. **A1(i)**) (Ν.Τ.). Μεταλλαγές στα γονίδια *spe-5* και *vha-12*, τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές της υπομονάδας Β, ή στο *unc-32*, που κωδικοποιεί την υπομονάδα a της V-ΑΤΡάσης, προκάλεσαν επίσης καταστολή της νέκρωσης σε ζώα με το ίδιο γενετικό υπόβαθρο (*mec-4(d)*) (Εικ. **A1(i)**) (Π.Σ). Παρόμοια μείωση του κυτταρικού θανάτου διαπιστώθηκε, όταν ελαττώθηκε η έκφραση των γονιδίων *vha-2*, *vha-10* και *vha-12* με την τεχνική του RNAi (Εικ. **A1(i)**). Η VHA-2 είναι μία ισομορφή της υπομονάδας c, ενώ το *vha-10* κωδικοποιεί την υπομονάδα G της V-ΑΤΡάσης. Η καταστολή της νέκρωσης που παρατηρήθηκε ήταν σημαντική αλλά όχι πλήρης, πιθανά λόγω μερικής αναστολής της δράσης της V-ΑΤΡάσης. Προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης αναστολή, πραγματοποιήθηκε RNAi τα γονίδια *vha-2* ή *vha-12* σε στελέχη *vha-12(n2915)mec-4(d)*. Ο προσδιορισμός της νέκρωσης ωστόσο δεν ήταν δυνατός γιατί στην 1η περίπτωση προέκυψε μεγάλο ποσοστό εμβρυϊκής θνησιμότητας, ενώ RNAi για το *vha-12* προκάλεσε στειρότητα στα ζώα. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προϋπάρχοντα δεδομένα σχετικά με τους φαινοτύπους που προκαλεί η απώλεια της ενεργότητας της V-ΑΤΡάσης, όπως αυτοί αναγράφονται στον πίνακα 1.

Η επιβίωση και λειτουργικότητα των νευρώνων σε ζώα με δυσλειτουργική V-ΑΤΡάση επιβεβαιώθηκε μετά από παρατήρηση της έκφρασης της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP σε ενήλικα άτομα *zdIs5*[p_{mec-4}GFP];*unc-32(e189);mec-4(d)* ((Εικ. **A1(ii)**) (Π.Σ.). Η καταστολή της νέκρωσης δεν ήταν αποτέλεσμα μείωσης των επιπέδων της τοξικής πρωτεΐνης MEC-4(d). Τα επίπεδα έκφρασης της εξωχρωμοσωμικής αλληλουχίας p_{mec-4}MEC-4::GFP ήταν παρόμοια σε στελέχη άγριου τύπου και σε μεταλλαγμένα στελέχη *unc-32(e189)* (Εικ. **A1(iv)**) (Π.Σ.). Επιπλέον, η παρατηρούμενη καταστολή δεν οφείλεται απλά σε καθυστέρηση του νεκρωτικού θανάτου. Μέτρηση του ποσοστού νεκρωτικών κυττάρων σε διαφορετικά προνυμφικά στάδια έδειξε ότι το μέγιστο ποσοστό εμφανίζεται στο 1ο προνυμφικό στάδιο L1 και μειώνεται στη συνέχεια (Εικ. **A1(iii)**). Αυτό ίσχυε τόσο για τα απλά μεταλλαγμένα στελέχη *mec-4(d)* όσο και για τα διπλά μεταλλαγμένα *unc-32(e189);mec-4(d)* και *vha-12(n2915)mec-4(d)*.

Προκειμένου να διερευνηθεί αν η ενεργότητα της V-ΑΤΡάσης απαιτείται γενικότερα για τη νέκρωση και όχι ειδικά και μόνο στην περίπτωση του *mec-4(d)*, μελετήθηκε η επίπτωση της δυσλειτουργίας της σε στελέχη νηματωδών *deg-3(d)*, α_s*(gf)* και μετά από επώαση ζώων σε διάλυμα αζιδίου του νατρίου (NaN_3). Το αλληλόμορφο *deg-3(d)* οδηγεί στην έκφραση ενός υπερενεργού καναλιού ασβεστίου κυρίως σε ενδιάμεσους (PVCs και AVG) και αισθητικούς (ALMs, PLMs, PVDs και IL1s) νευρώνες (Chalfie and Wolinsky, 1990; Treinin and Chalfie, 1995). Τα στελέχη α_s*(gf)* παράγουν τριμερείς πρωτεΐνες G με συνεχώς ενεργή υπομονάδα α, με αποτέλεσμα τη νέκρωση ορισμένων ενδιάμεσων (AVA,

AVB, AVD, AVE και PVC) και κινητικών νευρώνων (Berger et al., 1998; Korswagen et al., 1997; Maricq et al., 1995). Το NaN_3 αναστέλλει τη δράση της αναπνευστικής αλυσίδας και άρα τη σύνθεση ATP. Η χρήση του προσομοιάζει τις συνθήκες υποξίας, όπου απουσία οξυγόνου δεν είναι δυνατή η δράση της συνθάσης ATP των μιτοχονδρίων, και προκαλεί το θάνατο του οργανισμού (Scott et al., 2002). Μεταλλαγές στα γονίδια *unc-32* και *vha-12* προκάλεσαν αφενός μείωση της απώλειας νευρικών κυττάρων σε στελέχη *deg-3(d)* και $\alpha_s(gf)$ (Εικ. **A1(v)**) και αφετέρου αύξηση της βιωσιμότητας των ζώων μετά από επίδραση NaN_3 (Εικ. **A1(vi)**). Κατά συνέπεια, η δυσλειτουργία της V-ATPάσης δρα προστατευτικά έναντι στο νεκρωτικό θάνατο, ανεξάρτητα από το ερέθισμα που τον προκαλεί.

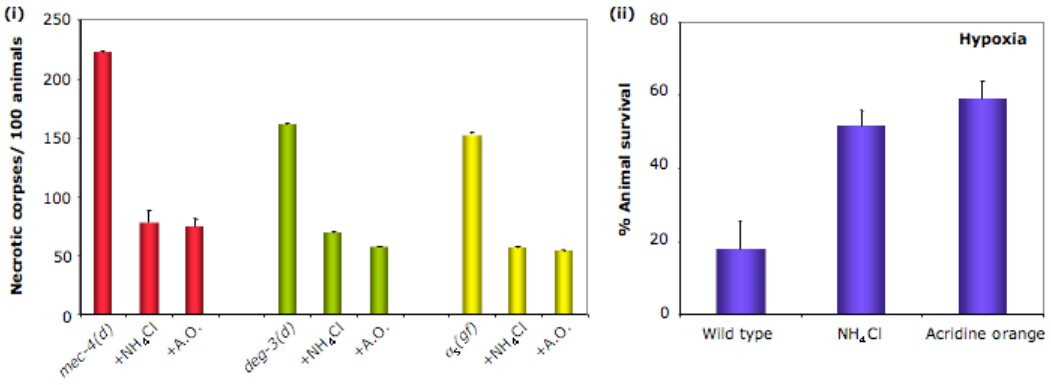


Εικόνα Α1. Η λειτουργία των κυστιδιακών ATPασών απαιτείται για το νεκρωτικό θάνατο σε νηματώδεις. (i) Ποσοστό νεκρωτικών πτωμάτων νευρώνων σε ζώα προνυμφικού σταδίου L1, τα οποία εκφράζουν το

αλληλόμορφο *mec-4(d)* κι έχουν μειωμένη ενεργότητα V-ATPασών, λόγω μεταλλαγών ή RNAi για γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες αυτών, καθώς και μετά από χορήγηση των ειδικών χημικών αναστολέων bafilomycin A1 και filomycin. (ii) Οι νευρώνες που επιβιώνουν σε διπλά μεταλλαγμένα στελέχη *unc-32(e189);mec-4(d)* διατηρούν τη λειτουργικότητά τους, όπως φαίνεται από την ικανότητα να εκφράζουν GFP. (iii) Ποσοστό νεκρωτικών πτωμάτων σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια στελεχών *mec-4(d)*, *vha-12(n2915)mec-4(d)* και *unc-32(e189);mec-4(d)*. Σε όλες τις περιπτώσεις, το μέγιστο ποσοστό νέκρωσης διαπιστώνεται στο 1ο προνυμφικό στάδιο L1. (iv) Δυσλειτουργία των V-ATPασών σε νηματώδεις με τη μεταλλαγή *unc-32(e189)* δεν επηρεάζει την έκφραση και τη σταθερότητα της χίμαιρας MEC-4::GFP. (v) Προσδιορισμός των επιπέδων νεκρωτικού θανάτου σε στελέχη *deg-3(d)* και α_s*(gf)* με δυσλειτουργική V-ATPάση. (vi) Μέτρηση του ποσοστού των ζώων που επιβιώνουν μετά από χορήγηση του αναστολέα της αναπνευστικής αλυσίδας NaN_3. Μειώνοντας την παραγωγή ATP, το NaN_3 έχει ανάλογη δράση με συνθήκες υποξίας.

A2. Αύξηση του pH ενδοσωμάτων και λυσοσωμάτων προστατεύει τα κύτταρα από το νεκρωτικό θάνατο

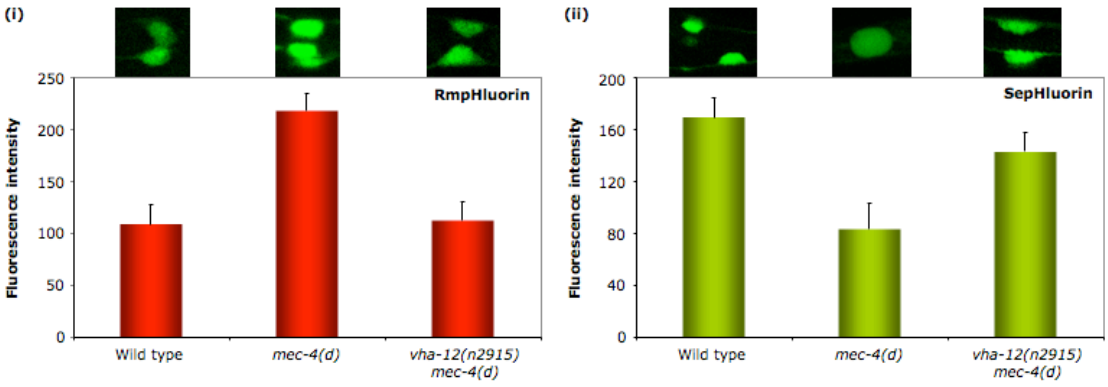
Οι V-ATPάσες, που όπως φάνηκε προηγουμένως απαιτούνται για το νεκρωτικό θάνατο, ρυθμίζουν την οξίνιση κυτταροπλασματικών οργανιδίων. Προκειμένου να ελεχθεί η σημασία της ύπαρξης όξινων ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων κατά τη νέκρωση, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα των ασθενών βάσεων χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) και acridine orange (A.O.). Οι ουσίες αυτές τείνουν να συσσωρεύονται σε λυσοσώματα και άλλα όξινα οργανίδια και σε μεγάλες συγκεντρώσεις μειώνουν την οξύτητα αυτών (Oka and Futai, 2000). Επώαση νηματωδών σε 5mM NH_4Cl ή 80μM A.O. προκάλεσε καταστολή της νέκρωσης σε στελέχη *mec-4(d)*, *deg-3(d)* και α_s*(gf)* (Εικ. **A2(i)**). Επιπλέον, αύξησε την ανθεκτικότητα και βιωσιμότητα των ζώων μετά από επώαση σε NaN_3 (Εικ. **A2(ii)**). Συνεπώς, η επιτέλεση του νεκρωτικού θανάτου εξαρτάται άμεσα από την ανάπτυξη όξινων συνθηκών σε ενδοκυτταρικά οργανίδια.



Εικόνα A2. Αύξηση του pH ενδοσωμικών διαμερισμάτων με χορήγηση ασθενών βάσεων προστατεύει από το νεκρωτικό θάνατο. (i) Αριθμός νεκρωτικών νευρώνων ανά 100 ζώα σταδίου L1 των στελεχών *mec-4(d)*, *deg-3(d)* και α_s*(gf)* μετά από επώαση σε διαλύματα υψηλών συγκεντρωσεων των ασθενών βάσεων NH_4Cl και acridine orange. (ii) Επώαση νηματωδών σε NH_4Cl ή acridine orange μείωσε την ευαισθησία αυτών σε συνθήκες υποξίας.

Α3. Προσδιορισμός των μεταβολών του ενδοκυτταρικού pH κατά τη νέκρωση

Για την παρακολούθηση της οξύτητας των κυττάρων κατά τη διάρκεια της νέκρωσης, χρησιμοποιήθηκαν μορφές της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP ευαίσθητες στις αλλαγές του pH (pHluorins). Όταν οι ratiometric και superecliptic pHluorins (RmpHluorins και SepHluorins αντίστοιχα) διεγείρονται με ακτινοβολία μήκους κύματος 515nm, η εκπομπή αυτών στα 476nm εξαρτάται από την τιμή του pH (Miesenbock et al., 1998; Sankaranarayanan et al., 2000). Η εκπομπή της RmpHluorin αυξάνεται σε χαμηλό pH, ενώ της SepHluorin μειώνεται. Οι δύο μορφές pHluorins εκφράστηκαν στους έξι αισθητήριους νευρώνες, που είναι υπεύθυνοι για την αντίληψη μηχανικών ερεθισμάτων και προσδιορίστηκε η ένταση του φθορισμού σε νευρώνες στελεχών άγριου τύπου και στελεχών *mec-4(d)*. Διαπιστώθηκε αύξηση της έντασης της RmpHluorin (Εικ. **Α3(i)**) και μείωση της SepHluorin (Εικ. **Α3(ii)**) σε διογκωμένα λόγω νέκρωσης νευρικά κύτταρα στελεχών *mec-4(d)*. Κατά συνέπεια, ο νεκρωτικός θάνατος συνοδεύεται από οξίνιση του κυτταρόπλασματος. Αντίστοιχη οξίνιση ωστόσο δεν παρατηρήθηκε όταν οι pHluorins εκφράστηκαν σε διπλά μεταλλαγμένα στελέχη *vha-12(n2915)mec-4(d)*, στα οποία δυσλειτουργούν οι V-ATPάσες (Εικ. **Α3**). Επομένως, η ενεργότητα των V-ATPασών είναι απαραίτητη για τη μείωση του κυτταροπλασματικού pH. Δεδομένου ότι η δυσλειτουργία των κυστιδιακών αντλιών πρωτονίων οδηγεί επίσης σε καταστολή της νέκρωσης (Εικ. **Α1**), μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η οξίνιση του κυτταροπλάσματος δεν είναι απλά συνέπεια της καταστροφής των κυττάρων, αλλά είναι αναγκαία για το νεκρωτικό θάνατο.

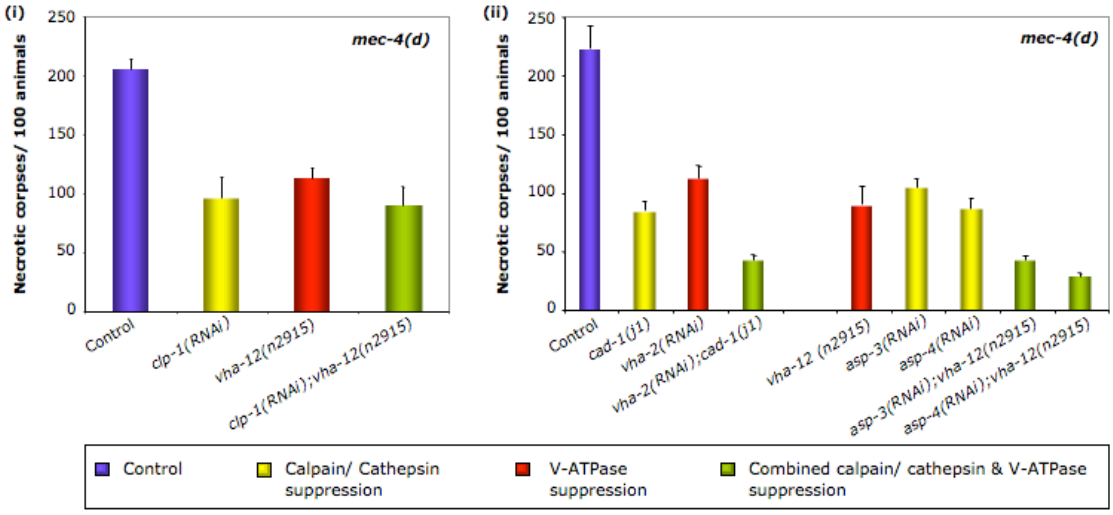


Εικόνα Α3. Η οξίνιση του κυτταροπλάσματος νευρικών κυττάρων που υφίστανται νέκρωση απαιτεί τη δράση των V-ATPασών. (i) Η ένταση εκπομπής της RmpHluorin στα 515nm είναι μεγαλύτερη σε εκφυλιζόμενους νευρώνες στελεχών *mec-4(d)* σε σύγκριση με τους νευρώνες ζώων άγριου τύπου. Μειώνεται ωστόσο στα διπλά μεταλλαγμένα στελέχη *vha-12(n2915)mec-4(d)*, υποδεικνύοντας ότι δε συμβαίνει οξίνιση των νευρικών κυττάρων σε αυτά τα ζώα. (ii) Αντίστροφα, η ένταση εκπομπής της SepHluorin είναι χαμηλή στο όξινο πριβάλλον εκφυλιζόμενων νευρώνων και αυξάνεται στο πιο αλκαλικό περριβάλλον του κυτταροπλάσματος των νευρικών κυττάρων στελεχών άγριου τύπου και *vha-12(n2915)mec-4(d)*.

Α4. Συσχέτιση της δράσης των V-ATPασών με το μονοπάτι καλπαϊνών-καθεψινών κατά το νευροεκφυλισμό

Προηγούμενες μελέτες σε νηματώδεις έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση αρχικά των καλπαϊνών CLP-1 και TRA-3 και ακολούθως των πρωτεασών ασπαρτικού ASP-3 και ASP-4 συμβάλλει στο νεκρωτικό θάνατο (Syntichaki et al., 2002). Αντίστοιχα μόρια εμπλέκονται και στον εκφυλισμό νευρώνων θηλαστικών (Yoshida et al., 2002). Προκειμένου να διερευνηθεί η συσχέτιση της δράσης αυτών των παραγόντων με τη δράση των V-ATPασών κατά τη νέκρωση, μελετήθηκε το αποτέλεσμα της συνδυασμένης καταστολής τους σε γενετικό υπόβαθρο *mec-4(d)*. RNAi για το γονίδιο *clp-1* σε διπλά μεταλλαγμένα στελέχη *vha-12(n2915)mec-4(d)* προκάλεσε μικρή περαιτέρω μείωση στο ποσοστό νευροεκφυλισμού (Εικ. **A4(i)**). Το τελικό αποτέλεσμα ωστόσο δε διέφερε σημαντικά από την επίδραση RNAi για το *clp-1* σε στελέχη *mec-4(d)*. Πιθανότατα, οι V-ATPάσες συμμετέχουν στον κυτταρικό θάνατο, δρώντας στο ίδιο μονοπάτι με τις καλπαΐνες. Λαμβάνοντας υπόψη και την προστατευτική επίδραση της δυσλειτουργίας των V-ATPασών σε στελέχη με υπερενεργά κανάλια ασβεστίου (*deg-3(d)*) (Εικ. **A1(v)**), θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η δράση των αντλιών πρωτονίων έπεται της ανόδου της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού ασβεστίου και της ενεργοποίησης των καλπαϊνών.

Για τον προσδιορισμό της συσχέτισης V-ATPασών και πρωτεασών ασπαρτικού κατά τη νέκρωση, στοχεύθηκε καταρχήν με RNAi το γονίδιο *vha-2* σε στελέχη *cad-1(j1);mec-4(d)*. Η ενεργότητα των καθεψινών είναι μειωμένη κατά 90% σε γενετικό υπόβαθρο *cad-1(j1)*, με συνέπεια την καταστολή του νεκρωτικού θανάτου (Jacobson et al., 1988; Syntichaki et al., 2002). Η καταστολή ενισχύθηκε ακόμη περισσότερο, όταν στα ίδια ζώα ελαττώθηκε η λειτουργία των V-ATPασών (Εικ. **A4(ii)**). Παρομοίως, ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης των ενζύμων ASP-3 ή ASP-4 και της δραστηριότητας των αντλιών H^+ σε νηματώδεις που εκφράζουν το αλληλόμορφο *vha-12(n2915)*, οδήγησε σε αυξημένη προστασία έναντι στο νεκρωτικό θάνατο σε σύγκριση με το αποτέλεσμα της μεμονωμένης επίδρασης κάθε παράγοντα (Εικ. **A4(ii)**). Η οξίνιση του κυττάρου μέσω της δραστηριότητας των V-ATPασών συμβάλλει πιθανά στη δημιουργία συνθηκών πιο ιδανικών για την αποδομητική δράση υδρολυτικών ενζύμων κατά τη νέκρωση. Εξάλλου, άριστη ενεργότητα των πρωτεασών ασπαρτικού επιτυγχάνεται σε όξινο περιβάλλον, όπως αυτό που επικρατεί στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων (Goll et al., 2003; Ishidoh and Kominami, 2002).



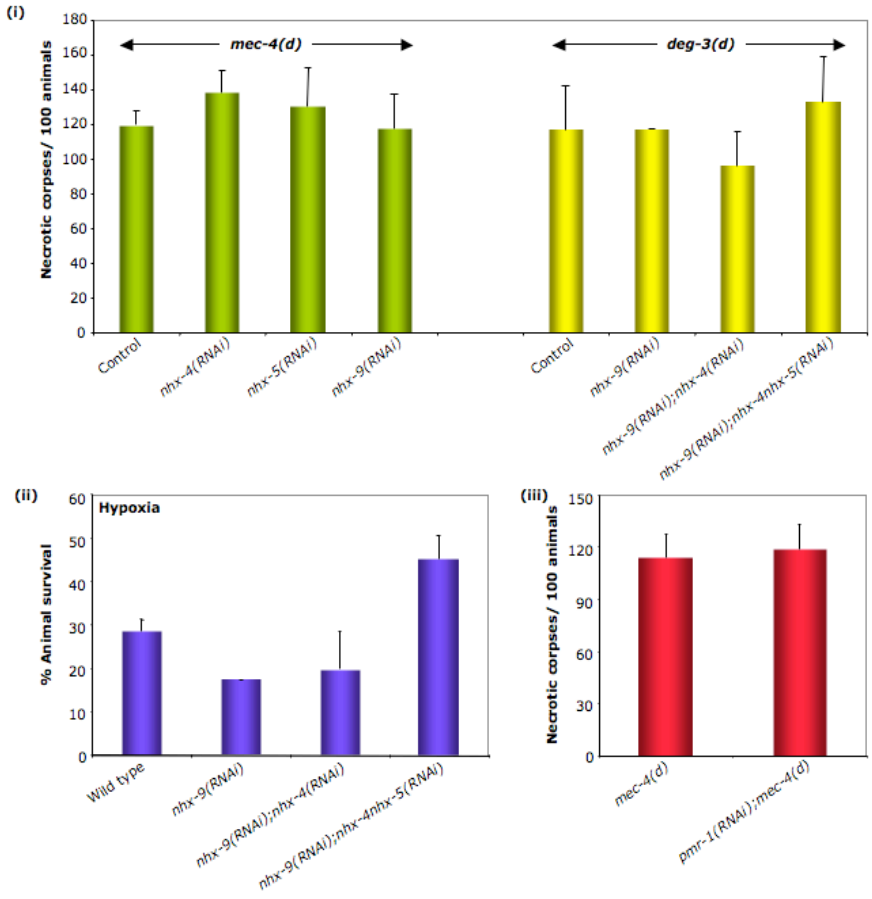
Εικόνα Α4. Οι V-ATPάσες συνεργάζονται με πρωτεολυτικά ένζυμα για την επιτέλεση του νεκρωτικού θανάτου νευρώνων στο *C. elegans*. (i) Δυσλειτουργία των V-ATPασών δεν είχε καμία επιπλέον επίδραση στην καταστολή της νέκρωσης λόγω μειωμένης έκφρασης της καλπαΐνης CLP-1. (ii) Η καταστολή της νέκρωσης λόγω μείωσης της ενεργότητας των πρωτεασών ασπαρτικού ενισχύεται όταν στα ίδια ζώα παρεμποδίζεται ταυτόχρονα η δράση των V-ATPασών.

Α5. Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών μηχανισμών ομοιόστασης του ενδοκυτταρικού pH στη νέκρωση

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης του pH στο κύτταρο παίζουν οι αντλίες ανταλλαγής ιόντων Na^+/H^+, που εντοπίζονται σε μεμβράνες ενδοκυτταρικών οργανιδίων και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στο *C. elegans* έχουν ανιχνευθεί εννέα αντλίες Na^+/H^+ (NHX-1 ως NHX-9) με διαφορετικό πρότυπο έκφρασης τόσο σε ιστολογικό όσο και σε υποκυτταρικό επίπεδο (πίνακας 2-*ΕΙΣΑΓΩΓΗ*) (Nehrke and Melvin, 2002). Δεδομένου ότι η πλειονότητα των γενετικών ερεθισμάτων νέκρωσης επιδρά σε νευρικά κύτταρα, επελέχθησαν με βάση το ιστολογικό πρότυπο τα κανάλια NHX-4, -5 και -9, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των αντλιών κατά το νεκρωτικό θάνατο. Το NHX-4 εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα του νηματώδους, ενώ τα NHX-5 και -9 σε νευρώνες και στο εκκριτικό κύτταρο αντίστοιχα. Η λειτουργία του εκκριτικού κυττάρου επηρεάζει την ομοιόσταση ιόντων σε ολόκληρο το σώμα των νηματωδών. Επειδή δεν υπήρχαν διαθέσιμα στελέχη με μεταλλαγές στα αντίστοιχα γονίδια, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του RNAi για τη μείωση της έκφρασής τους. RNAi για καθένα από αυτά τα γονίδια ξεχωριστά δεν είχε σημαντική επίδραση στα επίπεδα κυτταρικού θανάτου στελεχών *mec-4(d)* (Εικ. **Α5(i)**). Αφενός όμως το αλληλόμορφο *mec-4(d)* προκαλεί υψηλά ποσοστά νέκρωσης, καθιστώντας δύσκολη την ανίχνευση παραγόντων που οδηγούν σε περαιτέρω αύξηση, και αφετέρου είναι πιθανό απουσία ενός καναλιού NHX, η λειτουργία του να επιτελείται από άλλα κανάλια του ίδιου τύπου. Για να εξαλειφθούν αυτοί οι περιορισμοί, στοχεύθηκαν με RNAi ταυτόχρονα τα

γονίδια *nhx-4* και *-9*, καθώς και τα *nhx-4*, *-5* και *-9* σε στελέχη *deg-3(d)* και σε στελέχη άγριου τύπου υπό συνθήκες υποξίας. Όπως φαίνεται στην εικόνα **A4(i)**, μικρή αύξηση της νέκρωσης παρατηρήθηκε σε στελέχη *deg-3(d)* μετά από παράλληλη στόχευση και των τριών γονιδίων. Ωστόσο αυτή η μεταβολή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Πιο εμφανής ήταν η επίδραση υπό συνθήκες υποξίας, όπου RNAi για το *nhx-9* αύξησε την ευαισθησία των ζώων, ενώ ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης των *nhx-4*, *-5* και *-9* έδρασε προστατευτικά (Εικ. **A5(ii)**). Το τελευταίο αποτέλεσμα έρχεται σε αντίθεση με την τάση που παρατηρήθηκε σε στελέχη *deg-3(d)* και δεν επιτρέπει την εξαγωγή σαφούς συμπεράσματος σχετικά με το ρόλο των αντλιών Na^+/H^+ στη νέκρωση.

Η ΑΤΡάση-μεταφορέας κατιόντων τύπου P, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *pmr-1*, αποτελεί έναν ακόμη μηχανισμό ρύθμισης του pH στα κύτταρα. RNAi για το *pmr-1* δεν είχε ωστόσο επίδραση στο νεκρωτικό θάνατο νευρώνων, που εκφράζουν την τοξική πρωτεΐνη MEC-4(d) (Εικ. **A5(iii)**).



Εικόνα Α5. Επίδραση διαφορετικών μηχανισμών ρύθμισης του κυτταρικού pH στη νέκρωση. (i) Καταστολή της έκφρασης ενός ή περισσότερων αντλιών ανταλλαγής Na^+/H^+ με RNAi σε στελέχη *mec-4(d)* και *deg-3(d)*. Σε καμία περίπτωση δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική επίδραση στο νεκρωτικό θάνατο. (ii) RNAi για τα γονίδια *nhx-9*, *-4* και *-5* σε νηματώδεις που επωάζονται παρουσία NaN_3. Ενώ η επιβίωση των ζώων μειώνεται μετά από καταστολή του *nhx-9*, αυξάνεται μετά από συνδυασμένη στόχευση και των τριών γονιδίων. (iii) RNAi για το γονίδιο *pmr-1* δεν επηρεάζει τα επίπεδα νεκρωτικού θανάτου σε στελέχη *mec-4(d)*.

Β. Τα Λυσοσώματα στο Νεκρωτικό Θάνατο

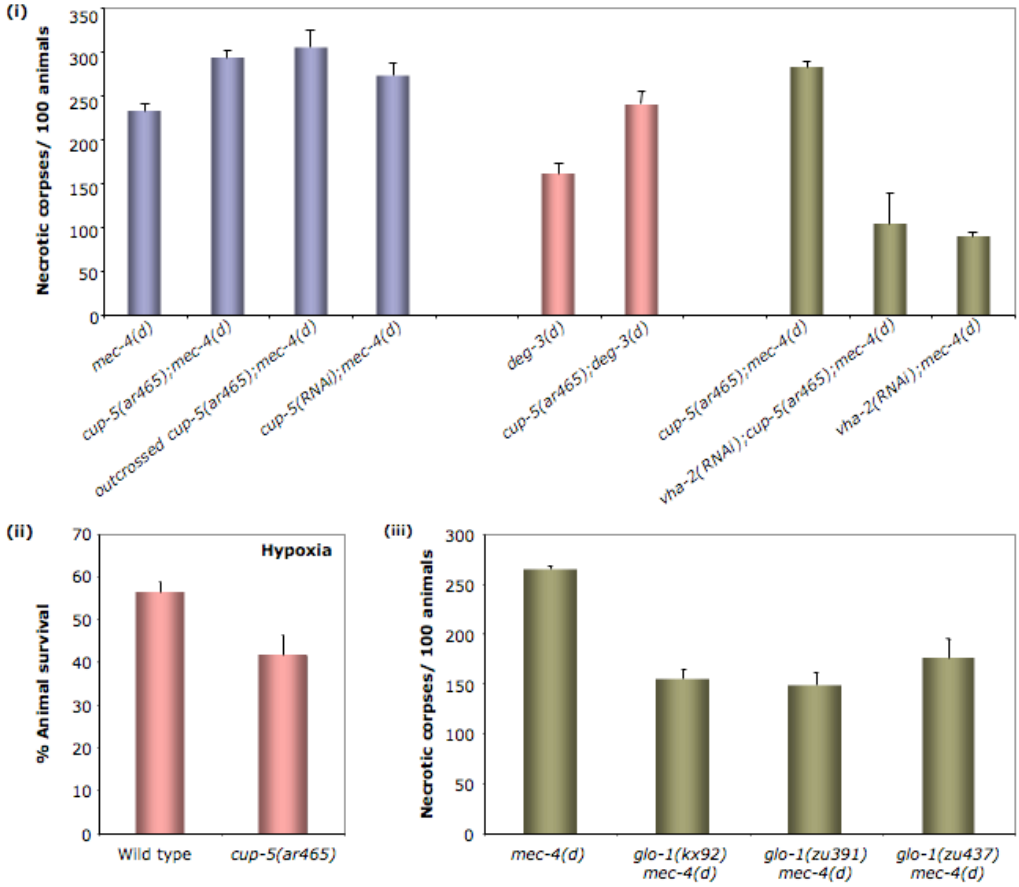
Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν προηγουμένως δείχνουν ότι κατά τη διάρκεια της νέκρωσης συμβαίνει οξίνιση του κυτταροπλάσματος, που είναι σημαντική για την καταστροφή των κυττάρων. Οι παρατηρήσεις σχετικά με την επίδραση λυσομοτροπικών ασθενών βάσεων και τη συμβολή των V-ATPασών, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως σε όξινα ενδοκυτταρικά οργανίδια, καταδεικνύουν τη σημασία της ύπαρξης λειτουργικών λυσοσωμάτων για την καταστροφή των κυττάρων. Η διερεύνηση του ρόλου των λυσοσωμάτων στο νευροεκφυλισμό αποτέλεσε στόχο των πειραμάτων που περιγράφονται σε αυτήν την ενότητα.

Β1. Επίδραση αλληλομόρφων, που επηρεάζουν τη βιογένεση των λυσοσωμάτων, στους μηχανισμούς νέκρωσης

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος των λυσοσωμάτων, μελετήθηκαν καταρχάς οι επιπτώσεις μεταλλαγών σε γονίδια, τα οποία συμμετέχουν στη βιογένεση αυτών των οργανιδίων.

Το γονίδιο *cup-5* του νηματώδους είναι ομόλογο με το γονίδιο του ανθρώπου mucolipin-1 (Fares and Greenwald, 2001). Το προϊόν αυτού, η πρωτεΐνη Mucolipin-1, σχηματίζει ένα μη εκλεκτικό κανάλι κατιόντων και έχει συσχετισθεί με την ασθένεια Mucolipidosis τύπου IV. Το *cup-5* απαιτείται για την ομαλή βιογένεση των λυσοσωμάτων του *C. elegans* (Schaheen et al., 2006). Στελέχη με το υπομορφικό αλληλόμορφο *cup-5(ar465)* παρουσιάζουν αύξηση στον αριθμό και το μέγεθος των κατά τα άλλα όξινων λυσοσωμάτων (Fares and Greenwald, 2001). Διαπιστώθηκε ότι τα στελέχη αυτά ήταν πιο ευαίσθητα στην τοξική επίδραση των αλληλομόρφων *mec-4(d)* και *deg-3(d)* (Ν.Τ. και Π.Σ.), καθώς και του αναστολέα της αναπνευστικής αλυσίδας NaN_3 (Εικ. **Β1(i)** και **(ii)**). Η ενίσχυση της νέκρωσης θα μπορούσε ωστόσο να οφείλεται σε μη ταυτοποιημένες μεταλλαγές του γενετικού υποβάθρου των συγκεκριμένων ζώων και όχι στο *ar465*. Για να διερευνηθεί αυτή η πιθανότητα, πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις μεταξύ στελεχών *cup-5(ar465)* και άγριου τύπου με συνεχή επιλογή για το *ar465*, ώστε να απαλλαχθεί το στέλεχος *cup-5(ar465)* από πιθανές άγνωστες μεταλλαγές (Μ. Α-S). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του RNAi, για να μειωθεί ειδικά η έκφραση του *cup-5* (Μ. Α-S). Και μετά από αυτούς τους χειρισμούς τα ποσοστά νέκρωσης σε στελέχη *mec-4(d)* αυξήθηκαν (Εικ. **Β1(i)**). Το αποτέλεσμα αυτό αντιστράφηκε όταν ελλατώθηκε η ενεργότητα της V-ATPάσης, που είναι απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία των λυσοσωμάτων. RNAi για το γονίδιο *vha-2* προστάτευσε τους νευρώνες στελεχών *cup-5(ar465);mec-4(d)* (Εικ. **Β1(i)**). Φαίνεται λοιπόν ότι η αυξημένη ενεργότητα των λυσοσωμάτων προκαλεί και αύξηση του νεκρωτικού θανάτου.

Σε μία αντίστροφη προσέγγιση, μελετήθηκε η νέκρωση σε στελέχη *glo-1(lf)*, με απώλεια λειτουργίας του αντίστοιχου γονιδίου (M. A-S). Το *glo-1* κωδικοποιεί μία GTPάση Rab, απαραίτητη για τη βιογένεση οργανιδίων λυσοσωμικής φύσης του πεπτικού σωλήνα (Hermann et al., 2005). Τόσο η ανίχνευση λυσοσωμικών δεικτών όσο και η έκφραση των υπομονάδων της V-ATPάσης VHA-11 και VHA-17 σε πρόδρομα κύτταρα του εντέρου είναι αμελητέες σε στελέχη *glo-1(lf)*. Απώλεια λειτουργίας του *glo-1*, λόγω έκφρασης του αλληλομόρφου *zu391*, *kx92* ή του *zu437*, οδήγησε σε μείωση των επιπέδων νέκρωσης σε στελέχη *mec-4(d)* (Εικ. **B1(iii)**). Το σύνολο των αποτελεσμάτων φανερώνει την καθοριστική σχεδόν σημασία της παρουσίας λειτουργικών λυσοσωμάτων για την επιτέλεση του νεκρωτικού θανάτου.



Εικόνα B1. Η δημιουργία λειτουργικών λυσοσωμάτων είναι σημαντική για τη νέκρωση. (i) Ο νευροεκφυλισμός στελεχών *mec-4(d)* και *deg-3(d)* ενισχύεται υπό συνθήκες όπου το λυσοσωμικό σύστημα είναι εκτεταμένο, όπως σε γενετικό υπόβαθρο *cup-5(ar465)* ή μετά από RNAi για το *cup-5*. Τα επίπεδα κυτταρικού θανάτου ωστόσο μειώνονται, όταν σε νηματώδεις *cup-5(ar465);mec-4(d)* παρεμποδίζεται η οξίνιση των λυσοσωμάτων με RNAi για το γονίδιο *vha-2*. (ii) Το αλληλόμορφο *cup-5(ar465)* αυξάνει την ευαισθησία των νηματωδών σε συνθήκες υποξίας. (iii) Αναστολή της ομαλής βιογένεσης των λυσοσωμάτων από τρία διαφορετικά μεταλλαγμένα αλληλόμορφα του γονιδίου *glo-1* καταστέλλει τη νέκρωση που επάγεται από το *mec-4(d)*.

Β2. Αλλαγές στην κατανομή και μορφολογία των λυσοσωμάτων κατά τη διάρκεια της νέκρωσης

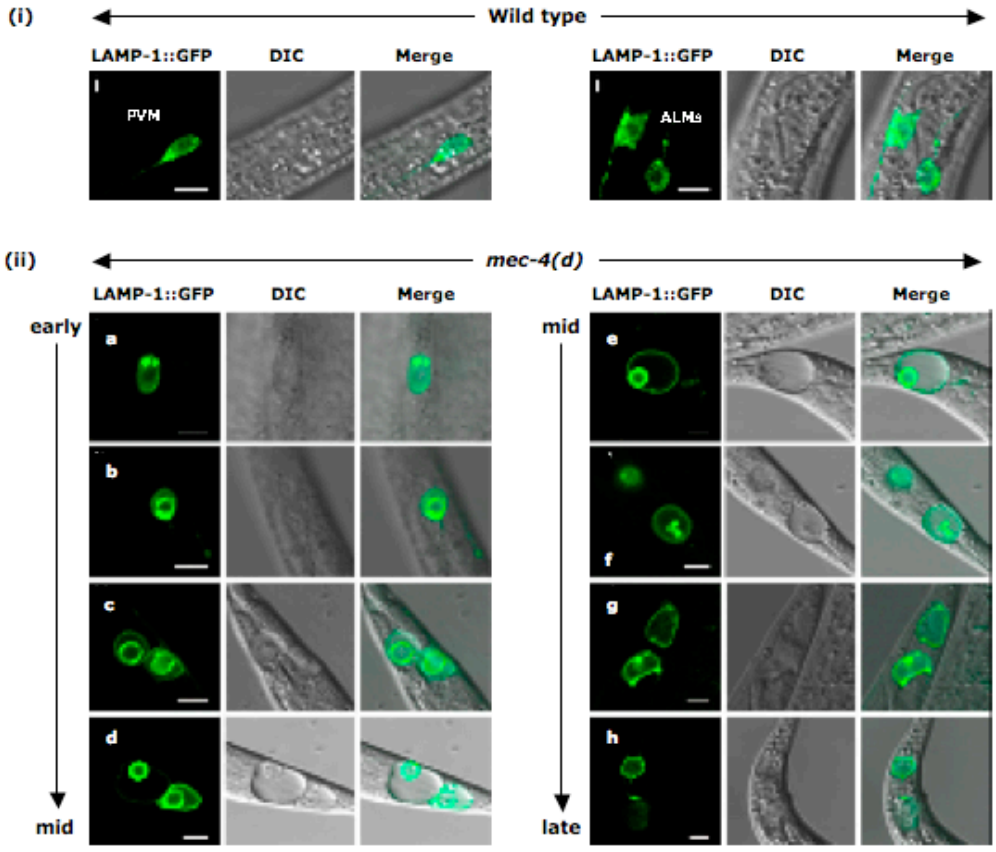
Η παρακολούθηση υποκυτταρικών μεταβολών κατά την εξέλιξη του νεκρωτικού θανάτου σε ζωντανά δείγματα (*in vivo*) πραγματοποιήθηκε με παρατήρηση ζώων, που εξέφραζαν κατάλληλους δείκτες, σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (M. A-S). Για την ανίχνευση λυσοσωμάτων εκφράστηκε η χιμαιρική πρωτεΐνη LMP-1::GFP στους έξι νευρώνες του *C. elegans*, που αντιλαμβάνονται μηχανικά ερεθίσματα. Η LMP-1 παρουσιάζει ομοιότητες με τη LAMP/CD68 της λυσοσωμικής μεμβράνης σπονδυλωτών (Eskelinen et al., 2003; Kostich et al., 2000). Είναι η μοναδική γνωστή πρωτεΐνη του νηματώδους, το καρβοξυτελικό άκρο της οποίας φέρει αλληλουχία στόχευσης στα λυσοσώματα (GYXXΦ, όπου Φ ένα μεγάλο υδρόφοβο αμινοξύ) (Kostich et al., 2000). Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση λυσοσωμάτων και ώριμων ενδοσωμάτων (Hermann et al., 2005; Nunes et al., 2005; Treusch et al., 2004).

Τα λυσοσώματα στελεχών άγριου τύπου ήταν διάσπαρτα στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων (Εικ. **Β2(i)**). Σε νευρικά κύτταρα στελεχών *mec-4(d)* η κατανομή και το σχήμα των λυσοσωμάτων παρουσίασε μεταβολές κατά την εξέλιξη του νεκρωτικού θανάτου (Εικ. **Β2(ii)**). Σε πρώιμα στάδια, διογκωμένα λυσοσώματα εντοπίστηκαν γύρω από των πυρήνα (Εικ. **Β2(ii)a**). Σταδιακά, οι μεμβράνες των λυσοσωμάτων συντήχθηκαν στην περιφέρεια μίας ενδοκυτταρικής δομής με μορφή κυστιδίου (Εικ. **Β2(ii)b-e**). Χρώση με DAPI έδειξε ότι η δομή αυτή αντιπροσώπευε πιθανότατα το διογκωμένο πυρήνα του καταστρεφόμενου κυττάρου (Εικ. **Β3**). Η σύντηξη των λυσοσωμικών μεμβρανών ήταν πιθανά αποτέλεσμα της αύξησης της συγκέντρωσης του ασβεστίου, που συμβαίνει άλλωστε κατά τη νέκρωση (Bakker et al., 1997). Αργότερα ο πυρήνας μετατοπίστηκε προς την περιφέρεια του νευρώνα και συρρικνώθηκε (Εικ. **Β2(ii)f** και **g**). Η ένταση του φθορισμού μειώθηκε σε πιο προχωρημένα στάδια (Εικ. **Β2(ii)h**). Ο φθορισμός δεν ήταν πλέον εντοπισμένος σε συγκεκριμένες δομές αλλά διάχυτος στο εσωτερικό του κυττάρου, πιθανά εξαιτίας της διάρρηξης των λυσοσωμάτων. Διάρρηξη της λυσοσωμικής μεμβράνης κατά τον κυτταρικό θάνατο έχει περιγραφεί και σε προηγούμενες αναφορές (Kroemer and Jaattela, 2005). Έχει συσχετισθεί μάλιστα με τον εντοπισμό καλπαϊνών στην περιφέρεια των λυσοσωμάτων (Yamashima, 2000; Yamashima et al., 2003).

Για να επιβεβαιωθεί η αποσταθεροποίηση των λυσοσωμάτων πραγματοποιήθηκε χρώση νευρώνων, που υφίστανται νέκρωση, με acridine orange (Π.Σ.). Παρόλο που αυτή η χρωστική τείνει να συγκεντρώνεται σε όξινα οργανίδια, η κατανομή της ήταν διάχυτη στο εσωτερικό διογκωμένων νευρώνων *mec-4(d)* (Εικ. **Β4**). Αυτή η παρατήρηση συνιστά μία επιπλέον ένδειξη της οξίνισης του κυττάρου κατά τη νέκρωση, όπως είχε διαπιστωθεί και με τη χρήση των pHlourins. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η διάρρηξη των λυσοσωμάτων

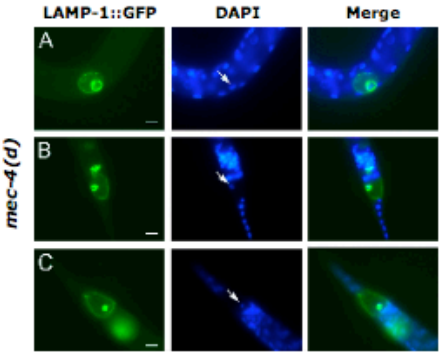
και η επακόλουθη απελευθέρωση του όξινου περιεχομένου αυτών συμβάλλει, μερικώς τουλάχιστον, στη μείωση του κυτταροπλασματικού pH κατά τη νέκρωση. Άμεση συνέπεια είναι βέβαια και η απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων, που συμμετέχουν στην αποδόμηση κυτταρικών συστατικών.

Παρόμοιες λυσοσωμικές μεταβολές συνόδευσαν το νεκρωτικό θάνατο μετά από χειρισμούς, που οδήγησαν στην αύξηση ή την καταστολή αυτού (στελέχη *cad-1(j1)*, μεταλλαγές στα γονίδια *cup-5* και *glo-1*, επίδραση NH_4Cl και Α.Ο.) (Εικ. **Β5**) (Μ. Α-S). Σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκε η αναμενόμενη διαφορά στο ποσοστό των κυττάρων που πεθαίνουν. Είναι επίσης εμφανής σε όλες τις εικόνες ο εντοπισμός της LMP-1::GFP στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Εικ. **Β2** και **Β5**). Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες σχετικές με την υποκυτταρική τοποθέτηση της LMP-1 (Hermann et al., 2005; Hughes and August, 1982; Lippincott-Schwartz and Fambrough, 1986).

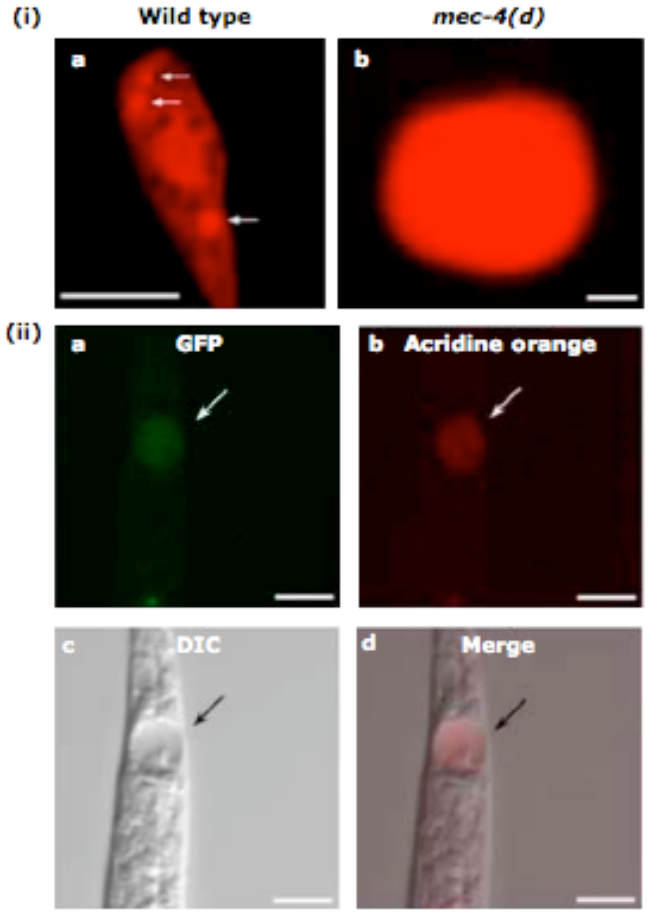


Εικόνα Β2. Μορφολογία και κατανομή των λυσοσωμάτων κατά τη νέκρωση. Η χίμαιρα LMP-1::GFP χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης λυσοσωμάτων κι εκφράστηκε στους νευρώνες που αντιλαμβάνονται μηχανικά ερεθίσματα υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *mec-17*. Απεικονίζονται φωτογραφίες από συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης, από μικροσκόπιο διαφορικής συμβολής (DIC), καθώς και το αποτέλεσμα συνδυασμού αυτών (merge). (i) Τα λυσοσώματα εμφανίζονται διάσπαρτα στο κυτταρόπλασμα νευρώνων PVM και ALMs ζώων άγριου τύπου. (ii) Κατανομή των λυσοσωμάτων σε νευρώνες PLMs στελεχών *mec-4(d)*. Κατά τα πρώτα κι ενδιάμεσα στάδια του νευροεκφυλισμού τα λυσοσώματα αυξάνουν σε μέγεθος και συγκεντρώνονται γύρω από ένα διογκωμένο πυρήνα (a-d). Στη συνέχεια ο πυρήνας μετακινείται προς την περιφέρεια του κυττάρου και

συρρικνώνεται (d-g). Σε προχωρημένα στάδια της νέκρωσης δεν είναι δυνατή η ανίχνευση διακριτών λυσοσωμάτων και εκπέμπεται διάχυτος φθορισμός από τα διογκωμένα κύτταρα (g, h).

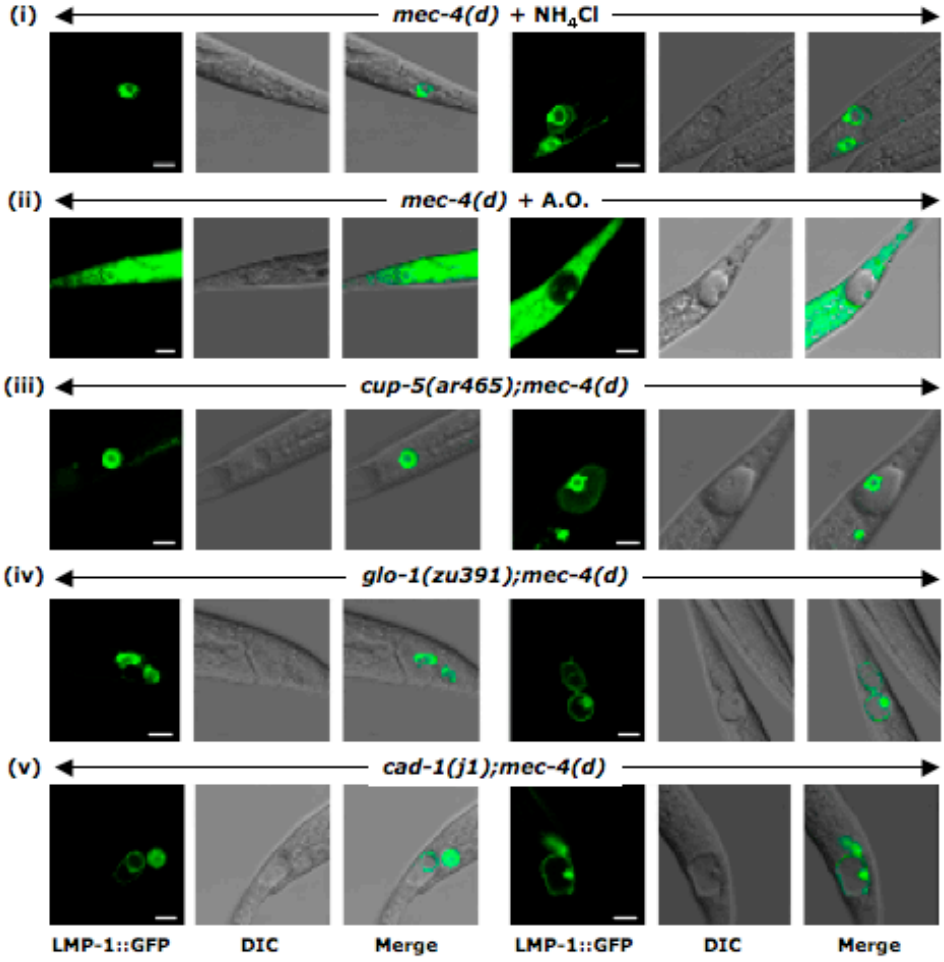


Εικόνα Β3. Χρώση πυρήνων με DAPI σε στελέχη *mec-4(d)* που εκφράζουν τη χίμαιρα LMP-1::GFP. (A) Νευρώνας ALM. (B και C) Νευρώνες PLMs. Τα βέλη δείχνουν πυρήνες εκφυλιζόμενων νευρώνων βαμμένους με DAPI.



Εικόνα Β4. Χρώση όξινων ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων με acridine orange. (i) Σε ζώα άγριου τύπου η χρωστική acridine orange συγκεντρώνεται σε λυσοσώματα (βέλη φωτογραφίας a), με αποτέλεσμα το ουδέτερο κυτταρόπλασμα να φαίνεται πιο σκούρο (a). Αντίθετα, η acridine orange διαχέεται στο πιο όξινο κυτταρόπλασμα των εκφυλιζόμενων νευρικών κυττάρων σε στελέχη *mec-4(d)* (b). Οι λευκές γραμμές αντιπροσωπεύουν μήκος περίπου 5μm. (ii) Για την ανίχνευση των εκφυλιζόμενων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε GFP, η οποία εκφράστηκε στους νευρώνες που αντιλαμβάνονται μηχανικά ερεθίσματα υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *mec-4* (a).

Η acridine orange συγκεντρώνεται στο κυτταρόπλασμα νευρώνων που υφίστανται νέκρωση (b, d), το οποίο είναι εμφανώς διογκωμένο στα συγκεκριμένα κύτταρα (c, d). Οι λευκές γραμμές αντιπροσωπεύουν μήκος περίπου 25μm.



Εικόνα Β5. Επίδραση της παρεμπόδισης της βιογένεσης και λειτουργικότητας των λυσοσωμάτων στην κατανομή και τη μορφολογία αυτών κατά τη νέκρωση. Απεικονίζονται φωτογραφίες ζώων που φέρουν το αλληλόμορφο *mec-4(d)* και οι νευρώνες PLMs των οποίων βρίσκονται σε πρώιμα (αριστερά) ή πιο προχωρημένα (δεξιά) στάδια νέκρωσης. Η χίμαιρα LMP-1::GFP χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης λυσοσωμάτων σε νευρικά κύτταρα που αντιλαμβάνονται μηχανικά ερεθίσματα. Φωτογραφίες ελήφθησαν από συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης και μικροσκόπιο διαφορικής συμβολής (DIC), ενώ απεικονίζεται και το αποτέλεσμα συνδυασμού αυτών (merge). (i και ii) Εκφυλιζόμενοι νευρώνες μετά από χορήγηση NH_4Cl 5mM (i) και A.O. 40μM (ii). Στη δεύτερη περίπτωση ανιχνεύονται και πυρήνες, επειδή η A.O. σε υψηλές συγκεντρώσεις βάφει και DNA. (iii-v) Εκφυλιζόμενοι νευρώνες σε στελέχη με αυξημένα (iii) και μειωμένα (iiv, v) επίπεδα νέκρωσης. Οι λευκές γραμμές αντιπροσωπεύουν μήκος περίπου 5μm.

Γ. Η Συμβολή της Αυτοφαγίας στο Νεκρωτικό Θάνατο

Ο ρόλος της αυτοφαγίας σε μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Τα δεδομένα σχετικά με το αν η ενεργοποίησή της έχει προστατευτική ή καταστροφική δράση είναι αντιφατικά. Σε ορισμένες μάλιστα περιπτώσεις η επαγωγή της φαίνεται να αποτελεί απλή συνέπεια της έναρξης μηχανισμών θανάτου, χωρίς ουσιαστική επίδραση σε αυτόν (Degterev et al., 2005). Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ο νηματώδης *C. elegans*, προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή συμμετοχή της αυτοφαγίας στη νέκρωση. Καταρχάς, αναζητήθηκαν στη βιβλιογραφία και μέσω του προγράμματος BLAST (Basic Local Allignment Search Tool), γονίδια του νηματώδους ομόλογα με αυτοφαγικά γονίδια της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* ή θηλαστικών (πίνακας 3-*ΕΙΣΑΓΩΓΗ*). Επιλέχθηκαν συγκεκριμένα γονίδια από κάθε στάδιο, για να μελετηθεί η επίδραση της δυσλειτουργίας τους στο νεκρωτικό θάνατο. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν φαρμακευτικοί παράγοντες για την αναστολή της αυτοφαγίας και κατάλληλοι δείκτες για την παρατήρηση αυτοφαγοσωμάτων στα κύτταρα και τη συσχέτισή τους με άλλα οργανίδια κατά τη νέκρωση. Τα αποτελέσματα αναγράφονται στη συνέχεια.

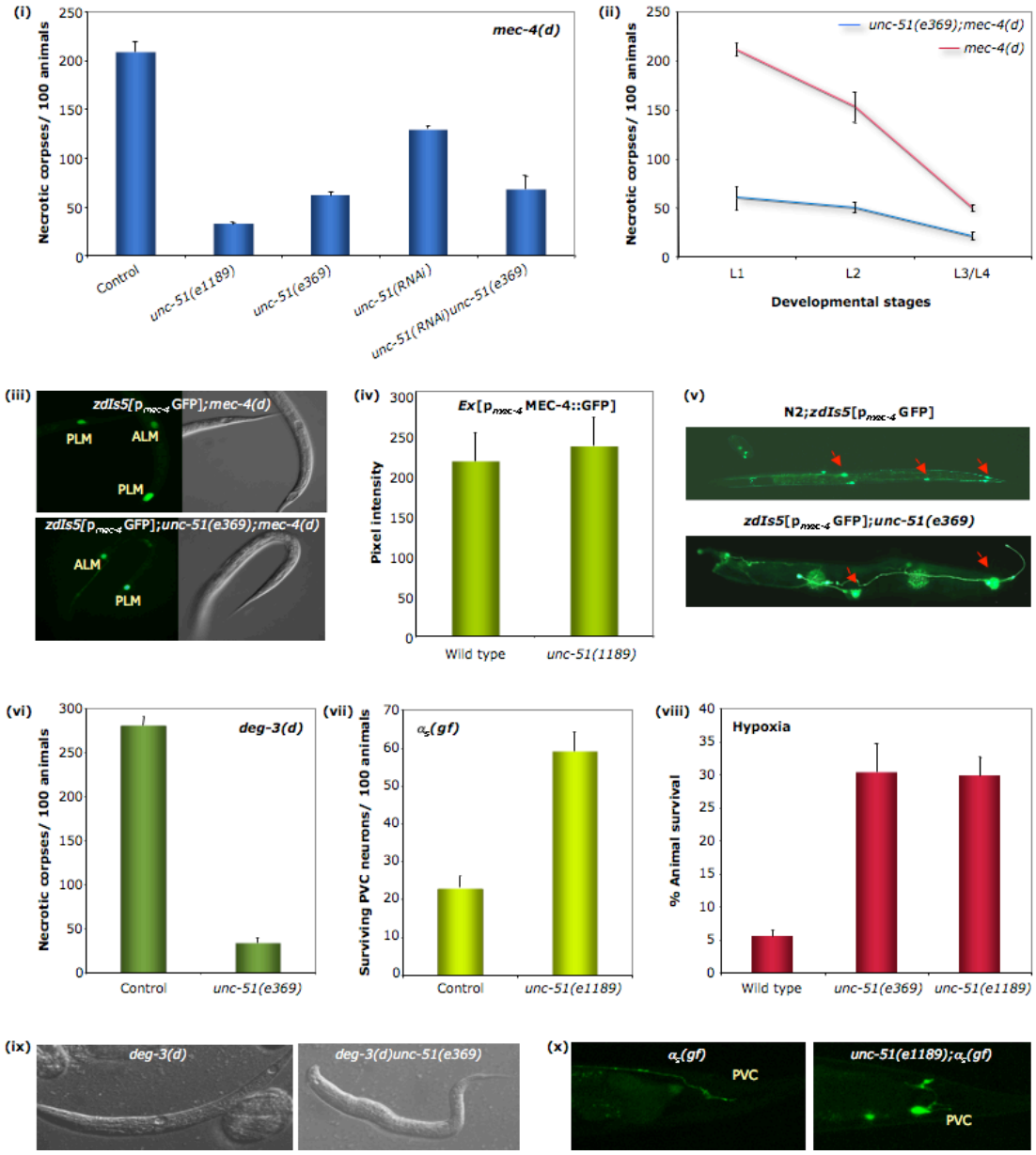
Γ1. Η κινάση UNC-51 απαιτείται για τη νέκρωση στο *C. elegans*

Το γονίδιο *unc-51* κωδικοποιεί μία κινάση σερίνης/θρεονίνης και είναι ομόλογο του γονιδίου της ζύμης Atg1, που συμμετέχει στην έναρξη σχηματισμού αυτοφαγικών κυστιδίων. Μείωση της λειτουργίας του *unc-51* με RNAi, καθώς και σε στελέχη που εκφράζουν τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα *e369* ή *e1189*, κατέστειλε σημαντικά την τοξικότητα της πρωτεΐνης MEC-4(d) (Εικ. **Γ1(i)**). Το αλληλόμορφο *e1189* προκαλεί μείωση των επιπέδων mRNA του *unc-51*, ενώ το *e369* φέρει πρώιμα κωδικόνια λήξης και θεωρείται το πιο ισχυρό αλληλόμορφο (Ogura et al., 1997). Υπάρχουν ωστόσο ενδείξεις ότι δεν οδηγεί σε πλήρη απώλεια της ενεργότητας της UNC-51 (Lai and Garriga, 2004). Προκειμένου να επιτευχθεί ολική αναστολή της δράσης της κινάσης, πραγματοποιήθηκε RNAi για το *unc-51* σε ζώα με γενετικό υπόβαθρο *unc-51(e369);mec-4(d)*. Δεν ενισχύθηκε όμως η καταστολή της νέκρωσης (Εικ. **Γ1(i)**). Κατά τον προσδιορισμό των ποσοστών του κυτταρικού θανάτου διαπιστώθηκε ότι ζώα με μεταλλαγές στο *unc-51* διατηρούσαν σχετικά μεγάλο αριθμό διογκωμένων-νεκρωτικών κυττάρων στο 2ο προνυμφικό στάδιο (L2). Δεδομένου ότι η νέκρωση που επάγεται από το *mec-4(d)* κορυφώνεται στο στάδιο L1 ((Hall et al., 1997), Εικ. **A1(iii)**), η προηγούμενη παρατήρηση θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη καθυστέρησης του νεκρωτικού θανάτου. Μέτρηση των ποσοστών νέκρωσης σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια έδειξε ότι η καταστολή της νέκρωσης σε στελέχη *unc-51(e369);mec-4(d)* δεν οφείλεται σε αλλαγή του χρονικού προτύπου εκδήλωσης της τοξικότητας του *mec-4(d)* (Εικ. **Γ1(ii)**). Διαπιστώθηκε

επίσης ότι ο συνολικός αριθμός των καταστρεφόμενων κυττάρων ήταν σημαντικά μικρότερος στα ζώα με δυσλειτουργική UNC-51 (131.8±21.6 σε στελέχη *unc-51(e369);mec-4(d)* έναντι 413.1±26.2 σε στελέχη *mec-4(d)*). Οι νευρώνες που επιβίωσαν, λόγω μείωσης της ενεργότητας της πρωτεΐνης UNC-51, διατήρησαν τη λειτουργικότητά τους, όπως φάνηκε από την ικανότητά τους να εκφράζουν GFP (Εικ. **Γ1(iii)**) (Π.Σ.).

Για να διαπιστωθεί αν η προστατευτική δράση της δυσλειτουργίας της UNC-51 οφείλεται σε μεταβολές στην έκφραση του τοξικού ερεθίσματος, συγκρίθηκαν τα επίπεδα φθορισμού σε στελέχη άγριου τύπου και *unc-51(e1189)*, που έφεραν την εξωχρωμοσωμική αλληλουχία *Ex*[p_{mec-4}MEC-4::GFP]. Η ένταση της GFP δεν παρουσίασε καμία διαφορά (Εικ. **Γ1(iv)**), δείχνοντας ότι η έκφραση του γονιδίου *mec-4* δεν επηρεάζεται από μεταλλαγές στο *unc-51*. Η φυσιολογική απόκριση στελεχών *unc-51(e369)* σε μηχανικά ερεθίσματα, συμπεριφορά η οποία εξαρτάται από τη MEC-4, επιβεβαίωσε ότι ούτε η λειτουργικότητα αυτής της τελευταίας επηρεάζεται από την UNC-51. Επιπλέον, ο σχηματισμός των έξι αισθητήριων νευρώνων, που ευθύνονται για τη συγκεκριμένη συμπεριφορά κι εκφράζουν το γονίδιο *mec-4*, δεν παρεμποδίζεται σε ζώα *unc-51(e369)* και μόνο οι άξονες αυτών εμφανίζονται παραμορφωμένοι (Εικ. **Γ1(v)**) (Π.Σ.). Άλλωστε η πρωτεΐνη UNC-51 των νηματωδών συμμετέχει σε διαδικασίες επιμήκυνσης νευραξόνων (Lai and Garriga, 2004). Φαίνεται λοιπόν ότι η UNC-51 παίζει ρόλο στην επιτέλεση της νέκρωσης, επιδρώντας σε κάποιο στάδιο μετά την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου.

Για να διαπιστωθεί αν το γονίδιο *unc-51* είναι γενικότερα απαραίτητο στη νέκρωση, ανεξάρτητα από το ερέθισμα που την προκαλεί, μελετήθηκε η επίδραση των αλληλομόρφων *e369* ή/και *e1189* σε στελέχη *deg-3(d)* και α_s*(gf)*, καθώς και υπό συνθήκες υποξίας. Το ποσοστό των νεκρών κυττάρων ήταν σημαντικά μικρότερο σε ζώα *deg-3(d)unc-51(e369)* σε σύγκριση με τα απλά μεταλλαγμένα στελέχη *deg-3(d)* (Εικ. **Γ1(vi)** και **(ix)**). Παρομοίως, μέτρηση των λειτουργικών-φθοριζόντων νευρώνων PVC σε ενήλικα ζώα με γενετικό υπόβαθρο α_s*(gf)* έδειξε ότι ο αριθμός τους ήταν σημαντικά μεγαλύτερος σε στελέχη που εξέφραζαν παράλληλα το *unc-51(e1189)* (Εικ. **Γ1(vii)** και **(x)**). Ακόμη, και τα δύο αλληλόμορφα (*e369* και *e1189*) του *unc-51* έδρασαν προστατευτικά κατά την επώαση νηματωδών σε NaN_3 (Εικ. **Γ1(viii)**). Συνεπώς, η δράση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης UNC-51 συμμετέχει στον εκφυλισμό που επάγεται από νεκρωτικά ερεθίσματα.



Εικόνα Γ1. Η πρωτεΐνη UNC-51 απαιτείται για το νεκρωτικό θάνατο σε νηματώδεις. (i) Αριθμός νεκρωτικών πτωμάτων ανά 100 ζώα του στελέχους *mec-4(d)*, που βρίσκονται στο 1ο προνυμφικό στάδιο ανάπτυξης L1 και στα οποία καταστέλλεται η δράση της πρωτεάσης UNC-51 με μεταλλαγές ή RNAi. (ii) Ποσοστό νεκρωτικών πτωμάτων σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια ζώων *mec-4(d)* και *unc-51(e369);mec-4(d)*. (iii) Έκφραση GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *mec-4* στους νευρώνες που αντιλαμβάνονται μηχανικά ερεθίσματα. Τα κύτταρα που επιβιώνουν σε στελέχη *unc-51(e369);mec-4(d)* παραμένουν λειτουργικά κι εξακολουθούν να εκφράζουν GFP. (iv) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της χίμαιρας MEC-4::GFP, που εκφράζεται υπό τον έλεγχο του ενδογενούς υποκινητή του *mec-4*. Δυσλειτουργία της UNC-51 δεν επηρεάζει την έκφραση και τη σταθερότητα της χιμαιρικής πρωτεΐνης. (v) Έκφραση της αλληλουχίας p_{mec-4}GFP σε στελέχη *unc-51(e369)* δείχνει ότι ο σχηματισμός των νευρώνων που αντιλαμβάνονται μηχανικά ερεθίσματα δεν παρεμποδίζεται στα συγκεκριμένα ζώα. Παρόλο που οι νευράξονες αυτών εμφανίζονται παραμορφωμένοι, τα κύτταρα είναι λειτουργικά και ικανά να συνθέτουν GFP. (vi) Το αλληλόμορφο *unc-51(e369)* μειώνει τα επίπεδα της νέκρωσης σε στελέχη *deg-3(d)*. (vii) Προσδιορισμός του ποσοστού των ενδιάμεσων νευρώνων PVC που επιβιώνουν σε ενήλικα ζώα του στελέχους $\alpha_s(gf)$, στα οποία η ενεργότητα της UNC-51 είναι μειωμένη. (viii) Ποσοστό

νηματωδών με μεταλλαγές στο γονίδιο *unc-51*, που επιβιώνουν μετά από επώαση σε υψηλές συγκεντρώσεις NaN_3 (συνθήκες υποξίας). (ix) Φωτογραφίες ζώων με γονότυπο *deg-3(d)* και *deg-3(d)unc-51(e369)* σε μικροσκόπιο διαφορικής συμβολής (DIC). Στο στέλεχος *deg-3(d)unc-51(e369)* δεν ανιχνεύονται διογκωμένοι νευρώνες-νεκρωτικά κύτταρα. (x) Φωτογραφίες ζώων α_s*(gf)* και *unc-51(e1189);*α_s*(gf)* σε μικροσκόπιο φθορισμού. Οι νευρώνες PVC απουσιάζουν από ενήλικα ζώα του στελέχους α_s*(gf)*, ενώ επιβιώνουν και παράγουν GFP, όταν η UNC-51 δυσλειτουργεί.

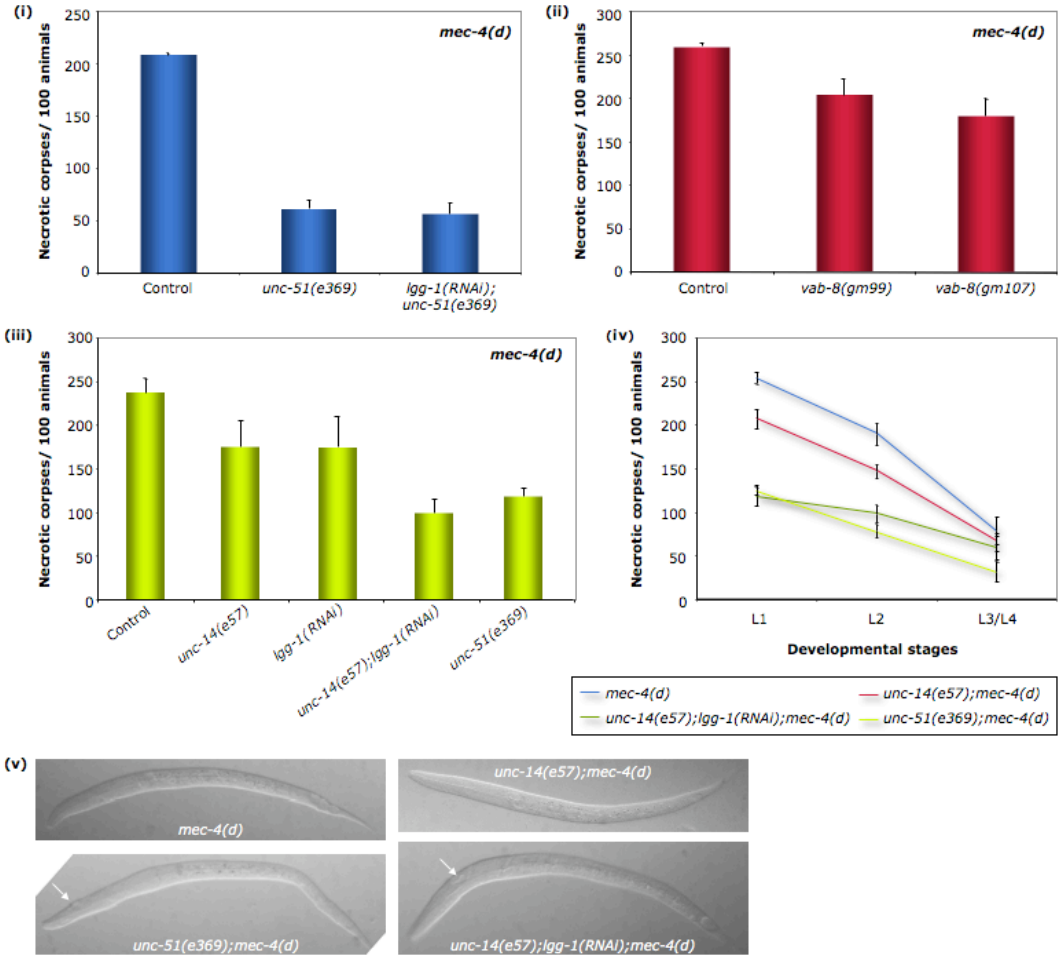
Γ2. Πιθανοί μηχανισμοί δράσης της UNC-51 κατά τη νέκρωση

Μορφολογικές παρατηρήσεις στελεχών με μεταλλαγές στο γονίδιο *unc-51* παρέχουν ενδείξεις για συμμετοχή της UNC-51 γενικά σε διαδικασίες μετακίνησης κυτταρικών μεμβρανών (Ogura et al., 1994). Σε νηματώδεις έχει εμπλακεί ειδικά στην αύξηση και τη μετανάστευση νευραξόνων και μυοβλαστών των γονάδων κατά την ανάπτυξη των ζώων (Branda and Stern, 2000; Ogura et al., 1997). Οι λειτουργίες αυτές απαιτούν αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών VAB-8 ή/και UNC-14 με το καρβοξυτελικό άκρο της UNC-51 (Lai and Garriga, 2004). Αυτή ακριβώς η θέση απουσιάζει από το αλληλόμορφο *e369*, που όπως δείχθηκε προηγουμένως δρα προστατευτικά έναντι του νεκρωτικού θανάτου (Εικ. **Γ1**). Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν αναφορές για συμμετοχή των VAB-8 και UNC-14 στην αυτοφαγία, έγινε προσπάθεια να διασαφηνιστούν οι μηχανισμοί συμβολής της UNC-51 στη νέκρωση.

Καταρχήν, διερευνήθηκε αν η συμμετοχή της UNC-51 στο νεκρωτικό θάνατο πραγματοποιείται όντως μέσω αυτοφαγικών διαδικασιών. Για το σκοπό αυτό στοχεύθηκε με RNAi το γονίδιο *lgg-1* σε διπλά μεταλλαγμένα στελέχη *unc-51(e369);mec-4(d)*. Η πρωτεΐνη LGG-1 απαιτείται για το σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων (πίνακας 3-*ΕΙΣΑΓΩΓΗ*) (δρα συνεπώς σε στάδιο που έπεται του σταδίου δράσης της UNC-51) και όπως περιγράφεται στην επόμενη ενότητα (Γ3), η δυσλειτουργία της καταστέλλει τη νέκρωση νευρικών κυττάρων. Μείωση της έκφρασης του *lgg-1* δεν επηρέασε ωστόσο τα επίπεδα νευροεκφυλισμού ζώων *unc-51(e369);mec-4(d)* (Εικ. **Γ2(i)**). Επομένως, είναι πολύ πιθανό ότι η διαδικασία της αυτοφαγίας παίζει ρόλο στη δράση της UNC-51 κατά τη νέκρωση.

Διερευνήθηκε στη συνέχεια ρόλος των μορίων VAB-8 και UNC-14. Η πρωτεΐνη VAB-8 είναι απαραίτητη για τη μετανάστευση νευραξόνων προς το οπίσθιο τμήμα του σώματος (Wightman et al., 1996). Απαντά σε δύο μορφές, τη VAB-8S, που δεν παρουσιάζει καμία ομολογία με ήδη γνωστές πρωτεΐνες, και τη VAB-8L η οποία περιέχει μία περιοχή κινεσίνης στο αμινο-τελικό της άκρο (Wolf et al., 1998). Εκτός από τον άγριο τύπο του γονιδίου *vab-8*, είναι διαθέσιμα δύο αλληλόμορφα, το ισχυρό αλληλόμορφο *gm99*, που προκαλεί απώλεια λειτουργίας και των δύο τύπων της πρωτεΐνης και οδηγεί στη δημιουργία ζώων με πολλαπλές ανωμαλίες, και το πιο ασθενές *gm107*, το οποίο επηρεάζει μόνο τη VAB-

8L και προκαλεί απλά έλλειψη συντονισμού κατά την κίνηση. Τόσο το *gm99* όσο και το *gm107* προκάλεσαν μικρή καταστολή του νεκρωτικού θανάτου (Εικ. **Γ2(ii)**). Μικρή αλλά στατιστικά πιο σημαντική ήταν η μείωση της νέκρωσης σε στελέχη *unc-14(e57);mec-4(d)* (Εικ. **Γ2(iii)**). Η UNC-14 είναι μία πρωτεΐνη 665 αμινοξέων, που εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους νευρώνες του *C. elegans* (Ogura et al., 1997). Επειδή η επίδρασή της θεωρήθηκε αρκετά σημαντική, διερευνήθηκε περαιτέρω ο ρόλος της.



Εικόνα Γ2. Μηχανισμοί δράσης της UNC-51 κατά τη νέκρωση. (i) Μέτρηση του ποσοστού εκφυλιζόμενων νευρώνων σε νηματώδεις σταδίου L1. RNAi για το αυτοφαγικό γονίδιο *lgg-1* δεν επηρεάζει τα επίπεδα νέκρωσης του στελέχους *unc-51(e369);mec-4(d)*. (ii) Προσδιορισμός των επιπέδων νεκρωτικού θανάτου, που επάγεται από το *mec-4(d)*, σε στελέχη με δυσλειτουργική πρωτεΐνη VAB-8. (iii) Μεταλλαγή στο γονίδιο *unc-14* προκαλεί στατιστικά σημαντική καταστολή της νέκρωσης σε νηματώδεις που εκφράζουν το αλληλόμορφο *mec-4(d)*. Αυτή η καταστολή ενισχύεται ακόμα περισσότερο με ταυτόχρονη μείωση της αυτοφαγίας στα διπλά μεταλλαγμένα στελέχη *unc-14(e57);mec-4(d)*, οπότε και τα επίπεδα του κυτταρικού θανάτου προσεγγίζουν αυτά του στελέχους *unc-51(e369);mec-4(d)*. (iv) Χρονικό πρότυπο του νεκρωτικού θανάτου σε στελέχη *mec-4(d)*, *unc-51(e369);mec-4(d)*, *unc-14(e57);mec-4(d)* και μετά από RNAi για το *lgg-1* σε νηματώδεις *unc-14(e57);mec-4(d)*. (v) Φωτογραφίες νηματωδών σε μικροσκόπιο διαφορικής συμβολής (DIC). Κυστιδιακές δομές είναι εμφανείς (λευκά βέλη) στην περιοχή της κεφαλής ζώων με γονότυπο *unc-51(e369);mec-4(d)*, καθώς και μετά από καταστολή της αυτοφαγίας σε ζώα με γενετικό υπόβαθρο *unc-14(e57);mec-4(d)*.

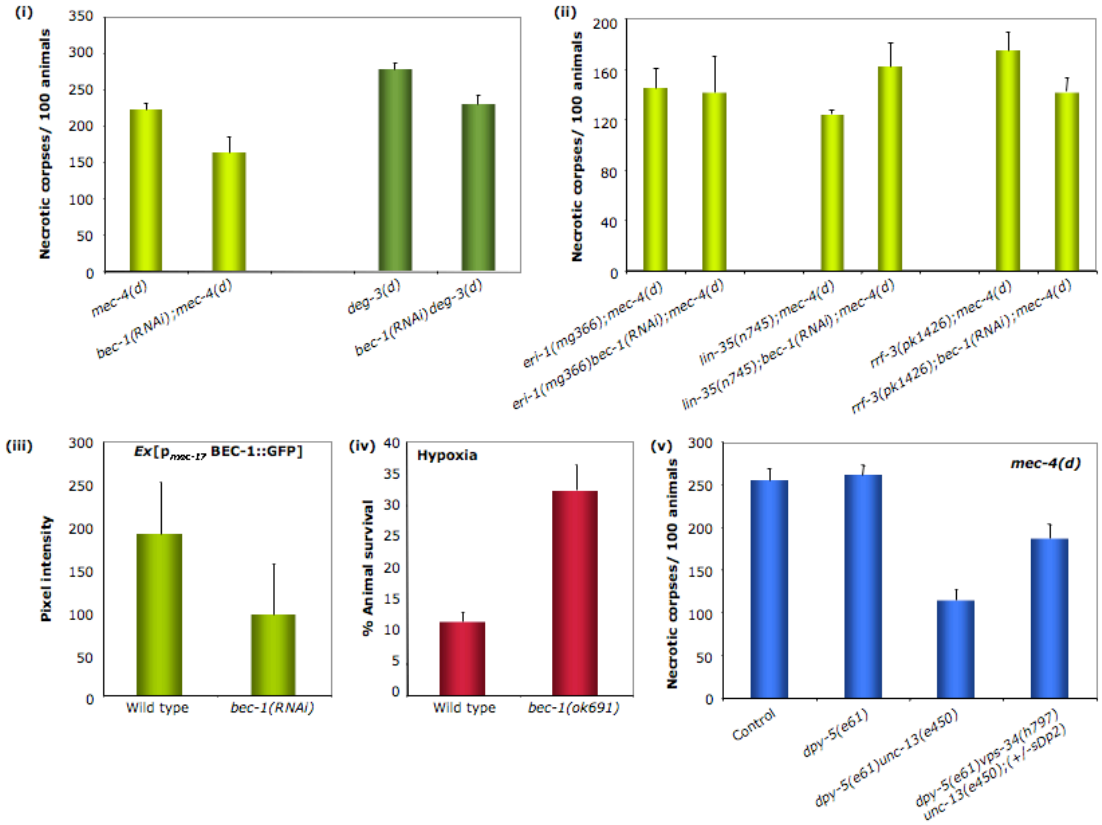
Αν η UNC-14, που αλληλεπιδρά με την UNC-51, συμβάλλει στη νέκρωση μέσω αυτοφαγίας, δυσλειτουργία γνωστών αυτοφαγικών μορίων δε θα είχε καμία επιπρόσθετη επίδραση στο ποσοστό νευροεκφυλισμού στελεχών *unc-14(e57);mec-4(d)*. Ωστόσο, RNAi για το αυτοφαγικό γονίδιο *lgg-1* ενίσχυσε την επιβίωση των νευρώνων, με αποτέλεσμα τα επίπεδα νέκρωσης να είναι παρόμοια με αυτά στελεχών *unc-51(e369);mec-4(d)* (Εικ. **Γ2(iii)**). Επιπλέον, το χρονικό πρότυπο της νέκρωσης μετά από ταυτόχρονη καταστολή της λειτουργίας των *unc-14* και *lgg-1* έμοιαζε με το αντίστοιχο ζώων με δυσλειτουργία του *unc-51* (Εικ. **Γ2(iv)**), ενώ ομοιότητες παρουσιάστηκαν και στη μορφολογία του σώματος (Εικ. **Γ2(v)**). Οι νηματώδεις με γονότυπο *unc-51(e369);mec-4(d)* έχουν κοντό και πιο παχύ σώμα και συχνά εμφανίζουν δομές που φαίνονται σαν κενά κυστίδια στη περιοχή της κεφαλής. Παρόμοια ήταν και η μορφολογία στελεχών *unc-14(e57);mec-4(d)* μετά από RNAi για το *lgg-1*. Το σύνολο αυτών των παρατηρήσεων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη UNC-51 εμπλέκεται στο νεκρωτικό θάνατο μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών, της αυτοφαγίας και μίας διαδικασίας που περιλαμβάνει τη δράση του μορίου UNC-14. Η συγκεκριμένη διατριβή εστιάστηκε στη διερεύνηση του ρόλου της αυτοφαγίας στη νέκρωση. Σχετικά δεδομένα αναφέρονται στη συνέχεια.

Γ3. Διερεύνηση της συμμετοχής λοιπών αυτοφαγικών μορίων στο νεκρωτικό θάνατο

Η καταστολή της νέκρωσης σε νηματώδεις με δυσλειτουργική UNC-51 αποτελεί ένδειξη της συμμετοχής της αυτοφαγίας σε μηχανισμούς νεκρωτικού θανάτου. Με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της αυτοφαγίας, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών αυτοφαγικών παραγόντων στη νέκρωση.

Το γονίδιο *bec-1* είναι ορθόλογο με το Atg6/Vps30 της ζύμης και παρουσιάζει 31% ομοιότητα με το γονίδιο Beclin1 του ανθρώπου (Melendez et al., 2003). Συμμετέχει στα αρχικά στάδια σχηματισμού αυτοφαγικών κυστιδίων, ως συστατικό ενός συμπλόκου κινασών PI3 τάξης III. RNAi για το *bec-1* προκάλεσε μικρή μείωση του νευροεκφυλισμού σε στελέχη νηματωδών *mec-4(d)* και *deg-3(d)* (Εικ. **Γ3.Ι(i)**). Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της μεθόδου με προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης της χίμαιρας BEC-1::GFP, έδειξε ότι το RNAi για το *bec-1* κατέστειλε μερικώς μόνο την έκφραση του γονιδίου (Εικ. **Γ3.Ι(iii)**). Πιθανά αυτός να ήταν και ο λόγος του ασθενούς φαινοτύπου που παρατηρήθηκε. Προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση της τεχνικής, χρησιμοποιήθηκαν στελέχη με γενετικό υπόβαθρο *eri-1(mg366)*, *lin-35(n745)* ή *rrf-3(pk1426)*, τα νευρικά κύτταρα των οποίων έχουν αυξημένη ευαισθησία στο RNAi (Kennedy et al., 2004; Lehner et al., 2006; Simmer et al., 2003; Timmons, 2004). Αν και το στέλεχος *rrf-3(pk1426);mec-4(d)* εμφάνισε ελαφρώς μειωμένο ποσοστό κυτταρικού θανάτου, καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε στο *eri-*

1(mg366);mec-4(d), ενώ αύξηση της νέκρωσης διαπιστώθηκε μετά από στόχευση του *bec-1* σε στελέχη *lin-35(n745);mec-4(d)* (Εικ. **Γ3.Ι(ii)**), περιπλέκοντας την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.



Εικόνα Γ3.Ι. Επίδραση της δυσλειτουργίας μορίων που επάγουν το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων στο νευροεκφυλισμό. (i) Αριθμός εκφυλιζόμενων νευρώνων ανά 100 ζώα σταδίου L1 σε στελέχη *mec-4(d)* και *deg-3(d)*, μετά από μείωση της έκφρασης του γονιδίου *bec-1* με RNAi. (ii) RNAi για το *bec-1* σε γενετικά υπόβαθρα με αυξημένη ευαισθησία στη συγκεκριμένη τεχνική. (iii) Προσδιορισμός του βαθμού καταστολής της εκφραζόμενης χιμαιρικής πρωτεΐνης BEC-1::GFP μετά από RNAi για το *bec-1*. Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας του RNAi πραγματοποιήθηκε σε νηματώδεις που εκφράζουν τη χίμαιρα BEC-1::GFP ειδικά σε νευρώνες, οι οποίοι εκφράζουν και το γονίδιο *mec-4*. (iv) Στελέχη με έλλειψη της BEC-1 εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα υπό συνθήκες υποξίας. (v) Ποσοστό νεκρωτικών πτωμάτων σε απογόνους στελεχών *mec-4(d)*, που εκφράζουν ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο της κινάσης VPS-34, καθώς και σε νηματώδεις με παρεμφερές γενετικό υπόβαθρο.

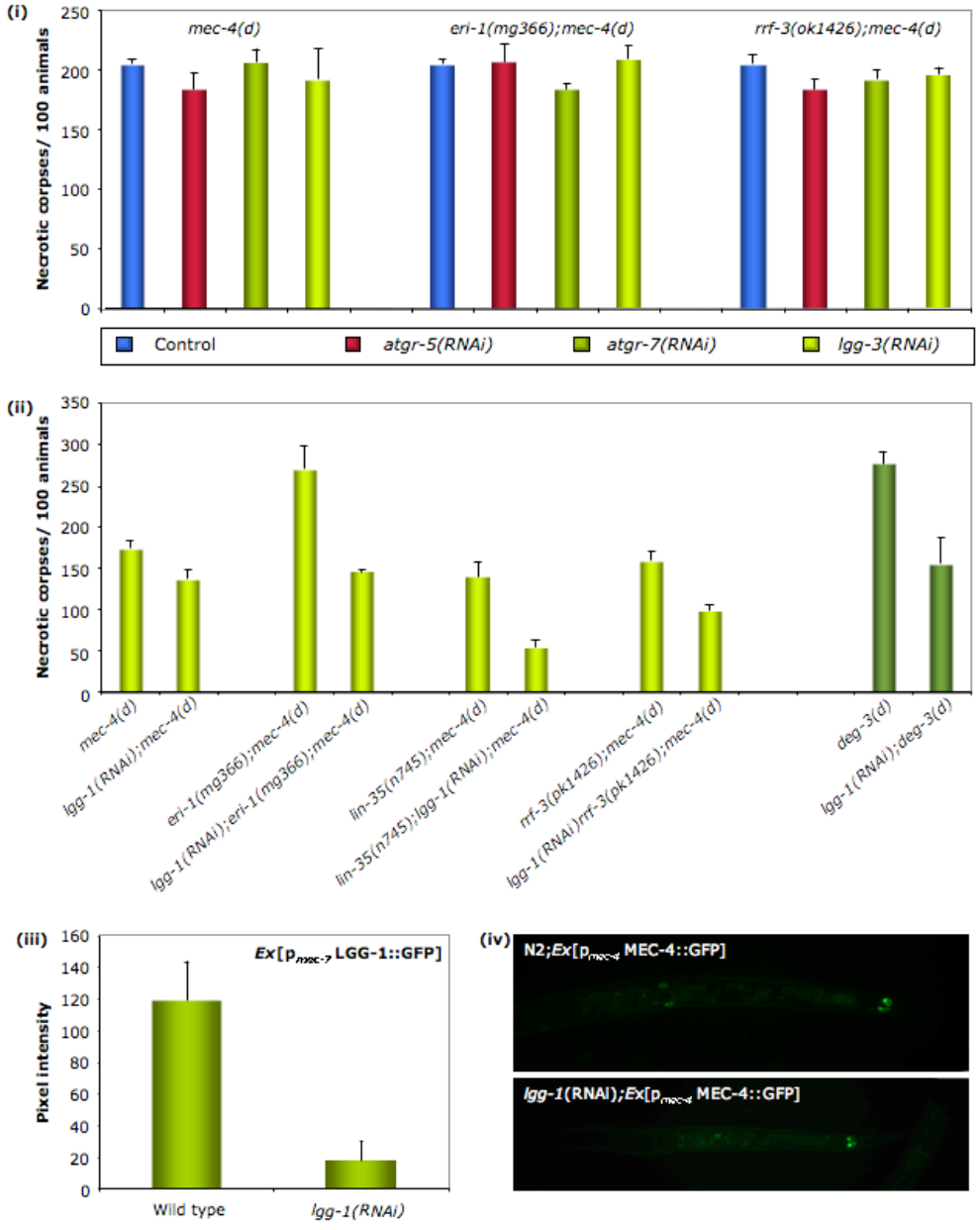
Στην προσπάθεια να διαλευκανθεί ο ρόλος του *bec-1* χρησιμοποιήθηκε το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *ok691*. Ομόζυγα στελέχη *bec-1(ok691)* σταματούν συνήθως την ανάπτυξή τους σε κάποιο προνυμφικό στάδιο και τα λίγα άτομα που καταφέρνουν να φτάσουν στην ενηλικίωση είναι στείρα. Το στέλεχος λοιπόν διατηρείται ως ετερόζυγο στη μορφή *bec-1(ok691)IV/nT1[qIs51](IV;V)*, όπου τμήμα του χρωμοσώματος IV με το αλληλόμορφο άγριου τύπου του *bec-1* και την κωδική αλληλουχία της GFP ως δείκτη έχει

μετατοπιστεί στο χρωμόσωμα V. Οι ομόζυγοι για το αλληλόμορφο *ok691* απόγονοι αυτού του στελέχους μπορούν να διακριθούν, επειδή είναι οι μόνοι που δεν εκφράζουν GFP. Σε αυτόν το φαινότυπο βασίστηκε ο προσδιορισμός της ευαισθησίας ενήλικων ζώων, ομόζυγων για το *bec-1(ok691)* στην υποξία και διαπιστώθηκε ότι είναι πιο ανθεκτικά από νηματώδεις άγριου τύπου (Εικ. **Γ3.Ι(iv)**). Λόγω τεχνικών δυσκολιών στην κατασκευή κατάλληλων στελεχών δεν διερευνήθηκε η επίδραση του αλληλομόρφου *ok691* στη νέκρωση που επάγεται από γενετικά ερεθίσματα, όπως το *mec-4(d)*. Παρ' όλα αυτά η πλειοψηφία των δεδομένων υποστηρίζει ότι η BEC-1 συμβάλλει στο νεκρωτικό θάνατο.

Στο σύμπλοκο της κινάσης PI3 τύπου III, η BEC-1 αλληλεπιδρά με την κινάση VPS-34, που κωδικοποιείται στο *C. elegans* από το γονίδιο *let-512* ή *vps-34* (Takacs-Vellai et al., 2005). Απώλεια της λειτουργίας αυτού σε ζώα ομόζυγα για το αλληλόμορφο *vps-34(h797)* προκαλεί θνησιμότητα. Είναι ωστόσο δυνατή η διατήρηση στελεχών *dpy-5(e61)vps-34(h797)unc-13(e450);sDp2*, που φέρουν το αλληλόμορφο άγριου τύπου για το *vps-34* στην εξωχρωμοσωμική αλληλουχία *sDp2*. Η αλληλουχία αυτή δεν είναι σταθερή και χάνεται με συγκεκριμένο ρυθμό κατά τη διαίρεση των κυττάρων. Προκύπτουν με αυτόν τον τρόπο ζώα χωρίς την *sDp2*, που πεθαίνουν σε προνυμφική φάση της ανάπτυξής τους. Συγκρίθηκαν τα επίπεδα νέκρωσης μεταξύ απογόνων σταδίου L1 ζώων *dpy-5(e61)vps-34(h797)unc-13(e450);mec-4(d);sDp2* και στελεχών *mec-4(d)* και *dpy-5(e61)unc-13(e450);mec-4(d)*. Το ποσοστό νέκρωσης στους απογόνους ατόμων *dpy-5(e61)vps-34(h797)unc-13(e450);mec-4(d);sDp2* ήταν μικρότερο από το αντίστοιχο ατόμων *mec-4(d)* αλλά μεγαλύτερο από αυτό ζώων *dpy-5(e61)unc-13(e450);mec-4(d)*, με τα οποία διαθέτουν κοινό γενετικό υπόβαθρο (Εικ. **Γ3.Ι(v)**). Η αδυναμία διάκρισης μεταξύ ζώων 1ου προνυμφικού σταδίου που φέρουν ή δε φέρουν το διπλασιασμό *sDp2*, καθιστά δύσκολη την εξαγωγή συμπεράσματος από αυτό το αποτέλεσμα.

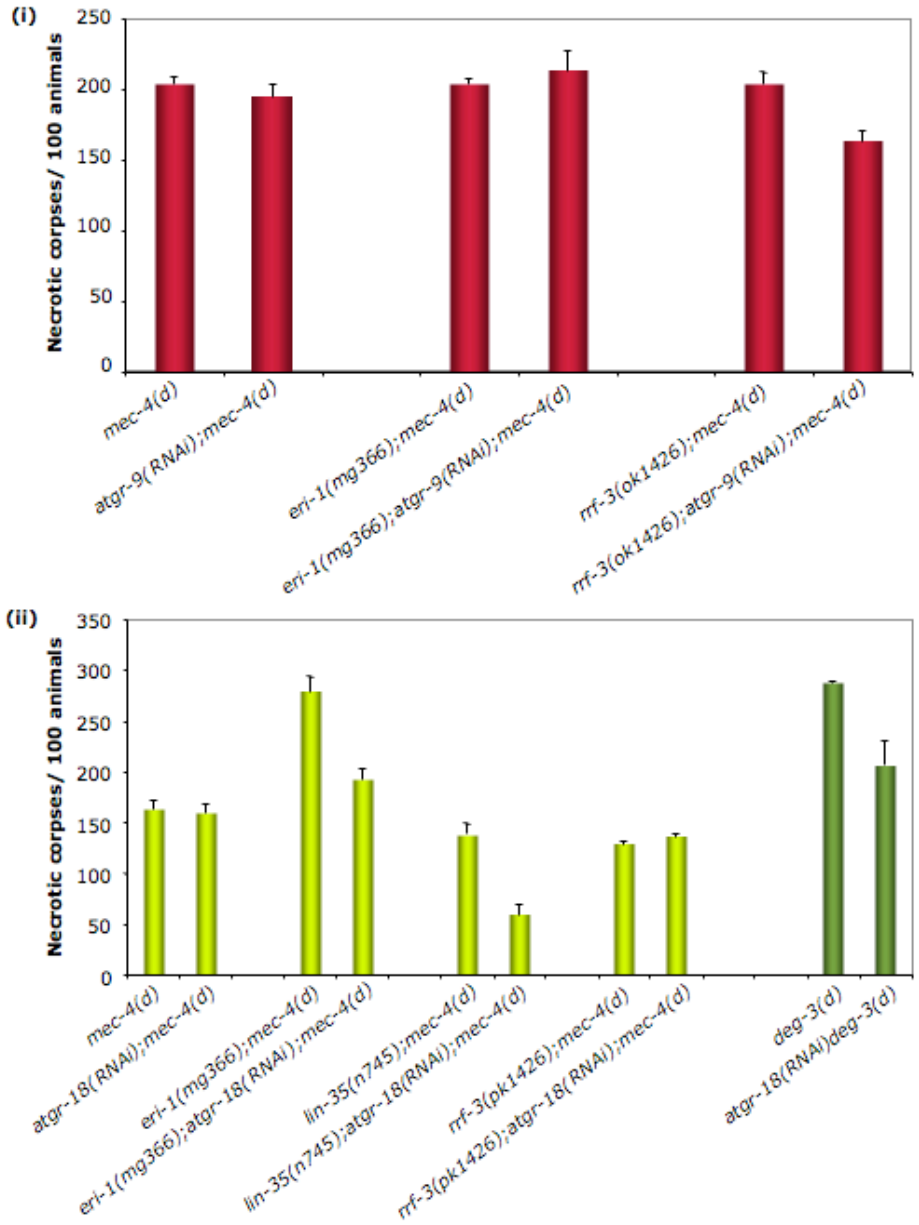
Όπως φαίνεται στον πίνακα 3 (*ΕΙΣΑΓΩΓΗ*), συγκεκριμένα αυτοφαγικά γονίδια συμμετέχουν στην ωρίμανση των αυτοφαγοσωμάτων. Μελετήθηκε η επίδραση της μειωμένης έκφρασης των πρωτεϊνών ATGR-5, ATGR-7, LGG-1 και LGG-3 στη νέκρωση που επάγεται από το *mec-4(d)*. RNAi για το *lgg-3* δεν είχε καμία επίδραση, ενώ μείωση της έκφρασης του *atgr-7* προκάλεσε πολύ μικρή καταστολή του κυτταρικού θανάτου σε στελέχη *eri-1(mg366);mec-4(d)* (Εικ. **Γ3.ΙΙ(i)**). Μικρή ήταν επίσης η προστατευτική δράση της καταστολής του γονιδίου *atgr-5* σε στελέχη *mec-4(d)* και *rrf-3(pk1426);mec-4(d)* (Εικ. **Γ3.ΙΙ(i)**). Πιο σημαντική ήταν η επίδραση της καταστολής του *lgg-1*, ιδιαίτερα στα ευαίσθητα για το RNAi γενετικά υπόβαθρα *eri-1(mg366);mec-4(d)*, *lin-35(n745);mec-4(d)* και *rrf-3(pk1426);mec-4(d)*, καθώς και σε στελέχη *deg-3(d)* (Εικ. **Γ3.ΙΙ(ii)**). Πειράματα ελέγχου της αποτελεσματικότητας της μεθόδου σε νηματώδεις που εξέφραζαν τη χίμαιρα LGG-1::GFP, έδειξαν άλλωστε ότι η απόδοσή της ήταν αρκετά υψηλή όσον αφορούσε στο

γονίδιο *lgg-1* (Εικ. **Γ3.ΙΙ(iii)**). Μικροσκοπική παρατήρηση ζώων που έφεραν την εξωχρωμοσωμική αλληλουχία *Ex*[p_{mec-4}MEC-4::GFP] οδήγησε στο συμπέρασμα ότι μείωση της λειτουργικότητας του *lgg-1* μέσω του RNAi δεν επηρέασε την έκφραση του *mec-4* και κατ' επέκταση του τοξικού ερεθίσματος (στη συγκεκριμένη περίπτωση της MEC-4(d)) (Εικ. **Γ3.ΙΙ(iv)**).



Εικόνα Γ3.ΙΙ. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ωρίμανση των αυτοφαγοσωμάτων απαιτούνται για το νεκρωτικό θάνατο. (i) RNAi για τα γονίδια *atgr-5*, *atgr-7* και *lgg-3* σε νηματώδεις που φέρουν το αλληλόμορφο *mec-4(d)*. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης ζώα με μεταλλαγές, που αυξάνουν την ευαισθησία στο RNAi. (ii) Επίδραση της μείωσης της έκφρασης του *lgg-1* στη νέκρωση που επάγεται από τα αλληλόμορφα *mec-4(d)* και *deg-3(d)*. (iii) RNAi για το *lgg-1* μειώνει σημαντικά την έκφραση της χίμαιρας GFP::LGG-1 στους νευρώνες που εκφράζουν και το γονίδιο *mec-4*. (iv) Μείωση της δραστικότητας της LGG-1 δεν επηρεάζει την έκφραση και τη σταθερότητα της χίμαιρας MEC-4::GFP.

Διερευνήθηκε τέλος η εξάρτηση του νεκρωτικού θανάτου από τα μόρια ATGR-9 και ATGR-18, που συμμετέχουν στην ανάκτηση αυτοφαγικών πρωτεϊνών μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού των αυτοφαγοσωμάτων, με σκοπό την επαναχρησιμοποίησή τους. Ενώ η μείωση της έκφρασης της ATGR-9 κατέστειλε αμυδρά μόνο την καταστροφή νευρικών κυττάρων σε στελέχη *rrf-3(pk1426);mec-4(d)* (Εικ. **Γ3.ΙΙΙ(i)**), RNAi για το *atgr-18* μείωσε σημαντικά το ποσοστό θανάτου σε ζώα των στελεχών *eri-1(mg366);mec-4*, *lin-35(n745);mec-4* και *deg-3(d)* (Εικ. **Γ3.ΙΙΙ(ii)**).

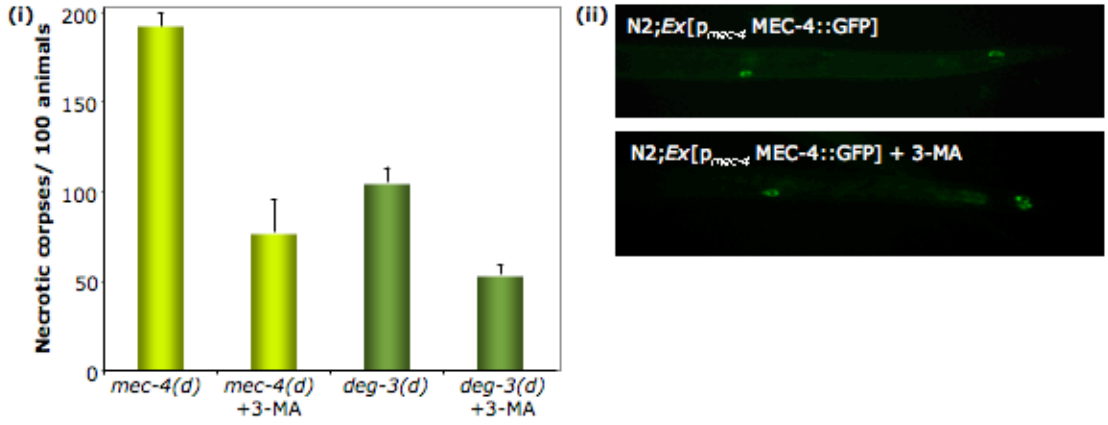


Εικόνα Γ3.ΙΙΙ. Παρεμπόδιση της ανάκτησης αυτοφαγικών πρωτεϊνών από ώριμα αυτοφαγοσώματα αναστέλλει το νεκρωτικό θάνατο. (i) Ποσοστά νεκρωτικού θανάτου στελεχών *mec-4(d)* μετά από μείωση της έκφρασης του γονιδίου *atgr-9*. (ii) RNAi για το *atgr-18* μειώνει τα επίπεδα νευροεκφυλισμού σε νηματώδεις που εκφράζουν τα αλληλόμορφα *mec-4(d)* ή *deg-3(d)*.

Το σύνολο των αποτελεσμάτων φανερώνει ότι συγκεκριμένα γονίδια που απαιτούνται για την επαγωγή της αυτοφαγίας, την έναρξη σχηματισμού αυτοφαγικών κυστιδίων και την ωρίμανσή τους, καθώς και για την ανακύκλωση αυτοφαγικών πρωτεϊνών, συμβάλλουν στην επιτέλεση του νεκρωτικού θανάτου μετά από την επίδραση τοξικών ερεθισμάτων σε νηματώδεις.

Γ4. Χημική αναστολή της αυτοφαγίας προστατεύει από το νεκρωτικό θάνατο

Η χημική ουσία μεθυλαδενίνη-3 (3-methyladenine ή 3-MA) αναστέλλει ειδικά τη δράση των φωσφατιδυλ-κινασών κι έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την καταστολή της αυτοφαγίας (Codogno and Meijer, 2005; Seglen and Gordon, 1982). Αναστέλλοντας την ενεργότητα κινασών PI3 τύπου III, παρεμποδίζει συγκεκριμένα το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων. Επώαση νηματωδών σε συγκεντρώσεις 3-MA μεγαλύτερες των 10mM μείωσε το ποσοστό νευροεκφυλισμού σε στελέχη *mec-4(d)* και *deg-3(d)* (Εικ. **Γ4(i)**). Για να ελεγχθεί αν αυτό το αποτέλεσμα ήταν συνέπεια μείωσης της έκφρασης των επιπέδων του τοξικού ερεθίσματος, μελετήθηκε η σχετική έκφραση, σταθερότητα και υποκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης MEC-4. Μικροσκοπική παρατήρηση ζώων που έφεραν την αλληλουχία p_{mec-4}MEC-4::GFP έδειξε ότι καμία από αυτές τις παραμέτρους δεν επηρεάστηκε κατά τη χορήγηση 3-MA σε νηματώδεις (Εικ. **Γ4(ii)**). Η προστατευτική επίδραση της 3-MA αποτελεί μία ακόμα ένδειξη της συμμετοχής της αυτοφαγίας στη νεκρωτική καταστροφή κυττάρων.

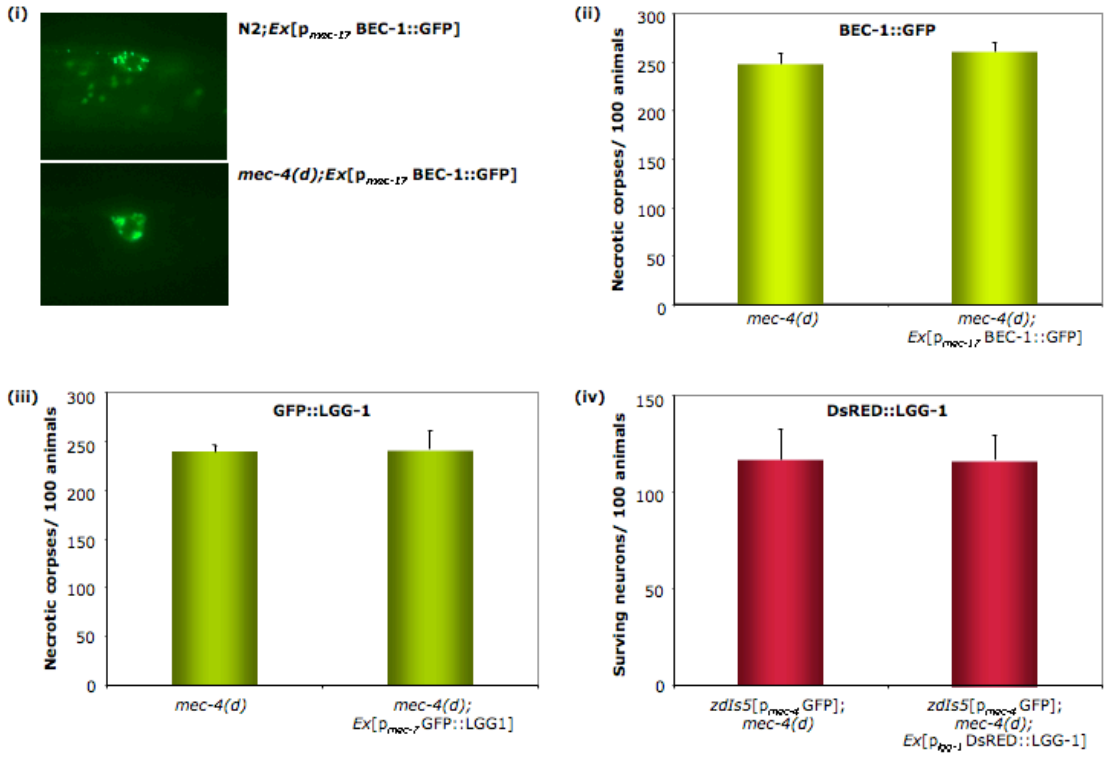


Εικόνα Γ4. Μείωση του νευροεκφυλισμού μετά από χημική αναστολή της αυτοφαγίας. (i) ποσοστό νεκρωτικών πτωμάτων στο προνυμφικό στάδιο L1 στελεχών *mec-4(d)* και *deg-3(d)*, μετά από επώαση σε διάλυμα μεθυλαδενίνης-3 (3-methyladenine ή 3-MA). (ii) Η χορήγηση 3-MA δεν επηρεάζει την έκφραση ή τη σταθερότητα της χίμαιρας MEC-4::GFP.

Γ5. Υπερέκφραση αυτοφαγικών πρωτεϊνών σε νηματώδεις

Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν υποδεικνύουν ότι η διαδιακασία της αυτοφαγίας συμβάλλει στην καταστροφή των κυττάρων κατά τη νέκρωση. Σε μία αντίστροφη προσέγγιση, έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί πρώτον, αν η επαγωγή αυτοφαγίας είναι ικανή να προκαλέσει νεκρωτικό θάνατο και δεύτερον, αν το ποσοστό νεκρωτικού θανάτου είναι υψηλότερο σε ζώα με αυξημένα επίπεδα αυτοφαγίας.

Προκειμένου να ενεργοποιηθεί η αυτοφαγία σε νηματώδεις υπερεκφράστηκαν οι αυτοφαγικές πρωτεΐνες BEC-1 ή LGG-1, που συμμετέχουν στην έναρξη σχηματισμού και στην ωρίμανση των αυτοφαγοσωμάτων αντίστοιχα. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση της ορθόλογης της BEC-1, Beclin 1, είναι ικανή να προκαλέσει επαγωγή αυτοφαγίας σε καλλιέργειες κυττάρων (Liang et al., 1999). Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, η BEC-1 εκφράστηκε ειδικά στους έξι νευρώνες που αντιλαμβάνονται μηχανικά ερεθίσματα υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *mec-17* και σε σύνδεση με GFP στο καρβοξυ-τελικό της άκρο. Ένθεση της αντίστοιχης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε νηματώδεις δεν ήταν επαρκής για να ενεργοποιήσει διαδικασίες νεκρωτικού θανάτου σε ζώα άγριου τύπου. Επιπλέον, δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα νέκρωσης στο στέλεχος *mec-4(d)* (Εικ. **Γ5(ii)**). Παρόμοιες ήταν οι συνέπειες της υπερέκφρασης της LGG-1 μέσω των πλασμιδιακών κατασκευών p_{mec-7}GFP::LGG-1 και p_{lgg-1}DsRED::LGG-1 (Εικ. **Γ5(iii)** και **(iv)**). Σύμφωνα με αυτές τις παρατηρήσεις, η επαγωγή της αυτοφαγίας δεν έχει επίπτωση στη νέκρωση. Εναλλακτικά, τα αποτελέσματα είναι πιθανό να οφείλονται σε απώλεια της λειτουργικότητας των πρωτεϊνών BEC-1 και LGG-1 λόγω σύνδεσης τους με τις φθορίζουσες πρωτεΐνες GFP ή DsRED, παρόλο που μικροσκοπικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι η υποκυτταρική τους τοποθέτηση είναι πιθανότατα σωστή. Τόσο η χίμαιρα BEC-1::GFP όσο και οι GFP::LGG-1 και DsRED::LGG-1 εντοπίστηκαν σε διάστικτα σημεία στο κυτταρόπλασμα (Εικ. **Γ5(i), Γ7(ii)** και **Γ8**). Επιπλέον, υπερέκφραση της LGG-1 δεν έχει δειχθεί να προκαλεί ενεργοποίηση της αυτοφαγίας. Τέλος, ειδικά για την περίπτωση του προσδιορισμού της νέκρωσης σε στελέχη *mec-4(d)*, έχει σημασία το γεγονός ότι τόσο η BEC-1 όσο και η LGG-1 εκφράστηκαν μέσω εξωχρωμοσωμικών αλληλουχιών. Αυτές δεν είναι σταθερές αλλά χάνονται κατά τις κυτταρικές διαιρέσεις, με συνέπεια τη δημιουργία μωσαϊκών ζώων, τα οποία πιθανά να μην εκφράζουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες στα κύτταρα που υφίστανται νέκρωση.



Εικόνα Γ5. Υπερέκφραση αυτοφαγικών πρωτεϊνών στο *C. elegans*. (i) Φωτογραφίες νευρώνων, που εκφράζουν τη χίμαιρα BEC-1::GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή p_{mec-17}. Τόσο σε νηματώδεις άγριου τύπου όσο και στο στέλεχος *mec-4(d)*, η BEC-1::GFP εμφανίζει διάστικτη κατανομή κυρίως στο κυτταρόπλασμα. (ii-iii) Επίπεδα νέκρωσης σε ζώα *mec-4(d)*, που υπερεκφράζουν BEC-1::GFP (ii) και GFP::LGG-1 (iii). (iv) Αριθμός νευρώνων που επιβιώνουν ανά 100 ενήλικα ζώα φθοριζόντων στιγμάτων *mec-4(d)*, τα οποία υπερεκφράζουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη DsRED::LGG-1. Για να είναι δυνατή η ανίχνευση των κυττάρων που εκφράζουν την τοξική πρωτεΐνη MEC-4(d), χρησιμοποιήθηκαν στελέχη με ενσωματωμένη στο γονιδίωμα νουκλεοτιδική αλληλουχία για την έκφραση GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *mec-4*.

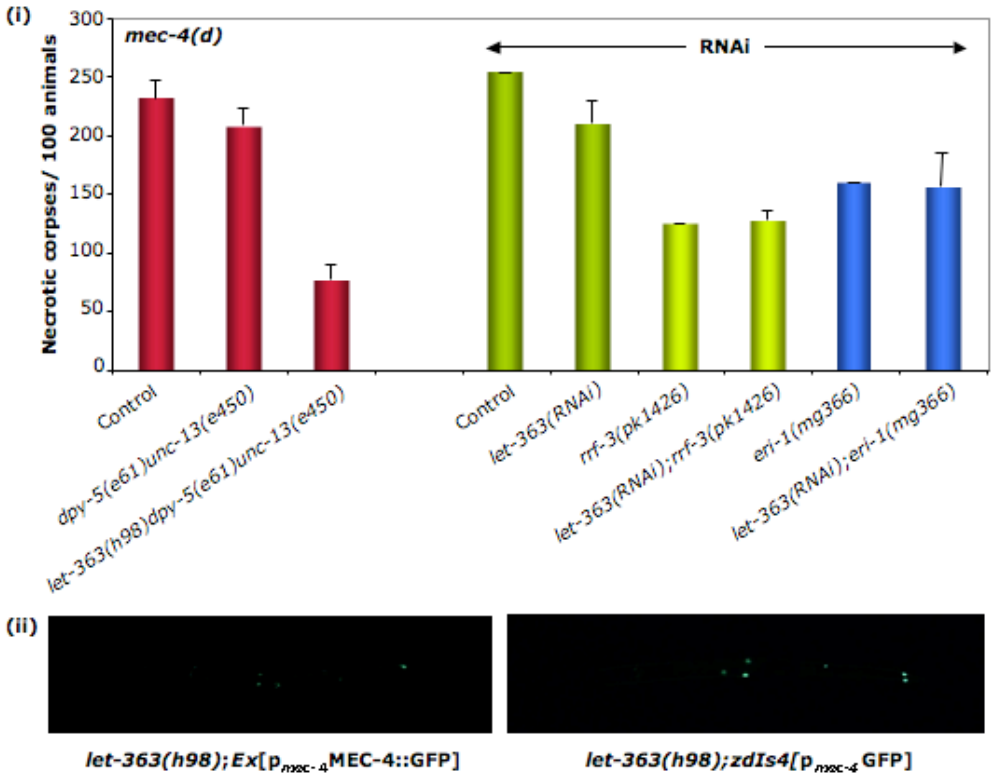
Γ6. Διερεύνηση του ρόλου της κινάσης TOR κατά τη νέκρωση

Η πρωτεΐνη TOR είναι μία συντηρημένη κινάση σερίνης/θρεονίνης, που συμμετέχει στη διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου και του οργανισμού, ρυθμίζοντας την πρωτεϊνοσύνθεση, τη μετακίνηση μεμβρανών και γενικότερα τις φυσιολογικές αποκρίσεις στη διαθεσιμότητα θρεπτικών. Αναστολή της δραστηριότητάς της με χορήγηση ραπαμυκίνης προκαλεί ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, καθώς η κινάση TOR αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή αυτής της διαδικασίας (Larsen and Sulzer, 2002).

Στο *C. elegans* η TOR κωδικοποιείται από το γονίδιο *let-363*, μεταλλαγές του οποίου οδηγούν σε παύση της ανάπτυξης στο 3ο προνυμφικό στάδιο ή σε θνησιμότητα. RNAi για το *let-363* προκάλεσε πολύ μικρή αλλά στατιστικά σημαντική καταστολή του νευροεκφυλισμού σε στελέχη *mec-4(d)* (Εικ. **Γ6(i)**). Επειδή η μέθοδος του RNAi δεν είναι τόσο αποτελεσματική σε νευρικά κύτταρα, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα νέκρωσης σε στελέχη που

φέρουν το αλληλόμορφο *h98* του *let-363*. Αν και το *h98* είναι θνησιγόνο, μπορεί να διατηρηθεί σε στελέχη *let-363(h98)dpy-5(e61)unc-13(e450)I;sDp2(I;f)*, όπου το αλληλόμορφο άγριου τύπου βρίσκεται στην εξωχρωμοσωμική αλληλουχία *sDp2*. Διαπιστώθηκε ότι μεταλλαγές που οδηγούν σε δυσλειτουργία της TOR, προστατεύουν σημαντικά από το νεκρωτικό θάνατο, που επάγεται από το *mec-4(d)* (Εικ. **Γ6(i)**). Αυτή η προστασία έναντι της νέκρωσης δεν οφείλεται σε μείωση των επιπέδων της τοξικής πρωτεΐνης MEC-4(d). Τόσο η έκφραση της GFP όσο και της χίμαιρας MEC-4::GFP υπό τον υποκινητή του γονιδίου *mec-4* φαίνονται να είναι φυσιολογικές σε ζώα ομόζυγα για το αλληλομόρφο *h98* (Εικ. **Γ6(ii)**).

Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα σχετικά με το ρόλο της κινάσης TOR στη νέκρωση, αντικρούουν τις προηγούμενες ενδείξεις για συμβολή της αυτοφαγίας στην καταστροφή των κυττάρων. Εξάλλου, αν αυτή η υπόθεση είναι σωστή, θα αναμενόταν ενίσχυση του κυτταρικού θανάτου σε περίπτωση δυσλειτουργίας της TOR. Στο κεφάλαιο της "Συζήτησης" γίνεται προσπάθεια να ερμηνευτεί αυτή η αντίφαση σε συνδυασμό και με πρόσφατα δεδομένα από άλλη ερευνητική ομάδα.



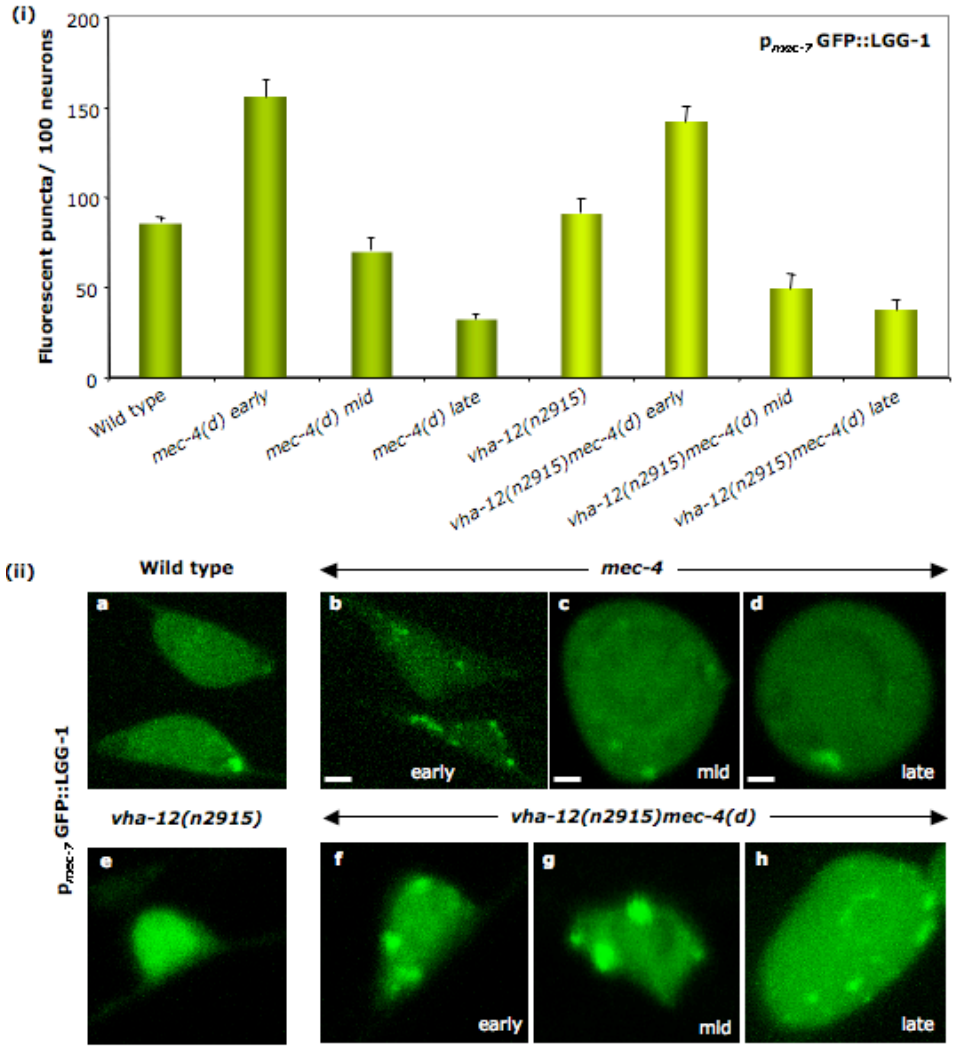
Εικόνα Γ6. Ρόλος της κινάσης TOR στο νεκρωτικό θάνατο που επάγεται από την τοξική πρωτεΐνη MEC-4(d). (i) Ποσοστό νεκρωτικών πτωμάτων σε νηματώδεις 1ου προνυμφικού σταδίου , στους οποίους δυσλειτουργεί η κινάση TOR, είτε επειδή φέρουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο αυτής *h98*, είτε λόγω καταστολής της έκφρασής της με RNAi. (ii) Έκφραση GFP σε σύνδεση ή μη με την πρωτεΐνη MEC-4 υπό τον έλεγχο του υποκινητή p_{mec-4} σε νηματώδεις με έλλειψη της κινάσης TOR.

Γ7. Ενεργοποίηση της αυτοφαγίας σε πρώιμα στάδια της νέκρωσης

Στα πλαίσια της διερεύνησης του ρόλου της αυτοφαγίας στη νέκρωση, χρησιμοποιήθηκαν επίσης κατάλληλοι δείκτες για τη μικροσκοπική παρακολούθηση αυτής της διαδικασίας σε ζωντανούς οργανισμούς *in vivo*. Η πρωτεΐνη Atg8 της ζύμης και η ομόλογη MAP-LC3 των θηλαστικών είναι οι μόνες που παραμένουν στα αυτοφαγικά κυστίδια μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού τους κι έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ειδικοί δείκτες αυτοφαγοσωμάτων (Chu, 2006; Kabeya et al., 2000). Η ομόλογη πρωτεΐνη LGG-1 έχει χρησιμοποιηθεί για τον ίδιο σκοπό στους νηματώδεις (Roudier et al., 2005). Κατασκευάστηκε πλασμιδιακή αλληλουχία για την έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης GFP::LGG-1 υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *mec-7*. Ο υποκινητής αυτός είναι ενεργός κυρίως στους έξι αισθητικούς νευρώνες που αντιλαμβάνονται μηχανικά ερεθίσματα. Η εισαγωγή του πλασμιδίου σε νηματώδεις πραγματοποιήθηκε με μικροενέσεις στις γονάδες ζώων άγριου τύπου, ενώ η μεταφορά της αλληλουχίας σε άλλα στελέχη επετεύχθει μέσω γενετικών διασταυρώσεων.

Η πλασμιδιακή κατασκευή $p_{mec\text{-}7}$GFP::LGG-1 εισήχθη αρχικά σε ζώα άγριου τύπου και σε στελέχη *mec-4(d)*. Τα αυτοφαγοσώματα είχαν τη μορφή φθοριζόντων στιγμάτων στο κυτταρόπλασμα κατά την παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Εικ. **Γ7(ii)**). Οι νευρώνες νηματωδών άγριου τύπου έφεραν μικρό αριθμό αυτοφαγοσωμάτων, συνήθως ένα ή κανένα (Εικ. **Γ7(i)** και **(ii)**). Αντίθετα, ο αριθμός των αυτοφαγοσωμάτων ήταν σημαντικά αυξημένος σε νευρώνες ζώων του στελέχους *mec-4(d)* κατά τα πρώιμα στάδια της νέκρωσης, πριν η μορφολογία του κυττάρου υποστεί οποιαδήποτε αλλοίωση. Ο αριθμός αυτός μειώθηκε σταδιακά, ώστε κύτταρα σε προχωρημένα στάδια της διαδικασίας θανάτου είχαν σπάνια ένα και συνήθως κανένα αυτοφαγόσωμα. Για να διαπιστωθεί αν η αύξηση των αυτοφαγοσωμάτων στα αρχικά στάδια οφείλεται σε ενεργοποίηση της αυτοφαγίας ή απλά σε ελάττωση του ρυθμού αποδόμησής τους μέσω των λυσοσωμάτων, εισήχθη η κατασκευή $p_{mec\text{-}7}$GFP::LGG-1 σε στελέχη *vha-12(n2915)*, με δυσλειτουργική V-ATPάση. Στα ζώα αυτά δεν πραγματοποιείται οξίνιση των λυσοσωμάτων, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η σύντηξή τους με αυτοφαγοσώματα και τα τελευταία να παραμένουν στο κυτταρόπλασμα (Kawai et al., 2007; Yamamoto et al., 1998). Δυσλειτουργία της V-ATPάσης δεν είχε σημαντική επίδραση σε ζώα "άγριου τύπου" (Εικ. **Γ7(i)** και **(ii)**). Κατά συνέπεια, ο αυξημένος αριθμός αυτοφαγοσωμάτων κατά τα πρώιμα στάδια της νέκρωσης σε στελέχη *mec-4(d)* οφείλεται μερικώς τουλάχιστον σε επαγωγή της αυτοφαγίας. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η δυσλειτουργία της V-ATPάσης δεν επηρέασε τον αριθμό αυτοφαγικών κυστιδίων ούτε σε ζώα με γενετικό υπόβαθρο *mec-4(d)* (Εικ. **Γ7(i)**). Στα πλαίσια του νεκρωτικού θανάτου συμβαίνει σταδιακή αποσταθεροποίηση των λυσοσωμάτων (βλέπε ενότητα Β2). Πιθανά αυτός είναι και ο λόγος που περαιτέρω δυσλειτουργία αυτών μέσω του υπομορφικού

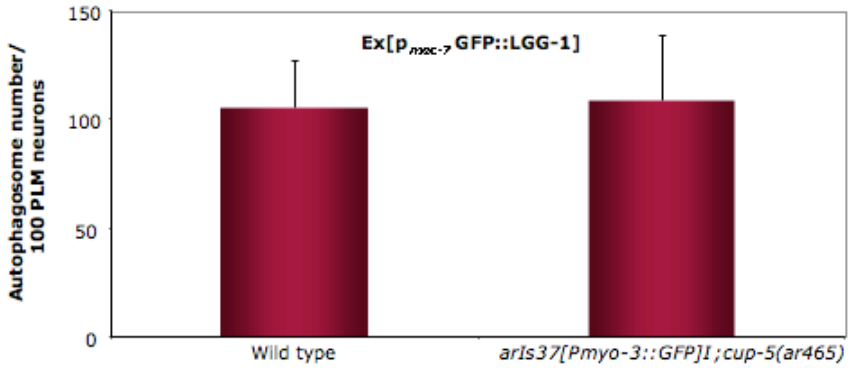
άλλωστε αλληλομόρφου *n2915*, δεν είχε καμία επίπτωση στην αυτοφαγία. Περιστασιακά ωστόσο παρατηρήθηκαν και ζώα *vha-12(n2915)mec-4(d)* με υψηλό αριθμό αυτοφαγικών κυστιδίων σε προχωρημένα στάδια της νέκρωσης (Εικ. **Γ7(ii)**).



Εικόνα Γ7. Αύξηση του αριθμού των αυτοφαγοσωμάτων σε πρώιμα στάδια της νέκρωσης. (i) Αριθμός φθοριζόντων στιγμάτων ανά 100 νευρώνες PVM ή PLMs νηματωδών που εκφράζουν τον ειδικό δείκτη αυτοφαγοσωμάτων GFP::LGG-1. Προσδιορίζεται το ποσοστό φθοριζόντων στιγμάτων-αυτοφαγοσωμάτων σε νευρικά κύτταρα ζώων άγριου τύπου, στελεχών *mec-4(d)* σε διαφορετικά στάδια της νέκρωσης και νηματωδών με δυσλειτουργική V-ATPάση λόγω έκφρασης του αλληλομόρφου *vha-12(n2915)*. (ii) Φωτογραφίες νευρώνων, που εκφράζουν το διαγονίδιο p_{mec-7}GFP::LGG-1, σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης. Μικρός αριθμός αυτοφαγοσωμάτων (συνήθως ένα ή κανένα) ανιχνεύεται σε νευρώνες ζώων άγριου τύπου (a). Το κυτταρόπλασμα κυττάρων που εκφράζουν το αλληλόμορφο *mec-4(d)* και βρίσκονται σε πρώιμα στάδια νεκρωτικού θανάτου, εμφανίζει αυξημένο αριθμό αυτοφαγοσωμάτων (b). Μειώνονται όμως σε πιο προχωρημένα στάδια της νέκρωσης, καθώς τα εκφυλιζόμενα κύτταρα διογκώνονται (c, d). Το πρότυπο κατανομής των αυτοφαγοσωμάτων είναι γενικά παρόμοιο σε νηματώδεις με δυσλειτουργική V-ATPάση (e, f). Περιστασιακά ωστόσο παρατηρούνται νευρώνες που διατηρούν υψηλό αριθμό αυτοφαγικών κυστιδίων σε ενδιάμεσα και προχωρημένα στάδια εκφυλισμού (g, h). Οι λευκές γραμμές αντιπροσωπεύουν μήκος περίπου 2μm.

Γ8. Διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ αυτοφαγίας και νέκρωσης σε στελέχη *cup-5(ar465)*

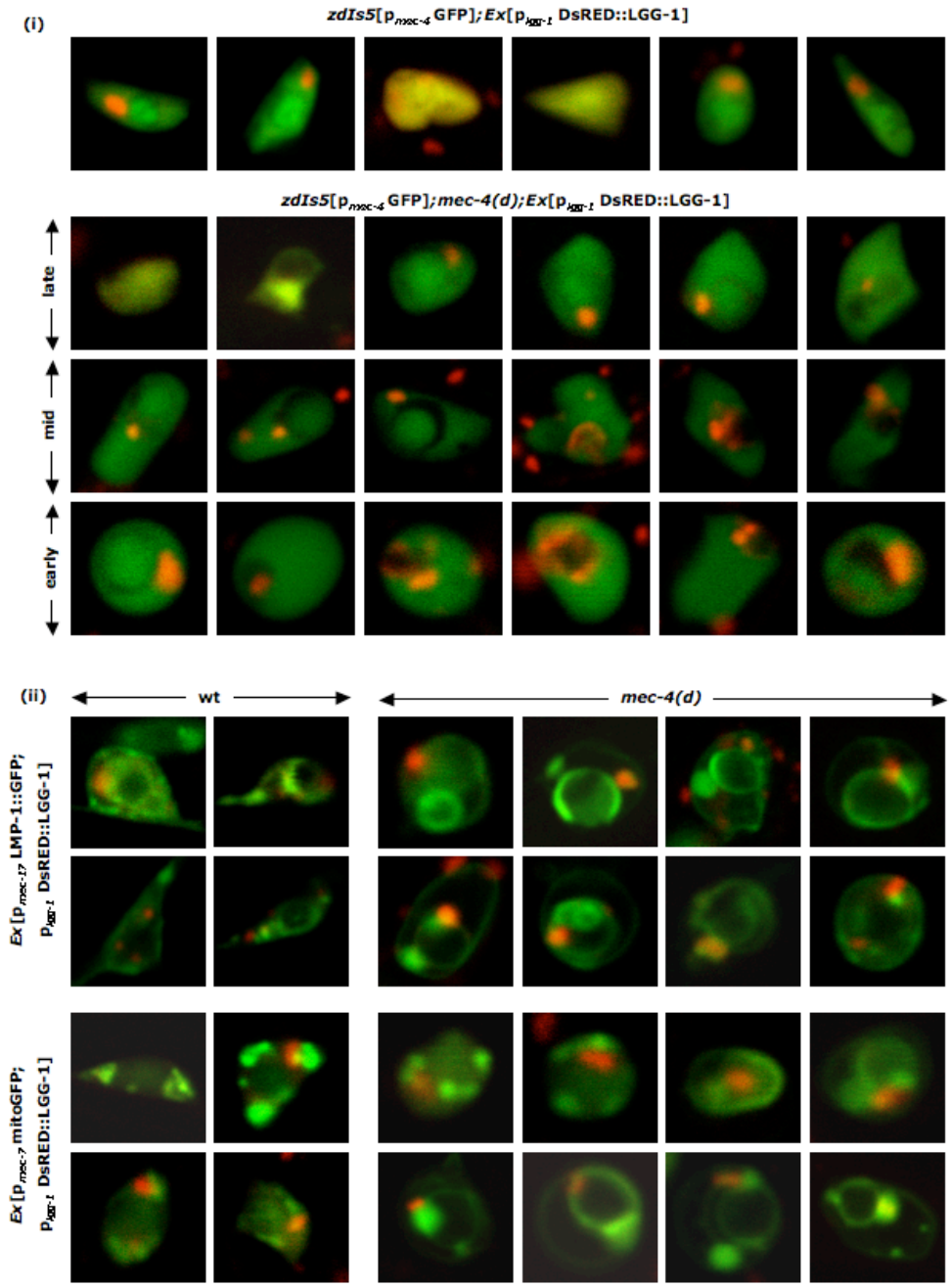
Όπως παρουσιάστηκε προηγουμένως (Εικ. **Β1**), τα επίπεδα νεκρωτικού θανάτου αυξάνονται σε νηματώδεις που εκφράζουν το αλληλόμορφο *cup-5(ar465)*. Τα έμβρυα αυτών των ζώων παρουσιάζουν επίσης ελαφρώς αυξημένο αριθμό αυτοφαγοσωμάτων, γεγονός που οφείλεται πιθανότατα σε ενεργοποίηση της αυτοφαγικής διαδικασίας (Schaheen et al., 2006). Προκειμένου να διερευνηθεί αν η ενίσχυση της νέκρωσης σε στελέχη *cup-5(ar465);mec-4(d)* σχετίζεται με την αύξηση των επιπέδων αυτοφαγίας, χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης p_{mec-7}GFP::LGG-1, για να ελεγχθεί αν το αλληλόμορφο *ar465* επηρεάζει τον αριθμό αυτοφαγοσωμάτων ειδικά στους αισθητικούς νευρώνες που εκφράζουν την πρωτεΐνη MEC-4. Δε διαπιστώθηκε όμως διαφορά μεταξύ νηματωδών του στελέχους *cup-5(ar465)* και ζώων άγριου τύπου (Εικ. **Γ8**). Αν και αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να υποδηλώνει ότι η αύξηση του νεκρωτικού θανάτου από το αλληλόμορφο *ar465* δεν αποδίδεται στην αύξηση των επιπέδων αυτοφαγίας στους νευρώνες που υφίσταται νέκρωση, η εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος παρεμποδίζεται από την έλλειψη κατάλληλου "μάρτυρα". Οι νηματώδεις άγριου τύπου ("wild type"), που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες στο συγκεκριμένο πείραμα, δεν έφεραν την ενσωματωμένη αλληλουχία *arIs37[Pmyo-3::GFP]I*, η οποία υπάρχει στο γενετικό υπόβαθρο του στελέχους *cup-5(ar465)III*. Επιπλέον, για τη δημιουργία ζώων *cup-5(ar465)III;Ex*[p_{mec-7}GFP::LGG-1] χρησιμοποιήθηκαν στελέχη με γονότυπο *arIs37[Pmyo-3::GFP]I;cup-5(ar465)III;dpy-20(e1282)IV* και δεν ελέγχθηκε η παρουσία ή απουσία του αλληλομόρφου *dpy-20(e1282)* από τα τελικά στελέχη *arIs37[Pmyo-3::GFP]I;cup-5(ar465)III;Ex*[p_{mec-7}GFP::LGG-1]. Τόσο η έκφραση της αλληλουχίας *arIs37[Pmyo-3::GFP]I* όσο και η παρουσία του αλληλομόρφου *dpy-20(e1282)* είναι πιθανό να επηρεάζουν τα επίπεδα αυτοφαγίας.



Εικόνα Γ8. Προσδιορισμός του αριθμού αυτοφαγοσωμάτων σε νευρώνες ζώων που εκφράζουν το αλληλόμορφο *cup-5(ar465)*. Ο αριθμός των αυτοφαγοσωμάτων είναι παρόμοιος σε αισθητικούς νευρώνες PLM ζώων άγριου τύπου και στελεχών *cup-5(ar465)*.

Γ9. Κατανομή των αυτοφαγοσωμάτων κατά τη νέκρωση

Για την παρακολούθηση της κατανομής των αυτοφαγοσωμάτων κατά την εξέλιξη του νεκρωτικού θανάτου και τη συσχέτιση αυτών με άλλα ενδοκυτταρικά οργανίδια χρησιμοποιήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή $p_{lgg\text{-}1}$DsRED::LGG-1. Η κατασκευή αυτή εισήχθη σε στελέχη που συνθέτουν τη χίμαιρα MEC-4::GFP υπό τον υποκινητή του γονιδίου *mec-4*, ώστε να καταστεί δυνατή η ανίχνευση των νευρώνων που νεκρώνονται. Παρατήρηση ζώων άγριου τύπου επιβεβαίωσε το μικρό αριθμό αυτοφαγοσωμάτων στα νευρικά τους κύτταρα (Εικ. **Γ9(i)**). Λόγω τεχνικών δυσκολιών δεν κατέστη δυνατή η παρατήρηση πολύ πρώιμων σταδίων νέκρωσης, στα οποία προηγουμένως είχε διαπιστωθεί αύξηση των αυτοφαγοσωμάτων. Ωστόσο, διεξοδική παρατήρηση ενδιάμεσων και προχωρημένων σταδίων κυτταρικής καταστροφής σε στελέχη *mec-4(d)*, έδειξε ότι τα αυτοφαγοσώματα κατά τη νέκρωση τείνουν να συσσωρεύονται γύρω από το διογκωμένο πυρήνα του κυττάρου (Εικ. **Γ9(i)**). Σε ορισμένες μάλιστα περιπτώσεις διαπιστώθηκε σύντηξη αυτοφαγοσωμάτων στην περιφέρεια του πυρήνα, ειδικά σε πολύ προχωρημένα στάδια κυτταρικού θανάτου. Στη θέση αυτή παρουσίασαν περιστασιακά μερικό ή ολικό συνεντοπισμό με λυσοσώματα και μιτοχόνδρια (Εικ. **Γ9(ii)**), ο οποίος θεωρείται αναμενόμενος δεδομένης αφενός της φυσιολογικής σύντηξης αυτοφαγοσωμάτων με λυσοσώματα και αφετέρου της φυσιολογικής αποδόμησης μιτοχονδρίων μέσω της αυτοφαγίας. Η ανίχνευση λυσοσωμάτων και μιτοχονδρίων έγινε σε ζώα, που εξέφραζαν τους δείκτες LMP-1::GFP και mitoGFP αντίστοιχα, ταυτόχρονα με το δείκτη αυτοφαγοσωμάτων DsRED::LGG-1. Οι παραπάνω παρατηρήσεις συμφωνούν με αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν προηγουμένως, σχετικά με την κατανομή των λυσοσωμάτων κατά τη νέκρωση (Εικ. **Β2(ii)**). Επιπλέον, φανερώνουν ότι η τάση μετατόπισης στην περιφέρεια του πυρήνα κατά το νεκρωτικό θάνατο είναι μάλλον κοινή για διαφορετικά μεμβρανικά οργανίδια.



Εικόνα Γ9. Κατανομή αυτοφαγοσωμάτων και άλλων ενδοκυτταρικών οργανιδίων κατά τη διάρκεια της νέκρωσης. (i) Κατανομή αυτοφαγοσωμάτων σε νευρώνες ζώων άγριου τύπου και στελεχών *mec-4(d)*, που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια εκφυλισμού. Για την ανίχνευση αυτοφαγοσωμάτων χρησιμοποιήθηκε το διαγονίδιο p_{lgg-1}DsRED::LGG-1. Προκειμένου να καταστεί δυνατός ο εντοπισμός των νευρικών κυττάρων, που εκφράζουν το *mec-4*, χρησιμοποιήθηκαν νηματώδεις που συνθέτουν GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή αυτού του γονιδίου. (ii) Συσχέτιση της κατανομής των αυτοφαγοσωμάτων με την κατανομή λυσοσωμάτων και μιτοχονδρίων σε νευρικά κύτταρα νηματωδών άγριου τύπου και νευρώνες ζώων *mec-4(d)* κατά την εξέλιξη του νεκρωτικού θανάτου. Ως δείκτης λυσοσωμάτων χρησιμοποιήθηκε η χίμαιρα LMP-1::GFP, ενώ για την ανίχνευση μιτοχονδρίων χρησιμοποιήθηκε GFP σε σύνδεση με μία αλληλουχία στόχευσης σε μιτοχόνδρια (mitoGFP). Και οι δύο εκφράστηκαν ειδικά στους νευρώνες που εκφράζουν την πρωτεΐνη MEC-4.

Γ10. Συνεργασία της αυτοφαγίας με το μονοπάτι καλπαϊνών-καθεψινών στα πλαίσια του νεκρωτικού θανάτου

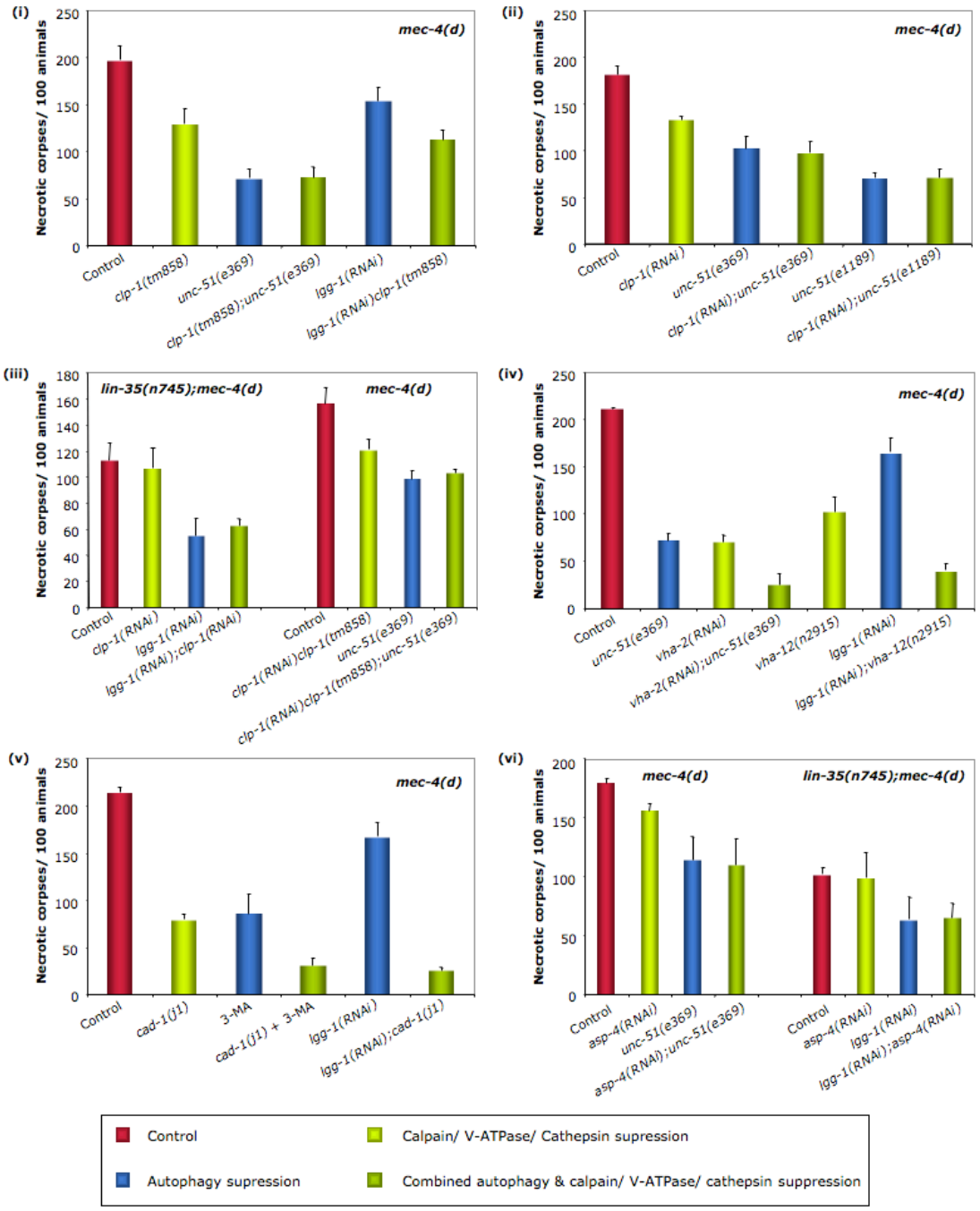
Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν μέχρι τώρα δείχνουν ότι η διαδικασία της αυτοφαγίας ενεργοποιείται κατά τα αρχικά στάδια του νεκρωτικού θανάτου, συμβάλλοντας στην καταστροφή του κυττάρου. Επόμενος στόχος λοιπόν ήταν η συσχέτιση της δράσης της με γνωστούς παράγοντες της νέκρωσης σε νηματώδεις, όπως οι καλπαΐνες και το σύστημα των λυσοσωμάτων.

Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, η δυσλειτουργία αυτοφαγικών πρωτεϊνών καταστέλλει τη νέκρωση σε στελέχη *deg-3(d)* (Εικ. **Γ1(vi)**). Δεδομένου ότι αυτοί οι νηματώδεις εκφράζουν υπερενεργά κανάλια ασβεστίου, η συγκεκριμένη παρατήρηση αποτελεί ένδειξη ότι η αυτοφαγία συμμετέχει στην κυτταρική καταστροφή σε στάδιο, που έπεται της αύξησης των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση έγινε προσπάθεια να μελετηθούν οι συνέπειες παρεμπόδισης της αυτοφαγίας μετά από χορήγηση της χημικής ουσίας thapsigargin. Η thapsigargin προκαλεί νεκρωτικό θάνατο, προωθώντας την έξοδο ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Ωστόσο, υπήρξαν τεχνικές δυσκολίες στην επιτέλεση αυτού του πειράματος. Εναλλακτικά, διερευνήθηκαν η επιπτώσεις μείωσης της αυτοφαγίας σε ζώα με δυσλειτουργικές καλπαΐνες. Αυτές οι πρωτεάσες άλλωστε υπερενεργοποιούνται κατά τη νέκρωση εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων κυτταροπλασματικού ασβεστίου. Χρησιμοποιήθηκε αρχικά το στέλεχος *clp-1(tm858)*. Το αλληλόμορφο *tm858* δεν είχε καμία επιπλέον επίδραση στην καταστολή της νέκρωσης στελεχών *mec-4(d)* από το αλληλόμορφο *unc-51(e369)* ή μετά από RNAi για το γονίδιο *lgg-1* (Εικ. **Γ10(i)**). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα μετά από RNAi για το *clp-1* σε διπλά μεταλλαγμένα στελέχη *unc-51(e369);mec-4(d)* ή *unc-51(e1189);mec-4(d)* (Εικ. **Γ9(ii)**). Επειδή τόσο η μεταλλαγή *clp-1(tm858)* όσο και το RNAi για το *clp-1* είχαν καθεαυτά μικρή επίδραση στο νευροεκφυλισμό (Εικ. **Γ10(i)** και **(ii)**), έγινε προσπάθεια να ενισχυθεί η δυσλειτουργία της CLP-1 αφενός με χρήση του ευαίσθητου στο RNAi γενετικού υποβάθρου *lin-35(n745)* και αφετέρου, με RNAi για το *clp-1* σε στελέχη *clp-1(tm858)*. Ούτε αυτοί οι χειρισμοί ωστόσο επηρέασαν το ποσοστό κυτταρικού θανάτου σε ζώα με μειωμένη έκφραση του *lgg-1* και σε στελέχη *unc-51(e369);mec-4(d)* αντίστοιχα (Εικ. **Γ10(iii)**). Το σύνολο των αποτελεσμάτων δείχνει ότι η αυτοφαγία ενεργοποιείται μετά από την άνοδο του ενδοκυτταρικού ασβεστίου κατά τη νέκρωση και δρα στο ίδιο μονοπάτι με τις καλπαΐνες. Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί με πειραματικά δεδομένα που συσχετίζουν την επαγωγή αυτοφαγίας με την κυτταροπλασματική συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου (Inbal et al., 2002).

Η συσχέτιση της αυτοφαγίας με το λυσοσωμικό σύστημα κατά τη νέκρωση είναι αναμενόμενη, δεδομένης της εξάρτησης της αυτοφαγικής διαδικασίας από τα λυσοσώματα, προκειμένου να αποδομηθεί το περιεχόμενο των αυτοφαγοσωμάτων. Ο ρόλος των V-

ΑΤΡασών στη νέκρωση έχει ήδη συζητηθεί στην ενότητα Α. Οι αντλίες αυτές απαιτούνται για την οξίνιση και κατ΄ επέκταση τη λειτουργικότητα των λυσοσωμάτων (Nishi and Forgac, 2002). Ταυτόχρονη μείωση της δράσης των V-ΑΤΡασών και της αυτοφαγίας, με RNAi για το γονίδιο *vha-2* σε νηματώδεις *unc-51(e369);mec-4(d)*, ή RNAi για το *lgg-1* σε στελέχη *vha-12(n2915)mec-4(d)*, πρόσφερε μεγαλύτερη προστασία έναντι του νευροεκφυλισμού σε σύγκριση με τη μεμονωμένη δυσλειτουργία V-ΑΤΡασών ή αυτοφαγίας (Εικ. **Γ10(iv)**). Παρόμοιες πειραματικές προσεγγίσεις για τη μείωση της έκφρασης του γονιδίου *vha-2* σε ζώα *unc-51(e1189);mec-4(d)*, είτε για την καταστολή της έκφρασης του *vha-12* σε στελέχη με μεταλλαγές στο *unc-51* οδήγησαν σε μεγάλο βαθμό στειρότητας ή εμβρυϊκής θνησιμότητας, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο προσδιορισμός των επιπέδων νέκρωσης. Τα προηγούμενα δεδομένα ωστόσο υποδεικνύουν συνεργασία μεταξύ αυτοφαγίας και λυσοσωμάτων για την καταστροφή των κυττάρων.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει επίσης την εξάρτηση της νέκρωσης από τη λειτουργία πρωτεασών ασπαρτικού, όπως οι υδρολάσες ASP-3 και ASP-4 που δρουν κυρίως σε λυσοσώματα (Syntichaki et al., 2002). Η μεταλλαγή *cad-1(j1)* προκαλεί μείωση της δραστικότητας καθεψινών κατά 90% και δρα προστατευτικά σε στελέχη *mec-4(d)* (Syntichaki et al., 2002). Προσπάθεια εισαγωγής του αλληλομόρφου *unc-51(e369)* σε νηματώδεις που έφεραν την μεταλλαγή *cad-1(j1)*, προκάλεσε θνησιμότητα. Για το λόγο αυτό, καταστολή της αυτοφαγίας σε στελέχη *cad-1(j1);mec-4(d)*, πραγματοποιήθηκε μέσω χορήγησης 3-ΜΑ ή με RNAi για το *lgg-1* και διαπιστώθηκε περαιτέρω μείωση στο ποσοστό του νευροεκφυλισμού (Εικ. **Γ10(v)**). Αντίθετα, RNAi για το γονίδιο *asp-4* δεν είχε καμία επίδραση σε στελέχη *unc-51(e369);mec-4(d)* ή στα ευαίσθητα στελέχη *lin-35(n745);mec-4(d)*, στα οποία παράλληλα μειώθηκε η έκφραση της LGG-1 (Εικ. **Γ10(vi)**). Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται πιθανότατα σε αποτυχία ελάττωσης των επιπέδων έκφρασης της ASP-4, δεδομένου ότι, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες ((Syntichaki et al., 2002), Εικ. **Α4**), RNAi για το *asp-4* στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν πρόσφερε σημαντική προστασία σε νευρώνες ζώων *mec-4(d)* (Εικ. **Γ10(vi)**). Το σύνολο των παρατηρήσεων επιβεβαιώνουν την προηγούμενη υπόθεση ότι η αυτοφαγία συνεργάζεται με το λυσοσωμικό πρωτεολυτικό σύστημα για την επιτέλεση του νεκρωτικού θανάτου.



Εικόνα Γ10. Η αυτοφαγία συμβάλλει στο νεκρωτικό θάνατο σε συνεργασία με το πρωτεολυτικό λυσοσωμικό σύστημα. (i-iii) Μείωση της ενεργότητας της καλπαΐνης CLP-1 μέσω έκφρασης του αλληλομόρφου *tm858* (i), RNAi για το *clp-1* (ii, iii) ή συνδυασμού αυτών (iii), δεν έχει καμία επιπλέον επίδραση στα επίπεδα κυτταρικού θανάτου στελεχών *mec-4(d)*, στα οποία η διαδικασία της αυτοφαγίας είναι ελαττωματική. (iv) Καταστολή της λειτουργίας των V-ATPασών ενισχύει την επιβίωση νευρικών κυττάρων σε στελέχη *unc-51(e369);mec-4(d)* και ζώα *mec-4(d)*, που έχουν υποστεί RNAi για το *lgg-1*. (v) Η καταστολή της νέκρωσης σε στελέχη *cad-1(j1)*, που διαθέτουν χαμηλή ενεργότητα πρωτεασών ασπαρτικού, ενισχύεται ακόμη περισσότερο με ταυτόχρονη παρεμπόδιση της αυτοφαγίας. (vi) Ποσοστά νευροεκφυλισμού μετά από RNAi για το γονίδιο *asp-4* σε νηματώδεις *mec-4(d)*, που διαθέτουν ελαττωματικούς μηχανισμούς αυτοφαγίας.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Α. Η Ομοιόσταση του pH στο Νεκρωτικό Θάνατο

Τα δεδομένα που ελήφθησαν στα πλαίσια της διερεύνησης του ρόλου της ομοιόστασης του pH κατά τη νέκρωση οδήγησαν στις εξής διαπιστώσεις:

α) η λειτουργία των κυστιδιακών αντλιών πρωτονίων (V-ATPασών) είναι γενικά απαραίτητη για το θάνατο των κυττάρων ή του οργανισμού μετά από νεκρωτικά ερεθίσματα (Εικ. **Α1**),

β) αύξηση του pH όξινων ενδοκυτταρικών οργανιδίων, λόγω δυσλειτουργίας των V-ATPασών ή μετά από επίδραση ασθενών βάσεων, προστατεύει έναντι της νέκρωσης (Εικ. **Α1**, **Α2** και **Α3**),

γ) ο νεκρωτικός νευροεκφυλισμός συνοδεύεται από οξίνιση του κυτταροπλάσματος των εκφυλιζόμενων κυττάρων, υπό την προϋπόθεση ότι οι V-ATPάσες είναι λειτουργικές (Εικ. **Α3**) και

δ) οι V-ATPάσες συνεργάζονται με πρωτεολυτικούς μηχανισμούς των κυττάρων, για να συμβάλλουν στην καταστροφή που έπεται της ανόδου των επιπέδων του κυτταροπλασματικού ασβεστίου και της επακόλουθης ενεργοποίησης καλπαϊνών (Εικ. **Α4**).

Στο κείμενο που ακολουθεί γίνεται προσπάθεια να ερμηνευτούν αυτά τα αποτελέσματα και να συσχετισθούν με ανάλογα ευρήματα στο ίδιο ή σε διαφορετικά πειραματικά συστήματα, καθώς και να αναλυθεί η φυσιολογική τους σημασία.

Α1. Απορρύθμιση της ομοιόστασης του pH κατά τη νέκρωση

Η οξίνιση του κυτταροπλάσματος που παρατηρήθηκε σε εκφυλιζόμενα κύτταρα (Εικ. **Α3**) αποτελεί ένδειξη της απορρύθμισης της ομοιόστασης του pH κατά τη διάρκεια του νεκρωτικού θανάτου. Η ιοντική ανισορροπία, που δημιουργείται κατά τη νέκρωση με την υπερβολική αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και πιθανά άλλων ιόντων (π.χ. Na^+), προκαλεί έντονα ωσμωτικά φαινόμενα στο εσωτερικό των κυττάρων (Sattler and Tymianski, 2000). Εκτός από την διόγκωση των τελευταίων, είναι πιθανό ότι το επερχόμενο ωσμωτικό σοκ διαταράσσει τις συγκεντρώσεις ρυθμιστικών μορίων του κυτταροπλάσματος (H_3PO_4, CO_2, αμινοξέα, γαλακτικό, οξικό και κιτρικό οξύ), με αποτέλεσμα να χάνουν τη ρυθμιστική τους ικανότητα.

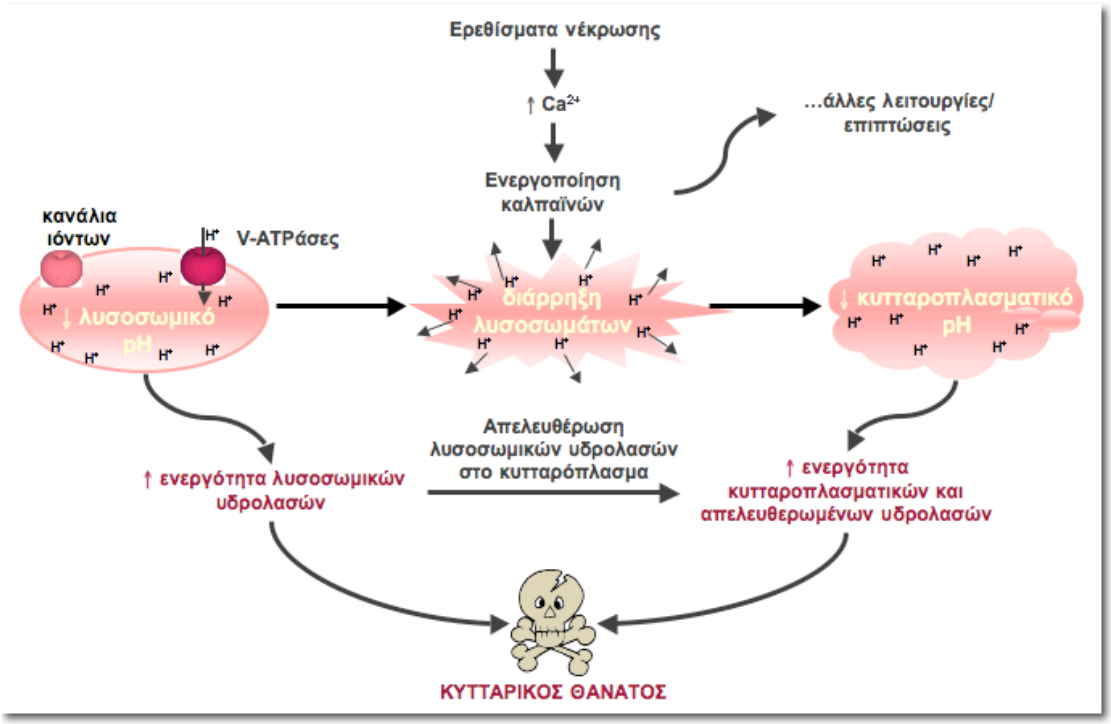
Διαπιστώθηκε ωστόσο ότι αναγκαία συνθήκη, προκειμένου να μειωθεί το ενδοκυτταρικό pH και να επέλθει κυτταρικός θάνατος, αποτελεί η φυσιολογική δράση των V-ATPασών (Εικ. **Α3** και **Α1**). Οι V-ATPάσες είναι αντλίες, υπεύθυνες για τη μετακίνηση πρωτονίων προς τον εξωκυττάριο χώρο ή το εσωτερικό ενδοκυτταρικών οργανιδίων (Stevens and Forgac, 1997). Στη λειτουργία τους στηρίζεται η οξίνιση των λυσοσωμάτων, ώστε να

δημιουργηθούν κατάλληλες συνθήκες για τη δράση υδρολυτικών ενζύμων. Η διατάραξη αυτών των συνθηκών με τη χορήγηση των ασθενών βάσεων NH_4Cl και acridine orange, οδήγησε σε μείωση των επιπέδων νευροεκφυλισμού (Εικ. **A2**). Φαίνεται λοιπόν ότι η ανάπτυξη όξινων συνθηκών στον αυλό των λυσοσωμάτων είναι σημαντική τόσο για τη μείωση του κυτταροπλασματικού pH όσο και για την καταστροφή, που επάγεται από νεκρωτικά ερεθίσματα.

Μελέτες σε νευρώνες ιπποκάμπου πρωτευόντων, οι οποίοι υφίστανται ισχαιμικά επεισόδια, έχουν δείξει ότι η επακόλουθη άνοδος της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου προκαλεί ενεργοποίηση καλπαϊνών (Yamashima, 2000). Οι καλπαΐνες είναι πρωτεάσες κυστεΐνης που ενεργοποιούνται φυσιολογικά από ιόντα ασβεστίου (Goll et al., 2003; Sorimachi and Suzuki, 2001). Η σημασία τους στο νεκρωτικό θάνατο έχει δειχθεί επίσης σε νηματώδεις (Syntichaki et al., 2002). Σε πρωτεύοντα εντοπίστηκαν ενεργοποιημένα μόρια καλπαϊνών σε μεμβράνες διερρηγμένων λυσοσωμάτων (Yamashima, 2000; Yamashima et al., 2003). Διατυπώθηκε έτσι η υπόθεση ότι οι καλπαΐνες συμβάλλουν με τη δράση τους στην καταστροφή αυτών των οργανιδίων. Αποσταθεροποίηση των λυσοσωμάτων παρατηρήθηκε και σε νηματώδεις (Εικ. **B2** και **B4**). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι κατά τη νέκρωση οι V-ATPάσες δρουν στο ίδιο μονοπάτι με τις καλπαΐνες (Εικ. **A4(i)**). Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των δεδομένων, θα μπορούσε να προταθεί ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η οξίνιση του κυτταροπλάσματος κατά τη νέκρωση οφείλεται στη διάρρηξη όξινων οργανιδίων, όπως τα λυσοσώματα (Εικ. **20**). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι V-ATPάσες δρουν μεταφέροντας πρωτόνια στο εσωτερικό λυσοσωμάτων, ώστε να επιτυγχάνεται το μέγιστο της δράσης των περιεχόμενων ενζύμων. Η έναρξη της νεκρωτικής διαδικασίας πυροδοτεί μία σειρά γεγονότων (για παράδειγμα υπερενεργοποίηση καλπαϊνών και παραγωγή ROS), που μεταξύ άλλων προκαλούν παρατεταμένη αποσταθεροποίηση λυσοσωμικών μεμβρανών και έκλυση των συσσωρευμένων πρωτονίων. Δημιουργούνται έτσι μικροπεριβάλλοντα υψηλής οξύτητας γύρω από κάθε κατεστραμμένο λυσόσωμα, τα οποία θα μπορούσαν να επηρεάσουν το pH ολόκληρου του κυττάρου σε προχωρημένα στάδια ή υπό τις ακραίες συνθήκες, που προκαλούν νέκρωση.

Η επαγωγή νεκρωτικού και γενικότερα μη αποπτωτικού θανάτου έχει συσχετιστεί επίσης με ενδοκυτταρική οξίνιση σε καλλιέργειες ουδετερόφιλων και κοκκιωδών κυττάρων (Coakley et al., 2002; Schneider et al., 2004). Εκτός από τη δράση των V-ATPασών στην πρώτη περίπτωση, στα συγκεκριμένα μοντέλα παίζει ρόλο και η λειτουργία των καναλιών NHE. Ενεργοποίηση αυτών των αντλιών έχει αναφερθεί κατά την ισχαιμία και οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού νατρίου και δευτερογενώς των επιπέδων ενδοκυτταρικού Ca^{2+} (Luo et al., 2005). RNAi για τη μείωση της έκφρασης των ορθόλογων πρωτεϊνών των νηματωδών NHX δεν είχε ωστόσο σαφή επίδραση στη νέκρωση στο *C.*

elegans (Εικ. **A5(i)** και **(ii)**). Είναι πιθανό ότι ο συγκεκριμένος ομοιοστατικός μηχανισμός ρύθμισης του pH δεν επηρεάζει σημαντικά το νευροεκφυλισμό σε νηματώδεις. Εναλλακτικά, τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να οφείλονται σε ανεπαρκή αποτελεσματικότητα της τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε (RNAi), η οποία άλλωστε έχει συνήθως χαμηλή απόδοση σε νευρικά κύτταρα. Παρόμοια μπορεί να ερμηνευτεί και το αποτελέσμα της στόχευσης του γονιδίου *pmr-1*, που κωδικοποιεί μία ATPάση-μεταφορέα κατιόντων τύπου P (Εικ. **A5(iii)**).



Εικόνα 20. Μοντέλο για το ρόλο της ομοιόστασης του pH στη νέκρωση.

A2. Η σημασία της μείωσης του pH στο νευροεκφυλισμό

Η μείωση του pH αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό ποικίλων παθολογικών καταστάσεων του ανθρώπου. Όξινες συνθήκες αναπτύσσονται στον εγκέφαλο σε καταστάσεις έντονου ή παρατεταμένου στρες, όπως κατά την παύση της αναπνοής, την ταυτόχρονη δυσλειτουργία πολλών οργάνων και την κωματώδη κατάσταση (Li et al., 2004). Η ομοιόσταση του pH διαταράσσεται ακόμα μετά από σοβαρούς τραυματισμούς στην περιοχή της κεφαλής, αιμορραγίες στο υπαραχνοειδή χώρο και γενικότερη μείωση της ομαλής κυκλοφορίας του αίματος στον εγκέφαλο (Clausen et al., 2005; Ding et al., 2000). Κατά την ισχαιμία, οξίνιση συμβαίνει τόσο εξωκυτταρικά όσο και στο εσωτερικό των κυττάρων (Kristian, 2004). Αποδίδεται κυρίως στην παραγωγή γαλακτικού οξέος μέσω διαδικασιών γλυκόλυσης, η οποία χρησιμοποιείται ως εναλλακτική πηγή ενέργειας, επειδή η

χαμηλή πίεση οξυγόνου δρα περιοριστικά για τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια.

Μελέτες σε καλλιέργειες τομών ιπποκάμπου έχουν δείξει ότι ήπια μείωση του pH, περίπου στο 6.6-6.0, είναι ικανή να προκαλέσει καταστροφή νευρώνων (Ding et al., 2000; Xiang et al., 2004). Νέκρωση παρατηρείται πολύ νωρίς μετά την επίδραση του ερεθίσματος, ενώ απόπτωση σε μετέπειτα στάδια (Ding et al., 2000). Υπό συνθήκες έντονης μείωσης του pH, όπως σε υπεργλυκαιμία ή υπερκάπνια (υπερβολική αύξηση της πίεσης CO_2), η καταστροφή εγκεφαλικών ιστών είναι πιο εκτεταμένη και νεκρωτικό θάνατο υφίστανται όχι μόνο οι νευρώνες αλλά και κύτταρα γλοίας, καθώς και κύτταρα του ενδοθηλίου των αγγείων (Katsura et al., 1994; Kristian, 2004; Pirchl et al., 2006). Διερεύνηση των μηχανισμών τοξικότητας λόγω υψηλής οξύτητας "ενοχοποιεί" τα κανάλια ASICs (Acid-Sensing Ion Channels), που ενεργοποιούνται κυρίως από πρωτόνια. Η ευαισθησία τους επομένως αυξάνεται στο όξινο περιβάλλον, το οποίο επικρατεί ιδιαίτερα στην περιφέρεια ισχαιμικών επεισοδίων (Culmsee and Krieglstein, 2007). Όσα κανάλια φέρουν την υπομονάδα ASIC1a είναι διαπερατά σε ιόντα ασβεστίου. Η ενεργοποίησή τους λοιπόν τόσο υπό όξινες συνθήκες όσο και δευτερογενώς μέσω της κινάσης CaMKII (Ca^{2+}/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II) μετά από υπερδιέγερση των υποδοχέων γλουταμικού NMDA, εντείνει την αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου και κατ' επέκταση της κυτταροτοξικότητας (Yermolaieva et al., 2004). Ο καταστροφικός τους ρόλος επιβεβαιώνεται από την προστατευτική επίδραση της φαρμακευτικής αναστολής αυτών μετά από εγκεφαλικά επεισόδια (Simon and Xiong, 2006).

Αν και η λειτουργία των καναλιών ASICs προσφέρει μία ερμηνεία για την τοξικότητα που επέρχεται λόγω οξίνισης του εξωκυττάριου χώρου, δεν εξηγεί τις καταστροφικές επιπτώσεις της μείωσης του κυτταροπλασματικού pH. Σχετικές πληροφορίες έχουν προκύψει από μελέτες βλαβών του μυοκαρδίου υπό συνθήκες υποξίας. Η επακόλουθη οξίνιση των καρδιακών μυϊκών κυττάρων επάγει την καταστροφή τους αφενός μέσω ενεργοποίησης της κινάσης p38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) και αφετέρου, προκαλώντας μετατόπιση του προ-αποπτωτικού παράγοντα BNIP3 στη μεβράνη των μιτοχονδρίων (Graham et al., 2004; Zheng et al., 2005). Άμεση συνέπεια αυτού είναι η αποσταθεροποίηση των μιτοχονδρίων και η ενεργοποίηση ενός μηχανισμού θανάτου, που όμως δεν εξαρτάται από κασπάσες, αλλά περιλαμβάνει ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες σε εμβρυϊκούς ηπατικούς ιστούς ποντικών και σε καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών (Tracy et. al., 2007). Μελέτες του νεκρωτικού εκφυλισμού στο *C. elegans* έδειξαν ότι η παρεμπόδιση της δράσης μορίων, που ευθύνονται για τη μείωση του ενδοκυτταρικού pH στο συγκεκριμένο σύστημα, ενισχύει την προστατευτική επίδραση που έχει η καταστολή καθεψινών (Εικ. **A4(ii)**). Δεδομένου ότι η

μέγιστη ενεργότητα υδρολασών, όπως οι πρωτεάσες ασπαρτικού, επιτυγχάνεται σε χαμηλό pH (Goll et al., 2003; Ishidoh and Kominami, 2002), είναι πιθανό ότι η οξίνιση του κυτταροπλάσματος κατά τη νέκρωση ενισχύει τη δράση ενζύμων που έχουν απελευθερωθεί από λυσοσώματα, αυξάνοντας έτσι την τοξικότητά τους (Εικ. **20**). Εναλλακτικά, οι V-ATPάσες μπορεί να συνεισφέρουν στον κυτταρικό θάνατο ανεξάρτητα από τη δράση καθεψινών. Ο έλεγχος αυτής της υπόθεσης απαιτεί πλήρη αναστολή της ενεργότητας αυτών των μορίων, η οποία οδηγεί όμως σε εμβρυϊκή θνησιμότητα (Oka and Futai, 2000; Pujol et al., 2001). Η άνοδος της συγκέντρωσης πρωτονίων επηρεάζει πιθανότατα και άλλες κυτταρικές διαδικασίες, η διαλεύκανση των οποίων απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Β. Τα Λυσοσώματα στο Νεκρωτικό Θάνατο

Κατά τη διερεύνηση του ρόλου των λυσοσωμάτων σε γεγονότα νέκρωσης στο *C. elegans* πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες παρατηρήσεις:

α) μεταλλαγές που οδηγούν σε αύξηση του αριθμού και μεγέθους των λυσοσωμάτων προωθούν το νεκρωτικό θάνατο (Εικ. **B1(i)** και **(ii)**), ενώ παρεμπόδιση της φυσιολογικής βιογένεσης αυτών των οργανιδίων δρα προστατευτικά (Εικ. **B1(iii)**), και

β) κατά τα πρώιμα κι ενδιάμεσα στάδια της νέκρωσης τα λυσοσώματα συσσωρεύονται και συντήκονται στην περιφέρεια διογκωμένων πυρήνων, ενώ σε πιο προχωρημένα στάδια του εκφυλισμού η ανίχνευσή τους καθίσταται αδύνατη (Εικ. **B2-5**).

Αναλύονται στη συνέχεια οι πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν στη συγκεκριμένη τοποθέτηση-συμπεριφορά των λυσοσωμάτων κατά τη νέκρωση, καθώς και η συμβολή τους σε εκφυλιστικές κυτταρικές διαδικασίες.

Β1. Συσσώρευση και αποσταθεροποίηση λυσοσωμάτων και άλλων ενδοκυτταρικών οργανιδίων κατά τη νέκρωση

Η έκφραση του δείκτη των λυσοσωμάτων LMP-1::GFP ειδικά σε νευρώνες νηματωδών που υφίστανται νέκρωση, κατέστησε δυνατή την παρακολούθηση των λυσοσωμάτων σε ζωντανούς οργανισμούς (*in vivo*) κατά την εξέλιξη του κυτταρικού θανάτου (Εικ. **B2**). Σε αρχικά στάδια διαπιστώθηκε διόγκωση και συσσώρευση αυτών των οργανιδίων γύρω από διογκωμένους κυτταρικούς πυρήνες (Εικ. **B2(ii)a-e**). Η διόγκωση είναι πιθανά αποτέλεσμα του ωσμωτικού σοκ που υφίστανται τα εκφυλιζόμενα κύτταρα. Αύξηση του μεγέθους ώριμων ενδοσωμάτων και λυσοσωμάτων έχει παρατηρηθεί επίσης σε πολύ πρώιμα στάδια μετά από χημική επαγωγή εκφυλισμού σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων ιπποκάμπου αρουραίων (Adamec et al., 2000). Η τοποθέτηση λυσοσωμάτων γύρω από τον πυρήνα αντανακλά πιθανά πρώιμες αλλοιώσεις του κυτταροσκελετού κατά το νευροεκφυλισμό. Η μετακίνηση τους υπό φυσιολογικές συνθήκες πραγματοποιείται άλλωστε με τη μεσολάβηση μικροσωληνίσκων και ινιδίων ακτίνης (Burkhardt et al., 1997). Ενδείξεις που υποστηρίζουν την παραπάνω υπόθεση προέρχονται από την ανίχνευση υποστρωμάτων των ενζύμων που δρουν κατά τη νέκρωση, όπως οι καλπαΐνες και οι καθεψίνες. Η πρωτεΐνη tau, που παίζει ρόλο στη διασύνδεση μικροσωληνίσκων, αποτελεί υπόστρωμα τόσο των καλπαϊνών όσο και της καθεψίνης D (Bi et al., 2000; Grynspan et al., 1997). Η κυτταροσκελετική πρωτεΐνη σπεκτρίνη είναι ένας καλά μελετημένος στόχος των καλπαϊνών κατά τον αποπτωτικό αλλά και κατά το νεκρωτικό θάνατο (Martin et al., 1995; Masliah et al., 1990). Οι καλπαΐνες ευθύνονται επίσης για τη διάσπαση των συστατικών του

κυτταροσκελετού cain/cabin 1, νευροϊνιδίων και φοδρίνης (Aki et al., 2002; Kim et al., 2002; Stys and Jiang, 2002). Η μη ελεγχόμενη αποδόμηση της cain/cabin 1 έχει συσχετιστεί με διαφορετικές μορφές κυτταρικού θανάτου, μέσω αποκαταστολής της δράσης της καλσινευρίνης (Kim et al., 2002). Τα νευροϊνίδια αποτελούν βασικό συστατικό των νευραξόνων και η διάσπασή τους έχει επιπτώσεις στη λειτουργία των νευρώνων (Stys and Jiang, 2002). Πρωτεόλυση της φοδρίνης έχει παρατηρηθεί κατά τη νέκρωση καρδιακών μυϊκών κυττάρων σε αρουραίους υπό συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (Aki et al., 2002). Βέβαια, δεν υπάρχουν στοιχεία που αποκλείουν την πιθανότητα ελεγχόμενης συσσώρευσης των λυσοσωμάτων στην περιφέρεια πυρήνων μέσω εξειδικευμένων διαδικασιών.

Αύξηση του μεγέθους και συσσώρευση στην περιφέρεια πυρήνων παρατηρήθηκε επίσης και στην περίπτωση αυτοφαγοσωμάτων και μιτοχονδρίων (Εικ. **Γ9**). Ως δείκτες αυτών χρησιμοποιήθηκαν οι χίμαιρες GFP::LGG-1 ή DsRED::LGG-1 και mitoGFP αντίστοιχα. Οι μεταβολές στην ωσμωτική πίεση και οι αλλοιώσεις του κυτταρικού σκελετού, που περιγράφηκαν προηγουμένως για τα λυσοσώματα, είναι πιθανά υπεύθυνες και για τις αλλαγές στη μορφολογία και κατανομή αυτών των οργανιδίων. Ωστόσο, τα λυσοσώματα, τα αυτοφαγοσώματα και τα μιτοχόνδρια διαφέρουν μεταξύ τους τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία, με συνέπεια να έχουν και διαφορετική σύσταση μεμβρανικών ή εσωτερικών-περιεχόμενων μορίων. Είναι επομένως πιθανό οι διαδικασίες και τα γεγονότα, που επηρεάζουν την κατανομή και τη μορφολογία τους κατά τη νέκρωση, να διαφέρουν σε κάποιο βαθμό. Πέρα από τις διαφορές όμως, υπάρχει και συσχέτιση μεταξύ αυτών των ενδοκυτταρικών οργανιδίων. Τα αυτοφαγοσώματα συντήκονται με λυσοσώματα προκειμένου να διασπαστεί το φορτίο τους. Επιπλέον, η αποδόμηση μιτοχονδρίων πραγματοποείται μέσω αυτοφαγίας. Σε αυτή τη λειτουργική συσχέτιση οφείλεται πιθανότατα ο μερικός συνεντοπισμός που παρατηρήθηκε μετά από συνέκφραση διαφορετικών φθοριζόντων δεικτών σε εκφυλιζόμενους νευρώνες (Εικ. **Γ9(ii)**).

Σε προχωρημένα στάδια της νέκρωσης ήταν αδύνατη η ανίχνευση διακριτών λυσοσωμάτων (Εικ. **Β2(ii)h** και **Β4**), αποτέλεσμα πιθανότατα της διάρρηξης και καταστροφής αυτών. Μείωση της σταθερότητας της λυσοσωμικής μεμβράνης με άμεση συνέπεια την αυξημένη συγέντρωση καθεψίνης D στο κυτταρόπλασμα έχει διαπιστωθεί σε γηρασμένους εγκεφάλους και κατά τη νόσο του Alzheimer (Samara and Tavernarakis, 2003). Επιπλέον, απελευθέρωση λυσοσωμικών ενζύμων λόγω τραυματισμού ή διάρρηξης λυσοσωμάτων συμβαίνει σε περιπτώσεις καρδιακής και εγκεφαλικής ισχαιμίας (Decker et al., 1980). Ο εντοπισμός ενεργοποιημένων μορίων καλπαΐνης σε λυσοσωμικές μεμβράνες μετά από επαγωγή ισχαιμικών επεισοδίων σε πρωτεύοντα υποδηλώνει συμμετοχή αυτών των πρωτεασών κυστεΐνης στην αποσταθεροποίησή των συγκεκριμένων οργανιδίων (Yamashima, 2000; Yamashima et al., 2003). Η υπερβολική αύξηση των ιόντων ασβεστίου στο

κυτταρόπλασμα κατά τη νέκρωση, εκτός από την ενεργοποίηση καλπαϊνών, είναι πιθανό να υποβοηθά τη διάρρηξη των λυσοσωμάτων, προκαλώντας ωσμωτικό σοκ σε αυτά μέσω της δράσης της φωσφορικής λιπάσης C (PLC, phospholipase C) (Zhao et al., 2005). Ενεργοποίηση αυτού του ενζύμου εξάλλου έχει διαπιστωθεί κατά την απόπτωση, τη νέκρωση και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις. Η περίπτωση της διάρρηξης των λυσοσωμάτων μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα TNFR1 έχει μελετηθεί πιο διεξοδικά. Εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου αλλά και τη μεταβολική του κατάσταση ή το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται (Kroemer and Jaattela, 2005). Συνήθως πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-8 και οδηγεί σε απόπτωση. Σημαντικός είναι επίσης ο ρόλος του κεραμιδίου, που παράγεται μέσω της δράσης της σφιγγομυελινάσης της κυτταρικής μεμβράνης. Το κεραμίδιο είτε δρα απευθείας στη λυσοσωμική μεμβράνη, είτε μετατρέπεται μέσω της ενεργότητας της όξινης κεραμιδάσης των λυσοσωμάτων σε σφιγγοσίνη, η οποία έχει ιδιότητες απορρυπαντικού. Η συσσώρευση κεραμιδίου σε διογκωμένα ενδοσώματα/λυσοσώματα έχει συνδεθεί ακόμα με ενεργοποίηση των κασπασών-3, -8 και -9 (Ditaranto-Desimone et al., 2003). Διάρρηξη των λυσοσωμάτων μπορεί να συμβεί ωστόσο και μέσω της πρωτεΐνης RIP1 (Kroemer and Jaattela, 2005). Η RIP1 σε συνδυασμό με την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου, που αποσταθεροποιούν τη μεμβράνη οξειδώνοντας τα λιπίδιά της, επάγει συνήθως νεκρωτικό θάνατο. Μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες νευρικών κυττάρων και σε διαγονιδιακά ποντίκια έχουν δείξει ότι η παρουσία της απολιποπρωτεΐνης Ε4 και πεπτιδίων Αβ1-42 ενισχύει την ευαισθησία των λυσοσωμικών μεμβρανών (Ji et al., 2006).

Εκτός από τα λυσοσώματα και ο αριθμός των αυτοφαγοσωμάτων μειώθηκε σημαντικά σε πολύ προχωρημένα στάδια του νευροεκφυλισμού (Εικ. **Γ7**). Η καταστολή της αυτοφαγίας είναι πιθανά αποτέλεσμα της γενικότερης δυσλειτουργίας του κυττάρου, εξαιτίας της καταβολικής δραστηριότητας υδρολυτικών ενζύμων στο κυτταρόπλασμα και ίσως της οξειδωτικής επίδρασης ενεργών ριζών οξυγόνου. Η ενεργοποίηση της TOR και κινασών Akt αναφέρεται επίσης ως υπεύθυνη για την απενεργοποίηση της αυτοφαγίας σε ένα μοντέλο τοξικής υπερ-διέγερσης υποδοχέων γλουταμινικού σε ποντίκια (Shacka et al., 2007). Αν και ελαττώνεται λοιπόν ο ρυθμός αποδόμησης αυτοφαγικών κυστιδίων λόγω της κατάρρευσης του λυσοσωμικού συστήματος κατά τη νέκρωση (Εικ. **Β2(ii)h** και **Β4**), η απουσία αυτοφαγοσωμάτων υποδηλώνει ότι ο ρυθμός σύνθεσής τους είχε μειωθεί σημαντικά πριν τα λυσοσώματα καταστούν ανενεργά.

Β2. Το λυσοσωμικό σύστημα σε εκφυλιστικές-παθολογικές καταστάσεις

Πειραματικά δεδομένα μελετών στο *C. elegans* έδειξαν ότι η λειτουργία των λυσοσωμάτων έχει καθοριστική σημασία στη νέκρωση και η παρεμπόδιση της βιογένεσής τους δρα προστατευτικά (Εικ. **Β1**). Σε συνδυασμό με προηγούμενες μελέτες σε νηματώδεις (Syntichaki et al., 2002) καθώς και με παρατηρήσεις σχετικά με την οξίνιση του κυτταροπλάσματος και τη συμμετοχή των V-ATPασών, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι τα λυσοσώματα έχουν διττό ρόλο κατά τη νέκρωση. Με τη διάρρηξή τους συμβάλλουν αφενός στην οξίνιση του κυτταροπλάσματος και αφετέρου στην έκλυση υδρολυτικών ενζύμων, τα οποία δρουν στο όξινο περιβάλλον αποδομώντας κυτταρικά συστατικά. Γενικότερα, το λυσοσωμικό σύστημα συμμετέχει με διάφορους τρόπους στο θάνατο των κυττάρων (Kroemer and Jaattela, 2005). Καταρχήν, είναι απαραίτητο κατά την απόπτωση για την αποδόμηση των αποπτωτικών σωμάτων με τη διαδικασία της φαγοκύτωσης. Στον προγραμματισμένο θάνατο τύπου ΙΙ, η σύντηξή λυσοσωμάτων με αυτοφαγοσώματα οδηγεί στην αυτόλυση του κυττάρου. Μέσω της συμβολής τους στη διαδικασία της αυτοφαγίας τα λυσοσώματα μπορεί να έχουν ωστόσο και προστατευτικό ρόλο. Έτσι, μελέτες σε καλλιέργειες νευρικών και άλλων κυττάρων έχουν δείξει ότι συμβάλλουν στην απομάκρυνση ολιγομερών α-synuclein, πριν σχηματιστούν ώριμα ινώδη έγκλειστα σωμάτια (Lee et al., 2004). Επιπλέον, η διάρρηξη της λυσοσωμικής μεμβράνης με την επακόλουθη απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων και δευτερογενών μηνυμάτων, ή ακόμα και την οξίνιση του κυττάρου, είναι δυνατό να ενεργοποιήσει ή να ενισχύσει μονοπάτια κυτταρικού θανάτου (Kroemer and Jaattela, 2005). Σε ήπιες καταστάσεις ενεργοποιούνται συνήθως κλασσικά αποπτωτικά μονοπάτια ή παρόμοιες διαδικασίες, που όμως δεν περιλαμβάνουν ενεργοποίηση κασπασών ή/και συμμετοχή μιτοχονδρίων. Έντονη αποσταθεροποίηση ωστόσο, προκαλεί μαζική έκλυση υδρολασών και οδηγεί σε νέκρωση.

Μεταβολές στο σύστημα των λυσοσωμάτων έχουν συσχετιστεί με διάφορες εκφυλιστικές καταστάσεις στον άνθρωπο και σε πειραματικά μοντέλα. Η γήρανση προκαλεί προοδευτική αλλαγή στην υποκυτταρική τοποθέτηση της καθεψίνης D και μετατόπισή της από τα λυσοσώματα στο κυτταρόπλασμα (Syntichaki and Tavernarakis, 2003). Πειράματα σε αρουραίους, ποντίκια και κυτταρικές καλλιέργειες, καθώς και παρατηρήσεις σε ανθρώπινους ιστούς φανέρωσαν ενεργοποίηση της καθεψίνης D σε συγκεκριμένες περιοχές του γηρασμένου εγκεφάλου και σε γηρασμένα κύτταρα, όπως ο ενδορρινικός φλοιός και οι νευρώνες CA1 του ιπποκάμπου (Samara and Tavernarakis, 2003). Σε νευρώνες γηρασμένων ποντικών και ανθρώπων, όπως και σε νευρώνες ευαίσθητους κατά τη νόσο του Alzheimer, αυξάνεται ακόμα ο αριθμός των λυσοσωμάτων (Crawford et al., 2000). Η νόσος του Alzheimer χαρακτηρίζεται από πρώιμη ενεργοποίηση του ενδοσωμικού-λυσοσωμικού συστήματος και αύξηση των επιπέδων της καθεψίνης D σε πληθυσμούς πυραμιδικών

νευρώνων (Cataldo et al., 1995). Η συγκεκριμένη πρωτεάση ανιχνεύεται επίσης σε αμυλοϊδείς πλάκες ασθενών, ενώ η συγκέντρωσή της μειώνεται στους ινοβλάστες του δέρματος αυτών των ατόμων, υποδηλώνοντας μια γενικότερη απορρύθμιση του λυσοσωμικού συστήματος στη συγκεκριμένη ασθένεια (Nixon and Cataldo, 2006; Urbanelli et al., 2006). Τόσο οι λυσοσωμικές καθεψίνες ασπαρτικού D και E όσο και οι καθεψίνες κυστεΐνης B και L εμπλέκονται ακόμα σε γεγονότα νευροεκφυλισμού, τα οποία συνοδεύουν ισχαιμικά επεισόδια (Syntichaki and Tavernarakis, 2003). Χορήγηση αναστολέων καθεψινών σε νευρώνες πρωτευόντων που έχουν εκτεθεί σε συνθήκες ισχαιμίας προστατεύει από καθυστερημένο νευροεκφυλισμό (Yoshida et al., 2002). Επιπλέον, αύξηση της έκφρασης της καθεψίνης D έχει διαπιστωθεί σε νευρικά ή/και νευρογλοιακά κύτταρα μετά από υπερδιέγερση νευρώνων από γλουταμικό ή καϊνικό οξύ (Syntichaki and Tavernarakis, 2003). Ενεργοποίηση του λυσοσωμικού-αυτοφαγικού συστήματος φαίνεται ότι συμβάλλει και στο θάνατο κοκκιωδών εγκεφαλικών νευρώνων αρουραίων σε πρωτογενείς καλλιέργειες απουσία ορού και καλίου (Kaasik et al., 2005).

Υπάρχει όμως και πληθώρα νευροεκφυλιστικών συνδρόμων, η εκδήλωση των οποίων προκαλείται από μείωση της ενεργότητας του λυσοσωμικού συστήματος. Κάποια από αυτά σχετίζονται με την αποθηκευτική ικανότητα των λυσοσωμάτων και εμφανίζονται συνήθως πριν την ενηλικίωση (Bahr and Bendiske, 2002). Η γενετική δυσλειτουργία των λυσοσωμάτων είναι η κύρια αιτία μιας ομάδας παθολογικών καταστάσεων γνωστών με το όνομα Batten ή Neuronal Ceroid Lipofuscinosces (NCL) (Shacka et al., 2007). Μεταλλαγές στην καθεψίνη D έχουν διαπιστωθεί πρόσφατα σε ασθενείς. Η δυσλειτουργία λυσοσωμάτων κατά τη γήρανση, μερικώς λόγω της ευαισθησίας αυτών στις συσσωρευμένες ενεργές ρίζες οξυγόνου, έχει συσχετιστεί με δημιουργία αμυλοειδών και τη συσσωμάτωση της α-synuclein και μεταλλαγμένων μορφών της huntingtin (Bahr and Bendiske, 2002). Πειραματικά επαγώμενη δυσλειτουργία λυσοσωμάτων *in vitro* και *in vivo* οδηγεί στην εμφάνιση χαρακτηριστικών, όπως απόθεση πρωτεϊνών και απώλεια συνάψεων, που προσομοιάζουν στις παραπάνω ασθένειες. Για παράδειγμα, έλλειψη της καθεψίνης D σε ποντίκια δημιουργεί συμπτώματα ανάλογα με αυτά της NCL. Επίσης, δυσλειτουργία στο λυσοσωμικό μεταφορέα σακχάρων benchwarmer (bnch) στη Drosophila δημιουργεί προβλήματα στην ενδοκύτωση με επιπτώσεις στη συναπτική λειτουργία, ενισχύει την τοξικότητα της πρωτεΐνης tau και προκαλεί νευροεκφυλισμό (Dermaut et al., 2005).

Γ. Η Συμβολή της Αυτοφαγίας στο Νεκρωτικό Θάνατο

Το σύνολο των πειραματικών αποτελεσμάτων που ελήφθησαν στα πλαίσια της διερεύνησης της συμμετοχής της αυτοφαγίας στο νεκρωτικό θάνατο, οδήγησαν στις παρακάτω διαπιστώσεις:

α) η αυτοφαγία είναι απαραίτητη για τη νέκρωση στο *C. elegans*· η μείωση της λειτουργίας αυτοφαγικών μορίων και η χημική καταστολή αυτής της διαδικασίας έχουν προστατευτική δράση (Εικ. **Γ1-4**),

β) σχηματισμός αυτοφαγοσωμάτων επάγεται έντονα σε πρώιμα στάδια του νευροεκφυλισμού (Εικ. **Γ7**), και

γ) η αυτοφαγία συμβάλλει στην επιτέλεση του νεκρωτικού θανάτου σε συνεργασία με λυσοσωμικούς πρωτεολυτικούς μηχανισμούς των κυττάρων (Εικ. **Γ10**).

Στο κείμενο που ακολουθεί σχολιάζεται ο ρόλος της αυτοφαγίας σε διαδικασίες κυτταρικής καταστροφής με έμφαση στο νεκρωτικό θάνατο και σε σύγκριση με πρόσφατα ευρήματα άλλων ερευνητικών ομάδων στο ίδιο πειραματικό μοντέλο. Επιπλέον, πραγματοποιείται προσπάθεια να ερμηνευτούν και να αναλυθούν πιο διεξοδικά αποτελέσματα σχετικά με το ρόλο συγκεκριμένων μορίων στη νέκρωση.

Γ1. Αυτοφαγία και νέκρωση

Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στην ενότητα Γ των "Αποτελεσμάτων" καταδεικνύουν στο σύνολό τους τη συμμετοχή της αυτοφαγίας στο νεκρωτικό εκφυλισμό (πιο ειδικά βλέπε Εικ. **Γ1**, **Γ2(i))**, **Γ3** και **Γ4**). Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύονται από πρόσφατες μελέτες που αναφέρουν μερική καταστολή της νέκρωσης, η οποία επάγεται από υπερενεργοποίηση των καναλιών ιόντων MEC-4, DEG-1 και DEG-3, σε νηματώδεις με μειωμένη έκφραση των αυτοφαγικών γονιδίων *unc-51*, *bec-1* και *lgg-1* (Toth et al., 2007). Έκφραση φθοριζόντων δεικτών σε εκφυλιζόμενους νευρώνες έδειξε επιπλέον ότι η αυτοφαγία ενεργοποιείται σε πολύ πρώιμα στάδια του νεκρωτικού θανάτου (Εικ. **Γ7**). Πιθανότατα να συμβάλλει στο σχηματισμό των κυτταροπλασματικών κυστιδιακών δομών, που έχουν παρατηρηθεί σε εκφυλιζόμενους νευρώνες νηματωδών (Εικ. **8**, (Hall et al., 1997)). Παρόμοια παροδική αύξηση του αριθμού των αυτοφαγοσωμάτων έχει αναφερθεί επίσης πολύ νωρίς, πριν από τον εκφυλισμό νευρώνων του ιπποκάμπου ποντικών, όταν αυτοί υπερ-διεγείρονται από καϊνικό οξύ (Shacka et al., 2007). Η ταυτόχρονη παρεμπόδιση διαδικασιών αυτοφαγίας και της δράσης γνωστών νεκρωτικών παραγόντων (Syntichaki et al., 2005; Syntichaki et al., 2002), αποκάλυψε ότι η αυτοφαγία δρα στο ίδιο μοριακό μονοπάτι με καλπαΐνες, ενώ συνεργάζεται με πρωτεάσες ασπαρτικού και V-ATPάσες, προκειμένου να

επιτελεστεί η καταστροφή των κυττάρων (Εικ. **Γ10**). Οι καλπαΐνες είναι πρωτεάσες που ενεργοποιούνται από ιόντα ασβεστίου (Goll et al., 2003; Sorimachi and Suzuki, 2001). Πρόσφατες μελέτες εμπλέκουν τόσο αυτές όσο και την αύξηση των επιπέδων ασβεστίου στην επαγωγή αυτοφαγίας. Ο σχηματισμός αυτοφαγοσωμάτων σε επιθηλιακά κύτταρα μετά από ενεργοποίηση υποδοχέων θανάτου απαιτεί την πρόσδεση καλμοδουλίνης-Ca^{2+} στις κινάσες DAPk και DRP-1 (Inbal et al., 2002). Επίσης, υπερέκφραση της καλπαΐνης-10 των μιτοχονδρίων προκαλεί έναρξη της αυτοφαγίας, ενώ δυσλειτουργία της τελευταίας επέρχεται μετά από απώλεια της ρυθμιστικής υπομονάδας των καλπαϊνών (Arrington et al., 2006; Demarchi et al., 2006). Πρόσφατα διαπιστώθηκε ακόμα ότι η πρωτεΐνη Atg5 αποτελεί υπόστρωμα καλπαϊνών (Yousefi et al., 2006).

Οι προηγούμενες παρατηρήσεις συμφωνούν με ένα μοντέλο κατά το οποίο οι ακραίες συνθήκες που επάγουν νέκρωση επιφέρουν και ακραίες κυτταρικές αποκρίσεις. Τα κυτταροπλασματικά επίπεδα ασβεστίου αυξάνονται υπερβολικά, με αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική ταυτόχρονη ενεργοποίηση κατά τ' άλλα μη τοξικών μορίων και κυτταρικών διαδικασιών, που εξαρτώνται από ασβέστιο. Η αυτοφαγία αποτελεί ίσως μία από αυτές τις διαδικασίες. Η ενεργοποίησή της μπορεί να οφείλεται ακόμα στη μείωση των ενεργειακών επιπέδων, που συνοδεύουν την επίδραση νεκρωτικών ερεθισμάτων (Edinger and Thompson, 2004). Παρόλο που η επαγωγή της, τουλάχιστον στην τελευταία περίπτωση, στοχεύει στην επιβίωση των κυττάρων, η υπερβολική ενεργοποίηση της αυτοφαγίας οδηγεί πιθανά σε ανεξέλεγκτη αποδόμηση κυτταρικών συστατικών, για όσο χρόνο υποστηρίζεται από ένα ενεργό σύστημα λυσοσωμάτων. Συνεπώς, πρώιμη υπερ-ενεργοποίηση της αυτοφαγίας κατά τη νέκρωση είναι δυνατό να προωθεί την καταστροφή των κυττάρων, πριν η διάρρηξη των λυσοσωμάτων και η επακόλουθη απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων αναλάβουν την ολοκλήρωσή της. Συγκέντρωση υδρολυτικών ενζύμων ωστόσο έχει διαπιστωθεί και στο εσωτερικό αυτοφαγοσωμάτων, που συσσωρεύονται σε δυστροφικούς νευρίτες (Rubinsztein et al., 2005). Η απελευθέρωση αυτών είναι πιθανό να συμβάλλει επίσης σε νεκρωτικές διαδικασίες.

Η συμμετοχή της αυτοφαγίας στο νεκρωτικό εκφυλισμό υποστηρίζεται από μελέτες σε διαφορετικά πειραματικά συστήματα. Τραυματισμός του εγκεφάλου οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της Atg6/Beclin 1 και της Atg8/LC3 σε νευρώνες και πολύ αργότερα σε αστροκύτταρα (Diskin et al., 2005; Egami et al., 2005; Erlich et al., 2006). Εγκεφαλικά κύτταρα ενήλικων ποντικών που υφίστανται υποξία λόγω αποκλεισμού της καρωτιδικής αρτηρίας, πεθαίνουν εκδηλώνοντας χαρακτηριστικά, όπως διόγκωση του κυτταροπλάσματος, λύση ενδοκυτταρικών οργανιδίων κι ενεργοποίηση της αυτοφαγίας (Adhami et al., 2006). Αύξηση των επιπέδων αυτοφαγίας συνοδεύει επίσης την υπερδιέγερση υποδοχέων γλουταμινικού σε ποντίκια, κοτόπουλα και καλλιέργειες τομών ιπποκάμπου (Borsello et al.,

2003; Tarabal et al., 2005; Yue, 2007). Ενεργοποίηση του παράγοντα RIP, που είναι συστατικό του μοριακού μονοπατιού της κινάσης JNK, προκαλεί τοξικότητα που χαρακτηρίζεται από εμφάνιση πολυάριθμων αυτοφαγοσωμάτων (Yu et al., 2004). Το μονοπάτι της JNK έχει συσχετιστεί επίσης με την εκδήλωση νεκρωτικού θανάτου (Baehrecke, 2005; Sakon et al., 2003; Xu et al., 2006; Yaglom et al., 2003).

Παρόλο που η αυτοφαγία επάγεται σε όλες τις προηγούμενες περιπτώσεις, δεν είναι σαφές αν έχει στόχο την προστασία ή την καταστροφή των κυττάρων. Εκτός από δεδομένα σε νηματώδεις ((Toth et al., 2007), αποτελέσματα που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή), μελέτες *in vivo* και *in vitro* σε μοντέλα θηλαστικών καταδεικνύουν μια θετική συσχέτιση μεταξύ αυτοφαγίας και νεκρωτικού θανάτου. Τα ποντίκια Lurcher εκφράζουν μία διαρκώς ενεργό μορφή του υποδοχέα γλουταμικού GluRδ2 (Selimi et al., 2003). Η συνεχής εισροή ιόντων έχει ως άμεσο αποτέλεσμα το θάνατο κυττάρων Purkinje της παρεγκεφαλίδας. Οι νευρώνες αυτοί εμφανίζουν μεγάλο αριθμό αυτοφαγικών κυστιδίων με διπλές ή πολλαπλές μεμβράνες (Yue et al., 2002). Ο υποδοχέας GluRδ σχηματίζει στην παρεγκεφαλίδα σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες Beclin 1 και nPIST. Συνέκφραση της Beclin 1 με μία μορφή της nPIST, που δε μπορεί να αλληλεπιδράση με το GluRδ, προκαλεί εξαρτώμενο από την αυτοφαγία θάνατο σε κύτταρα θηλαστικών. Σε ένα διαφορετικό πειραματικό σύστημα, η υπερέκφραση της ανθρώπινης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης Spin1 σε καλλιέργειες κυττάρων προκαλεί εκφυλισμό, που συνοδεύεται από συσσώρευση πολυάριθμων μεβρανικών δομών (Yanagisawa et al., 2003). Η Spin1 αλληλεπιδρά με τους αντι-αποπτωτικούς παράγοντες Bcl-x_L και Bcl-2 και συνεντοπίζεται με αυτούς σε μιτοχόνδρια, κυρίως μετά την επίδραση αποπτωτικών ερεθισμάτων. Χορήγηση χημικών αναστολέων τόσο της αυτοφαγίας όσο και της νέκρωσης μειώνει τα επίπεδα θανάτου των κυττάρων που υπερεκφράζουν τη Spin1.

Αν και στα προηγούμενα παραδείγματα η αυτοφαγία διευκολύνει την καταστροφή των κυττάρων, η επαγωγή της φαίνεται να λειτουργεί προστατευτικά ή ουδέτερα σε άλλες περιπτώσεις. Χορήγηση του επαγωγέα της αυτοφαγίας ραπαμυκίνη προστατεύει μερικώς τους νευρώνες, μειώνει την ενεργοποίηση μικρογλοίας/μακροφάγων και βελτιώνει την ανάρρωση ποντικιών, που έχουν υποστεί τραυματισμό του εγκεφάλου (Erlich et al., 2007). Πειράματα σε χοίρους και σε καλλιέργειες καρδιακών μυοκυττάρων δείχνουν ότι η προστατευτική δράση της αυτοφαγίας είναι ιδιαίτερα έντονη μετά από την εκδήλωση ισχαιμικών επεισοδίων στο μυοκάρδιο (Dosenko et al., 2006; Hamacher-Brady et al., 2006; Yan et al., 2006). Η ενεργοποίηση υποδοχέων θανάτου σε συγκεκριμένους τύπους κυτταρικών σειρών, με ή χωρίς ταυτόχρονη αναστολή κασπασών, προκαλεί μία μορφή θανάτου που καλείται "νεκρόπτωση" (Degterev et al., 2005). Τα κύτταρα εμφανίζουν χαρακτηριστικά νέκρωσης, όπως διόγκωση οργανιδίων και πρώιμη απώλεια της

ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης. Έχει παρατηρηθεί ακόμα συρρίκνωση του πυρήνα και αυξημένος αριθμός αυτοφαγικών κυστιδίων. Ωστόσο, η δυσλειτουργία της αυτοφαγίας δεν επηρεάζει τον κυτταρικό θάνατο. Η επαγωγή της αποτελεί πιθανά δευτερογενή συνέπεια των συνθηκών που προκαλούν κυτταροτοξικότητα. Επιπλέον, ούτε η παρέμβαση στην ομοιόσταση του ασβεστίου ή τη δράση καλπαϊνών επηρεάζει τη νεκρόπτωση.

Το σύνολο των παρατηρήσεων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο συνδυασμός παραμέτρων, όπως το είδος και η ένταση του τοξικού ερεθίσματος, ο τύπος των κυττάρων, η μεταβολική τους κατάσταση και το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται, καθορίζει όχι μόνο τη μορφή του θανάτου αλλά και την επίδραση που έχει σε αυτόν ενδεχόμενη ενεργοποίηση της αυτοφαγίας.

Γ2. Η συμβολή της κινάσης UNC-51 στο νεκρωτικό θάνατο

Το γονίδιο *unc-51* κωδικοποιεί μία κινάση σερίνης/θρεονίνης, ορθόλογη με τη πρωτεΐνη Atg1 του σακχαρομύκητα (Matsuura et al., 1997; Ogura et al., 1994). Μόρια παρόμοια με την UNC-51 κωδικοποιούνται επίσης από το γονιδίωμα του ανθρώπου (ULK1 και ULK2) και του ποντικού (Unc51.1 και Unc51.2) (Kuroyanagi et al., 1998; Tomoda et al., 1999; Tomoda et al., 2004; Yan et al., 1998). Υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν τη συμμετοχή αυτών των ενζύμων σε διαδικασίες μετακίνησης μεμβρανών. Η Atg1p του *S. cerevisiae* προσδένεται σε αποφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Atg13 σε ένα σύμπλοκο απαραίτητο για το σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων (Funakoshi et al., 1997; Mizushima et al., 2002). Η ULK1 αλληλεπιδρά με δύο μόρια, που παρουσιάζουν ομοιότητα με την πρωτεΐνη MAP-LC3 (microtubule associated protein light chain 3)· την υπομονάδα γ2 της πρωτεΐνης GABARAP και τη GATE-16 (Golgi-associated ATPase enhancer of 16kD) (Okazaki et al., 2000). Η GABARAP συνδέεται με τον υποδοχέα $GABA_A$ ($GABA_A$ receptor associated protein-GABARAP) και ρυθμίζει πιθανότατα τη μεταφορά του, διασυνδέοντάς τον με τον κυτταροσκελετό (Wang et al., 1999). Η GATE-16 συμμετέχει στη μετακίνηση πρωτεϊνών στο σύστημα Golgi (Sagiv et al., 2000). Η Unc51.1 του ποντικού αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες SynGAP (synaptic GTPase-activating protein) και Syntenin (Tomoda et. al., 2004). Η Syntenin εντοπίζεται στη μεμβράνη ενδοσωμάτων και δρα ως σύνδεσμος μεταξύ της Unc51.1 και του ενδοσωμικού μορίου Rab5. Η Unc51.1 αναστέλλει τη δράση της SynGAP, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που ξεκινούν από τις Ras και Rab5 και κατ' επέκταση διαδικασιών ενδοκύτωσης. Η παρατήρηση ασυνήθιστων κυστιδιακών δομών σε νευρώνες νηματωδών με μεταλλαγές στο *unc-51* υποδηλώνει συμμετοχή της αντίστοιχης πρωτεΐνης στη ροή μεμβρανών (McIntire et al., 1992). Η UNC-51

φέρει μία περιοχή 106 αμινοξέων προς το καρβοξυ-τελικό της άκρο, με τη οποία αλληλεπιδρά τις πρωτεΐνες VAB-8 και UNC-14 (Lai and Garriga, 2004; Ogura et al., 1997). Η VAB-8 ανήκει σε μία υπο-οικογένεια μορίων που μοιάζουν με κινεσίνες, ενώ η UNC-14 περιέχει μία περιοχή RUN, η οποία σχετίζεται λειτουργικά με τη μετακίνηση κυστιδίων (Callebaut et al., 2001; Wolf et al., 1998). Η UNC-51 ρυθμίζει τη μετανάστευση κυττάρων και την ανάπτυξη νευραξόνων φωσφορυλιώνοντας τις VAB-8 και UNC-14 (Lai and Garriga, 2004). Τα δύο αυτά υποστρώματα συμμετέχουν πιθανά σε διαφορετικές διαδικασίες, μέσω ελέγχου της μετακίνησης μεμβρανών.

Πειραματικά δεδομένα στο *C. elegans* έδειξαν ότι η κινάση UNC-51 απαιτείται γενικά για τη νέκρωση σε νηματώδεις (Εικ. **Γ1**). Πιο μικρή αλλά στατιστικά σημαντική καταστολή του νευροεκφυλισμού, που επάγεται από το αλληλόμορφο *mec-4(d),* προέκυψε σε ζώα με δυσλειτουργία της VAB-8 και κυρίως της UNC-14 (**Γ2(ii)** και **(iii)**). Επομένως, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συγκεκριμένων μορίων και κατά συνέπεια τα γεγονότα μετακίνησης μεμβρανών παίζουν ρόλο στην καταστροφή των νευρώνων. Αυτή η υπόθεση βρίσκεται σε συμφωνία με δεδομένα σχετικά με την επίδραση ανωμαλιών της ενδοκύτωσης στη νέκρωση (μη δημοσιευμένες παρατηρήσεις). Καταστολή της αυτοφαγίας σε γενετικό υπόβαθρο με μεταλλαγές στο γονίδιο *unc-51* δεν είχε επιπλέον επίδραση στο νεκρωτικό εκφυλισμό (Εικ. **Γ2(i)**). Το σύνολο των παρατηρήσεων υποδεικνύει ότι η UNC-51 συμβάλλει στην καταστροφή των κυττάρων, τόσο μέσω συμμετοχής γενικά στη δυναμική μεμβρανών όσο και μέσω αυτοφαγικών διαδικασιών ειδικότερα. Γενικότερα, διάφορα αυτοφαγικά γονίδια εμπλέκονται σε λειτουργίες που σχετίζονται με μεβράνες αλλά όχι με την αυτοφαγία, όπως η ενδοκύτωση και η μετακίνηση κυστιδίων (Klionsky and Emr, 2000). Παρότι δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα συμμετοχή των μορίων VAB-8 και UNC-14 στην αυτοφαγία, δεν υπάρχουν δεδομένα που αποκλείουν άμεσα αυτήν την πιθανότητα. Φαινοτυπικές μελέτες φανέρωσαν ομοιότητες, όσον αφορά στη μορφολογία αλλά και στη νέκρωση, μεταξύ στελεχών που φέρουν το αλληλόμορφο *unc-51(e365)* και μετά από καταστολή της αυτοφαγίας σε ζώα με μεταλλαγές στο *unc-14* (Εικ. **Γ2(iii-v)**). Αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζουν ένα μοντέλο, στο οποίο η δράση της UNC-51 στη νέκρωση συντελείται μέσω δύο τουλάχιστον διακριτών μονοπατιών· το ένα περιλαμβάνει τη λειτουργία της UNC-14 και το άλλο τη διαδικασία της αυτοφαγίας. Η επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

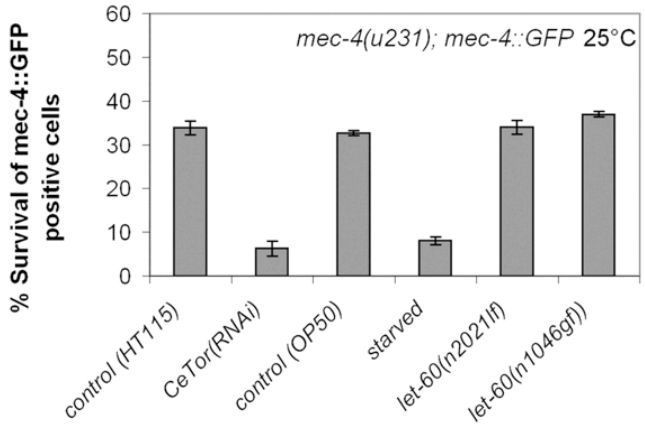
Γ3. Επιπτώσεις δυσλειτουργίας της κινάσης TOR στο νευροεκφυλισμό

Η TOR είναι ένα πολύ συντηρημένο μέλος της οικογένειας των κινασών PI3K. Επιτελεί τη λειτουργία της σχηματίζοντας δύο διαφορετικά σύμπλοκα, τα TORC1 και TORC2 (Martin and Hall, 2005). Το τελευταίο ρυθμίζει κυρίως την οργάνωση των ινιδίων ακτίνης στον κυτταροσκελετό, ενώ το TORC1 λαμβάνει σήματα που σχετίζονται με τη διαθεσιμότητα αμινοξέων, αυξητικών παραγόντων και την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, ώστε να ρυθμίσει κατάλληλα την κυτταρική αύξηση. Η παρουσία θρεπτικών συστατικών στο περιβάλλον των κυττάρων αναστέλλει τη δράση του συμπλόκου TSC1/TSC2, το οποίο ενεργοποιεί GTPάσες. Ενεργοποιείται τότε το συμπλόκο της TOR με την πρωτεΐνη raptor και ακολούθως, η μετάφραση και μεταγραφή γονιδίων μεταβολικών ενζύμων, καθώς και γονιδίων που σχετίζονται με τη μεταφορά αμινοξέων (Martin and Hall, 2005; Schmelzle and Hall, 2000). Επιπλέον, η κινάση TOR αναστέλλει την αυτοφαγία είτε προκαλώντας (άμεσα ή έμμεσα) φωσφορυλίωση της Atg13, καθιστώντας ασθενή την αλληλεπίδρασή της με την Atg1, είτε μέσω μεταγραφικού ελέγχου των αυτοφαγικών γονιδίων (Kamada et al., 2000; Klionsky, 2005; Noda and Ohsumi, 1998). Παρ' όλα αυτά, μελέτες έχουν δείξει ότι πλήρης ενεργοποίηση της αυτοφαγίας προϋποθέτει δράση της κινάσης p70S6, η οποία ενεργοποιείται από την TOR (Scott et al., 2004).

Έλλειψη της TOR στο *C. elegans* παρεμποδίζει την ανάπτυξη των νηματωδών πέρα από ενδιάμεσα ή προχωρημένα στάδια του προνυμφικού σταδίου L3 (Long et al., 2002). Προκαλεί επίσης σοβαρές ανωμαλίες στον πεπτικό σωλήνα, που οφείλονται πιθανά σε μαζική αναστολή της μετάφρασης mRNAs. Αυτές εκδηλώνονται με τη συσσώρευση φθοριζόντων κυστιδίων και τη συρρίκνωση επιθηλιακών κυττάρων, η οποία συνοδεύεται από προοδευτική αύξηση του μεγέθους του εντερικού αυλού. Το σύμπλοκο TOR/raptor του *C. elegans* (LET-363/DAF-15) αποτελεί κεντρικό σημείο, όπου συναντώνται σηματοδοτικά μονοπάτια ινσουλίνης και θρεπτικών συστατικών (Jia et al., 2004). Αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα DAF-16 μετά από πρόσδεση ινσουλίνης στον υποδοχέα DAF-2 αποκαταστέλλει το σύμπλοκο LET-363/DAF-15, επάγοντας τη σύνθεση μεταβολικών και αναπαραγωγικών μορίων. Αντίθετα, ενεργοποίηση του DAF-16 αναστέλλει τη δράση της TOR, επιτρέποντας την έναρξη της αυτοφαγίας και το σχηματισμό των ανθεκτικών μορφών dauers.

Αν η αυτοφαγία απαιτείται όντως για το νεκρωτικό θάνατο, θα αναμενόταν η έλλειψη της κινάσης TOR, του αναστολέα δηλαδή της αυτοφαγίας, να επιδεινώνει την καταστροφή των κυττάρων. Ωστόσο, καταστολή του γονιδίου *let-363* με RNAi και κυρίως μέσω του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου *h98*, έδρασε προστατευτικά σε στελέχη *mec-4(d)* (Εικ. **Γ6(i)**). Η επίδραση μεταλλαγής της TOR στο νευροεκφυλισμό ήταν ιδιαίτερα σημαντική και δε μπορεί να αποδοθεί σε μείωση της έκφρασης της τοξικής πρωτεΐνης MEC-

4(d) (Εικ. **Γ6(ii)**). Η νέκρωση απαιτεί τη δράση ποικίλων μορίων, όπως λυσοσωμικές πρωτεάσες, καλπαΐνες και πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την ομοιόσταση του pH (Syntichaki et al., 2005; Syntichaki et al., 2002). Δεδομένου ότι η TOR ρυθμίζει τη γενική μετάφραση mRNAs, είναι πιθανό η έκφραση κάποιων από τα προαναφερθέντα μόρια να βρίσκεται υπό τον έλεγχό της. Εναλλακτικά, η επίδραση της μεταλλαγής *let-363(h98)* στο νεκρωτικό θάνατο, είναι αποτέλεσμα της σοβαρής ατροφίας του εντέρου των αντίστοιχων στελεχών (Long et al., 2002). Κατά συνέπεια τα ζώα βρίσκονται υπό συνθήκες πείνας, που επιδρούν αρνητικά στην ενεργότητα πρωτεασών ασπαρτικού, καταστέλλοντας έτσι το νευροεκφυλισμό (Syntichaki et al., 2002). Διαφορετική πειραματική προσέγγιση οδήγησε ωστόσο σε αντίθετα αποτελέσματα, αναφέροντας αύξηση του κυτταρικού θανάτου, όταν προνύμφες L1 (οπόταν παρατηρείται και το μέγιστο της νέκρωσης) εκτίθενται σε συνθήκες πείνας ((Toth et al., 2007), Εικ. **21**). Δεδομένου ότι υπό αυτές τις συνθήκες αναστέλλεται η ενεργότητα της κινάσης TOR και συμβαίνει επαγωγή της αυτοφαγίας (Levine and Klionsky, 2004), η παρατήρηση των Toth *et al*. υποστηρίζει τη συμβολή της αυτοφαγικής διαδικασίας στο νεκρωτικό θάνατο. Η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε επίσης ότι RNAi για το γονίδιο *let-363* μειώνει ακόμα περισσότερο την επιβίωση νευρώνων στο στέλεχος *mec-4(d)* ((Toth et al., 2007), Εικ. **21**). Παρότι η παρατηρούμενη ενίσχυση της νέκρωσης φαίνεται να είναι αρκετά μεγαλύτερη και πιο σαφής από το αντίθετο αποτέλεσμα (την καταστολή του κυτταρικού θανάτου), που παρουσιάστηκε στην παρούσα διατριβή (Εικ. **Γ6(i)**), η διαλεύκανση αυτής της αντίφασης απαιτεί έλεγχο της αποτελεσματικότητας της μεθόδου του RNAi για το *let-363* ειδικά στους νευρώνες που υφίστανται νέκρωση. Σε περίπτωση απόδειξης της ορθότητας των αποτελεσμάτων των Toth *et al*., τα πειραματικά δεδομένα που ελήφθησαν με χρήση νηματωδών οι οποίοι εκφράζουν το *let-363(h98)*, θα μπορούσαν να οφείλονται σε παρουσία άγνωστων μεταλλαγών στο γενετικό υπόβαθρο του στελέχους KR344.



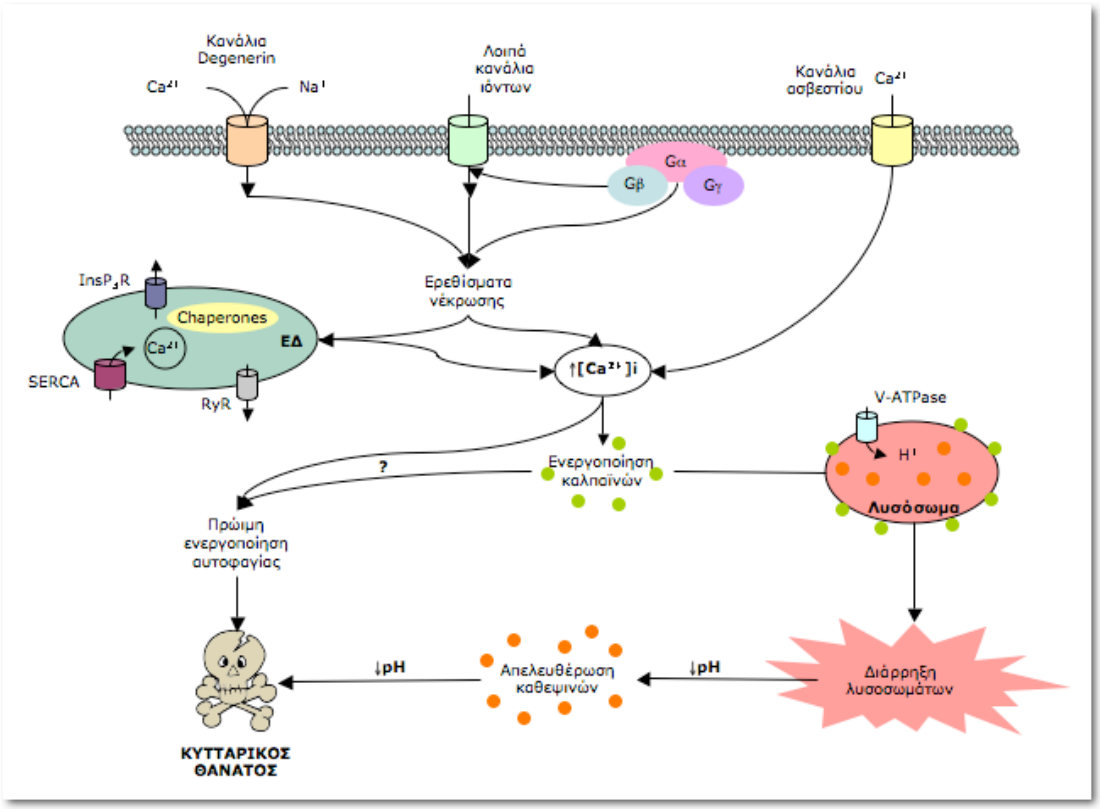
Εικόνα 21. Επίδραση σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών στην τοξικότητα που επάγεται από υπερενεργά κανάλια Degenerins. Στις δύο πρώτες (από αριστερά) μπάρες φαίνεται η επίδραση της καταστολής της κινάσης TOR στο ποσοστό επιβίωσης των νευρώνων νεαρών ενήλικων ατόμων του στελέχους *mec-4(d)* (Toth et al., 2007).

Δ. Μηχανισμοί Νεκρωτικού Θανάτου· Αναπάντητα Ερωτήματα

Επίδραση ακραίων ερεθισμάτων και έντονη μείωση των ενεργειακών επιπέδων προκαλούν καταστροφή των κυττάρων συνήθως μέσω διαδικασιών νέκρωσης. Μελέτες κυρίως σε μοντέλα θηλαστικών και σε νηματώδεις έχουν δείξει ότι κεντρικό ρόλο στον εκφυλισμό παίζει η υπερβολική άνοδος των επιπέδων κυτταροπλασματικού ασβεστίου (Εικ. **22**). Ιόντα ασβεστίου εισέρχονται στα κύτταρα από το μεσοκυττάριο χώρο μέσω ιοντικών καναλιών (Lipton and Nicotera, 1998; Nicotera and Bano, 2003). Η παράλληλη είσοδος κατιόντων νατρίου αυξάνει περαιτέρω την εισροή ασβεστίου, ενεργοποιώντας αντλίες ανταλλαγής Na^+/Ca^{2+} (Sattler and Tymianski, 2000). Η έξοδος ιόντων ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο συμβάλλει επίσης σημαντικά στην αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσής τους κατά τη νέκρωση (Mattson et al., 2000; Paschen, 2001; Xu et al., 2001; Yu et al., 2000). Το ασβέστιο αποτελεί όμως ενεργοποιητή πολλών ενζύμων και κυτταρικών διαδικασιών. Ενεργοποίηση καλπαϊνών έχει αναφερθεί σε νευρώνες πρωτευόντων μετά από ισχαιμία και η σημασία της δράσης τους στο νεκρωτικό θάνατο έχει δειχθεί επίσης στο *C. elegans* (Syntichaki et al., 2002; Yamashima, 2000; Yamashima, 2004). Η ανίχνευση ενεργών καλπαϊνών σε λυσοσωμικές μεμβράνες έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι συμμετέχουν στη διάρρηξη αυτών, με συνέπεια την απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων στο κυτταρόπλασμα (Εικ. **22**). Η παρακολούθηση της αποσταθεροποίησης των λυσοσωμάτων *in vivo* κατά την εξέλιξη της νέκρωσης κατέστη δυνατή σε νηματώδεις που εξέφραζαν κατάλληλους δείκτες. Πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στην παρούσα διατριβή υποδηλώνουν ότι η απώλεια της ακεραιότητας των λυσοσωμάτων συνοδεύεται πιθανά και από έκλυση πρωτονίων, που είχαν συσσωρευτεί στο εσωτερικό αυτών των οργανιδίων με τη δράση κυστιδιακών αντλιών πρωτονίων (V-ATPασών). Άμεσο αποτέλεσμα είναι η οξίνιση του κυτταροπλάσματος, η οποία συμβάλλει στην καταστροφή των νευρώνων αυξάνοντας την ενεργότητα των εκλυόμενων υδρολασών. Αποκαλύφθηκε επιπλέον ότι οι συνθήκες που δημιουργούνται σε αρχικά στάδια του νευροεκφυλισμού, ανάμεσα στις οποίες πιθανά και η αύξηση των ιόντων ασβεστίου ή/και η ενεργοποίηση καλπαϊνών, προκαλούν παροδική επαγωγή αυτοφαγίας. Η καταστολή της δράσης αυτοφαγικών μορίων έδειξε ότι η αυτοφαγία έχει στη συγκεκριμένη περίπτωση καταστροφικό ρόλο, τον οποίο επιτελεί σε συνεργασία με το λυσοσωμικό σύστημα.

Τόσο στα πλαίσια αυτής της διατριβής όσο και σε προηγούμενες μελέτες (Syntichaki et al., 2002), οι πειραματικοί χειρισμοί που εφαρμόστηκαν δεν έχουν επιτύχει πλήρη καταστολή του νεκρωτικού θανάτου σε νηματώδεις. Αιτία αυτού είναι πιθανά η μερική καταστολή των νεκρωτικών παραγόντων, εφόσον στις περισσότερες περιπτώσεις ολοκληρωτική απώλεια της ενεργότητάς τους θα ήταν θνησιγόνος (για παράδειγμα στην περίπτωση των V-ATPασών και του γονιδίου *bec-1*). Επιπλέον, η αποτυχία πλήρους

καταστολής της νέκρωσης δείχνει ότι άγνωστα μέχρι σήμερα μοριακά μονοπάτια συμμετέχουν στην καταστροφή των κυττάρων. Στην παρούσα διατριβή παρουσιάστηκαν άλλωστε ενδείξεις για τη συμβολή διαδικασιών μετακίνησης μεμβρανών, που διαφέρουν από την αυτοφαγία. Η ανακάλυψη του συνόλου των νεκρωτικών παραγόντων απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Η ανίχνευση ορισμένων γενετικών καταστολέων μπορεί ωστόσο να παρεμποδίζεται λόγω δυσμενών επιπτώσεων αυτών στη βιωσιμότητα ή τη γονιμότητα των οργανισμών. Παρόλα αυτά, η ανακάλυψή τους έχει ιδιαίτερη σημασία, δεδομένου ότι συνιστούν υποψήφιους φαρμακευτικούς στόχους στην προσπάθεια να αντιμετωπιστούν παθολογικές καταστάσεις του ανθρώπου. Ήδη, τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα υποδεικνύουν ότι παρέμβαση σε μονοπάτια που ρυθμίζουν την ομοιόσταση του pH και τη λειτουργικότητα των λυσοσωμάτων ή μείωση των επιπέδων αυτοφαγίας θα μπορούσαν να δράσουν προστατευτικά σε νευροεκφυλιστικές καταστάσεις, όπως τα εγκεφαλικά ισχαιμικά επεισόδια.



Εικόνα 22. Μοντέλο νεκρωτικού θανάτου στο *C. elegans*.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

Abraham, M. C., Lu, Y., and Shaham, S. (2007). A morphologically conserved nonapoptotic program promotes linker cell death in Caenorhabditis elegans. Dev Cell *12*, 73-86.

Adamec, E., Mohan, P. S., Cataldo, A. M., Vonsattel, J. P., and Nixon, R. A. (2000). Up-regulation of the lysosomal system in experimental models of neuronal injury: implications for Alzheimer's disease. Neuroscience *100*, 663-675.

Adhami, F., Liao, G., Morozov, Y. M., Schloemer, A., Schmithorst, V. J., Lorenz, J. N., Dunn, R. S., Vorhees, C. V., Wills-Karp, M., Degen, J. L.*, et al.* (2006). Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. Am J Pathol *169*, 566-583.

Aggoun-Zouaoui, D., Margalli, I., Borrega, F., Represa, A., Plotkine, M., Ben-Ari, Y., and Charriaut-Marlangue, C. (1998). Ultrastructural morphology of neuronal death following reversible focal ischemia in the rat. Apoptosis *3*, 133-141.

Aki, T., Yoshida, K., and Fujimiya, T. (2002). Phosphoinositide 3-kinase accelerates calpain-dependent proteolysis of fodrin during hypoxic cell death. J Biochem (Tokyo) *132*, 921-926.

Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M. T., Michel, P. P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E. C., and Agid, Y. (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. Histol Histopathol *12*, 25-31.

Aronoff, R., Mellem, J. E., Maricq, A. V., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (2004). Neuronal toxicity in Caenorhabditis elegans from an editing site mutant in glutamate receptor channels. J Neurosci *24*, 8135-8140.

Arrington, D. D., Van Vleet, T. R., and Schnellmann, R. G. (2006). Calpain 10: a mitochondrial calpain and its role in calcium-induced mitochondrial dysfunction. Am J Physiol Cell Physiol *291*, C1159-1171.

Arsham, A. M., and Neufeld, T. P. (2006). Thinking globally and acting locally with TOR. Curr Opin Cell Biol *18*, 589-597.

Artal-Sanz, M., Samara, C., Syntichaki, P., and Tavernarakis, N. (2006). Lysosomal biogenesis and function is critical for necrotic cell death in Caenorhabditis elegans. J Cell Biol *173*, 231-239.

Arthur, P. G., Matich, G. P., Pang, W. W., Yu, D. Y., and Bogoyevitch, M. A. (2007). Necrotic death of neurons following an excitotoxic insult is prevented by a peptide inhibitor of c-jun N-terminal kinase. J Neurochem.

Baehrecke, E. H. (2005). Autophagy: dual roles in life and death? Nat Rev Mol Cell Biol *6*, 505-510.

Bahr, B. A., and Bendiske, J. (2002). The neuropathogenic contributions of lysosomal dysfunction. J Neurochem *83*, 481-489.

Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., Brunskill, E. W., Sayen, M. R., Gottlieb, R. A., Dorn, G. W.*, et al.* (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. Nature *434*, 658-662.

Bakker, A. C., Webster, P., Jacob, W. A., and Andrews, N. W. (1997). Homotypic fusion between aggregated lysosomes triggered by elevated [Ca2+]i in fibroblasts. J Cell Sci *110 (Pt 18)*, 2227-2238.

Bamber, B. A., and Rowland, A. M. (2006). Shaping cellular form and function by autophagy. Autophagy *2*, 247-249.

Bano, D., Munarriz, E., Chen, H. L., Ziviani, E., Lippi, G., Young, K. W., and Nicotera, P. (2007). The plasma membrane Na+/Ca2+ exchanger is cleaved by distinct protease families in neuronal cell death. Ann N Y Acad Sci *1099*, 451-455.

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

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

Baumgartner, H. K., Gerasimenko, J. V., Thorne, C., Ashurst, L. H., Barrow, S. L., Chvanov, M. A., Gillies, S. G., Criddle, D. N., Tepikin, A. V., Petersen, O. H*., et al.* (2007). Caspase-8 Mediated Apoptosis Induced By Oxidative Stress Is Independent Of The Intrinsic Pathway And Dependent On Cathepsins. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.

Berger, A. J., Hart, A. C., and Kaplan, J. M. (1998). G alphas-induced neurodegeneration in Caenorhabditis elegans. J Neurosci *18*, 2871-2880.

Bernales, S., McDonald, K. L., and Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. PLoS Biol *4*, e423.

Bi, X., Haque, T. S., Zhou, J., Skillman, A. G., Lin, B., Lee, C. E., Kuntz, I. D., Ellman, J. A., and Lynch, G. (2000). Novel cathepsin D inhibitors block the formation of hyperphosphorylated tau fragments in hippocampus. J Neurochem *74*, 1469-1477.

Bianchi, L., Gerstbrein, B., Frokjaer-Jensen, C., Royal, D. C., Mukherjee, G., Royal, M. A., Xue, J., Schafer, W. R., and Driscoll, M. (2004). The neurotoxic MEC-4(d) DEG/ENaC sodium channel conducts calcium: implications for necrosis initiation. Nat Neurosci *7*, 1337-1344.

Blondet, B., Carpentier, G., Ait-Ikhlef, A., Murawsky, M., and Rieger, F. (2002). Motoneuron morphological alterations before and after the onset of the disease in the wobbler mouse. Brain Res *930*, 53-57.

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

Bohensky, J., Shapiro, I. M., Leshinsky, S., Watanabe, H., and Srinivas, V. (2007). PIM-2 is an independent regulator of chondrocyte survival and autophagy in the epiphyseal growth plate. J Cell Physiol.

Boland, B., and Nixon, R. A. (2006). Neuronal macroautophagy: from development to degeneration. Mol Aspects Med *27*, 503-519.

Borsello, T., Croquelois, K., Hornung, J. P., and Clarke, P. G. (2003). N-methyl-d-aspartate-triggered neuronal death in organotypic hippocampal cultures is endocytic, autophagic and mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. Eur J Neurosci *18*, 473-485.

Boulton, S. J., Gartner, A., Reboul, J., Vaglio, P., Dyson, N., Hill, D. E., and Vidal, M. (2002). Combined functional genomic maps of the C. elegans DNA damage response. Science *295*, 127-131.

Bowman, E. J., Siebers, A., and 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.

Boyd-Kimball, D., Poon, H. F., Lynn, B. C., Cai, J., Pierce, W. M., Jr., Klein, J. B., Ferguson, J., Link, C. D., and Butterfield, D. A. (2006). Proteomic identification of proteins specifically

oxidized in Caenorhabditis elegans expressing human Abeta(1-42): implications for Alzheimer's disease. Neurobiol Aging *27*, 1239-1249.

Branda, C. S., and Stern, M. J. (2000). Mechanisms controlling sex myoblast migration in Caenorhabditis elegans hermaphrodites. Dev Biol *226*, 137-151.

Braungart, E., Gerlach, M., Riederer, P., Baumeister, R., and Hoener, M. C. (2004). Caenorhabditis elegans MPP+ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. Neurodegener Dis *1*, 175-183.

Bredesen, D. E., Rao, R. V., and Mehlen, P. (2006). Cell death in the nervous system. Nature *443*, 796-802.

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

Burkhardt, J. K., Echeverri, C. J., Nilsson, T., and Vallee, R. B. (1997). Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. J Cell Biol *139*, 469-484.

Bursch, W. (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. Cell Death Differ *8*, 569-581.

Butler, D., Nixon, R. A., and Bahr, B. A. (2006). Potential compensatory responses through autophagic/lysosomal pathways in neurodegenerative diseases. Autophagy *2*, 234-237.

Callebaut, I., de Gunzburg, J., Goud, B., and Mornon, J. P. (2001). RUN domains: a new family of domains involved in Ras-like GTPase signaling. Trends Biochem Sci *26*, 79-83.

Cao, S., Gelwix, C. C., Caldwell, K. A., and Caldwell, G. A. (2005). Torsin-mediated protection from cellular stress in the dopaminergic neurons of Caenorhabditis elegans. J Neurosci *25*, 3801-3812.

Carre-Pierrat, M., Mariol, M. C., Chambonnier, L., Laugraud, A., Heskia, F., Giacomotto, J., and Segalat, L. (2006). Blocking of striated muscle degeneration by serotonin in C. elegans. J Muscle Res Cell Motil *27*, 253-258.

Castino, R., Bellio, N., Nicotra, G., Follo, C., Trincheri, N. F., and Isidoro, C. (2007). Cathepsin D-Bax death pathway in oxidative stressed neuroblastoma cells. Free Radic Biol Med *42*, 1305-1316.

Cataldo, A. M., Barnett, J. L., Berman, S. A., Li, J., Quarless, S., Bursztajn, S., Lippa, C., and Nixon, R. A. (1995). Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. Neuron *14*, 671-680.

Chalfie, M., and Wolinsky, E. (1990). The identification and suppression of inherited neurodegeneration in Caenorhabditis elegans. Nature *345*, 410-416.

Choi, D. W. (1992). Excitotoxic cell death. J Neurobiol *23*, 1261-1276.

Choi, K. Y., Ji, Y. J., Dhakal, B. K., Yu, J. R., Cho, C., Song, W. K., and Ahnn, J. (2003). Vacuolar-type H+-ATPase E subunit is required for embryogenesis and yolk transfer in Caenorhabditis elegans. Gene *311*, 13-23.

Christensen, M., Estevez, A., Yin, X., Fox, R., Morrison, R., McDonnell, M., Gleason, C., Miller, D. M., 3rd, and Strange, K. (2002). A primary culture system for functional analysis of C. elegans neurons and muscle cells. Neuron *33*, 503-514.

Chu, C. T. (2006). Autophagic stress in neuronal injury and disease. J Neuropathol Exp Neurol *65*, 423-432.

Chung, S., Gumienny, T. L., Hengartner, M. O., and 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.

Clausen, T., Khaldi, A., Zauner, A., Reinert, M., Doppenberg, E., Menzel, M., Soukup, J., Alves, O. L., and Bullock, M. R. (2005). Cerebral acid-base homeostasis after severe traumatic brain injury. J Neurosurg *103*, 597-607.

Coakley, R. J., Taggart, C., McElvaney, N. G., and O'Neill, S. J. (2002). Cytosolic pH and the inflammatory microenvironment modulate cell death in human neutrophils after phagocytosis. Blood *100*, 3383-3391.

Codogno, P., and Meijer, A. J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. Cell Death Differ *12 Suppl 2*, 1509-1518.

Cooper, J. D., Messer, A., Feng, A. K., Chua-Couzens, J., and Mobley, W. C. (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.

Coulson, A., Waterston, R., Kiff, J., Sulston, J., and Kohara, Y. (1988). Genome linking with yeast artificial chromosomes. Nature *335*, 184-186.

Crawford, F. C., Freeman, M. J., Schinka, J., Abdullah, L. I., Richards, D., Sevush, S., Duara, R., and Mullan, M. J. (2000). The genetic association between Cathepsin D and Alzheimer's disease. Neurosci Lett *289*, 61-65.

Criollo, A., Maiuri, M. C., Tasdemir, E., Vitale, I., Fiebig, A. A., Andrews, D., Molgo, J., Diaz, J., Lavandero, S., Harper, F.*, et al.* (2007). Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. Cell Death Differ.

Cuervo, A. M. (2004). Autophagy: in sickness and in health. Trends Cell Biol *14*, 70-77.

Culmsee, C., and Krieglstein, J. (2007). Ischaemic brain damage after stroke: new insights into efficient therapeutic strategies. International Symposium on Neurodegeneration and Neuroprotection. EMBO Rep *8*, 129-133.

Decker, R. S., Poole, A. R., Crie, J. S., Dingle, J. T., and Wildenthal, K. (1980). Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. II. Immunohistochemical and biochemical changes in cathepsin D. Am J Pathol *98*, 445-456.

Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A., and Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. Nat Chem Biol *1*, 112-119.

Demarchi, F., Bertoli, C., Copetti, T., Tanida, I., Brancolini, C., Eskelinen, E. L., and Schneider, C. (2006). Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells. J Cell Biol *175*, 595-605.

Dermaut, B., Norga, K. K., Kania, A., Verstreken, P., Pan, H., Zhou, Y., Callaerts, P., and Bellen, H. J. (2005). Aberrant lysosomal carbohydrate storage accompanies endocytic defects and neurodegeneration in Drosophila benchwarmer. J Cell Biol *170*, 127-139.

Ding, D., Moskowitz, S. I., Li, R., Lee, S. B., Esteban, M., Tomaselli, K., Chan, J., and Bergold, P. J. (2000). Acidosis induces necrosis and apoptosis of cultured hippocampal neurons. Exp Neurol *162*, 1-12.

Diskin, T., Tal-Or, P., Erlich, S., Mizrachy, L., Alexandrovich, A., Shohami, E., and Pinkas-Kramarski, R. (2005). Closed head injury induces upregulation of Beclin 1 at the cortical site of injury. J Neurotrauma *22*, 750-762.

Ditaranto-Desimone, K., Saito, M., Tekirian, T. L., Saito, M., Berg, M., Dubowchik, G., Soreghan, B., Thomas, S., Marks, N., and Yang, A. J. (2003). Neuronal endosomal/lysosomal membrane destabilization activates caspases and induces abnormal accumulation of the lipid secondary messenger ceramide. Brain res Bull *59*, 523-531.

Dosenko, V. E., Nagibin, V. S., Tumanovska, L. V., and Moibenko, A. A. (2006). Protective effect of autophagy in anoxia-reoxygenation of isolated cardiomyocyte? Autophagy *2*, 305-306.

Driscoll, M., and 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.

Driscoll, M., and Gerstbrein, B. (2003). Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration. Nat Rev Genet *4*, 181-194.

Edinger, A. L., and Thompson, C. B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. Curr Opin Cell Biol *16*, 663-669.

Egami, Y., Kiryu-Seo, S., Yoshimori, T., and Kiyama, H. (2005). Induced expressions of Rab24 GTPase and LC3 in nerve-injured motor neurons. Biochem Biophys Res Commun *337*, 1206-1213.

Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans. Cell *44*, 817-829.

Erlich, S., Alexandrovich, A., Shohami, E., and Pinkas-Kramarski, R. (2007). Rapamycin is a neuroprotective treatment for traumatic brain injury. Neurobiol Dis *26*, 86-93.

Erlich, S., Shohami, E., and Pinkas-Kramarski, R. (2006). Neurodegeneration induces upregulation of Beclin 1. Autophagy *2*, 49-51.

Eskelinen, E. L., Tanaka, Y., and Saftig, P. (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. Trends Cell Biol *13*, 137-145.

Eum, H. A., Cha, Y. N., and Lee, S. M. (2007). Necrosis and apoptosis: Sequence of liver damage following reperfusion after 60min ischemia in rats. Biochem Biophys Res Commun *358*, 500-505.

Faber, P. W., Alter, J. R., MacDonald, M. E., and Hart, A. C. (1999). Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a Caenorhabditis elegans sensory neuron. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 179-184.

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

Fraser, A. G., Kamath, R. S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., and Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of C. elegans chromosome I by systematic RNA interference. Nature *408*, 325-330.

Funakoshi, T., Matsuura, A., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1997). Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, Saccharomyces cerevisiae. Gene *192*, 207-213.

Gaud, A., Simon, J. M., Witzel, T., Carre-Pierrat, M., Wermuth, C. G., and Segalat, L. (2004). Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient Caenorhabditis elegans. Neuromuscul Disord *14*, 365-370.

Gems, D., and Riddle, D. L. (2000). Defining wild-type life span in Caenorhabditis elegans. J Gerontol A Biol Sci Med Sci *55*, B215-219.

Goedert, M. (1993). Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. Trends Neurosci *16*, 460-465.

Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., and Cong, J. (2003). The calpain system. Physiol Rev *83*, 731-801.

Golstein, P., and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. Trends Biochem Sci *32*, 37-43.

Gonczy, P., Echeverri, C., Oegema, K., Coulson, A., Jones, S. J., Copley, R. R., Duperon, J., Oegema, J., Brehm, M., Cassin, E*., et al.* (2000). Functional genomic analysis of cell division in C. elegans using RNAi of genes on chromosome III. Nature *408*, 331-336.

Gozuacik, D., and Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. Oncogene *23*, 2891-2906.

Graham, R. M., Frazier, D. P., Thompson, J. W., Haliko, S., Li, H., Wasserlauf, B. J., Spiga, M. G., Bishopric, N. H., and Webster, K. A. (2004). A unique pathway of cardiac myocyte death caused by hypoxia-acidosis. J Exp Biol *207*, 3189-3200.

Grynspan, F., Griffin, W. R., Cataldo, A., Katayama, S., and Nixon, R. A. (1997). Active site-directed antibodies identify calpain II as an early-appearing and pervasive component of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. Brain Res *763*, 145-158.

Gumienny, T. L., Lambie, E., Hartwieg, E., Horvitz, H. R., and Hengartner, M. O. (1999). Genetic control of programmed cell death in the Caenorhabditis elegans hermaphrodite germline. Development *126*, 1011-1022.

Gyrd-Hansen, M., Farkas, T., Fehrenbacher, N., Bastholm, L., Hoyer-Hansen, M., Elling, F., Wallach, D., Flavell, R., Kroemer, G., Nylandsted, J., and Jaattela, M. (2006). Apoptosome-independent activation of the lysosomal cell death pathway by caspase-9. Mol Cell Biol *26*, 7880-7891.

Hall, D. H., Gu, G., Garcia-Anoveros, J., Gong, L., Chalfie, M., and Driscoll, M. (1997). Neuropathology of degenerative cell death in Caenorhabditis elegans. J Neurosci *17*, 1033-1045.

Hamacher-Brady, A., Brady, N. R., and Gottlieb, R. A. (2006). Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. J Biol Chem *281*, 29776-29787.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., and Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. Nature *441*, 885-889.

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

Hars, E. S., Qi, H., Ryazanov, A. G., Jin, S., Cai, L., Hu, C., and Liu, L. F. (2007). Autophagy regulates ageing in C. elegans. Autophagy *3*, 93-95.

Hermann, G. J., Schroeder, L. K., Hieb, C. A., Kershner, A. M., Rabbitts, B. M., Fonarev, P., Grant, B. D., and Priess, J. R. (2005). Genetic analysis of lysosomal trafficking in Caenorhabditis elegans. Mol Biol Cell *16*, 3273-3288.

Hope, I. A., Albertson, D. G., Martinelli, S. D., Lynch, A. S., Sonnhammer, E., and Durbin, R. (1996). The C. elegans expression pattern database: a beginning. Trends Genet *12*, 370-371.

Houthoofd, K., Gems, D., Johnson, T. E., and Vanfleteren, J. R. (2007). Dietary restriction in the nematode Caenorhabditis elegans. Interdiscip Top Gerontol *35*, 98-114.

Hoyer-Hansen, M., Bastholm, L., Mathiasen, I. S., Elling, F., and Jaattela, M. (2005). Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death. Cell Death Differ *12*, 1297-1309.

Hoyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R.*, et al.* (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. Mol Cell *25*, 193-205.

Huang, M., and Chalfie, M. (1994). Gene interactions affecting mechanosensory transduction in Caenorhabditis elegans. Nature *367*, 467-470.

Huang, W. P., and Klionsky, D. J. (2002). Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. Cell Struct Funct *27*, 409-420.

Hughes, E. N., and August, J. T. (1982). Murine cell surface glycoproteins. Identification, purification, and characterization of a major glycosylated component of 110,000 daltons by use of a monoclonal antibody. J Biol Chem *257*, 3970-3977.

Ian A., H. (1999). C. elegans A PRACTICAL APPROACH (New York: OXFORD UNIVERSITY PRESS).

Inbal, B., Bialik, S., Sabanay, I., Shani, G., and Kimchi, A. (2002). DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. J Cell Biol *157*, 455-468.

Ishidoh, K., and Kominami, E. (2002). Processing and activation of lysosomal proteinases. Biol Chem *383*, 1827-1831.

Jacobson, L. A., Jen-Jacobson, L., Hawdon, J. M., Owens, G. P., Bolanowski, M. A., Emmons, S. W., Shah, M. V., Pollock, R. A., and Conklin, D. S. (1988). Identification of a putative structural gene for cathepsin D in Caenorhabditis elegans. Genetics *119*, 355-363.

Jennings, J. J., Jr., Zhu, J. H., Rbaibi, Y., Luo, X., Chu, C. T., and Kiselyov, K. (2006). Mitochondrial aberrations in mucolipidosis Type IV. J Biol Chem *281*, 39041-39050.

Jentsch, S., and Ulrich, H. D. (1998). Protein breakdown. Ubiquitous deja vu. Nature *395*, 321, 323.

Ji, Z. S., Mullendorff, K., Cheng, I. H., Miranda, R. D., Huang, Y., and Mahley, R. W. (2006). Reactivity of apolipoprotein E4 and amyloid beta peptide: lysosomal stability and neurodegeneration. J Biol Chem *281*, 2683-2692.

Jia, K., Chen, D., and Riddle, D. L. (2004). The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate C. elegans larval development, metabolism and life span. Development *131*, 3897-3906.

Jia, K., Hart, A. C., and Levine, B. (2007). Autophagy genes protect against disease caused by polyglutamine expansion proteins in Caenorhabditis elegans. Autophagy *3*, 21-25.

Kaasik, A., Rikk, T., Piirsoo, A., Zharkovsky, T., and Zharkovsky, A. (2005). Up-regulation of lysosomal cathepsin L and autophagy during neuronal death induced by reduced serum and potassium. Eur J Neurosci *22*, 1023-1031.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. Embo J *19*, 5720-5728.

Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. J Cell Biol *150*, 1507-1513.

Kamath, R. S., Fraser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M.*, et al.* (2003). Systematic functional analysis of the Caenorhabditis elegans genome using RNAi. Nature *421*, 231-237.

Kamath, R. S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A. G., and Ahringer, J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Genome Biol *2*, RESEARCH0002.

Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature *325*, 733-736.

Kapahi, P., Zid, B. M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V., and Benzer, S. (2004). Regulation of lifespan in Drosophila by modulation of genes in the TOR signaling pathway. Curr Biol *14*, 885-890.

Katsura, K., Kristian, T., Smith, M. L., and Siesjo, B. K. (1994). Acidosis induced by hypercapnia exaggerates ischemic brain damage. J Cereb Blood Flow Metab *14*, 243-250.

Kawai, A., Uchiyama, H., Takano, S., Nakamura, N., and Ohkuma, S. (2007). Autophagosome-lysosome fusion depends on the pH in acidic compartments in CHO cells. Autophagy *3*, 154-157.

Kennedy, S., Wang, D., and Ruvkun, G. (2004). A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in C. elegans. Nature *427*, 645-649.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer *26*, 239-257.

Khan, L. A., Bauer, P. O., Miyazaki, H., Lindenberg, K. S., Landwehrmeyer, B. G., and Nukina, N. (2006). Expanded polyglutamines impair synaptic transmission and ubiquitin-proteasome system in Caenorhabditis elegans. J Neurochem *98*, 576-587.

Kim, M. J., Jo, D. G., Hong, G. S., Kim, B. J., Lai, M., Cho, D. H., Kim, K. W., Bandyopadhyay, A., Hong, Y. M., Kim, D. H.*, et al.* (2002). Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 9870-9875.

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

Kimble, J., and Hirsh, D. (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in Caenorhabditis elegans. Dev Biol *70*, 396-417.

Kinchen, J. M., and Hengartner, M. O. (2005). Tales of cannibalism, suicide, and murder: Programmed cell death in C. elegans. Curr Top Dev Biol *65*, 1-45.

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

Klionsky, D. J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. J Cell Sci *118*, 7-18.

Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., and Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. Dev Cell *5*, 539-545.

Klionsky, D. J., and Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science *290*, 1717-1721.

Komatsu, M., Ueno, T., Waguri, S., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2007). Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. Cell Death Differ.

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. Nature *441*, 880-884.

Korswagen, H. C., Park, J. H., Ohshima, Y., and Plasterk, R. H. (1997). An activating mutation in a Caenorhabditis elegans Gs protein induces neural degeneration. Genes Dev *11*, 1493-1503.

Kosta, A., Roisin-Bouffay, C., Luciani, M. F., Otto, G. P., Kessin, R. H., and Golstein, P. (2004). Autophagy gene disruption reveals a non-vacuolar cell death pathway in Dictyostelium. J Biol Chem *279*, 48404-48409.

Kostich, M., Fire, A., and Fambrough, D. M. (2000). Identification and molecular-genetic characterization of a LAMP/CD68-like protein from Caenorhabditis elegans. J Cell Sci *113 (Pt 14)*, 2595-2606.

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

Kraemer, B. C., Zhang, B., Leverenz, J. B., Thomas, J. H., Trojanowski, J. Q., and Schellenberg, G. D. (2003). Neurodegeneration and defective neurotransmission in a Caenorhabditis elegans model of tauopathy. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 9980-9985.

Kristian, T. (2004). Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. Cell Calcium *36*, 221-233.

Kroemer, G., and Jaattela, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. Nat Rev Cancer *5*, 886-897.

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. Nature *432*, 1032-1036.

Kumar, A., and Rothman, J. H. (2007). Cell death: hook, line and linker. Curr Biol *17*, R286-289.

Kuroyanagi, H., Yan, J., Seki, N., Yamanouchi, Y., Suzuki, Y., Takano, T., Muramatsu, M., and Shirasawa, T. (1998). Human ULK1, a novel serine/threonine kinase related to UNC-51 kinase of Caenorhabditis elegans: cDNA cloning, expression, and chromosomal assignment. Genomics *51*, 76-85.

Kuwahara, T., Koyama, A., Gengyo-Ando, K., Masuda, M., Kowa, H., Tsunoda, M., Mitani, S., and Iwatsubo, T. (2006). Familial Parkinson mutant alpha-synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic Caenorhabditis elegans. J Biol Chem *281*, 334-340.

L'Allemain, G., Paris, S., and Pouyssegur, J. (1985). Role of a Na+-dependent Cl-/HCO3- exchange in regulation of intracellular pH in fibroblasts. J Biol Chem *260*, 4877-4883.

Lai, T., and Garriga, G. (2004). The conserved kinase UNC-51 acts with VAB-8 and UNC-14 to regulate axon outgrowth in C. elegans. Development *131*, 5991-6000.

Lakowski, B., and 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, A. M., Sirvio, J., Thomas, J. H., Nass, R., Blakely, R. D., and Wong, G. (2003). Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in Caenorhabditis elegans overexpressing human alpha-synuclein. J Neurochem *86*, 165-172.

Laporte, C., Kosta, A., Klein, G., Aubry, L., Lam, D., Tresse, E., Luciani, M. F., and Golstein, P. (2007). A necrotic cell death model in a protist. Cell Death Differ *14*, 266-274.

Larsen, K. E., and Sulzer, D. (2002). Autophagy in neurons: a review. Histol Histopathol *17*, 897-908.

Lee, H. J., Khoshaghideh, F., Patel, S., and Lee, S. J. (2004). Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. J Neurosci *24*, 1888-1896.

Lehner, B., Calixto, A., Crombie, C., Tischler, J., Fortunato, A., Chalfie, M., and Fraser, A. G. (2006). Loss of LIN-35, the Caenorhabditis elegans ortholog of the tumor suppressor p105Rb, results in enhanced RNA interference. Genome Biol *7*, R4.

Lettre, G., and Hengartner, M. O. (2006). Developmental apoptosis in C. elegans: a complex CEDnario. Nat Rev Mol Cell Biol *7*, 97-108.

Levin, S., Bucci, T. J., Cohen, S. M., Fix, A. S., Hardisty, J. F., LeGrand, E. K., Maronpot, R. R., and Trump, B. F. (1999). The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. Toxicol Pathol *27*, 484-490.

Levine, B. (2007). Cell biology: autophagy and cancer. Nature *446*, 745-747.

Levine, B., and Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Dev Cell *6*, 463-477.

Levine, B., and Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? J Clin Invest *115*, 2679-2688.

Li, J. Z., Vawter, M. P., Walsh, D. M., Tomita, H., Evans, S. J., Choudary, P. V., Lopez, J. F., Avelar, A., Shokoohi, V., Chung, T.*, et al.* (2004). Systematic changes in gene expression in postmortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions. Hum Mol Genet *13*, 609-616.

Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. Nature *402*, 672-676.

Link, C. D. (2005). Invertebrate models of Alzheimer's disease. Genes Brain Behav *4*, 147-156.

Lippincott-Schwartz, J., and Fambrough, D. M. (1986). Lysosomal membrane dynamics: structure and interorganellar movement of a major lysosomal membrane glycoprotein. J Cell Biol *102*, 1593-1605.

Lipton, S. A., and Nicotera, P. (1998). Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. Cell Calcium *23*, 165-171.

Lobner, D., Canzoniero, L. M., Manzerra, P., Gottron, F., Ying, H., Knudson, M., Tian, M., Dugan, L. L., Kerchner, G. A., Sheline, C. T.*, et al.* (2000). Zinc-induced neuronal death in cortical neurons. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) *46*, 797-806.

Lodish, H. B., Arnold; Zipursky, S.Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. (2000). Molecular Cell Biology (New York: W. H. Freeman & Co.).

Long, X., Spycher, C., Han, Z. S., Rose, A. M., Muller, F., and Avruch, J. (2002). TOR deficiency in C. elegans causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation. Curr Biol *12*, 1448-1461.

Luo, J., Chen, H., Kintner, D. B., Shull, G. E., and Sun, D. (2005). Decreased neuronal death in Na+/H+ exchanger isoform 1-null mice after in vitro and in vivo ischemia. J Neurosci *25*, 11256-11268.

Machaca, K., and L'Hernault, S. W. (1997). The Caenorhabditis elegans spe-5 gene is required for morphogenesis of a sperm-specific organelle and is associated with an inherent cold-sensitive phenotype. Genetics *146*, 567-581.

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

Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J. C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N.*, et al.* (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. Embo J.

Maricq, A. V., Peckol, E., Driscoll, M., and Bargmann, C. I. (1995). Mechanosensory signalling in C. elegans mediated by the GLR-1 glutamate receptor. Nature *378*, 78-81.

Martin, D. E., and Hall, M. N. (2005). The expanding TOR signaling network. Curr Opin Cell Biol *17*, 158-166.

Martin, L. J. (2001). Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review). Int J Mol Med *7*, 455-478.

Martin, L. J., Brambrink, A. M., Price, A. C., Kaiser, A., Agnew, D. M., Ichord, R. N., and Traystman, R. J. (2000). Neuronal death in newborn striatum after hypoxia-ischemia is necrosis and evolves with oxidative stress. Neurobiol Dis *7*, 169-191.

Martin, S. J., O'Brien, G. A., Nishioka, W. K., McGahon, A. J., Mahboubi, A., Saido, T. C., and Green, D. R. (1995). Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. J Biol Chem *270*, 6425-6428.

Martinez-Vicente, M., and Cuervo, A. M. (2007). Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. Lancet Neurol *6*, 352-361.

Masliah, E., Iimoto, D. S., Saitoh, T., Hansen, L. A., and Terry, R. D. (1990). Increased immunoreactivity of brain spectrin in Alzheimer disease: a marker for synapse loss? Brain Res *531*, 36-44.

Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y., and Ohsumi, Y. (1997). Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in Saccharomyces cerevisiae. Gene *192*, 245-250.

Matthews, L. R., Vaglio, P., Reboul, J., Ge, H., Davis, B. P., Garrels, J., Vincent, S., and Vidal, M. (2001). Identification of potential interaction networks using sequence-based searches for conserved protein-protein interactions or "interologs". Genome Res *11*, 2120-2126.

Mattson, M. P., LaFerla, F. M., Chan, S. L., Leissring, M. A., Shepel, P. N., and Geiger, J. D. (2000). Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. Trends Neurosci *23*, 222-229.

Matyja, E., Naganska, E., Taraszewska, A., and Rafalowska, J. (2005). The mode of spinal motor neurons degeneration in a model of slow glutamate excitotoxicity in vitro. Folia Neuropathol *43*, 7-13.

Mavrakis, M., Lippincott-Schwartz, J., Stratakis, C. A., and Bossis, I. (2007). mTOR kinase and the regulatory subunit of protein kinase A (PRKAR1A) spatially and functionally interact during autophagosome maturation. Autophagy *3*, 151-153.

McIntire, S. L., Garriga, G., White, J., Jacobson, D., and Horvitz, H. R. (1992). Genes necessary for directed axonal elongation or fasciculation in C. elegans. Neuron *8*, 307-322.

Melendez, A., Talloczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E. L., Hall, D. H., and Levine, B. (2003). Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in C. elegans. Science *301*, 1387-1391.

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

Merzendorfer, H., Huss, M., Schmid, R., Harvey, W. R., and Wieczorek, H. (1999). A novel insect V-ATPase subunit M9.7 is glycosylated extensively. J Biol Chem *274*, 17372-17378.

Miesenbock, G., De Angelis, D. A., and Rothman, J. E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. Nature *394*, 192-195.

Miyasaka, T., Ding, Z., Gengyo-Ando, K., Oue, M., Yamaguchi, H., Mitani, S., and Ihara, Y. (2005). Progressive neurodegeneration in C. elegans model of tauopathy. Neurobiol Dis *20*, 372-383.

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. Nature *395*, 395-398.

Mizushima, N., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. Cell Struct Funct *27*, 421-429.

Morck, C., and Pilon, M. (2006). C. elegans feeding defective mutants have shorter body lengths and increased autophagy. BMC Dev Biol *6*, 39.

Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. Nature *434*, 652-658.

Nass, R., Hall, D. H., Miller, D. M., 3rd, and Blakely, R. D. (2002). Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in Caenorhabditis elegans. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 3264-3269.

Nehrke, K. (2003). A reduction in intestinal cell pHi due to loss of the Caenorhabditis elegans Na+/H+ exchanger NHX-2 increases life span. J Biol Chem *278*, 44657-44666.

Nehrke, K., and Melvin, J. E. (2002). The NHX family of Na+-H+ exchangers in Caenorhabditis elegans. J Biol Chem *277*, 29036-29044.

Nicotera, P., and Bano, D. (2003). The enemy at the gates. Ca2+ entry through TRPM7 channels and anoxic neuronal death. Cell *115*, 768-770.

Nicotera, P., Leist, M., and Manzo, L. (1999). Neuronal cell death: a demise with different shapes. Trends Pharmacol Sci *20*, 46-51.

Niquet, J., Seo, D. W., Allen, S. G., and Wasterlain, C. G. (2006a). Hypoxia in presence of blockers of excitotoxicity induces a caspase-dependent neuronal necrosis. Neuroscience *141*, 77-86.

Niquet, J., Seo, D. W., and Wasterlain, C. G. (2006b). Mitochondrial pathways of neuronal necrosis. Biochem Soc Trans *34*, 1347-1351.

Nishi, T., and Forgac, M. (2002). The vacuolar (H+)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. Nat Rev Mol Cell Biol *3*, 94-103.

Nixon, R. A., and Cataldo, A. M. (2006). Lysosomal system pathways: genes to neurodegeneration in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis *9*, 277-289.

Nixon, R. A., Cataldo, A. M., and Mathews, P. M. (2000). The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. Neurochem Res *25*, 1161-1172.

Noda, T., and Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. J Biol Chem *273*, 3963-3966.

Nunes, F., Wolf, M., Hartmann, J., and Paul, R. J. (2005). The ABC transporter PGP-2 from Caenorhabditis elegans is expressed in the sensory neuron pair AWA and contributes to lysosome formation and lipid storage within the intestine. Biochem Biophys Res Commun *338*, 862-871.

Oberstein, A., Jeffrey, P., and Shi, Y. (2007). Crystal structure of the BCL-XL-beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. J Biol Chem.

Ogura, K., and Goshima, Y. (2006). The autophagy-related kinase UNC-51 and its binding partner UNC-14 regulate the subcellular localization of the Netrin receptor UNC-5 in Caenorhabditis elegans. Development *133*, 3441-3450.

Ogura, K., Shirakawa, M., Barnes, T. M., Hekimi, S., and Ohshima, Y. (1997). The UNC-14 protein required for axonal elongation and guidance in Caenorhabditis elegans interacts with the serine/threonine kinase UNC-51. Genes Dev *11*, 1801-1811.

Ogura, K., Wicky, C., Magnenat, L., Tobler, H., Mori, I., Muller, F., and Ohshima, Y. (1994). Caenorhabditis elegans unc-51 gene required for axonal elongation encodes a novel serine/threonine kinase. Genes Dev *8*, 2389-2400.

Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. Nat Rev Mol Cell Biol *2*, 211-216.

Oka, T., and 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., and 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., and 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., and 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.

Okazaki, N., Yan, J., Yuasa, S., Ueno, T., Kominami, E., Masuho, Y., Koga, H., and Muramatsu, M. (2000). Interaction of the Unc-51-like kinase and microtubule-associated protein light chain 3 related proteins in the brain: possible role of vesicular transport in axonal elongation. Brain Res Mol Brain Res *85*, 1-12.

Pandey, U. B., Nie, Z., Batlevi, Y., McCray, B. A., Ritson, G. P., Nedelsky, N. B., Schwartz, S. L., DiProspero, N. A., Knight, M. A., Schuldiner, O.*, et al.* (2007). HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. Nature *447*, 860-864.

Parker, J. A., Holbert, S., Lambert, E., Abderrahmane, S., and Neri, C. (2004). Genetic and pharmacological suppression of polyglutamine-dependent neuronal dysfunction in Caenorhabditis elegans. J Mol Neurosci *23*, 61-68.

Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X., and Xue, D. (2001). Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in C. elegans. Nature *412*, 90-94.

Parrish, J. Z., Yang, C., Shen, B., and Xue, D. (2003). CRN-1, a Caenorhabditis elegans FEN-1 homologue, cooperates with CPS-6/EndoG to promote apoptotic DNA degradation. Embo J *22*, 3451-3460.

Paschen, W. (2001). Dependence of vital cell function on endoplasmic reticulum calcium levels: implications for the mechanisms underlying neuronal cell injury in different pathological states. Cell Calcium *29*, 1-11.

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. Cell *122*, 927-939.

Pirchl, M., Marksteiner, J., and Humpel, C. (2006). Effects of acidosis on brain capillary endothelial cells and cholinergic neurons: relevance to vascular dementia and Alzheimer's disease. Neurol Res *28*, 657-664.

Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R.*, et al.* (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science *276*, 2045-2047.

Portera-Cailliau, C., Price, D. L., and Martin, L. J. (1997). Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. J Comp Neurol *378*, 70-87.

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. J Biol Chem *276*, 11913-11921.

Putney, L. K., Denker, S. P., and Barber, D. L. (2002). The changing face of the Na+/H+ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. Annu Rev Pharmacol Toxicol *42*, 527-552.

Pyo, J. O., Jang, M. H., Kwon, Y. K., Lee, H. J., Jun, J. I., Woo, H. N., Cho, D. H., Choi, B., Lee, H., Kim, J. H.*, et al.* (2005). Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. J Biol Chem *280*, 20722-20729.

Qin, Z. H., Wang, Y., Kegel, K. B., Kazantsev, A., Apostol, B. L., Thompson, L. M., Yoder, J., Aronin, N., and DiFiglia, M. (2003). Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments. Hum Mol Genet *12*, 3231-3244.

Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O'Kane, C. J., and Rubinsztein, D. C. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. Nat Genet *36*, 585-595.

Riddle, D. L. (1997). C. elegans II (Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Rideout, H. J., Lang-Rollin, I., and Stefanis, L. (2004). Involvement of macroautophagy in the dissolution of neuronal inclusions. Int J Biochem Cell Biol *36*, 2551-2562.

Roudier, N., Lefebvre, C., and Legouis, R. (2005). CeVPS-27 is an endosomal protein required for the molting and the endocytic trafficking of the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in Caenorhabditis elegans. Traffic *6*, 695-705.

Rowland, A. M., Richmond, J. E., Olsen, J. G., Hall, D. H., and Bamber, B. A. (2006). Presynaptic terminals independently regulate synaptic clustering and autophagy of GABAA receptors in Caenorhabditis elegans. J Neurosci *26*, 1711-1720.

Rubinsztein, D. C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. Nature *443*, 780-786.

Rubinsztein, D. C., DiFiglia, M., Heintz, N., Nixon, R. A., Qin, Z. H., Ravikumar, B., Stefanis, L., and Tolkovsky, A. (2005). Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. Autophagy *1*, 11-22.

Sagiv, Y.,Legesse-Miller, A., Porat, A., and Elazar, Z. (2000). GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. Embo J *19*, 1494-1504.

Sakon, S., Xue, X., Takekawa, M., Sasazuki, T., Okazaki, T., Kojima, Y., Piao, J. H., Yagita, H., Okumura, K., Doi, T., and Nakano, H. (2003). NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. Embo J *22*, 3898-3909.

Samara, C., and Tavernarakis, N. (2003). Calcium-dependent and aspartyl proteases in neurodegeneration and ageing in C. elegans. Ageing Res Rev *2*, 451-471.

Sankaranarayanan, S., De Angelis, D., Rothman, J. E., and Ryan, T. A. (2000). The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. Biophys J *79*, 2199-2208.

Sarkar, S., Davies, J. E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., and Rubinsztein, D. C. (2007). Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. J Biol Chem *282*, 5641-5652.

Sattler, R., and Tymianski, M. (2000). Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. J Mol Med *78*, 3-13.

Sauvage, M., Maziere, P., Fathallah, H., and Giraud, F. (2000). Insulin stimulates NHE1 activity by sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C zeta in human erythrocytes. Eur J Biochem *267*, 955-962.

Schaheen, L., Dang, H., and Fares, H. (2006). Basis of lethality in C. elegans lacking CUP-5, the Mucolipidosis Type IV orthologue. Dev Biol *293*, 382-391.

Schmelzle, T., and Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. Cell *103*, 253-262.

Schneider, D., Gerhardt, E., Bock, J., Muller, M. M., Wolburg, H., Lang, F., and Schulz, J. B. (2004). Intracellular acidification by inhibition of the Na+/H+-exchanger leads to caspase-independent death of cerebellar granule neurons resembling paraptosis. Cell Death Differ *11*, 760-770.

Scott, B. A., Avidan, M. S., and Crowder, C. M. (2002). Regulation of hypoxic death in C. elegans by the insulin/IGF receptor homolog DAF-2. Science *296*, 2388-2391.

Scott, R. C., Juhasz, G., and Neufeld, T. P. (2007). Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. Curr Biol *17*, 1-11.

Scott, R. C., Schuldiner, O., and Neufeld, T. P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. Dev Cell *7*, 167-178.

Seglen, P. O., and Gordon, P. B. (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A *79*, 1889-1892.

Selimi, F., Lohof, A. M., Heitz, S., Lalouette, A., Jarvis, C. I., Bailly, Y., and Mariani, J. (2003). Lurcher GRID2-induced death and depolarization can be dissociated in cerebellar Purkinje cells. Neuron *37*, 813-819.

Shacka, J. J., Lu, J., Xie, Z. L., Uchiyama, Y., Roth, K. A., and Zhang, J. (2007). Kainic acid induces early and transient autophagic stress in mouse hippocampus. Neurosci Lett *414*, 57-60.

Shaham, S. (2006). The Dynami(n)cs of cell corpse engulfment. Dev Cell *10*, 690-691.

Shintani, T., and Klionsky, D. J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. Science *306*, 990-995.

Silva-Zacarin, E. C., Tomaino, G. A., Brocheto-Braga, M. R., Taboga, S. R., and De Moraes, R. L. (2007). Programmed cell death in the larval salivary glands of Apis mellifera (Hymenoptera, Apidae). J Biosci *32*, 309-328.

Simmer, F., Moorman, C., van der Linden, A. M., Kuijk, E., van den Berghe, P. V., Kamath, R. S., Fraser, A. G., Ahringer, J., and Plasterk, R. H. (2003). Genome-wide RNAi of C. elegans using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. PLoS Biol *1*, E12.

Simon, R., and Xiong, Z. (2006). Acidotoxicity in brain ischaemia. Biochem Soc Trans *34*, 1356-1361.

Sorimachi, H., and Suzuki, K. (2001). The structure of calpain. J Biochem (Tokyo) *129*, 653-664.

Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature *388*, 839-840.

Stevens, T. H., and Forgac, M. (1997). Structure, function and regulation of the vacuolar (H+)-ATPase. Annu Rev Cell Dev Biol *13*, 779-808.

Stys, P. K., and Jiang, Q. (2002). Calpain-dependent neurofilament breakdown in anoxic and ischemic rat central axons. Neurosci Lett *328*, 150-154.

Sulston, J. E., and Horvitz, H. R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans. Dev Biol *56*, 110-156.

Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., and Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans. Dev Biol *100*, 64-119.

Syntichaki, P., Samara, C., and Tavernarakis, N. (2005). The vacuolar H+ -ATPase mediates intracellular acidification required for neurodegeneration in C. elegans. Curr Biol *15*, 1249-1254.

Syntichaki, P., and Tavernarakis, N. (2002). Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? EMBO Rep *3*, 604-609.

Syntichaki, P., and Tavernarakis, N. (2003). The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? Nat Rev Neurosci *4*, 672-684.

Syntichaki, P., Xu, K., Driscoll, M., and Tavernarakis, N. (2002). Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in C. elegans. Nature *419*, 939-944.

Takacs-Vellai, K., Vellai, T., Puoti, A., Passannante, M., Wicky, C., Streit, A., Kovacs, A. L., and Muller, F. (2005). Inactivation of the autophagy gene bec-1 triggers apoptotic cell death in C. elegans. Curr Biol *15*, 1513-1517.

Tarabal, O., Caldero, J., Casas, C., Oppenheim, R. W., and Esquerda, J. E. (2005). Protein retention in the endoplasmic reticulum, blockade of programmed cell death and autophagy selectively occur in spinal cord motoneurons after glutamate receptor-mediated injury. Mol Cell Neurosci *29*, 283-298.

Tavernarakis, N., and Driscoll, M. (2001). Degenerins. At the core of the metazoan mechanotransducer? Ann N Y Acad Sci *940*, 28-41.

Tavernarakis, N., Shreffler, W., Wang, S., and Driscoll, M. (1997). unc-8, a DEG/ENaC family member, encodes a subunit of a candidate mechanically gated channel that modulates C. elegans locomotion. Neuron *18*, 107-119.

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

Tettamanti, G., Malagoli, D., Marchesini, E., Congiu, T., de Eguileor, M., and Ottaviani, E. (2006). Oligomycin A induces autophagy in the IPLB-LdFB insect cell line. Cell Tissue Res *326*, 179-186.

Timmons, L. (2004). Endogenous inhibitors of RNA interference in Caenorhabditis elegans. Bioessays *26*, 715-718.

Timmons, L., Court, D. L., and Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans. Gene *263*, 103-112.

Timmons, L., and Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. Nature *395*, 854.

Tomoda, T., Bhatt, R. S., Kuroyanagi, H., Shirasawa, T., and Hatten, M. E. (1999). A mouse serine/threonine kinase homologous to C. elegans UNC51 functions in parallel fiber formation of cerebellar granule neurons. Neuron *24*, 833-846.

Tomoda, T., Kim, J. H., Zhan, C., and Hatten, M. E. (2004). Role of Unc51.1 and its binding partners in CNS axon outgrowth. Genes Dev *18*, 541-558.

Toth, M. L., Simon, P., Kovacs, A. L., and Vellai, T. (2007). Influence of autophagy genes on ion-channel-dependent neuronal degeneration in Caenorhabditis elegans. J Cell Sci *120*, 1134-1141.

Tracy, k., Dbling, B. C., Spike, B. T., Knabb, J. R., Schumacker, P., and Macleod K. F. (2007). BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-inducd autophagy. Mol Cell Biol *18*, [Epub ahead of print].

Treinin, M., and Chalfie, M. (1995). A mutated acetylcholine receptor subunit causes neuronal degeneration in C. elegans. Neuron *14*, 871-877.

Treusch, S., Knuth, S., Slaugenhaupt, S. A., Goldin, E., Grant, B. D., and Fares, H. (2004). Caenorhabditis elegans functional orthologue of human protein h-mucolipin-1 is required for lysosome biogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 4483-4488.

Tzur, Y. B., Margalit, A., Melamed-Book, N., and Gruenbaum, Y. (2006). Matefin/SUN-1 is a nuclear envelope receptor for CED-4 during Caenorhabditis elegans apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 13397-13402.

Urbanelli, L., Emiliani, C., Massini, C., Persichetti, E., Orlacchio, A., Pelicci, G., Sorbi, S., Hasilik, A., Bernardi, G., and Orlacchio, A. (2006). Cathepsin D expression is decreased in Alzheimer's disease fibroblasts. Neurobiol Aging.

van Haaften, G., Romeijn, R., Pothof, J., Koole, W., Mullenders, L. H., Pastink, A., Plasterk, R. H., and Tijsterman, M. (2006). Identification of conserved pathways of DNA-damage response and radiation protection by genome-wide RNAi. Curr Biol *16*, 1344-1350.

Vartiainen, S., Pehkonen, P., Lakso, M., Nass, R., and Wong, G. (2006). Identification of gene expression changes in transgenic C. elegans overexpressing human alpha-synuclein. Neurobiol Dis *22*, 477-486.

Velentzas, A. D., Nezis, I. P., Stravopodis, D. J., Papassideri, I. S., and Margaritis, L. H. (2007). Apoptosis and autophagy function cooperatively for the efficacious execution of programmed nurse cell death during Drosophila virilis oogenesis. Autophagy *3*, 130-132.

Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., Kovacs, A. L., Orosz, L., and Muller, F. (2003). Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in C. elegans. Nature *426*, 620.

Waldmann, R., Champigny, G., Voilley, N., Lauritzen, I., and Lazdunski, M. (1996). The mammalian degenerin MDEG, an amiloride-sensitive cation channel activated by mutations causing neurodegeneration in Caenorhabditis elegans. J Biol Chem *271*, 10433-10436.

Walhout, A. J., Sordella, R., Lu, X., Hartley, J. L., Temple, G. F., Brasch, M. A., Thierry-Mieg, N., and Vidal, M. (2000). Protein interaction mapping in C. elegans using proteins involved in vulval development. Science *287*, 116-122.

Wang, C. W., and Klionsky, D. J. (2003). The molecular mechanism of autophagy. Mol Med *9*, 65-76.

Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., and Xue, D. (2002). Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in Caenorhabditis elegans. Science *298*, 1587-1592.

Wang, H., Bedford, F. K., Brandod, N. J., Moss, S. J., and Olsen, R. W. (1999). GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. Nature *397*, 69-72.

Waterston, R., and Sulston, J. (1995). The genome of Caenorhabditis elegans. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 10836-10840.

Wei, L., Ying, D. J., Cui, L., Langsdorf, J., and Yu, S. P. (2004). Necrosis, apoptosis and hybrid death in the cortex and thalamus after barrel cortex ischemia in rats. Brain Res *1022*, 54-61.

Weidhaas, J. B., Eisenmann, D. M., Holub, J. M., and Nallur, S. V. (2006). A Caenorhabditis elegans tissue model of radiation-induced reproductive cell death. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 9946-9951.

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

Wicks, S. R., Yeh, R. T., Gish, W. R., Waterston, R. H., and Plasterk, R. H. (2001). Rapid gene mapping in Caenorhabditis elegans using a high density polymorphism map. Nat Genet *28*, 160-164.

Wightman, B., Clark, S. G., Taskar, A. M., Forrester, W. C., Maricq, A. V., Bargmann, C. I., and Garriga, G. (1996). The C. elegans gene vab-8 guides posteriorly directed axon outgrowth and cell migration. Development *122*, 671-682.

Wolf, F. W., Hung, M. S., Wightman, B., Way, J., and Garriga, G. (1998). vab-8 is a key regulator of posteriorly directed migrations in C. elegans and encodes a novel protein with kinesin motor similarity. Neuron *20*, 655-666.

Wu, Y. C., Stanfield, G. M., and Horvitz, H. R. (2000). NUC-1, a caenorhabditis elegans DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. Genes Dev *14*, 536-548.

Xiang, Z., Yuan, M., Hassen, G. W., Gampel, M., and Bergold, P. J. (2004). Lactate induced excitotoxicity in hippocampal slice cultures. Exp Neurol *186*, 70-77.

Xu, K., Tavernarakis, N., and 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.

Xu, W., Wong, T. P., Chery, N., Gaertner, T., Wang, Y. T., and Baudry, M. (2007). Calpain-mediated mGluR1alpha truncation: a key step in excitotoxicity. Neuron *53*, 399-412.

Xu, Y., Kim, S. O., Li, Y., and Han, J. (2006). Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. J Biol Chem *281*, 19179-19187.

Yaglom, J. A., Ekhterae, D., Gabai, V. L., and Sherman, M. Y. (2003). Regulation of necrosis of H9c2 myogenic cells upon transient energy deprivation. Rapid deenergization of mitochondria precedes necrosis and is controlled by reactive oxygen species, stress kinase JNK, HSP72 and ARC. J Biol Chem *278*, 50483-50496.

Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. Cell Struct Funct *23*, 33-42.

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.

Yamashima, T., Tonchev, A. B., Tsukada, T., Saido, T. C., Imajoh-Ohmi, S., Momoi, T., and Kominami, E. (2003). Sustained calpain activation associated with lysosomal rupture executes necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates. Hippocampus *13*, 791-800.

Yan, J., Kuroyanagi, H., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Tokumitsu, H., Tomoda, T., Shirasawa, T., and Muramatsu, M. (1998). Identification of mouse ULK1, a novel protein kinase structurally related to C. elegans UNC-51. Biochem Biophys Res Commun *246*, 222-227.

Yan, L., Sadoshima, J., Vatner, D. E., and Vatner, S. F. (2006). Autophagy: a novel protective mechanism in chronic ischemia. Cell Cycle *5*, 1175-1177.

Yanagisawa, H., Miyashita, T., Nakano, Y., and Yamamoto, D. (2003). HSpin1, a transmembrane protein interacting with Bcl-2/Bcl-xL, induces a caspase-independent autophagic cell death. Cell Death Differ *10*, 798-807.

Yermolaieva, O., Leonard, A. S., Schnizler, M. K., Abboud, F. M., and Welsh, M. J. (2004). Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 6752-6757.

Yoshida, M., Yamashima, T., Zhao, L., Tsuchiya, K., Kohda, Y., Tonchev, A. B., Matsuda, M., and Kominami, E. (2002). Primate neurons show different vulnerability to transient ischemia and response to cathepsin inhibition. Acta Neuropathol (Berl) *104*, 267-272.

Yoshimori, T. (2004). Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. Biochem Biophys Res Commun *313*, 453-458.

Yoshimori, T. (2007). Autophagy: paying Charon's toll. Cell *128*, 833-836.

Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., and Simon, H. U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. Nat Cell Biol *8*, 1124-1132.

Yu, G., Zucchi, R., Ronca-Testoni, S., and Ronca, G. (2000). Protection of ischemic rat heart by dantrolene, an antagonist of the sarcoplasmic reticulum calcium release channel. Basic Res Cardiol *95*, 137-143.

Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E. H., and Lenardo, M. J. (2004). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. Science *304*, 1500-1502.

Yu, W. H., Cuervo, A. M., Kumar, A., Peterhoff, C. M., Schmidt, S. D., Lee, J. H., Mohan, P. S., Mercken, M., Farmery, M. R., Tjernberg, L. O.*, et al.* (2005). Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. J Cell Biol *171*, 87-98.

Yu, X., Odera, S., Chuang, C. H., Lu, N., and Zhou, Z. (2006). C. elegans Dynamin mediates the signaling of phagocytic receptor CED-1 for the engulfment and degradation of apoptotic cells. Dev Cell *10*, 743-757.

Yuan, J. (2006). Divergence from a dedicated cellular suicide mechanism: exploring the evolution of cell death. Mol Cell *23*, 1-12.

Yue, Z. (2007). Regulation of neuronal autophagy in axon: implication of autophagy in axonal function and dysfunction/degeneration. Autophagy *3*, 139-141.

Yue, Z., Horton, A., Bravin, M., DeJager, P. L., Selimi, F., and Heintz, N. (2002). A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. Neuron *35*, 921-933.

Zhao, H. F., Wang, X., and Zhang, G. J. (2005). Lysosome destabilization by cytosolic extracts, putative involvement of Ca(2+)/phospholipase C. FEBS Lett *579*, 1551-1556.

Zheng, L., Roberg, K., Jerhammar, F., Marcusson, J., and Terman, A. (2006). Oxidative stress induces intralysosomal accumulation of Alzheimer amyloid beta-protein in cultured neuroblastoma cells. Ann N Y Acad Sci *1067*, 248-251.

Zheng, M., Reynolds, C., Jo, S. H., Wersto, R., Han, Q., and Xiao, R. P. (2005). Intracellular acidosis-activated p38 MAPK signaling and its essential role in cardiomyocyte hypoxic injury. Faseb J *19*, 109-111.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- **Samara, C.**, and Tavernarakis, N. (2003). Calcium-dependent and aspartyl proteases in neurodegeneration and ageing in C. elegans. Ageing Res Rev *2*, 451-471.
- Syntichaki, P., **Samara, C.**, and Tavernarakis, N. (2005). The vacuolar H+ -ATPase mediates intracellular acidification required for neurodegeneration in C. elegans. Curr Biol *15*, 1249-1254.
- Tavernarakis N. Syntichaki P., **Samara C.** and Voglis G. (2004) Of Men and Worms II: The role of C. elegans in modern biomedical research. The Greek quarterly BIO, 9: 42-49.
- Tavernarakis N. Syntichaki P., **Samara C.** and Voglis G. (2004) Of Men and Worms I: The biology of the nematode C. elegans. The Greek quarterly BIO, 8: 30-34.
- Tavernarakis N., Syntichaki P., **Samara C.** and Troulinaki K. (2005) Biochemical pathways mediating necrotic cell death and neurodegeneration in Caenorhabditis elegans. The FEBS Journal, 272 S1: 178.
- Artal-Sanz, M., **Samara, C.**, Syntichaki, P., and Tavernarakis, N. (2006). Lysosomal biogenesis and function is critical for necrotic cell death in Caenorhabditis elegans. J Cell Biol *173*, 231-239.
- **Samara, C.**, and Tavernarakis, N. (2007). Autophagy and cell death in *Caenorhabditis elegans*. Current Pharmaceutical Design (*in press*).
- **Samara, C.**, Syntichaki, P., and Tavernarakis, N. Autophagy is required for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. Cell Death and Differentiation (*in press*).