



FORTH
Institute of Molecular Biology
and Biotechnology



Μεταπτυχιακή Εργασία

“Δημιουργία εργαλείων για την *in vivo* παρατήρηση
μιτοχονδρίων στο νευρικό σύστημα των
νηματωδών- ρόλος της MAGE-1 στη γήρανση του *C.*
elegans”

Χαρπίλας Νικόλαος

Υπεύθυνος Καθηγητής: κ^{ος} Νεκτάριος Ταβερναράκης

Ηράκλειο, Οκτώβριος 2013

Ευχαριστώ...

Πριν ξεκινήσω την παρουσίαση των πειραμάτων και των αποτελεσμάτων του περασμένου χρόνου, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω μερικούς ανθρώπους!

Θα ξεκινήσω με τον κύριο Νεκτάριο Ταβερναράκη, ο οποίος από την πρώτη φορά που συναντηθήκαμε αντιμετώπισε θετικά το ενδεχόμενο να με δεχτεί στο εργαστήριο του, ήταν πάντα πρόθυμος να συζητήσει μαζί μου παρά το βαρύ πρόγραμμα του και αποτελεί για μένα αυτό που και ο ίδιος έχει ομολογήσει πως θα ήθελε για τον εαυτό του (“Leader by example”). Ελπίζω να φανώ άξιος της εμπιστοσύνης του και στο μέλλον. Επίσης την κυρία Αλεξανδράκη και τον κύριο Μαυροθαλασσίτη που ήταν μέλη της τριμελούς επιτροπής του μάστερ μου.

Στη συνέχεια, τη Βασιλική που επέβλεπε τα πειράματά μου ολόκληρο αυτό το χρόνο, με εισήγαγε στο project και ήταν πάντα εκεί για να συζητήσουμε για όποιο πρόβλημα αντιμετώπισα. Άκουγε πάντα τις ανησυχίες μου, δεν με έκανε ποτέ να νιώσω πιεσμένος και μου συμπαραστάθηκε στις δύσκολες στιγμές. Επίσης την κυρία Μαίρη που μου στάθηκε πάρα πολύ το δίμηνο που η Βασιλική απουσίαζε και έμαθα πολλά από τις συμβουλές της. Μετά, την Αγγέλα γιατί όλοι στο εργαστήριο νιώθουμε πιο άνετα εξαιτίας του ότι βρίσκεται δίπλα μας σε ό,τι χρειαστούμε, αλλά και για τις εικόνες που πήραμε μαζί στο confocal.

Ακόμα, τα υπόλοιπα παιδιά του Tavernarakis lab. Να ξεκινήσω με τον Κώστα που τον θεωρώ το «έτερον ήμισυ» εντός εργαστηρίου. Τον ευχαριστώ για τη βοήθεια του καθ’ όλο τον χρόνο στα πειράματα αλλά περισσότερο για την θετική διάθεση που πάντα μου μετέδιδε. Την Ιωάννα, με την οποία είμαι συνοδοιπόρος από τον καιρό της πτυχιακής μου εργασίας και μου έχει σταθεί σε αρκετές στιγμές. Τον Μάνο, την Ειρήνη, τον Ηλία, τον Matthias, την Andrea, τη Χριστίνα, τη Διονυσία που με έκαναν να θέλω να βρίσκομαι στο εργαστήριο και έκαναν ευχάριστες τις ώρες μου εκεί.

Τη Γεωργία για αρκετούς λόγους που η ίδια γνωρίζει...

Τη μητέρα μου Αγγελική γιατί πάντα νιώθω τη συμπαράσταση της έστω κι από μακριά και τον αδερφό μου Αντρέα που αγαπώ πολύ.

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκαν εργαλεία για την *in vivo* παρατήρηση των μιτοχονδρίων των νευρικών κυττάρων του νηματώδους *C. elegans*. Επίσης, εξετάστηκε η πιθανή εμπλοκή της πρωτεΐνης MAGE-1, του κοντινότερου ομολόγου της MAGE πρωτεϊνικής οικογένειας, στη διαδικασία της γήρανσης των νηματωδών. Υπερέκφραση της MAGE-1 υπό τον ενδογενή της ή ένα νευρο-ειδικό υποκινητή μειώνει το μέσο χρόνο ζωής των σκουληκιών και τα αυξάνει την ευαισθησία τους σε θερμικό και UV στρες. Αντίθετα, αποσιώπηση της έκφρασης της MAGE-1 δεν επιδρά στη γήρανση, αλλά αυξάνει την ενεργότητα των μεταγραφικών παραγόντων DAF-16, SKN-1 αλλά και της αυτοφαγίας. Νευρο-ειδική αποσιώπηση της MAGE-1 φαίνεται να συνοδεύεται από μορφολογικές ανωμαλίες στους νευράξονες, προτείνοντας ένα ιστοειδικό ρόλο της πρωτεΐνης αυτής στη φυσιολογία του οργανισμού.

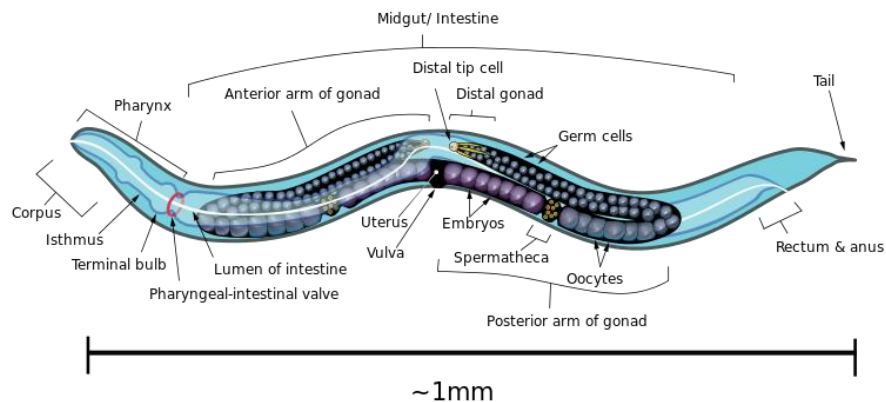
Summary

In the current study, we have developed tools for monitoring mitochondria specifically in the neuronal system of the nematode *C. elegans in vivo*. Furthermore, we examined the possible involvement of protein MAGE-1, the closest homologue of MAGE protein family, in the process of ageing of worms. Overexpression of MAGE-1 under its own promoter or under a neuron-specific one reduces the median lifespan of worms and increases their sensitivity in heat and UV stress. In contrast, knock-down of MAGE-1 expression has no effect in ageing, but increases the activity of transcription factors DAF-16, SKN-1 and autophagy. Neuron-specific genetic inhibition of MAGE-1 leads to morphological abnormalities in neuronal axons, highlighting a tissue-specific role of the protein in maintaining organism's physiology.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο *C. elegans* ως πειραματικό μοντέλο

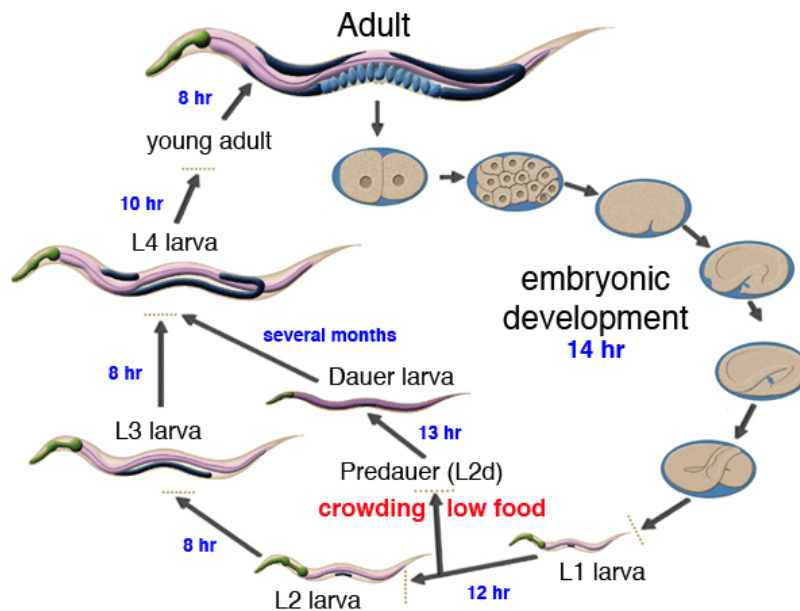
Ο *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) είναι ένας μικρός σε μέγεθος (φτάνει περίπου το 1mm σε μήκος), μη μεταμεριδιωμένος νηματώδης σκώληκας με αμφίπλευρη συμμετρία, που υπό φυσιολογικές συνθήκες ζει στο έδαφος. Λόγω του σχετικά εύκολου χειρισμού του στο εργαστήριο αλλά και της απλής ανατομίας του (**εικόνα A**), την τελευταία τριακονταετία έχει εξελιχτεί ως σημαντικό πειραματικό μοντέλο στη βιολογική έρευνα [Brenner, 1974]. Το σώμα του ενήλικου ατόμου αποτελείται από 959 συνολικά κύτταρα, ενώ 131 κύτταρα υπόκεινται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και αποπίπτουν κατά την ανάπτυξη του οργανισμού [Ellis et al, 1986]. Περίπου το ένα τρίτο των συνολικών κυττάρων του σκουληκιού είναι νευρώνες (302 κύτταρα).



Εικόνα A: Η βασική ανατομία του *C. elegans* περιλαμβάνει το στόμα, τον φάρυγγα, το έντερο, μύες και την επιδερμίδα που αποτελείται από κολλαγόνο. Το αναπαραγωγικό σύστημα περιλαμβάνει ένα ζεύγος ωοθηκών και σπερματοθηκών.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του οργανισμού αυτού είναι ο αρκετά μικρός κύκλος ζωής του (life cycle) (**εικόνα B**) και ο χαμηλός μέσος όρος ζωής του (median lifespan). Η ανάπτυξη ξεκινά εντός του σώματος του ερμαφρόδιτου γονέα, που περιέχει τόσο ωοθήκες (παραγωγή ωοκυττάρων) όσο και σπερματοθήκες (παραγωγή

σπέρματος). Αφότου γονιμοποιηθεί, το ωάριο απελευθερώνεται στο περιβάλλον από τη νυλνα. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη είναι αρκετά γρήγορη (διαρκεί περίπου 14h) και ολοκληρώνεται με το σκάσιμο (hatching) των αυγών. Ακολουθούν τέσσερα προνυμφικά στάδια (larval stages) πρώτου τα άτομα φτάσουν στην ενηλικίωση (adulthood). Κάθε ενήλικο άτομο μπορεί να αποθέσει έως και τριακόσια αυγά και η επιβιώνει κατά μέσο όρο έως και είκοσι μέρες. Μετά τις πρώτες πέντε μέρες ενήλικης ζωής αρχίζουν να εμφανίζονται και τα πρώτα σημάδια γήρανσης, όπου η κίνηση (locomotion) των ατόμων όπως και η πρόσληψη τροφής (food rumping) περιορίζονται, ενώ σταδιακά εμφανίζονται και σημάδια εκφυλισμού (degeneration) για παράδειγμα στους μύες [Collins et al, 2008]. Όταν αναπτυχθούν υπό αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, τα σκουλήκια μπορούν να μεταπέσουν σε μια φάση ληθάργου (την ονομαζόμενη φάση dauer), όπου μπορούν να επιβιώσουν για παραπάνω από πέντε μήνες. Η κατάσταση αυτή είναι αντιστρέψιμη, καθώς η εκ νέου επικράτηση ευνοϊκών συνθηκών επιτρέπει στα ζώα να επανέρθουν στο φυσιολογικό κύκλο ζωής τους και να εξέλθουν από τη φάση dauer.



Εικόνα Β: Ο κύκλος ζωής του νηματώδους *C. elegans* διαρκεί περίπου τρεις ημέρες. Τέσσερα προνυμφικά στάδια (L1, L2, L3, L4) προηγούνται της ενηλικίωσης.

Επιπρόσθετα, τα σκουλήκια είναι διαφανή, γεγονός που διευκολύνει αρκετά τις τεχνικές μικροσκοπίας για την παρατήρηση κυτταρικών διεργασιών, μέσω της χρήσης για παράδειγμα φθορίζουσών πρωτεϊνών και μικροσκοπίας φθορισμού (fluorescent microscopy) ή και απλής μικροσκοπίας ορατού φωτός (light microscopy). Παράλληλα, ο εκτενής και λεπτομερειακός χαρακτηρισμός του νευρικού του συστήματος, καθιστά τον *C. elegans* ιδανικό μοντέλο οργανισμό για νευροεκφυλισμό. Η διατήρηση μεγάλου αριθμού ατόμων είναι εφικτή στο εργαστήριο. Οι νηματώδεις τοποθετούνται πάνω σε βακτηριακή χλόη ενός συγκεκριμένου στελέχους *Escherichia coli* (OP50) και αναπτύσσονται κατά το βέλτιστο τρόπο σε θερμοκρασία 20°C. Παραταύτα, μπορούν να διατηρηθούν και σε χαμηλότερη θερμοκρασία (15°C), όπου η ανάπτυξη επιβραδύνεται περίπου κατά το ήμισυ.

Το γονιδίωμα του *C. elegans* έχει αλληλουχηθεί πλήρως [**The C. elegans Sequencing Consortium, 1998**]. Αποτελείται από πέντε ζεύγη αυτοσωμικών χρωμοσώματων (I-V) και ένα ζεύγος φυλετικού χρωμοσώματος X. Σπάνια (0,1% των απογόνων) και εξαιτίας τυχαίων σφαλμάτων στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την κυτταρική διαίρεση, μπορούν να προκύψουν αρσενικά άτομα (γονότυπος XO). Στο εργαστήριο, η στοχευμένη παραγωγή αρσενικών ατόμων μας βοηθά στην κατά βούληση παραγωγή διπλών ή τριπλών μεταλλαγμάτων. Από την ανάλυση του γονιδιώματος του *C. elegans*, έχουν προβλεφθεί περίπου 20000 ORFs [**Blumenthal et al, 2002**], ενώ παράλληλα εκτεταμένα δίκτυα γενετικών αλληλεπιδράσεων έχουν κατασκευαστεί [**Lee et al, 2008**].

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αποτελεσματικότητα της γενετικής αποσιώπησης (genetic inhibition) των επιθυμητών γονιδίων-στόχων στον *C. elegans* [**Mello and Conte, 2004**]. Γι αυτή αρκεί η θρέψη των σκουληκιών με ένα ειδικό στέλεχος βακτηρίων (HT115) που περιέχει ένα πλασμίδιο ικανό να παράγει δίκλινα RNA μόρια για το γονίδιο επιλογής μας. Αναλύσεις ευρείας κλίμακας τέτοιου τύπου, έχουν προβλέψει μεγάλο αριθμό γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της γήρανσης [**Hertweck et al, 2003**]. Η γενετική αποσιώπηση στο νευρικό σύστημα είναι λιγότερο

αποτελεσματική, ωστόσο έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι, όπως για παράδειγμα η υπερέκφραση του καναλιού SID-1 [Winston et al, 2002], που επιτρέπει την είσοδο των dsRNA μορίων στα νευρικά κύτταρα. Τέλος, διαγονιδιακά ζώα μπορούν να αποκτηθούν είτε μέσω μικροένεσης (microinjection) στις γονάδες ενήλικων σκουληκιών της επιθυμητής κατασκευής σε συνδυασμό με ένα πλασμίδιο-μάρτυρα (π.χ pRF4) είτε μέσω βαλιστικής-βομβαρδισμού (bombardment) [Rieckher et al, 2009].

Η πρωτεΐνη Necdin

Η Necdin είναι μέλος της πρωτεϊνικής οικογένειας MAGE (Melanoma Antigen Gene). Αρχικά, εντοπίστηκε σε πυρήνες τελικά διαφοροποιημένων νευρικών κυττάρων, τα οποία έχουν εξέλθει μόνιμα από τον κυτταρικό κύκλο [Hayashi et al, 1995]. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την Necdin είναι εντυπωμένο (imprinted) τόσο στον ποντικό όσο και στον άνθρωπο, καθώς μόνο το πατρικό αλληλίο μεταγράφεται. Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η πιθανή εμπλοκή της NDN στην πρόκληση του συνδρόμου Prader-Willi [MacDonald and Wevrick, 1997 και Jay et al, 1997], μιας ιδιαίτερα σοβαρής νευρολογικής διαταραχής καθώς και σε περιπτώσεις αυτισμού. Και στις δύο περιπτώσεις, αλλαγές σε μια γενωμική περιοχή που εδράζεται στο χρωμόσωμα 15 του ανθρώπου (15q11-q13) φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση των συμπτωμάτων [Takumi, 2011].

Η Necdin πιστεύεται ότι μπορεί να έχει ογκοκατασταλτική δράση, ανάλογη με την Rb (Retinoblastoma), καθώς μεταξύ άλλων έχει αναφερθεί πως αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό E2F1 που είναι σημαντικός για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου [Taniura et al, 1998]. Επιπρόσθετα, η Necdin πιστεύεται πως αλληλεπιδρά και με τον p53, ένα παράγοντα που εμπλέκεται στην καταστολή της κυτταρικής αύξησης και πολλαπλασιασμού μετά από στρες [Taniura et al, 1999]. Διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης ευθύνονται για τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, την πυρηνική στόχευση, αλλά και την καταστολή της κυτταρικής αύξησης [Taniura et al, 2005]. Μοντέλα knock-

out ποντικών έχουν παραχθεί για το γονίδιο της Ndn, και εμφανίζουν ποικιλία φαινοτύπων που κυμαίνονται από θνησιμότητα μετά τη γέννηση [Gerard et al, 1999] έως και διαταραχή της λειτουργίας νευρώνων του υποθαλάμου, καθώς και γνωστικές και συμπεριφορικές διαταραχές που θυμίζουν φαινότυπους που συνδέονται με το σύνδρομο Prader-Willi [Muscatelli et al, 2000]. Ο θνησιγόνος φαινότυπος έχει προταθεί πως οφείλεται στην απορύθμιση της λειτουργίας ενός υποπληθισμού νευρώνων του κέντρου ρύθμισης του αναπνευστικού ρυθμού, του λεγόμενου συμπλέγματος pre-Bötzinger [Ren et al, 2003].

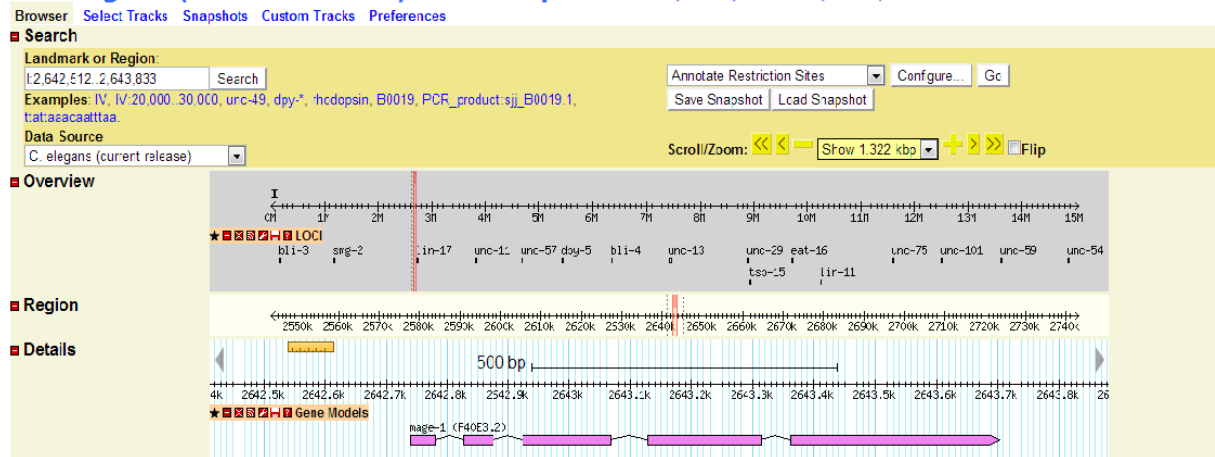
Εκτοπική υπερέκφραση της Necdin σε κύτταρα νευροβλαστώματος τα οδηγεί προς διαφοροποίηση και τα προστατεύει από την απόπτωση που προκαλείται μετά από υπερέκφραση του παράγοντα E2F1 [Kobayashi et al, 2002]. Μια άλλη ενδιαφέρουσα αλληλεπίδραση είναι αυτή της Necdin με τον p75 που είναι ένας υποδοχέας για τον νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF) της νευροτροφίνης (neurotrophin) [Bronfman et al, 2003]. Η αλληλεπίδραση της Necdin και της MAGE-G1 (ενός άλλου μέλους της MAGE πρωτεϊνικής οικογένειας) τόσο με τον E2F1 όσο και p75 φαίνεται να εμπλέκονται στην επιβίωση των νευρικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου [Kuwako et al, 2004]. Κινητήριοι νευρώνες στους οποίους η Necdin δεν εκφράζεται, εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία απουσία νευροτροφικών παραγόντων [Aebischer et al, 2011]. Εκτός αυτού, η Necdin έχει βρεθεί να ρυθμίζει και ενδοκυτταρικές διεργασίες που απαιτούνται για την έκφυση των νευριτών και για την επιμήκυνση των νευρικών αξόνων [Lee et al, 2005].

Πέρα απ' το σημαντικό ρόλο των MAGE πρωτεϊνών στο νευρικό σύστημα, πρόσφατες μελέτες τους αποδίδουν σημαντικό ρόλο και σε άλλους ιστούς. Οι Fujiwara et al, 2012 αναφέρουν ότι η Necdin λειτουργεί ως ενδογενής ρυθμιστής της διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων (preadipocytes) στους αναπτυσσόμενους λιπώδεις ιστούς. Knock-out ποντίκια για τη Necdin εμφανίζουν υπεραύξηση των λιπώδων ιστών τους λόγω υπερπλασίας των λιποκυττάρων τους, άρα η Necdin φαίνεται να ευθύνεται για τη διατήρηση του σωστού αριθμού λιποκυττάρων κατά την

ανάπτυξη. Επιπρόσθετα, η *Necdin* έχει σημαντικό ρόλο και κατά τη μυογένεση, καθώς ενισχύει την επιβίωση των μυοβλαστών μέσω της αποικοδόμησης του ρυθμιστή της απόπτωσης CCAR1/CARP1 [Francois et al, 2012].

Ομόλογα της *Necdin* έχουν βρεθεί σε αρκετούς οργανισμούς-μοντέλα, μεταξύ των οποίων το zebrafish *Danio rerio* [Bischof et al, 2003], η *Drosophila* [Nishimura et al, 2007] και το κοτόπουλο [Lopez-Sanchez, 2007]. Ο *C. elegans*, φαίνεται να έχει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη της οικογένειας *MAGE* (εικόνα Γ).

■ *C. elegans* (current release): 1.321 kbp from 1:2,642,512..2,643,833



Εικόνα Γ: Το μοναδικό ομόλογο της οικογένειας *MAGE* των θηλαστικών στον *C. elegans* ονομάζεται *mage-1* και εδράζεται στο πρώτο χρωμόσωμα (εικόνα από τη Wormbase).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1) Παρασκευή πιάτων NGM (Nematode Growth Medium) και RNAi

- Γεμίζουμε μια φλάσκα δύο λίτρων με ddH₂O
- Κρατούμε επίσης και μια ποσότητα 500mL σε ένα άλλο μπουκάλι
- Για δύο λίτρα θρεπτικό χρειαζόμαστε τα ακόλουθα συστατικά:

NaCl 6gr

Bactopeptone 5gr

Agar 34gr

Streptomycin 0.4gr (μόνο στην περίπτωση των NGM πιάτων)

- Βάζουμε όλες τις σκόνες στην δίλιτρη φλάσκα και αναδεύουμε με μαγνήτη
- Αποστειρώνουμε τόσο τη φλάσκα όσο και το μπουκάλι με το νερό σε χύτρα υψηλής πίεσης
- Μετά το πέρας της αποστείρωσης προσθέτουμε τα ακόλουθα:

2mL 1M CaCl₂

2mL 1M MgSO₄

2mL cholesterol

2mL nystatin

50mL KPO₄

1mL ampicillin (100mg/mL) (μόνο στην περίπτωση των RNAi πιάτων)

- Στρώνουμε τα πιατάκια με τη βοήθεια ειδικής αντλίας

M9 buffer

3gr KH₂PO₄

6gr Na₂HPO₄

5gr NaCl

1mL 1M MgSO₄ (μετά από την αποστείρωση)

x mL H₂O (μέχρι το 1L)

2) Πειράματα αποσιώπησης (RNAi) των επιθυμητών γονιδίων

Η αποσιώπηση των υπό μελέτη γονιδίων είναι μια εύκολη διαδικασία στον νηματώδη *C. elegans*. Αρκεί η θρέψη των σκουληκιών με ένα ειδικό βακτηριακό στέλεχος (HT115), το οποίο έχει το ιδανικό περιβάλλον για την παραγωγή dsRNA μορίων έπειτα από μετασχηματισμό με το πλασμίδιο pL4440 που περιέχει εκατέρωθεν υποκινητές T7 και έτσι μπορεί να μεταγράψει το επιθυμητό ένθεμα και προς τις δύο κατευθύνσεις. Η παραγωγή των δίκλωνων αυτών μορίων ενεργοποιεί τον ενδογενή μηχανισμό σίγησης (μέσω της δράσης του ενζύμου Dicer).

Από πιατάκια στα οποία έχει γίνει streaking από stab βακτηρίων που εκφράζουν ένα πλασμίδιο ικανό να παράγει dsRNAs για το γονίδιο της επιλογής μας, επιλέγουμε μια αποικία και βάζουμε O/N καλλιέργεια των 4-5mL (προσθήκη Amp, Tet) στους 37°C.

O/N καλλιέργεια

4mL LB

4μL ampicillin (stock 100mg/mL)

8μL tetracycline (stock 5mg/mL)

Την επόμενη μέρα, βάζουμε O/D καλλιέργειες, με σκοπό να μειώσουμε την συγκέντρωση της τετρακυκλίνης που είναι τοξική για τα σκουλήκια.

O/D καλλιέργεια

5mL LB

5μL ampicillin (stock 100mg/mL)

50μL από την O/N καλλιέργεια/1mL LB O/D

Αφήνουμε τα βακτήρια να αναπτυχθούν για 2-3 ώρες (μέχρι να φτάσουν σε OD=1). Στη συνέχεια, φτιάχνουμε ένα μείγμα O/D καλλιέργειας και IPTG (για την επαγωγή της μεταγραφής του ενθέματός μας). Σε 900μL O/D καλλιέργειας προσθέτουμε 100μL IPTG (stock 20mM), ώστε να φτάσουμε σε τελική συγκέντρωση IPTG 2mM. Στη συνέχεια, στρώνουμε ~200μL από το μείγμα βακτηρίων και IPTG σε

πιατάκια RNAi (που περιέχουν Amp), τα αφήνουμε να αναπτυχθούν καθόλη την υπόλοιπη νύχτα και την επόμενη μέρα τοποθετούμε πάνω τους τα σκουλήκια μας για να δούμε την επίδραση της αποσιώπησης του γονιδίου μας σε αυτά.

3) Bleaching

Την επεξεργασία αυτή την πραγματοποιούμε όταν θέλουμε να απομονώσουμε μεγάλο αριθμό αυγών από τα σώματα ενήλικων σκουληκιών. Ουσιαστικά βασίζεται στο κάψιμο των σωμάτων των ζώων, ενώ τα αυγά παραμένουν ανθεκτικά.

- Προσθέτουμε στο πιατάκι που έχει τα σκουλήκια μας M9 και συλλέγουμε με την πιπέτα όσο περισσότερα άτομα μπορούμε και τα τοποθετούμε σε erpendorf 1,5mL.
- Φυγοκέντρηση για 1min στις 2000rpm.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε νέο M9 (~1mL).
- Επαναλαμβάνουμε το ξέπλυμα δύο φορές ακόμα.
- Απομακρύνουμε το περισσότερο υπερκείμενο (αφήνοντας περίπου 250μL M9) και προσθέτουμε διάλυμα λύσης (bleaching buffer) σε αναλογία 1:2.5 (περίπου 650μL). Bleaching buffer: **1mL NaOH 5N, 2mL NaOCl 5% και 7mL ddH₂O**.
- Παρακολουθούμε στο στερεοσκόπιο μέχρι τα σώματα των σκουληκιών να λιώσουν (περίπου 10-15 λεπτά) και να απελευθερωθούν τα αυγά.
- Φυγοκέντρηση στις 10000rpm για 1min.
- Ξέπλυμα των αυγών δύο ακόμα φορές με 1mL διάλυμα M9.
- Προσθέτουμε στα πιάτα μας τον επιθυμητό αριθμό αυγών και ξεκινάμε το πείραμα.

Να σημειωθεί ότι το bleaching αποτελεί ένα συνηθισμένο τρόπο συγχρονισμού ατόμων, παραδείγματος χάριν πριν την αρχή ενός πειράματος γήρανσης.

4) Απομόνωση RNA (RNA isolation) από τον *C. elegans*

- Συλλέγουμε 10-50 σκουλήκια του επιθυμητού σταδίου σε erpendorf.
- Πελετάρουμε τα σκουλήκια φυγοκεντρώντας στις 14000rpm.
- Προσθήκη 250μL Trizol.
- Vortex με το χέρι για 30sec και μετά έντονο vortex για περίπου 4 λεπτά.
- Τοποθετούμε το erpendorf στους -80°C για 10 λεπτά και μετά στους 65°C για 5 λεπτά.
- Προσθήκη 50μL χλωροφορμίου.
- Vortex για 15 δεύτερα και αφήνουμε το erpendorf σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
- Μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης σε καινούριο erpendorf.
- Δεύτερη κατά σειρά προσθήκη χλωροφορμίου, φυγοκέντρηση και συλλογή της πάνω φάσης.
- Προσθήκη 125μL 2-προπανόλης και ανακίνηση.
- Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 3 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C για να κατακρημνιστεί το RNA.
- Πλύση με 1mL 70% αιθανόλη (διαλυμένη σε RNase-free νερό).
- Φυγοκέντρηση στην μέγιστη ταχύτητα για 15 λεπτά στους 4°C.
- Απομάκρυνση της μεγαλύτερης ποσότητας του υπερκειμένου και στέγνωμα της πελέτας.
- Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 20μL RNase-free H₂O.
- Ποσοτικοποίηση και μέτρηση του λόγου $OD_{260}/OD_{280} \sim 2.0$ που είναι ενδεικτικός της καθαρότητας του RNA μας.

Για τη σύνθεση cDNA από το RNA που συλλέξαμε, χρησιμοποιούμε περίπου 900ng RNA και το Kit Iscript (Biorad), ενώ για την αντίδραση της real-time Eva Green Supermix (Biorad).

5) Καθαρισμός πλασμιδίων για ενέσεις (injections)

- Μεγαλώνουμε καλλιέργεια των 5mL από θετικό κλώνο για το πλασμίδιο μας.
- Επαναδιαλυτοποιούμε την πελέτα σε 300μL P1 (+RNase) buffer.
- Λύουμε τα βακτήρια προσθέτοντας 300μL P2 buffer και επωάζουμε σε RT για περίπου 5 λεπτά.
- Προσθέτουμε 300μL διάλυμα εξουδετέρωσης P3, ανακινούμε καλά και αφήνουμε στον πάγκο για 5 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 10 λεπτά. Απομονώνουμε προσεχτικά το υπερκείμενο που περιέχει το πλασμιδιακό DNA.
- Στο μεταξύ έχουμε εξισορροπήσει την κολώνα QIAGEN-tip20 προσθέτοντας 1mL διαλύματος QBT και αφήνοντας την κολώνα να αδειάσει με την επίδραση της βαρύτητας.
- Αφήνουμε το υπερκείμενο που συλλέξαμε να περάσει από την ρητίνη με την επίδραση της βαρύτητας.
- Δύο διαδοχικές πλύσεις με 2mL διαλύματος QC.
- Έκλυση του DNA μετά από προσθήκη 800μL διαλύματος QF και συλλογή του σε erpendorf.
- Κατακρήμνιση με προσθήκη 0.7V (~800μL) ισοπροπανόλης. Φυγοκεντρούμε το μέγιστο για 30 λεπτά.
- Πλύση με 70% αιθανόλη και φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 10 λεπτά.
- Στέγνωμα της πελέτας και επαναδιαλυτοποίηση στον κατάλληλο όγκο ddH₂O.

6) Παραγωγή αρσενικών ατόμων για διασταυρώσεις

- Ετοιμάζουμε 4-5 πιατάκια με 8-10 σκουλήκια σταδίου L4.
- Θερμικό σοκ για 4-6 ώρες στους 32°C.
- Ανάκαμψη των ατόμων στους 20°C και παρατήρηση της γενιάς F1.
- Συλλογή περίσσειας αρσενικών ατόμων και διασταύρωση με λίγα ερμαφρόδιτα (αναλογία 3:1 ή και περισσότερο)

7) Θερμικό στρες (Heat stress)

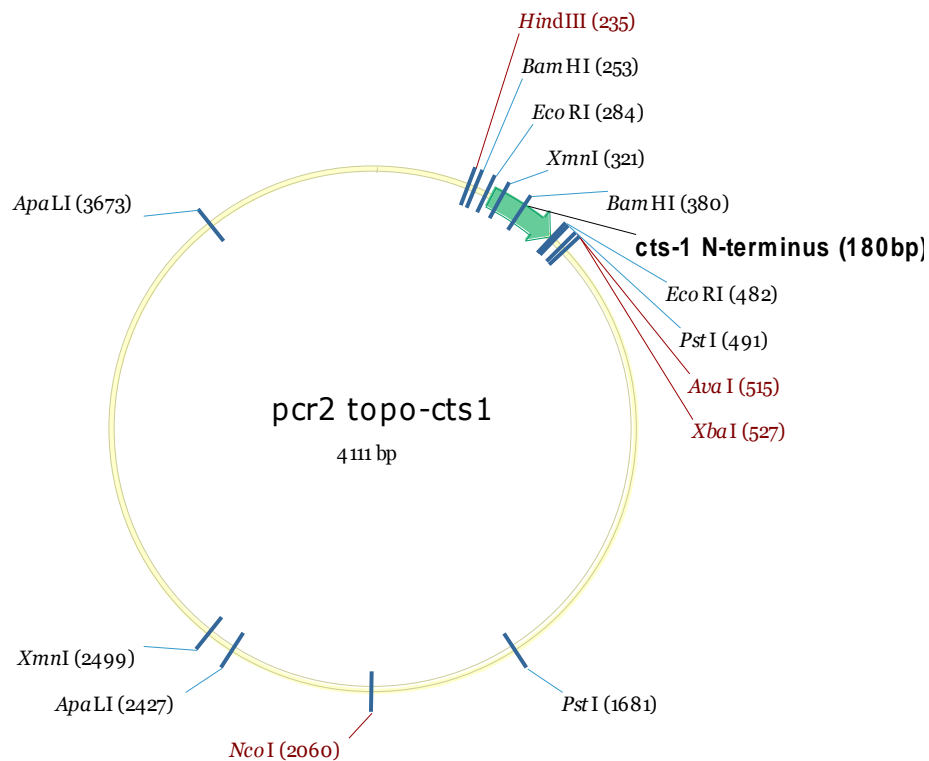
Τα πιατάκια με τα σκουλήκια τοποθετήθηκαν στους 37°C και ο αριθμός των ατόμων που παρέμεναν ζωντανά μετρήθηκε ανά μια ώρα.

8) UV στρες (UV stress)

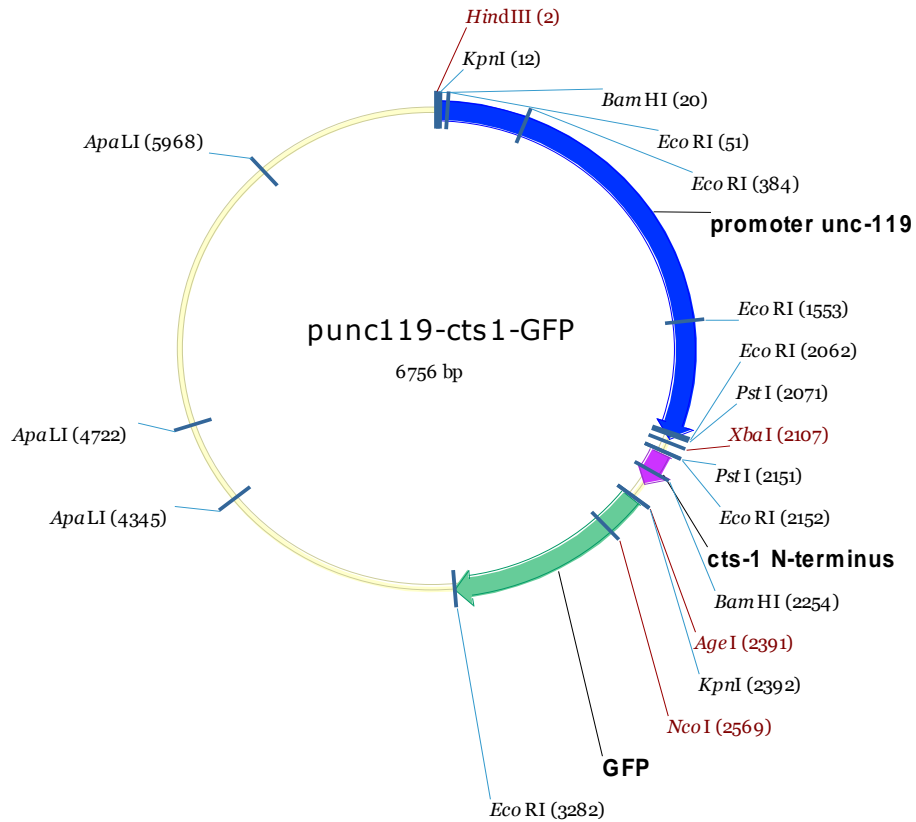
Τα πιατάκια με τα σκουλήκια ακτινοβολήθηκαν με UV για 1 λεπτό και ο αριθμός των ατόμων που παρέμεναν ζωντανά μετρήθηκαν ανά μια μέρα.

9) Χρώση με TMRE (Tetramethylrhodamine, ethyl ester)

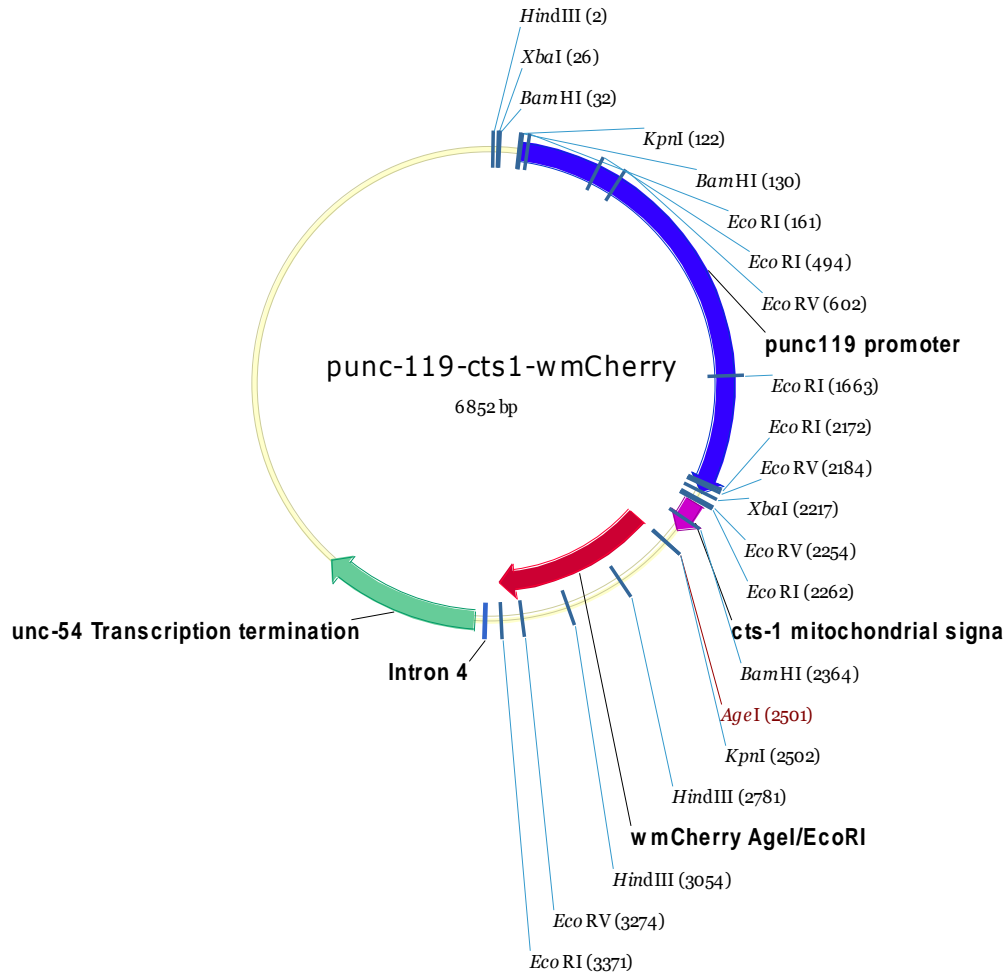
Το TMRE σε τελική συγκέντρωση 10μM επιστρώθηκε σε πιατάκια NGM ή RNAi. Στη συνέχεια, μεταφέρουμε σκουλήκια στα πιατάκια αυτά και τα αφήνουμε O/N υπό προστασία από το φως γιατί το TMRE είναι φωτοευαίσθητο.



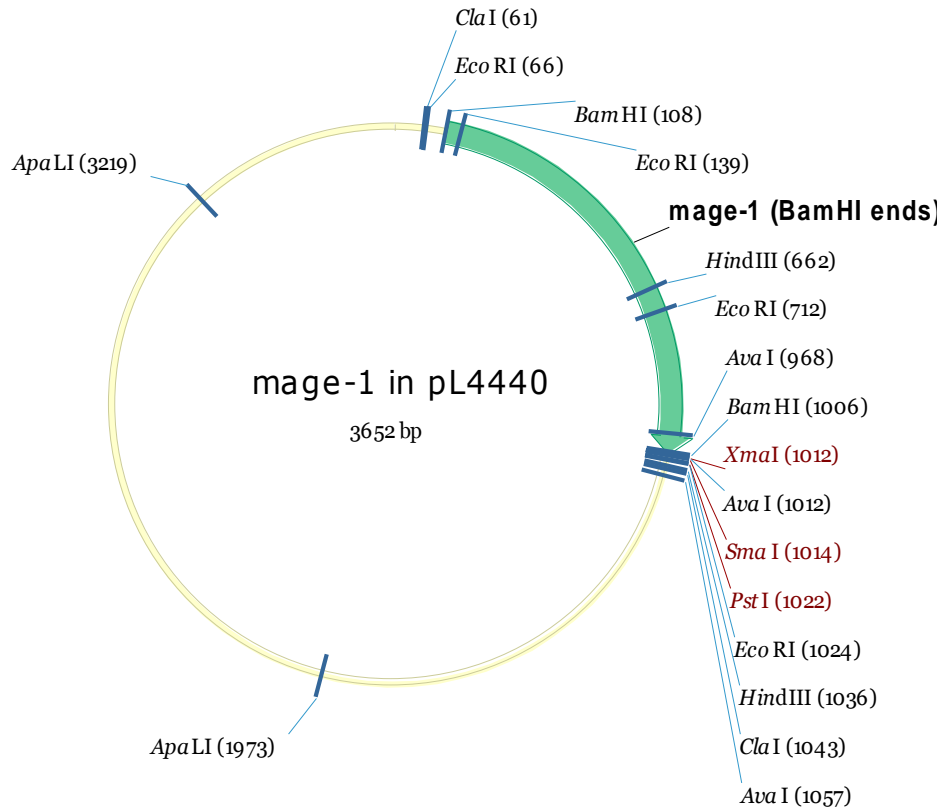
Ένα τμήμα 180 βάσεων που αντιστοιχεί στο αμινοτελικό κομμάτι του γονιδίου *cts-1* που κωδικοποιεί για το ένζυμο της συνθάσης του κιτρικού οξέος και περιέχει το σινιάλο για στόχευση στα μιτοχόνδρια, πολλαπλασιάστηκε με PCR από γενωμικό DNA του *C. elegans*. Το τμήμα αυτό κλωνοποιήθηκε στον TOPO (μια θετική αποικία φοράς 3'-5') και από εκεί απομονώθηκε για να εισαχθεί στον φορέα *runc-119-cts-1-GFP* (επόμενη σελίδα).



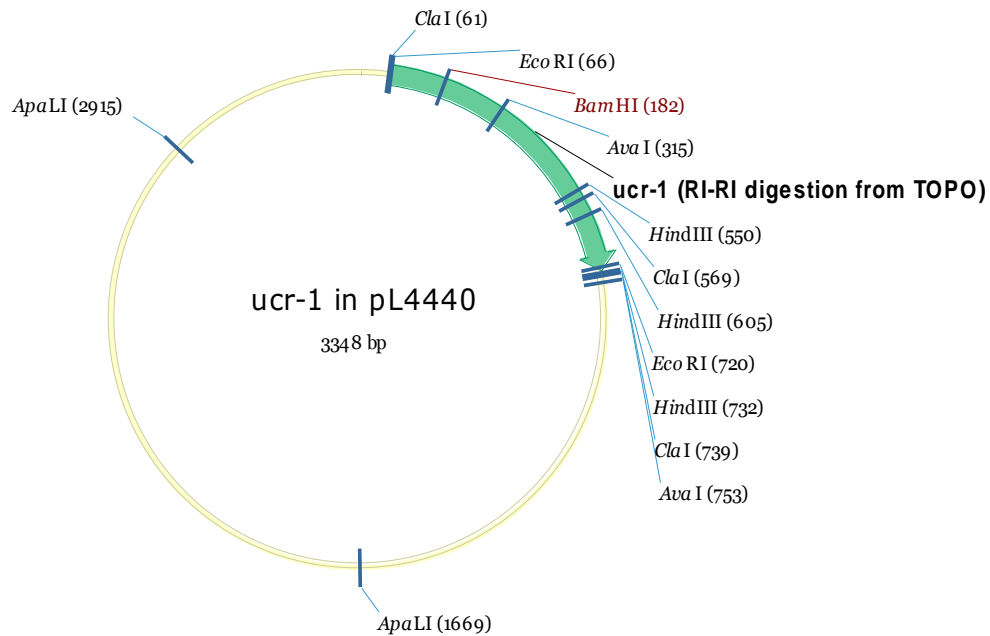
Το αμινοτελικό τμήμα του γονιδίου *cts-1* απομονώθηκε από τον ΤΟΡΟ με πέψη *XbaI-XmnI* (τυφλά άκρα) και συγκολλήθηκε στον φορέα *pPD95.77* που ήδη περιείχε τον υποκινητή του γονιδίου *unc-119* ώστε να επιτρέπει την έκφραση της GFP αποκλειστικά στο νευρικό σύστημα του *C. elegans* μετά από πέψη του τελευταίου με *XbaI-MscI* (τυφλά άκρα). Τα ένζυμα *XbaI*, *MscI* αφήνουν τυφλά άκρα οπότε είναι συμβατά. Με την στρατηγική αυτή, αντιστράφηκε και η φορά του κομματιού του *cts-1* από 3'-5' στον ΤΟΡΟ σε 5'-3' στον *pPD95.77*.



Ολόκληρη η κασέτα που περιέχει τον υποκινητή *unc-119* και το αμινοτελικό τμήμα του *cts-1* απομονώθηκε από τον φορέα *punc-119-cts1-GFP* (προηγούμενη σελίδα) έπειτα από πέψη με το ένζυμο *KpnI* δίνοντας ένα κομμάτι ~2.4kb. Στην συνέχεια, το κομμάτι αυτό συγκολλήθηκε στον άδειο φορέα *pPD95.77-wmCherry* ο οποίος είχε γραμμοποιηθεί μετά από πέψη με *KpnI* επίσης. Η φορά του ενθέματος ελέγχθηκε μετά από πέψεις με *BamHI* και *XbaI*.



Μια περιοχή που αντιστοιχεί σχεδόν σε ολόκληρο το γονίδιο του *mage-1* πολλαπλασιάστηκε με PCR και κλωνοποιήθηκε στον TOPO. Στην συνέχεια, ακολούθησε πέψη με *Bam*HI και συγκόλληση στον φορέα pL4440 που είχε γραμμοποιηθεί έπειτα από πέψη με το ίδιο ένζυμο και είχε υποστεί αποφωσφορυλίωση των ελεύθερων άκρων του (με SAP).



Εκκινητές που υβριδίζονται στο δεύτερο και τέταρτο εξώνιο του γονιδίου *ucr-1* και τα ιντρόνια που βρίσκονται μεταξύ τους χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση από γενωμικό DNA ενός κομματιού ικανού να δώσει αποτελεσματική καταστολή. Το τμήμα αυτό, κλωνοποιήθηκε αρχικά στον TOPO και στην συνέχεια μέσω πέψης με *Eco*RI απομονώθηκε και εισήχθη στον φορέα pL4440 ο οποίος είχε κοπεί επίσης με *Eco*RI και είχε υποστεί επεξεργασία με SAP.

Κατάλογος εκκινήτων (primers)

- Κλωνοποίηση του αμινοτελικού τμήματος του γονιδίου *cts-1*:

cts-1 FW primer: 5'-ATGTCGCTCTCTGGAATGGC-3'

cts-1 REV primer: 5'-GGTGCTACCGTGCTCTGTGC-3'

- Κλωνοποίηση τμήματος του γονιδίου *mage-1* για κατασκευή RNAi:

mage-1 FW primer: 5'-ATTTTTGGATTGTTTCGCTGCATT-3'

mage-1 REV primer: 5'-TTGGATCCGTCCTACTGTCC-3'

- Εκκινήτες για μέτρηση των επιπέδων του *mage-1* mRNA:

mage-1 FW primer: 5'-TGGATTGTTTCGCTGCATTTGTG-3'

mage-1 REV primer: 5'-TCGTCTTGGATGACTGCATTCC-3'

- Κλωνοποίηση τμήματος του γονιδίου *ucr-1* για κατασκευή RNAi:

ucr-1 FW primer: 5'-GCAATGCTTCATCAGCTGTCTCC-3'

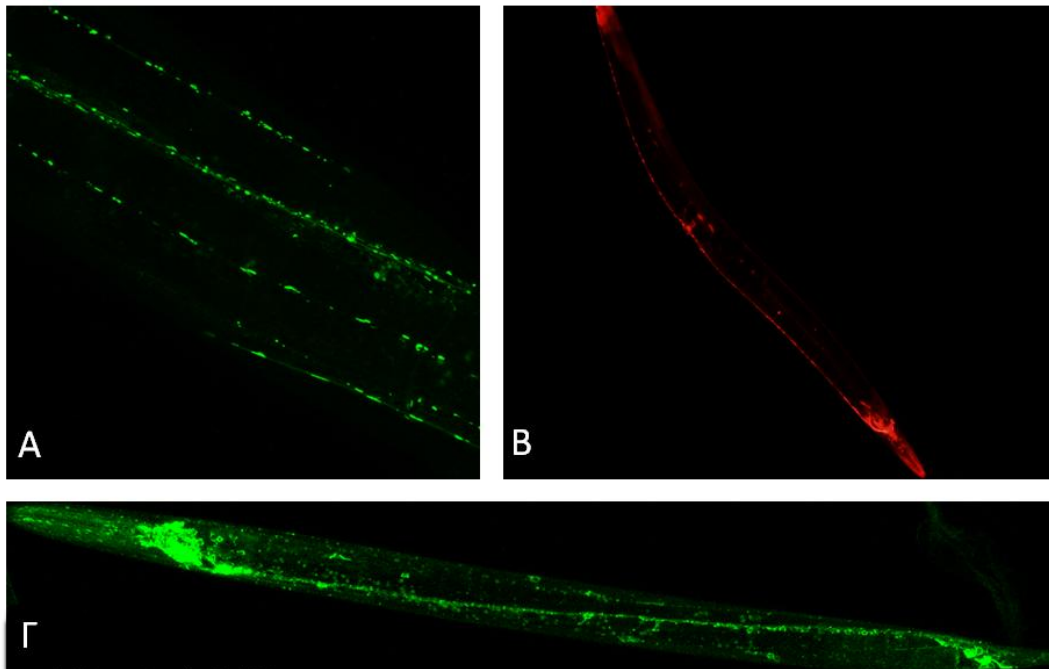
ucr-1 REV primer: 5'-GGAATGCTCTCACTGGTTCCGAG-3'

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

In vivo σήμανση μιτοχονδρίων στα νευρικά κύτταρα του *C. elegans*

Για τη δημιουργία των διαγονιδιακών αυτών σειρών σκουληκιών-ανταποκριτών (reporters), το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης CTS-1 που περιέχει το σινιάλο μιτοχονδριακής στόχευσης συντήχθηκε με τη GFP ή wmCherry, διατηρώντας ανέπαφο το πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF). Το γονίδιο *cts-1* κωδικοποιεί για το ένζυμο της συνθάσης του κιτρικού που λαμβάνει μέρος στον κύκλο του Crebs (εντός της μιτοχονδριακής μήτρας). Η έκφραση της χιμερικής πρωτεΐνης τέθηκε υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *unc-119* που εκφράζεται σε όλα τα νευρικά κύτταρα του νηματώδους.

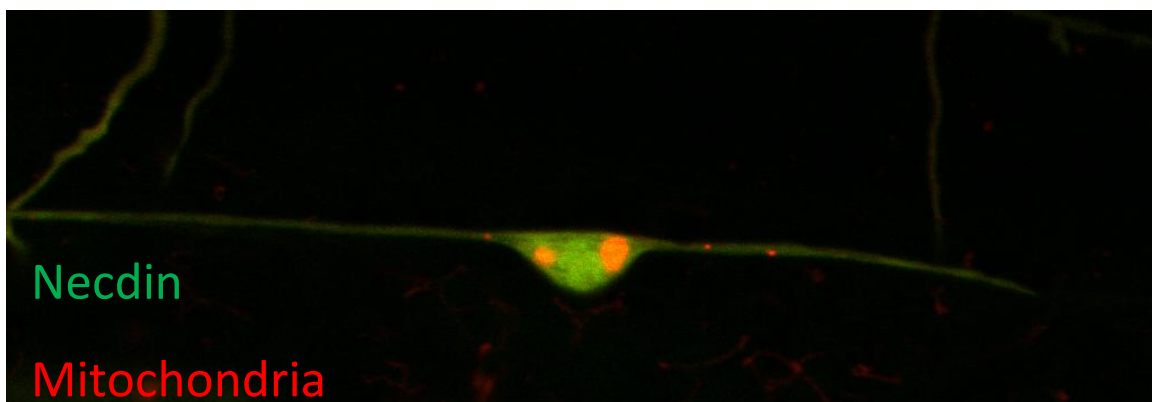
Σε εικόνες από συνεστειακό (confocal) μικροσκόπιο, είναι εμφανής η στικτή κατανομή των μιτοχονδρίων και η ανάλυση μπορεί να φτάσει μέχρι και στο επίπεδο ενός και μονο νευρικού άξονα (**εικόνα 1**).



Εικόνα 1: Σκουλήκια-ανταποκριτές (reporters) για την παρατήρηση μιτοχονδρίων στο νευρικό σύστημα του νηματώδους *C. elegans*. A) Νευρικοί άξονες που διατρέχουν το

σώμα σκουληκιού. Η εικόνα έχει ληφθεί από συνεστειακό (confocal) μικροσκόπιο σε φακό 63x. Τα μιτοχόνδρια έχουν στικτή (punctuated) εμφάνιση και σημαίνονται με GFP. Τα διαγονιακά αυτά ζώα έχουν προκύψει από μικροένεση (microinjection) στις γονάδες σκουληκιών αγρίου τύπου. Γονότυπος: **N2; Ex[p_{unc-119}::CTS-1::GFP]**. Β) Εικόνα που προέρχεται από μικροσκόπιο φθορισμού και απεικονίζει μιτοχόνδρια στα νευρικά κύτταρα του νηματώδους σημασμένα με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη wmCherry. Τα διαγονιδιακά αυτά ζώα έχουν προκύψει από βομβαρδισμό (bombardment) σε ζώα γονοτύπου *unc-119* (παράλυτα). Γονότυπος: **unc-119(ed-3) III; Ex [p_{unc-119}::CTS-1::wmCherry+ Cb-unc-119(+)]**. Γ) Εικόνα σκουληκιού σταδίου L3 που έχει ληφθεί με συνεστειακή μικροσκοπία και απεικονίζει τα μιτοχόνδρια σε ολόκληρο το νευρικό σύστημα του σκουληκιού. Γονότυπος όμοιος του Α.

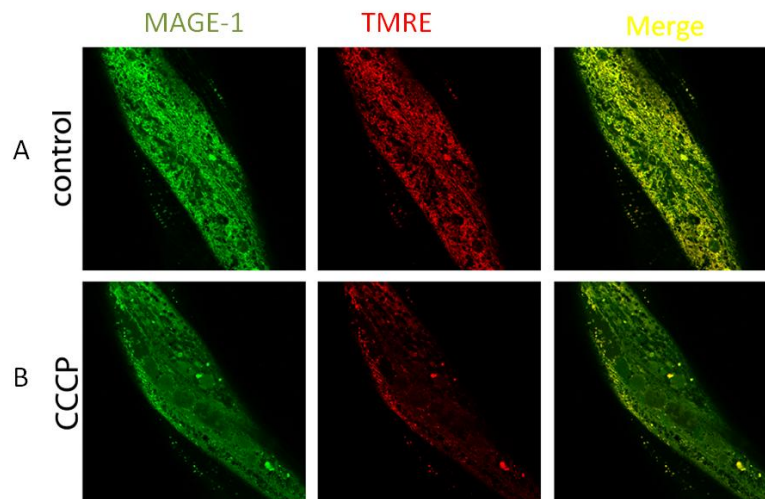
Η σήμανση μιτοχονδρίων στους νευρώνες, μας επιτρέπει μεταξύ άλλων να εξετάσουμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό και τον πιθανό συνεντοπισμό των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν με τα μιτοχόνδρια. Για παράδειγμα, η Necdin των θηλαστικών υπερκεφράστηκε στο νευρικό σύστημα των σκουληκιών, των οποίων τα μιτοχόνδρια είχαν ταυτόχρονα σημασθεί με wmCherry. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 2**, η Necdin έχει μια χαρακτηριστική διάχυτη κατανομή εντός του κυτταρικού σώματος αλλά και κατά μήκος του νευράξονα. Υπάρχει σαφής συνεντοπισμός της με μιτοχόνδρια σε συγκεκριμένα σημεία, αλλά ένα ποσοστό της πρέπει να εντοπίζεται επίσης στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, όπως άλλωστε προτείνεται από τη βιβλιογραφία.



Εικόνα 2: Διπλή διαγωνιακή σειρά που υπερεκφράζει τη Necdin (πράσινο) στο νευρικό σύστημα του *C. elegans*, και ταυτόχρονα τα μιτοχόνδρια έχουν σημανθεί με wmCherry. Είναι εμφανής ο μερικός συνεντοπισμός μιτοχονδρίων-Necdin στα νευρικά κύτταρα (τόσο στο κυτταρικό σώμα όσο και στον νευράξονα). Γονότυπος: **N2; Ex[p_{unc-119}::CTS-1::wmCherry; p_{unc-119}::Necdin::GFP]**

Η MAGE-1 εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια του *C. elegans*

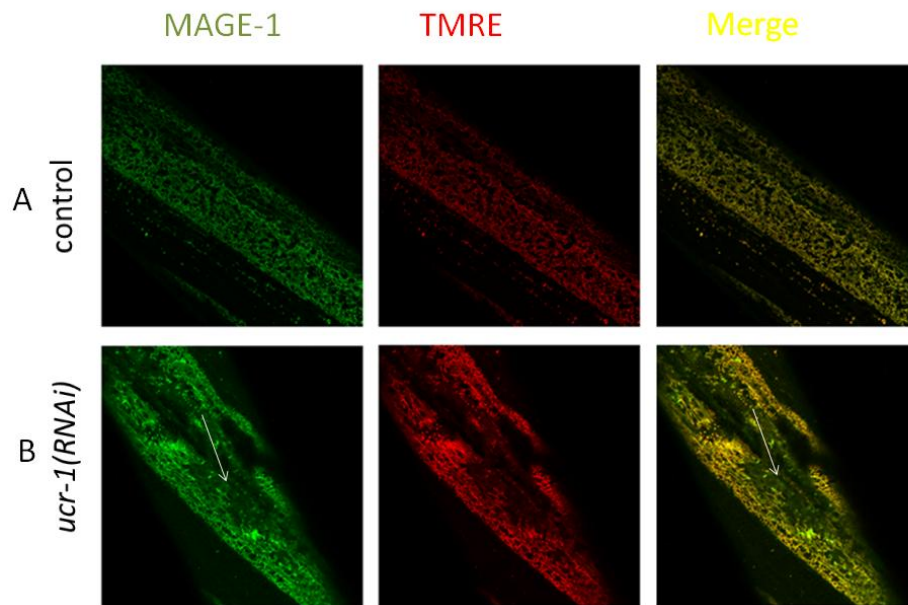
Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η πρωτεΐνη MAGE-1 είναι το πιο κοντινό ομόλογο της Necdin στον νηματώδη *C. elegans*. Ωστόσο, μέχρι στιγμής σε πρωτεΐνες της οικογένειας MAGE έχουν αποδοθεί αποκλειστικά πυρηνικές ή κυτταροπλασματικές λειτουργίες. Μετά από χρώση των μεταφραστικών ανταποκριτών (translational reporters) σκουληκιών με TMRE (Tetramethylrhodamine, Ethyl Ester), είναι εμφανές ότι η MAGE-1 συνεντοπίζεται σχεδόν πλήρως με το μιτοχονδριακό δίκτυο του εντέρου (εικόνα 3A). Μετά από προσθήκη του τοξικού για τα μιτοχόνδρια παράγοντα CCCP που διαταρράσει το ηλεκτροχημικό δυναμικό που είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική τους λειτουργία και τη σύνθεση ATP, το μιτοχονδριακό δίκτυο επηρεάζεται αισθητά, όπως και ο εντοπισμός της πρωτεΐνης MAGE-1 (εικόνα 3B).



Εικόνα 3: Η MAGE-1 εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και ο εντοπισμός της διαταράσσεται μετά από την προσθήκη CCCP. A) Χρώση σκουληκιών-μεταφραστικών ανταποκριτών (translational reporters) για την πρωτεΐνη MAGE-1 με τη χρωστική TMRE που βάφει ενεργά μιτοχόνδρια, καταδεικνύει εμφανή συνεντοπισμό της MAGE-1 με τα μιτοχόνδρια (στην συγκεκριμένη περίπτωση στο δίκτυο του εντέρου). B) Μετά από χορήγηση CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone), το μιτοχονδριακό δίκτυο καταστρέφεται, το TMRE βάφει σαφώς λιγότερα ενεργά μιτοχόνδρια και η MAGE-1 φαίνεται να χάνει κι αυτή τον στικτό της εντοπισμό και να εμφανίζεται πιο διάχυτη.

Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι **Lavi-Itzkovitz et al, 2012** κατασκεύασαν ένα δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων για τη Necdin, το ομόλογο της MAGE-1 στα θηλαστικά. Μεταξύ των στόχων, υπήρχε μια μονάχα πρωτεΐνη με μιτοχονδριακή λειτουργία, συγκεκριμένα η UCR-1 (Ubiquinol- cytochrome c reductase core protein 1). Κατασκευάσαμε RNAi για την ομόλογη πρωτεΐνη της αναπνευστικής αλυσίδας του σκουληκιού και ταΐσαμε τα τους μεταφραστικούς ανταποκριτές για τη MAGE-1 με βακτήρια που εκφράζουν τα dsRNA μόρια που καταστέλλουν την έκφραση της UCR-1 (**εικόνα 4**). Πιστεύουμε ότι αποσιώπηση της UCR-1 επηρεάζει την κατανομή της MAGE-1 και συγκεκριμένα την κάνει να εντοπίζεται σε μεμονωμένα μιτοχόνδρια που αποσπώνται από το υπόλοιπο δίκτυο, προτείνοντας μια πιθανή αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών.

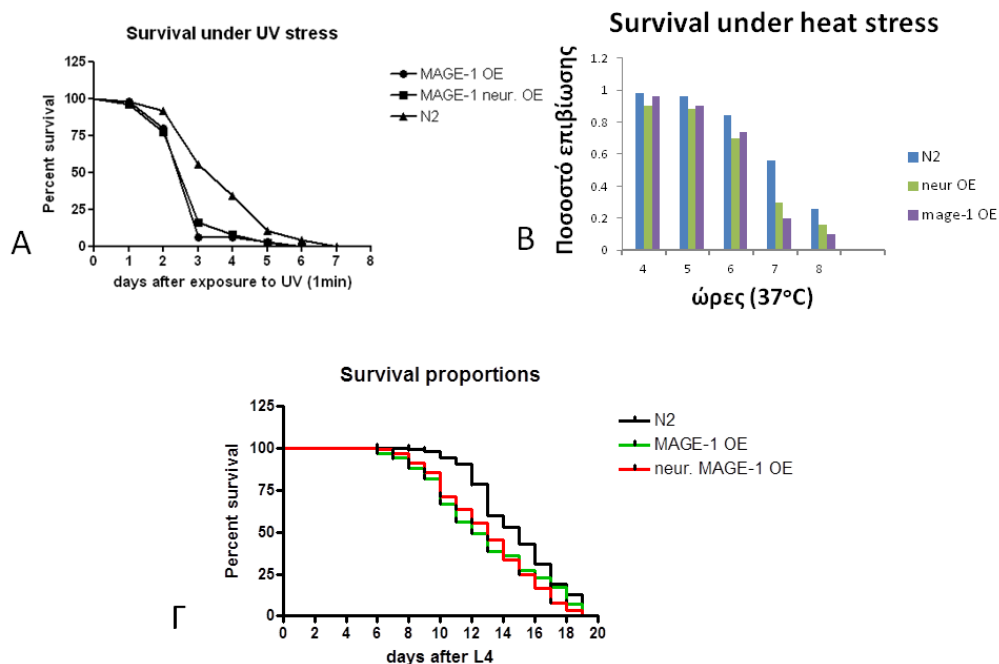
Όλα τα προηγούμενα, καταδεικνύουν ότι η MAGE-1 εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια του *C. elegans*, κάτι που δεν έχει αναφερθεί ποτέ στα θηλαστικά για το ομόλογό της (Necdin). Ο εντοπισμός της αυτός οφείλεται πιθανώς στην αλληλεπίδραση της με μια πρωτεΐνη-μέλος της αναπνευστικής αλυσίδας, την UCR-1 του συμπλόκου III.



Εικόνα 4: Μετά από αποσιώπηση της πρωτεΐνης UCR-1 που είναι μέλος του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας, φαίνεται πως ο εντοπισμός της MAGE-1 επηρεάζεται. A) Η πρωτεΐνη MAGE-1 φυσιολογικά εντοπίζεται στο μιτοχονδριακό δίκτυο του εντέρου. B) Μετά από αποσιώπηση της UCR-1, η MAGE-1 εντοπίζεται σε μεμονωμένα μιτοχόνδρια που έχουν αποσπαστεί από το δίκτυο, δείχνοντας μια πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών στον *C. elegans*.

Εμπλοκή της MAGE-1 στη διαδικασία της γήρανσης στον *C. elegans*

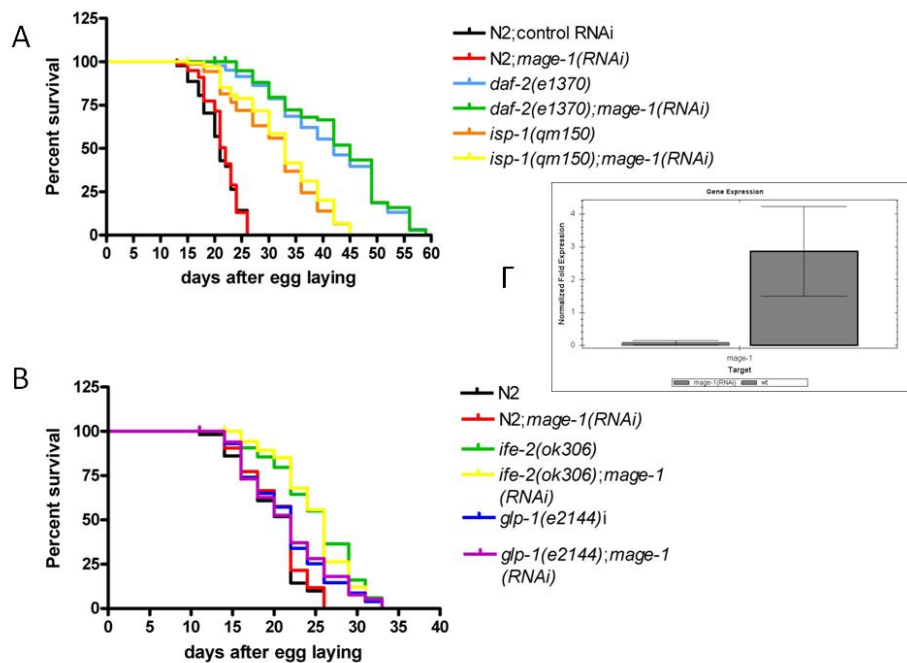
Ο *C. elegans* είναι ιδανικός οργανισμός για τη μελέτη της γήρανσης, λόγω του μικρού χρόνου ζωής του (maximum lifespan) αλλά και του μεγάλου αριθμού ατόμων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών. Επομένως, μετά από τον εντοπισμό της MAGE-1 στα μιτοχόνδρια, θέλαμε να εξετάσουμε την πιθανή εμπλοκή της στη γήρανση. Σκουλήκια που υπερεκφράζουν την MAGE-1 υπό τον έλεγχο του ενδογενούς υποκινητή της ή υπό τον έλεγχο ενός νευρο-ειδικού υποκινητή ($\rho_{unc-119}$), παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε συνθήκες UV (εικόνα 5A) ή θερμικού στρες (εικόνα 5B) σε σχέση με αγρίου τύπου ζώα. Επίσης, η επιβίωση των ζώων που υπερεκφράζουν MAGE-1 μειώνεται σημαντικά (εικόνα 5Γ).



Εικόνα 5: Δοκιμασίες στρες (stress assays) και πειράματα γήρανσης σε σκουλήκια που υπερεκφράζουν την MAGE-1 υπό τον έλεγχο του ενδογενούς του υποκινητή ή ενός υποκινητή του γονιδίου *unc-119* για νευροειδική έκφραση. A) Μέτρηση της επιβίωσης μετά από UV στρες ενός λεπτού. Τα σκουλήκια που υπερεκφράζουν τη MAGE-1 δείχνουν να είναι πιο ευαίσθητα σε σχέση με τα σκουλήκια αγρίου τύπου. B) Μέτρηση

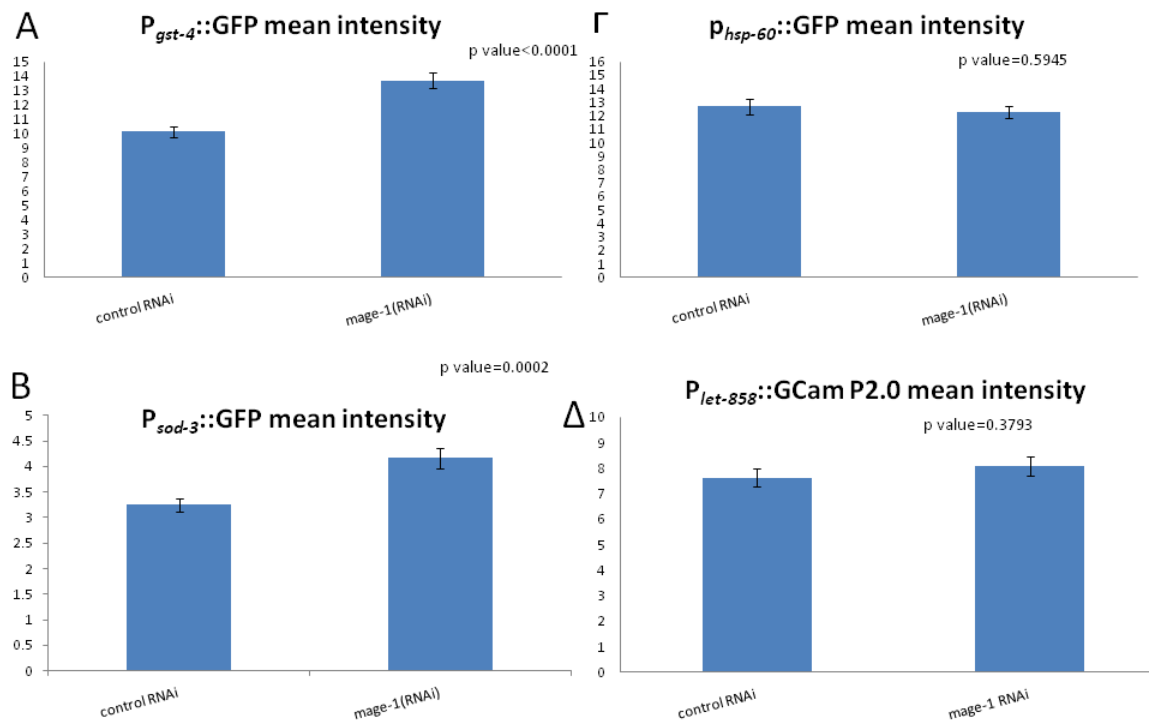
της επιβίωσης μετά από θερμικό στους 37°C. Τα σκουλήκια που υπερεκφράζουν την *MAGE-1* δείχνουν εκ νέου να πεθαίνουν πιο γρήγορα. Γ) Πείραμα γήρανσης πάνω σε πιατάκια στρωμένα με OP50 βακτήρια. Η μέση επιβίωση (median survival) μειώθηκε από δεκαπέντε ημέρες στα αγρίου τύπου σκουλήκια σε δώδεκα ημέρες στα σκουλήκια που εκφράζουν *MAGE-1* υπό τον ενδογενή του υποκινητή και σε δεκατρείς ημέρες στα σκουλήκια που εκφράζουν *MAGE-1* στο νευρικό σύστημα των ζώων.

Ωστόσο, η γενετική αποσιώπηση (genetic inhibition) της έκφρασης της πρωτεΐνης *MAGE-1* δεν φαίνεται να επηρεάζει τη γήρανση, σε αντίθεση με την υπερέκφραση της. Πειράματα γήρανσης διεξήχθησαν σε άτομα αγρίου τύπου αλλά και μεταλλάγματα διαφόρων γενετικών υποβάθρων, όπως τα *daf-2* (μειωμένη σηματοδότηση Insulin/IGF), *isp-1* (μετάλλαγμα αναπνευστικής αλυσίδας), *ife-2* (μειωμένοι ρυθμοί πρωτεϊνοσύνθεσης), *glp-1* (εξάλειψη των γαμετικών κυττάρων) (εικόνα 6). Όλα τα προηγούμενα στελέχη έχουν αυξημένο προσδόκιμο επιβίωσης, αλλά οι καμπύλες επιβίωσης (survival curves) τους δεν επηρεάζονται από την αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης *MAGE-1*.



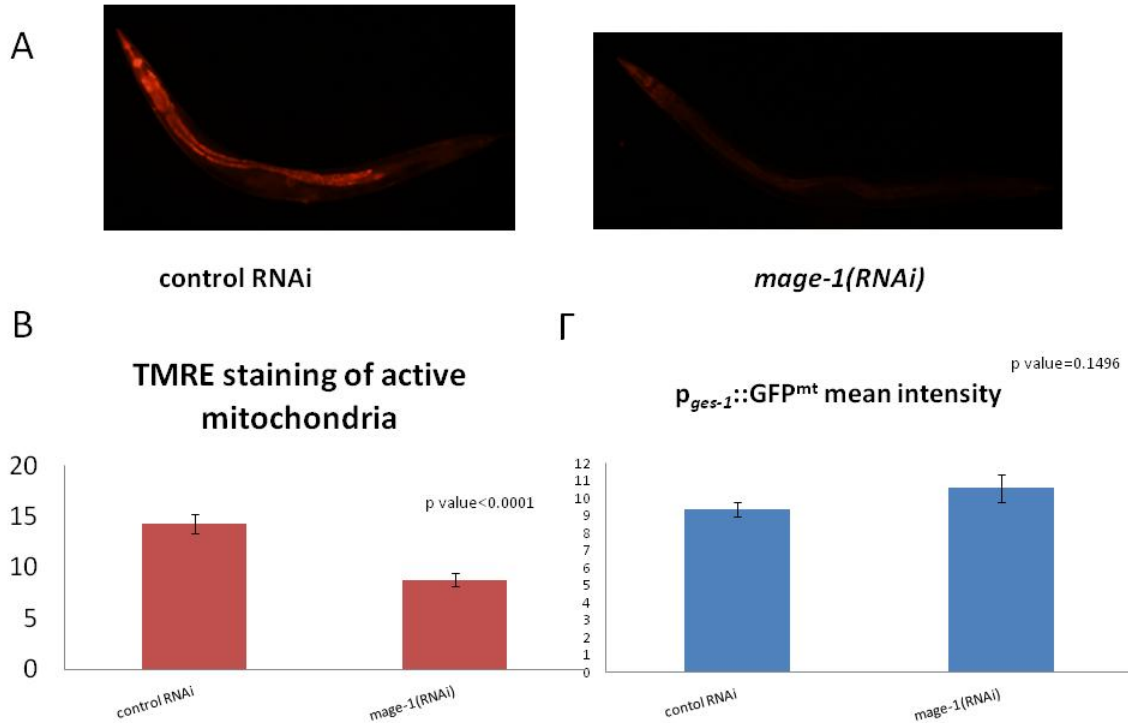
Εικόνα 6: Αντίθετα με την υπερέκφραση, η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης *MAGE-1* δεν επιφέρει κάποια αλλαγή κατά τη γήρανση. Α) Σκουλήκια των γονοτύπων *N2* (αγρίου τύπου), *daf-2 (e1370)*, *isp-1 (qm150)* τράφηκαν με βακτήρια που εκφράζουν είτε *control (RNAi)* είτε *mage-1 (RNAi)* που καταστέλει την έκφραση της *MAGE-1*. Καμία αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στους ρυθμούς της γήρανσης. Β) Σκουλήκια των γονοτύπων *N2* (αγρίου τύπου), *ife-2 (ok306)*, *glp-1 (e2144)* τράφηκαν με βακτήρια που εκφράζουν είτε *control (RNAi)* είτε *mage-1 (RNAi)*. Καμία αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στους ρυθμούς της γήρανσης. Γ) Η θρέψη των σκουληκιών με βακτήρια που παράγουν dsRNA μόρια για το γονίδιο *mage-1*, οδηγεί σε αποτελεσματική καταστολή της έκφρασης. Τα επίπεδα του *mage-1* mRNA μετρήθηκαν μετά από απομόνωση RNA και PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR).

Στη συνέχεια, εξετάσαμε την επίδραση της αποσιώπησης της *MAGE-1* στο φθορισμό διαφόρων σκουληκιών-ανταποκριτών (εικόνα 7). Από τα αποτελέσματα που συλλέξαμε φαίνεται πως οι σημαντικοί μεταγραφικοί παράγοντες *DAF-16* (ομόλογος του *FOXO* των θηλαστικών) και *SKN-1* (ομόλογος των *NRF1/2* των θηλαστικών) δείχνουν να ενεργοποιούνται μετά από την αποσιώπηση της έκφρασης της *MAGE-1*. Αντίθετα δεν συμβαίνει το ίδιο με την μιτοχονδριακή *URP* (Unfolded Protein Response), ούτε με την συγκέντρωση του ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα που δεν εμφανίζουν κάποια σημαντική διαφορά. Ωστόσο, μετά από χρώση σκουληκιών αγρίου τύπου με *TMRE* για την ανίχνευση της ενεργότητας των μιτοχονδρίων, φάνηκε ότι η αποσιώπηση της *MAGE-1* μειώνει σημαντικά τον αριθμό των ενεργών μιτοχονδρίων στα ζώα, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει τον συνολικό τους αριθμό, για παράδειγμα στο έντερο των σκουληκιών (εικόνα 8).



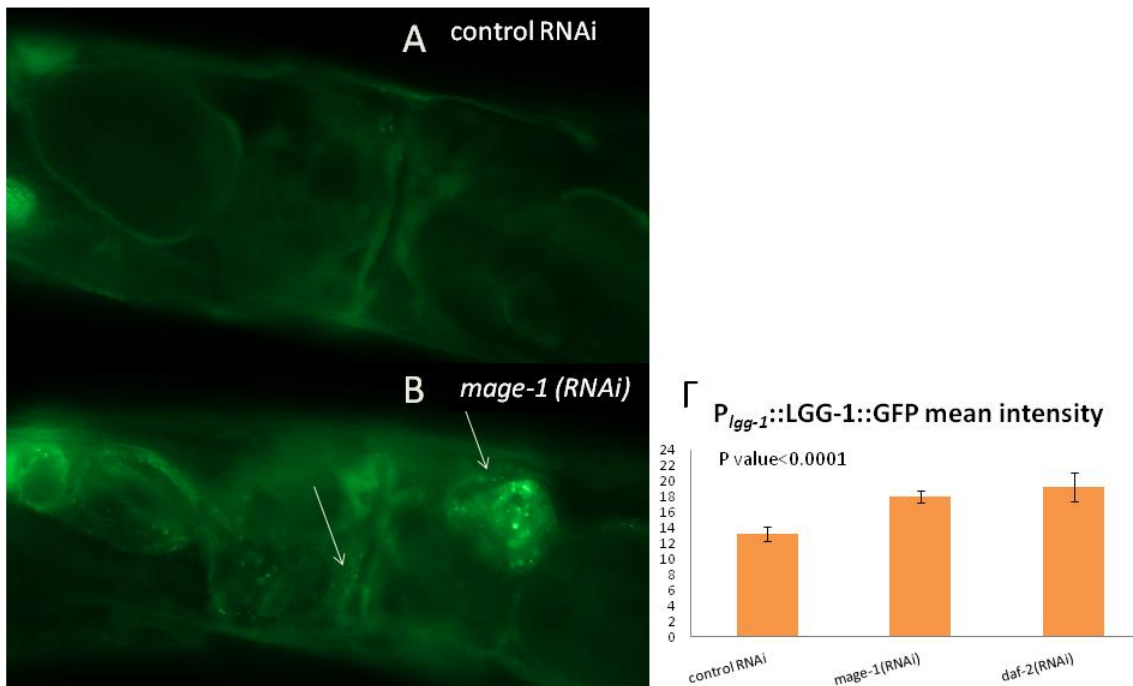
Εικόνα 7: Επίδραση της αποσιώπησης (downregulation) της έκφρασης της πρωτεΐνης MAGE-1 στον φθορισμό διαφόρων σκουληκιών-ανταποκριτών (reporters). Α) Στατιστικά σημαντική αύξηση ($p \text{ value} < 0.0001$) του φθορισμού μεταγραφικού ανταποκριτή (transcriptional reporter) του *gst-4*, ενός καλά χαρακτηρισμένου γονιδίου-στόχου του μεταγραφικού παράγοντα SKN-1 του νηματώδους. Β) Στατιστικά σημαντική αύξηση ($p \text{ value} = 0.0002$) του φθορισμού μεταγραφικού ανταποκριτή (transcriptional reporter) του *sod-3*, ενός καλά χαρακτηρισμένου στόχου του μεταγραφικού παράγοντα DAF-16 του σκουληκιού. Γ) Μη ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής UPR (unfolded protein response), όπως είναι εμφανές από την μη στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \text{ value} = 0.5945$) στο φθορισμό ενός μεταγραφικού ενεργοποιητή του γονιδίου που κωδικοποιεί για την HSP-60, μια σαπερόνη που ενεργοποιείται κατά την απόκριση της mtUPR. Δ) Μη στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \text{ value} = 0.3793$) στην κυτταροπλασματική συγκέντρωση του ασβεστίου (Ca^{2+}), όπως αυτή μετριέται με τη

χρήση ενός chameleon ανταποκριτή που εκφράζεται υπό τον έλεγχο ενός συστατικού υποκινητή του νηματώδους ($p_{let-858}$).



Εικόνα 8: Η ενεργότητα των μιτοχονδρίων αλλά όχι ο συνολικός αριθμός τους μειώνεται μετά από αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MAGE-1. Α) Μετά από χρώση με TMRE (Tetramethylrhodamine, Ethyl Ester), που βάφει ειδικά τα ενεργά μιτοχόνδρια βασιζόμενο στην παρουσία ηλεκτροχημικού δυναμικού σε αυτά, είναι εμφανές ότι τα σκουλήκια που έχουν τραφεί με βακτήρια που παράγουν *mage-1* dsRNA μόρια παρουσιάζουν μείωση της ενεργότητας των μιτοχονδρίων τους. Β) Ποσοτικοποίηση της διαφοράς στον φθορισμό που φαίνεται στην εικόνα Α (**p value < 0.0001**). Γ) Ο συνολικός αριθμός των μιτοχονδρίων στο έντερο των σκουληκιών δεν φαίνεται να επηρεάζεται μετά από αποσιώπηση της πρωτεΐνης MAGE-1 (**p value = 0.1496**).

Τέλος, αρκετά ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η αποσιώπηση της *MAGE-1* οδηγεί σε ενεργοποίηση της διαδικασίας της αυτοφαγίας (autophagy), μιας καταβολικής κυτταρικής λειτουργίας που συνεισφέρει στην απομάκρυνση μη λειτουργικών ή κατεστραμένων οργανιδίων (εικόνα 9). Το γεγονός αυτό ανιχνεύτηκε με χρήση ενός μεταφραστικού ανταποκριτή για την πρωτεΐνη LGG-1 του σκουληκιού, η οποία είναι ομόλογη με την Atg8p του ζυμομύκητα και την LC3 των θηλαστικών, που εμπλέκονται στην παραγωγή αυτοφαγοσωμάτων (autophagosomes) που εγκολπώνουν το φορτίο που οδεύει προς καταστροφή μέσω της διαδικασίας της αυτοφαγίας.

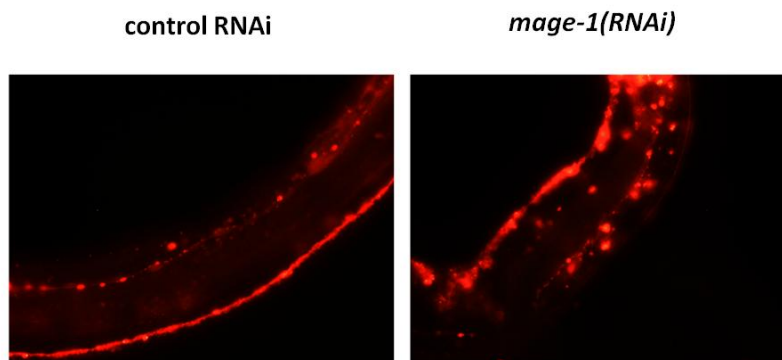


Εικόνα 9: Η αυτοφαγία φαίνεται να ενεργοποιείται μετά από αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης *MAGE-1*. A),B) Ένας μεταφραστικός ανταποκριτής (translational reporter) για την πρωτεΐνη LGG-1 που είναι μάρτυρας της παρουσίας αυτοφαγοσωμάτων χρησιμοποιήθηκε για να ανιχνευτεί πιθανή αύξηση της αυτοφαγίας μετά από αποσιώπηση της *MAGE-1*. Ενώ στα control σκουλήκια, η LGG-1 έχει μια

διάχυτη παρουσία, μετά από από αποσιώπηση της *MAGE-1* εμφανίζεται πιο σικτική, γεγονός που δηλώνει το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων. Γ) Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης *LGG-1* φαίνεται να αυξάνονται στατιστικά σημαντικά (**p value<0.0001**) μετά από αποσιώπηση της *MAGE-1*, σε επίπεδα ανάλογα με την αύξηση που παρατηρείται μετά από καταστολή της σηματοδότησης *Insulin/IGF*.

Αποσιώπηση της *MAGE-1* στο νευρικό σύστημα διαταράσσει το μιτοχονδριακό δίκτυο

Μετά από διασταύρωση $p_{unc-119}::CTS-1::wmCherry$ ανταποκριτών με σκουλήκια που υπερεκφράζουν το *SID-1 dsRNA* κανάλι στους νευρώνες ($p_{unc-119}::SID-1$) και αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης *MAGE-1* φαίνεται πως το μιτοχονδριακό δίκτυο στους νευρώνες διαταράσσεται (**εικόνα 10**). Τα πρωτογενή αποτελέσματα (preliminary results) του πειράματος αυτού, υποδηλώνουν μια πιθανή εμπλοκή της πρωτεΐνης *MAGE-1* στη διατήρηση και λειτουργικότητα των νευρώνων των νηματωδών.



Εικόνα 10: RNAi αποσιώπηση της *MAGE-1* στο νευρικό σύστημα διαταράσσει το μιτοχονδριακό δίκτυο των νευρώνων (εικόνα από Β. Νικολετοπούλου)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη, κατασκευάσαμε διαγονιδιακούς νηματώδεις σκώληκες-ανταποκριτές (reporters) για τη σήμανση των μιτοχονδρίων στα νευρικά κύτταρα *in vivo*. Να σημειωθεί ότι σκουλήκια-μάρτυρες για σήμανση μιτοχονδρίων σε ιστούς όπως το έντερο (στέλεχος $p_{ges-1}::GFP^{mt}$) [Benedetti et al, 2006] ή στους μύες (στέλεχος $p_{myo-3}::GFP^{mt}$) [Labrousse et al, 1999] του *C. elegans*, έχουν ήδη κατασκευαστεί. Το εργαλείο αυτό μπορεί να αποδειχτεί ιδιαίτερα χρήσιμο, για παράδειγμα στην εξέταση της επίδρασης της γενετικής αποσιώπησης του επιθυμητού γονιδίου στο μιτοχονδριακό δίκτυο των νευρικών κυττάρων (εικόνα 10) ή για παρατήρηση αλλαγών στη μορφολογία ή τη συγκέντρωση-κατανομή μιτοχονδρίων που επέρχονται κατά τη πρόοδο της γήρανσης (αποτελέσματα δεν δείχνονται).

Επιπρόσθετα, προσπαθήσαμε να διαλευκάνουμε το ρόλο της πρωτεΐνης MAGE-1, του κοντινότερου ομολόγου της Necdin των θηλαστικών, στη φυσιολογία του νηματώδους *C. elegans* και να εξετάσουμε την πιθανή εμπλοκή της στη γήρανση. Αρχικά, φαίνεται πως η MAGE-1 συνεντοπίζεται με τα μιτοχόνδρια των σκουληκιών, για παράδειγμα σε ιστούς όπως το έντερο (εικόνες 3, 4), κάτι που μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί για τα ομόλογα της οικογένειας MAGE στα θηλαστικά. Στη Necdin έχουν αποδοθεί ρόλοι κυτταροπλασματικού αντάπτορα (adaptor), αλλά και πυρηνικές λειτουργίες [Lavi-Itzkovitz et al, 2012].

Όσον αφορά την εμπλοκή στη γήρανση, η υπερέκφραση της MAGE-1 υπό τον έλεγχο του ενδογενούς της υποκινητή ή ενός νευροειδικού υποκινητή μειώνει σημαντικά το μέσο χρόνο ζωής των νηματωδών, κάτι που συμβαδίζει με την αυξημένη ευαισθησία των ζώων αυτών σε συνθήκες UV ή θερμικού στρες. Αντιθέτως, αποσιώπηση της έκφρασής της δεν επιδρά στη γήρανση αγρίου τύπου ζώων όσο και διάφορων μεταλλάγματων με αλλαγές στους ρυθμούς της γήρανσης (*daf-2*, *isp-1*, *ife-2*, *glp-1*), παρότι το μιτοχονδριακό έντερο φαίνεται να καταστρέφεται απουσία της MAGE-1 (πειράματα Β.Νικολετοπούλου, εικόνες δεν δείχνονται). Ίσως αυτό να οφείλεται στην ενεργοποίηση ανισταθμιστικών κυτταρικών μηχανισμών (compensatory mechanisms). Σε αυτή την κατεύθυνση, πιστεύουμε ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες DAF-16 και SKN-

1 που είναι ιδιαίτερα σημαντικοί για την ομοιόσταση του *C. elegans* είναι περισσότερο ενεργοί μετά από αποσιώπηση της MAGE-1. Οι παράγοντες αυτοί ενεργοποιούν πλήθος-γονιδίων στόχων [Oh et al, 2006 και Oliveira et al, 2009], που συμμετέχουν σε αποκρίσεις για την αντιμετώπιση καταστάσεων στρες και έχουν γενικότερα ευεργετικές δράσεις για τον οργανισμό. Επίσης, η αποσιώπηση της MAGE-1 ενεργοποιεί την αυτοφαγία (autophagy), μια καταβολική διαδικασία που απομακρύνει οργανίδια που είναι μη λειτουργικά ή έχουν υποστεί βλάβη και συνεπώς είναι επικίνδυνα για το κύτταρο [Boya et al, 2013].

Παράλληλα, φαίνεται πως όταν η έκφραση της MAGE-1 αποσιωπάται, ένα ποσοστό των μιτοχόνδριων χάνει τη λειτουργικότητά του. Τα μιτοχόνδρια είναι εκτός από το κύριο οργανίδιο παραγωγής ενέργειας των ευκαρυωτικών κυττάρων και η κύρια πηγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), τοξικών παραπροϊόντων του μεταβολισμού [Scialo et al, 2011]. Μείωση των ενεργών μιτοχονδρίων συνεπάγεται μείωση των επιπέδων των ROS, λιγότερη τοξικότητα για τα κύτταρα και συνεπώς μπορεί να έχει ωφέλιμο αποτέλεσμα για την ομοιόσταση (θεωρία hormesis).

Να σημειωθεί επίσης, ότι τα πρώτα πειράματα αποσιώπησης της MAGE-1 ειδικά στο νευρικό σύστημα είναι ενθαρρυντικά, καθώς καταδεικνύουν πιθανή εμπλοκή της πρωτεΐνης μας στη διατήρηση και σωστή μορφολογία του νευρικού μιτοχονδριακού δικτύου (εικόνα 10). Συνεπώς, ενδέχεται μέσω απλών RNAi πειραμάτων γήρανσης (όπου το RNAi δεν είναι αποτελεσματικό στο νευρικό σύστημα), να έχουμε παραβλέψει την πιθανή δράση της MAGE-1 με ιστοειδικό τρόπο, συγκεκριμένα στο νευρικό σύστημα των νηματωδών.

Αναφορές-Βιβλιογραφία

Aebischer J., Sturny R., Andrieu D., Rieusset A., Schaller F., Geib S., Raoul C., Muscatelli F. (2011): Necdin protects embryonic motor neurons from programmed cell death. PLOS, 6(9), e23764

Benedetti C., Haynes C., Yang Y., Harding H., Ron D. (2006): Ubiquitin-like protein 5 positively regulates chaperone gene expression in the mitochondrial unfolded protein response. Genetics, 174, 229-239

Bischof J., Ekker M., Wevrick R. (2003): A MAGE/NDN-like gene in zebrafish. Dev Dynam, 228, 475-479

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

Boya P., Reggiori F., Codogno P. (2013): Emerging regulation and functions of autophagy. Nat Cell Biol, 15(7), 713-720

Brenner S. (1974): The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics, 77(1), 71-94

Bronfman FC, Tcherpakov M, Jovin TM, Fainzilber M. (2003): Ligand-induced internalization of the p75 neurotrophin receptor: a slow route to the signaling endosome. J Neurosci, 23(8), 3209-3220

Collins J.J, Huang C, Hughes S, Kornfeld K. (2008): The measurement and analysis of age-related changes in *C. elegans*. Wormbook, 1-21

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

Francois S., D'Orlando C., Fatone T., Touvier T., Pessina P., Meneveri R., Brunelli S. (2012): Necdin enhances myoblast survival by facilitating the degradation of the mediator of apoptosis CCAR1/CARP1. PLOS, 7(8), e43335

Fujiwara K., Hasegawa K., Ohkumo H., Miyoshi H., Tseng Y-H., Yoshikawa K. (2012): Necdin controls proliferation of white adipose progenitor cells. PLOS, 7(1), e30948

Gerard M., Hernandez L., Wevrick R., Stewart CL. (1999): Disruption of the mouse necdin gene results in early post-natal lethality. Nat Genet, 23(2), 199-202

Hayashi Y., Matsuyama K., Takaqi K., Sugiura H., Yoshikawa K. (1995): Arrest of cell growth by necdin, a nuclear protein expressed in postmitotic neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 213(1), 317-324

Hertweck M., Hoppe T., Baumeister R. (2003): *C. elegans*, a model for aging with high-throughput capacity. *Experimental Gerontology*, 38, 345-346

Jay P., Rougeulle C., Massacrier A., Moncla A., Mattel M., Malzac P., Roeckel N., Taviaux S., Lefranc J., Cau P., Berta P., Lalande M., Muscatelli F. (1997): The human necdin gene, NDN, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat Genet*, 17, 357-361

Kobayashi M., Taniura H., Yoshikawa K. (2002): Ectopic expression of necdin induces differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 277(44), 42128-42135

Kuwako K, Taniura H, Yoshikawa K. (2004): Necdin-related MAGE proteins differentially interact with the E2F1 transcription factor and the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem*, 279(3), 1703-1712

Labrousse A., Zappaterra M., Rube D., van der Blik A. (1999): *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell*, 4, 815-826

Lavi-Itzkovitz A., Tcherpakov M., Levy Z., Itzkovitz S., Muscatelli F., Fainzilber M. (2012): Functional consequences of Necdin nucleocytoplasmic localization. *PLOS*, 7(3), e33786

Lee I., Lehner B., Crombie C., Wong W., Fraser A., Marcotte E. (2007): A single gene network accurately predicts phenotypic effects of gene perturbation in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet*, 40(2), 181-188

Lee S, Walker CL, Karten B, Kuny SL, Tennese AA, O'Neill MA, Wevrick R. (2005): Essential role for the Prader-Willi syndrome protein necdin in axonal outgrowth. *Hum Mol Genet*, 14(5), 627-637

Lopez-Sanchez N., Gonzalez-Fernandez Z., Niinobe M., Yoshikawa K., Maria-Frade J. (2007): Single mage gene in the chicken genome encodes CMage, a protein with functional similarities to mammalian type II Mage proteins. *Physiol Genomics*, 30, 156-171

MacDonald HR, Wevrick R. (1997): The necdin gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse. *Hum Mol Genet*, 6(11), 1873-1878

Mello C.C., Conte D. (2004): Revealing the world of RNA interference. *Nat Cell Biol*, 431, 338-342

Muscatelli F., Abrous DN, Massacrier A., Boccaccio I., Le Moal M., Cau P., Cremer H. (2000): Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet*, 9(20), 3101-3110

Nishimura I., Shimizu S., Sakoda J., Yoshikawa K. (2007): Expression of Drosophila MAGE gene encoding a necdin homologous protein in postembryonic neurogenesis. *Gene Expression Patterns*, 7, 244-251

Oh SW., Mukhopadhyay A., Dixit BL., Raha T., Green MR., Tissenbaum HA (2006): Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nat. Genet.*, 38(2), 251-257

Oliveira R., Porter Abate J., Dilks K., Landis J., Ashraf J., Murphy C., Blackwell T.K. (2009): Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell*, 8(5), 524-541

Ren J, Lee S, Pagliardini S, Gérard M, Stewart CL, Greer JJ, Wevrick R. (2003): Absence of Ndn, encoding the Prader-Willi syndrome-deleted gene necdin, results in congenital deficiency of central respiratory drive in neonatal mice. *J Neurosci*, 23(5), 1569-1573

Rieckher M., Kourtis N., Pasparaki A., Tavernarakis N. (2009): Transgenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Methods in Molecular Biology*, 561, 21-39

Scialo F, Mallikarjun V, Stefanatos R, Sanz A. (2011): Regulation of lifespan by the mitochondrial electron transport chain: reactive oxygen species-dependent and reactive oxygen species-independent mechanisms. *Antioxid Redox Signal*

Takumi T. (2011): The neurobiology of mouse models syntenic to human chromosome 15q. *J Neurodevelop Disord*, 3, 270-281

Taniura H., Taniguchi N., Hara M., Yoshikawa K. (1998): Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1. *J Biol Chem.*, 273(2), 720-728

Taniura H., Matsumoto K., Yoshikawa K. (1999): Physical and Functional Interactions of Neuronal Growth Suppressor Necdin with p53. *J Biol Chem*. 274(23), 16242-16248

Taniura H, Kobayashi M, Yoshikawa K. (2005): Functional domains of necdin for protein-protein interaction, nuclear matrix targeting, and cell growth suppression. *J Cell Biochem*, 94(4), 804-815

The *C. elegans* Sequencing Consortium, Consortium (1998): Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology". *Science*, 282, 2012–2018

Winston W. M., Molodowitch C., Hunter C. P. (2002): Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295, 2456-2459