Τμήμα Βιολογίας & Ινστιτούτο Μοπριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας

« Μελέτη του μηχανισμού της μιτοφαγίας στον νηματώδη *Caenorhabditis elegans* »

Παληκαράς Κωνσταντίνος

Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Νηματοδών

Επιβλέπων Ερευνητής: Νεκτάριος Ταβερναράκης

Υπεύθυνα μέλη ΔΕΠ Τμήματος Βιολογίας Π.Κ.:

Ιωσήφ Παπαματθαιάκης, Χαράλαμπος Σπηλιανάκης

Ηράκλειο 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ……..…..2

ΠΕΡΙΛΗΨΗ……..…….…….…….4

ΕΙΣΑΓΩΓΗ…….…….…….6

Ι. Εισαγωγή στη Βιολογία του Νηματώδους *Caenorhabditis elegans*……6

ΙΙ. Το Μιτοχόνδριο…… …….…….9

ΙΙΙ. Οξειδωτική Βλάβη των Μιτοχονδρίων.....10

IV. Αυτοφαγία (Autophagy)……..11

V. Μιτοφαγία (Mitophagy) ……...13

Vα. Μιτοφαγία στη ζύμη.……..14

Vβ. Μιτοφαγία κατά τη διαφοροποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων..……14

Vγ. Επαγωγή της μιτοφαγίας μέσω του μονοπατιού Pink1 – Parkin….…….……..15

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ……..…….…… 17

Α. Μοριακή Βιολογία…….……...……...17

1. Απομόνωση γενωμικού DNA από τον *C. elegans*……..…….....17

2. Δημιουργία και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* (competent cells)…….17

2.1 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων *E. coli*…….……...……...17

2.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli*……...….…….....19

3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA……....…….20

3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης κυττάρων σε μεγάλη κλίμακα (large-prep)……..……..……20

3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης κυττάρων σε μικρή κλίμακα (mini-prep)……..…….22

4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)……...……..……23

5. Κλωνοποίηση τμήματος του γονιδίου *dct-1*……...……...23

6. Πέψη και Αντίδραση λιγάσης.…….…….……..24

7. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης……...……..24

Β. Μέθοδοι στον *C. elegans*……..…….…..…….25

1. Βακτηριακά στελέχη……..……25

2. Θρεπτικά μέσα και διαλύματα…….……..……25

2. Α. NGM (Nematode Growth Media) (1lt)…….……..…….25

2. Β. Υδατικό διάλυμα M9 (1lt)…….……..…….….……25

3. Κατασκευή πλασμιδίων για την έκφραση πρωτεϊνών στον *C. elegans*……..….……..26

4. Κατασκευή πλασμιδίων για την καταστολή της έκφρασης γονιδίων με την τεχνική του RNAi…….….27

5. Ανάπτυξη και διατήρηση στελεχών *C. elegans*……..…….…..27

5. Α. Διατήρηση στους 15°C……..……...27

5. Β. Διατήρηση στους -80°C…….……...28

6. Συγχρονισμός πληθυσμού νηματωδών και καθαρισμός από μολύνσεις….……..28

7. Δημιουργία αρσενικών ζώων *C. elegans*……...……29

8. Πειράματα γήρανσης.……..……..29

9. Real – Time PCR.……..30

10.Τεχνικές μικροσκοπίας…….……31

11. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.……..…….31

12. Άλλες Πληροφορίες…….31

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ……...…… 32

I. Ο ρόλος της μιτοφαγίας στη χρονολογική γήρανση του νηματώδε *C. elegans*.....32

II. Καταστολή μιτοφαγίας και παρατήρηση του μιτοχονδριακού δικτύου.....35

IV. *In vivo* σύστημα μικροσκοπικής απεικόνισης της μιτοφαγίας.....36

III. Καταστολή μιτοφαγίας και ποσοτικοποίηση μιτοχονδριακού DNA……...36

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....38

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....40

Summary

Mitochondria are ubiquitous membrane – bound organelles and they are a defining feature of eukaryotic cell. The organelle is composed of a soluble matrix surrounded by a double membrane, an ion impermeable inner membrane and a permeable outer membrane. Despite the fact that mitochondria contain their own independent genome, they are characterized as semi-autonomous organelles because their biological functions rely on the expression of nuclear genes. The mitochondrion is the site where electron transport chain and oxidative phosphorylation take place and provides the cell with the essential energy in the form of ATP for many cellular activities. Also, mitochondria are the major source of cellular reactive oxygen species (ROS) that cause oxidative damage to mtDNA, proteins and lipids. Accordingly, damaged, aged and excess mitochondria are a risk factor for the cell and proper elimination of them is important to maintain cellular homeostasis. Mitochondrial quality control mechanisms are therefore indispensable to cell survival and these include the removal of damaged mitochondrial proteins by an intra – organelle proteolytic system, the repair of damaged mitochondria by healthy ones through fission and fusion events and the removal of severely damaged mitochondria by autophagy (mitophagy). Mitophagy is a selective type of autophagy and the major degradative pathway for mitochondrial turnover. Little is known about the role of mitophagy in chronological ageing. During this thesis we examined the requirement for mitophagy process during ageing in *Caenorhabditis elegans* and we established an *in vivo* imaging system for monitoring mitophagy upon specific stimuli.

Περίληψη

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια, τα οποία περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη, και αποτελούν βασικό χαρακτηριστικό των ευκαρυωτικών κυττάρων. Τα μιτοχόνδρια αποτελούνται από μια υγρή – διαλυτή μήτρα που περιβάλλεται από δύο μεμβράνες, μια εσωτερική μεμβράνη μη διαπέρατη σε ιόντα, μια εξωτερική μεμβράνη διαπερατή σε ιόντα και το διαμεμβρανικό χώρο που είναι απαραίτητος για τη λειτουργική επικοινωνία των δύο μεμβρανών. Παρά το γεγονός ότι τα μιτοχόνδρια περιέχουν το δικό τους γονιδίωμα, χαρακτηρίζονται ως ημι – αυτόνομα οργανίδια επειδή οι βασικές βιολογικές τους λειτουργίες εξαρτώνται από την έκφραση και τη ρύθμιση συγκεκριμένων πυρηνικών γονιδίων. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν «τα εργοστάσια παραγωγής ενέργειας» του κυττάρου και εφοδιάζουν με ATP το κύτταρο για να πραγματοποιηθεί μια ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών. Επίσης, τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή Ενεργών Ριζών Οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species) που προκαλούν οξειδωτική βλάβη στο μιτοχονδριακό DNA, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια. Επομένως, τα γηρασμένα μιτοχόνδρια, τα μιτοχόνδρια με βλάβες αλλά και ο αυξημένος αριθμός μιτοχονδρίων αποτελούν υψηλό παράγοντα κινδύνου για τη ζωή του κυττάρου. Για να παραμείνει σταθερή η κυτταρική ομοιόσταση σε τέτοιες περιπτώσεις λαμβάνουν χώρα μηχανισμοί ποιοτικού ελέγχου των μιτοχονδρίων. Η απομάκρυνση κατεστραμένων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών μέσω πρωτεολυτικών μηχανισμών, η αποκατάσταση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων από τα υγιή μέσω των μηχανισμών σχάσης και σύντηξης και η απομάκρυνση των μιτοχονδρίων που έχουν υποστεί σοβαρές βλάβες μέσω της διαδικασίας της αυτοφαγίας (μιτοφαγία) αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου των μιτοχονδρίων. Η μιτοφαγία είναι ένας ειδικός – εκλεκτικός τύπος αυτοφαγίας και αποτελεί τον κύριο μηχανισμό αποικοδόμησης και απομάκρυνσης κατεστραμμένων μιτοχονδρίων. Ελάχιστα πράγματα είναι γνωστά για τον ρόλο της μιτοφαγίας κατά την διαδικασία της χρονολογικής γήρανσης. Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε κατά πόσο η διαδικασία της μιτοφαγίας είναι απαραίτητη κατά την διάρκεια της γήρανσης στον νηματώδη *Caenorhabditis elegans* και αναπτύξαμε ένα *in vivo* σύστημα μικροσκοπικής απεικόνισης για την παρατήρηση της επαγωγής της μιτοφαγίας κατόπιν συγκεκριμένων ερεθισμάτων.

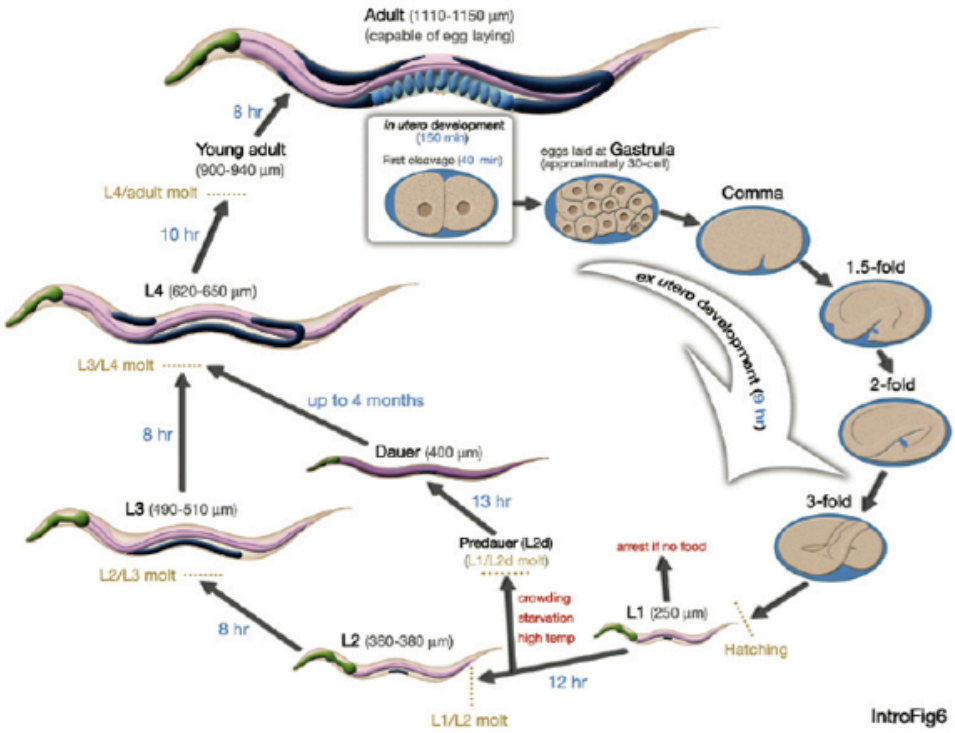
Εισαγωγή

Ι. 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 1ου 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 1ου 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 **.** 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 2ου 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 4ου σταδίου (L4).



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. 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).

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 τον γενετικό, είναι διαθέσιμος και φυσικός χάρτης, που αποτελείται από αλληλεπικαλυπτόμενους 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.,

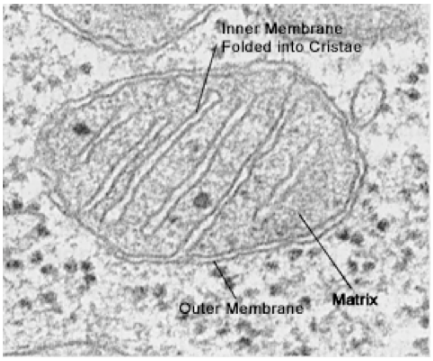
2000). Αν κι έχει το μειονέκτημα ότι δεν είναι ιδιαίτερα αποδοτική σε νευρικά κύτταρα, η ανακάλυψη στελεχών με αυξημένη ευαισθησία στο RNAi (στελέχη με τις μεταλλαγές *eri-1(mg366), lin-35(n745)* ή *rrf-3(pk1426)*), την έχει καταστήσει πιο αποτελεσματική (Kennedy et al., 2004; Lehner et al., 2006; Simmer 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 τον *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).

ΙΙ. Το Μιτοχόνδριο

Τα μιτοχόνδρια καταλαμβάνουν ένα σημαντικό τμήμα του κυτταροπλάσματος των ευκαρυωτικών κυττάρων (18 – 20%) και η συμβολή τους ήταν ουσιαστική για την εξέλιξη των οργανισμών. Συνήθως απεικονίζονται ως σταθεροί, επιμήκεις κύλινδροι με διάμετρο από 0,5 έως 1μm, που μοιάζουν με βακτήρια. Διάφορες τεχνικές μικροσκοπίας παρατήρηση των ζωντανών κυττάρων (Time – lapse microcinematography), ωστόσο, έχουν δείξει ότι τα μιτοχόνδρια είναι εντυπωσιακά κινητικά και εμφανίζουν μεγάλη δομική πλαστικότητα, με αποτέλεσμα συνεχώς να αλλάζουν το σχήμα τους. Στην πραγματικότητα τα μιτοχόνδρια απαρτίζουν ένα δυναμικό δίκτυο που ονομάζεται μιτοχονδριακό δίκτυο (mitochondrial network) και χαρακτηρίζεται από μια αέναη κίνηση και αλλαγή σχήματος. Το μιτοχονδριακό δίκτυο εξαπλώνεται και σμικραίνει, μέσω των φαινομένων σχάσης και σύντηξης μεταξύ των μιτοχονδρίων, ανάλογα με τις μεταβολικές απαιτήσεις των εκάστοτε κυτταρικών τύπων. Καθώς κινούνται στο κυτταρόπλασμα τα μιτοχόνδρια φαίνεται ότι «ακολουθούν» τις δομές των μικροσωληνίσκων, οι οποίες μπορούν να καθορίσουν τον προσανατολισμό και τη διανομή των μιτοχονδρίων μέσα στο κύτταρο. Έτσι, το μιτοχονδριακό δίκτυο σε κάποια κύτταρα έχει τη μορφή μακριών ινών ή αλυσίδων, ενώ σε άλλα κύτταρα τα μιτοχόνδρια παραμένουν σταθερά σε μια θέση και παρέχουν ATP σε μια τοποθεσία με πολύ υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις.

Η δομή των μιτοχονδρίων είναι χαρακτηριστική, όπως φαίνεται με ηλεκτρονική μικροσκοπία μικρών τομών. Κάθε μιτοχόνδριο οριοθετείται από δύο μεμβράνες, την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη που σχηματίζει πολυάριθμες πτυχώσεις (cristae). Μαζί οι δύο αυτές μεμβράνες δημιουργούν δύο ξεχωριστά τμήματα: i) τον εσωτερικό χώρο του μιτοχονδρίου που ονομάζεται μιτοχονδριακή μήτρα (mitochondrial matrix) και ii) τον διαμεμβρανικό χώρο που αποτελεί το χώρο μεταξύ των δύο μεμβρανών και είναι απαραίτητος για τη λειτουργική τους επικοινωνία. Οι δύο μεμβράνες έχουν διαφορετική σύσταση σε λιπίδια και πρωτεΐνες. Η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη περιέχει κυρίως πορίνες (porins) που αποτελούν υδρόφιλους διαύλους μέσα στη διπλοστιβάδα των λιπιδίων. Η μεμβράνη αυτή μοιάζει με κόσκινο και είναι διαπερατή σε μόρια με μέγεθος έως και 5 KDa. Τα περισσότερα από αυτά τα μόρια μπορούν να εισέλθουν στο διαμεβρανικό χώρο αλλά δεν μπορούν να περάσουν την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη αποτελεί έναν φραγμό που χαρακτηρίζεται από μεγάλη επιλεκτικότητα. Επιπλέον, περιέχει μεγάλο ποσοστό του φωσφολιπιδίου καρδιολιπίνης (cardiolipin) που βοηθάει την μεμβράνη να γίνει ειδικά στεγανή σε ιόντα. Η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων περιέχει αρκετά ένζυμα του κύκλου του Krebs, της αναπνευστική αλυσίδας (κυτοχρώματα b, c_1, c, a, a_3) και της σύνθεσης ATP. Η μιτοχονδριακή μήτρα, δηλαδή η περιοχή που περικλείεται από τις πτυχώσεις της εσωτερικής μεμβράνης περιέχει πολλά και ετερογενή συστατικά όπως ένζυμα του κύκλου του Krebs (κιτρική συνθετάση, ισοκιτρική αφυδρογονάση, φουμαράση, μαλεϊκή αφυδρογονάση), ένζυμα οξείδωσης λιπαρών οξέων και ακόμα DNA, RNA και ριβοσώματα.

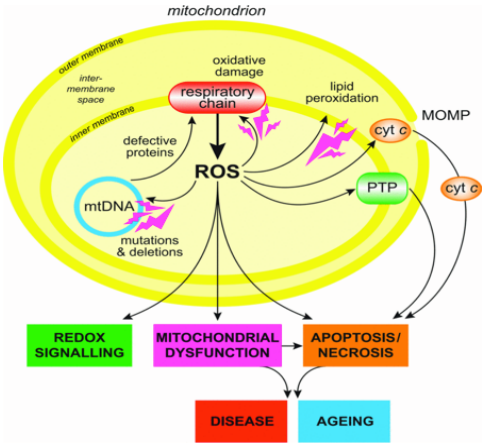


Φωτογραφία μιτοχονδρίου από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Περιλαμβάνει: εξωτερική μεμβράνη, εσωτερική μεμβράνη, μήτρα (matrix), πτυχώσεις (cristae) και ηλεκτρονιόπυκνα σφαιρίδια που περιέχουν ασβέστιο.

Τα μιτοχόνδρια (όπως και «οι κοντινοί συγγενείς» τους οι χλωροπλάστες) είναι ξεχωριστά ευκαρυωτικά οργανίδια καθώς περιέχουν δικό τους γενετικό υλικό που κωδικοποιεί rRNA και tRNA καθώς και mRNAs για την σύνθεση πρωτεϊνών στα οργανιδιακά ριβοσώματα. Όμως η σύνθεση αυτή δεν επαρκεί για τις λειτουργικές και δομικές ανάγκες των οργανιδίων γι' αυτό και γίνεται εισαγωγή μορίων από το κυτταρόπλασμα. Συνήθως ο αριθμός των απαιτούμενων μορίων που συντίθενται στο μιτοχόνδριο είναι μικρός και κατά συνέπεια τα οργανίδια αυτά δεν έχουν πλήρης αυτονομία και χαρακτηρίζονται ως ημιαυτόνομα. Το DNA των μιτοχονδρίων είναι κυκλικό και ποικίλλει σε μέγεθος από 6000 bp για τα μιτοχόνδρια του πρωτόζωου *Plasmodium falciparum* μέχρι 300.000 bp για τα μιτοχόνδρια μερικών φυτικών κυττάρων. Το μιτοχονδριακό DNA έχει βρεθεί σε πολλά ίδια αντίγραφα σε κάθε μιτοχόνδριο. Με το μιτοχονδριακό DNA έχει βρεθεί ότι σχετίζονται τουλάχιστον 20 πρωτεΐνες που δημιουργούν τα μιτοχονδριακά νουκλεοειδή (mt – nucleoid). Πρωτεΐνες αυτές σταθεροποιούν τα νουκλεοειδή και κατευθύνουν την αντιγραφή του mtDNA. Για τα ανώτερα ζώα και τον άνθρωπο, η κληρονομική μεταβίβαση του mtDNA γίνεται μητρικά, αφού από τα δύο γενετικά κύτταρα, μόνο τα μιτοχόνδρια του ωαρίου χρησιμοποιούνται κατά την εμβρυογένεση.

III. Οξειδωτική Βλάβη των Μιτοχονδρίων

Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής αναπνοής παράγονται διάφορα παραπροϊόντα που μπορεί να προκαλέσουν κυτταροτοξικότητα και να οδηγήσουν στο κυτταρικό θάνατο. Σε αυτή την κατηγορία των παραπροϊόντων ανήκουν είναι οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species) όπως είναι το H_2O_2 και το $O_2\bullet^-$. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου και γι' αυτό το λόγο είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε βλάβες από ROS. Τα ROS μπορεί να οδηγήσουν σε οξειδωτική βλάβη των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, των μιτοχονδριακών μεμβρανών και του μιτοχονδριακού DNA. Τα παραπάνω έχουν ως συνέπεια να μειώσουν την ικανότητα των μιτοχονδρίων να παράγουν ATP και να διεξάγουν το ευρύ φάσμα των μεταβολικών λειτουργιών τους, όπως είναι ο κύκλος του Krebs, η οξείδωση των λιπαρών οξέων, ο κύκλος της ουρίας, ο μεταβολισμός των αμινοξέων, η σύνθεση της αίμης κ.α. Η μιτοχονδριακή οξειδωτική βλάβη μπορεί επίσης να αυξήσει την τάση των μιτοχονδρίων να απελευθερώσουν πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου, π.χ. κυτόχρωμα c, στο κυτταρόπλασμα μέσω της αύξησης της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP) που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μηχανισμών αποπτωτικού και νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου. Επιπλέον, η μιτοχονδριακή παραγωγή ROS οδηγεί στην επαγωγή της διαπερατότητας των μιτοχονδριακών πόρων (Mitochondrial Premeability Transition Pore, PTP), η οποία καθιστά την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη διαπερατή σε μικρά μόρια, όπως συμβαίνει σε καταστάσεις ισχαιμίας (Michael P. Murphy, 2009). Κατά συνέπεια, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία συμβάλει στην ανάπτυξη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, π.χ. καρδιομυοπάθειες, πάρκινσον, διαβήτης, αλλά και στην διαδικασία της γήρανσης.



Οξειδωτική μιτοχονδριακή βλάβη (Michael P. Murphy, 2009)

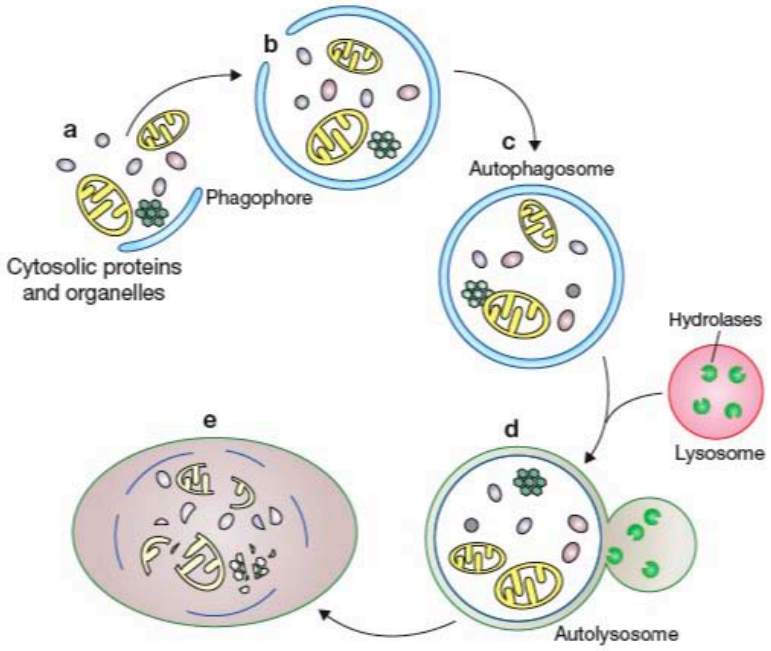
Το κύτταρο, λοιπόν, έχει αναπτύξει μια πληθώρα μηχανισμών που ενεργοποιούνται κατά την οξειδωτική βλάβη των μιτοχονδρίων για αν διατηρήσουν την κυτταρική ομοιόσταση και τη βιωσιμότητα του. Η απομάκρυνση κατεστραμμένων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών μέσω πρωτεολυτικών μηχανισμών, η αποκατάσταση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων από τα υγιή μέσω των μηχανισμών σχάσης και σύντηξης και η απομάκρυνση των μιτοχονδρίων που έχουν υποστεί σοβαρές βλάβες μέσω της διαδικασίας της αυτοφαγίας (μιτοφαγία) αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου των μιτοχονδρίων.

IV. Αυτοφαγία (Autophagy)

Οι βασικές κυτταρικές διαδικασίες για την αποδόμηση κυτταρικών συστατικών είναι η αυτοφαγία και η διάσπαση στα πρωτεοσώματα. 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 τσαπερονών (chaperone-mediated autophagy, CMA) και η μακρο-αυτοφαγία (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. 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 τα μεταφέρουν στα λυσοσώματα. 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 όξυνση, 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). 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 (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).



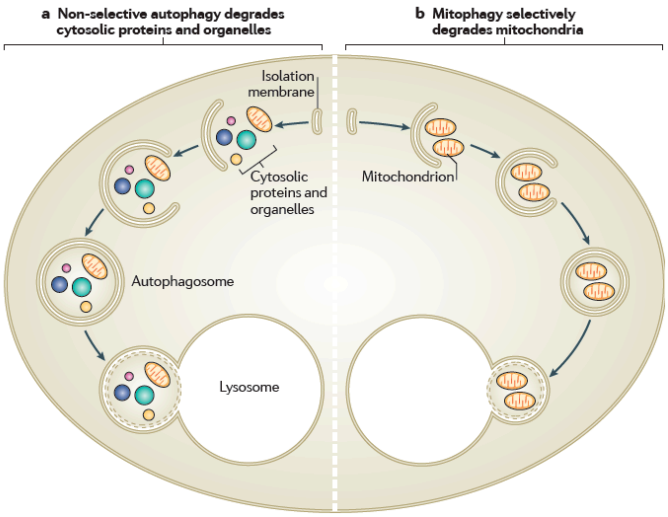
Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της αυτοφαγίας. a,b) κυτταροπλασματικό υλικό εγκολπώνεται από διπλή κυτταροπλασματική μεμβράνη του φαγοφόρου **c)** σχηματισμός του αυτοφαγοσώματος **d)** Η εξωτερική μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος συντήκεται με τη λυσοσωμική και το υπολειπόμενο αυτοφαγικό σωμάτιο απελευθερώνεται στον αυλό του λυσοσώματος **e)** Αποικοδόμηση του κυτταροπλασματικού υλικού (Xie Z. and Klionsky D.J., 2007)

V. Μιτοφαγία (Mitophagy)

Μέχρι σήμερα έχουν παρατηρηθεί δύο μορφές μακρο – αυτοφαγίας η μη – εξειδικευμένη και η εξειδικευμένη αυτοφαγία. Η μη – εξειδικευμένη αυτοφαγία παρατηρείται στο κύτταρο όταν υπάρχει έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Μέσω αυτής της διαδικασίας τα κύτταρα προμηθεύονται με βασικές δομικές μονάδες για τον μεταβολισμό και ενέργεια μέχρι θρεπτικές ουσίες να είναι διαθέσιμες και να μπορούν να ληφθούν ξανά από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Αντίθετα, η εξειδικευμένη αυτοφαγία παρατηρείται όταν υπάρχει πληθώρα θρεπτικών ουσιών και λαμβάνει χώρα για να απομακρύνει τα περιττά/κατεστραμμένα οργανίδια ή πρωτεϊνικά συσσωματώματα που μπορεί να είναι τοξικά για το κύτταρο. Εξειδικευμένες μορφές αυτοφαγίας παρατηρούνται είτε όταν αλλάζει η πηγή των θρεπτικών συστατικών είτε κατά την διάρκεια των αναπτυξιακών διαδικασιών. Κάποιες μορφές εξειδικευμένης αυτοφαγίας που έχουν παρατηρηθεί είναι η αποδόμηση των υπεροξεισωμάτων, των ριβοσωμάτων, κάποιων τμημάτων του ενδοπλασματικού δικτύου και κάποιων παθογόνων που εισβάλουν στον οργανισμό και για τις οποίες χρησιμοποιούνται αντίστοιχα οι αγγλικοί όροι pexophagy, ribophagy, ER-phagy και xenophagy (Youle RJ. and Narendra DP, 2011).

Μια πολύ καλά μελετημένη μορφή εξειδικευμένης αυτοφαγίας είναι η μιτοφαγία (mitophagy), η οποία μεσολαβεί για την επιλεκτική απομάκρυνση των μιτοχονδρίων. Η μιτοφαγία παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε κύτταρα θηλαστικών με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Κατά τη διάρκεια αυτών των μελετών παρατηρήθηκε αυξημένη μιτοχονδριακή απομόνωση σε λυσοσώματα μετά από διέγερση του καταβολισμού των ηπατοκυττάρων με γλουκαγόνο (C. De Duve and Wattiaux, 1966). Χρησιμοποιώντας αυτό το μοντέλο, καθώς και την συνεχή έλλειψη θρεπτικών συστατικών από τις κυτταροκαλλιέργειες (starvation), παρατηρήθηκε η εγκόλπωση μιτοχονδρίων σε μεμβρανικά κυστίδια, στα οποία εντοπίστηκε η μεμβρανική πρωτεΐνη LC3 που βρίσκεται στις μεμβράνες των αυτοφαγοσωμάτων, και η διαδικασία αυτή ονομάστηκε μιτοφαγία (Kim I. *et al.,* 2007). Αυτές οι πρώτες μελέτες έδειξαν ότι η μιτοφαγία ελέγχει των αριθμό των μιτοχονδρίων, έτσι ώστε να συμβαδίζει με τις μεταβολικές ανάγκες των κυττάρων, καθώς και ότι αποτελεί έναν μηχανισμό ελέγχου της «ποιότητας» των μιτοχονδρίων που έχει την δυνατότητα να απομακρύνει τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια από το κύτταρο.

Στο *Saccharomyce cerevisiae* (Nowikovsky A.M. *et al.,* 2007) και σε κύτταρα θηλαστικών (Twig G. *et al.,* 2008) έχει παρατηρηθεί ότι η μιτοφαγία λαμβάνει χώρα πριν από την σχάση (fission) των μιτοχονδρίων (Westermann D. *et al.,* 2010). Λειτουργεί σαν μηχανισμό ποιοτικού ελέγχου όπου απομακρύνει τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια πριν τον διπλασιασμό τους (Tal R. et al., 2007). Πέρα από αυτό τον ποιοτικό έλεγχο η μιτοφαγία έχει δειχθεί ότι απαιτείται για ένα συνεχή έλεγχο που ρυθμίζει τον αριθμό των μιτοχονδρίων ανάλογα με τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων (Kisova I. et al., 2004) , αλλά και κατά τη διάρκεια εξειδικευμένων αναπτυξιακών σταδίων σε κύτταρα θηλαστικών όπως συμβαίνει για παράδειγμα στη διαφοροποιήση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Schweer R.L. et al., 2007; Kundu M. et al., 2008).



Μη – εξειδικευμένη αυτοφαγία και Μιτοφαγία. a) Η μη – εξειδικευμένη αυτοφαγία λαμβάνει χώρα όταν υπάρχει έλλειψη θρεπτικών συστατικών και αποδομεί κυτταροπλασματικό υλικό συμπεριλαμβανομένων πολλών πρωτεϊνών και οργανιδίων. **b)** Η μιτοφαγία λαμβάνει χώρα για να απομακρύνει μόνο μιτοχόνδρια για τους εξής λόγους είτε για να ρυθμίσει τον αριθμό τους σε κάθε κύτταρο ανάλογα με τη μεταβολική δραστηριότητά του είτε για να απομακρύνει τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια. (Youle RJ. and Narendra DP, 2011)

Να. Μιτοφαγία στη ζύμη

Η διαδικασία της μιτοφαγίας παρατηρήθηκε στο *Saccharomyce cerevisiae* γεγονός που βοήθησε κατά πολύ στη μελέτη των μοριακών της μηχανισμών. Πρόσφατα, έρευνες από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Atg32 είναι απαραίτητη για τη διαδικασία της μιτοφαγίας (Okamoto K. et al., 2009; Kanki T. et al., 2009). Η πρωτεΐνη Atg32 έχει μέγεθος ~60KDa και διαπερνά την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, το καρβοξυλικό της άκρο βρίσκεται στον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου και το αμινοτελικό της στο κυτταρόπλασμα. Παρ' ότι είναι απαραίτητη για την διαδικασία της μιτοφαγίας δεν συμβαίνει το ίδιο με τη διαδικασία της μη – εξειδικευμένης αυτοφαγίας (Kanki T. et al., 2009).

Όταν επάγεται η μιτοφαγία η Atg32 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Atg11, η οποία έχει τον ρόλο του adaptor, και στη συνέχεια αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Atg8 που βρίσκεται στην μεμβράνη των αυτοφαγοσωμάτων. Επιπλέον, το κυτταροπλασματικό μέρος της πρωτεΐνης Atg32 περιέχει το μοτίβο των αμινοξέων WXXL (WXXL – like motif) που είναι γνωστό ότι χρειάζεται για να αλληλεπιδράσει μια πρωτεΐνη με την πρωτεΐνη των αυτοφαγοσωμάτων Atg8. Έτσι, λοιπόν, η Atg32 μπορεί να αλληλεπιδράσει άμεσα και έμμεσα με την Atg8 και να οδηγήσει στην εγκόλπωση των μιτοχονδρίων από το αυτοφαγόσωμα.

Νβ. Μιτοφαγία κατά τη διαφοροποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων

Απομάκρυνση των μιτοχονδρίων πραγματοποιείται και κατά την διάρκεια εξειδικευμένων αναπτυξιακών σταδίων. Στα θηλαστικά, για παράδειγμα, κατά την διαφοροποίηση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων σε ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια απομακρύνεται ο πυρήνας και όλα τα οργανίδια για να έχουν τα κύτταρα αυτά αρκετό χώρο να μεταφέρουν οξυγόνο. Έχει δειχθεί ότι τα μιτοχόνδρια από τα πρόδρομα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται με τη διαδικασία της μιτοφαγίας (Kundu M. et al., 2008; Mortensen M. et al., 2010; Zhang J. et al., 2009).

Η πρωτεΐνη NIP3L – like X (NIX) που βρίσκεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη συμμετέχει στη διαδικασία της απομάκρυνσης των μιτοχονδρίων από τα πρόδρομα ερυθροκύτταρα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε στα ερυθροκύτταρα που απομονώθηκαν από knock – out ποντίκια *NIX* $^{-/-}$ υπάρχει αυξημένος αριθμός μιτοχονδρίων (Schweer R.L. et al., 2007; Aerbajinai W. et al., 2003; Sandoval H. et al., 2008). Η πρωτεΐνη NIX περιέχει στην αμινοξική της αλληλουχία που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα το μοτίβο WXXL, το οποίο χρειάζεται για την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη LC3 που είναι ομόλογη της πρωτεΐνης Atg8 της ζύμης. Έτσι, κατά την διάρκεια της μιτοφαγία στα ερυθροκύτταρα η NIX αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη LC3 και ακολουθεί η εγκόλπωση των μιτοχονδρίων από τα αυτοφαγοσώματα (Schwarten M. et al., 2009; Novak I. et al., 2010).

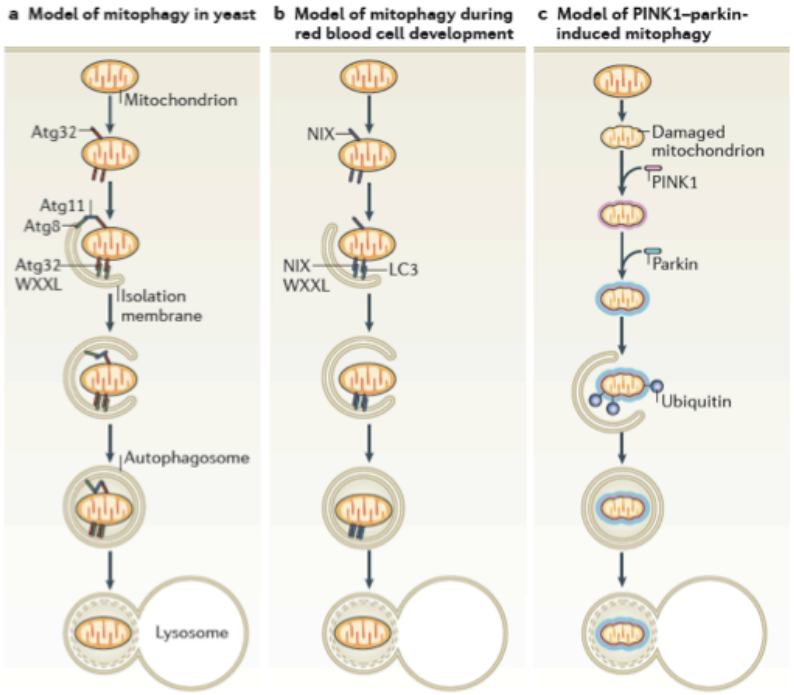
Vγ. Επαγωγή της μιτοφαγίας μέσω του μονοπατιού Pink1 – Parkin

Πρόσφατες μελέτες έχουν συνδέσει την ασθένεια του Πάρκινσον με την ελαττωματική μιτοφαγία. Οι μεταλλαγές δύο γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν για την κινάση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης PINK1 και για την κυτταροπλασματική Ε3 λιγάση ουβικιτίνης (E3 – ubiquitin ligase) Parkin, οδηγούν σε ανάπτυξη της ασθένειας του Παρκινσον (Valente E.M. et al., 2004; Kitada T. et al., 1998). Οι δύο αυτές πρωτεΐνες έχουν βρεθεί ότι λειτουργούν στο ίδιο μονοπάτι για να καταστείλουν τις μιτοχονδριακές βλάβες στη *Drosophila melanogaster* και η απώλειά τους οδηγεί σε δυσλειτουργία των μυών, των ντοπαμινεργικών νευρώνων καθώς και σε στειρότητα (Greene J.C. et al., 2003; Park J. et al., 2006; Clark I.E. et al., 2006).

Έπειτα από επαγωγή στρες με τη χρήση συγκεκριμένων χημικών ουσιών (mitochondrial uncouplers), οι οποίες προκαλούν εκπόλωση (depolarization) των μιτοχονδριακών μεμβρανών, παρατηρήθηκε ότι η Parkin μετακινείται και συσσωρεύεται από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ύστερα από την καταστολή της σύντηξης (fusion) των μιτοχονδρίων, η Parkin να συσσωρεύεται στα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια και όχι στα υγιή. Έτσι, λοιπόν, βάσει της επιλεκτικής συσσώρευσης της Parkin στα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια και τη μετέπειτα επαγωγή της μιτοφαγίας για την απομάκρυνσή τους, προτάθηκε ότι η Parkin συμμετέχει στο μηχανισμό ποιοτικού ελέγχου των μιτοχονδρίων μέσω του οποίου διατηρείται ο υγιής πληθυσμός των οργανιδίων(Narendra D.P. et al., 2008).

Για τη μετακίνηση της Parkin στα εκπολωμένα μιτοχόνδρια και την επαγωγή της Parkin – εξαρτώμενης μιτοφαγίας απαιτείται η ενεργότητα της κινάσης PINK1 (Narendra D.P. et al., 2010; Vives – Bauza C. et al., 2010; Geiser S. et al., 2010; Matsuda N. et al., 2010). Η υπερέκφραση της PINK1 αρκεί για να μετακινηθεί η Parkin στα μιτοχόνδρια και να επαχθεί η μιτοφαγία απουσία εκπολωμένων μιτοχονδρίων (Kim Y. et al., 2008; Kawajiri S. et al., 2010). Επιπλέον, μέσω πειραμάτων γενετικής (πειραμάτων επίστασης) στη *Drosophila melanogaster* δείχθηκε *in vivo* ότι η PINK1 και η Parkin συμμετέχουν στο ίδιο μονοπάτι για να διατηρήσουν τη ομοιόσταση των μιτοχονδρίων (Park J. et al., 2006; Clark I.E. et al., 2006; Yang Y. et al., 2006). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού παρατηρήθηκε, η πρωτεΐνη NIX να «δίνει» σήμα στην Parkin για να μετακινηθεί στα μιτοχόνδρια και να επαχθεί με αυτόν τον τρόπο η Parkin – εξαρτώμενη μιτοφαγία (Ding W.X. et al., 2010). Όμως είναι άγνωστο το πώς η PINK1 αναγνωρίζει τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια και μεταφέρει το σήμα στη Parkin. Κάποια δεδομένα προτείνουν ότι η πρωτεόλυση της PINK1 μέσα στα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια καταστέλλεται με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται η PINK1 στα μιτοχόνδρια αυτά (Narendra D.P. et al., 2008; Matsuda N. et al., 2010). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η PINK1 αλληλεπιδρά με την Parkin και την φωσφορυλιώνει (Kim Y. et al., 2008; Geiser S. et al., 2010; Shiba K. et al., 2009; Um J.W. et al., 2009; Sha D. et al., 2010). Παρ' όλα αυτά όμως ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο η PINK1 στρατολογεί την Parkin στα μιτοχόνδρια παραμένει άγνωστος.

Η επαγωγή της μιτοφαγίας ύστερα από στρατολόγηση της Parkin πιστεύεται ότι περιλαμβάνει την ουβικιτινυλίωση κάποιων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (Matsuda N. et al., 2010). Επιπλέον, παρατηρήθηκε, έπειτα από την εκπόλωση μιτοχονδρίων, συσσώρευση της πρωτεΐνης p62 στα μιτοχόνδρια. Η πρωτεΐνη p62 είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με ουβικιτινυλιωμένα συσσωματώματα πρωτεϊνών και στη συνέχεια αλληλεπιδρά με την LC3, οδηγώντας στην εγκόλπωση τους από τις μεμβράνες των αυτοφαγοσωμάτων (Pankiv S. et al., 2007). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η p62 αλληλεπιδρά με ουβικιτινυλιωμένες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες αλλά δεν έχει ακόμα αποδειχθεί για το εάν είναι απαραίτητη αυτή η αλληλεπίδραση για την επαγωγή της μιτοφαγίας ή όχι (Geiser S. et al., 2010; Ding W.X. et al., 2010; Lee J. et al., 2010; Okatsu K. et al., 2010; Narendra D. et al., 2010). Οι mitofusin 1και mitofusin 2, ο παράγοντας MARF (Mitofusin Assembly Regulatory Factor) στη μύγα και το κανάλι VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) στα κύτταρα των θηλαστικών που βρίσκονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, αποτελούν μερικά μιτοχονδριακά υποστρώματα της Parkin (Dawson T.M. and Dawson V.L., 2010; Zivizni E. et al., 2010; Poole A.C et al., 2010; Gegg M.E. et al., 2010)



Τα μονοπάτια του Atg32, NIX και PINK1 – Parkin που ελέγχουν την μιτοφαγία. a) Στη ζύμη η πρωτεΐνη Atg32 που βρίσκεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα με την Atg8 και επάγει την εγκόλπωση των μιτοχονδρίων από τις μεμβράνες των αυτοφαγοσωμάτων **b)** Κατά τη διαφοροποίηση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων σε ώριμα ερυθροκύτταρα η πρωτεΐνη NIX που βρίσκεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη αλληλεπιδρά μέσω του WXXL μοτίβου με την πρωτεΐνη LC3 και επάγει την εγκόλπωση των μιτοχονδρίων από τις μεμβράνες των αυτοφαγοσωμάτων και την περαιτέρω απομάκρυνσή τους **c)** Όταν υπάρχουν κατεστραμμένα μιτοχόνδρια η κινάση PINK1 συσσωρεύεται σε αυτά και στρατολογεί την E3 λιγάση ουβικιτίνης Parkin. Στη συνέχεια, η Parkin ουβικιτινυλιώνει κάποιες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες και προκαλεί την εγκόλπωση των μιτοχονδρίων από τις μεμβράνες των αυτοφαγοσωμάτων. (Youle RJ. and Narendra DP, 2011)

Υλικά & Μέθοδοι

Α. Μοριακή Βιολογία

1. Απομόνωση γενωμικού DNA από τον *C. elegans*

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από τον *C. elegans* ακολουθήθηκε η παρακάτω μέθοδος. Η μέθοδος αυτή στηρίχθηκε στο πρωτόκολλο "Standard protocol for human or animal tissue and cultured cells" (Nucleospin® tissue, Macherey-Nagel).

2. Δημιουργία και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E. coli (competent cells)

2.1 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων E. coli

Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε για την δημιουργία δεκτικών κυττάρων E.coli στηρίχτηκε στην προσέγγιση που περιγράφεται στο (Sambrook et al., 2001) και εφαρμόστηκε με κάποιες τροποποιήσεις. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν και μετατράπηκαν σε δεκτικά αποτελούσαν κύτταρα του XL-1 blue στελέχους του βακτηρίου *E. coli*. Αυτό το στέλεχος (ανθεκτικό στην τετρακυκλίνη) επιτρέπει το blue-white screening και αποτελεί έναν ιδανικό ξενιστή για καθημερινές εφαρμογές κλωνοποίησης.

Competent solution

- 50mM $CaCl_2$
- 10% (v/v) glycerol

Filtered and stored at 4°C

- Λήψη ενός βακτηριολογικού σωλήνα και προσθήκη 5ml θρεπτικού μέσου LB
- Προσθήκη τετρακυκλίνης (stock 10mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml (δηλαδή προσθήκη 5μl τετρακυκλίνης σε 5ml LB)
- Πραγματοποίηση επιμόλυνσης με λίγες αποικίες XL1-blue κυττάρων (single colony inoculation)
- Επώαση της αρχικής καλλιέργειας (starter culture) στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (στον shaker) overnight (~16 ώρες)
- Επιμόλυνση 50ml θρεπτικού μέσου LB με 500μl από την αρχική καλλιέργεια κυττάρων (δηλαδή πραγματοποιείται αραίωση της αρχικής καλλιέργειας 1/100)
- Επώαση της καλλιέργειας στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (στον shaker) για περίπου 3 ώρες
- Συνεχής παρατήρηση της OD600 της καλλιέργειας των κυττάρων
- Συλλογή της καλλιέργειας όταν η OD600 κυμαίνεται από ~0.4-0.6 και τοποθέτησή της στον πάγο
- Διαμοιρασμός της καλλιέργειας σε δύο falcon tubes των 50ml
- Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης για 10min στις 3000rpm στους 4°C
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου
- Μεταφορά και των δύο πελεττών σε ένα falcon
- Προσθήκη 10ml παγωμένου competent solution
- Προσεκτική επαναδιάλυση της πελέττας με την χρήση της πιπέττας
- Επώαση των κυττάρων στον πάγο (4oC) για 30min (ελαφριές αναδεύσεις κατά την διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος)
- Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης για 5min στις 2000rpm στους 4°C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Προσθήκη competent solution (μέχρι Vτελ=2ml)
- Ελαφριά επαναδιάλυση της πελέττας με την πιπέττα
- Διαμοιρασμός σε aliquots των 100μl και αποθήκευση στους -80°C

Η όλη διαδικασία γίνεται στον πάγο (4°C). Η τιμή της OD600 είναι αρκετά κρίσιμη για την επιτυχία της διαδικασίας και η μέτρησή της μπορεί να γίνει είτε εμπειρικά (με το μάτι) είτε με την χρήση φασματοφωτόμετρου. Όσον αφορά το competent solution μετά την δημιουργία του (φροντίζεται να είναι πρόσφατο), φιλτράρεται και αποθηκεύεται στους 4°C και χρησιμοποιείται παγωμένο στην όλη διαδικασία.

2.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli*

Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε για τον μετασχηματισμό με πλασμιδιακό DNA των δεκτικών κυττάρων που δημιουργήθηκαν με την παραπάνω διαδικασία στηρίχτηκε στην πειραματική διαδικασία που περιγράφεται.

- Λήψη δεκτικών κυττάρων από τους -80°C
- Τοποθέτηση στον πάγο (4°C) και αναμονή για ~3min προκειμένου να «ξεπαγώσουν» τα κύτταρα
- Προσθήκη 5-10μl πλασμιδιακού DNA και ελαφριά ανάδευση με την πιπέττα
- Επώαση στον πάγο (4°C) για 30min (ελαφριές αναδεύσεις κατά την διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος)
- Τοποθέτηση στους 42°C για 45sec (heat shock)
- Επώαση για 2min στον πάγο (4°C)
- Προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB (ή SOC)
- Επώαση για 1h στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (στον shaker)
- Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης για 2min στις 3000rpm σε RT
- Απομάκρυνση υπερκείμενου (να παραμείνουν ~100-150μl στο eppendorf)
- Προσεκτική επαναδιάλυση της πελέττας με την πιπέττα
- Επίστρωση των κυττάρων σε πιάτα με γυάλινη ράβδο (plating)
- Επώαση των πιάτων στους 37°C overnight

3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA τόσο σε μικρή (όγκος καλλιέργειας κυττάρων 1.5ml) όσο και σε μεγάλη (όγκος καλλιέργειας κυττάρων 50ml) κλίμακα με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης των κυττάρων όπως περιγράφεται (Sambrook et al., 2001) με κάποιες τροποποιήσεις

Διάλυμα P1	**Διάλυμα P2 (για Vτελ=10ml)**	**Διάλυμα P3 (για Vτελ=100ml)**
• 50mM glucose (or dextrose) • 25mM Tris-Cl (pH=8) • 10mM EDTA (pH=8)	• 0.2N NaOH (400μl από 5N stock) • 1% SDS (500μl από 20% stock) • 9.1ml ddH_2O	• 3M potassium acetate (60ml από 5M stock) • 11.5ml glacial acetic acid • 28.5ml ddH_2O

3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης κυττάρων σε μεγάλη κλίμακα (large-prep)

Το large-prep αφορά όγκο καλλιέργειας κυττάρων 100ml. Η καλλιέργεια διαμοιράζεται σε 2 falcon (50ml στο κάθε ένα) και τα βήματα που ακολουθούνται για την απομόνωση του πλασμιδιακού στο ένα από αυτά περιγράφεται παρακάτω. Στις πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν τα πλασμίδια που είχε πραγματοποιηθεί ο μετασχηματισμός των κυττάρων έφεραν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.

- Προσθήκη 100μl Amp (stock 100mg/ml) σε 100ml LB (τελική συγκέντρωση 100μg/ml)
- Επιμόλυνση του θρεπτικού μέσου με αποικίες κυττάρων (στις περισσότερες περιπτώσεις πραγματοποιείται single colony inoculation)
- Επώαση της καλλιέργειας στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση overnight (στον shaker)
- Διαμοιρασμός της καλλιέργειας σε δύο falcon των 50ml
- Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης για 10min στις 3000rpm (4°C)
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Προσθήκη 20ml ddH2O σε κάθε falcon («washing» κυττάρων)
- Πλήρης επαναδιάλυση της πελέττας με vortex
- Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης για 10min στις 3000rpm (4°C)
- Απομάκρυνση υπερκείμενου

**Τιρ: Το ένα από τα δύο falcon με τα κύτταρα το αποθηκεύουμε στους -20oC σε περίπτωση κάποιου σφάλματος στην διαδικασία δημιουργίας μιας πλασμιδιακής κατασκευής (χρήση ως δικλείδα ασφαλείας)*

- Προσθήκη 5ml διαλύματος P1 και πλήρης επαναδιάλυση της πελέττας με την πιπέττα
- Προσθήκη 10μl RNase A (10mg/ml)
- Επώαση για ~5-10min (χωρίς ωστόσο η αναμονή να είναι απαραίτητη)
- Προσθήκη 5ml διαλύματος P2
- Επώαση στον πάγο (4°C). Μέγιστος χρόνος αναμονής=5min (κατά την διάρκεια της αναμονής ~8-10 ελαφριές αναδεύσεις)
- Προσθήκη 5ml διαλύματος P3 για «εξουδετέρωση» διαλύματος P2
- Επώαση στον πάγο (4°C). (Πραγματοποίηση πολλών και καλών αναδεύσεων). Η χρονική διάρκεια αυτού του βήματος μπορεί να υπερβαίνει και τα 10min)
- Τα κυτταρικά υπολείμματα μετά την λύση των κυττάρων παρατηρούνται με μυξώδη μορφή μέσα στο falcon
- Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης για 15min στις 3200rpm (4°C)
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο falcon μετά από πέρασμα από υαλοβάμβακα
- Προσθήκη 0.6-0.8 όγκων ισοπροπανόλης. Καλή ανάδευση
- Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης για 30min στις 3500rpm (4°C)
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και στέγνωμα της πελέττας σε RT (μετά από αναστροφή του falcon σε ένα κομμάτι χαρτιού)
- Επαναδιάλυση της πελέττας με την πιπέττα σε 1ml 70% (v/v) αιθανόλης
- Μεταφορά σε ένα eppendorf
- Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης για 15-20min στις 13000rpm (RT)
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Στέγνωμα σε χαρτί
- Επαναδιάλυση της πελέττας σε 100μl ddH2O

Σε περίπτωση που το πλασμιδιακό DNA θα χρησιμοποιηθεί για τον μετασχηματισμό του νηματώδους τότε πραγματοποιείται καθαρισμός με τη χρήση στήλης ιοντοανταλλαγής (QIAGEN-tip 20). Η αναμενόμενη συγκέντρωση πλασμιδιακού DNA που μπορεί να απομονωθεί από την παραπάνω διαδικασία κυμαίνεται από 5-6μg/μl.

3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης κυττάρων σε μικρή κλίμακα (mini-prep)

Λήψη αποστειρωμένων βακτηριολογικών σωλήνων και αρίθμησή τους ανάλογα με τον αριθμό των αποικιών που έχουν προκύψει από τον μετασχηματισμό των κυττάρων με το επιθυμητό πλασμίδιο

- Προσθήκη 1.5-2ml LB + Amp (100μg/ml) σε κάθε σωλήνα
- Single colony inoculation σε κάθε σωλήνα
- Επώαση των καλλιεργειών στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση overnight (στον shaker)
- Αρίθμηση τόσων eppendorfs όσοι και οι βακτηριολογικοί σωλήνες
- Μεταφορά σε κάθε αριθμημένο eppendorf 1-1.5ml καλλιέργειας κυττάρων από τον αντίστοιχο βακτηριολογικό σωλήνα
- Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης για 3-5min στις 8000rpm (RT)
- Απομάκρυνση υπερκείμενου με την χρήση αναρροφητήρα (aspirator)
- Προσθήκη 150μl διαλύματος P1+RNase A και πλήρης επαναδιάλυση της πελέττας με vortex
- Επώαση για 5-10min (RT) (αυτό το βήμα δεν είναι απαραίτητο)
- Προσθήκη 150μl διαλύματος P2
- Επώαση για 5min (μέγιστος χρόνος αναμονής) σε RT. Κατά την διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος ανακίνηση του eppendorf 8-10 φορές
- Προσθήκη 150μl διαλύματος P3 για εξουδετέρωση του διαλύματος P2
- Επώαση για τουλάχιστον 5min στον πάγο (4°C)
- Τα κυτταρικά υπολείμματα μετά την λύση των κυττάρων παρατηρούνται με μυξώδη μορφή μέσα στο eppendorf
- Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης για 10min στις 13000rpm (RT)
- Μεταφορά του υπερκειμένου με πιπέττα σε νέα αντίστοιχα αριθμημένα eppendorf
- Προσθήκη 0.6 όγκων ισοπροπανόλης και καλή ανάδευση
- Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης για 20min στις 13000rpm (RT)
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Προσθήκη 500-600μl 70% (v/v) αιθανόλης

- Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης για 20min στις 13000rpm (RT)
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Αναστροφή των eppendorfs και στέγνωμα τους σε ένα κομμάτι χαρτί σε RT (το στέγνωμά τους επίσης μπορεί να γίνει με τοποθέτησή τους στους 42°C στο heat-block)
- Επαναδιάλυση της πελέττας σε 30μl ddH2O
- Η αναμενόμενη συγκέντρωση πλασμιδιακού DNA που μπορεί να απομονωθεί από την παραπάνω διαδικασία κυμαίνεται από 0.5-1μg/μl.

4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια τεχνική με την οποία πετυχαίνεις τον εκλετκτικό πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA αρκεί να είναι γνωστές οι αλληλουχίες στα άκρα του τμήματος DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Τα συστατικά μιας αντίδρασης PCR είναι τα εξής: εκμαγείο, εκκινητές εκατέρωθεν του στόχου, ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου, dNTPs, Mg2+, Taq DNA Polymerase.

Η διαδικασία του PCR όπως είναι γνωστό περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια. Αρχικά γίνεται θέρμανση του DNA-μήτρα (DNA template) στους 92-95°C για την αποδιάταξη του DNA (DNA denaturation). Στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται στους 55-65°C για την πρόσδεση των κατάλληλων εκκινητών (primer's annealing) στη μονόκλωνη πλέον μήτρα και σε ένα επόμενο στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C για να δράσει η πολυμεράση και να πραγματοποιηθεί η σύνθεση του τμήματος του DNA μεταξύ των εκκινητών.

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό τμήματος του γονιδίου *dct-1* από το γονιδίωμα του *C. elegans* (N2, αγρίου τύπου). Ακολουθεί αναφορά των αλληλουχιών που απομονώθηκαν , καθώς και των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν γι' αυτόν το σκοπό.

***dct-1* in pL4440:**

Τμήμα DNA μήκους ~ 1171 bp που περιείχε την κωδική περιοχή του γονιδίου *dct-1* απομονώθηκε με PCR από το γονιδίωμα του *C. elegans* με ολιγονουκλεπτίδια:

FW*dct-1*: 5' – TTGCGTCCGGCGAGAAGACG – 3'
RV*dct-1*: 5' – CTGCTGCTCCAACGACAAAGCTG – 3'

5. Κλωνοποίηση τμήματος του γονιδίου *dct-1*

Για την κλωνοποίηση τμήματος του γονιδίου *dct-1* στον πλασμιδιακό φορέα pCR®II-TOPO® και γενικά για τμήματα DNA που έχουν πολλαπλασιαστεί μέσω PCR με την χρήση Taq πολυμεράσης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται (pCR®II-TOPO®, TOPO TA Cloning®, Invitrogen), ενώ για το screening των βακτηριακών αποικιών ακολουθήθηκε η προσέγγιση που στηρίζεται στην χρήση του χρωμογόνου υποστρώματος XGAL και IPTG (blue-white screening) (Sambrook et al., 2001).

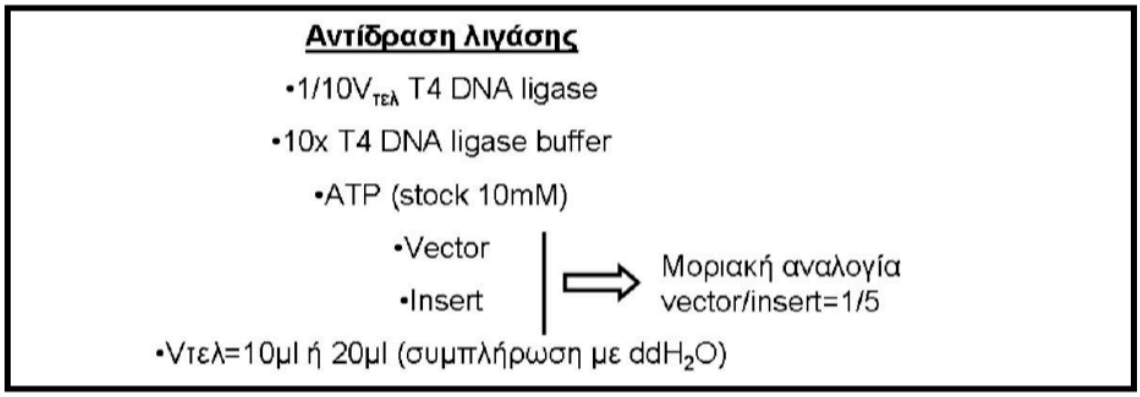
6. Πέψη και Αντίδραση λιγάσης

Για τη δημιουργία ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, απαιτείται ένας πλασμιδιακός φορέας και το επιθυμητό DNA-ένθεμα που πρόκειται να εισαχθεί στο πλασμίδιο. Απαραίτητα

στοιχεία των πλασμιδίων είναι η αρχή έναρξης αντιγραφής του, γονίδιο μάρτυρας ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό και ένας πολυσυνδέτης (ένα τμήμα που περιέχει κατάλληλες θέσεις περιορισμού).

Τα περιοριστικά ένζυμα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες παλίνδρομες αλληλουχίες στο δίκλωνο μόριο του DNA μεγέθους 4-6 νουκλεοτιδικών βάσεων και τις κόβουν αφήνοντας είτε μονόκλωνα είτε τυφλά άκρα. Για την δράση των ενζύμων αυτών απαιτούνται συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και κατάλληλο μικρο-περιβάλλον (pH, συγκέντρωση αλάτων).

Η συγκόλληση πραγματοποιείται με την βοήθεια δράσης του ενζύμου T4 DNA λιγάσης, η οποία ενώνει τα δίκλωνα μόρια DNA δημιουργώντας φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ της φωσφορικής ομάδας του 5' άκρου και της υδροξυλικής ομάδας του 3' άκρου. Το ένθεμα στην αντίδραση έχει 10 πλάσια μοριακότητα σε σχέση με τον φορέα.
Σε γενικές γραμμές τα συστατικά της αντίδρασης και η αναλογία τους φαίνονται παρακάτω:



Ο τελικός όγκος της αντίδρασης μπορεί να είναι είτε 10 ή 20μl. Για να ευνοηθούν οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις και όχι οι ενδομοριακές (μεταξύ των μορίων του ενθέματος ή του πλασμιδίου), λαμβάνοντας υπόψιν την αναλογία μήκους μεταξύ του φορέα και του ενθέματος καθώς και τις συγκεντρώσεις τους που έχουν απομονωθεί, αυτό που πρέπει να επιτευχθεί είναι μια αναλογία vector:insert ίση με 1:5 (αναλογία μήκους x αναλογία συγκεντρώσεων=1:5). Η αντίδραση είναι ενδόθερμη και το ATP χρησιμοποιείται στην αντίδραση για την παροχή ενέργειας για τον σχηματισμό των απαραίτητων φωσφοδιεστερικών δεσμών για την συνένωση των δύο τμημάτων DNA. Η επώαση της αντίδρασης γίνεται στους 25°C (RT) και μπορεί να διαρκέσει από 3 ώρες έως και overnight.

7. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Για τον καθαρισμό τμημάτων DNA που είχαν απομονωθεί από πήκτωμα αγαρόζης (1%) (προσεκτική κοπή με λεπίδα του τμήματος του πηκτώματος που περιείχε την επιθυμητή ζώνη) ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο «Protocol for DNA extraction from agarose gels» (Nucleospin® Extract II, Macherey-Nagel).

Β. Μέθοδοι στον *C. elegans*

1. 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 lacIqZΔM15 Tn10* (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).

2. Θρεπτικά μέσα και διαλύματα

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

Α) NGM (Nematode Growth Media) (1lt):

- 3g NaCl
- 2.5g bactopeptone
- 0.2g streptomycin
- 17g agar
- 1 ml CaCl2 1M
- 1 ml MgSO4 1M
- 1 ml cholesterol (5mg/ml σε 100% αιθανόλη)
- 1 ml nystatin (100mg/ml σε 70% αιθανόλη)
- 25 ml K·PO4* 1M, pH 6

Τα διαλύματα CaCl2, MgSO4, K·PO4, 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.

Β) Υδατικό διάλυμα Μ9 (1lt):

- 3gr KH2PO4
- 6gr Na2HPO4
- 5g NaCl
- 1 ml MgSO4 1M

Γ) Διάλυμα ψύξης νηματωδών - Freezing solution (1lt):

- 5,85g NaCl
- 50 ml K·PO4* 1M, pH 6
- ~200ml glycerol
- 3 ml MgSO4 1M (Προστίθεται μετά την αποστείρωση.)

* Το διάλυμα του K·PO4 περιέχει 204.4gr KH2PO4 και 114.12gr K2HPO4 σε τελικό όγκο νερού 2000ml.

Για την ανάπτυξη των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα θρεπτικά μέσα:

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

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

Β) LB + ampicillin:

Το αντιβιοτικό ampicillin προστίθεται στο LB, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 100μg/ml.

Γ) LB + tetracycline:

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

3. Κατασκευή πλασμιδίων για την έκφραση πρωτεϊνών στον *C. elegans*

Για την κατασκευή των πλασμιδίων που περιγράφονται στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν οι συνηθισμένες τεχνικές κλωνοποίησης και υποκλωνοποίησης (όπως αναγράφονται αναλυτικά παραπάνω). 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.

4. 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. Τα κύτταρα HT115 (DE3) χρειάζονται IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) για να εκφράσουν την T7 πολυμεράση.

Πιο αναλυτικά, εφαρμόστηκε το εξής πρωτόκολλο:

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

- Μεταφορά ~250μl από την προηγούμενη καλλιέργεια σε 5ml LB+amp και επώαση για 3-4h υπό σταθερή ανάδευση στους 37°C, ώσπου η νέα καλλιέργεια να προσεγγίσει την εκθετική φάση αύξησης

- Τοποθέτηση σε τρυβλίο NGM 120μl τελικής καλλιέργειας με 2mM IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) κι επώαση για 16-18h σε θερμοκρασία δωματίου.

- Μεταφορά στα τρυβλία αυγών ή νηματωδών απαλλαγμένων από άλλα στελέχη βακτηρίων

- Επώαση στους 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).

5. 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 επαναδιαλύθηκαν σε M9.

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

Α) Διατήρηση στους 15°C:

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.

Β) Διατήρηση στους -80°C:

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:

1. 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.

2. Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος ψύξης νηματωδών (θερμοκρασίας 4°C) και ανάδευση.

3. Μεταφορά του εναιωρήματος σε 10 τουλάχιστον ειδικά δοχεία των 2ml, όπου έχουν αναγραφεί τα χαρακτηριστικά του στελέχους, και τοποθέτηση αυτών στους -80°C.

4. 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.

6. 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 ***bleaching solution*** με την ακόλουθη σύσταση:

1ml NaOH 5N
2ml NaOCl 5%
7ml ddH_2O

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 13000rpm και ξεπλένονταν ~2 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.

7. 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 χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω μέθοδος:

Θερμικό σοκ (Heat shock):

- 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.

8. Πειράματα γήρανσης

Συγχρονισμένοι πληθυσμοί δημιουργήθηκαν με τοποθέτηση 20-30 ενήλικων ερμαφρόδιτων ζώων σε καθαρά τρυβλία NGM, τα οποία προηγουμένως είχαν επιστρωθεί με *Escherichia coli* (OP50) όπου παρέμειναν για διάστημα 4 – 6 ωρών, εωσότου «αφήσουν» ένα αρκετά μεγάλο αριθμό αυγών. Στη συνέχεια, όταν τα ζώα βρίσκονταν σε L4 αναπτυξιακό στάδιο μεταφέρθηκαν σε νέα καθαρά τρυβλία NGM. Σε όλα τα πειράματα ως πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ερμαφρόδιτα ζώα αγρίου στελέχους (N2 Bristol) ή τα μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία δεν υφίσταντο οποιαδήποτε τροποποίηση. Σε RNAi πειράματα γήρανσης ερμαφρόδιτα ζώα τοποθετήθηκαν σε καθαρά τρυβλία NGM (RNAi) τα οποία περιείχαν 1mM IPTG και είχαν επιστρωθεί με HT115(DE3) βακτήρια μετασχηματισμένα είτε με κενό τον πλασμιδιακό φορέα pL4440 (πείραμα ελέγχου) ή με τον πλασμιδιακό φορέα pL4440 ο οποίος περιείχε την αλληλουχία του γονιδίου-στόχου. Για το συγχρονισμό του πληθυσμού, οι απόγονοι αναπτύχθηκαν σε NGM (RNAi) τα οποία είχαν προηγουμένως επιστρωθεί με HT115(DE3) βακτήρια μετασχηματισμένα με κενό πλασμιδιακό φορέα pL4440. Με τον τρόπο αυτό, αποκλείσαμε τυχόν επιπτώσεις που ενδεχομένως να είχε η σίγηση του γονιδίου-στόχου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του οργανισμού. Όλα τα πειράματα γήρανσης πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 20°C. Επιπλέον στα τρυβλία NGM τα ζώα τοποθετήθηκαν ανά ομάδες των 20-30 ατόμων, με συνολικό αριθμό 60-100 ατόμων σε κάθε πείραμα. Ως t=0 ορίστηκε η πρώτη ημέρα ενηλικίωσης. Τα ζώα μεταφέρονταν σε νέα τρυβλία κάθε 2 ημέρες για την αποφυγή είτε συνθηκών έλλειψης τροφής, η οποία θα είχε ως συνέπεια την αλλαγή της μορφολογίας των ζώων, ή περιπτώσεις μολύνσεων. Οι πληθυσμοί παρακολουθούνταν καθημερινά για την ύπαρξη, ικανότητα κίνησης έπειτα από απτικό ερέθισμα και/ή παλμών του φάρυγγα έως και το τέλος της ζωής τους.

Κάθε πείραμα γήρανσης που παρατίθεται στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον 3 φορές και το κάθε διάγραμμα αποτελεί αντιπροσωπευτική εικόνα του κάθε πειράματος.

9. Real – Time PCR

Η Real – Time PCR είναι μια τεχνική που άρχισε να αναπτύσσεται πρόσφατα, και έχει βελτιώσει σημαντικά την ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων. Κατά την real-time PCR ανιχνεύονται και ποσοτικοποιούνται τα προϊόντα που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου της αντίδρασης. Οι μέθοδοι που είναι σήμερα διαθέσιμες χρησιμοποιούν φθορίζουσες ουσίες και ένα σύστημα μέτρησης (ανίχνευσης) του φθορισμού που είναι προσαρμοσμένο στον thermocycler. Προφανώς για να επαχθεί ο φθορισμός πρέπει να υπάρχει ακτινοβολία διέγερσης, η οποία παράγεται από ένα laser. Το βασικότερο πλεονέκτημα της Real – Time PCR είναι ότι επιτρέπει την ανίχνευση του προϊόντος της PCR κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων (κύκλων) της αντίδρασης. Το να μπορούμε να μετρήσουμε την κινητική της αντίδρασης στα αρχικά της στάδια είναι σημαντικό πλεονέκτημα σε σχέση με την παραδοσιακή μέθοδο όπου χρησιμοποιούνται gels αγαρόζης και τα προϊόντα που ηλεκτροφορούνται προέρχονται από την τελική φάση ή το τελικό σημείο της αντίδρασης.

Στη Real – Time PCR χρησιμοποιήσαμε τον παρακάτω τρόπο για την μέτρηση της συσσώρευσης του προϊόντος κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Αυτό το πετύχαμε με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green. Η SYBR Green είναι μια χρωστική που πιάνει μέσα σε δίκλωνο DNA (όπως συμβαίνει και με το βρωμιούχο αιθίδιο). Μόνο τα μόρια της χρωστικής που είναι δεσμευμένα σε δίκλωνο DNA εκπέμπουν φώς (φθορίζουν) όταν διεγερθούν από μια πηγή φωτός. Η χρωστική δεσμεύεται σε κάθε νεοσυντιθέμενο δίκλωνο μόριο DNA και έτσι σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, θεωρητικά, η ένταση του φθορισμού αυξάνεται κατά το ποσοστό αύξησης του προϊόντος, δηλαδή υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ έντασης φθορισμού και ποσότητας δίκλωνου DNA.

Τα πλεονεκτήματα της χρωστικής SYBR Green είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση του πολλαπλασιασμού κάθε δίκλωνου DNA, και ότι αποτελεί την φθηνότερη επιλογή για την Real – Time PCR. Αυτό συμβαίνει γιατί δεν χρειάζεται η σύνθεση άλλων ολιγονουκλεοτιδίων εκτός των εκκινητών και επιπλέον αν χρησιμοποιείται μόνο SYBR Green οι «απαιτήσεις» του συστήματος laser – thermocycler είναι οι ελάχιστες δυνατές. Το κύριο μειονέκτημα της SYBR Green είναι ότι μπορεί να δημιουργήσει ψευδώς θετικό σήμα φθορισμού επειδή η χρωστική δεν έχει εξειδίκευση για το συγκεκριμένο δίκλωνο DNA και δεσμεύει και μη – ειδικές (non – specific) αλληλουχίες. Ειδική προσοχή δίνεται στα δίκλωνα εκκινητή – μονόκλωνου DNA κατά τη φάση ανίχνευσης («ανάγνωσης») του φθορισμού.

Ακολουθεί αναφορά των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν γι' αυτόν το σκοπό:

FW RT2 *dct-1*: 5' – GGCTCCAACCTTACCACTCC – 3'
RV RT2 *dct-1*: 5' – GCAAATCCTACTGCTGCTCC – 3'

FW Mito1 : 5' – GTTTATGCTGCTGTAGCGTG – 3'
RV Mito1 : 5' – CTGTTAAAGCAAGTGGACGAG – 3'

FW *ama-1*: 5' – CCTACCTACACTCCAAGTCCATCG – 3'
RV *ama-1*: 5' – GGTGAAGCTGGCGAATACGTTG – 3'

10. Τεχνικές μικροσκοπίας

Σε όλες τις περιπτώσεις για την προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ξέπλυμα των ζώων με διάλυμα M9 και αναισθητοποίηση αυτών σε διάλυμα Levamisole 2 – 4 mM σε M9 ή special mounting material (30% PEG 8000, 25% Glycerol 100%, 1X PBS). Η παρατήρηση και φωτογράφηση έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).

Για κάθε ξεχωριστό πείραμα, οι φωτογραφήσεις πάρθηκαν στην ίδια μεγέθυνση και σε ίδιες συνθήκες φθορισμού. Η φωτογράφηση έγινε από απλό μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axio Imager Z2 Epifluorescence/DIC Microscope και από μικροσκόπιο συνεστιακής μικροσκοπίας (Confocal Microscope) Zeiss LSM 710 / NLO / DUO / InTune. Η επεξεργασία και τροποποίηση των εικόνων, όπου χρειάστηκε, πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Photoshop (version CS3; Adobe).

11. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων, που ελήφθησαν από τις μετρήσεις των ποσοστών θνησιμότητας, και των ποσοστιαίων αναλογιών επιβίωσης πραγματοποιήθηκε με τα υπολογιστικό πρόγραμμα, GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, USA).

12. Άλλες Πληροφορίες

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

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

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

Τα ειδικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις εταιρείες: PCRIITOPO Cloning (Invitrogen), Genomic DNA purification kit (Macherey-Nagel, NucleoSpin Tissue), PCR Purification Kit (Qiagen-QIAquick), SSoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad).

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

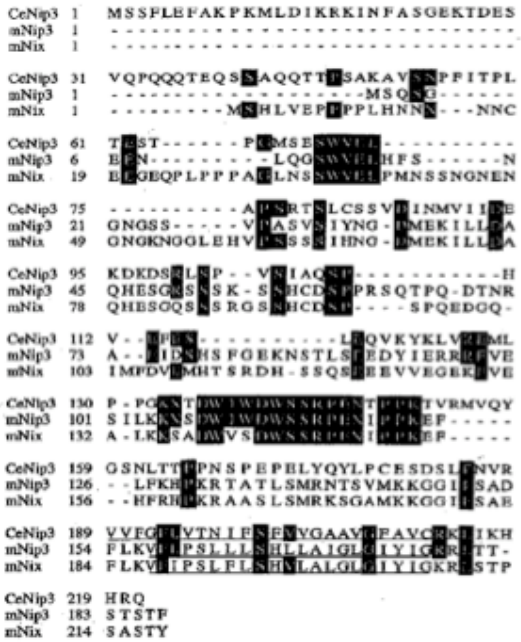
Η ανάλυση των εικόνων που αποκτήθηκαν από την Συνεστιακή μικροσκοπία (Confocal Microscopy) έγινε με το πρόγραμμα ImageJ 1.41.

Αποτελέσματα

Ελάχιστα πράγματα είναι γνωστά για τον ρόλο της μιτοφαγίας κατά την διαδικασία της χρονολογικής γήρανσης. Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε κατά πόσο η διαδικασία της μιτοφαγίας είναι απαραίτητη κατά την διάρκεια της γήρανσης στον νηματώδη *Caenorhabditis elegans* και αναπτύξαμε ένα *in vivo* σύστημα μικροσκοπικής απεικόνισης για την παρατήρηση της επαγωγής της μιτοφαγίας κατόπιν συγκεκριμένων ερεθισμάτων.

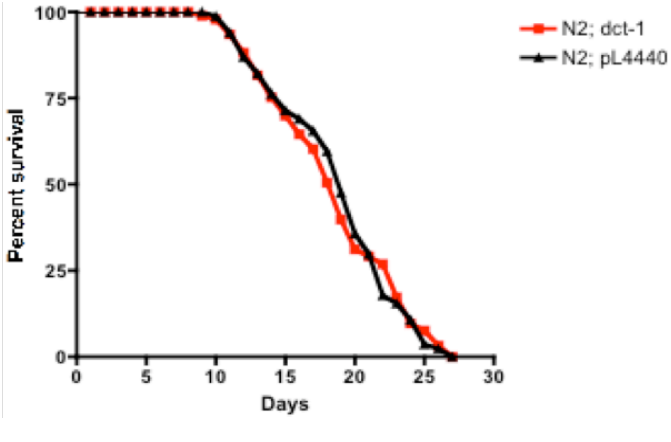
Ι. Ο ρόλος της μιτοφαγίας στη χρονολογική γήρανση του νηματώδη *C.elegans*

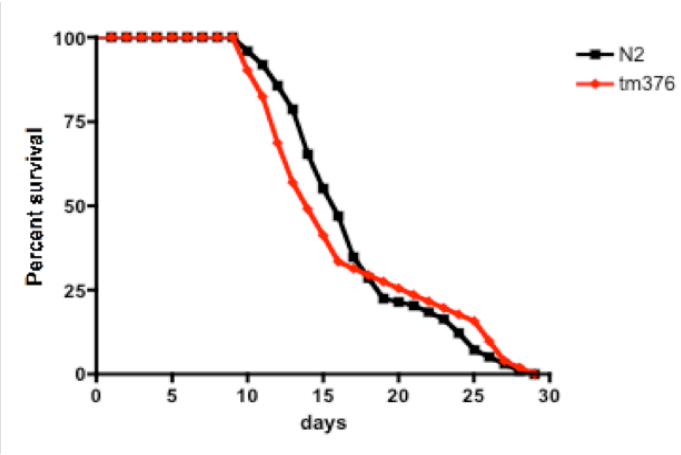
Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες NIX/BNIP3 στα θηλαστικά και η Atg32 στη ζύμη είναι απαραίτητες για την διαδικασία της μιτοφαγίας, χωρίς η έλλειψή τους να επηρεάζει τον ευρύτερο μηχανισμό της αυτοφαγίας του κυττάρου. Το ομόλογο των πρωτεϊνών NIX/BNIP3 των θηλαστικών στον *C. elegans* είναι η πρωτεΐνη DCT-1 (DAF-16 Controlled, germline Tumor affecting). Το γονίδιο *dct-1* ρυθμίζεται σε επίπεδο μεταγραφής από τον μεταγραφικό παράγοντα DAF-16 (Pinkston-Gosse J. and Kenyon C., 2007).



Στοίχιση των αλληλουχιών των πρωτεϊνών BNIP3/NIX του ποντικού και DCT-1 του *C. elegans*. Τα υπογραμμισμένα αμινοξικά κατάλοιπα αντιστοιχούν στη συντηρημένη διαμεμβρανική περιοχή των πρωτεϊνών που απαιτείται για την τοποθέτησή τους στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Cizeau J. et al., 2000). Και οι τρεις πρωτεΐνες φέρουν το μοτίβο WXXL που είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδρασή τους με την πρωτεΐνη LC3/LGG-1 που βρίσκεται στην μεμβράνη των αυτοφαγοσωμάτων.

Έτσι, λοιπόν, αρχικά δημιουργήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή ***dct-1* in pL4440** (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα γήρανσης (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι). Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν N2 (wild type), tm376 και *daf-2(e1370)*.



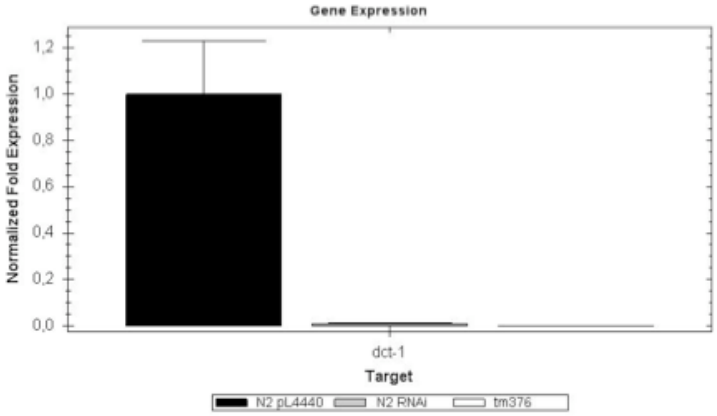


Πειράματα γήρανσης. Καμπύλες επιβίωσης πληθυσμών νηματωδών αγρίου τύπου (N2) που υποβλήθηκαν σε RNAi και Καμπύλες επιβίωσης πληθυσμών νηματωδών αγρίου τύπου (N2) και του στελέχους tm376 με το ποσοστό των ζώων που παραμένει εν ζωή να αναπαρίσταται γραφικά έναντι των ηλικιών τους σε ημέρες. Τα πειράματα γήρανσης πραγματοποιήθηκαν στους 20°C και η τελική συγκέντρωση του IPTG στο κάθε πιάτο ήταν 2mM.

Στελέχη	Median survival	Maximum survival
N2; pL4440	19	27
N2; *dct-1* (RNAi)	19	27
N2	16	29
tm376	14	29

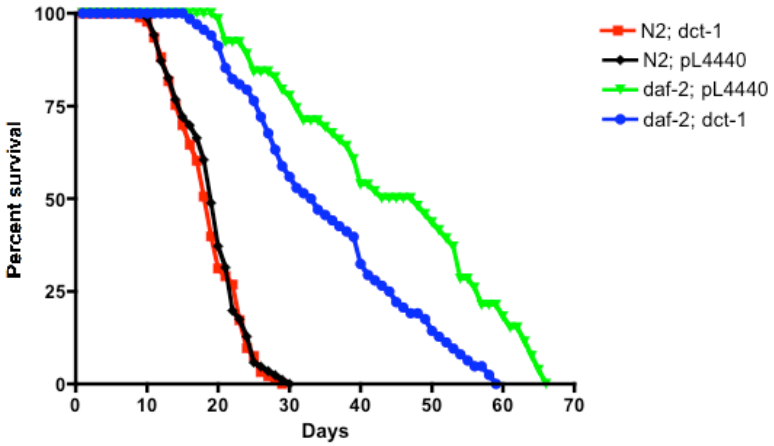
Φαίνεται λοιπόν από τα παραπάνω πειράματα γήρανσης ότι η καταστολή του γονιδίου *dct-1* μέσω της τεχνικής RNAi δεν προκαλεί κάποια σημαντική διαφορά στη διάρκεια ζωής στα αγρίου τύπου ζώα, N2. Επιπλέον, σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου ζώα δεν φαίνεται να παρουσιάζει κάποια σημαντική διαφορά ούτε το στέλεχος tm376, το οποίο αποτελεί null – μετάλλαγμα για το γονίδιο *dct-1* καθώς φέρει μια έλλειψη ~ 900 bp στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου αυτού.

Στη συνέχεια, για να δείξουμε ότι η RNAi τεχνική λειτούργησε αλλά και για να ελέγξουμε τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *dct-1* στο μετάλλαγμα tm376 πραγματοποιήθηκε Real – Time PCR. Από τα αποτελέσματα της Real – Time PCR παρατηρούμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *dct-1* είναι πολύ χαμηλά τόσο στο μετάλλαγμα tm376 όσο και στα ζώα που έχει πραγματοποιηθεί καταστολή του γονιδίου.



Αποτελέσματα Real – Time PCR. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *dct-1* σε αγρίου τύπου ζώα (N2), σε ζώα που έχει πραγματοποιηθεί καταστολή του γονιδίου *dct-1* μέσω της τεχνικής RNAi και σε μεταλλάγματα tm376. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τα επίπεδα έκφρασης του συστατικού γονιδίου *ama-1*.

Επίσης, πειράματα γήρανσης πραγματοποιήθηκαν στα μεταλλαγμένα ζώα *daf-2(e1370)*. Τα ζώα αυτά εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα διάρκειας ζωής λόγω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα DAF-16, ο οποίος ενεργοποιείται όταν το μονοπάτι insulin/IGF-1 είναι ανενεργό και εισέρχεται στο εσωτερικό του πυρήνα (Henderson and Johnson, 2001; Lee et al., 2001; Lin et al., 2001) όπου και ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τη επιβίωση του οργανισμού, την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες και του θερμικού σοκ, την έμφυτη ανοσία, το μεταβολισμό και την αυτοφαγία (Antebi, 2007; Honda and Honda, 1999; Lee et al., 2003; McElwee et al., 2004; Melendez et al., 2003; Murphy et al., 2003). Όπως είναι αναμενόμενο, η μεταγραφική δράση του DAF-16/FOXO έχει ως αποτέλεσμα τη αύξηση των ορίων ηλικίας των ζώων.



Πειράματα γήρανσης. Καμπύλες επιβίωσης πληθυσμών νηματωδών αγρίου τύπου (N2) και μεταλλαγμάτων *daf-2(e1370)* που υποβλήθηκαν σε RNAi με το ποσοστό των ζώων που παραμένει εν ζωή να αναπαρίσταται γραφικά έναντι των ηλικιών τους σε ημέρες. Τα πειράματα γήρανσης πραγματοποιήθηκαν στους 20°C και η τελική συγκέντρωση του IPTG στο κάθε πιάτο ήταν 2mM.

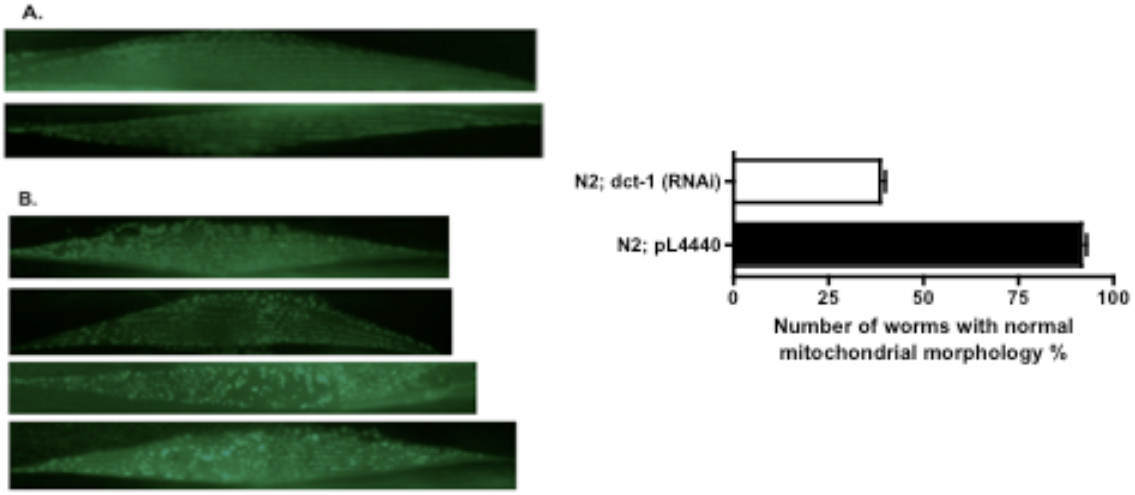
Στελέχη	Median survival	Maximum survival
N2; pL4440	19	30
N2; *dct-1* (RNAi)	19	29
daf-2(e1370); pL4440	48	68
daf-2(e1370); *dct-1* (RNAi)	34	59

Φαίνεται λοιπόν ότι η καταστολή του γονιδίου *dct-1* μειώνει την διάρκεια ζωής των μεταλλαγμάτων *daf-2(e1370)* χωρίς να επηρεάζει την διάρκεια ζωής των αγρίου τύπου ζώων (N2). Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η διαδικασία της μιτοφαγίας είναι απαραίτητη και η δράση της απαιτείται για την αυξημένη διάρκεια ζωής του μεταλλάγματος *daf-2(e1370)*.

ΙΙ. Καταστολή μιτοφαγίας και παρατήρηση του μιτοχονδριακού δικτύου

Μελέτες του μιτοχονδριακού δικτύου στο νηματώδη *C. elegans* έχουν πραγματοποιηθεί παρατηρώντας το μιτοχονδριακό δίκτυο που εμφανίζεται στους μυς του σώματος (body wall muscles) των ζώων. Τα μιτοχόνδρια στους μύες του *C. elegans* σχηματίζουν ένα σωληνοειδές, επίμηκες και πολύ καλά οργανωμένο δίκτυο (Ichishita R. et al., 2008; Lee S.S. et al., 2003). Το μιτοχονδριακό δίκτυο διατρέχει όλο το σώμα του οργανισμού και φαίνεται να ακολουθά το δίκτυο των μυϊκών ινών (myofibrils). Οι μυϊκές ίνες αποτελούν την βασική μονάδα των μυών. Οι μύες αποτελούνται από σωληνοειδή κύτταρα που ονομάζονται μυοκύττρα. Τα μυοκύτταρα αποτελούνται από τις μυϊκές ίνες. Οι μυϊκές ίνες αποτελούνται από μεγάλες πρωτεΐνες όπως είναι η ακτίνη, η μυοσίνη και η τιτίνη. Αυτές οι πρωτεΐνες οργανώνονται σε λεπτές ίνες και παχιά νημάτια, τα οποία επαναλαμβάνονται κατά μήκος των μυϊκών ινών και σχηματίζουν τα λεγόμενα σαρκομερή.

Για να παρατηρήσουμε το μιτοχονδριακό δίκτυο στους μύες του σώματος των ζώων χρησιμοποιήσαμε το στέλεχος *SJ4103* [+/+; $P_{myo\text{-}3}::$mtGFP] που εκφράζει τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (Green Fluorescent Protein) συνδεδεμένη με ένα πεπτίδιο σινιάλο που την οδηγεί στα μιτοχόνδρια. Αυτή η κατασκευή εκφράζεται κάτω από τον έλεγχο του ιστοειδικού υποκινητή *myo-3* που οδηγεί την έκφραση της μιτοχονδριακής GFP μόνο στους μύες του σώματος. Χρησιμοποιώντας την RNAi τεχνική καταστείλαμε το γονίδιο της μιτοφαγίας *dct-1* και παρατηρήσαμε το μιτοχονδριακό δίκτυο σε ενήλικα ζώα ηλικίας 4 ημερών.



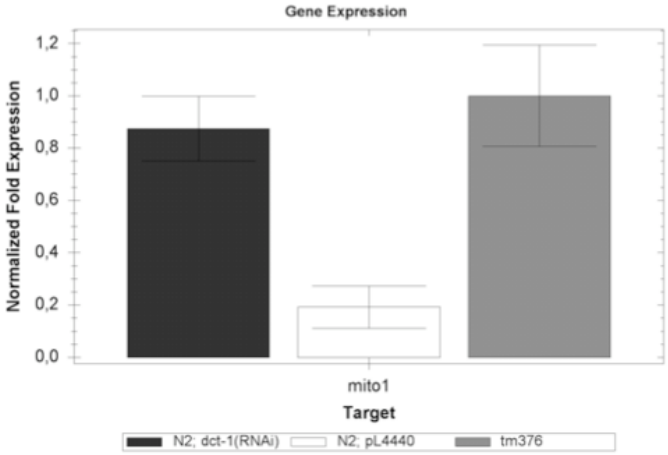
Μορφολογική ανάλυση διαγονιδιακών ζώων που εκφράζουν μιτοχονδριακή GFP στους σωματικούς μύες. Α. Διαγονιδιακά ζώα (control *SJ4103*; pL4440) που έχουν μεγαλώσει σε πιάτα με βακτήρια *E. coli* (HT115), τα οποία περιέχουν τον πλασμιδιακό φορέα pL4440 **Β.** Διαγονιδιακά ζώα (*SJ4103*; *dct-1*)που έχουν μεγαλώσει σε πιάτα με βακτήρια *E. coli* (HT115), τα οποία περιέχουν τον πλασμιδιακό φορέα *dct-1 in* pL4440 για την καταστολή του γονιδίου της μιτοφαγίας. Το διάγραμμα παρουσιάζει των αριθμό των ζώων με φυσιολογική μορφολογία του μιτοχονδριακού δικτύου. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στους 20°C και η τελική συγκέντρωση του IPTG στο κάθε πιάτο ήταν 2mM.

Φαίνεται λοιπόν ότι η καταστολή του γονιδίου *dct-1* μέσω της τεχνικής RNAi προκαλεί την αποδιοργάνωση του μιτοχονδριακού δικτύου καθώς και την κατακερμάτισή του. Επιπλέον, παρατηρείται δημιουργία μιτοχονδριακών συσωματωμάτων.

III. Καταστολή μιτοφαγίας και ποσοτικοποίηση μιτοχονδριακού DNA

Η διαδικασία της μιτοφαγίας είναι υπεύθυνη να απομακρύνει τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια αλλά και να ρυθμίζει των αριθμό των μιτοχονδρίων ανάλογα με τις μεταβολικές δραστηριότητες του κυττάρου (Youle RJ. and Narendra DP, 2011). Επομένως, αν ο μηχανισμός της μιτοφαγίας απενεργοποιηθεί τότε ο αριθμός των μιτοχονδρίων, κατεστραμμένων και μη, αυξάνεται. Το ίδιο συμβαίνει και με το μιτοχονδριακό DNA.

Χρησιμοποιώντας τη τεχνική της Real – Time PCR και με ειδικούς εκκινητές που προσδένονται μόνο στο μιτοχονδριακό DNA ποσοτικοποιήσαμε το μιτοχονδριακό DNA στα αγρίου τύπου ζώα (N2), στα μεταλλάγματα tm376 και σε ζώα που είχαμε καταστείλει το γονίδιο *dct-1* μέσω της τεχνικής RNAi.



Ποσοτικοποίηση μιτοχονδριακού DNA. Τα αποτελέσματα της qReal – Time PCR φανερώνουν αύξηση του μιτοχονδριακού DNA τόσο στο μετάλλαγμα tm376 όσο και στα ζώα που έχει γίνει καταστολή του γονιδίου *dct-1* σε σχέση με το μιτοχονδριακό DNA του αγρίου τύπου, N2. Η κανονικοποίηση έγινε χρησιμοποιώντας τους εκκινητές του γονιδίου *pmr-3* που προσδένονται στο γενωμικό DNA

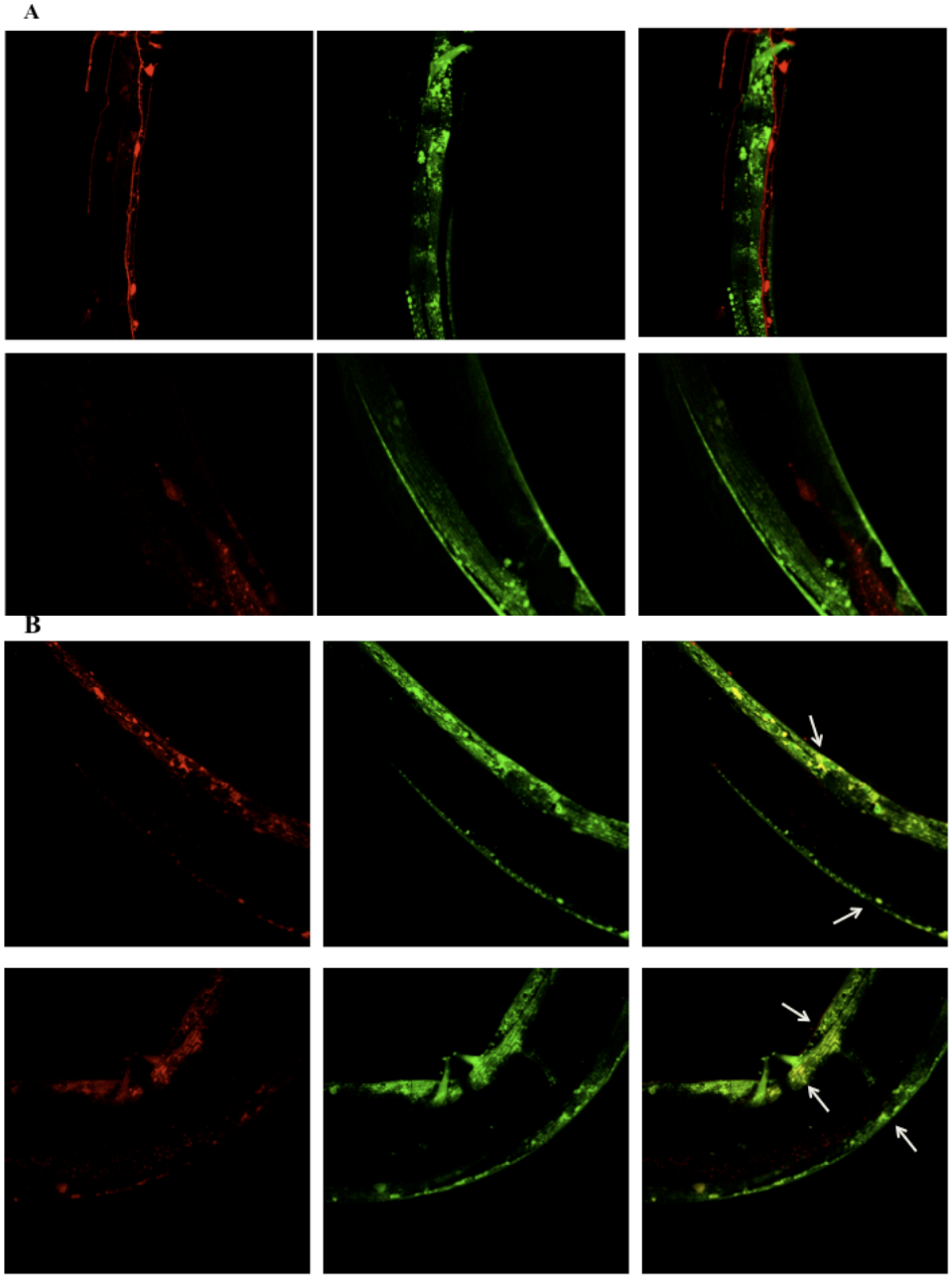
Φαίνεται λοιπόν ότι τόσο τα ζώα στα οποία πραγματοποιήθηκε καταστολή του γονιδίου *dct-1* μέσω της τεχνικής RNAi όσο και τα μεταλλάγματα tm376 εμφανίζουν περισσότερη ποσότητα μιτοχονδριακού DNA σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου ζώα.

IV. *In vivo* σύστημα μικροσκοπικής απεικόνισης της μιτοφαγίας

Για να επιτευχθεί η μικροσκοπική απεικόνιση της μιτοφαγίας χρειάστηκε να διασταυρώσουμε αρσενικά ζώα από το στέλεχος *SJ4103* [+/+; P_{myo-3}::mtGFP], το οποίο εκφράζει στους μύες του σώματος τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP συνδεδεμένη με ένα πεπτίδιο σινιάλο που την οδηγεί στα μιτοχόνδρια, με ερμαφρόδιτα διαγονιδιακά ζώα που έφεραν την εξωχρωμοσωμική αλληλουχία P_{lgg-1}::DsRed::LGG-1 και δείκτη διαμόλυνσης το πλασμίδιο pPD122.11 με την αλληλουχία P_{myo-2}::GFP που οδηγεί την έκφραση της GFP στο φάρυγγα του ζώου. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν μόνο τα ζώα *SJ4103*[+/+; P_{myo-3}::mtGFP]; P_{lgg-1}::DsRed::LGG-1 τα οποία εκφράζουν τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP στους μύες του σώματος και στον φάρυγγα.

Η χιμαιρική πρωτεΐνη DsRed::LGG-1 χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης των αυτοφαγοσωμάτων, ενώ ως δείκτης των μιτοχονδρίων χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP όπου στο αμινοτελικό της άκρο είχε προστεθεί σηματοδοτική αλληλουχία για τη τοποθέτησή της σε μιτοχόνδρια (mtGFP). Επομένως, όταν η διαδικασία της μιτοφαγίας λαμβάνει χώρα θα πρέπει η χιμαιρική πρωτεΐνη DsRed::LGG-1 να συνεντοπίζεται με τα μιτοχόνδρια (mtGFP).

Προκειμένου να ενεργοποιηθεί η μιτοφαγία οι νηματώδεις *SJ4103* [+/+; P_{myo-3}::mtGFP]; P_{lgg-1}::DsRed::LGG-1 μεγάλωσαν σε πιάτα που περιείχαν τη χημική ουσία Carbonyl Cyanide 3 – Chlorophenylhydrazone (CCCP). Το CCCP είναι μια χημική ουσία που προκαλεί εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και οδηγεί σε επαγωγή της μιτοφαγίας (Lemire BD *et al*., 2009; Geisler *et al.,* 2010). Στη συνέχεια τα ενήλικα ζώα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο.



Επαγωγή και Μικροσκοπική απεικόνιση της μιτοφαγίας. Α. Απεικόνιση ζώων που έχουν μεγαλώσει σε πιάτα που περιείχαν DMSO (Dimethyl Sulfoxide). **Β.** Απεικόνιση ζώων που έχουν μεγαλώσει σε πιάτα που περιείχαν 10mM CCCP. Τα βέλη δείχνουν τον συνεντοπισμό μεταξύ της χιμαιρικής πρωτεΐνης DsRed::LGG-1 και των μιτοχονδρίων (mtGFP). Όλες οι φωτογραφίες πάρθηκαν στην ίδια μεγέθυνση και σε ίδιες συνθήκες φθορισμού.

Φαίνεται λοιπόν ότι το CCCP επάγει τη μιτοφαγία καθώς μόνο στα ζώα που μεγάλωσαν σε πιάτα που περιείχαν CCCP παρατηρούμε συνεντοπισμό μεταξύ της χιμαιρικής πρωτεΐνης DsRed::LGG-1 και των μιτοχονδρίων (mtGFP).

Συζήτηση

Καθώς ένας οργανισμός γερνάει, τα κύτταρα συσσωρεύουν μεταλλάξεις τόσο στο γενωμικό όσο και στο μιτοχονδριακό DNA, οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν βλάβες στα μακρομόρια και στα διάφορα κυτταρικά οργανίδια. Επομένως, το κύτταρο έχει την ανάγκη της ύπαρξης μηχανισμών «ποιοτικού ελέγχου» που να διατηρούν την κυτταρική ομοιόσταση και τη βιωσιμότητα του οργανισμού.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν εξελικτικά «απομεινάρια» αερόβιων βακτηρίων που εισέβαλαν στο πρώτο ευκαρυωτικό κύτταρο περίπου ένα δισεκατομμύριο χρόνια πριν. Ως εκ τούτου, έχουν ένα δικό τους ξεχωριστό γονιδίωμα και παρέχουν στο κύτταρο ενέργεια με τη μορφή ATP μέσω τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ωστόσο, ως παραπροϊόν αυτής της διαδικασίας τα μιτοχόνδρια παράγουν ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) που πρέπει να απομακρυνθούν. Τόσο η μιτοχονδριακή «ανεπάρκεια» όσο και η υπερβολική παραγωγή ROS ή και τα δύο φαίνεται να αποτελούν τις κινητήριες δυνάμεις της γήρανσης καθώς προκαλούν βλάβες σε άλλα οργανίδια αλλά και μεταλλάξεις στο πυρηνικό γονιδίωμα του κυττάρου (D.R.Green *et al.,* 2011).

Η απομάκρυνση κατεστραμμένων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών μέσω πρωτεολυτικών μηχανισμών, η αποκατάσταση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων από τα υγιή μέσω των μηχανισμών σχάσης και σύντηξης και η απομάκρυνση των μιτοχονδρίων που έχουν υποστεί σοβαρές βλάβες μέσω της διαδικασίας της μιτοφαγία αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου των μιτοχονδρίων, οι οποίοι λαμβάνουν χώρα για να διατηρήσουν την κυτταρική ομοιόσταση.

Στην παρούσα διατριβή δείξαμε ότι η καταστολή του γονιδίου *dct-1* μέσω της τεχνικής RNAi δεν προκαλεί κάποια σημαντική διαφορά στη διάρκεια ζωής στα αγρίου τύπου ζώα, N2. Σε αντίθεση, η καταστολή του γονιδίου *dct-1* σε διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο στα ζώα *daf-2 (e1370)*, τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη διάρκεια ζωής λόγω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα DAF-16 (Henderson and Johnson, 2001; Lee et al., 2001; Lin et al., 2001), οδήγησε σε δραματική μείωση της διάρκειας ζωής των ζώων. Η πρωτεΐνη DCT-1 (DAF-16 Controlled, germline Tumor affecting) στον *C. elegans* αποτελεί το ομόλογο των πρωτεϊνών NIX/BNIP3 στα θηλαστικά. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες NIX/BNIP3 στα θηλαστικά είναι απαραίτητες για την διαδικασία της μιτοφαγίας, χωρίς η έλλειψή τους να επηρεάζει τον ευρύτερο μηχανισμό της αυτοφαγίας του κυττάρου. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η πρωτεΐνη BNIP3 έπειτα από επαγωγή της μιτοφαγίας αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη LC3 που βρίσκεται στην μεμβράνη των αυτοφαγωσωμάτων και μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια απομακρύνονται επιλεκτικά από το κύτταρο (S. Rikka *et al*., 2011; R.L. Thomas *et al.,* 2011). Έτσι, καταστέλλοντας το γονίδιο *dct-1* μπλοκάρουμε την διαδικασία της μιτοφαγίας στο *C. elegans* γεγονός που οδηγεί στα αυξημένα επίπεδα μιτοχονδριακού DNA όπως παρατηρήθηκε από παραπάνω πειράματα (Βλέπε Αποτελέσματα).

Επιπλέον, μελετήσαμε τον ρόλο του γονιδίου *dct-1* στη μορφολογία του μιτοχονδριακού δικτύου. Για να μελετήσουμε το μιτοχονδριακό δίκτυο στους μύες του σώματος των ζώων χρησιμοποιήσαμε το στέλεχος *SJ4103* [+/+; P_{myo-3}::mtGFP] που εκφράζει τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (Green Fluorescent Protein) συνδεδεμένη με ένα πεπτίδιο σινιάλο που την οδηγεί στα μιτοχόνδρια. Αυτή η κατασκευή εκφράζεται κάτω από τον έλεγχο του ιστοειδικού υποκινητή *myo-3* που οδηγεί την έκφραση της μιτοχονδριακής GFP μόνο στους μύες του σώματος. Η καταστολή του γονιδίου *dct-1* οδήγησε στην αποδιοργάνωση του μιτοχονδριακού δικτύου καθώς και στην κατακερμάτισή του. Επιπλέον, παρατηρήθηκε δημιουργία μιτοχονδριακών συσωματωμάτων. Η μιτοφαγία είναι γνωστό ότι λαμβάνει χώρα πριν από την σχάση των μιτοχονδρίων και λειτουργεί ως μηχανισμός ποιοτικού ελέγχου επιτρέποντας μόνο στα υγιή μιτοχόνδρια να διαιρεθούν (Youle RJ. and Narendra DP, 2011). Τη μιτοφαγία, λοιπόν, μπορούμε

να την παρομοιάσουμε με ένα είδος check – point που λαμβάνει χώρα στο κύκλο ζωής των μιτοχονδρίων και ρυθμίζει την ομοιόσταση του μιτοχονδριακού δικτύου. Όταν καταστέλλεται η διαδικασία της μιτοφαγίας τα μιτοχόνδρια σχηματίζουν συσσωματώματα και ακολουθεί κατακερματισμός και αποδιοργάνωση του μιτοχονδριακού δικτύου.

Τέλος, αναπτύξαμε ένα *in vivo* σύστημα μικροσκοπικής απεικόνισης για την παρατήρηση της επαγωγής της μιτοφαγίας κατόπιν συγκεκριμένων ερεθισμάτων. Για να επιτευχθεί η μικροσκοπική απεικόνιση της μιτοφαγίας διασταυρώσαμε αρσενικά ζώα από το στέλεχος *SJ4103* [+/+; P_{myo-3}::mtGFP] με ερμαφρόδιτα διαγονιδιακά ζώα που έφεραν την εξωχρωμοσωμική αλληλουχία P_{lgg-1}::DsRed::LGG-1. Έπειτα, επιλέχθηκαν μόνο τα ζώα *SJ4103* [+/+; P_{myo-3}::mtGFP]; P_{lgg-1}::DsRed::LGG-1 και τοποθετήθηκαν σε πιάτα που περιείχαν CCCP. Παρατηρήσαμε ότι τα ζώα που μεγάλωσαν παρουσία CCCP εμφάνισαν επαγωγή της μιτοφαγίας, η οποία ανιχνεύεται ως συνεντοπισμός μεταξύ των μιτοχονδρίων (mtGFP) και της χιμαιρικής πρωτεΐνης DsRed::LGG-1, η οποία εντοπίζεται στη μεμβράνη των αυτοφαγοσωμάτων. Το *in vivo* σύστημα μικροσκοπικής απεικόνισης της μιτοφαγίας που αναπτύχθηκε παραπάνω μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για το χαρακτηρισμό γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι της μιτοφαγίας όσο και για τη μελέτη διαφόρων ουσιών που μπορεί να επάγουν ή να καταστέλουν τη διαδικασία αυτή.

Βιβλιογραφία

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

Aerbajinai, W., Giattina, M., Lee, Y. T., Raffeld, M. & Miller, J. L. (2003) The proapoptotic factor Nix is coexpressed with Bcl□xL during terminal erythroid differentiation. *Blood* 102, 712–717.

Antebi, A. (2007). Genetics of aging in *Caenorhabditis elegans.* PLoS Genet 3, 1565-1571. Apfeld, J., and Kenyon, C. (1999). Regulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans*. Nature 402, 804-809.

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.

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

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

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.

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.

Cizeau J, Ray R, Chen G, Gietz RD, Greenberg AH. (2000)The C. elegans orthologue ceBNIP3 interacts with CED-9 and CED-3 but kills through a BH3- and caspase-independent mechanism. Oncogene 19(48):5453-63.

Clark, I. E. *et al.* (2006) *Drosophila pink1* is required formitochondrial function and interacts genetically with *parkin*. *Nature* 441, 1162–1166.

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

Dawson, T. M. & Dawson, V. L. (2010) The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **25** (Suppl. 1), S32–S39.

De Duve, C. & Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* 28, 435–492.

Deng, H., Dodson, M. W., Huang, H. & Guo, M. (2008) The Parkinson's disease genes *pink1* and *parkin* promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 14503–14508.

Ding, W. X. *et al.* (2010) Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species□mediated autophagy induction and Parkin–ubiquitin–p62□ mediated mitochondrial priming. *J. Biol. Chem.* 285, 27879–27890.

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.

Gegg, M. E. *et al.* (2010) Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin□dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 4861–4870.

Geisler, S. *et al.* (2010) PINK1/Parkin□mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature Cell Biol.* 12, 119–131.

Greene, J. C. *et al.* (2003) Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 4078–4083.

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.

Henderson, S. T., and Johnson, T. E. (2001). daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Curr Biol 11, 1975-1980.

Honda, Y., and Honda, S. (1999). The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans.* Faseb J 13, 1385-1393.

Ichishita R, Tanaka K, Sugiura Y, Sayano T, Mihara K, Oka T. (2008). An RNAi screen for mitochondrial proteins required to maintain the morphology of the organelle in Caenorhabditis elegans. J Biochem. 143(4):449-54.

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

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.

Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M. & Klionsky, D. J. (2009) Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev. Cell* 17, 98–109.

Kawajiri, S. *et al.* (2010) PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy. *FEBS Lett.* 584, 1073–1079.

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

Kim, I., Rodriguez Enriquez, S. & Lemasters, J. J. (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 245–253.
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.

Kim, Y. *et al.* (2008) PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. *BBRC* 377, 975–980.

Kissova, I., Deffieu, M., Manon, S. & Camougrand, N. (2004) Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 39068–39074.

Kitada, T. *et al. (*1998) Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605–608.

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

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

Kundu, M. *et al.* (2008) Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosome's during reticulocyte maturation. *Blood* 112, 1493–1502.

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

Lee, R. Y., Hench, J., and Ruvkun, G. (2001). Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the daf-2 insulin-like signaling pathway. Curr Biol 11, 1950-1957.

Lee, S. S., Kennedy, S., Tolonen, A. C., and Ruvkun, G. (2003). DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. Science 300, 644-647.

Lee SS, Lee RY, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G. (2003). A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in C. elegans longevity. Nat Genet. 33(1):40-8.

Lee, J. Y., Nagano, Y., Taylor, J. P., Lim, K. L. & Yao, T. P. (2010) Disease causing mutations in Parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6 dependent mitophagy. *J. Cell Biol.* **189**, 671–679.

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.

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

Lin, K., Hsin, H., Libina, N., and Kenyon, C. (2001). Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. Nat Genet 28, 139-145.

Lin, W. & Kang, U. J. (2008) Characterization of PINK1 processing, stability, and subcellular localization. *J. Neurochem.* 106, 464–474.

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.

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

Matsuda, N. *et al* (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J. Cell Biol.* 189, 211–221.

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.

McElwee, J. J., Schuster, E., Blanc, E., Thomas, J. H., and Gems, D. (2004). Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* Dauer larvae and long-lived daf-2 mutants implicates detoxification system in longevity assurance. J Biol Chem 279, 44533-44543.

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.

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

Mortensen, M. *et al.* (2010) Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia *in vivo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 832–837.

Murphy, C. T., McCarroll, S. A., Bargmann, C. I., Fraser, A., Kamath, R. S., Ahringer, J., Li, H., and Kenyon, C. (2003). Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. Nature 424, 277-283.

Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417(1):1-13, 2009a.

Nakatogawa, H., Ichimura, Y. & Ohsumi, Y. (2007) Atg8, a ubiquitin□like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 130, 165–178

Narendra, D., Kane, L., Hauser, D., Fearnley, I. & Youle, R. (2010) p62/SQSTM1 is required for Parkin□induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensible for both. *Autophagy* **6**, 1090–1106.

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F. & Youle, R. J. (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183, 795–803.

Narendra, D. *et al.* (2010) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 8, e1000298.

Novak, I. *et al.* (2010) Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep.* 11, 45–51.

Nowikovsky, K., Reipert, S., Devenish, R. J. & Schweyen, R. J. (2007).Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K+/H+ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death Differ.* 14, 1647–1656.

Okamoto, K., Kondo□Okamoto, N. & Ohsumi, Y. (2009) Mitochondria□anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev. Cell* 17, 87–97.

Okatsu, K. *et al.* (2010) p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes Cells* **15**, 887–900.

Pankiv, S. *et al.* (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/ LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 24131–24145.

Park, J. *et al.* (2006) Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441, 1157–1166.

Pinkston-Gosse, J. and Kenyon, C. (2007). DAF-16/FOXO targets genes that regulate tumor growth in *Caenorhabditis elegans*. Nature Genetics 39(11), 1403-1409.

Poole, A. C. *et al.* (2008) The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 1638–1643.

Poole, A. C., Thomas, R. E., Yu, S., Vincow, E. S. & Pallanck, L. (2010) The mitochondrial fusion□promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PLoS ONE* **5**, e10054.

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

Sandoval, H. *et al.* (2008) Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* 454, 232–235.

Schwarten, M. *et al.* (2010) Nix directly binds to GABARAP: a possible crosstalk between apoptosis and autophagy. *Autophagy* 5, 690–698.

Schweers, R. L. *et al.* (2007) NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 19500–19505.

Sha, D., Chin, L. S. & Li, L. (2010) Phosphorylation of parkin by Parkinson disease□linked kinase PINK1 activates parkin E3 ligase function and NF□κB signaling. *Hum. Mol. Genet.* 19, 352–363.

Shiba, K. *et al.* (2009) Parkin stabilizes PINK1 through direct interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383, 331–335.

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.

Suen, D. F., Narendra, D. P., Tanaka, A., Manfredi, G. & Youle, R. J. (2010)Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 11835–11840.

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.

Tal, R., Winter, G., Ecker, N., Klionsky, D. J. & Abeliovich, H. (2007) Aup1p, a yeast mitochondrial protein phosphatase homolog, is required for efficient stationary phase mitophagy and cell survival. *J. Biol. Chem.* 282, 5617–5624.

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.

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.

Tolkovsky, A. M., Xue, L., Fletcher, G. C. & Borutaite, V. (2002) Mitochondrial disappearance from cells: a clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease? *Biochimie* 84, 233–240.

Twig, G. *et al.* (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27, 433–446.

Um, J. W., Stichel□Gunkel, C., Lubbert, H., Lee, G. &Chung, K. C. (2009) Molecular interaction between Parkin and Pink1 in mammalian neuronal cells. *Mol. Cell Neurosci.* 40, 421–432.

Valente, E. M. *et al.* (2004) Hereditary early□onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304, 1158–1160.

Vives□Bauza, C. *et al.* (2010) PINK1□dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 378–383 (2010).

Xie, Z. and D.J. Klionsky (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. Nat. Cell Biol., 9: 1102-1109.

Yang, Y. *et al.* (2008) Pink1 regulates mitochondrial dynamicsthrough interaction with the fission/fusion machinery. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 7070–7075.

Yang, Y. *et al.* (2006) Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 10793–10798.

Youle RJ, Narendra DP. (2011) Mechanisms of mitophagy. Nat Rev Mol Cell Biol. 12(1):9-14.

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.

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

Westermann, D. (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 872–884.

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.

Whitworth, A. J. *et al.* (2008) Rhomboid 7 and HtrA2/Omi act in a common pathway with the Parkinson's disease factors Pink1 and Parkin. *Dis. Model Mech.* 1, 168–174.

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.

Zhang, J. *et al.* (2009) Mitochondrial clearance is regulated by Atg7 dependent and independent mechanisms during reticulocyte maturation. *Blood* 114, 157–164.

Ziviani, E., Tao, R. N. & Whitworth, A. J. (2010) *Drosophila* parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 5018–5023.