

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Βιολογίας
Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα
Μοριακής Βιολογίας-Βιοϊατρικής

«Μελέτη της επίδρασης των ενδοκυτταρικών μηχανισμών μεταφοράς
και του ρόλου των ανταλλακτών $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (NCX1,2,3,4 & 5) κατά την
νέκρωση
στο *C.elegans*».

Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Νηματωδών
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας
Υπεύθυνος ερευνητής: Ταβερναράκης Νεκτάριος

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Αθανασάκη Ειρήνη

Τρουλλιανάκη Κωστούλα
Ηράκλειο 2004

Στους γονείς μου...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Είναι δύσκολο κανείς να αναφέρεται σε άτομα που εκτιμά ιδιαίτερα και σέβεται μέσα από μια κόλλα χαρτί, για να τους ευχαριστήσει. Εξάλλου σ' αυτούς είναι προτιμότερο να το δείχνει με τις πράξεις και τα «έργα» του. Παρόλα αυτά, τούτη τη στιγμή αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω κάποια τέτοια άτομα, που στάθηκαν δίπλα και με στήριξαν καθόλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας.

Πρώτα απ' όλα την «κεφαλή» του εργαστηρίου μας, τον άνθρωπο που με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω μαζί του: του ερευνητή Δρ. Ταβερναράκη Νεκτάριο. Είναι αυτός που με εκπλήσσει καθημερινά και εμένα αλλά και όλα τα παιδιά του εργαστηρίου μας, με την επιστημονική του σκέψη, τις γνώσεις του, την ευκολία που έχει να λύνει προβλήματα, μικρά και μεγάλα, την ηρεμία που μας αντιμετωπίζει όταν εμείς του κάνουμε «καζές» ερωτήσεις και προπαντός τον ευθουσιασμό του για αυτό που λέγεται έρευνα! Τον ευχαριστώ για την επιστημονική του καθοδήγηση, τις συμβουλές και τις καλοπροαίρετες παρατηρήσεις του, την συμπαράσταση και την υπομονή... Τον ευχαριστώ για όλα!

Έπειτα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα κοριτσάκια αλλά και το μοναδικό αγοράκι του εργαστηρίου μας. Με την Πόπη και την Χρύσα είμαστε από την ίδια «πλευρά»...του πάγκου, και ασχολούμαστε με κοινά θέματα. Τις ευχαριστώ και τις δυο για την συνεργασία τους, την βοήθεια τους, τις συμβουλές τους, την ανεκτικότητα που δείχνουν απέναντι μου και τις «πλακίτσες» που ομορφαίνουν την καθημερινότητα μας. Ευχαριστώ και τους «απέναντι» (του πάγκου), την Δάφνη, το Γιάννη και την τεχνικό μας την Αγγέλα. Για την συνεργασία τους, την ευχάριστη ατμόσφαιρα που δημιουργούν στο εργαστήριο και τα ... competent cells!

Δεν μπορώ, βέβαια να μην αναφερθώ και στις φίλες μου, που πάσχουν από τις ίδιες ανησυχίες και ασχολούνται, επίσης, με τον πάγκο! Την Μαριάνθη, που ευτυχώς θα είναι δίπλα και τα επόμενα 3-4 τουλάχιστον χρόνια, την Ντίνα (την «άλλη», που λέει και ο Γιάννης Κ.) που δυστυχώς μας εγκαταλείπει και την Έφη, που την κέρδισε η έρευνα στην Ιατρική Σχολή (Αχ, ψυχολόγε μου!). Τις ευχαριστώ όλες για ότι έχουν κάνει όλα αυτά τα χρόνια...

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σ' αυτούς που βρίσκονται πίσω απ' όλα αυτά, στους γονείς μου. Για την υποστήριξη τους σε κάθε νέα προσπάθεια,, την συμπαράσταση, την υπομονή που δείχνουν και την πίστη τους σ' εμένα. Χωρίς αυτούς, σίγουρα δεν θα είχα φτάσει έως εδώ!



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Μέρος Α΄

«Μελέτη του ρόλου των μηχανισμών ενδοκυτταρικής μεταφοράς στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο στο νηματώδη *C. elegans*»

<u>Περίληψη</u>	σελ.4
<u>Εισαγωγή</u>	
⊗ Μορφές κυτταρικού θανάτου	σελ.5-6
⊗ Ο <i>C.elegans</i> ως μοντέλο μελέτης του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου	σελ.6
⊗ Το φαινόμενο της νέκρωσης στο <i>C.elegans</i>	σελ.7
⊗ Ενδείξεις για το ρόλο της ενδοκυττάρωσης στη νέκρωση	σελ.7-8
⊗ Ενδοκύτωση μέσω υποδοχέα	σελ.8-10
⊗ Σκοπός της εργασίας	σελ.11-12
<u>Υλικά και Μέθοδοι</u>	
⊗ Δημιουργία διπλά μεταλλαγμένων στελεχών	σελ.12
⊗ Προσδιορισμός του ποσοστού της νέκρωσης	σελ.12
<u>Αποτελέσματα</u>	σελ.13-17
<u>Συζήτηση</u>	σελ.18-20

Μέρος Β'

«Μελέτη του ρόλου των ιοντο-ανιαλλακτών NCX στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο στο νηματώδη»

Περίληψη

σελ.22

Εισαγωγή

- ⊗ Ομοιόσταση ασβεστίου σελ.23
- ⊗ Ανιαλλάκτες $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ σελ.24
- ⊗ Το Ca^{2+} ως σήμα θανάτου σελ.24-25
- ⊗ Calpain-cathepsin hypothesis” σελ.25
- ⊗ Σκοπός της εργασίας σελ.26

Υλικά και Μέθοδοι

- ⊗ PCR σελ.26-27
- ⊗ Καθαρισμός των PCR fragments και κλωνοποίηση αυτών σε pUC19 φορέα σελ.27-28
- ⊗ Κλωνοποίηση των *ncx-1-5* σε pL4440 φορέα σελ.28
- ⊗ RNAi πειράματα σελ.28-29

Αποτελέσματα

σελ.30-31

Συζήτηση

σελ.32

ΜΕΡΟΣ Α'

*Μελέτη του ρόλου των μηχανισμών ενδοκυτταρικής
μεταφοράς στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο στο νηματώδη
*C. elegans**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι δυο κύριοι τύποι κυτταρικού θανάτου είναι η απόπτωση και η νέκρωση. Η απόπτωση είναι ο «προγραμματισμένος» θάνατος. Συμβαίνει κυρίως κατά την ανάπτυξη ενός οργανισμού και είναι απαραίτητη για την σωστή δημιουργία των οργάνων και των ιστών. Η νέκρωση, αντίθεση, λαμβάνει χώρα όταν το κύτταρο βρεθεί σε πολύ αντίξοες συνθήκες, όπως έλλειψη οξυγόνου ή αυξημένη θερμοκρασία. Συναντάται σε περιπτώσεις ισχαιμίας και τραύματος, και θεωρείται η κύρια μορφή θανάτου των νευρικών κυττάρων σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Σε μοριακό επίπεδο, η νέκρωση είναι ελάχιστα μελετημένη, σε σχέση με την απόπτωση. Για την εκτέλεση της δεν φαίνεται να υπάρχουν εξειδικευμένοι μηχανισμοί ή πρωτεΐνες. Οι τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι σε συνθήκες έντονου στρες, διάφοροι μηχανισμοί που εξυπηρετούν την φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου, μπορούν να στραφούν εναντίον του και να αποβούν καταστροφικοί.

Η πρώτη ανωμαλία που εμφανίζει ένα κύτταρο που πεθαίνει με νέκρωση είναι ο σχηματισμός μικρών δακτυλίων ή «δυνών». Οι δακτύλιοι αυτοί φαίνεται να προκύπτουν από την κυτταρική μεμβράνη. Στα επόμενα στάδια εσωτερικεύονται και μοιάζει να σχηματίζουν μεγάλες ηλεκτρονικά πυκνές δομές.

Με βάση τα παραπάνω μορφολογικά χαρακτηριστικά, καθώς επίσης και το γεγονός ότι διακοπτόμενη ενδοκυτταρική μεταφορά έχει συσχετιστεί και με νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως Alzheimer, Huntington και ALS (Syntichaki and Tavernarakis, 2003), αποφασίσαμε να μελετήσουμε την επίδραση των ενδοκυτταρικών μηχανισμών μεταφοράς στη νέκρωση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε το νηματώδη *C. elegans*. Ο οργανισμός αυτός έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μελέτες κυτταρικού θανάτου. Τοξικές μεταλλάξεις σε διάφορα γνωστά γονίδια επάγουν εκφυλισμό διάφορων τύπων νευρώνων ή άλλων κυττάρων. Η μορφή της νέκρωσης αυτών των κυττάρων είναι αντίστοιχη με κύτταρα θηλαστικών.

Επιλέχθηκαν αρχικά διάφορα γονίδια θηλαστικών, τα προϊόντα των οποίων παίζουν σημαντικό ρόλο στα μονοπάτια της ενδοκυτταρικής μεταφοράς. Βρέθηκαν, έπειτα τα ορθόλογα τους στο νηματώδη και τα μεταλλάγματα αυτών χρησιμοποιήθηκαν σε μελέτες για την νέκρωση. Έγινε, έτσι, μια πρώτη εκτίμηση για το αν οι εν λόγω μηχανισμοί μπορεί να έχουν κάποιο ρόλο στη νέκρωση.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μορφές κυτταρικού θανάτου

Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να διακριθεί σε δυο είδη: γενετικά και μη γενετικά καθορισμένο, ανάλογα με το αν έχει σχεδιαστεί να συμβεί ή όχι. Η πρώτη μορφή θανάτου έχει συνήθως την μορφή της απόπτωσης. Για την διεξαγωγή της απαιτείται η συνεργασία πολλών διαφορετικών πρωτεϊνών, όπως των κασπασών, του κυτοχρώματος C και των Bcl₂ και Bcl_{xL}. Οι πρωτεΐνες αυτές ακολουθούν ένα συγκεκριμένο «πρόγραμμα», που υπάρχει καταγεγραμμένο στο γενετικό υλικό κάθε κυττάρου. Ωστόσο, το «πρόγραμμα» ενεργοποιείται μόνο σ' εκείνα τα κύτταρα που έχει προγραμματιστεί να πεθάνουν σ' ένα συγκεκριμένο χρονικό σημείο. Το είδος αυτού του θανάτου είναι απαραίτητο για την σωστή δημιουργία των οργάνων και των ιστών ενός οργανισμού, κατά την ανάπτυξη του. Η παρεμπόδιση του μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές ανωμαλίες, από αναπτυξιακά ελαττώματα μέχρι καρκίνο.

Πέραν όμως του «προγράμματος», ένα κύτταρο μπορεί να πεθάνει απρόσμενα και ξαφνικά. Στην περίπτωση αυτή ο θάνατος μπορεί να εμφανίσει πολλά χαρακτηριστικά από αποπτωτικά μέχρι και νεκρωτικά, ή ακόμα και συνδυασμό των δυο. Η πιο γνωστή περίπτωση απρόσμενου θανάτου είναι η νέκρωση (Proskuryakov et al., 2003).

Η νέκρωση είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης ακραίων περιβαλλοντικών συνθηκών. Όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες έντονου στρες, που δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν οι ομοιοστατικοί του μηχανισμοί, είναι καταδικασμένο να πεθάνει. Μερικές τέτοιες συνθήκες που μπορεί να επάγουν νέκρωση είναι η έλλειψη οξυγόνου ή θρεπτικών (για παράδειγμα σε περίπτωση ισχαιμίας μετά από εγκεφαλικό), η αυξημένη θερμοκρασία, η επαφή με τοξικά συστατικά και η υπερβολική μηχανική πίεση (όπως το τραύμα) (Syntichaki and Tavernarakis, 2002).

Η νέκρωση έχει διαπιστωθεί σε περιπτώσεις ισχαιμίας, επιληψίας και σε νευροεκφυλιστικά σύνδρομα. Θεωρείται ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο πεθαίνουν τα νευρικά κύτταρα σε ασθένειες όπως Alzheimer, Parkinson, Huntington, και ALS (Driscoll and Gerstbrein, 2003). Στις περιπτώσεις αυτές, τα αίτια της νέκρωσης εντοπίζονται κυρίως στη συσσώρευση αδιάλυτων και τοξικών πρωτεϊνικών ινιδίων στα κύτταρα, όπως η α-synuclein.

Στην περίπτωση της απόπτωσης υπάρχει γνωστό εύρος πληροφοριών, σε σχέση με τα αποπτωτικά προγράμματα, τη σειρά των γεγονότων και τις πρωτεΐνες που λαμβάνουν μέρος. Αντίθετα, το φαινόμενο του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου είναι ελάχιστα μελετημένο σε μοριακό επίπεδο. Μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ένα ανεξέλεγκτο χαοτικό σπάσιμο του κυττάρου κάτω από ανυπόφορες γι' αυτό συνθήκες. Οι τελευταίες μελέτες, ωστόσο, σε οργανισμούς όπως ο νηματώδης *Caenorabditis elegans* και η *Drosophila melanogaster* δείχνουν ότι η νέκρωση προκαλείται από την ακατάλληλη δράση μορίων. Πρωτεΐνες και μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται για την φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου, κάτω από αντίξοες συνθήκες, στρέφονται

εναντίον του και αποβαίνουν καταστροφικοί (Syntichaki and Tavernarakis, 2002) .

Ο *C.elegans* ως μοντέλο μελέτης του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου

Ο οργανισμός αυτός έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα στην έρευνα. Καταρχήν, η εργαστηριακή του συντήρηση είναι πολύ εύκολη και οικονομική. Πρόκειται για ένα πολύ μικρό, ερμαφρόδιτο οργανισμό, μεγέθους ~1mm, που τρέφεται με βακτήρια του γένους *E.coli* και ολοκληρώνει τον κύκλο ζωής του σε 2,5 μέρες σε θερμοκρασία 25°C. Κατά την διάρκεια της ζωής του το ενήλικο άτομο μπορεί να δώσει μέχρι 300 απογόνους. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τον μικρό κύκλο ζωής του επιτρέπει την μελέτη διαγονιδιακών στελεχών σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η δημιουργία τέτοιων στελεχών γίνεται σχετικά εύκολα με μικρο-ενέσεις στη γονάδα νεαρών ενήλικων ζώων και διευκολύνεται από τη διαθεσιμότητα φορέων εκτοπικής έκφρασης καθώς και έκφρασης γονιδίων αναφοράς (markers), όπως GFP και β-γαλακτοσιδάση.

Η «ιδιότητα» του ως ερμαφρόδιτος, καθιστά εύκολη την ανάκτηση ομόζυγων ατόμων για οποιαδήποτε μεταλλαγή. Ταυτόχρονα, η ικανότητα του να διασταυρώνεται και με αρσενικά άτομα του είδους, παρέχει την δυνατότητα δημιουργίας διπλά μεταλλαγμένων στελεχών και την πραγματοποίηση αναλύσεων συμπληρωματικότητας.

Για τη χαρτογράφηση γονιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι κλασσικές τεχνικές. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι ο οργανισμός αυτός έχει πλήρως αλληλουχημένο γονιδίωμα, κατατεθειμένο σε μια πολύ καλά οργανωμένη βάση δεδομένων. Υπάρχει λεπτομερής και ακριβής γενετικός χάρτης με περισσότερες από 2000 μεταλλάξεις.

Είναι, επίσης, δυνατή η πραγματοποίηση «αντίστροφης γενετικής» και η εφαρμογή της μεθόδου του RNAi (double-stranded RNA mediated interference) για την προσωρινή καταστολή της έκφρασης γονιδίων. Ένα βασικό πλεονέκτημα του οργανισμού αυτού σε σχέση με άλλους, όπως τη *Drosophila*, είναι ότι το RNAi είναι «συστημικό». Αυτό σημαίνει ότι το δίκλωνο RNA διανέμεται σε όλο το σώμα του ζώου και προκαλεί σίγηση οπουδήποτε κι αν εκφράζεται το συγκεκριμένο γονίδιο που στοχεύουμε.

Ένα σημαντικό τμήμα της γνώσης μας γύρω από τους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου προέρχεται από μελέτες στο *C.elegans* (Metzstein et al., 1998). Αυτό οφείλεται σε όλα τα παραπάνω πλεονεκτήματα, καθώς και στο ότι ο οργανισμός αυτός είναι διάφανος και επιτρέπει έτσι την διάκριση κυττάρων που πεθαίνουν ακόμα και σε ζωντανά άτομα, με τη χρήση μόνο οπτικού μικροσκοπίου. Οι κύριοι μηχανισμοί της απόπτωσης έχουν αποκαλυφθεί μετά από εκτεταμένη έρευνα στο νηματώδη. Σημαντική, επίσης, προσπάθεια καταβάλλεται και για την διερεύνηση του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου με ολοένα και περισσότερα αποτελέσματα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι πολλά βασικά μονοπάτια για τη ζωή, μεταξύ των οποίων και ο κυτταρικός θάνατος είναι συντηρημένα μεταξύ των ειδών. Μελετώντας τα, επομένως, στο νηματώδη, είναι δυνατόν να αποκαλυφθούν πληροφορίες και για τις αντίστοιχες διαδικασίες στον άνθρωπο (Putcha and Johnson, 2004).

✚ Το φαινόμενο της νέκρωσης στο *C.elegans*

Ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να επαχθεί πολύ εύκολα στο *C.elegans*. Τοξικές μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια επάγουν εκφυλισμό διάφορων τύπων νευρώνων ή άλλων κυττάρων. Πρόκειται κυρίως για μεταλλάξεις gain-of-function σε συγκεκριμένα γονίδια-μέλη της οικογένειας των degenerins, που ανήκουν στην ευρύτερη υπεροικογένεια των γονιδίων DEG/ENaC και κωδικοποιούν για κανάλια ιόντων Na⁺, ευαίσθητα σε amiloride. Ονομάστηκαν 'degenerins' ακριβώς επειδή προκαλούν εκφυλισμό των κυττάρων στα οποία εκφράζονται. Έτσι, επικρατής μεταλλαγή στο *deg-1(d)* επάγει το θάνατο μίας ομάδας ενδιάμεσων νευρώνων (Chalfie and Wolinsky, 1990), ενώ παρόμοια μετάλλαξη στο *mec-4(d)* προκαλεί καταστροφή των 6 αισθητικών νευρώνων, που είναι υπεύθυνοι για την απόκριση σε απαλό άγγιγμα (Driscoll and Chalfie, 1991). Και στις δύο περιπτώσεις, ο θάνατος των νευρώνων είναι ανεξάρτητος από τις caspases CED-3 και CED-4, που απαιτούνται για την απόπτωση. Οι υπεύθυνες μεταλλάξεις αφορούν αντικατάσταση μιας Ala στο εξωκυτταρικό τμήμα της αντίστοιχης πρωτεΐνης -και κοντά στη διαμεμβρανική περιοχή που συμμετέχει στο σχηματισμό του πόρου-, από ένα μεγαλύτερο σε όγκο αμινοξύ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται το κλείσιμο του καναλιού, με συνέπεια την αυξημένη είσοδο ιόντων στο κυτταρόπλασμα. Στην οικογένεια των degenerins περιλαμβάνονται ακόμη τα *mec-10*, *unc-8*, ημι-επικρατές μεταλλάξεις του οποίου οδηγούν σε διόγκωση και δυσλειτουργία νευρώνων της κοιλιακής νευρικής χορδής, και *unc-105*, που εκφράζεται σε μυϊκά κύτταρα.

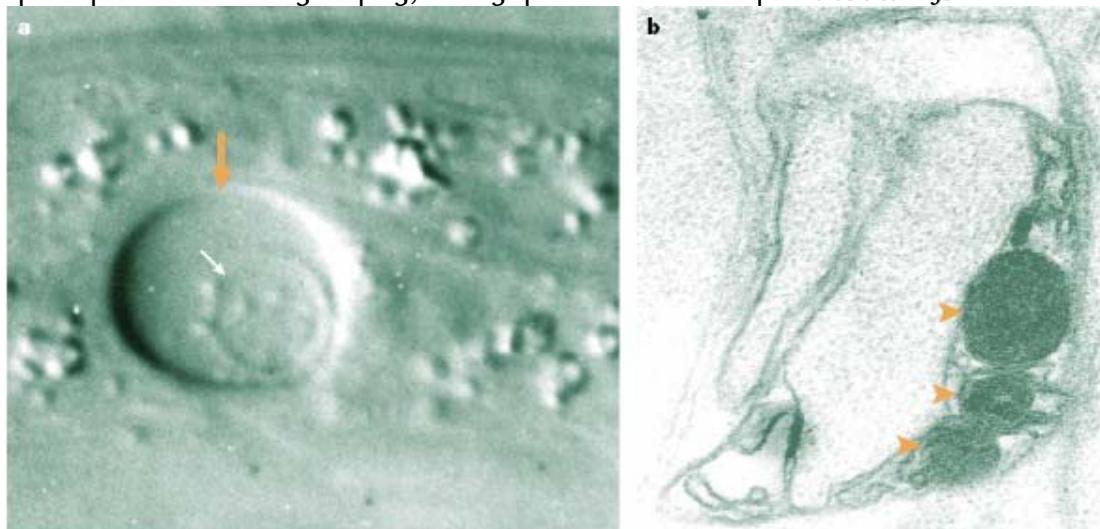
Εκτός από τις degenerins, κυτταρικός θάνατος με μορφολογικά χαρακτηριστικά νέκρωσης στο *C.elegans* προκαλείται και από συνεχώς ενεργές μεταλλαγμένες μορφές της α υπομονάδας των ετεοτριμερών G πρωτεϊνών (Gas) (Berger et al., 1998), καθώς και μεταλλάξεις που οδηγούν σε αυξημένη ενεργότητα του γονιδίου *deg-3* (Treinin et al., 1998). Το τελευταίο κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με το νικοτινικό υποδοχέα ακετυλοχολίνης των σπονδυλωτών και συμμετέχει στο σχηματισμό ενός καναλιού Ca²⁺.

Τέλος, νέκρωση στο νηματώδη επάγεται και κάτω από συνθήκες υποξίας. Στελέχη με συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο *daf-2*, που είναι απαραίτητο για το σχηματισμό ανθεκτικών μορφών dauer, εμφανίζουν μειωμένο θάνατο λόγω υποξίας (Scott et al., 2002).

✚ Ενδείξεις για το ρόλο της ενδοκυττάρωσης στη νέκρωση

Η νέκρωση που προκαλείται από μεταλλαγμένες degenerins στο *C.elegans* έχει μελετηθεί εκτενώς και τα χαρακτηριστικά της φαίνονται πολύ διαφορετικά από αυτά της απόπτωσης (Syntichaki and Tavernarakis, 2003). Αρχικά, ο πυρήνας και το κυτταρικό σώμα φαίνονται παραμορφωμένα. Έπειτα, το κύτταρο πρήζεται αρκετές φορές σε σχέση με τη φυσιολογική του διάμετρο (Εικόνα 1.α), μοιάζοντας μορφολογικά με τα θηλαστικά κύτταρα που πεθαίνουν με νέκρωση. Κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η πρώτη ανωμαλία που ανιχνεύεται

είναι ο σχηματισμός μικρών δακτυλίων ή «δυνών» που φαίνεται να προκύπτουν από την κυτταρική μεμβράνη (Εικόνα 1.β). Αυτοί οι δακτύλιοι εσωτερικεύονται και μοιάζει να σχηματίζουν μεγάλες ηλεκτρονικά πυκνές δομές, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.β.



Εικόνα 1. Ένα νευρικό κύτταρο του *C. elegans* που πεθαίνει με νέκρωση ως αποτέλεσμα της υπερενεργοποίησης ιοντικού καναλιού
α) Φαίνεται το πρήξιμο του κυττάρου (πορτοκαλί βέλος) και η παραμόρφωση του πυρήνα (άσπρο βέλος)
β) Οι δύνες όπως φαίνονται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Σχηματίζονται, έπειτα μεγάλα κυστίδια και η χρωματίνη συμπυκνώνεται και διασπάται τυχαία μέσα στον πυρήνα που διογκώνεται. Ο όγκος του κυττάρου μπορεί να αυξηθεί μέχρι και 100 φορές. Τέλος, τα οργανίδια και το περιεχόμενο τους αποδομούνται, αφήνοντας συνήθως ένα μεμβρανικό κέλυφος. Οι χαρακτηριστικές μεμβρανικές εγκλείσεις (inclusions) υποδεικνύουν ότι πιθανόν οι μηχανισμοί ενδοκυτταρικής μεταφοράς να εμπλέκονται στον εκφυλισμό του κυττάρου. Αξιοσημείωτο είναι ότι σε κάποιες εκφυλιστικές καταστάσεις στα θηλαστικά, όπως στη *neuronal ceroid lipofuscinosis*, τα κύτταρα παρουσιάζουν κυστίδια και δύνες που μοιάζουν να είναι αντίστοιχες των δομών στους νευρώνες που πεθαίνουν στο *C.elegans* (Tavernarakis and Driscoll, 2001). Επιπρόσθετα, διακοπτόμενη ενδοκυτταρική μεταφορά έχει συσχετιστεί και με νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως Alzheimer, Huntington και ALS (Syntichaki and Tavernarakis, 2003).

✚ Ενδοκύττωση μέσω υποδοχέα

Μέσα στα πλαίσια της φυσιολογικής λειτουργίας του, το ευκαρυωτικό κύτταρο προσλαμβάνει πολλά μακρομόρια και άλλες ουσίες από το εξωκυτταρικό περιβάλλον του, με μια διαδικασία γνωστή ως ενδοκυττάρωση (Mukherjee et al., 1997). Το υλικό που προσλαμβάνεται περιβάλλεται από μια περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης που στη συνέχεια κόβεται προς τα μέσα και σχηματίζει ένα κυστίδιο. Με το κυστίδιο αυτό οι ουσίες «ταξιδεύουν» στο εσωτερικό του

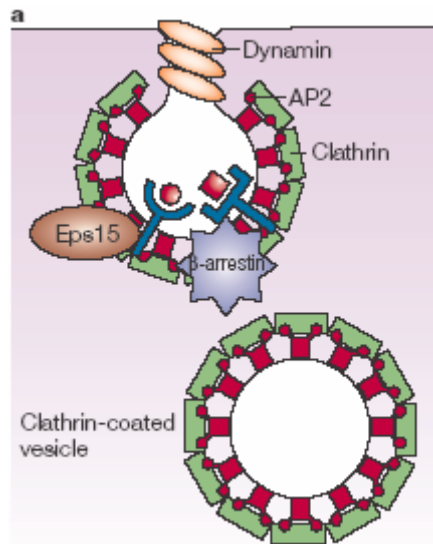
και ενώνονται με τα κατάλληλα οργανίδια (λυσοσώματα). Ανάλογα με το μέγεθος των προσλαμβανόμενων ουσιών η ενδοκυττάρωση διακρίνεται σε φαγοκύτωση και πινοκύτωση (McPherson et al., 2001).

Η καλύτερα χαρακτηρισμένη μορφή πινοκύτωσης είναι η «ενδοκύτωση μέσω υποδοχέων» (receptor mediated endocytosis). Στη περίπτωση αυτή, τα μακρομόρια που πρόκειται να εισέλθουν δένονται αρχικά σε ειδικούς επιφανειακούς υποδοχείς, οι οποίοι βρίσκονται συγκεντρωμένοι σε περιοχές της μεμβράνης που λέγονται βοθρία καλυμμένα με κλαθρίνη (clathrin-coated pits). Η κλαθρίνη προσδένεται στη μεμβράνη μέσω περιφερειακών μεμβρανικών πρωτεϊνών που ονομάζονται adaptins (McPherson et al., 2001). Οι πρωτεΐνες αυτές προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς κάθε φορά, καθορίζοντας με αυτό τον τρόπο την επιλογή του προς μεταφορά φορτίου (Kirchhausen, 2002). Τα βοθρία αποκόπτονται από την μεμβράνη, μέσω μιας πρωτεΐνης που λέγεται δυναμίνη (Hinshaw, 2000), και σχηματίζουν μικρά κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη που περιέχουν τους υποδοχείς με τα συνδεδεμένα μόρια τους. Στη συνέχεια τα κυστίδια χάνουν το κάλυμμα τους και συντήκονται με τα πρώιμα ενδοσώματα, όπου γίνεται μια διαλογή ως προς το ποιες ουσίες θα καταλήξουν στο λυσόσωμα και ποιες θα ανακυκλωθούν στη μεμβράνη. Ο τύπος αυτός της ενδοκύτωσης είναι τόσο γρήγορος που υπολογίζεται ότι μπορεί να αποκόπτονται 1-3.000 κυστίδια από την μεμβράνη ενός καλλιεργούμενου κυττάρου το κάθε λεπτό!!

Η σύντηξη των κυστιδίων περιλαμβάνει ειδική αναγνώριση μεταξύ των μεμβρανών του κυστιδίου και του στόχου (Mayer, 2001; Mayer, 2002). Όταν δυο μεμβράνες πρόκειται να συντηχθούν, οι SNAREs των κυστιδίων (v-SNAREs) αναγνωρίζουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες της μεμβράνης-στόχου (t-SNAREs) (Kavalali, 2002). Μετά τη σύντηξη, οι v-SNAREs και t-SNAREs βρίσκονται αναπόφευκτα στην ίδια μεμβράνη και σχηματίζουν ένα 'cis' σύμπλοκο. Τα σύμπλοκα αυτά χαρακτηρίζονται από μεγάλη σταθερότητα και επομένως, η αποσύνδεση των πρωτεϊνών χρειάζεται κατανάλωση ενέργειας. Η απαιτούμενη ενέργεια προέρχεται από την υδρόλυση μορίων ATP, η οποία πραγματοποιείται από ATPάσες γνωστές ως NSF's. Οι τελευταίες προσδένονται στο 'cis' σύμπλοκο των SNAREs μέσω κάποιων άλλων διαλυτών κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, των SNAPs.

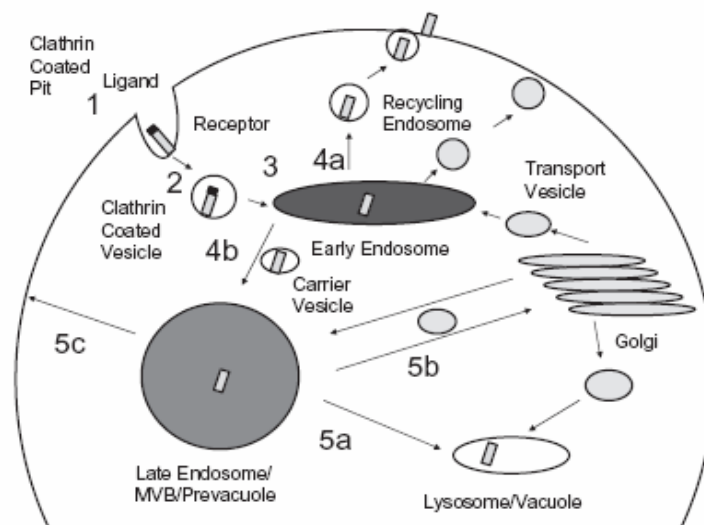
Ο σχηματισμός των καλυμμένων με κλαθρίνη κυστιδίων, ξεκινάει από την AP2 πρωτεΐνη, η οποία στρατολογεί την κλαθρίνη στη κυτταρική μεμβράνη και επάγει τη συναρμολόγηση της σε ένα δικτυωτό πλέγμα. Η συναρμολόγηση της κλαθρίνης δημιουργεί την απαραίτητη δύναμη για τον σχηματισμό των βοθρίων (Kirchhausen, 2002). Η πρόσδεση των ligands στους υποδοχείς τους σηματοδοτεί την στρατολόγηση των υποδοχέων στα καλυμμένα με κλαθρίνη βοθρία, μέσω αλληλεπιδράσεων των κυτταροπλασματικών τους ουρών με την AP2 ή τη β-arrestin. Μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, η κλαθρίνη και η AP2 προσδένονται, επίσης σε διάφορες πρωτεΐνες της ενδοκυτταρικής μηχανής συμπεριλαμβανομένων της amphiphysin I, amphiphysin II, epsin και Eps15, στρατολογώντας τις, έτσι, στα βοθρία. Τα μόρια αυτά αλληλεπιδρούν με άλλες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες όπως η δυναμίνη, η

synaptojanin, intersectin, endophilin και syndapin/PACSIN. Όλες αυτές οι πρωτείνες ρυθμίζουν τον σχηματισμό των καλυμμένων με κλαθρίνη βοθρίων και κυστιδίων. Για παράδειγμα, η δυναμίνη είναι μια GTPase που ρυθμίζει την απόσχιση των κυστιδίων από τη κυτταρική μεμβράνη., ενώ η synaptojanin είναι μια φωσφατάση λιπιδίων που ρυθμίζει την απόδυση (uncoating) των κυστιδίων (Gonzalez-Gaitan, 2003).



Εικόνα 2. Σχηματισμός ενός καλυμμένου με κλαθρίνη κυστιδίου (Gonzalez-Gaitan, 2003)

Η πολυπλοκότητα της πρωτεϊνικής μηχανής για τη δημιουργία και την αποκοπή των καλυμμένων με κλαθρίνη κυστιδίων από την κυτταρική μεμβράνη είναι εκπληκτική, δεδομένου ότι άλλα παρόμοια γεγονότα, όπως ο σχηματισμός των καλυμμένων με COPI κυστιδία, απαιτεί πολύ λιγότερες πρωτείνες. Μια πιθανή εξήγηση γι' αυτό είναι ότι η ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης είναι ο μηχανισμός εσωτερίκευσης ενός μεγάλου αριθμού φορτίων, συμπεριλαμβανομένων των ανακυκλώμενων υποδοχέων, ιοντικών καναλιών, receptor tyrosine kinases, cell adhesion molecules και synaptic vesicle membranes.



Εικόνα 3. Το «ταξίδι» του καλυμμένου με κλαθρίνη κυστιδίου μέσα στο κύτταρο.

✚ Σκοπός της εργασίας

Η νέκρωση, όπως προαναφέρθηκε, είναι γενικά μια μορφή κυτταρικού θανάτου για την οποία είναι γνωστά πολύ λίγα πράγματα σε σχέση με τους μοριακούς μηχανισμούς της. Ωστόσο, από τις μέχρι τώρα μελέτες οι επιστήμονες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι αν και η διαδικασία αυτή είναι συντηρημένη από το σκουλήκι μέχρι τον άνθρωπο, εντούτοις δεν υπάρχουν εξειδικευμένες πρωτεΐνες ή δομές που να οδηγούν το κύτταρο στον αιφνίδιο θάνατο. Αντίθετα, πιστεύεται ότι οι ίδιοι οι μηχανισμοί του κυττάρου που είναι απαραίτητοι για την φυσιολογική του λειτουργία, όπως για παράδειγμα τα υδρολυτικά ένζυμα cathepsins που βρίσκονται στα λυσοσώματα, κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες, στρέφονται ενάντια στο κύτταρο οδηγώντας το στο θάνατο. Με βάση τη λογική αυτή και δεδομένου ότι υπάρχουν μεταλλάγματα γονιδίων του ενδοκυτταρικού μονοπατιού που προκαλούν καταστολή του κυτταρικού θανάτου λόγω του *mec-4(d)* στο *C.elegans*, επιχειρήσαμε να διαπιστώσουμε αν οι μηχανισμοί αυτοί έχουν κάποιο ρόλο στην όλη διαδικασία.

Για τον σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν κάποια γονίδια στο *C.elegans*, που τα ορθόλογα τους στα θηλαστικά κωδικοποιούν για βασικές πρωτεΐνες του ενδοκυτταρικού μονοπατιού (Fares and Grant, 2002; Nurrish, 2002; Richmond and Broadie, 2002). Τα γονίδια αυτά φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

<u>Mammals</u>	<u><i>C. elegans</i></u>
dynamin	dyn-1
AP1	unc-101
syntaxin	unc-64
synaptotagmin	snt-1
synaptobrevin	snb-1
Kinesin-like	vab-8

Η δυναμίνη (***dyn-1***) είναι μια κυτταροπλασματική GTPase, που βρίσκεται στα caveolae και πολυμερίζεται γύρω από το βοθρίο, όπου μετά από υδρόλυση GTP, αποκόπτεται το βοθρίο σχηματίζοντας ένα κυστίδιο (Hinshaw, 2000).

Η AP1 (***unc-101***) είναι μια πρωτεΐνη σύμπλοκο που αποτελείται από 4 υπομονάδες. Η μια από αυτές τις υπομονάδες ($\mu 1$) κωδικοποιείται από το ***unc-101*** στο *C. elegans*. Βρίσκεται στο trans-Golgi και εμπλέκεται στην επιλογή των πρωτεϊνών και στη ρυθμιζόμενη εξωκύτωση (Shim et al., 2000).

Η syntaxin (***unc-64***) βρίσκεται στη κυτταρική μεμβράνη των νευρικών κυττάρων και απαιτείται για την απελευθέρωση των

νευροδιαβιβαστών κατά την σύντηξη του συναπτικού κυστιδίου. Είναι μια t-SNARE πρωτεΐνη, που σχηματίζει σύμπλοκο με την synaptobrevin ή VAMP και την SNAP-25 (Ogawa et al., 1998; Saifee et al., 1998).

Η synaptotagmin (**snt-1**) βρίσκεται στα κυστίδια και αλληλεπιδρά με το SNARE σύμπλοκο. Είναι ο κύριος αισθητήρας ασβεστίου που μεσολαβεί κατά την σύντηξη των κυστιδίων με την προσυναπτική μεμβράνη. Έχει βρεθεί, ακόμα, ότι η synaptotagmin προσδένει πρωτεΐνες εμπλεκόμενες σε ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης, όπως υπομονάδες της AP2. Επομένως, η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται να παίζει διπλό ρόλο: στην εξωκύτωση των συναπτικών κυστιδίων και στην ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης (Jorgensen et al., 1995; Koh and Bellen, 2003; Littleton and Bellen, 1995; Littleton et al., 1999; Nonet et al., 1998; O'Connor and Lee, 2002; Tucker and Chapman, 2002).

Η synaptobrevin (**snb-1**) είναι μια v-SNARE πρωτεΐνη. Βρίσκεται στο συναπτικό κυστίδιο και απαιτείται για την απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών, μετά από σηματοδότηση με Ca^{2+} (Nonet et al., 1998).

Η **vab-8** είναι μια πρωτεΐνη που μοιάζει με κινεσίνη. Συνεντοπίζεται στο κύτταρο με την ακτίνη και με τους μικροσωληνίσκους. Έχει βρεθεί ότι μεσολαβεί για την ανάπτυξη του νευράξονα των νευρικών κυττάρων (Wightman et al., 1996; Wolf et al., 1998).

Τα μεταλλάγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία διπλών μεταλλαγμάτων με *mec-4(d)* ή *deg-3(d)*, τα οποία παρουσιάζουν νέκρωση στους 6 αισθητήριους νευρώνες των ζώων. Στη συνέχεια, έγινε εκτίμηση του ποσοστού της νέκρωσης σε τέτοια σκουλήκια για να διαπιστωθεί η πιθανή επίδραση των μηχανισμών ενδοκύτωσης και μεταφοράς κυστιδίων στο κυτταρικό αυτό τύπο θανάτου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Δημιουργία διπλά μεταλλαγμένων στελεχών

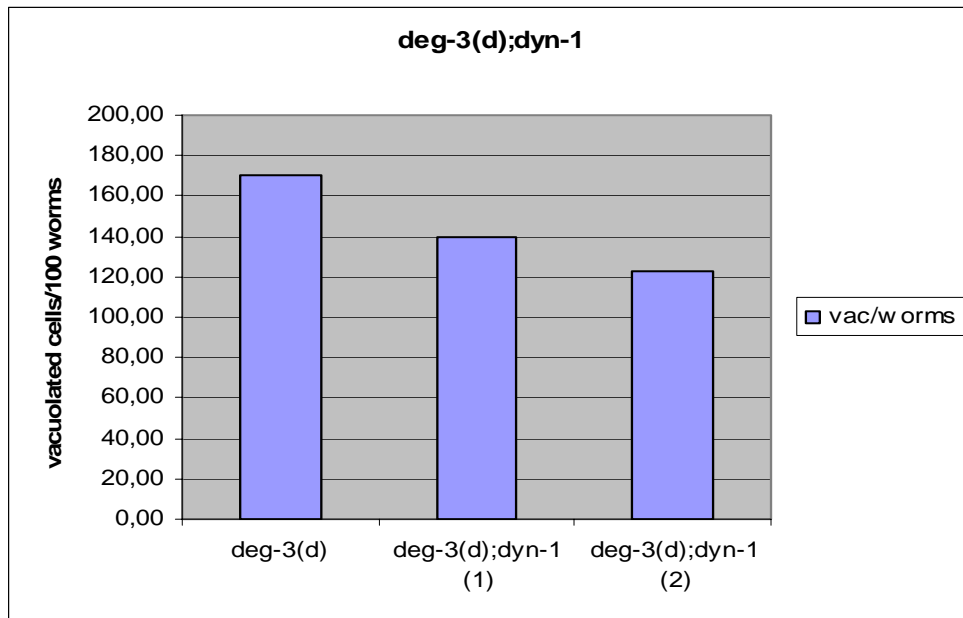
Ένας τρόπος για να εκτιμήσει κανείς αν ένα γονίδιο επιδρά στη διαδικασία της νέκρωσης και προκαλεί καταστολή ή όχι αυτής, είναι να δημιουργήσει διπλά μεταλλάγματα μεταξύ του υπό εξέταση γονιδίου και ενός γονιδίου που επάγει νέκρωση, όπως του *mec-4(d)* και του *deg-3(d)*. Για το σκοπό αυτό διασταυρώνει αρσενικά από το ένα στέλεχος με ερμαφρόδιτα άτομα του άλλου στελέχους και επιλέγει, στη συνέχεια, τα διπλά μεταλλαγμένα με βάση τον αναμενόμενο φαινότυπο.

Προσδιορισμός του ποσοστού της νέκρωσης

Ο προσδιορισμός του ποσοστού της νέκρωσης πραγματοποιείται με μέτρηση του αριθμού των κενών κυστιδίων (vacuoles), που σχηματίζουν τα κύτταρα που νεκρώνονται, σε τουλάχιστον 100 διαφορετικά άτομα L1. Το τελικό ποσοστό αναφέρεται σε αριθμό κυστιδίων/ 100 άτομα.

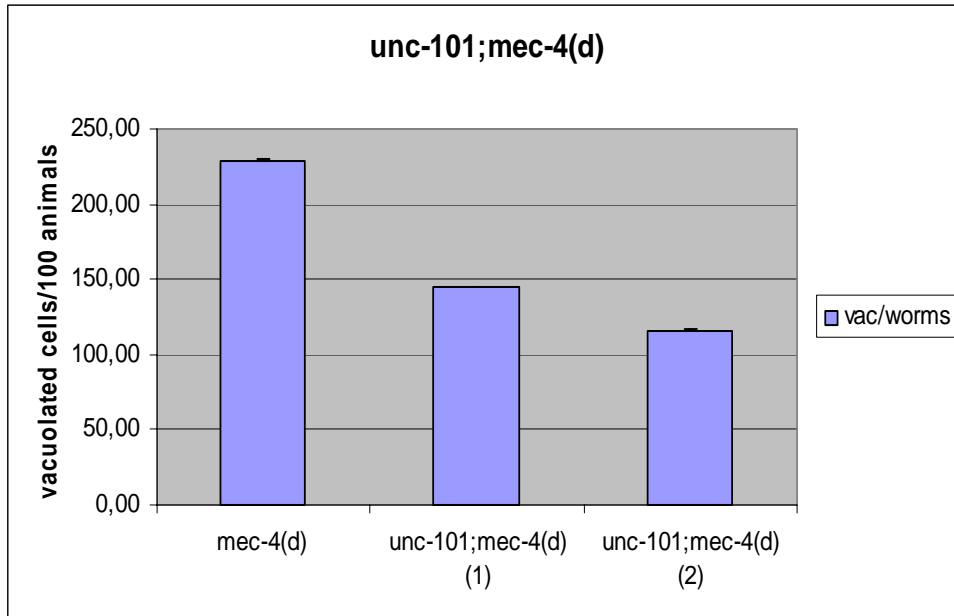
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα γονίδια *mec-4* και *dyn-1* βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα και σε πολύ κοντινή απόσταση. Για το λόγο αυτό ήταν πρακτικά αδύνατο να φτιαχτεί διπλό μετάλλαγμα αυτών των δυο. Έτσι, για την επίδραση του *dyn-1* στη νέκρωση, επιλέχθηκε να γίνει διπλό μετάλλαγμα μεταξύ αυτού και του *deg-3(d)*. Προσδιορίστηκε το ποσοστό νεκρωτικού θανάτου σε στελέχη *deg-3(d)*, που χρησιμοποιήθηκαν ως control, καθώς και στα στελέχη *dyn-1;deg-3(d)*. Τα τελευταία φέρουν μεταλλαγές στο γονίδιο της δυναμίνης, με αποτέλεσμα να έχουν πρόβλημα στην αποκοπή των καλυμμένων κυστιδίων με κλαθρίνη, από την πλασματική μεμβράνη, κατά την διαδικασία της ενδοκύτωσης. Έχουν, επίσης μεταλλαγμένο το γονίδιο *deg-3*, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν νέκρωση σε κάποια νευρικά κύτταρα, αλλά κυρίως στους 6 αισθητήριους νευρώνες του ζώου. Όπως φαίνεται από το σχήμα 1., όταν τα κυστίδια δεν μπορούν να αποκοπούν, το ποσοστό της νέκρωσης από το *deg-3(d)* μειώνεται.



Σχήμα 1.

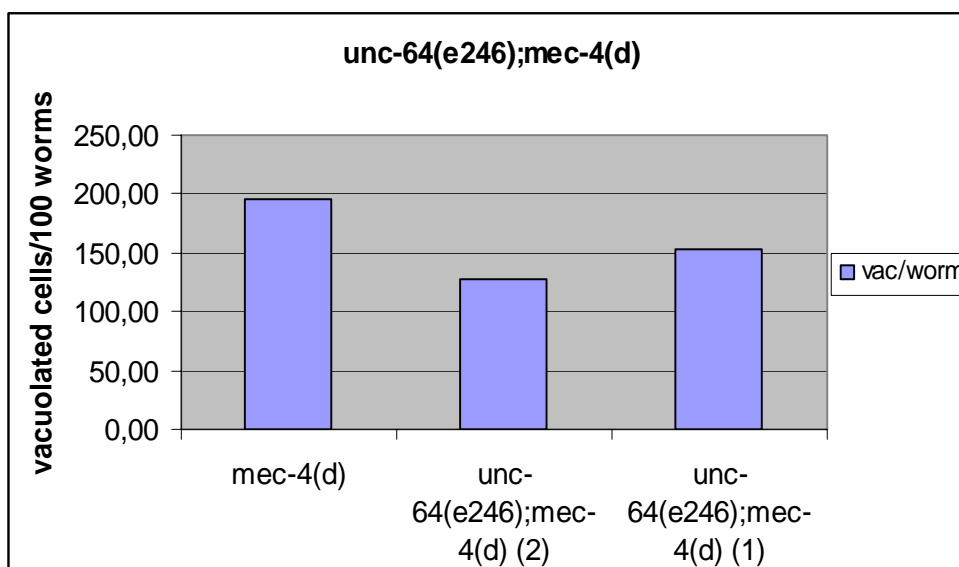
Κατά αντίστοιχο τρόπο δημιουργήθηκε το διπλό μετάλλαγμα *unc-101;mec-4(d)*, και προσδιορίστηκε το ποσοστό της νέκρωσης σε σχέση με σκουλήκια του στελέχους *mec-4(d)*. Τα σκουλήκια αυτά φέρουν μεταλλαγές στο γονίδιο που κωδικοποιεί για μια πρωτεϊνή προσαρμοστή, ομόλογη της (μ 1-I υπομονάδας της) AP1. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 2.



Σχήμα 2.

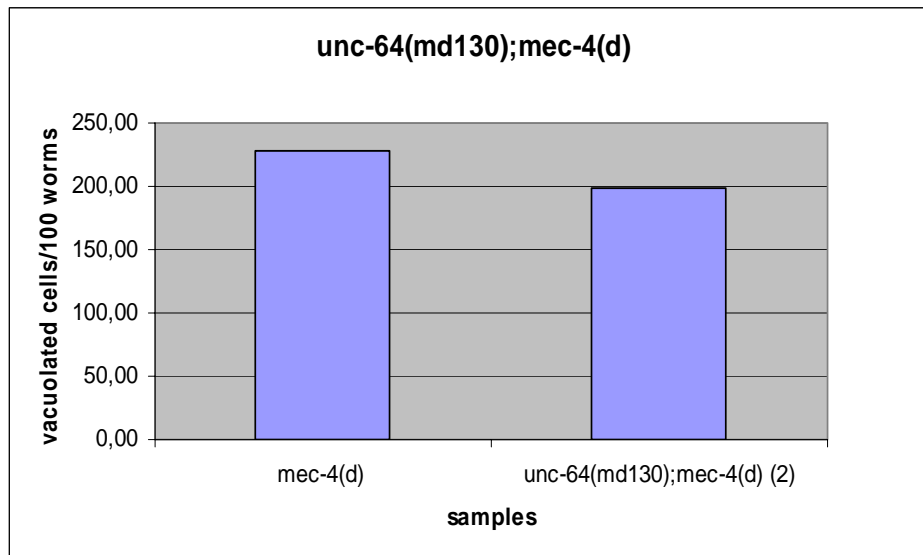
Όπως φαίνεται από το σχήμα αυτό, μεταλλαγή του εν λόγω γονιδίου προκαλεί μεγάλη μείωση στο ποσοστό νέκρωσης των νευρώνων του *C.elegans* εξαιτίας της υπερβολικής εισόδου ιόντων νατρίου που προκαλεί η επικρατής μεταλλαγή στο γονίδιο *mec-4(d)*.

Με την ίδια λογική δημιουργήθηκαν δυο διπλά μεταλλάγματα *unc-64;mec-4(d)*, από δυο διαφορετικά αλληλόμορφα του *unc-64*. Τα σκουλήκια αυτά έχουν πρόβλημα στο γονίδιο της syntaxin, που απαιτείται για την σύντηξη των συναπτικών κυστιδίων με την πλασματική μεμβράνη στα νευρικά κύτταρα. Όπως φαίνεται από το σχήμα 3., το μετάλλαγμα *unc-64(e246);mec-4(d)* παρουσιάζει μια σχετική καταστολή στη νέκρωση σε σχέση με το control, *mec-4(d)*.



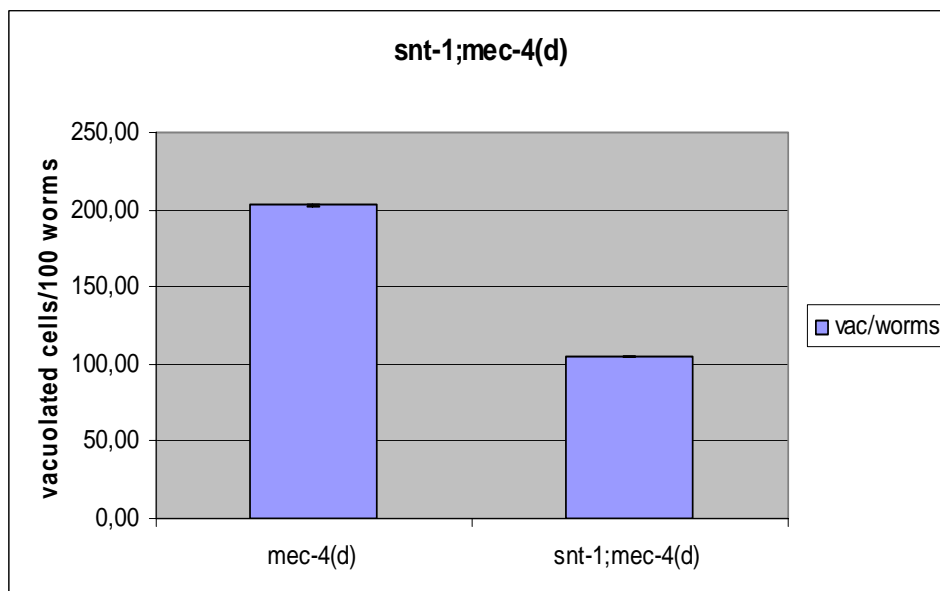
Σχήμα 3.

Σε αντίθεση όμως με το αλληλόμορφο e246, το αλληλόμορφο md130 δεν φαίνεται να παρουσιάζει μείωση στη νέκρωση. (Σχήμα 4)



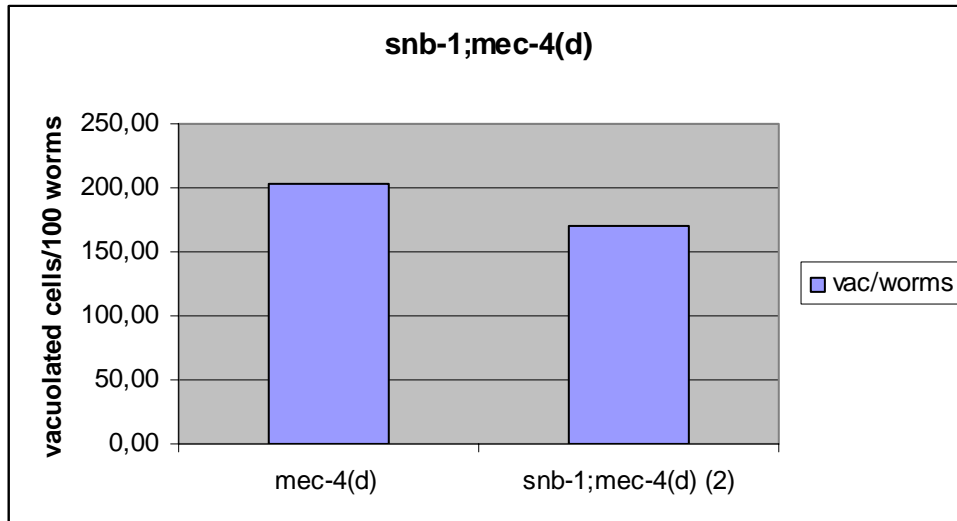
Σχήμα 4.

Στην περίπτωση του διπλού μεταλλάγματος *snt-1;mec-4(d)*, παρατηρούμε ότι συμβαίνει σημαντική μείωση του ποσοστού της νέκρωσης από ~200 σε ~100 κυστίδια/100 άτομα! Τα εν λόγω σκουλήκια έχουν πρόβλημα στο γονίδιο της *synaptotagmin*, που είναι ο κύριος αισθητήρας ασβεστίου που μεσολαβεί κατά την σύντηξη των κυστιδίων.



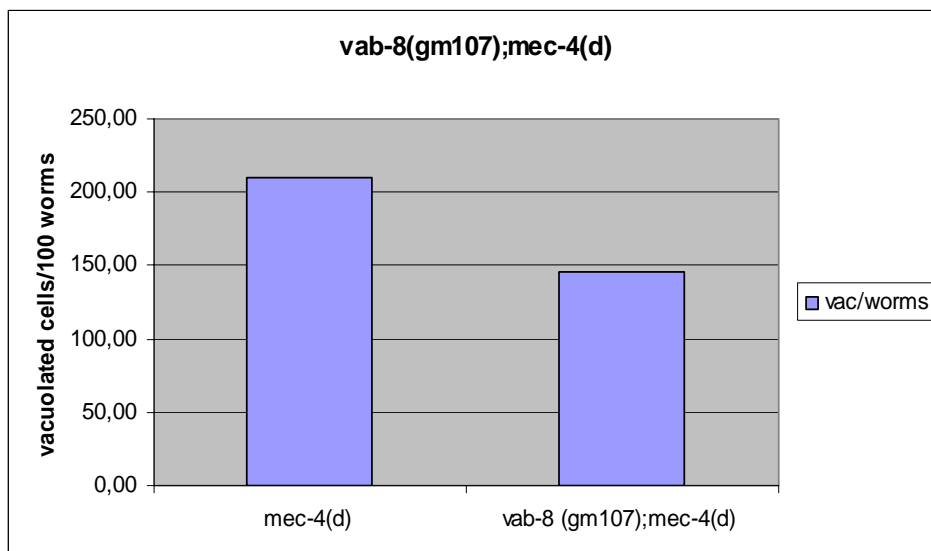
Σχήμα 5.

Όσον αφορά το διπλό μετάλλαγμα *snb-1;mec-4(d)*, το οποίο παρουσιάζει πρόβλημα στη SNARE πρωτεΐνη SNB-1, διαπιστώνουμε ότι εμφανίζει μικρή καταστολή της νέκρωσης σε σχέση με το control *mec-4(d)* (Σχήμα 6.).



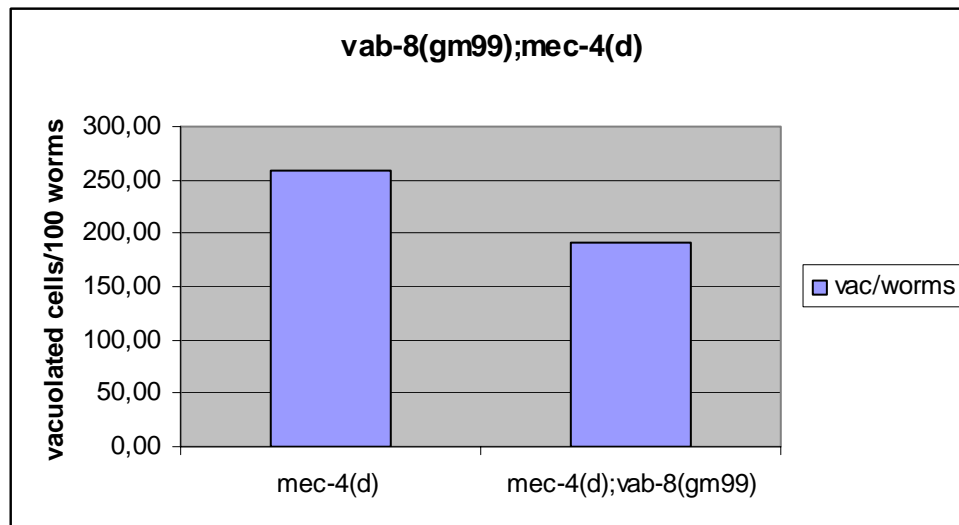
Σχήμα 6.

Κατά αντίστοιχο τρόπο δημιουργήθηκαν δυο διπλά μεταλλάγματα *vab-8;mec-4(d)*, από δυο διαφορετικά αλληλόμορφα του *vab-8*. Τα σκουλήκια αυτά έχουν πρόβλημα σε μια πρωτεΐνη με domain ομόλογο κινεσίνης. Όπως φαίνεται από το σχήμα 7., το μετάλλαγμα *vab-8(gm107);mec-4(d)* παρουσιάζει καταστολή στη νέκρωση σε σχέση με το control, *mec-4(d)*.



Σχήμα 7.

Αντίστοιχα αποτελέσματα ισχύουν και για το άλλο αλληλόμορφο του *vab-8*, το *gm99*, όπως φαίνεται και στο σχήμα 8.



Σχήμα 8.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ενδοκύτωση μέσω υποδοχέα είναι μια από τις βασικότερες διαδικασίες που εκτελεί ένα κύτταρο, απαραίτητη για την επιβίωση του. Για την διαδικασία αυτή, καθώς και για την μεταφορά κυστιδίων μέσα στο κύτταρο, έχουν εξειδικευθεί πολλά γονίδια. Επιλέχθηκαν κάποια από αυτά, που αποτελούν σημεία κλειδιά στις εν λόγω διαδικασίες, με σκοπό να εξεταστεί η ανάμειξη τους (ή όχι) στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο.

Μετά από την πρόσδεση κάποιου συνδέτη στον αντίστοιχο υποδοχέα, που βρίσκεται σε περιοχή καλυμμένη με κλαθρίνη, είναι απαραίτητο να σχηματιστεί και να αποκοπεί το κυστίδιο για να μπορέσει να ταξιδέψει στο εσωτερικό του κυττάρου και να φτάσει στον προορισμό του (π.χ. λυσόσωμα). Η κύρια πρωτεΐνη που μεσολαβεί για την αποκοπή των κυστιδίων είναι η GTPase δυναμίνη. Μεταλλάσσοντας την δυναμίνη σε σκουλήκια στα οποία είναι «προγραμματισμένο» ότι θα πεθάνουν οι 6 αισθητήριοι νευρώνες τους, λόγω της έκφρασης του *deg-3(d)* (μια υπενεργοποιημένη υπομονάδα του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης), παρατηρείται μια σχετική καταστολή της νέκρωσης (Σχήμα 1). Αυτό πιθανόν υποδεικνύει ότι κατά την εκτέλεση του νεκρωτικού θανάτου απαιτείται η αποκοπή κυστιδίων από την μεμβράνη. Ίσως οι δύνες που εμφανίζονται κατά τα πρώτα στάδια της νέκρωσης να οφείλονται ακριβώς σ' αυτό.

Μια άλλη κατηγορία πρωτεϊνών που παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την ενδοκύτωση και μεταφορά κυστιδίων είναι οι πρωτεΐνες προσαρμοστές. Αυτές διακρίνονται σε AP1, AP2, AP3 και β-arrestin. Μεσολαβούν για την επιλογή του φορτίου τόσο από την κυτταρική μεμβράνη, κατά την ενδοκύτωση μέσω υποδοχέα, όσο και για την εξαγωγή και «αποστολή» πρωτεϊνών από το trans-Golgi. Στην πρώτη περίπτωση καθορίζουν τους υποδοχείς που θα βρίσκονται σε εκείνη την (καλυμμένη με κλαθρίνη) περιοχή της μεμβράνης, ενώ στη δεύτερη περίπτωση επιλέγουν άμεσα τις προς μεταφορά πρωτεΐνες. Το σύμπλοκο AP1 ανήκει στη δεύτερη περίπτωση. Αποτελείται από 4 υπομονάδες, μια εκ των οποίων είναι η μ1, που η ορθόλογη της στο σκουλήκι κωδικοποιείται από το γονίδιο *unc-101*. Μετά από μετάλλαξη της πρωτεΐνης αυτής σε σκουλήκια *mec-4(d)* (εκφράζουν την τοξική MEC-4 πρωτεΐνη-κανάλι που επάγει νέκρωση στους 6 αισθητήριους νευρώνες) παρατηρείται δραματική μείωση (Σχήμα 2) του νεκρωτικού θανάτου περίπου στο ήμισυ! Είναι πιθανόν η πρωτεΐνη αυτή να είναι απαραίτητη για την μεταφορά του καναλιού MEC-4 από το trans-Golgi στη πλασματική μεμβράνη. Έτσι, όταν λείπει, η τοξική MEC-4 (στα *mec-4(d)* σκουλήκια), το αίτιο δηλαδή της νέκρωσης, δεν μπορεί να μεταφερθεί και να δράσει και το κύτταρο δεν πεθαίνει. Ωστόσο, για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση είναι απαραίτητο να μπορέσουμε να «δούμε» αν εξακολουθεί να υπάρχει το αίτιο, δηλαδή το MEC-4, στα κύτταρα που επιβιώνουν ή αν η επιβίωση οφείλεται στην απουσία αυτού. Για το σκοπό αυτό υπάρχουν ειδικές διαγονιδιακές σειρές σκουληκιών που εκφράζουν το MEC-4 συντηγμένο με GFP ειδικά στους 6 αισθητήριους νευρώνες. Με τις κατάλληλες διασταυρώσεις μεταξύ των παραπάνω διαγονιδιακών

σκουληκιών και σκουληκιών *unc-101*, και με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας ανιχνεύεται η παρουσία ή όχι του καναλιού MEC-4 στους αισθητήριους νευρώνες, καθώς και η περιοχή στην οποία βρίσκεται (υποκυτταρικός εντοπισμός).

Η κύρια λειτουργία που επιτελεί ένα νευρικό κύτταρο είναι η μεταβίβαση κάποιου ερεθίσματος που δέχεται στους διπλανούς τους νευρώνες, με τους οποίους συνδέεται στη σύναψη. Στην περίπτωση των χημικών συνάψεων η μεταβίβαση του ερεθίσματος γίνεται με τη μεσολάβηση των νευροδιαβιβαστών. Οι νευροδιαβιβαστές παράγονται και «φορτώνονται» σε συναπτικά κυστιδία. Τα κυστιδία αυτά βρίσκονται ακριβώς πίσω από την προσυναπτική μεμβράνη και μετά από το κατάλληλο ερέθισμα, συντήκονται με την μεμβράνη και απελευθερώνεται ο νευροδιαβιβαστής. Σε όλη αυτή την διαδικασία παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο κάποιες μεμβρανικές πρωτεΐνες των συναπτικών κυστιδίων, αλλά και της πλασματικής μεμβράνης, που αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν το SNARE σύμπλοκο. Συγκεκριμένα, στα συναπτικά κυστιδία βρίσκεται η *synaptobrevin* (v-SNARE) και στη συναπτική μεμβράνη η *syntaxin* και η *SNAP-25* (t-SNAREs). Χωρίς ερέθισμα, τα κυστιδία σχεδόν ακουμπούν τη μεμβράνη και οι *synaptobrevin*, *syntaxin* *SNAP-25* αλληλεπιδρούν χαλαρά. Στα συναπτικά κυστιδία βρίσκεται και μια εξίσου σημαντική για αυτή τη διαδικασία πρωτεΐνη, η *synaptotagmin*. Η πρωτεΐνη αυτή είναι αισθητήρας Ca^{2+} . Στην περίπτωση που ένα ερέθισμα φτάσει, εισέρχεται Ca^{2+} στο κύτταρο, μέσω *voltage-gated* καναλιών της μεμβράνης, το οποίο αντιλαμβάνεται η *synaptotagmin*. Η τελευταία προκαλεί ενδυνάμωση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών του SNARE συμπλόκου, με αποτέλεσμα να συντήκονται τα κυστιδία με την προσυναπτική μεμβράνη. Οι ορθόλογες αυτών των πρωτεϊνών στο νηματώδη είναι η *unc-64* (*syntaxin*), *snb-1* (*synaptobrevin*) και *snt-1* (*synaptotagmin*).

Στο *C. elegans* υπάρχουν 2 μεταλλαγμένα αλληλόμορφα της *unc-64*, το *e246* και το *md130*. Αρχικά, φάνηκε ότι το *unc-64(e246)* προκαλεί καταστολή της νέκρωσης (Σχήμα 3) λόγω της υπερβολικής εισόδου ιόντων νατρίου που προκαλεί η επικρατής μεταλλαγή στο γονίδιο *mec-4(d)*. Το δεύτερο, όμως, αλληλόμορφο, το *unc-64(md130)* δεν παρουσιάζει καταστολή της νέκρωσης (Σχήμα 4). Το γεγονός ότι το ένα αλληλόμορφο καταστέλλει, ενώ το άλλο όχι, υποδεικνύει ότι μάλλον, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν εμπλέκεται στην εκτέλεση του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου, τουλάχιστον στο νηματώδη.

Στην περίπτωση της *synaptotagmin* (*snt-1*) τα αποτελέσματα είναι πολύ ενθαρρυντικά, καθώς η μετάλλαξη της προκαλεί μεγάλη (50%!) καταστολή της νέκρωσης (Σχήμα 5) λόγω του *mec-4(d)*. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ιδιότητα του στη σύντηξη των συναπτικών κυστιδίων με τη μεμβράνη ή και σε άλλους λόγους. Για παράδειγμα, δεν είναι γνωστό, αν η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται γενικά σε διάφορα κυστιδία και απαιτείται για την σύντηξη τους με τον κατάλληλο στόχο, κατά την δημιουργία του SNARE συμπλόκου. Θα μπορούσε, λόγω χάρη να εμπλέκεται στη σύντηξη οργανιδίων (π.χ. αυτοφαγοσωμάτων) με το λυσόσωμα και την καταστροφή του περιεχομένου τους. Έχει βρεθεί, ακόμα, ότι προσδένει

πρωτεΐνες εμπλεκόμενες σε ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης, όπως το AP1 σύμπλοκο. Μπορεί, επομένως, η μεταλλαγή της να παρεμποδίζει την διαδικασία της ενδοκύτωσης και τον σχηματισμό κυστιδίων, που μπορεί να απαιτούνται κατά την διάρκεια της νέκρωσης. Για να εξετάσει κανείς όλες αυτές τις υποθέσεις, είναι απαραίτητο πρώτα απ' όλα να γίνει ο υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης. Για το σκοπό αυτό πρέπει να γίνει σύντηξη της πρωτεΐνης με GFP και ένα κατάλληλο υποκινητή που θα καθοδηγεί την έκφραση της χιμαιρικής αυτής πρωτεΐνης στους 6 αισθητήριους νευρώνες. Έπειτα, θα δημιουργηθούν διαγονιδιακά σκουλήκια και θα γίνει ανίχνευση της synaptotagmin, μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας (ουσιαστικά γίνεται ανίχνευση GFP).

Όσον αφορά την synaptobrevin (*snb-1*) τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι προκαλεί μικρή καταστολή (Σχήμα 6) της νέκρωσης από το *mec-4(d)*. Αυτό υποδηλώνει, ότι η εν λόγω πρωτεΐνη, μάλλον δεν έχει να κάνει με το μηχανισμό του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου.

Οι κινεσίνες είναι μια κατηγορία πρωτεϊνών που βοηθούν στη μεταφορά κυστιδίων πάνω στους μικροσωληνίσκους του κυτταροσκελετού. Η πρωτεΐνη *vab-8* του νηματώδη διαθέτει μια περιοχή με ομολογία κινεσίνης. Ωστόσο, δεν είναι ακριβώς εξακριβωμένη η λειτουργία της. Είναι γνωστό ότι συνεργάζεται με δυο ακόμα πρωτεΐνες, την *unc-51* και την *unc-14*, για την ανάπτυξη των νευραξόνων. Οι δυο τελευταίες ρυθμίζουν την μεταφορά κυστιδίων που φέρουν πρωτεΐνες απαραίτητες για τους νευράξονες. Στο νηματώδη υπάρχουν δυο μεταλλάγματα της *vab-8*. Και τα δυο μεταλλαγμένα αλληλόμορφα φαίνεται (Σχήματα 7 & 8) ότι προκαλούν καταστολή της νέκρωσης από το *mec-4(d)*. Μια πιθανή εξήγηση αυτού είναι ότι η εν λόγω πρωτεΐνη μπορεί να βοηθάει στη μεταφορά του MEC-4 καναλιού στη μεμβράνη των νευραξόνων κατά την δημιουργία τους.

ΜΕΡΟΣ Β'

*Μελέτη του ρόλου των ανταλλακτών NCX στο νεκρωτικό
κυτταρικό θάνατο στο νηματώδη *C.elegans**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ασβέστιο είναι ένα από τα βασικότερα ιόντα που υπάρχουν μέσα στο κύτταρο. Σε περιπτώσεις, ωστόσο, που η κυτταροπλασματική του συγκέντρωση υπερβεί κάποια όρια το ιόν αυτό μπορεί να αποβεί θανατηφόρο. Για το λόγο αυτό υπάρχουν προστατευτικοί μηχανισμοί που διατηρούν τα ενδοκυτταρικά του επίπεδα σταθερά. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν αντλίες και κανάλια τόσο στη πλασματική μεμβράνη όσο και στα οργανίδια (μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο και σαρκοπλασματικό).

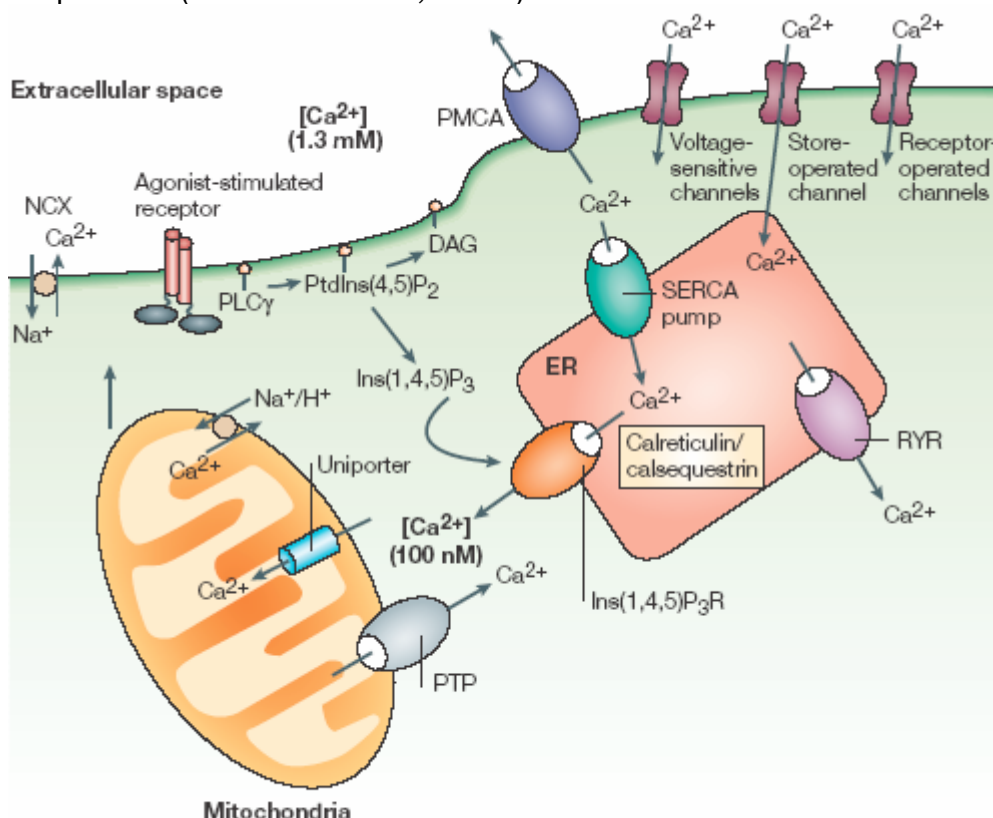
Μια κατηγορία πρωτεϊνών που παίζουν ρόλο στην ομοιόσταση του ασβεστίου είναι οι ανταλλάκτες $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Σε φυσιολογικές συνθήκες οι NCX βάζουν στο κύτταρο 3 Na^+ και βγάζουν 1 Ca^{2+} . Σε συνθήκες stress αντιστρέφεται η φορά μεταφοράς, με αποτέλεσμα να εισέρχονται Ca^{2+} στο εσωτερικό του κυττάρου και να εξέρχονται Na^+ στον εξωκυτταρικό χώρο (Blaustein and Lederer, 1999). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μεγάλη αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του Ca^{2+} . Σύμφωνα, όμως με την γνωστή “calpain-cathepsin hypothesis”, αυτό μπορεί να αποτελέσει σήμα για νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο.

Με βάση το γεγονός αυτό, επιχειρήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση των συγκεκριμένων ανταλλακτών στην διεξαγωγή του νεκρωτικού θανάτου στο *C. elegans*. Για το λόγο αυτό κλωνοποιήσαμε τα ορθόλογα γονίδια *ncx-1-5* στους κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς και πραγματοποιήσαμε RNAi. Τα πειράματα έγιναν σε σκουλήκια *mec-4(d)*. Τα τελευταία εκφράζουν την τοξική πρωτεΐνη MEC-4, η οποία οδηγεί σε υπερβολική αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και επάγει νέκρωση. Με τα RNAi πειράματα για τα *ncx-1-5* υπολογίστηκε η καταστολή της νέκρωσης και εκτιμήθηκε η επίδραση τους σ’ αυτό το είδος του θανάτου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ομοιόσταση ασβεστίου

Το κυτταροπλασματικό ασβέστιο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, σε όλους σχεδόν τους τύπους των ζωικών κυττάρων. Η ενδοκυτταρική ομοιόσταση αυτού του ιόντος διατηρείται μέσω καναλιών και αντλιών, που λειτουργούν είτε για να βάλουν ασβέστιο μέσα στο κυτταρόπλασμα είτε για να το απομακρύνουν από αυτό. Τα κανάλια που συνεισφέρουν κυρίως στην αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ασβεστίου είναι κάποια κανάλια της κυτταρικής μεμβράνης (voltage, receptor & store-gated channels), ο υποδοχέας τριφωσφορικής ινοσιτόλης (inositol triphosphate receptor InsP3Rs) του ενδοπλασματικού δικτύου και ryanodine υποδοχέας (ryanodine receptor RyR). Η απομάκρυνση ασβεστίου από το κυτταρόπλασμα γίνεται κυρίως μέσω της αντλίας ασβεστίου, με κατανάλωση ATP (Ca²⁺-ATPase pump) και των ανταλλακτών Na⁺/Ca²⁺ της κυτταρικής μεμβράνης, και της αντλίας SERCA (sarco-ER ATPase) του ενδοπλασματικού δικτύου. Οι ανταλλάκτες Na⁺/Ca²⁺ και ο πόρος μετάβασης διαπερατότητας (permeability transition pore) των μιτοχονδρίων μπορεί επίσης να παίζουν κάποιο ρόλο στην ομοιόσταση του ασβεστίου (Orrenius et al., 2003).



Εικόνα 1. Ρύθμιση της διαμερισματοποίησης του Ca²⁺ μέσα στο κύτταρο (Orrenius et al., 2003)

✚ Ανταλλάκτες Na^+/Ca^{2+}

Ανταλλάκτες NCX έχουν βρεθεί σε πολλούς ιστούς και διάφορα είδη, μεταξύ των οποίων, τον άνθρωπο, την μύγα και το σκουλήκι. Διακρίνονται σε δυο οικογένειες, την NCX οικογένεια, τα μέλη της οποίας δεν μεταφέρουν K^+ και την NCKX οικογένεια, τα μέλη της οποίας μεταφέρουν K^+ . Στα θηλαστικά έχουν βρεθεί 6 διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν αυτούς τους «ανταλλάκτες». Τα 3 είναι για NCX (NCX1, NCX2, NCX3) και τα άλλα 3 για τους NCKX (NCKX1, NCKX2, NCKX3) (Guerini, 1998).

Οι NCX ανταλλάκτες παρουσιάζουν σημαντική ομολογία αλληλουχίας (~70%). Εμφανίζουν 11 διαμεμβρανικά domains, μια μεγάλη κεντρική υδροφιλική ρυθμιστική περιοχή, ενδοκυτταρικά, μεταξύ του διαμεμβρανικού domain 5 και 6, ένα εξωκυτταρικό αμινοτελικό και ένα κυτταροπλασματικό καρβοξυτελικό άκρο (Blaustein and Lederer, 1999).

Είναι ηλεκτρογενείς μεταφορείς που μπορούν να μετακινήσουν Ca^{2+} είτε προς τα μέσα (ανταλλάσσοντας εξωκυτταρικό Ca^{2+} για ενδοκυτταρικό Na^+) είτε προς τα έξω (ανταλλάσσοντας εξωκυτταρικό Na^+ για ενδοκυτταρικό Ca^{2+}) του κυττάρου, ανάλογα με το δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης και την διαβάθμιση της συγκέντρωσης των Na^+ , Ca^{2+} και K^+ κατά μήκος αυτής. Σε φυσιολογικές συνθήκες οι NCX βάζουν στο κύτταρο 3 Na^+ και βγάζουν 1 Ca^{2+} , ενώ οι NCKX βάζουν 4 Na^+ και βγάζουν 1 Ca^{2+} και 1 K^+ . Σε συνθήκες stress αντιστρέφεται η φορά μεταφοράς, με αποτέλεσμα να εισέρχονται Ca^{2+} στο εσωτερικό του κυττάρου και να εξέρχονται Na^+ στον εξωκυτταρικό χώρο (Blaustein and Lederer, 1999). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μεγάλη αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του Ca^{2+} , κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του κυττάρου (Orrenius et al., 2003).

✚ Το ασβέστιο ως σήμα θανάτου

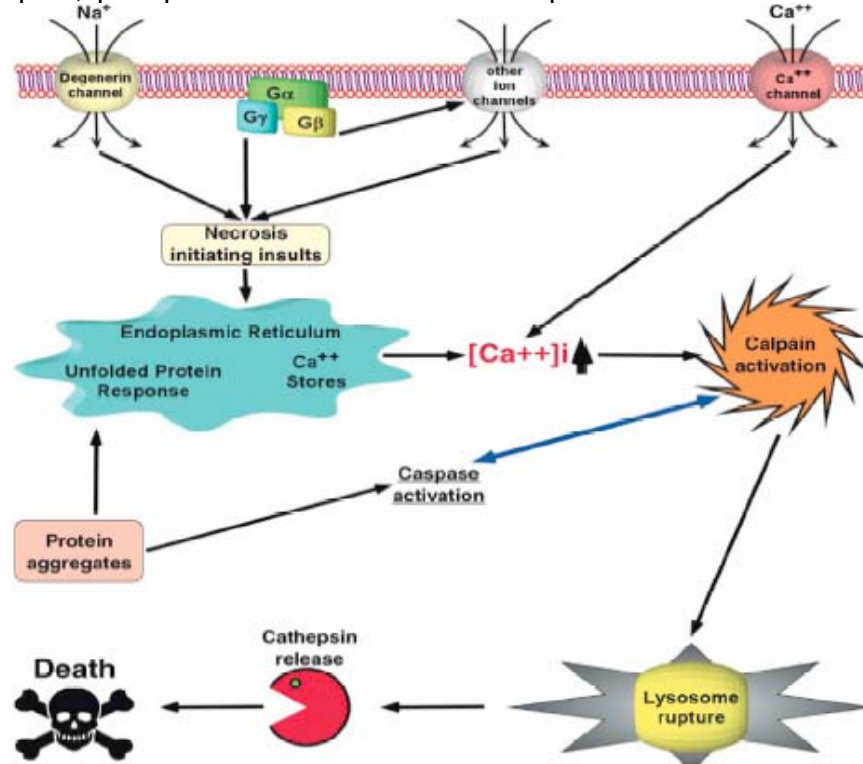
Στην περίπτωση που τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου υπερβούν κάποια όρια και οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί δεν μπορέσουν να επαναφέρουν την συγκέντρωση στα φυσιολογικά επίπεδα, τότε τα πράγματα γίνονται πολύ δύσκολα για το κύτταρο (Orrenius et al., 2003). Ανάλογα με την συγκέντρωση ασβεστίου και τις υπόλοιπες συνθήκες που επικρατούν εκείνη τη στιγμή, το κύτταρο μπορεί να οδηγηθεί σε απόπτωση ή νέκρωση. Για παράδειγμα, υψηλότερη από την φυσιολογική συγκέντρωση ασβεστίου μπορεί να οδηγήσει σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια και παρεμπόδιση της λειτουργίας του αποπτωτικού αναστολέα Bcl₂, με αποτέλεσμα την επαγωγή του αποπτωτικού μονοπατιού. Εναλλακτικά, υπερβολική είσοδος ασβεστίου μπορεί να οδηγήσει σε νέκρωση.

Πρόσφατες μελέτες στο νηματώδη *C. elegans* υποδεικνύουν ότι το ασβέστιο είναι κεντρικός παράγοντας στο νευροεκφυλισμό (Syntichaki and Tavernarakis, 2003). Διάφορα πειράματα αποκάλυψαν τουλάχιστον 4 πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου που ρυθμίζουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου και απαιτούνται για τον νεκρωτικό

κυτταρικό θάνατο. Αυτές είναι η calreticulin calnexin, που είναι τσαπερόνες που δεσμεύουν ασβέστιο, και τα κανάλια ασβεστίου InsP3R και RyR (Tavernarakis and Driscoll, 2001). Επιπρόσθετα, gain of function μεταλλαγές στη DEG-3 πρωτεΐνη, μια υπομονάδα του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (κανάλι ασβεστίου), επάγουν νέκρωση στο νηματώδη. Στα θηλαστικά ο θάνατος από υπερδιέγερση (excitotoxic death), που μοιάζει με την νέκρωση στους νηματώδεις, προκαλείται από περίσσεια γλουταμικού με επακόλουθη την υπέρ-ενεργοποίηση των καναλιών υποδοχέων γλουταμικού, AMPA, NMDA και kainate, στη μετασυναπτική μεμβράνη των νευρικών κυττάρων (Syntichaki and Tavernarakis, 2003).

🚩 “Calpain-cathepsin hypothesis”

Βασισμένος σε ανακαλύψεις στα πρωτεύοντα και στους αρουραίους, ο Yamashima (2000) (Yamashima, 2000) πρότεινε ένα μηχανισμό κυτταρικής καταστροφής κατά την διάρκεια της νέκρωσης, ο οποίος είναι γνωστός ως “calpain-cathepsin hypothesis”. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, μεγάλη είσοδος ασβεστίου από κανάλια και αντλίες της μεμβράνης, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης Ca^{2+} , που με τη σειρά της οδηγεί σε ενεργοποίηση των ενζύμων calpains. Τα ένζυμα αυτά είναι κυτταροπλασματικές πρωτεάσες κυστεΐνης, που έχουν διάφορα υποστρώματα όπως πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου. Σε περίπτωση υπερενεργοποίησης από ασβέστιο μπορεί να επιτεθούν στο λυσόσωμα και να προκαλέσουν απελευθέρωση των cathepsin proteases. Οι τελευταίες αποικοδομούν διάφορες δομές του κυττάρου, με άμεσο επακόλουθο τον νεκρωτικό θάνατο.



Εικόνα 2. Πιθανό σενάριο νεκρωτικού θανάτου (Samara and Tavernarakis, 2003)

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Με βάση την “calpain-cathepsin hypothesis” για τον ρόλο του ασβεστίου στη νέκρωση και τα αποτελέσματα από μελέτες με πρωτεΐνες μεταφορείς ασβεστίου, θελήσαμε να μελετήσουμε την πιθανή ανάμειξη των ανταλλακτών NCX.

Για τον σκοπό αυτό απομονώσαμε τα 5 ορθόλογα γονίδια *ncx* του νηματώδη, τα οποία και κλωνοποιήσαμε σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς. Οι συγκεκριμένες κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση RNAi, με σκοπό την προσωρινή τους σίγηση και την διερεύνηση του πιθανού ρόλου των καναλιών αυτών κατά την νέκρωση των νευρικών κυττάρων του *C.elegans*.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μελέτη του ρόλου των NCX στη νέκρωση στηρίχθηκε στη μέθοδο του RNAi. Για το λόγο αυτό, απομονώθηκαν με PCR από γενωμικό DNA αγρίου τύπου N2 Bristol σκουληκιών, τα αντίστοιχα γονίδια του *C.elegans* για τα NCX (1-5), τα οποία κλωνοποιήθηκαν στους κατάλληλους φορείς (pL4440). Η κλωνοποίηση των γονιδίων σε pL4440 φορέα, γίνεται πάντα μεταξύ 2 T7 υποκινητών, με αντίθετη φορά, με αποτέλεσμα τα μετάγραφα που παράγονται να είναι συμπληρωματικά και να σχηματίζουν δίκλωνο RNA.

Οι πλασμιδιακές κατασκευές που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν, στη συνέχεια, για τον μετασχηματισμό των κατάλληλων επιδεκτικών κυττάρων για RNAi πειράματα (HT115 cells). Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν ένα πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο της T7 πολυμεράσης κάτω από τον έλεγχο ενός υποκινητή που επάγεται από IPTG. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται παραγωγή δίκλωνου RNA, μόνο μετά από επαγωγή (με IPTG) του συστήματος.

Τα μετασχηματισμένα HT115 κύτταρα, αποτέλεσαν, τέλος, την τροφή σκουληκιών *mec-4(d)*. Τα συγκεκριμένα σκουλήκια έχουν μια μεταλλαγή στο κανάλι MEC-4, που το υπερενεργοποιεί και προκαλεί νέκρωση στους 6 αισθητήριους νευρώνες, όπου εκφράζεται. Όταν τα σκουλήκια φάνε τα βακτήρια, το δίκλωνο RNA απελευθερώνεται και πάει σε όλα τα κύτταρα τους, αλλά προκαλεί σίγηση του αντίστοιχου γονιδίου, μόνο στα κύτταρα που εκφράζεται.

Σε περίπτωση, επομένως που τα NCX σχετίζονται με το φαινόμενο της νέκρωσης –και αν αυτά εκφράζονται στους 6 αισθητήριους νευρώνες–, αναμένεται μείωση του φαινομένου αυτού, σε *mec-4(d)* background.

PCR

Χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA από σκουλήκια αγρίου τύπου N2 Bristol μαζί με τους κατάλληλους κάθε φορά εκκινητές για την

απομόνωση των 5 NCX γονιδίων του *C.elegans.*, με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών, αναγράφονται παρακάτω:

Αλληλουχίες primers

ncx-1 5': CCC-AAG-CTT-CAG-GAA-AAC-CTG-TCA-GAA-TGC

ncx-1 3': CCC-AAG-CTT-TCT-AAC-CGA-ATT-GCC-CAG-CA

ncx-2 5': CCC-AAG-CTT-TTC-AAC-CGT-CAT-CGG-ATC-CA

ncx-2 3': CCC-AAG-CTT-CCT-CAA-TGC-AAT-CGG-TCC-TC

ncx-3 5': CCC-AAG-CTT-GTA-TCG-CAA-TTG-CGG-CTG-AC

ncx-3 3': CCC-AAG-CTT-GCA-GAA-TCT-GTA-CTC-TCT-TGG

ncx-4 5': CCC-AAG-CTT-GCG-TCG-GAT-CAA-CGG-TTC-GA

ncx-4 3': CCC-AAG-CTT-CTT-CAG-GAA-GTT-GCT-CCA-ATG

ncx-5 5': CCC-AAG-CTT-CCT-CCA-AAC-ACG-TCG-AAG-AG

ncx-5 3': CCC-AAG-CTT-TCT-GGA-AGT-GTG-TAT-GCC-AG

Κάθε αντίδραση περιείχε τα εξής:

10μl γενωμικό DNA

10μl PCR buffer

10μl dNTPs (2mM)

3μl Taq Polymerase

1μl primer 5'

1μl primer 3'

65μl H₂O

100μl τελικός όγκος αντίδρασης

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε κάτω από τις εξής συνθήκες:

94°C για 3min	}	5 κύκλοι
93°C για 30sec		
50°C για 30sec		
72°C για 3min		
93°C για 30sec	}	25 κύκλοι
56°C για 30sec		
72°C για 2min		

και final extension στους 72°C για 10min.

Καθαρισμός των PCR fragments και κλωνοποίηση αυτών σε pUC19 φορέα

Οι αντιδράσεις PCR καθαρίστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο QIAquick PCR Purification Protocol της Qiagen, και μια ποσότητα από αυτές κόπηκε με το ένζυμο HindIII. Με το ίδιο ένζυμο κόπηκε και ο

πλασμιδιακός φορέας pUC19 στον οποίο επρόκειτο να γίνει η κλωνοποίηση.

Μετά από τις πέψεις, ακολούθησαν αντιδράσεις συγκόλλησης (ligation) μεταξύ κάθε γονιδίου *ncx* και του πλασμιδιακού φορέα pUC19. Κάθε αντίδραση περιελάμβανε:

- 1μl vector pUC19
- 5μl insert *ncx*
- 2μl NEB buffer 10x
- 1μl 10mM ATP
- 1μl ligase
- 10μl H₂O
- 20μl τελικός όγκος αντίδρασης

Κλωνοποίηση των *ncx-1-5* σε pL4440 φορέα

Απομονώθηκαν, αρχικά, τα γονίδια *ncx-1(-5)* από τις πλασμιδιακές κατασκευές pUC19-*ncx1(-5)*, μετά από πέψη με τα ένζυμα με τα οποία έγινε η κλωνοποίηση στους φορείς pUC19.

Ο καθαρισμός των τμημάτων που απομονώθηκαν έγινε μετά από ηλεκτροφόρηση των πέσεων σε 1% πήκτωμα αγαρόζης και εφαρμογή του πρωτοκόλλου “Qiaquick Gel Extraction Kit Protocol” της Qiagen. Η ίδια διαδικασία ακολούθηθηκε και για την απομόνωση του κομμένου φορέα pL4440.

Ακολούθησαν οι κατάλληλες αντιδράσεις συγκόλλησης (ligation) μεταξύ του κομμένου πλασμιδιακού φορέα pL4440 και του καθαρισμένου ενθέματος-γονιδίου. Κάθε αντίδραση περιείχε:

- 1μl vector pL4440/ένζυμο
- 10μl insert *ncx1 (-5)*/ένζυμο
- 2μl NEB buffer 10x
- 1μl 10mM ATP
- 1μl ligase
- 5μl H₂O
- 20μl τελικός όγκος αντίδρασης

Μέρος των αντιδράσεων αυτών (10μl) χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό χημικά επιλεκτικών κυττάρων XL1-blue. Οι θετικές αποικίες επιλέχθηκαν μετά από απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας (mini-preps/ πρωτόκολλο boiling με λυσοζύμη) και πέψη με τα ένζυμα με τα οποία επιχειρούνταν η κλωνοποίηση κάθε φορά. Για μεγαλύτερη σιγουριά έγιναν συμπληρωματικές πέψεις με ένζυμα που έδιναν χαρακτηριστικό pattern για κάθε construct.

Οι τελικές πλασμιδιακές κατασκευές pL4440-*ncx1(-5)* χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό επιλεκτικών κυττάρων HT115, που χρησιμοποιούνται για RNAί πειράματα.

RNAi πειράματα

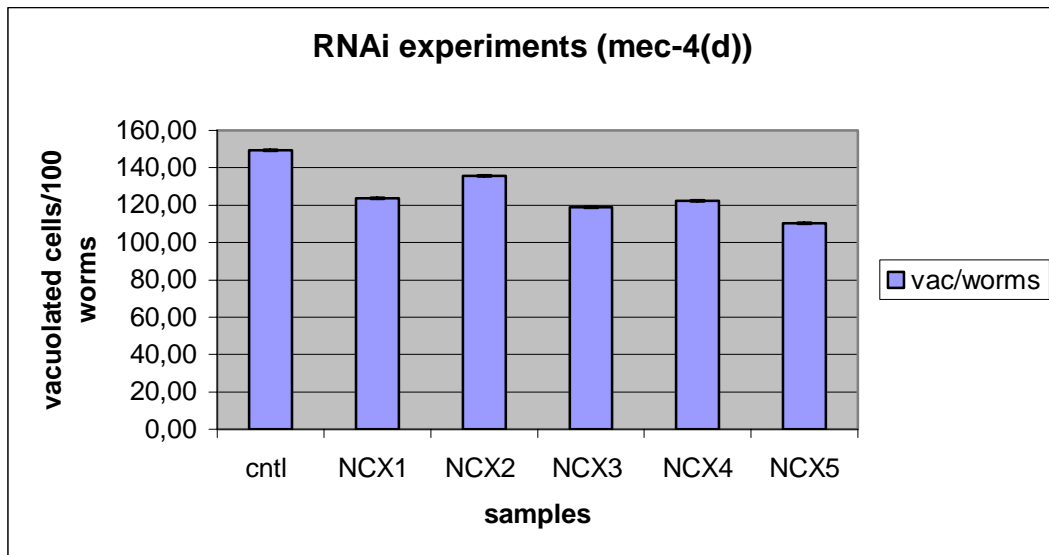
Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε το *mec-4(d)* στέλεχος.

Τοποθετούνται αρχικά 20-25 σκουλήκια *mec-4(d)* σταδίου L2-L3 σε NGM πιάτα χωρίς τροφή για 1-2hrs , ώστε να απομακρυνθούν τα βακτήρια από την επιφάνεια της επιδερμίδας. Στη συνέχεια, τα άτομα αυτά τοποθετούνται σε NGM πιατάκια με τα μετασχηματισμένα HT115 βακτήρια. Τα μετασχηματισμένα HT115 εκφράζουν το κατάλληλο κάθε φορά δίκλωνο RNA, υπό τον έλεγχο του T7 υποκινητή, μετά από επαγωγή με IPTG. Τα σκουλήκια αφήνονται στους 15°C (~3 μέρες), μέχρι να αφήσουν αυγά. Ξεπλένονται, έπειτα, τα σκουλήκια και αφήνονται τα αυγά να σκάσουν στους 20°C για ~4ώρες. Τέλος, συλλέγονται τα σκουλήκια σε M9 buffer, (2short spins έως 7000rpm), ναρκώνονται (με NaN3 20mM) και αφού τοποθετηθούν σε μια αντικειμενοφόρο, μετρώνται νεκρωτικά κυστίδια στο μικροσκόπιο σε άτομα L1 και προσδιορίζεται το ποσοστό της νέκρωσης. Σε κάθε περίπτωση υπολογίζεται και το ποσοστό της νέκρωσης σε σκουλήκια που τρέφονται με βακτήρια HT115, τα οποία φέρουν άδειο το φορέα (αρνητικοί μάρτυρες).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μέθοδος του RNAi εφαρμόστηκε για την προσωρινή σίγηση και των 5 γονιδίων *ncx-1-5*. Τα σκουλήκια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν *mec-4(d)*. Τα σκουλήκια αυτά εκφράζουν την τοξική πρωτεΐνη MEC-4, η οποία προκαλεί νέκρωση στους 6 αισθητήριους νευρώνες του ζώου.

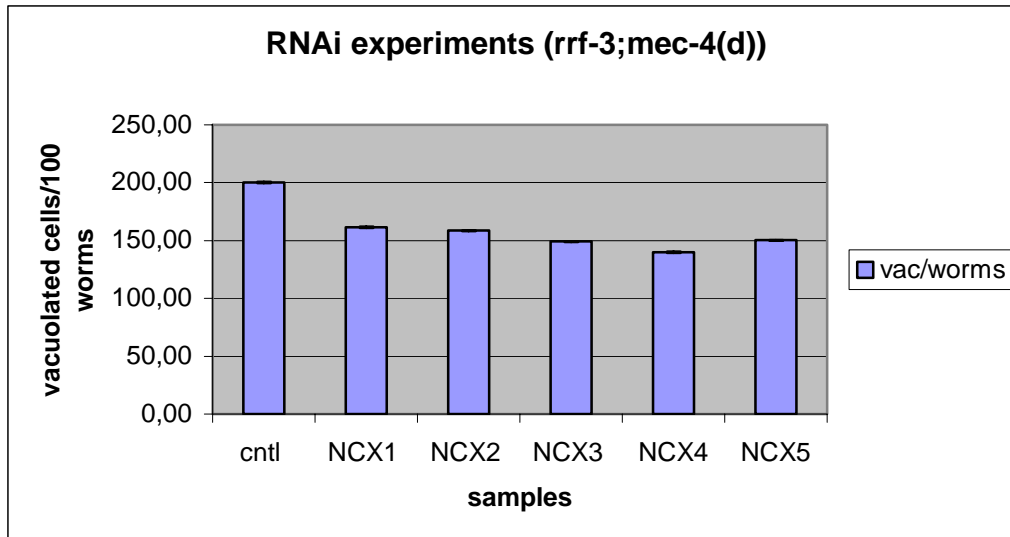
Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 8 πειράματα, τα αποτελέσματα των οποίων εμφάνιζαν μεγάλες διακυμάνσεις. Μετά από υπολογισμό της μέσης τιμής για κάθε δείγμα, προέκυψε το διάγραμμα που ακολουθεί.



Σχήμα 1.

Φαίνεται από το σχήμα ότι συμβαίνει μια μικρή μείωση της νέκρωσης, που όμως δεν μπορεί να θεωρηθεί σημαντική. Με βάση και το γεγονός ότι το πείραμα έχει επαναληφθεί 8 φορές, το συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι οι ανταλλάκτες $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ μάλλον δεν σχετίζονται με την νέκρωση. Ωστόσο, επειδή η μέθοδος του RNAi δεν «πετυχαίνει» κάθε φορά και ειδικά στη περίπτωση των νευρικών κυττάρων που εμείς ενδιαφερόμαστε, επιχειρήσαμε να χρησιμοποιήσουμε ένα άλλο στέλεχος που βιβλιογραφικά είναι γνωστό ότι είναι ευαίσθητο στο RNAi. Το στέλεχος αυτό είναι το *rf-3;mec-4(d)*.

Το πείραμα επαναλήφθηκε 7 φορές. Τα αποτελέσματα, ωστόσο, εμφάνιζαν και πάλι μεγάλες διακυμάνσεις. Υπολογίζοντας την μέση τιμή για κάθε δείγμα προκύπτει η γραφική παράσταση που ακολουθεί.



Σχήμα 2.

Στην περίπτωση του *rrf-3;mec-4(d)* τα αποτελέσματα φάνηκε να είναι κάπως καλύτερα από αυτά με τα *mec-4(d)* σκουλήκια. Η σίγηση των γονιδίων δίνει μια σχετική καταστολή, σε σχέση με τα control σκουλήκια (*mec-4(d)* στα οποία χορηγήθηκε σκέτος ο πλασμιδιακός φορέας pL4440). Ωστόσο, επειδή οι τιμές από πείραμα σε πείραμα δεν ήταν σταθερές δεν μπορούμε να εμπιστευτούμε το αποτέλεσμα αυτό.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με βάση τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν παραπάνω, οι ανταλλάκτες NCX δεν φαίνεται να σχετίζονται με την διαδικασία της νέκρωσης. Από την μια οι τιμές από πείραμα σε πείραμα ποικίλλουν και από την άλλη η καταστολή που παρατηρείται είναι πολύ μικρή, μη σημαντική. Αυτό ισχύει τόσο για τα πειράματα σε *mec-4(d)* γενετικό υπόβαθρο, όσο και για αυτά σε *rrf-3;mec-4(d)*. Ωστόσο, δεν μπορεί κανείς να αποκλείσει την πιθανότητα να έχουν κάποιο ρόλο οι ανταλλάκτες αυτοί στη νέκρωση, καθώς τα πειράματα τα οποία έγιναν στηρίζονται στο RNAί.

Τα αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στην ίδια τη “φύση” των RNAί πειραμάτων, τα οποία δεν πετυχαίνουν πάντοτε καθώς μπορούν να επηρεαστούν από πολλούς διαφορετικούς παράγοντες, όπως το στάδιο των σκουληκιών, η θερμοκρασία και οι μέρες που αφήνονται για να δράσει το RNA κ.ά. Επίσης, το στέλεχος *rrf-3;mec-4(d)* μπορεί να θεωρείται πιο ευαίσθητο στη συγκεκριμένη μέθοδο, αλλά από μελέτες που έχουν γίνει έχει αποδειχθεί ότι αρκετά γονίδια χάνουν την επίδραση τους σε έναν συγκεκριμένο φαινότυπο όταν χρησιμοποιείται αυτό το στέλεχος. Με άλλα λόγια, το *rrf-3;mec-4(d)* στέλεχος μπορεί να είναι αποτελεσματικότερο για RNAί με κάποια γονίδια, ενώ αντίθετα να δίνει λάθος αποτελέσματα με κάποια άλλα. Δεν θα πρέπει, τέλος, να ξεχνάμε ότι το RNAί στους νευρώνες του σκουληκιού είναι πολύ δύσκολο να πετύχει και να δώσει αποτελέσματα.

Για να καταλήξει κανείς σε ένα πιο σίγουρο συμπέρασμα, αποκλείοντας την πιθανότητα να φταίει το πείραμα που δεν πέτυχε, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσει αντίστοιχα μεταλλάγματα για τα γονίδια. Ωστόσο, μεταλλάγματα για τους ανταλλάκτες NCX δεν υπάρχουν ακόμα. Για το λόγο αυτό καταφύγαμε σε RNAί πειράματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Berger, A. J., Hart, A. C., and Kaplan, J. M. (1998). G alphas-induced neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* *18*, 2871-2880.
- Blaustein, M. P., and Lederer, W. J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* *79*, 763-854.
- Chalfie, M., and Wolinsky, E. (1990). The identification and suppression of inherited neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *345*, 410-416.
- Driscoll, M., and Chalfie, M. (1991). The *mec-4* gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature* *349*, 588-593.
- Driscoll, M., and Gerstbrein, B. (2003). Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration. *Nat Rev Genet* *4*, 181-194.
- Fares, H., and Grant, B. (2002). Deciphering endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *Traffic* *3*, 11-19.
- Gonzalez-Gaitan, M. (2003). Signal dispersal and transduction through the endocytic pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 213-224.
- Guerini, D. (1998). The Ca²⁺ pumps and the Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *Biometals* *11*, 319-330.
- Hinshaw, J. E. (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* *16*, 483-519.
- Jorgensen, E. M., Hartwig, E., Schuske, K., Nonet, M. L., Jin, Y., and Horvitz, H. R. (1995). Defective recycling of synaptic vesicles in synaptotagmin mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *378*, 196-199.
- Kavalali, E. T. (2002). SNARE interactions in membrane trafficking: a perspective from mammalian central synapses. *Bioessays* *24*, 926-936.
- Kirchhausen, T. (2002). Clathrin adaptors really adapt. *Cell* *109*, 413-416.
- Koh, T. W., and Bellen, H. J. (2003). Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci* *26*, 413-422.
- Littleton, J. T., and Bellen, H. J. (1995). Synaptotagmin controls and modulates synaptic-vesicle fusion in a Ca(2+)-dependent manner. *Trends Neurosci* *18*, 177-183.
- Littleton, J. T., Serano, T. L., Rubin, G. M., Ganetzky, B., and Chapman, E. R. (1999). Synaptic function modulated by changes in the ratio of synaptotagmin I and IV. *Nature* *400*, 757-760.
- Mayer, A. (2001). What drives membrane fusion in eukaryotes? *Trends Biochem Sci* *26*, 717-723.
- Mayer, A. (2002). Membrane fusion in eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* *18*, 289-314.
- McPherson, P. S., Kay, B. K., and Hussain, N. K. (2001). Signaling on the endocytic pathway. *Traffic* *2*, 375-384.

Metzstein, M. M., Stanfield, G. M., and Horvitz, H. R. (1998). Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet* 14, 410-416.

Mukherjee, S., Ghosh, R. N., and Maxfield, F. R. (1997). Endocytosis. *Physiol Rev* 77, 759-803.

Nonet, M. L., Saifee, O., Zhao, H., Rand, J. B., and Wei, L. (1998). Synaptic transmission deficits in *Caenorhabditis elegans* synaptobrevin mutants. *J Neurosci* 18, 70-80.

Nurrish, S. J. (2002). An overview of *C. Elegans* trafficking mutants. *Traffic* 3, 2-10.

O'Connor, V., and Lee, A. G. (2002). Synaptic vesicle fusion and synaptotagmin: 2B or not 2B? *Nat Neurosci* 5, 823-824.

Ogawa, H., Harada, S., Sassa, T., Yamamoto, H., and Hosono, R. (1998). Functional properties of the *unc-64* gene encoding a *Caenorhabditis elegans* syntaxin. *J Biol Chem* 273, 2192-2198.

Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-565.

Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., and Gabai, V. L. (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 283, 1-16.

Putcha, G. V., and Johnson, E. M., Jr. (2004). Men are but worms: neuronal cell death in *C. elegans* and vertebrates. *Cell Death Differ* 11, 38-48.

Richmond, J. E., and Broadie, K. S. (2002). The synaptic vesicle cycle: exocytosis and endocytosis in *Drosophila* and *C. elegans*. *Curr Opin Neurobiol* 12, 499-507.

Saifee, O., Wei, L., and Nonet, M. L. (1998). The *Caenorhabditis elegans unc-64* locus encodes a syntaxin that interacts genetically with synaptobrevin. *Mol Biol Cell* 9, 1235-1252.

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

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

Shim, J., Sternberg, P. W., and Lee, J. (2000). Distinct and redundant functions of *mul* medium chains of the AP-1 clathrin-associated protein complex in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 11, 2743-2756.

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

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

Tavernarakis, N., and Driscoll, M. (2001). Cell/Neuron degeneration. In *The Encyclopedia of Genetics*, S. Brenner, and J. Miller, eds. (New York, NY, Academic Press).

- Treinin, M., Gillo, B., Liebman, L., and Chalfie, M. (1998). Two functionally dependent acetylcholine subunits are encoded in a single *Caenorhabditis elegans* operon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15492-15495.
- Tucker, W. C., and Chapman, E. R. (2002). Role of synaptotagmin in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Biochem J* 366, 1-13.
- Wightman, B., Clark, S. G., Taskar, A. M., Forrester, W. C., Maricq, A. V., Bargmann, C. I., and Garriga, G. (1996). The *C. elegans* gene *vab-8* guides posteriorly directed axon outgrowth and cell migration. *Development* 122, 671-682.
- Wolf, F. W., Hung, M. S., Wightman, B., Way, J., and Garriga, G. (1998). *vab-8* is a key regulator of posteriorly directed migrations in *C. elegans* and encodes a novel protein with kinesin motor similarity. *Neuron* 20, 655-666.
- Yamashima, T. (2000). Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol* 62, 273-295.