

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΓΕΝΕΣΗΣ
ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΙΤΟΦΑΓΙΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗ
ΓΗΡΑΝΣΗ ΣΤΟΝ ΝΗΜΑΤΩΔΗ *Caenorhabditis elegans***

ΠΑΛΗΚΑΡΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2015

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Νευρογενετικής και Γήρανσης του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, στο Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας στο Ηράκλειο Κρήτης, στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος Μοριακή Βιολογία- Βιοϊατρική.

Επιβλέπων Καθηγητής: ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ ΤΑΒΕΡΝΑΡΑΚΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

ΓΙΩΡΓΟΣ ΓΑΡΙΝΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΣΠΗΛΙΑΝΑΚΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ ΤΑΒΕΡΝΑΡΑΚΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

ΓΙΩΡΓΟΣ ΓΑΡΙΝΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
ΑΧΙΛΛΕΑΣ ΓΡΑΒΑΝΗ, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης
ΓΙΩΡΓΟΣ ΜΑΥΡΟΘΑΛΑΣΣΙΤΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης
ΙΩΣΗΦ ΠΑΠΑΜΑΤΘΑΙΑΚΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΣΠΗΛΙΑΝΑΚΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ ΤΑΒΕΡΝΑΡΑΚΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΧΑΛΕΠΑΚΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
<u>I. Εισαγωγή στη βιολογία του νηματώδους <i>Caenorhabditis elegans</i></u>	9
<u>II. Το Μιτοχόνδριο</u>	12
<u>III. Οξειδωτική Βλάβη των Μιτοχονδρίων</u>	13
<u>IV. Αυτοφαγία (Autophagy)</u>	14
<u>V. Μιτοφαγία (Mitophagy)</u>	16
<u>Vα. Μιτοφαγία στη ζύμη</u>	17
<u>Vβ. Μιτοφαγία κατά τη διαφοροποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων</u>	17
<u>Vγ. Επαγωγή της μιτοφαγίας μέσω του μονοπατιού Pink1 – Parkin</u>	18
<u>VI. Μιτοχονδριακή βιογένεση</u>	20
<u>VIα. Μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν στη βιογένεση μιτοχονδρίων</u>	20
<u>VIβ. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη μιτοχονδριακή βιογένεση</u>	21
<u>VII. Συντονισμός της μιτοχονδριακής βιογένεσης και της μιτοφαγίας</u>	22
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
A. Μοριακή Βιολογία	27
1. Απομόνωση γενωμικού DNA από τον <i>C. elegans</i>	27
2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	28
3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	28
5. Απομόνωση ολικού mRNA και αντίδραση Real Time PCR.....	29
B. Μέθοδοι στον <i>C. elegans</i>	31
1. Βακτηριακά στελέχη.....	31
2. Θρεπτικά μέσα και διαλύματα.....	31
2. A. NGM (Nematode Growth Media) (1lt).....	31

2. Β. Υδατικό διάλυμα M9 (1lt).....	31
2. Γ. Διάλυμα ψύξης νηματωδών – Freezing solution (1lt).....	32
3. Κατασκευή πλασμιδίων για την έκφραση πρωτεϊνών στον <i>C. elegans</i>	32
4. Κατασκευή πλασμιδίων για την καταστολή της έκφρασης γονιδίων με την τεχνική του RNAi.....	33
5. Ανάπτυξη και διατήρηση στελεχών <i>C. elegans</i>	34
5. Α. Διατήρηση στους 15°C.....	34
5. Β. Διατήρηση στους -80°C.....	34
6. Συγχρονισμός πληθυσμού νηματωδών και καθαρισμός από μολύνσεις.....	35
7. Δημιουργία αρσενικών ζώων <i>C. elegans</i>	35
8. Πειράματα γήρανσης.....	36
9. Τεχνικές μικροσκοπίας.....	37
10. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	37
11. Άλλες Πληροφορίες.....	37
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
<u>I. Ο ρόλος της μιτοφαγίας στη διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης</u>	39
<u>II. In vivo συστήματα μικροσκοπικής απεικόνισης της μιτοφαγίας</u>	46
<u>III. Ο ρόλος της μιτοφαγίας στη γήρανση και στην αντιμετώπιση συνθηκών στρες</u>	49
<u>IV. Αλληλεπίδραση και επικοινωνία μεταξύ των πρωτεϊνών DCT-1, PINK-1 και PDR-1 στη μιτοφαγία</u>	52
<u>V. Επαγωγή ανάδρομης κυτταρικής σηματοδότησης έπειτα από καταστολή της μιτοφαγίας</u>	54
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

Ευχαριστίες...

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια απόκτησης του μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης “Μοριακή Βιολογία – Βιοϊατρική”, στο εργαστήριο Νευρογενετικής και Γήρανσης υπό την επίβλεψη του Καθηγητή, Νεκτάριου Ταβερναράκη, στο Ίνστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ).

Πρωταρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Νεκτάριο για την ευκαιρία που μου έδωσε να γίνω μέλος της ερευνητικής του ομάδας. Αναμφισβήτητα η προσφορά του είναι μεγάλη και θα του είμαι ευγνώμων για το ενδιαφέρον του, την εμπιστοσύνη, την στήριξη και τις συμβουλές που μου έδινε κατά την διάρκεια της ερευνητικής μου εργασίας.

Στην συνέχεια, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Αγγέλα για την άριστη συνεργασία μας αλλά και για τεχνική της υποστήριξη. Είμαι σίγουρος ότι η συνεργασία αυτή θα συνεχιστεί με την ίδια επιτυχία και στο μέλλον. Αγγέλα ευχαριστώ πραγματικά για την υπομονή, τις συμβουλές και την βοήθειά σου!!!

Επιπλέον, θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ και στα υπόλοιπα μέλη της εργαστηριακής ομάδας παλιά και νέα. Ευχαριστώ λοιπόν την Ευγενία, την Άρτεμης, την Μαρκέλλα, τον Matthias, τον Νίκο (Κούρτη), τον Μάνο (Βλάχο), τη Βασιλική, την Ιωάννα, τη Διονυσία, την Andrea, την Μαργαρίτα, την Χριστίνα, την Ειρήνη, τον Ηλία, τον Μάνο (Κυριακάκη) και τον Νίκο (Χαρμπίλα) για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε στο εργαστήριο και την φιλία τους. Εδώ θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον Μάνο και τον Νίκο για τις ατέλειωτες συζητήσεις μας για επιστημονικά, μπασκετικά θέματα (και όχι μόνο!!!). Παιδιά ευχαριστώ πραγματικά!!!

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην κα Μαίρη, η οποία πάντα έβρισκε χρόνο να ακούσει τις απορίες και τις ανησυχίες μου όλα αυτά τα χρόνια. Επιπλέον, την ευχαριστώ θερμά για τις πάντα χρήσιμες και σωστές συμβουλές και παρατηρήσεις σε θέματα επιστημονικά αλλά και προσωπικά. Κα Μαίρη σας ευχαριστώ πάρα πάρα πολύ!!!

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου στο Πανεπιστήμιο και ιδιαίτερος τον κ. Χαράλαμπο Σπηλιανάκη και τον κ. Σίφη Παπαματθαίακη, οι οποίοι ήταν πάντα πρόθυμοι και ορεξάτοι να μιλήσουν μαζί μου, να με συμβουλέψουν και να με βοηθήσουν όποτε τους χρειάστηκα. Θέλω να τους πω ότι θα τους είμαι πάντα ευγνώμων για την στήριξή τους και για την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο το πρόσωπό μου.

Επίσης θέλω πραγματικά να ευχαριστήσω τους κολλητούς μου φίλους Σωτήρη και Μαρίνα για την κοινή πορεία που είχαμε και τη δυνατή φιλία που αναπτύξαμε τα τελευταία 8 χρόνια. Είμαι βέβαιος ότι θα είμαστε δεμένοι για πάντα παρά το γεγονός ότι οι δρόμοι μας χωρίζουν! Ένα ακόμα μεγάλο ευχαριστώ στους Αθηναίους φίλους μου, Γιώργο, Γιάννη, Μιχάλη, Τάσο, Αποστόλη, Αριστείδη, Αγγελική, για τις τηλεφωνικές κουβέντες και live συζητήσεις όλα αυτά τα χρόνια που βρίσκομαι στην Κρήτη!!! Η Βοήθειά τους και η στήριξή τους ήταν μεγάλη και ας μην το ήξεραν όλα αυτά τα χρόνια...ειδικά σε δύσκολες στιγμές που τους χρειάστηκα ήταν δίπλα μου!!! Ευχαριστώ παιδιά!!!

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω αυτή την εργασία στους γονείς μου (Γιώργο και Ιωάννα) και στον Δημήτρη, τον μικρό μου αδερφό, οι οποίοι μέσα από τον καθημερινό τους αγώνα και τις πολλές τους στερήσεις μου εξασφάλιζαν και συνεχίζουν να εξασφαλίζουν τα πάντα ώστε να μπορώ χωρίς άλλες έννοιες να συγκεντρώνομαι σε αυτό που πραγματικά μου αρέσει. **Το ότι έχω φτάσει εδώ που είμαι σήμερα το οφείλω πραγματικά σ' αυτούς!!!**

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). Aberrant accumulation of mitochondria in disparate cell types is a shared hallmark of many human pathologies and ageing. How mitochondrial biogenesis coordinates with the removal of damaged or superfluous mitochondria to maintain cellular homeostasis is not well understood. Here, we show that mitophagy, a selective type of autophagy targeting mitochondria for degradation, interfaces with mitochondrial biogenesis to regulate mitochondrial content in *Caenorhabditis elegans*. We found that DCT-1 is a key mediator of mitophagy and longevity assurance under conditions of stress in *C. elegans*. Impairment of mitophagy compromises stress resistance and triggers mitochondrial retrograde signalling through the SKN-1 transcription factor that regulates both mitochondrial biogenesis genes and mitophagy by enhancing DCT-1 expression. Our findings reveal a homeostatic feedback loop that integrates metabolic signals to coordinate the biogenesis and turnover of mitochondria. Uncoupling of these two processes during ageing contributes to overproliferation of damaged mitochondria and decline of cellular function.

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 διαπερατή 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 κατεστραμμένων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών μέσω πρωτεολυτικών μηχανισμών, η αποκατάσταση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων από τα υγιή μέσω των μηχανισμών σχάσης/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 τύπος αυτοφαγίας και αποτελεί τον κύριο μηχανισμό αποικοδόμησης και απομάκρυνσης κατεστραμμένων μιτοχονδρίων. Η ανεξέλεγκτη συσσώρευση μιτοχονδριακής μάζας παρατηρείται σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις και κατά την διάρκεια της γήρανσης. Ωστόσο, ο μηχανισμός που ρυθμίζει αυτό το φαινόμενο παραμένει άγνωστος. Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε την συμμετοχή της μιτοφαγίας και της μιτοχονδριακής βιογένεσης στο παραπάνω φαινόμενο και ποιές είναι οι συνέπειες απορρύθμισης του συντονισμού αυτών των δύο αντιτιθέμενων κυτταρικών διαδικασιών στη μιτοχονδριακή λειτουργία και κατ' επέκταση στην διατήρηση της ομοιόστασης του νηματώδους *Caenorhabditis elegans*. Βρήκαμε ότι η πρωτεΐνη DCT-1 είναι ο κύριος υποδοχέας της μιτοφαγίας. Η μείωση των επιπέδων μιτοφαγίας κατά την γήρανση οδηγεί σε προοδευτική συσσώρευση, κυρίως μη λειτουργικών μιτοχονδρίων. Κάτι τέτοιο οδηγεί τελικά σε ελάττωση του προσδόκιμου επιβίωσης. Αντίθετα, ενίσχυση της ανακύκλωσης των μιτοχονδρίων έχει ως αποτέλεσμα τη θωράκιση της ομοιόστασης των κυττάρων, την ανθεκτικότητα στο στρες και την σημαντική αύξηση της διάρκειας ζωής του οργανισμού. Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την παρουσία μιτοχονδριακών βλαβών, οδηγεί στην έναρξη μιας διμερούς ανάδρομης κυτταρικής σηματοδότησης που διαμεσολαβείται από τον μεταγραφικό παράγοντα SKN-1 και περιλαμβάνει την συντονισμένη επαγωγή γονιδίων που ρυθμίζουν τόσο τη μιτοχονδριακή βιογένεση όσο και τη μιτοφαγία. Ο συντονισμός των δύο αυτών διαδικασιών διατηρεί την εύρυθμη μιτοχονδριακή λειτουργία, απομακρύνοντας τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια και δημιουργώντας νέα και υγιή. Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των δύο αυτών διαδικασιών κατά τη διάρκεια της γήρανσης συμβάλλει στην υπερπολλαπλασιασμό των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων και τη μείωση της κυτταρικής λειτουργίας.

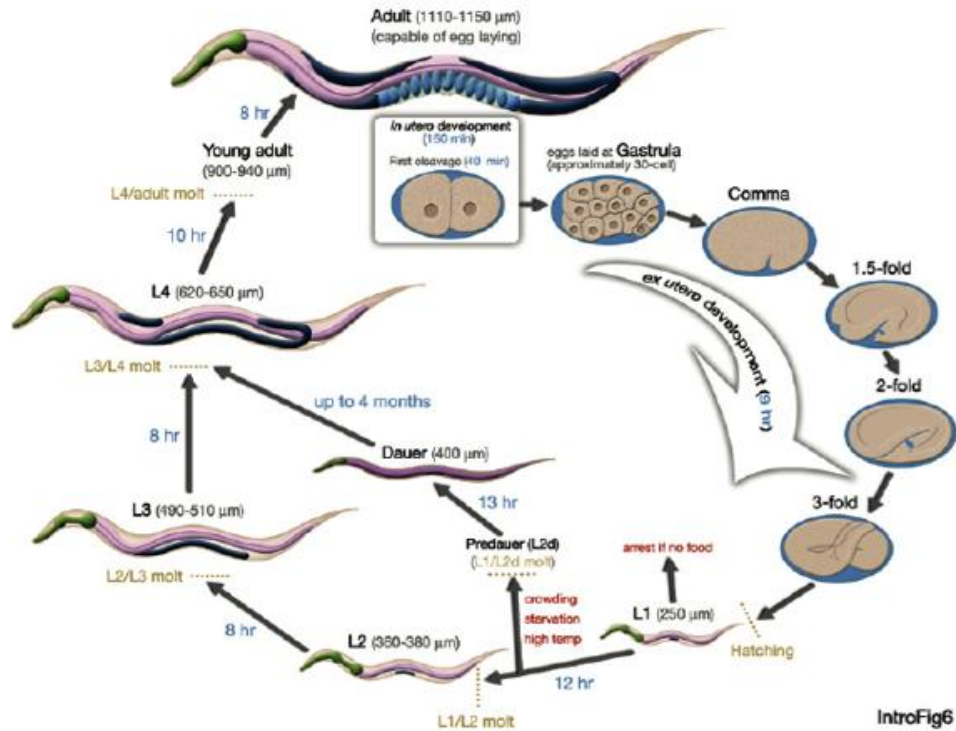
Εισαγωγή

I. Εισαγωγή στη βιολογία του νηματώδους *Caenorhabditis elegans*

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

Ο *C. elegans* είναι ένα ελεύθερο (μη παρασιτικό) είδος νηματώδους, που ζει στο έδαφος (Riddle, 1997). Το μέγεθός του είναι πολύ μικρό, τα ενήλικα άτομα έχουν μήκος περίπου 1.3mm και διάμετρο 100μm. Η ανάπτυξή του στο εργαστήριο πραγματοποιείται σε στερεά ή υγρά θρεπτικά μέσα και ως τροφή χρησιμοποιείται το αργά αναπτυσσόμενο στέλεχος του βακτηρίου *Escherichia coli*, OP50. Η συντήρηση νηματωδών στο εργαστήριο είναι συνεπώς οικονομική και δεν απαιτεί χρόνο. Διευκολύνεται επίσης από τη δυνατότητα διατήρησης παγωμένων στελεχών στους -80°C 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 15°C.

Ο αναπαραγωγικός κύκλος του *C. elegans* διαρκεί περίπου 2.5 μέρες στους 25°C, 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 X κατά τη μείωση είναι δυνατόν να οδηγήσουν στη δημιουργία αρσενικών ατόμων χρωμοσωμικής σύστασης XO. 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), καταναμημένα 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

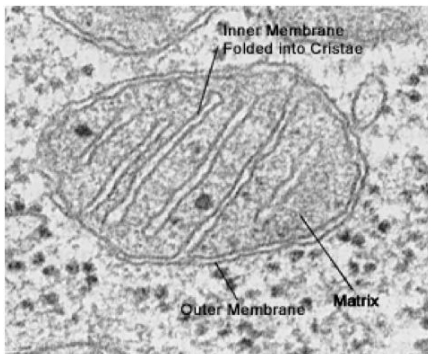
διαφορετικά επίπεδα και σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια (Fire et al., 1998; Tavernarakis et al., 2000). Αν κι έχει το μειονέκτημα ότι δεν είναι ιδιαίτερα αποδοτική σε νευρικά κύτταρα, η ανακάλυψη στελεχών με αυξημένη ευαισθησία στο RNAi (στελέχη με τις μεταλλαγές *eri-1(mg366)*, *lin-35(n745)* ή *rrf-3(pk1426)*), 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 κλασικής 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 συμβάλει 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 καλλιιεργειών κυττάρων του *C. elegans* για μελέτες *ex vivo* (Christensen et al., 2002).

II. 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 μακρών 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 διαμεμβρανικό 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 αναπνευστικής αλυσίδας (κυτοχρώματα b, c₁, c, a, a₃) 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, μαλαϊκή αφυδρογονάση), ένζυμα οξείδωσης λιπαρών οξέων και ακόμα DNA, RNA και ριβοσώματα.

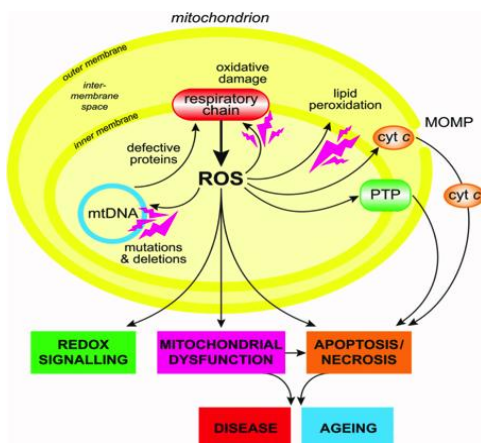


Φωτογραφία μιτοχονδρίου από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Περιλαμβάνει: εξωτερική μεμβράνη, εσωτερική μεμβράνη, μήτρα (matrix), πτυχώσεις (cristae) και ηλεκτρονιόπυκνα σφαιρίδια που περιέχουν ασβέστιο.

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 $O_2^{\cdot-}$. 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 (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.



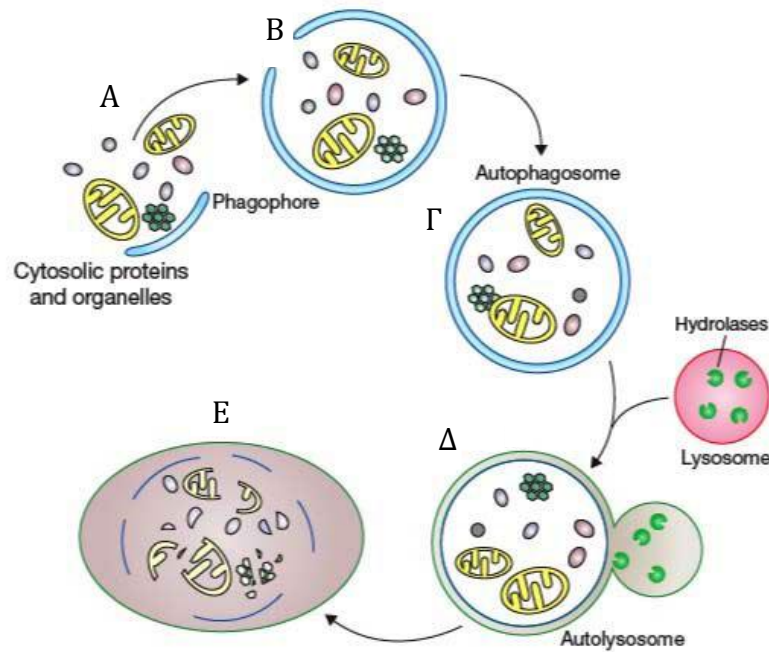
Οξειδωτική μιτοχονδριακή βλάβη (Murphy, 2009)

Το κύτταρο, λοιπόν, έχει αναπτύξει μια πληθώρα μηχανισμών που ενεργοποιούνται κατά την οξειδωτική βλάβη των μιτοχονδρίων για να 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 σωματίο 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).



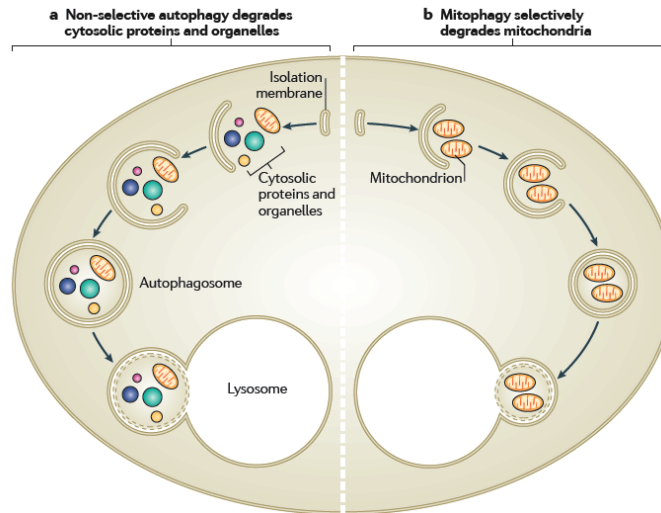
Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της αυτοφαγίας. **A, B)** κυτταροπλασματικό υλικό εγκλωπώνεται από διπλή κυτταροπλασματική μεμβράνη του φαγοφόρου **Γ)** σχηματισμός του αυτοφαγοσώματος **Δ)** Η εξωτερική μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος συντήκεται με τη λυσοσωμική και το υπολειπόμενο αυτοφαγικό σωματίδιο απελευθερώνεται στον αυλό του λυσοσώματος **E)** Αποικοδόμηση του κυτταροπλασματικού υλικού (Xie and Klionsky, 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 εισβάλλουν στον οργανισμό και για τις οποίες χρησιμοποιούνται αντίστοιχα οι αγγλικόι όροι pexophagy, ribophagy, ER-phagy και xenophagy (Youle and Narendra, 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 (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 et al., 2007). Αυτές οι πρώτες μελέτες έδειξαν ότι η μιτοφαγία ελέγχει τον 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 et al., 2007) και σε κύτταρα θηλαστικών (Twig et al., 2008) έχει παρατηρηθεί ότι η μιτοφαγία λαμβάνει χώρα πριν από την σχάση (fission) των μιτοχονδρίων (Westermann et al., 2010). Λειτουργεί σαν μηχανισμό ποιοτικού ελέγχου όπου απομακρύνει τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια πριν τον διπλασιασμό τους (Tal 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 et al., 2004), αλλά και κατά τη διάρκεια εξειδικευμένων αναπτυξιακών σταδίων σε κύτταρα θηλαστικών όπως συμβαίνει για παράδειγμα στη διαφοροποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Schweer et al., 2007; Kundu et al., 2008).



Μη – εξειδικευμένη αυτοφαγία και Μιτοφαγία. **Α)** Η μη – εξειδικευμένη αυτοφαγία λαμβάνει χώρα όταν υπάρχει έλλειψη θρεπτικών συστατικών και αποδομεί κυτταροπλασματικό υλικό συμπεριλαμβανομένων πολλών πρωτεϊνών και οργανιδίων. **Β)** 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 and Narendra, 2011)

Va. 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 et al., 2009; Kanki 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 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 αυτοφαγισωμάτων. 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 αυτοφαγισωμάτων Atg8. Έτσι, λοιπόν, η Atg32 μπορεί να αλληλεπιδράσει άμεσα και έμμεσα με την Atg8 και να οδηγήσει στην εγκόλπωση των μιτοχονδρίων από το αυτοφαγόσωμα.

Vβ. 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 δείχθει ότι τα μιτοχόνδρια από τα πρόδρομα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται με τη διαδικασία της μιτοφαγίας (Kundu et al., 2008; Mortensen et al., 2010; Zhang 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 et al., 2007; Aerbajinai et al., 2003; Sandoval 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 μιτοφαγίας στα ερυθροκύτταρα η NIX αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη LC3 και ακολουθεί η εγκόλλωση των μιτοχονδρίων από τα αυτοφαγοσώματα (Schwarten et al., 2009; Novak et al., 2010).

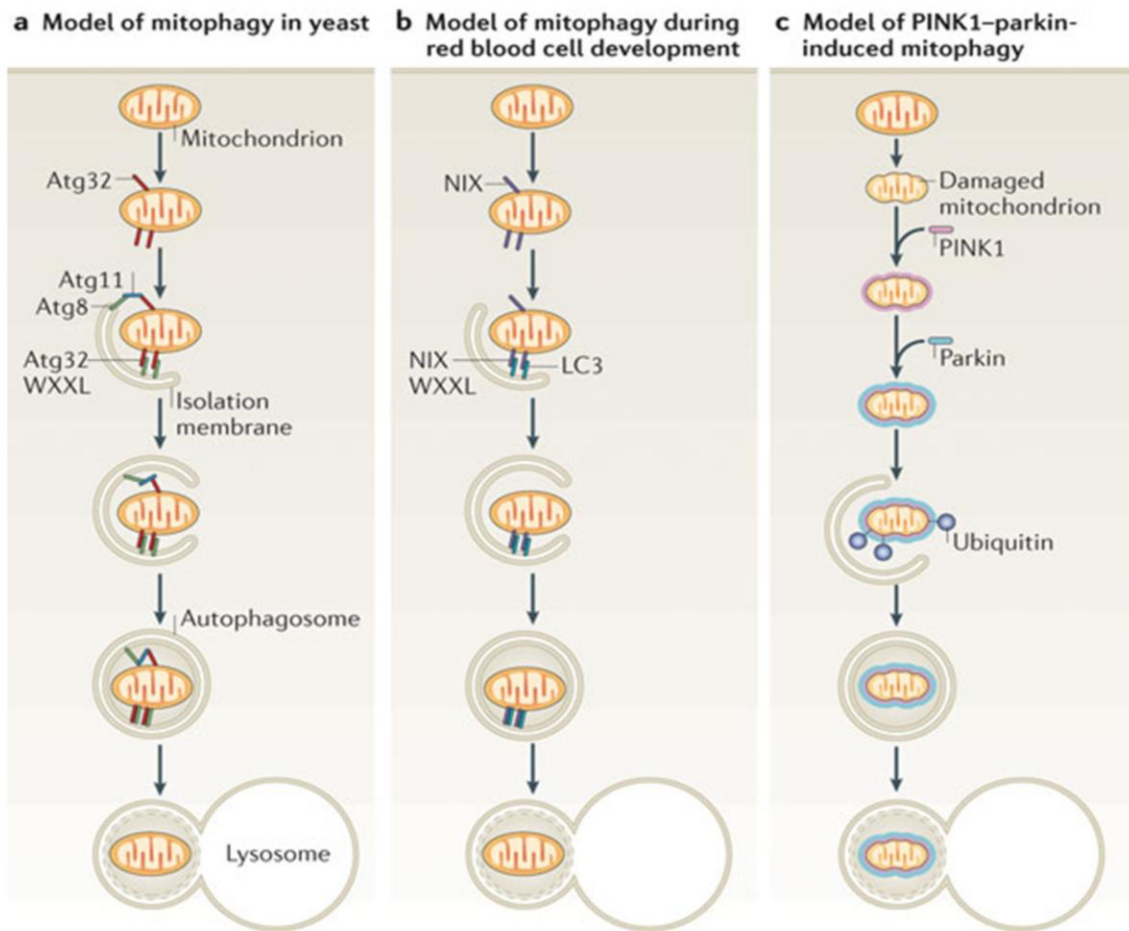
Υγ. Επαγωγή της μιτοφαγίας μέσω του μονοπατιού PINK1 – Parkin

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 E3 λιγάση ουβικιτίνης (E3 – ubiquitin ligase) Parkin, οδηγούν σε ανάπτυξη της ασθένειας του Πάρκινσον (Valente et al., 2004; Kitada 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 et al., 2003; Park et al., 2006; Clark 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 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 et al., 2010; Vives – Bauza et al., 2010; Geiser et al., 2010; Matsuda et al., 2010). Η υπερέκφραση της PINK1 αρκεί για να μετακινηθεί η Parkin στα μιτοχόνδρια και να επαχθεί η μιτοφαγία απουσία εκπολωμένων μιτοχονδρίων (Kim et al., 2008; Kawajiri 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 et al., 2006; Clark et al., 2006; Yang 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 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 et al., 2008; Matsuda et al., 2010). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η PINK1 αλληλεπιδρά με την Parkin και την φωσφορυλιώνει (Kim et al., 2008; Geiser et al., 2010; Shiba et al., 2009; Um et al., 2009; Sha 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 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 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 et al., 2010; Ding et al., 2010; Lee et al., 2010; Okatsu et al., 2010; Narendra et al., 2010). Οι mitofusin 1 και 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 and Dawson, 2010; Zivizni et al., 2010; Poole et al., 2010; Gegg et al., 2010)



Τα μονοπάτια του Atg32, NIX και PINK1 – Parkin που ελέγχουν την μιτοφαγία. Α) 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 Β) 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 Γ) Όταν υπάρχουν κατεστραμμένα μιτοχόνδρια η κίνηση 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 and Narendra, 2011).

VI. Μιτοχονδριακή βιογένεση

Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια και διαθέτουν δικό τους DNA, έτσι ώστε να μπορούν να αναπαράγονται χωρίς να χρειάζεται να διαιρεθεί το κύτταρο. Το DNA των μιτοχονδρίων (mtDNA) είναι δίκλωνο κυκλικό και είναι τοποθετημένο στις εσοχές που δημιουργεί η εσωτερική μεμβράνη. Κάθε μιτοχόνδριο περιέχει πολλά αντίγραφα του κυκλικού αυτού μορίου DNA. Επίσης υπάρχει ένα ολοκληρωμένο σύστημα έκφρασης των γονιδίων που περιλαμβάνει ριβοσώματα και άλλες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες γι' αυτήν την λειτουργία. Το mtDNA κωδικοποιεί 13 πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, 22 tRNAs και 2 rRNAs (Calvo and Mootha, 2010). Ο μεγαλύτερος αριθμός των πρωτεϊνών που απαιτούνται για την λειτουργία του οργανιδίου κωδικοποιείται από γονίδια του DNA του πυρήνα, συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια εισέρχονται στο μιτοχόνδριο.

Η μιτοχονδριακή βιογένεση είναι μια εκλεπτυσμένη και πολυσύνθετη διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει τη μεταγραφή και τη μετάφραση γονιδίων του mtDNA, μετάφραση μεταγράφων του πυρήνα που προέρχονται μεταγραφή πυρηνικών γονιδίων, στρατολόγηση νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και λιπιδίων, εισαγωγή των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και συναρμολόγηση των μιτοχονδριακών συμπλόκων σε ένα διευρυνόμενο μιτοχονδριακό δίκτυο (Zhu et al, 2013). Η χωροχρονική ρύθμιση της μιτοχονδριακής βιογένεσης επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση πολλών μεταγραφικών παραγόντων έπειτα από την απόκριση σε ποικίλα ερεθίσματα, όπως η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, ορμονών, αναπτυξιακοί παράγοντες και διακυμάνσεις της θερμοκρασίας. Nuclear respiratory factors (NRF1 and NRF2), nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (Nrf2/NFE2L2), estrogen-related receptors (ERR- α , ERR- β , ERR- γ) και ο peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1-alpha (PGC-1 α) είναι οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες και συνενεργοποιητές που συμμετέχουν και ρυθμίζουν την διαδικασία της δημιουργίας μιτοχονδρίων.

Επιπλέον, μιτοχονδριακή βιογένεση ρυθμίζεται επίσης και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η τρανσλοκάση της εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνης (σύμπλοκο TOM), φωσφορυλιώνεται από κυτταροπλασματικές κινάσες, όπως οι casein 1, casein 2 και η protein kinase A, προωθώντας ή αναστέλοντας την εισαγωγή πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια και επηρεάζοντας τη μιτοχονδριακή βιογένεση (Gerbeth et al., 2013; Schmidt et al., 2011).

VIα. Μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν στη βιογένεση μιτοχονδρίων

Οι μεταγραφικοί παράγοντες NRF1 και NRF2 ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με πολλαπλές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Η μεταγραφική δραστηριότητα του NRF1 έχει συνδεθεί με την έκφραση πολλών πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν υπομονάδες των μιτοχονδριακών συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, ένζυμα βιοσύνθεσης της αίμης, πρωτεΐνες που σχετίζονται με την εισαγωγή μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, μιτοχονδριακές ριβοσωμικές πρωτεΐνες και tRNA συνθετάσες (Scarpulla, 2008). Επιπλέον, τόσο ο NRF1 όσο και ο NRF2 ρυθμίζουν τη μεταγραφή του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα A (Transcriptional Factor A; TFAM) και των μεταγραφικών παραγόντων B (Transcription Factor proteins; TFBs), οι οποίοι είναι σημαντικοί ρυθμιστές της μεταγραφής και αντιγραφής του μιτοχονδριακού DNA (Gleyzer et al., 2005; Scarpulla, 2008).

Σε κύτταρα θηλαστικών έχει δειχθεί ότι ο nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (Nrf2/NFE2L2) ενεργοποιείται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και ρυθμίζει την μεταγραφή γονιδίων που επάγουν την επιβίωση των κυττάρων (Ma Q., 2013; Yun and Finkel, 2014). Μεταξύ των γονιδίων αυτών ο Nrf2/NFE2L2 επάγει την μεταγραφή πυρηνικών γονιδίων που σχετίζονται με την μιτοχονδριακή λειτουργία.

Οι Estrogen-related receptors (ERR- α , - β , - γ) είναι μέλη της οικογένειας του υποδοχέα των πυρηνικών ορμονών, και προωθούν τη μιτοχονδριακή βιογένεση σε απόκριση ορμονικών σημάτων. Ο ERR- α είναι γνωστό ότι ρυθμίζει τη μεταγραφή πυρηνικών γονιδίων που σχετίζονται με τη δημιουργία μιτοχονδριακών παραγόντων, περιλαμβανομένων εκείνων που εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, οξείδωση των λιπαρών οξέων, τον κύκλο του Krebs και των διαδικασιών της μιτοχονδριακής σχάσης και σύντηξης (Dominy and Puigserver, 2013).

Η πολύπλοκη ρύθμιση της μιτοχονδριακής βιογένεσης επιτυγχάνεται με την συμμετοχή μελών της οικογένειας των συνενεργοποιητών peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). Ο PGC-1 α , ο πιο καλά μελετημένος παράγοντας αυτής της οικογένειας, συμμετέχει στην συνενεργοποίηση και στον συντονισμό διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν τη διαδικασία της μιτοχονδριακής βιογένεσης, όπως είναι οι NRFs και οι ERRs (Dominy and Puigserver, 2013). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του PGC-1 α οδηγούν σε αυξημένη μιτοχονδριακή βιογένεση, που συνοδεύεται από αυξημένη μιτοχονδριακή μάζα, αυξημένα συμπλέγματα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην εισαγωγή μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, αυξημένη μιτοχονδριακή αναπνευστική ικανότητα και οξείδωση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση του PGC-1 α βοηθά στην αντιμετώπιση των μιτοχονδριακών βλαβών και προκαλεί μιτοχονδριακή βιογένεση σε μοντέλα ποντικών για μιτοχονδριακές ασθένειες (Viscomi et al., 2011). Επιπροσθέτως, μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα με ανεπάρκεια στα συμπλέγματα III και IV της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, έδειξαν ότι υπερέκφραση τόσο του PGC-1 α και - β βελτιώνει την μιτοχονδριακή λειτουργία (Sirvastava et al., 2009). Ως εκ τούτου, ο PGC-1 α χαρακτηρίζεται ως ο κύριος ρυθμιστής της μιτοχονδριακής βιογένεσης και λειτουργίας.

VIβ. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη μιτοχονδριακή βιογένεση

Μιτοχονδριακή λειτουργία και συνάμα η ομοίωση ρυθμίζεται επίσης από μονοπάτια σηματοδότησης που τελικά συγκλίνουν επί των προαναφερθέντων μεταγραφικών παραγόντων. Η εξάντληση του ATP είτε με μειωμένη σύνθεση ATP είτε με αυξημένη κατανάλωση ATP οδηγεί σε αυξημένες αναλογίες ενδοκυτταρικού AMP/ATP, που ενισχύουν η ενζυματική δράση της AMP-activated protein kinase (AMPK). Η AMPK λειτουργεί ως ένας κυτταρικός αισθητήρας της ενέργειας και ενεργοποιείται όταν οι ενεργειακές απαιτήσεις είναι πολύ υψηλές (Hardie, 2007).

Ενεργοποίηση της AMPK προάγει τη μιτοχονδριακή βιογένεση μέσω της μεταγραφικής ρύθμισης αρκετών πυρηνικών γονιδίων. Μελέτες σε μυϊκά κύτταρα και ποντίκια έδειξαν ότι η AMPK φωσφορυλιώνει τον PGC-1 α και προκαλεί αύξηση της μιτοχονδριακής βιογένεσης (Birkenfeld et al., 2011; Jager et al., 2007). Η AMPK διεγείρει επίσης την δραστηριότητα της SIRT1 μέσω της αύξησης των κυτταρικών επιπέδων του NAD⁺. Στη συνέχεια, η SIRT1 αποακετυλιώνει και ενεργοποιεί τον PGC-1 α , που προωθεί τον οξειδωτικό μεταβολισμό και την αύξηση του μιτοχονδριακού πληθυσμού (Canto et al., 2009).

Επιπλέον, οι διακυμάνσεις στη συγκέντρωση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου επηρεάζουν μιτοχονδριακή φυσιολογία μέσω της ενεργοποίησης της mitogen kinase p38 και της Calcium/calmodulin-dependent kinase (CaMK), οι οποίες επηρεάζουν άμεσα την δραστηριότητα του PGC-1α (Wright et al., 2007; Wu et al., 2002).

Μαζί με την AMPK και την CaMK, η mTOR (mammalian Target Of Rapamycin; mTOR) κινάση επηρεάζει τη μιτοχονδριακή βιογένεση και λειτουργία μέσω μοριακών μηχανισμών που είναι εξαρτώμενοι ή ανεξάρτητοι της μεταγραφικής ρύθμισης. Μελέτες σε κύτταρα των σκελετικών μυών έχουν αποδείξει ότι η mTOR κινάση αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό καταστολέα YingYang1 (YY1). Ο YY1 είναι συζευγμένος με τον PGC-1α και ρυθμίζουν την έκφραση αρκετών μιτοχονδριακών γονιδίων. Έπειτα από χορήγηση ραπαμυκίνης και αναστολή της mTOR κινάσης, το YY1-PGC-1α σύμπλεγμα διασπάται και η μεταγραφή του μιτοχονδριακών γονιδίων σταματά (Blatteret al., 2012; Cunningham et al., 2007). Επιπλέον, η mTOR κινάση αλληλεπιδρά με μιτοχονδριακές πρωτεΐνες επηρεάζοντας την διαδικασία της μιτοχονδριακής αναπνοής και παραγωγής ενέργειας ανεξαρτήτως μεταγραφικής ρύθμισης (Schieke et al., 2006).

VII. Συντονισμός της μιτοχονδριακής βιογένεσης και της μιτοφαγίας

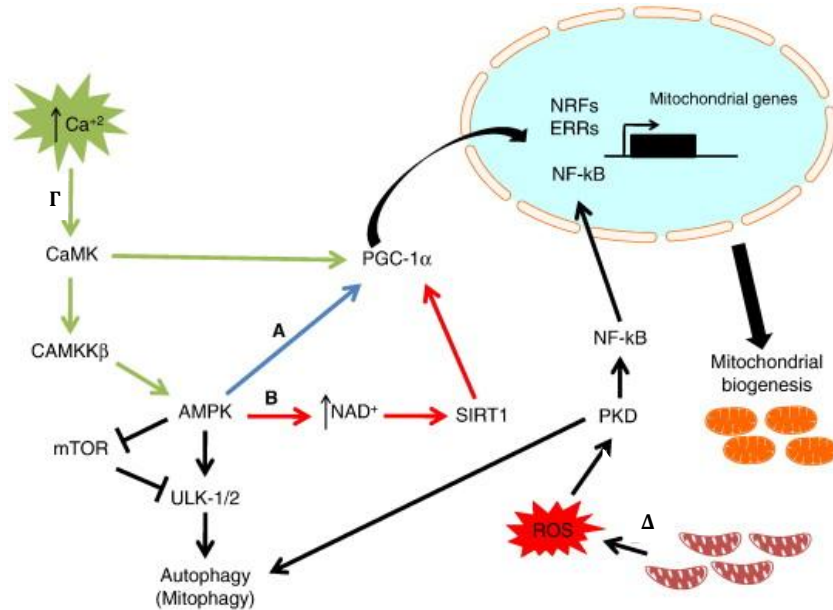
Ο συντονισμός μεταξύ δύο αντιτιθέμενων διαδικασιών, όπως είναι η μιτοχονδριακή βιογένεση και η μιτοφαγία, ρυθμίζει τόσο την ποσότητα όσο και την ποιότητα του μιτοχονδριακού πληθυσμού και επιτρέπει στα κύτταρα να προσαρμόζουν το μιτοχονδριακό τους περιεχόμενο ανάλογα με την κυτταρική μεταβολική κατάσταση, διάφορες συνθήκες στρες και άλλα ενδοκυτταρικά ή περιβαλλοντικά σήματα. Η ανισορροπία μιας εκ των δύο αυτών κυτταρικών διαδικασιών μπορεί να οδηγήσει σε λειτουργική αλλοίωση των βιολογικών συστημάτων και να προάγει τον κυτταρικό θάνατο.

Κατά τη διάρκεια της γήρανσης και σε αρκετές παθολογικές συνθήκες, έχει παρατηρηθεί μια προοδευτική αύξηση της μάζα των μιτοχονδρίων (Artal-Sanz and Tavernarakis, 2009; Fan et al., 2008; Kaerbelein, 2010; Malpass, 2013; Palikaras et al., 2015; Preston et al., 2008; Vafai and Moortha, 2012). Τέτοια διαταραχή της μιτοχονδριακής ομοιόστασης υποδεικνύει ότι η επικοινωνία μεταξύ της μιτοφαγίας και της δημιουργίας νέων μιτοχονδρίων αποτελεί ζωτικής σημασίας για τη φυσιολογία του κυττάρου και ολόκληρου του οργανισμού. Υπάρχουν ενδείξεις ότι αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια μεσολαβούν στο συντονισμό της απομάκρυνσης των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων και του μιτοχονδριακού πολλαπλασιασμού.

Η AMPK ενεργοποιείται σε απόκριση του περιορισμού των θερμιδών και σε συνθήκες περιβαλλοντικού στρες. Στη συνέχεια, η AMPK φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες ULK1/2, οι οποίες είναι κινάσες υπεύθυνες για την έναρξη της αυτοφαγίας (Kim et al., 2011). Μελέτες σε κύτταρα θηλαστικών υποδεικνύουν ότι η απώλεια είτε της AMPK είτε της ULK1 προκαλεί συσσώρευση της πρωτεΐνης p62 και μη αποτελεσματική μιτοφαγία κατά τη διάρκεια συνθηκών “πείνας” (Egan et al., 2011). Τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν τον σημαντικό ρόλο της AMPK στην μιτοχονδριακή ομοιόσταση. Ωστόσο, είναι πιθανό ότι η AMPK ξεκινά μια διμερή απόκριση που προάγει την μιτοχονδριακή καταστροφή και ταυτόχρονα προκαλεί μιτοχονδριακή βιογένεση ενεργοποιώντας τον PGC-1α (Birkenfeld et al., 2011; Canto et al., 2009; Jager et al., 2007). Επιπλέον, τα αυξημένα κυτταροπλασματικά επίπεδα ασβεστίου προκαλούν επαγωγή της αυτοφαγίας, μέσω ενός μονοπατιού σηματοδότησης ότι περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της Calcium/calmodulin kinase (CaMK). Εκτός από την ενεργοποίηση του PGC-1α (Wright et al., 2007; Wu et al., 2002), η CaMK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την Ca^{2+} -calmodulin dependent

kinase kinase beta (CaMKKβ), η οποία με τη σειρά της επάγει την ενζυματική δραστηριότητα της AMPK (Εικόνα 2Α, Β; Cardenas and Fosskett, 2011; Decuyper et al., 2011).

Η Protein kinase D1 (PKD) αποτελεί μια κίνηση σερίνης/θρεονίνης (Ser/Thr) που συμμετέχει σε μια πληθώρα κυτταρικών διαδικασιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική κίνηση και ο κυτταρικός θάνατος (Jaggi et al., 2007). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η PKD ενεργοποιείται έπειτα από οξειδωτικό στρες (Storz et al., 2004; Waldron and Rozengurt, 2000). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η PKD ελέγχει την επαγωγή της αυτοφαγίας σε συνθήκες στρες. Η PKD αλληλεπιδρά και φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη VPS34, η οποία συμμετέχει στην δημιουργία των αυτοφαγοσωμάτων (Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2012). Η PKD-επαγόμενη αυτοφαγία πιθανόν να οδηγεί σε απομάκρυνση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων σε συνθήκες στρες. Επιπλέον, η PKD έχει δείχθει ότι παίζει τον ρόλο του αισθητήρα των μιτοχονδριακών ROS, επάγοντας ένα σηματοδοτικό μονοπάτι από τα μιτοχόνδρια στον πυρήνα προωθώντας την αποτοξίνωση και την κυτταρική επιβίωση. Μετά από οξειδωτικό στρες, ο μεταγραφικός παράγοντας Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell (NF-κB) ενεργοποιείται από την PKD και επάγει την έκφραση της manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD), η οποία έχει ενεργό ρόλο στην διαδικασία της κυτταρικής αποτοξίνωσης (Storz et al., 2005). Επίσης, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε σκελετικά μυϊκά κύτταρα, ο NF-κB εμπλέκεται στην μιτοχονδριακή βιογένεση μέσω της ρύθμισης του PGC-1β (Bakkar et al., 2012). Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, υπάρχουν ενδείξεις ότι το μοριακό μονοπάτι στο οποίο συμμετέχουν ενεργά η PKD και ο NF-κB συντονίζει τις κυτταρικές διαδικασίες της μιτοφαγίας και της μιτοχονδριακής βιογένεσης έπειτα από οξειδωτικό στρες.



Μοριακοί μηχανισμοί που συντονίζουν τη μιτοχονδριακή βιογένεση και τη μιτοφαγία. (Α) Ο περιορισμός των θερμικών και διάφορες συνθήκες στρες (π.χ. οξειδωτικό στρες) επάγουν την AMPK. Στη συνέχεια, η AMPK ξεκινά μια διμερή απόκριση που προωθεί τόσο τη βιογένεση των μιτοχονδρίων ενεργοποιώντας τον PGC-1α όσο και τη μιτοφαγία. (Β) Η AMPK ενισχύει την δράση της SIRT1 μέσω της αύξησης των επιπέδων NAD^+ . Επιπλέον, η SIRT1 επάγει την μιτοχονδριακή βιογένεση μέσω του PGC-1α. (Γ) Αυξημένα επίπεδα του κυτταροπλασματικού ασβεστίου ενεργοποιούν την CaMK. Στη συνέχεια, η CaMK φωσφορυλιώνει τον PGC-1α και προωθεί την δημιουργία νέων μιτοχονδρίων. Επιπλέον, η CaMK επάγει την αυτοφαγία έπειτα από την ενεργοποίηση της AMPK. (Δ) Η PKD ενεργοποιείται και επάγει την μιτοχονδριακή βιογένεση, μέσω του NF-κβ, και την αυτοφαγία σε απόκριση αυξημένης παραγωγής μιτοχονδριακών ROS (Palikaras and Tavernarakis, 2014).

Η Parkin δεν απαιτείται μόνο για την επαγωγή της μιτοφαγίας και την εκκαθάριση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων (Burchell et al., 2013; Chen and Dorn, 2013; Yang and Yang, 2013), αλλά συμμετέχει επίσης στη διατήρηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας και τη μιτοχονδριακή βιογένεση. Μελέτες σε καρκινικά κύτταρα υποδεικνύουν ότι η Parkin προωθεί μιτοχονδριακή βιογένεση μέσω της σύνδεσής της με TFAM, ενισχύοντας την TFAM-εξαρτώμενη μεταγραφή (Kuroda et al., 2006). Επιπλέον, η Parkin αλληλεπιδρά με το mtDNA και διατηρεί την ακεραιότητα του γονιδιώματος σε συνθήκες που τα επίπεδα των ROS είναι αυξημένα (Rothfuss et al., 2009). Επιπλέον, η Parkin ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή βιογένεση μέσω της ρύθμισης της PARIS (ZFN746). Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η PARIS αναστέλλει την έκφραση του PGC-1α και γονιδίων-στόχων του, όπως ο NRF1. *Parkin*^{-/-} ποντίκια ή ποντίκια που υπερεκφράζουν PARIS εμφανίζουν μια προοδευτική απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Η υπερέκφραση του είτε της Parkin είτε του PGC-1α προστατεύει από τον PARIS-εξαρτώμενο νευροεκφυλισμό (Shin et al., 2011). Έτσι, η Parkin προστατεύει τη μιτοχονδριακή φυσιολογία και τον μιτοχονδριακό μεταβολισμό μέσω της ρύθμισης τόσο της μιτοφαγίας όσο και της μιτοχονδριακής βιογένεσης.

Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι ο συντονισμός μεταξύ μιτοφαγίας και μιτοχονδριακής βιογένεση είναι ζωτικής σημασίας για να προσαρμόσει το κύτταρο τον μιτοχονδριακό πληθυσμό σε διάφορες καταστάσεις και τελικά να προάγει την εύρυθμη μιτοχονδριακή λειτουργία. Ο ανεξέλεγκτος μιτοχονδριακός πολλαπλασιασμός και η συσσώρευση των δυσλειτουργικών μιτοχόνδρια, μέσω της προοδευτικής μείωσης της δραστηριότητας της αυτοφαγίας κατά τη διάρκεια της γήρανση, συνδέονται με την ανάπτυξη ασθενειών που σχετίζονται με τη γήρανση, όπως καρδιομυοπάθειες (Thomas και Gustafsson, 2013), ψυχιατρικές διαταραχές (Manji et al., 2012) και νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Exner et al., 2012, Malpass, 2013, Martinez-Vicente et al., 2010; Palikaras and Tavernarakis, 2012).

Υλικά & Μέθοδοι

Υλικά

Τα χημικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι προϊόντα των εταιρειών: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Qiagen (California, CA, USA), Invitrogen (Carlsbad, USA), Merck (New Jersey, NJ, USA), Molecular Probes (Eugene, USA), Finnzymes (Espoo, Finland), Difco Laboratories, Biorad, Biomol και Roche.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις εταιρείες New England Biolabs και Minotech, ενώ τα ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μικροχημείας του IMBB.

Τα ειδικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις εταιρείες: RT-PCR kit (Qiagen & Invitrogen), PCRII-TOPO Cloning (Invitrogen), Genomic DNA purification kit (Macherey-Nagel, Nucleospin Tissue), PCR purification kit (Qiagen-QIAquick).

Οι αλληλουχίες των γονιδίων και των πρωτεϊνών του *C. elegans* προέρχονται από την Wormbase (<http://www.wormbase.org>).

Η στατιστική ανάλυση όλων των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν έγινε με το πρόγραμμα 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 ή το πρόγραμμα ZEN 2012.

Μέθοδοι

A) Μοριακή Βιολογία

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

Υλικά: M9, διάλυμα λύσης, πρωτεΐνάση K, φαινόλη/χλωροφόρμιο, 3 M NaC₂H₃O₂, 100% EtOH, 70% EtOH, ddH₂O

Διαδικασία:

1. Καλλιέργεια νηματωδών σε πιάτα NGM τα οποία φέρουν τροφή OP50
2. Πλύσιμο των ζώων με M9 και κατακρήμνιση των ζώων με φυγοκέντρηση σε πλήρη ταχύτητα για περίπου ένα λεπτό
3. Απομάκρυνση του υπερκείμενου
4. Προσθήκη φρέσκου M9, φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκείμενου
5. Ψύξη της πελέτας σε υγρό άζωτο
6. Προσθήκη πέντε όγκων διαλύματος λύσης με πρωτεΐνάση K (0.1 mg/mL)
7. Επώαση στους 65°C για 60 min
8. Επώαση στους 95°C για 20 min ώστε να απενεργοποιηθεί η πρωτεΐνάση K
9. Προσθήκη RNase A (0.1 mg/mL) και επώαση στους 37°C για 60 min
10. Προσθήκη ενός όγκου φενόλης/χλωροφορμίου εξισορροπημένης με Tris, στον απαγωγό
11. Ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου
12. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα
13. Επανάληψη των βημάτων 10-12, δυο ακόμα φορές
14. Προσθήκη 0.1 όγκου 3M NaC₂H₃O₂ και <2 όγκων 100% EtOH και ανάμιξη
15. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 60 min τουλάχιστον
16. Κατακρήμνιση του DNA με φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 15 min
17. Προσεκτική απομάκρυνση του μεγαλύτερου μέρους του υπερκείμενου
18. Πλύσιμο της πελέτας με 70% EtOH και απομάκρυνση του υπερκείμενου
19. Επανάληψη του βήματος 18 αρκετές φορές
20. Στέγνωμα της πελέτας στον απαγωγό και επαναδιάλυση σε H₂O
21. Υπολογισμός της συγκέντρωσης με τη χρήση Nanodrop στα 260 nm.

Για μια καλής ποιότητας DNA ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀ πρέπει να είναι 1.8

Συνταγές:

Διάλυμα λύσης για γενωμικό DNA

200 mM NaCl

100 mM Tris-HCl (pH 8.5)

50 mM EDTA (pH 8.0)

0.5% SDS

Προσθήκη 0.1% mg/mL πρωτεΐνάσης K πριν τη χρήση

M9 (1L)

5.8 g Na₂HPO₄•7H₂O

3.0 g KH₂PO₄

5.0 g NaCl

0.25 g MgSO₄•7H₂O

ddH₂O έως το 1L

αποστείρωση

2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (καλλιέργεια 1.5 mL) έγινε με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης των κυττάρων (Sambrook and Russell, 2001). Με ελαφρώς τροποποιημένη μέθοδο έγινε και αλκαλική λύση από μεγαλύτερου όγκου καλλιέργεια (50 mL). Το DNA που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση διαγνωστικών πέψων, ως μήτρα σε αντίδραση PCR ή για τη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων. Στην τελευταία περίπτωση είναι αναγκαίος ο περαιτέρω καθαρισμός με χρήση στήλης ιοντοανταλλαγής.

3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αντίδραση πολυμεράσης είναι μια αυτοματοποιημένη διαδικασία η οποία χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων επιθυμητών αλληλουχιών με σκοπό την ταυτοποίηση ελλείψεων σε μεταλλαγμένα αλληλόμορφα ή την κλωνοποίηση τμημάτων γενωμικού DNA σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς. Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια. Αρχικά, θερμαίνεται το DNA-μήτρα στους 92-95°C ώστε να γίνει αποδιάταξη της έλικας. Στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται στους 55-65°C ώστε να γίνει πρόσδεση των κατάλληλων εκκινήτων στη μονόκλωνη πλέον μήτρα, ενώ σε επόμενο στάδιο ακολουθεί αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C όπου δρα η πολυμεράση για τη σύνθεση του τμήματος DNA. Στην περίπτωση γενετικών διασταυρώσεων είναι πιθανό να χρειαστεί να ελέγξουμε το γονότυπο των ζώων που προκύπτουν κατά τις επιμέρους γενιές διασταύρωσης.

Στην περίπτωση αυτή, αντί γενωμικού DNA χρησιμοποιούμε το ίδιο το σκουλήκι. Το ζώο τοποθετείται με 2.5 μ L διαλύματος λύσης, όπως περιγράφηκε παραπάνω σε σωλήνα και στη συνέχεια στους 80°C για 30 min τουλάχιστον. Έπειτα γίνεται λύση στους 65°C για 60 min και απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης στους 95°C για 15 min. Το προϊόν της λύσης χρησιμοποιείται ως μήτρα για την ακόλουθη αντίδραση PCR.

Υλικά

- DNA μήτρα (10 ng-100 ng)
- Taq polymerase (5 U/ μ L) Vmax=1/10Vτελ
- 10x Taq buffer (1/10Vτελ)
- Forward primer (stock 100 ng/ μ L) Cτελ=5 ng/ μ L
- Reverse primer (stock 100 ng/ μ L) Cτελ= 5ng/ μ L
- dNTPs (Stock=2mM each) Cτελ=100 μ M/ μ L
- H₂O

Μέθοδος

- 95°C για 3-5 min
(x) 30 φορές
- 95°C για 30 sec
- 55-62°C για 30-60 sec
- 68-72°C για χρονικό διάστημα που εξαρτάται από τις ιδιότητες της πολυμεράσης και το μέγεθος DNA που κλωνοποιείται
- 68-72°C για 5-10 min προκειμένου να γίνει σύνθεση των ημιτελών κομματιών της αντίδρασης

4. Απομόνωση ολικού mRNA και αντίδραση Real-Time PCR

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των επιπέδων mRNA σε ζώα αγρίου τύπου και σε διάφορα μεταλλαγμένα ζώα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι:

dct-1:

5'GGCTCCAACCTTACCACTCC3' & 5'GCAAATCCTACTGCTGCTCC3'

atp-5:

5'ACTGGTCGAAGCTCGCCGAG3' & 5'ACTCGGCTGGAACCTCTCCG3'

hmg-5:

5'CGTCCAAGTGTTCCCTCCAAGTG3' & 5'CTTCGCTTCGTCTGTGTACTTCTTT3'

gas-1:

5'CTGGATGTTTCGAGGAACGTG3' & 5'AGCTGACACAAGTCCGATGTC3'

tim-17:

5'TGCGAGAAGTACGAATGAGAAGCAC3' & 5'CGAGACGAATCCTTCCATCTTTGG3'

W09C5.8:

5'ATGCTGCCACGTTTGGCTCTCC3' & 5'ACGGAAGCTGTAGCGGTACAAGAGC3'

pink-1:

5'AGCATATCGAATCGCAAATGAGTTAG3' & 5'TCGACCGTGGCGAGTTACAAG3'

pdr-1:

5'AGCCACCGAGCGATTGATTGC3' & 5'GTGGCATTTTGGGCATCTTCTTG3'

ges-1:

5'TCGCCAAGAGGTATGCTTCACAAG3' & 5'TGCTGCTCCTGCACTGTATCCC3'

myo-3:

5'AGCCAGACGGTGAGGAAGATGC3' & 5'TGCGTCAAGGGTCTTGTTACATCTGG3'

unc-119:

5'AACAACAACAATCGATCGCACC3' & 5'CACGTGTTCCGTGTCGAGGTC3'

Mito1:

5'GTTTATGCTGCTGTAGCGTG3' & 5'CTGTTAAAGCAAGTGGACGAG3'

Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια *ama-1* και *pmp-3* το οποίο κωδικοποιεί την μεγάλη υπομονάδα της RNA πολυμεράσης II και έναν ABC transporter αντίστοιχα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

ama-1:

5'CCTACCTACACTCCAAGTCCATCG3' & 5'GGTGAAGCTGGCGAATACGTTG3'

pmp-3:

5'ATGATAAATCAGCGTCCCGAC3' & 5'TTGCAACGAGAGCAACTGAAC3'

Υλικά

- M9
- Trizol
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπανόλη
- 70% EtOH
- RNase free H2O
- iScript cDNA Synthesis Kit
- KAPA SYBR FAST qPCR Master mix

Διαδικασία

1. Συλλογή 10 ατόμων σε 20 μL M9 σε RNase free σωλήνα
2. Κατακρήμνιση των ζώων με σύντομη φυγοκέντρηση στις 14000 rpm
3. Προσθήκη 250 μL Trizol, στον απαγωγό
4. Ανάδευση (vortex) για 30 sec και ακολούθως ανάδευση στους 4°C έως ότου διαλυθούν τα σώματα των ζώων
5. Προσθήκη 50 μL χλωροφόρμιο στον απαγωγό
6. Ανάδευση για 30 sec
7. Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 min
8. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 min στους 4°C
9. Μεταφορά της διάφανης φάσης σε νέο σωλήνα
10. Επανάληψη των βημάτων 5-9
11. Προσθήκη 125 μL ισοπροπανόλης και ανακίνηση
12. Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου για μερικά λεπτά
13. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min στους 4°C
14. Απόρριψη του υπερκείμενου
15. Πλύσιμο της πελέτας με 250 μL 70%EtOH
16. Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 5 min στους 4°C
17. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και στέγνωμα της πελέτας
18. Επαναδιάλυση σε 10 μL RNase free H₂O
19. Υπολογισμός της συγκέντρωσης RNA στο Nanodrop.

Για καθαρό RNA πρέπει ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀ να είναι κοντά στο 2

Σύνθεση cDNA

Για δείγμα 20 μL :

- 4 μL 5x iScript Mix
- 1 μL Reverse Transcriptase
- 10 μL RNA
- 5 μL RNase free H₂O

Πρόγραμμα:

25°C για 5 min

42°C για 30 min

85°C για 5 min

4°C για άπειρο

→ Αποθήκευση στους 4°C

RT-PCR

Για ένα δείγμα 20 μL προσθέτουμε:

3 μL cDNA

2 μL Forward primer (10pmol)

2 μL Reverse primer (10pmol)

10 μL KAPA Master mix

1 μL dH₂O

→ Χρησιμοποιούμε τριπλέτες για το κάθε δείγμα

B) 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 lacIqZAM15 Tn10 (Tetr)]*.
- **HT115 (DE3) (CGC) με γενότυπο:** *F-, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE), lambda-, 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:

A) 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 K₂PO₄* 1M, pH 6

Τα διαλύματα CaCl₂, MgSO₄, K₂PO₄, 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.

B) Υδατικό διάλυμα M9 (1lt):

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

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

- 5,85g NaCl
- 50 ml K_2PO_4 * 1M, pH 6
- ~200ml glycerol
- 3 ml $MgSO_4$ 1M (Προστίθεται μετά την αποστείρωση.)

* Το διάλυμα του K_2PO_4 περιέχει 204.4gr KH_2PO_4 και 114.12gr K_2HPO_4 σε τελικό όγκο νερού 2000ml.

Για την ανάπτυξη των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα θρεπτικά μέσα:

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

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

B) 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 χρησιμοποιήθηκαν οι συνηθισμένες τεχνικές κλωνοποίησης και υποκλωνοποίησης (όπως αναγράφονται αναλυτικά παραπάνω). Όλοι οι πλασμδιακοί 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 oligονουκλεοτίδια-εκκινητές παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μικροχημείας του IMBB και της Invitrogen. Για τον πολλαπλασιασμό των πλασμδιακών φορέων και κατασκευών, πραγματοποιήθηκαν μετασχηματισμοί σε επιδεκτικά κύτταρα XL1-Blue.

Ακολουθεί αναφορά των πλασμιδιακών κατασκευών που δημιουργήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή:

1. p_{dct-1} DCT-1::GFP
2. $p_{let-858}$ TOMM-20::GCaMP2.0
3. p_{myo-3} DsRed::LGG-1
4. p_{myo-3} TOMM-20::Rosella
5. p_{myo-3} PDR-1::DsRed
6. $p_{let-858}$ DCT-1
7. $p_{let-858}$ DCT-1(Δ WXXL)
8. $p_{let-858}$ DCT-1(Δ MER)
9. $p_{let-858}$ DCT-1(Δ BH3)

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 πραγματοποιούνταν 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).

Ακολουθεί αναφορά των RNAi πλασμιδιακών κατασκευών που δημιουργήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή:

1. *skn-1* in pL4440
2. *dct-1* in pL4440
3. *pdr-1* in pL4440
4. *pbs-5* in pL4440
5. *rpn-6* in pL4440
6. *fzo-1* in pL4440
7. *drp-1* in pL4440
8. *isp-1* in pL4440
9. *clk-1* in pL4440
10. *unc-43* in pL4440

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:

A) 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.

B) 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:

<p>1ml NaOH 5N</p> <p>2ml NaOCl 5%</p> <p>7ml ddH₂O</p>

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 1 min 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 μετασηματισμένα 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 αναπύχθηκαν σε NGM (RNAi) τα οποία είχαν προηγουμένως επιστρωθεί με HT115(DE3) βακτήρια μετασηματισμένα 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 μόλυνσεων. 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.

Ακολουθεί αναφορά των στελεχών και των διαγονιδιακών ζώων που δημιουργήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή:

N2: Bristol isolate	N2;Ex[p _{dct-1} DCT-1::GFP]
CB1370: <i>daf-2(e1370)III</i>	N2;Ex[p _{dct-1} DCT-1::GFP;p _{myo-3} INVOM::RFP]
CB4876: <i>clk-1(e2519)III</i>	N2;Is[p _{myo-3} mtGFP];Ex[p _{lgg-1} DsRed::LGG-1]
MQ887: <i>isp-1(qm150)IV</i>	N2;Ex[p _{myo-3} DsRed::LGG-1;p _{dct-1} DCT-1::GFP]
DA465: <i>eat-2(ad465)II</i>	N2;Ex[p _{myo-3} PDR-1::DsRed;p _{dct-1} DCT-1::GFP]
CF1038: <i>daf-16(mu86)I</i>	N2;Ex[p _{myo-3} TOMM-20::Rosella]
<i>pink-1(tm1779)II</i>	<i>dct-1(tm376)</i> ;Is[p _{myo-3} mtGFP]
<i>dct-1(tm376)X</i>	N2;Ex[p _{unc-119} CTS-1::mCherry]
VC1024: <i>pdr-1(gk448)III</i>	DA2123: N2;Is[p _{lgg-1} GFP::LGG-1]
N2;Ex[p _{myo-3} INVOM::RFP]	MAH14: <i>daf-2(e1370)</i> ;Is[p _{lgg-1} GFP::LGG-1]
SJ4103: N2;Is[p _{myo-3} mtGFP]	N2;Ex[p _{lgg-1} DsRed::LGG-1]
SJ4143: N2;Is[p _{ges-1} mtGFP]	<i>pink-1(tm1779)</i> ;Ex[p _{dct-1} DCT-1::GFP]
CL2166: N2;Is[p _{gst-4} GFP]	<i>pdr-1(gk448)</i> ;Ex[p _{dct-1} DCT-1::GFP]
<i>daf-2(e1370)III</i> ;Is[p _{gst-4} GFP]	<i>dct-1(tm376)</i> ;Ex[p _{let-858} DCT-1]
CF1553: N2;Is[p _{sod-3} GFP]	<i>dct-1(tm376)</i> ;Ex[p _{let-858} DCT-1(ΔMER)]
SJ4005: N2;Is[p _{hsp-4} GFP]V	<i>dct-1(tm376)</i> ;Ex[p _{let-858} DCT-1(ΔBH3)]
SJ4058:N2;Is[p _{hsp-60} GFP]V	<i>dct-1(tm376)</i> ;Ex[p _{let-858} DCT-1(ΔWXXL)]
EU1: <i>skn-1(zu67)IV/nT1(IV;V)</i>	JRIS1: N2;Is[p _{rpl-17} HyPer]
EU31: <i>skn-1(zu135)IV/nT1(IV;V)</i>	N2;Ex[p _{let-858} GCaMP2.0]
EU40: <i>skn-1(zu129)IV/nT1(IV;V)</i>	

9. 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 φωτογράφιση έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).

Για κάθε ξεχωριστό πείραμα, οι φωτογραφίες πάρθηκαν στην ίδια μεγέθυνση και σε ίδιες συνθήκες φθορισμού. Η φωτογράφιση 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).

10. 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).

11. 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: PCRITTOPO Cloning (Invitrogen), Genomic DNA purification kit (Macherey-Nagel, NucleoSpin Tissue), PCR Purification Kit (Qiagen-QIAquick), SSoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad).

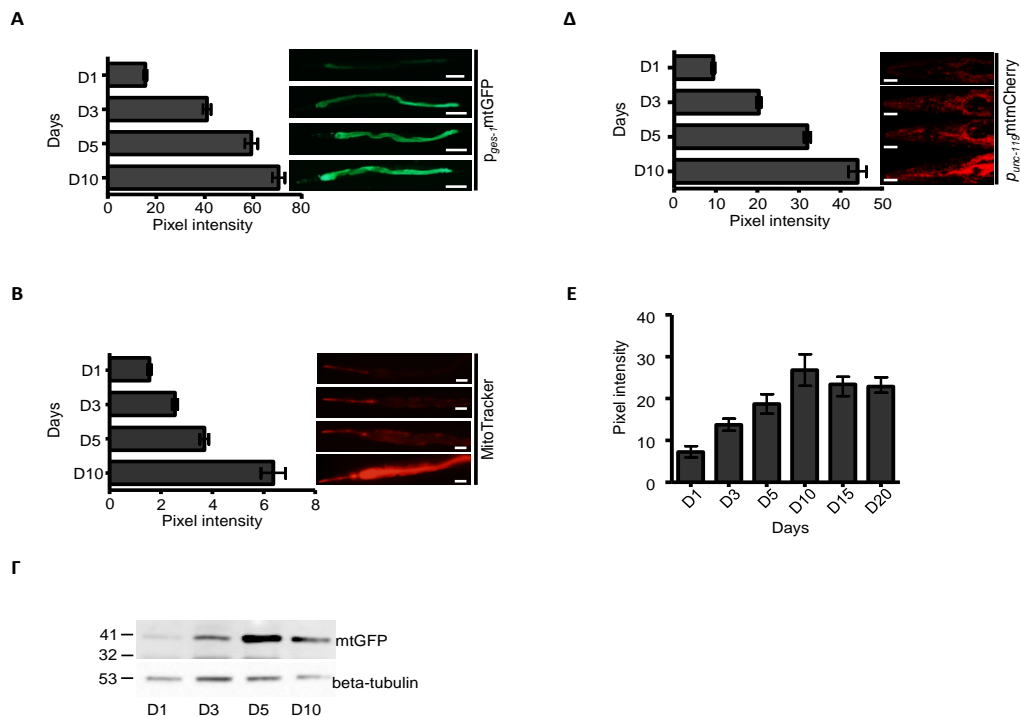
Η στατιστική ανάλυση όλων των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν έγινε με το Prism software package (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

Αποτελέσματα

Η ανεξέλεγκτη συσσώρευση μιτοχονδριακής μάζας παρατηρείται σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις και κατά την διάρκεια της γήρανσης (Artal-Sanz and Tavernarakis, 2009; Fan et al., 2008; Kaerbelein, 2010; Malpass, 2013; Palikaras et al., 2015; Preston et al., 2008; Vafai and Mootha, 2012). Ωστόσο, ο μηχανισμός που ρυθμίζει αυτό το φαινόμενο παραμένει άγνωστος. Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε την συμμετοχή της μιτοφαγίας και της μιτοχονδριακής βιογένεσης στο παραπάνω φαινόμενο και ποιές είναι οι συνέπειες απορρύθμισης του συντονισμού αυτών των δύο αντιτιθέμενων κυτταρικών διαδικασιών στη μιτοχονδριακή λειτουργία και κατ' επέκταση στην διατήρηση της ομοιόστασης ολόκληρου του οργανισμού. Επιπλέον, επειδή ελάχιστα πράγματα είναι γνωστά για τον ρόλο της μιτοφαγίας κατά την διαδικασία της χρονολογικής γήρανσης, μελετήσαμε κατά πόσο η διαδικασία της μιτοφαγίας είναι απαραίτητη κατά την διάρκεια της γήρανσης στον νηματώδη *Caenorhabditis elegans* και αναπτύξαμε δύο *in vivo* συστήματα μικροσκοπικής απεικόνισης για την παρατήρηση της επαγωγής της μιτοφαγίας κατόπιν συγκεκριμένων ερεθισμάτων.

I. Ο ρόλος της μιτοφαγίας στη διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης

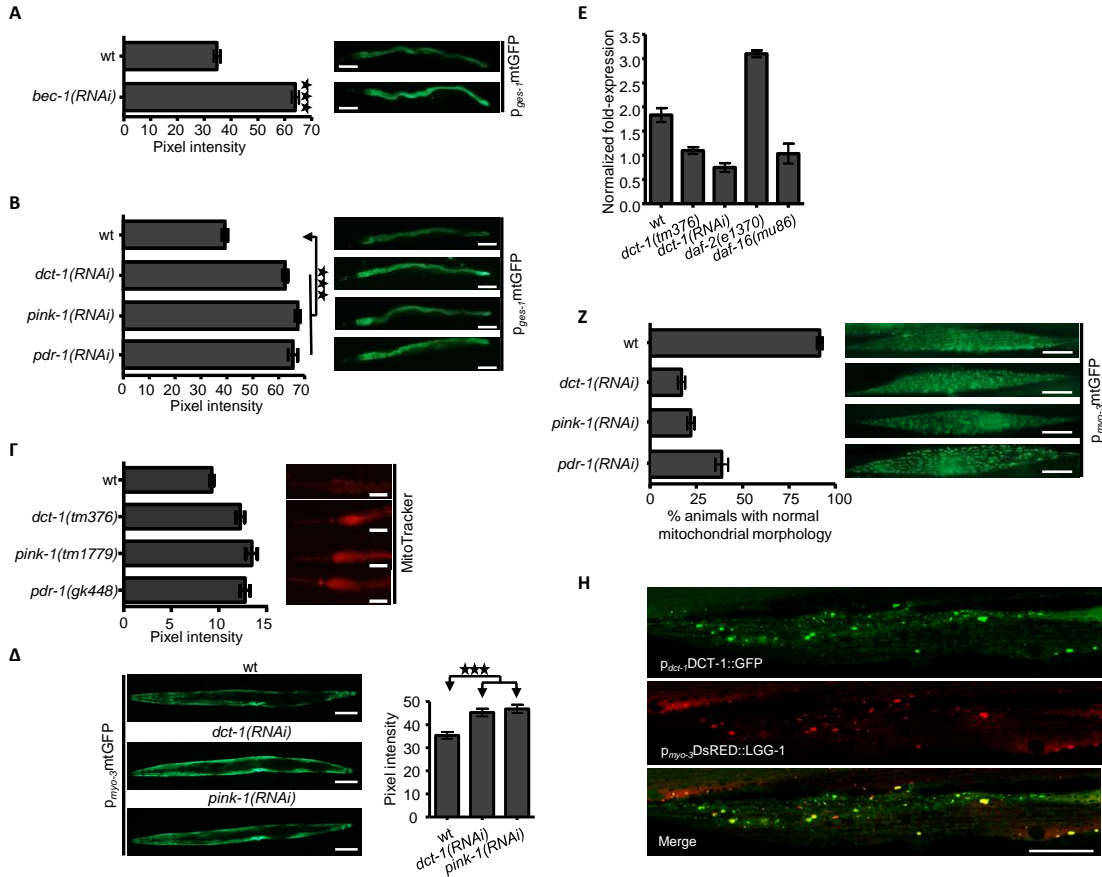
Για να αποκαλύψουμε τους μοριακούς και κυτταρικούς μηχανισμούς που διέπουν την διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης, εξετάσαμε την συμμετοχή της μιτοφαγίας στη ρύθμιση του μιτοχονδριακού πληθυσμού στα κυττάρα του νηματώδη *Caenorhabditis elegans* κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Παρατηρήσαμε ότι τα μιτοχόνδρια σταδιακά συσσωρεύονται σε διάφορους ιστούς κατά τη διάρκεια της γήρανσης σε αγρίου τύπου νηματώδεις (Εικόνα 1A-E). Η πρωτεΐνη BEC-1 αποτελεί κύριο ρυθμιστή της γενικής αυτοφαγίας (Melendez et al., 2003) αλλά και της ειδικής αυτοφαγίας των μιτοχονδρίων. Σίγηση της έκφρασης του γονιδίου *bec-1* έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της μιτοχονδριακής μάζας, όπως συμβαίνει και με την επίδραση της γήρανσης (Εικόνα 2A). Έτσι, μειωμένη απόδοση της αυτοφαγίας παρεμποδίζει την αφαίρεση των μιτοχονδρίων και μπορεί να συμβάλλει στην προοδευτική συσσώρευση τους.



Εικόνα 1. Αύξηση της μιτοχονδριακής μάζας κατά τη διάρκεια της γήρανσης στον νηματώδη *C. elegans*. (A) Διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν mtGFP στον έντερο κάτω από τον έλεγχο του *ges-1* υποκινητή παρατηρήθηκαν κατά

τη διάρκεια της γήρανσης και ελέγχθηκαν για τη μιτοχονδριακή μάζα. Ενδεικτικές εικόνες παρατίθενται στα δεξιά για τις ημέρες 1, 3, 5 και 10 (D1, D3, D5, D10). ($n > 70$ animals per assay; $P < 0.001$ for D1 vs D3, $P < 0.001$ for D1 vs D5, $P < 0.001$ for D1 vs D10; one-way ANOVA). **(B)** Ζώα αγρίου τύπου παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της γήρανσης και ελέγχθηκαν για τη μιτοχονδριακή μάζα έπειτα από χρώση με MitoTracker Red FM. Ενδεικτικές εικόνες παρατίθενται στα δεξιά για τις ημέρες 1, 3, 5 και 10 (D1, D3, D5, D10). ($n > 70$ animals per assay; $P < 0.001$ for D1 vs D3, $P < 0.001$ for D1 vs D5, $P < 0.001$ for D1 vs D10; one-way ANOVA). **(Γ)** Διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν mtGFP στον έντερο κάτω από τον έλεγχο του *ges-1* υποκινήτη παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της γήρανσης και ελέγχθηκαν για τη μιτοχονδριακή μάζα με τη χρήση αντισώματος για τη GFP. **(Δ)** Διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν mtmCherry στους νευρώνες κάτω από τον έλεγχο του *unc-119* υποκινήτη παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της γήρανσης και ελέγχθηκαν για τη μιτοχονδριακή μάζα. Ενδεικτικές εικόνες παρατίθενται στα δεξιά για τις ημέρες 1, 3, 5 και 10 (D1, D3, D5, D10). ($n > 70$ animals per assay; $P < 0.001$ for D1 vs D3, $P < 0.001$ for D1 vs D5, $P < 0.001$ for D1 vs D10; one-way ANOVA). **(E)** Διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν mtGFP στον έντερο κάτω από τον έλεγχο του *ges-1* υποκινήτη παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της γήρανσης και ελέγχθηκαν για τη μιτοχονδριακή μάζα. Ενδεικτικές εικόνες παρατίθενται στα δεξιά για τις ημέρες 1, 3, 5, 10, 15 και 20 (D1, D3, D5, D10, D15, D20). ($n > 70$ animals per assay; $P < 0.001$ for D1 vs D3, $P < 0.001$ for D1 vs D5, $P < 0.001$ for D1 vs D10, $P < 0.001$ for D1 vs D15, $P < 0.001$ for D1 vs D20; one-way ANOVA). Scale bars, 100μm. Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

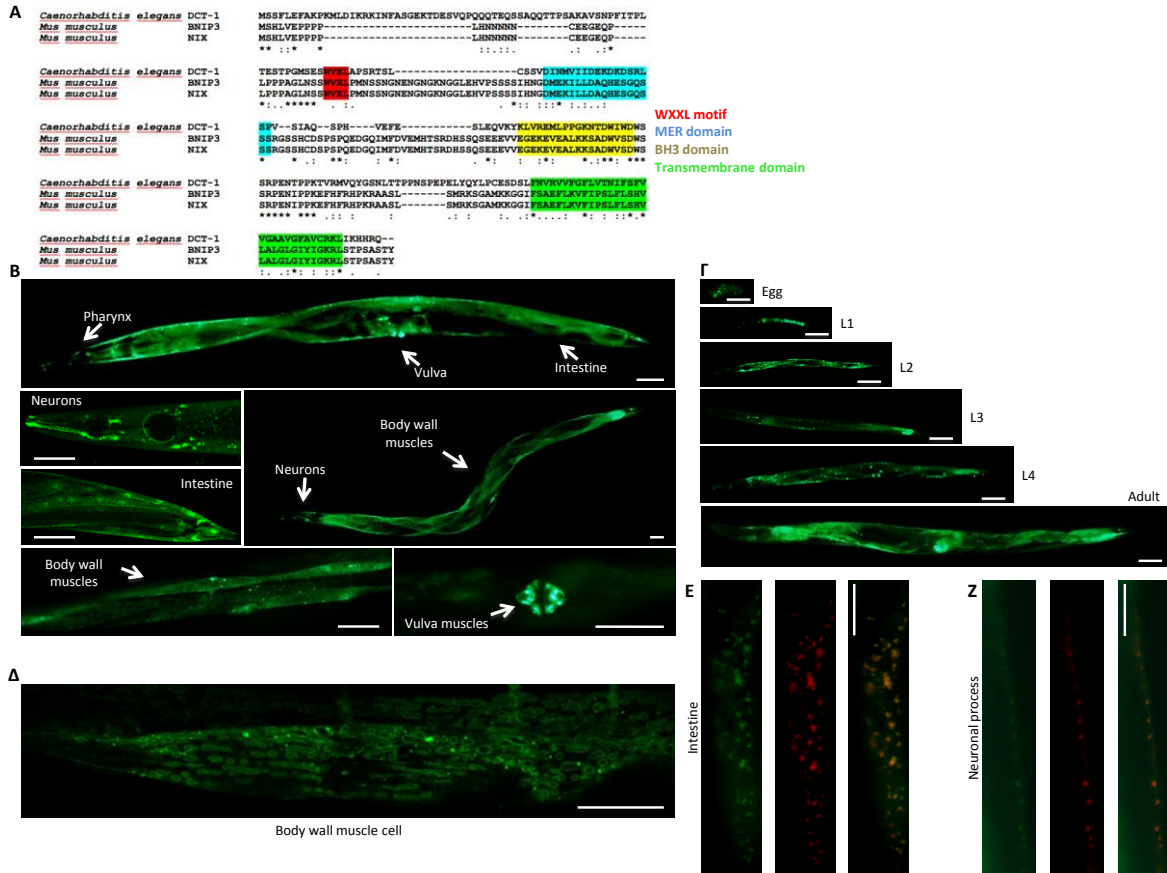
Για να μελετήσουμε συγκεκριμένα τη διαδικασία της μιτοφαγίας, χωρίς να επηρεάσουμε άλλες μορφές αυτοφαγίας, στοχεύσαμε και σιγήσαμε το γονίδιο *dct-1* (DAF-16/FOXO Controlled, germline Tumour affecting-1) (Oh et al., 2006; Pinkston-Goose and Kenyon, 2007). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες NIX/BNIP3L και BNIP3 (Nip3-like protein X/Bcl-2 and adenovirus E1B interacting protein) 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/BNIP3L των θηλαστικών στον *C. elegans* είναι η πρωτεΐνη DCT-1 (**Εικόνα 3A**). Το γονίδιο *dct-1* ρυθμίζεται σε επίπεδο μεταγραφής από τον μεταγραφικό παράγοντα DAF-16 (Pinkston-Gosse and Kenyon, 2007) (**Εικόνα 2A**). NIX/BNIP3L λειτουργεί ως υποδοχέας της μιτοφαγίας και αλληλεπιδρά με την μεμβρανική πρωτεΐνη των αυτοφαγοσωμάτων Atg8/LC3, μέσω του μοτίβου Trp-X-X-Leu (WXXL) και της πρωτεϊνικής επικράτειας MER (domain), προωθώντας την εξάλειψη των μιτοχονδρίων κατά την διάρκεια ανάπτυξης των ερυθροκυττάρων (Scweers et al., 2007; Sandoval et al., 2008; Zhang et al., 2012; Zhu et al., 2012).



Εικόνα 2. Μειωμένη απόδοση της μιτοφαγίας προκαλεί την συσσώρευση των μιτοχονδρίων. (Α) Καταστολή της έκφρασης του *bec-1* προκαλεί αύξηση της μιτοχονδριακής μάζας σε νεαρά διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν mtGFP στο έντερο ($n > 70$ animals per assay; $P < 0.0001$ for wt vs *bec-1(RNAi)*; unpaired *t*-test). **(Β)** Καταστολή της έκφρασης των *dct-1*, *pink-1* και *pdr-1* προκαλεί αύξηση της μιτοχονδριακής μάζας σε νεαρά διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν mtGFP στο έντερο ($n > 100$ animals per assay; $P < 0.001$ for wt vs *dct-1(RNAi)*, $P < 0.001$ for wt vs *pink-1(RNAi)*, $P < 0.001$ for wt vs *pdr-1(RNAi)*; one-way ANOVA). Scale bar, 100μm. **(Γ)** Νεαρά ζώα αγριίου τύπου, *dct-1(tm376)*, *pink-1(tm1779)* και *pdr-1(gk448)* μεταλλάγματα παρατηρήθηκαν και ελέγχθηκαν για τη μιτοχονδριακή μάζα έπειτα από χρώση με MitoTracker Red FM. Ενδεικτικές εικόνες παρατηρήθηκαν στα δεξιά ($n > 70$ animals per assay; $P < 0.001$ for wt vs *dct-1(tm376)*, $P < 0.001$ for wt vs *pink-1(tm1779)*, $P < 0.001$ for wt vs *pdr-1(gk448)*; one-way ANOVA). Scale bars, 100μm. **(Δ)** Καταστολή της έκφρασης των *dct-1* και *pink-1* προκαλεί αύξηση της μιτοχονδριακής μάζας σε νεαρά διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν mtGFP στους μύες του σώματος ($n > 100$ animals per assay; $P < 0.001$ for wt vs *dct-1(RNAi)*, $P < 0.001$ for wt vs *pink-1(RNAi)*; one-way ANOVA). Size bars, 20μm. **(Ε)** Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *dct-1* σε αγριίου τύπου, *dct-1(tm376)*, *dct-1(RNAi)*, *daf-2(e1370)* και *daf-16(mu86)*. **(Ζ)** Καταστολή των *dct-1*, *pink-1* και *pdr-1* γονιδίων σε νεαρά διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν mtGFP στους μύες του σώματος οδηγεί σε αποδιοργανωμένο μιτοχονδριακό δίκτυο. **(Η)** Οι πρωτεΐνες DCT-1 και LGG-1 συνεντοπίζονται σε διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν ταυτόχρονα την πρωτεΐνη DCT-1::GFP και την πρωτεΐνη των αυτοφαγοσωμάτων DsRed::LGG-1. Scale bars, 20μm. Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

Στον *C. elegans*, η DCT-1 εκφράζεται ευρέως σε όλους τους ιστούς και σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια (Εικόνα 3B, Γ). Η DCT-1 είναι μια μεμβρανικά ενσωματωμένη πρωτεΐνη και εντοπίζεται ειδικά στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Εικόνα 3Δ-Z, Εικόνα 4A, Β). Η έκφραση του γονιδίου *dct-1* ρυθμίζεται μερικώς από τον DAF-16 μεταγραφικό παράγοντα παρουσιάζοντας αυξημένα επίπεδα έκφρασης όταν το μονοπάτι insulin/IGF-1 είναι ανενεργό 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

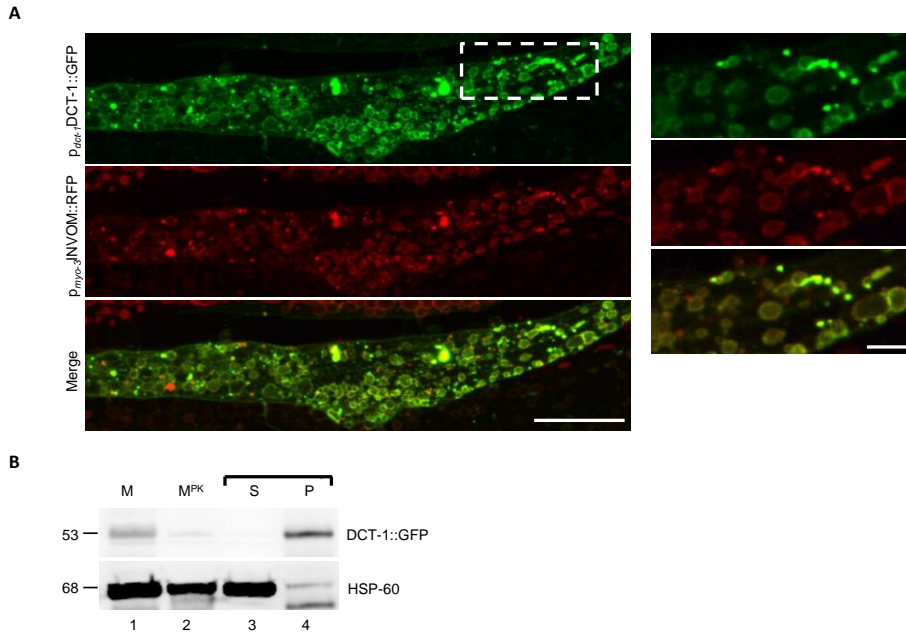
Johnson, 2001; Lee et al., 2001; Lin et al., 2001) όπου και ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τη επιβίωση του οργανισμού, την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες και του θερμικού σοκ, την έμφυτη ανοσία, το μεταβολισμό και την αυτοφαγία (Antebi, 2007; Honda and Honda, 1999; Lee et al., 2003; McElwee et al., 2004; Melendez et al., 2003; Murphy et al., 2003) (Εικόνα 2Α). Βρήκαμε ότι παρόμοια με τη BEC-1, η ανεπάρκεια στην πρωτεΐνη DCT-1 αυξάνει την μιτοχondριακή μάζα σε νεαρά ενήλικα ζώα (Εικόνα 2Β, Γ).



Εικόνα 3. Πρότυπο έκφρασης και η τοπολογία της DCT-1 πρωτεΐνης. (A) Η DCT-1 είναι ομόλογη της BNIP3 και της BNIP3L/NIX στον νηματώδη *C. elegans*. Στοίχιση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των DCT-1, BNIP3 και BNIP3L/NIX. Η διαμεμβρανική περιοχή των πρωτεϊνών έχει σημειωθεί με πράσινο, το WxxL μοτίβο με κόκκινο, η MER πρωτεϊνική επικράτεια με κίτρινο και η BH3 πρωτεϊνική επικράτεια με γαλάζιο χρώμα. (B) Η DCT-1 πρωτεΐνη εκφράζεται σε όλους τους ιστούς του νηματώδη *C. elegans*. (Γ) Η DCT-1 εντοπίζεται στα έμβρυα και η έκφρασή της παραμένει υψηλή σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του νηματώδη. (Δ) Η DCT-1 εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχόνδριων. (E, Z) Η DCT-1::GFP συνεντοπίζεται με τη χρωστική MitoTracker Red FM στο έντερο και σε άξονες νευρώνων. Scale bar, 50μm.

Μελέτες του μιτοχondριακού δικτύου στο νηματώδη *C. elegans* έχουν πραγματοποιηθεί παρατηρώντας το μιτοχondριακό δίκτυο που εμφανίζεται στους μύες του σώματος (body wall muscles) και στο έντερο (intestine) των ζώων. Τα μιτοχόνδρια στους μύες του *C. elegans* σχηματίζουν ένα σωληνοειδές, επίμηκες και πολύ καλά οργανωμένο δίκτυο (Ichishita et al., 2008; Lee et al., 2003). Το μιτοχondριακό 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 μυοκύτταρα. 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. Τα μιτοχόνδρια στο έντρο σχηματίζουν ένα πολυ πυκνά οργανωμένο δίκτυο. Παρατηρήσαμε ότι η μορφολογία του μιτοχονδριακού δικτύου παραμορφώνεται απουσία της DCT-1. Φαίνεται λοιπόν ότι η καταστολή του γονιδίου *dct-1* προκαλεί την αποδιοργάνωση του μιτοχονδριακού δικτύου καθώς και την κατακερμάτισή του. Επιπλέον, παρατηρείται δημιουργία μιτοχονδριακών συσσωματωμάτων (**Εικόνα 2Z**).

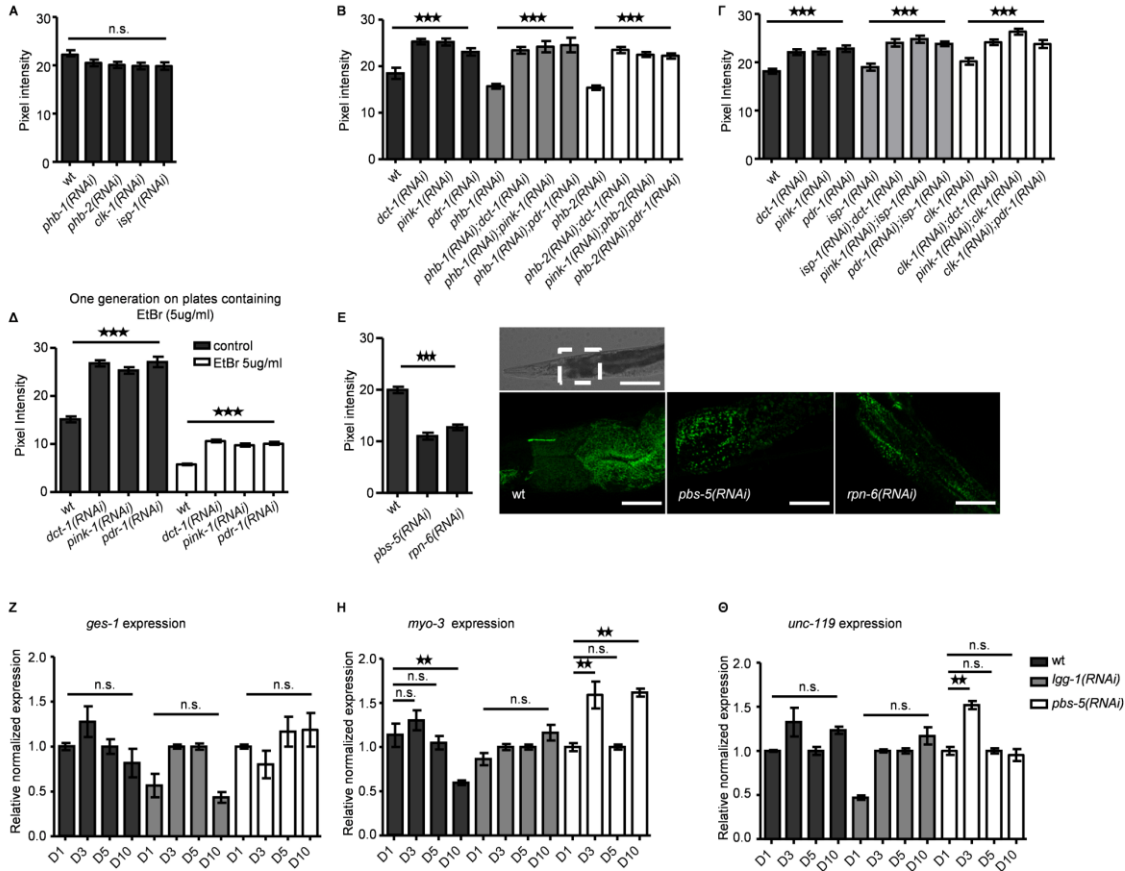


Εικόνα 4. Η DCT-1 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη και εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. (A) Η DCT-1::GFP συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη INVOM::RFP που είναι γνωστό ότι εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Scale bar, 10μm και 5μm. **(B)** Μιτοχόνδρια απομονώθηκαν από διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν p_{dct-1} DCT-1::GFP. Στη συνέχεια επώαστηκαν με πρωτεϊνάση K (Proteinase K; M^{PK} lane 2) ή με sodium carbonate για να διαχωριστούν τα μεμβρανικά (P) από τα διαλυτά (S) μέρη των μιτοχονδρίων (lane 3, 4). Η πρωτεΐνη DCT-1 είναι προσβάσιμη στη δράση της πρωτεϊνάσης K και εντοπίζεται στα μεμβρανικά μέρη των μιτοχονδρίων σε αντίθεση με την γνωστή μιτοχονδριακή πρωτεΐνη τη μήτρας των μιτοχονδρίων, HSP-60.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η DCT-1 είναι ορθόλογη των NIX/BNIP3L και BNIP3 πρωτεϊνών στον *C. elegans*, και λειτουργεί ως ρυθμιστής κλειδί της μιτοφαγίας. Επιπλέον, η DCT-1 περιλαμβάνει το μοτίβο WXXL και την MER πρωτεϊνική επικράτεια και συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη των αυτοφαγοσωμάτων LGG-1, η οποία είναι ομόλογη των Atg8/LC3 στον *C. elegans* (**Εικόνα 2H**).

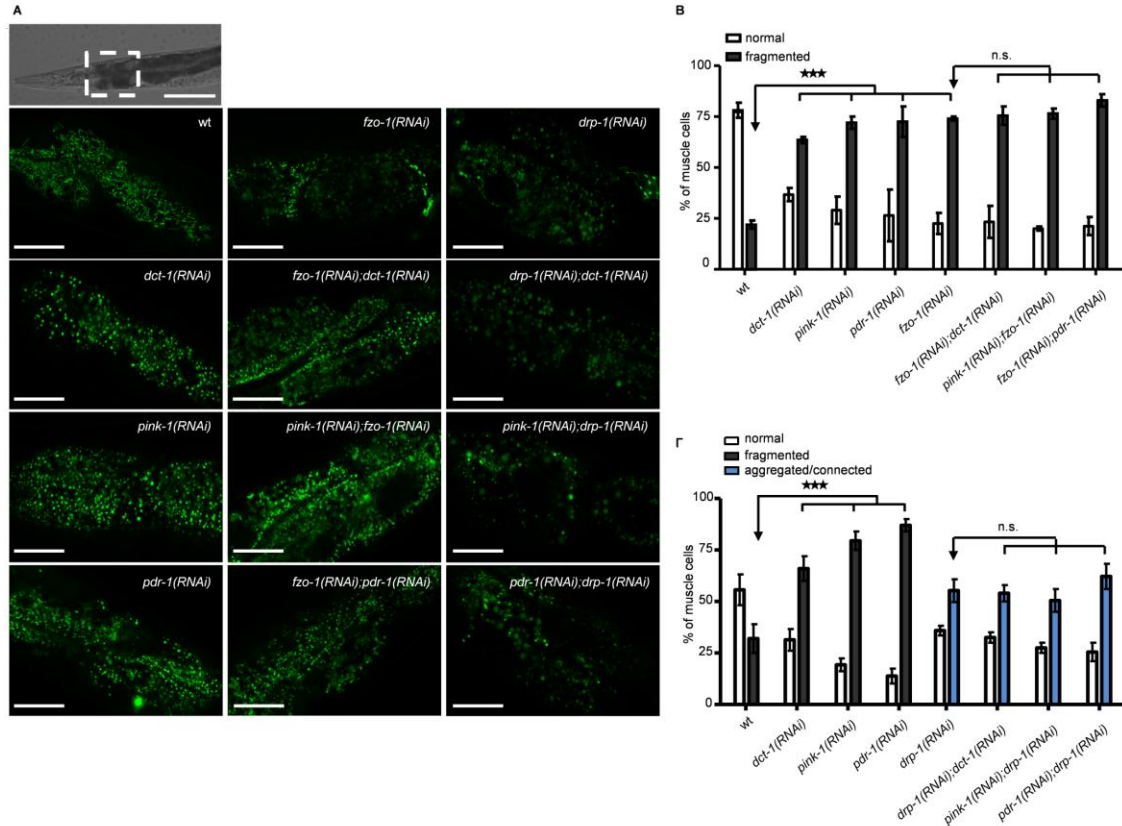
Εκτός από την πρωτεΐνη DCT-1, ελέγξαμε και τον ρόλο της μιτοχονδριακής κινάσης PINK1 και της E3 λιγάσης ουβικιτίνης Parkin στην μιτοφαγία και την διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης στον *C. elegans*. Η PINK1 σε κανονικές συνθήκες αποικοδομείται στα μιτοχόνδρια από τις μιτοχονδριακές πρωτεάσες. Στην περίπτωση μιτοχονδριακών βλαβών, η αποικοδόμηση PINK1 αναστέλλεται και με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια. Στη συνέχεια στρατολογεί την Parkin στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Lazarou et al., 2012; Narendra et al., 2008; Narendra et al., 2010). Με τη σειρά της, η Parkin ουβικιτινυλιώνει αρκετές μεμβρανικές πρωτεΐνες της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, όπως είναι οι MFN1/2 και πρωτεΐνες του TOM συμπλόκου, μαρκάροντας τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια ώστε να απαπομακρυνθούν με την διαδικασία της μιτοφαγίας (Chan et al., 2011; Chen and Dorn, 2013; Gegg et al., 2010; Palikaras and Tavernarakis, 2014; Yoshii et al., 2011).

Η καταστολή της έκφρασης των γονιδίων *pink-1* και *pdr-1* αυξάνει την μιτοχondριακή μάζα και αποδιοργανώνει το μιτοχondριακό δίκτυο σε νεαρά ενήλικα ζώα (**Εικόνα 2B-Δ, Z**). Τα αποτελέσματα αυτά είναι όμοια με τα αποτελέσματα που παρατηρήσαμε και από την σίγηση του γονιδίου *dct-1*, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα γονίδια *dct-1*, *pink-1* και *pdr-1* συμμετέχουν σε κοινό γενετικό μονοπάτι που ελέγχει τη μιτοχondριακή λειτουργία και ομοίωση. Επιπλέον, η αυξημένη μιτοχondριακή μάζα που παρατηρείται στα μεταλλάγματα των *dct-1*, *pink-1* και *pdr-1* γονιδίων δεν οφείλεται σε ένα αντισταθμικό μηχανισμό που αυξάνει την μιτοχondριακή μάζα λόγω αυξημένης μιτοχondριακής βλάβης, ούτε λόγω αυξημένων επιπέδων μιτοχondριακής βιογένεσης, ούτε λόγω μειωμένης αποτελεσματικότητας του πρωτεασώματος, ούτε σε διακυμάνσεις της ενεργότητας των ιστοειδικών υποκινητών που χρησιμοποιήθηκαν (**Εικόνα 5**).



Εικόνα 5. Η μιτοχondριακή μάζα δεν επηρεάζεται από δυσλειτουργίες της μιτοχondριακής λειτουργίας. (A) Καταστολή της έκφρασης των πρωτεϊνών PHB-1, PHB-2, CLK-1 και ISP-1 δεν επηρεάζει τη μιτοχondριακή μάζα σε διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν mtGFP στο έντερο (n=100; n.s., P>0.05; one-way ANOVA). (B, Γ) Ταυτόχρονη RNAi σίγηση για τα γονίδια *phb-1/dct-1*, *phb-1/pink-1*, *phb-1/pdr-1*, *phb-2/dct-1*, *pink-1/phb-2*, *phb-2/pdr-1*, *isp-1/dct-1*, *pink-1/isp-1*, *pdr-1/isp-1*, *clk-1/dct-1*, *pink-1/clk-1*, *clk-1/pdr-1* προκαλεί αύξηση της μιτοχondριακής μάζας (n=100; ***P<0.001; one-way ANOVA). (Δ) Καταστολή των DCT-1, PINK-1 και PDR-1 προκαλεί αύξηση της μιτοχondριακής μάζας σε διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν mtGFP στο έντερο. Διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν mtGFP στο έντερο μεγάλωσαν παρουσία EtBr για μια γενιά ώστε να εμποδίσουμε την μιτοχondριακή βιογένεση. Παρ' όλα αυτά, η καταστολή των DCT-1, PINK-1 και PDR-1 σε ζώα που μεγάλωσαν παρουσία EtBr προκαλεί αύξηση της μιτοχondριακής μάζας (n=100; ***P<0.001; one-way ANOVA). (E) Καταστολή της έκφρασης των πρωτεϊνών PBS-5 και RPN-6, οι οποίες αποτελούν δομικά συστατικά του πρωτεασώματος, οδηγούν σε μείωση της μιτοχondριακής μάζας (n=100; ***P<0.001; one-way ANOVA). (Z, H, Θ) Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ges-1*, *myo-3* και *unc-119* παραμένουν σχετικά σταθερά κατά τη διάρκεια της γήρανσης και έπειτα από καταστολής της αυτοφαγίας ή του πρωτεασώματος (n=100; n.s., P>0.05, **P<0.01; one-way ANOVA). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

Επιπλέον, το αποδιοργανωμένο μιτοχondριακό δίκτυο που παρατηρείται με την απώλεια των DCT-1, PINK-1 και PDR-1 είναι αποτέλεσμα δευτερευόντων γεγονότων που οφείλονται στην μειωμένη μιτοφαγία, αφού καταστολή της έκφρασης των *dct-1*, *pink-1* και *pdr-1* δεν μεταβάλλει περαιτέρω το ήδη κατακεραματισμένο μιτοχondριακό δίκτυο των FZO-1 μεταλλαγμάτων (FZO-1 είναι ομόλογη πρωτεΐνη με αυτές των θηλαστικών MFN-1/-2), ή το πολύ συνδεδεμένο και πυκνό μιτοχondριακό δίκτυο των DRP-1 μεταλλαγμάτων (DRP-1 είναι ομόλογη πρωτεΐνη με την Dynamin Related Protein 1 στα θηλαστικά) (Εικόνα 6). Οι πρωτεΐνες FZO-1 και DRP-1 έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στη διαμόρφωση του μεγέθους και της διατήρησης της ομοιότητας του μιτοχondριακού δικτύου, καθώς ελέγχουν τις διαδικασίες σχάσης και σύντηξης των μιτοχondρίων (Rolland, 2014).

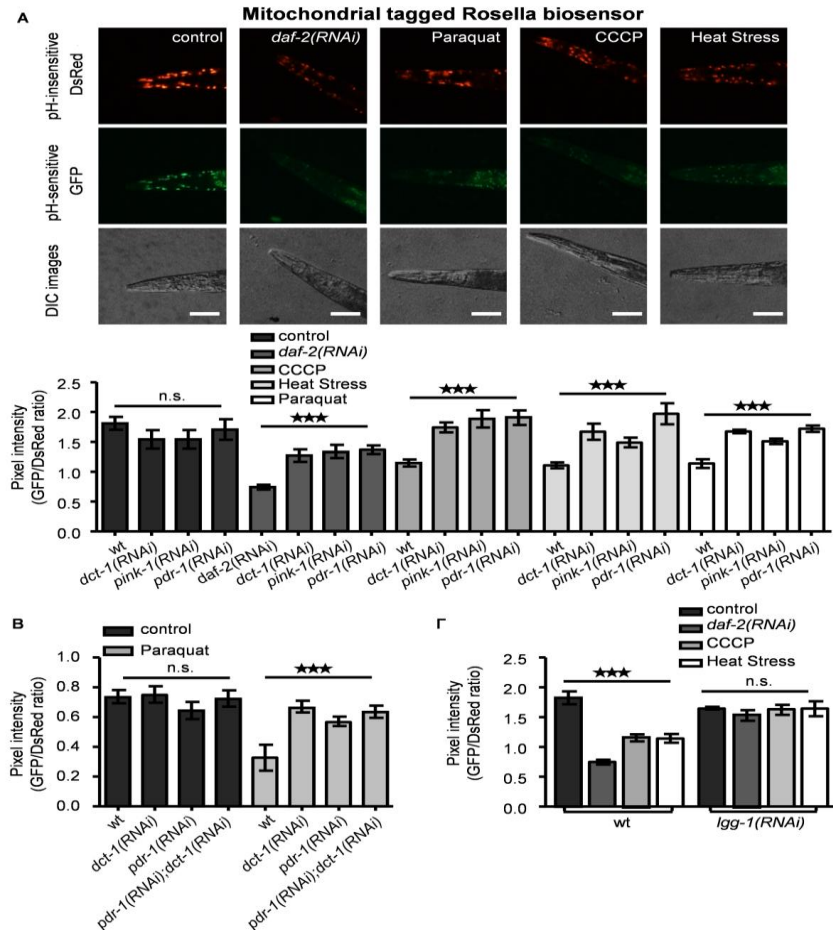


Εικόνα 6. Η καταστολή της μιτοφαγίας δεν επηρεάζει την μορφολογία του μιτοχondριακού δικτύου στα *fzo-1* και *drp-1* μεταλλάγματα. (A) Μείωση της μιτοφαγίας έπειτα από σίγηση των *dct-1*, *pink-1* και *pdr-1* προκαλεί αποδιοργανωμένο μιτοχondριακό δίκτυο σε αγρίου τύπου ζώα που εκφράζουν mtGFP στο έντερο και δεν επηρεάζει περαιτέρω το ήδη κατεστραμμένο δίκτυο των FZO-1 και DRP-1 κατεσταλμένων ζώων. Scale bar, 20μm. (B, Γ) Καταστολή των *dct-1*, *pink-1* και *pdr-1* προκαλεί αποδιοργανωμένο μιτοχondριακό δίκτυο σε αγρίου τύπου ζώα που εκφράζουν mtGFP στους μύες του σώματος. Ταυτόχρονη σίγηση των *fzo-1/dct-1*, *pink-1/fzo-1* και *fzo-1/pdr-1* ή των *drp-1/dct-1*, *pink-1/drp-1* και *pdr-1/drp-1* δεν προκαλεί επιπλέον αλλαγές στο ήδη κατεστραμμένο και αποδιοργανωμένο μιτοχondριακό δίκτυο. (n=100; n.s., P>0.05, ***P<0.001; one-way ANOVA). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

II. *In vivo* συστήματα μικροσκοπικής απεικόνισης της μιτοφαγίας

Παρά την πρόοδο στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν τη διαδικασία της μιτοφαγίας, δεν υπάρχει ακόμη διαθέσιμο ένα *in vivo* σύστημα για την παρακολούθηση της αποβολής των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων σε πολυκύτταρους οργανισμούς. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρουσιάζουμε την ανάπτυξη δύο σύνθετων συστημάτων για την παρακολούθηση της μιτοφαγίας *in vivo* σε ζωντανά άτομα. Επιπλέον, ανακαλύψαμε διάφορες συνθήκες που είτε προκαλούν είτε καταστέλλουν την μιτοφαγία στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans*.

Αρχικά δημιουργήσαμε διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν το βιοαισθητήρα Rosella στα μιτοχόνδρια (mtRosella) στους μυς του σώματος (body wall muscles). Η Rosella αποτελεί έναν ειδικής κατασκευής αισθητήρα που περιλαμβάνει την φθορίζουσα πρωτεΐνη DsRed, η οποία είναι ανθεκτική σε χαμηλές τιμές pH, συγχωνευμένη με μια παραλλαγή της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP, η οποία είναι ευαίσθητη σε χαμηλές τιμές pH. Σε κανονικές συνθήκες, τα μιτοχόνδρια εκφράζουν και τις δύο φθορίζουσες πρωτεΐνες. Όταν έχουμε επαγωγή της μιτοφαγίας, τα μιτοχόνδρια εγκοιλώνονται από τα αυτοφαγοσώματα και στη συνέχεια συγχωνεύονται με τα λυσοσώματα. Εκφράσαμε την mtRosella στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, έτσι λοιπόν, όταν τα μιτοχόνδρια έρθουν σε επαφή με το όξινο περιβάλλον των λυσοσωμάτων το σήμα από τη GFP σβήνει ενώ το σήμα από τη DsRed παραμένει σταθερό. Ο βιοαισθητήρας αυτός έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε προηγούμενες μελέτες για την παρακολούθηση της μιτοφαγίας στο μονοκύτταρο οργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* (Rosado et al., 2008; Mijaljica, 2011). Στη συνέχεια, εξετάσαμε διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν την mtRosella, υπό κανονικές και συνθήκες που είναι γνωστό ότι επάγουν την διαδικασία της μιτοφαγίας, όπως οξειδωτικό στρες, μιτοχονδριακό στρες και θερμικό στρες. Όλες οι παραπάνω συνθήκες μειώνουν την αναλογία GFP/DsRed του φθορισμού της Rosella, γεγονός που δηλώνει την διέγερση μιτοφαγίας (**Εικόνα 7A**).

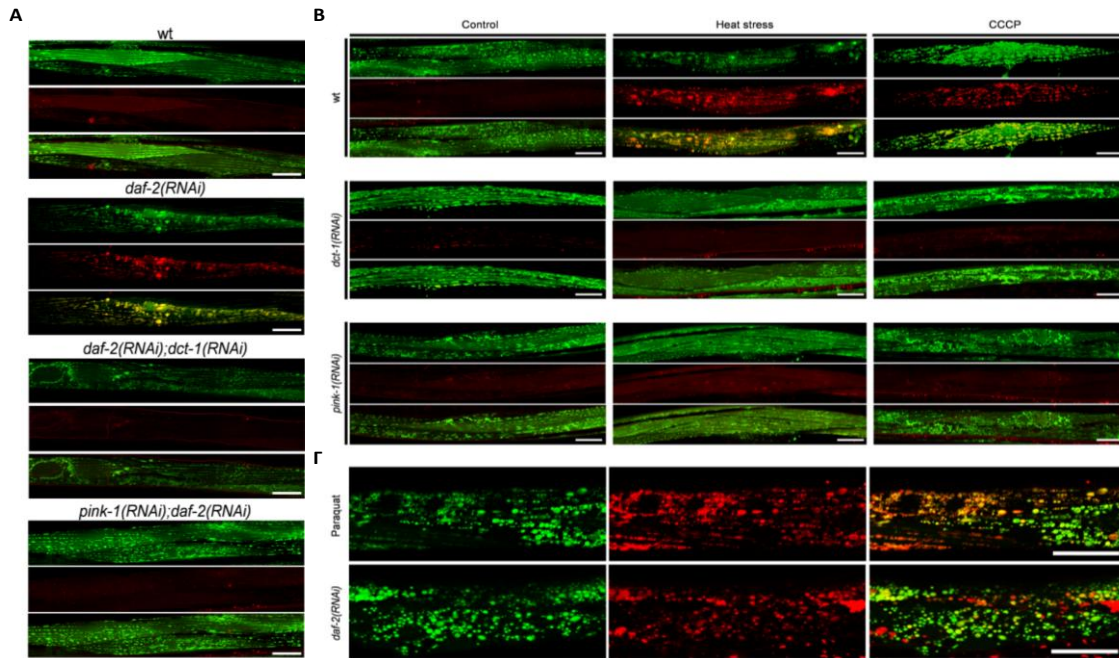


Εικόνα 7. *In vivo* μικροσκοπική απεικόνιση της μιτοφαγίας με τη χρήση του βιοαισθητήρα mtRosella. (A) Διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν mtRosella στους μύες του σώματος επώαστηκαν σε *daf-2(RNAi)*, paraquat, CCCP και στους 37°C. Η επαγωγή της μιτοφαγίας παρατηρείται από την μείωση του λόγου GFP (pH sensitive)/DsRed (pH insensitive). Οι πρωτεΐνες DCT-1, PINK-1 και PDR-1 είναι απαραίτητες για την επαγωγή της μιτοφαγίας (n=100; n.s., P>0.05, ***P<0.001; one-way ANOVA). (B) Καταστολή της έκφρασης των *dct-1*, *pdr-1* μειώνει την επαγωγή της μιτοφαγίας παρουσία paraquat. Ταυτόχρονη σίγηση των *dct-1/pdr-1* δεν προκαλεί παραπάνω μείωση των επιπέδων μιτοφαγίας (n=100; n.s., P>0.05, ***P<0.001; one-way ANOVA). (Γ) Η καταστολή του μηχανισμού της γενικής αυτοφαγίας αναστέλλει τη μιτοφαγία (n=100; n.s., P>0.05, ***P<0.001; one-way ANOVA). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

Εκτός από τη mtRosella, δημιουργήσαμε διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη DsRed::LGG-1, η οποία χρησιμοποιείται ως δείκτης των αυτοφαγοσωμάτων, και τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP συνδεδεμένη με ένα πεπτιδίο σινιάλο που την οδηγεί στα μιτοχόνδρια (mtGFP). Η πρωτεΐνη DsRed::LGG-1 εκφράζεται κάτω από τον έλεγχο του ενδογενούς υποκινητή της LGG-1 πρωτεΐνης, ενώ η mtGFP εκφράζεται μόνο στους μύες του σώματος. Στη συνέχεια, εξετάσαμε τα διαγονιδιακά ζώα υπό κανονικές συνθήκες και συνθήκες που επάγουν την μιτοφαγία, όπως οξειδωτικό στρες, μιτοχονδριακό στρες και θερμικό στρες. Όλες οι παραπάνω συνθήκες διεργείρουν τη μιτοφαγία και επάγουν τον σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων που συνεντοπίζονται με τα μιτοχόνδρια στο μυς του σώματος (Εικόνα 8Α-Γ).

Επιπλέον, χρησιμοποιώντας και τα δύο συστήματα μικροσκοπική απεικόνισης της μιτοφαγίας *in vivo*, παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα της μιτοφαγίας είναι υψηλά όταν το μονοπάτι insulin/IGF-1 είναι ανενεργό μετά από σίγηση του γονιδίου *daf-2* (Εικόνα 7Α, Γ και Εικόνα 8Α, Γ). Ακόμα βρήκαμε ότι η επαγωγή της μιτοφαγίας κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες,

μιτοχονδριακού στρες, θερμικού στρες και χαμηλών επιπέδων ινσουλίνης εξαρτάται από την δράση των DCT-1, PINK-1 και PDR-1 πρωτεϊνών (Εικόνα 7A, B και Εικόνα 8A, B). Η ταυτόχρονη σίγηση των *dct-1* και *pdr-1* δεν οδηγεί σε περαιτέρω μείωση της μιτοφαγίας κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες σημειώνοντας ότι τα δύο αυτά γονίδια συμμετέχουν στο ίδιο γενετικό μονοπάτι για να ρυθμίσουν την μιτοφαγία (Εικόνα 7B). Επιπλέον, αναστέλλοντας τον γενικό μηχανισμό της αυτοφαγίας μέσω της σίγησης του *lgg-1* γονιδίου εμποδίζουμε την διαδικασία της μιτοφαγίας (Εικόνα 7Γ). Επαληθεύοντας ότι η ειδική μιτοχονδριακή αυτοφαγία χρειάζεται την ύπαρξη των κυρίως δομικών συστατικών της γενικής αυτοφαγίας για να πραγματοποιηθεί.

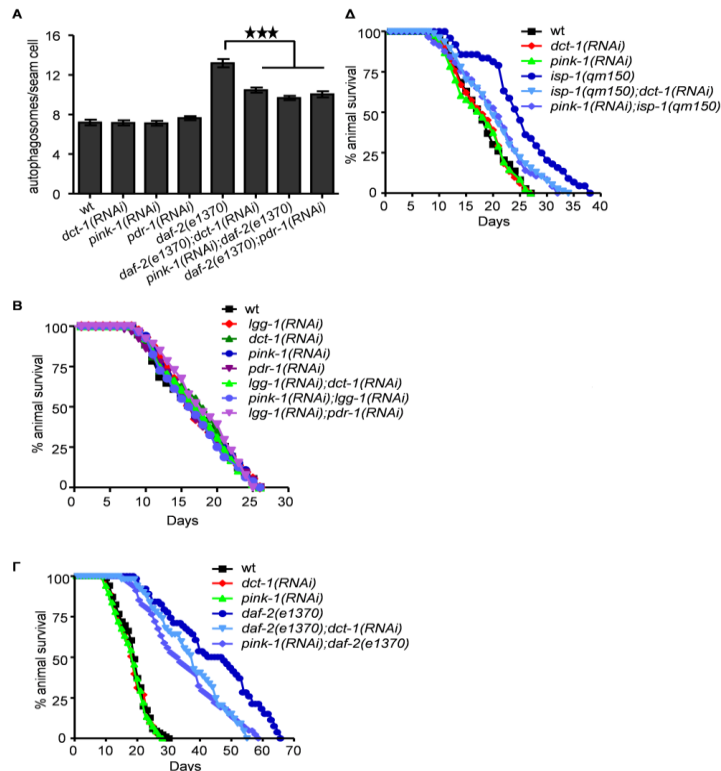


Εικόνα 8. Η μιτοφαγία επάγεται κάτω από συνθήκες στρες και απαιτεί την δράση των DCT-1 και PINK-1 πρωτεϊνών. (A, B, Γ) Επαγωγή της μιτοφαγίας σε συνθήκες στρες (χαμηλά επίπεδα ινσουλίνης (*daf-2(RNAi)*), θερμικό στρες, μιτοχονδριακό στρες (CCCp) και οξειδωτικό στρες (paraquat)). Διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν mtGFP (μιτοχόνδρια) και την αυτοφαγοσωμική πρωτεΐνη DsRed::LGG-1 (αυτοφαγοσώματα) στους μύες του σώματος. Η μιτοφαγία παρατηρείται με τον συνεντοπισμό των mtGFP και DsRed::LGG-1 πρωτεϊνών. Η καταστολή της έκφρασης των γονιδίων *dct-1* και *pink-1* αναστέλλει τη διαδικασία της μιτοφαγίας. Scale bar, 20μm, 10μm.

III. Ο ρόλος της μιτοφαγίας στη γήρανση και στην αντιμετώπιση συνθηκών στρες

Για να μελετήσουμε τη συμβολή της μιτοφαγίας στην μακροζωία και τη γήρανση, καταστήσαμε την έκφραση των γονιδίων *dct-1*, *pink-1* και *pdr-1* σε αγρίου τύπου άτομα και σε μεταλλάγματα που παρουσιάζουν αυξημένη διάρκεια ζωής. Αξίζει να σημειωθεί ότι η απουσία των DCT-1, PINK-1 και PDR-1 πρωτεϊνών μειώνει τα επίπεδα γενικής αυτοφαγίας και την αυξημένη διάρκεια ζωής στα μεταλλάγματα *daf-2(e1370)*, ενώ δεν επηρεάζει τα επίπεδα βασικής αυτοφαγίας ή την διάρκεια ζωής των αγρίου τύπου ζώων ή των ζώων με ελλειμματικό μηχανισμό της γενικής αυτοφαγίας (**Εικόνα 9Α-Δ και Εικόνα 10Α-Ζ**). Συμπερασματικά, η μιτοφαγία συμμετέχει σε μεγάλο ποσοστό στα αυξημένα επίπεδα γενικής αυτοφαγίας που παρατηρείται στα *daf-2(e1370)* ζώα και οι πρωτεΐνες DCT-1, PINK-1 και PDR-1 λειτουργούν συνεργατικά για να επάγουν τη μιτοφαγία και να προάγουν την μακροζωία όταν τα επίπεδα ινσουλίνης είναι χαμηλά.

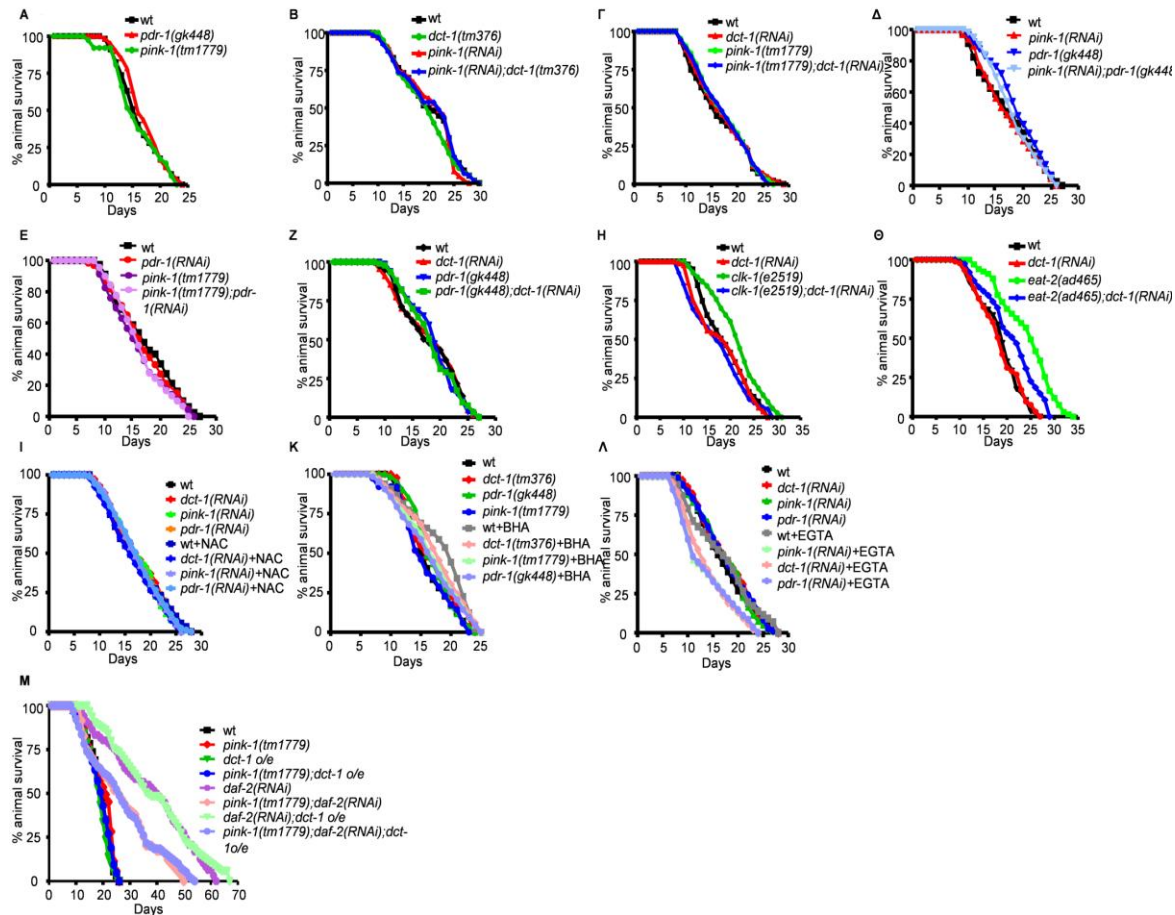
Εξετάσαμε, επίσης, τη συμβολή της μιτοφαγίας στην αυξημένη παράταση ζωής που προκαλείται έπειτα από μέτρια μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ή από τον περιορισμό των θερμιδών στο *C. elegans*. Η σίγηση της έκφρασης είτε της DCT-1 είτε της PINK-1 μειώνει τη διάρκεια ζωής των μακρόβιων *isp-1(qm150)* και *clk-1(e2519)* μεταλλαγμάτων. Ομοίως, βρήκαμε ότι η ανεπάρκεια στην πρωτεΐνη DCT-1 ελαττώνει την αυξημένη διάρκεια ζωής των *eat-2(ad465)* ζώων (**Εικόνα 9Δ και Εικόνα 10Η, Θ**). Έτσι, λοιπόν, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η μιτοφαγία είναι ένας κυτταρικός μηχανισμός που διασφαλίζει τη μακροζωία έπειτα από διάφορους χειρισμούς που αυξάνουν το προσδόκιμο ζωής στον *C. elegans*.



Εικόνα 9. Η δράση της μιτοφαγίας είναι απαραίτητη για την αυξημένη διάρκεια ζωής των *daf-2(e1370)* και *isp-1(qm150)* μεταλλαγμάτων. (Α) Η καταστολή της μιτοφαγίας δεν επηρεάζει τα επίπεδα της γενικής αυτοφαγίας. Καταγραφή του αριθμού των αυτοφαγοσωμάτων στα seam cells σε ζώα L4 σταδίου έπειτα από *dct-1(RNAi)*, *pink-1(RNAi)* και *pdr-1(RNAi)*. Καταστολής της μιτοφαγίας μειώνει τον αριθμό των αυτοφαγοσωμάτων σε ζώα που έχουν υποστεί σίγηση για το γονίδιο *daf-2* ($n=100$; n.s., $P>0.05$, $***P<0.001$; one-way ANOVA). Οι γραμμές σφάλματος

δηλώνουν το S.E.M. **(B)** Η καταστολή της έκφρασης των γονιδίων *dct-1*, *pink-1*, *pdr-1*, *lgg-1* ή η ταυτόχρονη καταστολή *lgg-1/dct-1*, *pink-1/igg-1* και *lgg-1/pdr-1* δεν επηρεάζει τη διάρκεια ζωής των ζώων. **(Γ, Δ)** Καταστολή της μιτοφαγίας προκαλεί μείωση στην αυξημένη διάρκεια ζωής των *daf-2(e1370)* και των *isp-1(qm150)* μεταλλάγματων.

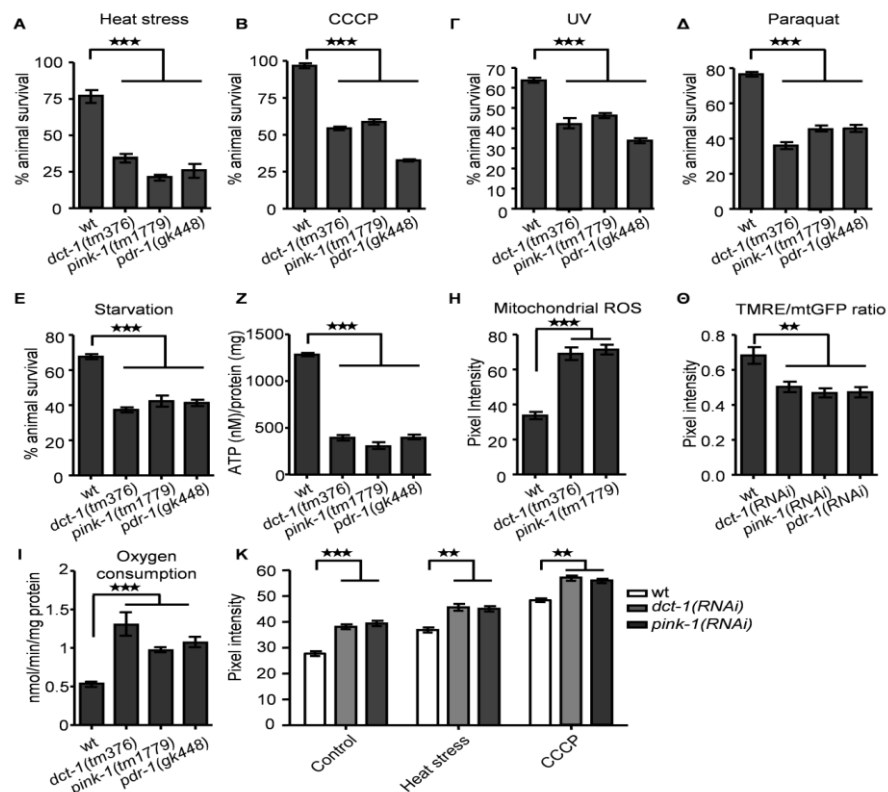
Για να διερευνήσουμε το μηχανισμό με τον οποίο συμβάλλει η μιτοφαγία στη μακροζωία, ελέγξαμε την αντοχή σε συνθήκες στρες σε ζώα με ελειμματικό το μηχανισμό της μιτοφαγίας, τα οποία φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις DCT-1, PINK-1 και PDR-1 πρωτεΐνες. Τα *dct-1(tm376)*, *pink-1(tm1779)* και *pdr-1(gk448)* μεταλλάγματα είναι σημαντικά πιο ευαίσθητα σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες, όπως το οξειδωτικό στρες, το μιτοχονδριακό στρες, το θερμικό στρες, η UV ακτινοβολία και σε συνθήκες πείνας, σε σύγκριση με αγρίου τύπου άτομα **(Εικόνα 11A-E και Εικόνα 12A, B)**. Αντίθετως, η υπερέκφραση του γονιδίου *dct-1* προσδίδει PINK-1- και PDR-1-εξαρτώμενη προστασία ενάντια σε συνθήκες στρες **(Εικόνα 10M και Εικόνα 12K, Λ)**. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το WXXL μοτίβο είναι απαραίτητο για την προστασία ενάντια στο στρες έπειτα από υπερέκφραση του *dct-1* γονιδίου, ενώ οι επικράτειες MER και BH3 της DCT-1 πρωτεΐνης δεν είναι απαραίτητες για το φαινότυπο αυτό **(Εικόνα 12H-D)**.



Εικόνα 10. Η καταστολή της μιτοφαγίας επηρεάζει το προσδόκιμο ζωής ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο. **(A)** Διάρκεια ζωής αγρίου τύπου, *dct-1(tm376)* και *pink-1(tm1779)* μεταλλάγματων **(B, Γ)** Καταστολή της έκφρασης των PINK-1 και DCT-1 **(Δ, Ε)** Καταστολή της έκφρασης των PINK-1 και PDR-1 **(Z)** Καταστολή της έκφρασης των DCT-1 και PDR-1 **(H)** Καταστολή της έκφρασης του *dct-1* γονιδίου σε *clk-1(e2519)* μεταλλάγματα **(Θ)** Καταστολή της έκφρασης του *dct-1* γονιδίου σε *eat-2(ad465)* μεταλλάγματα **(I, K)** Η μιτοχονδριακή μιτοφαγία δεν επηρεάζει τη διάρκεια ζωής των ζώων με κατεσταλμένη μιτοφαγία **(Λ)** Τα ζώα με κατεσταλμένη μιτοφαγία παρουσιάζουν μειωμένη διάρκεια ζωής παρουσία EGTA **(M)** Η υπερέκφραση του γονιδίου *dct-1* δεν επηρεάζει τη διάρκεια ζωής των αγρίου τύπου ζώων ή των *pink-1(tm1779)* μεταλλάγματων. Η υπερέκφραση του γονιδίου *dct-1* επιμηκύνει την μέγιστη διάρκεια ζωής των

daf-2(RNAi) ζώων. Όμως η καταστολή του *pink-1* μειώνει τη διάρκεια ζωής τόσο των *daf-2(RNAi)* ζώων όσο και των *daf-2(RNAi)* ζώων που υπερεκφράζουν το *dct-1* γονίδιο.

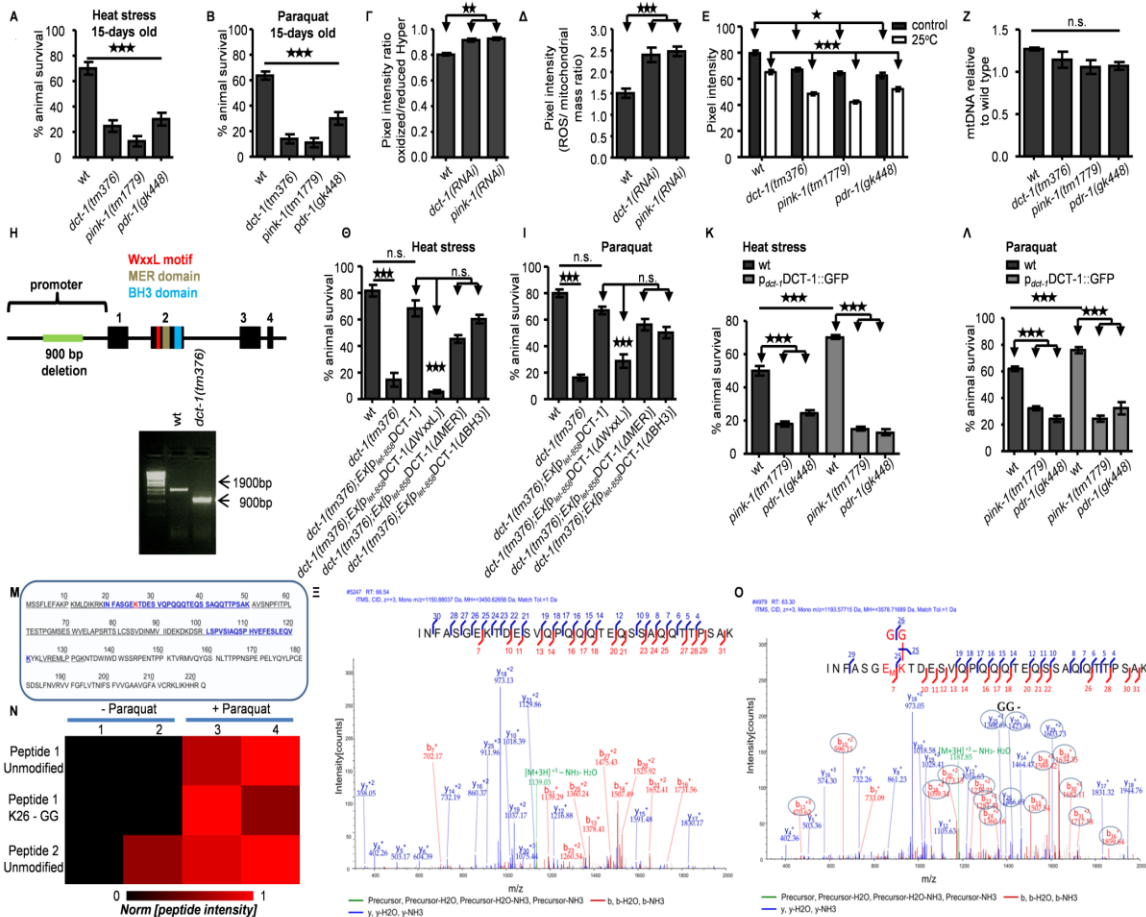
Υποθέσαμε ότι αυξημένη ευαισθησία στο στρες μπορεί να οφείλεται στην παρατεταμένη συσσώρευση των δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων στα μεταλλάγματα με μειωμένη μιτοφαγία. Πράγματι, σε ζώα με ανεπάρκεια στις πρωτεΐνες DCT-1, PINK-1 και PDR-1, αν και τα επίπεδα του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) παραμένουν σχετικά αμετάβλητα (**Εικόνα 12Z**), παρατηρήσαμε μείωση των επιπέδων ATP, αυξημένη παραγωγή μιτοχονδριακών ROS (mitochondrial derived ROS), αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης (mitochondrial membrane depolarization), αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και αυξημένα επίπεδα κυτταροπλασματικού ασβεστίου (Ca^{2+}), που επιδεινώνονται κάτω από συνθήκες στρες (**Εικόνα 11Z-K και Εικόνα 12Γ-E**). Τα ευρήματα αυτά, σε συνδυασμό με το αποδιοργανωμένη μορφολογία του μιτοχονδριακού δικτύου που προαναφέρθηκε, δείχνουν ότι η απορρύθμιση της διαδικασίας της μιτοφαγίας συμβάλλει στην έντονη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, επηρεάζοντας την ομοίωσταση και την βιοσημότητα ολόκληρου του οργανισμού. Συμπερασματικά, λοιπόν, οι πρωτεΐνες DCT-1, PINK-1 και PDR-1 συμμετέχουν σε κοινό μοριακό μονοπάτι, είναι απαραίτητες για την επαγωγή της μιτοφαγίας και την απομάκρυνση των μη λειτουργικών μιτοχονδρίων. Επιπλέον, από πειράματα επίστασης που πραγματοποιήθηκαν βρήκαμε ότι η πρωτεΐνη DCT-1 δρα μετά από τις PINK-1 και PDR-1.



Εικόνα 11. Η καταστολή της μιτοφαγίας επηρεάζει την ανοχή σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες και την εύρυθμη μιτοχονδριακή λειτουργία. (A, B, Γ, Δ, E) Τα *dct-1(tm376)*, *pink-1(tm1779)* και *pdr-1(gk448)* μεταλλάγματα παρουσιάζουν έντονη ευαισθησία σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες (θερμικό στρες, μιτοχονδριακό στρες, UV ακτινοβολία, οξειδωτικό στρες και πείνα) σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα. **(Z, H, Θ, I, K)** Τα *dct-1(tm376)*, *pink-1(tm1779)* και *pdr-1(gk448)* μεταλλάγματα παρουσιάζουν **(Z)** μειωμένα επίπεδα ATP **(H)** αυξημένα επίπεδα μιτοχονδριακών ROS **(Θ)** αυξημένα επίπεδα αποπόλωσης της μιτοχονδριακής μεμβράνης **(I)** αυξημένα επίπεδα κατανάλωσης οξυγόνου και **(K)** αυξημένα επίπεδα κυτταροπλασματικού ασβεστίου, τα οποία αυξάνονται περαιτέρω υπό συνθήκες στρες (n=100, ***P<0.001; one-way ANOVA). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

IV. Αλληλεπίδραση και επικοινωνία μεταξύ των πρωτεϊνών DCT-1, PINK-1 και PDR-1 στην μιτοφαγία

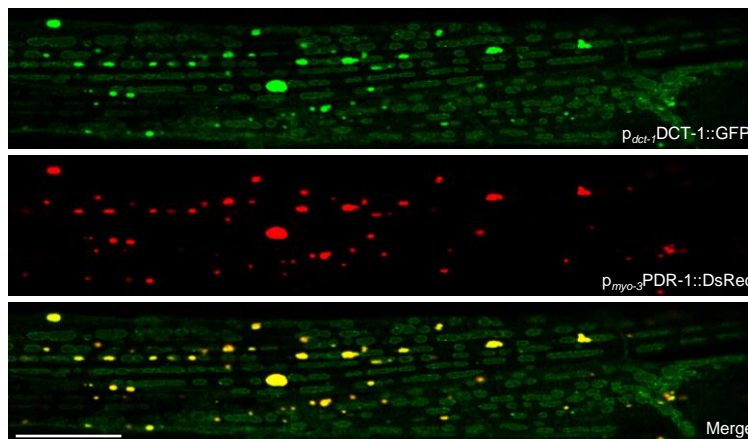
Για να διερευνήσουμε τον μοριακό μηχανισμό της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών DCT-1, PINK-1 και PDR-1, πραγματοποιήσαμε ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης DCT-1 έπειτα από επαγωγή της μιτοφαγίας από οξειδωτικό στρες. Αφού αρχικά επεξεργαστήκαμε με τρυψίνη την ανοσοκατακρημνισμένη πρωτεΐνη DCT-1, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των πεπτιδίων με φασματομετρία μάζας (mass spectrometry). Βρήκαμε ότι η DCT-1 είναι ουβικιτινυλωμένη στο κατάλοιπο λυσίνης 26 (K26), μια τροποποίηση η οποία αυξάνεται μετά από συνθήκες που επάγουν την μιτοφαγία και εξαρτάται από την δράση της PINK-1 κινάσης (Εικόνα 12M-O).



Εικόνα 12. Η μιτοφαγία προάγει τη διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης και την αντοχή σε στρεσογόνους παράγοντες. 15-ημερών ζώα αγριού τύπου, *dct-1(tm376)*, *pink-1(tm1779)* και *pdr-1(gk448)* επλώστηκαν (A) στους 37°C (n=100, ***P<0.001; one-way ANOVA) και (B) παρουσία paraquat (n=100, ***P<0.001; one-way ANOVA). (C) Διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν τον βιοαισθητήρα Hyper, ο οποίος καταγράφει την συγκέντρωση του κυτταροπλασματικού υπεροξειδίου του οξυγόνου (H₂O₂). Καταστολή της έκφρασης των *dct-1* και *pink-1* γονιδίων προκαλεί αύξηση των επιπέδων του H₂O₂ (n=100, ***P<0.001; one-way ANOVA). (D) Ζώα με κατεσταλμένη μιτοφαγία παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα μιτοχονδριακών ROS σε σχέση με την ολική μιτοχονδριακή μάζα (mtGFP) (n=100, ***P<0.001; one-way ANOVA). (E) Χρώση με TMRE στους 20°C και 25°C σε αγριού τύπου ζώα, *dct-1(tm376)*, *pink-1(tm1779)* και *pdr-1(gk448)* μεταλλάγματα (n=100, ***P<0.001; one-way ANOVA). (F) Τα επίπεδα του mtDNA παραμένουν σταθερά στα ζώα με κατασταλμένη μιτοφαγία (n=100, n.s. P>0.05; one-way ANOVA). (G) Ο γενετικός τόπος του *dct-1* γονιδίου. Το μετάλλαγμα *dct-1(tm376)* είναι ομόζυγο για την μεταλλαγή και φέρει ένα έλλειμμα 900bp στον υποκινητή του γονιδίου. (H, I) Διαγονιδιακά ζώα που υπερεκφράζουν το γονίδιο *dct-1* ή το γονίδιο *dct-1* με ελλείμματα για το μοτίβο WXXL, την πρωτεϊνική επικράτεια MER και BH3 επλώστηκαν

(Θ) στους 37°C (n=100, n.s. P>0.05, ***P<0.001; one-way ANOVA) και (Ι) παρουσία paraquat (n=100, n.s. P>0.05, ***P<0.001; one-way ANOVA). Το μοτίβο WXXL είναι απαραίτητο για την μιτοφαγία. (Κ, Λ) Ζώα αγρίου τύπου, *dct-1(tm376)*, *pink-1(tm1779)* και *pdr-1(gk448)*, τα οποία υπερεκφράζουν το διαγονίδιο p_{dct-1} DCT-1::GFP, επωάστηκαν (Κ) στους 37°C (n=100, ***P<0.001; one-way ANOVA) και (Λ) παρουσία paraquat (n=100, ***P<0.001; one-way ANOVA). Η υπερέκφραση του DCT-1 είναι αρκετή για να προάγει την αντοχή σε συνθήκες στρες. Η δράση των πρωτεϊνών PINK-1 και PDR-1 είναι απαραίτητη για την αντοχή στο στρες που προσδίδει η υπερέκφραση του DCT-1. Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M. (Μ, Ν, Ο) Η πρωτεΐνη DCT-1 ουβικιτινυλιώνεται με ένα μηχανισμό που απαιτεί την δράση της PINK-1 κινάσης μετά από οξειδωτικό στρες. Η ουβικιτινυλίωση πραγματοποιείται στο κατάλοιπο λυσίνη 26 (K26). Η τροποποίηση αυτή ανακαλύφθηκε με τη χρήση της φασματομετρίας μάζας (Mass spectrometry).

Οι μιτοχονδριακές βλάβες είναι γνωστό ότι επάγουν την συσσώρευση της μιτοχονδριακής κινάσης PINK1 στα μιτοχόνδρια. Στη συνέχεια, η PINK1 στρατολογεί την E3 λιγάση ουβικιτίνης Parkin, η οποία με τη σειρά της ουβικιτινυλιώνει μια πληθώρα πρωτεϊνών της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, σημαίνοντας με αυτό τον τρόπο τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια για να απομακρυνθούν μέσω της μιτοφαγίας. Δείξαμε ότι η πρωτεΐνη DCT-1 βρίσκεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και ουβικιτινυλιώνεται, μέσω ενός PINK-1-εξατρώμενου μηχανισμού, έπειτα από συνθήκες που επάγουν την μιτοφαγία (Εικόνα12 Μ-Ο). Επιπλέον, δείξαμε ότι η DCT-1 συνεντοπίζεται με την PDR-1, η οποία είναι ομόλογη της Parkin στον *C. elegans* (Εικόνα 13). Επομένως, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η PDR-1 είναι υπεύθυνη για την αυξημένη ουβικιτινυλίωση της DCT-1.

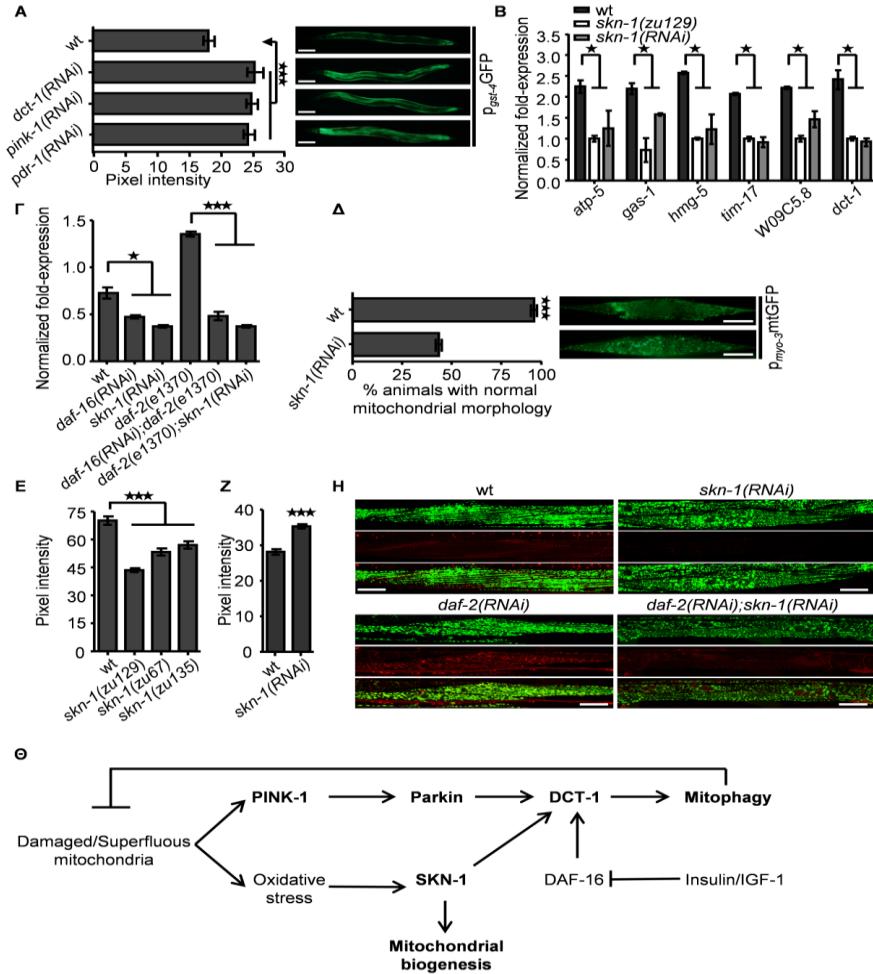


Εικόνα 13. Συνεντοπισμός του υποδοχέα της μιτοφαγίας DCT-1 με την E3 λιγάση ουβικιτίνης PDR-1 σε μυϊκά κύτταρα στον νηματώδη *C. elegans*. Οι πρωτεΐνες PDR-1 και DCT-1 συνεντοπίζονται στα διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν την πρωτεΐνη PDR-1::DsRed και την πρωτεΐνη DCT-1::GFP στους μύς του σώματος. Scale bar, 20μm.

V. Επαγωγή της ανάδρομης κυτταρικής σηματοδότησης έπειτα από καταστολή της μιτοφαγίας

Παρά τις προαναφερόμενες επιπτώσεις στην μιτοχονδριακή λειτουργία και στην κυτταρική ομοιόσταση λόγω της μειωμένης μιτοφαγίας, τα ζώα που φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια υπεύθυνα για την μιτοφαγία παρουσιάζουν κανονική διάρκεια ζωής απουσία ερεθισμάτων στρες (**Εικόνα 9B-Δ και Εικόνα 10A-Z**). Για να επιλύσουμε αυτό το προφανές παράδοξο, θεωρήσαμε ότι η συσσώρευση των δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων μετά την καταστολή της μιτοφαγίας σηματοδοτεί μια αντισταθμιστική ανάδρομη κυτταρική σηματοδότηση, η οποία επάγει την έκφραση πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν για μιτοχονδριακές πρωτεΐνες και για πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την αντιμετώπιση οξειδωτικών βλαβών.

Η συσσώρευση μη λειτουργικών μιτοχονδρίων προκαλεί οξειδωτικό στρες. Στα κύτταρα θηλαστικών, ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2/NFE2L2 ενεργοποιείται υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες και ενορχηστρώνει την έκφραση αρκετών γονιδίων προωθώντας την επιβίωση των κυττάρων (Ma, 2013; Yun and Finkel, 2014). Ο μεταγραφικός παράγοντας SKN-1, ο ομόλογος του Nrf2/NFE2L2 στον *C. elegans*, βρέθηκε πρόσφατα να συνδέεται με την μιτοχονδριακή πρωτεΐνη PGAM-5 που βρίσκεται στη εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Paek et al., 2012). Επιπλέον, η μεταγραφική δραστηριότητα του SKN-1 έχει ζωτική σημασία τόσο για την μακροζωία που οφείλεται στην δράση της μιτοχονδριακής όρμησης (mitohormesis) (Zarse et al., 2013; Schmeisser et al., 2013) όσο και για τη διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης (Ghose et al., 2013; Staab et al., 2014). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι ο SKN-1 ενεργοποιείται κατά την καταστολή της μιτοφαγίας (**Εικόνα 14A και Εικόνα 15A-Δ**). Επιπλέον, βρήκαμε ότι ο SKN-1 είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή αρκετών πυρηνικών γονιδίων η δράση των οποίων σχετίζεται με τη μιτοχονδριακή βιογένεση (**Εικόνα 14B και Εικόνα 15E**). Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι ο κύριος υποδοχέας της μιτοφαγίας, DCT-1, υπόκειται στον μεταγραφικό έλεγχο του SKN-1 (**Εικόνα 14Γ**). Έτσι λοιπόν, εκτός από τον DAF-16, η έκφραση του γονιδίου *dct-1* ελέγχεται επίσης και από τον SKN-1 (**Εικόνα 14Γ**). Σε αντίθεση με το *dct-1*, τα γονίδια *pink-1* και *pdr-1* δεν ρυθμίζονται μεταγραφικά ούτε από τον SKN-1 αλλά ούτε από τον DAF-16 (**Εικόνα 15Θ**). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι ο SKN-1 μπορεί να ελέγχει τη διαδικασία της μιτοφαγίας μέσω της μεταγραφικής ρύθμισης του DCT-1 υποδοχέα.

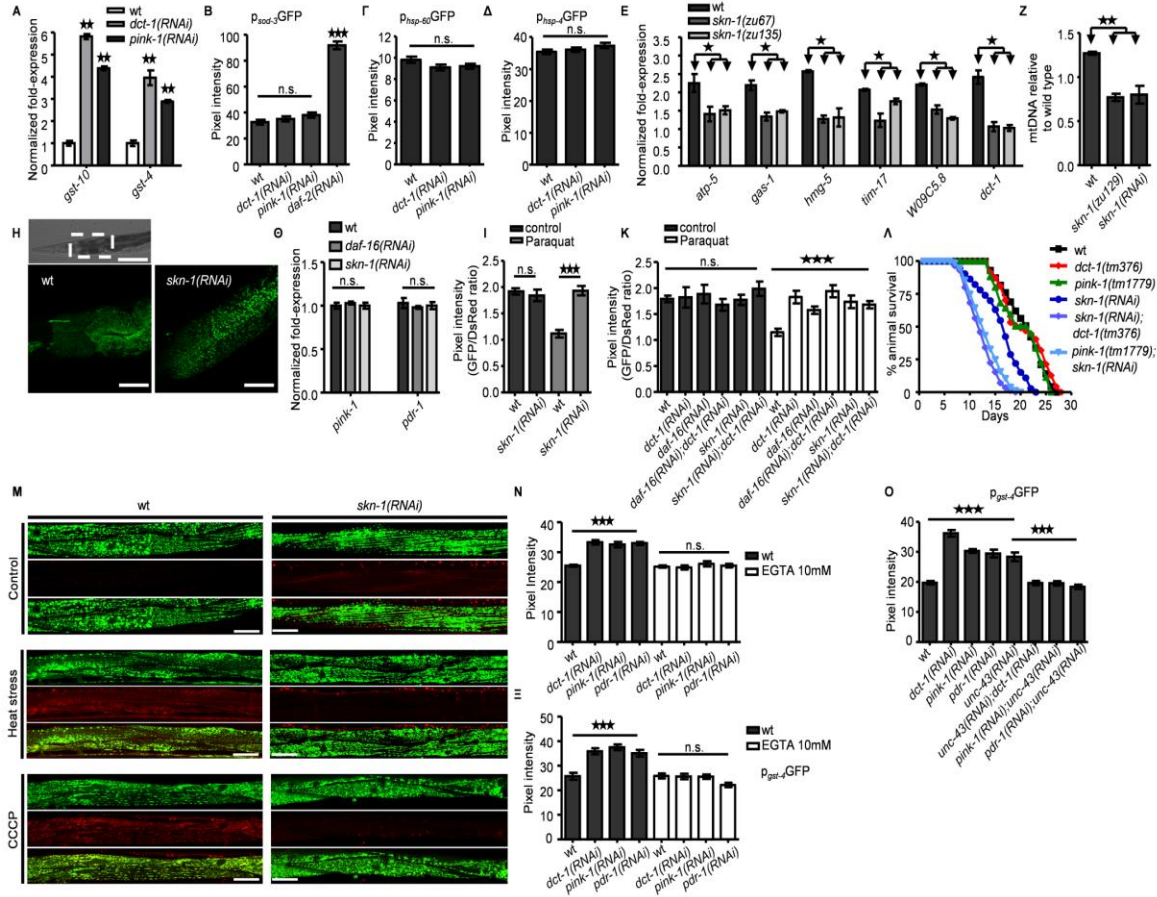


Εικόνα 14. Η καταστολή της μιτοφαγίας επάγει την ανάδρομη κυτταρική σηματοδότηση μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα SKN-1. **(Α)** Ζώα που εκφράζουν το διαγονίδιο *p_{gst-4}GFP* παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο έπειτα από την καταστολή των *dct-1*, *pink-1* και *pdr-1* γονιδίων (n=100; ***P<0.001; one-way ANOVA). Scale bar, 100µm. **(Β)** Τα επίπεδα mRNA των γονιδίων *atp-5*, *gas-1*, *hmg-5*, *tim-17*, *W09C5.8* και *dct-1* σε αγρίου τύπου ζώα και *skn-1(zu129)* μεταλλάγματα (*P<0.01; one-way ANOVA). **(Γ)** Τα επίπεδα mRNA του *dct-1* γονιδίου σε ζώα αγρίου τύπου, *daf-16(RNAi)*, *skn-1(RNAi)*, *daf-2(e1370)*, *daf-16(RNAi);daf-2(e1370)* και *daf-2(e1370);skn-1(RNAi)* (*P<0.01; one-way ANOVA). Η καταστολή της έκφρασης του *skn-1* γονιδίου προκαλεί **(Δ)** αποδιοργάνωση του μιτοχονδριακού δικτύου (n=120; ***P<0.001; unpaired t-test). Scale bar, 20µm, **(Ε)** αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης (n=100; ***P<0.01; one-way ANOVA), **(Ζ)** αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου (n=120; ***P<0.001; unpaired t-test) και **(Η)** καταστολή της μιτοφαγίας έπειτα από *daf-2(RNAi)*. Scale bar, 20µm. Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M. **(Θ)** Στην εικόνα απεικονίζεται η συμβολή του DCT-1 υποδοχέα της μιτοφαγίας και του μεταγραφικού παράγοντα SKN-1 στη διατήρηση της μιτοχονδριακής φυσιολογίας και κατά συνέπεια στην κυτταρική ομοιόσταση. Η πρωτεΐνη DCT-1 είναι ουσιαστικά ο μεσολαβητής της μιτοφαγίας και μεταγραφικά ρυθμίζεται τόσο από τον DAF-16 όσο και από τον SKN-1. Υπό κανονικές συνθήκες, τα βασικά επίπεδα μιτοφαγίας διατηρούν το μιτοχονδριακό πληθυσμό και ρυθμίζουν την μιτοχονδριακή μάζα, ανάλογα με την μεταβολική κατάσταση του κυττάρου. Η μιτοφαγία ενεργοποιείται κάτω από συνθήκες στρες για την εξάλειψη των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων και την προώθηση της κυτταρικής επιβίωσης. Η ενεργοποίηση του SKN-1 ενισχύει παράλληλα τη μιτοφαγία και προωθεί τη μιτοχονδριακή βιογένεση διεγείροντας την έκφραση της DCT-1 και αρκετών μιτοχονδριακών γονιδίων.

Πράγματι, σίγηση της έκφρασης του SKN-1 οδηγεί σε αποδιοργανωμένο μιτοχονδριακό δίκτυο, προκαλεί αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και αυξάνει τα επίπεδα κυτταροπλασματικού ασβεστίου (**Εικόνα 14Δ-Ζ και Εικόνα 15Η**), αποτελέσματα όμοια με την καταστολή της έκφρασης του DCT-1 υποδοχέα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ζώα που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *skn-1* παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα mtDNA, τονίζοντας περαιτέρω το

ρόλο του SKN-1 στη διατήρηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας και ομοιόστασης (**Εικόνα 15Z**). Επιπλέον, η επαγωγή της μιτοφαγίας από συνθήκες στρες μειώνεται δραματικά με την απουσία του SKN-1 (**Εικόνα 14H και Εικόνα 15I, M**). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η μεταγραφική δραστηριότητα του DAF-16 είναι απαραίτητη για τη διέγερση της μιτοφαγίας. Ταυτόχρονη καταστολή της έκφρασης είτε DAF-16 και DCT-1, είτε SKN-1 και DCT-1, δεν προκαλεί περαιτέρω μείωση των επιπέδων μιτοφαγίας (**Εικόνα 15K**), υποδεικνύοντας ότι DAF-16, SKN-1 και DCT-1 αποτελούν συστατικά ενός κοινού μοριακού μονοπατιού που ρυθμίζει τη μιτοφαγία.

Σίγηση της έκφρασης του *dct-1* ή *pink-1* μειώνει την διάρκεια ζωής των μεταλλαγμάτων του SKN-1 σε αντίθεση με τα άγριου τύπου ζώα (**Εικόνα 15A**), υποδεικνύοντας ότι ενεργοποίηση του SKN-1 αντισταθμίζει τη μειωμένη βασική μιτοφαγία και προστατεύει ενάντια στη συσσώρευση των δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων και του οξειδωτικού στρες ώστε τα ζώα αυτά να διατηρούν κανονική διάρκεια ζωής. Μεγαλώνοντας τα ζώα με μειωμένη μιτοφαγία παρουσία αντιοξειδωτικών, όπως το *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) και το butylated hydroxyanisole (BHA) (Schulz et al., 2007; Schmeisser et al., 2013), δεν επηρεάζει τη διάρκεια ζωής τους αποκλείοντας τη συμμετοχή της mitohormesis στη ανάδρομη κυτταρική σηματοδότηση (**Εικόνα 10 I, K**). Όταν όμως τα ζώα με μειωμένη μιτοφαγία μεγάλωσαν παρουσία ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), το οποίο είναι ένας χημικός παράγοντας που δεσμεύει τα ιόντα ασβεστίου, παρατηρείται μείωση στη διάρκεια ζωής τους ενώ δεν επηρεάζεται η διάρκεια ζωής των άγριου τύπου ζώων (**Εικόνα 10A**). Τα αυξημένα επίπεδα κυτταροπλασματικού ασβεστίου που παρατηρούνται στα ζώα με μειωμένη έκφραση των *dct-1*, *pink-1* και *pdr-1* γονιδίων, μειώνονται με την παρουσία EGTA (**Εικόνα 15N**). Επιπλέον, ο μεταγραφικός παράγοντας SKN-1 δεν ενεργοποιείται σε ζώα με κατεσταλμένη μιτοφαγία υπο την παρουσία EGTA (**Εικόνα 15E**).



Εικόνα 15. Ο μεταγραφικός παράγοντας SKN-1 ελέγχει τη μεταγραφή πυρηνικών γονιδίων που σχετίζονται με τη μιτοχondριακή λειτουργία και προάγει την διατήρηση της μιτοχondριακής ομοιότητας. (Α) Τα επίπεδα των γονιδίων στόχων του SKN-1, *gst-4* και *gst-10*, σε αγρίου τύπου, *ddt-1(RNAi)* και *pink-1(RNAi)* ζώα (* $P < 0.01$; one-way ANOVA). Ο μεταγραφικός παράγοντας DAF-16 **(Β)**, το μονοπάτι UPR^{mt} **(Γ)** και το μονοπάτι UPR^{ER} **(Δ)** δεν διεγείρονται σε συνθήκες κατεσταλμένης μιτοφαγίας (n=100, n.s. $P > 0.05$, *** $P < 0.001$; one-way ANOVA). **(Ε)** Τα επίπεδα mRNA των γονιδίων *atp-5*, *gas-1*, *hmg-5*, *tim-17*, *W09C5.8* και *ddt-1* σε αγρίου τύπου ζώα, *skn-1(zu67)* και *skn-1(zu135)* μεταλλάγματα (* $P < 0.01$; one-way ANOVA). **(Ζ)** Τα επίπεδα mtDNA είναι μειωμένα στα *skn-1(zu129)* και *skn-1(RNAi)* μεταλλάγματα (** $P < 0.01$; one-way ANOVA). **(Η)** Καταστολή της έκφρασης του *skn-1* σε διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν mtGFP στο έντερο προκαλεί κατακερματισμό του μιτοχondριακού δικτύου. Scale bar, 20μm. **(Θ)** Τα επίπεδα έκφρασης των *pink-1* και *pdr-1* γονιδίων σε *daf-16(RNAi)* και *skn-1(RNAi)* ζώα (n.s. $P > 0.05$; one-way ANOVA). **(Ι)** Η καταστολή της έκφρασης του *skn-1* μειώνει τη μιτοφαγία έπειτα από οξειδωτικό στρες (n=100; n.s. $P > 0.05$, *** $P < 0.001$; one-way ANOVA). **(Κ)** Ο DAF-16 απαιτείται για την επαγωγή της μιτοφαγίας σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Ταυτόχρονη σίγηση των *daf-16/ddt-1* ή *skn-1/ddt-1* δεν μειώνει περαιτέρω την μιτοφαγία έπειτα από οξειδωτικό στρες (n=100; n.s. $P > 0.05$, *** $P < 0.001$; one-way ANOVA). **(Λ)** Η δράση του SKN-1 αντισταθμίζει την αναστολή της μιτοφαγίας στα *ddt-1(tm376)* και *pink-1(tm1779)* μεταλλάγματα. Καμπύλες επιβίωσης έπειτα από ταυτόχρονη σίγηση του DCT-1 και SKN-1, ή PINK-1 και SKN-1. **(Μ)** Η δράση του SKN-1 απαιτείται για την επαγωγή της μιτοφαγίας κάτω από συνθήκες θερμικού και μιτοχondριακού στρες. Scale bar, 20μm. **(Ν)** Τα επίπεδα κυτταροπλασματικού ασβεστίου μειώνονται παρουσία EGTA. Τα επίπεδα κυτταροπλασματικού ασβεστίου μετρήθηκαν σε διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν τον βιοαισθητήρα καταγραφής συγκέντρωσης ασβεστίου, GCaMP2.0, έπειτα από καταστολή της μιτοφαγίας, παρουσία ή απουσία EGTA (n=100; n.s. $P > 0.05$, *** $P < 0.001$; one-way ANOVA). **(Ξ)** Η μεταγραφική δραστηριότητα του SKN-1 παρατηρήθηκε έπειτα από καταστολή της μιτοφαγίας, παρουσία ή απουσία EGTA (n=100; n.s. $P > 0.05$, *** $P < 0.001$; one-way ANOVA). **(Ο)** Η πρωτεϊνική κίνηση ασβεστίου UNC-43 απαιτείται για την επαγωγή της μεταγραφικής δραστηριότητας του SKN-1 έπειτα από καταστολή της μιτοφαγίας (n=100; *** $P < 0.001$; one-way ANOVA). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

Τα αυξημένα επίπεδα κυτταροπλασματικού ασβεστίου προωθούν τη μιτοχondριακή βιογένεση μέσω της ενεργοποίησης ενός μοριακού μονοπατιού που περιλαμβάνει την κίνηση

Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), τη p38 κινάση (mitogen activated protein kinase; MAPK), και τον συνενεργοποιητή PGC-1α (Wright et al., 2007; Ventura-Clapier et al., 2008). Παρατηρήσαμε ότι η δράση της κινάσης UNC-43, η οποία είναι η ομόλογη της CaMKII στον *C. elegans*, ρυθμίζει την μεταγραφική δραστηριότητα του SKN-1 κατόπιν καταστολής της μιτοφαγίας, όπου τα επίπεδα του κυτταροπλασματικού ασβεστίου είναι αυξημένα (**Εικόνα 150**).

Συμπερασματικά, οι παρατηρήσεις μας υποδηλώνουν ότι η κυτταροπλασματική αύξηση του ασβεστίου που προκύπτει κατά τη δυσλειτουργία της μιτοφαγίας επάγει την ενεργοποίηση του SKN-1, που προστατεύει τα κύτταρα από τις αρνητικές επιπτώσεις της μειωμένης βασικής μιτοφαγίας και οδηγεί στην επιβίωση και τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού.

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 (Green *et al.*, 2011).

Η απομάκρυνση κατεστραμμένων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών μέσω πρωτεολυτικών μηχανισμών, η αποκατάσταση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων από τα υγιή μέσω των μηχανισμών σχάσης/σύντηξης, η *de novo* δημιουργία νέων και υγιή μιτοχονδρίων μέσω της μιτοχονδριακής βιογένεσης και η απομάκρυνση των μιτοχονδρίων που έχουν υποστεί σοβαρές βλάβες μέσω της διαδικασίας της μιτοφαγίας αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου των μιτοχονδρίων, οι οποίοι λαμβάνουν χώρα για να διατηρήσουν την κυτταρική ομοιόσταση (Palikaras and Tavernarakis, 2014).

Η υπερβολική συσσώρευση μιτοχονδρίων παρατηρείται σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως νευροεκφυλιστικές ασθένειες (π.χ. νόσος του Αλτσχάιμερ, νόσος του Πάρκινσον, νόσος του Χάντινγκτον) και στη γήρανση (Artal-Sanz and Tavernarakis, 2009; Fan *et al.*, 2008; Kaerbelein, 2010; Malpass, 2013; Palikaras *et al.*, 2015; Preston *et al.*, 2008; Vafai and Mootha, 2012). Ωστόσο, ο λόγος πίσω από αυτό το φαινόμενο παραμένει άγνωστος. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή βρήκαμε ότι η φθίνουσα αποτελεσματικότητα της μιτοφαγίας κατά τη διάρκεια της γήρανσης προκαλεί την προοδευτική συσσώρευση των μιτοχονδρίων. Αναστολή είτε του γενικού μηχανισμού της αυτοφαγίας ή της μιτοφαγίας *per se* σε νεαρά άτομα έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη μιτοχονδριακή μάζα προσομοιάζοντας την επίδραση της γήρανσης. Επιπλέον, δείξαμε για πρώτη φορά ότι η μιτοφαγία επάγεται ιδιαίτερα υπό συνθήκες χαμηλής ινσουλίνης και αυτό έχει ευεργετική επίδραση στην αύξηση του προσδόκιμου της ζωής. Επίσης, η κατάργηση της μιτοφαγίας μειώνει τη μακροζωία που προέρχεται από μέτρια λειτουργία των μιτοχονδρίων ή τον περιορισμό των θερμιδών. Εκτός από τις επιπτώσεις της μιτοφαγίας στη μακροζωία, η επαγωγή της μιτοφαγίας προσδίδει αντοχή σε διάφορες συνθήκες καταπόνησης του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων της πείνας, του γονοτοξικού, του μιτοχονδριακού και του οξειδωτικού στρες.

Συντήρηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας απαιτεί τόσο την εκκαθάριση των δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων όσο και την παραγωγή νέων και υγιή. Στοιχεία πρόσφατων μελετών υποδεικνύουν ότι ο συντονισμός μεταξύ των διαδικασιών της μιτοχονδριακής βιογένεσης και της μιτοφαγίας υπαγορεύει τη διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης. Παρ' όλα αυτά ο μηχανισμός που διέπει τον συντονισμό των δύο κυτταρικών διαδικασιών παραμένει άγνωστος. Αρκετά μόρια, συμπεριλαμβανομένων ενζύμων, συνενεργοποιητών και μεταγραφικών παραγόντων, θα μπορούσαν να αποτελούν πιθανοί υποψήφιοι για τη συμμετοχή τους στην ενορχήστρωση του συντονισμού της μιτοχονδριακής βιογένεσης και της μιτοφαγίας.

Οι σιρτουΐνες, οι οποίες λειτουργούν ως απακετυλάσες, ρυθμίζουν το μεταβολισμό του

κυττάρου και τη μακροζωία. Έχει αποδειχθεί ότι κατά τη διάρκεια περιορισμού των θερμιδών, η SIRT1 αποακετυλιώνει τον συνενεργοποιητή PGC-1α για να επάγει την έκφραση γονιδίων που προωθούν τη μιτοχονδριακή βιογένεση σε σκελετικούς μυς (Gerhart-Hines et al. 2007). Επιπλέον, η ενεργοποίηση της SIRT1 επάγει την αυτοφαγία, ενώ έλλειμμα του γονιδίου σε ορισμένους ιστούς προκαλεί συσσώρευση δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων. Έχει προταθεί ότι η SIRT1 στοχεύει συστατικά του μηχανισμού της αυτοφαγίας, προκειμένου να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της αυτοφαγίας (Lee et al., 2008). Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός ρύθμισης της αυτοφαγίας από τις σιρτουΐνες παραμένει ανεξιχνίαστος. Η AMPK, η οποία ενεργοποιείται σε απαιτήσεις υψηλής ενέργειας, εμπλέκεται επίσης στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής βιογένεσης μέσω της ενεργοποίησης του PGC-1α (Hardie, 2007; Jager, et al., 2007; Birkenfeld et al. 2011). Παράλληλα, απώλεια της AMPK και της ULK1, μιας κινάσης που απαιτείται για την έναρξη της αυτοφαγίας και αποτελεί στόχο της AMPK, οδηγεί σε συσσώρευση της p62 πρωτεΐνης και μειωμένη αποτελεσματικότητα της μιτοφαγίας κατά τη διάρκεια πείνας (Edgan et al., 2011).

Άλλες μελέτες αποκάλυψαν επίσης ότι η πρωτεΐνη p53, η οποία αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της αντίδραση στο γονοτοξικό στρες, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της μεταβολικής ομοιόστασης. Ο τύπος δράσης της p53 είναι τόσο ο πυρήνας του κυττάρου όσο και τα μιτοχόνδρια, με αποτέλεσμα να μπορεί να επηρεάσει τη φυσιολογία των μιτοχονδρίων με ένα μηχανισμό εξαρτώμενο ή ανεξάρτητο της μεταγραφικής της δραστηριότητας. Η επαγωγή της μιτοχονδριακής βιογένεσης και η ρύθμιση της αυτοφαγίας είναι μερικοί από τους τρόπους που η p53 μπορεί να επηρεάζει την λειτουργία των μιτοχονδρίων (Sahin & DePinho, 2012; Hoshino et al., 2014). Τέλος, η Parkin, η E3 λιγάσης ουβικουΐτινης που είναι υπεύθυνη για τη σήμανση και την απομάκρυνση των δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων μέσω της μιτοφαγίας, συμμετέχει επίσης στη διατήρηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας και βιογένεσης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της σύνδεσής της με τον μιτοχονδριακό μεταγραφικό παράγοντα TFAM, το mtDNA και την PARIS, η οποία είναι μια πρωτεΐνη που αναστέλει τη μεταγραφική ικανότητα του PGC-1α (Kuroda et al., 2006; Rothfuss et al. 2009; Shin et al. 2011).

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αποκαλύπτουν ένα βασικό ρυθμιστικό μηχανισμό που συντονίζει τις διαδικασίες της μιτοχονδριακής βιογένεσης και της μιτοφαγίας ώστε να διατηρείται η ομοιόσταση του μεταβολισμού στο *Caenorhabditis elegans*. Ο μεταγραφικός παράγοντας SKN-1, το ομόλογο του Nrf2/NFE2L2 στα θηλαστικά, βρίσκεται στην καρδιά αυτού του μηχανισμού. Ομοίως με τον ομόλόγο του, ο SKN-1 ενεργοποιείται από το οξειδωτικό στρες λόγω αυξημένης μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και οδηγεί στην έκφραση αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με την μιτοχονδριακή βιογένεση. Είναι ήδη γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι η μεταγραφική δραστηριότητα του SKN-1 είναι απαραίτητη για την επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής, η οποία εξαρτάται από την ενεργοποίηση του μηχανισμού της mitochormesis, και εμπλέκεται στην διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης (Zarse et al., 2012; Schmeisser et al., 2013; Ghose et al., 2013; Staab et al., 2014; Weimer et al. 2014). Αξίζει να σημειωθεί ότι, το γονίδιο *dct-1* που κωδικοποιεί τον κύριο υποδοχέα της μιτοφαγίας είναι μεταξύ των στόχων του SKN-1. Η πρωτεΐνη DCT-1 είναι ομόλογη του BNIP3 και BNIP3L/NIX των θηλαστικών και αποτελεί μεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Επιπλέον, η DCT-1 προάγει τη μιτοφαγία μέσω της αλληλεπίδρασής της με την αυτοφαγισωμική πρωτεΐνη LGG-1, το ομόλογο της LC3 των θηλαστικών στο *C. elegans*. Έχει παρατηρηθεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2/NFE2L2 βρίσκεται στα μιτοχόνδρια μέσω της αλληλεπίδρασής του με τις πρωτεΐνες Keap1 και PGAM5 (Lo & Hannink, 2008). Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι και ο SKN-1 αλληλεπιδρά επίσης με την εξωτερική μιτοχονδριακή πρωτεΐνη PGAM-5 (Paek et al. 2012).

Διακυμάνσεις στη κυτταροπλασματική συγκέντρωση του ασβεστίου ενεργοποιούν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια που είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν την μιτοχονδριακή βιογένεση μέσω της CaMKII κινάσης ασβεστίου, της p38 MAPK κινάσης και της ενεργοποίησης του PGC-

1α (Wright, 2007; Wu et al., 2002). Παρά το γεγονός ότι, ο PGC-1α δεν υπάρχει στους νηματώδεις, βρήκαμε ότι η μεταγραφική δραστηριότητα του SKN-1 εξαρτάται από αυξημένα κυτταροπλασματικά επίπεδα ασβεστίου και τη λειτουργία της πρωτεΐνης UNC-43, η οποία είναι ομόλογη της CaMKII των θηλαστικών, κατόπιν καταστολής της μιτοφαγίας.



Εικόνα 16. Διατήρηση της μεταβολικής ομοιόστασης μέσω του συντονισμού των διαδικασιών της μιτοχονδριακής βιογένεσης και της μιτοφαγίας. Η στενή επικοινωνία μεταξύ της μιτοχονδριακής βιογένεσης και της μιτοφαγίας οδηγεί στην απομάκρυνση των δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων και ταυτόχρονα στη βιοσύνθεση νέων οργανιδίων. Η διασφάλιση του ενεργειακού μεταβολισμού επιβάλλει τον συντονισμό αυτών των δύο διαδικασιών με αποτέλεσμα την επιβίωση των κυττάρων και αντοχή σε συνθήκες έντονου στρες. Διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ της βιογένεσης των μιτοχονδρίων και της μιτοφαγίας οδηγεί σε επιδείνωση της κυτταρικής λειτουργίας και τελικά σε κυτταρικό θάνατο.

Συνολικά, η παρούσα μελέτη αποκαλύπτει ένα βασικό ρυθμιστικό μηχανισμό που συντονίζει τη μιτοχονδριακή βιογένεση με την εκκαθάριση των κατεστραμμένων ή γηρασμένων μιτοχονδρίων μέσω της μιτοφαγίας ώστε να διατηρηθεί η μεταβολική ομοιόσταση στον *C. elegans*. Ένα κεντρικός κόμβος του μονοπατιού είναι ο υποδοχέας της μιτοφαγίας DCT-1/NIX, που ενσωματώνει διάφορα σήματα σε συνθήκες στρες μέσω των μεταγραφικών παραγόντων DAF-16 και SKN-1 για να ελέγξει τη διαδικασία της μιτοφαγίας και της βιογένεσης των μιτοχονδρίων (**Εικόνα 14Θ**). Η συσσώρευση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων προκαλεί οξειδωτικό στρες, οδηγώντας στην έναρξη μιας διμερούς ανάδρομης κυτταρικής σηματοδότησης που διαμεσολαβείται από τον SKN-1 και περιλαμβάνει την συντονισμένη επαγωγή γονιδίων που ρυθμίζουν τόσο τη μιτοχονδριακή βιογένεση όσο και τη μιτοφαγία. Ο συντονισμός των δύο αυτών διαδικασιών διατηρεί την εύρυθμη μιτοχονδριακή λειτουργία, απομακρύνοντας τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια και δημιουργώντας νέα και υγιή (**Εικόνα 14Θ**). Επίσης, είναι σημαντικό ότι η μείωση των επιπέδων μιτοφαγίας κατά την γήρανση οδηγεί σε προοδευτική συσσώρευση, κυρίως μη λειτουργικών μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα τόσο τη μη απομάκρυνση των κατεστραμμένων όσο και την εξασθένηση της δημιουργίας νέων μιτοχονδρίων. Κάτι τέτοιο οδηγεί τελικά σε ελάττωση του προσδόκιμου επιβίωσης. Αντίθετα, ενίσχυση της ανακύκλωσης των μιτοχονδρίων έχει ως αποτέλεσμα τη θωράκιση της ομοιόστασης των κυττάρων, την ανθεκτικότητα στο στρες και την σημαντική αύξηση της διάρκειας ζωής του οργανισμού (**Εικόνα 16**). Επειδή οι ρυθμιστικοί παράγοντες που συμμετέχουν και συντονίζουν αυτό το μοριακό μονοπάτι είναι εξελικτικά συντηρημένοι, ενδέχεται ο συντονισμός των δύο κυτταρικών διαδικασιών να πραγματοποιείται και σε άλλους οργανισμούς με παρόμοιο τρόπο ώστε να διατηρείται η εύρυθμη μιτοχονδριακή λειτουργία και η κυτταρική και ομοιόσταση.

Βιβλιογραφία

- (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018.
- Aerbajinai, W. et al (2003) The proapoptotic factor Nix is coexpressed with Bcl-xL during terminal erythroid differentiation. *Blood* 102, 712–717.
- Artal-Sanz, M., Tavernarakis, N. (2009) Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in *C. elegans*. *Nature* 461, 793-7.
- 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.
- Bakkar, N. et al (2012) IKKalpha and alternative NF-kappaB regulate PGC-1beta to promote oxidative muscle metabolism. *J Cell Biol* 196, 497-511.
- 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.
- Blattler, S. M. et al (2012) Yin Yang 1 deficiency in skeletal muscle protects against rapamycin-induced diabetic-like symptoms through activation of insulin/IGF signaling. *Cell Metab* 15, 505-17.
- Blumenthal, T. et al (2002) A global analysis of *Caenorhabditis elegans* operons. *Nature* 417, 851-854.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Birkenfeld, A. L. et al (2011) Deletion of the mammalian INDY homolog mimics aspects of dietary restriction and protects against adiposity and insulin resistance in mice. *Cell Metab* 14, 184-95
- Boulton, S. J. et al (2002) Combined functional genomic maps of the *C. elegans* DNA damage response. *Science* 295, 127-131.
- Burchell, V. S. et al (2013) The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. *Nat Neurosci* 16, 1257-65.
- Calvo, S. E., Mootha, V. K. (2010) The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11, 25-44.
- Canto, C. et al (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056-60

- Cardenas, C., Foskett, J. K. (2011) Mitochondrial Ca(2+) signals in autophagy. *Cell Calcium* 52, 44-51.
- Chan, N. C. et al (2011) Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet* 20, 1726-1737.
- Chen, Y., Dorn II, G.W. (2013) PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science* 340, 471-475.
- Christensen, M. et al (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. et al (2000) The *C. elegans* orthologue ceBNIP3 interacts with CED-9 and CED-3 but kills through a BH3- and caspase-independent mechanism. *Oncogene* 19, 5453-63.
- Clark, I. E. et al (2006) *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with *parkin*. *Nature* 441, 1162-1166.
- Coulson, A. et al (1988) Genome linking with yeast artificial chromosomes. *Nature* 335, 184-186.
- Cunningham, J. T. et al (2007) mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450, 736-40.
- 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.
- Decuyper, J. P., Bultynck, G., Parys, J. B. (2011) A dual role for Ca(2+) in autophagy regulation. *Cell Calcium* 50, 242-50.
- Deng, H. et al (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.
- Dominy, J. E., Puigserver, P. (2013) Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Egan, D. F. et al (2011) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456-61.
- Eisenberg-Lerner, A., Kimchi, A. (2012) PKD is a kinase of Vps34 that mediates ROS-induced autophagy downstream of DAPk. *Cell Death Differ* 19, 788-97.
- Exner, N. et al (2012) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J* 31, 3038-62.
- Fan, W. et al. (2008) A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against

- severe mtDNA mutations. *Science* 319, 958–962.
- Fire, A. et al (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.
- Gerbeth, C. et al (2013) Glucose-induced regulation of protein import receptor Tom22 by cytosolic and mitochondria-bound kinases. *Cell Metab* 18, 578 –587.
- Ghose, P. et al (2013) Anoxia-reoxygenation regulates mitochondrial dynamics through the hypoxia response pathway, SKN-1/Nrf, and stomatin-like protein STL-1/SLP-2. *PLoS genetics* 9, e1004063.
- Gleyzer, N., Vercauteren, K., Scarpulla, R. C. (2005) Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol* 25, 1354-66.
- 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. et al (1997). Genetically targeted cell disruption in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 13128-13133.
- Hardie, D. G. (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 774-85.
- 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. et al (2008) An RNAi screen for mitochondrial proteins required to maintain the morphology of the organelle in *Caenorhabditis elegans*. *J Biochem.* 143, 449-54.
- Jager, S. et al (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 12017-22.
- Jaggi, M. et al (2007) Protein kinase D1: a protein of emerging translational interest. *Front Biosci* 12, 3757-67.
- Jentsch, S., and Ulrich, H. D. (1998) Protein breakdown. Ubiquitous deja vu. *Nature* 395, 321, 323.
- Kaeberlein, M. (2010) Lessons on longevity from budding yeast. *Nature* 464, 513-519.
- Kamath, R. S. et al (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421, 231-237.

- Kanki, T. et al (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, J. et al (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13, 132–41.
- Kim, S. K. et al (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.
- Kuroda, Y. et al (2006) Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Hum Mol Genet* 15, 883–95.
- Larsen, K. E., and Sulzer, D. (2002) Autophagy in neurons: a review. *Histol Histopathol* 17, 897–908.
- Lazarou, M. et al (2012) Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev Cell* 22, 320–333.
- 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. et al (2003) DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. *Science* 300, 644–647.
- Lee S. S. et al (2003) A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C.*

elegans longevity. *Nat Genet* 33, 40-8.

Lee, J. Y. et al (2010) Disease causing mutations in Parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J. Cell Biol.* 189, 671–679.

Lehner, B. et al (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. et al (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.

Lo, S. C. & Hannink, M. (2008) PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria. *Exp Cell Research* 314, 1789-803.

Ma, Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology* 53, 401-426 (2013).

Maeda, I. et al (2001) Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol* 11, 171-176.

Manji, H. et al (2012) Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 13, 293-307.

Malpass, K. (2013) Neurodegenerative disease: Defective mitochondrial dynamics in the hot seat—a therapeutic target common to many neurological disorders? *Nat Rev Neurol* 9, 417.

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

Martinez-Vicente, M. et al (2010) Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci* 13, 567-76.

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. et al (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. et al (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. et al (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. *et al.* (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424, 277–283.
- Murphy MP. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1–13.
- 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. *et al.* (2010) p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* 6, 1090–1106.
- Narendra, D. *et al.* (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. *et al.* (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.
- Paek, J. *et al.* (2012) Mitochondrial SKN-1/Nrf mediates a conserved starvation response. *Cell metabolism* 16, 526–537.
- Palikaras K. *et al.* (2015) Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature*
- Palikaras K. and Tavernarakis N. (2014) Mitochondrial homeostasis: The interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Experimental Gerontology*, 56: 182–188.
- Palikaras, K., Tavernarakis, N. (2012) Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Front Genet* 3, 297.
- 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. et al (2010) The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PLoS ONE* 5, e10054.

Preston, C. C. et al (2008) Aging-induced alterations in gene transcripts and functional activity of mitochondrial oxidative phosphorylation complexes in the heart. *Mech Ageing Dev* 129, 304–312.

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.

Rolland, S.G. (2014). How to analyze mitochondrial morphology in healthy cells and apoptotic cells in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Enzymol* 544. 75-98.

Rothfuss, O. et al (2009) Parkin protects mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair. *Hum Mol Genet* 18, 3832-50.

Rosado, C. J. et al (2008) Rosella: a fluorescent pH-biosensor for reporting vacuolar turnover of cytosol and organelles in yeast. *Autophagy* 4, 205-213.

Mijaljica, D., Prescott, M. & Devenish, R. J. (2011) A fluorescence microscopy assay for monitoring mitophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of visualized experiments : JoVE*.

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

Scarpulla, R. C. (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* 88, 611-38.

Schmeisser, K. et al (2013) Role of sirtuins in lifespan regulation is linked to methylation of nicotinamide. *Nat Chem Biol* 9, 693.

Schmeisser, S. et al (2013) Mitochondrial hormesis links low-dose arsenite exposure to lifespan extension. *Aging Cell* 12, 508-517.

Schmidt, O. et al (2011) Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases. *Cell* 144, 227–239

Schulz, T. J. et al (2007) Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell metabolism* 6, 280-293.

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.

- Shin, J. H. et al (2011) PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell* 144, 689-702.
- Simmer, F. et al (2003) Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. *PLoS Biol* 1, E12.
- Srivastava, S. et al (2009) PGC-1alpha/beta induced expression partially compensates for respiratory chain defects in cells from patients with mitochondrial disorders. *Hum Mol Genet* 18, 1805-12.
- Staab, T. A. et al (2014) Regulation of synaptic nlg-1/neuroigin abundance by the skn-1/Nrf stress response pathway protects against oxidative stress. *PLoS genetics* 10, e1004100.
- Storz, P., Doppler, H., Toker, A. (2004) Protein kinase Cdelta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling. *Mol Cell Biol* 24, 2614-26.
- Storz, P., Doppler, H., Toker, A. (2005) Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell Biol* 25, 8520-30.
- Suen, D. F. et al (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. et al (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100, 64-119.
- Tal, R. et al (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. et al (2000) Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat Genet* 24, 180-183.
- Thomas, R. L., Gustafsson, A. B. (2013) Mitochondrial autophagy. *Circ J* 77, 2449-54.
- 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. et al (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. et al (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.

- Ventura-Clapier, R., Garnier, A. & Veksler, V (2008) Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovascular research* 79, 208-217.
- Viscomi, C. et al (2011) In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1alpha axis. *Cell Metab* 14, 80-90.
- Vives-Bauza, C. et al (2010) PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 378–383.
- Xie, Z. and D.J. Klionsky (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* 9, 1102-1109.
- Yang, J.Y., Yang, W.Y. (2013) Bit-by-bit autophagic removal of parkin-labelled mitochondria. *Nat Commun* 4, 2428
- 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.
- Yoshii, S. R. et al (2011) Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *The Journal of biological chemistry* 286, 19630-19640.
- Youle R. J., Narendra D. P. (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12, 9-14.
- Yun, J. & Finkel, T. (2014) Mitohormesis. *Cell metabolism* 19, 757-766.
- Waldron, R. T., Rozengurt, E. (2000) Oxidative stress induces protein kinase D activation in intact cells. Involvement of Src and dependence on protein kinase C. *J Biol Chem* 275, 17114-21.
- Walhout, A. J. et al (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 USA* 92, 10836-10840.
- Weimer, S. et al (2014) D-Glucosamine supplementation extends life span of nematodes and of ageing mice. *Nature communications* 5, 3563.
- Westermann, D. (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 872–884.
- White, J. G. et al (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. et al (2001) Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density

polymorphism map. *Nat Genet* 28, 160 -164.

Wright, D. C. et al (2007) Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 282, 18793-9.

Wu, H. et al (2002) Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296, 349-52.

Zarse, K. et al (2012) Impaired Insulin/IGF1 Signaling Extends Life Span by Promoting Mitochondrial L-Proline Catabolism to Induce a Transient ROS Signal. *Cell metabolism* 15, 451-465.

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

Zhu, J., Wang, K. Z., Chu, C. T. (2013) After the banquet: Mitochondrial biogenesis, mitophagy and cell survival. *Autophagy* 9.

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.