

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**“Μοριακοί μηχανισμοί μνήμης και μάθησης στον οργανισμό *Caenorhabditis elegans*: Ο ρόλος του καναλιού ASIC-1”**

**Βόγγλης Ιωάννης**

Νοέμβριος 2007

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Νηματωδών του Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας υπό την επίβλεψη του ερευνητή Νεκτάριου Ταβερναράκη στα πλαίσια του διατμηματικού προγράμματος «Μοριακής Βιολογίας και Βιοϊατρικής» .

#### Συμβουλευτική Επιτροπή

**Δ. Καρδάσης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

**Κ. Λούης**, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

**Ν. Ταβερναράκης**, Ερευνητής Β' (IMBB)

#### Εξεταστική Επιτροπή

**Χ. Δελιδάκης**, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

**Δ. Καρδάσης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

**Κ. Λούης**, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

**Α. Οικονόμου**, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

**Ι. Παπαματθαϊάκης**, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

**Χ. Σαββάκης**, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

**Ν. Ταβερναράκης**, Ερευνητής Β' (IMBB)

**Στη Λυδία...**

ἔστι μὲν οὖν ἡ μνήμη οὔτε αἴσθησις οὔτε ὑπόληψις, ἀλλὰ τούτων τινὸς ἕξις ἢ πάθος, ὅταν γένηται χρόνος. τοῦ δὲ νῦν ἐν τῷ νῦν οὐκ ἔστι μνήμη, καθάπερ εἴρηται [καὶ πρότερον], ἀλλὰ τοῦ μὲν παρόντος αἴσθησις, τοῦ δὲ μέλλοντος ἐλπίς, τοῦ δὲ γενομένου μνήμη· διὸ μετὰ χρόνου πᾶσα μνήμη. ὥσθ' ὅσα χρόνου αἰσθάνεται, ταῦτα μόνα τῶν ζώων μνημονεύει, καὶ τούτῳ ᾧ αἰσθάνεται.

Ἡ μνήμη λοιπὸν δὲν εἶναι αἴσθησις οὔτε (συλληπτική) νόησις, ἀλλὰ ἕξις (κατοχή) ἢ πάθος τι τῶν δυνάμεων τούτων, ὅταν παρέλθῃ χρόνος. Μνήμη ὅμως τοῦ παρόντος πράγματος ἐν τῷ παρόντι χρόνῳ δὲν ὑπάρχει, ὡς εἴπομεν, ἀλλ' ὑπάρχει αἴσθησις τοῦ παρόντος, ἐλπίς τοῦ μέλλοντος, καὶ μνήμη τοῦ παρελθόντος. Διότι πᾶσα μνήμη συνοδεύεται ἀπὸ (τῆς ἀντιλήψεως) τοῦ χρόνου. Ὡστε ὅσα ζῶα ἔχουσι τὴν ἀντίληψιν τοῦ χρόνου, ταῦτα μόνα ἔχουσι μνήμην, ἐνθυμοῦνται δὲ διὰ τῆς δυνάμεως, δι' ἧς ἀντιλαμβάνονται τὸν χρόνον.

*Περὶ μνήμης καὶ ἀναμνήσεως*

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ, 384-322 π.Χ.

## Ευχαριστίες

Φτάνοντας στο σημείο αυτό, ίσως το δυσκολότερο του ταξιδιού, είθισται να αναφέρονται οι σημαντικότεροι άνθρωποι που βοήθησαν στην ολοκλήρωσή του και γι' αυτό χρειάζεται κανείς να ανασύρει από τη μνήμη του πράγματα, καταστάσεις και τελικά πρόσωπα. Όσο κι αν πιστεύω ότι τα λόγια είναι περιττά νιώθω την ανάγκη να γράψω τα παρακάτω ίσως διότι δυσκολεύομαι να τα εκφράσω διαφορετικά.

Ευχαριστώ,

Την οικογένειά μου, την αδελφή μου Σωσώ και τους γονείς μου. Οι γονείς μου είναι σίγουρα οι άνθρωποι που μου συμπαραστάθηκαν και συνεχίζουν να το κάνουν, οι άνθρωποι τους οποίους αγαπώ και μαζί εκτιμώ. Τους ευχαριστώ γιατί όλα μου τα είπαν μέσα από το δικό τους παράδειγμα, το δικό τους τρόπο να αντιμετωπίζουν την ζωή.

Τη Λυδία, τον άνθρωπο με τον οποίο έχω αρχίσει και σκοπεύω να συνεχίσω ένα άλλο ταξίδι, αυτό της ζωής. Την ευχαριστώ που μοιράζεται μαζί μου τη δική της ζωή και για όλα αυτά που ξέρει και ξέρω ότι έχουμε ζήσει τα χρόνια που πέρασαν.

Το φίλο και συνοδοιπόρο Δημήτρη, τον άνθρωπο που μου κράτησε συντροφιά όλα αυτά τα χρόνια και που με έκανε να πιστέψω ότι υπάρχουν ακόμα άνθρωποι.

Τους φίλους Θανάση, Γιάννη, Ειρήνη, Καλλιόπη, Θωμά, Φίλιππο, Θάνο, Παντελή, Ψηλό και Bill.

Τους ανθρώπους του εργαστηρίου, Αγγέλα (για την υπομονή αλλά και την ευχάριστη νότα της στο εργαστήριο), Χρύσα, Δάφνη, Κωστούλα, Μάρτα, Μουντού, Μαρκέλα, Πόπη, Νίκο και το Μάνο για όλες τις στιγμές που περάσαμε μαζί δουλεύοντας και καμιά φορά χαζεύοντας, αλλά και όλα τα παιδιά που πέρασαν από το εργαστήριο όλα αυτά τα χρόνια.

Τους ανθρώπους του ινστιτούτου κυρίες Κατερίνα και Στέλλα αλλά και τον Αλέκο για την πολύτιμη βοήθειά του στο confocal.

Τους ανθρώπους του Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής και Laser (IESL), από το εργαστήριο του κ. Φωτάκη, Γιώργο, Χρήστο και Εμίλιο και από το εργαστήριο του κ. Ripoll.

Τον άνθρωπο που ήταν ο πρώτος μου δάσκαλος στον πάγκο, το φίλο Γιάννη Παπανικολάου αλλά και τη Δέσποινα Αλεξανδράκη για τις πολύτιμες συζητήσεις μας.

Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Κίτσο Λούη και Δημήτρη Καρδάση για την πολύτιμη βοήθειά τους και σχόλια και τα μέλη της επταμελούς επιτροπής Σήφη Παπαματθαϊάκη, Τάσο Οικονόμου, Χρήστο Δελιδάκη και Χαράλαμπο Σαββάκη.

Το δάσκαλό μου Νεκτάριο Ταβερναράκη ή αλλιώς Νέκ. Θέλω καταρχήν να τον ευχαριστήσω για την τιμή που μου έκανε δίνοντάς μου την ευκαιρία να συνεργαστούμε. Ο Νεκτάριος ήταν σίγουρα για μένα ΔΑΣΚΑΛΟΣ. Υπήρξε πρότυπο επιστημονικό καθώς μου έδωσε τα ερεθίσματα, την έμπνευση αλλά και την ελευθερία να πειραματιστώ. Μέσα από τις ατελείωτες συζητήσεις μας, ξεδιάλυσε τα πράγματα στο μυαλό μου και μου δίδαξε τον τρόπο να δουλεύω. Αν και ίσως ακούγεται οξύμωρο, τον ευχαριστώ κυρίως για τις φορές που έκανε τα πράγματα δύσκολα για μένα. Μέσα από αυτές τις καταστάσεις με έκανε να αντιληφθώ την πραγματική διάσταση των πραγμάτων και πάνω απ' όλα να αλλάξω, θέλω να πιστεύω προς το καλύτερο...

Περιεχόμενα

## Περιεχόμενα

<u>Γενικά</u> .....	10
<u>Περίληψη</u> .....	14
<u>Summary</u> .....	16

### Κεφάλαιο 1

#### Εισαγωγή

1. Μνήμη και μάθηση: παραδείγματα και μορφές του φαινομένου.....	19
1.1. Κυτταρική και μοριακή βάση του φαινομένου: Η σύναψη του Hebb και το φαινόμενο του LTP.....	21
1.2. Ο ρόλος της ντοπαμίνης στην πλαστικότητα του νευρικού συστήματος.....	24
1.3. Τα κανάλια ASIC: Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά.....	25
1.3.1. ρόλος των ASICs στο περιφερικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών.....	28
1.3.2. Ο ρόλος των ASICs στο κεντρικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών.....	29
2. Μελέτη της μνήμης και της μάθησης στον οργανισμό <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	31
2.1. Η βιολογική “πλατφόρμα” <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	32
2.2. Degenerins: μέλη της υπεροικογένειας των DEG/EnaCs στον <i>C. elegans</i> .....	35
2.3. Το σύστημα ντοπαμίνης στο νηματώδη <i>C. elegans</i>	
2.3.1. Νευρωνικό δίκτυο.....	36
2.3.2. Βιοσύνθεση και σηματοδότηση.....	37
2.3.3. Ο ρόλος της ντοπαμίνης στη συμπεριφορά του <i>C. elegans</i> .....	40
2.4. Παραδείγματα μνήμης και μάθησης στον <i>C. elegans</i> .....	42
2.4.1. Μη εξαρτημένη μάθηση (non associative learning).....	43
2.4.2. Εξαρτημένη μάθηση (associative learning).....	45

## Κεφάλαιο 2

<u>Στόχοι</u> .....	53
---------------------	----

### Αποτελέσματα

1. Η πρωτεΐνη ASIC-1: ένα νέο μέλος της υπεροικογένειας των DEG/ENaCs στον <i>C. elegans</i> .....	54
2. Ανάλυση της αλληλουχίας του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου <i>ok415</i> .....	56
3. Μορφολογική και φαινοτυπική ανάλυση του στελέχους <i>asic-1(ok415)</i> .....	60
4. Το κανάλι ASIC-1 ελέγχει την πλαστικότητα στη συμπεριφορά του <i>C. elegans</i> .....	62
5. Το κανάλι ASIC-1 εντοπίζεται στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του <i>C. elegans</i> .....	68
6. Η σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης ρυθμίζει τη συμπεριφορά της εξαρτημένης μάθησης.....	72
7. Το κανάλι ASIC-1 δε ρυθμίζει την εκδήλωση άλλων συμπεριφορών εξαρτώμενων από την ντοπαμίνη.....	75
8. Το κανάλι ASIC-1 εντοπίζεται στις συνάψεις των ντοπαμινεργικών νευρώνων.....	79
9. Το κανάλι ASIC-1 ελέγχει τα επίπεδα της εκλυόμενης ντοπαμίνης.....	83
10. Το κανάλι ASIC-1 ελέγχει την ενεργότητα των ντοπαμινεργικών συνάψεων.....	84
11. Μοντέλο δράσης: Το κανάλι ASIC-1 ελέγχει τη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης ρυθμίζοντας την ενεργότητα των ντοπαμινεργικών συνάψεων μέσω ενός μηχανισμού θετικής ανάδρασης.....	89

## Κεφάλαιο 3

### Συζήτηση

1. Σύνοψη των αποτελεσμάτων.....	93
2. Σχολιασμός καινοτομιών.....	94
3. Η σύναψη του Hebb.....	95
4. Το σύστημα ντοπαμίνης κατά την εκδήλωση πλαστικότητας στο νευρικό σύστημα του νηματώδη.....	96
5. Το νευρωνικό δίκτυο- μελλοντικές προσεγγίσεις	



5.1. Οι προσυναπτικοί νευρώνες.....	99
5.2. Οι μετασυναπτικοί στόχοι.....	102
6. Μελέτη των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του καναλιού ASIC-1 και χαρακτηρισμός της μεταλλαγής του στελέχους <i>asic-1(ok415)</i> .....	103

## Κεφάλαιο 4

### Υλικά – Μέθοδοι

Υλικά.....	106
Μέθοδοι.....	107

#### A) Μοριακή Βιολογία

1. Απομόνωση γενωμικού DNA από τον <i>C. elegans</i> .....	107
2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	108
3. Απομόνωση ολικού mRNA.....	108
4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	110
5. Single worm PCR.....	111
6. Αντίστροφη μεταγραφή ακολουθούμενη από PCR (RT-PCR).....	112
7. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. Coli</i> .....	112
8. Μετασχηματισμός νηματώδους.....	112
9. RNAi.....	115

#### B) Πλασμιδιακές Κατασκευές.....

#### Γ) Φαινοτυπικές αναλύσεις στον *C. elegans*

1. Δοκιμασία χημειοτακτισμού.....	123
2. Δοκιμασία μνήμης και μάθησης (conditioning).....	126
3. Δοκιμασία θερμόταξης (isothermal tracking assay) .....	127
4. Δοκιμασία θερμόταξης σε πληθυσμό.....	129
5. Basal slowing.....	130
6. Δοκιμασία απόθεσης αυγών (egg laying assay) .....	131

7. Δοκιμασία αίσθησης μηχανικών ερεθισμάτων.....	132
8. Δοκιμασία αποφυγής δυσμενούς οσμωτικού περιβάλλοντος.....	134
9. Locomotion.....	134
10. Pharyngeal pumping.....	135
11. Defecation.....	135
Δ) <u>Γενετική</u> .....	137
Ε) <u>Μικροσκοπία</u>	
1. Συνεστιακή μικροσκοπία.....	139
2. Dye Filling.....	140
3. Formaldehyde-Induced Fluorescence (FIF).....	141
4. FRAP.....	142

## Παράρτημα Α

Εφαρμογή μεθόδων μη γραμμικής μικροσκοπίας στον οργανισμό *Caenorhabditis elegans*

<u>Περίληψη</u> .....	145
<u>Summary</u> .....	146
<u>Εισαγωγή</u> .....	147
<u>Στόχοι</u> .....	151
<u>Αποτελέσματα</u> .....	152
<u>Συζήτηση</u> .....	159

## Παράρτημα Β

Εφαρμογή μεθόδων οπτικής τομογραφίας (OPT) στον οργανισμό *Caenorhabditis elegans*

<u>Μεθοδολογία – Αποτελέσματα</u> .....	164
<u>Βιβλιογραφία</u> .....	168
<u>Δημοσιεύσεις</u> .....	186

## Γενικά

Στην παρούσα εργασία περιγράφεται η προσπάθεια που έγινε για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών οι οποίοι εμπλέκονται στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης στον οργανισμό *Caenorhabditis elegans*. Χρειάζεται ωστόσο να παρατεθούν κάποιοι λογικοί προβληματισμοί (τουλάχιστο με τη δική μου λογική θεώρηση των πραγμάτων) σε σχέση με το αποτέλεσμα αυτής της προσπάθειας, την προσέγγιση του θέματος στο νηματώδη αλλά κυρίως να οριστούν οι στόχοι της διατριβής, με σκοπό την καλύτερη κατανόησή της από τους αναγνώστες.

Αρχικά, πρέπει να διευκρινιστεί ότι η φυσιολογική αυτή συμπεριφορά αποτελεί ένα από τα μεγάλα μυστήρια της σύγχρονης νευροβιολογίας. Πώς δηλαδή επιτυγχάνεται η αποθήκευση των φυσικοχημικών ερεθισμάτων που φτάνουν σε έναν οργανισμό, υπό τη μορφή βιολογικής πληροφορίας και πώς αυτή η πληροφορία μπορεί να ανασυρθεί από το νευρικό σύστημα στο μέλλον; Βεβαίως, η απάντηση σε αυτό το ερώτημα δεν βρίσκεται στις επόμενες σελίδες της διατριβής που κρατάτε στα χέρια σας (και επομένως δεν είναι σκόπιμο να συνεχιστεί η ανάγνωσή της για το λόγο αυτό). Το γιατί δεν απαντάται όμως ολοκληρωτικά το παραπάνω ερώτημα δεν είναι πάντοτε τόσο προφανές και γι' αυτό χρειάζεται η παράθεση μερικών απλών δεδομένων. Αξίζει λοιπόν να σημειωθεί ότι σε μελέτες που έχουν γίνει, έχουν αναγνωριστεί συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου ανώτερων θηλαστικών, ως υπεύθυνες για την εκδήλωση της μνήμης και της μάθησης. Μια τέτοια προσέγγιση όμως, όσο και αν μπορεί να αποδειχτεί διαφωτιστική στο μέλλον, απέχει σημαντικά από την εξακρίβωση του συνόλου των βιολογικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα. Αυτό οφείλεται σε δυο βασικούς παράγοντες. Κατά πρώτον, στο γεγονός ότι η μνήμη και η μάθηση είναι ένα φαινόμενο εξαιρετικά πολύπλοκο και οι περιοχές ή οι ομάδες νευρώνων που αναγνωρίζονται κάθε φορά συνεισφέρουν στην επίτευξη ενός μόνο μέρους της συνολικής βιολογικής διαδικασίας. Κατά δεύτερον, όταν γίνεται λόγος για περιοχές ή τύπους νευρώνων στον εγκέφαλο θηλαστικών, συνήθως γίνεται αναφορά σε μερικές δεκάδες χιλιάδες κυττάρων στην απλούστερη περίπτωση. Έχοντας τα παραπάνω ως υπόβαθρο και φτάνοντας στη μοριακή βάση των πραγμάτων, ο βαθμός πολυπλοκότητας αυξάνεται εκθετικά. Δηλαδή, η εννοηστρωμένη επικοινωνία τόσων πολλών και διαφορετικών νευρώνων κατά την εκδήλωση της πολύπλοκης συμπεριφοράς της μνήμης και της μάθησης απαιτεί τη συμμετοχή πολλαπλών μονοπατιών μετάδοσης σήματος που λαμβάνουν χώρα σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών κυττάρων.

Στην προσπάθεια κατανόησης των παραπάνω φαινομένων, πολλές φορές οργανισμοί μοντέλα, όπως ο νηματώδης *C. elegans* έχουν αποδειχθεί πολύτιμα εργαλεία.

Όμως κι εδώ προκύπτουν εύλογα ερωτήματα και χρειάζεται για αυτό να υπάρξουν και πάλι ορισμένες αποσαφηνίσεις και παραδοχές. Μπορεί λοιπόν ένα σκουληκάκι που ζει στο χώμα και δεν είναι ορατό με γυμνό μάτι να εκτελεί διαδικασίες που χαρακτηρίζουν ανώτερους οργανισμούς; Όταν γίνεται λόγος για ανώτερες ή ακόμα περισσότερο, πνευματικές διεργασίες είναι σαφές ότι υπάρχει μια εντελώς ανθρωποκεντρική θεώρηση της βιολογίας και έτσι φαντάζει αδύνατο σχετικά απλοί οργανισμοί να είναι χρήσιμα βιολογικά μοντέλα προς παρατήρηση. Στην επιστημονική όμως πραγματικότητα, τέτοια φαινόμενα που εμπεριέχουν έντονα υποκειμενικά στοιχεία, δύσκολα ή τουλάχιστον πολύ προσεχτικά προσεγγίζονται. Αυτό συμβαίνει πάντοτε με έναν βασικό γνώμονα που δεν είναι άλλος από την ικανότητα αντικειμενικής μέτρησης και ποσοτικοποίησης του φαινομένου, που στην περίπτωση μας είναι η συμπεριφορά της μνήμης και της μάθησης. Με αυτά γίνεται σαφές ότι στην παρούσα εργασία δεν περιγράφεται η προσπάθεια ανάλυσης υποκειμενικών στην παρατήρηση φαινομένων. Αντίθετα, παρατηρήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε με ακρίβεια η ικανότητά του καινοραβδίτη να αλλάζει τη συμπεριφορά του με βάση την προγενέστερη εμπειρία. Αυτός είναι εξάλλου και ο απλούστερος ορισμός της πλαστικότητας ενός νευρικού συστήματος που υπογραμμίζει το φαινόμενο της μνήμης και της μάθησης σε όλους τους οργανισμούς που το εκδηλώνουν. Για την ανάλυση τέτοιων φαινομένων λοιπόν, ο *C. elegans* είναι ένα εξαιρετικό μοντέλο, όχι μόνο διότι εμφανίζει πλαστικότητα στο νευρικό του σύστημα αλλά και για ιδιότητες που αφορούν στην εύκολη γενετική ανάλυση και το καλά μελετημένο νευρικό σύστημα και οι οποίες αναλύονται εκτενώς στη συνέχεια.

Σε ότι αφορά στη μελέτη του φαινομένου, αυτή συνήθως προσανατολίζεται σε δυο διαφορετικά επίπεδα. Αρχικά, είναι χρήσιμο να αναγνωριστούν οι νευρώνες εκείνοι οι οποίοι δημιουργούν το κατάλληλο νευρικό δίκτυο, στο οποίο αποθηκεύεται μια πληροφορία. Σε ένα επόμενο επίπεδο γίνεται προσπάθεια κατανόησης των ενδοκυτταρικών μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην αποθήκευση της πληροφορίας αυτής και στον τρόπο που εξυπηρετείται η διακυτταρική επικοινωνία, με σκοπό την ολοκλήρωση του νευρωνικού κυκλώματος το οποίο συνολικά θα οδηγήσει στην εκδήλωση μνήμης και μάθησης. Γενικά είναι γνωστό ότι η μνήμη και η μάθηση είναι λειτουργίες οι οποίες εξαρτώνται από την ευκολία μετάδοσης σήματος ανάμεσα τους διαφορετικούς νευρώνες του κατάλληλου νευρικού κυκλώματος. Η επικοινωνία αυτή, εν συνεχεία, εξαρτάται από τη δράση μιας σειράς παραγόντων οι οποίοι είτε τη διευκολύνουν είτε την αναστέλλουν με το να ασκούν ρυθμιστικό έλεγχο στην ενεργότητα νευρώνων και συνάψεων. Σε αυτή τη διαδικασία έχουν εμπλακεί διαφορετικά μόρια, όπως κανάλια ιόντων, τα οποία έχουν βρεθεί να ρυθμίζουν τη διακυτταρική επικοινωνία κατά την εκδήλωση της μνήμης και της μάθησης. Έτσι, συνοπτικά αναφέρεται ότι στη συγκεκριμένη εργασία έγινε αναγνώριση μορίων που συμμετέχουν στη

συμπεριφορά της μνήμης και της μάθησης στο νηματώδη ενώ αναλύθηκε ο μηχανισμός δράσης αυτών κατά την παραπάνω διαδικασία. Προκειμένου αυτό να επιτευχθεί προέκυψαν επιμέρους ερωτήματα που αφορούν στις μορφές της μνήμης και μάθησης οι οποίες επηρεάζονται από τα μόρια αυτά, στο νευρωνικό δίκτυο όπου επιτυγχάνεται η αποθήκευση των πληροφοριών και βέβαια στο είδος της σηματοδότησης που ελέγχεται.

Εν κατακλείδι, αν θέλαμε να περιγράψουμε με απλά λόγια την φυσιολογική σημασία των ευρημάτων αυτής της εργασίας, θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι επιβεβαιώθηκε στο μοριακό επίπεδο η ρήση του *επανάληψη μήτηρ μαθήσεως*.

Περιεχόμενα

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

## Περίληψη

Στη συγκεκριμένη διατριβή παρουσιάζεται η μελέτη των μοριακών μηχανισμών που ορίζουν την πλαστικότητα στην επικοινωνία των νευρικών κυττάρων του νηματώδους *Caenorhabditis elegans* κατά τη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης. Η πλαστικότητα του νευρικού συστήματος εμφανίζεται να είναι συντηρημένη ανάμεσα σε διαφορετικά είδη και παρατηρείται από την αλλαγή στη συμπεριφορά τους με βάση την προγενέστερη εμπειρία. Το νευρικό σύστημα υποδέχεται και επεξεργάζεται τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα οδηγώντας αρχικά στην άμεση απόκριση του οργανισμού και κατόπιν σε μακροπρόθεσμες αλλαγές της συμπεριφοράς. Το νηματώδες σκουλήκι *C. elegans* παρουσιάζει αξιοσημείωτη πλαστικότητα στο νευρικό του σύστημα και κατά συνέπεια στη συμπεριφορά του, εμφανίζοντας μια σειρά από διαφορετικά τέτοια παραδείγματα. Η αλλαγή της συμπεριφοράς ενός οργανισμού με βάση την προγενέστερη εμπειρία αποτελεί την εκδήλωση του φαινομένου της μνήμης και της μάθησης. Από τη συγκεκριμένη προσπάθεια βρέθηκε ότι το κανάλι ιόντων νατρίου ASIC-1 αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα της ικανότητας του οργανισμού να εμφανίζει πλαστικότητα στη συμπεριφορά του. Το κανάλι ASIC-1 ενεργοποιείται από τη μείωση του εξωκυττάριου pH και είναι μέλος της υπεροικογένειας των DEG/ENaCs η οποία περιλαμβάνει μόρια που συναντώνται από το νηματώδη μέχρι και τον άνθρωπο. Βρέθηκε ότι το στέλεχος *asic-1(ok415)*, που φέρει μια έλλειψη στο γονίδιο *asic-1* εμφανίζει μειωμένη ικανότητα εξαρτημένης μάθησης (associative learning) ενώ η ικανότητα αντίληψης περιβαλλοντικών ερεθισμάτων παραμένει φυσιολογική. Για τη διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο το συγκεκριμένο κανάλι συμμετέχει στη διαδικασία της μάθησης αναγνωρίστηκε το μοτίβο έκφρασης του γονιδίου *asic-1*. Βρέθηκε ότι εκφράζεται σε 8 νευρώνες του *C. elegans* οι οποίοι συνιστούν το ντοπαμινεργικό σύστημα του οργανισμού. Αναλύοντας λεπτομερώς την υποκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης διαπιστώθηκε ότι εμφανίζεται σε σπικτική διάταξη στη μεμβράνη των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Πειράματα συνεντοπισμού με το συναπτικό μάρτυρα SNB-1 έδειξαν ότι το κανάλι ASIC-1 τοποθετείται στις προσυναπτικές περιοχές των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Για τη διερεύνηση του ρόλου της ντοπαμίνης στην εξαρτημένη μάθηση ακολούθησε ανάλυση του μεταλλαγμένου στελέχους *cat-2(e1112)* το οποίο παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα βιοσύνθεσης του νευροδιαβιβαστή. Το στέλεχος αυτό εμφανίζει όμοια προβλήματα μάθησης με το μεταλλαγμένο στέλεχος *asic-1(ok415)* επιβεβαιώνοντας τον κομβικό ρόλο της ντοπαμίνης στην παραπάνω διαδικασία. Αυτό διαπιστώνεται και από το γεγονός ότι εξωγενής χορήγηση ντοπαμίνης οδηγεί στη διάσωση του φαινοτύπου τόσο για το στέλεχος *cat-2(e1112)* όσο και για το στέλεχος *asic-1(ok415)*, παρά το γεγονός ότι το τελευταίο παράγει ντοπαμίνη σε φυσιολογικά επίπεδα. Ομοίως, το

διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος για το ASIC-1 και το μεταφορέα ντοπαμίνης DAT-1 οδηγεί σε διάσωση του φαινοτύπου καθώς τα επίπεδα του νευροδιαβιβαστή είναι αυξημένα εξαιτίας της μεταλλαγής του DAT-1. Ακολουθώντας την αντίθετη προσέγγιση έγινε διακοπή της σηματοδότησης μέσω ντοπαμίνης. Έτσι, απαλοιφή των ντοπαμινεργικών νευρώνων αλλά και μεταλλαγή των υποδοχέων ντοπαμίνης οδηγεί σε φαινοτυπικές ανωμαλίες όμοιες με εκείνες του στελέχους *asic-1(ok415)*. Ποιος είναι όμως ο μηχανισμός δράσης του καναλιού ASIC-1 για την εκδήλωση της μνήμης και της μάθησης; Προκειμένου να απαντηθεί το ερώτημα αυτό έγινε καταγραφή της ενεργότητας των ντοπαμινεργικών συνάψεων σε πειράματα FRAP. Βρέθηκε ότι η ενεργότητα των συνάψεων αυτών είναι μειωμένη στο στέλεχος *asic-1(ok415)*. Έτσι, συμπεραίνεται ότι το κανάλι ASIC-1 δρα στις παραπάνω συνάψεις εξασφαλίζοντας την αυξημένη ενεργότητα και συνεπώς τη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης που απαιτείται για τη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης. Από την εργασία αυτή προκύπτει ένας νέος ρόλος για ένα μέλος των DEG/ENaCs στο νηματώδη, ενώ είναι η πρώτη φορά για οποιοδήποτε οργανισμό που ένα τέτοιο κανάλι συνδέεται με τη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης κατά τη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης.

Περιεχόμενα



## Summary

The work presented in the following pages focuses on the elucidation of the molecular mechanisms underlying neuronal plasticity and communication in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Neuronal plasticity appears to be conserved among different species and can be observed through changes in animal's behavior after certain experiences. The nervous system processes and integrates sensory input to generate both immediate responses and long-term changes in behavior. The nematode worm *Caenorhabditis elegans* displays a remarkable capacity for experience-induced changes in behavior and several such paradigms have been described so far. Modulation of behavior by past experience is a manifestation of the *C. elegans* learning capacity. Here, we report the identification of ASIC-1 as modulator of associative learning process. ASIC-1 is an acid sensing ion channel that conducts sodium ions and belongs to the degenerin/epithelial sodium channel superfamily with members ranging from nematode to mammals. We find that animals lacking ASIC-1 are defective in associative learning although they show normal sensory perception. To address the question of how this ion channel mediates associative learning we identified gene's expression pattern. *asic-1* is expressed in the 8 neurons that constitute the worm's dopaminergic system. In a more detailed analysis we observed a punctuate distribution of ASIC-1 in membrane regions that confine with the presynaptic marker synaptobrevin. Therefore, we assume that ASIC-1 localizes at presynaptic terminals of dopaminergic neurons. The observation that the dopamine deficient mutant *cat-2(e1112)* also displays learning defects confirmed that dopamine is required for normal associative learning. Additionally, exogenous supply of dopamine or elimination of the DAT-1 dopamine transporter counterbalance the defects associated with ASIC-1 deficiency although ASIC-1 mutants synthesize normal levels of the neurotransmitter. Similarly, interruption of dopaminergic signaling by genetic ablation of neurons expressing *asic-1* impairs associative learning, which is again restored by exogenous addition of dopamine. Removal of the dopamine receptors DOP-1 and DOP-2, but not DOP-3, recapitulates the effects of *asic-1* deletion on associative learning. But what is the mechanism that ASIC-1 mediates during associative learning and how it modulates dopaminergic signaling? To address the aforementioned basic question we monitored the neurotransmitter release at dopaminergic synapses through FRAP experiments. We found that in the absence of ASIC-1 the activity of dopaminergic neurons is compromised. Thus, ASIC-1 functions in dopaminergic neurons to mediate normal dopaminergic signaling, necessary for associative learning in *C. elegans*.

Our results reveal a novel role of DEG/ENaC ion channels in modulating neuronal communication by regulating the activity of dopaminergic synapses.

Περιεχόμενα

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

## Εισαγωγή

### 1. Μνήμη και μάθηση: παραδείγματα και μορφές του φαινομένου

Όλοι οι οργανισμοί που διαθέτουν νευρικό σύστημα, ανεξάρτητα από την πολυπλοκότητα που το χαρακτηρίζει έχουν τη δυνατότητα να αντιλαμβάνονται το περιβάλλον και να προσαρμόζουν τη συμπεριφορά τους ανάλογα με αυτό. Προκειμένου ένας οργανισμός να έχει τη δυνατότητα προσαρμογής στο περιβάλλον είναι απαραίτητο να κάνει χρήση κάποιων στάνταρτ ή αλλιώς μιας νόρμας συμπεριφοράς, βάσει της οποίας θα εκδηλώσει απάντηση στις πληροφορίες που λαμβάνει (Seymour et al., 2007). Πώς όμως ορίζεται αυτό το πρότυπο στη συμπεριφορά, γιατί δεν είναι το ίδιο ανάμεσα σε διαφορετικούς οργανισμούς και ποιο σκοπό εξυπηρετεί; Με τον τρόπο αυτό εξυπηρετείται ο θεμελιώδης σκοπός της λογικής αντίληψης του περιβάλλοντος από τους οργανισμούς, κύρια για την εύρεση τροφής αλλά και την επιβίωσή τους. Αν και οι παράγοντες που καθορίζουν τον τρόπο με τον οποίο διαμορφώνεται η ικανότητα του κάθε ατόμου να αντιλαμβάνεται και να απαντά στο περιβάλλον είναι πολλοί, όλοι εξαρτώνται από την ικανότητα του ατόμου αυτού για μνήμη και μάθηση. Οι παραπάνω δηλαδή νόρμες στη συμπεριφορά δεν είναι άλλο από την ανάκληση μνημών όπου ανάλογες προγενέστερες εμπειρίες καθορίζουν την απόκριση του ατόμου στον παρόντα και μελλοντικό χρόνο. Καθώς οι εμπειρίες αυτές δεν είναι κοινές για όλα τα άτομα γίνεται αντιληπτό ότι και η μελλοντική συμπεριφορά απέναντι σε δεδομένα ερεθίσματα δεν πρόκειται να είναι απολύτως όμοια ανάμεσα σε διαφορετικά άτομα. Η ικανότητα των οργανισμών να προσαρμόζουν τη συμπεριφορά τους με βάση την προγενέστερη εμπειρία αντικατοπτρίζει την ικανότητά τους για εκδήλωση εξαρτημένης (associative learning) ή μη εξαρτημένης μάθησης (nonassociative learning). Η μη εξαρτημένη μορφή μάθησης περιλαμβάνει τη συμπεριφορά του habituation και του sensitization, ενώ η εξαρτημένη μορφή μάθησης διακρίνεται σε δυο βασικές κατηγορίες, το classical conditioning και το operant conditioning.

Κατά την εκδήλωση του habituation παρατηρείται η προοδευτική μείωση τις πιθανότητας να εκδηλωθεί μια συμπεριφορά απέναντι σε ένα ερέθισμα (Groves and Thompson, 1970). Έτσι, κατά την επαναλαμβανόμενη άσκηση του ερεθίσματος στον οργανισμό, την αρχική έντονη αντίδραση (sensitization) ακολουθεί η μείωση της απόκρισης όταν αυτό δεν προκαλεί καμία θετική ή αρνητική συνέπεια. Αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε α) λόγω της ανικανότητας αντίληψης του ερεθίσματος εξαιτίας κορεσμού του νευρώνα ή του αντίστοιχου υποδοχέα (neuronal / receptor fatigue), είτε β) λόγω της ενεργής μάθησης από

τον οργανισμό για μη απόκριση (habituation). Η διάκριση ανάμεσα στις δυο συνθήκες επιτυγχάνεται μέσω του φαινομένου της απευαισθητοποίησης (desensitization) όπου η άσκηση έντονου ερεθίσματος επαναφέρει την αρχική απόκριση, λόγω αναστολής του habituation αλλά όχι του adaptation.

Κατά την εκδήλωση classical conditioning το άτομο μαθαίνει ότι η παρουσία ενός ερεθίσματος προβλέπει την ύπαρξη ενός δεύτερου (De Houwer et al., 2001; Siwicki and Ladewski, 2003; Vogel et al., 2004) Ένα ουδέτερο ερέθισμα (Conditioning Stimulus ή CS) παρουσιάζεται στον οργανισμό μαζί με ένα ερέθισμα δεδομένης βιολογικής σημασίας (Unconditioning Stimulus ή US) το οποίο επάγει από μόνο του συγκεκριμένη θετική ή αρνητική απόκριση. Η μελλοντική παρουσία μόνο του ουδέτερου ερεθίσματος (CS) πρόκειται να προκαλέσει την αντίδραση η οποία είχε επαχθεί από το δεύτερο ερέθισμα (US) καθώς έχει λάβει χώρα ο προγενέστερος συσχετισμός τους (Pavlov et al., 1928). Στον τύπο αυτής της μορφής μάθησης τα δυο ερεθίσματα είναι δυνατό να παρουσιάζονται ταυτόχρονα (Simultaneous Conditioning), το CS να προηγείται του US (Forward Conditioning) ή το US να προηγείται του CS (Backward Conditioning). Σημαντική παράμετρος για τον συσχετισμό των δύο ερεθισμάτων (CS και US) είναι επίσης ο χρόνος έκθεσης του οργανισμού σε αυτά, αλλά και η επανάληψη της έκθεσης σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Στην περίπτωση του operant conditioning ο οργανισμός μαθαίνει από τις συνέπειες που προκαλεί η ίδια του η απόκριση απέναντι σε δεδομένο ερέθισμα (reinforcing stimulus) (Baxter and Byrne, 2006; Martin-Soelch et al., 2007; Samson et al., 2005). Λαμβάνει δηλαδή χώρα η αποτίμηση του αποτελέσματος και η αλλαγή της συμπεριφοράς με βάση αυτό. Έτσι, ένα ερέθισμα που οδηγεί σε απόκριση χαρακτηρίζεται ως ελκτικό ή απωθητικό, ανάλογα με το αν το αποτέλεσμα είναι θετικό ή αρνητικό, ενώ διακρίνεται και η περίπτωση κατά την οποία το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι ουδέτερο για τον οργανισμό. Κατά αυτόν τον τρόπο διακρίνεται η συμπεριφορά του reinforcement, του punishment και του extinction αντίστοιχα. Κατά το reinforcement αυξάνεται η συχνότητα εκδήλωσης μιας συμπεριφοράς όταν το αποτέλεσμά που προκαλείται είναι επιβραβευτικό (reward) ή όταν δεν είναι αρνητικό οπότε η συμπεριφορά καλείται positive reinforcement ή appetitive motivation (Seymour et al., 2007). Κατά το punishment ελαττώνεται η συχνότητα εκδήλωσης μιας συμπεριφοράς όταν αυτή προκαλεί απωθητικό αποτέλεσμα ή όταν δεν επιτυγχάνεται το επιθυμητό και η συμπεριφορά που εκδηλώνεται καλείται negative reinforcement ή aversive motivation (Seymour et al., 2007). Οι παραπάνω περιπτώσεις αποτελούν το μέτρο σύμφωνα με το οποίο αποτιμάται το αποτέλεσμα της αντίδρασης και ταυτόχρονα δημιουργούν τη νόρμα εκείνη που θα καθορίσει τη μελλοντική συμπεριφορά του ατόμου.

### 1.1. Κυτταρική και μοριακή βάση του φαινομένου: Η σύναψη του Hebb και το φαινόμενο του LTP

Η διάκριση των παραπάνω μορφών μνήμης και μάθησης έγινε στη βάση φαινοτυπικών παρατηρήσεων σε διαφορετικούς οργανισμούς και με τη χρήση ποικίλων δοκιμασιών ελέγχου της συμπεριφοράς. Ποια είναι όμως η κυτταρική και μοριακή βάση του φαινομένου; Παρατηρήσεις σε οργανισμούς με σημαντικές βλάβες σε περιοχές του εγκεφάλου οδήγησαν στην αναγνώριση συγκεκριμένων περιοχών οι οποίες ευθύνονται για την εκδήλωση του φαινομένου όπως ο ιππόκαμπος, τα αμύγδαλα και το cerebellum (Maren, 2003). Καθώς όμως, βασικό χαρακτηριστικό της μάθησης είναι η έντονη πλαστικότητα και η επαγωγή της με βάση την προγενέστερη εμπειρία, προκύπτει το ερώτημα για τον τρόπο που αντικατοπτρίζεται σε κυτταρικό επίπεδο. Οι αλλαγές στη λειτουργία του νευρικού συστήματος μπορούν να οφείλονται στην αλλαγή της συνδεσιμότητας των νευρώνων όπου με βάση την εμπειρία παρατηρείται ο σχηματισμός νέων συνάψεων (Balderas et al., 2004). Εντούτοις, σημαντική θεωρείται και η αλλαγή στην ικανότητα των υπαρχόντων συνάψεων για διακυτταρική επικοινωνία. Σε αυτή την αρχή στηρίζεται η θεωρία που διατυπώθηκε το 1949 από τον Donald Hebb και είναι γνωστή ως ο κανόνας του Hebb ή η σύναψη του Hebb (Hebb, 1949). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή η πλαστικότητα στη συμπεριφορά οφείλεται σε σχετικά μόνιμες αλλαγές που υφίσταται το νευρικό σύστημα από τις διάφορες εμπειρίες. Στο μοντέλο του Hebb η ταυτόχρονη ενεργότητα του προσυναπτικού με τον μετασυναπτικό νευρώνα προκαλούν ενίσχυση της σύναψης, ενώ σε αντίθετη περίπτωση προκαλείται η αποδυνάμωσή της. Πρόκειται δηλαδή για αλλαγές της ενεργότητας των συνάψεων ή του συναπτικού βάρους (synaptic weight) που έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διακυτταρικής επικοινωνίας (Zhang and Linden, 2003). Έτσι, ένα νευρωνικό κύκλωμα διαδίδει ευκολότερα μια πληροφορία η οποία έχει παρουσιαστεί στον οργανισμό κατά το παρελθόν οδηγώντας και πάλι στην ίδια απόκριση ως αποτέλεσμα της μνήμης η οποία έχει αποθηκευτεί.

Το κοντινότερο βιοφυσικό φαινόμενο στην θεωρία του Hebb είναι αυτό του LTP (Long Term Potentiation) και του LTD (Long Term Depression) (Hansel et al., 2001; Nicoll and Schmitz, 2005; Zucker and Regehr, 2002). Συγκεκριμένα, η ισχυρή και επαναλαμβανόμενη ηλεκτρική ενεργοποίηση του προσυναπτικού νευρώνα προκαλεί μακράς διάρκειας αύξηση της ενεργότητας του μετασυναπτικού (Zakharenko et al., 2001). Αυτό συμβαίνει διότι ο μετασυναπτικός νευρώνας υφίσταται μόνιμες αλλαγές στη φυσιολογία του από την παραπάνω ενεργοποίηση. Αντίθετα, η έλλειψη ενεργοποίησης προκαλεί τη μακράς διάρκειας ελάττωση της ενεργότητας του νευρώνα (LTD) (Bear and Malenka, 1994). Με τον τρόπο

αυτό, που αφορά τις χημικές συνάψεις εκδηλώνονται αλλαγές στην ικανότητα των νευρωνικών δικτύων για τη μεταφορά και την επεξεργασία των διαφορετικών σημάτων. Το φαινόμενο αυτό μεσολαβεί το σχηματισμό μνήμης και μάθησης καθώς άτομα με μεταλλαγές οι οποίες αναστέλλουν το φαινόμενο του LTP εμφανίζουν επίσης αδυναμία εκδήλωσης διαφορετικών μορφών μνήμης (Siegelbaum and Kandel, 1991; Xu and Kang, 2005). Για την εκδήλωση LTP στο μετασυναπτικό νευρώνα απαιτείται η ένταση και η συχνότητα της αρχικής ενεργοποίησης, από τον προσυναπτικό, να υπερβαίνει ένα δεδομένο όριο. Έτσι, διασφαλίζεται ότι η ενίσχυση της συνδεσιμότητας μεταξύ των δυο νευρώνων δε θα προκύψει τυχαία. Μάλιστα, όσο μεγαλύτερη είναι συχνότητα ενός ερεθίσματος, τόσο μικρότερη είναι η απαίτηση για ένταση και το αντίστροφο. Επίσης, η συχνότητα του ασκούμενου ερεθίσματος ποικίλει ανάλογα με το εκάστοτε ερέθισμα και το νευρώνα. Έτσι, για το συσχετισμό π.χ. χημικών ενώσεων, η έκθεση στο ερέθισμα διαρκεί μερικές ώρες, ενώ για τη μάθηση οπτικών ερεθισμάτων χρειάζονται μόνο μερικά ms. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό είναι ότι η επαγωγή του LTP περιορίζεται σε συγκεκριμένες συνάψεις του μετασυναπτικού νευρώνα. Έτσι, η ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA σε μια σύναψη οδηγεί στην τοπική αύξηση των ιόντων ασβεστίου, κάτι που δεν ισχύει για γειτονικές συνάψεις. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ειδικότητα που απαιτείται για τη διαδικασία της μάθησης. Αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό δεδομένου ότι κάθε ενδιάμεσος νευρώνας δέχεται πολλαπλά σήματα από τα οποία κάποια μόνο αποθηκεύονται. Παρά ταύτα, κατά την εκδήλωση associative learning είναι δυνατό κάποιες συνάψεις που δέχονται μικρής έντασης σήμα να οδηγηθούν σε LTP αν κάποιες άλλες συνάψεις του ίδιου νευρώνα δέχονται ισχυρή ενεργοποίηση ικανή να επάγει LTP. Σε αυτή την περίπτωση και για να είναι εφικτή η εκδήλωση LTP και στις δυο ομάδες συνάψεων απαιτείται η ταυτόχρονη ενεργοποίησή τους ή αλλιώς ο συντονισμός τους. Έτσι, διασφαλίζεται ότι θα υπάρξει ειδικότητα κατά το συσχετισμό διαφορετικών ερεθισμάτων στους ενδιάμεσους νευρώνες.

Το φαινόμενο του LTP έχει παρατηρηθεί σε πολλά είδη διαφορετικών συνάψεων και κυρίως στις χημικές συνάψεις των γλουταματεργικών νευρώνων (Bliss and Collingridge, 1993; Zhao et al., 2005). Η ενεργοποίηση των υποδοχέων γλουταμικού AMPA και NMDA στους νευρώνες του ιππόκαμπου είναι συνυφασμένη πλέον με την εκδήλωση του LTP και χαρακτηρίζει το φαινόμενο της νευρικής πλαστικότητας (Tsien et al., 1996). Συγκεκριμένα σε μια γλουταματεργική σύναψη η πρόσδεση του νευροδιαβιβαστή στον ιονοτροπικό υποδοχέα AMPA προκαλεί την αύξηση της αγωγιμότητας σε ιόντα νατρίου και τη δημιουργία ηλεκτρικού δυναμικού. Το δυναμικό αυτό προκαλεί στη συνέχεια την απελευθέρωση των ανασταλτικών ιόντων μαγνησίου από τον υποδοχέα NMDA και την ενεργοποίησή του με τελικό αποτέλεσμα την είσοδο ιόντων ασβεστίου (Daw et al., 1993). Αυτή είναι και η απαρχή για ένα ασβεστιο-

εξαρτώμενο μονοπάτι αλληλεπιδράσεων και διαδοχικών φωσφορυλιώσεων που οδηγούν στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων, την αύξηση του αριθμού και της ενεργότητας μιας σειράς μορίων απαραίτητων για την εκδήλωση της μνήμης και της μάθησης (Derkach et al., 1999; Nelson et al., 2005; Rongo and Kaplan, 1999; Voglis and Tavernarakis, 2006). Κομβικής σημασίας για την παραπάνω μεταγραφική ενεργοποίηση αποτελεί η παραγωγή κυκλικού AMP ή cAMP από το ασβέστιο-εξαρτώμενο μόριο της αδενυλικής κυκλάσης. Πιο συγκεκριμένα τα αυξημένα επίπεδα cAMP προκαλούν την αύξηση της ενεργότητας του νευρικού κυττάρου με την καταστολή της λειτουργίας καναλιών  $K^+$ . Έτσι, παρατηρείται η αυξημένη είσοδος ιόντων  $Ca^{2+}$  και η επαγωγή έτσι περαιτέρω απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή (Klein and Kandel, 1980). Η απενεργοποίηση των καναλιών  $K^+$  λαμβάνει χώρα με τη φωσφορυλίωση αυτών από την κινάση PKA, της οποίας η λειτουργία εξαρτάται από τα επίπεδα cAMP του κυττάρου. Τέτοια κανάλια ιόντων καλίου είναι τα τύπου S των οποίων η ενεργότητα εξαρτάται από το cAMP (Shuster et al., 1985). Σειρά μάλιστα παρατηρήσεων έδειξαν ότι τα υψηλά επίπεδα cAMP συνδέονται απ' ευθείας με την παρουσία δυναμικών ενεργείας στον προσυναπτικό νευρώνα και έτσι με την εκδήλωση φαινομένων πλαστικότητας του νευρικού συστήματος. Όπως είναι η μικρής διάρκειας μνήμη (Byrne and Kandel, 1996). Η επαγωγή μακράς διάρκειας μνήμης βρέθηκε να διαφοροποιείται από αυτή της μικρής διάρκειας από το γεγονός ότι στην πρώτη περίπτωση απαιτείται η σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Και σε αυτή την περίπτωση ο ρόλος του cAMP είναι κομβικός, καθώς η ενεργοποιημένη κινάση PKA θα προκαλέσει τη στρατολόγηση του μορίου MAPK. Ακολουθεί η από κοινού μετάβαση στον πυρήνα και η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα cAMP Response Element Binding protein ή CREB. Έτσι, επάγεται η μεταγραφή μιας σειράς άλλων μεταγραφικών παραγόντων όπως CEBP και AF και τελικά η παραγωγή μορίων τα οποία θα οδηγήσουν είτε στη δημιουργία νέων συνάψεων είτε στην ενίσχυση της λειτουργίας των ήδη υπαρχόντων (Kandel, 2004). Και στις δυο αυτές περιπτώσεις παρατηρείται αύξηση της διακυτταρικής επικοινωνίας ανάμεσα σε νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για την εκδήλωση του φαινομένου της μνήμης και της μάθησης.

Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι η πλαστικότητα στο νευρικό σύστημα και κατ' επέκταση στη συμπεριφορά έχει μοριακή βάση. Η σύναψη του Hebb που αρχικά διατυπώθηκε ως υπόθεση φαίνεται ότι επιβεβαιώνεται σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Έτσι, η εξαρτώμενη από την εμπειρία, ενδυνάμωση της συνδεσιμότητας των νευρώνων αποτελεί τη βάση για την εκδήλωση της μνήμης και της μάθησης. Εντούτοις, αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν ανοιχτά ερωτήματα, των οποίων η απάντηση θα βοηθήσει στην «τοποθέτηση» του LTP στο πάζλ που λέγεται μνήμη και μάθηση. Ένα ερώτημα που τίθεται έχει να κάνει με το αν ο μετασυναπτικός νευρώνας, στον οποίο εκδηλώνεται το LTP, έχει



κάποια ανάδρομη επίδραση στη λειτουργία του προσυναπτικού, του νευρώνα δηλαδή που επάγει το LTP (Humeau et al., 2003). Χρειάζεται έτσι να γίνει σαφές αν το αποτέλεσμα του LTP είναι η αύξηση της ικανότητας του μετασυναπτικού νευρώνα να δέχεται υψηλότερη νευροδιαβίβαση ή του προσυναπτικού να επάγει ή και τα δυο μαζί (Lisman et al., 2003). Επίσης, αν και είναι σαφές ότι το LTP είναι αναγκαίο για την επαγωγή της μάθησης, δεν είναι ξεκάθαρο αν είναι ικανό από μόνο του για κάτι τέτοιο. Χρειάζεται δηλαδή να γίνει σαφές αν η ενδυνάμωση της συναπτικής σύνδεσης μεταξύ των νευρώνων είναι από μόνο του ως γεγονός ικανό, μόνο να επάγει ή και να διεκπεραιώσει την αποθήκευση μιας πληροφορίας. Τέλος, αν και είναι γνωστό ότι νέα κανάλια ιόντων και υποδοχείς μεταφέρονται στη σύναψη για την εκδήλωση της μάθησης (Bradshaw et al., 2003; Lee et al., 2003), δεν είναι ξεκάθαρο αν άλλες, δομικές (και όχι μόνο λειτουργικές) αλλαγές λαμβάνουν χώρα.

## **1.2. Ο ρόλος της ντοπαμίνης στην πλαστικότητα του νευρικού συστήματος**

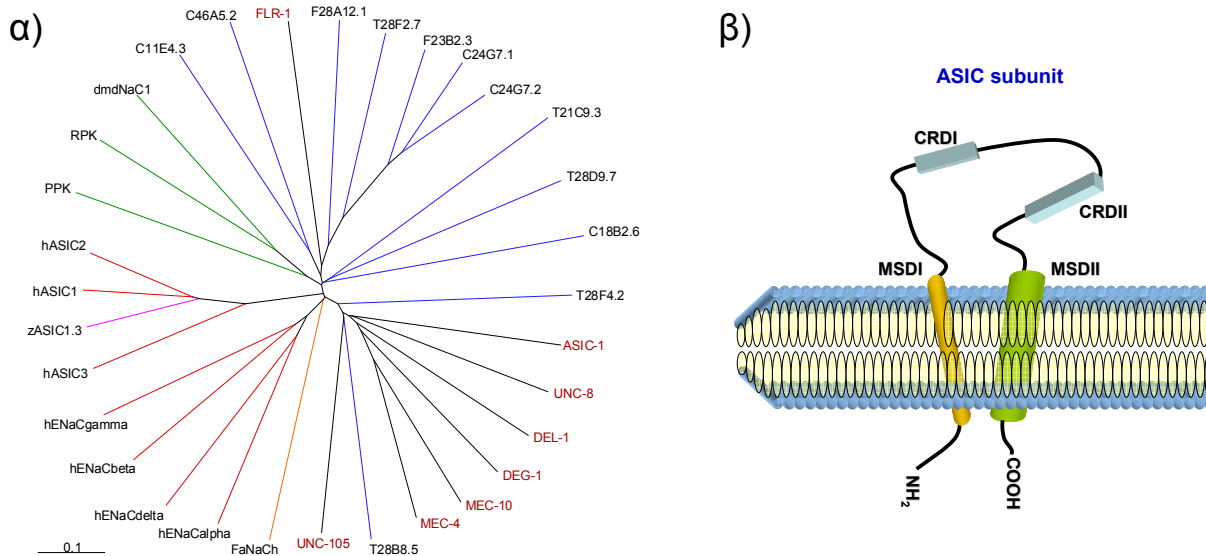
Τα παραπάνω φαινόμενα περιγράφουν τους βασικούς μηχανισμούς αλλαγής της νευρικής ενεργότητας με βάση την εμπειρία για την εκδήλωση μνήμης και μάθησης. Εντούτοις, γίνεται αντιληπτό ότι ο σκοπός των παραπάνω μηχανιστικών αλλαγών σε συνάψεις και νευρικά κυκλώματα είναι η αύξηση της ικανότητας του νευρικού συστήματος για νευροδιαβίβαση. Ποιος είναι όμως ο ρόλος συγκεκριμένων νευροδιαβιβαστών στην εκδήλωση της πλαστικότητας του νευρικού συστήματος; Η εκτεταμένη μελέτη προς αυτή τη κατεύθυνση έχει αναδείξει τις βιογενείς αμίνες σε σημαντικούς παίκτες του παιχνιδιού που λέγεται νευρική πλαστικότητα. Μία από αυτές, η ντοπαμίνη έχει βρεθεί να ελέγχει την πλαστικότητα στη συμπεριφορά διαφορετικών οργανισμών, αλλά και να εμπλέκεται στην εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων. Έτσι, ανωμαλίες στη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης από μεταλλάξεις ή θάνατο των ντοπαμινεργικών νευρώνων προκαλούν ασθένειες όπως Parkinson (Marsden, 1992), Alzheimer's (Piggott et al., 2007) και σχιζοφρένεια (Hietala and Syvalahti, 1996), ενώ σημαντικός είναι και ο ρόλος της στον εθισμό (Hyman et al., 2006). Ο ρόλος της ντοπαμίνης στη συμπεριφορά παρουσιάζεται σίγουρα ευρύς καθώς ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών παραδειγμάτων μνήμης και μάθησης έχει βρεθεί ότι επηρεάζεται από τη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης. Έτσι, είναι γενικά αποδεκτό ότι η ντοπαμίνη ασκεί ρυθμιστικό ρόλο σε νευρώνες ή νευρωνικά δίκτυα κατά τη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης αυξάνοντας ή μειώνοντας έτσι την ικανότητα του νευρικού συστήματος για απόκριση σε αυτά (motivation) (Huber, 2005; Schultz, 2007). Σε αυτή την περίπτωση η διακοπή της σηματοδότησης μέσω ντοπαμίνης προκαλεί σταδιακή μείωση της ικανότητας των ατόμων για μνήμη και μάθηση αλλά όχι πλήρη απώλεια αυτής

εφόσον ο ρόλος της είναι ρυθμιστικός. Εντούτοις, η μελέτη του ρόλου της σε διαφορετικούς οργανισμούς οδήγησε στο συμπέρασμα ότι κατά την εξαρτημένη μάθηση η ντοπαμίνη μπορεί να σηματοδοτεί για κάποιο από τα συσχετιζόμενα ερεθίσματα και να το καθορίζει ταυτόχρονα ως ελκτικό ή απωθητικό. Σε αυτή την περίπτωση η ντοπαμίνη δε ρυθμίζει την απόκριση του οργανισμού στο ερέθισμα αλλά ορίζει το ίδιο το ερέθισμα. Αυτό παρατηρήθηκε στον οργανισμό *Drosophila melanogaster* όπου οι μονοαμίνες, ντοπαμίνη και οκτοπαμίνη ελέγχουν τη διαδικασία της εξαρτημένης μάθησης κατά ένα αντίθετο τρόπο. Η σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης ελέγχει τη διαδικασία του operant conditioning όταν το ερέθισμα είναι απωθητικό οδηγώντας στην εκδήλωση aversive reinforcement (punishment) (Riemensperger et al., 2005). Αντίθετα, η σηματοδότηση μέσω οκτοπαμίνης μεσολαβεί στο συσχετισμό θετικών ερεθισμάτων οδηγώντας στην εκδήλωση appetitive reinforcement (reward) (Schwaerzel et al., 2003). Στο παράδειγμα αυτό η ντοπαμίνη δεν είναι μόνο απαραίτητη για την επαγωγή της μάθησης αλλά και ικανή να επάγει aversive reinforcement ακόμα και κατά την έλλειψη ερεθίσματος (CS) και με μόνη προϋπόθεση ότι οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες είναι ενεργοί (Schroll et al., 2006). Επίσης, είναι σημαντικό ότι κατά την επαγωγή των ντοπαμινεργικών νευρώνων η ικανότητα του οργανισμού να αντιλαμβάνεται το απωθητικό ερέθισμα δεν αλλάζει. Έτσι, φαίνεται ότι η ντοπαμίνη δεν επηρεάζει την ικανότητα για αντίληψη του ερεθίσματος αλλά καθορίζει τη βιολογική του αξία (value) κατά τη διαδικασία του conditioning. Βέβαια, κατά την εκδήλωση operant conditioning, η ντοπαμίνη δεν κωδικοποιεί σε όλους τους οργανισμούς για απωθητικά ερεθίσματα. Στην *Aplysia* που απαιτείται τόσο κατά το classical όσο και κατά το operant conditioning, οδηγεί στην εκδήλωση θετικών συσχετισμών (appetitive reinforcement) (Brembs et al., 2002) ενώ αντίστοιχος είναι και ο ρόλος της στον άνθρωπο, όπου συμμετέχει στην εκδήλωση appetitive παρά aversive reinforcement (Mirenowicz and Schultz, 1996).

### **1.3. Τα κανάλια ASIC μέλη της υπεροικογένειας των DEG/ENaCs: Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά**

Η υπεροικογένεια των DEG/ENaCs είναι μια ομάδα πρωτεϊνών που περιλαμβάνει μέλη τα οποία απαντώνται από το νηματώδη μέχρι και τον άνθρωπο και επιτελούν μια σειρά από διαφορετικές λειτουργίες (Εικόνα 1α). Πρόκειται για κανάλια ιόντων που τοποθετούνται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και επιτρέπουν την είσοδο ιόντων νατρίου στο εσωτερικό αυτών. Τα μόρια αυτά εισάγουν σε μικρότερο βαθμό και ιόντα ασβεστίου ενώ κοινό χαρακτηριστικό όλων είναι ότι η λειτουργία τους διακόπτεται από τη χημική ένωση amiloride (Kellenberger and Schild, 2002). Το μήκος για μια DEG/ENaC κυμαίνεται από 550

ως 950 αμινοξικά κατάλοιπα. Η λειτουργική ανάλυση των καναλιών σε συνδυασμό με πειράματα μεταλλαξογένεσης έδειξε ότι μοιράζονται κοινά και συντηρημένα μοτίβα τα οποία έχουν βρεθεί να είναι σημαντικά τόσο για τη λειτουργία όσο και την τοπολογία τους. Έτσι, η αλληλουχία μιας τυπικής DEG/ENaC περιλαμβάνει δυο διαμεμβρανικές περιοχές (MSDI και II) με τα δυο άκρα της πρωτεΐνης (αμινοτελικό και καρβοξυτελικό) να έχουν σχετικά μικρό μήκος και να βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου (Tavernarakis et al., 2001). Το μεγαλύτερο μέρος του μορίου εμφανίζεται να είναι εξωκυττάριο (Garcia-Anoneros et al., 1997) και να περιλαμβάνει τρεις διακριτές και εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές, πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης (CRD) αλλά και μια περιοχή που σχετίζεται με τη νευροτοξικότητα των μορίων όταν υποστεί μεταλλαγές (Εικόνα 1β) (Tavernarakis and Driscoll, 2000). Οι παραπάνω συντηρημένες αλληλουχίες αποτελούν τη βάση για τη συγκρότηση της υπεροικογένειας των DEG/ENaCs εφόσον στην οικογένεια αυτή εντάσσονται μόρια, μη χαρακτηρισμένα ως τώρα, με μόνο κριτήριο την ύπαρξη ομολογίας σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας.



**Εικόνα 1:** α) Δενδρόγραμμα που απεικονίζει τη φυλογενετική σχέση μεταξύ πρωτεϊνών της οικογένειας DEG/ENaCs σε διαφορετικούς οργανισμούς. Οι γενετικά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες στο νηματώδη φαίνονται με κόκκινα γράμματα (ASIC-1, DEG-1, DEL-1, FLR-1, MEC-4, MEC-10, UNC-8, and UNC-105). Τα μέλη της οικογένειας που ανήκουν σε θηλαστικά φαίνονται με κόκκινες γραμμές, ενώ με πράσινες απεικονίζονται τα αντίστοιχα μέλη της δροσόφιλα. β) Σχηματική απεικόνιση της δομής μιας τυπικής ASIC. Φαίνονται οι περιοχές πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης, οι δυο διαμεμβρανικές περιοχές του καναλιού και το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο του μορίου να εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα.

Μια ομάδα πρωτεϊνών που ανήκει στις DEG/ENaCs είναι οι ASICs. Η ονομασία τους αντικατοπτρίζει τη λειτουργία που επιτελούν (acid sensing ion channels). Πρόκειται δηλαδή για κανάλια ιόντων νατρίου τα οποία ενεργοποιούνται από την ελάττωση του pH (Krishtal and Pidoplichko, 1980). Πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας στους κινητικούς μύες του καινοραβδίτη έχουν δείξει ότι υπάρχουν ASICs οι οποίες ελέγχουν την ημιτονοειδή κίνηση του οργανισμού. Έτσι, η ελάττωση του εξωκυττάρου pH προκαλεί την αλλαγή του δυναμικού στη μεμβράνη των μυϊκών κυττάρων, φαινόμενο που αναστέλλεται από την ένωση amiloride. Οι ASICs έχουν μελετηθεί εκτενώς σε οργανισμούς-μοντέλα θηλαστικών. Για πρώτη φορά, ένα μέλος της οικογένειας των DEG/ENaCs βρέθηκε να ενεργοποιείται από την ελάττωση του pH στον οργανισμό *Rattus norvegicus* όταν με πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας σε τομές νωτιαίου μυελού μετρήθηκε η αλλαγή του δυναμικού της μεμβράνης παρουσία και απουσία του καναλιού ASIC1 (Krishtal and Pidoplichko, 1980). Σήμερα έχουν αναγνωριστεί τέσσερα διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν για ASICs στα θηλαστικά (*asic1-4*) ενώ από τα γονίδια *asic1* και την *asic2* προκύπτουν διαφορετικές ισομορφές των αντίστοιχων πρωτεϊνών μέσω εναλλακτικού ματίσματος.

Η συγκρότηση ενός καναλιού ASIC αποτελείται συνήθως από διαφορετικές υπομονάδες και επομένως η αναφορά σε μια πρωτεΐνη ASIC στην πραγματικότητα απευθύνεται σε μια υπομονάδα του καναλιού. Τα κανάλια των ASICs μπορούν να συγκροτούνται είτε από τις ίδιες υπομονάδες, οπότε είναι ομομερή είτε από το συνδυασμό διαφορετικών υπομονάδων ASIC οπότε είναι ετερομερή. Η σύσταση αυτή των υπομονάδων αλλά και η στοιχειομετρία τους για τη συγκρότηση ενός καναλιού ASIC αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας. Πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας μετά από εκτοπική έκφραση των καναλιών και συνανοσοκατακρήμνιση δείχνουν ότι όλες οι φυσικοχημικοί παράμετροι που χαρακτηρίζουν ένα κανάλι ASIC διαφοροποιούνται ανάλογα με τη σύστασή του σε επίπεδο υπομονάδων (Bassilana et al., 1997). Έτσι, όλες οι υπομονάδες των ASICs μπορούν να σχηματίσουν ομομερή με εξαίρεση την ASIC3. Επίσης, όλες οι υπομονάδες σχηματίζουν ετερομερή με την ASIC1, με εξαίρεση το συνδυασμό ASIC1/ASIC3 (Hesslager et al., 2004). Η στοιχειομετρία των καναλιών που σχηματίζονται από ίδιες ή διαφορετικές υπομονάδες των ASICs υπολογίστηκε *in vivo* με τη μέθοδο FRET, ενώ οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν και με πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας σε κύτταρα CHO. Έτσι, βρέθηκε ότι λειτουργικά κανάλια είναι δυνατό να προκύψουν είτε ως ομομερή (1α/1α, 2α/2α, 2β/2β) είτε ως ετερομερή (1α/2β, 2α/2β). Επιπρόσθετα, ένα λειτουργικό ετερομερές κανάλι βρέθηκε να αποτελείται από δυο υπομονάδες 1α και δυο υπομονάδες 2β (Gao et al., 2007).

Τα παραπάνω λειτουργικά κανάλια εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες σε ότι αφορά την ευαισθησία τους στο pH. Έτσι, η χαμηλότερη τιμή του pH (4,5) απαιτείται για την ενεργοποίηση του καναλιού ASIC2a και η ψηλότερη (6,4) για την ενεργοποίηση του καναλιού ASIC3. Τα ομομερή ASIC1a ενεργοποιούνται σε τιμές του pH μεταξύ 5,8 και 6,1. Η ενεργοποίηση αυτή φτάνει στο μέγιστο σε χρονικά διαστήματα μεταξύ 10 και 15  $\mu$ s επιτρέποντας την επιλεκτική είσοδο ιόντων νατρίου (Hesselager et al., 2004). Εκτός όμως από την υψηλή ταχύτητα απόκρισης ένα επιπλέον χαρακτηριστικό της λειτουργίας των καναλιών είναι και η εκπληκτικά υψηλή τους ευαισθησία σε αλλαγές του pH. Έτσι, έχει δειχθεί ότι η αγωγιμότητα των καναλιών διπλασιάζεται όταν προκύψουν αλλαγές του pH της τάξης των 0,05 μονάδων επιβεβαιώνοντας τη δράση τους ως αισθητήρες πρωτονίων, ενώ τα κανάλια ASIC1a και ASIC2a ενεργοποιούνται από την ελάττωση μόνο του εξωκυττάριου pH και όχι του ενδοκυττάριου. Σε ότι αφορά τη συνάφειά τους, τα συγκεκριμένα κανάλια εμφανίζουν ισχυρή προτίμηση για ιόντα νατρίου. Εντούτοις και ανάλογα με τη σύσταση των υπομονάδων που τα συγκροτούν (ομο- ή ετερομερή) επιτρέπουν και την είσοδο και ιόντων ασβεστίου (Yermolaieva et al., 2004). Η ιοντική αυτή αναλογία ( $P_{Na^+}/P_{Ca^{2+}}$ ) κυμαίνεται από 2,5 για ομο(δι)μερή ASIC1a μέχρι και 100 για τα κανάλια ASIC3 και ASIC1b (Sutherland et al., 2001). Επίσης, βρέθηκε ότι τα ιόντα ασβεστίου έχουν διπλή ιδιότητα και κάποιες φορές έχουν ανασταλτική επίδραση στην αγωγιμότητα των ASICs (Jospin and Allard, 2004; Paukert et al., 2004; Zhang et al., 2006).

### 1.3.1. Ο ρόλος των ASICs στο περιφερικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών

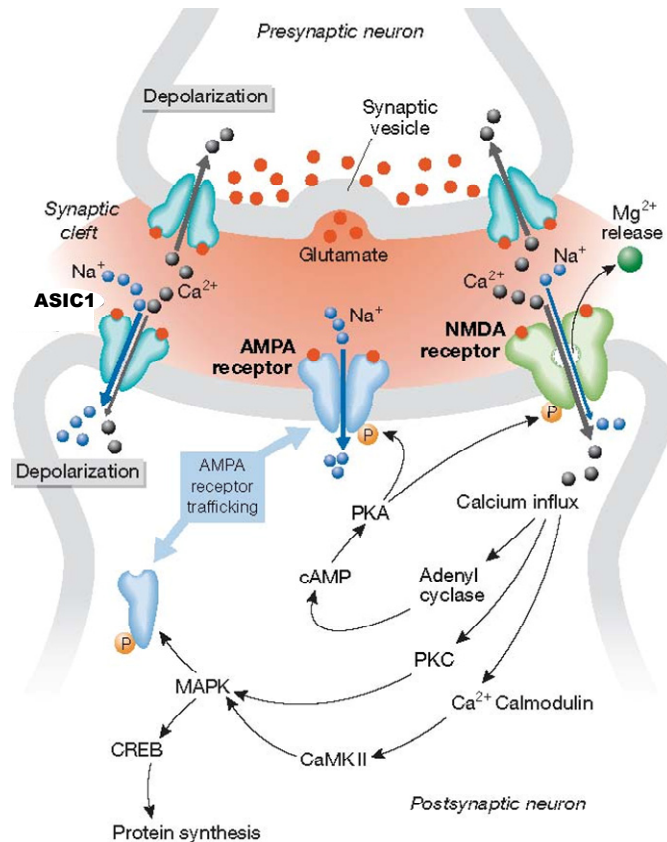
Η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα παραπάνω κανάλια εμφανίζεται εξαιρετικά έντονη στο νευρικό σύστημα. Οι ASIC1a, ASIC2a και ASIC2b εκφράζονται τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα ενώ η ASIC3 κυρίως στο περιφερικό (Alvarez de la Rosa et al., 2003). Η κατανομή κάποιων ASICs στο περιφερικό νευρικό σύστημα και ειδικά η ανίχνευσή τους σε αισθητήριους νευρώνες διαφορετικών οργάνων και ιστών (Benson et al., 2002; Waldmann et al., 1999) οδήγησε στη διατύπωση της άποψης ότι η λειτουργία τους είναι πιθανό να σχετίζεται με τη διαδικασία της αίσθησης του πόνου (Waldmann et al., 1997). Κι αυτό, καθώς η αλλαγή της ομοιόστασης ή η παρουσία φλεγμονής οδηγούν σε πτώση του pH, σε τέτοιο βαθμό ώστε να είναι δυνατή η ενεργοποίηση των καναλιών αυτών (Poirot et al., 2006). Κάτι τέτοιο φαίνεται ότι ισχύει καθώς έχει διαπιστωθεί ότι η έκφραση των ASICs εξαρτάται από φλεγμονώδεις παράγοντες και ότι η δράση τους αναστέλλεται από μη στεροειδείς αντιφλεγμονώδεις ουσίες (Mamet et al.,

2002; Voilley et al., 2001). Ο ρόλος των ASICs στην αντίληψη ερεθισμάτων επιβεβαιώνεται και από γενετικά πειράματα και φαινοτυπικές αναλύσεις. Έτσι, στελέχη ποντικού που φέρουν μηδενικές μεταλλάξεις για την ASIC2 και ASIC3 εμφανίζουν αδυναμία αντίληψης ελαφρών ή επίπινων μηχανικών και θερμικών ερεθισμάτων αντίστοιχα. Παράλληλα, διαπιστώθηκε ότι στην αίσθηση των ερεθισμάτων αυτών μεσολαβούν κανάλια αποτελούμενα κυρίως από διαφορετικές υπομονάδες (ετερομερή) παρά όμοιες (ομομερή) (Chen et al., 2002; Price et al., 2001). Όμως και το κανάλι ASIC1α έχει βρεθεί να παίζει ρόλο στην αντίληψη επώδυνων ερεθισμάτων στα τρωκτικά. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η ένωση *Psalmotoxin 1* έχει ισχυρά αναλγητικές ιδιότητες σε επώδυνα θερμικά, χημικά και μηχανικά ερεθίσματα εξαιτίας της καταστολής της λειτουργίας του καναλιού ASIC1a (Mazzuca et al., 2007).

### 1.3.2. Ο ρόλος των ASICs στο κεντρικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών

Εκτός της έκφρασης ορισμένων ASICs στο περιφερικό νευρικό σύστημα, παρατηρείται ισχυρός εντοπισμός και σε περιοχές του εγκεφάλου του ποντικού όπως ο ιππόκαμπος, ο οσφρητικός λοβός και η παρεγκεφαλίδα (Alvarez de la Rosa et al., 2003). Οι περιοχές αυτές χαρακτηρίζονται από μεγάλη πλαστικότητα στη λειτουργία και στον άνθρωπο ελέγχουν συμπεριφορές όπως ο εθισμός, η αυτόβουλη κίνηση και η μνήμη. Για την κατανόηση του τρόπου δράσης των ASICs σε αυτές τις περιοχές του εγκεφάλου έγινε προσπάθεια ανίχνευσης της θέσης τους στους παραπάνω νευρώνες. Υποκυτταρικός εντοπισμός του καναλιού ASIC1 στον ποντικό έδειξε ότι συνεντοπίζεται με το μετασυναπτικό μάρτυρα PSD-95, ενώ παρατηρήθηκε και έντονη συγκέντρωση στους δενδρίτες των νευρώνων του ιππόκαμπου οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το κανάλι ASIC1 αποτελεί συναπτικό μόριο των νευρώνων αυτών (Wemmie et al., 2002). Σημαντικό επίσης είναι το γεγονός ότι κατά την απομόνωση συναπτοσωμάτων από περιοχές του ιππόκαμπου, το κανάλι ASIC1 εντοπίζεται περισσότερο στις μετασυναπτικές πλευρές της μεμβράνης χωρίς ωστόσο να αποκλείεται η έκφρασή του και σε προσυναπτικές περιοχές. Έτσι προκύπτει το ερώτημα για τον πιθανό τρόπο με τον οποίο η συγκεκριμένη ASIC λειτουργεί στις διαφορετικές πλευρές της σύναψης. Για την εξακρίβωση της λειτουργίας του καναλιού πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας. Βρέθηκε ότι στους παραπάνω νευρώνες το κανάλι ASIC1 ελέγχει τη δημιουργία δυναμικού στη μεμβράνη με βάση τις αλλαγές του εξωκυττάριου pH (Wemmie et al., 2002). Περαιτέρω ανάλυση της λειτουργίας του οδήγησε στην παρατήρηση ότι η μεταλλαγή του δεν προκαλεί αλλαγές στη βασική συναπτική λειτουργία. Εντούτοις, το μεταλλαγμένο στέλεχος ASIC1<sup>(-/-)</sup> παρουσιάζει αδυναμία εκδήλωσης «μακράς διάρκειας ενίσχυση της συναπτικής ενεργότητας» ή Long

Term Potentiation (LTP) στους νευρώνες όπου εκφράζεται υποδεικνύοντας το ρόλο του ASIC1 στη συναπτική πλαστικότητα. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από πειράματα συμπεριφοράς στα οποία η μεταλλαγή του ASIC1 προκαλεί μειωμένη ικανότητα εκδήλωσης χωρικής μάθησης (spatial learning) (Wemmie et al., 2002) και συσχέτισμού διαφορετικών ερεθισμάτων (fear conditioning) (Wemmie et al., 2003). Παρά ταύτα, τα άτομα του μεταλλαγμένου στελέχους διατηρούν ένα μέρος της ικανότητάς τους για μνήμη και μάθηση υποδεικνύοντας ότι το συγκεκριμένο μόριο έχει ένα μάλλον ρυθμιστικό παρά θεμελιώδη ρόλο στην πλαστικότητα του νευρικού συστήματος. Σε μια αντίθετη προσέγγιση η υπερέκφραση του γονιδίου ASIC1 του αγρίου τύπου οδηγεί στην αύξηση της ικανότητας μνήμης και μάθησης όπως φάνηκε από τους αντίστοιχους φαινοτυπικούς ελέγχους (Wemmie et al., 2004). Η ανάλυση του φαινομένου σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο με γενετικά και ηλεκτροφυσιολογικά πειράματα έδειξε ότι η μεταλλαγή του υποδοχέα γλουταμικού NMDA ή της κινάσης PKC παρακάμπτει τις φαινοτυπικές ανωμαλίες στο LTP που προκαλούνται από τη μεταλλαγή του ASIC1 (Wemmie et al., 2002). Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το κανάλι ASIC1 δρα πριν από το κανάλι NMDA και την κινάση PKC και πιθανώς ρυθμίζει τη λειτουργία τους.



**Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου δράσης του καναλιού ASIC1 στο μετασυναπτικό νευρώνα κατά την εκδήλωση του φαινομένου του LTP.** Η ενεργοποίηση του καναλιού ASIC1 προκαλεί την είσοδο ιόντων νατρίου και την εκπόλωση του μετασυναπτικού νευρώνα. Το ηλεκτρικό δυναμικό που δημιουργείται επιτρέπει την απελευθέρωση των ανασταλτικών για τη δράση των καναλιών NMDA, ιόντων  $Mg^{2+}$ . Η ενεργοποίηση των NMDAs επάγει ασβέστιο-εξαρτώμενα ενδοκυτταρικά μονοπάτια που οδηγούν στην εκδήλωση LTP και σε φαινόμενα μνήμης και μάθησης.

Από την παραπάνω μελέτη φάνηκε ότι το κανάλι ASIC1 έχει σημαντικό ρόλο στην πλαστικότητα του νευρικού συστήματος των θηλαστικών. Το γεγονός μάλιστα ότι εντοπίζεται στις συνάψεις των νευρώνων του ιππόκαμπου και επηρεάζει το φαινόμενο του LTP υποδεικνύει τον πιθανό του ρόλο στην ενίσχυση της νευροδιαβίβασης. Ποιος όμως μπορεί να είναι ο μηχανισμός που επιτυγχάνεται κάτι τέτοιο; Μια απάντηση στο καίριο αυτό ερώτημα και με βάση τα παραπάνω, θα μπορούσε να είναι η απευθείας αλληλεπίδραση μεταξύ ASIC1 και NMDA. Είναι δηλαδή πιθανό κατά τη νευροδιαβίβαση, η ελάττωση του εξωκυττάρου pH (Krishtal et al., 1987) να επάγει τη λειτουργία του ASIC1 στις μετασυναπτικές περιοχές και αυτό με τη σειρά του να προκαλεί αλλαγή του δυναμικού της μεμβράνης, δηλαδή να την εκπολώνει. Η δημιουργία ηλεκτρικού δυναμικού στη μεμβράνη του μετασυναπτικού νευρώνα είναι πιθανό να προκαλεί την απελευθέρωση των ιόντων  $Mg^{2+}$ , τα οποία αναστέλλουν τη δράση των καναλιών NMDA και έτσι να οδηγεί στην ενεργοποίησή τους (Voglis and Tavernarakis, 2006) (Εικόνα 2). Επομένως, η νευροδιαβίβαση που λαμβάνει χώρα στον προσυναπτικό νευρώνα είναι σύμφωνα με το μοντέλο αυτό η αιτία ενεργοποίησης του ASIC1 που με τη σειρά του επάγει την περαιτέρω ενίσχυσή της. Από την άλλη και όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι ASICs, εκτός από ιόντα νατρίου επιτρέπουν σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό και την είσοδο ιόντων ασβεστίου (Yermolaieva et al., 2004). Τα ιόντα αυτά αποτελούν σημαντικό παράγοντα επαγωγής του LTP (Voglis and Tavernarakis, 2006) και επομένως είναι πιθανό η δράση του ASIC1 στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης να σχετίζεται και με την είσοδο ιόντων ασβεστίου. Εντούτοις, ένα ανοιχτό ερώτημα που παραμένει σχετίζεται με την πιθανή λειτουργία του καναλιού στην προσυναπτική περιοχή του νευρώνα όπως αυτή ανιχνεύθηκε από πειράματα απομόνωσης συναπτοσωμάτων (Wemmie et al., 2002).

## **2. Μελέτη της μνήμης και της μάθησης στον οργανισμό *Caenorhabditis elegans***

Το φαινόμενο της μνήμης και της μάθησης είναι για τους οργανισμούς μια θεμελιώδης διαδικασία που δίνει τη δυνατότητα για την λογική αντίληψη του περιβάλλοντος. Ο



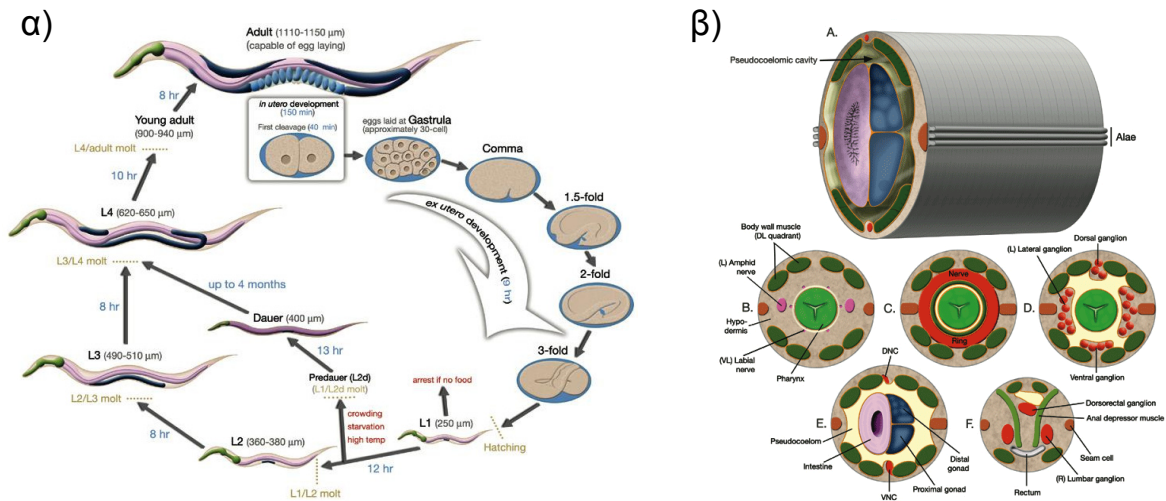
νηματώδης *C. elegans* αρχικά έγινε γνωστός από τις μελέτες που αφορούν την ανάπτυξη του και τη μελέτη φαινομένων όπως ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Η επιλογή του οργανισμού όμως από τον Sydney Brenner έγινε στη βάση της παρατήρησης ότι διαθέτει ένα σταθερό (σε αριθμό νευρώνων) νευρικό σύστημα. Από την αρχή της μελέτης του οργανισμού τέθηκε λοιπόν το ερώτημα για το αν ένα τέτοιο στερεοτυπικό νευρικό σύστημα διαθέτει πλαστικότητα. Με άλλα λόγια το εύλογο ερώτημα που προέκυψε ήταν το αν μπορεί ο *C. elegans* να μάθει. Σήμερα και μετά από θεμελιώδεις μελέτες για το φαινόμενο στον οργανισμό, το παραπάνω ερώτημα έχει μετατραπεί στο τι δεν μπορεί ο οργανισμός να μάθει. Ο νηματώδης σαφώς δεν έχει την ικανότητα να θυμάται εικόνες καθώς δε διαθέτει όραση. Όμως, μπορεί μέσα από ένα εκπληκτικής ακρίβειας χημειο- και θερμο-υποδοκτικό σύστημα να εκδηλώνει πολύπλοκες μορφές μνήμης και μάθησης δείχνοντας ότι το στερεοτυπικό του νευρικό σύστημα χαρακτηρίζεται από απίστευτη πλαστικότητα στη λειτουργία. Τα χαρακτηριστικά του οργανισμού και του νευρικού του συστήματος, αλλά και τα παραδείγματα πλαστικότητας στη συμπεριφορά του περιγράφονται στη συνέχεια.

### 2.1. Η βιολογική “πλατφόρμα” *Caenorhabditis elegans*

Ο οργανισμός *Caenorhabditis elegans* ή *C. elegans* είναι ένα μικρό ερμαφρόδιτο νηματώδες σκουλήκι με μέγιστο μήκος ~1 mm το οποίο ζει στο χώμα και τρέφεται κυρίως με βακτήρια. Η διάρκεια του αναπαραγωγικού του κύκλου εξαρτάται από τη θερμοκρασία και ολοκληρώνεται σε 2,5 ημέρες στους 25 °C και σε 4,5 στους 15 °C. Με την ολοκλήρωσή του κάθε ενήλικο άτομο του αγρίου τύπου δίνει 200-250 απογόνους. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες αναπτύσσεται και αναπαράγεται κανονικά, με την ανάπτυξή του να αρχίζει από το γονιμοποιημένο αυγό και μέσα από τέσσερα στάδια νύμφης να φτάνει στο ενήλικο στάδιο οπότε ζει για 2-3 εβδομάδες (Εικόνα 3α) (Brenner, 1974). Εντούτοις, κάτω από αντίξοες συνθήκες όπως ακραίες θερμοκρασίες, έλλειψη φαγητού και υπερπληθυσμό, τα άτομα που βρίσκονται στο δεύτερο στάδιο νύμφης εισέρχονται σε ένα εναλλακτικό αναπτυξιακό στάδιο, τη φάση dauer, όπου και επιβιώνουν (~4 μήνες) μέχρι οι συνθήκες να γίνουν και πάλι ευνοϊκές, οπότε ο οργανισμός εισέρχεται και πάλι στο τέταρτο στάδιο νύμφης απ’ όπου συνεχίζει την ανάπτυξή του φυσιολογικά (Εικόνα 3α) (Golden and Riddle, 1984).

Ο *C. elegans* χαρακτηρίζεται ως μια βιολογική πλατφόρμα, κατάλληλη για τη μελέτη πολύπλοκων βιολογικών λειτουργιών. Ποια είναι όμως εκείνα τα χαρακτηριστικά και ποιές οι δυνατότητες που παρέχει ο συγκεκριμένος οργανισμός για την πραγματοποίηση τέτοιων μελετών; Αρχικά, ο νηματώδης έχει απλό σχήμα και βιολογικές δομές που είναι εύκολες στην

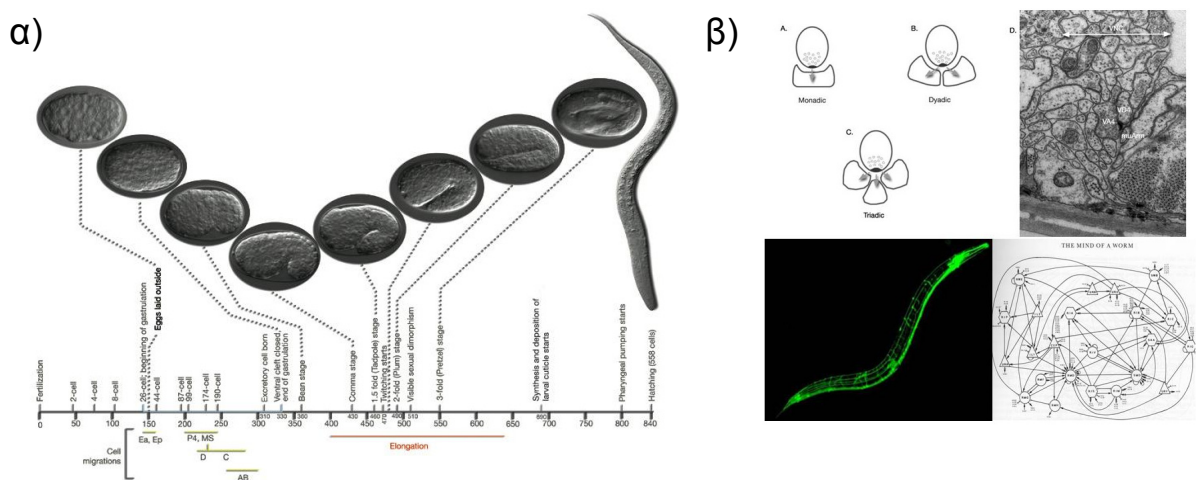
παρατήρηση και την ανάλυση με διάφορες μεθόδους μικροσκοπίας (Ward et al., 1975; White et al., 1986).



**Εικόνα 3: Ανάπτυξη και δομή του σώματος του οργανισμού *C. elegans*.** α) Σχηματική απεικόνιση του κύκλου ζωής του *Caenorhabditis elegans* στους 22<sup>o</sup>C (<http://www.wormatlas.org>). β) Σχηματική απεικόνιση του σώματος του νηματώδη. Φαίνονται σε εγκάρσιες τομές οι διαφορετικοί ιστοί που αποτελούν το σώμα και η σχετική τους θέση σε αυτό (<http://www.wormatlas.org>).

Το σχήμα του οργανισμού είναι σχεδόν κυλινδρικό και δε χαρακτηρίζεται από μεταμέρεια. Συνίσταται από δυο κυλινδρικές δομές, μια εξωτερική και μια εσωτερική, οι οποίες χωρίζονται μεταξύ τους σχηματίζοντας τον ψευδοκυκλωματικό χώρο. Η εξωτερική κυλινδρική δομή αποτελεί το τοίχωμα του οργανισμού (body wall). Αυτό συνίσταται από την επιδερμίδα η οποία αποτελείται από κολλαγόνο, την υποδερμίδα η οποία αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα, το απεκκριτικό σύστημα, νευρώνες και μύες. Η εσωτερική κυλινδρική δομή αποτελείται από το φάρυγγα, που σχηματίζουν μυϊκά κύτταρα, το έντερο, που σχηματίζουν επιθηλιακά κύτταρα και τη γονάδα (Εικόνα 3β). Όλοι οι παραπάνω ιστοί βρίσκονται υπό υδροστατική πίεση η οποία παρέχει στήριξη και συνοχή στους ιστούς. Έτσι, αναφέρεται ότι ο νηματώδης φέρει έναν υδροστατικό σκελετό. Σημαντική ιδιότητα του οργανισμού που βοήθησε στην παρατήρηση της ανάπτυξής του είναι το γεγονός ότι σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια είναι διάφανος. Έτσι, η παρατήρηση με οπτικό μικροσκόπιο έκανε δυνατή την ανάλυση του εμβρυϊκού και μετα-εμβρυϊκού αναπτυξιακού προτύπου (Εικόνα 4α). Μάλιστα, ο νηματώδης είναι ο πρώτος πολυκύτταρος οργανισμός του οποίου έχει καταγραφεί το σύνολο των κυτταρικών διαιρέσεων από το ζυγωτό μέχρι και το ενήλικο άτομο (Sulston and Horvitz, 1977). Είναι λοιπόν γνωστό ότι το ενήλικο ερμαφρόδιτο άτομο

αποτελείται από 959 σωματικά κύτταρα, ενώ το αντίστοιχο αρσενικό από 1031. Επιπρόσθετα, με την εφαρμογή μεθόδων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αναλύθηκαν οι ιστοί που αποτελούν τον οργανισμό, ενώ έμφαση δόθηκε στο νευρικό του σύστημα. Αυτό ανασυστήθηκε μετά από διαδοχική παρατήρηση εγκάρσιων τομών ολόκληρου του οργανισμού με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Μέσα από την προσπάθεια αυτή έγινε γνωστό το πλήρες διάγραμμα των νευρωνικών συνδέσεων, γνωστό και ως “wiring diagram”, κάτι που είναι μοναδικό για οποιοδήποτε οργανισμό μέχρι σήμερα. Βρέθηκε ότι το νευρικό σύστημα του *C. elegans* αποτελείται από 302 νευρώνες οι οποίοι χωρίζονται σε 118 κλάσεις με βάση μορφολογικά και βιοχημικά κριτήρια (White et al., 1976, 1986). Η εκτεταμένη μελέτη του νευρικού συστήματος έχει οδηγήσει στην ταυτοποίηση της λειτουργίας επιμέρους νευρώνων, αλλά και στην αναγνώριση νευρωνικών δικτύων που ελέγχουν μια σειρά από φυσιολογικές λειτουργίες (Εικόνα 4β).



**Εικόνα 4:** α) Εικόνες από διαφορετικά εμβρυικά αναπτυξιακά στάδια του νηματώδη στους 22<sup>0</sup>C. Οι εικόνες αυτές προέκυψαν μετά από παρατήρηση του αυγού με οπτικό μικροσκόπιο (<http://www.wormatlas.org>). β) Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό και συνεστιακό μικροσκόπιο και σχηματική απεικόνιση χημικών νευρικών συνάψεων καθώς και του νευρωνικού κυκλώματος που ελέγχει για την ημιτονοειδή κίνηση του οργανισμού (<http://www.wormatlas.org>).

Όμως, ο νηματώδης δεν διακρίνεται μόνο από την εκτεταμένη γνώση που είναι διαθέσιμη σε σχέση με το αναπτυξιακό πρότυπο και το νευρικό σύστημα. Εξαιρετικής σημασίας είναι η ευκολία πραγματοποίησης μεταλλαξογένεσης αλλά και μετασχηματισμού. Φθορίζοντες μάρτυρες και άλλα χημικά μόρια είναι εφικτό να εκφραστούν εκτοπικά στον οργανισμό δίνοντας τη δυνατότητα ταυτοποίησης του μοτίβου έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, τη διάσωση φαινοτυπικών ανωμαλιών κ.α.. Από την άλλη τα μεταλλαγμένα

αλληλόμορφα μπορούν να κλωνοποιηθούν με τη χρήση χαρακτηρισμένων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Koch et al., 2000; Wicks et al., 2001) αλλά και ενός πλήρη φυσικού χάρτη με επικαλυπτόμενους κοσμιδιακούς κλώνους οι οποίοι περιλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος των χρωμοσωμάτων του οργανισμού (Chalfie et al., 1995; Coulson et al., 1995). Το γονιδίωμα ενός ερμαφρόδιτου ατόμου αποτελείται από 6 ζεύγη χρωμοσωμάτων, 5 αυτοσωμικών και 1 φυλετικού (XX), ενώ το γονιδίωμα ενός αρσενικού ατόμου περιλαμβάνει 5 ζεύγη αυτοσωμικών και ένα μόνο φυλετικό χρωμόσωμα (XO). Τέλος, το γονιδίωμα του *C. elegans* υπήρξε το πρώτο πολυκύτταρου οργανισμού που αλληλουχήθηκε πλήρως (1998) ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)).

## 2.2. Degenerins: μέλη της υπεροικογένειας των DEG/ENaCs στον *C. elegans*

Η αλληλούχηση του γονιδιώματος του καινοραβδίτη έφερε στο φώς την ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων, τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή ομοιότητα στην αλληλουχία τους με τα αντίστοιχα των θηλαστικών. Πολλά από τα γονίδια αυτά έχουν κλωνοποιηθεί σήμερα επιβεβαιώνοντας την πρόβλεψη ότι η ομοιότητα στην αλληλουχία συνεπάγεται συχνά και ομοιότητα σε επίπεδο λειτουργίας. Μια ομάδα πρωτεϊνών που εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα στην αλληλουχία (Krishtal, 2003) και συναντώνται από το νηματώδη μέχρι και σε ανώτερα θηλαστικά όπως ο ποντικός και ο άνθρωπος είναι η υπεροικογένεια των DEG/ENaCs. Στο νηματώδη έχουν αναγνωριστεί 30 διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν για μέλη της υπεροικογένειας των DEG/ENaCs και ονομάζονται degenerins (Εικόνα 1α). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι συγκεκριμένες μεταλλαγές σε ορισμένες degenerins προκαλούν τον εκφυλισμό των κυττάρων όπου εκφράζονται λόγω επαγωγής νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου (Driscoll and Chalfie, 1991). Από τις 30 degenerins που υπολογίζεται ότι περιλαμβάνονται στο γονιδίωμα του *C. elegans*, μόνο 7 έχουν χαρακτηριστεί γενετικά μέχρι σήμερα. Έτσι, έχει βρεθεί ότι τα συγκεκριμένα κανάλια ιόντων νατρίου συμμετέχουν στη διαδικασία αντίληψης μηχανικών ερεθισμάτων (Syntichaki and Tavernarakis, 2004; Tavernarakis and Driscoll, 1997, 2001a, b), στην εκδήλωση της ημιτονοειδούς κίνησης του οργανισμού (Tavernarakis et al., 1997), στη ρύθμιση ουλτραδιανών ρυθμών, ενώ επάγουν νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο όταν υποστούν μεταλλαγές (Hong et al., 2000).

Ένα ερώτημα που παραμένει ανοιχτό και σχετίζεται με τις degenerins αφορά την ύπαρξη ASICs ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας. Για την αναγνώριση ASICs στον καινοραβδίτη έγιναν πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας σε συνδυασμό με γενετικές αναλύσεις. Έτσι, βρέθηκε ότι είναι δυνατή η επαγωγή ηλεκτρικού δυναμικού από την ελάττωση του pH στους μύες του οργανισμού. Μάλιστα, φάνηκε ότι η μεταλλαγή του καναλιού UNC-105, μιας

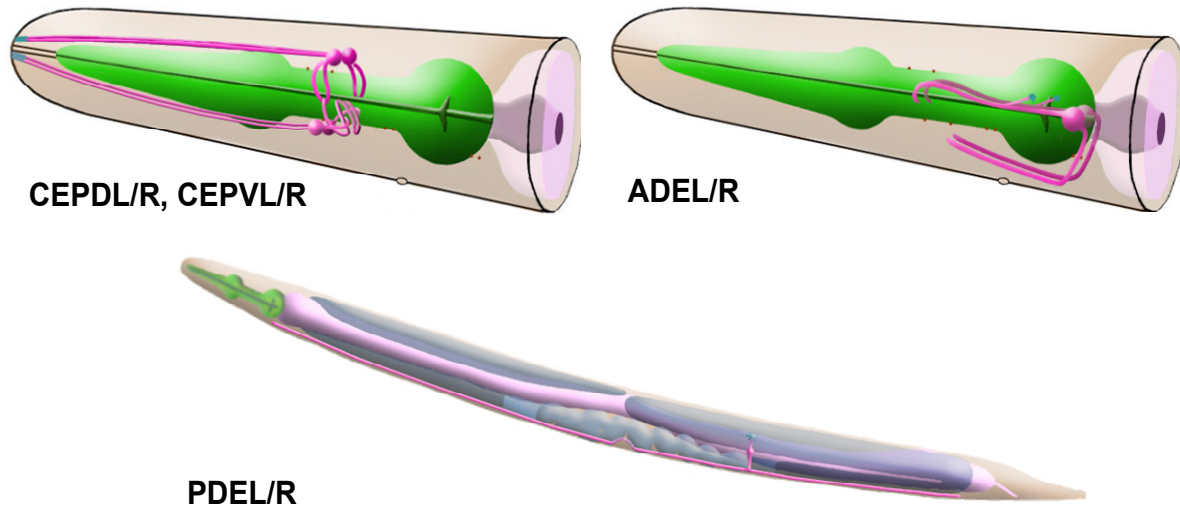
υποψήφιας ASIC, δεν αλλάζει την ευαισθησία των μυικών κυττάρων στην ελάτωση του pH υποδεικνύοντας την ύπαρξη άλλων ASICs στο νηματώδη (Jospin and Allard, 2004; Jospin et al., 2004). Παρά την πρόβλεψη ότι ο νηματώδης φέρει λειτουργικές ASICs, μέχρι σήμερα δεν έχει καταστεί δυνατή η κλωνοποίηση και ο χαρακτηρισμός τους. Εντούτοις, εκτός από τα παραπάνω πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας και την ομοιότητα πολλών πρωτεϊνών σε επίπεδο αλληλουχίας, αξίζει να σημειωθεί ότι η ύπαρξη των ASICs γίνεται πιθανή και από το γεγονός ότι ο οργανισμός αντιλαμβάνεται περιβάλλοντα με χαμηλό pH εκδηλώνοντας έντονη απωθητική απόκριση (Ward, 1973).

### **2.3. Το σύστημα ντοπαμίνης στο νηματώδη *C. elegans***

#### **2.3.1. Νευρωνικό δίκτυο**

Η βιογενής αμίνη ντοπαμίνη αναγνωρίστηκε στο νηματώδη σε μια προσπάθεια ανίχνευσης νευροδιαβιβαστών, κοινών με αυτούς των θηλαστικών. Έτσι, με τη μέθοδο της επαγωγής φθορισμού μέσω φορμαλδεΐδης (FIF) αναγνωρίστηκαν νευρώνες οι οποίοι συνθέτουν ντοπαμίνη στο νηματώδη (Sulston et al., 1975). Βρέθηκε ότι 8 συνολικά νευρώνες στο ερμαφρόδιτο άτομο και 14 στο αρσενικό συνθέτουν τη συγκεκριμένη αμίνη, συγκροτώντας το ντοπαμινεργικό σύστημα του οργανισμού. Στο ερμαφρόδιτο άτομο οι 6 από τους 8 νευρώνες εντοπίζονται στο πρόσθιο τμήμα του ζώου στην περιοχή του κεφαλιού. Από αυτούς οι 4 έχουν τα σώματά τους τοποθετημένα μεταξύ πρώτου και δεύτερου φαρυγγικού λοβού, στην περιοχή μπροστά από το νευρικό δακτύλιο. Οι νευρώνες αυτοί ονομάζονται cephalic neurons (CEPs) και εμφανίζουν ανά ζεύγη, συμμετρία στο ραχιαίο-κοιλιακό άξονα (dorsal-ventral), ενώ οι νευρώνες κάθε ζεύγους εμφανίζουν αμφίπλευρη συμμετρία (left-right) (Εικόνα 5). Χαρακτηριστική δομική τους ιδιότητα είναι οι μεγάλοι δενδρίτες που προεκβάλλουν μέχρι το πρόσθιο άκρο του οργανισμού (sensillum) και οι μικροί άξονες που προεκβάλλουν στο νευρικό δακτύλιο. Οι άλλοι δύο πρόσθιοι ντοπαμινεργικοί νευρώνες (ADEs) έχουν τα σώματά τους πίσω και πλευρικά σε σχέση με το δεύτερο φαρυγγικό λοβό και εμφανίζουν επίσης αμφίπλευρη συμμετρία, ενώ φέρουν άξονες που προεκβάλλουν στη νευρική δομή γνωστή ως οπίσθιο γάγγλιο. Οι δενδρίτες τους εμφανίζουν ένα χαρακτηριστικό μεταξύ τους χίασμα ενώ επίσης χαρακτηριστική είναι η προεκβολή που φέρει κάθε δενδρίτης και η οποία οδηγεί στη δομή που καλείται sensillum και βρίσκεται στην πλευρική επιφάνεια της επιδερμίδας (Εικόνα 5). Τέλος, δυο ακόμα νευρώνες εντοπίζονται στο μέσω του σώματος του οργανισμού

(PDEs). Στο αρσενικό άτομο οι 6 επιπλέον νευρώνες εντοπίζονται στην ουρά και συγκεκριμένα σε δομές που είναι υπεύθυνες για τη σύζευξη των ατόμων (mail rays) (Sulston et al., 1975).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων ενός ερμαφρόδιτου ατόμου *C. elegans* (<http://www.wormatlas.org>)

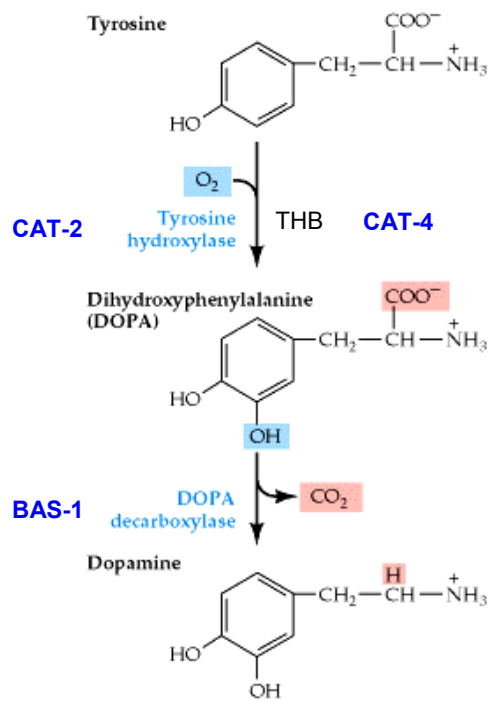
### 2.3.2. Βιοσύνθεση και σηματοδότηση

Η ντοπαμίνη στο νηματώδη σχηματίζεται από το αμινοξύ τυροσίνη, σε μια αντίδραση όπου η δράση της υδροξυλάσης τυροσίνης οδηγεί στο σχηματισμό 1-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) και στη συνέχεια η δράση της αποκαρβοξυλάσης αρωματικών αμινοξέων οδηγεί στο σχηματισμό ντοπαμίνης (DA). Στον *C. elegans* η υδροξυλάση τυροσίνης κωδικοποιείται από το γονίδιο *cat-2* και συμμετέχει αποκλειστικά στη βιοσύνθεση της ντοπαμίνης, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την έκφραση του γονιδίου μόνο στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Lints and Emmons, 1999). Αντίθετα, η αποκαρβοξυλάση αρωματικών αμινοξέων που κωδικοποιείται από το γονίδιο *bas-1* (Loer and Kenyon, 1993) εκτός της βιοσύνθεσης της ντοπαμίνης ελέγχει και τη βιοσύνθεση της σεροτονίνης από το αμινοξύ τρυπτοφάνη. Η αντίδραση σχηματισμού L-DOPA απαιτεί το συνένζυμο tetrahydrobiopterin (THB) το οποίο ελέγχεται από την ενεργότητα της GTP cyclohydrolase (GTPCH) (Karatos et al., 1999). Η συγκεκριμένη υδρολάση φαίνεται να κωδικοποιείται από το γονίδιο *cat-4* το οποίο σύμφωνα με *in silico* ανάλυση φέρει υψηλή ομοιότητα με την ανθρώπινη GTP cyclohydrolase (*gch1*) (1998) (Εικόνα 6).

Τη σύνθεση της ντοπαμίνης ακολουθεί το φόρτωμα στα συναπτικά κυστίδια για τη μετέπειτα μεταφορά του νευροδιαβιβαστή στις συνάψεις. Η διαδικασία αυτή προϋποθέτει την κατάλληλη κλίση πρωτονίων, γεγονός που εξασφαλίζεται από τη δράση της αντλίας πρωτονίων V-ATPase η οποία εντοπίζεται στη μεμβράνη των συναπτικών κυστιδίων (Pujol et al., 2001). Η μεταφορά της ντοπαμίνης στο εσωτερικό των συναπτικών κυστιδίων επιτελείται από το μεταφορέα μονοαμινών CAT-1, ο οποίος εκτός της ντοπαμίνης μεταφέρει και σεροτονίνη (Duerr et al., 1999). Η μεταφορά και η κατανομή των συναπτικών κυστιδίων στους άξονες των κυττάρων γίνεται με τη δράση της κινεσίνης UNC-104. Αυτό επιβεβαιώθηκε από πειράματα εντοπισμού του μεταφορέα CAT-1, σε μεταλλαγμένο γενετικό υπόβαθρο *unc-104*, όπου τα συναπτικά κυστίδια εντοπίζονται στο σώμα του νευρικού κυττάρου και όχι στις συνάψεις του (Hall and Hedgecock, 1991).

Η μεταφορά των συναπτικών κυστιδίων στις συνάψεις έχει ως αποτέλεσμα τη συγκέντρωσή τους σε περιοχές που καλούνται active zones. Στην πραγματικότητα και σε μια υποθετική κατάσταση απόλυτης ηρεμίας του νευρώνα όλα τα συναπτικά κυστίδια βρίσκονται κοντά στη σύναψη «έτοιμα» να απελευθερώσουν το νευροδιαβιβαστή μετά την ενεργοποίηση του νευρώνα. Την έκλυση του νευροδιαβιβαστή ακολουθούν τρία βασικά γεγονότα. Αυτά είναι η πρόσδεση στους υποδοχείς ντοπαμίνης, η επανάκτησή τους στον προσυναπτικό νευρώνα ή/και η αποικοδόμηση στον εξωκυττάριο χώρο. Η αποικοδόμηση των μονοαμινών έχει ως βασικό καταβολίτη το ομοβαλινικό οξύ (homovanilic acid) του οποίου η παρουσία έχει ανιχνευτεί σε εκχυλίσματα του *C. elegans* (Wintle and Van Tol, 2001). Την αντίδραση καταβολισμού των μονοαμινών είναι γνωστό από τα θηλαστικά ότι καταλύει η οξειδάση MAO (monoamine oxidase) με το συνένζυμο catechol-o-methyltransferase (COMT). Αν και πολλές ομόλογες πρωτεΐνες των ενζύμων αυτών προβλέπεται να κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του καινοραβδίτη, δεν έχουν εντούτοις κλωνοποιηθεί μέχρι σήμερα (Wintle and Van Tol, 2001). Παρά ταύτα, ο καταβολισμός του νευροδιαβιβαστή δεν αποτελεί από μόνος του ικανή συνθήκη για τη διακοπή της σηματοδότησης μέσω ντοπαμίνης όπως φάνηκε και από πειράματα ποντικών τα οποία έφεραν μεταλλαγή στο μεταφορέα ντοπαμίνης DAT (Spielewoy et al., 2000). Το μεγαλύτερο μέρος του εκλυόμενου νευροδιαβιβαστή στη σύναψη μεταφέρεται από το μεταφορέα ντοπαμίνης DAT-1 στο εσωτερικό του νευρώνα (re uptake), γεγονός που οδηγεί στη διακοπή της σηματοδότησης μέσω ντοπαμίνης. Αντίθετα, η μεταλλαγή του μεταφορέα αυτού οδηγεί στη συγκέντρωση του νευροδιαβιβαστή στη σύναψη και τελικά σε αυξημένα επίπεδα σηματοδότησης μέσω ντοπαμίνης (Gainetdinov and Caron, 2003; Giros et al., 1996). Ο υποδοχέας DAT-1 στο νηματώδη εντοπίζεται αποκλειστικά στις προσυναπτικές περιοχές των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Nass et al., 2005) και εμφανίζει υψηλή συνάφεια για την

ντοπαμίνη όπως φάνηκε από πειράματα εκτοπικής έκφρασης σε κύτταρα HeLa (Jayanthi et al., 1998). Ο μεταφορέας ντοπαμίνης περιλαμβάνει 12 διαμεμβρανικές περιοχές με το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό του άκρο να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Όπως και οι υπόλοιποι μεταφορείς μονοαμινών έτσι και ο DAT εμφανίζει ηλεκτρογενή χαρακτηριστικά, μεταφέροντας μαζί με κάθε μόριο ντοπαμίνης και ιόντα Cl<sup>-</sup> (Giros and Caron, 1993). Μάλιστα, από πειράματα σε καλλιέργειες νευρώνων του νηματώδη έχειδειχτεί ότι η ενεργοποίηση του μεταφορέα από την ντοπαμίνη μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ηλεκτρικού δυναμικού στη μεμβράνη αυξάνοντας έτσι την ενεργότητα των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Carvelli et al., 2004).



**Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού βιοσύνθεσης της ντοπαμίνης.** Φαίνονται τα ένζυμα υδροξυλάση τυροσίνης (CAT-2) και αποκαρβοξυλάση αρωματικών αμινοξέων (BAS-1). Επίσης, φαίνεται το συνένζυμο GTP cyclohydrolase (TBH) που προβλέπεται να κωδικοποιείται από το γονίδιο *cat-4*.

Η ενεργοποίηση των μετασυναπτικών νευρώνων από την ντοπαμίνη γίνεται μέσα από την πρόσδεση του μορίου στους αντίστοιχους υποδοχείς. Οι υποδοχείς ντοπαμίνης ανήκουν στην οικογένεια των G-protein coupled receptors, πρωτεϊνών με χαρακτηριστική δομή επτά διαμεμβρανικών περιοχών. Η λειτουργία τους σχετίζεται με την αλληλεπίδραση με διαφορετικές G πρωτεΐνες. Αυτό που έχει ως αποτέλεσμα είτε την ενεργοποίηση, είτε την καταστολή του μορίου αδενυλική κυκλάση η οποία αντιστοίχως αυξάνει ή ελαττώνει τα



επίπεδα κυκλικού AMP (cAMP). Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζεται η δράση πρωτεϊνικών κινασών και έτσι η φωσφορυλίωση καναλιών ιόντων τα οποία είτε αυξάνουν είτε καταστέλλουν την ενεργότητα των μετασυναπτικών νευρώνων (Perez et al., 2006). Οι υποδοχείς ντοπαμίνης χωρίζονται σε δυο βασικές κατηγορίες ανάλογα με το αποτέλεσμα που έχει η δράση τους στα επίπεδα cAMP του κυττάρου. Έτσι, συναντώνται οι υποδοχείς τύπου ένα (D1) και οι υποδοχείς τύπου δυο (D2). Η ενεργοποίηση των υποδοχέων D1 οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων cAMP μέσα από την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, ενώ αντίθετο είναι το αποτέλεσμα από την ενεργοποίηση των υποδοχέων D2 (Suo et al., 2002). Στα θηλαστικά έχουν χαρακτηριστεί 5 διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν για υποδοχείς ντοπαμίνης και από τα οποία προκύπτει μεγάλος αριθμός υποδοχέων μέσω εναλλακτικού ματίσματος. Στο νηματώδη έχουν κλωνοποιηθεί 4 γονίδια που κωδικοποιούν για υποδοχείς ντοπαμίνης (DOP-1,2,3,4) και από αυτά μόνο ο υποδοχέας DOP-1 εμπίπτει στην κατηγορία D1 (Suo et al., 2002). Όπως και στα θηλαστικά, τα επίπεδα cAMP βρέθηκαν να εξαρτώνται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα DOP-1 ενώ η δράση του συνδέεται και με το κανάλι ιόντων καλίου, GIRK προκαλώντας έτσι σημαντική αλλαγή του δυναμικού της μεμβράνης (Sanyal et al., 2004). Ο υποδοχέας DOP-2 ανήκει στην κατηγορία D2 και είναι ο μοναδικός ο οποίος εκφράζεται στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες (autoreceptor) (Suo et al., 2003). Ο υποδοχέας DOP-3 είναι τύπου δυο και η ενεργοποίησή του προκαλεί ελάττωση των επιπέδων cAMP. Στο νηματώδη εκφράζεται μαζί με τον υποδοχέα DOP-1 στους χολινεργικούς κινητικούς νευρώνες για τον έλεγχο της κίνησης του οργανισμού. Ο κάθε υποδοχέας είναι συνδεδεμένος με διαφορετικό μονοπάτι μετάδοσης σήματος αποτελούμενο από G-proteins, ενώ το ένα ανταγωνίζεται το άλλο. Γενετική ανάλυση έδειξε ότι ο υποδοχέας DOP-3 οδηγεί στην ενεργοποίηση της G-protein  $G_{\alpha}$  (GOA-1), της πρωτεΐνης RGS (EAT-16) και εν συνεχεία της κινάσης δυακυλογλυκερόλης (DGK-1) (Chase et al., 2004). Η δράση του παραπάνω μονοπατιού μετάδοσης σήματος ανταγωνίζεται αυτό που επάγεται από τον υποδοχέα DOP-1 και περιλαμβάνει την G πρωτεΐνη  $G_{\alpha}$  (EGL-30) (Chase et al., 2004; Jorgensen, 2004; McDonald et al., 2006). Τέλος, ο υποδοχέας DOP-4 έχει βρεθεί να προκαλεί την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων cAMP γεγονός που τον κατατάσσει στην κατηγορία των υποδοχέων D1 (Sugiura et al., 2005).

### 2.3.3. Ο ρόλος της ντοπαμίνης στη συμπεριφορά του *C. elegans*

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τη διαλεύκανση του ρόλου της ντοπαμίνης στον οργανισμό του *C. elegans*. Οι μελέτες αυτές δείχνουν ότι η ντοπαμίνη συμμετέχει στην εκδήλωση πλαστικότητας σε διαφορετικές συμπεριφορές. Ο ρόλος της

αρχικά διερευνήθηκε με την εξωγενή προσθήκη σε υψηλή συγκέντρωση όπου βρέθηκε να προκαλεί τόσο παράλυση όσο και καταστολή της συμπεριφοράς της ωτοκίας (Schafer and Kenyon, 1995). Αυτό το αποτέλεσμα της ντοπαμίνης στον οργανισμό είναι αναστρέψιμο εφόσον μετά από μικρό χρονικό διάστημα και παρά τη συνεχιζόμενη παρουσία της, τα άτομα επανέρχονται στην φυσιολογική τους κατάσταση. Το φαινόμενο της προσαρμογής (adaptation) στην ντοπαμίνη βρέθηκε ότι προϋποθέτει τη δράση του καναλιού UNC-2 (voltage gated  $Ca^{2+}$  channel) στους κινητικούς νευρώνες VC αλλά και στους σεροτονεργικούς νευρώνες HSN (Schafer and Kenyon, 1995). Παράλληλα, η ενεργοποίηση του καναλιού UNC-2 από την ντοπαμίνη γίνεται μέσω των υποδοχέων τύπου D2 όπως φάνηκε από πειράματα σε θηλαστικά με τη χρήση κατάλληλων ανταγωνιστών (Olson et al., 2005). Η καταστολή της λειτουργίας των υποδοχέων ντοπαμίνης τύπου D2 οδηγεί επίσης στην αύξηση της ωτοκίας αλλά και του defecation και στη διάσωση των φαινοτυπικών ανωμαλιών σε αυτές τις συμπεριφορές από την *gain of function* μεταλλαγή του γονιδίου *egl-2* (Reiner et al., 1995). Καθώς το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για ένα κανάλι ιόντων καλίου φαίνεται ότι εδώ η λειτουργία των υποδοχέων τύπου D2 συνδέεται με την ενεργοποίηση του καναλιού EGL-2, ενώ υποδεικνύει τον κατασταλτικό ρόλο της ντοπαμίνης και σε αυτές τις συμπεριφορές (Weinshenker et al., 1999).

Μια άλλη συμπεριφορά του νηματώδη που ελέγχεται από την ντοπαμίνη είναι το basal slowing (Sawin et al., 2000). Πρόκειται για μια μορφή πλαστικότητας στη συμπεριφορά που περιλαμβάνει την ελάττωση της ταχύτητας κίνησης του οργανισμού κατά την είσοδό του στο θρεπτικό μέσο. Αυτή η συμπεριφορά αντικατοπτρίζει τη στρατηγική που ακολουθεί ο οργανισμός σε συνθήκες άφθονης τροφής και η οποία του εξασφαλίζει το μέγιστο χρόνο παραμονής του σε αυτήν. Η σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης ελέγχει τη συμπεριφορά αυτή καθώς άτομα του στελέχους *cat-2(e1112)* αδυνατούν να συνθέσουν ντοπαμίνη και μαζί να εκδηλώσουν basal slowing (Sawin et al., 2000). Μάλιστα, βρέθηκε ότι οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες είναι υπεύθυνοι για την αίσθηση των μηχανικών και όχι χημικών ερεθισμάτων που προκύπτουν από την τροφή. Έτσι, ο ίδιος φαινότυπος παρατηρείται και στην περίπτωση που η τροφή έχει αντικατασταθεί από μικροσφαιρίδια σεφαρόζης, ενώ και εδώ τα άτομα που δε συνθέτουν ντοπαμίνη εκδηλώνουν φαινοτυπικές ανωμαλίες. Η παραπάνω συμπεριφορά εξαρτάται και από την προγενέστερη εμπειρία, εφόσον άτομα που έχουν επωαστεί απουσία τροφής εκδηλώνουν εντονότερη ελάττωση της ταχύτητάς τους σε μια συμπεριφορά που εξαρτάται από τη σεροτονίνη και καλείται enhanced basal slowing (Sawin et al., 2000).

Μια άλλη συμπεριφορά εξαρτώμενη από την ντοπαμίνη είναι το area restricted search (ARS) (Hills et al., 2004). Πρόκειται για μια στρατηγική διερεύνησης του

περιβάλλοντος η οποία επιτρέπει στον οργανισμό να παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στην περιοχή της τροφής του. Σε περιβάλλον χωρίς τροφή, ο νηματώδης εκδηλώνει την τάση να κινείται περισσότερο ευθύγραμμα καλύπτοντας μεγάλες αποστάσεις (de Bono and Bargmann, 1998). Αντίθετα, σε περιβάλλον με άφθονη τροφή κινείται ευθύγραμμα με μικρότερη συχνότητα και συνήθως εκδηλώνει χαρακτηριστικές οπισθοπορείες (reversals) που καλούνται και omega turns. Η συμπεριφορά αυτή είναι ένα ακόμα παράδειγμα πλαστικότητας καθώς τα omega turns ελαττώνονται με την πάροδο του χρόνου (adaptation). Και σε αυτήν την περίπτωση ο ρόλος της ντοπαμίνης είναι κομβικός. Η διακοπή της σηματοδότησης μέσω ντοπαμίνης με τη μεταλλαγή του γονιδίου *cat-2*, την απαλοιφή των ντοπαμινεργικών νευρώνων (laser ablation) ή την αναστολή των υποδοχέων ντοπαμίνης οδηγεί στην απώλεια της συμπεριφοράς (Hills et al., 2004). Εντούτοις, το ίδιο συμβαίνει και κατά τη διακοπή της σηματοδότησης μέσω γλουταμικού. Το γεγονός ότι απουσία τροφής η εξωγενής ντοπαμίνη επάγει τη συμπεριφορά (ARS) στα άτομα του αγρίου τύπου, αλλά όχι σε στελέχη με απώλεια σηματοδότησης μέσω γλουταμικού δείχνει ότι η ντοπαμίνη οδηγεί στην εκδήλωση ARS ρυθμίζοντας τη σηματοδότηση μέσω γλουταμικού (Hills et al., 2004).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η ντοπαμίνη διαδραματίζει κομβικό ρόλο σε μια σειρά από συμπεριφορές του οργανισμού στις οποίες έχει κατασταλτική δράση σε ότι αφορά την κίνησή του. Μάλιστα χαρακτηριστικό των συμπεριφορών αυτών είναι η πλαστικότητα δηλαδή η εκδήλωσή τους ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Όμως αυτά δεν είναι τα μόνα παραδείγματα που η ντοπαμίνη ελέγχει την πλαστικότητα στη συμπεριφορά του *C. elegans*. Βασικός φαίνεται να είναι ο ρόλος της στην εκδήλωση διαφόρων μορφών μάθησης από τον οργανισμό και για αυτές γίνεται λόγος στη συνέχεια.

#### **2.4. Παραδείγματα μνήμης και μάθησης στον *C. elegans***

Το πολύπλοκο φαινόμενο της μνήμης και της μάθησης εκδηλώνεται ως αλλαγή της συμπεριφοράς με βάση την προγενέστερη εμπειρία. Η αλλαγή αυτή περιλαμβάνει την εκδήλωση απλών μορφών μάθησης, όπως η μη εξαρτημένη (non associative learning) (Bernhard and van der Kooy, 2000; Groves and Thompson, 1970; Rose and Rankin, 2001), ή πιο πολύπλοκων όπως η εξαρτημένη (associative learning). Ο νηματώδης μπορεί να εκδηλώσει τόσο μη εξαρτημένη όσο και εξαρτημένη μάθηση. Και στις δυο αυτές μορφές το ερέθισμα που ασκείται στον οργανισμό μπορεί να είναι χημικό, θερμικό ή μηχανικό (Bargmann, 2005; de Bono and Maricq, 2005; Rankin, 2004). Το ερώτημα που λογικά προκύπτει εν συνεχεία είναι πώς ο οργανισμός εκτός της μάθησης εκδηλώνει και μνήμη. Και

οι δυο αυτές συμπεριφορές περιγράφουν ουσιαστικά τα δυο σκέλη μιας ενιαίας συμπεριφοράς, της μνήμης και της μάθησης, εφόσον είναι λογικό ότι οι οργανισμοί μαθαίνουν για να θυμούνται ή αντίστροφα δεν μπορούν να θυμούνται κάτι που δεν έχουν πρώτα μάθει. Έτσι, το φαινόμενο της μνήμης μπορεί να χαρακτηριστεί ανάλογα με το χρονικό διάστημα για το οποίο είναι διαθέσιμη μια δεδομένη πληροφορία και γι' αυτό διακρίνεται η μνήμη μικρής και μακράς διάρκειας. Βέβαια, οι μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν τη μνήμη μπορούν να διακριθούν από αυτούς της μάθησης, όμως η ξεχωριστή παρατήρησή τους εξαρτάται κάθε φορά από το παράδειγμα της συμπεριφοράς που χρησιμοποιείται. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στον *C. elegans* για τη διερεύνηση των παραπάνω φαινομένων επικεντρώνονται σε δυο βασικές κατευθύνσεις: α) στην αναγνώριση του νευρωνικού δικτύου που είναι υπεύθυνο για την εκδήλωση κάθε μιας από τις διαφορετικές μορφές μνήμης και μάθησης και β) στην αναγνώριση μορίων που ελέγχουν τις συμπεριφορές αυτές.

#### **2.4.1. Μη εξαρτημένη μάθηση (non associative learning)**

Το καλύτερα ίσως χαρακτηρισμένο παράδειγμα μη εξαρτημένης μάθησης είναι αυτό της μειωμένης απόκρισης σε μη στοχευμένο μηχανικό ερέθισμα γνωστό και ως touch habituation (Rose and Rankin, 2001). Η άσκηση μη στοχευμένου μηχανικού ερεθίσματος στο πιάτο καλλιέργειας του οργανισμού (tap) προκαλεί συνήθως την οπισθοπορεία του και λιγότερο συχνά την επιτάχυνσή του σε πρόσθια κατεύθυνση. Η επαναλαμβανόμενη άσκηση του ερεθίσματος θα οδηγήσει στη μείωση της απόκρισης (habituation) εφόσον το μηχανικό ερέθισμα θα πάψει να θεωρείται επικίνδυνο (Rankin et al., 1990; Rose and Rankin, 2001). Η συγκεκριμένη απόκριση αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα μη εξαρτημένης μάθησης καθώς ισχυρό ηλεκτρικό ερέθισμα επαναφέρει την απόκριση σε μηχανικά ερεθίσματα στα αρχικά επίπεδα (dishabituation). Παράλληλα, από τη στιγμή της εκδήλωσης του φαινομένου (μειωμένη απόκριση) η εμφάνισή του διαρκεί για περισσότερες από 48h καταδεικνύοντας την ύπαρξη μνήμης. Στην εκδήλωση του φαινοτύπου συμμετέχουν οι 6 μηχανο-αισθητήριοι νευρώνες (PLMs, ALMs, AVM, PVM) του οργανισμού μαζί με το νευρωνικό κύκλωμα των ενδιάμεσων νευρώνων που ελέγχει τη λειτουργία τους (AVAs, AVBs, AVDs, and PVCs) (Chalfie et al., 1985) και ακόμα οι νευρώνες (PVDs και DVA) (Wicks and Rankin, 1995, 1997).

Για την εκδήλωση αυτής της μορφής μη εξαρτημένης μάθησης απαιτείται τόσο η σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης όσο και η σηματοδότηση μέσω γλουταμικού. Η ντοπαμίνη ελέγχει το φαινόμενο του touch habituation όπως φάνηκε από πειράματα στο μεταλλαγμένο

στέλεχος *cat-2*, το οποίο εμφανίζει habituation γρηγορότερα. Επίσης, χορήγηση εξωγενούς ντοπαμίνης στο στέλεχος αυτό οδηγεί στη διάσωση της παρατηρούμενης φαινοτυπικής ανωμαλίας (Sanyal et al., 2004). Εντούτοις, οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες δε συνδέονται απευθείας με τους μηχανο-αισθητήριους αλλά σχηματίζουν χημικές συνάψεις με τους ενδιάμεσους νευρώνες που τους ελέγχουν (White et al., 1986). Μια απάντηση για τον τρόπο που η ντοπαμίνη επιδρά στο φαινόμενο έρχεται από την αναγνώριση του υποδοχέα ντοπαμίνης DOP-1 ως του υπεύθυνου μορίου για τη μετάδοση του σήματος στο μετασυναπτικό νευρώνα (Sanyal et al., 2004). Το μεταλλαγμένο στέλεχος για τον DOP-1 εμφανίζει όμοια με το στέλεχος *cat-2* γρηγορότερο touch habituation, ενώ η διάσωση του φαινοτύπου γίνεται από την έκφραση του γονιδίου του αγρίου τύπου επιλεκτικά στους μηχανο-αισθητήριους νευρώνες και όχι στους ενδιάμεσους οι οποίοι τους ελέγχουν (Sanyal et al., 2004). Μάλιστα, η εκδήλωση του φαινομένου επηρεάζεται από το περιβάλλον και συγκεκριμένα την ύπαρξη τροφής, καθώς απουσία αυτής τα άτομα εκδηλώνουν habituation γρηγορότερα. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι σε αυτό το παράδειγμα του mechrosensory habituation, ο υποδοχέας DOP-1 επάγει τη σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού Gq/PLC με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων ασβεστίου στα κύτταρα μηχανοϋποδοχείς (Kindt et al., 2007). Η ενεργοποίηση αυτή των κυττάρων μηχανοϋποδοχέων προκαλεί ακολούθως την ενεργοποίηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων σχηματίζοντας μια θηλιά θετικής ανάδρασης. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αλλαγή της ικανότητας των ντοπαμινεργικών νευρώνων να αντιλαμβάνονται την ύπαρξη τροφής κι έτσι να καθορίζουν την εκδήλωση του φαινομένου του habituation. Έτσι, εξηγείται πώς η ντοπαμίνη επηρεάζει την αλλαγή στη συμπεριφορά με βάση το περιβάλλον (context) (Kindt et al., 2007).

Και πάλι όμως χρειάζεται να σημειωθεί ότι οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες δε συνάπτονται απευθείας στους νευρώνες μηχανοϋποδοχείς. Επομένως, η πλαστικότητα της κίνησης του οργανισμού ορίζεται από τη δράση της ντοπαμίνης ως νευρο-ορμόνη και όχι ως απλού συναπτικού νευροδιαβιβαστή. Αυτός ο τρόπος δράσης της ντοπαμίνης επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι η παραλυτική της δράση βρέθηκε να επιτελείται από την ενεργοποίηση και την ανταγωνιστική δράση των υποδοχέων DOP-1 και DOP-3 στους κινητικούς νευρώνες του οργανισμού οι οποίοι δεν συνάπτονται απευθείας με τους ντοπαμινεργικούς (Chase et al., 2004). Όπως και στην περίπτωση διακοπής της σηματοδότησης μέσω ντοπαμίνης, έτσι και κατά τη διακοπή της σηματοδότησης μέσω γλουταμικού τα άτομα δε χάνουν την ικανότητα εκδήλωσης habituation αλλά αυτό γίνεται γρηγορότερα. Έτσι, στελέχη που φέρουν μεταλλαγή για τον υποδοχέα γλουταμικού GLR-1 (kainite/AMPA) εμφανίζουν γρηγορότερα μειωμένη απόκριση σε μηχανικό ερέθισμα. Σε περαιτέρω πειράματα φάνηκε ότι και η μακράς διάρκειας μνήμη διακόπτεται στα

μεταλλαγμένα στελέχη *eat-4* (vesicular glutamate transporter) και *glr-1*, εφόσον 24h μετά, τα άτομα αδυνατούν να εκδηλώσουν μειωμένη απόκριση σε μηχανικό ερέθισμα (tap habituation) (Rose et al., 2003).

Η εκδήλωση μη εξαρτημένης μάθησης όμως, δεν περιλαμβάνει μόνο την άσκηση μηχανικού ερεθίσματος στον οργανισμό. Αντίστοιχο παράδειγμα είναι εκείνο όπου η παρατεταμένη έκθεση σε χημικό ερέθισμα προκαλεί τη μείωση της απόκρισης του νηματώδους. Το φαινόμενο αυτό μελετήθηκε και για την ένωση diacetyl η οποία γίνεται αντιληπτή από τους νευρώνες AWA και συγκεκριμένα από τον υποδοχέα diacetyl ODR-10. Βρέθηκε ότι η υψηλή συγκέντρωση της ένωσης οδηγεί σε μη αντιστρεπτή μείωση της απόκρισης (dishabituation) εξαιτίας κορεσμού του υποδοχέα ODR-10. Αντίθετα, μικρές συγκεντρώσεις της ένωσης επάγουν τη μη εξαρτημένη μορφή μάθησης που καλείται habituation και για την εμφάνισή της απαιτείται η δράση της αδενυλικής κυκλάσης ODR-1 (Bernhard and van der Kooy, 2000). Έτσι, γίνεται φανερό ότι η διαδικασία αίσθησης ενός ερεθίσματος διαφέρει από τη διαδικασία ενσωμάτωσης του ίδιου ερεθίσματος στο νευρικό σύστημα για την εκδήλωση του φαινομένου της μάθησης.

#### **2.4.2. Εξαρτημένη μάθηση (associative learning)**

Εκτός όμως από τις απλές μορφές πλαστικότητας στη συμπεριφορά, ο νηματώδης έχει την ικανότητα να εμφανίζει και πιο πολύπλοκες συμπεριφορές. Έχει παρατηρηθεί ότι πραγματοποιεί συσχετισμούς μεταξύ χημικών ερεθισμάτων και περιβαλλοντικών συνθηκών εκδηλώνοντας την πολύπλοκη συμπεριφορά της εξαρτημένης μάθησης. Η πρώτη παρατήρηση για την εκδήλωση πλαστικότητας στη συμπεριφορά του νηματώδη κατά την παρουσία χημικών ερεθισμάτων έγινε όταν η έκθεση στην πτητική ένωση βενζαλδεΐδη μετέτρεπε την κατά τα άλλα ελκτική ένωση σε απωθητικό ερέθισμα οδηγώντας στο φαινόμενο του adaptation (Colbert and Bargmann, 1995). Η βενζαλδεΐδη γίνεται αντιληπτή από το ζεύγος των αισθητήριων νευρώνων AWC, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι και για την αντίληψη των επίσης ελκτικών ενώσεων ισοαμυλική αλκοόλη και βουτανόνη (Bargmann et al., 1993). Σε αυτό το παράδειγμα, δε μετατρέπεται σε απωθητικό ερέθισμα μόνο η βενζαλδεΐδη. Παρατηρήθηκε ότι το ίδιο συμβαίνει για την ισοαμυλική αλκοόλη (cross-adaptation), αλλά όχι το αντίθετο εφόσον η έκθεση στην ισοαμυλική ή τη βουτανόνη δεν προκαλεί κανένα αποτέλεσμα στη βενζαλδεΐδη. Η διαδικασία αυτή του adaptation για τη βουτανόνη και τη βενζαλδεΐδη βρέθηκε ότι εξαρτάται από την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ασβεστίου κάτι που δεν ισχύει για το adaptation στην ισοαμυλική αλκοόλη. Με βάση το παράδειγμα αυτό απομονώθηκαν σε πειράματα μεταλλαξογένεσης τα στελέχη *adp-1*

και *osm-9*. Η κλωνοποίηση και ο χαρακτηρισμός του στελέχους *adp-1* δεν έχει καταστεί δυνατός. Εντούτοις, το στέλεχος *osm-9* φέρει μεταλλαγή σε γονίδιο που κωδικοποιεί για κανάλι ιόντων ασβεστίου και ανήκει στην οικογένεια των καναλιών TRP (Transient Receptor Potential). Αυτό εκφράζεται μεταξύ άλλων στους αισθητήριους νευρώνες για τις παραπάνω πτητικές ενώσεις (AWC) (Colbert and Bargmann, 1997). Έτσι, η λειτουργία του καναλιού OSM-9 επιτρέπει την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων  $Ca^{2+}$  που απαιτούνται για την εκδήλωση του φαινομένου του adaptation.

Σε μια προσπάθεια αναγνώρισης στελεχών που φέρουν ανωμαλίες στην εκδήλωση του παραπάνω φαινοτύπου απομονώθηκαν τα στελέχη *lrm-1* και *lrm-2* (Wen et al., 1997). Η φαινοτυπική ανάλυση των στελεχών αυτών έδειξε ότι οι ανωμαλίες που εμφανίζουν περιορίζονται στην εξαρτημένη μάθηση μεταξύ υδατοδιαλυτών ή πτητικών χημικών ενώσεων (Morrison et al., 1999) και της έλλειψης τροφής. Αντίθετα, απλές συμπεριφορές όπως η χημειόταξη ή η μη εξαρτημένη μάθηση δεν επηρεάζονται από τις μεταλλαγές των στελεχών αυτών. Εντούτοις, η χαρτογράφηση και η γενετική ανάλυση των παραπάνω αλληλόμορφων δεν έχει οδηγήσει στην κλωνοποίηση και το χαρακτηρισμό των αντίστοιχων γονιδίων με αποτέλεσμα οι μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν να παραμένουν άγνωστοι.

Σε ένα αντίστοιχο παράδειγμα παρατηρήθηκε ότι η ελάττωση του χημειοτακτισμού για την ελκτική ένωση βενζαλδεΐδη είναι ισχυρότερη, σε σχέση με αυτή του habituation, όταν γίνεται έκθεση στην ουσία σε συνθήκες έλλειψης φαγητού (conditioning). Στο συγκεκριμένο παράδειγμα βρέθηκε ότι η διαδικασία της μάθησης διακόπτεται από τη χορήγηση εξωγενούς σεροτονίνης (Colbert and Bargmann, 1997). Έτσι, φαίνεται ότι η διαθεσιμότητα φαγητού επάγει τη σηματοδότηση μέσω σεροτονίνης και για την πραγματοποίηση του αρνητικού συσχετισμού μεταξύ βενζαλδεΐδης και έλλειψης τροφής τα επίπεδα σεροτονίνης στον οργανισμό χρειάζεται να ελαττωθούν. Αυτό επιβεβαιώνεται και από πειράματα συμπεριφοράς με τα μεταλλαγμένα στελέχη *tph-1* (tryptophan hydroxylase) και *cat-4* (GTP cyclohydrolase I) τα οποία αδυνατούν να συνθέσουν σεροτονίνη. Η πραγματοποίηση conditioning παρουσία φαγητού στα στελέχη αυτά προκαλεί ίδιο φαινότυπο με αυτόν του στελέχους του αγρίου τύπου, απουσία όμως φαγητού. Με άλλα λόγια, η διακοπή της σηματοδότησης μέσω σεροτονίνης ισοδυναμεί με έλλειψη φαγητού επιτρέποντας στα παραπάνω στελέχη να μειώνουν το χημειοτακτισμό στη βενζαλδεΐδη ανεξάρτητα της ύπαρξης ή όχι τροφής (Nuttley et al., 2002). Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και στην περίπτωση όπου ο οργανισμός καλείται να επιλέξει ανάμεσα σε δύο ελκτικές ενώσεις εκ των οποίων η μια έχει συσχετιστεί με έλλειψη τροφής. Αν και φυσιολογικά ο οργανισμός επιλέγει την ένωση που δεν έχει συσχετιστεί με έλλειψη τροφής, ο συσχετισμός αυτός διακόπτεται

από τη χορήγηση σεροτονίνης καθώς και πάλι η παρουσία της ισοδυναμεί με την παρουσία τροφής (Saeki et al., 2001). Σε αυτό το παράδειγμα η χορήγηση ντοπαμίνης σε φυσιολογικά άτομα δεν επηρεάζει την εκδήλωση μάθησης. Εντούτοις θα ήταν σκόπιμο να ελεγχθεί και η περίπτωση στην οποία τα επίπεδα του νευροδιαβιβαστή είναι ελαττωμένα (Saeki et al., 2001).

Στην αντίθετη περίπτωση, ο νηματώδης έχει τη δυνατότητα να πραγματοποιεί θετικό συσχετισμό μεταξύ χημικών ερεθισμάτων και της διαθεσιμότητας αυτή τη φορά τροφής. Σε ένα τέτοιο παράδειγμα, η ικανότητα χημειόταξης για την ελκτική ένωση βουτανόνη βελτιώνεται όταν η ένωση αυτή παρουσιάζεται στον οργανισμό παρουσία τροφής. Το αποτέλεσμα της έκθεσης αυτής δεν μπορεί να θεωρηθεί ως καταστολή του *adaptation* από την τροφή (Nuttley et al., 2002) εφόσον η χημειόταξη δεν επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα των ατόμων του αγρίου τύπου, αλλά αυξάνει ακόμα περισσότερο. Το εύλογο όμως ερώτημα που τίθεται έχει να κάνει με την επαγωγή του *habituation*. Κατά την έκθεση δηλαδή στη βουτανόνη θα αναμενόταν η μείωση της χημειόταξης ως αποτέλεσμα της μη εξαρτημένης μάθησης ή *habituation*. Εντούτοις, φάνηκε ότι οι δυο αυτές μορφές μάθησης εξαρτώνται από την ένταση του ερεθίσματος και το χρόνο έκθεσης σε αυτό. Χαμηλής έντασης ερέθισμα και μεγάλη χρονική έκθεση οδηγεί στο θετικό συσχετισμό μεταξύ βουτανόνης και τροφής, ενώ υψηλής έντασης ερέθισμα και μικρή χρονική έκθεση προκαλεί *habituation* (Torayama et al., 2007). Γενετική ανάλυση του φαινομένου οδήγησε στην απομόνωση των μεταλλαγμένων στελεχών *olrn-1* και *olrn-2*, τα οποία εμφάνιζαν μειωμένη ικανότητα εκδήλωσης της πλαστικής αυτής συμπεριφοράς. Από αυτά, το στέλεχος *olrn-2* έχει επίσης αδυναμία εκδήλωσης συσχετιζόμενης μάθησης μεταξύ βενζαλδεϋδης και έλλειψης τροφής, γεγονός που δεν ισχύει για το στέλεχος *olrn-1*. Περαιτέρω ανάλυση οδήγησε στο συμπέρασμα ότι για την εκδήλωση της παραπάνω συμπεριφοράς απαιτείται η λειτουργία του αισθητήριου νευρώνα AWC αλλά και η σηματοδότηση σε αυτόν μέσω των γουανυλικών κυκλασών ODR-1 και DAF-11, οι οποίες είναι μεταλλαγμένες στα στελέχη *olrn-1* και *olrn-2* αντίστοιχα. Στην περίπτωση αυτή της ενίσχυσης του χημειοτακτισμού για τη βουτανόνη, λόγω της προγενέστερης εμπειρίας, γίνεται εφικτή και η παρατήρηση του χρονικού διαστήματος που διαρκεί το φαινόμενο, δηλαδή της μνήμης. Έτσι, βρέθηκε ότι το φαινόμενο διαρκεί για μια περίοδο περίπου τεσσάρων ωρών (Torayama et al., 2007)

Όπως φάνηκε παραπάνω, η πλαστικότητα στη συμπεριφορά ελέγχεται κατά ένα μεγάλο μέρος από τη σηματοδότηση μέσω σεροτονίνης και ντοπαμίνης. Όμως αυτοί δεν είναι οι μοναδικοί νευροδιαβιβαστές που ελέγχουν τη μνήμη και τη μάθηση. Όπως και στο παράδειγμα της μη εξαρτημένης μάθησης (*habituation*), η μεταλλαγή του υποδοχέα



γλουταμικού GLR-1 (kainite/AMPA) προκαλεί μείωση της ικανότητας για εκδήλωση εξαρτημένης μάθησης όταν ο οργανισμός καλείται να συσχετίσει την ελκτική ένωση diacetyl με το απωθητικό ερέθισμα του οξικού οξέος (Morrison and van der Kooy, 2001). Καθώς η μεταλλαγή δεν επηρεάζει την ικανότητα αίσθησης κανενός από τα δυο ερεθίσματα γίνεται φανερό ότι η δράση του υποδοχέα γλουταμικού και κατ' επέκταση η σηματοδότηση μέσω γλουταμικού λαμβάνει χώρα σε κάποιον άγνωστο μέχρι τώρα ενδιάμεσο νευρώνα, ο οποίος δέχεται σήμα από τους γλουταματεργικούς αισθητήριους νευρώνες, τους υπεύθυνους για την αντίληψη των δυο ενώσεων (Morrison and van der Kooy, 2001).

Σε ένα άλλο παράδειγμα φαίνεται ότι η ικανότητα του νηματώδη να πραγματοποιεί συσχετισμούς μεταξύ χημικού ερεθίσματος και της διαθεσιμότητας τροφής εξαρτάται από την ενδογενή κατάσταση του οργανισμού (Bettinger and McIntire, 2004). Έτσι, πραγματοποιήθηκε conditioning (βενζαλδεΰδη-έλλειψη τροφής) παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αιθανόλης, ικανής να προκαλέσει αλλαγή στη φυσιολογία των ατόμων (intoxication). Όταν ο έλεγχος της χημειότητας πραγματοποιείται απουσία αιθανόλης δεν παρατηρείται μείωση του δείκτη χημειότητας, σε αντίθεση με την περίπτωση που υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης προστίθεται κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας. Η εκδήλωση αυτής της μορφής μάθησης (state dependent) εξαρτάται από τη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης όπως φάνηκε από το στέλεχος *cat-2* (Bettinger and McIntire, 2004).

Ένα χαρακτηριστικό της εξαρτημένης μάθησης είναι ότι για την εκδήλωσή της ο οργανισμός αντιλαμβάνεται το ευρύτερο πλαίσιο των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων τα οποία και ρυθμίζουν την ικανότητά του για εκδήλωση μάθησης (Law et al., 2004). Μάλιστα, κάθε ένα από αυτά τα ερεθίσματα γίνονται αντιληπτά ξεχωριστά και η ανάκληση της μνήμης προϋποθέτει την ύπαρξη του συνόλου των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων σε μια διαδικασία που καλείται occasion setting mechanism. Συγκεκριμένα, όταν γίνεται conditioning μεταξύ δυο ερεθισμάτων (CS και US) και ένα τρίτο ή πολλά περισσότερα ορίζουν το περιβάλλον, τότε τα δευτερεύοντα αυτά ερεθίσματα είναι απαραίτητα προκειμένου να ανακληθεί η μνήμη του συσχετισμού μεταξύ CS και US. Σε αυτή την περίπτωση, δεν λαμβάνει χώρα ο συσχετισμός όλων των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων (σαν να ήταν ένα μίγμα και συνεπώς ένα CS) με το US. Το μεταλλαγμένο στέλεχος για την G πρωτεΐνη GPC-1, δεν εκδηλώνει μάθηση για την υδατοδιαλυτή ένωση NaCl (Jansen et al., 2002). Το στέλεχος όμως αυτό εκδηλώνει συσχετισμούς με την πτητική ένωση βενζαλδεΰδη ενώ στο περιβάλλον του μπορεί να βρίσκεται NaCl. Σε αυτή την περίπτωση η ανάκληση αυτού του συσχετισμού χρειάζεται την παρουσία NaCl (occasion setting mechanism). Αντίθετα, το στέλεχος *lrm-1* πραγματοποιεί συσχετισμούς με την πτητική βενζαλδεΰδη αλλά για την εκδήλωση της

μάθησης δεν απαιτεί την παρουσία του NaCl δείχνοντας έτσι ότι έχει αδυναμία εκδήλωσης occasion setting learning (Law et al., 2004).

Από τα παραπάνω παραδείγματα φαίνεται ότι η ικανότητα του οργανισμού να εκδηλώνει μάθηση εξαρτάται από την ικανότητά του να ενσωματώνει διαφορετικά ερεθίσματα και τελικά να αποφασίζει για την απόκριση που θα πραγματοποιήσει. Σε έναν τέτοιο φαινοτυπικό έλεγχο ο οργανισμός καλείται να εκδηλώσει χημειόταξη προς την ελκτική ένωση diacetyl αφού όμως αποφασίσει να περάσει από το δυσμενές περιβάλλον που συνιστά η ύπαρξη ιόντων  $\text{Cu}^{2+}$ . Το γεγονός ότι το στέλεχος του αγρίου τύπου επιλέγει να περάσει από το δυσμενές περιβάλλον με τα ιόντα  $\text{Cu}^{2+}$  και να επιλέξει την ελκτική diacetyl υποδηλώνει ότι η αντίληψή της καταστέλλει την αίσθηση των ιόντων  $\text{Cu}^{2+}$ . Το μεταλλαγμένο στέλεχος *hen-1* εμφανίζει αδυναμία να εκδηλώσει χημειόταξη στη συγκεκριμένη δοκιμασία παρά το γεγονός ότι η αντίληψη τόσο της ελκτικής diacetyl όσο και των απωθητικών ιόντων  $\text{Cu}^{2+}$  είναι φυσιολογική (Ishihara et al., 2002). Έτσι, μόνο η ενσωμάτωση των δυο ερεθισμάτων φαίνεται να επηρεάζεται στο στέλεχος *hen-1*. Επιπρόσθετα, το συγκεκριμένο στέλεχος αδυνατεί να εκδηλώσει εξαρτημένη μάθηση μεταξύ υδατοδιαλυτών ενώσεων και έλλειψης τροφής αλλά και μεταξύ θερμοκρασίας και ύπαρξης τροφής (θερμότητα), επιβεβαιώνοντας την αδυναμία για πλαστικότητα στη συμπεριφορά του. Το στέλεχος αυτό φέρει μεταλλαγή σε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη με μοτίβο υποδοχέα LDL, ο οποίος ανήκει στην υπεροικογένεια των υποδοχέων ινσουλίνης. Για την εκδήλωση των παραπάνω συμπεριφορών απαιτείται η έκφρασή του στον αισθητήριο και ενδιάμεσο αντίστοιχα νευρώνα ASH και AIY. Εντούτοις, η εκτοπική έκφραση του γονιδίου *hen-1* σε άλλους αισθητήριους νευρώνες μπορεί επίσης να οδηγήσει σε διάσωση του φαινοτύπου υποδεικνύοντας ότι η δράση του δεν είναι cell-autonomous (Ishihara et al., 2002).

Σε ένα επόμενο παράδειγμα εξαρτημένης μάθησης στο νηματώδη βρέθηκε ότι η συμπεριφορά αυτή ελέγχεται από το μονοπάτι μετάδοσης σήματος μέσω ινσουλίνης (insulin-like signaling pathway) (Tomiooka et al., 2006). Συγκεκριμένα, η ικανότητα του οργανισμού να συσχετίζει την έλλειψη τροφής με διαφορετικές υδατοδιαλυτές ενώσεις επηρεάζεται από μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν για το παραπάνω μονοπάτι μετάδοσης σήματος. Το μονοπάτι αυτό, που έχει βρεθεί να ελέγχει το μεταβολισμό, το αναπτυξιακό πρόγραμμα και τη γήρανση του οργανισμού (Jia et al., 2004) περιλαμβάνει τα γονίδια *ins-1*, *daf-2*, *age-1*, *rdk-1* και *akt-1*. Αυτά κωδικοποιούν για την ινσουλίνη, τον υποδοχέα ινσουλίνης IGF-I, την κινάση PI 3, την εξαρτώμενη από φωσφοϊνοσιτίδια κινάση και την πρωτεΐνη Akt/PKB αντίστοιχα. Το μονοπάτι μετάδοσης σήματος από ινσουλίνη που αρχίζει από τον υποδοχέα ινσουλίνης DAF-2 και την κινάση AGE-1 βρέθηκε να επηρεάζει την ικανότητα μάθησης με την

ενεργοποίησή του στον αισθητήριο για τις υδατοδιαλυτές ενώσεις νευρώνα ASER (Bargmann and Kaplan, 1998; Pierce-Shimomura et al., 2001). Από την άλλη η ινσουλίνη παράγεται στον ενδιάμεσο νευρώνα AIA ο οποίος δέχεται συναπτικά σήματα από πολλούς αισθητήριους νευρώνες αλλά και στέλνει σήμα στο νευρώνα ASER (White et al., 1986). Επομένως, φαίνεται ότι η ενσωμάτωση της πληροφορίας γίνεται στον ενδιάμεσο νευρώνα AIA ο οποίος στη συνέχεια παράγει και εκκρίνει ινσουλίνη που ενεργοποιεί το μονοπάτι μετάδοσης σήματος DAF-2/AGE-1 στον αισθητήριο νευρώνα ASER καθορίζοντας έτσι την ικανότητά του για πλαστικότητα.

Όπως αναφέρθηκε, εκτός από τα μηχανικά και χημικά ερεθίσματα ο νηματώδης έχει τη δυνατότητα να συσχετίζει και την περιβαλλοντική θερμοκρασία με τη διαθεσιμότητα της τροφής, εκδηλώνοντας έτσι εξαρτημένη μάθηση. Ο οργανισμός αναπτύσσεται φυσιολογικά σε ένα θερμοκρασιακό εύρος μεταξύ 15°C και 25°C ενώ διαθέτει αξιοσημείωτη ικανότητα αντίληψης αλλαγών στην περιβαλλοντική θερμοκρασία (0,5°C). Όταν καλλιεργείται σε σταθερή θερμοκρασία παρουσία τροφής εκδηλώνει θετικό συσχετισμό της θερμοκρασίας αυτής με την τροφή. Έτσι, όταν αντιμετωπίσει θερμοκρασιακό κλινές, παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχει πλέον τροφή, εντοπίζει την ισόθερμη που αντιστοιχεί στη θερμοκρασία καλλιέργειάς του και κινείται σε αυτή. Στην αντίθετη περίπτωση, η καλλιέργεια του οργανισμού σε συνθήκες έλλειψης τροφής προκαλεί την αποφυγή της θερμοκρασίας καλλιέργειας στο θερμοκρασιακό κλινές (Hedgcock and Russell, 1975). Προκειμένου να καταστεί δυνατός ο παραπάνω συσχετισμός απαιτείται χρονικό διάστημα περίπου 4 ωρών. Πειράματα απαλοιφής των νευρώνων με χρήση laser οδήγησαν στο χαρακτηρισμό του νευρωνικού δικτύου του υπεύθυνου για την εκδήλωση θερμόταξης (Mori and Ohshima, 1995). Έτσι βρέθηκε ότι για την αντίληψη της θερμοκρασίας είναι υπεύθυνος ένας τουλάχιστον αισθητήριος νευρώνας (AFD) ο οποίος ενεργοποιεί το μετασυναπτικό ενδιάμεσο νευρώνα AIY και αυτός με τη σειρά του ενεργοποιεί σε ένα δεύτερο επίπεδο τους επίσης ενδιάμεσους νευρώνες AIZ και RIA (Mori and Ohshima, 1995). Μάλιστα βρέθηκε ότι οι νευρώνες AIY και AIZ έχουν ανταγωνιστική δράση καθώς η απαλοιφή του πρώτου οδηγεί τον οργανισμό στην επιλογή χαμηλών θερμοκρασιών (cryophilic), ενώ η απαλοιφή του δεύτερου οδηγεί τον οργανισμό στην επιλογή υψηλών θερμοκρασιών (thermophilic) (Mori, 1999). Αντίθετα, η απαλοιφή του αισθητήριου νευρώνα AFD αλλά και του ενδιάμεσου νευρώνα RIA δεν δημιουργεί καμία προτίμηση στη θερμοκρασία προκαλώντας την ακανόνιστη κίνηση του οργανισμού (athermotactic). Έτσι, φαίνεται ότι η επιλογή της θερμοκρασίας από τον οργανισμό εκτελείται από το νευρώνα RIA όπου ενσωματώνεται η πληροφορία που προέρχεται από το νευρώνα AFD αφού πρώτα διανεμηθεί στους νευρώνες

AIY και AIZ. Πώς όμως γίνεται ο συσχετισμός της πληροφορίας αυτής με το ερέθισμα της τροφής ώστε να εκδηλωθεί εξαρτώμενη μάθηση;

Σε μια προσπάθεια αναγνώρισης μορίων που εξυπηρετούν την εξαρτημένη μάθηση με βάση τη θερμοκρασία, κλωνοποιήθηκε στο νηματώδη το γονίδιο *ncs-1* το οποίο κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που φέρει μοτίβα αλληλεπίδρασης με ιόντα ασβεστίου (Gomez et al., 2001). Η πρωτεΐνη αυτή εντοπίστηκε μεταξύ άλλων στον αισθητήριο για τη θερμοκρασία νευρώνα AFD, ενώ η μεταλλαγή του γονιδίου προκαλούσε ανωμαλία στη συμπεριφορά της θερμότητας. Συγκεκριμένα, τα μεταλλαγμένα άτομα παρουσιάστηκαν κρυοφιλικά (cryophilic), φαινότυπος που επίσης εμφανίζεται με την απαλοιφή των νευρώνων AFD και AIY, αλλά και κατά τη μεταλλαγή του γονιδίου *ttx-3* το οποίο κωδικοποιεί τον υπεύθυνο μεταγραφικό παράγοντα για το σχηματισμό του νευρώνα AIY (Mori, 1999). Καθώς η πρωτεΐνη NCS-1 είναι ένας αισθητήρας ιόντων ασβεστίου, τέθηκε το ερώτημα για το αν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου ρυθμίζουν τη συμπεριφορά της θερμότητας. Παρατηρήθηκε ότι η διάσωση του φαινοτύπου δεν ήταν δυνατή όταν στο στελέχος *ncs-1* γινόταν μετασχηματισμός με το μεταλλαγμένο για την περιοχή πρόσδεσης των ιόντων ασβεστίου μόριο NCS-1. Αντίθετα, η εισαγωγή του γονιδίου του αγρίου τύπου οδηγούσε σε διάσωση του φαινοτύπου όταν αυτό εκφραζόταν στο νευρώνα AIY. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα των ιόντων ασβεστίου στο νευρώνα αυτό ελέγχουν την ικανότητα των ατόμων για εκδήλωση εξαρτημένης μάθησης και γι' αυτό ο νευρώνας AIY πιθανότατα ενσωματώνει τις διαφορετικές πληροφορίες της θερμοκρασίας και της ύπαρξης τροφής (Gomez et al., 2001). Η πρωτεΐνη NCS-1 ενεργοποιείται στη συνέχεια οδηγώντας στη βελτίωση της διακυτταρικής επικοινωνίας μεταξύ του νευρώνα AIY και του AFD ή των μετασυναπτικών RIA και AIZ

Περιεχόμενα

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

## Στόχοι

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας τέθηκαν οι εξής στόχοι:

1. Αναγνώριση στον καινοραβδίτη μη χαρακτηρισμένων καναλιών ιόντων τα οποία να ρυθμίζουν/ελέγχουν την πλαστικότητα του νευρικού συστήματος του οργανισμού με απώτερο σκοπό τη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν την πλαστικότητα του νευρικού συστήματος.
2. Μελέτη και καθορισμός των μορφών μνήμης και μάθησης που ελέγχουν. Πρόκειται δηλαδή για παράγοντες των οποίων η δράση περιορίζεται σε συγκεκριμένες μορφές μνήμης και μάθησης ή έχουν γενικότερη επίδραση στην πλαστικότητα του νευρικού συστήματος;
3. Αναγνώριση του νευρωνικού δικτύου μέσω του οποίου εκδηλώνεται το φαινόμενο της μνήμης και της μάθησης. Ποιοι είναι δηλαδή οι νευρώνες εκείνοι στους οποίους δρουν τα παραπάνω μόρια και συνεπώς ποιού είδους σηματοδότηση ελέγχουν στο νευρικό σύστημα;
4. Μελέτη του μηχανισμού δράσης των αναγνωρισμένων μορίων. Πρόκειται για μόρια που ρυθμίζουν/ελέγχουν την πλαστικότητα του νευρικού συστήματος μέσω της ρύθμισης της διακυτταρικής επικοινωνίας; Αν ναι ποιος είναι ο μηχανισμός που το πετυχαίνουν αυτό;

Περιεχόμενα

## Αποτελέσματα

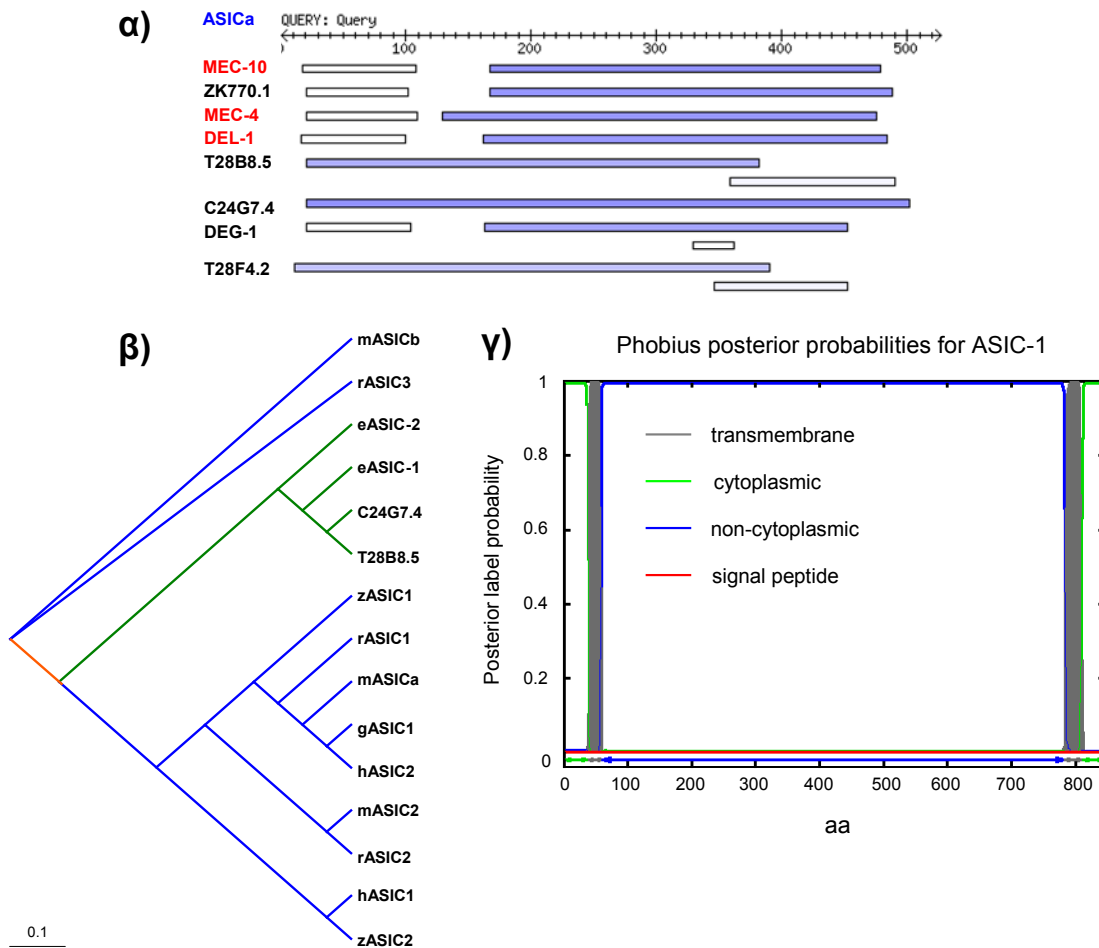
### 1. Η πρωτεΐνη ASIC-1: ένα νέο μέλος της οικογένειας των DEG/ENaCs στον *C. elegans*

Όπως αναφέρθηκε, οι ASICs είναι μια ομάδα πρωτεϊνών που ανήκουν στην υπεροικογένεια των DEG/ENaCs. Πρόκειται για κανάλια ιόντων νατρίου των οποίων η βασική διαφορά από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας έγκειται στο γεγονός ότι ενεργοποιούνται από το χαμηλό pH. Τα περισσότερα από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας που έχουν μέχρι σήμερα χαρακτηριστεί έχουν βρεθεί να ενεργοποιούνται από μηχανικά ερεθίσματα (Tavernarakis and Driscoll, 2001b). Ιδιαίτερα στον καινοραβδίτη έχει βρεθεί ότι δυο τέτοια κανάλια, το MEC-4 και το MEC-10 αποτελούν τις υπομονάδες που συγκροτούν το κανάλι μηχανο-αισθητήρα υπεύθυνο για την αντίληψη των περιβαλλοντικών μηχανικών ερεθισμάτων (Driscoll and Tavernarakis, 1997; Tavernarakis and Driscoll, 2001a). Από την άλλη, ένα αντίστοιχο κανάλι φαίνεται να μεσολαβεί στην ημιτονοειδή κίνηση του οργανισμού και την αντίληψη των μηχανικών πιέσεων που δημιουργούνται από αυτήν. Το κανάλι αυτό φέρει ως υπομονάδες τα μέλη των DEG/ENaCs, UNC-8 και DEL-1 (Tavernarakis et al., 1997). Επιπρόσθετα, οι διαφορές μεταξύ των ASICs και των υπόλοιπων DEG/ENaCs περιορίζονται περισσότερο σε λειτουργικό επίπεδο παρά σε διαφορές στην αλληλουχία και σε χαρακτηριστικά μοτίβα.

Για την αναγνώριση υποψήφιων καναλιών ASIC στο νηματώδη ακολουθήθηκε *in silico* ανάλυση. Έτσι, αναζητήθηκαν πρωτεΐνες στο νηματώδη οι οποίες να φέρουν ομολογία με το χαρακτηρισμένο στα θηλαστικά κανάλι ASIC1a. Για το σκοπό χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία του καναλιού ASIC1a του ποντικού και η αναζήτηση έγινε με τον αλγόριθμο BLASTp. Από την αναζήτηση αυτή επιβεβαιώθηκε αρχικά ότι οι διαφορές μεταξύ των ASICs και των Degenerins σε επίπεδο αλληλουχίας είναι μικρές. Κι αυτό καθώς μεταξύ των πρώτων πρωτεϊνών στη λίστα αναζήτησης είναι μόρια όπως το MEC-10, το MEC-4, το UNC-8 και το DEL-1 (Εικόνα 1α). Εντούτοις, στη σχετική λίστα η πρωτεΐνη ZK770.1 εμφανίστηκε μαζί με την MEC-10 να έχει την υψηλότερη ομοιότητα στην αλληλουχία με την πρωτεΐνη ASIC1a του ποντικού (47%), ενώ και η φυλογενετική απόσταση της ASIC-1 του νηματώδη φαίνεται να είναι μικρή σε σχέση με τις υπόλοιπες ASICs (Εικόνα 1β).

Σε συνέχεια της *in silico* ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος Phobius για την πρόβλεψη διαμεμβρανικών, ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων περιοχών στην υπό μελέτη πρωτεΐνη. Βρέθηκε ότι η ASIC-1 σχηματίζει ένα κανάλι του οποίου η πρωτοταγής δομή είναι

όμοια με αυτή των υπολοίπων DEG/ENaCs. Η αμινοξική αλληλουχία του μορίου εμφανίζει με υψηλή πιθανότητα δυο διαμεμβρανικές περιοχές, το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο στο εσωτερικό του κυττάρου και μια μεγάλη εξωκυττάρια θηλιά να περιλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης (Εικόνα 1γ). Έτσι, επιβεβαιώνεται ότι πρόκειται για ένα μέλος της οικογένειας των DEG/ENaCs.



**Εικόνα 1: Φυλογενετική και λειτουργική ανάλυση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης ASIC-1.** (α) Χρήση του αλγορίθμου BLASTr για την αναζήτηση πρωτεϊνών του *C. elegans* οι οποίες φέρουν ομολογία σε επίπεδο αλληλουχίας με την πρωτεΐνη ASIC1a του ποντικού. Όλες οι πρωτεΐνες που προέκυψαν ανήκουν στην υπεροικογένεια των DEG/ENaCs. Με κόκκινα γράμματα φαίνονται οι DEG/ENaCs του νηματώδη που έχουν χαρακτηριστεί γενετικά. Η πρωτεΐνη ZK770.1 βρέθηκε να έχει το ίδιο υψηλό δείκτη ομοιότητας με την MEC-10 που έχει βρεθεί να παίζει ρόλο στη διαδικασία της αντίληψης μηχανικών ερεθισμάτων. (β) Κλαδογράμμο που απεικονίζει την εξελικτική σχέση ανάμεσα σε ASICs διαφορετικών οργανισμών. Στο σχηματισμό του κλαδογράμματος έχουν χρησιμοποιηθεί ASICs προερχόμενες από τον άνθρωπο (h), τον ποντικό (m), τον αρουραίο (r), το zebrafish (z) και το νηματώδη (e). Οι διαφορετικοί κλάδοι απεικονίζουν τη σχετική εξελικτική απόσταση μεταξύ των διαφορετικών πρωτεϊνών, υπολογιζόμενη ως αμινοξικές αλλαγές ανά θέση. (γ) Εφαρμογή του αλγορίθμου Phobius για την τοπολογική ανάλυση της πρωτεΐνης ASIC-1 με βάση την πρωτοταγή της δομή.



Στο γράφημα απεικονίζονται οι πιθανότητες, τμήματα της πρωτεΐνης να είναι διαμεμβρανικά, ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια. Με πιθανότητες που φτάνουν το 100%, το κανάλι ASIC-1 φέρει ένα αμινοτελικό και ένα καρβοξυτελικό άκρο στο εσωτερικό του κυττάρου, δυο διαμεμβρανικές περιοχές και μια εξωκυττάρια θηλιά, ακολουθώντας την τυπική τοπολογία των καναλιών DEG/ENaCs.

## 2. Ανάλυση της αλληλουχίας του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου *ok415*

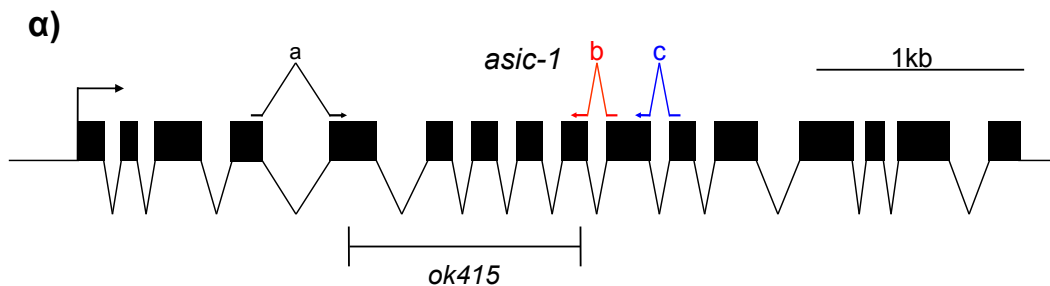
Για τη μελέτη της λειτουργίας του καναλιού ASIC-1 στο νηματώδη χρησιμοποιήθηκε το μεταλλαγμένο στέλεχος *asic-1(ok415)* που παραχωρήθηκε από το Caenorhabditis Genetic Consortium (CGC). Το συγκεκριμένο στέλεχος έφερε μια μεταλλαγή στον γενετικό τόπο του *asic-1*. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *asic-1* του αγρίου τύπου έχει μήκος 4196 bp και περιλαμβάνει 15 εξώνια τα οποία κωδικοποιούν για μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 844 αμινοξέα. Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *asic-1(ok415)* έφερε μια έλλειψη με υπολογιζόμενο μήκος περίπου στις 950 bp. Για την ανάλυση της συγκεκριμένης μεταλλαγής έγινε αλληλούχηση με κύριο στόχο την οριοθέτηση της έλλειψης στο γονίδιο. Έτσι, βρέθηκε ότι η συγκεκριμένη μεταλλαγή είναι μια έλλειψη 941 βάσεων που εκτείνεται εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου *asic-1* και πιο συγκεκριμένα από το τέλος του 5<sup>ου</sup> εξωνίου μέχρι και το τέλος του 9<sup>ου</sup> εξωνίου. Εξαιτίας της έλλειψης αυτής υπολογίζεται ότι δεν αλλάζει το πλαίσιο ανάγνωσης και ότι προκύπτει γονιδιακό προϊόν με μήκος μικρότερο του αγρίου τύπου κατά 165 αμινοξικά κατάλοιπα (Εικόνα 2α).

Σε ένα επόμενο βήμα μελετήθηκε η έκφραση του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου σε σχέση με αυτήν του αγρίου τύπου. Για το σκοπό αυτό σχηματίστηκε και πολλαπλασιάστηκε το cDNA που προκύπτει από το μετάγραφο του εκάστοτε αλληλόμορφου. Όπως αναμενόταν, το αλληλόμορφο *asic-1(ok415)* δίνει προϊόν μικρότερου μήκους κατά 165aa σε σχέση με αυτό του αγρίου τύπου. Επιπρόσθετα, επιβεβαιώνεται ότι η παραπάνω μεταλλαγή δεν προκαλεί αποσταθεροποίηση της μεταγραφικής ή μεταφραστικής διαδικασίας στο στέλεχος *asic-1(ok415)* και έτσι προκύπτει πρωτεΐνη μικρότερου μεγέθους (Εικόνα 2β).

Στην περίπτωση που η παραπάνω μεταλλαγή άλλαζε το πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου ή/και προέκυπτε κωδικόνιο λήξης που θα διέκοπτε το σχηματισμό ακέραιης πρωτεΐνης, τότε θα ήταν δόκιμο η μεταλλαγή να θεωρείται μηδενική. Τι συμβαίνει όμως στην περίπτωσή μας που όπως φαίνεται προκύπτει πρωτεϊνικό προϊόν μικρότερου μήκους; Ποιό είναι δηλαδή το αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μεταλλαγής και ποιες οι επιπτώσεις της στη λειτουργικότητα του καναλιού ASIC-1; Το καίριο αυτό ερώτημα μπορεί να απαντηθεί σε δυο διαφορετικά επίπεδα. Αρχικά, με πειράματα ελέγχου της λειτουργίας του καναλιού και των φυσιολογικών παραμέτρων που το χαρακτηρίζουν. Έτσι, θα ήταν σκόπιμο να

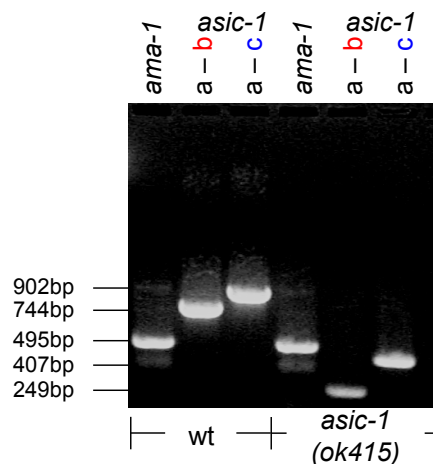
πραγματοποιηθούν πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας όπου η ευαισθησία της ASIC-1 σε χαμηλό pH και η αγωγιμότητα του καναλιού σε ιόντα νατρίου ή/και ασβεστίου θα μπορούσαν να υπολογιστούν. Εντούτοις, το εξαιρετικά μικρό μέγεθος των νευρώνων του *C. elegans* αλλά και η τοποθέτησή τους ανάμεσα σε επιθηλιακό και μυϊκό ιστό στο σώμα του οργανισμού τους κάνουν εξαιρετικά δύσκολα προσπελάσιμους για *in vivo* πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας.

Στην περίπτωση που η παραπάνω προσέγγιση ακολουθηθεί απαιτείται εκτοπική έκφραση του καναλιού σε ένα άλλο σύστημα το οποίο να επιτρέπει την ηλεκτροφυσιολογική ανάλυση (π.χ. ωκύτταρα *Xenopus* ή κυτταρικές σειρές). Σε ένα επόμενο όμως επίπεδο το αποτέλεσμα της μεταλλαγής στο αλληλόμορφο *ok415* μπορεί να μελετηθεί μέσα από την ανάλυση του φαινοτύπου που πιθανόν ελέγχει και τη διάσωσή του από το γονίδιο του αγρίου τύπου. Στην περίπτωση δηλαδή που παρατηρείται διάσωση του φαινοτύπου, το αλληλόμορφο *ok415* φέρει είτε μια μηδενική μεταλλαγή είτε δίνει προϊόν που αποτελεί μια υπομορφή του φυσιολογικού καναλιού.



β)

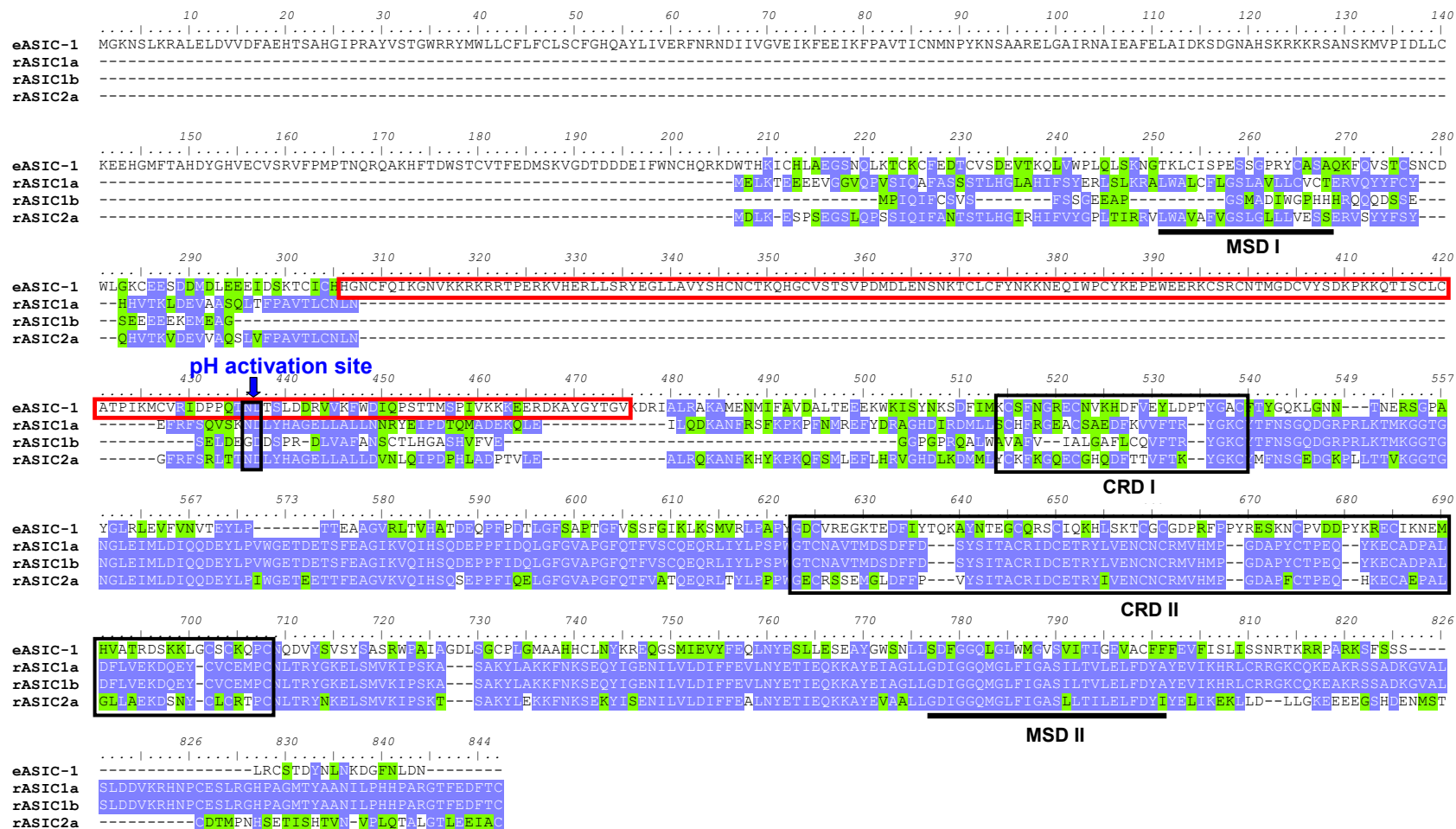
RT-PCR analysis



**Εικόνα 2. Υπολογιστική ανάλυση της αλληλουχίας του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου και έλεγχος της έκφρασής του στο στέλεχος *asic-1(ok415)*.** (α) Απεικόνιση της κωδικής περιοχής του γονιδίου *asic-1*. Το γονίδιο περιλαμβάνει 15 εξώνια, ενώ η μεταλλαγή του αλληλομόρφου *ok415* είναι μια έλλειψη που εκτείνεται από το 5<sup>ο</sup> μέχρι το 9<sup>ο</sup> εξώνιο. Επίσης απεικονίζονται σχηματικά οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση RT-PCR. Οι εκκινητές είναι σχεδιασμένοι ώστε να υβριδοποιούνται ταυτόχρονα σε δυο εξώνια με σκοπό την εξάλειψη της πιθανότητας πολλαπλασιασμού γενωμικού DNA κατά την αντίδραση RT-PCR. (β) Έλεγχος της έκφρασης του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου *ok415* μέσω αντίδρασης RT-PCR. Φαίνονται οι διαφορές στο μέγεθος ανάμεσα στο mRNA που προκύπτει από το γονίδιο *asic-1* του αγρίου τύπου και του αλληλομόρφου *ok415*. Για το σκοπό αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί δυο ζεύγη εκκινητών (a-b) και (a-c), ενώ στην αντίδραση ελέγχου έχει χρησιμοποιηθεί ζεύγος εκκινητών που υβριδοποιείται στο mRNA που προκύπτει από το γονίδιο *ama-1* (μεγάλη υπομονάδα της RNA πολυμεράσης II).

Πριν όμως από την ανάλυση αυτή, η *in silico* ανάλυση της αλληλουχίας του καναλιού ASIC-1 μπορεί να δώσει χρήσιμες ενδείξεις σε ότι αφορά την περιοχή της πρωτεΐνης που λείπει. Έτσι, πολλαπλή αντιστοίχιση (multiple alignment) της αλληλουχίας της ASIC-1 με τις αντίστοιχες χαρακτηρισμένων ASICs από τα σπονδυλωτά έδειξε ότι το τμήμα της πρωτεΐνης που απομακρύνεται στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *ok415* περιλαμβάνει μια περιοχή συντηρημένη ανάμεσα στις ASICs (Εικόνα 3). Επιπρόσθετα φάνηκε ότι όπως και στις υπόλοιπες ASICs, η ASIC-1 του *C. elegans* εμφανίζει υψηλή συντήρηση σε περιοχές πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης, ένα χαρακτηριστικό στην αλληλουχία των καναλιών DEG/ENaCs. Επίσης, η ανάλυση αυτή έκανε φανερό ότι η περιοχή της πρωτεΐνης που λείπει στο μεταλλαγμένο στέλεχος *ok415* είναι σημαντική για τη λειτουργία του καναλιού ASIC-1 καθώς στη συγκεκριμένη συντηρημένη περιοχή άλλων ASICs έχουν χαρακτηριστεί μεταλλαγές που διακόπτουν τη λειτουργία τους και συγκεκριμένα την ενεργοποίησή τους σε όξινες συνθήκες (Babini et al., 2002). Καθώς, η έλλειψη στο αλληλόμορφο *ok415* περιλαμβάνει και την παραπάνω περιοχή είναι πολύ πιθανό ότι θα έχει παρόμοιο αν όχι ισχυρότερο αποτέλεσμα στη λειτουργία του παραγόμενου μορίου.

## Multiple alignment



**Εικόνα 3: Multiple alignment διαφορετικών ASICs.** Εφαρμογή του αλγορίθμου T-coffee (Notredame et al., 2000), για την αντιστοίχιση της αλληλουχίας μορίων ASIC από διαφορετικούς οργανισμούς. Χρησιμοποιήθηκαν ASICs του αρουραίου (*r*) και η ASIC-1 του νηματώδη (*e*). Απεικονίζεται ακόμα η περιοχή που αντιστοιχεί στη μεταλλαγή (έλλειψη) που φέρει το αλληλόμορφο *ok415* (κόκκινο πλαίσιο) και η οποία περιλαμβάνει συντηρημένες περιοχές ανάμεσα στις διαφορετικές ASICs. Επιπρόσθετα, στη συγκεκριμένη περιοχή έχουν χαρτογραφηθεί μεταλλαγές οι οποίες διακόπτουν τη λειτουργία των ASICs, καθώς η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του καναλιού από πρωτόνια (χαμηλό pH) (Babini et al., 2002; Salinas et al., 2006). Επίσης, υψηλή συντήρηση παρουσιάζουν περιοχές που σχετίζονται με τη λειτουργία των παραπάνω καναλιών όπως είναι οι δυο διαμεμβρανικές περιοχές (υπογραμμισμένες περιοχές, MSD) και οι περιοχές πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης (πλαίσιο, CDR).

### 3. Μορφολογική και φαινοτυπική ανάλυση του στελέχους *asic-1(ok415)*

Προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος του καναλιού ASIC-1 στο νηματώδη έγιναν φαινοτυπικοί έλεγχοι σε μια σειρά από συμπεριφορές και λειτουργίες του στελέχους *asic-1(ok415)*. Αρχικά, έγιναν απλές παρατηρήσεις όπως είναι το μέγεθος, το σχήμα και μια σειρά από χαρακτηριστικά της κίνησης του στελέχους *asic-1(ok415)*. Βρέθηκε ότι σε όλους τους φαινοτυπικούς ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα άτομα του αγρίου τύπου (Πίνακας 1). Οι παρατηρήσεις αυτές δίνουν μια πρώτη εικόνα για την κατάσταση του στελέχους που λόγω του τρόπου μεταλλαξογένεσης (TMP-UV) είναι πιθανό να φέρει και άλλες μεταλλαγές εκτός της έλλειψης στο γονίδιο *asic-1*. Με την παραπάνω προσέγγιση γίνεται προσπάθεια ανίχνευσης πιθανών ανωμαλιών οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν δευτερογενώς άλλους φαινοτύπους και οι οποίες να οφείλονται στο ευρύτερο γενετικό υπόβαθρο του στελέχους και όχι απαραίτητα στην υπό μελέτη μεταλλαγή. Έτσι, στην περίπτωση που παρατηρούνται αδρές φαινοτυπικές ανωμαλίες, οι διαδοχικές διασταυρώσεις με το στέλεχος του αγρίου τύπου (*out crosses*) καθίστανται επιβεβλημένες. Παρά το γεγονός ότι αυτό δεν συμβαίνει με το στέλεχος *asic-1(ok415)*, η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε με τρεις διαδοχικές διασταυρώσεις με το στέλεχος του αγρίου τύπου.

Κατά το φαινοτυπικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε, η ASIC-1 δεν βρέθηκε να συμμετέχει στη διαδικασία αντίληψης μηχανικών ερεθισμάτων (Πίνακας 1), όπως συμβαίνει με άλλα μέλη της οικογένειας των *degenerins*. Έτσι, η ικανότητα του μεταλλαγμένου στελέχους να αντιδρά σε μηχανικά ερεθίσματα που ασκούνται στο σώμα του (*gentle body touch*, *harsh touch*, *nose touch*) βρέθηκε να είναι όμοια με αυτή του αγρίου τύπου.

**Πίνακας 1: Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός του μεταλλαγμένου στελέχους *asic-1(ok415)*.** Όλα τα φαινοτυπικά τεστ πραγματοποιήθηκαν στις συνθήκες συνθήκες καλλιέργειας του οργανισμού.

	Pharyngeal pumping*	Defecation†	Sinusoidal locomotion¶	Speed§	Body size#	Gentle body touch response‡	Harsh touch response‡	Nose touch response‡	Egg-laying††
<b>wild type</b>	223±14	44.1±4.7	0.72±0.1 (0.31±0.2)	1.3±0.6	1.1±0.4	95±3	98±1	82±2	2.65±0.21
<b><i>asic-1(ok415)</i></b>	218±19	36.6±3.1	0.74±0.2 (0.34±0.2)	1.2±0.7	1.0±0.2	91±4	96±3	79±3	2.72±0.53

\* Pumps per minute

† Duration of defecation cycle in seconds

¶ Wavelength of sinusoidal track in mm (amplitude of sinusoidal track in mm)

§ mm per second

# Adult body length in millimeters

‡ Percentage of animals responding

†† Number of eggs laid per worm per hour

Επίσης, έγινε έλεγχος της ημιτονοειδούς κίνησης του στελέχους, μια συμπεριφορά η οποία φυσιολογικά βασίζεται στην εφαρμογή μηχανικής πίεσης για την ενεργοποίηση των κινητήριων νευρώνων του οργανισμού μέσω καναλιών DEG/ENaCs (Tavernarakis et al., 1997). Η μεταλλαγή του γονιδίου *asic-1* δεν επηρεάζει κανένα από τα μεγέθη που χαρακτηρίζουν την κίνηση του οργανισμού (Πίνακας 1). Τέλος, μελετήθηκαν και άλλες φυσιολογικές λειτουργίες οι οποίες σχολιάζονται στη συνέχεια. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνάδουν στην ιδέα ότι η ASIC-1 είναι πιθανότερο να έχει ρόλο αισθητήρα πρωτονίων παρά να συμβάλλει στην αίσθηση μηχανικών ερεθισμάτων (mechanotransduction).

#### 4. Το κανάλι ASIC-1 ελέγχει την πλαστικότητα στη συμπεριφορά του *C. elegans*

Για την εξακρίβωση του ρόλου της ASIC-1 στον καινοραβδίτη τέθηκε το εξής ερώτημα: Θα μπορούσε μια ASIC να εξυπηρετεί στον *C. elegans* λειτουργίες που συναντώνται σε ανώτερους οργανισμούς; Όπως αναφέρθηκε δυο βασικές λειτουργίες που εξυπηρετούνται από τις ASICs στα θηλαστικά είναι η αίσθηση του πόνου, στο περιφερικό νευρικό σύστημα και η διαδικασία της μνήμης και της μάθησης στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Επικεντρώνοντας τη μελέτη στο ρόλο των ASICs στην πλαστικότητα του νευρικού συστήματος προκύπτει εύλογα το ερώτημα: Είναι υπαρκτή η πλαστικότητα του νευρικού συστήματος στον καινοραβδίτη και αν ναι πως μπορεί να παρατηρηθεί; Προκειμένου να είναι δυνατή η μελέτη και η γενετική ανάλυση του φαινομένου χρειάζεται ο οργανισμός να εκδηλώνει με επαναλαμβανόμενο και σταθερό τρόπο μια συμπεριφορά και στη συνέχεια, η αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών να οδηγεί στην αλλαγή της συμπεριφοράς αυτής. Με τον τρόπο αυτό ορίζεται η πλαστικότητα στη συμπεριφορά ενός οργανισμού, αντανακλώντας την πλαστικότητα στη λειτουργία του νευρικού του συστήματος.

Μια σταθερή και επαναλαμβανόμενη συμπεριφορά που εκδηλώνει ο νηματώδης είναι αυτή της χημειόταξης. Πρόκειται για μια θεμελιώδη λειτουργία που εξυπηρετεί στην επικοινωνία του οργανισμού με το εξωτερικό περιβάλλον. Δεδομένου ότι ο *C. elegans* ζει και αναπτύσσεται στο φυσικό περιβάλλον χρειάζεται να καλύπτει μεγάλες αποστάσεις προκειμένου να εντοπίζει την τροφή του αλλά και να αποφεύγει επικίνδυνα περιβάλλοντα. Ο προσανατολισμός για την εύρεση τροφής αλλά και η αντίληψη του πληθυσμού για τη ρύθμιση μιας σειράς αναπτυξιακών και φυσιολογικών λειτουργιών βασίζονται στο φαινόμενο της χημειόταξης. Ο νηματώδης μπορεί να αντιλαμβάνεται μια τεράστια ποικιλία από υδατοδιαλυτές και πτητικές χημικές ενώσεις. Αυτές διαχωρίζονται σε ελκτικές, οι οποίες πηγάζουν από εστίες ύπαρξης τροφής αλλά και ως προϊόντα μεταβολισμού των βακτηρίων και σε απωθητικές οι οποίες προκύπτουν από περιβάλλοντα δυσμενή για την επιβίωσή του .

Έτσι, ο νηματώδης αντιλαμβάνεται χημικά ερεθίσματα τα οποία είτε επιλέγει (chemoattraction) είτε αποφεύγει (chemorepulsion) μέσω της συμπεριφοράς της χημειότητας (Bargmann et al., 1993; Bargmann and Horvitz, 1991; de Bono and Maricq, 2005; Hedgecock and Russell, 1975; Hobert, 2003; Mori, 1999; Ward, 1973). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο συγκεκριμένος φαινότυπος αντικατοπτρίζει την ενδογενή τάση για την προσέγγιση ή την αποφυγή μιας δεδομένης χημικής ουσίας εφόσον αυτό γίνεται χωρίς να απαιτείται η προγενέστερη επαφή του ατόμου με την ουσία αυτή. Επομένως, η χημειότητα είναι μια συμπεριφορά που οφείλεται στο στερεοτυπικό νευρικό σύστημα του οργανισμού και στην επιμέρους λειτουργία συγκεκριμένων νευρώνων του.

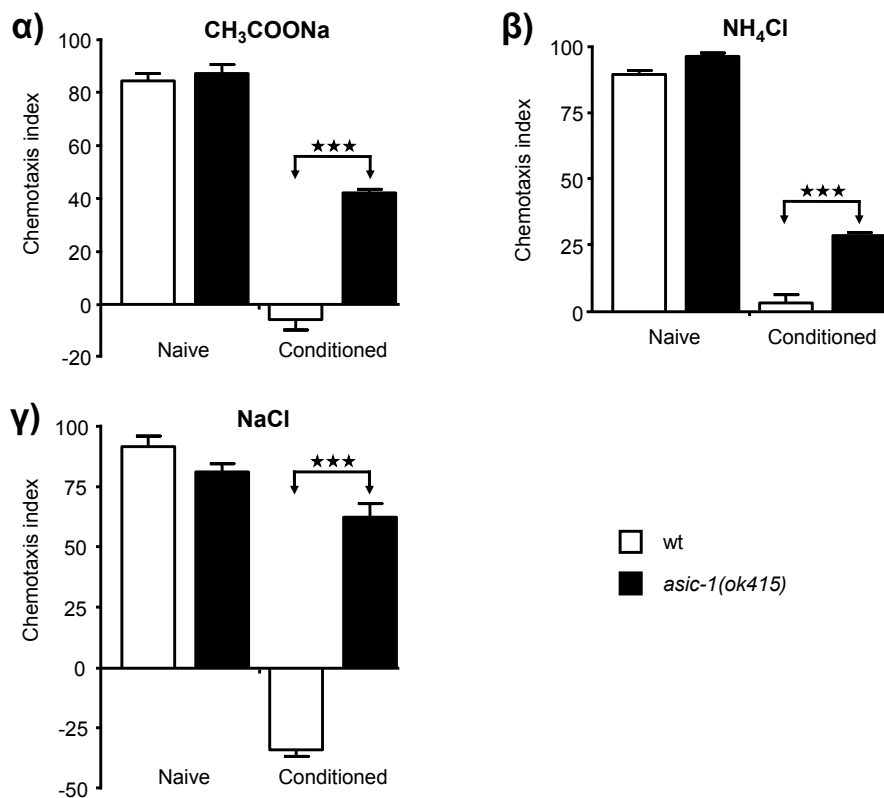
Κάνοντας λόγο για ελκτικές χημικές ενώσεις, η ενδογενής έλξη που περιγράφηκε μπορεί να τροποποιηθεί με βάση την προγενέστερη εμπειρία. Ένα τέτοιο παράδειγμα περιλαμβάνει την έκθεση του οργανισμού σε αυτές τις ενώσεις σε συνθήκες έλλειψης τροφής, σε μια διαδικασία που καλείται conditioning. Σε αυτό το παράδειγμα, όπου αντικατοπτρίζεται η ικανότητα εκδήλωσης εξαρτημένης μάθησης (associative learning), η έλλειψη τροφής αποτελεί ένα ισχυρά απωθητικό ερέθισμα και χαρακτηρίζεται ως unconditioning stimulus (US). Το ερέθισμα αυτό συσχετίζεται με ένα δεύτερο που είναι η ελκτική χημική ένωση και η οποία χαρακτηρίζεται ως conditioning stimulus (CS). Με βάση αυτή την εμπειρία επάγεται η αλλαγή της συμπεριφοράς της χημειότητας (de Bono and Maricq, 2005; Hobert, 2003). Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας-εμπειρίας είναι η δραματική μείωση του χημειοτακτισμού καθώς η μέχρι πρότινος ελκτική ουσία μετατρέπεται σε απωθητική εφόσον έχει συσχετιστεί με την έλλειψη τροφής. Αυτή η αλλαγή στη συμπεριφορά αντικατοπτρίζει την πλαστικότητα του νευρικού συστήματος του νηματώδους ως αποτέλεσμα του associative learning που εκδηλώνει.

Για να μελετηθεί ο πιθανός ρόλος του καναλιού ASIC-1 στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης στον *C. elegans* έγινε conditioning του στελέχους *asic-1(ok415)*. Σε αυτό το παράδειγμα ελέγχθηκε η ικανότητα του οργανισμού να συσχετίζει κάθε φορά μια εκ των ελκτικών ενώσεων AcNa, NH<sub>4</sub>Cl και NaCl (CS) με την έλλειψη φαγητού (US). Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι τα άτομα του στελέχους *asic-1(ok415)* τα οποία δεν είχαν καμία προγενέστερη εμπειρία (naive) αντιλαμβάνονται και επιλέγουν τις παραπάνω ελκτικές ουσίες εκδηλώνοντας χημειοτακτισμό αντίστοιχο με αυτόν του αγρίου τύπου (Εικόνα 4α-γ). Επομένως το κανάλι ASIC-1 δεν συμμετέχει στη διαδικασία αντίληψης χημικών ερεθισμάτων. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την περαιτέρω μελέτη της ικανότητάς του οργανισμού να εκδηλώνει μνήμη και μάθηση καθώς για να συμβεί αυτό προϋποτίθεται η ικανότητα αντίληψης του συσχετιζόμενου ερεθίσματος. Έτσι, τέθηκε το ερώτημα αν το υπό μελέτη



στέλεχος εμφανίζει την ικανότητα συσχετισμού των χημικών αυτών ερεθισμάτων με το επώδυνο ερέθισμα της έλλειψης τροφής. Σε αυτόν το φαινοτυπικό έλεγχο φάνηκε ότι το στέλεχος *asic-1(ok415)* έχει εμφανή αδυναμία να εκδηλώσει πλαστικότητα στη συμπεριφορά του καθώς ο χημειοτακτισμός των ατόμων δεν ελαττώνεται στον ίδιο βαθμό με του αγρίου τύπου μετά από τη διαδικασία του conditioning (Εικόνα 4α-γ).

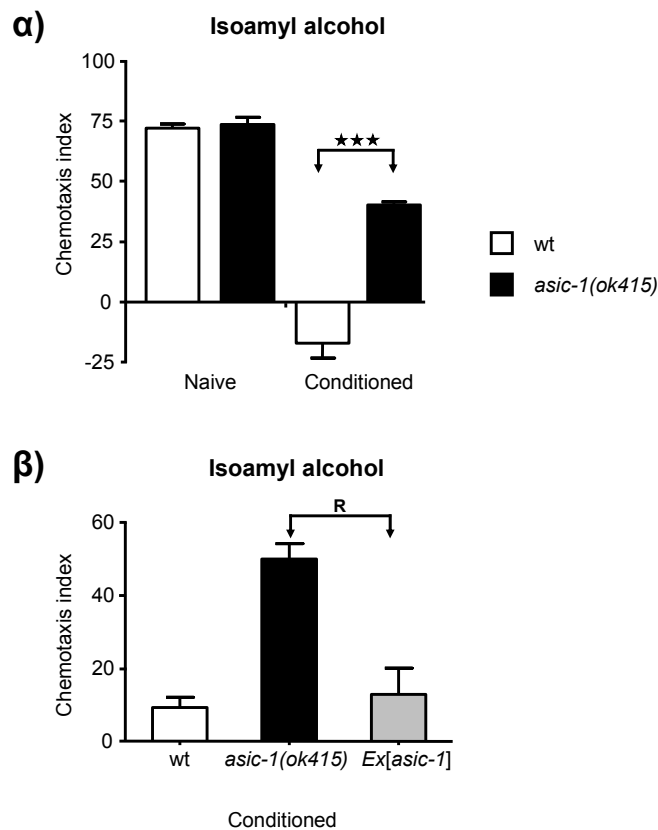
Σε μια επιπρόσθετη προσπάθεια ανάλυσης του ρόλου της ASIC-1 στο associative learning επιχειρήθηκε η επαγωγή του RNAi για τη στοχευμένη καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *asic-1*. Στην περίπτωση που παρατηρούνταν τα ίδια φαινοτυπικά αποτελέσματα με αυτά του μεταλλαγμένου στελέχους θα επιβεβαιωνόταν ότι η μεταλλαγή του *asic-1* προκαλεί την απώλεια της λειτουργίας του παραγόμενου μορίου. Εντούτοις, κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε εφόσον η καταστολή της έκφρασης γονιδίων σε νευρικά κύτταρα δεν είναι αποτελεσματική όταν εφαρμόζεται με τη μέθοδο του feeding (Tavernarakis et al., 2000).



**Εικόνα 4: Το κανάλι ASIC-1 ελέγχει τη διαδικασία του associative learning όταν το CS είναι υδατοδιαλυτές χημικές ενώσεις.** Η ικανότητα χημειοτακτισμού προς τις ελκτικές υδατοδιαλυτές ενώσεις (α) AcNa, (β) NH<sub>4</sub>Cl και (γ) NaCl δεν επηρεάζεται από τη μεταλλαγή του γονιδίου *asic-1*. Ανεκπαίδευτα (naive) άτομα του αγρίου τύπου (άσπρες στήλες-naive) και του μεταλλαγμένου στελέχους *asic-1(ok415)* (μαύρες στήλες-naive) εμφανίζουν υψηλό δείκτη χημειόταξης σε όλες τις ελκτικές ενώσεις που ελέγχθηκαν. Η παρουσίαση κάθε μιας από τις ενώσεις σε συνθήκες έλλειψης φαγητού οδηγεί σε μείωση του δείκτη χημειόταξης για τα άτομα του αγρίου τύπου (άσπρες

στήλες-conditioned), αλλά όχι για τα άτομα του στελέχους *asic-1(ok415)* (μαύρες στήλες-conditioned). (Κάθε στήλη αναπαριστά το μέσο όρο των τιμών από τουλάχιστον 4 διαφορετικές δοκιμασίες. Σε κάθε συνθήκη ελέγχθηκαν συνολικά 750 άτομα από κάθε στέλεχος - \*\*\*:  $P < 0.001$ , unpaired t-test).

Οι παραπάνω χημικές ενώσεις είναι υδατοδιαλυτές και για την αντίληψή τους είναι κυρίως υπεύθυνοι οι νευρώνες ASE και σε μικρότερο βαθμό οι ASI, ASG και ADF (Bargmann and Horvitz, 1991; Troemel, 1999). Έτσι, προκύπτει το ερώτημα για το αν το στέλεχος *asic-1(ok415)* αδυνατεί να συσχετίσει μόνο υδατοδιαλυτές χημικές ενώσεις. Σε αυτήν την περίπτωση η εκδήλωση της μνήμης και της μάθησης είναι πιθανό να περιορίζεται είτε στους αισθητήριους νευρώνες των παραπάνω ενώσεων είτε σε μετασυναπτικούς νευρώνες, οι οποίοι ολοκληρώνουν το νευρωνικό δίκτυο που ευθύνεται για την αίσθηση των ενώσεων αυτών. Για να απαντηθεί το συγκεκριμένο ερώτημα έγινε νέος φαινοτυπικός έλεγχος όπου η ελκτική χημική ένωση που χρησιμοποιήθηκε για conditioning ήταν η πτητική ισοαμυλική αλκοόλη. Η ένωση αυτή γίνεται αισθητή μόνο από ένα ζεύγος νευρώνων του νηματώδη (AWC) και όχι από τους παραπάνω χημειοϋποδοχείς.



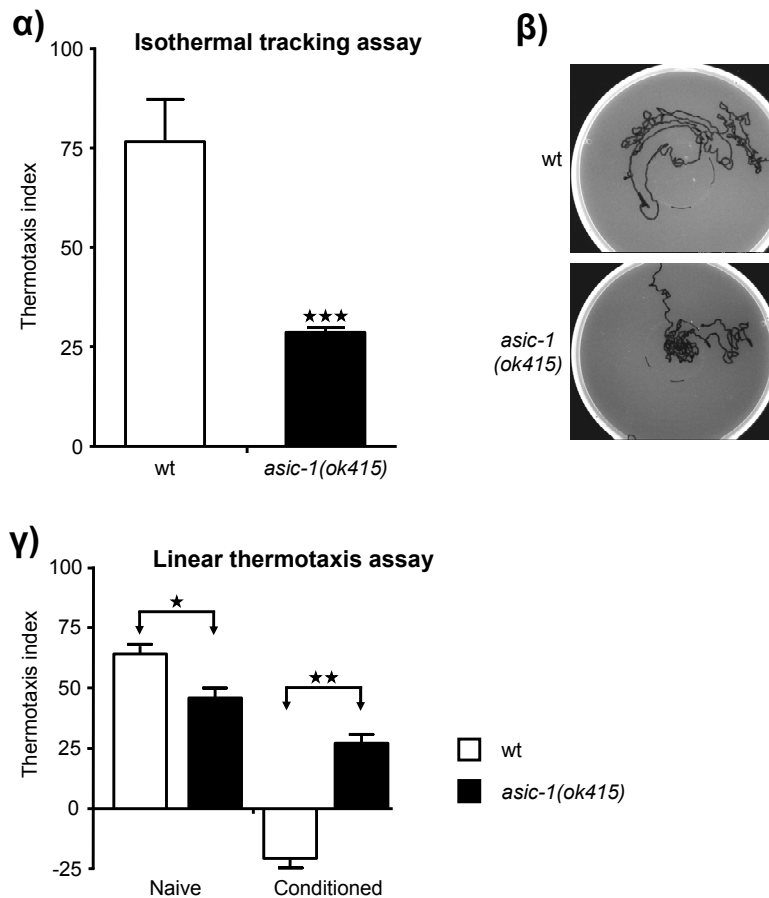
**Εικόνα 5: Το κανάλι ASIC-1 ελέγχει τη διαδικασία του associative learning όταν το CS είναι η πτητική ισοαμυλική αλκοόλη. (α) Η ικανότητα χημειοτακτισμού προς την ελκτική πτητική ένωση ισοαμυλική αλκοόλη δεν**

επηρεάζεται από τη μεταλλαγή του γονιδίου *asic-1*. Ανεκπαίδευτα (naive) άτομα του αγρίου τύπου (άσπρη στήλη-naive) και του μεταλλαγμένου στελέχους *asic-1(ok415)* (μαύρη στήλη-naive) εμφανίζουν υψηλό δείκτη χημειόταξης στην ισοαμυλική αλκοόλη. Η παρουσίαση της ισοαμυλικής σε συνθήκες έλλειψης φαγητού οδηγεί σε μείωση του δείκτη χημειόταξης για τα άτομα του αγρίου τύπου (άσπρη στήλη-conditioned), αλλά όχι για τα άτομα του στελέχους *asic-1(ok415)* (μαύρη στήλη-conditioned). (β) Το μετασχηματισμένο στέλεχος με το γονίδιο *asic-1* του αγρίου τύπου, *Ex[asic-1]* εκδηλώνει φυσιολογική ικανότητα για associative learning (γκρι στήλη). (Κάθε στήλη αναπαριστά το μέσο όρο των τιμών από τουλάχιστον 5 διαφορετικές δοκιμασίες. Σε κάθε συνθήκη ελέγχθηκαν συνολικά 900 άτομα από κάθε στέλεχος. – R=rescue \*\*\*: P<0.001, unpaired t-test).

Έτσι, βρέθηκε ότι το στέλεχος *asic-1(ok415)* εμφανίζει φυσιολογική χημειόταξη προς την ισοαμυλική αλκοόλη, ενώ αδυνατεί να τη συσχετίζει με την έλλειψη τροφής κατά αντίστοιχο τρόπο με πριν (Εικόνα 5α). Επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το κανάλι ASIC-1 συμμετέχει στη διαδικασία του associative learning όταν το ερέθισμα το οποίο καλείται κάθε φορά να συσχετίσει (CS) είναι χημικό. Επιπρόσθετα, και για να επιβεβαιωθεί ότι οι παρατηρούμενες φαινοτυπικές ανωμαλίες οφείλονται αποκλειστικά και μόνο στη μεταλλαγή του γονιδίου *asic-1*, το στέλεχος *asic-1(ok415)* μετασχηματίστηκε με το γονίδιο του αγρίου τύπου. Παρατηρήθηκε ότι τα διαγονιδιακά άτομα που προέκυψαν εμφανίζουν φυσιολογική συμπεριφορά associative learning (Εικόνα 5β). Το γεγονός αυτό της διάσωσης του φαινοτύπου από το γονίδιο του αγρίου τύπου αρχικά επιβεβαιώνει ότι το κανάλι ASIC-1 ελέγχει τη συγκεκριμένη συμπεριφορά και ότι οι παρατηρούμενες φαινοτυπικές ανωμαλίες δεν οφείλονται στο ευρύτερο γενετικό υπόβαθρο του στελέχους. Επιπρόσθετα, επιβεβαιώνει ότι η μεταλλαγή του στελέχους *asic-1(ok415)* προκαλεί ολική ή μερική απώλεια λειτουργίας του καναλιού ASIC-1.

Τί συμβαίνει όμως όταν ο νηματώδης καλείται να συσχετίσει διαφορετικής φύσης ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία του περιβάλλοντος με τη διαθεσιμότητα τροφής; Στην περίπτωση που εμφανίζει επίσης αδυναμία εκδήλωσης associative learning, μια πρώτη υπόθεση είναι ότι το κανάλι ASIC-1 ελέγχει την πλαστικότητα στη συμπεριφορά του οργανισμού με έναν ευρύτερο τρόπο, ο οποίος είναι ανεξάρτητος από το είδος του ερεθίσματος που προσλαμβάνει. Έτσι, εφαρμόστηκε φαινοτυπικός έλεγχος για την ικανότητα του οργανισμού να εκδηλώνει θερμότητα. Σε αυτό το παράδειγμα ελέγχεται η ικανότητα συσχετισμού είτε της παρουσίας, είτε της απουσίας τροφής (US) με την περιβαλλοντική θερμοκρασία (CS). Έτσι, ελέγχεται είτε ο θετικός συσχετισμός μεταξύ CS και US (reward) είτε ο αρνητικός κατά την έλλειψη τροφής (punishment). Το αποτέλεσμα αυτού του συσχετισμού είναι ο νηματώδης να επιλέγει τη θερμοκρασία καλλιέργειας όταν αντιμετωπίσει ένα θερμοκρασιακό κλινές εφόσον η προγενέστερη εμπειρία (conditioning) προβλέπει τη διαθεσιμότητα τροφής στη δεδομένη θερμοκρασία (Εικόνα 6β). Στην αντίθετη περίπτωση,

όταν έχει προηγηθεί conditioning σε μια θερμοκρασία απουσία τροφής, τότε ο οργανισμός απωθείται από αυτήν στο αντίστοιχο θερμοκρασιακό κλίμα καθώς προβλέπει την έλλειψη τροφής. Οι παραπάνω φαινοτυπικοί έλεγχοι έδειξαν ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος *asic-1(ok415)* παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα εκδήλωσης associative learning σε σχέση με αυτό του αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, εμφανίζει αδυναμία συσχέτισμού της περιβαλλοντικής θερμοκρασίας όταν αυτή παρουσιάζεται είτε παρουσία (Εικόνα 6α, 6γ) είτε απουσία τροφής (Εικόνα 6β).



**Εικόνα 6. Το κανάλι ASIC-1 ελέγχει τη συμπεριφορά της θερμοτάξης.** (α) Η ικανότητα φυσιολογικών και μεταλλαγμένων ατόμων να συσχετίζουν την περιβαλλοντική θερμοκρασία με την τροφή ελέγχθηκε στη δοκιμασία κυκλικού θερμοκρασιακού κλινούς (single worm isothermal tracking assay). Τα άτομα του αγρίου τύπου εμφανίζουν υψηλό δείκτη θερμοτάξης (άσπρη στήλη) σε αντίθεση με τα άτομα του στελέχους *asic-1(ok415)* (μαύρη στήλη). Κάθε στήλη αναπαριστά το επί τοις εκατό ποσοστό των ατόμων που εκδηλώνουν θερμοτάξη. Το ποσοστό αυτό προέκυψε από 200 διαφορετικές δοκιμασίες του ενός ατόμου (single worm) για το κάθε στέλεχος. (β) Καταγραφή της πορείας ενός ατόμου σε πιάτο με κυκλικό θερμοκρασιακό κλίμα. Τα άτομα του αγρίου τύπου εντοπίζουν στο κλίμα, την ισόθερμη που αντιστοιχεί στη θερμοκρασία καλλιέργειάς τους (20°C) και κινούνται πάνω σε αυτήν διαγράφοντας κύκλους. Αντίθετα, τα άτομα του στελέχους *asic-1(ok415)* εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα εκδήλωσης της συμπεριφοράς της θερμοτάξης και μην μπορώντας να εντοπίσουν την ισόθερμη των

20°C κινούνται συνήθως προς τις χαμηλότερες θερμοκρασίες του κλινούς. (γ) Η ικανότητα φυσιολογικών και μεταλλαγμένων ατόμων να συσχετίζουν την περιβαλλοντική θερμοκρασία με την τροφή ελέγχθηκε και στη δοκιμασία του γραμμικού θερμοκρασιακού κλινούς (linear thermal gradient assay). Η ικανότητα των ατόμων του στελέχους *asic-1(ok415)* για θερμόταξη (μαύρη στήλη-παίβε) εμφανίζεται να είναι διαφορετική στη συγκεκριμένη δοκιμασία σε σχέση με αυτή των ατόμων του αγρίου τύπου (άσπρη στήλη-παίβε). Τα άτομα του στελέχους *asic-1(ok415)* εμφανίζουν επίσης αδυναμία να συσχετίσουν τη θερμοκρασία καλλιέργειας με την έλλειψη φαγητού (μαύρη στήλη-conditioned), με αποτέλεσμα να μην απομακρύνονται από αυτήν όταν τη συναντούν στο γραμμικό θερμοκρασιακό κλινές. (Κάθε στήλη αναπαριστά το μέσο όρο των τιμών από τουλάχιστον 3 διαφορετικές δοκιμασίες. Σε κάθε δοκιμασία υπολογίστηκε το επί τοις εκατό ποσοστό των ατόμων ενός πληθυσμού, από κάθε στέλεχος, που εκδήλωσαν θερμόταξη. Σε κάθε συνθήκη ελέγχθηκαν συνολικά 900 άτομα από κάθε στέλεχος. \*: P<0.05, \*\*: P<0.01 \*\*\*: P<0.001, unpaired t-test).

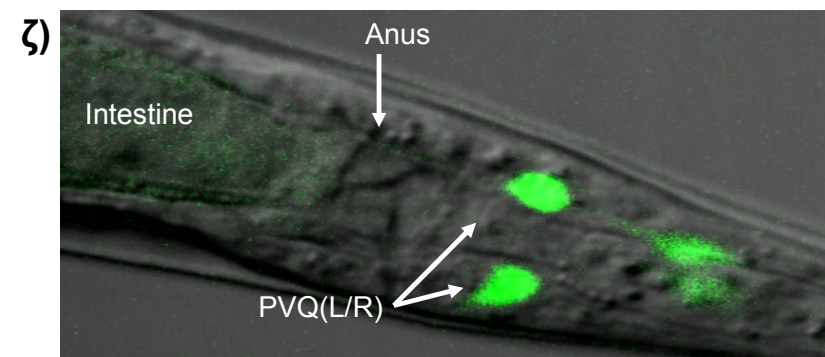
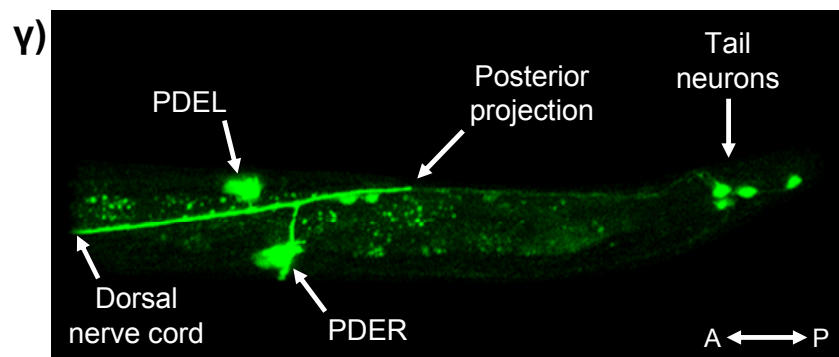
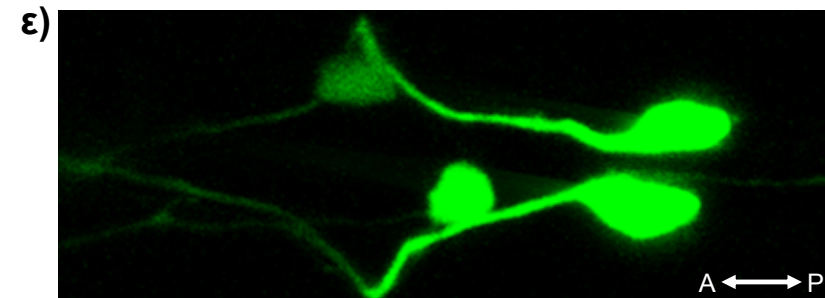
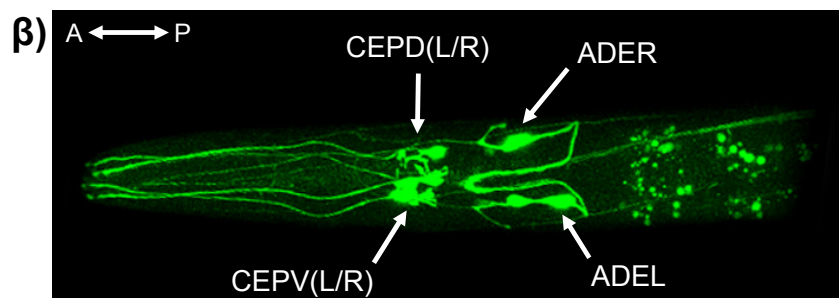
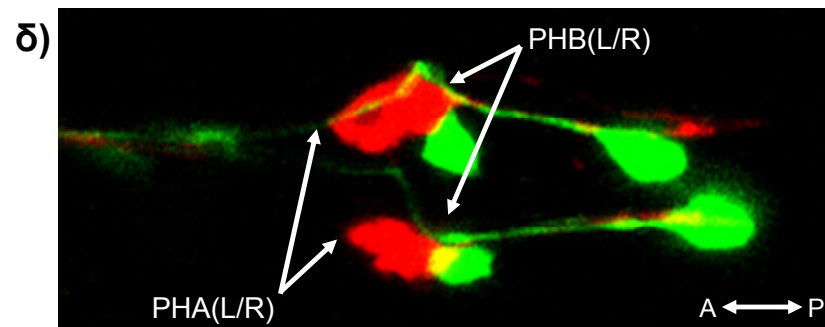
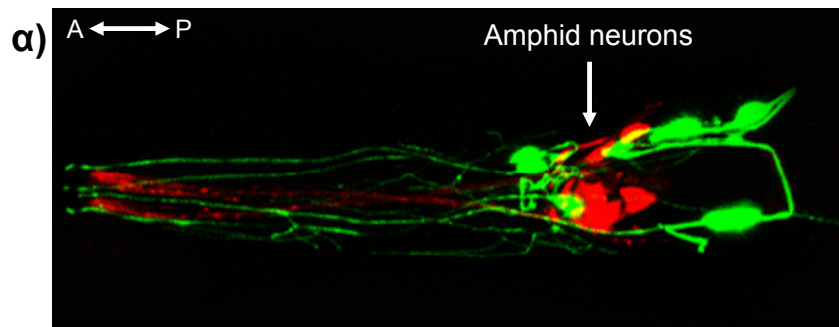
Για την αντίληψη της περιβαλλοντικής θερμοκρασίας είναι υπεύθυνο το ζεύγος νευρώνων AFD. Σε αυτήν δηλαδή την περίπτωση το συσχετιζόμενο ερέθισμα προσλαμβάνεται από διαφορετικούς με πριν αισθητήριους νευρώνες. Μελετώντας συνολικά τα παραπάνω φαινοτυπικά αποτελέσματα γίνεται σαφές ότι η έλλειψη του καναλιού ASIC-1 προκαλεί αδυναμία εξαρτημένης μάθησης σε μια σειρά από διαφορετικά παραδείγματα. Σε αυτούς τους ελέγχους της συμπεριφοράς το CS γίνεται κάθε φορά αντιληπτό από διαφορετικούς αισθητήριους νευρώνες. Ο έτερος παράγοντας που συμμετέχει και είναι κοινός σε όλα τα παραδείγματα είναι η διαθεσιμότητα τροφής (US). Έτσι, μια πρώτη εξήγηση των αποτελεσμάτων θα μπορούσε να είναι ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος αδυνατεί να αντιληφθεί τη διαθεσιμότητα τροφής. Και πάλι όμως χρειάζεται να σημειωθεί ότι ενώ στο παράδειγμα του conditioning με χημικά ερεθίσματα το US είναι η έλλειψη τροφής, στο παράδειγμα της θερμόταξης το US είναι τόσο η παρουσία όσο και απουσία τροφής. Επομένως, θα μπορούσε να διατυπωθεί η άποψη ότι και στις δυο περιπτώσεις (παραούσια και απουσία τροφής) απαιτείται σηματοδότηση η οποία ελέγχεται από το κανάλι ASIC-1.

## **5. Το κανάλι ASIC-1 εντοπίζεται στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του *C. elegans***

Για την κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο το κανάλι ASIC-1 ελέγχει τη συμπεριφορά του associative learning στο νηματώδη έγινε προσπάθεια αναγνώρισης του μοτίβου έκφρασής του. Για το σκοπό αυτό, ο φθορίζοντας μάρτυρας της GFP εκφράστηκε υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *asic-1*. Έτσι, προέκυψε η διαγονιδιακή σειρά N2 *Ex[p<sub>asic-1</sub>GFP]*. Η παρατήρηση του φθορισμού στα συγκεκριμένα άτομα έδειξε ότι η έκφραση του γονιδίου *asic-1* περιορίζεται αποκλειστικά σε νευρικά κύτταρα. Η ανάλυση της έκφρασης

έγινε με βάση τη θέση αλλά και το σχήμα των κυττάρων και οδήγησε στην αναγνώριση των νευρώνων που εκφράζουν το γονίδιο *asic-1*. Συνολικά 12 νευρώνες εμφάνισαν σταθερή και επαναλαμβανόμενη έκφραση της GFP. Από αυτούς, 6 εντοπίζονται στο πρόσθιο τμήμα του σώματος στην περιοχή του φάρυγγα. Συγκεκριμένα, οι 4 από αυτούς έχουν τα σώματά τους μπροστά από το δεύτερο φαρυγγικό λοβό και φέρουν χαρακτηριστικές προεκβολές των δενδριτών τους μέχρι το *sensillum* (την περιοχή στο πρόσθιο τμήμα της μύτης του οργανισμού όπου καταλήγουν και οι δενδρίτες των *amphid-neurons*), ενώ οι άξονές τους προεκβάλλουν στο νευρικό δακτύλιο. Οι άλλοι 2 έχουν τα σώματά τους τοποθετημένα στην οπίσθια και πλευρική περιοχή του δεύτερου φαρυγγικού λοβού, με τους άξονές τους να προεκβάλλουν στο νευρικό δακτύλιο, και τους δενδρίτες τους να εμφανίζουν ένα χαρακτηριστικό μεταξύ τους χίασμα. Δυο ακόμα νευρώνες εντοπίστηκαν στη μέση του σώματος με τους νευράξονες να διατρέχουν τη ραχιαία νευρική χορδή μέχρι την περιοχή του νευρικού δακτυλίου. Τέλος 4 νευρώνες εντοπίστηκαν στο οπίσθιο τμήμα του οργανισμού και συγκεκριμένα στην περιοχή της ουράς.

Για την ταυτοποίηση των παραπάνω νευρώνων ακολούθησαν μια σειρά από πειράματα συνεντοπισμού για την επιβεβαίωση της έκφρασης σε υποψήφιους νευρώνες. Αρχικά σημάνθηκαν οι νευρώνες χημειούποδοχείς στο πρόσθιο (*amphids*) και στο οπίσθιο (*rasmids*) τμήμα του σώματος σε τη χρωστική Dil. Βρέθηκε ότι κανένας από τους 6 νευρώνες στην περιοχή του κεφαλιού και τους 4 στην περιοχή της ουράς δεν είναι κάποιος από τους *amphids* (ASE, ASI, ASJ, ADF, ASK, ASH, ADL, AWB) ή *rasmids* (PHA, PHB) αντίστοιχα (Troemel, 1999), εφόσον δεν παρατηρήθηκε συνεντοπισμός της GFP με τη χρωστική Dil. (Εικόνα 7α και 7δ). Ακολούθως βρέθηκε ότι το γονίδιο *asic-1* δεν εκφράζεται ούτε και στους νευρώνες μηχανοϋποδοχείς (PLMs) εφόσον το σήμα από την GFP δεν χάνεται από τον κυτταρικό θάνατο που προκαλεί στους συγκεκριμένους νευρώνες εξαιτίας της τοξικής μεταλλαγής *mec-4(u231)* (Driscoll and Chalfie, 1991) (Εικόνα 7ε). Επομένως συμπεραίνεται ότι το γονίδιο *asic-1* δεν εκφράζεται σε κάποιον από τους νευρώνες χημειούποδοχείς αλλά ούτε και στους νευρώνες μηχανοϋποδοχείς του οργανισμού.



**Εικόνα 7: Ανάλυση του προτύπου έκφρασης του καναλιού ASIC-1.** (α) Χρώση των amphid neurons με τη λιπόφιλη χρωστική Dil, σε διαγονιδιακά άτομα N2 *Ex[p<sub>asic-1</sub>-GFP]*. Η GFP δεν συνεντοπίζεται με την Dil και έτσι αποκλείεται η έκφραση του γονιδίου *asic-1* στους amphid chemosensory neurons. (β) Εντοπισμός της GFP στην περιοχή του κεφαλιού στους 4 cephalic neurons (CEPs) και στους 2 anterior derides (ADEs). (γ) Έκφραση του φθορίζοντα μάρτυρα της GFP στους 2 posterior deride neurons (PDEs). (δ) Χρώση των phasmid chemosensory neurons στο οπίσθιο τμήμα του σώματος του οργανισμού. Ο φθορίζοντας μάρτυρας της GFP δεν συνεντοπίζεται με τη χρωστική Dil σε άτομα της διαγονιδιακής σειράς N2 *Ex[p<sub>asic-1</sub>-GFP]* αποκλείοντας την έκφραση του *asic-1* στους phasmids. (ε) Εντοπισμός της GFP στους οπίσθιους νευρώνες σε διαγονιδιακά άτομα *mec-4(u231)Ex[p<sub>asic-1</sub>-GFP]*. Στο γενετικό υπόβαθρο *mec-4(u231)* παρατηρείται νέκρωση των μηχανο-αισθητήριων νευρώνων στην ουρά του οργανισμού από την τοξική μεταλλαγή του γονιδίου *mec-4*. Η έκφραση του φθορίζοντα μάρτυρα στην περιοχή αυτή αποκλείει την πιθανή έκφραση του *asic-1* στους νευρώνες αυτούς (PLMs). (στ) Εντοπισμός της GFP σε 4 νευρώνες στο οπίσθιο άκρο του οργανισμού. Οι 2 από τους νευρώνες αυτούς είναι οι PVQ που εντοπίζονται ακριβώς μετά την απόληψη του εντέρου του οργανισμού.

Με βάση τα παραπάνω αλλά και το γνωστό νευρωνικό δίκτυο του οργανισμού όπου περιγράφεται το ακριβές σχήμα και η θέση του κάθε νευρώνα (White et al., 1986) αναγνωρίστηκαν τα κύτταρα που εκφράζουν το γονίδιο *asic-1*. Τους 4 πρόσθιους νευρώνες απαρτίζουν δυο ζεύγη ραχιαία και κοιλιακά τοποθετημένων και αμφίπλευρα συμμετρικών νευρώνων που καλούνται cephalic neurons. Συγκεκριμένα είναι οι CEPD(L/R) και CEPV(L/R) (Εικόνα 7β). Στην περιοχή του κεφαλιού βρίσκονται επίσης δυο νευρώνες που είναι οι αμφίπλευρα συμμετρικοί derides ADE(L/R) (Εικόνα 7β). Στη μέση του σώματος του οργανισμού και πίσω από την νύλα βρίσκονται δύο ακόμα συμμετρικοί νευρώνες που είναι οι επίσης derides PDE(L/R) (Εικόνα 7γ). Τέλος, στην περιοχή της ουράς, από τους 4 συνολικά νευρώνες που εντοπίστηκαν, αποκλείστηκαν οι μηχανοαισθητήριοι PLM(L/R) (Εικόνα 7ε) και αναγνωρίστηκαν οι δυο ως οι PVQ(L/R) (Εικόνα 7ζ) ενώ οι επόμενοι 2 είναι κάποιοι από τους PVR, PVN και PVC.

Από την παραπάνω ανάλυση του μοτίβου έκφρασης του γονιδίου *asic-1* βρέθηκε ότι εκφράζεται σε 12 μόνο από τους 302 νευρώνες του ερμαφρόδιτου ατόμου και από αυτούς ταυτοποιήθηκαν οι 10. Ποιος είναι όμως ο ρόλος των παραπάνω νευρώνων; Όπως είναι γνωστό, στο νηματώδη πέρα από την αναγνώριση της συνδεσιμότητας ολόκληρου του νευρωνικού δικτύου, είναι γνωστή η λειτουργία για πολλούς επιμέρους νευρώνες. Έτσι, οι 8 από τους 12 νευρώνες που εκφράζουν το γονίδιο *asic-1* είναι γνωστό ότι συνιστούν το σύστημα ντοπαμίνης του οργανισμού (Sulston et al., 1975). Πρόκειται δηλαδή για τους μοναδικούς νευρώνες του οργανισμού οι οποίοι παράγουν και χρησιμοποιούν ως νευροδιαβιβαστή τη βιογενή αμίνη ντοπαμίνη.



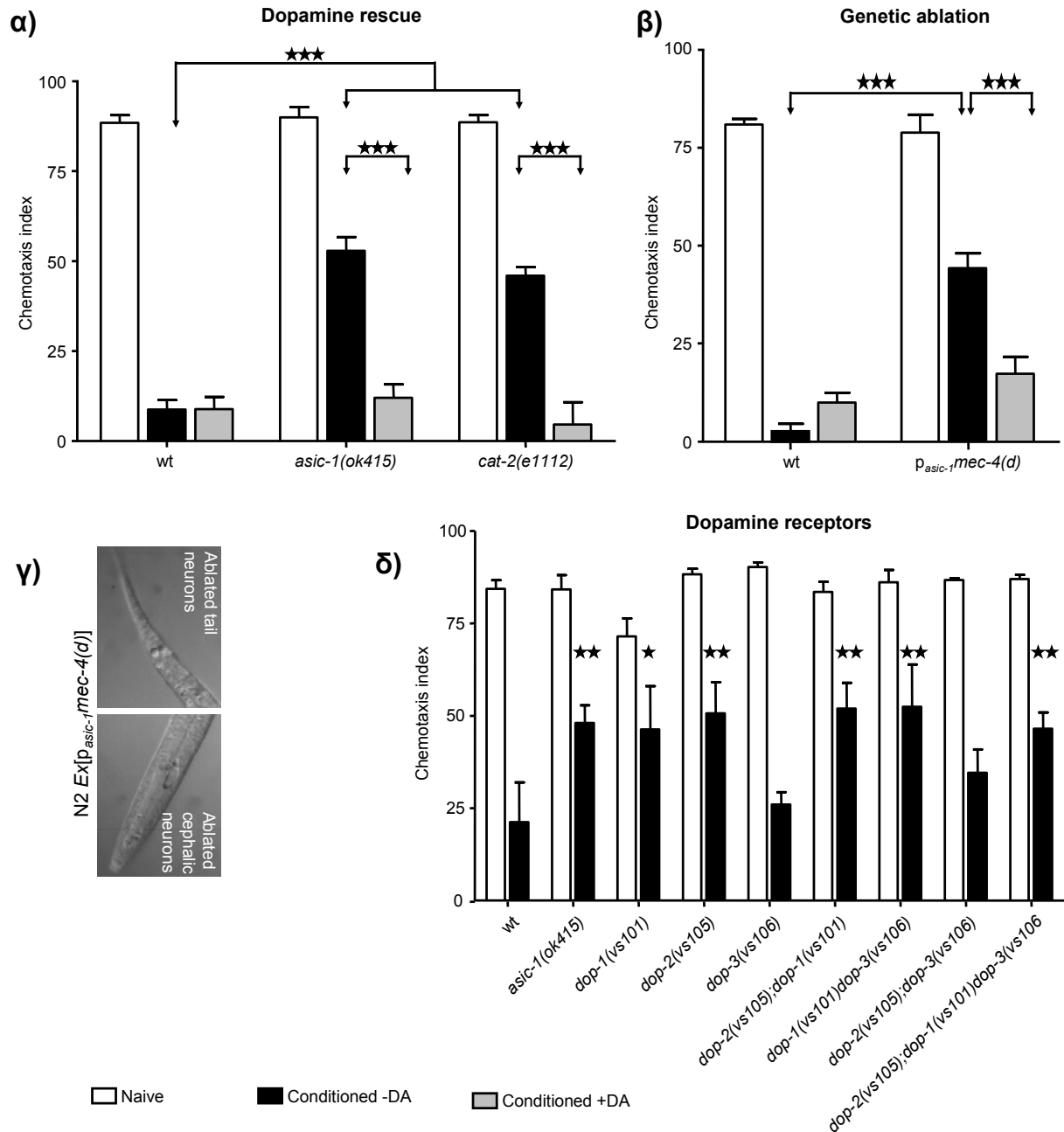
## 6. Η σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης ρυθμίζει τη συμπεριφορά του *associative learning*.

Η περιορισμένη έκφραση του *asic-1* στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του οργανισμού οδήγησε στο ερώτημα για την αναγκαιότητα της ντοπαμίνης στη διαδικασία του *associative learning*. Στην περίπτωση που η δράση του καναλιού ASIC-1 συνδέεται απευθείας με τη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης και η τελευταία είναι απαραίτητη για το *associative learning*, τότε είναι πιθανό οι φαινοτυπικές ανωμαλίες από τη μεταλλαγή του ASIC-1 να διασώζονται με τη χορήγηση του νευροδιαβιβαστή εξωγενώς. Σε συνέχεια της ίδιας συλλογιστικής η εξάλειψη των ντοπαμινεργικών νευρώνων θα πρέπει να έχει το ίδιο αποτέλεσμα με την έλλειψη του ASIC-1 στην περίπτωση που το τελευταίο ασκεί ρυθμιστικό έλεγχο στη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης.

Προκειμένου να απαντηθούν τα ερωτήματα αυτά έγινε φαινοτυπικός έλεγχος για εξαρτημένη μάθηση τόσο σε άτομα του στελέχους *asic-1(ok415)* όσο και σε άτομα του στελέχους *cat-2(e1112)*. Το στέλεχος αυτό φέρει μια μεταλλαγή στην υδροξυλάση τυροσίνης η οποία ευθύνεται για τη βιοσύνθεση της βιογενούς αμίνης ντοπαμίνης (Lints and Emmons, 1999). Έτσι, σε άτομα του στελέχους *cat-2(e1112)* τα επίπεδα ντοπαμίνης είναι μειωμένα μέχρι και 70% (Rios et al., 1999; Sanyal et al., 2004). Βρέθηκε ότι τόσο το στέλεχος *asic-1(ok415)* όσο και το *cat-2(e1112)* εκδήλωσαν όμοιες φαινοτυπικές ανωμαλίες, αδυνατώντας να συσχετίσουν την ισοαμυλική αλκοόλη με την έλλειψη τροφής (Εικόνα 8α). Οι φαινοτυπικές αυτές ανωμαλίες διασώθηκαν στη συνέχεια με τη χορήγηση ντοπαμίνης εξωγενώς. Αυτό υποδεικνύει αφενός την αναγκαιότητα του συγκεκριμένου νευροδιαβιβαστή στη διαδικασία του *associative learning*, αφετέρου την εμπλοκή του καναλιού ASIC-1 στο μηχανισμό σηματοδότησης μέσω ντοπαμίνης (Εικόνα 8α). Επιπρόσθετα, φάνηκε ότι η εξωγενής ντοπαμίνη, στη συγκέντρωση που προστέθηκε, δεν προκαλεί παράλυση των ατόμων (Schafer and Kenyon, 1995) αλλά ούτε και ενισχύει την ικανότητα μάθησης (Saeki et al., 2001). Έτσι, επιβεβαιώνεται ότι για την εκδήλωση του φαινομένου απαιτούνται συγκεκριμένα επίπεδα ντοπαμίνης τα οποία διασφαλίζονται από το κανάλι ASIC-1.

Ο κομβικός ρόλος της ντοπαμίνης στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης επιβεβαιώθηκε και σε ένα επόμενο βήμα από τη διακοπή της σηματοδότησης, αρχικά στο επίπεδο των προσυναπτικών νευρώνων (ντοπαμινεργικών) και εν συνεχεία στο επίπεδο των μετασυναπτικών νευρώνων-στόχων οι οποίοι και ενεργοποιούνται από το νευροδιαβιβαστή. Έτσι, σχηματίστηκε η διαγονιδιακή σειρά *N2 Ex [p<sub>asic-1</sub>mec-4(u231)]* στην οποία η εκτοπική έκφραση του τοξικού αλληλομόρφου *mec-4(u231)* στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες προκαλεί τη νεκρωσή τους (Εικόνα 8γ). Τα άτομα της διαγονιδιακής αυτής σειράς εμφανίζουν

ανικανότητα για associative learning όμοια με το στέλεχος *asic-1(ok415)* (Εικόνα 8β). Όμοια με το προηγούμενο παράδειγμα η χορήγηση ντοπαμίνης εξωγενώς διασώζει τις φαινοτυπικές ανωμαλίες που προέκυψαν τόσο από τη μεταλλαγή του ASIC-1 όσο και από την απαλοιφή των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Εικόνα 8β).



**Εικόνα 8: Ανάλυση του ρόλου της ντοπαμίνης για την εκδήλωση της συμπεριφοράς του associative learning.** (α) Φαινοτυπικός έλεγχος των στελεχών *asic-1(ok415)* και *cat-2(e1112)* για την εκδήλωση associative learning. Η ικανότητα χημειοτακτισμού προς την ελκτική ένωση ισοαμυλική αλκοόλη δεν επηρεάζεται από τη μεταλλαγή του γονιδίου *asic-1* ή του γονιδίου *cat-2*. Ανεκπαιδευτα (naive) άτομα των μεταλλαγμένων στελεχών

*asic-1(ok415)* και *cat-2(e1112)* εμφανίζουν υψηλό δείκτη χημειόταξης στην ισοαμυλική αλκοόλη (άσπρες στήλες). Η παρουσίαση της αλκοόλης αυτής σε συνθήκες έλλειψης φαγητού οδηγεί σε μείωση του δείκτη χημειόταξης για τα άτομα του αγρίου τύπου αλλά όχι για τα άτομα του στελέχους *asic-1(ok415)* και *cat-2(e1112)* (μαύρες στήλες). Εξωγενής χορήγηση ντοπαμίνης αναστέλλει τις φαινοτυπικές ανωμαλίες για τα μεταλλαγμένα στελέχη οδηγώντας σε διάσωση του φαινοτύπου (γκρι στήλες). (β) Η έκφραση του αλληλομόρφου *mec-4(u231)* στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες δεν διαταράσσει την ικανότητα χημειοτακτισμού (άσπρες στήλες) αλλά προκαλεί αδυναμία εκδήλωσης associative learning (μαύρες στήλες). Εξωγενής χορήγηση ντοπαμίνης διασώζει το φαινότυπο (γκρι στήλες). (γ) Εικόνες διαγονιδιακών ατόμων  $N2$  *Ex [p<sub>asic-1</sub>mec-4(u231)]* σε οπτικό μικροσκόπιο με τη μέθοδο Nomarski (DiC). Παρατηρούνται ντοπαμινεργικοί νευρώνες του πρόσθιο και οπίσθιο μέρους του σώματος να υπόκεινται νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. (δ) Φαινοτυπικός έλεγχος των μεταλλαγμένων στελεχών για τους υποδοχείς ντοπαμίνης DOP-1, DOP-2 και DOP-3. Η ικανότητα χημειοτακτισμού προς την ελκτική πτητική ένωση ισοαμυλική αλκοόλη δεν επηρεάζεται από τη μεταλλαγή των παραπάνω γονιδίων. Ανεκπαίδευτα (naive) άτομα των μεταλλαγμένων στελεχών εμφανίζουν υψηλό δείκτη χημειόταξης στην ισοαμυλική αλκοόλη (άσπρες στήλες). Η παρουσίαση της αλκοόλης σε συνθήκες έλλειψης φαγητού οδηγεί σε μείωση του δείκτη χημειόταξης για τα άτομα του αγρίου τύπου αλλά όχι για τα άτομα των στελεχών *asic-1(ok415)*, *dop-1(vs101)* και *dop-2(vs105)* (μαύρες στήλες). Ο υποδοχέας DOP-3 φαίνεται να μην συμμετέχει στην εκδήλωση associative learning. (Κάθε στήλη αναπαριστά το μέσο όρο των τιμών από τουλάχιστον 5 διαφορετικές δοκιμασίες. Σε κάθε συνθήκη ελέγχθηκαν συνολικά 600 άτομα από κάθε στέλεχος - \*: P<0.05 - \*\*: P<0.01 - \*\*\*: P<0.001, unpaired t-test).

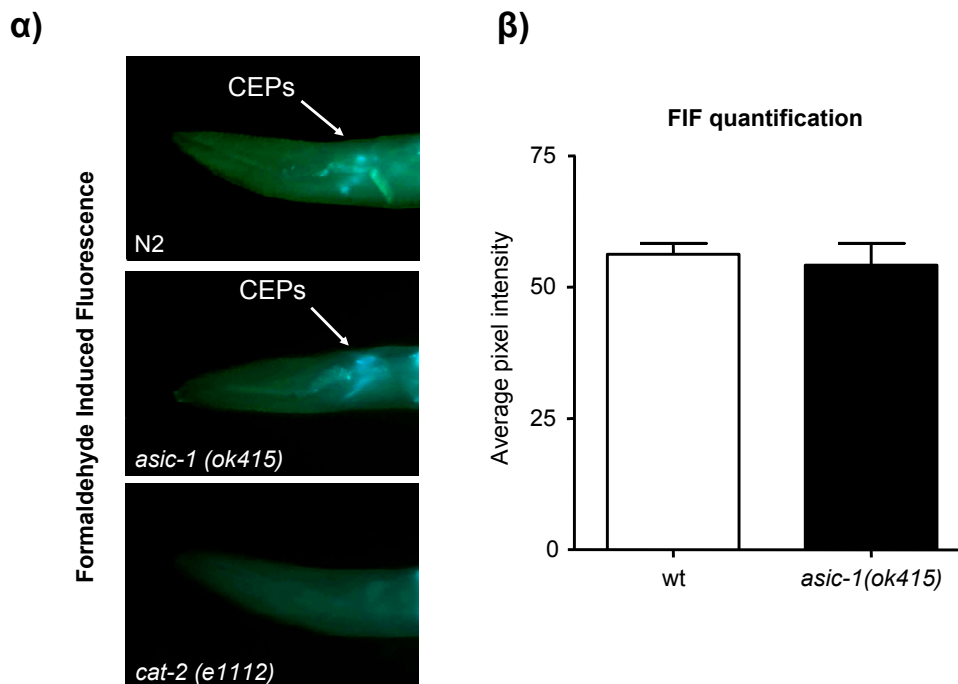
Για τη διακοπή της σηματοδότησης ντοπαμίνης στο επίπεδο των μετασυναπτικών νευρώνων χρησιμοποιήθηκαν στελέχη που έφεραν μεταλλαγές για τους υποδοχείς ντοπαμίνης. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί τέσσερις διαφορετικοί υποδοχείς ντοπαμίνης στο νηματώδη που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *dop-1*, *dop-2*, *dop-3* και *dop-4* (Sugiura et al., 2005; Suo et al., 2004). Για την ανάλυση της συμμετοχής των υποδοχέων ντοπαμίνης στο associative learning χρησιμοποιήθηκαν απλά, διπλά και τριπλά μεταλλαγμένα στελέχη που έφεραν όλους τους συνδυασμούς μεταλλαγών για τους υποδοχείς DOP-1, DOP-2 και DOP-3. Ο υποδοχέας DOP-4 δεν συμπεριλήφθηκε καθώς δεν είχε κλωνοποιηθεί όταν πραγματοποιήθηκε η παραπάνω μελέτη. Βρέθηκε ότι τα στελέχη *dop-1(vs101)* και *dop-2(vs105)* αλλά όχι το στέλεχος *dop-3(vs106)* εμφανίζουν αδυναμία για associative learning όμοια με το στέλεχος *asic-1(ok415)* (Εικόνα 8δ). Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει αρχικά την αναγκαιότητα για σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης για την εκδήλωση associative learning. Από την άλλη, θα μπορούσε να οδηγήσει στην αναγνώριση των μετασυναπτικών στόχων και τη διερεύνηση του νευρωνικού δικτύου που ελέγχει τη μνήμη και τη μάθηση στο νηματώδη. Μια τέτοια προσπάθεια εντούτοις δεν οδήγησε στα επιθυμητά αποτελέσματα καθώς οι υποδοχείς DOP-1 και DOP-2 εμφανίζουν επικαλυπτόμενη έκφραση σε μεγάλο αριθμό μετασυναπτικών νευρώνων ενώ πολλοί από αυτούς δεν έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα. Έτσι, η αναγνώριση των μετασυναπτικών στόχων κατά την εκδήλωση του associative learning δεν κατέσται εφικτή.

## 7. Το κανάλι ASIC-1 δε ρυθμίζει την εκδήλωση άλλων συμπεριφορών εξαρτώμενων από την ντοπαμίνη.

Από την παραπάνω φαινοτυπική ανάλυση φάνηκε ότι η μεταλλαγή του γονιδίου *asic-1* έχει το ίδιο αποτέλεσμα σε ότι αφορά την εξαρτημένη μάθηση με τη μεταλλαγή του γονιδίου *cat-2*. Δηλαδή, και τα δυο πρωτεϊνικά προϊόντα απαιτούνται για την εκδήλωση μάθησης και μάλιστα η έλλειψή τους μπορεί να ξεπεραστεί αν χορηγηθεί ντοπαμίνη εξωγενώς. Καθώς όμως η υδροξυλάση τυροσίνης έχει χαρακτηριστεί να συμμετέχει στη βιοσύνθεση της ντοπαμίνης και η μεταλλαγή της οδηγεί σε δραματική μείωση των επιπέδων του παραγόμενου νευροδιαβιβαστή, τέθηκε το ερώτημα για το αν η μεταλλαγή του γονιδίου *asic-1* έχει αντίστοιχο αποτέλεσμα. Για να απαντηθεί το ερώτημα αυτό ελέγχθηκαν τα επίπεδα βιοσύνθεσης του νευροδιαβιβαστή στο στέλεχος *asic-1(ok415)* με τη μέθοδο του επαγόμενου φθορισμού μέσω φορμαλδεΐδης ή Formaldehyde Induced Fluorescence (FIF). Βρέθηκε ότι το συγκεκριμένο στέλεχος παράγει, όμοια με το στέλεχος του αγρίου τύπου, επίπεδα ντοπαμίνης ικανά να ανιχνευθούν με τη συγκεκριμένη μέθοδο. Αντίθετα, το στέλεχος *cat-2(e1112)* δεν παράγει ανιχνεύσιμα επίπεδα ντοπαμίνης (Εικόνα 9α). Επομένως, οι ανωμαλίες στη συμπεριφορά που προκαλεί το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *ok415*, παρά το γεγονός ότι διασώζονται από τη χορήγηση εξωγενούς ντοπαμίνης, δεν οφείλονται στη μειωμένη βιοσύνθεσή της στο στέλεχος *asic-1(ok415)*. Τα φυσιολογικά επίπεδα της παραγόμενης ντοπαμίνης στο μεταλλαγμένο στέλεχος διαπιστώθηκαν και από μετρήσεις της έντασης του φθορισμού κατά την εφαρμογή της μεθόδου FIF (Εικόνα 9β). Έτσι, ελέγχθηκε αν η μεταλλαγή του καναλιού ASIC-1 οδηγούσε όχι στην παντελή διακοπή της βιοσύνθεσης ντοπαμίνης, αλλά στη μείωση αυτής. Διαπιστώθηκε ότι οι νευρώνες οι οποίοι είχαν σημανθεί ως θετικοί και στα δυο στελέχη παρήγαγαν και αντίστοιχα ποσά του νευροδιαβιβαστή όπως καταδεικνύεται με τη μέτρηση της έντασης του φθορισμού σε κάθε περίπτωση. Παράλληλα, διαπιστώθηκε ότι το σύνολο των νευρώνων του στελέχους *asic-1(ok415)* σημαίνεται με την παραπάνω μέθοδο γεγονός που αποκλείει η μεταλλαγή του καναλιού να επηρεάζει ειδικά κάποιους από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες.

Σε ένα επόμενο βήμα έγινε προσπάθεια να αναδειχθεί ο ρόλος του ASIC-1 στις συμπεριφορές που εξαρτώνται από την ντοπαμίνη. Κι αυτό διότι ο ρόλος του συγκεκριμένου νευροδιαβιβαστή στο νηματώδη δεν περιορίζεται αυστηρά στη εξαρτημένη μάθηση. Όπως αναφέρθηκε, μια άλλη συμπεριφορά η οποία εξαρτάται από την ντοπαμίνη είναι αυτή του basal slowing, δηλαδή η μείωση της ταχύτητας κίνησης του οργανισμού όταν βρεθεί σε περιβάλλον πλούσιο σε τροφή. Πρακτικά, ο οργανισμός ελαττώνει την ταχύτητά του κατά 40% περίπου όταν αντιμετωπίζει τη βακτηριακή χλόη η οποία αποτελεί και το θρεπτικό του

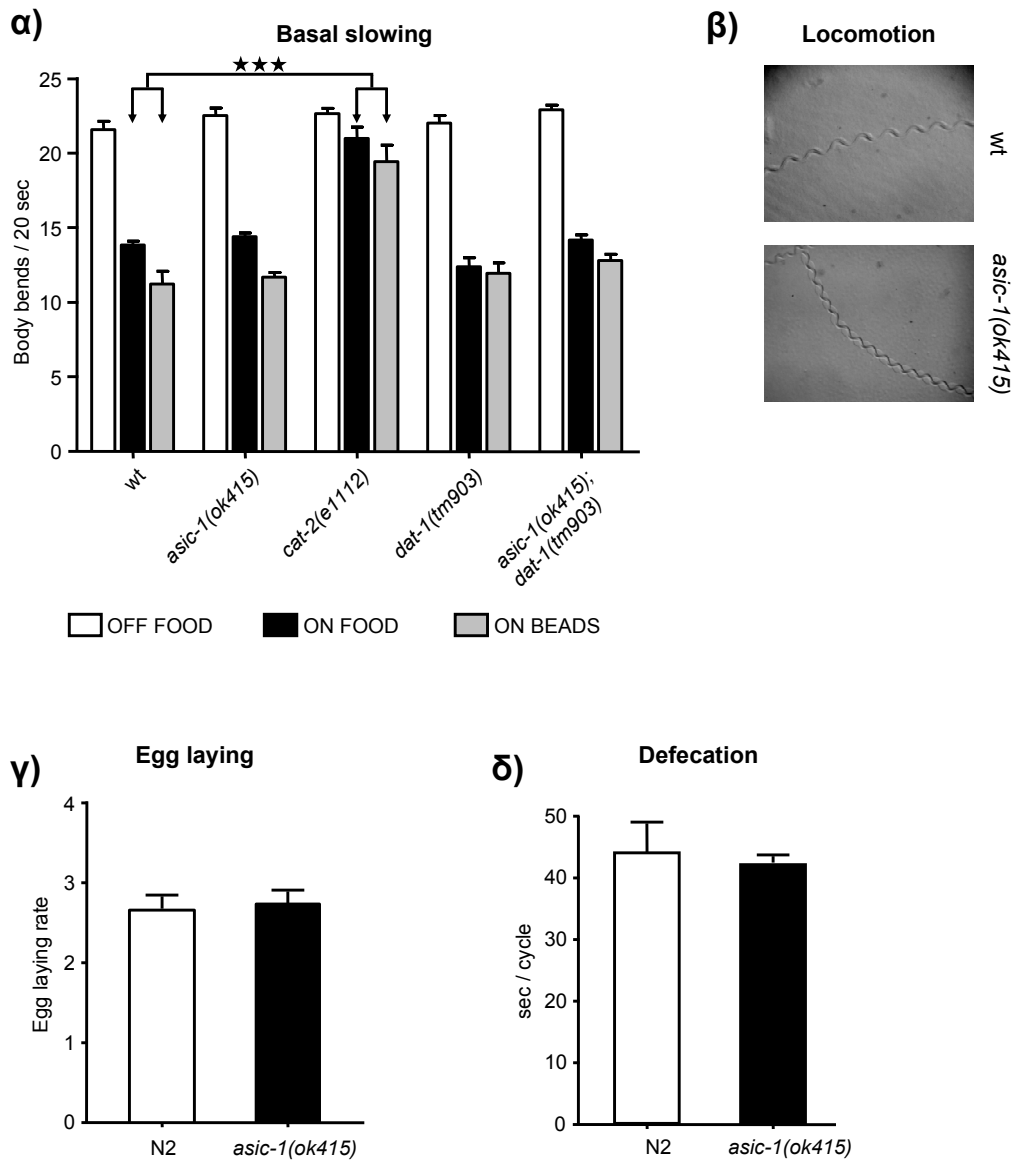
μέσο στο εργαστήριο. Η συμπεριφορά αυτή αντικατοπτρίζει την απόκριση του οργανισμού στην τροφή και αποτελεί μια βασική στρατηγική που εξασφαλίζει την αύξηση του χρόνου παραμονής σε αυτήν. Η αντίληψη εντούτοις της τροφής οφείλεται στα μηχανικά ερεθίσματα που προκαλούνται από αυτήν καθώς το ίδιο αποτέλεσμα στην κίνηση του οργανισμού παρατηρείται και στην περίπτωση που η βακτηριακή χλόη αντικαθίσταται από σφαιρίδια σεφαρόζης (Sawin et al., 2000). Η συμπεριφορά αυτή οφείλεται στη λειτουργία των ντοπαμινεργικών νευρώνων όπως βρέθηκε από πειράματα εξάλειψης αυτών με τη χρήση laser αλλά και από το φαινοτυπικό έλεγχο του στελέχους *cat-2(e1112)* (Sawin et al., 2000). Έτσι, τα παραπάνω αποτέλεσμα εκτός της ανάδειξης της ντοπαμίνης ως βασικού νευροδιαβιβαστή για τη συμπεριφορά του basal slowing οδήγησαν στο χαρακτηρισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων ως μηχανοαισθητήριους.



**Εικόνα 9: Το κανάλι ASIC-1 δεν επηρεάζει τη βιοσύνθεση της ντοπαμίνης.** (α) Επαγωγή του φθορισμού από βιογενείς αμίνες στο νηματώδη με τη μέθοδο του FIF. Παρατηρείται ότι το σήμα του φθορισμού είναι κοινό ανάμεσα στο στέλεχος του αγρίου τύπου και το μεταλλαγμένο στέλεχος *asic-1(ok415)*. Στο στέλεχος *cat-2(e1112)* δεν υπάρχουν ανιχνεύσιμα επίπεδα νευροδιαβιβαστή. Η συγκεκριμένη μέθοδος σημαίνει και τις υπόλοιπες βιογενείς αμίνες όπως η σεροτονίνη, η οκτοπαμίνη και η τυραμίνη. Εντούτοις, δεν προκύπτει έντονο σήμα φθορισμού από τις συγκεκριμένες αμίνες όπως φαίνεται και από το στέλεχος *cat-2(e1112)* το οποίο παράγει φυσιολογικά επίπεδα των ανιμών αυτών. Επομένως, το σήμα που παρατηρείται στο στέλεχος *asic-1(ok415)* προέρχεται κυρίως από την επαγωγή του φθορισμού της ντοπαμίνης. (β) Ποσοτική ανάλυση της έντασης του φθορισμού FIF σε νευρώνες του στελέχους του αγρίου τύπου και του στελέχους *asic-1(ok415)*. Η ένταση του παραγόμενου φθορισμού είναι όμοια και στα δύο στελέχη.

Η περιορισμένη έκφραση του γονιδίου *asic-1* στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του νηματώδη εγείρει το ερώτημα για την πιθανή δράση του καναλιού στη συμπεριφορά του basal slowing. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι το ASIC-1 ανήκει στις DEG/ENaCs όπου πολλά από τα μέλη της οικογένειας έχουν χαρακτηριστεί ως μηχανοϋποδοχείς εγείρει το ερώτημα για το αν το συγκεκριμένο μόριο θα μπορούσε να εξυπηρετεί αντίστοιχο ρόλο στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Φαινοτυπικός έλεγχος που ακολούθησε, έδειξε ότι το στέλεχος *asic-1(ok415)* εκδηλώνει φυσιολογική συμπεριφορά σε ότι αφορά το φαινότυπο του basal slowing, ελαττώνοντας την ταχύτητα κίνησής του τόσο παρουσία βακτηριακής χλόης όσο και σε αξενικό περιβάλλον αποτελούμενο από σφαιρίδια σεφαρόζης (Εικόνα 10α). Αντίθετα, το στέλεχος *cat-2(e1112)* δεν ελαττώνει την ταχύτητα κίνησής του επιβεβαιώνοντας τις προηγούμενες παρατηρήσεις (Εικόνα 10α). Παράλληλα, έγινε έλεγχος της συμπεριφοράς του μεταλλαγμένου στελέχους *dat-1(tm903)*, αλλά και του διπλά μεταλλαγμένου στελέχους *asic-1(ok415);dat-1(tm903)*. Το στέλεχος *dat-1(tm903)* φέρει μια μεταλλαγή στο μεμβρανικό μεταφορέα της ντοπαμίνης ο οποίος είναι υπεύθυνος για την απομάκρυνση του νευροδιαβιβαστή από τη σύναψη μετά την απελευθέρωσή του (Jayanthi et al., 1998; Nass et al., 2005). Όπως παρατηρήθηκε σε κυτταρικές καλλιέργειες ντοπαμινεργικών νευρώνων ποντικού το αποτέλεσμα της μεταλλαγής του DAT-1 είναι η αύξηση των επιπέδων του νευροδιαβιβαστή στη σύναψη (Gainetdinov and Caron, 2003; Giros et al., 1996). Ο φαινοτυπικός έλεγχος του στελέχους *dat-1(tm903)* έδειξε ότι η περίσσεια ντοπαμίνης δεν προκαλεί ανωμαλίες στο basal slowing, ενώ όπως αναμενόταν και το διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος εκδήλωσε φυσιολογικά το φαινότυπο (Εικόνα 10α).

Η ντοπαμίνη δεν ελέγχει όμως μόνο το basal slowing. Έχει επίσης χαρακτηριστεί να ελέγχει τη διαδικασία της ωοτοκίας (egg laying) και την ικανότητα κίνησης του οργανισμού (locomotion). Έτσι, η ντοπαμίνη ασκεί κατασταλτική δράση στο νευρωνικό δίκτυο που ελέγχει το egg laying μέσω των υποδοχέων ντοπαμίνης της τάξης D2 (Schafer and Kenyon, 1995; Weinshenker et al., 1995). και ελέγχει την κίνηση του οργανισμού έχοντας κατασταλτική δράση στη λειτουργία των κινητήριων νευρώνων που ελέγχουν το locomotion (Sanyal et al., 2004; Sawin et al., 2000). Τέλος, η ντοπαμίνη έχει κατασταλτικό ρόλο στη διαδικασία του defecation (Wintle and Van Tol, 2001). Προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανή εμπλοκή του καναλιού ASIC-1 στις παραπάνω λειτουργίες του οργανισμού έγινε φαινοτυπικός έλεγχος μεταξύ του στελέχους *asic-1(ok415)* και ατόμων του αγρίου τύπου. Βρέθηκε ότι το μεταλλαγμένο για το ASIC-1 στέλεχος είχε φυσιολογική συμπεριφορά στο egg laying (Εικόνα 10γ, Πίνακας 1) και στο defecation (Εικόνα 10δ), ενώ όλες οι παράμετροι της κίνησής του δεν διέφεραν από αυτές του αγρίου τύπου (Εικόνα 10β, Πίνακας 1).



**Εικόνα 10: Το κανάλι ASIC-1 δεν ελέγχει άλλες συμπεριφορές, εξαρτώμενες από την ντοπαμίνη.** (α) Έλεγχος των στελεχών *asic-1(ok415)*, *cat-2(e1112)*, *dat-1(tm903)* και *asic-1(ok415); dat-1(tm903)* για τη συμπεριφορά του basal slowing. Όλα τα στελέχη εκτός του *cat-2(e1112)* εμφανίζουν φυσιολογική μείωση της ταχύτητάς τους όταν εισέλθουν σε βακτηριακή χλόη (μαύρες στήλες) ή σε σφαιρίδια σεφαρόζης (γκρι στήλες). Επιπρόσθετα, κανένα στέλεχος δεν εμφανίζει προβλήματα κίνησης όταν βρίσκεται μακριά από την τροφή (άσπρες στήλες). (Κάθε στήλη αναπαριστά το μέσο όρο των τιμών από τουλάχιστον 5 διαφορετικές δοκιμασίες. Σε κάθε συνθήκη ελέγχθηκαν από 10 μέχρι 50 διαφορετικά άτομα από κάθε στέλεχος - \*\*\*  $P < 0.001$ , unpaired t-test). (β) Απεικόνιση της πορείας που χαράσσει στην επιφάνεια της βακτηριακής χλόης το στέλεχος του αγρίου τύπου και το *asic-1(ok415)*. Η ποιοτική αυτή σύγκριση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα χαρακτηριστικά της κίνησης των ζώων (locomotion) δεν αλλοιώνονται από τη μεταλλαγή του γονιδίου *asic-1*. (γ) Έλεγχος της συμπεριφοράς της ωοτοκίας. Ο ρυθμός εναπόθεσης αυγών κατά τη δεύτερη ημέρα του ενήλικου σταδίου δεν διαφέρει ανάμεσα στο στέλεχος του αγρίου τύπου και το *asic-1(ok415)*. (Κάθε στήλη αναπαριστά το μέσο όρο των τιμών από τουλάχιστον 3 διαφορετικές δοκιμασίες. Σε κάθε συνθήκη ελέγχθηκαν 10 διαφορετικά άτομα από κάθε στέλεχος, unpaired t-test). (δ) Έλεγχος της συμπεριφοράς του defecation. Ο ουλτραδιανός κύκλος του defecation

κάτω από συνθήκες άφθονης τροφής και ηρεμίας είναι ίδιος ανάμεσα στο στέλεχος του αγρίου τύπου και το *asic-1(ok415)*. (Κάθε στήλη αναπαριστά το μέσο όρο των τιμών από τουλάχιστον 3 διαφορετικές δοκιμασίες. Σε κάθε συνθήκη ελέγχθηκαν 5 διαφορετικά άτομα από κάθε στέλεχος, unpaired t-test).

Το σύνολο των παραπάνω αποτελεσμάτων έκανε ξεκάθαρο ότι το κανάλι ASIC-1 έχει μια εξαιρετικά εντοπισμένη επίδραση στη διαδικασία του associative learning. Για να συμβεί αυτό φαίνεται ότι ελέγχει τη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης καθώς η προσθήκη του νευροδιαβιβαστή εξωγενώς διασώζει τις φαινοτυπικές ανωμαλίες από τη μεταλλαγή του γονιδίου *asic-1* (Εικόνα 8α). Εντούτοις, το ίδιο συμβαίνει και για το στέλεχος *cat-2(e1112)* το οποίο παράγει περιορισμένα επίπεδα ντοπαμίνης (Εικόνα 8α και 9α). Επομένως, προκύπτει το ερώτημα για το πώς θα μπορούσε το κανάλι ASIC-1 να ελέγχει τη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης κατά την εκδήλωση του associative learning.

#### **8. Το κανάλι ASIC-1 εντοπίζεται στις συνάψεις των ντοπαμινεργικών νευρώνων**

Για την απάντηση του πώς το ASIC-1 θα μπορούσε να ελέγχει τη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης έγινε προσπάθεια ανίχνευσης της θέσης του καναλιού στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Για την ανίχνευση του μοτίβου έκφρασης του γονιδίου *asic-1*, που περιγράφηκε παραπάνω, σχηματίστηκε η διαγονιδιακή σειρά N2 *Ex[p<sub>asic-1</sub>GFP]*. Τα διαγονιδιακά άτομα δηλαδή εξέφραζαν το φθορίζοντα μάρτυρα της GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *asic-1* με αποτέλεσμα να γίνεται δυνατή η παρατήρηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης του συγκεκριμένου γονιδίου. Καταυτόν τον τρόπο τα μόρια της GFP παρέμειναν κυτταροπλασματικά μη φέροντας οποιοδήποτε τμήμα της αλληλουχίας του ASIC-1 που θα τα καθοδηγούσε σε συγκεκριμένη περιοχή-δομή του κυττάρου. Στην περίπτωση όμως που ο στόχος είναι ο υποκυτταρικός εντοπισμός του παραγόμενου μορίου τότε χρειάζεται να γίνει σήμανση του πρωτεϊνικού προϊόντος. Η σήμανση αυτή μπορεί να επιτευχθεί αφενός με τη χρησιμοποίηση κατάλληλου αντισώματος, αφετέρου με το σχηματισμό ενός χημικού μορίου όπου ολόκληρο το κανάλι ASIC-1 είναι ενωμένο με το φθορίζοντα μάρτυρα της GFP.

Η πρώτη περίπτωση δεν ακολουθήθηκε, αρχικά για το λόγο ότι δεν ήταν διαθέσιμο κάποιο αντίσωμα που να ανιχνεύει την ASIC-1 στο νηματώδη. Σε μια πιθανή προσπάθεια παρασκευής του, αυτό θα έπρεπε πιθανότατα να ήταν μονοκλωνικό καθώς η πλειάδα των degenerins στο νηματώδη θα αποτελούσε ένα ισχυρό background γι' αυτό. Όμως, ο κυριότερος λόγος που δεν ακολουθήθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος είναι το γεγονός ότι η κολλαγονοειδής επιδερμίδα του νηματώδη (cuticle) μαζί με την τοποθέτηση των

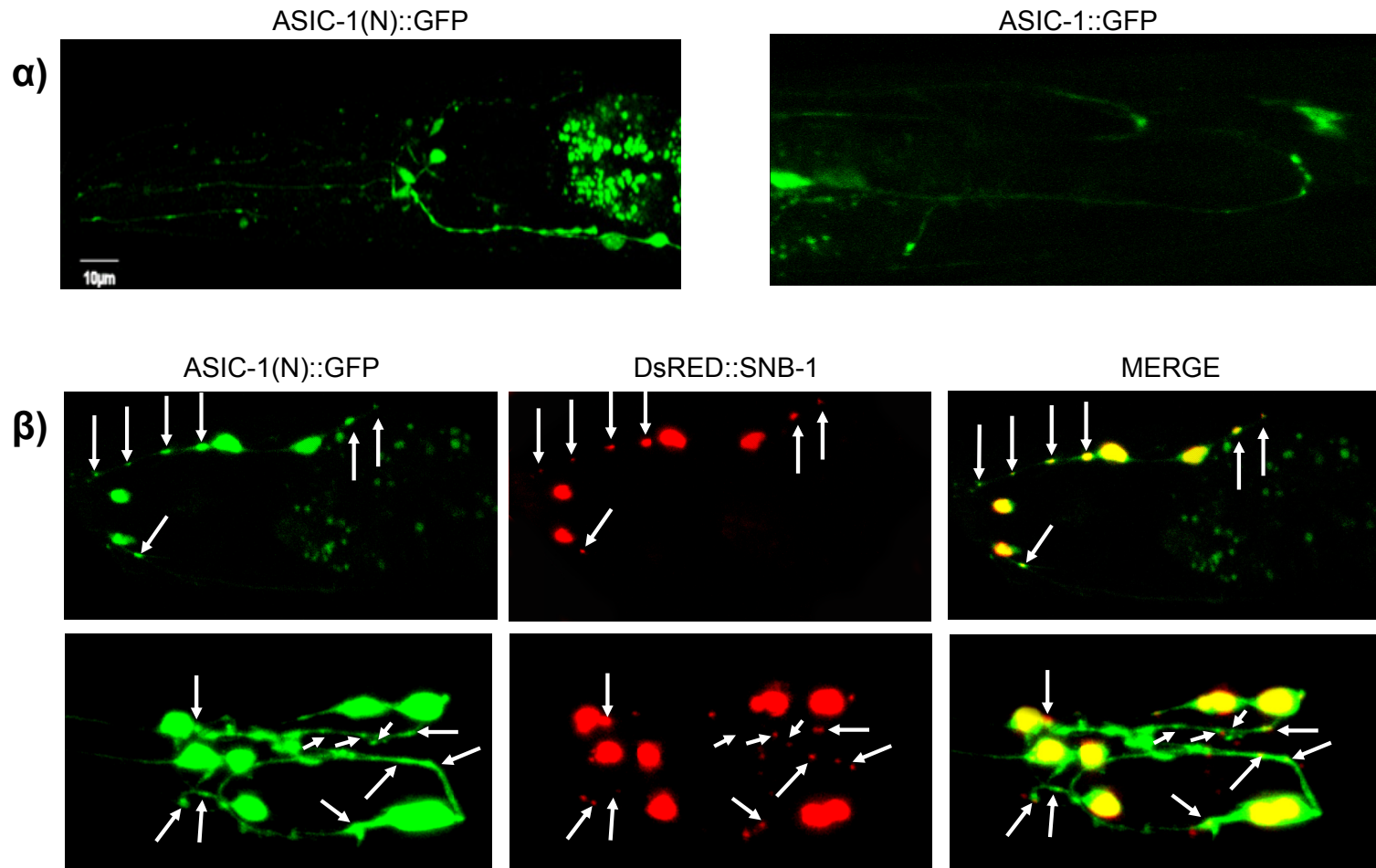


ντοπαμινεργικών νευρώνων στο νευρικό δακτύλιο τους κάνει δύσκολα προσπελάσιμους για χρώση με αντίσωμα.

Για τον σκοπό αυτό ακολουθήθηκε η προσέγγιση σήμανσης του καναλιού με την έκφρασή του σε σύνδεση με τον φθορίζοντα μάρτυρα της GFP. Θεωρήθηκε ότι ο ακριβέστερος και πλέον πληροφοριακός τρόπος σήμανσης του ASIC-1 θα ήταν η έκφραση ολόκληρης της πρωτεΐνης σε σύνδεση με τη GFP. Για τον σκοπό αυτό σχηματίστηκε η διαγονιδιακή σειρά N2 *Ex[ASIC-1::GFP]* ενώ παράλληλα, σχηματίστηκε η διαγονιδιακή σειρά N2 *Ex[ASIC-1(N')::GFP]* όπου το χιμαιρικό μόριο που εκφράστηκε περιελάμβανε το αμινοτελικό άκρο του μορίου της ASIC-1 και όχι το σύνολο της πρωτεΐνης. Ο λόγος που δημιουργήθηκαν οι δύο αυτές διαγονιδιακές σειρές έχει να κάνει με την ένταση του παραγόμενου σήματος. Συγκεκριμένα, τα άτομα της σειράς N2 *Ex[ASIC-1::GFP]* παράγουν σήμα που βρέθηκε να κυμαίνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Αντίθετα, τα άτομα της σειράς N2 *Ex[ASIC-1(N')::GFP]* δίνουν εξαιρετικά υψηλότερη ένταση φθορισμού. Προκειμένου όμως να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω μελέτες το τελευταίο στέλεχος είναι απαραίτητο να οδηγεί στο ίδιο μοτίβο έκφρασης σε ότι αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό. Πώς όμως θα μπορούσε μόνο η αμινοτελική περιοχή του καναλιού να έχει όμοιο εντοπισμό με αυτό ολόκληρου του μορίου; Έχει δείχτει ότι για την τοποθέτηση των degenerins στο κύτταρο είναι υπεύθυνο το αμινοτελικό άκρο του μορίου (Tavernarakis et al., 2001) και συνεπώς είναι ικανό να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της ASIC-1. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τη σύγκριση μεταξύ των ατόμων των δυο διαφορετικών διαγονιδιακών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν. Βρέθηκε ότι και στις δυο περιπτώσεις η έκφραση του παραγόμενου χιμαιρικού μορίου έχει μια ισχυρή προτίμηση για τη μεμβράνη των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ο σπικτός εντοπισμός της ASIC-1 στη μεμβράνη (Εικόνα 11α), ένα μοτίβο που είναι χαρακτηριστικό για τα μέλη των DEG/ENaCs. Έτσι, επιβεβαιώνεται η αξιοπιστία των παρατηρήσεων από τη διαγονιδιακή σειρά N2 *Ex[ASIC-1(N')::GFP]* η οποία χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για περαιτέρω παρατηρήσεις. Μια άλλη παρατήρηση που έγινε κατά το παραπάνω πείραμα είναι ο περιορισμός της έκφρασης στους άξονες των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Οι συγκεκριμένες περιοχές είναι πλούσιες σε συνάψεις και για το λόγο αυτό τέθηκε το ερώτημα αν ο μεμβρανικός και συνάμα σπικτός εντοπισμός της ASIC-1 συμπίπτει με τις συνάψεις των νευρώνων αυτών. Για να απαντηθεί το ερώτημα αυτό έγινε σήμανση του μορίου της ASIC-1 και ταυτόχρονη σήμανση των συνάψεων με το φθορίζοντα μάρτυρα της DsRED. Συγκεκριμένα, σχηματίστηκαν διαγονιδιακά ζώα τα οποία εξέφραζαν υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *asic-1* το χιμαιρικό μόριο μεταξύ της DsRED και του προσυναπτικού μάρτυρα της synaptobrevin (SNB-1). Η synaptobrevin είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται στα συναπτικά κυστίδια

των νευρώνων και μετά την έκλυση του νευροδιαβιβαστή αποτελεί μέρος της κυτταρικής μεμβράνης των συνάψεων του προσυναπτικού νευρώνα. Έτσι, η παρατήρηση των διαγονιδιακών ατόμων N2 *Ex[ASIC-1(N)::GFP; p<sub>asic-1</sub>SNB-1::DsRED]* έδειξε ότι το κανάλι ASIC-1 συνεντοπίζεται με τον προσυναπτικό μάρτυρα της *synaptobrevin* (Εικόνα 11β).

### Subcellular localization



**Εικόνα 11: Το κανάλι ASIC-1 εντοπίζεται στις συνάψεις των ντοπαμινεργικών νευρώνων.** (α) Σήμανση της αμινοτελικής περιοχής του καναλιού ASIC-1 αλλά και ολόκληρου του μορίου με το φθορίζοντα μάρτυρα της GFP. Παρατηρείται αλλαγή του εντοπισμού της GFP σε σχέση με τη διαγονιδιακή σειρά  $N2 \text{ Ex}[p_{\text{asic-1}}\text{GFP}]$ . Η αμινοτελική περιοχή του καναλιού οδηγεί την GFP στη μεμβράνη των ντοπαμινεργικών κυττάρων δίνοντας μια στικτή έκφραση κατά μήκος των νευραξόνων, σε περιοχές δηλαδή που είναι πλούσιες σε συνάψεις, ενώ όμοιος είναι και ο εντοπισμός για ολόκληρο το κανάλι. (β) Ταυτόχρονη σήμανση της ASIC-1 (πράσινο χρώμα) και του προσυναπτικού μάρτυρα της *synaptobrevin* (κόκκινο χρώμα). Παρατηρείται πλήρης συνεντοπισμός των φθοριζόντων πρωτεϊνών της GFP και της DsRED (κίτρινο χρώμα) υποδεικνύοντας το συνεντοπισμό μεταξύ ASIC-1 και SNB-1 (άσπρα βέλη). Η πρωτεΐνη ASIC-1 είναι ένα συναπτικό κανάλι ιόντων νατρίου.

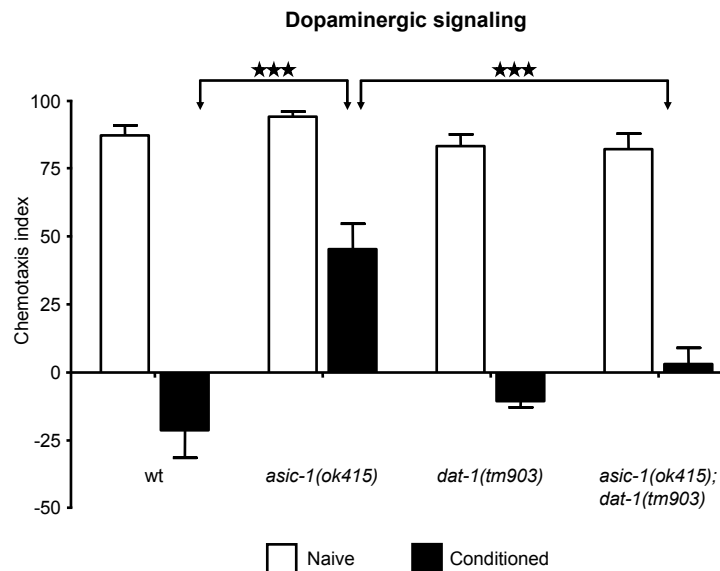
## 9. Το κανάλι ASIC-1 ελέγχει τα επίπεδα της εκλυόμενης ντοπαμίνης.

Συνοψίζοντας τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι εμφανές ότι το κανάλι ASIC-1 ελέγχει τη διαδικασία της εξαρτημένης μάθησης μέσα από τη δράση του στις συνάψεις των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Από την άλλη, η σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης είναι μεταξύ άλλων απαραίτητη για την εκδήλωση της μνήμης και της μάθησης στο νηματώδη και φαίνεται ότι διακόπτεται από τη μεταλλαγή του γονιδίου *asic-1*, εφόσον η προσθήκη ντοπαμίνης διασώζει το φαινότυπο του associative learning στο στέλεχος *asic-1(ok415)*.

Για την εξακρίβωση του ρόλου της ASIC-1 στην εκδήλωση του associative learning τέθηκε το ερώτημα για το πώς επηρεάζει τη σηματοδότηση ντοπαμίνης κατά την εκδήλωση της εξαρτημένης μάθησης. Για την απάντηση του ερωτήματος αυτού ακολουθήθηκε γενετική ανάλυση όπου έγινε φαινοτυπικός έλεγχος του μεταλλαγμένου στελέχους *dat-1(tm903)* και του διπλά μεταλλαγμένου στελέχους *asic-1(ok415);dat-1(tm903)*. Όπως αναφέρθηκε, ο μεταφορέας της ντοπαμίνης DAT-1 (dopamine reuptake transporter) είναι ένα συναπτικό μόριο που όταν απενεργοποιηθεί οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του νευροδιαβιβαστή στις συνάψεις των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Gainetdinov and Caron, 2003; Giros et al., 1996). Αυτή η κατάσταση δεν έδειξε να αλλοιώνει την ικανότητα του στελέχους για εκδήλωση associative learning (Εικόνα 12). Αντίθετα, το στέλεχος *asic-1(ok415)* εμφανίζει μειωμένη ικανότητα συσχετισμού μεταξύ της ισοαμυλικής αλκοόλης και της έλλειψης φαγητού. Στην περίπτωση του διπλά μεταλλαγμένου στελέχους *asic-1(ok415);dat-1(tm903)* παρατηρήθηκε φυσιολογική ικανότητα για εκδήλωση associative learning (Εικόνα 12).

Το αποτέλεσμα αυτό κάνει εμφανές ότι ο μεταφορέας ντοπαμίνης DAT-1 είναι επιστατικός του καναλιού ASIC-1. Σε λειτουργικό επίπεδο, αυτή η γενετική σχέση μεταξύ των δυο μορίων μπορεί να εξηγηθεί από το αποτέλεσμα που αυτά έχουν στα επίπεδα της εκλυόμενης ντοπαμίνης στις συνάψεις. Αρχικά, φάνηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα ντοπαμίνης δεν αναστέλλουν το associative learning (στέλεχος *dat-1(tm903)*). Στο διπλά μεταλλαγμένο

στέλεχος, η μεταλλαγή του DAT-1 οδηγεί σε διάσωση του προβληματικού φαινοτύπου από τη μεταλλαγή του ASIC-1. Με άλλα λόγια το κανάλι ASIC-1 δεν είναι αναγκαίο για το associative learning όταν ο DAT-1 είναι απενεργοποιημένος. Δηλαδή, όταν τα επίπεδα ντοπαμίνης στη σύναψη είναι υψηλά δεν είναι απαραίτητη η δράση του ASIC-1. Επομένως, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες το κανάλι ASIC-1 και ο μεταφορέας DAT-1 έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα σε ότι αφορά τα επίπεδα της ντοπαμίνης στη σύναψη. Το μεν κανάλι ASIC-1 προκαλεί αύξηση της ντοπαμίνης, ο δε μεταφορέας προκαλεί τη μείωσή της από τη σύναψη.



**Εικόνα 12: Το κανάλι ASIC-1 ρυθμίζει τα επίπεδα της εκλυόμενης ντοπαμίνης.** Φαινοτυπικός έλεγχος των στελεχών *asic-1(ok415)*, *dat-1(tm903)* και του διπλά μεταλλαγμένου στελέχους *asic-1(ok415); dat-1(tm903)* για την εκδήλωση associative learning. Η ικανότητα χημειοτακτισμού προς την ελκτική ένωση ισοαμυλική αλκοόλη δεν επηρεάζεται από τη μεταλλαγή του γονιδίου *asic-1* ή του γονιδίου *dat-1*. Ανεκπαίδευτα (naive) άτομα των μεταλλαγμένων στελεχών εμφανίζουν υψηλό δείκτη χημειόταξης στην ισοαμυλική αλκοόλη (άσπρες στήλες). Το conditioning μεταξύ της ισοαμυλικής αλκοόλης και της έλλειψης φαγητού οδηγεί σε μείωση του δείκτη χημειόταξης για τα άτομα του αγρίου τύπου αλλά όχι για τα άτομα του στελέχους *asic-1(ok415)*. Η μεταλλαγή του μεταφορέα DAT-1 δεν αλλάζει την ικανότητα για μάθηση, ενώ διασώζει και τις φαινοτυπικές ανωμαλίες από τη μεταλλαγή του ASIC-1 (μαύρες στήλες). (Κάθε στήλη αναπαριστά το μέσο όρο των τιμών από τουλάχιστον 5 διαφορετικές δοκιμασίες. Σε κάθε συνθήκη ελέγχθηκαν συνολικά 800 άτομα από κάθε στέλεχος. \*\*\*  $P < 0.001$ , unpaired t-test).

## 10. Το κανάλι ASIC-1 ελέγχει την ενεργότητα των ντοπαμινεργικών συνάψεων.

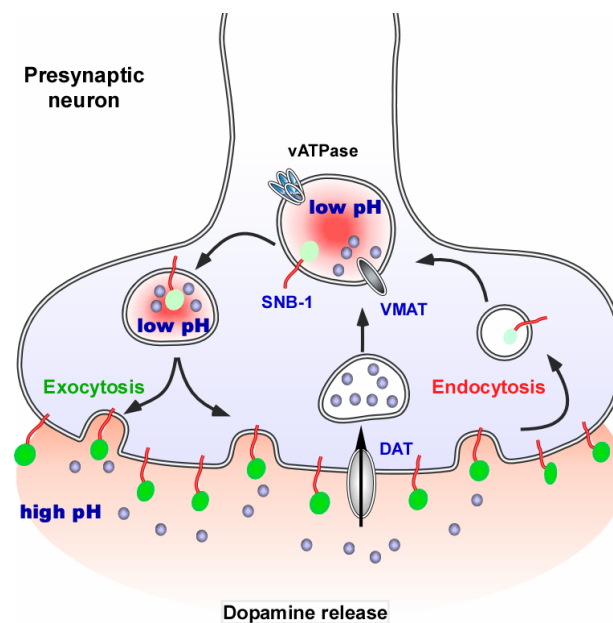
Για τη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης της ASIC-1 και με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα έγινε προσπάθεια καταγραφής της ενεργότητας των ντοπαμινεργικών

συνάψεων. Στην περίπτωση δηλαδή που ο ρόλος της ASIC-1 είναι να αυξάνει τα επίπεδα του νευροδιαβιβαστή στη σύναψη, όπως φάνηκε από το παραπάνω πείραμα, γίνεται η υπόθεση ότι και η ενεργότητα των συνάψεων αυτών θα είναι αυξημένη κατά την παρουσία του καναλιού. Ο πιο άμεσος τρόπος για την επιβεβαίωση ή τη διάψευση της υπόθεσης αυτής θα ήταν η απευθείας καταγραφή της ενεργότητας των ντοπαμινεργικών νευρώνων, εφόσον η ενεργότητα μεταξύ του νευρώνα και των συνάψεων του είναι μεγέθη ευθέως ανάλογα. Η καταγραφή αυτή θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας, τα οποία όμως είναι ανέφικτο να πραγματοποιηθούν στους εξαιρετικά μικρούς και δύσκολα προσπελάσιμους νευρώνες του νηματώδη. Έτσι, θα έπρεπε να γίνει επιλογή μεταξύ της εκτοπικής έκφρασης του καναλιού σε άλλο βιολογικό σύστημα και στην πραγματοποίηση αντίστοιχων *in vivo* μετρήσεων με εναλλακτικό τρόπο.

Ένας τέτοιος τρόπος είναι διαθέσιμος και περιλαμβάνει την *in vivo* καταγραφή της ενεργότητας των επιθυμητών συνάψεων του νηματώδη με οπτικό τρόπο και συγκεκριμένα με τη μέθοδο του FRAP (Bozza et al., 2004; Reiff et al., 2005; Samuel et al., 2003; Sankaranarayanan et al., 2000). Πρόκειται για μια διαδικασία όπου γίνεται σήμανση των συνάψεων του οργανισμού μέσω της προσυναπτικής πρωτεΐνης synaptobrevin. Για τη σήμανση της πρωτεΐνης χρησιμοποιείται ο φθορίζοντας μάρτυρας της super ecliptic pHluorin (SE) (Miesenbock et al., 1998). Βασική διαφορά στις ιδιότητες αυτής της παραλλαγμένης GFP, σε σχέση με την κλασσική, είναι το γεγονός ότι έχει μεγάλη ευαισθησία στις αλλαγές του pH. Η συγκεκριμένη που χρησιμοποιήθηκε (SE) δεν φθορίζει σε όξινο περιβάλλον, ενώ ανακτά την ικανότητα φθορισμού όταν η τιμή του pH αυξάνει (Εικόνα 14α). Πώς όμως αυτή η ιδιότητα εξυπηρετεί στις μετρήσεις της ενεργότητας των ντοπαμινεργικών συνάψεων; Για να γίνει αυτό ακολουθήθηκε το εξής σχήμα: Αρχικός στόχος ήταν η τοποθέτηση της SE σε όξινο περιβάλλον με σκοπό την αποσιώπηση του φθορισμού. Επόμενος στόχος είναι η αύξηση του pH, που θα οδηγήσει στην ανάκτηση του φθορισμού, να συμπίπτει με κυτταρικές λειτουργίες που να αντικατοπτρίζουν την ενεργότητα των συνάψεων. Με τον τρόπο αυτό θα γίνει δυνατή η καταγραφή σήματος φθορισμού που θα ανταποκρίνεται στην ενεργοποίηση του νευρώνα.

Αυτό εξασφαλίζεται κατά το σχεδιασμό της πλασμιδιακής κατασκευής του χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των ζώων. Συγκεκριμένα, η SE είναι συνδεδεμένη με το καρβοξυτελικό άκρο της synaptobrevin το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό του συναπτικού κυστιδίου, δηλαδή σε όξινο pH (Anderson and Orci, 1988; Pujol et al., 2001; Sudhof, 1995). Μετά από την εξωκύτωση του νευροδιαβιβαστή η SE περνάει στον εξωκυττάριο χώρο όπου το pH είναι λιγότερο όξινο σε σχέση με πριν και ανακτά την

ικανότητα φθορισμού (Εικόνα 13) (Ryan, 2001). Επομένως, το παρατηρούμενο σήμα στις συνάψεις των ντοπαμινεργικών νευρώνων προέρχεται από μόρια της SE που εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης και αυτό συνεπάγεται ότι έχουν τοποθετηθεί εκεί μετά από γεγονότα έκλυσης νευροδιαβιβαστή (Εικόνα 13). Με τη χρήση κατάλληλου laser και μέσω του φαινομένου του photobleaching εξαφανίζεται αρχικά ο φθορισμός στις συνάψεις. Η ανάκτηση στη συνέχεια του σήματος αντικατοπτρίζει τα γεγονότα απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή εφόσον το σήμα προέρχεται από τα νέα μόρια SE που έφτασαν στις συνάψεις. Με τη μέθοδο λοιπόν του Fluorescence Recovery After Photo-bleaching (FRAP) έγινε καταγραφή της ενεργότητας των συνάψεων των ντοπαμινεργικών νευρώνων.



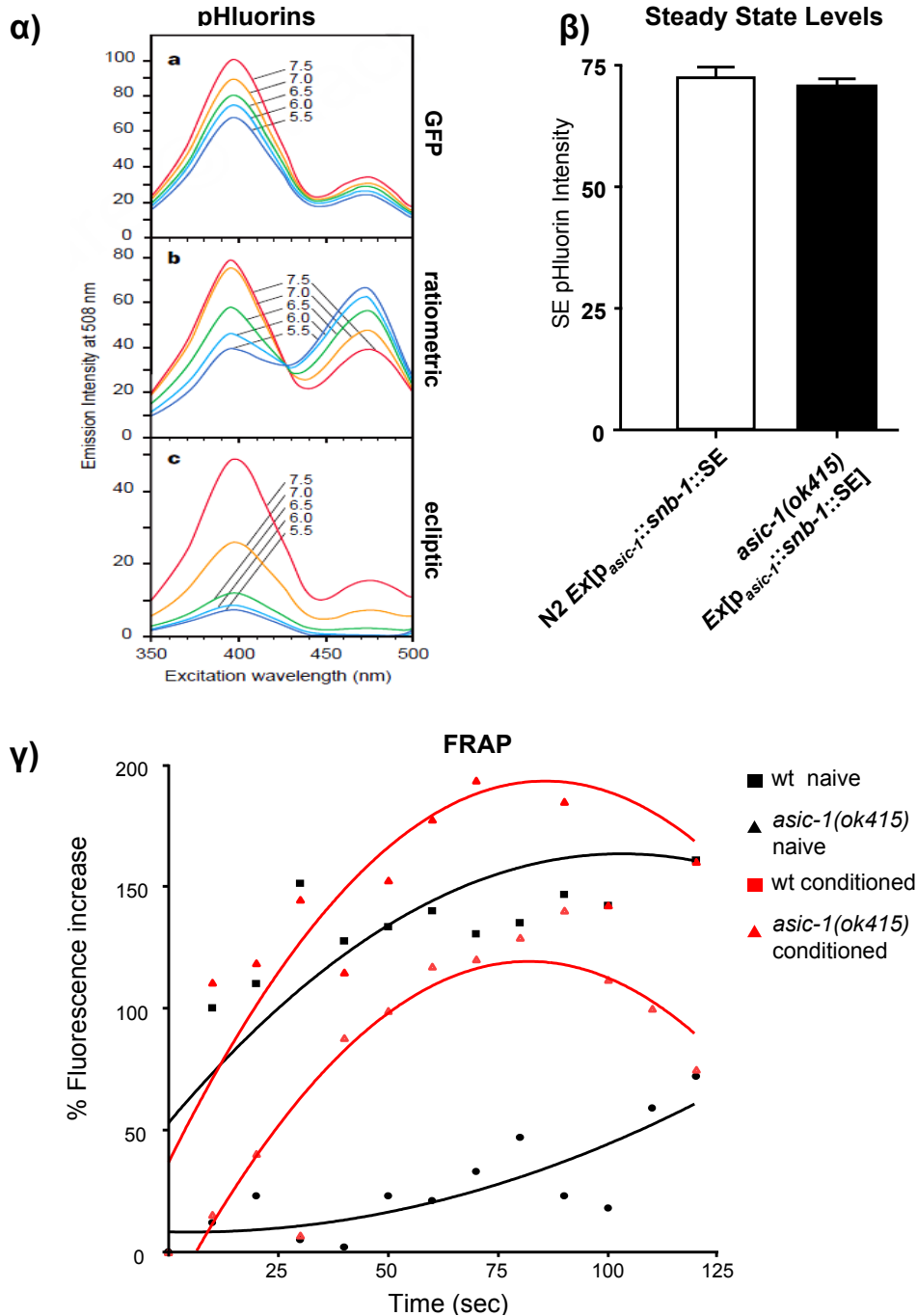
**Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας μιας ντοπαμινεργικής σύναψης και των μοριακών παραμέτρων στις οποίες βασίζεται η μέτρηση της ενεργότητας της σύναψης με τη μέθοδο FRAP. Ο προσυναπτικός μάρτυρας της synaptobrevin (SNB-1) χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση των συνάψεων των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Η synaptobrevin εντοπίζεται στη μεμβράνη των συναπτικών κυστιδίων και διαπερνά τη μεμβράνη αυτών. Το καρβοξυτελικό της άκρο εντοπίζεται αρχικά στο εσωτερικό των κυστιδίων και μετά την έκλυση του νευροδιαβιβαστή περνά στον εξωκυττάριο χώρο (συναπτική σχισμή). Η synaptobrevin σημάνθηκε με το φθορίζοντα μάρτυρα Super Ecliptic pHluorin (SE). Η SE ενώθηκε στο καρβοξυτελικό άκρο της synaptobrevin. Έτσι, αρχικά εντοπίζεται στο εσωτερικό των συναπτικών κυστιδίων όπου το pH είναι όξινο (Anderson and Orci, 1988) και ο παραγόμενος φθορισμός μηδαμινός (Miesenbock et al., 1998). Το όξινο περιβάλλον των συναπτικών κυστιδίων οφείλεται στη δράση του συμπλόκου της V-ATPase το οποίο εισάγει πρωτόνια (Pujol et al., 2001). Αυτή η κλίση πρωτονίων είναι η απαραίτητη συνθήκη για τη δράση του μεταφορέα ντοπαμίνης VMAT, ο οποίος είναι υπεύθυνος για το φόρτωμα του νευροδιαβιβαστή στα συναπτικά κυστίδια (Duell et al., 1999). Στη συνέχεια και μετά την εξωκύτωση του νευροδιαβιβαστή, η SE ακολουθώντας την synaptobrevin περνά στον εξωκυττάριο**

χώρο όπου το pH αυξάνεται και ανακτά την ικανότητα φθορισμού. Έτσι, η ανίχνευση σήματος οφείλεται σε μόρια της SE που βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης στη σύναψη.

Έτσι, σχηματίστηκαν διαγονιδιακά ζώα του αγρίου τύπου και του στελέχους *asic-1(ok415)* τα οποία έφεραν την πλασμιδιακή κατασκευή  $p_{asic-1}::SEpHluorin$ . Η αρχική παρατήρηση των ντοπαμινεργικών συνάψεων έδειξε ότι πριν από το photobleaching δεν υπήρχε διαφορά στα επίπεδα του σήματος ανάμεσα στα δυο στελέχη (steady state fluorescence) (Εικόνα 14β). Αυτή η παρατήρηση κάνει φανερό ότι η λειτουργικότητα των συνάψεων δεν έχει επηρεαστεί από τη μεταλλαγή του ASIC-1. Δηλαδή η πρωτεΐνη ASIC-1 δεν αποτελεί βασικό δομικό μόριο της σύναψης και δεν μεσολαβεί στη συναπτική λειτουργία σε βασικό επίπεδο (basal synaptic activity). Έτσι, η ένταση του σήματος της SE που ανιχνεύεται φαίνεται να εξαρτάται από τη χωροταξική διάταξη των συναπτικών κυστιδίων στη συναπτική μεμβράνη και όχι από την ASIC-1. Για το λόγο αυτό τα steady state επίπεδα φθορισμού είναι ίδια μεταξύ του στελέχους *asic-1(ok415)* και των ατόμων του αγρίου τύπου (Εικόνα 14β).

Αν πράγματι ο ρόλος του καναλιού ASIC-1 δεν είναι δομικός θα μπορούσε να είναι ρυθμιστικός; Θα μπορούσε δηλαδή το κανάλι αυτό να ρυθμίζει το ρυθμό έκλυσης νευροδιαβιβαστή ή αλλιώς την ενεργότητα των ντοπαμινεργικών συνάψεων; Για να απαντηθεί το ερώτημα αυτό ακολούθησε η μέτρηση της ενεργότητας των ντοπαμινεργικών συνάψεων με τη μέθοδο του FRAP. Βρέθηκε ότι ενώ τα αρχικά επίπεδα του φθορισμού είναι ίδια και στα δύο στελέχη, ο ρυθμός ανάκτησης του φθορισμού μετά το photobleaching διαφέρει σημαντικά μεταξύ τους. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι το στέλεχος *asic-1(ok415)* έχει δραματικά μικρότερο ρυθμό ανάκτησης του φθορισμού σε σχέση με αυτό του αγρίου τύπου, με αποτέλεσμα για το χρονικό διάστημα που έγινε η παρατήρηση το μεταλλαγμένο στέλεχος να μην φτάνει τα επίπεδα φθορισμού του φυσιολογικού στελέχους (Εικόνα 14γ). Έτσι, γίνεται σαφές ότι το κανάλι ASIC-1 ασκεί ρυθμιστικό ρόλο στις ντοπαμινεργικές συνάψεις αυξάνοντας την ενεργότητά τους και συνεπώς τα επίπεδα του εκλυόμενου νευροδιαβιβαστή. Γι' αυτό και απουσία του καναλιού ο ρυθμός ανάκτησης του φθορισμού είναι ελαττωμένος σε σύγκριση με το στέλεχος του αγρίου τύπου. Αυτή βεβαίως η ποιοτική διαφορά ανάμεσα στα δυο στελέχη δεν είναι εμφανής όταν παρατηρούνται τα steady state levels του φθορισμού, καθώς γίνεται κατανοητό ότι σε μακρό χρονικό διάστημα η συσσώρευση της SE στη σύναψη δεν εξαρτάται από διαφορές στο ρυθμό με τον οποίο τα συναπτικά κυστίδια φτάνουν σε αυτήν.





**Εικόνα 14: Το κανάλι ASIC-1 ρυθμίζει την ενεργότητα των ντοπαμινεργικών συνάψεων.** (α) Σχηματική απεικόνιση του φάσματος απορρόφησης και εκπομπής των φοριζόντων μορίων της GFP, ratiometric και ecliptic pHluorin σε σχέση με το pH (Miesenbock et al., 1998). Παρατηρούνται οι διαφορετικές ιδιότητες μεταξύ ratiometric και ecliptic pHluorin σε υψηλές και χαμηλές τιμές του pH. (β) Ανάλυση της έντασης του φορισμού στις ντοπαμινεργικές συνάψεις ατόμων του αγρίου τύπου (άσπρη στήλη) και του στελέχους *asic-1(ok415)* (μαύρη στήλη). Παρατηρείται ότι τα steady state επίπεδα φορισμού στις ντοπαμινεργικές συνάψεις δεν διαφέρουν ανάμεσα στα δυο στελέχη. Το εύρος τιμών του φορισμού κυμαίνονται μεταξύ 0 και 255. Οι τιμές του διαγράμματος απεικονίζουν το μέσο όρο των τιμών από 150 διαφορετικές συνάψεις για κάθε στέλεχος (unpaired t-test). (γ) Σχηματική απεικόνιση του ρυθμού ανάκτησης φορισμού στις ντοπαμινεργικές συνάψεις ατόμων του

αγρίου τύπου και του στελέχους *asic-1(ok415)*. Η μέτρηση της ανάκτησης του φθορισμού πραγματοποιήθηκε σε άτομα *naïve* (μαύρες καμπύλες) και άτομα που είχαν υποστεί conditioning (κόκκινες καμπύλες) σε ισοαμλική αλκοόλη και συνθήκες όμοιες με αυτές που ακολουθήθηκαν κατά τον φαινοτυπικό έλεγχο του οργανισμού. Κάθε καμπύλη αποτελείται από ένα σύνολο σημείων που αντιστοιχούν στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (time points). Κάθε σημείο της εκάστοτε καμπύλης αναπαριστά την επί τοις εκατό αύξηση του φθορισμού σε ένα δεδομένο χρονικό σημείο σε σχέση με το προηγούμενο. Οι καμπύλες αναπαριστούν το ρυθμό αύξησης του φθορισμού ακριβώς μετά το photobleaching (μηδενικός φθορισμός). Οι μετρήσεις του φθορισμού έγιναν σε διαστήματα των 10 sec και διήρκησαν 130 sec συνολικά εφόσον από αυτό το χρονικό σημείο και μετά δεν παρατηρήθηκε ποτέ αύξηση του φθορισμού σε κανένα στέλεχος (πλατό). Η ελάττωση του παρατηρούμενου φθορισμού οφείλεται στο φαινόμενο του photobleaching κατά την καταγραφή του σήματος, όπως διαπιστώθηκε και από την παρατήρηση γειτονικών συνάψεων. Κάθε καμπύλη προέκυψε από την επεξεργασία των τιμών με τη δευτεροβάθμια πολυονυμική εξίσωση  $Y=A + B X + C X^2$

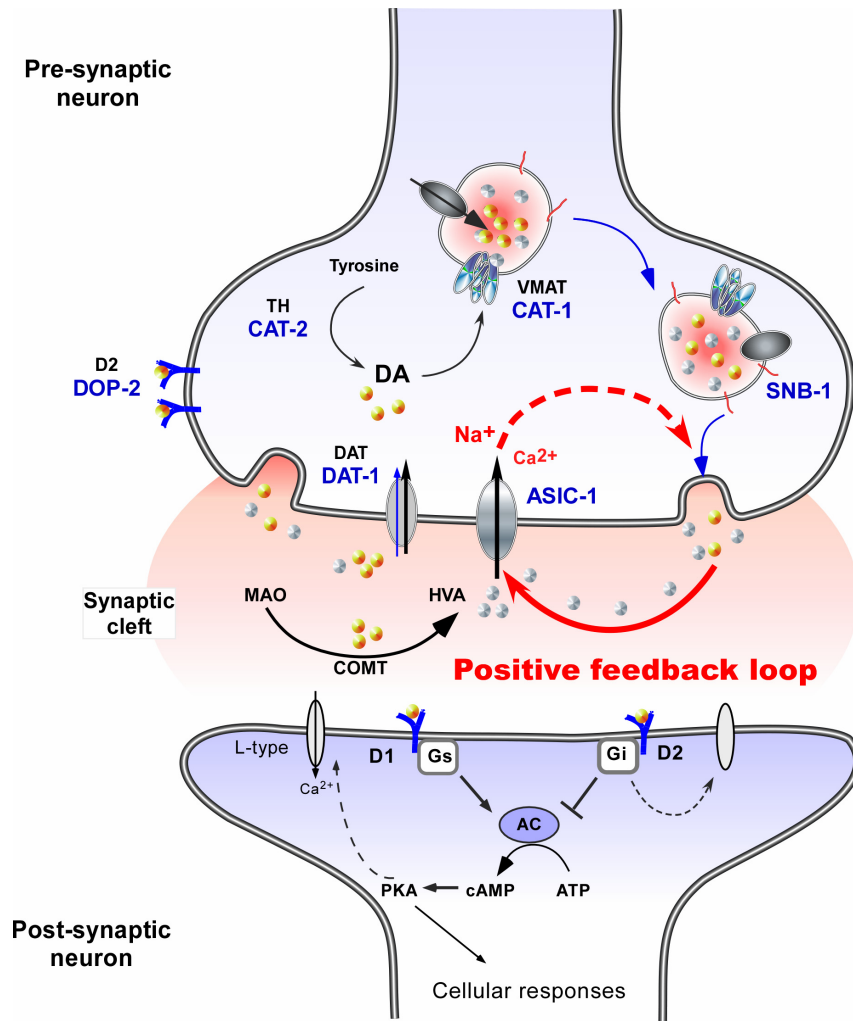
Παράλληλα, η σημασία που έχει αυξημένη ενεργότητα των συνάψεων για την εκδήλωση της εξαρτημένης μάθησης φαίνεται και από την μελέτη των ντοπαμινεργικών συνάψεων μετά από conditioning. Στην περίπτωση αυτή, έγινε έκθεση του οργανισμού σε συνθήκες όμοιες με εκείνες κατά τις οποίες έγινε επαγωγή της αλλαγής στη συμπεριφορά. Βρέθηκε ότι οι συνθήκες αυτές εκτός των φαινοτυπικών αποτελεσμάτων που περιγράφηκαν προκαλούν και αλλαγή στην ενεργότητα των ντοπαμινεργικών συνάψεων. Έτσι, γίνεται η απ' ευθείας συσχέτιση μεταξύ πλαστικότητας στη συμπεριφορά και πλαστικότητα στη συναπτική λειτουργία των συγκεκριμένων νευρώνων. Επίσης, γίνεται εμφανές ότι το conditioning προκαλεί αύξηση της ενεργότητας στις συνάψεις τόσο των ατόμων του αγρίου τύπου όσο και του στελέχους *asic-1(ok415)*. Εντούτοις, είναι σαφές ότι τα επίπεδα της ενεργότητας του μεταλλαγμένου στελέχους δεν προσεγγίζουν σε καμία από τις δυο συνθήκες (*naïve* - conditioned) εκείνα των ατόμων του αγρίου τύπου, κάνοντας έτσι σαφές ότι η λειτουργία του καναλιού ASIC-1 είναι συνυφασμένη με την ενεργότητα των ντοπαμινεργικών συνάψεων κατά την εκδήλωση εξαρτημένης μάθησης (Εικόνα 14γ).

#### **11. Μοντέλο δράσης: Το κανάλι ASIC-1 ελέγχει τη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης ρυθμίζοντας την ενεργότητα των ντοπαμινεργικών συνάψεων μέσω ενός μηχανισμού θετικής ανάδρασης.**

Το σύνολο των παραπάνω πειραμάτων κάνουν εμφανές ότι κανάλι ASIC-1 ελέγχει στο νηματώδη *C. elegans* την πολύπλοκη συμπεριφορά της εξαρτημένης μάθησης (associative learning). Στα παραδείγματα που ελέγχθηκαν βρέθηκε ότι ένα ευρύ φάσμα από διαφορετικά μεταξύ τους χημικά και θερμικά ερεθίσματα ενσωματώνονται στο νευρικό σύστημα του οργανισμού αλλάζοντας τη συμπεριφορά του και γι' αυτό είναι υπεύθυνο το

κανάλι ASIC-1 (Εικόνα 4, 5, 6). Ο κομβικός ρόλος του καναλιού σε αυτήν τη λειτουργία του νευρικού συστήματος λαμβάνει χώρα από τη δράση του στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του οργανισμού (Εικόνα 7). Μάλιστα ο εντοπισμός του καναλιού σε περιοχές πλούσιες σε συνάψεις και ειδικότερα ο συνεντοπισμός του με προσυναπτικούς μάρτυρες υποδεικνύει ως πιθανότερη λειτουργία του τον έλεγχο της σηματοδότησης μέσω ντοπαμίνης (Εικόνα 11). Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι η μεταλλαγή του μεμβρανικού μεταφορέα της ντοπαμίνης DAT-1, που προκαλεί την αύξηση του νευροδιαβιβαστή στη σύναψη οδηγεί στη διάσωση των φαινοτυπικών ανωμαλιών από τη μεταλλαγή του ASIC-1 (Εικόνα 12). Αντίθετα, η απαλοιφή των ντοπαμινεργικών νευρώνων και η μεταλλαγή των υποδοχέων ντοπαμίνης DOP-1 και DOP-2, προκαλούν τα ίδια φαινοτυπικά αποτελέσματα με το στέλεχος *asic-1(ok415)* (Εικόνα 8). Τέλος, ο ρυθμιστικός ρόλος του καναλιού στην ενίσχυση της σηματοδότησης μέσω ντοπαμίνης επιβεβαιώνεται από την παρατήρηση ότι η ενεργότητα των ντοπαμινεργικών συνάψεων είναι σημαντικά μειωμένη στο στέλεχος *asic-1(ok415)* (Εικόνα 14γ).

Πως όμως το συγκεκριμένο μόριο οδηγεί στην ενίσχυση της ενεργότητας των ντοπαμινεργικών συνάψεων; Ποια δηλαδή είναι τα μοριακά γεγονότα που ενεργοποιούν την ASIC-1 και ποια η φυσιολογική σημασία της δράσης του καναλιού; Για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης του μορίου χρειάζεται να ληφθούν υπόψη όχι μόνο τα παραπάνω αποτελέσματα, αλλά και η πληροφορία που είναι γνωστή και αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ASICs εν γένει. Πρόκειται δηλαδή για κανάλια ιόντων νατρίου τα οποία ενεργοποιούνται από το χαμηλό εξωκυττάριο pH. Τέτοιες συνθήκες προκύπτουν στη συναπτική σχισμή κατά την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή όπου μαζί με την ντοπαμίνη απελευθερώνονται και πρωτόνια (Krishtal et al., 1987) προκαλώντας τοπική και οξίνιση περιοχών της συναπτικής σχισμής. Αυτή η παροδική ελάττωση του εξωκυττάριου pH είναι ικανή να προκαλέσει την ενεργοποίηση της ASIC-1 (Waldmann et al., 1999) ή οποία εντοπίζεται στις συνάψεις. Το αποτέλεσμα αυτής της ενεργοποίησης είναι η δράση του καναλιού το οποίο επιτρέπει την είσοδο ιόντων νατρίου που θα προκαλέσουν την αλλαγή του δυναμικού της μεμβράνης, δηλαδή την εκπόλωση του νευρώνα (Hesselager et al., 2004). Το γεγονός αυτό οδηγεί στην εκ νέου απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή και έτσι, στο σχηματισμό ενός κύκλου ανάδρομης ενεργοποίησης του καναλιού ASIC-1 με τελικό αποτέλεσμα την ενίσχυση της ενεργότητας της σύναψης και την αυξημένη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης (Εικόνα 15).



**Εικόνα 15: Μοντέλο λειτουργίας του καναλιού ASIC-1.** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού ενίσχυσης μιας ντοπαμινεργικής σύναψης κατά την εκδήλωση εξαρτημένης μάθησης. Η βιογενής αμίνη, ντοπαμίνη (DA) συντίθεται από το αμινοξύ τυροσίνη μέσω της υδροξυλάσης τυροσίνης (CAT-2). Το φόρτωμα του νευροδιαβιβαστή στα συναπτικά κυστίδια γίνεται από το μεταφορέα VMAT (CAT-1). Γι' αυτό προϋποτίθεται η κλίση πρωτονίων στα κυστίδια από τη δράση της αντλίας πρωτονίων V-ATPase. Η πρόσδεση και η σύντηξη των συναπτικών κυστιδίων στη μεμβράνη των συνάψεων γίνεται από τη δράση ενός συμπλόκου πρωτεϊνών (SNARE complex) μέρος του οποίου είναι η πρωτεΐνη synaptobrevin. Η απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή συνεπάγεται την παροδική ελάττωση του pH σε περιοχές της σύναψης. Αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση του ευαίσθητου σε αλλαγές του pH καναλιού ιόντων ASIC-1 και η αύξηση της διαπερατότητάς του σε ιόντα νατρίου. Έτσι, προκαλείται η εκπόλωση του νευρώνα και η εκ νέου απελευθέρωση ντοπαμίνης δημιουργώντας έναν κύκλο θετικής ανάδρασης για το κανάλι ASIC-1. Τελικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση της ενεργότητας της ντοπαμινεργικής σύναψης.

Περιεχόμενα

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

## Συζήτηση

### 1. Σύνοψη των αποτελεσμάτων

Στην παραπάνω εργασία περιγράφηκε η προσπάθεια που έγινε για την κατανόηση των μηχανισμών μνήμης και μάθησης στο νηματώδη *C. elegans*. Ο βασικός στόχος που τέθηκε αρχικά ήταν η αναγνώριση καναλιών ιόντων τα οποία εξυπηρετούν το φαινόμενο, αλλά και των νευρώνων εκείνων που συμβάλλουν στην εκδήλωσή του. Έτσι, έγινε φαινοτυπικός έλεγχος σε στέλεχος που έφερε μεταλλαγή για το κανάλι ιόντων ASIC-1. Το κανάλι αυτό ανήκει στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών DEG/ENaCs και φέρει σημαντική ομολογία με μέλη της, τα οποία ενεργοποιούνται από την ελάττωση του εξωκυττάριου pH. Η μεταλλαγή του προκαλεί αδυναμία για εκδήλωση νευρικής πλαστικότητας στο νηματώδη. Τα άτομα του μεταλλαγμένου στελέχους δεν καταφέρνουν να συσχετίσουν τη διαθεσιμότητα της τροφής (έλλειψη ή παρουσία) με μια σειρά από διαφορετικά ερεθίσματα όπως χημικά ή θερμικά. Πρόκειται δηλαδή για αδυναμία εκδήλωσης εξαρτημένης μάθησης εξαιτίας της μεταλλαγής του ASIC-1. Ποιος είναι όμως ο μηχανισμός δράσης του ASIC-1 στην εκδήλωση εξαρτημένης μάθησης; Αρχικά, βρέθηκε ότι το ASIC-1 εντοπίζεται στις συνάψεις των ντοπαμινεργικών νευρώνων και συγκεκριμένα στην προσυναπτική περιοχή της σύναψης. Η σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης αποτελεί κομβικό σημείο για την εκδήλωση του φαινομένου και αυτό φάνηκε τόσο από τη διακοπή της βιοσύνθεσής της όσο και από την απαλοιφή (νέκρωση) των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Το κανάλι ASIC-1 παρά το γεγονός ότι δεν επηρεάζει τη βιοσύνθεση της ντοπαμίνης μεσολαβεί στην εκδήλωση εξαρτημένης μάθησης μέσα από τη σηματοδότηση ντοπαμίνης καθώς οι φαινοτυπικές ανωμαλίες που προκαλούνται από τη μεταλλαγή του, διασώζονται κατά τη χορήγηση εξωγενούς ντοπαμίνης. Εντούτοις, η επίδραση του καναλιού γίνεται κατά έναν εξαιρετικά ακριβή τρόπο καθώς άλλες συμπεριφορές, εξαρτώμενες από την ντοπαμίνη, δεν επηρεάζονται από τη μεταλλαγή του. Πώς όμως το κανάλι αυτό επηρεάζει τη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης ειδικά κατά την εκδήλωση μνήμης και μάθησης; Για την απάντηση αυτού του καίριου ερωτήματος λήφθηκε υπόψη ο υποκυτταρικός εντοπισμός του καναλιού, ο εντοπισμός δηλαδή στις συνάψεις των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Έτσι, παρατηρήθηκε ότι οι φαινοτυπικές ανωμαλίες από τη μεταλλαγή του ASIC-1 διασώζονται σε μεταλλαγμένο γενετικό υπόβαθρο για τον μεταφορέα ντοπαμίνης DAT-1, ο οποίος επίσης εντοπίζεται στην προσυναπτική περιοχή των ντοπαμινεργικών συνάψεων και η μεταλλαγή του οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της ντοπαμίνης στη σύναψη. Είναι λοιπόν θέμα ποσότητας; Και αν ναι τότε πως το ASIC-1 θα μπορούσε να συντελεί στην αύξηση της νευροδιαβίβασης κατά την εκδήλωση εξαρτημένης

μάθησης; Η απάντηση στο ερώτημα αυτό προέκυψε με τον έλεγχο της ενεργότητας των ντοπαμινεργικών συνάψεων με οπτικό τρόπο. Βρέθηκε ότι οι συνάψεις αυτές έχουν δραματικά μειωμένη ενεργότητα όταν το ASIC-1 απουσιάζει από τη σύναψη. Για την ανάλυση του μηχανισμού με τον οποίο το συγκεκριμένο κανάλι ελέγχει την ενεργότητα της σύναψης λήφθηκαν υπόψη οι φυσιολογικές ιδιότητες που έχει τόσο το ίδιο όσο και η σύναψη κατά τη διάρκεια της νευροδιαβίβασης. Έτσι, προτείνεται ως πιθανότερο μοντέλο δράσης η δημιουργία ενός κύκλου θετικής ανάδρασης όπου το ASIC-1 ενεργοποιείται από τη διαδοχική έκλυση ντοπαμίνης στη σύναψη και προκαλεί την περαιτέρω απελευθέρωσή της. Όλα αυτά τα αποτελέσματα είναι στην πραγματικότητα κομμάτια ενός πάζλ που για να αποκτήσουν βιολογικό νόημα είναι απαραίτητο να τοποθετηθούν στο κατάλληλο πλαίσιο. Παράλληλα, είναι σκόπιμο να τονιστούν οι καινοτομίες των παρατηρήσεων αυτών, αλλά και να συζητηθούν τα νέα ερωτήματα που προέκυψαν και να σχολιαστούν οι τρόποι με τους οποίους θα μπορούσαν να απαντηθούν σε μελλοντικές προσπάθειες.

## 2. Σχολιασμός καινοτομιών

Η παραπάνω εργασία περιλαμβάνει μια σειρά από διαφορετικά και καινοτόμα ευρήματα. Κομβικής σημασίας είναι η σύνδεση της λειτουργίας ενός μέλους της υπεροικογένειας των DEG/ENaCs με τη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης κατά την εκδήλωση εξαρτημένης μάθησης. Οι ASICs έχουν εντοπιστεί στο κεντρικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών όπου μεταξύ άλλων ρυθμίζουν την πλαστικότητα στη συμπεριφορά. Ιδιαίτερα η ASIC1 του ποντικού ελέγχει διαδικασίες όπως το fear conditioning και το spatial learning. Είναι εντούτοις η πρώτη φορά που μια παρόμοια λειτουργία περιγράφεται για τις ASICs στον *C. elegans*. Μέχρι τώρα όλα τα μέλη των Degenerins που έχουν χαρακτηριστεί γενετικά έχουν βρεθεί να εκφράζονται σε αισθητήριους, ενδιάμεσους και κινητικούς νευρώνες όπου ελέγχουν την αντίληψη μηχανικών ερεθισμάτων και την κίνηση του οργανισμού. Ο χαρακτηρισμός της ASIC-1 όμως δείχνει ότι ο ρόλος κάποιων από τα μέλη της οικογένειας εξαπλώνεται σε φαινόμενα όπως της μνήμης και της μάθησης. Αλλά και στο μηχανιστικό επίπεδο, η λειτουργία της ASIC-1 στο νηματώδη εμφανίζεται διαφοροποιημένη σε σχέση με τα θηλαστικά καθώς εντοπίστηκε στις προσυναπτικές περιοχές των ντοπαμινεργικών νευρώνων και όχι σε μετασυναπτικές περιοχές. Αυτός ο τρόπος ελέγχου της νευρικής πλαστικότητας στο επίπεδο του προσυναπτικού νευρώνα αποτελεί άλλη μια καινοτομία καθώς μέχρι τώρα η ενίσχυση της συναπτικής λειτουργίας έχει βρεθεί να οφείλεται πρωτίστως στη δράση καναλιών ιόντων (π.χ AMPA, NMDA) στον μετασυναπτικό νευρώνα. Σε ότι αφορά στον ρόλο της ντοπαμίνης στη νευρική πλαστικότητα χρειάζεται να αναφερθεί

ότι είναι γνωστός τόσο για τα θηλαστικά όσο και σε άλλους οργανισμούς όπου έχει μελετηθεί εκτενώς. Ειδικά για τον καινοραβδίτη έχει εμπλακεί στην εκδήλωση μη εξαρτημένης και εξαρτημένης μάθησης (Bettinger and McIntire, 2004; Rose and Rankin, 2001). Έτσι, είναι γνωστό ότι η ντοπαμίνη είναι ένας διαδεδομένος νευρο-ρυθμιστής που συναντάται πολύ συχνά στα διαφορετικά είδη. Παρά ταύτα, ο μηχανισμός με τον οποίο ενισχύεται η σηματοδότηση αυτού του νευροδιαβιβαστή κατά την εκδήλωση μάθησης δεν έχει περιγραφεί σε κανένα σύστημα ως τώρα. Πρόκειται δηλαδή για την πρώτη φορά κατά την οποία μελετάται ο τρόπος ενίσχυσης της σηματοδότησης μέσω ντοπαμίνης κατά την εκδήλωση μάθησης. Η σύνδεση της λειτουργίας της ASIC-1 με τη σηματοδότηση ντοπαμίνης αποκτά μεγαλύτερη βαρύτητα από πρόσφατες παρατηρήσεις. Σύμφωνα με αυτές έγινε δυνατός ο εντοπισμός ASICs σε περιοχές του εγκεφάλου του ποντικού οι οποίες είναι πλούσιες σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Pidoplichko and Dani, 2006). Έτσι, είναι πολύ πιθανό η σύνδεση της δράσης του ASIC-1 με τη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης να επεκτείνεται και σε πολυπλοκότερους από τον καινοραβδίτη οργανισμούς.

### **3. Η σύναψη του Hebb**

Η ενίσχυση της ενεργότητας των ντοπαμινεργικών συνάψεων κατά την εκδήλωση εξαρτημένης μάθησης συνάδει με τη θεωρία της σύναψης του Hebb. Μέχρι τώρα, η θεωρία αυτή έχει μελετηθεί και επιβεβαιωθεί κατά τη σηματοδότηση μέσω γλουταμικού, όπου οι υποδοχείς NMDA οδηγούν στο φαινόμενο του LTP. Το φαινόμενο αυτό, αν και χαρακτηρίζεται από πληθώρα φυσικοχημικών ιδιοτήτων έχει ως βάση την αύξηση της ενεργότητας της σύναψης και τη διατήρηση σε αυτή την κατάσταση για μεγάλο χρονικό διάστημα. Όπως περιγράφεται παραπάνω, αυτό είναι και το αποτέλεσμα της λειτουργίας του καναλιού ASIC-1 στις ντοπαμινεργικές συνάψεις. Θα μπορούσε λοιπόν να υποστηριχτεί ότι το συγκεκριμένο κανάλι δρα στις ντοπαμινεργικές συνάψεις για να τις προσδώσει ιδιότητες όμοιες με αυτές της σύναψης του Hebb; Αν η ενδυνάμωση της συναπτικής διαβίβασης με βάση την εμπειρία επιβεβαιωθεί και σε αυτή την περίπτωση, τότε ενισχύεται η άποψη ότι αυτό το γεγονός αποτελεί τη βάση για την εκδήλωση της μνήμης και της μάθησης. Για να ισχύει όμως κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο να πληρείται μια ακόμα προϋπόθεση. Σύμφωνα με τη θεωρία του Hebb, οι μόνιμες αλλαγές που επάγονται στη σύναψη με βάση την προγενέστερη εμπειρία οφείλονται στην ταυτόχρονη ενεργοποίηση του προσυναπτικού και του μετασυναπτικού νευρώνα. Εξάλλου, για την επαγωγή του LTP στο μετασυναπτικό νευρώνα γίνεται ηλεκτρική ενεργοποίηση του προσυναπτικού. Με άλλα λόγια, για να διαπιστωθεί αν το ASIC-1 προκαλεί την εκδήλωση LTP, είναι απαραίτητο να γίνει



ταυτόχρονα καταγραφή της ενεργότητας τόσο του προσυναπτικού (ντοπαμινεργικός) όσο και του μετασυναπτικού νευρώνα. Αυτό όμως προϋποθέτει αφενός την ταυτοποίηση των μετασυναπτικών στόχων των ντοπαμινεργικών νευρώνων κατά την εκδήλωση μάθησης, αφετέρου την εφαρμογή μεθόδων ηλεκτροφυσιολογίας. Μέχρι τώρα όμως, κάτι τέτοιο δεν έχει καταστεί εφικτό. Έτσι, από τα παραπάνω δεδομένα μπορεί να αναφερθεί ότι η δράση του ASIC-1 προκαλεί την αύξηση της ενεργότητας των ντοπαμινεργικών συνάψεων με βάση την προγενέστερη εμπειρία. Το χρονικό διάστημα που αυτό διαρκεί και οι αλλαγές που προκαλεί στην ενεργότητα των μετασυναπτικών νευρώνων είναι σίγουρα αντικείμενο περαιτέρω μελέτης. Και αν η ηλεκτροφυσιολογική προσέγγιση δεν μπορεί να ακολουθηθεί λόγω του μικρού σε μέγεθος νευρικού συστήματος, η αναγνώριση των μετασυναπτικών νευρώνων που ενεργοποιούνται κατά την εξαρτημένη μάθηση μπορεί να αποτελεί έναν μελλοντικό στόχο, όπως σχολιάζεται παρακάτω.

Ένα επόμενο ερώτημα που αφορά την ενεργότητα των μετασυναπτικών νευρώνων σχετίζεται με την πιθανή συνεργασία του ASIC-1 με μόρια γνωστά για τη λειτουργία τους στην εκδήλωση του LTP. Ένα τέτοιο μόριο είναι ο υποδοχέας γλουταμικού NMDA. Από μελέτες στον εγκέφαλο ποντικών βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση του ASIC1 προκαλεί ηλεκτρικό δυναμικό ικανό να επάγει την ενεργοποίηση του NMDA στο μετασυναπτικό νευρώνα (Wemmie et al., 2002). Θα ήταν σημαντικό να μελετηθεί αν ο αντίστοιχος μηχανισμός λαμβάνει χώρα και στο νηματώδη. Για να συμβαίνει όμως αυτό προαπαιτείται ότι οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες δέχονται σήμα από γλουταματερικούς και συνεπώς εκφράζουν τους αντίστοιχους υποδοχείς. Όπως γίνεται αντιληπτό, το ASIC-1 δεν μπορεί να συνεντοπίζεται μαζί με τους υποδοχείς γλουταμικού καθώς είναι προσυναπτικό μόριο, ενώ οι συγκεκριμένοι υποδοχείς είναι μετασυναπτικοί. Εντούτοις, είναι πιθανό η εκπόλωση που επάγει το ASIC-1 να επηρεάζει ολόκληρο ή μέρος του νευρώνα και έτσι να αλλάζει η ικανότητα των ντοπαμινεργικών νευρώνων για ενεργοποίηση από γλουταματερικούς. Καθώς έχει βρεθεί ότι στα θηλαστικά η σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης επηρεάζεται από τη λειτουργία υποδοχέων γλουταμικού (Schilstrom et al., 2006), θα ήταν σκόπιμο να διερευνηθεί αν ισχύει το ίδιο στο νηματώδη και αν σε αυτό μεσολαβεί το κανάλι ASIC-1.

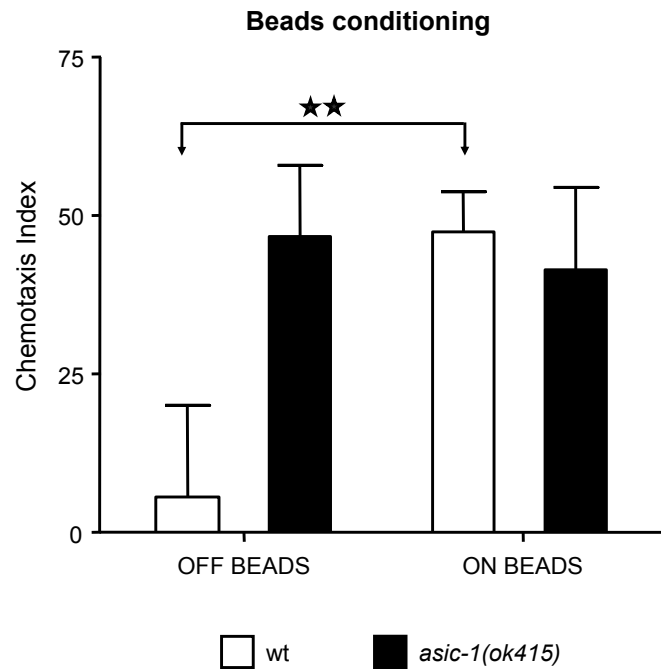
#### **4. Το σύστημα ντοπαμίνης κατά την εκδήλωση πλαστικότητας στο νευρικό σύστημα του νηματώδη**

Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν τη σημασία που έχει η σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης για τη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης. Η συμμετοχή τους όμως στην εκδήλωση του φαινομένου εγείρουν ερωτήματα που σχετίζονται με τον τρόπο

ενεργοποίησής τους. Ποιο είναι δηλαδή το ερέθισμα που οδηγεί στη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης; Μέχρι τώρα οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες έχουν χαρακτηριστεί ως μηχανοαισθητήριοι και συγκεκριμένα ως υπεύθυνοι για την αντίληψη των μηχανικών ερεθισμάτων από την τροφή. Στα παραδείγματα της συμπεριφοράς που μελετήθηκαν η τροφή αποτελούσε πάντοτε το unconditioning stimulus (US). Εκείνο που όμως περιπλέκει τα πράγματα είναι ότι το conditioning σε χημικά ερεθίσματα γίνεται απουσία τροφής, ενώ αυτό της θερμότητας παρουσία τροφής. Και στα δύο η ντοπαμίνη είναι απαραίτητη όπως και το ASIC-1. Σύμφωνα με την ανάλυση της σηματοδότησης ντοπαμίνης στο φαινόμενο του basal slowing, η παραγωγή της ταυτίζεται με την παρουσία τροφής και απαιτείται για την εκδήλωση του φαινομένου. Αν το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση του conditioning τότε είναι φυσιολογικό τα άτομα να μην εκδηλώνουν θερμότητα, αφού ελλείψει ASIC-1 (και συνεπώς χαμηλής σηματοδότησης μέσω ντοπαμίνης) θα είναι σαν να βρίσκονται σε περιβάλλον χωρίς τροφή. Το conditioning όμως σε χημικά ερεθίσματα πραγματοποιείται σε συνθήκες έλλειψης τροφής. Σε αυτή την περίπτωση και σύμφωνα πάντα με το μοντέλο του basal slowing, τα άτομα του αγρίου τύπου δε θα παράγαν ντοπαμίνη λόγω απουσίας τροφής και συνεπώς δε θα διέφεραν από εκείνα στα οποία η σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης έχει διακοπεί. Κάτι τέτοιο όμως δεν ισχύει αφού όπως διαπιστώθηκε από σειρά πειραμάτων η σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης ήταν και εδώ απαραίτητη. Έτσι, γίνεται σαφές ότι η ντοπαμίνη είναι γενικά απαραίτητη για την εκδήλωση εξαρτημένης μάθησης. Ο τρόπος που επάγεται η έκλυσή της φαίνεται ότι δεν είναι απολύτως συνυφασμένος με την παρουσία ή την απουσία τροφής μόνο. Οι μέχρι τώρα φαινοτυπικές παρατηρήσεις υποδεικνύουν μεγαλύτερη ίσως πολυπλοκότητα από την απλή ενεργοποίηση των νευρώνων αυτών με την παρουσία και μόνο της τροφής. Η ντοπαμίνη έχει συνδεθεί σε διαφορετικούς οργανισμούς με φαινόμενο του reward το οποίο εκδηλώνεται σε διαφορετικά περιβάλλοντα όπως είναι το ελκτικό της παρουσίας τροφής (Hyman et al., 2006) αλλά και με επώδυνα ερεθίσματα (punishment) (Riemensperger et al., 2005). Θα ήταν σίγουρα θετικό να γίνει κατανοητό πως οι διαφορετικές αυτές συνθήκες επάγουν τη σηματοδότηση ντοπαμίνης στον *C. elegans*, ενός οργανισμού που ενσωματώνει και τις δύο αυτές μορφές εξαρτημένης μάθησης (Rankin, 2004). Μια πιθανότητα σε σχέση με τη λειτουργία του καναλιού ASIC-1 και τον ρόλο ακολούθως της ντοπαμίνης στον οργανισμό είναι να εξυπηρετείται το φαινόμενο του reward. Το φαινόμενο δηλαδή όπου το αποτέλεσμα της μάθησης οδηγεί στην επανεκτίμηση από τον οργανισμό των αρχικών ερεθισμάτων και την αλλαγή τελικά της συμπεριφοράς ανάλογα με την επανεκτίμηση αυτή. Η ντοπαμίνη είναι γνωστή νευρο-ορμόνη για τον έλεγχο του φαινομένου του reward. Θα μπορούσε όμως το κανάλι ASIC-1 να εξυπηρετεί τον σκοπό αυτό; Για να ελεγχθεί κάτι τέτοιο είναι σαφές ότι θα έπρεπε με ακριβή τρόπο να γίνει

αποσυσχετισμός μεταξύ reward και learning. Εντούτοις, αυτό δεν είναι δυνατό σε φαινοτυπικό επίπεδο για τον νηματώδη. Όμως, το φαινόμενο του basal slowing είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα reward στον καινοραβδίτη και εκεί φάνηκε ότι το κανάλι ASIC-1 δε διαδραματίζει κανένα ρόλο. Επομένως, μπορεί να διατυπωθεί με σχετική ασφάλεια ότι ο ρόλος του ASIC-1 περιορίζεται στην εκδήλωση εξαρτημένης μάθησης.

Σε μια προσπάθεια κατανόησης του τρόπου που ο οργανισμός αντιλαμβάνεται την έλλειψη τροφής κατά το conditioning σε χημικές ενώσεις, η συγκεκριμένη δοκιμασία έγινε παρουσία μικροσφαιριδίων σεφαρόζης. Σε αυτό το παράδειγμα είναι σαφές ότι ενώ ο οργανισμός δεν τρέφεται, δέχεται μηχανικά ερεθίσματα τα οποία προσομοιάζουν εκείνα της τροφής, όπως έχει διαπιστωθεί και κατά την εκδήλωση basal slowing (Sawin et al., 2000). Έτσι, εδώ ελέγχεται το εξής ερώτημα: για την εκδήλωση μάθησης ο οργανισμός αντιλαμβάνεται την έλλειψη τροφής ως απουσία μηχανικών ερεθισμάτων ή ως απουσία χημικών ερεθισμάτων ή και τα δύο μαζί; Αν ο οργανισμός αντιλαμβάνεται την ύπαρξη τροφής μόνο ως μηχανικό ερέθισμα από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, τότε παρουσία μικροσφαιριδίων σεφαρόζης θα εμφανίζει πλήρη αδυναμία ελάττωσης της χημειότητας. Αν κατά το conditioning ο οργανισμός αντιλαμβάνεται την τροφή μόνο ως χημικό ερέθισμα, τότε παρουσία μικροσφαιριδίων σεφαρόζης θα συμπεριφέρεται όπως και κατά την απουσία τους. Αν όμως ο οργανισμός αντιλαμβάνεται την τροφή ως ένα άθροισμα μηχανικών και χημικών ερεθισμάτων, τότε αναμένεται να παρουσιάζει μια ενδιάμεση φαινοτυπική ανωμαλία σε σχέση με τις παραπάνω περιπτώσεις. Κι αυτό αφού η απουσία χημικών ερεθισμάτων δε θα συμπληρώνεται από την απουσία μηχανικών ερεθισμάτων. Στο πείραμα αυτό ελέγχθηκαν άτομα του αγρίου τύπου και άτομα του στελέχους *asic-1(ok415)*. Παρατηρήθηκε ότι τα άτομα του στελέχους *asic-1(ok415)* διατηρούν τη γνωστή αδυναμία εκδήλωσης εξαρτημένης μάθησης όπως έχει παρατηρηθεί από προηγούμενες παρατηρήσεις. Τα άτομα από την άλλη του αγρίου τύπου εκδήλωσαν επίσης αδυναμία για conditioning. Συγκρινόμενα δηλαδή με τη συνθήκη όπου το conditioning γίνεται απουσία τροφής, παρατηρείται ότι η παρουσία μικροσφαιριδίων σεφαρόζης δεν επιτρέπει μείωση της χημειότητας κατά ανάλογο τρόπο. Έτσι, γίνεται αντιληπτό ότι η αίσθηση της τροφής περιλαμβάνει δυο βασικά μονοπάτια. Το ένα αφορά τα μηχανικά ερεθίσματα που επάγουν τη σηματοδότηση μέσω ντοπαμίνης και το άλλο τα χημικά ερεθίσματα που επάγουν τη σηματοδότηση μέσω σεροτονίνης. Μάλιστα είναι γνωστό ότι η σεροτονίνη κωδικοποιεί για την ύπαρξη τροφής καθώς προσθήκη εξωγενούς σεροτονίνης διακόπτει την εκδήλωση conditioning (Colbert and Bargmann, 1997; Nuttley et al., 2002).



**Εικόνα 1: Ο *C. elegans* αντιλαμβάνεται την τροφής ως μηχανικό και χημικό ερέθισμα.** Φαινοτυπικός έλεγχος ατόμων του αγρίου τύπου και του στελέχους *asic-1(ok415)* για την εκδήλωση associative learning παρουσία μικροσφαιριδίων σεφαρόζης. Η ικανότητα εκδήλωσης conditioning σε συνθήκες απουσίας τροφής επηρεάζεται από τη μεταλλαγή του γονιδίου *asic-1*. Στις συνθήκες αυτές, η χημειόταξη για την ισοαμυλική αλκοόλη ελαττώνεται δραματικά για τα άτομα του αγρίου τύπου (άσπρη στήλη – OFF BEADS) αλλά όχι για τα άτομα του στελέχους *asic-1(ok415)* (μαύρη στήλη – OFF BEADS). Το conditioning στην ισοαμυλική αλκοόλη διακόπτεται από την παρουσία μικροσφαιριδίων σεφαρόζης. Τα άτομα του αγρίου τύπου εκδηλώνουν μειωμένη ικανότητα για ελάττωση της χημειόταξης (άσπρη στήλη – ON BEADS) σε σχέση με τη συνθήκη όπου δεν υπήρχαν μηχανικά ερεθίσματα από τη σεφαρόζη. Τα άτομα του στελέχους *asic-1(ok415)* διατηρούν τη μειωμένη ικανότητα για μάθηση (μαύρη στήλη – ON BEADS) όπως και στην προηγούμενη συνθήκη. (Κάθε στήλη αναπαριστά το μέσο όρο των τιμών από τουλάχιστον 3 διαφορετικές δοκιμασίες. Σε κάθε συνθήκη ελέγχθηκαν συνολικά 500 άτομα από κάθε στέλεχος. \*\*  $P < 0.01$ , unpaired t-test).

## 5. Το νευρωνικό δίκτυο – μελλοντικές προσεγγίσεις

### 5.1. Οι προσυναπτικοί νευρώνες

Ένα από τα καίρια ερωτήματα στο πεδίο της μνήμης και της μάθησης είναι σαφώς η αναγνώριση του εκάστοτε νευρωνικού κυκλώματος που οδηγεί στην ολοκλήρωση του φαινομένου. Ποιοί είναι δηλαδή οι νευρώνες που ευθύνονται για την αντίληψη, το συσχετισμό και την αποθήκευση διαφορετικών ερεθισμάτων; Το ερώτημα αυτό είναι εξαιρετικά δύσκολο

να απαντηθεί καθώς ο ρόλος του κάθε νευρώνα στο κύκλωμα είναι διαφορετικός, ενώ ο βαθμός δυσκολίας αυξάνει εκθετικά με την αύξηση της πολυπλοκότητας του νευρικού συστήματος. Έτσι, ο νηματώδης φαντάζει ιδανικό μοντέλο, σε σύγκριση με αυτά των θηλαστικών, λόγω του εξαιρετικά μικρού νευρικού συστήματος που διαθέτει. Παρά ταύτα, η πλήρης αναγνώριση του υπεύθυνου νευρικού κυκλώματος στο νηματώδη δεν είναι απλή. Η συμμετοχή των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης κάνει σαφές ότι αποτελούν ένα τμήμα του νευρωνικού κυκλώματος και δίνει έναυσμα για νέα ερωτήματα που σχετίζονται με τη λειτουργία τους.

Σε ένα πρώτο επίπεδο τίθεται το ερώτημα για το πώς οι νευρώνες αυτοί επηρεάζουν το φαινόμενο. Αποτελούν δηλαδή μέρος του κυκλώματος από το οποίο διέρχεται η πληροφορία ή η ενεργοποίησή τους ρυθμίζει κάποιο βασικό κύκλωμα. Με άλλα λόγια, αν οι νευρώνες αυτοί ήταν π.χ. αισθητήριοι, τότε κατά την απαλοιφή τους δε θα εκδηλωνόταν συσχετιζόμενη μάθηση καθώς το ερέθισμα δε θα γινόταν αντιληπτό από τον οργανισμό. Αν αντίστοιχα ήταν νευρώνες στους οποίους συγκλίνουν και ενσωματώνονται οι διαφορετικές πληροφορίες τότε και πάλι δε θα παρατηρούσαν μάθηση από τον θάνατό τους. Εντούτοις, παρατηρήθηκαν δυο πράγματα. Αρχικά, κανένας από τους γνωστούς χημειο- και θερμο-αισθητήριοις νευρώνες δε συνάπτεται απευθείας στους ντοπαμινεργικούς, που σημαίνει ότι αν αυτοί δέχονται κάποιο σήμα, τότε το δέχονται έμμεσα και με τη συμμετοχή άλλων νευρώνων. Δεύτερο και ίσως σημαντικότερο είναι ότι κατά την απαλοιφή τους ή τη διακοπή της σηματοδότησης μέσω ντοπαμίνης, ενώ η ικανότητα για μάθηση δε χάνεται εντελώς αλλά διαταράσσεται. Έτσι βλέπουμε ότι στις περιπτώσεις αυτές, ενώ η χημειόταξη δε μειώνεται όπως στα άτομα του αγρίου τύπου, εντούτοις ελαττώνεται σε σχέση με τα παύσα άτομα. Αυτό υποδεικνύει ότι οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες έχουν ρυθμιστικό ρόλο και συγκεκριμένα ενισχύουν την απόκριση ενός βασικού για τη μάθηση νευρωνικού κυκλώματος.

Ένα άλλο ερώτημα που επίσης αφορά το νευρωνικό δίκτυο, σχετίζεται με τον αριθμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων που συμμετέχουν. Συγκεκριμένα, είναι σημαντικό να διαπιστωθεί αν όλοι ή κάποιοι από αυτούς συμβάλλουν στην εκδήλωση μάθησης. Αυτό θα μπορούσε να απαντηθεί με δυο τρόπους. Αρχικά, με τη διαδοχική απαλοιφή των ντοπαμινεργικών νευρώνων με τη χρήση laser. Σε μια τέτοια προσέγγιση θα μπορούσε να γίνει απαλοιφή συγκεκριμένων νευρώνων κάθε φορά και εν συνεχεία φαινοτυπικός έλεγχος των ατόμων. Αυτή όμως η προσέγγιση δεν μπορεί να είναι αξιοποιήσιμη καθώς ο αριθμός των ατόμων που υπόκεινται απαλοιφή στους νευρώνες με τη χρήση laser είναι εξαιρετικά περιορισμένος, ενώ οι φαινοτυπικοί έλεγχοι για τη μάθηση γίνονται σε πληθυσμιακό επίπεδο (απαιτείται μεγάλος αριθμός ατόμων). Αυτό το αριθμητικό πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί

αν αντί της χρήσης laser η απαλοιφή των νευρώνων γίνει με γενετικό τρόπο (*mec-4(d)*) όπως περιγράφεται στην παραπάνω εργασία. Όμως εδώ υπεισέρχεται ένας άλλος περιοριστικός παράγοντας που καλείται υποκινητής. Για να είναι δηλαδή δυνατή η διάκριση της συμμετοχής συγκεκριμένων ντοπαμινεργικών νευρώνων απαιτείται η ύπαρξη υποκινητή/ων που να ενεργοποιείται σε κάποιο/ους μόνο από αυτούς. Μέχρι σήμερα όμως δεν έχουν αναγνωρισθεί τέτοιοι υποκινητές και έτσι η έκφραση του τοξικού αλληλόμορφου που θα προκαλέσει τη νέκρωση των νευρώνων δεν μπορεί να περιοριστεί σε ορισμένους από τους ντοπαμινεργικούς. Εντούτοις, αν για την εκδήλωση μάθησης ενεργοποιούνται κάποιοι μόνο από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, αυτοί θα μπορούσαν να ανιχνευθούν με την καταγραφή της ενεργοποίησής τους. Γι' αυτό απαιτείται η έκφραση του ασβεστιο-εξαρτώμενου μορίου *cameleon* ή *G-CaMP* (Kerr et al., 2000). Η έκφραση αυτή θα μπορούσε να καθοδηγηθεί από τον υποκινητή του γονιδίου *asic-1*, οπότε όλοι οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες θα εξέφραζαν το μόριο. Έτσι, θα μπορούσε να καταστεί εφικτή η αναγνώριση κάποιου/ων ή και όλων των νευρώνων οι οποίοι ενεργοποιούνται. Εντούτοις, σε μια τέτοια προσέγγιση θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και κάποιοι περιοριστικοί παράγοντες. Αρχικά, η εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικό χρόνο απαιτεί συγκεκριμένη διάταξη μικροσκοπίου περιορίζοντας τη δυνατότητα εφαρμογής της. Δεύτερον, δεν είναι σίγουρο ότι θα καταστεί δυνατή η καταγραφή της ενεργοποίησης των νευρώνων αυτών. Όπως γίνεται αντιληπτό στα διαγονιδιακά άτομα θα πρέπει να προηγηθεί *conditioning* αφού έτσι επάγεται η εξαρτημένη μάθηση. Η ενεργοποίηση όμως των ντοπαμινεργικών νευρώνων από το *conditioning* είναι σαφές ότι ακολουθεί μια κινητική. Στην περίπτωση που η κινητική αυτή είναι σχετικά μικρή τότε η δυνατότητα καταγραφής της περιορίζεται. Έτσι, η προϋπόθεση να γίνουν τα παραπάνω είναι είτε η κινητική να είναι μεγάλη, είτε η καταγραφή να γίνει ταυτόχρονα με το *conditioning*, συνθήκη όμως που είναι τεχνικά δύσκολη.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η έκφραση του τοξικού αλληλόμορφου *mec-4(d)* έγινε υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *asic-1*. Αυτή η προσέγγιση θα μπορούσε να διαφοροποιηθεί εξυπηρετώντας έναν άλλο σκοπό. Όπως έγινε σαφές από το μοτίβο έκφρασης του γονιδίου *asic-1*, εκτός των ντοπαμινεργικών νευρώνων υπάρχουν και άλλοι 4 οι οποίοι εκφράζουν το γονίδιο. Από τα φαινοτυπικά πειράματα που ακολούθησαν έγινε σαφές ότι η ντοπαμίνη είναι απαραίτητη για την εκδήλωση μάθησης, αλλά και ότι το κανάλι ASIC-1 επηρεάζει τη σηματοδότηση ντοπαμίνης. Αν και οι διαφορετικές αυτές παρατηρήσεις συγκλίνουν στο ότι το κανάλι ASIC-1 ασκεί τη δράση του κατά τη μάθηση μέσα από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, δεν αποκλείεται άμεσα (αυτό γίνεται έμμεσα) η πιθανή δράση του στους 4 επιπλέον νευρώνες όπου εκφράζεται. Για τον σκοπό αυτό θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν δυο υποκινητές οι οποίοι εκφράζονται αποκλειστικά τους

ντοπαμινεργικούς νευρώνες και είναι αυτοί των γονιδίων *cat-2* και *dat-1*. Με τη χρήση αυτών των υποκινητών, θα μπορούσε αρχικά να γίνει προσπάθεια διάσωσης του φαινοτύπου στο στέλεχος *ok415*. Ακολουθώντας την αντίθετη προσέγγιση, θα μπορούσε να επιχειρηθεί η καταστολή της έκφρασης του *asic-1* με την έκφραση δίκλωνου RNA (hairpin) ειδικά στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Σε ένα επόμενο επίπεδο, θα μπορούσε να οδηγηθεί η έκφραση του τοξικού αλληλομόρφου *mec-4(d)* οπότε θα προέκυπτε η απαλοιφή μόνο των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Αν παρατηρούνταν αντιστοίχως διάσωση του φαινοτύπου ή/και φαινοτυπικές ανωμαλίες στη μάθηση, τότε θα επιβεβαιωνόταν πλήρως ότι η δράση του ASIC-1 περιορίζεται μόνο στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Στα πειράματα που περιγράφονται παραπάνω και οι δυο προσεγγίσεις (διάσωση-απαλοιφή) έγιναν με τη χρήση του υποκινητή του γονιδίου *asic-1*. Αυτό έγινε κυρίως εξαιτίας τεχνικών δυσκολιών, καθώς η κλωνοποίηση των διαφορετικών υποκινητών και μαζί του μεγάλου σε μήκος πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου *asic-1* αποδείχθηκαν απαιτητικές. Εντούτοις, πρόσφατα έγινε εφικτή η κατασκευή πλασμιδιακού φορέα όπου το γονίδιο *asic-1* εκφράζεται υπό τον έλεγχο του γονιδίου *dat-1* αλλά και σε σύνδεση με το μόριο της GFP. Οι αρχικές παρατηρήσεις δείχνουν ότι το μόριο που σχηματίζεται εντοπίζεται στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Περαιτέρω πειράματα και φαινοτυπικές αναλύσεις θα καταδείξουν αν ο ρόλος του ASIC-1 στη μάθηση επιτελείται αποκλειστικά και μόνο από τους νευρώνες αυτούς.

## 5.2. Οι μετασυναπτικοί στόχοι

Στη συνέχεια, θα ήταν σημαντικό να γίνει γνωστό ποιοι είναι οι μετασυναπτικοί στόχοι του ASIC-1. Αυτό έγινε προσπάθεια να απαντηθεί από τον έλεγχο μιας σειράς μεταλλαγμένων στελεχών για τους ως τώρα χαρακτηρισμένους υποδοχείς ντοπαμίνης. Καθώς βρέθηκε ότι οι υποδοχείς DOP-1 και DOP-2 αλλά όχι DOP-3 μεσολαβούν στο φαινόμενο της μάθησης προκύπτει ένα «παράθυρο» με νευρώνες οι οποίοι εκφράζουν τους υποδοχείς αυτούς και καθίστανται έτσι υποψήφιοι ως μετασυναπτικοί στόχοι των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Από τη μελέτη των υπάρχοντων αναφορών γίνονται σαφή δυο πράγματα, τα οποία και κάνουν δύσκολη την προσπάθεια αναγνώρισης των νευρώνων αυτών. Οι παραπάνω υποδοχείς εκφράζονται σε ένα ευρύ φάσμα νευρώνων, η ταυτότητα των οποίων δεν έχει γίνει γνωστή για όλους. Από τους νευρώνες αυτούς άλλοι εκφράζουν και τους δυο υποδοχείς μαζί και άλλοι κάθε έναν μεμονωμένα. Σε αυτή τη φάση λοιπόν δεν μπορούν εύκολα να αναγνωριστούν οι μετασυναπτικοί στόχοι. Σε αυτό θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι υποψήφιοι δεν είναι μόνο οι νευρώνες εκείνοι που εκφράζουν και τους δυο υποδοχείς (DOP-1 και DOP-2). Είναι εξίσου πιθανό η έκλυση της ντοπαμίνης να προκαλεί

την ενεργοποίηση νευρώνων που εκφράζουν μόνο τον ένα από τους δυο υποδοχείς ή και τους δυο μαζί. Εκείνο που θα μπορούσε να γίνει προς αυτή την κατεύθυνση είναι αρχικά μια προσπάθεια αναγνώρισης όλων των νευρώνων που εκφράζουν τους υποδοχείς DOP-1 και DOP-2 και οι οποίοι είναι μετασυναπτικοί των ντοπαμινεργικών. Σημειώνεται ότι τέτοιοι υποδοχείς εντοπίζονται και σε μη μετασυναπτικούς νευρώνες, τους οποίους η ντοπαμίνη ενεργοποιεί ως νευρο-ορμόνη αλλά δεν αποτελούν θέμα προς διερεύνηση. Στη συνέχεια θα ήταν σκόπιμο να γίνει προσπάθεια αναγνώρισης κυτταρο-ειδικών υποκινητών ή τουλάχιστο κάποιων που να εκφράζονται σε όσο το δυνατό μικρότερο αριθμό από τους μετασυναπτικούς νευρώνες. Στην περίπτωση που υπάρξουν τέτοιοι υποκινητές, τότε οι τρόποι για να μελετήσει κανείς την πιθανή συμμετοχή των νευρώνων αυτών στη μάθηση είναι πολλαπλοί. Αρχικά, δίνεται η δυνατότητα απενεργοποίησης-απαλοιφής τους με γενετικό τρόπο (έκφραση *mec-4(d)*) και εν συνεχεία φαινοτυπικού ελέγχου για εξαρτημένη μάθηση. Επίσης, μπορεί να γίνει στοχευμένη απενεργοποίηση του εκάστοτε υποδοχέα ντοπαμίνης σε συγκεκριμένα κύτταρα μέσω του φαινομένου του RNAi (Tavernarakis et al., 2000). Έτσι, η επαγωγή του σχηματισμού δίκλωνου RNA (hairpin) για τον εκάστοτε υποδοχέα γίνεται σε συγκεκριμένα κύτταρα και έτσι διαπιστώνεται ο ρόλος που έχουν στη διαδικασία της μάθησης. Στην περίπτωση βέβαια που ο χρησιμοποιούμενος υποδοχέας εκφράζεται σε σχετικά μεγάλο αριθμό νευρώνων-μετασυναπτικών στόχων, ο αριθμός τους θα μπορούσε να περιοριστεί σε μια εναλλακτική προσέγγιση. Συγκεκριμένα, όμοια με παραπάνω θα μπορούσε να καταγραφεί η ενεργοποίηση κάποιου/ων ή και όλων των μετασυναπτικών νευρώνων-στόχων οι οποίοι ενεργοποιούνται κατά την εκδήλωση εξαρτημένης μάθησης. Βέβαια, χρειάζεται να σημειωθεί ότι και σε αυτή την περίπτωση ισχύουν οι ίδιοι περιορισμοί με αυτούς που συναντώνται κατά την καταγραφή της ενεργοποίησης των προσυναπτικών νευρώνων.

## **6. Μελέτη των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του καναλιού ASIC-1 και χαρακτηρισμός της μεταλλαγής του στελέχους *asic-1(ok415)***

Σε ότι αφορά τη λειτουργία του ASIC-1 ως αισθητήρα πρωτονίων χρειάζεται να σημειωθεί ότι βασίστηκε κατά κύριο λόγο σε *in silico* ανάλυση. Από την προσέγγιση αυτή αναγνωρίστηκε η υψηλή ομολογία της πρωτεΐνης με αντίστοιχες των θηλαστικών αλλά και ο μεγάλος βαθμός συντήρησης σε περιοχές κρίσιμες για τη λειτουργία των ASICs. Για την ταυτοποίηση της λειτουργίας του ASIC-1 θα μπορούσε εντούτοις να ακολουθηθεί μια στρατηγική καταγραφής των ηλεκτρικών δυναμικών που παράγει το μόριο σε συνθήκες χαμηλού pH. Μια τέτοια προσπάθεια ηλεκτροφυσιολογικής ανάλυσης βέβαια δεν είναι



δυνατό να εφαρμοστεί *in vivo* στο νηματώδη. Για το λόγο αυτό θα απαιτούνταν η εκτοπική έκφραση τόσο του φυσιολογικού καναλιού, όσο και του μεταλλαγμένου μορίου από το στέλεχος *asic-1(ok415)*, σε ένα άλλο σύστημα (π.χ. *Xenopus* oocytes, COS cells), προσβάσιμο από τις μεθόδους ηλεκτροφυσιολογίας. Στην περίπτωση που ανιχνευόταν η δημιουργία ηλεκτρικού δυναμικού επαγόμενη από την ελάττωση του pH θα επιβεβαιωνόταν η δράση του ASIC-1 ως αισθητήρα πρωτονίων. Επίσης, το γεγονός ότι στο στέλεχος *asic-1(ok415)* παράγεται πρωτεϊνικό προϊόν δίνει τη δυνατότητα να γίνει χαρακτηρισμός της μεταλλαγής στο επίπεδο της λειτουργίας του καναλιού. Κάτι τέτοιο είναι πιθανώς εφικτό και από τη χρήση της ένωσης amiloride, η οποία προκαλεί τη διακοπή της λειτουργίας των degenerins, οπότε θα μπορούσε να γίνει σύγκριση μεταξύ του μεταλλαγμένου μορίου και του μορίου του αγρίου τύπου υπό την επίδραση της ουσίας. Βέβαια, σε μια τέτοια προσέγγιση, εκτός από τις τεχνικές δυσκολίες που επιφέρει η κλωνοποίηση του μεγάλου σε μέγεθος cDNA του ASIC-1, ενέχονται και άλλοι περιορισμοί. Έτσι, στην περίπτωση που δεν είναι εφικτή η καταγραφή ηλεκτρικού δυναμικού, δεν μπορεί να αποκλειστεί η δράση του ASIC-1 ως αισθητήρα πρωτονίων. Αυτό γίνεται αντιληπτό αν αναλογιστεί κανείς ότι η εκτοπική έκφραση του μορίου σε ετερόλογο σύστημα αποκλείει όλα εκείνα τα επικουρικά στη λειτουργία του ASIC-1 μόρια. Ακόμα όμως και αν η έκφραση επιπλέον μορίων δεν είναι αναγκαία, χρειάζεται να ληφθεί υπόψη ότι με βάση τις μελέτες των ASICs στα θηλαστικά είναι πολύ πιθανό το ASIC-1 να αποτελεί τη μια από τις υπομονάδες ενός ετερομερούς καναλιού. Σε αυτή την περίπτωση είναι εξαιρετικά πιθανό να μη καταγράφεται ηλεκτρικό δυναμικό όχι διότι το ASIC-1 δεν έχει δράση αισθητήρα πρωτονίων αλλά γιατί δε σχηματίζεται λειτουργικό κανάλι. Εδώ είναι χρήσιμο να αναφερθεί ότι σε μια συμπληρωματική προσπάθεια αναγνωρίστηκε το μοτίβο έκφρασης δυο επιπλέον DEG/ENaCs του νηματώδη οι οποίες φέρουν υψηλή ομολογία με τις ASICs των θηλαστικών. Τα κανάλια αυτά (ASIC-2 και T28B8.5) δεν εντοπίστηκαν στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες και έτσι αποκλείεται η πιθανότητα να σχηματίζουν κάποιο λειτουργικό κανάλι με το ASIC-1.

#### Περιεχόμενα

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

## ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

### ΥΛΙΚΑ

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, Becton Dickinson, Pharmacia-Biorad, Biomol και Roche.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις εταιρείες New England Biolabs και Minotech.

Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR και αλληλούχησης παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μικροχημείας του IMBB.

Τα ειδικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται 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 που χρησιμοποιήθηκαν για την φυλογενετική ανάλυση προήλθαν από την Wormbase (<http://www.wormbase.org/>; WS159).

Οι αναλύσεις Blast (Altschul et al., 1997) έγιναν από το National Center for Biotechnology Information web servers (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Οι αναλύσεις multiple sequence alignment έγιναν με τον αλγόριθμο M-Coffee (Notredame et al., 2000) <http://tcoffee.vital-it.ch> και απεικονίστηκαν με το πρόγραμμα BoxShade 3.21 (EMBLNet; [http://www.ch.emblnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.emblnet.org/software/BOX_form.html)).

Η ανάλυση για την αναγνώριση συντηρημένων μοτίβων στις πρωτεϊνικές αλληλουχίες έγινε από το Expert Protein Analysis System (ExpASY) proteomics web based server (Swiss Institute of Bioinformatics – SIB; <http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>).

Η ανάλυση της τοπολογίας της πρωτεΐνης ASIC-1 έγινε με τον αλγόριθμο Phobius(Kall et al., 2004); (<http://phobius.cgb.ki.se/>).

Η στατιστική ανάλυση όλων των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν έγινε με τα υπολογιστικά προγράμματα Microsoft Office 2003 Excel software package (Microsoft Corporation, Redmond, USA) και Prism software package (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

## ΜΕΘΟΔΟΙ

### A) Μοριακή Βιολογία

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

Η απομόνωση γενωμικού DNA από το νηματώδη έγινε όπως περιγράφεται από τους (Williams et al., 1992) με κάποιες τροποποιήσεις. Στο πρώτο στάδιο της μεθόδου γίνεται λύση των κυττάρων του οργανισμού μετά από διαδοχική ψύξη (-80°C) και θέρμανση (65°C), ενώ σε ένα επόμενο στάδιο γίνεται κατακερματισμός των πρωτεϊνών που απελευθερώνονται από τα λυμένα κύτταρα με την προσθήκη της πρωτεάσης Proteinase K. Η καθαρότητα του παραγόμενου DNA δεν είναι υψηλή, αλλά παραμένει αποδεκτή για τη χρήση του ως μήτρα σε αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η συγκέντρωση του DNA που απομονώνεται είναι της τάξης των 10-20 ng/μL.

#### Υλικά

##### Lysis buffer

- 50 mM KCl (50 μl from 1M stock)
- 10 mM Tris pH8.5 (10 μl from 1M stock)
- 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (2.5 μl from 1M stock)
- 0.45 % Triton-X (45 μl from 10 % stock)
- 0.45 % Tween-20 (4.5 μl from 100 % stock)
- H<sub>2</sub>O (888 μl) → 1 ml total

!Το διάλυμα αυτό μπορεί να αποθηκευτεί είτε σε RT είτε στους -20°C.

200 μg/ml PrK (10 μl from 20 mg/ml)

! Το διάλυμα της PrK πρέπει πάντοτε να διατηρείται στους -20°C και να προστίθεται φρέσκο στο διάλυμα του lysis buffer.

## Μέθοδος

- Συλλογή όλων των ατόμων από ένα πιάτο με ζώα σταδίου YA και gravid adult με 1,5 ml H<sub>2</sub>O.
- Πλύσιμο με διαδοχικές αναδεύσεις σε vortex και απομάκρυνση του υπερκείμενου ώστε να απομακρυνθούν τα βακτήρια.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος ώστε να μείνει μόνο το ίζημα με τα άτομα η οποία θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν λευκή ως ένδειξη καθαρότητας.
- Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος lysis buffer.
- Τοποθέτηση για 20 min στους -80°C και αμέσως μετά στους 65°C για δυο επαναλήψεις (το ίζημα με τα ζώα μπορεί να αποθηκευτεί στους -80°C).
- Προσθήκη PrK σε τελική συγκέντρωση 200 µg/ml.
- 3h στους 65°C με ενδιάμεσες αναδεύσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα.
- 20 min στους 95°C (βρασμός) για απενεργοποίηση της PrK.
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 20 min και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάκι eppendorf.

## 2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (καλλιέργεια 1,5 ml) έγινε με τη μέθοδο του boiling prep αλλά και της αλκαλική λύσης των κυττάρων (Sambrook et al., 2001). Αλκαλική λύση εφαρμόστηκε για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγαλύτερη κλίμακα (καλλιέργεια 50 ml). Το DNA που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση διαγνωστικών πέσεων, ως μήτρα σε αντίδραση PCR ή για το μετασχηματισμό ατόμων *C. elegans*. Στην τελευταία περίπτωση είναι αναγκαίος ο περαιτέρω καθαρισμός με τη χρήση στήλης ιοντοανταλλαγής (QIAGEN-tip 20).

## 3. Απομόνωση ολικού mRNA

Με τη διαδικασία αυτή είναι δυνατή η απομόνωση ολικού mRNA από άτομα του νηματώδους και η χρήση του ως μήτρα σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR). Βασική αρχή της διαδικασίας είναι η λύση των κυττάρων του οργανισμού και η απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων, του DNA, των πρωτεϊνών και των υπόλοιπων βιομορίων

ώστε να παραμείνει καθαρό το ολικό mRNA που έχει παραχθεί. Στην περίπτωση του νηματώδους σημειώνεται ότι το mRNA στόχος μπορεί να παράγεται σε μικρό αριθμό κυττάρων και έτσι να αποτελεί ένα μικρό μόνο μέρος του συνολικού mRNA που τελικά απομονώνεται καθιστώντας έτσι την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης δύσκολη. Στην πράξη όμως η ποσότητα mRNA που απομονώνεται είναι ικανή να δώσει προϊόν κατά την αντίδραση RT-PCR ακόμα και αν αυτό προέρχεται από ελάχιστα κύτταρα του οργανισμού.

### **Υλικά**

- Trizol (Gibco BRL)
- Chloroform
- 75 % EtOH in ddH<sub>2</sub>O

### **Μέθοδος**

- Συλλογή όλων των ατόμων από ένα πιάτο με ζώα σταδίου YA και gravid adult με 1,5 ml H<sub>2</sub>O.
- Πλύσιμο με διαδοχικές αναδεύσεις σε vortex και απομάκρυνση του υπερκείμενου ώστε να απομακρυνθούν τα βακτήρια.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος ώστε να μείνει μόνο το ίζημα με τα άτομα το οποίο θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν λευκό ως ένδειξη καθαρότητας και υπολογισμός του όγκου του (x).
- Προσθήκη τετραπλάσιου όγκου (4x) Gibco BRL Trizol (χαοτροπικό διάλυμα) σε σχέση με τον όγκο του ιζήματος, οπότε λαμβάνει χώρα η αποδιάταξη των ιστών του οργανισμού.
- Έντονη ανάδευση με vortex μέχρι την ολοκληρωτική λύση των ατόμων (διαρκεί περισσότερο από 4 min).
- 2 κύκλοι παγώματος (-80°C) και θέρμανση (65°C) για τη λύση των κυττάρων του οργανισμού (σε αυτό το σημείο είναι εφικτή η αποθήκευση του δείγματος στους -80°C).

- Μετά το τελευταίο λιώσιμο προσθήκη άλλων δυο όγκων (2x) Trizol σε σχέση με τον αρχικό όγκο του ιζήματος των ζώων.
- Προσθήκη δυο όγκων (2x) χλωροφορμίου (CHCl<sub>3</sub>) σε σχέση με τον αρχικό όγκο του ιζήματος των ζώων.
- Χειροκίνητη ανάδευση για 15 sec και επώαση σε RT για 3 min.
- Φυγοκέντρηση στα 12,000 g για 15 min στους 4°C.
- Μεταφορά της υπερκείμενης υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα, χωρίς την ανάδευση της ενδιάμεσης φάσης.
- Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης, ανάδευση και επώαση σε RT για 10 min για την κατακρήμιση του RNA.
- Πλύσιμο του ιζήματος του RNA με 0,5 ml 75 % EtOH και φυγοκέντρηση στα 7500 g για 5 min στους 4°C.
- Στέγνωμα του ιζήματος και επαναδιάλυση σε διπλά αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O (περίπου μισό όγκο σε σχέση με τον αρχικό όγκο του ιζήματος των ζώων).
- Υπολογισμός της συγκέντρωσης με τη μέθοδο της φωτομέτρησης σε συσκευή φασματοφωτόμετρου (Nanodrop ND-100). Η επιθυμητή συγκέντρωση κυμαίνεται μεταξύ 50 pg/μl και 100 ng/μl.

#### 4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αντίδραση PCR είναι πλέον μια αυτοματοποιημένη διαδικασία η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων επιθυμητών αλληλουχιών με σκοπό την ταυτοποίηση ελλείψεων σε μεταλλαγμένα αλληλόμορφα ή την κλωνοποίηση τμημάτων γενωμικού DNA σε πλασμίδια για τη δημιουργία φορέων έκφρασης. Η διαδικασία του PCR περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια. Αρχικά γίνεται θέρμανση του DNA-μήτρα (γενωμικό ή πλασμιδιακό ή κοσμιδιακό) στους 92-95°C για την αποδιάταξη του DNA. Στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται στους 55-65°C για την πρόσδεση των κατάλληλων εκκινητών στη μονόκλωνη πλέον μήτρα και σε ένα επόμενο στάδιο ακολουθεί αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C οπότε δρα η πολυμεράση για τη σύνθεση του τμήματος του DNA μεταξύ των εκκινητών.

## Υλικά

- DNA template (10 ng-100 ng)
- Taq polymerase (5 U/μl) Vmax=1/10 Vτελ
- 10x Taq buffer (1/10 Vτελ)
- Sense Primer (Stock=100 ng/μl) Cτελ=5 ng/μl
- Antisense Primer (Stock=100 ng/μl) Cτελ=5 ng/μl
- dNTPs (Stock=2 mM each) Cτελ=100 μM/μl
- H<sub>2</sub>O

## Μέθοδος

↓ (x) 35φορές

- 92-95°C για 3-5 min
- 92-95°C για 30 sec
- 55-65°C για 30-60 sec
- 68-72°C για χρόνο που εξαρτάται από την ταχύτητα πολυμερισμού της εκάστοτε πολυμεράσης
- 68-72°C για 15 min προκειμένου να γίνει σύνθεση των ημιτελών τμημάτων της αντίδρασης

### 5. Single worm PCR

Μια παραλλαγή της αντίδρασης PCR που βρίσκει εφαρμογή στον *C. elegans* είναι η χρήση του οργανισμού απευθείας στο μείγμα της αντίδρασης. Σε περιπτώσεις όπου το PCR χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση γενετικής ανάλυσης και το γενετικό υλικό από πολλά διαφορετικά άτομα χρειάζεται να αναλυθεί ξεχωριστά, κάθε ένα από τα άτομα αυτά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα στην αντίδραση PCR. Η φυσιολογία του οργανισμού επιτρέπει τη λύση του κατά το πρώτο στάδιο θέρμανσης της αντίδρασης στους 95°C και έτσι δεν απαιτείται να προηγηθεί ευρείας κλίμακας απομόνωση γενωμικού DNA. Εντούτοις, η ποσότητα του DNA από τα 959 κύτταρα του οργανισμού δεν δίνει πάντα ανιχνεύσιμο προϊόν μετά από 30 κύκλους της αντίδρασης PCR. Σε αυτές τις περιπτώσεις ακολουθείται η



διαδικασία του nested PCR όπου εσωτερικοί εκκινητές ενισχύουν περαιτέρω και με μεγαλύτερη ακρίβεια το προϊόν της πρώτης αντίδρασης. Σε μια παραλλαγή της παραπάνω μεθόδου, το κάθε άτομο μπορεί να μην προστεθεί απευθείας στην αντίδραση, αλλά να προηγηθεί λύση του οργανισμού με τρόπο αντίστοιχο της απομόνωσης γενωμικού DNA.

## **6. Αντίστροφη μεταγραφή ακολουθούμενη από PCR (RT-PCR)**

Η συγκεκριμένη αντίδραση έχει στόχο τη σύνθεση cDNA από ώριμο mRNA προκειμένου να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων στόχων. Για το σκοπό αυτό από το ώριμο mRNA ενός γονιδίου στόχου σχηματίζεται cDNA με τη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση στους 50°C. Στη συνέχεια και με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών και του ενζύμου DNA πολυμεράση λαμβάνει χώρα ο πολλαπλασιασμός του cDNA με κανονική αντίδραση PCR (βλέπε A.4). Καθώς είναι δυνατός ο πολλαπλασιασμός γενωμικού DNA (εκτός από cDNA) οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται προσδένονται μόνο σε περιοχές δυο διαδοχικών εξωνίων, αποτρέποντας έτσι την πρόσδεση σε τμήματα γενωμικού DNA. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια από τις εταιρείες Qiagen (QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit) και Invitrogen (SuperScript™ One-Step RT-PCR Systems).

## **7. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli***

Ο σχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* έγινε με επώαση των κυττάρων για 30 min σε διάλυμα που περιείχε 50mM CaCl<sub>2</sub> και 10 % γλυκερόλη. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων αυτών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από (Sambrook et al., 2001).

## **8. Μετασχηματισμός νηματώδους**

Η εισαγωγή εξωγενούς ή ενδογενούς DNA στο νηματώδη *C. elegans* και η δημιουργία διαγονιδιακών ατόμων αποτελεί ένα εξαιρετικής σημασίας εργαλείο για τη μελέτη του οργανισμού (Mello and Fire, 1995; Mello et al., 1991). Με τη μέθοδο αυτή γίνεται εφικτή η χαρτογράφηση γονιδιακών μεταλλαγών με την έκφραση γονιδίων του αγρίου τύπου και τη διάσωση του αντίστοιχου φαινοτύπου, η εκτοπική έκφραση ή υπερέκφραση γονιδίων και η έκφραση χιμαιρικών μορίων όπου ενδογενή γονίδια ή τμήματα γονιδίων εκφράζονται σε σύνδεση με εξωγενή γονίδια-μάρτυρες (GFP, DsRED κτλ) για την παρακολούθηση του

χωροχρονικού μοτίβου έκφρασης. Επίσης, γίνεται δυνατή η στοχευμένη καταστολή της έκφρασης γονιδίων με την έκφραση συνθετικών μορίων δίκλωνου RNA (dsRNA) και η επαγωγή της διαδικασίας του RNAi (Kimble et al., 1982). Η εισαγωγή του επιθυμητού κλώνου DNA οδηγεί κυρίως στο σχηματισμό ενός έξτρα μίνι χρωμοσώματος. Σε ένα μικρότερο ποσοστό (5%) το τμήμα αυτό του DNA που προκύπτει εντίθεται στο γονιδίωμα μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού (Berezikov et al., 2004; Broverman et al., 1993).

## Υλικά

### Agarose pads

- Χρησιμοποιούμε διάλυμα αγαρόζης σε συγκέντρωση 2 % σε H<sub>2</sub>O.
- Απλώνουμε στον πάγκο slides (24 x 50 mm) σε ίσιες αποστάσεις μεταξύ τους (1cm).
- Περνάμε μια μικρή ταινία στο επάνω και στο κάτω μέρος των slides ώστε αφενός να ακινητοποιηθούν, αφετέρου να έχει δημιουργηθεί η κατάλληλη απόσταση με την αντικειμενοφόρο που θα τα καλύψει καθορίζοντας έτσι το πάχος του agarose pad.
- Βάζουμε μια σταγόνα του διαλύματος αγαρόζης με ένα κομμένο μπλέ tip.
- Βάζουμε μια αντικειμενοφόρο πλάκα από πάνω (sandwich). Η αντικειμενοφόρος αυτή πατάει επάνω στην ταινία και από τις δυο πλευρές και έτσι η απόστασή της από το κάτω slide μένει σταθερή. Με τον τρόπο αυτό καθορίζεται το σταθερό πάχος των agarose pads.
- Τραβάμε κάθε μια αντικειμενοφόρο προσεχτικά.
- Αφήνουμε να στεγνώσουν για τουλάχιστο μια μέρα.

### Ρυθμίσεις μικροσκοπίου

- Οι ενέσεις μετασχηματισμού του νηματώδους έγιναν σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο τύπου Zeiss Axiovert 200.
- Κλείνουμε το διάφραγμα (μείωση του οπτικού πεδίου) και εστιάζουμε τον condenser ώστε η εικόνα που έχουμε να είναι κατά το δυνατόν καθαρότερη.
- Η ένταση του φωτός ρυθμίζεται στο μέγιστο επίπεδο.
- Εστιάζουμε με τον κάθε προσοφθάλμιο φακό ξεχωριστά.

### Σχηματισμός βελονών

- Οι βελόνες με τις οποίες πραγματοποιούνται οι ενέσεις σχηματίζονται από τριχοειδή υλικού Borosil διαστάσεων 1 mm (OD) x 0,5 mm (ID).
- Από τα τριχοειδή αυτά κατασκευάζονται βελόνες σε ειδική συσκευή (needle puller). Οι βελόνες που προκύπτουν είναι κλειστές και γι' αυτό θα χρειαστεί να σπάσουν. Αυτό γίνεται με ακρίβεια κάτω από το μικροσκόπιο και επάνω στο agarose pad.
- Προκαλούμε μια αμυχή στο agarose pad.
- Καλύπτουμε την επιφάνειά του με halocarbon oil.
- Εστιάζουμε στην αμυχή του agarose pad και τοποθετούμε την άκρη της βελόνας στο πεδίο.
- Μετακινούμε τη βελόνα ώστε αυτή να σπάσει καθώς θα συναντήσει την αμυχή του agarose pad (όλη η διαδικασία θα πρέπει να γίνει με ακριβείς κινήσεις κάτω από το μικροσκόπιο).

### Τριχοειδή

- Τοποθετούμε τα γυάλινο σωληνίσκο σε φλόγα και αφού πυρακτωθεί τραβάμε τις άκρες του σε αντίθετες κατευθύνσεις ώστε να σχηματιστεί ένα τριχοειδές.
- Βάζουμε το τριχοειδές στο διάλυμα του DNA και αυτό εισέρχεται στο εσωτερικό λόγω τριχοειδούς φαινομένου.
- Βάζουμε το τριχοειδές στο πίσω άκρο της βελόνας και την γεμίζουμε φουσώντας.

### **Μέθοδος**

#### Μικροενέσεις

! Η επιλογή των ατόμων που θα ενεθούν αποτελεί κομβικό σημείο της διαδικασίας. Τα καταλληλότερα άτομα είναι εκείνα που διαθέτουν το μέγιστο αριθμό ωοκυττάρων (υψηλό γενετικό δυναμικό) και είναι εύρωστα προκειμένου να επιβιώσουν μετά από τη μικροένεση. Έτσι, επιλέγονται άτομα που έχουν εισέλθει στο στάδιο της ενηλικίωσης (gravid adults) χωρίς εντούτοις να είναι μεγάλης ηλικίας.

- Μεταφέρουμε τα άτομα με μεταλλικό έλασμα επάνω στο slide σε περιοχή όπου υπάρχει halocarbon oil αλλά όχι agarose και τα μετακινούμε προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα βακτήρια και η υγρασία που τα περιβάλλει.
- Στη συνέχεια τα μεταφέρουμε πάνω στο pad όπου ακινητοποιούνται λόγω αφυδάτωσης. Η αφυδάτωση που προκαλείται είναι ευεργετική για την ακινητοποίηση των ζώων, αλλά προκαλεί το θάνατό τους αν διαρκέσει πολύ.
- Στοχεύουμε τη γονάδα του ατόμου και συγκεκριμένα το σημείο όπου βρίσκονται μη γονιμοποιημένα ωοκύτταρα, στο οπίσθιο άκρο του κάθε βραχίονα.
- Αφού γίνουν οι ενέσεις, ενυδατώνουμε τα άτομα και πάλι με διάλυμα M9 και τα μεταφέρουμε σε πιάτο με άφθονη τροφή όπου και επωάζονται.

## 9. RNAi

Για την καταστολή της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων στον *C. elegans* εφαρμόστηκε η μέθοδος του RNA interference (RNAi) (Kamath et al., 2001). Με τη μέθοδο αυτή δίκλωνο RNA παράγεται από βακτηριακά στελέχη τα οποία φέρουν κατάλληλους φορείς έκφρασης. Στη συνέχεια τα βακτήρια αυτά χρησιμοποιούνται ως τροφή για το νηματώδη και έτσι επιτυγχάνεται η εισαγωγή δίκλωνου RNA σε κύτταρα του οργανισμού και η επαγωγή του μηχανισμού του RNAi. Η συγκεκριμένη μέθοδος (feeding) εμφανίζεται να είναι λιγότερο αποτελεσματική στα νευρικά κύτταρα σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα του οργανισμού (επιθηλιακά, μυϊκά).

Ετοιμάζουμε πιάτα που περιέχουν 100 µg / ml ampicillin αλλά όχι nystatin. Την προηγούμενη μέρα απλώνουμε 200 µl βακτήρια του στελέχους HT115 μετασχηματισμένα με το κατάλληλο φορέα έκφρασης και προσθέτουμε 5 µl IPTG με συγκέντρωση 20 mM ώστε η τελική του συγκέντρωση να φτάσει το 1 mM και επωάζουμε για 16-18h στους 25°C. Την επόμενη ημέρα προσθέτουμε 5 άτομα σταδίου L4 και τα οποία αφήνουν αυγά στους 15 ή 25°C. Ο φαινοτυπικός έλεγχος γίνεται στα ενήλικα άτομα της F1 και F2 γενεάς.

## B) Πλασμιδιακές κατασκευές

### 1. $p_{asic-1}$ GFP

Για την παρακολούθηση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *asic-1* δημιουργήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή pPD95.77 $p_{asic-1}$ GFP όπου το γονίδιο του φθορίζοντα μάρτυρα της GFP εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *asic-1*. Μέσω της στρατηγικής αυτής γίνεται δυνατή η παρακολούθηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης του υπό μελέτη γονιδίου και η αναγνώριση του ιστού του οργανισμού ή πιο λεπτομερώς, των κυττάρων όπου αυτό εκφράζεται. Σε ένα επόμενο επίπεδο καθίσταται δυνατή η αναγνώριση του αναπτυξιακού σταδίου κατά το οποίο είναι απαραίτητη η έκφραση του γονιδίου. Έτσι, γίνεται εφικτή η αναγνώριση του χωροχρονικού μοτίβου έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου. Εφαρμόζοντας αυτήν τη στρατηγική για το γονίδιο *asic-1*, ένα μέρος της 5' μη κωδικής περιοχής μαζί με τμήμα του 1<sup>ου</sup> εξωνίου πολλαπλασιάστηκε με τη διαδικασία της αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης ή PCR από γενωμικό DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές τα ολιγονουκλεοτίδια

5'CCCAAGCTTCAATCAGTCACCCAGGTGTAC3'

5'CGCGGTACCTGCTCCGCAAAGTCAACGAC3'

τα οποία φέρουν στα άκρα τους τις θέσεις περιορισμού της *HindIII* και *KpnI* αντίστοιχα. Οι θέσεις αυτές ενσωματώνονται στο προϊόν της αντίδρασης το οποίο έχει μέγεθος 2 kb. Ακολούθησε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *HindIII* και *KpnI* τόσο του προϊόντος της αντίδρασης όσο και του πλασμιδιακού φορέα pPD95.77 ενώ ακολούθησε αντίδραση λιγάσης κατά την οποία ο υποκινητής του γονιδίου *asic-1* υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pPD95.77, δίνοντας την τελική κατασκευή  $p_{asic-1}$ GFP (Εικόνα 1α).

### 2. $p_{asic-1}$ ASIC-1(N)::GFP

Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης ASIC-1 δημιουργήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή  $p_{asic-1}$ ASIC-1(N)::GFP όπου ο φθορίζοντας μάρτυρας της GFP εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *asic-1* σε σύνδεση με ένα τμήμα της κωδικής περιοχής του γονιδίου *asic-1*. Συγκεκριμένα, σχηματίστηκε ένα χιμαιρικό μόριο μεταξύ ενός τμήματος του καναλιού ASIC-1 και της GFP το οποίο εκφράστηκε υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *asic-1*. Το τμήμα του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης περιλαμβάνει 137 bp από την αρχή του γονιδίου και κωδικοποιεί τα πρώτα 39 αμινοξέα που

αντιστοιχούν στο ενδοκυττάριο αμινοτελικό άκρο του καναλιού, αμέσως πριν από την πρώτη διαμεμβρανική περιοχή. Η επιλογή του συγκεκριμένου πρωτεϊνικού τμήματος βασίστηκε σε μελέτες ομόλογων γονιδίων όπου έχει δείχτεί ότι το αμινοτελικό άκρο των Degenerins αλληλεπιδρά με ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες και σταθεροποιούν το κανάλι σε συγκεκριμένες περιοχές της μεμβράνης (Tavernarakis et al., 2001). Στη συγκεκριμένη κατασκευή δεν περιλήφθηκε η διαμεμβρανική περιοχή του καναλιού. Κατ' αυτόν τον τρόπο το μόριο της GFP τοποθετείται στο εσωτερικό του κυττάρου όπου και παραμένει λειτουργικό, κάτι που δεν συμβαίνει όταν περνάει στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Έτσι, από γενωμικό DNA προέκυψε μέσω αντίδρασης PCR ένα τμήμα μήκους 2.2 kb. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια

5'CCCAAGCTTCAATCAGTCACCCAGGTGTAC3'

5'CGCGGTACCTGCTCCGCAAAGTCAACGAC 3'

τα οποία φέρουν στα άκρα τους τις θέσεις περιορισμού της *HindIII* και *KpnI* αντίστοιχα. Οι θέσεις αυτές ενσωματώνονται στο προϊόν της αντίδρασης το οποίο έχει μέγεθος 2 kb. Ακολούθησε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *HindIII* και *KpnI* τόσο του προϊόντος της αντίδρασης όσο και του πλασμιδιακού φορέα pPD95.77 ενώ ακολούθησε αντίδραση λιγάσης κατά την οποία ο υποκινητής του γονιδίου *asic-1* υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pPD95.77, δίνοντας την τελική κατασκευή p<sub>asic-1</sub>GFP (Εικόνα 1α).

### 3. pL4440-*asic-1*

Για την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *asic-1* χρησιμοποιήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή pL4440-*asic-1*. Στην κατασκευή αυτή ένα τμήμα του γονιδίου *asic-1* πολλαπλασιάστηκε από γενωμικό DNA μέσω αντίδρασης PCR. Το τμήμα αυτό ήταν μήκους 1,5 kb και περιλάμβανε 0,6 kb κωδικής αλληλουχίας. Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια

5'TCAAGTATCCACGTGTAGTAA3'

5'ATCTGGAAATGGTTGCTCGTC3'

Το προϊόν της αντίδρασης αρχικά εισήλθε στο φορέα pCRII-Topo (Invitrogen, Carlsbad, USA). Από εκεί απομονώθηκε μετά από πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* και υποκλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pL4440 (Timmons et al., 2001) οπότε και σχηματίστηκε η κατασκευή pL4440-*asic-1* (Εικόνα 1γ). Με την πλασμιδιακή αυτή κατασκευή μετασχηματίστηκε ακολούθως στο βακτηριακό στέλεχος της *E. coli* HT115(DE3) στο οποίο

δεν παράγεται το ένζυμο RNase-E. Έτσι, επιτυγχάνεται η παραγωγή δίκλωνου RNA (dsRNA).

#### 4. $p_{asic-1}$ DsRED::SNB-1

Για τη σήμανση των συνάψεων των ντοπαμινεργικών νευρώνων δημιουργήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή  $p_{asic-1}$ DsRED::SNB-1, όπου το χιμαιρικό μόριο που σχηματίζει ο φορορίζοντας μάρτυρας της DsRED με την πρωτεΐνη SNB-1 (Nonet et al., 1998) εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *asic-1*. Αρχικά έγινε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *AgeI* και *EcoRI* στο πλασμίδιο pDsRED2-C1 (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, USA) και απομονώθηκε ένα τμήμα DNA μήκους 0.7 kb που περιλάμβανε την κωδική περιοχή του γονιδίου της DsRED. Ακολούθησε πέψη με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες (*AgeI* και *EcoRI*) στο πλασμίδιο pPD95.77 από το οποίο απομακρύνθηκε το γονίδιο της GFP και στη θέση του εντέθηκε το γονίδιο της DsRED δίνοντας το φορέα pPD95.77dsRED. Στη συνέχεια, η κωδική περιοχή του γονιδίου *snb-1* πολλαπλασιάστηκε από γενωμικό DNA με αντίδραση PCR. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια

5'CGGGGTACCGAATTCGGACGCTCAAGGAGATGCCGGC3'

5'CGGGGTACCGAATTCCTTTTCCTCCAGCCCATAAAACG3'

τα οποία φέρουν στα άκρα τους την περιοριστική θέση της *EcoRI*. Στο προϊόν της αντίδρασης αλλά και στο φορέα pPD95.77DsRED έγινε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* και ακολούθησε αντίδραση λιγάσης από την οποία προέκυψε η κατασκευή pPD95.77DsRED::SNB-1. Στη συνέχεια μια περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *asic-1* μήκους 2,4 kb πολλαπλασιάστηκε από γενωμικό DNA με αντίδραση PCR. Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια

5'CGCGGATCCTTCGACACTAATTTACAATTAGGT3'

5'CGCGGTACCATTTGGTGGCCTGAAATTTGATC3'

στα άκρα των οποίων περιλαμβάνονται οι θέσεις περιορισμού *BamHI* και *KpnI*. Στο προϊόν της αντίδρασης PCR αλλά και στο φορέα pPD95.77DsRED::SNB-1 έγινε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI* και *KpnI* ενώ ακολούθησε αντίδραση λιγάσης όπου υποκλωνοποιήθηκε ο υποκινητής του γονιδίου *asic-1* σχηματίζοντας τον τελικό φορέα έκφρασης  $p_{asic-1}$ DsRED::SNB-1 (Εικόνα 1δ).

## 5. $p_{asic-1}$ SNB-1::SEpHluorin

Για την παρακολούθηση της εξωκύτωσης του νευροδιαβιβαστή στις ντοπαμινεργικές συνάψεις δημιουργήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης  $p_{asic-1}$ SNB-1::SEpHluorin. Στο φορέα αυτό, το χιμαιρικό μόριο που σχηματίζουν ο φθορίζοντας μάρτυρας της Super Ecliptic pHluorin (SEpHluorin) (Miesenbock et al., 1998) με τη synaptobrevin (SNB-1) (Nonet et al., 1998) εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *asic-1*. Αρχικά, η κωδική περιοχή του γονιδίου της SEpHluorin πολλαπλασιάστηκε με αντίδραση PCR από το πλασμίδιο pGEX-2T-SEpHluorin (Miesenbock et al., 1998) με τη χρήση των ολιγονουκλεοτιδίων

5'CGGGGTACCGGATCCACCGGTGGAAGT3'

5'CCGGAATTCACCGGTTTTGTATAGTTC3'

Στα άκρα τους βρίσκονται οι θέσεις περιορισμού *KpnI* και *EcoRI* αντίστοιχα. Στο προϊόν της αντίδρασης αλλά και στο φορέα pPD95.77 έγινε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *KpnI* και *EcoRI* και μετά από αντίδραση λιγάσης η κωδική περιοχή της SEpHluorin αντικατέστησε αυτήν της GFP που υπήρχε στο φορέα pPD95.77. Έτσι, προέκυψε ο φορέας PD95.77SEpHluorin. Στη συνέχεια μια περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *asic-1* μήκους 2,4 kb πολλαπλασιάστηκε με αντίδραση PCR από γενωμικό DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια

5'CGCGGATCCTTCGACACTAATTTACAATTAGGT3'

5'CGCGGTACCATTTGGTGGCCTGAAATTTGATC3'

τα οποία φέρουν στα άκρα τους τις περιοριστικές θέσεις *BamHI* and *KpnI* αντίστοιχα. Ακολούθησε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI* και *KpnI*, τόσο του προϊόντος της αντίδρασης PCR όσο και του φορέα pPD95.77SEpHluorin και αντίδραση λιγάσης. Με τον τρόπο αυτό προέκυψε ο φορέας έκφρασης  $p_{asic-1}$ SEpHluorin. Σε ένα επόμενο στάδιο η κωδική περιοχή του γονιδίου *snb-1* πολλαπλασιάστηκε με αντίδραση PCR από γενωμικό DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια

5'CGGGGTACCGAATTCGGACGCTCAAGGAGATGCCGGC3'

5'CGGGGTACCGAATTCCTTTTCTCCAGCCCATAAAACG3'

τα οποία φέρουν στα άκρα τους την περιοριστική θέση της *KpnI*. Ακολούθησε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *KpnI* τόσο του προϊόντος της αντίδρασης όσο και του πλασμιδίου  $p_{asic-1}$ SEpHluorin. Τέλος, πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης απ' όπου και προέκυψε ο τελικός πλασμιδιακός φορέας έκφρασης  $p_{asic-1}$ SNB-1::SEpHluorin (Εικόνα 1ε).



## 6. $p_{asic-1}mec-4(u231)$

Για την απαλοιφή των νευρώνων στους οποίους εκφράζεται το γονίδιο *asic-1* (ντοπαμινεργικοί) δημιουργήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή  $p_{asic-1}mec-4(u231)$ . Στο φορέα αυτόν το τοξικό και επικρατές αλληλόμορφο *mec-4(u231)* (Driscoll and Chalfie, 1991) εκφράστηκε υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *asic-1*. Ο υποκινητής και μέρος του πρώτου εξωνίου του γονιδίου *asic-1* πολλαπλασιάστηκε με αντίδραση PCR από γενωμικό DNA με τη χρήση των ολιγονουκλεοτιδίων

5'ACGCGTCGACTTCGACACTAATTTACAATTAGGTC3'

5'CGGGGTACCGACTCGTGTGCGCCGCAAAGTCAACGAC3'

τα οποία έφεραν στα άκρα τους, τις περιοριστικές θέσεις *Sall* και *KpnI* αντίστοιχα. Στο προϊόν της αντίδρασης μήκους 2.4 kb, όπως και στο φορέα  $p_{mec-7}mec-4(u231)$  (Harbinder et al., 1997; Tavernarakis et al., 1997) έγινε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Sall* και *KpnI*. Ακολούθησε αντίδραση λιγάσης όπου ο υποκινητής του γονιδίου *asic-1* αντικατέστησε τον υποκινητή του γονιδίου *mec-7* και προέκυψε ο φορέας  $p_{asic-1}mec-4(u231)$ . Η αλληλουχία του φορέα από την οποία προέκυψε η κατασκευή  $p_{mec-7}mec-4(u231)$  δεν είναι πλήρως γνωστή. Για το λόγο αυτό και η αλληλουχία της κατασκευής  $p_{mec-7}mec-4(u231)$  αναφέρεται προσεγγιστικά και έτσι είναι πιθανό να υπάρχουν θέσεις περιορισμού οι οποίες δεν απεικονίζονται στον αντίστοιχο χάρτη (Εικόνα 1ζ).

## 7. $p_{asic-1}ASIC-1::GFP$

Σε μια επόμενη προσέγγιση το γονίδιο *asic-1* του αγρίου τύπου εκφράστηκε σε σύνδεση με το φθορίζοντα μάρτυρα της GFP. Αρχικά, η κωδική περιοχή του γονιδίου μαζί με ένα τμήμα της 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής του, πολλαπλασιάστηκαν μέσω αντίδρασης πολυμεράσης από το κοσμίδιο ZK770. Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια

5'TCCCCCGGGGAAAGAACAGCTTAAAACG3'

5'GAACCGGTTTATCAAGATTAAACCCGTC3',

τα οποία φέρουν στα άκρα τους τις περιοριστικές θέσεις *SmaI* και *AgeI* αντίστοιχα. Το προϊόν της αντίδρασης μήκους 4,2 Kb υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pCRII-Toro οπότε προέκυψε ο φορέας pCRII-Toro-*asic-1*. Από το φορέα αυτό απομονώθηκε η κωδική περιοχή του γονιδίου *asic-1* μετά από πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *SmaI* και *AgeI* και υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pPD95.77 μεταξύ των θέσεων αυτών, οπότε προέκυψε το πλασμίδιο pPD95.77-*asic-1*GFP. Στη συνέχεια, ο υποκινητής του γονιδίου *asic-1*

πολλαπλασιάστηκε μέσω αντίδρασης πολυμεράσης από το κοσμίδιο ZK770. Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια

5'ACGCGTCGACTTAGGGTCGGTATTTTGAGT3'

5'TCCCCCGGGCATTTGGTGGCCTGAAATTT3'

τα οποία έφεραν στα άκρα τους τις θέσεις περιορισμού *Sall* και *SmaI* αντίστοιχα. Το προϊόν της αντίδρασης μήκους 2 Kb υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pCRII-Toro οπότε και προέκυψε το πλασμίδιο pCRII-Toro-p<sub>asic-1</sub>. Από το πλασμίδιο αυτό απομονώθηκε ο υποκινητής του γονιδίου *asic-1* μετά από πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Sall* και *SmaI* και εντέθηκε στο φορέα pPD95.77-*asic-1* GFP μεταξύ των θέσεων αυτών, οπότε και προέκυψε ο τελικός φορέας pPD95.77- p<sub>asic-1</sub>*asic-1*GFP (Εικόνα 1η).

### 8. p<sub>mec-7</sub>PAT-3(td)::GFP

Για την έκφραση του φθορίζοντα μάρτυρα της GFP στους 6 νευρώνες-μηχανοϋποδοχείς του νηματώδους, αλλά και για τη τοποθέτησή της στη μεμβράνη των κυττάρων αυτών σχηματίστηκε το μόριο p<sub>mec-7</sub>PAT-3(td)::GFP. Εδώ ο κυτταρο-ειδικός υποκινητής του γονιδίου *mec-7* καθοδηγεί την έκφραση ενός χιμαιρικού μορίου το οποίο αποτελούν η διαμεμβρανική περιοχή του γονιδίου *pat-3* και το μόριο της GFP. Ο υποκινητής μήκους 0,9 Kb απομονώθηκε από το πλασμίδιο pPD117.01 (Fire et al., 1990) μετά από πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *HindIII* και *BamHI*, ενώ εντέθηκε μεταξύ των ίδιων θέσεων στο πλασμίδιο pPD122.39 (Εικόνα 1θ).

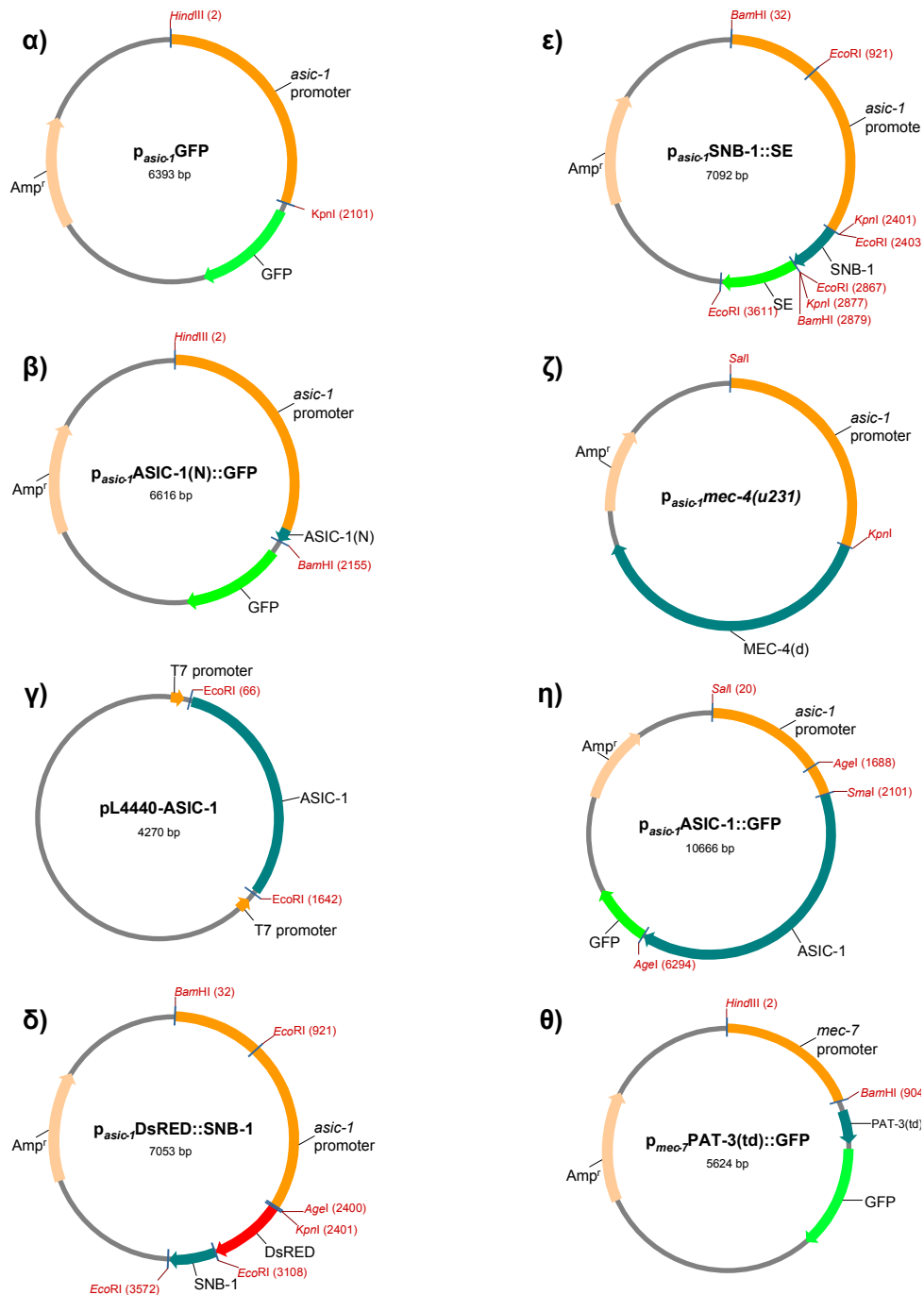
### 9. p<sub>asic-1</sub>ASIC-1

Για τη διάσωση-συμπλήρωση του φαινοτύπου του μεταλλαγμένου στελέχους *asic-1(ok415)* ακολουθήθηκαν δυο διαφορετικές στρατηγικές. Στην πρώτη, μεταλλαγμένα άτομα μετασχηματίστηκαν με το γονίδιο *asic-1* του αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα ένα τμήμα του κοσμιδίου ZK770 (Coulson et al., 1995) που περιλαμβάνει τον υποκινητή και την κωδική αλληλουχία του γονιδίου *asic-1* πολλαπλασιάστηκε μέσω αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια

5'AGTCTGCCTACTACTTCTGACT3'

5'TTCGCATCACCGATTCTACCACA3'

ενώ το προϊόν μήκους 5,8 kb ενέθηκε στις γονάδες ατόμων του στελέχους *asic-1(ok415)*.



**Εικόνα 1.** Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδιακών κατασκευών που χρησιμοποιήθηκαν. Απεικονίζονται τόσο οι θέσεις στις οποίες έγιναν οι κλωνοποιήσεις των διάφορων ενθεμάτων όσο και τα τμήματα DNA που εντέθηκαν σε κάθε πλασμίδιο. Επίσης, φαίνονται τα μήκη στα οποία βρίσκονται οι θέσεις περιορισμού για τον υπολογισμό του μήκους των αναμενόμενων τμημάτων μετά από διαγνωστικές πέψεις.

## Γ) Φαινοτυπικές αναλύσεις στον *C. elegans*

### 1. Δοκιμασία χημειοτακτισμού

Για τη μέτρηση και την ποσοτικοποίηση του συγκεκριμένου φαινοτύπου δημιουργείται ένα κλινές συγκέντρωσης μιας πτητικής ή υδατοδιαλυτής χημικής ένωσης σε ένα βακτηριολογικό πιάτο διαστάσεων 9 cm το οποίο περιέχει 10 ml υποστρώματος και υπολογίζεται ο δείκτης χημειόταξης του πληθυσμού μετά από 1 ώρα σε σταθερή θερμοκρασία 20°C. Με βάση τον τρόπο υπολογισμού (Εικόνα 2) ο συγκεκριμένος δείκτης λαμβάνει τιμές που κυμαίνονται από 100% μέχρι -100% αντικατοπτρίζοντας πλήρη έλξη ή απώθηση αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, ο δείκτης χημειόταξης αφορά σε πληθυσμό (100 με 200 άτομα ανά δοκιμή) παρά σε μεμονωμένα άτομα. Στο στέλεχος του αγρίου τύπου και για μια ελκτική ένωση παίρνει τιμές μεταξύ 75 και 90 %, ενώ για μια απωθητική ένωση μεταξύ 10 και -20 % περίπου.

### Υλικά

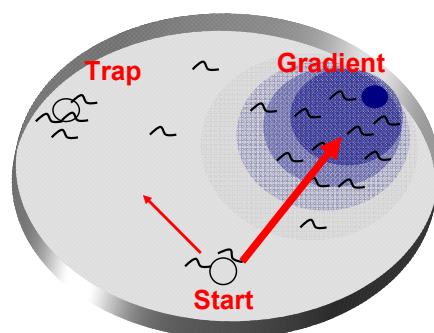
#### Assay plates

Τα πιάτα στα οποία πραγματοποιείται ο έλεγχος της συμπεριφοράς της χημειόταξης έχουν διάμετρο 9 cm και περιλαμβάνουν 10 ml άγαρ με σύσταση 20 g/l agar, 5 mM K-PO<sub>4</sub> buffer [pH 6], 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM MgSO<sub>4</sub> (Colbert and Bargmann, 1995; Saeki et al., 2001). Στην επιφάνεια του πιάτου αυτού ορίζονται τρία σημεία που είναι: α) το σημείο όπου εναποτίθενται τα άτομα στην αρχή της δοκιμής (start), β) το σημείο από το οποίο αρχίζει το κλινές συγκέντρωσης της εκάστοτε χημικής ένωσης (gradient) και γ) το σημείο που βρίσκεται αντιδιαμετρικά του τελευταίου και έχει ρόλο σταθεράς (control). Από το σημείο αυτό (trap) υπολογίζεται ο αριθμός των ατόμων που φτάνουν στην αρχή του κλινούς συγκέντρωσης στοχαστικά και όχι χημειοτακτικά. Τα τρία αυτά σημεία σχηματίζουν ένα ισοσκελές τρίγωνο όπου τα σημεία του trap και του gradient απέχουν μεταξύ τους 6,5 cm και από το σημείο start 4 cm (Εικόνα 2). Πάνω στα σημεία του trap και του gradient προστίθενται 2 μl NaN<sub>3</sub> για την αναισθητοποίηση των ατόμων που φτάνουν εκεί. Ο δείκτης χημειόταξης υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (Εικόνα 2).

#### Assay buffer

Τα άτομα που χρησιμοποιούνται στα assays της χημειόταξης μεταφέρονται από τα πιάτα όπου καλλιεργούνται και πλένονται δυο φορές με διάλυμα σύστασης: 5 mM KPO<sub>4</sub> [pH

6], 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>. Το στάδιο αυτό είναι σημαντικό καθώς όλα τα βακτήρια που περιβάλλουν τα άτομα χρειάζεται να απομακρυνθούν πλήρως. Σε διαφορετική περίπτωση ο οργανισμός δεν πραγματοποιεί χημειόταξη.



$$\text{Chemotaxis Index} = \frac{N_{(\text{gradient})} - N_{(\text{trap})}}{N_{(\text{total})}}$$

**Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της δοκιμασίας της χημειόταξης.** Απεικονίζεται η κατανομή του πληθυσμού του αγρίου τύπου μετά από μια δοκιμασία για μια ελκτική χημική ένωση. Επίσης, φαίνεται η μαθηματική εξίσωση με την οποία υπολογίζεται ο δείκτης χημειόταξης.

#### Κλινές συγκέντρωσης πτητικών ενώσεων

Για το σχηματισμό του κλινούς συγκέντρωσης της πτητικής ισοαμλικής αλκοόλης, 2μl της ένωσης τοποθετούνται στο σημείο του gradient ενός πιάτου (assay plate), που έχει στεγνώσει για 1h σε RT, αμέσως πριν από την πραγματοποίηση της δοκιμής. Προκειμένου να μην απορροφηθεί η ουσία από το agar του πιάτου τοποθετούμε πρώτα ένα μικρό κομμάτι parafilm και πάνω σε αυτό προσθέτουμε την ισοαμλική αλκοόλη.

#### Κλινές συγκέντρωσης υδατοδιαλυτών ενώσεων

Για το σχηματισμό του κλινούς συγκέντρωσης των υδατοδιαλυτών ενώσεων NaCl, AcNa και NH<sub>4</sub>Cl αρχικά κατασκευάστηκαν πιάτα τα οποία χρησίμευσαν ως πηγή της εκάστοτε ένωσης στο κλινές συγκέντρωσής της. Τα πιάτα αυτά περιείχαν 20 g/l agar, 5 mM K-PO<sub>4</sub> buffer [pH 6], 1 mM CaCl<sub>2</sub> και 1 mM MgSO<sub>4</sub> ενώ προστέθηκαν 100 mM NaCl, 200 mM AcNa και 250 mM NH<sub>4</sub>Cl αντίστοιχα. 16 ώρες πριν από το assay ένα κυλινδρικό κομμάτι των παραπάνω πιάτων τοποθετήθηκε στο σημείο του gradient ενός assay plate που είχε στεγνώσει για 1 h σε RT και επωάστηκε στους 20°C.

### Συγχρονισμός καλλιέργειας

Τα πειράματα χημειόταξης πραγματοποιήθηκαν σε ενήλικα άτομα καθώς σε προηγούμενα αναπτυξιακά στάδια το νευρικό σύστημα του οργανισμού δεν είναι πλήρως ανεπτυγμένο. Έτσι είναι σκόπιμο να χρησιμοποιηθούν συγχρονισμένες καλλιέργειες, οι οποίες προέκυψαν με τους εξής τρόπους.

α) 50 ενήλικα άτομα μεταφέρονται σε καλλιέργεια με άφθονη τροφή όπου εναποθέτουν αυγά για 2 με 3 ώρες. Στη συνέχεια απομακρύνονται και τα αυγά επωάζονται στους 20°C για 4,5 ημέρες σχηματίζοντας μια συγχρονισμένη καλλιέργεια όπου τα άτομα έχουν χρονική διαφορά της τάξεως των δυο με τριών ωρών.

β) 4 με 7 άτομα (ανάλογα με το στέλεχος και το egg laying που το χαρακτηρίζει) τοποθετούνται σε πιάτο με άφθονη τροφή και επωάζονται στους 20°C για 4 ημέρες οπότε και προκύπτει καλλιέργεια με κατάλληλο αριθμό ατόμων αλλά όχι σύγχρονη. Ο συγχρονισμός της επιτυγχάνεται κατά το πλύσιμο των ατόμων. Συγκεκριμένα το πλύσιμο γίνεται σε σωληνάκι erpendorf όπου τα άτομα αφήνονται να καθιζήσουν λόγω βαρύτητας. Εκείνα που επιπλέουν είναι τα μικρότερης ηλικίας και μεγέθους τα οποία και απομακρύνονται δίνοντας έτσι μια λιγότερο αλλά αποδεκτά συγχρονισμένη καλλιέργεια.

γ) Τα άτομα μιας ασύγχρονης καλλιέργειας συλλέγονται με H<sub>2</sub>O και πλένονται δυο φορές. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα σύστασης: 1 % hydrochloride και 0,5 N NaOH σε H<sub>2</sub>O (bleach solution) οπότε και έχουμε πλήρη αποδιάταξη των ιστών του οργανισμού. Από τη διαδικασία αυτή επιβιώνουν μόνο τα αυγά που βρίσκονται στις γονάδες των ατόμων τα οποία και τοποθετούνται σε πιάτο με άφθονη τροφή. Από μια τέτοια ασύγχρονη καλλιέργεια και με την παραπάνω μέθοδο μπορούν να προκύψουν μέχρι και τέσσερις νέες συγχρονισμένες καλλιέργειες οι οποίες χρησιμοποιούνται σε πειράματα χημειόταξης.

### **Μέθοδος**

Τα άτομα από συγχρονισμένη καλλιέργεια συλλέγονται με assay buffer σε σωληνάκι erpendorf όπου και πλένονται δυο φορές για την απομάκρυνση των βακτηρίων. Αυτή η διαδικασία δεν πρέπει να διαρκεί πάνω από 5 min ενώ δεν είναι απαραίτητη η χρήση vortex και φυγοκέντρου. Μετά από το δεύτερο πλύσιμο τα ζώα αφήνονται και καθιζάνουν με τη βαρύτητα. Στη συνέχεια μεταφέρονται στο assay plate μέσα σε μια σταγόνα διαλύματος assay buffer όπου και παραμένουν χωρίς να μπορούν να απομακρυνθούν. Αν το χημικό ερέθισμα είναι μια πτητική ουσία, τότε προστίθεται η απαραίτητη ποσότητα της ουσίας αυτής πάνω σε ένα κομμάτι parafilm και στη συνέχεια απομακρύνεται το διάλυμα όπου βρίσκονται

τα ζώα με διηθητικό χαρτί. Το πιάτο τυλίγεται ερμητικά με πλαστική μεμβράνη και τοποθετείται στους 20°C. Από αυτήν τη στιγμή αρχίζει το chemotaxis assay το οποίο διαρκεί 1h. Το πείραμα σταματάει με την προσθήκη μερικών σταγόνων χλωροφορμίου οπότε και θανατώνονται όλα τα άτομα. Η χρήση incubator στο παραπάνω πείραμα δεν είναι συνήθως αποδεκτή καθώς η λειτουργία του προκαλεί δονήσεις που επηρεάζουν σημαντικά το πείραμα. Για το σκοπό αυτό η όλη διαδικασία είναι προτιμότερο να γίνεται σε δωμάτιο με θερμοκρασία μεταξύ 20 και 24°C.

## 2. Δοκιμασία μνήμης και μάθησης (conditioning)

Σκοπός της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η επαγωγή της αλλαγής της συμπεριφοράς της χημειόταξης με βάση την προγενέστερη εμπειρία (de Bono and Maricq, 2005; Hobert, 2003). Όπως προαναφέρθηκε, ο νηματώδης αντιλαμβάνεται μια ευρεία γκάμα χημικών ενώσεων τις οποίες διακρίνει είτε ως απωθητικές είτε ως ελκτικές. Στην τελευταία περίπτωση εκδηλώνεται ισχυρή χημειόταξη η οποία είναι ενδογενής. Αυτή η ενδογενής έλξη μπορεί να αλλάξει όταν ο οργανισμός εκτίθεται στην ίδια ελκτική χημική ένωση εν απουσία τροφής σε μια διαδικασία που λέγεται conditioning.

Το conditioning έγινε σε συνθήκες έλλειψης τροφής. Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν πιάτα (conditioning plates) με σύσταση 20 g/l agar, 5 mM K-PO<sub>4</sub> buffer [pH 6], 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>. Όταν το conditioning stimulus είναι οι υδατοδιαλυτές ενώσεις NaCl, AcNa και NH<sub>4</sub>Cl, αυτές προστίθενται στα παραπάνω πιάτα σε συγκέντρωση 20 mM, 200 mM και 50 mM αντίστοιχα. Όταν το conditioning stimulus είναι η πτητική ισοαμυλική αλκοόλη τότε 3 μl της ένωσης προστίθενται στο καπάκι κάθε conditioning plate. Κατά το conditioning παρουσία ντοπαμίνης, εκτός από την εκάστοτε χημική ένωση προστίθεται και hydroxyl-dopamine σε συγκέντρωση 5 μM. Κατά το conditioning παρουσία μικροσφαιριδίων σεφαρόζης, στην επιφάνεια του conditioning plate προστίθενται 600 μl sepharose beads σε συγκέντρωση 30 mg/ml. Τα conditioning plates στεγνώνουν σε RT 1 h πριν από την κάθε δοκιμή. Σε κάθε δοκιμή, περίπου 500 ενήλικα άτομα συλλέγονται από συγχρονισμένη καλλιέργεια και πλένονται με assay buffer. Στη συνέχεια μεταφέρονται στο conditioning plate και η περίσσεια διαλύματος απομακρύνεται με διηθητικό χαρτί. Η διάρκεια του conditioning είναι 3h για τις υδατοδιαλυτές χημικές ενώσεις και 90 min για την ισοαμυλική αλκοόλη και γίνεται σε δωμάτιο με θερμοκρασία μεταξύ 20°C και 24°C. Μετά το τέλος του conditioning τα άτομα συλλέγονται με assay buffer και χρησιμοποιούνται σε πείραμα χημειόταξης.

### 3. Δοκιμασία θερμότητας (isothermal tracking assay)

Μια συμπεριφορά που εκδηλώνει ο *C. elegans* και η οποία συμβάλλει στην επικοινωνία του με το εξωτερικό περιβάλλον είναι η θερμότητα (Hedgcock and Russell, 1975). Ο νηματώδης είναι ένας εξώθερμος οργανισμός που αναπτύσσεται και αναπαράγεται φυσιολογικά σε ένα θερμοκρασιακό εύρος μεταξύ 14 και 26°C. Η περιβαλλοντική θερμοκρασία ρυθμίζει το μεταβολισμού του οργανισμού καθορίζοντας την ταχύτητα ανάπτυξής του αλλά και μεταβάλλοντας το αναπτυξιακό του πρόγραμμα όταν είναι μικρότερη από 14°C ή μεγαλύτερη από 26°C. Ο νηματώδης έχει τη δυνατότητα να αντιλαμβάνεται αλλαγές στη θερμοκρασία της τάξεως των 0,1°C, ενώ μπορεί να τη συσχετίζει με την ύπαρξη ή την έλλειψη τροφής εκδηλώνοντας συσχετιζόμενη μνήμη και μάθηση. Σε αυτήν την περίπτωση, η προγενέστερη εμπειρία μεταβάλλει τη μελλοντική συμπεριφορά. Σε ένα τέτοιο παράδειγμα η θερμοκρασία έχει το ρόλο του conditioning stimulus (CS) και η τροφή το ρόλο του unconditioning stimulus (US).

Για τη μελέτη και την ποσοτικοποίηση του φαινοτύπου, ενήλικα άτομα που έχουν καλλιεργηθεί σε σταθερή θερμοκρασία για τουλάχιστον 4h αντιμετωπίζουν ένα θερμοκρασιακό κλινές με εύρος 14 με 26°C (Mori, 1999; Mori and Ohshima, 1995). Τα άτομα που έχουν συσχετίσει την ύπαρξη της τροφής με την περιβαλλοντική θερμοκρασία εντοπίζουν την ισόθερμη εκείνη που αντιστοιχεί στη θερμοκρασία καλλιέργειας. Η συγκεκριμένη δοκιμή μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε μεμονωμένα άτομα (isothermal tracking assay) είτε σε έναν πληθυσμό ατόμων (population thermotaxis assay). Ο δείκτης θερμότητας στην πρώτη περίπτωση παίρνει τιμές από 0 ως 100% και αναφέρεται στο ποσοστό μεμονωμένων ατόμων ενός στελέχους που εκδηλώνουν θερμότητα. Ο δείκτης θερμότητας στη δεύτερη περίπτωση παίρνει τιμές από -100% ως και 100% και αναφέρεται στο ποσοστό των ατόμων του πληθυσμού που εκδηλώνουν θερμότητα. Για το στέλεχος του αγρίου τύπου και όταν τα άτομα έχουν επωαστεί παρουσία τροφής ο δείκτης θερμότητας είναι περίπου 75%.

#### Υλικά

##### Assay plates

Τα πιάτα στα οποία πραγματοποιείται ο έλεγχος της συμπεριφοράς της θερμότητας έχουν διάμετρο 9 cm και περιλαμβάνουν 10 ml άγαρ με σύσταση 20 g/l agar, 3 g/l NaCl και 25 mM K-PO<sub>4</sub> buffer [pH 6]. Τα πιάτα αυτά πρέπει να προετοιμάζονται την προηγούμενη ημέρα του κάθε πειράματος και να στεγνώνουν σε RT για περίπου 18h.

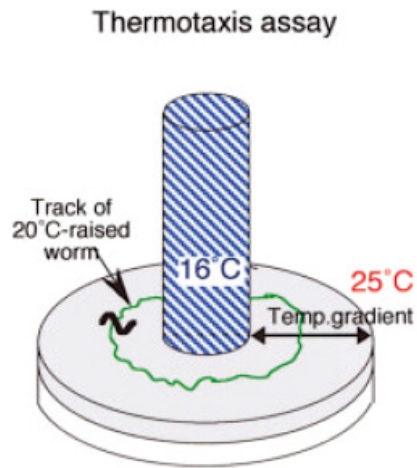


### Κλινές θερμοκρασίας

Για τη δημιουργία του θερμοκρασιακού κλινούς χρησιμοποιούνται γυάλινα σωληνάκια διαμέτρου 2,5 cm και μήκους 10 cm και στα οποία προστίθενται 20 ml κρυσταλλικό οξικό οξύ. Η συγκεκριμένη ένωση έχει σημείο τήξης τους 17 °C και θα χρησιμοποιηθεί ως ψυχρή πηγή του κλινούς. Τα σωληνάκια αυτά τοποθετούνται στους -80°C για μερικές ώρες και στη συνέχεια αποθηκεύονται στους 4°C.

### **Μέθοδος**

- 30 ενήλικα άτομα από συγχρονισμένη καλλιέργεια επωάζονται σε σταθερή θερμοκρασία 20oC για 16h.
- 1h πριν τη δοκιμασία τα assay plates στεγνώνουν σε RT.
- 30 min πριν τη δοκιμασία τα σωληνάκια με το παγωμένο οξικό οξύ αφήνονται σε RT μέχρι αυτό να αρχίσει να λιώνει.
- Τα σωληνάκια με το οξικό οξύ τοποθετούνται στο κέντρο της πίσω πλευράς των assay plates πάνω σε μια σταγόνα γλυκερόλης και αφήνονται σε RT για περίπου 15 min ώστε να σχηματιστεί το θερμοκρασιακό κλινές (Εικόνα 3).
- Με τη χρήση τρίχας ένα άτομο μεταφέρεται στην άκρη κάθε πιάτου και αφήνεται ελεύθερο να κινηθεί για 1h.
- Τα σωληνάκια απομακρύνονται και το σκουλήκι νεκρώνεται με μερικές σταγόνες χλωροφορμίου που προσθέτουμε στο καπάκι του κάθε πιάτου.
- Τα σημάδια από την πορεία του κάθε ατόμου (track) πάνω στο assay plate σημειώνεται με λεπτό μαρκαδόρο.
- ! Η παρατήρηση αυτή γίνεται εξαιρετικά δύσκολη όταν το assay plate δεν είναι αρκετά στεγνό και όταν η ποσότητα του άγαρ σε αυτό είναι μεγάλη.
- Ο δείκτης θερμότητας υπολογίζεται ως το ποσοστό των ατόμων που πραγματοποίησαν θερμότητα.
- ! Ως θετικά χαρακτηρίζονται τα άτομα που κινούνται επάνω στην ισόθερμη που αντιστοιχεί στη θερμοκρασία καλλιέργειας. Στην πραγματικότητα όμως αυτό δεν συμβαίνει καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής και έτσι ως θετικά υπολογίζονται τα άτομα που έχουν διαγράψει το μισό τουλάχιστον της πορείας τους πάνω στην ισόθερμη.



**Εικόνα 3.** Σχηματική απεικόνιση της δοκιμασίας της θερμόταξης σε κυκλικό θερμοκρασιακό κλινές. Φαίνεται η διάταξη που ακολουθείται για το σχηματισμό του θερμοκρασιακού κλινούς και η πορεία που διαγράφεται από ένα άτομο του αγρίου τύπου το οποίο εκδηλώνει θερμόταξη.

#### 4. Δοκιμασία θερμόταξης σε πληθυσμό (population thermotaxis assay)

Εναλλακτικός τρόπος παρατήρησης της θερμόταξης είναι εκείνος στον οποίο δεν ελέγχονται μεμονωμένα άτομα αλλά ένας ολόκληρος πληθυσμός. Σε αυτήν την περίπτωση σχηματίζεται ακτινωτό κλινές θερμοκρασίας και όχι κυκλικό. Το μεγαλύτερο ίσως εμπόδιο στη συγκεκριμένη προσέγγιση είναι ο ακριβής σχηματισμός του κλινούς. Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε συσκευή PCR με δυνατότητα σχηματισμού θερμοκρασιακού κλινούς όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

#### Υλικά

##### Assay plates

Τα πιάτα στα οποία πραγματοποιείται ο έλεγχος της συμπεριφοράς της θερμόταξης σε αυτήν την περίπτωση είναι πιάτα που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση αντιδράσεων PCR (96 wells plate). Η περιφέρεια των πιάτων αυτών κλίνεται με χάρτινη ταινία και η εσωτερική επιφάνεια καλύπτεται με 10 ml άγαρ που έχει σύσταση 20 g/l agar, 3 g/l NaCl και 25 mM K-PO<sub>4</sub> buffer [pH 6]. Κάθε τέτοιο πιάτο μπορεί να αποθηκευτεί για περίπου μια εβδομάδα στους 4°C.

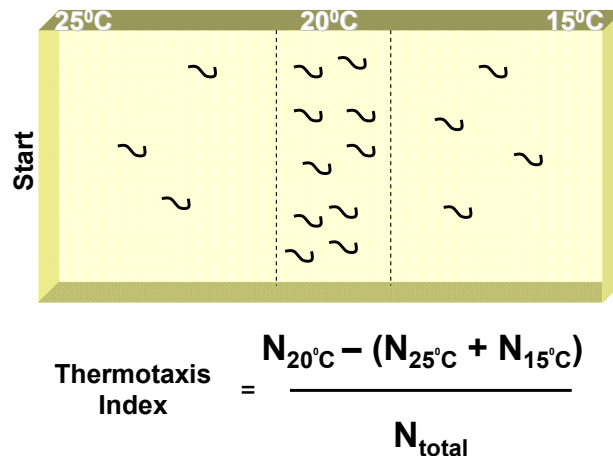
##### Θερμοκρασιακό κλινές

Στη συγκεκριμένη δοκιμασία σχηματίζεται ακτινωτό θερμοκρασιακό κλινές μεταξύ 25 και 15°C. Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε συσκευή PCR (Eppendorf-Mastercycler gradient) η

οποία έχει τη δυνατότητα σχηματισμού θερμοκρασιακού κλινούς. Μάλιστα, με τον τρόπο αυτό έχουμε τη δυνατότητα να γνωρίζουμε επακριβώς τη θέση που βρίσκεται η επιθυμητή θερμοκρασία στο πιάτο και επομένως να κάνουμε ακριβέστερες παρατηρήσεις σε σχέση με τη θέση των σκουληκιών και άρα την ικανότητά τους για θερμόταξη.

## Μέθοδος

Τα άτομα που χρησιμοποιούνται είναι όλα ενήλικα και προέρχονται από συγχρονισμένη καλλιέργεια ενώ έχουν επωαστεί για τουλάχιστον 6h στους 20°C. Τα άτομα αυτά συλλέγονται με assay buffer και πλένονται δυο φορές προκειμένου να απομακρυνθούν τα βακτήρια που τα περιβάλλουν. Στο μεταξύ το assay plate έχει αφεθεί να στεγνώσει για 20 min σε RT και έχει μεταφερθεί στη συσκευή PCR για 15 min ώστε να σχηματιστεί το κλινές της θερμοκρασίας. Τα άτομα μεταφέρονται στο θερμό άκρο του πιάτου (25°C) και αφήνονται για 45 min να μετακινηθούν ελεύθερα. Τέλος, το πιάτο μεταφέρεται στους 4°C οπότε και ακινητοποιούνται τα άτομα πριν από τη μέτρηση. Ο δείκτης θερμόταξης εδώ υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση της εικόνας (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Σχηματική απεικόνιση της δοκιμασίας της θερμόταξης σε ακτινωτό θερμοκρασιακό κλινές. Φαίνεται η κατανομή του πληθυσμού του αγρίου τύπου μετά τη δοκιμασία αλλά και η μαθηματική εξίσωση με την οποία υπολογίζεται ο δείκτης θερμόταξης.

## 5. Basal slowing

Ο νηματώδης εκδηλώνει διαφορετικές στρατηγικές για την προσέγγιση ή την παραμονή στην τροφή του. Μια από αυτές περιλαμβάνει τη μείωση της ταχύτητας κίνησής

του όταν βρεθεί σε περιβάλλον με τροφή (Sawin et al., 2000). Με τη συμπεριφορά αυτή ο νηματώδης διασφαλίζει το μέγιστο χρόνο παραμονής στο περιβάλλον όπου υπάρχει τροφή. Έτσι, μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί ότι ενώ σε πιάτο καλλιέργειας NGM χωρίς τροφή κινείται με μια ταχύτητα 20 bends/20 sec, μόλις συναντήσει βακτηριακή χλόη η ταχύτητά του μειώνεται στα 12-14 bends/20 sec. Εδώ χρειάζεται να σημειωθεί ότι η ταχύτητα κίνησης του νηματώδη υπολογίζεται ως ο αριθμός των κυρτώσεων του σώματός του (body bends) σε ένα χρονικό διάστημα 20 sec. Αυτό συμβαίνει διότι αφενός η κίνησή του είναι ημιτονοειδής (οπότε μετρούνται τα ύψη των κυμάτων που διαγράφει) και αφετέρου διότι με βάση το πρότυπο κίνησης του οργανισμού, τα διάστημα των 20 sec διασφαλίζουν ότι κάνει μια ολοκληρωμένη πρόσθια κίνηση. Η συγκεκριμένη συμπεριφορά βρέθηκε να είναι αποτέλεσμα απόκρισης σε μηχανικό ερέθισμα και γι' αυτό μπορεί να μετρηθεί τόσο παρουσία τροφής (βακτηριακή χλόη) όσο και παρουσία μικροσφαιριδίων σεφαρόζης (Sawin et al., 2000).

### **Μέθοδος**

- Περίπου 10 άτομα μεταφέρονται σε πιάτο NGM και αφήνονται για 5 min προκειμένου να απομακρυνθούν τα βακτήρια που τα περιβάλουν.
- Τα άτομα αυτά μεταφέρονται προσεχτικά με τρίχα σε πιάτο NGM το οποίο περιέχει φρέσκια βακτηριακή χλόη του στελέχους HB101.
- Ο αριθμός των κυρτώσεων του σώματός τους μετράται μετά από τουλάχιστον 2 min και για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 20 sec.
- Όταν η δοκιμασία γίνεται παρουσία σφαιριδίων σεφαρόζης, ακολουθείται η ίδια διαδικασία. Για το σχηματισμό όμως της επιφάνειας των μικροσφαιριδίων, 600 ml διαλύματος Sephadex beads G200 σε συγκέντρωση 30 mg / ml απλώθηκαν στην επιφάνεια πιάτων NGM. Η δοκιμασία έγινε μετά από 15 min επώασης των πιάτων αυτών σε RT προκειμένου να στεγνώσουν.

### **6. Δοκιμασία απόθεσης αυγών (egg laying assay)**

Η εναπόθεση αυγών από το ενήλικο άτομο είναι μια βασική αναπαραγωγική λειτουργία του οργανισμού. Κάθε άτομο του αγρίου τύπου παράγει ~250 αυγά μέσα στον αναπαραγωγικό του κύκλο. Ένα γονιμοποιημένο αυγό απελευθερώνεται μετά από τη συντονισμένη δράση μιας ομάδας καλά χαρακτηρισμένων μυών και νευρώνων. Η διαδικασία αρχίζει στο στάδιο της ενηλικίωσης και διαρκεί για περίπου 3 ημέρες. Σε αυτήν την περίοδο

παρατηρούνται χρονικά διαστήματα έντονης απόθεσης αυγών (bursts) παρά ένα συνεχές και ομοιόμορφα καταμεμημένο μοτίβο στο χρόνο. Έτσι, η καμπύλη του αριθμού των αυγών στο χρόνο έχει κωδωνοειδή κατανομή όπου ο υψηλότερος ρυθμός απόθεσης παρατηρείται στο μέσο της όλης διαδικασίας. Σημαντικοί ρυθμιστικοί παράμετροι είναι η περιβαλλοντική θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα τροφής, ο πληθυσμός αλλά και η παρουσία μηχανικών ερεθισμάτων.

Για τη μέτρηση του φαινοτύπου ακολουθήθηκαν δυο προσεγγίσεις. Κατά την πρώτη μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός αυγών ανά άτομο ενώ κατά τη δεύτερη ο ρυθμός απόθεσης αυγών. Και στις δυο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν 10 ενήλικα και εύρωστα άτομα ανά δοκιμασία, τα οποία μεταφέρθηκαν σε πιάτα με άφθονη τροφή όπου και παρέμειναν σε σταθερή θερμοκρασία 20°C. Για τον υπολογισμό του συνολικού αριθμού των αυγών ανά άτομο, και τα 10 άτομα μεταφέρθηκαν σε νέα πιάτα με τροφή στο τέλος κάθε ημέρας. Έτσι, μετά από 3 ημέρες αθροίστηκε ο αριθμός των αυγών και διαιρέθηκε με τον αριθμό των ατόμων. Για τον υπολογισμό του ρυθμού του egg laying τα 10 άτομα αφέθηκαν σε πιάτο με άφθονη τροφή για μια ώρα στους 20 °C και στη συνέχεια μετρήθηκε ο αριθμός των αυγών ανά άτομο ανά ώρα.

! Σε αυτή την περίπτωση χρειάζεται να επιλεγούν άτομα που βρίσκονται ακριβώς στο ίδιο στάδιο της διαδικασίας ώστε να μην προκύψουν διαφορές ανάμεσα στα στελέχη και οι οποίες να οφείλονται στο διαφορετικό αναπτυξιακό τους στάδιο.

## **7. Δοκιμασία αίσθησης μηχανικών ερεθισμάτων**

Σε ότι αφορά την αίσθηση μηχανικών ερεθισμάτων που γίνονται αντιληπτά από το σώμα του νηματώδη, αυτά μπορούν να διακριθούν σε δυο κατηγορίες με βάση την ένταση του μηχανικού ερεθίσματος αλλά και τους νευρώνες οι οποίοι είναι απαραίτητοι σε κάθε συμπεριφορά.

### **7.1. Gentle body touch**

Ο νηματώδης αντιλαμβάνεται και αποκρίνεται σε μικρής έντασης μηχανικά ερεθίσματα τα οποία φτάνουν κατά μήκος του σώματός του σε μια συμπεριφορά η οποία ονομάζεται gentle body touch. Για την αντίληψη των ερεθισμάτων αυτών ευθύνονται 6 νευρώνες-μηχανοϋποδοχείς οι οποίοι τοποθετούνται κατά μήκος του σώματος του οργανισμού. Μηχανικά ερεθίσματα που φτάνουν στο οπίσθιο μέρος του σώματος επάγουν

την πρόσθια κίνηση του νηματώδη, ενώ όταν αυτά φτάνουν στο πρόσθιο μέρος (μέχρι και πριν το φάρυγγα του ζώου) επάγουν την οπίσθια κίνηση (Tavernarakis and Driscoll, 1997).

Για τη μέτρηση του φαινοτύπου χρησιμοποιούνται ενήλικα και εύρωστα άτομα τα οποία μεταφέρονται σε καλλιέργεια με άφθονη τροφή όπου και αφήνονται σε ηρεμία για τουλάχιστον 2h. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται μια πολύ λεπτή τρίχα η οποία είναι στερεωμένη σε οδοντογλυφίδα. Μέσω της τρίχας ασκούνται διαδοχικά ερεθίσματα στον οργανισμό τόσο στο οπίσθιο, όσο και στο πρόσθιο τμήμα του και παρατηρούνται οι αντιδράσεις του οργανισμού. Ένα άτομο που έχει αντιδράσει από ένα μηχανικό ερέθισμα στην ουρά και κινείται σε πρόσθια κατεύθυνση διακόπτει την κίνησή του πηγαίνοντας σε αντίθετη κατεύθυνση όταν ένα επόμενο ερέθισμα φτάσει στο πρόσθιο τμήμα του σώματος. Για το στέλεχος του αγρίου τύπου, το ποσοστό των ατόμων που εκδηλώνουν αντίδραση σε άσκηση ήπιου μηχανικού ερεθίσματος κυμαίνεται στο 95%.

! Ο συγκεκριμένος φαινότυπος μπορεί να επηρεαστεί ισχυρά όταν η τρίχα δεν είναι αρκετά λεπτή ή αρκετά ενυδατωμένη. Επίσης, τα μηχανικά ερεθίσματα παύουν να γίνονται αντιληπτά μετά από διαδοχικές δοκιμές λόγω του φαινομένου του habituation.

## **7.2. Harsh touch**

Ο νηματώδης έχει επίσης την ικανότητα αντίληψης μηχανικών ερεθισμάτων μεγάλης έντασης. Σε αυτήν την περίπτωση ο νευρώνας PVD φαίνεται να έχει το ρόλο μηχανοϋποδοχέα. Έτσι, άτομα ανίκανα να αισθανθούν μηχανικά ερεθίσματα μικρής έντασης διατηρούν την ικανότητα απόκρισης σε ισχυρά μηχανικά ερεθίσματα εκδηλώνοντας κυρίως οπίσθια κίνηση. Για τη μέτρηση του συγκεκριμένου φαινοτύπου ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως και πριν με τη μόνη διαφορά ότι αντί για λεπτή τρίχα χρησιμοποιείται μικρό και λεπτό μεταλλικό έλασμα.

## **7.3. Nose touch**

Ο νηματώδης αντιλαμβάνεται μηχανικά ερεθίσματα τόσο από το περιβάλλον του όσο και από το ίδιο του το σώμα καθώς κινείται. Στην περίπτωση που συναντά κάποιο εμπόδιο κατά την πρόσθια κίνησή του αντιδρά, κινούμενο προς τα πίσω και εν συνεχεία αλλάζοντας την κατεύθυνσή του κινείται και πάλι μπροστά (Bargmann and Kaplan, 1998). Για τη μέτρηση του συγκεκριμένου φαινοτύπου 10 με 20 ενήλικα άτομα τοποθετούνται σε πιάτο με άφθονη τροφή. Χρησιμοποιούμε μια τρίχα στερεωμένη σε μια οδοντογλυφίδα και την τοποθετούμε

μπροστά από ένα άτομο που κινείται. Παρατηρούμε την αντίδραση του ατόμου το οποίο και θεωρούμε θετικό. Ο δείκτης του nose touch response όπως ονομάζεται είναι περίπου 95% για το στέλεχος του αγρίου τύπου. Στην περίπτωση που ένα άτομο δεν αντιδρά το ελέγχουμε και πάλι μετά από κάποιο χρονικό διάστημα και αν δούμε ότι αντιδρά το θεωρούμε θετικό.

! Όταν η τρίχα που τοποθετούμε δεν είναι εντελώς ακίνητη μπορεί να επάγει την αντίδραση ακόμα και από άτομα που έχουν αδυναμία για nose touch response. Το μέγεθος της τρίχας είναι σημαντικό αφού θα πρέπει να είναι τέτοιο που να γίνεται αντιληπτό από τον οργανισμό. Επίσης, οι δοκιμές δεν πρέπει να είναι συνεχείς για ένα δεδομένο άτομο αφού αυτό θα πάψει να αποκρίνεται λόγω του φαινομένου του habituation.

#### **8. Δοκιμασία αποφυγής δυσμενούς οσμωτικού περιβάλλοντος (osmotic avoidance assay)**

Με τη συγκεκριμένη συμπεριφορά ο νηματώδης αποφεύγει περιβάλλοντα με υψηλή οσμωτική συγκέντρωση όπως διαλύματα φρουκτόζης αλλά και NaCl (Culotti and Russell, 1978). Για τη συγκεκριμένη συμπεριφορά υπεύθυνος είναι κυρίως ο νευρώνας ASH του οποίου το σώμα βρίσκεται κοντά στο νευρικό δακτύλιο του ζώου και οι δενδρίτες του προεκβάλουν στο πρόσθιο άκρο της μύτης του ζώου.

Για τη μέτρηση του φαινοτύπου ακολουθήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται από τον Richard I. Morimoto (<http://www.biochem.northwestern.edu>). Έτσι, στην επιφάνεια ενός πιάτου NGM όπου δεν υπήρχε τροφή σχηματίστηκε ένας δακτύλιος διαμέτρου 2 cm από διάλυμα δεξτρόζης με συγκέντρωση 5M. Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν 50 μl του διαλύματος. Μετά από 5 min μεταφέρθηκαν στο κέντρο του δακτυλίου 20-30 άτομα τα οποία είχαν πρώτα καθαριστεί από τα βακτήρια με assay buffer. Τα άτομα αφέθηκαν ελεύθερα για 10 min και στη συνέχεια υπολογίστηκε το επί τοις εκατό ποσοστό των ατόμων που έμειναν μέσα στο δακτύλιο και άρα αποκρίθηκαν στην υψηλή οσμωτική συγκέντρωση.

#### **9. Locomotion**

Η κίνηση του οργανισμού χαρακτηρίζεται ως ημιτονοειδής καθώς ακολουθεί μια χαρακτηριστική κυματομορφή με συγκεκριμένα πλάτη και ύψη. Η κίνηση αυτή προκύπτει από τη συντονισμένη δράση τεσσάρων ομάδων μυών που διατρέχουν το σώμα του οργανισμού και οι οποίοι διεγείρονται από μια ομάδα κινητήριων νευρώνων. Για την εκδήλωση της ημιτονοειδούς κίνησης του οργανισμού απαιτείται η περιοδική σύσπαση και

χαλάρωση των παραπάνω μυών ενώ μια σειρά από νευρώνες και μόρια που συμβάλλουν σε αυτό έχουν χαρακτηριστεί (Tavernarakis and Driscoll, 1997; Tavernarakis et al., 1997).

Για τη μέτρηση των χαρακτηριστικών της κίνησης ενός στελέχους, 5 με 10 άτομα ενήλικου σταδίου μεταφέρονται σε πιάτο NGM με φρέσκια βακτηριακή χλόη του στελέχους OP50. Επωάζονται για περίπου 30 min σε συνθήκες απόλυτης ηρεμίας στους 20-25°C και στη συνέχεια οι διαδρομές των ατόμων στην επιφάνεια της χλόης καταγράφονται με τη χρήση κάμερας προσαρμοσμένης σε οπτικό στερεοσκόπιο. Ακολούθως μετρούνται σε mm τόσο το πλάτος όσο και το ύψος της ημιτονοειδούς καμπύλης.

## 10. Pharyngeal pumping

Ο φάρυγγας του *C. elegans* είναι μια δομή την οποία συνιστούν δυο λοβοί που σκοπό έχουν να συνθλίβουν την τροφή και να την προωθήσουν στο έντερο του οργανισμού. Η δομή αυτή αποτελείται κυρίως από μυϊκά κύτταρα (34)τα οποία νευρώνονται από 20 νευρικά κύτταρα (Albertson and Thomson, 1976). Για τη σωστή λειτουργία του φάρυγγα απαιτούνται δυο βασικές κινήσεις που είναι η παγίδευση της τροφής από τον πρώτο λοβό και η προώθησή της στο δεύτερο μέσω κατάλληλης περισταλτικής κίνησης. Για τον έλεγχο της λειτουργίας του φάρυγγα υπολογίζεται ο αριθμός αυτών των περισταλτικών κινήσεων ανά λεπτό.

## 11. Defecation

Το defecation είναι ένας ουλτραδικός ρυθμός που συναντάται στο *C. elegans*. Ο οργανισμός αποβάλλει τα παραπροϊόντα της πέψης της τροφής του, αλλά και μέρος αυτής (βακτήρια) από την έδρα του (anus), με τη διαδοχική σύσπαση και χαλάρωση μιας ομάδας μυών. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται κάθε 45 sec περίπου και είναι γνωστό ότι ελέγχεται από βιογενείς αμίνες όπως η σεροτονίνη και η ντοπαμίνη (Schafer and Kenyon, 1995), ενώ επηρεάζεται από την παρουσία τροφής, το αναπτυξιακό στάδιο αλλά και την ύπαρξη μηχανικών ερεθισμάτων.

Για τη μέτρηση του φαινοτύπου 20 ενήλικα άτομα τοποθετήθηκαν σε πιάτο με άφθονη τροφή και αφέθηκαν για 2 περίπου ώρες στους 20 °C. Στη συνέχεια κάθε άτομο παρακολουθείται στο στερεοσκόπιο και μετρούνται τα χρονικά διαστήματα που μεσολαβούν σε κάθε κύκλο συστολής και διαστολής των μυών του ζώου.



! Μεγάλες αποκλίσεις στις μετρήσεις μπορούν να προκύψουν αν κατά την παρατήρηση των ατόμων ασκηθούν μηχανικά ερεθίσματα, αν ο αριθμός των ατόμων της καλλιέργειας είναι μεγάλος ή αν τα άτομα δεν είναι ενήλικα.

Περιεχόμενα

## Δ) ΓΕΝΕΤΙΚΗ

### Σκοπός

Για το σχηματισμό διπλά μεταλλαγμένων στελεχών αλλά και την παρατήρηση μετασχηματισμένων ατόμων σε μεταλλαγμένο γενετικό υπόβαθρο πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις ανάμεσα στα αντίστοιχα στελέχη ή στελέχη και διαγονιδιακά άτομα (Liu and Sternberg, 1995; Loer and Kenyon, 1993; Ward and Carrel, 1979). Η επιλογή του στελέχους ή της διαγονιδιακής σειράς απ' όπου θα χρησιμοποιηθούν αρσενικά άτομα γίνεται με βάση την ικανότητα ζευγαρώματος (mating). Από τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν κανένα δεν παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα ζευγαρώματος, ενώ από τις διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν προέκυψαν τα στελέχη: α) *mec-4(u231);p<sub>asic-1</sub>GFP*, β) *asic-1(ok415);dat-1(tm903)* και γ) *asic-1(ok415);cat-2(e1112)*

### Αρσενικά άτομα

Τα αρσενικά άτομα έχουν γονότυπο XO και προκύπτουν από το μη αποχωρισμό των φυλετικών αδελφών χρωματίδων κατά τις μειωτικές διαιρέσεις των γαμετικών κυττάρων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η συχνότητα εμφάνισής τους είναι περίπου 1‰ ενώ το ποσοστό αυτό αυξάνεται υπό συνθήκες στρες. Έτσι, 5 άτομα σταδίου L4 επωάζονται για 4h στους 34°C και συλλέγονται αρσενικά άτομα από τους απογόνους τους.

### Διασταυρώσεις

Κάθε διασταύρωση πραγματοποιήθηκε σε πιάτα όπου μια μικρή μόνο επιφάνειά της ήταν καλυμμένη με βακτήρια ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα συνεύρεσης των ατόμων. Εκεί τοποθετήθηκαν αρσενικά και ερμαφρόδιτα άτομα σε αναλογία (3/8). Για να θεωρηθεί μια διασταύρωση επιτυχημένη παρατηρούνται τα άτομα της γενιάς F1 στα οποία το ποσοστό των αρσενικών ατόμων πρέπει να είναι περίπου 50%. Από την γενιά F1 παίρνουμε 5 ερμαφρόδιτα άτομα και τα τοποθετούμε ξεχωριστά σε νέα πιάτα όπου και αφήνουν αυγά. Τα άτομα αυτά θα πρέπει να είναι όλα ετερόζυγα για την κάθε μεταλλαγή και στην περίπτωση που αυτές είναι υποτελείς θα πρέπει να έχουν φαινότυπο αγρίου τύπου. Από τα άτομα της γενιάς F2 τα ομόζυγα και για τις δυο μεταλλαγές προκύπτουν σε αναλογία 1/16 καθώς η κληρονομικότητα ακολουθεί Μεντελιανό πρότυπο. Ο έλεγχος για την εκάστοτε μεταλλαγή

γίνεται είτε μέσω του φαινοτύπου είτε μέσω αντίδρασης PCR όταν η μεταλλαγή είναι μια έλλειψη που δεν προκαλεί μορφολογικές ή ανατομικές ανωμαλίες.

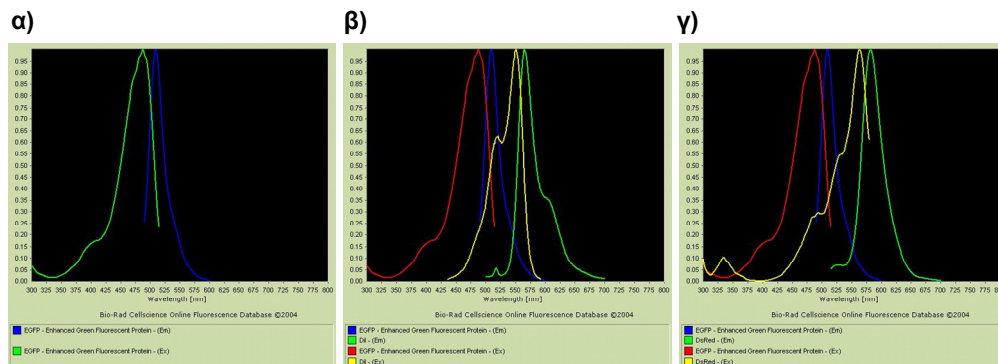
Στην περίπτωση διασταυρώσεων με διαγονιδιακά άτομα η επιλογή γίνεται με βάση το δείκτη μετασχηματισμού (cotransformation marker) και λαμβάνεται υπόψη ότι η κληρονομικότητά του δεν ακολουθεί Μεντελιανό πρότυπο λόγω του φαινομένου του μωσαϊκισμού.

Περιεχόμενα

## Ε) Μικροσκοπία

### 1. Συνεστιακή μικροσκοπία

Για την παρατήρηση ατόμων *C. elegans* στο συνεστιακό ή οπτικό μικροσκόπιο ακολουθήθηκε κοινή πρακτική προετοιμασίας των δειγμάτων. Έτσι, τα άτομα μιας καλλιέργειας του νηματώδη, συνήθως ασύγχρονης συλλέχθηκαν με τη χρήση 1,5 ml M9. Μετά από 2-3 διαδοχικές πλύσεις αφέθηκαν ελεύθερα να συγκεντρωθούν στον πάτο ενός σωλήνα erlenmeyer και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο διάλυμα. Στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος  $\text{NaN}_3$  συγκέντρωσης 20 mM για την αναισθητοποίηση των ατόμων. Ακολούθως, 13  $\mu\text{l}$  (τα παίρνουμε με απότομη κίνηση) μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και τα σκεπάζουμε με coverslip. Τέλος, κλείνουμε τις άκρες με τη χρήση μανό ώστε να μην εξατμιστεί το διάλυμα και αποξηραθούν τα ζώα. Εναλλακτικά, είναι δυνατό να τοποθετήσουμε τα ζώα πάνω σε φρέσκο agarose pad που έχουμε τοποθετήσει στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Σε αυτή την περίπτωση, σκεπάζουμε τα ζώα με κατάλληλο coverslip χωρίς να είναι απαραίτητη η μόνωση με μανό. Το αναισθητικό  $\text{NaN}_3$  προκαλεί μετά από μικρό χρονικό διάστημα το θάνατο των ζώων που παρατηρούμε καθώς μπλοκάρει την αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Αυτό δεν αποτελεί συνήθως πρόβλημα για πειράματα όπου μελετάται το μοτίβο έκφρασης κάποιων γονιδίων ή ο υποκυτταρικός εντοπισμός κάποιων πρωτεϊνών. Για πειράματα όμως που μελετώνται *in vivo* δυναμικά φαινόμενα (π.χ. ενεργότητα συνάψεων) απαιτείται τα ζώα να είναι ακινητοποιημένα και ζωντανά.



**Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση των φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής ακτινοβολίας από το φοριζόμενο μάρτυρα της eGFP (α). Επίσης, φαίνονται τα φάσματα μεταξύ eGFP και DiI (β) και eGFP και DsRED (γ) σε πειράματα συνεντοπισμού.**

Σε αυτές τις περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ως αναισθητικά οι ανταγωνιστές των υποδοχέων ακετυλοχολίνης, levamisole ή tetramisole ή ο ανταγωνιστής καναλιών νατρίου, tricaine σε συγκεντρώσεις 10-50 mM. Παράλληλα, είναι δυνατή η χρήση κόλλας (ethyl-cyanoakrylate) ή κατάλληλα μεταλλαγμένου γενετικού υπόβαθρου (Unc). Το συνεστιακό μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση κυττάρων του νηματώδους που εξέφραζαν φθορίζοντα μόρια μάρτυρες. Έτσι, αναγνωρίστηκε το μοτίβο έκφρασης γονιδίων και ο υποκυτταρικός τους εντοπισμός είτε με απλή παρατήρηση του φθορίζοντα μάρτυρα της eGFP (S65C) (Εικόνα 5α), είτε με πειράματα συνεντοπισμού με τη χρωστική Dil (Εικόνα 5β) και το φθορίζοντα μάρτυρα DsRED (Εικόνα 5γ).

## 2. Dye Filling

Η εφαρμογή της μεθόδου Dye filling στον *C. elegans* έχει ως αποτέλεσμα τη χρώση 11 ζευγών χημειο-αισθητήριων νευρώνων που βρίσκονται στο σπρόσθιο τμήμα του οργανισμού (amphids) και 3 ζεύγη στην ουρά του (rhasmids). Οι νευρώνες αυτοί διαθέτουν δενδρίτες που προεκβάλλουν στο εξωτερικό περιβάλλον μέσω ενός πόρου που σχηματίζουν τα shocket και sheath cells, ενώ οι απολήξεις τους εμφανίζονται πεπλατυσμένες πιθανότατα για την καλύτερη αίσθηση των χημικών ερεθισμάτων. Σε αυτή τη μορφολογική και τοπολογική ιδιότητα των νευρώνων χημειοϋποδοχέων βασίζεται η χρώση με λιπόφιλες φθορίζουσες χρωστικές με μέθοδο που ονομάζεται Dye filling.

Άτομα του νηματώδη εμβαπτίζονται σε διάλυμα της λιπόφιλης χρωστικής και καθώς οι παραπάνω νευρώνες έρχονται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον προκύπτει σήμανση των μεμβρανών τους. Εδώ χρειάζεται να σημειωθεί ότι εκτεταμένη χρώση παρατηρείται και στους μύες του φάρυγγα του οργανισμού αλλά και στο έντερο το οποίο επίσης έρχεται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία αυτή ποικίλουν σε σχέση με τις ιδιότητές τους όπως το μήκος κύματος απορρόφησης και εκπομπής φθορίζουσας ακτινοβολίας. Εδώ έγινε χρήση της χρωστικής Dil (Molecular probes, D-384, D-3911) η οποία έχει μέγιστο απορρόφησης στα 549 nm και μέγιστο εκπομπής στα 565 nm (εικόνα 5β). Με τον τρόπο αυτό γίνεται δυνατή η ταυτόχρονη παρακολούθηση νευρώνων οι οποίοι έχουν σημειωθεί με Dil αλλά εκφράζουν και το φθορίζοντα μάρτυρα της GFP.

## Μέθοδος

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι μια τροποποιημένη εκδοχή της μεθόδου που περιγράφηκε από τον Michael Koelle ([http://info.med.yale.edu/mbb/koelle/protocols/protocol\\_dye\\_filling\\_sens.html](http://info.med.yale.edu/mbb/koelle/protocols/protocol_dye_filling_sens.html))

- Παρασκευάζουμε διάλυμα όπου μια ποσότητα της χρωστικής διαλύεται σε διάλυμα M9 έως ότου το διάλυμα κορεστεί.
- Συλλέγουμε τα άτομα μιας καλλιέργειας και τα ξεπλένουμε τουλάχιστο δυο φορές.
- Προσθέτουμε 1 ml διαλύματος M9.
- Προσθέτουμε 5 μl από το διάλυμα της χρωστικής.
- Επωάζουμε για 1h στους 20°C.
- Μεταφέρουμε τα άτομα σε νέα καλλιέργεια και τα αφήνουμε για τουλάχιστον 16h στους 15°C ώστε να γίνει αποχρωματισμός του φάρυγγα και του εντέρου.
- Τα άτομα συλλέγονται και παρατηρούνται σε συνεστιακό μικροσκόπιο η μικροσκόπιο φθορισμού.

Μια ομάδα νευρώνων στους οποίους μπορεί επίσης να γίνει χρώση με Dil είναι οι ILs. Καθώς οι συγκεκριμένοι νευρώνες δεν προεκβάλλουν στο εξωτερικό περιβάλλον με τον τρόπο που το κάνουν οι χημειοαισθητήριοι, η χρώση τους απαιτεί μια εναλλακτική μέθοδο. Έτσι, η χρωστική διαλύεται σε H<sub>2</sub>O αντί σε διάλυμα M9 και τα άτομα συλλέγονται επίσης με H<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα οξικού ασβεστίου σε τελική συγκέντρωση 50 mM. Οι χρόνοι επώασης στη συνέχεια παραμένουν σταθεροί όπως και πριν.

### 3. Formaldehyde-Induced Fluorescence (FIF)

Με τη μέθοδο αυτή γίνεται επαγωγή του φθορισμού από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του *C. elegans*. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε, αρχικά περιγράφηκε από τον (Sulston et al., 1975). Έτσι, 5-10 άτομα τοποθετούνται σε μια σταγόνα από 5 μl διαλύματος παραφορμαλευδης (4% paraformaldehyde in 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) η οποία έχει τοποθετηθεί επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Γίνεται επώαση για 5 min σε RT. Στη συνέχεια αφαιρείται το διάλυμα με τη χρήση χαρτιού Kim wipe και ακολουθεί θέρμανση στους 100°C για 10 min. Ακολούθως, τα άτομα καλύπτονται με μια σταγόνα γλυκερόλης και ένα

coverslip. Η παρατήρηση γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού όπου χρησιμοποιούνται τα κατάλληλα φίλτρα (απορρόφηση: 395-440 nm; εκπομπή: 470 nm long pass).

#### 4. FRAP

Για την *in vivo* μέτρηση της ενεργότητας των ντοπαμινεργικών συνάψεων εφαρμόστηκε η μέθοδος του Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). Η μέτρηση της ενεργότητας μιας σύναψης, δηλαδή του ρυθμού απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή αλλά και της ενεργότητας ενός νευρώνα, δηλαδή του ρυθμού εκπόλωσης του μπορούν να γίνουν με κλασσικές μεθόδους ηλεκτροφυσιολογίας. Οι μέθοδοι αυτοί όμως πολύ σπάνια βρίσκουν εφαρμογή στο νηματώδη εξαιτίας του μικρού μεγέθους των νευρώνων του αλλά και της δύσκολης προσβασιμότητάς τους. Στην περίπτωση δε των ντοπαμινεργικών νευρώνων μια τέτοια προσέγγιση καθίσταται ανέφικτη δεδομένου ότι αυτοί βρίσκονται στο νευρικό δακτύλιο του ζώου μαζί με περίπου 100 άλλους νευρώνες.

Έτσι, έγινε σήμανση των συνάψεων με το φθορίζοντα μάρτυρα super ecliptic pHluorin (SEpHluorin). Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκε πλασμιδιακός φορέας έκφρασης όπου το χιμαιρικό μόριο μεταξύ της πρωτεΐνης synaptobrevin (SNB-1) και της SEpHluorin εκφράστηκε υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *asic-1* (βλέπε Β.5). Η SEpHluorin είναι συνδεδεμένη με το καρβοξυτελικό άκρο της SNB-1 η οποία διαπερνά τη μεμβράνη των συναπτικών κυστιδίων έχοντας το καρβοξυτελικό της άκρο στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης τους. Έτσι, η SEpHluorin τοποθετείται αρχικά στο εσωτερικό των συναπτικών κυστιδίων ενώ μετά την εξωκύτωση του νευροδιαβιβαστή στη σύναψη περνά στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Λόγω των ιδιοτήτων του μορίου αυτού, φθορισμός παράγεται μόνο όταν τοποθετείται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης, δηλαδή μετά την εξωκύτωση νευροδιαβιβαστή και όχι όταν βρίσκεται στο όξινο περιβάλλον των συναπτικών κυστιδίων. Αρχικά ο φθορισμός εξαλείφθηκε με την ακτινοβολία με δέσμη laser υψηλής έντασης και εν συνεχεία έγινε καταγραφή της αύξησης του φθορισμού στις συνάψεις.

#### Μέθοδος

- Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε διαγονιδιακά άτομα τόσο του αγρίου τύπου όσο και με μεταλλαγμένο γενετικό υπόβαθρο *asic-1(ok415)*.

- Σε κάθε δοκιμασία 5 άτομα ενήλικου σταδίου μεταφέρθηκαν σε φρέσκο agarose pad 2%.
- Για την ακινητοποίηση των ζώων προστέθηκαν 5 μl του αναισθητικού tetramisole σε συγκέντρωση 20 mM σε M9 και ακολούθως σκεπάστηκαν με ένα λεπτό coverslip.
- Η παρατήρηση έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Zeiss Axioscop with a Bio-Rad Radiance 2100 scanhead, Bio-Rad, Hercules, USA) με τη χρήση του λογισμικού Bio-Rad LaserSharp 2000.
- Για τη διέγερση της SEpHluorin χρησιμοποιήθηκε laser τύπου Argon με φίλτρο
- Για την παρατήρηση του παραγόμενου φθορισμού χρησιμοποιήθηκε φίλτρο με εύρος φάσματος
- Αρχικά έγινε photobleaching σε τρεις κύκλους των 5 sec με ένταση laser στο 50%. (5 mW)
- Η παρατήρηση της ανάκτησης του φθορισμού (recovery) έγινε σε 20 κύκλους των 10 sec και σε ένταση laser 10% (1 mW).
- Οι μετρήσεις της έντασης του φθορισμού έγιναν με το πρόγραμμα ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).
- Η απεικόνιση του ρυθμού ανάκτησης του φθορισμού έγινε με τον υπολογισμό της εκατοστιαίας αύξησής του σε κάθε κύκλο του recovery.

Περιεχόμενα



## Παράρτημα Α

**Εφαρμογή μεθόδων μη γραμμικής μικροσκοπίας στον  
οργανισμό *Caenorhabditis elegans***

## Περίληψη

Στη συγκεκριμένη εργασία περιγράφεται η προσπάθεια εφαρμογής μεθόδων μη γραμμικής μικροσκοπίας στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans*. Συγκεκριμένα έγινε προσπάθεια καταγραφής σήματος δεύτερης (SHG) και τρίτης (THG) αρμονικής που προκύπτει από τους ιστούς του οργανισμού αλλά και σήματος διφωτονικού φθορισμού (TPEF) από την έκφραση του φθορίζοντα μάρτυρα της GFP. Κατά την εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων μη γραμμικής μικροσκοπίας ελαττώνονται τα φαινόμενα φωτοτοξικότητας και απαλοιφής των φθορίζοντων μορίων. Παράλληλα, επιτυγχάνεται η καλύτερη απεικόνιση των βιολογικών δομών εξαιτίας της μεγαλύτερης διεισδυτικότητας και του μικρότερου εκτός εστίασης σήματος που παράγεται. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα femtosecond laser και αναπτύχθηκε ένα σχετικά απλό και αξιόπιστο σύστημα εφαρμογής μη γραμμικής μικροσκοπίας στον *C.elegans* με το οποίο επιτεύχθηκε η υψηλής ευκρίνειας απεικόνιση συγκεκριμένων νευρικών κυττάρων αλλά και μυϊκών ιστών του οργανισμού. Έτσι, με την εφαρμογή μεθόδων μη γραμμικής μικροσκοπίας έγινε εφικτή η παρακολούθηση αλλαγών στη δομή και τη λειτουργία των νευρικών κυττάρων του νηματώδη.

Περιεχόμενα

## Summary

In this work is described the application of non-linear microscopy in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Second-harmonic generation (SHG) and two-photon excitation fluorescence (TPEF) are relatively new and promising tools for the detailed imaging of biological samples and processes at the microscopic level. By exploiting these nonlinear phenomena, phototoxicity and photobleaching effects on the specimens are reduced dramatically. The main target of this work was the development of a compact inexpensive and reliable experimental apparatus for nonlinear microscopy measurements. Femto-second laser pulses were utilized for excitation. We achieved high-resolution imaging and mapping of *C. elegans* neurons and muscular structures of the pharynx, at the microscopic level by performing SHG, THG and TPEF measurements. By detecting these nonlinear phenomena, it is feasible to extract valuable information concerning the structure and the function of nematode neurons.

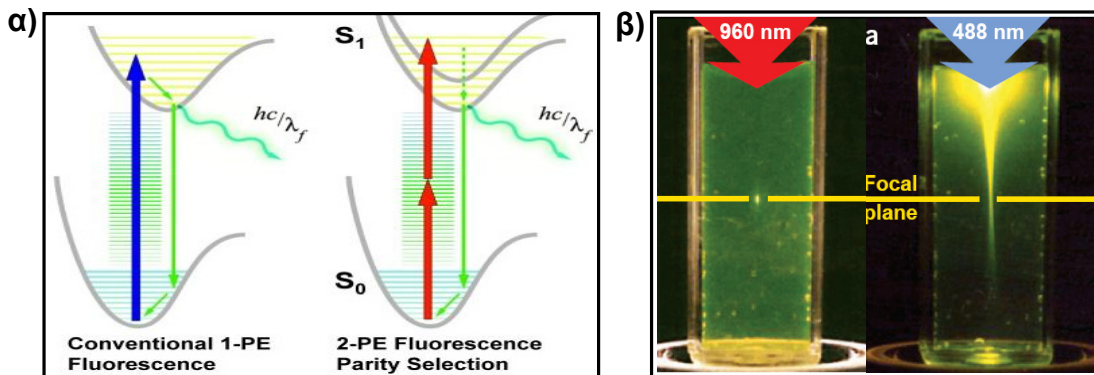
Περίεχόμενα

## Εισαγωγή

Τα φαινόμενα μη γραμμικής μικροσκοπίας έχουν αποδειχτεί χρήσιμα εργαλεία για την παρακολούθηση βιολογικών διαδικασιών. Τέτοια φαινόμενα είναι ο διφωτονικός φθορισμός (Two Photon Excitation Fluorescence ή TPEF) (Denk et al., 1990; Dufour et al., 2006; Maiti et al., 1997) και η παραγωγή δευτέρων (Second Harmonic Generation ή SHG) (Campagnola et al., 2001; Campagnola and Loew, 2003; Moreaux et al., 2003) και τρίτων αρμονικών (Third Harmonic Generation ή THG) (Debarre et al., 2006a; Debarre et al., 2005) δεδομένης ακτινοβολίας που διέρχεται από ένα υλικό. Σε τέτοιες εφαρμογές η πληροφορία που αντλείται δεν είναι κοινή αλλά αντίθετα συμπληρωματική. Έτσι, η ταυτόχρονη εφαρμογή τους κατά την παρατήρηση ενός βιολογικού δείγματος παρέχει διαφορετικές και αλληλοσυμπληρούμενες πληροφορίες τόσο για τις διαφορετικές βιολογικές δομές όσο και για τις βιολογικές διαδικασίες οι οποίες λαμβάνουν χώρα (Filippidis et al., 2005; Zoumi et al., 2002). Οι διαφορετική πληροφορία που προκύπτει από το κάθε φαινόμενο πηγάζει από τις διαφορές στην αρχή σχηματισμού δεύτερης αρμονικής, τρίτης αρμονικής και διφωτονικού φθορισμού (Botvinick and Shah, 2007; So et al., 2000). Ποιες είναι όμως οι διαφορές αυτές και πώς επηρεάζουν σε πρακτικό επίπεδο την εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων για την παρατήρηση των βιολογικών διαδικασιών;

Ο διφωτονικός φθορισμός προκύπτει από τη διέγερση ενός φθορίζοντος μάρτυρα (GFP) ο οποίος αποδιεγείρεται με τον κλασσικό τρόπο δίνοντας ένα φωτόνιο χαμηλότερης ενέργειας και συνεπώς υψηλότερου μήκους κύματος. Η διαφορά του τρόπου αυτού φθορισμού από τον μονοφωτονικό έγκειται στο γεγονός ότι για τη διέγερσή του απαιτείται η συνεισφορά δυο φωτονίων χαμηλότερης ενέργειας σε σχέση με αυτή του ενός φωτονίου. Πρακτικά, το μόριο της GFP απαιτεί για τη διέγερσή του την ακτινοβολία με φωτόνια δεδομένης ενέργειας  $\epsilon$  και μήκους κύματος  $\lambda$  ίσου με 488nm. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται παλμικό laser που παράγει ανα μικρά χρονικά διαστήματα φωτόνια στην περιοχή του υπέρυθρου (μήκους κύματος 1028nm) γίνεται αντιληπτό ότι τα παραγόμενα αυτά φωτόνια δε διαθέτουν την απαιτούμενη ενέργεια για τη διέγερση της GFP. Στην περίπτωση όμως που η εκπεμπόμενη ακτινοβολία είναι ισχυρά εστιασμένη, τότε ακριβώς στο σημείο εστίασης (focal point) η υψηλή συγκέντρωση φωτονίων προκαλεί τη μετάβαση ορισμένων από αυτά σε ένα παροδικό ενεργειακό επίπεδο που προσομοιάζει αυτό ενός φωτονίου διπλάσιας ενέργειας και μισού μήκους κύματος. Σε αυτή την περίπτωση και μόνο στο σημείο εστίασης θα προκύψουν φωτόνια τα οποία διαθέτουν την απαιτούμενη ενέργεια για τη διέγερση της GFP και τα οποία έχουν προκύψει από τη συνεισφορά της ενέργειας δυο φωτονίων. Από το σημείο της διέγερσης της GFP και μετά ακολουθεί η αποδιέγερσή της και

εκπομπή ενός φωτονίου μικρότερης ενέργειας και υψηλότερου μήκους κύματος. Έτσι, από την πηγή προκύπτουν φωτόνια μήκους κύματος  $\lambda=1028\text{nm}$  (υπέρυθρο) και ενέργειας  $\epsilon$ . Στο σημείο εστίασης της ακτινοβολίας κάποια από αυτά αποκτούν τη διπλάσια ενέργεια  $2\epsilon$  και συνεπώς το μισό μήκος κύματος ( $\lambda/2$ ), δηλαδή  $514\text{nm}$  (μπλε). Αυτά διεγείρουν το μόριο της GFP το οποίο όταν αποδιεγερθεί εκπέμπει φωτόνια μικρότερης ενέργειας και μεγαλύτερου μήκους κύματος  $520\text{nm}$  (πράσινο) (Εικόνα 1). Με τον τρόπο αυτό περιορίζονται σημαντικά φαινόμενα φθορισμού εκτός εστίασης καθώς η ενέργεια των εκπεμπόμενων φωτονίων δεν μπορεί ποτέ να είναι ικανή για διέγερση της GFP σε άλλο εστιακό επίπεδο (Εικόνα 1). Το αποτέλεσμα αυτής της ιδιότητας της μεθόδου είναι η αύξηση της ευκρίνειας και του εστιακού βάθους κατά την παρατήρηση σχετικά μεγάλων βιολογικών δειγμάτων, ενώ και το φαινόμενο της φωτοτοξικότητας περιορίζεται για τα εκτός εστιακού επιπέδου μόρια (Εικόνα 1) (Xu et al., 1996). Αυτός είναι και ο λόγος που η ευκρίνεια που επιτυγχάνεται από τον διφωτονικό φθορισμό είναι υψηλότερη σε σχέση με αυτή άλλων μεθόδων μονοφωτονικού φθορισμού όπως του confocal (Cox and Sheppard, 2004).



**Εικόνα 1: Αρχή του φαινομένου του διφωτονικού φθορισμού (TPEF).** (α) Σχηματική απεικόνιση των αλλαγών της ενεργειακής κατάστασης των φωτονίων που διεγείρουν το φθορίζοντα μάρτυρα της GFP. Σύγκριση ανάμεσα στο μονοφωτονικό και διφωτονικό φθορισμό. (β) Συγκριτική απεικόνιση του φθορισμού που προκύπτει από τον μονοφωτονικό (δεξιά) και διφωτονικό φθορισμό (αριστερά). Φαίνεται ότι κατά το διφωτονικό φθορισμό η διέγερση του φθορίζοντος μορίου λαμβάνει χώρα μόνο στο σημείο εστίασης και όχι έξω από αυτό.

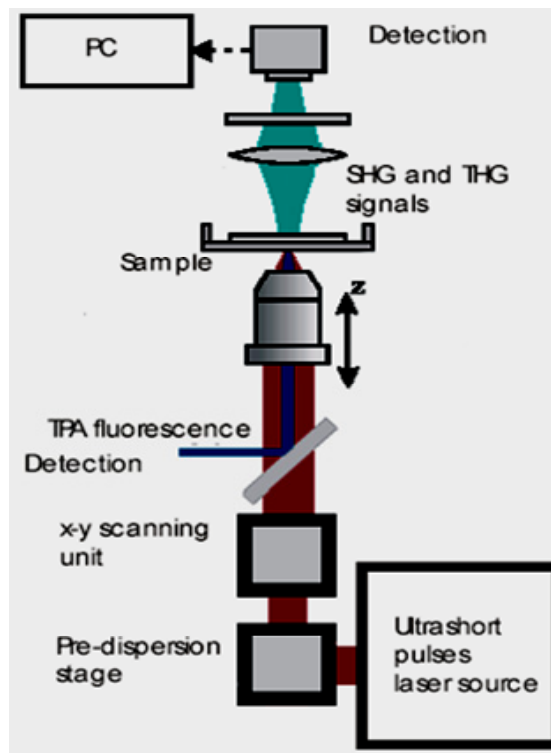
Αντίθετα με το διφωτονικό φθορισμό, η παραγωγή της δεύτερης αρμονικής οφείλεται στη σκέδαση που προκαλεί το μέσο το οποίο ακτινοβολείται και δεν περιλαμβάνει την απορρόφηση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας από το δείγμα (Oheim et al., 2006). Η παραγωγή της λαμβάνει χώρα όταν το ακτινοβολούμενο μέσο παρουσιάζει επαναλαμβανόμενες δομές με χαρακτηριστική ασυμμετρία. Έτσι, αν η ακτινοβολία που

χρησιμοποιείται και έχει μήκος κύματος  $\lambda$  και συχνότητα  $\omega$ , μετά τη σκέδαση στο δείγμα μετατρέπεται σε ακτινοβολία μήκος κύματος  $\lambda/2$  και συχνότητας  $2\omega$ . Σύμφωνα με το παραπάνω παράδειγμα αν η παραγόμενη από το laser ακτινοβολία είναι μήκους κύματος 1028nm, τότε η δεύτερη αρμονική αυτής της ακτινοβολίας έχει μήκος κύματος 514nm. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται δυνατή η καταγραφή σήματος από ιστούς του νηματώδη οι οποίοι φέρουν τα κατάλληλα χαρακτηριστικά, που όπως αναφέρθηκε είναι η επαναλαμβανόμενη τοποθέτηση μη συμμετρικών δομών. Τέτοιες δομές είναι τα ινίδια ακτίνης και μυσίνης στους μύες αλλά και ιστοί πλούσιοι σε κολλαγόνο. Εντούτοις, είναι σημαντικό ότι και το ίδιο το μόριο της GFP δύναται να παράξει δεύτερη αρμονική εφόσον η τοποθέτησή του στο κύτταρο εμφανίζεται επαναλαμβανόμενη. Η ιδιότητα του μορίου που επιτρέπει την εκδήλωση του φαινομένου είναι το γεγονός ότι και αυτό παρουσιάζει χαρακτηριστική ασυμμετρία, όπως σχολιάζεται στη συνέχεια. Αντίθετα, ελεύθερα κυτταροπλασματικά μόρια του μάρτυρα ενώ διατηρούν την ικανότητά τους για διφωτονικό φθορισμό δεν παράγουν δεύτερη αρμονική.

Η τρίτη αρμονική (THG) τέλος προκύπτει από αλλαγές στο δείκτη διάθλασης εντός του δείγματος (Debarre et al., 2005). Πρόκειται για μια μορφή μη γραμμικής μικροσκοπίας με την οποία καθίσταται δυνατή η παρατήρηση ασυνεχειών εντός του δείγματος όπως για παράδειγμα συμβαίνει κατά την παρατήρηση διαφορετικών ιστών σε έναν οργανισμό (Schins and Muller, 2002). Έχει βρεθεί ότι τρίτη αρμονική προκύπτει κατά την ακτινοβολήση λιπιδικών στοιβάδων, δηλαδή των μεμβρανών των κυττάρων ενός ιστού αλλά και εντός του κυττάρου από διαφορετικές υποκυτταρικές περιοχές και οργανίδια (Debarre et al., 2006b). Έτσι, αν ένα δείγμα με χαρακτηριστικές ασυνέχειες ακτινοβολείται με φώς μήκους κύματος  $\lambda$  και συχνότητας  $\omega$ , μετά την πρόσπτωση στο δείγμα παράγεται ακτινοβολία μήκος κύματος  $\lambda/3$  και συχνότητας  $3\omega$ . Σύμφωνα με το παραπάνω παράδειγμα αν η παραγόμενη από το laser ακτινοβολία είναι μήκους κύματος 1028nm, τότε η τρίτη αρμονική που συλλέγεται πρόκειται να έχει μήκος κύματος 343nm.

Για την ταυτόχρονη εφαρμογή των παραπάνω φαινομένων με τη χρήση μιας μόνο πηγής φωτονίων απαιτείται ο διαχωρισμός της παραγόμενης ακτινοβολίας. Αυτό συμβαίνει και πάλι με βάση τις αρχές στις οποίες στηρίζονται τα φαινόμενα αυτά. Έτσι, ο παραγόμενος διφωτονικός φθορισμός ανακλάται στην πραγματικότητα από το δείγμα γεγονός που το διαχωρίζει από τη SHG και τη THG οι οποίες και το διαπερνούν. Επομένως απαιτείται μόνο ο διαχωρισμός της ακτινοβολίας της SHG από τη THG κάτι που είναι σχετικά απλό να συμβεί εφόσον μεταξύ τους διαφέρουν σημαντικά (SHG=514nm και THG=343nm) (Εικόνα 2). Έτσι, χρησιμοποιείται κατάλληλος μονοχρωμάτορας για τη συλλογή της εκάστοτε ακτινοβολίας.

Συνοψίζοντας τις ιδιότητες της μη γραμμικής μικροσκοπίας αναφέρεται ότι η εφαρμογή της φέρει μια σειρά από πλεονεκτήματα σε σχέση με την εφαρμογή της κλασσικής γραμμικής μικροσκοπίας. Αρχικά, γίνεται σαφές ότι η ταυτόχρονη εφαρμογή των μεθόδων αυτών οδηγεί στη συλλογή διαφορετικών πληροφοριών από δεδομένο βιολογικό δείγμα κάνοντας δυνατή την παρακολούθηση αλλαγών στη δομή και τη λειτουργία των βιολογικών δειγμάτων. Λόγω της φύσης των μεθόδων αυτών επιτυγχάνεται μειωμένη θέρμανση και συνεπώς καταστροφή του δείγματος επιμηκύνοντας έτσι τη διάρκεια της παρατήρησης ενώ μεγάλης σημασίας είναι και η μεγαλύτερη διεισδυτικότητα στο δείγμα, η λιγότερη φωτοτοξικότητα και η υψηλότερη ευκρίνεια.



**Εικόνα 2:** Σχηματική απεικόνιση της διάταξης που χρησιμοποιείται για την ταυτόχρονη συλλογή σήματος SHG, THG και TPEF με τη χρήση μιας μόνο πηγής φωτονίων.

## Στόχοι

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας τέθηκαν οι εξής στόχοι:

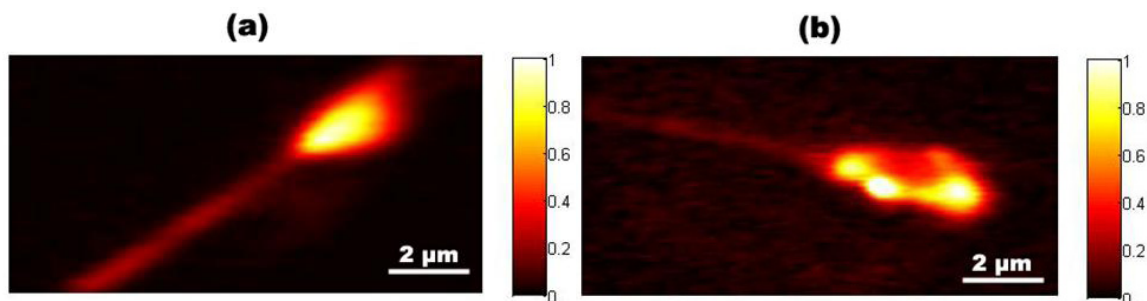
1. Ανάπτυξη μιας απλής και αξιόπιστης διάταξης για την εφαρμογή μεθόδων μη γραμμικής μικροσκοπίας στο νηματώδη *C. elegans*.
2. Παρατήρηση διαφορετικών βιολογικών δομών και συλλογή συμπληρωματικών πληροφοριών από τα διαφορετικά φαινόμενα μη γραμμικής μικροσκοπίας.
3. Εφαρμογή των μεθόδων μη γραμμικής μικροσκοπίας και ανάπτυξη εργαλείων κατάλληλων για την παρατήρηση με οπτικό τρόπο της ενεργότητας συγκεκριμένων νευρώνων του νηματώδη.

Περιεχόμενα



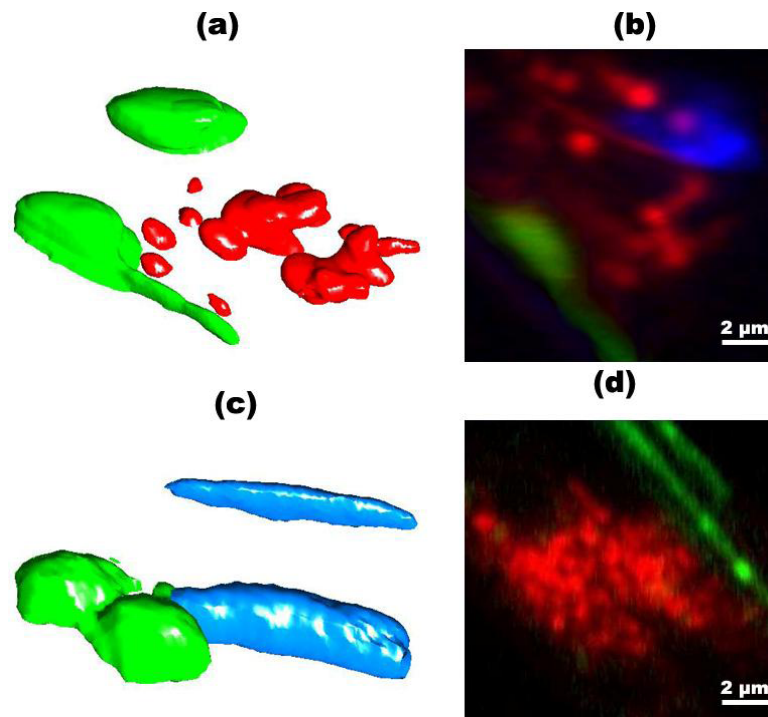
## Αποτελέσματα

Για την εφαρμογή των μεθόδων μη γραμμικής μικροσκοπίας στο νηματώδη σχηματίστηκαν δυο διαφορετικές διαγονιδιακές σειρές. Και στις δυο έγινε σήμανση των μηχανοαισθητήριων νευρώνων του νηματώδη με το φθορίζοντα μάρτυρα της GFP. Στην πρώτη διαγονιδιακή σειρά - N2  $Ex[p_{mec-4}GFP]$  – η GFP εκφράστηκε υπό τον έλεγχο του κυτταρο-ειδικού υποκινητή του γονιδίου *mec-4*. Το αποτέλεσμα είναι τα παραγόμενα φθορίζοντα μόρια να εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των 6 μηχανοαισθητήριων νευρώνων του οργανισμού. Ο σκοπός που κατασκευάστηκε η δεύτερη διαγονιδιακή σειρά - N2  $Ex[p_{mec-7}PAT-3(td)::GFP]$  – ήταν η τοποθέτηση των παραγόμενων μορίων της GFP στη μεμβράνη των 6 μηχανοαισθητήριων νευρώνων του οργανισμού. Για το σκοπό αυτό, το χιμαιρικό μόριο μεταξύ της διαμεμβρανικής περιοχής του γονιδίου *pat-3* και της GFP εκφράστηκε υπό τον έλεγχο του γονιδίου *mec-7*. Το συγκεκριμένο γονίδιο, παρά το γεγονός ότι εκφράζεται και σε άλλους νευρώνες παρουσιάζει ισχυρή έκφραση στους μηχανοαισθητήριους νευρώνες του οργανισμού. Η παρουσία της διαμεμβρανικής περιοχής του γονιδίου *pat-3* οδηγεί τώρα τα μόρια της GFP στη μεμβράνη των παραπάνω νευρώνων. Όπως αναμένεται παρατηρήθηκε ότι και στις δυο περιπτώσεις είναι δυνατή η ανίχνευση σήματος διφωτονικού φθορισμού εφόσον ο σχηματισμός του δεν εξαρτάται από την τοπολογία των φθορίζοντων μορίων. Συγκεκριμένα έγινε καταγραφή του σήματος που προέρχεται από τους δυο μηχανοαισθητήριους νευρώνες PLM(L/R) οι οποίοι εντοπίζονται στην ουρά του οργανισμού (Εικόνα 1).



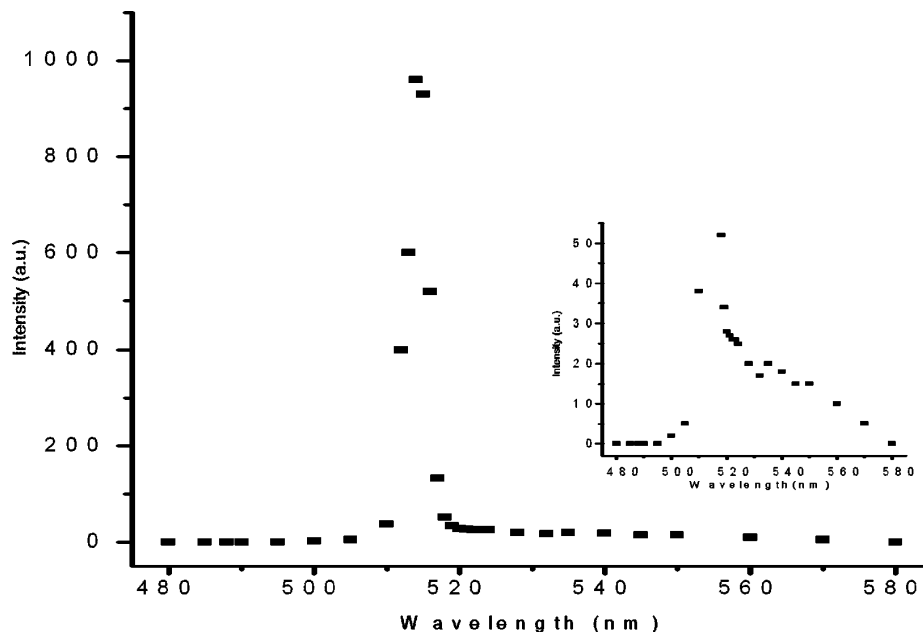
**Εικόνα 1:** Εικόνες διφωτονικού φθορισμού από τους οπίσθιους μηχανοαισθητήριους νευρώνες του *C. elegans*. (α) Το παραγόμενο σήμα εντοπίζεται κεντρικά στο σώμα του νευρώνα στα άτομα όπου τα μόρια της GFP είναι κυτταροπλασματικά. (β) Στα διαγονιδιακά άτομα που η GFP τοποθετείται στη μεμβράνη των νευρικών κυττάρων ο διφωτονικός φθορισμός εντοπίζεται στην περιφέρεια της τομής του νευρώνα.

Οι διαστάσεις της περιοχής που απεικονίζεται είναι  $12 \times 6 \mu\text{m}^2$  με ανάλυση  $60 \text{ nm/pixel}$ . Για τη διέγερση της GFP χρησιμοποιήθηκε πηγή φωτονίων μήκους κύματος  $1028 \text{ nm}$ . Το μέγιστο απορρόφησης και εκπομπής της GFP είναι  $488$  και  $507 \text{ nm}$  αντίστοιχα. Με τη χρησιμοποιούμενη διάταξη, στη GFP φτάνει φως μήκους κύματος  $514 \text{ nm}$  με αποτέλεσμα αυτή να απορροφά μόνο ένα ποσοστό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, της τάξης του 20%. Εντούτοις, το ανιχνεύσιμο σήμα είναι ισχυρό γεγονός που αναδεικνύει την ευαισθησία της συγκεκριμένης μεθόδου διφωτονικού φθορισμού. Μάλιστα, εκτός της ανίχνευσης σήματος από τα κυτταρικά σώματα ( $2-3 \mu\text{m}$ ) ήταν εφικτή και η ανίχνευση σήματος από λεπτότερες δομές του κυττάρου όπως οι άξονες ( $200 \text{ nm}$ ) γεγονός που αναδεικνύει την υψηλή διακριτική ικανότητα της μεθόδου απεικόνισης.



**Εικόνα 2: Μη γραμμικά σήματα ανιχνευόμενα από την ουρά διαγωνιδιακών ατόμων τα οποία εκφράζουν τον φθορίζοντα μάρτυρα της GFP στους μηχανοαισθητήριους νευρώνες του οργανισμού. (α) Τρισδιάστατη αναπαράσταση των μηχανοαισθητήριων νευρώνων του οργανισμού από τους οποίους παράγεται σήμα TPEF (πράσινο) και εσωτερικών δομών από τις οποίες προκύπτει και σήμα THG (κόκκινο). (β) Απεικόνιση των διαφορετικών σημάτων της TPEF με πράσινο χρώμα, της SHG με μπλε και της THG με κόκκινο από την ουρά διαγωνιδιακών ατόμων στα οποία τα μόρια της GFP εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των μηχανοαισθητήριων νευρώνων. (γ) Τρισδιάστατη αναπαράσταση των εσωτερικών δομών του οργανισμού από τις οποίες προκύπτει σήμα TPEF (πράσινο) και SHG (μπλε). (δ) Απεικόνιση των διαφορετικών σημάτων της TPEF με πράσινο χρώμα, της SHG με μπλε και της THG με κόκκινο από την ουρά διαγωνιδιακών ατόμων στα οποία τα μόρια της GFP εντοπίζονται στη μεμβράνη των μηχανοαισθητήριων νευρώνων.**

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια ταυτόχρονης εφαρμογής διαφορετικών μεθόδων μη γραμμικής μικροσκοπίας (TPEF-SHG-THG) και καταγραφή των διαφορετικών σημάτων που προκύπτουν. Καθώς σήμα THG προκύπτει από τα όρια των διαφορετικών δομών λόγω αλλαγής του δείκτη διάθλασης έγινε προσπάθεια τρισδιάστατης απεικόνισης των ανιχνευόμενων σημάτων με σκοπό την λεπτομερή καταγραφή και διάκριση των διαφορετικών δομών από τα οποία προέκυψε το εκάστοτε σήμα. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν άτομα της διαγονιδιακής σειράς N2 *Ex[p<sub>mec-4</sub>GFP]* τα οποία ακτινοβολήθηκαν με φωτόνια μήκους κύματος 1028nm. Βρέθηκε ότι από το οπίσθιο τμήμα του σώματος του οργανισμού και συγκεκριμένα την περιοχή όπου εντοπίζονται οι μηχανοαισθητήριοι νευρώνες παράγεται σήμα TPEF, SHG και THG (Εικόνα 2). Η ανίχνευση σήματος TPEF έγινε στην πρόσθια κατεύθυνση, ενώ στην οπίσθια σε σχέση με το δείγμα ανιχνεύθηκαν τα σήματα SHG και THG. Η διάκριση των δυο αυτών σημάτων έγινε μετά τη διαδοχική και επαναλαμβανόμενη μετάβαση του μονοχρωμάτορα από την τιμή των 514nm (SHG) στα 343nm (THG). Η επιβεβαίωση ότι τα ανιχνευόμενα φάσματα οφείλονται στην παραγωγή δεύτερης αρμονικής και όχι σε διφωτονικό φθορισμό ήρθε όταν η αλλαγή του μονοχρωμάτορα σε μια περιοχή 3-4 nm από την τιμή 514nm προκαλούσε δραματική μείωση της έντασης του ανιχνευόμενου σήματος (Εικόνα 3). Κάτι τέτοιο δεν θα μπορούσε να οφείλεται σε σήμα φθορισμού δεδομένου ότι η GFP διεγείρεται σε ένα σχετικά ευρύ φάσμα φωτός.

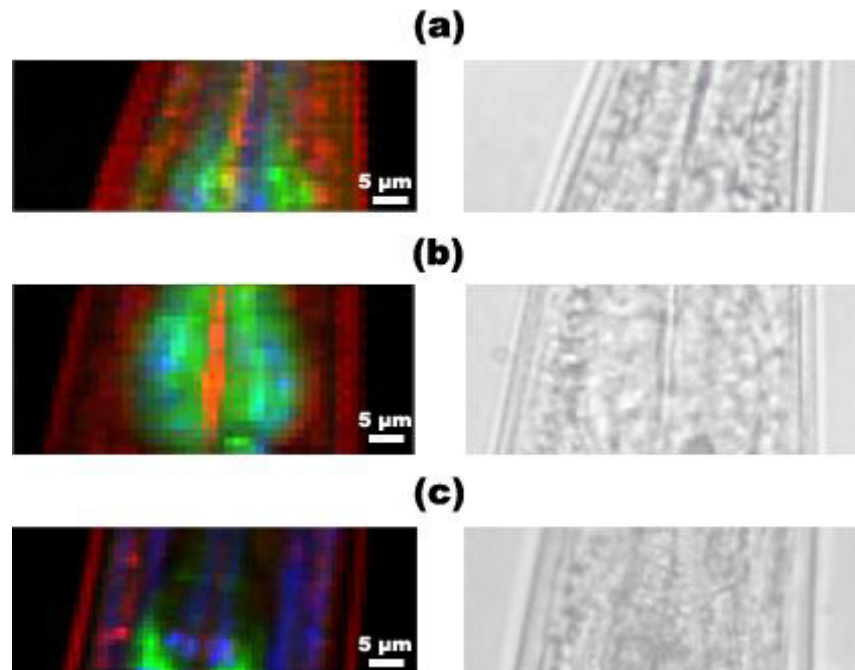


**Εικόνα 3:** Φασματική ανάλυση του ανιχνευόμενου σήματος δεύτερης αρμονικής (SHG) από το οπίσθιο τμήμα του σώματος του *C. elegans*.

Ανάλυση των ανιχνευόμενων σημάτων έδειξε ότι διφωτονικός φθορισμός προκύπτει από το σώμα και τους άξονες των μηχανοαισθητήριων νευρώνων καθότι εκφράζουν τον φθορίζοντα μάρτυρα της GFP (Εικόνα 2β – πράσινο χρώμα). Επίσης, σήμα δεύτερης αρμονικής προκύπτει από τα όρια του ζώου, την περιοχή δηλαδή όπου εντοπίζεται η πλούσια σε κολλαγόνο επιδερμίδα του οργανισμού (Εικόνα 2β – μπλε χρώμα). Ακολούθως, σήμα τρίτης αρμονικής προέκυψε από το κέντρο του σώματος του οργανισμού λόγω των πολλαπλών ασυνεχειών από τους διαφορετικούς ιστούς του οργανισμού (Εικόνα 2β – κόκκινο χρώμα). Η τρισδιάστατη αναπαράσταση των σημάτων αυτών έγινε με τη χρήση της πληροφορίας η οποία προέκυψε από 15 διαδοχικές τομές στην ουρά των ατόμων με απόσταση μεταξύ αυτών της τάξεως του 1μm. Έτσι, έγινε δυνατή η αναπαράσταση όλων των διαφορετικών σημάτων που ανιχνεύθηκαν (Εικόνα 2α, 2c). Επίσης, φάνηκε ότι και στα διαγονιδιακά άτομα N2 *Ex[p<sub>mec-7</sub>-PAT-3(td)::GFP]* στα οποία η GFP εντοπίζεται στη μεμβράνη των κυττάρων είναι δυνατή η ανίχνευση σήματος TPEF (Εικόνα 2d). Μάλιστα, στην περίπτωση αυτή παρατηρήθηκε η στικτή διάταξη των μορίων της GFP στους άξονες των κυττάρων όπως αναμενόταν από τη συνένωσή της με τη διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης PAT-3.

Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια προσέγγιση για την εφαρμογή μη γραμμικών φαινομένων μικροσκοπίας στο πρόσθιο τμήμα του οργανισμού. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα διαγονιδιακά άτομα N2 *Ex[p<sub>myo-2</sub>-GFP]*, στα οποία ο φθορίζοντας μάρτυρας της GFP εκφράζεται υπό τον έλεγχο του ιστοειδικού υποκινητή του γονιδίου *myo-2*. Το συγκεκριμένο γονίδιο εκφράζεται αποκλειστικά στους μύες του φάρυγγα του οργανισμού, ενώ τα παραγόμενα μόρια της GFP εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων αυτών. Η ταυτόχρονη μη γραμμική απεικόνιση της περιοχής του φάρυγγα του οργανισμού έδειξε ότι ανιχνεύονται διαφορετικά σήματα από διαφορετικές δομές (Εικόνα 4). Συγκεκριμένα έγιναν τρεις διαφορετικές σαρώσεις τις περιοχής σε διαφορετικά εστιακά επίπεδα. Οι διαστάσεις των τομών αυτών ήταν 60 x 25 μm<sup>2</sup>, 60 x 30 μm<sup>2</sup> και 60 x 25 μm<sup>2</sup>, ενώ η ανάλυση των εικόνων ήταν της τάξεως του 1μm. Η ταυτοποίηση των ιστών από τους οποίους προήλθε το εκάστοτε σήμα έγινε με την παράλληλη απεικόνιση της περιοχής με οπτικό μικροσκόπιο. Έτσι, ταυτοποιήθηκε ότι σήμα διφωτονικού φθορισμού παράγεται από την περιοχή του φάρυγγα του οργανισμού καθώς στην απεικόνιση της εγκάρσιας τομής που σαρώθηκε έγιναν εμφανείς οι δυο λοβοί του φάρυγγα. Παράλληλα, φάνηκε ότι το σήμα διακόπτεται στο διαμήκη άξονα, περιοχή που αντιστοιχεί στον περίπου κυλινδρικό πόρο που βρίσκεται εσωτερικά του φάρυγγα (lumen) (Εικόνα 4α,β – πράσινο χρώμα). Από την περιοχή αυτή όμως προκύπτει ισχυρό σήμα THG (Εικόνα 4α,β – κόκκινο χρώμα) καθώς παρατηρείται σημαντική αλλαγή του δείκτη διάθλασης κατά τη μετάβαση από τους παρακείμενους μύες

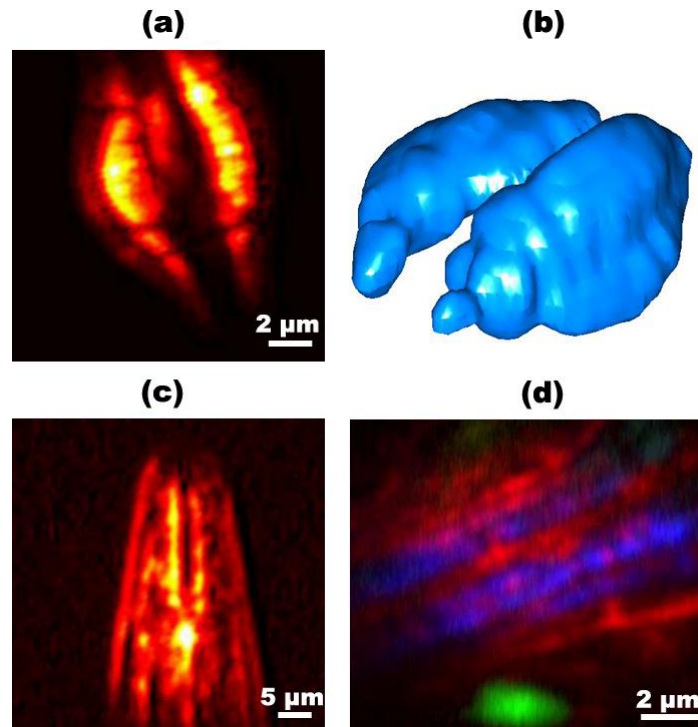
του φάρυγγα στον κενό πόρο που εσωκλείει το όργανο αυτό. Όμως, στην περιοχή του φάρυγγα εντοπίστηκε επίσης ισχυρό σήμα δεύτερης αρμονικής (Εικόνα 4α,β,γ – μπλε χρώμα). Μάλιστα, φάνηκε ότι το σήμα αυτό της SHG επικαλύπτεται με το παραγόμενο σήμα του TPEF, αλλά όχι της THG. Στα μυϊκά κύτταρα του φάρυγγα δηλαδή παρατηρούνται δυο διαφορετικά μη γραμμικά φαινόμενα και μάλιστα ο διαχωρισμός τους καθίσταται εφικτός. Έτσι, βλέπουμε ότι εκτός του διφωτονικού φθορισμού που πηγάζει από την GFP των κυττάρων αυτών, ανιχνεύεται και δεύτερη αρμονική η οποία οφείλεται στις δομικές ιδιότητές τους, δηλαδή στα πακεταρισμένα σαρκομερή των μυϊκών κυττάρων του φάρυγγα και στα ινίδια ακτίνης και μυοσίνης που περιλαμβάνουν (Plotnikov et al., 2006).



**Εικόνα 4: Απεικόνιση των μη γραμμικών σημάτων που ανιχνεύονται στο πρόσθιο τμήμα του *C. elegans*.** Παρατηρείται σήμα TPEF (πράσινο) στους μύες του φάρυγγα λόγω της έκφρασης του φθορίζοντα μάρτυρα της GFP. Σήμα THG (κόκκινο) προκύπτει από το εσωτερικό του φάρυγγα λόγω της έντονης αλλαγής του δείκτη διάθλασης σε σχέση με τον παρακείμενο μυϊκό ιστό. Επίσης, ανιχνεύεται σήμα SHG (μπλε) το οποίο οφείλεται στη δομή των μυϊκών κυττάρων του φάρυγγα αλλά και στη κολλαγονώδη επιδερμίδα του οργανισμού.

Για την καλύτερη και πιο λεπτομερή απεικόνιση της περιοχής του φάρυγγα έγινε σάρωση όπου η δέσμη του laser κατευθύνθηκε και στις τρεις διαστάσεις με τη χρήση galvo mirrors. Αυτή η προσέγγιση επέτρεψε την αύξηση της διακριτικής ικανότητας και της ανάλυσης της παραγόμενης εικόνας. Εικόνες που προέκυψαν έχουν διαστάσεις  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  και ανάλυση  $80 \text{ nm/pxel}$ . Έτσι, επιβεβαιώθηκαν οι προηγούμενες παρατηρήσεις για την

παραγωγή σήματος δεύτερης αρμονικής από τους μύες του φάρυγγα (Εικόνα 5a) και τρίτης αρμονικής από το εσωτερικό του οργάνου ή φαρυγγικό αυλό (Εικόνα 5c). Παράλληλα, έγινε δυνατή η τρισδιάστατη αναπαράσταση του πρώτου λοβού του φάρυγγα μετά από διαδοχικές σαρώσεις σε 12 διαφορετικά εστιακά επίπεδα με απόσταση μεταξύ τους 1μm (Εικόνα 5b).



**Εικόνα 5:** Υψηλής ανάλυσης απεικόνιση της περιοχής του φάρυγγα του οργανισμού μέσω μη γραμμικής μικροσκοπίας. Φαίνονται τα διαφορετικά σήματα SHG (a), THG (c) και TPEF (d) αλλά και η τρισδιάστατη απεικόνιση του φάρυγγα με βάση το σήμα SHG που ανιχνεύθηκε.

Συμπληρωματικά ακολουθήθηκε μια διαφορετική προσέγγιση κατά την οποία έγινε προσπάθεια απεικόνισης των παραπάνω δομών αλλά και ανίχνευσης σήματος TPEF από τα διαγονιδιακά άτομα N2 *Ex[p<sub>asic-1</sub>SNB-1::DsRED]*. Στα άτομα αυτά ο φθορίζοντας μάρτυρας της DsRED εκφράζεται σε σύνδεση με το συναπτικό μάρτυρα της synaptobrevin (SNB-1). Το χιμαιρικό αυτό μόριο εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *asic-1*. Έτσι, το σήμα του φθορισμού από την DsRED περιορίζεται στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του οργανισμού (ADEs, CEPs, PDEs) στους οποίους εκφράζεται και το γονίδιο *asic-1*. Από αυτούς, οι CEPs εντοπίζονται κοντά στον πρόσθιο λοβό του φάρυγγα. Στη συγκεκριμένη περιοχή έγινε σάρωση με τη χρήση laser μήκους κύματος 1028nm. Με τη συγκεκριμένη πηγή και για την παρατήρηση διφωτονικού φθορισμού (TPEF) η απορροφούμενη από την

DsRED ακτινοβολία θα έχει μήκος κύματος 514nm. Καθώς το μέγιστο απορρόφησης και διέγερσης για την DsRED είναι 557 και 579nm αντίστοιχα, υπολογίζεται ότι το 50% περίπου της ακτινοβολίας πρόκειται να απορροφηθεί. Επομένως, αναμένεται η απόδοση του συγκεκριμένου μάρτυρα να είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τη GFP. Έτσι, προέκυψαν εικόνες μεγέθους 12 x 12  $\mu\text{m}^2$  και ανάλυσης 60 nm/pixel. Παρατηρείται σήμα SHG (μπλε) που προκύπτει όπως και παραπάνω από τα μυϊκά κύτταρα του φάρυγγα. Το σήμα THG (κόκκινο) περιγράφει τα όρια του οργάνου από το οποίο δεν προκύπτει σήμα THG, με εξαίρεση τον φαρυγγικό αυλό. Τέλος, παρατηρείται σήμα TPEF (πράσινο) το οποίο παράγεται από το μόριο της DsRED. Έτσι, εντοπίζεται ένας από τους τέσσερις ντοπαμινεργικούς νευρώνες κοντά στον πρώτο φαρυγγικό λοβό.

Περιεχόμενα

## Συζήτηση

Στη παραπάνω εργασία παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εφαρμογής τριών διαφορετικών τεχνικών μη γραμμικής μικροσκοπίας στο νηματώδη *C. elegans*. Με την προσέγγιση αυτή έγινε δυνατή η *in vivo* παρατήρηση διαφορετικών δομών με τη χρήση μιας μόνο πηγής φωτονίων, ενός παλμικού laser femtosecond. Για πρώτη φορά στο νηματώδη έγινε καταγραφή σήματος τρίτης αρμονικής (THG). Η ανίχνευση του σήματος αυτού οδήγησε στη λεπτομερή ανατομική χαρτογράφηση του πρόσθιου και οπίσθιου τμήματος του οργανισμού. Καθώς, με τη συγκεκριμένη μέθοδο παρατηρούνται ασυνέχειες του οργανισμού, όπως διαφορετικοί ιστοί αλλά και όργανα έγινε εφικτή η τρισδιάστατη αναπαράσταση των οπίσθιων κυττάρων-μηχανοϋποδοχέων αλλά και του φάρυγγα του ζώου (Εικόνα 2, 5). Η βελτίωση της πειραματικής διάταξης με τη χρήση galvo mirrors επέτρεψε την αύξηση της διακριτικής ικανότητας και τη λεπτομερή καταγραφή των παραπάνω δομών με μικροσκοπικό επίπεδο. Παράλληλα, η ταυτόχρονη ανίχνευση σήματος SHG και TPEF έδωσε σημαντικές και αλληλοσυμπληρούμενες πληροφορίες. Έτσι, ενώ THG ανιχνεύεται κυρίως από ασυνέχειες του οργανισμού, SHG ανιχνεύεται από επαναλαμβανόμενες ασύμμετρες δομές όπως η ακτομουσίνη και το κολλαγόνο. Αυτό επιβεβαιώθηκε από τα *in vivo* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές περιοχές του οργανισμού. Από την άλλη σήμα TPEF ανιχνεύθηκε τόσο από το φθορίζοντα μάρτυρα της GFP όσο και από αυτόν της DsRED. Έτσι, από τις τρεις αυτές μεθόδους μη γραμμικής μικροσκοπίας και με τη χρήση ενός μόνο laser έγινε εφικτή η *in vivo* παρατήρηση και καταγραφή διαφορετικών πληροφοριών που προέρχονται από εντελώς διαφορετικές πηγές. Τα ερωτήματα που προκύπτουν στη συνέχεια είναι δυο. Πρώτον, γιατί να επιλέξει κανείς τις παραπάνω μεθόδους μη γραμμικής μικροσκοπίας έναντι σε αυτές τις κλασσικές οπτικής μικροσκοπίας ή του μονοφωτονικού φθορισμού; Δεύτερον, ποια είναι η δυναμική και ο απώτερος στόχος από τις εφαρμογές αυτές;

Οι ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τις παραπάνω μεθόδους δίνουν συγκριτικά πλεονεκτήματα στην εφαρμογή τους σε σχέση με τις κλασσικές μεθόδους μικροσκοπίας. Μη γραμμικά φαινόμενα όπως του SHG και THG δίνουν τη μοναδική δυνατότητα για παρατήρηση συγκεκριμένων ιστών σε κάποιον οργανισμό κατά τρόπο που δεν μπορεί να επιτευχθεί με οπτική μικροσκοπία. Αυτό οφείλεται κύρια στην αρχή σχηματισμού των παραπάνω φαινομένων. Έτσι, με τη μέθοδο του SHG μπορούν να παρατηρηθούν επαναλαμβανόμενες δομές όπως οι μύες και το κολλαγόνο. Πολύ περισσότερο απ' αυτό δίνεται η δυνατότητα για πραγματοποίηση ποιοτικών αναλύσεων εφόσον με τη μέθοδο αυτή μπορεί να διαγνωστούν αλλαγές στο μοριακό επίπεδο των παρατηρούμενων ιστών και όχι



μόνο στο μορφολογικό. Έτσι, είναι δυνατή η διάκριση ανάμεσα σε στελέχη των οποίων ενώ οι ιστοί διατηρούν τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, φέρουν διαφορές σε ότι αφορά τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Μια τέτοια συνθήκη προκαλεί διαφορετικό μοτίβο παραγωγής SHG κάτι που γίνεται αντιληπτό μόνο από την εφαρμογή μη γρμμικής μικροσκοπίας. Σε ένα επόμενο επίπεδο και πάλι εξαιτίας της αρχής σχηματισμού SHG επιτυγχάνεται μεγαλύτερο εστιακό βάθος στον ιστό δίνοντας έτσι τη δυνατότητα λεπτομερέστερης χαρτογράφησης των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ιστών. Επιπρόσθετα, το φαινόμενο αυτό οφείλεται στις ενδογενείς ιδιότητες των ακτινοβολούμενων μορίων και δεν περιλαμβάνει κανένα στάδιο απορρόφησης της ακτινοβολίας εφόσον αυτή σκεδάζεται. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη χρήση φωτονίων εξαιρετικά χαμηλής ενέργειας (περιοχή υπέρυθρου), δίνει το πλεονέκτημα της μειωμένης μετάδοσης ενέργειας στο δείγμα περιορίζοντας έτσι σημαντικά την αλλοίωσή του κατά την παρατήρηση.

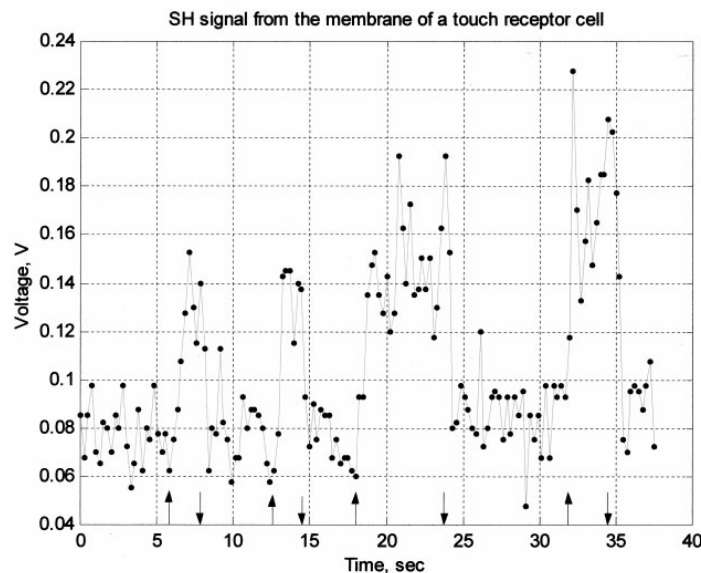
Σε ότι αφορά το φαινόμενο του THG δίνεται η δυνατότητα καταγραφής των ασυνεχειών ενός ιστού καθώς το παραγόμενο σήμα προκύπτει κατά την αλλαγή του δείκτη διάθλασης του μέσου. Η αύξηση της διακριτικής ικανότητας με την ακριβέστερη κατεύθυνση της δέσμης του laser επεκτείνει τα όρια εφαρμογής της συγκεκριμένης μεθόδου θέτοντας την πρόκληση για τη χαρτογράφηση ενδοκυτταρικών περιοχών και οργανιδίων. Το γεγονός αυτό θα επεκτείνει τις δυνατότητες για κυτταρική ανάλυση σε μικροσκοπικό επίπεδο χωρίς τη παρεμβολή φθορίζοντων μορίων ή άλλων μέσων, καθώς η παρατήρηση θα βασίζεται στις ενδογενείς ιδιότητες των υποκυτταρικών οργανιδίων και στην ικανότητά τους για παραγωγή σήματος THG.

Αλλά και κατά την εφαρμογή της μεθόδου TPEF οι διαφορές είναι σημαντικές σε σχέση με την εφαρμογή μικροσκοπίας confocal. Κοινό σημείο και των δυο μεθόδων αποτελεί η διέγερση ενός φθορίζοντα μάρτυρα. Εντούτοις, οι διαφορές μεταξύ διφωτονικού και μονοφωτονικού φθορισμού εστιάζονται στον τρόπο διέγερσης του μάρτυρα αυτού. Όπως αναφέρθηκε, η αρχή παραγωγής TPEF είναι η διέγερση του φθορίζοντος μορίου από φωτόνια που φέρουν ενέργεια ίση με το ήμισυ της απαιτούμενης. Για να καταστεί εφικτή η διέγερση του μορίου απαιτείται η μετάβαση των φωτονίων αυτών σε μια ενεργειακή κατάσταση όπου θα έχουν τη διπλάσια περίπου ενέργεια. Αυτό επιτυγχάνεται μόνο στο σημείο εστίασης της ακτινοβολίας και όχι σε ολόκληρη τη διαδρομή της δέσμης στο παρατηρούμενο δείγμα. Τα αποτελέσματα και τα οφέλη αυτής της ιδιότητας είναι πολλαπλά αν τεθεί σύγκριση με εφαρμογές μονοφωτονικού φθορισμού (confocal). Αρχικά, το παραγόμενο σήμα προκύπτει αποκλειστικά στο σημείο εστίασης και όχι από όλα τα σημεία από τα οποία διέρχεται η δέσμη laser. Αυτό το γεγονός εκμηδενίζει το φαινόμενο του εκτός

εστίασης φθορισμού. Έτσι, σε αντίθεση με το confocal δεν απαιτείται η χρήση pinhole για τον περιορισμό του εκτός εστιακού επιπέδου σήματος εφόσον αυτό δεν υπάρχει. Η έλλειψη pinhole, η οποία περιορίζει γενικά το παραγόμενο σήμα, επιτρέπει την ευκολότερη ανίχνευση ασθενικών σημάτων. Παράλληλα, η ευκρίνεια και η διακριτική ικανότητα αυξάνουν σημαντικά από την εφαρμογή αυτή καθώς το παραγόμενο σήμα περιορίζεται αποκλειστικά στο σημείο εστίασης. Επίσης, φαινόμενα photo-toxicity και photo-bleaching περιορίζονται δραματικά μόνο στο σημείο εστίασης και όχι σε φθορίζοντα μόρια εκτός εστίασης.

Φαίνεται λοιπόν ότι οι παραπάνω μέθοδοι προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα για την παρατήρηση βιολογικών δειγμάτων ενώ η ταυτόχρονη εφαρμογή τους προσφέρει διαφορετικές πληροφορίες. Όμως, η εφαρμογή τους δεν περιορίζεται αποκλειστικά στην παρατήρηση βιολογικών δομών. Αντίθετα επεκτείνεται και στην παρατήρηση βιολογικών λειτουργιών. Ειδικά για το νευρικό σύστημα μια τέτοια λειτουργία αφορά την ενεργότητα των νευρικών κυττάρων κατά τη μετάδοση βιολογικής πληροφορίας. Πρόκειται δηλαδή, για την ιδιότητα των νευρικών κυττάρων να εκπολώνονται κατά την ενεργοποίησή τους. Το φαινόμενο αυτό έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μεθόδων ηλεκτροφυσιολογίας προκειμένου να καταστεί δυνατή η καταγραφή της εκπόλωσης αυτής. Κι ενώ η ηλεκτροφυσιολογική μέτρηση της ενεργότητας των νευρικών και άλλων κυττάρων είναι ευρέως διαδεδομένη σε πολλούς οργανισμούς, η εφαρμογή της μεθόδου είναι σημαντικά περιορισμένη στον καινοραβδίτη. Το εξαιρετικά μικρό μέγεθος των νευρώνων του σε συνδυασμό με την τοποθέτησή τους σε δύσκολα προσβάσιμες περιοχές του οργανισμού καθιστούν απαγορευτική την *in vivo* μελέτη της λειτουργίας τους με βάση ηλεκτροφυσιολογικές μετρήσεις. Για τη μέτρηση αυτής της σημαντικής παραμέτρου των νευρικών κυττάρων έχουν αναπτυχθεί νέες μέθοδοι βασιζόμενοι στη μη γραμμική μικροσκοπία. Πώς όμως η παρατήρηση των νευρώνων με οπτικό τρόπο θα μπορέσει να δώσει πληροφορίες για την ενεργότητά τους; Τη λύση στο περίπλοκο αυτό θέμα έρχονται να δώσουν φαινόμενα μη γραμμικής μικροσκοπίας όπως του SHG. Έχει παρατηρηθεί ότι αλλαγές στο παραγόμενο σήμα δεύτερης αρμονικής μπορούν να προκύψουν από επαναλαμβανόμενες δομές (κολλαγόνο, μύες). Όμως και τα μόρια της GFP δύνανται να έχουν μια τέτοια ιδιότητα. Η προϋπόθεση για να συμβεί κάτι τέτοιο είναι τα μόρια αυτά να έχουν την απαιτούμενη ηλεκτρονιακή κατανομή ώστε να συνιστούν ηλεκτρικά δίπολα των οποίων η επαναλαμβανόμενη τοποθέτηση σε κυτταρικές περιοχές να επάγει το φαινόμενο του SHG. Το μόριο της GFP φέρει το ένα του άκρο μια φαινολική ομάδα και στο άλλο του άκρο έναν ημιδαζολικό δακτύλιο. Κατά τη διέγερση του μορίου από φωτόνια λαμβάνει χώρα η μεταφορά ηλεκτρονίων από τη φαινολική ομάδα στον ημιδαζολικό δακτύλιο. Αυτή η μεταφορά ηλεκτρονίων προκαλεί την αποπρωτονίωση της ουδέτερης φαινολικής ομάδας και τη μετατροπή της σε φαινολικό ανιόν. Έτσι, η GFP είναι ένα δίπολο

μόριο. Σημαντική ιδιότητα σε σχέση με την παραγωγή SHG είναι το γεγονός ότι κατά την παρουσία του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου του φωτός αλλάζει η ηλεκτρονιακή κατανομή του μορίου της GFP. Αυτό κάνει τη GFP να αλληλεπιδρά με το υπάρχον δυναμικό της μεμβράνης ενός νευρικού κυττάρου και να αλλάζει έτσι το παραγόμενο σήμα SHG. Έτσι, στην περίπτωση που η GFP βρίσκεται πολύ κοντά στη μεμβράνη, τότε το αρνητικό φορτίο στο εσωτερικό της μεμβράνης προκαλεί παροδική αλληλεπίδραση με τα δίπολα μόρια της GFP. Αν σε αυτήν την περίπτωση ακολουθήσει αλλαγή του δυναμικού της μεμβράνης τότε παύει να υφίσταται η παραπάνω αλληλεπίδραση με αποτέλεσμα να αλλάζει και το παραγόμενο σήμα SHG. Η GFP μπορεί να οδηγηθεί στη μεμβράνη των νευρικών κυττάρων αν εκφραστεί κατάλληλο χιμαιρικό μόριο όπου μια διαμεμβρανική περιοχή μιας πρωτεΐνης (π.χ. PAT-3) είναι ενωμένη με το μόριο της GFP. Σε κατάσταση ηρεμίας του νευρικού κυττάρου καταγράφεται σήμα SHG το οποίο αλλάζει από την εκπόλωση του κυττάρου αυτού (Εικόνα 6). Έτσι, η εφαρμογή των φαινομένων μη γραμμικής μικροσκοπίας και ιδιαίτερα του SHG έχει επιτρέψει την ανάπτυξη μεθόδων παρακολούθησης της ενεργότητας των νευρικών κυττάρων του νηματώδους (Khatchourians et al., 2000; Peleg et al., 1999) δίνοντας σημαντική ώθηση στη μελέτη της λειτουργίας του νευρικού συστήματος του οργανισμού.



**Εικόνα 6: Απεικόνιση του σήματος SHG όπως καταγράφηκε από τους μηχανοαισθητήριους νευρώνες (ALM) του *C. elegans*** (Khatchourians et al., 2000). Το χιμαιρικό μόριο μεταξύ της διαμεμβρανικής περιοχής της πρωτεΐνης DES-2 και της GFP εκφράστηκε ειδικά στους μηχανοαισθητήριους νευρώνες του οργανισμού. Οι αλλαγές στο ανιχνευόμενο σήμα SHG συμπίπτουν με την ενεργοποίηση των παραπάνω νευρώνων από την άσκηση μηχανικού ερεθίσματος (βέλη).

Περιεχόμενα

## **Παράρτημα Β**

**Εφαρμογή μεθόδων οπτικής τομογραφίας (OPT) στον  
οργανισμό *Caenorhabditis elegans***

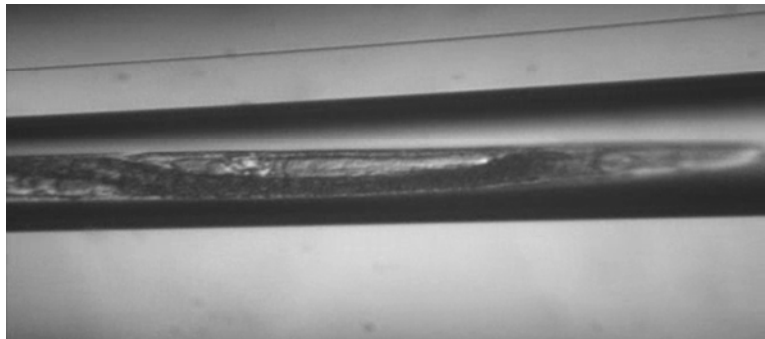
## Μεθοδολογία – Αποτελέσματα

Η οπτική τομογραφία ή Optical Projection Tomography (OPT) είναι μια σχετικά νέα μέθοδος μικροσκοπίας η οποία επιτρέπει την τρισδιάστατη απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων. Συγκεκριμένα, επιτρέπει την γρήγορη *in vivo* σάρωση ενός δείγματος και την ανίχνευση φθοριζόντων μορίων σε αυτό. Έτσι, αποδεικνύεται σημαντικό εργαλείο για την αναγνώριση της τρισδιάστατης κατανομής ενός μάρτυρα μέσα σε κάποιον ιστό ή όργανο, ενώ η χρησιμότητά της είναι μεγάλη για την ανάλυση του αναπτυξιακού προτύπου διαφορετικών οργανισμών (Sharpe, 2003, 2004; Sharpe et al., 2002). Η μεγάλη δυναμική της μεθόδου αποτυπώνεται και από τη σύγκριση με την κλασική πλέον μέθοδο της μικροσκοπίας confocal. Σε σχέση με την τελευταία λοιπόν μέθοδο η οπτική τομογραφία φέρει τη δυνατότητα παρατήρησης «βαθύτερα» στο δείγμα τόσο φθοριζόντων όσο και μη φθοριζόντων μορίων (π.χ. LacZ) ενώ παράλληλα επιτρέπει τη τρισδιάστατη απεικόνισή τους. Αλλά και συγκριτικά με τη μέθοδο της μαγνητικής τομογραφίας (MRI) επιτρέπει την ταχύτερη και με μεγαλύτερη ανάλυση απεικόνιση των δειγμάτων.

Ποια όμως είναι εκείνα τα χαρακτηριστικά της μεθόδου που την κάνουν να διαφέρει από τις υπόλοιπες μεθόδους τρισδιάστατης απεικόνισης; Η βασική διαφορά της μεθόδου πηγάζει από το γεγονός ότι η δέσμη της ακτινοβολίας κατευθύνεται στο δείγμα μέσω ενός φακού infinity, χωρίς δηλαδή να εστιάζεται. Έτσι, επιτυγχάνεται η απεικόνιση τομών του δείγματος καθώς η πληροφορία που συλλέγεται, αφορά το σύνολο των σημείων από τα οποία διέρχεται η δέσμη. Πρόκειται δηλαδή για μονοδιάστατες γραμμές, κάθετες προς τον άξονα των z. Καθώς μάλιστα η ακτινοβολία δεν εστιάζεται στο δείγμα το πεδίο που κάθε φορά είναι ορατό είναι σαφώς ευρύτερο σε σύγκριση με άλλες μεθόδους μικροσκοπίας. Έτσι, για να είναι δυνατή η τρισδιάστατη απεικόνιση με βάση τη συγκεκριμένη μέθοδο αρκεί η περιφορά του δείγματος στον χώρο και συγκεκριμένα στον άξονα των z. Αντίθετα, κατά την τρισδιάστατη απεικόνιση με τη χρήση confocal η δέσμη του laser εστιάζεται σε δεδομένα κάθε φορά σημεία του χώρου, από τα οποία και συλλέγεται η πληροφορία. Στην περίπτωση αυτή, η τρισδιάστατη απεικόνιση γίνεται με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού όπου λαμβάνεται υπόψη η θέση του εκάστοτε σημείου στον χώρο και η ανασύσταση της τρισδιάστατης εικόνας. Γίνεται όμως σαφές, ότι με τον τρόπο αυτό η συνολική πληροφορία που συλλέγεται και χρησιμοποιείται για κάποιο δείγμα είναι σαφώς μικρότερη σε σύγκριση με εκείνη της μεθόδου οπτικής τομογραφίας.

Το γεγονός ότι με τη χρήση της μεθόδου OPT συλλέγεται πληροφορία από σχετικά μεγάλους ιστούς επέτρεψε την εξάπλωση της μεθόδου στο πεδίο της απεικόνισης ολόκληρων ιστών από θηλαστικά (π.χ. ποντικό). Μέχρι στιγμής η εφαρμογή της μεθόδου δεν

έχει πραγματοποιηθεί στο νηματώδη *C. elegans*. Αυτό οφείλεται κυρίως στις ιδιότητες του οργανισμού που είναι το μικρό του μέγεθος αλλά και η μεγάλη διαπερατότητα του σώματός του. Έτσι, ο νηματώδης μπορεί εύκολα να απεικονιστεί και να παρατηρηθεί με περισσότερο διαδεδομένες μεθόδους (DIC, confocal). Σε όλες όμως τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται συναντάται ένα κοινό χαρακτηριστικό, που είναι η ελάττωση του πεδίου παρατήρησης με την αύξηση της εστίασης. Έτσι, γίνεται αντιληπτό ότι η υψηλής ανάλυσης απεικόνιση ενός δείγματος απαιτεί την ελαχιστοποίηση του παρατηρούμενου πεδίου. Αυτό δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα όταν χρειάζεται να παρατηρηθούν κύτταρα ή ακόμα περισσότερο τμήματα των κυττάρων του νηματώδη. Εντούτοις, η υψηλής ευκρίνειας παρατήρηση του αναπτυξιακού προτύπου του οργανισμού και η τρισδιάστατη απεικόνισή του καθίσταται πρακτικά δύσκολη με τις δεδομένες μεθόδους.

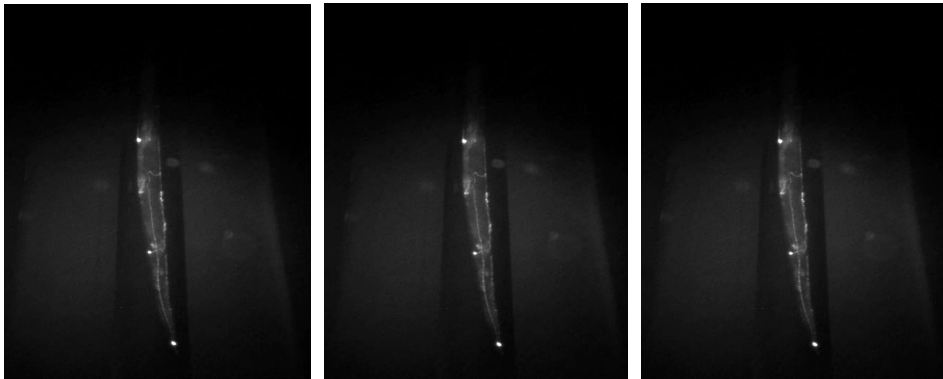


**Εικόνα 1:** Απεικόνιση της διάταξης που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της μεθόδου OPT στο νηματώδη *C. elegans*. Ο οργανισμός ακινητοποιήθηκε μέσα σε τριχοειδές με τη χρήση του αναισθητικού levamisole και αгарόζης 2%

Έτσι, έγινε προσπάθεια εφαρμογής της μεθόδου της οπτικής τομογραφίας στο νηματώδη με απώτερο στόχο την παρατήρηση του αναπτυξιακού προτύπου του νευρικού του συστήματος ή πιο συγκεκριμένα ορισμένων κάθε φορά νευρώνων. Σε μια πρώτη προσπάθεια το στέλεχος N2  $Is[p_{mec-4}GFP]$  παρατηρήθηκε με τη μέθοδο του OPT. Στο στέλεχος αυτό το μόριο της GFP εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *mec-4* στους μηχανοαισθητήριους νευρώνες του οργανισμού. Η διέγερση της GFP έγινε με τη χρήση λαμπτήρα τύπου Mercury και με τη χρήση κατάλληλων φίλτρων. Για την τρισδιάστατη απεικόνιση του μορίου χρειάστηκε άτομα του νηματώδη να εισαχθούν και να ακινητοποιηθούν μέσα σε τριχοειδές το οποίο περιστρεφόταν κατά τον άξονα των z (Εικόνα 1). Σε αυτή την κατάσταση δε χρησιμοποιήθηκε αναισθητικό που θα σκότωνε τον οργανισμό καθώς η παρατήρηση χρειάζεται να γίνει σε ζωντανά άτομα. Έτσι, η σχετική ακινητοποίησή

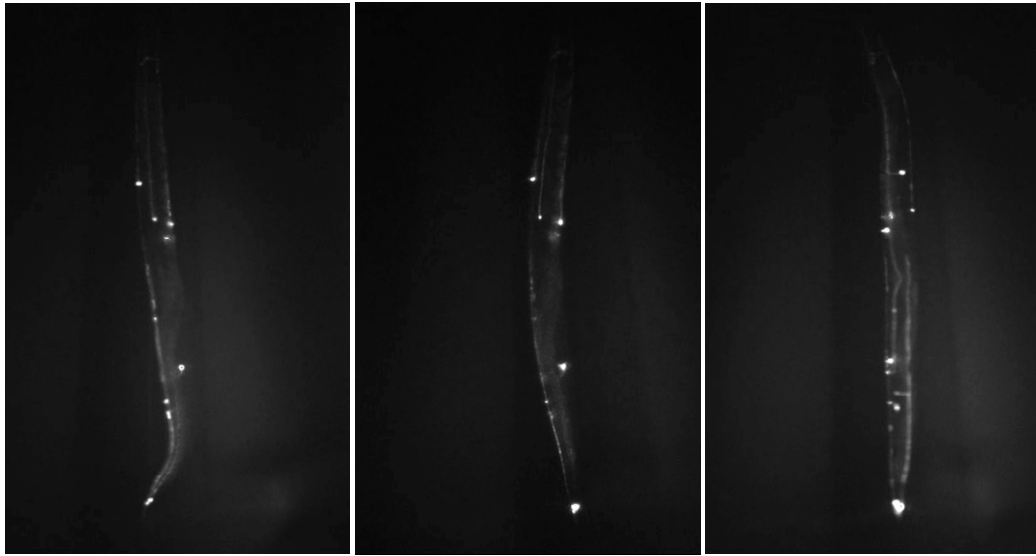
τους έγινε με τη χρήση αραρόζης. Αρχικά έγινε η απεικόνιση των ιστών του οργανισμού με τη χρήση ορατού φωτός (λευκού) οπότε και έγιναν εμφανείς οι ιστοί του οργανισμού (Εικόνα 1).

Σε μια επόμενη φάση έγινε απεικόνιση των μηχανοαισθητήριων νευρώνων του οργανισμού, των κυττάρων δηλαδή όπου είχαμε έκφραση της GFP. Η καταγραφή της GFP έγινε με τη χρήση φακού που προσέφερε μεγέθυνση 10x και στην οποία ολόκληρος ο οργανισμός ήταν ορατός. Η υψηλή διακριτική ικανότητα της μεθόδου έκανε εφικτή την ταυτόχρονη παρατήρηση και διάκριση των μηχανοαισθητήριων νευρώνων. Σημειώνεται ότι τα άτομα σε αυτή την κατάσταση δεν είναι πλήρως ακινητοποιημένα, αλλά μερικώς. Εντούτοις παρατηρήθηκε ότι η κίνηση του ατόμου μέσα στο τριχοειδές δεν επηρέασε την εστίαση και το ανιχνευόμενο σήμα, γεγονός που χαρακτηρίζει τη μέθοδο της οπτικής τομογραφίας (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2: Απεικόνιση των μηχανοαισθητήριων νευρώνων του οργανισμού με τη μέθοδο OPT.** Φαίνεται το παραγόμενο σήμα από τον φθορίζοντα μάρτυρα της GFP, η οποία εκφράζεται στους παραπάνω νευρώνες. Η απεικόνιση έγινε με τη χρήση φακού μεγέθυνσης 10x.

Τέλος έγινε προσπάθεια λεπτομερέστερης καταγραφής του παραγόμενου σήματος από το στέλεχος N2  $Is[p_{mec-4}GFP]$ . Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε φακός που προσέφερε μεγέθυνση 20x. Έτσι, έγινε δυνατή η καλύτερη και με μεγαλύτερη ανάλυση απεικόνιση του παραγόμενου σήματος (Εικόνα 3). Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ακριβή διάκριση τόσο των σωμάτων όσο και των νευραξόνων των 6 μηχανοαισθητήριων νευρώνων του νηματώδη. Και σε αυτή την περίπτωση σημειώνεται ότι τα άτομα δεν ήταν πλήρως ακινητοποιημένα, γεγονός που δεν εμπόδισε την λεπτομερή απεικόνιση του παραγόμενου σήματος φθορισμού.



**Εικόνα 3:** Απεικόνιση των μηχανοαισθητήριων νευρώνων του οργανισμού με τη μέθοδο OPT. Φαίνεται το παραγόμενο σήμα από τον φθορίζοντα μάρτυρα της GFP, η οποία εκφράζεται στους παραπάνω νευρώνες. Η απεικόνιση έγινε με τη χρήση φακού μεγέθυνσης 10x.

Μετά την ανάπτυξη της παραπάνω διάταξης για την απεικόνιση του νηματώδους με τη μέθοδο της οπτικής τομογραφίας στοχεύεται η πραγματοποίηση πειραμάτων που θα αφορούν το αναπτυξιακό πρότυπο διαφόρων νευρώνων. Ο απώτερος σκοπός δηλαδή της μεθόδου είναι η *in vivo* τρισδιάστατη απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο της ανάπτυξης συγκεκριμένων νευρώνων. Έτσι, θα μπορέσει να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση και ανάλυση τυχόν μορφολογικών-δομικών ανωμαλιών σε μεταλλαγμένα στελέχη του νηματώδη και η μελέτη μηχανισμών ανάπτυξης του νευρικού συστήματος του οργανισμού.

[Περιεχόμενα](#)



## Βιβλιογραφία

1. Albertson, D.G., and Thomson, J.N. (1976). The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 275, 299-325.
2. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
3. Alvarez de la Rosa, D., Krueger, S.R., Kolar, A., Shao, D., Fitzsimonds, R.M., and Canessa, C.M. (2003). Distribution, subcellular localization and ontogeny of ASIC1 in the mammalian central nervous system. *J Physiol* 546, 77-87.
4. Anderson, R.G., and Orci, L. (1988). A view of acidic intracellular compartments. *J Cell Biol* 106, 539-543.
5. Babini, E., Paukert, M., Geisler, H.S., and Grunder, S. (2002). Alternative splicing and interaction with di- and polyvalent cations control the dynamic range of acid-sensing ion channel 1 (ASIC1). *J Biol Chem* 277, 41597-41603.
6. Balderas, I., Ramirez-Amaya, V., and Bermudez-Rattoni, F. (2004). [Memory-linked morphological changes]. *Rev Neurol* 38, 944-948.
7. Bargmann, C. (2005). Neuroscience: comradeship and nostalgia in nematodes. *Curr Biol* 15, R832-833.
8. Bargmann, C.I., Hartweg, E., and Horvitz, H.R. (1993). Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* 74, 515-527.
9. Bargmann, C.I., and Horvitz, H.R. (1991). Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron* 7, 729-742.
10. Bargmann, C.I., and Kaplan, J.M. (1998). Signal transduction in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Annu Rev Neurosci* 21, 279-308.
11. Bassilana, F., Champigny, G., Waldmann, R., de Weille, J.R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997). The acid-sensitive ionic channel subunit ASIC and the mammalian degenerin MDEG form a heteromultimeric H<sup>+</sup>-gated Na<sup>+</sup> channel with novel properties. *J Biol Chem* 272, 28819-28822.
12. Baxter, D.A., and Byrne, J.H. (2006). Feeding behavior of *Aplysia*: a model system for comparing cellular mechanisms of classical and operant conditioning. *Learn Mem* 13, 669-680.
13. Bear, M.F., and Malenka, R.C. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current opinion in neurobiology* 4, 389-399.

14. Benson, C.J., Xie, J., Wemmie, J.A., Price, M.P., Henss, J.M., Welsh, M.J., and Snyder, P.M. (2002). Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H<sup>+</sup>-gated channels in mouse sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2338-2343.
15. Berezikov, E., Bargmann, C.I., and Plasterk, R.H. (2004). Homologous gene targeting in *Caenorhabditis elegans* by biolistic transformation. *Nucleic Acids Res* 32, e40.
16. Bernhard, N., and van der Kooy, D. (2000). A behavioral and genetic dissection of two forms of olfactory plasticity in *Caenorhabditis elegans*: adaptation and habituation. *Learn Mem* 7, 199-212.
17. Bettinger, J.C., and McIntire, S.L. (2004). State-dependency in *C. elegans*. *Genes Brain Behav* 3, 266-272.
18. Bliss, T.V., and Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
19. Botvinick, E.L., and Shah, J.V. (2007). Laser-based measurements in cell biology. *Methods Cell Biol* 82, 81-109.
20. Bozza, T., McGann, J.P., Mombaerts, P., and Wachowiak, M. (2004). In vivo imaging of neuronal activity by targeted expression of a genetically encoded probe in the mouse. *Neuron* 42, 9-21.
21. Bradshaw, K.D., Emptage, N.J., and Bliss, T.V. (2003). A role for dendritic protein synthesis in hippocampal late LTP. *Eur J Neurosci* 18, 3150-3152.
22. Brembs, B., Lorenzetti, F.D., Reyes, F.D., Baxter, D.A., and Byrne, J.H. (2002). Operant reward learning in *Aplysia*: neuronal correlates and mechanisms. *Science (New York, NY)* 296, 1706-1709.
23. Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
24. Broverman, S., MacMorris, M., and Blumenthal, T. (1993). Alteration of *Caenorhabditis elegans* gene expression by targeted transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 4359-4363.
25. Byrne, J.H., and Kandel, E.R. (1996). Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci* 16, 425-435.
26. Campagnola, P.J., Clark, H.A., Mohler, W.A., Lewis, A., and Loew, L.M. (2001). Second-harmonic imaging microscopy of living cells. *J Biomed Opt* 6, 277-286.
27. Campagnola, P.J., and Loew, L.M. (2003). Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nat Biotechnol* 21, 1356-1360.

28. Carvelli, L., McDonald, P.W., Blakely, R.D., and Defelice, L.J. (2004). Dopamine transporters depolarize neurons by a channel mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 16046-16051.
29. Chalfie, M., Eddy, S., Hengartner, M.O., Hodgkin, J., Kohara, Y., Plasterk, R.H., Waterston, R.H., and White, J.G. (1995). Genome maps. VI. *Caenorhabditis elegans*. Wall chart. *Science (New York, NY)* 270, 415-430.
30. Chalfie, M., Sulston, J.E., White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., and Brenner, S. (1985). The neural circuit for touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 5, 956-964.
31. Chase, D.L., Pepper, J.S., and Koelle, M.R. (2004). Mechanism of extrasynaptic dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Neurosci* 7, 1096-1103.
32. Chen, C.C., Zimmer, A., Sun, W.H., Hall, J., Brownstein, M.J., and Zimmer, A. (2002). A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8992-8997.
33. Colbert, H.A., and Bargmann, C.I. (1995). Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. elegans*. *Neuron* 14, 803-812.
34. Colbert, H.A., and Bargmann, C.I. (1997). Environmental signals modulate olfactory acuity, discrimination, and memory in *Caenorhabditis elegans*. *Learn Mem* 4, 179-191.
35. Coulson, A., Huynh, C., Kozono, Y., and Shownkeen, R. (1995). The physical map of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Methods Cell Biol* 48, 533-550.
36. Cox, G., and Sheppard, C.J. (2004). Practical limits of resolution in confocal and non-linear microscopy. *Microsc Res Tech* 63, 18-22.
37. Culotti, J.G., and Russell, R.L. (1978). Osmotic avoidance defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 90, 243-256.
38. Daw, N.W., Stein, P.S., and Fox, K. (1993). The role of NMDA receptors in information processing. *Annu Rev Neurosci* 16, 207-222.
39. de Bono, M., and Bargmann, C.I. (1998). Natural variation in a neuropeptide Y receptor homolog modifies social behavior and food response in *C. elegans*. *Cell* 94, 679-689.
40. de Bono, M., and Maricq, A.V. (2005). Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. *Annu Rev Neurosci* 28, 451-501.
41. De Houwer, J., Thomas, S., and Baeyens, F. (2001). Associative learning of likes and dislikes: a review of 25 years of research on human evaluative conditioning. *Psychol Bull* 127, 853-869.

42. Debarre, D., Pena, A.M., Supatto, W., Boulesteix, T., Strupler, M., Sauviat, M.P., Martin, J.L., Schanne-Klein, M.C., and Beaurepaire, E. (2006a). [Second- and third-harmonic generation microscopies for the structural imaging of intact tissues]. *Med Sci (Paris)* 22, 845-850.
43. Debarre, D., Supatto, W., and Beaurepaire, E. (2005). Structure sensitivity in third-harmonic generation microscopy. *Opt Lett* 30, 2134-2136.
44. Debarre, D., Supatto, W., Pena, A.M., Fabre, A., Tordjmann, T., Combettes, L., Schanne-Klein, M.C., and Beaurepaire, E. (2006b). Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy. *Nat Methods* 3, 47-53.
45. Denk, W., Strickler, J.H., and Webb, W.W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science (New York, NY)* 248, 73-76.
46. Derkach, V., Barria, A., and Soderling, T.R. (1999). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3269-3274.
47. Driscoll, M., and Chalfie, M. (1991). The mec-4 gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature* 349, 588-593.
48. Driscoll, M., and Tavernarakis, N. (1997). Molecules that mediate touch transduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Gravit Space Biol Bull* 10, 33-42.
49. Duerr, J.S., Frisby, D.L., Gaskin, J., Duke, A., Asermely, K., Huddleston, D., Eiden, L.E., and Rand, J.B. (1999). The cat-1 gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a vesicular monoamine transporter required for specific monoamine-dependent behaviors. *J Neurosci* 19, 72-84.
50. Dufour, P., Dufour, S., Castonguay, A., McCarthy, N., and De Koninck, Y. (2006). [Two-photon laser scanning fluorescence microscopy for functional cellular imaging: Advantages and challenges or One photon is good... but two is better!]. *Med Sci (Paris)* 22, 837-844.
51. Filippidis, G., Kouloumentas, C., Voglis, G., Zacharopoulou, F., Papazoglou, T.G., and Tavernarakis, N. (2005). Imaging of *Caenorhabditis elegans* neurons by second-harmonic generation and two-photon excitation fluorescence. *J Biomed Opt* 10, 024015.
52. Fire, A., Harrison, S.W., and Dixon, D. (1990). A modular set of lacZ fusion vectors for studying gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 93, 189-198.

53. Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2003). Monoamine transporters: from genes to behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 261-284.
54. Gao, Y., Liu, S.S., Qiu, S., Cheng, W., Zheng, J., and Luo, J.H. (2007). Fluorescence resonance energy transfer analysis of subunit assembly of the ASIC channel. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 143-150.
55. Garcia-Anoveros, J., Derfler, B., Neville-Golden, J., Hyman, B.T., and Corey, D.P. (1997). BNaC1 and BNaC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 1459-1464.
56. Giros, B., and Caron, M.G. (1993). Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol Sci* 14, 43-49.
57. Giros, B., Jaber, M., Jones, S.R., Wightman, R.M., and Caron, M.G. (1996). Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379, 606-612.
58. Golden, J.W., and Riddle, D.L. (1984). The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Dev Biol* 102, 368-378.
59. Gomez, M., De Castro, E., Guarin, E., Sasakura, H., Kuhara, A., Mori, I., Bartfai, T., Bargmann, C.I., and Nef, P. (2001). Ca<sup>2+</sup> signaling via the neuronal calcium sensor-1 regulates associative learning and memory in *C. elegans*. *Neuron* 30, 241-248.
60. Groves, P.M., and Thompson, R.F. (1970). Habituation: a dual-process theory. *Psychol Rev* 77, 419-450.
61. Hall, D.H., and Hedgecock, E.M. (1991). Kinesin-related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. *Cell* 65, 837-847.
62. Hansel, C., Linden, D.J., and D'Angelo, E. (2001). Beyond parallel fiber LTD: the diversity of synaptic and non-synaptic plasticity in the cerebellum. *Nat Neurosci* 4, 467-475.
63. Harbinder, S., Tavernarakis, N., Herndon, L.A., Kinnell, M., Xu, S.Q., Fire, A., and Driscoll, M. (1997). Genetically targeted cell disruption in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 13128-13133.
64. Hebb, D.O. (1949). *The organization of behavior; a neuropsychological theory* (New York,, Wiley).
65. Hedgecock, E.M., and Russell, R.L. (1975). Normal and mutant thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 4061-4065.

66. Hesselager, M., Timmermann, D.B., and Ahring, P.K. (2004). pH Dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits. *J Biol Chem* 279, 11006-11015.
67. Hietala, J., and Syvalahti, E. (1996). Dopamine in schizophrenia. *Ann Med* 28, 557-561.
68. Hills, T., Brockie, P.J., and Maricq, A.V. (2004). Dopamine and glutamate control area-restricted search behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 24, 1217-1225.
69. Hobert, O. (2003). Behavioral plasticity in *C. elegans*: paradigms, circuits, genes. *J Neurobiol* 54, 203-223.
70. Hong, K., Mano, I., and Driscoll, M. (2000). In vivo structure-function analyses of *Caenorhabditis elegans* MEC-4, a candidate mechanosensory ion channel subunit. *J Neurosci* 20, 2575-2588.
71. Huber, R. (2005). Amines and motivated behaviors: a simpler systems approach to complex behavioral phenomena. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 191, 231-239.
72. Humeau, Y., Shaban, H., Bissiere, S., and Luthi, A. (2003). Presynaptic induction of heterosynaptic associative plasticity in the mammalian brain. *Nature* 426, 841-845.
73. Hyman, S.E., Malenka, R.C., and Nestler, E.J. (2006). Neural Mechanisms of Addiction: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annu Rev Neurosci*.
74. Ishihara, T., Iino, Y., Mohri, A., Mori, I., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., and Katsura, I. (2002). HEN-1, a secretory protein with an LDL receptor motif, regulates sensory integration and learning in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 109, 639-649.
75. Jansen, G., Weinkove, D., and Plasterk, R.H. (2002). The G-protein gamma subunit *gpc-1* of the nematode *C.elegans* is involved in taste adaptation. *Embo J* 21, 986-994.
76. Jayanthi, L.D., Apparsundaram, S., Malone, M.D., Ward, E., Miller, D.M., Eppler, M., and Blakely, R.D. (1998). The *Caenorhabditis elegans* gene T23G5.5 encodes an antidepressant- and cocaine-sensitive dopamine transporter. *Mol Pharmacol* 54, 601-609.
77. Jia, K., Chen, D., and Riddle, D.L. (2004). The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* 131, 3897-3906.
78. Jorgensen, E.M. (2004). Dopamine: should I stay or should I go now? *Nat Neurosci* 7, 1019-1021.

79. Jospin, M., and Allard, B. (2004). An amiloride-sensitive H<sup>+</sup>-gated Na<sup>+</sup> channel in *Caenorhabditis elegans* body wall muscle cells. *J Physiol* 559, 715-720.
80. Jospin, M., Mariol, M.C., Segalat, L., and Allard, B. (2004). Patch clamp study of the UNC-105 degenerin and its interaction with the LET-2 collagen in *Caenorhabditis elegans* muscle. *J Physiol* 557, 379-388.
81. Kall, L., Krogh, A., and Sonnhammer, E.L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol* 338, 1027-1036.
82. Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G., and Ahringer, J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* 2, RESEARCH0002.
83. Kandel, E.R. (2004). The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Bioscience reports* 24, 475-522.
84. Kapatos, G., Hirayama, K., Shimoji, M., and Milstien, S. (1999). GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein is expressed in serotonin neurons and regulates tetrahydrobiopterin biosynthesis. *J Neurochem* 72, 669-675.
85. Kellenberger, S., and Schild, L. (2002). Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* 82, 735-767.
86. Kerr, R., Lev-Ram, V., Baird, G., Vincent, P., Tsien, R.Y., and Schafer, W.R. (2000). Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron* 26, 583-594.
87. Khachatourians, A., Lewis, A., Rothman, Z., Loew, L., and Treinin, M. (2000). GFP is a selective non-linear optical sensor of electrophysiological processes in *Caenorhabditis elegans*. *Biophys J* 79, 2345-2352.
88. Kimble, J., Hodgkin, J., Smith, T., and Smith, J. (1982). Suppression of an amber mutation by microinjection of suppressor tRNA in *C. elegans*. *Nature* 299, 456-458.
89. Kindt, K.S., Quast, K.B., Giles, A.C., De, S., Hendrey, D., Nicastro, I., Rankin, C.H., and Schafer, W.R. (2007). Dopamine Mediates Context-Dependent Modulation of Sensory Plasticity in *C. elegans*. *Neuron* 55, 662-676.
90. Klein, M., and Kandel, E.R. (1980). Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 6912-6916.
91. Koch, R., van Luenen, H.G., van der Horst, M., Thijssen, K.L., and Plasterk, R.H. (2000). Single nucleotide polymorphisms in wild isolates of *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res* 10, 1690-1696.

92. Krishtal, O. (2003). The ASICs: signaling molecules? Modulators? Trends Neurosci 26, 477-483.
93. Krishtal, O.A., Osipchuk, Y.V., Shelest, T.N., and Smirnov, S.V. (1987). Rapid extracellular pH transients related to synaptic transmission in rat hippocampal slices. Brain Res 436, 352-356.
94. Krishtal, O.A., and Pidoplichko, V.I. (1980). A receptor for protons in the nerve cell membrane. Neuroscience 5, 2325-2327.
95. Law, E., Nuttley, W.M., and van der Kooy, D. (2004). Contextual taste cues modulate olfactory learning in *C. elegans* by an occasion-setting mechanism. Curr Biol 14, 1303-1308.
96. Lee, H.K., Takamiya, K., Han, J.S., Man, H., Kim, C.H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R.S., *et al.* (2003). Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. Cell 112, 631-643.
97. Lints, R., and Emmons, S.W. (1999). Patterning of dopaminergic neurotransmitter identity among *Caenorhabditis elegans* ray sensory neurons by a TGFbeta family signaling pathway and a Hox gene. Development 126, 5819-5831.
98. Lisman, J., Lichtman, J.W., and Sanes, J.R. (2003). LTP: perils and progress. Nat Rev Neurosci 4, 926-929.
99. Liu, K.S., and Sternberg, P.W. (1995). Sensory regulation of male mating behavior in *Caenorhabditis elegans*. Neuron 14, 79-89.
100. Loer, C.M., and Kenyon, C.J. (1993). Serotonin-deficient mutants and male mating behavior in the nematode *Caenorhabditis elegans*. J Neurosci 13, 5407-5417.
101. Maiti, S., Shear, J.B., Williams, R.M., Zipfel, W.R., and Webb, W.W. (1997). Measuring serotonin distribution in live cells with three-photon excitation. Science (New York, NY 275, 530-532.
102. Mamet, J., Baron, A., Lazdunski, M., and Voilley, N. (2002). Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. J Neurosci 22, 10662-10670.
103. Maren, S. (2003). The amygdala, synaptic plasticity, and fear memory. Ann N Y Acad Sci 985, 106-113.
104. Marsden, C.D. (1992). Parkinson's disease. Postgrad Med J 68, 538-543.
105. Martin-Soelch, C., Linthicum, J., and Ernst, M. (2007). Appetitive conditioning: neural bases and implications for psychopathology. Neurosci Biobehav Rev 31, 426-440.



106. Mazzuca, M., Heurteaux, C., Alloui, A., Diochot, S., Baron, A., Voilley, N., Blondeau, N., Escoubas, P., Gelot, A., Cupo, A., *et al.* (2007). A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat Neurosci* 10, 943-945.
107. McDonald, P.W., Jessen, T., Field, J.R., and Blakely, R.D. (2006). Dopamine Signaling Architecture in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Mol Neurobiol*.
108. Mello, C., and Fire, A. (1995). DNA transformation. *Methods Cell Biol* 48, 451-482.
109. Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D., and Ambros, V. (1991). Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *Embo J* 10, 3959-3970.
110. Miesenbock, G., De Angelis, D.A., and Rothman, J.E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394, 192-195.
111. Mirenowicz, J., and Schultz, W. (1996). Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature* 379, 449-451.
112. Moreaux, L., Pons, T., Dambrin, V., Blanchard-Desce, M., and Mertz, J. (2003). Electro-optic response of second-harmonic generation membrane potential sensors. *Opt Lett* 28, 625-627.
113. Mori, I. (1999). Genetics of chemotaxis and thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Genet* 33, 399-422.
114. Mori, I., and Ohshima, Y. (1995). Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 376, 344-348.
115. Morrison, G.E., and van der Kooy, D. (2001). A mutation in the AMPA-type glutamate receptor, *glr-1*, blocks olfactory associative and nonassociative learning in *Caenorhabditis elegans*. *Behav Neurosci* 115, 640-649.
116. Morrison, G.E., Wen, J.Y., Runciman, S., and van der Kooy, D. (1999). Olfactory associative learning in *Caenorhabditis elegans* is impaired in *lrn-1* and *lrn-2* mutants. *Behav Neurosci* 113, 358-367.
117. Nass, R., Hahn, M.K., Jessen, T., McDonald, P.W., Carvelli, L., and Blakely, R.D. (2005). A genetic screen in *Caenorhabditis elegans* for dopamine neuron insensitivity to 6-hydroxydopamine identifies dopamine transporter mutants impacting transporter biosynthesis and trafficking. *J Neurochem* 94, 774-785.
118. Nelson, A.B., Gittis, A.H., and du Lac, S. (2005). Decreases in CaMKII activity trigger persistent potentiation of intrinsic excitability in spontaneously firing vestibular nucleus neurons. *Neuron* 46, 623-631.

119. Nicoll, R.A., and Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci* 6, 863-876.
120. Nonet, M.L., Saifee, O., Zhao, H., Rand, J.B., and Wei, L. (1998). Synaptic transmission deficits in *Caenorhabditis elegans* synaptobrevin mutants. *J Neurosci* 18, 70-80.
121. Notredame, C., Higgins, D.G., and Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302, 205-217.
122. Nuttley, W.M., Atkinson-Leadbetter, K.P., and Van Der Kooy, D. (2002). Serotonin mediates food-odor associative learning in the nematode *Caenorhabditiselegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12449-12454.
123. Oheim, M., Michael, D.J., Geisbauer, M., Madsen, D., and Chow, R.H. (2006). Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 788-808.
124. Olson, P.A., Tkatch, T., Hernandez-Lopez, S., Ulrich, S., Ilijic, E., Mugnaini, E., Zhang, H., Bezprozvanny, I., and Surmeier, D.J. (2005). G-protein-coupled receptor modulation of striatal CaV1.3 L-type Ca<sup>2+</sup> channels is dependent on a Shank-binding domain. *J Neurosci* 25, 1050-1062.
125. Paukert, M., Babini, E., Pusch, M., and Grunder, S. (2004). Identification of the Ca<sup>2+</sup> blocking site of acid-sensing ion channel (ASIC) 1: implications for channel gating. *J Gen Physiol* 124, 383-394.
126. Pavlov, I.P., Gantt, W.H., and Fol\*bert, G.V. (1928). *Lectures on conditioned reflexes* (New York,, International publishers).
127. Peleg, G., Lewis, A., Linial, M., and Loew, L.M. (1999). Nonlinear optical measurement of membrane potential around single molecules at selected cellular sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6700-6704.
128. Perez, M.F., White, F.J., and Hu, X.T. (2006). Dopamine D(2) receptor modulation of K(+) channel activity regulates excitability of nucleus accumbens neurons at different membrane potentials. *J Neurophysiol* 96, 2217-2228.
129. Pidoplichko, V.I., and Dani, J.A. (2006). Acid-sensitive ionic channels in midbrain dopamine neurons are sensitive to ammonium, which may contribute to hyperammonemia damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 11376-11380.

130. Pierce-Shimomura, J.T., Faumont, S., Gaston, M.R., Pearson, B.J., and Lockery, S.R. (2001). The homeobox gene *lim-6* is required for distinct chemosensory representations in *C. elegans*. *Nature* *410*, 694-698.
131. Piggott, M.A., Ballard, C.G., Rowan, E., Holmes, C., McKeith, I.G., Jaros, E., Perry, R.H., and Perry, E.K. (2007). Selective loss of dopamine D2 receptors in temporal cortex in dementia with Lewy bodies, association with cognitive decline. *Synapse* *61*, 903-911.
132. Plotnikov, S.V., Millard, A.C., Campagnola, P.J., and Mohler, W.A. (2006). Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres. *Biophys J* *90*, 693-703.
133. Poirot, O., Berta, T., Decosterd, I., and Kellenberger, S. (2006). Distinct ASIC currents are expressed in rat putative nociceptors and are modulated by nerve injury. *J Physiol* *576*, 215-234.
134. Price, M.P., McIlwrath, S.L., Xie, J., Cheng, C., Qiao, J., Tarr, D.E., Sluka, K.A., Brennan, T.J., Lewin, G.R., and Welsh, M.J. (2001). The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* *32*, 1071-1083.
135. Pujol, N., Bonnerot, C., Ewbank, J.J., Kohara, Y., and Thierry-Mieg, D. (2001). The *Caenorhabditis elegans* *unc-32* gene encodes alternative forms of a vacuolar ATPase a subunit. *J Biol Chem* *276*, 11913-11921.
136. Rankin, C.H. (2004). Invertebrate learning: what can't a worm learn? *Curr Biol* *14*, R617-618.
137. Rankin, C.H., Beck, C.D., and Chiba, C.M. (1990). *Caenorhabditis elegans*: a new model system for the study of learning and memory. *Behav Brain Res* *37*, 89-92.
138. Reiff, D.F., Ihring, A., Guerrero, G., Isacoff, E.Y., Joesch, M., Nakai, J., and Borst, A. (2005). In vivo performance of genetically encoded indicators of neural activity in flies. *J Neurosci* *25*, 4766-4778.
139. Reiner, D.J., Weinshenker, D., and Thomas, J.H. (1995). Analysis of dominant mutations affecting muscle excitation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *141*, 961-976.
140. Riemensperger, T., Voller, T., Stock, P., Buchner, E., and Fiala, A. (2005). Punishment prediction by dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Curr Biol* *15*, 1953-1960.

141. Rios, M., Habecker, B., Sasaoka, T., Eisenhofer, G., Tian, H., Landis, S., Chikaraishi, D., and Roffler-Tarlov, S. (1999). Catecholamine synthesis is mediated by tyrosinase in the absence of tyrosine hydroxylase. *J Neurosci* 19, 3519-3526.
142. Rongo, C., and Kaplan, J.M. (1999). CaMKII regulates the density of central glutamatergic synapses in vivo. *Nature* 402, 195-199.
143. Rose, J.K., Kaun, K.R., Chen, S.H., and Rankin, C.H. (2003). GLR-1, a non-NMDA glutamate receptor homolog, is critical for long-term memory in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 23, 9595-9599.
144. Rose, J.K., and Rankin, C.H. (2001). Analyses of habituation in *Caenorhabditis elegans*. *Learn Mem* 8, 63-69.
145. Ryan, T.A. (2001). Presynaptic imaging techniques. *Current opinion in neurobiology* 11, 544-549.
146. Saeki, S., Yamamoto, M., and Iino, Y. (2001). Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Biol* 204, 1757-1764.
147. Salinas, M., Rash, L.D., Baron, A., Lambeau, G., Escoubas, P., and Lazdunski, M. (2006). The receptor site of the spider toxin PcTx1 on the proton-gated cation channel ASIC1a. *J Physiol* 570, 339-354.
148. Sambrook, J., Russell, D.W., and Sambrook, J. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set)* (Cold).
149. Samson, R.D., Duvarci, S., and Pare, D. (2005). Synaptic plasticity in the central nucleus of the amygdala. *Rev Neurosci* 16, 287-302.
150. Samuel, A.D., Silva, R.A., and Murthy, V.N. (2003). Synaptic activity of the AFD neuron in *Caenorhabditis elegans* correlates with thermotactic memory. *J Neurosci* 23, 373-376.
151. Sankaranarayanan, S., De Angelis, D., Rothman, J.E., and Ryan, T.A. (2000). The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophys J* 79, 2199-2208.
152. Sanyal, S., Wintle, R.F., Kindt, K.S., Nuttley, W.M., Arvan, R., Fitzmaurice, P., Bigras, E., Merz, D.C., Hebert, T.E., van der Kooy, D., *et al.* (2004). Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* 23, 473-482.
153. Sawin, E.R., Ranganathan, R., and Horvitz, H.R. (2000). *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. *Neuron* 26, 619-631.

154. Schafer, W.R., and Kenyon, C.J. (1995). A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 375, 73-78.
155. Schilstrom, B., Yaka, R., Argilli, E., Suvarna, N., Schumann, J., Chen, B.T., Carman, M., Singh, V., Mailliard, W.S., Ron, D., *et al.* (2006). Cocaine enhances NMDA receptor-mediated currents in ventral tegmental area cells via dopamine D5 receptor-dependent redistribution of NMDA receptors. *J Neurosci* 26, 8549-8558.
156. Schins, J.M., and Muller, M. (2002). Third-harmonic generation microscopy in highly scattering media: comment. *Appl Opt* 41, 1995; discussion 1996-1997.
157. Schroll, C., Riemensperger, T., Bucher, D., Ehmer, J., Voller, T., Erbguth, K., Gerber, B., Hendel, T., Nagel, G., Buchner, E., *et al.* (2006). Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in *Drosophila* larvae. *Curr Biol* 16, 1741-1747.
158. Schultz, W. (2007). Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci*.
159. Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., and Heisenberg, M. (2003). Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J Neurosci* 23, 10495-10502.
160. Seymour, B., Singer, T., and Dolan, R. (2007). The neurobiology of punishment. *Nat Rev Neurosci* 8, 300-311.
161. Sharpe, J. (2003). Optical projection tomography as a new tool for studying embryo anatomy. *J Anat* 202, 175-181.
162. Sharpe, J. (2004). Optical projection tomography. *Annu Rev Biomed Eng* 6, 209-228.
163. Sharpe, J., Ahlgren, U., Perry, P., Hill, B., Ross, A., Hecksher-Sorensen, J., Baldock, R., and Davidson, D. (2002). Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies. *Science (New York, NY)* 296, 541-545.
164. Shuster, M.J., Camardo, J.S., Siegelbaum, S.A., and Kandel, E.R. (1985). Cyclic AMP-dependent protein kinase closes the serotonin-sensitive K<sup>+</sup> channels of *Aplysia* sensory neurones in cell-free membrane patches. *Nature* 313, 392-395.
165. Siegelbaum, S.A., and Kandel, E.R. (1991). Learning-related synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current opinion in neurobiology* 1, 113-120.
166. Siwicki, K.K., and Ladewski, L. (2003). Associative learning and memory in *Drosophila*: beyond olfactory conditioning. *Behav Processes* 64, 225-238.
167. So, P.T., Dong, C.Y., Masters, B.R., and Berland, K.M. (2000). Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Annu Rev Biomed Eng* 2, 399-429.

168. Spielow, C., Roubert, C., Hamon, M., Nosten-Bertrand, M., Betancur, C., and Giros, B. (2000). Behavioural disturbances associated with hyperdopaminergia in dopamine-transporter knockout mice. *Behav Pharmacol* 11, 279-290.
169. Sudhof, T.C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375, 645-653.
170. Sugiura, M., Fuke, S., Suo, S., Sasagawa, N., Van Tol, H.H., and Ishiura, S. (2005). Characterization of a novel D2-like dopamine receptor with a truncated splice variant and a D1-like dopamine receptor unique to invertebrates from *Caenorhabditis elegans*. *J Neurochem* 94, 1146-1157.
171. Sulston, J., Dew, M., and Brenner, S. (1975). Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* 163, 215-226.
172. Sulston, J.E., and Horvitz, H.R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56, 110-156.
173. Suo, S., Ishiura, S., and Van Tol, H.H. (2004). Dopamine receptors in *C. elegans*. *Eur J Pharmacol* 500, 159-166.
174. Suo, S., Sasagawa, N., and Ishiura, S. (2002). Identification of a dopamine receptor from *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Lett* 319, 13-16.
175. Suo, S., Sasagawa, N., and Ishiura, S. (2003). Cloning and characterization of a *Caenorhabditis elegans* D2-like dopamine receptor. *J Neurochem* 86, 869-878.
176. Sutherland, S.P., Benson, C.J., Adelman, J.P., and McCleskey, E.W. (2001). Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 711-716.
177. Syntichaki, P., and Tavernarakis, N. (2004). Genetic models of mechanotransduction: the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Physiol Rev* 84, 1097-1153.
178. Tavernarakis, N., and Driscoll, M. (1997). Molecular modeling of mechanotransduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Physiol* 59, 659-689.
179. Tavernarakis, N., and Driscoll, M. (2000). *Caenorhabditis elegans* degenerins and vertebrate ENaC ion channels contain an extracellular domain related to venom neurotoxins. *J Neurogenet* 13, 257-264.
180. Tavernarakis, N., and Driscoll, M. (2001a). Degenerins. At the core of the metazoan mechanotransducer? *Ann N Y Acad Sci* 940, 28-41.
181. Tavernarakis, N., and Driscoll, M. (2001b). Mechanotransduction in *Caenorhabditis elegans*: the role of DEG/ENaC ion channels. *Cell Biochem Biophys* 35, 1-18.

182. Tavernarakis, N., Everett, J.K., Kyrpides, N.C., and Driscoll, M. (2001). Structural and functional features of the intracellular amino terminus of DEG/ENaC ion channels. *Curr Biol* 11, R205-208.
183. Tavernarakis, N., Shreffler, W., Wang, S., and Driscoll, M. (1997). *unc-8*, a DEG/ENaC family member, encodes a subunit of a candidate mechanically gated channel that modulates *C. elegans* locomotion. *Neuron* 18, 107-119.
184. Tavernarakis, N., Wang, S.L., Dorovkov, M., Ryazanov, A., and Driscoll, M. (2000). Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat Genet* 24, 180-183.
185. The (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* (New York, NY 282, 2012-2018.
186. 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.
187. Tomioka, M., Adachi, T., Suzuki, H., Kunitomo, H., Schafer, W.R., and Iino, Y. (2006). The insulin/PI 3-kinase pathway regulates salt chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* 51, 613-625.
188. Torayama, I., Ishihara, T., and Katsura, I. (2007). *Caenorhabditis elegans* integrates the signals of butanone and food to enhance chemotaxis to butanone. *J Neurosci* 27, 741-750.
189. Troemel, E.R. (1999). Chemosensory signaling in *C. elegans*. *Bioessays* 21, 1011-1020.
190. Tsien, J.Z., Huerta, P.T., and Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87, 1327-1338.
191. Vogel, E.H., Castro, M.E., and Saavedra, M.A. (2004). Quantitative models of Pavlovian conditioning. *Brain Res Bull* 63, 173-202.
192. Voglis, G., and Tavernarakis, N. (2006). The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO Rep* 7, 1104-1110.
193. Voilley, N., de Weille, J., Mamet, J., and Lazdunski, M. (2001). Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci* 21, 8026-8033.
194. Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997). A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 386, 173-177.

195. Waldmann, R., Champigny, G., Lingueglia, E., De Welle, J.R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1999). H(+)-gated cation channels. *Ann N Y Acad Sci* 868, 67-76.
196. Ward, S. (1973). Chemotaxis by the nematode *Caenorhabditis elegans*: identification of attractants and analysis of the response by use of mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, 817-821.
197. Ward, S., and Carrel, J.S. (1979). Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 73, 304-321.
198. Ward, S., Thomson, N., White, J.G., and Brenner, S. (1975). Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* 160, 313-337.
199. Weinshenker, D., Garriga, G., and Thomas, J.H. (1995). Genetic and pharmacological analysis of neurotransmitters controlling egg laying in *C. elegans*. *J Neurosci* 15, 6975-6985.
200. Weinshenker, D., Wei, A., Salkoff, L., and Thomas, J.H. (1999). Block of an ether-a-go-go-like K(+) channel by imipramine rescues *egl-2* excitation defects in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 19, 9831-9840.
201. Wemmie, J.A., Askwith, C.C., Lamani, E., Cassell, M.D., Freeman, J.H., Jr., and Welsh, M.J. (2003). Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *J Neurosci* 23, 5496-5502.
202. Wemmie, J.A., Chen, J., Askwith, C.C., Hruska-Hageman, A.M., Price, M.P., Nolan, B.C., Yoder, P.G., Lamani, E., Hoshi, T., Freeman, J.H., Jr., *et al.* (2002). The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron* 34, 463-477.
203. Wemmie, J.A., Coryell, M.W., Askwith, C.C., Lamani, E., Leonard, A.S., Sigmund, C.D., and Welsh, M.J. (2004). Overexpression of acid-sensing ion channel 1a in transgenic mice increases acquired fear-related behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3621-3626.
204. Wen, J.Y., Kumar, N., Morrison, G., Rambaldini, G., Runciman, S., Rousseau, J., and van der Kooy, D. (1997). Mutations that prevent associative learning in *C. elegans*. *Behav Neurosci* 111, 354-368.
205. White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., and Brenner, S. (1976). The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 275, 327-348.



206. White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., and Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 314, 1-340.
207. Wicks, S.R., and Rankin, C.H. (1995). Integration of mechanosensory stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 15, 2434-2444.
208. Wicks, S.R., and Rankin, C.H. (1997). Effects of tap withdrawal response habituation on other withdrawal behaviors: the localization of habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Behav Neurosci* 111, 342-353.
209. Wicks, S.R., Yeh, R.T., Gish, W.R., Waterston, R.H., and Plasterk, R.H. (2001). Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nat Genet* 28, 160-164.
210. Williams, B.D., Schrank, B., Huynh, C., Shownkeen, R., and Waterston, R.H. (1992). A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics* 131, 609-624.
211. Wintle, R.F., and Van Tol, H.H. (2001). Dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*-potential for parkinsonism research. *Parkinsonism Relat Disord* 7, 177-183.
212. Xu, C., Zipfel, W., Shear, J.B., Williams, R.M., and Webb, W.W. (1996). Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 10763-10768.
213. Xu, J., and Kang, J. (2005). The mechanisms and functions of activity-dependent long-term potentiation of intrinsic excitability. *Rev Neurosci* 16, 311-323.
214. Yermolaieva, O., Leonard, A.S., Schnizler, M.K., Abboud, F.M., and Welsh, M.J. (2004). Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6752-6757.
215. Zakharenko, S.S., Zablow, L., and Siegelbaum, S.A. (2001). Visualization of changes in presynaptic function during long-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 4, 711-717.
216. Zhang, P., Sigworth, F.J., and Canessa, C.M. (2006). Gating of acid-sensitive ion channel-1: release of Ca<sup>2+</sup> block vs. allosteric mechanism. *J Gen Physiol* 127, 109-117.
217. Zhang, W., and Linden, D.J. (2003). The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nat Rev Neurosci* 4, 885-900.

218. Zhao, M.G., Toyoda, H., Lee, Y.S., Wu, L.J., Ko, S.W., Zhang, X.H., Jia, Y., Shum, F., Xu, H., Li, B.M., *et al.* (2005). Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* 47, 859-872.
219. Zoumi, A., Yeh, A., and Tromberg, B.J. (2002). Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11014-11019.
220. Zucker, R.S., and Regehr, W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64, 355-405.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## Δημοσιεύσεις

1. **Voglis G.**, Tavernarakis N. (2007) A synaptic DEG/ENaC ion channel mediates associative learning in *C. elegans* by modulating dopamine signaling. (Submitted)
2. Gualda E. J., Filippidis G., **Voglis G.**, Mari M., Fotakis C., and Tavernarakis N. (2007) In vivo imaging of cellular structures in *Caenorhabditis elegans* by combined TPEF, SHG and THG microscopy. **Journal of Microscopy**, in press.
3. Gualda E. J., Filippidis G., **Voglis G.**, Mari M., Fotakis C., and Tavernarakis N. (2007) [In vivo imaging of anatomical features of the nematode \*Caenorhabditis elegans\* using non-linear \(TPEF-SHG-THG\) microscopy.](#) In **Confocal, Multiphoton, and Nonlinear Microscopic Imaging III** (Tony Wilson and Ammasi Periasamy, editors), SPIE Press, Bellingham, USA.
4. Bazopoulou M. D., **Voglis G.** and Tavernarakis N. (2007) [The role of DEG/ENaC ion channels in sensory mechanotransduction.](#) In **Molecular Sensors for Cardiovascular Homeostasis** (Donna Wang, editor), Springer Science Academic Publishers, New York, USA.
5. **Voglis G.** and Tavernarakis N. (2006) [The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity.](#) **EMBO Reports**, 7: 1104-1110.
6. **Voglis G.** and Tavernarakis N. (2005) [Mechanotransduction in the nematode \*Caenorhabditis elegans\*.](#) In **Mechanosensitivity in Cells and Tissues**, (Andre Kamkin and Irina Kiseleva, editors) Academic Book Russian International Publishers, Inc. Russia. (Also accessible at [NCBI Books](#))
7. Filippidis G., Kouloumentas C., Kapsokalyvas D., **Voglis G.**, Tavernarakis N. and Papazoglou T. G. (2005) [Imaging of \*Caenorhabditis elegans\* samples and sub-cellular localization of new generation photosensitizers for photodynamic therapy, using non-linear microscopy.](#) **Journal of Physics D: Applied Physics**, 38: 2625-2632.
8. Filippidis G., Kouloumentas C., **Voglis G.**, Zacharopoulou F., Papazoglou T. G., Tavernarakis N. (2005) [Imaging of \*Caenorhabditis elegans\* neurons by second-harmonic generation and two-photon excitation fluorescence.](#) **Journal of Biomedical Optics**, 10: 24015/1-8.