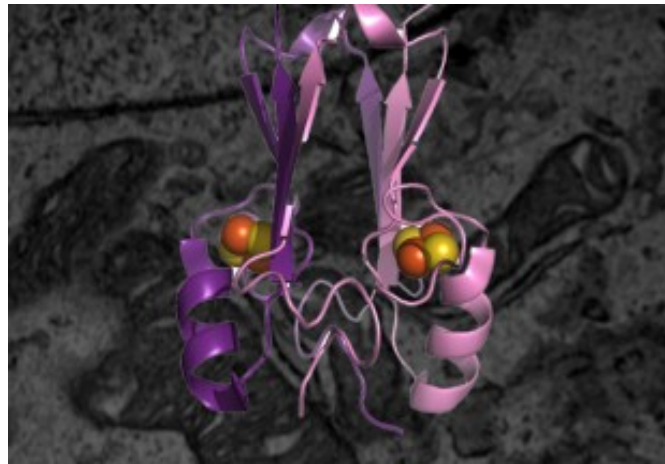




Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία

Μελέτη του ρόλου της μοναδικής πρωτεΐνης NEET στη γήρανση
του νηματώδους *Caenorabditis elegans*



Πλουμή Χριστίνα

Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Νηματωδών



ΙΤΕ
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας
& Βιοτεχνολογίας

Επιβλέπων Ερευνητής: Ταβερναράκης Νεκτάριος

Υπεύθυνα μέλη ΔΕΠ: Αλεξανδράκη Δέσποινα

Ηλιόπουλος Αριστείδης

Ευχαριστίες...

Η ολοκλήρωση της εργασίας αυτής υλοποιήθηκε με την υποστήριξη ενός αριθμού ανθρώπων στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή μου Νεκτάριο Τάβερναράκη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να γίνω μέλος της ερευνητικής του ομάδας και να εκπαιδευτώ τη μεταπτυχιακή μου διατριβή. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, το ενδιαφέρον καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Στη συνέχεια θέλω να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Μάνο, για την προθυμία του, την βοήθεια, τη συνεργασία και τη στήριξη του που συνεχίζει να μου προσφέρει από τα πρώτα βήματά μου στο εργαστήριο. Ευχαριστώ θερμά και την Αγγελία για τις όμορφες εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας, αλλά και για την πολύτιμη τεχνική υποστήριξη της στο εργαστήριο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στην κ. Μαίρη η οποία ήταν πάντα πρόθυμη να βοηθήσει και να συμβουλευθεί σε κάθε δυσκολία.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ ξεχωριστά σε όλα τα άλλα μέλη του εργαστηρίου (είμαστε και πολλοί!!!): τον Νίκο, τον Κώστα, τον Ηλία, την Ιωάννα, τη Διονυσία, την Ανδρέα, τη Μαργαρίτα, την Ειρήνη και τη Βασιλική. Μαζί τους πέρασε ένας χρόνος (και κάτι μήνες), γεμάτος όμορφες στιγμές: ενδιαφέρουσες συζητήσεις, γέλιο, πλάκες, ευχάριστα μεσημεριανά γεύματα και αρκετά ... (εργαστηριακά) ξενύχτια!

Θέλω ακόμα να ευχαριστήσω θερμά και τον Γιώργο, για την αγάπη, την υπομονή και τη στήριξη του τα τελευταία τέσσερα χρόνια. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω και τις κολλητές μου φίλες Αγγελική, Άννα και Μαρία. Τίς ευχαριστώ πολύ για τη δυνατή φιλία που αναπτύξαμε, και για τις υπέροχες στιγμές που περνάμε μαζί 6 χρόνια τώρα.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω τη συγκεκριμένη εργασία στους ανθρώπους που με στηρίζουν και είναι πάντα δίπλα μου σε κάθε βήμα της ζωής μου: στους γονείς μου, και στην αδερφή μου. Το ότι έχω φτάσει ως εδώ σήμερα το οφείλω πραγματικά σε αυτούς. Τους ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου και τους αγαπώ πολύ...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδες

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1. Εισαγωγή στη Βιολογία του <i>Caenorabditis elegans</i>	6
2. Πρωτεΐνες της οικογένειας NEET	8
1.1. CISD1	8
1.2. CISD2	10
1.3. CISD3	11
ΣΚΟΠΟΣ	12
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	13
A. Γενικές μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας	13
1. Δημιουργία δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> και μετασχηματισμός τους με τη μέθοδο ηλεκτρικού σοκ	13
2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας	14
3. Πέψη και αντίδραση συγκόλλησης	14
4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	15
5. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης	16
B. Συγκεκριμένη μεθοδολογία για τη δημιουργία των πλασμιδιακών κατασκευών της παρούσας εργασίας	16
1. Κατασκευή πλασμιδίων για τη δημιουργία μεταφραστικών μαρτύρων νηματώδων για το γονίδιο <i>W02B12.15</i>	16
2. Κατασκευή πλασμιδίων για την επαγωγή RNA παρεμβολής ειδικής για το γονίδιο <i>W02B12.15</i>	16
Γ. Τεχνικές που αφορούν τη μελέτη του νηματώδους <i>C. elegans</i>	
1. Στελέχη <i>C. elegans</i>	17
2. Βακτηριακά στελέχη και θρεπτικά μέσα για την καλλιέργειά τους	17
3. Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την ανάπτυξη των νηματώδων <i>C. elegans</i>	18
4. Ανάπτυξη και διατήρηση στελεχών	19
5. Συγχρονισμός και καθαρισμός νηματώδων από μολύνσεις (Bleaching)	20
6. Επαγωγή RNA παρεμβολής στον <i>C. elegans</i>	20
7. Πειράματα γήρανσης	21
8. Απομόνωση γενωμικού DNA	21

9. Απομόνωση ολικού RNA	22
10. Σύνθεση cDNA	22
11. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου	22
12. Δημιουργία διαγονιδιακών νηματώδων μέσω μικροένεσης	23
13. Μέτρηση ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου στον <i>C. elegans</i>	24
14. Μέτρηση παραγωγής ATP στον <i>C. elegans</i>	24
15. Τεχνικές μικροσκοπίας	24
Δ. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	25
Ε. Υλικά	25
1. Εκκινητές	25
2. Περιοριστικά ένζυμα	25
3. Χημικά αντιδραστήρια	25
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	26
1. Το γονίδιο <i>W02B12.15</i> κωδικοποιεί την μοναδική πρωτεΐνη NEET στον <i>C. elegans</i>	26
2. Προσδιορισμός του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης <i>W02B12.15</i>	27
3. Καταστολή έκφρασης του <i>W02B12.15</i> μειώνει σημαντικά τον μέσο όρο ζωής των ζώων αγρίου-τύπου	29
4. Καταστολή έκφρασης του <i>W02B12.15</i> εκλεκτικά στο νευρικό σύστημα μέσω RNAi	32
5. Μελέτη του ρόλου της πρωτεΐνης <i>W02B12.15</i> στη μιτοχονδριακή λειτουργία	32
6. Ρόλος της πρωτεΐνης <i>W02B12.15</i> στη ρύθμιση του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού (intrinsic apoptotic pathway)	35
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
ΠΑΡΑΘΕΜΑ_ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΧΑΡΤΕΣ	39
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	41

ABSTRACT

NEET family comprises a special type of iron-sulfur binding proteins implicated in a wide range of human pathologies: from ageing, to neurodegeneration and cancer. The nematode *Caenorabditis elegans* encodes only one functional homolog of the human NEET family, W02B12.15. The protein of interest is expressed in muscle, neuronal and intestinal epithelium cells in the nematode, and concerning its subcellular localization, it seems that it is tethered in the outer mitochondrial membrane. Downregulation of W02B12.15 gene expression through RNA interference reduces significantly the lifespan of wild-type worms, rendering W02B12.15 protein as an important determinant of ageing. It is suggested that W02B12.15 mediates its negative effects in ageing by maintaining steady-state levels of mitochondrial function and by regulating the balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic functions of the intrinsic apoptotic pathway.

Key Words: NEET, CDGSH domain, ageing, mitochondria, *C. elegans*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας NEET αποτελούν μία ειδική κατηγορία πρωτεϊνών οι οποίες δεσμεύουν συμπλέγματα σιδήρου-θείου [2Fe-2S] και έχουν εμπλακεί σε ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων στον άνθρωπο, από επίδραση στη γήρανση, μέχρι νευροεκφυλισμό και καρκίνο. Ο νηματώδης *Caenorabditis elegans* κωδικοποιεί μόνο ένα λειτουργικό ομόλογο της οικογένειας των πρωτεϊνών NEET, την πρωτεΐνη W02B12.15. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφράζεται σε μυϊκά, νευρικά καθώς και σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου του νηματώδους και ως προς την ενδοκυτταρική της τοπολογία, φαίνεται να προσδένεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Καταστολή έκφρασης του γονιδίου W02B12.15 μέσω RNA παρεμβολής προκαλεί σημαντική μείωση του μέσου όρου ζωής σε ζώα αγρίου-τύπου, καθιστώντας την πρωτεΐνη W02B12.15 σημαντικό καθοριστικό παράγοντα της γήρανσης. Προτείνεται ότι η W02B12.15 μεσολαβεί τις αντιγηραντικές επιδράσεις της, διατηρώντας σε σταθερά επίπεδα τη μιτοχονδριακή λειτουργία, αλλά και ρυθμίζοντας την ισορροπία προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών μηχανισμών του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού.

Λέξεις κλειδιά: NEET, επικράτεια CDGSH, γήρανση, μιτοχόνδρια, *C. elegans*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Εισαγωγή στη βιολογία του νηματώδους *Caenorabditis elegans*

Από το 1974, που ο Sydney Brenner τον πρότεινε ως μοντέλο-οργανισμό, ο νηματώδης *Caenorabditis elegans* έχει αποτελέσει πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη βιολογικών διεργασιών¹.

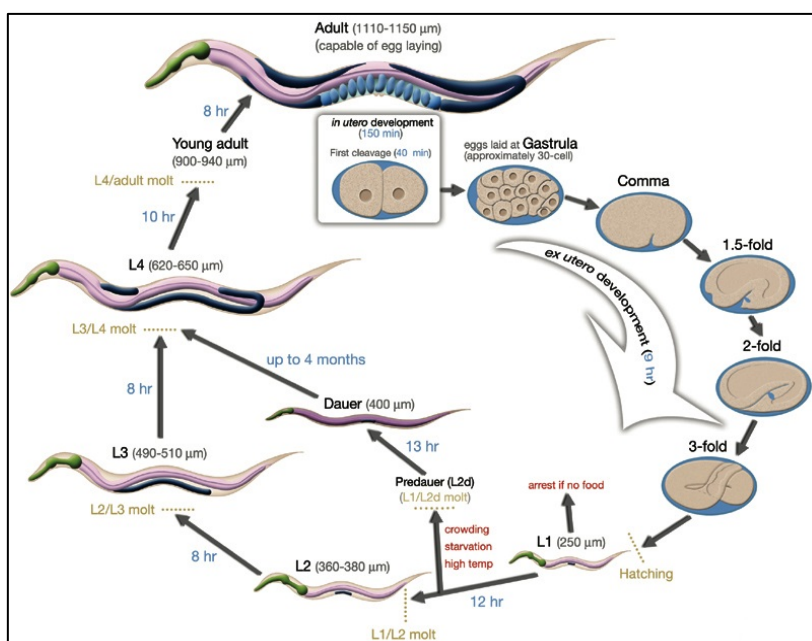
Ο *C. elegans* είναι ένας μικρός (το μέγιστο μήκος των ενήλικων ζώων είναι περίπου 1mm), ελεύθερος, μη παρασιτικός οργανισμός που ζει στο έδαφος. Σε εργαστηριακές συνθήκες, τρέφεται με το αργά αναπτυσσόμενο στέλεχος του βακτηρίου *Escherichia coli*, OP50, και μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, από 15 έως 25°C. Η κυρίαρχη σεξουαλική μορφή του *C. elegans* είναι τα ερμαφρόδιτα (γονότυπος XX), τα οποία μπορούν να αναπαραχθούν μέσω αυτογονιμοποίησης, αλλά μπορούν να δημιουργηθούν και αρσενικά (γονότυπος XO). Η χρήση των ερμαφρόδιτων προσφέρει τη δυνατότητα ανάκτησης και διατήρησης γενετικά πανομοιότυπων ζώων, ενώ διασταύρωση ερμαφρόδιτων ζώων με αρσενικά άτομα, επιτρέπει τη δημιουργία διπλά μεταλλαγμένων στελεχών.

Ο αναπαραγωγικός κύκλος του *C. elegans* είναι μόλις 2,5 μέρες, κατά τη διάρκεια των οποίων, περνάει από τέσσερα διαφορετικά προνυμφικά στάδια (L1, L2, L3 και L4), μέχρι να φτάσει στο στάδιο ενηλικίωσης κατά το οποίο μπορεί να δώσει νέους απογόνους μέσω της εναπόθεσης αυγών. Υπό αντίξοες συνθήκες (ακραίες θερμοκρασίες, έλλειψη τροφής και διάφορα άλλα στρες), οι νηματώδεις δευτέρου προνυμφικού σταδίου (L2) εισέρχονται σε ένα εναλλακτικό αναπτυξιακό στάδιο, το οποίο ονομάζεται dauer. Οι ανθεκτικές dauer λάρβες δεν τρέφονται, μπορούν να κινούνται, και φέρουν υψηλά επίπεδα αποθηκευμένου λίπους. Τόσο οι dauer όσο και οι λάρβες πρώτου σταδίου μπορούν να επιβιώσουν για μερικούς μήνες χωρίς τροφή, στους 15°C. Όταν οι συνθήκες ξαναγίνουν ευνοϊκές, οι dauer λάρβες περνούν απευθείας στο τέταρτο προνυμφικό στάδιο (L4), ολοκληρώνοντας φυσιολογικά τον κύκλο ζωής τους (**Εικόνα 1**). Από τη στιγμή της ενηλικίωσης, κάθε ζώο εναποθέτει περίπου 300 αυγά σε διάστημα 3 ημερών και ζει συνολικά περίπου 2~3 εβδομάδες.

Το γονιδίωμα του *C. elegans* έχει αλληλουχηθεί πλήρως και οργανώνεται σε 5 ζεύγη αυτοσωμικών και ένα ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων. Εκτός από τον γενετικό, είναι διαθέσιμος και ο φυσικός χάρτης, ο οποίος αποτελείται από αλληλεπικαλυπτόμενους κλώνους DNA και καλύπτει ολόκληρο σχεδόν το γονιδίωμα^{2, 3}. Αξιοποίηση αυτής της πληροφορίας σε ευρείας κλίμακας μεθόδους, όπως οι μικροσυστοιχίες DNA και η RNA παρεμβολή (RNAi), έχει οδηγήσει στην παραγωγή πληθώρας δεδομένων, που αφορούν σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, στην έκφραση και στη λειτουργία γονιδίων⁴⁻¹⁰. Η RNA παρεμβολή είναι μία μέθοδος αντίστροφης γενετικής, η οποία επιτρέπει γρήγορη καταστολή της έκφρασης γονιδίων σε διαφορετικά επίπεδα και σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια^{11, 12}. Αν κι έχει το μειονέκτημα ότι δεν είναι αποδοτική σε νευρικά κύτταρα, η ανακάλυψη στελεχών με

αυξημένη ευαισθησία στην RNAi (στελέχη με τις μεταλλαγές *eri-1(mg366)*, *lin-35(n745)* ή *rrf-3(pk1426)*, την έχει καταστήσει πιο αποτελεσματική¹³⁻¹⁶. Οι γενετικές μελέτες στους νηματώδεις διευκολύνονται ακόμα με τη δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών μέσω μικρο-ενέσεων με αλληλουχίες DNA στις γονάδες των ζώων¹⁷. Για την κατασκευή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών είναι διαθέσιμοι κατάλληλοι πλασμιδιακοί φορείς, ειδικοί για τον *C. elegans*. Η εφαρμογή μεθόδων κλασσικής γενετικής πραγματοποιείται επίσης με ευκολία. Στη χαρτογράφηση μεταλλαγών έχει βοηθήσει ιδιαίτερα η διαθεσιμότητα ενός ιδιαίτερα πλούσιου χάρτη μοναδικών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)¹⁸.

Η διαφάνεια του σώματός του, έχει καταστήσει εύκολο τον χαρακτηρισμό της κυτταρικής γενεαλογία καθώς και της θέσης των κυττάρων στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του *C. elegans*. Το σώμα του ερμαφρόδιτου ενήλικου ζώου αποτελείται από 959 κύτταρα, τα οποία προκύπτουν μετά από συγκεκριμένες κυτταρικές διαίρεσεις και τον θάνατο 131 κυττάρων^{19, 20}. Με τη βοήθεια ηλεκτρονικών μικροφωτογραφιών έχουν ανιχνευτεί επίσης οι νευρικές καθώς και οι νευρομυϊκές συνάψεις οδηγώντας τελικά στην κατασκευή διαγράμματος το οποίο απεικονίζει το ολοκληρωμένο δίκτυο των διασυνδέσεων μεταξύ των 302 νευρώνων του νηματώδους^{21, 22}. Η καταστροφή κι εξάλειψη συγκεκριμένων κυττάρων του *C. elegans* μπορεί να επιτευχθεί με έκφραση τοξικών πρωτεϊνών υπό την καθοδήγηση κατάλληλων υποκινητών ή με χρήση ακτινοβολίας laser^{23, 24}.

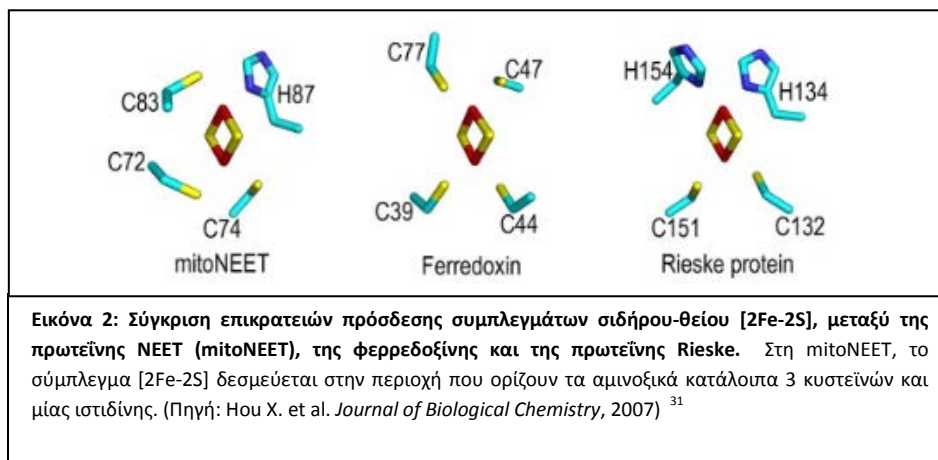


Εικόνα 1: Αναπαραγωγικός κύκλος του νηματώδους *Caenorabditis elegans*. Σε μπλε παρουσιάζονται οι ώρες που απαιτούνται για να γίνει η μετάβαση στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο, δεδομένου ότι η συντήρηση γίνεται στους 25°C. Η πρώτη μιτωτική διαίρεση του ζυγωτού συμβαίνει περίπου 40 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση. Το μήκος των ζώων σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο συμπεριλαμβάνεται μέσα στην παρένθεση, δίπλα από το όνομα του αναπτυξιακού σταδίου. [Πηγή: *Courtesy of WormAtlas* (<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/IMAGES/introfig6.jpg>)]

2. Πρωτεΐνες της οικογένειας NEET

Η οικογένεια των πρωτεϊνών NEET (το όνομα προκύπτει από την αλληλουχία αμινοξέων του καρβοξυτελικού άκρου: Asn - Glu - Glu - Thr)²⁵ έχει βρεθεί να εμπλέκεται σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων στον άνθρωπο, όπως στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2²⁶, στον καρκίνο²⁷, στη γήρανση^{28, 29}, καθώς και στην εκδήλωση νευροεκφυλιστικών νοσημάτων³⁰.

Οι πρωτεΐνες NEET είναι μία ειδική κατηγορία πρωτεϊνών που δεσμεύουν συμπλέγματα σιδήρου-θείου (Iron Sulfur Clusters_ISCs). Η πρόσδεση στα συμπλέγματα αυτά γίνεται μέσω της συντηρημένης επικράτειας (39 αμινοξικών καταλοίπων) CDGSH [C-X-C-X2-(S/T)-X3-P-X-C-D-G-(S/A/T)-H]. Η συγκεκριμένη επικράτεια διαφέρει από την κλασική επικράτεια δέσμευσης συμπλεγμάτων σιδήρου-θείου [2Fe-2S], η οποία υπάρχει στις πρωτεΐνες Rieske της αναπνευστικής αλυσίδας, καθώς και στη φερρεδοξίνη. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών NEET, το σύμπλεγμα δεσμεύεται από την περιοχή που ορίζουν τα αμινοξικά κατάλοιπα 3 κυστεϊνών (Cys-72, Cys-74, Cys-83) και μίας ιστοιδίνης (His-87), έναντι 4 κυστεϊνών στη φερρεδοξίνη, ή 2 κυστεϊνών και 2 ιστοιδινών στις πρωτεΐνες Rieske³¹ (Εικόνα 2). Η επικράτεια CDGSH χαρακτηρίζεται και από 5 συντηρημένα κατάλοιπα (Tyr-71, Ser-77, Pro-81, Phe-82, Asp-84), τα οποία δεν συμμετέχουν στην πρόσδεση των συμπλεγμάτων σιδήρου-θείου, αλλά προτείνεται ότι σταθεροποιούν τη συνολική δομή πρόσδεσης.

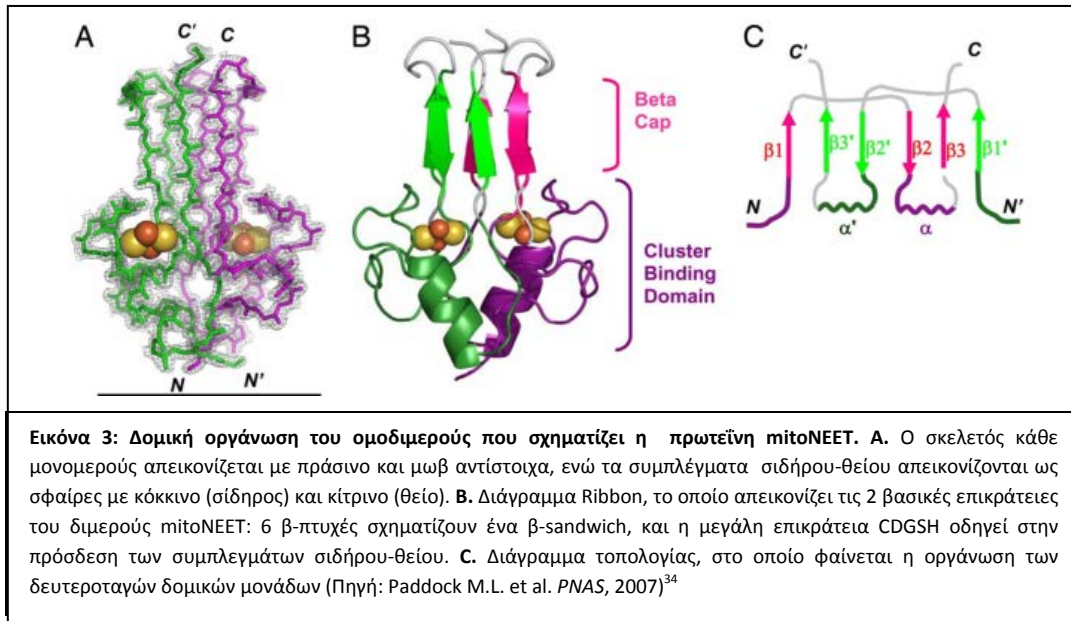


Το γονιδίωμα των θηλαστικών κωδικοποιεί άλλες 3 πρωτεΐνες που φέρουν τη συντηρημένη επικράτεια CDGSH: τη CISD1 (CDGSH Iron Sulfur Domain 1), τη CISD2 (CDGSH Iron Sulfur Domain 2) και τη CISD3 (CDGSH Iron Sulfur Domain 3).

2.1 CISD1

Το γονίδιο *Cisd1* εδράζεται στο χρωμόσωμα 10 του ανθρώπινου γονιδιώματος, και το προϊόν που κωδικοποιεί είναι μία μικρή πρωτεΐνη 76 αμινοξικών καταλοίπων. Η CISD1, γνωστή και ως mitoNEET ήταν η πρώτη πρωτεΐνη NEET που χαρακτηρίστηκε, και αναγνωρίστηκε ως στόχος της φαρμακευτικής ουσίας κατά του διαβήτη *Pioglitazone*²⁵.

Η κρυσταλλογραφική της μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε παράλληλα από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες ^{31, 32}, έδειξε ότι η mitoNEET σχηματίζει ομοδιμερή και κάθε μονομερές φέρει μία θέση πρόσδεσης για συμπλέγματα σιδήρου-θείου [2Fe-2S] (Εικόνα 3). Μέσω βιοχημικών και ανοσοϊστοχημικών πειραμάτων, βρέθηκε ότι η mitoNEET προσδένεται μέσω της αμινοτελικής διαμεμβρανικής της περιοχής, στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου (Outer Mitochondrial Membrane_ OMM), με το ενεργό της κέντρο (επικράτεια πρόσδεσης συμπλεγμάτων σιδήρου-θείου), στραμμένο προς το κυτταρόπλασμα ³³.



Στο διμερές που σχηματίζουν δύο μόρια mitoNEET, τα δύο συμπλέγματα σιδήρου-θείου [2Fe-2S] απέχουν μόλις 12Å, απόσταση, η οποία θεωρητικά θα μπορούσε να επιτρέψει την μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των συμπλεγμάτων. Η παρατήρηση αυτή, δεδομένου ότι η mitoNEET εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, οδήγησε στην υπόθεση ότι η πρωτεΐνη αυτή πιθανόν να συμμετέχει στο μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την μιτοχονδριακή αναπνοή μέσω εναλλαγής της οξειδωτικής κατάστασης του εμπεριεχομένου σε αυτή σιδήρου ³². Πράγματι, με τη χρήση ποντικών στα οποία έχει γίνει γονιδιακή απαλοιφή του γονιδίου *Cisd1*, απέδειξαν ότι απώλεια της mitoNEET οδηγεί σε μειωμένη αποδοτικότητα της μιτοχονδριακής αναπνοής, τουλάχιστον σε μιτοχόνδρια απομονωμένα από τον καρδιακό μυ ³³.

Λόγω της ικανότητάς της να προσδένει και να αποδεσμεύει συμπλέγματα σιδήρου-θείου, η mitoNEET πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην παροχή των συγκεκριμένων συμπλεγμάτων σε πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος, οδηγώντας έτσι στην κατάλληλη κατανομή του σιδήρου στο κύτταρο και εμποδίζοντας την υπερφόρτωσή του στη μήτρα των μιτοχονδρίων ³⁵.

Όσον αφορά το ρόλο της mitoNEET στο λιπώδη ιστό, έχει βρεθεί ότι υπερέκφραση της σε λιποκύτταρα ποντικών, οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα β-

οξειδωσης και ως εκ τούτου σε αυξημένη πρόσληψη λιπών στα κύτταρα, μέσω ομοιοστατικών μηχανισμών. Η αδυναμία ικανοποιητικής λιπόλυσης (μέσω της β-οξειδωσης) προκαλεί σταδιακή επέκταση του λιπώδους ιστού συμβάλλοντας στην εκδήλωση παχυσαρκίας. Παρόλα αυτά, τα συγκεκριμένα ζώα διατηρούν φυσιολογική την ευαισθησία τους ως προς την ινσουλίνη. Ο τρόπος με τον οποίο η mitoNEET μειώνει τα επίπεδα β-οξειδωσης δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, αλλά προτείνεται πως ρυθμίζει την ισορροπία μεταξύ των μηχανισμών λιπόλυσης και λιπογένεσης αναστέλλοντας την συσσώρευση του σιδήρου στη μήτρα των μιτοχονδρίων^{26 36}.

2.2 CISD2

Το γονίδιο *Cisd2* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 4 του ανθρώπινου γονιδιώματος και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 135 αμινοξικών καταλοίπων, τη CISD2, γνωστή και ως ERIS (Endoplasmic Reticulum Intermembrane Small protein), Miner1 (MitoNEET Related protein 1) ή NAF-1 (Nutrient-Deprivation Autophagy Factor-1). Η CISD2, όπως και η mitoNEET, φέρει μία θέση πρόσδεσης συμπλεγμάτων σιδήρου-θειού και έχει αναφερθεί ότι εντοπίζεται στη μεμβράνη του Ενδοπλασματικού δικτύου³⁰, αλλά και στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη³⁷.

Μεταλλαγές του γονιδίου *Cisd2* έχουν συνδεθεί με το σπάνιο νευροεκφυλιστικό σύνδρομο Wolfram τύπου 2³⁰. Το σύνδρομο Wolfram αποτελεί αυτοσωμική υπολειμματική διαταραχή, η οποία βλάπτει κυρίως το κεντρικό νευρικό σύστημα και διακρίνεται σε δύο τύπους: το σύνδρομο Wolfram τύπου 1 και το τύπου 2. Και οι δύο τύποι του συνδρόμου χαρακτηρίζονται από πρόωρη εκδήλωση σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2, τύφλωση λόγω ατροφίας των οπτικών νεύρων, καθώς και κώφωση λόγω εκφυλισμού των αισθητήριων ακουστικών νευρώνων. Επιπλέον, οι ασθενείς εκδηλώνουν ψυχικές διαταραχές, άνοια και παρουσιάζουν γενικά μειωμένο προσδόκιμο ζωής (περίπου 30 χρόνια)³⁸⁻⁴¹. Η παθογένεια ασθενών του συνδρόμου τύπου 1 οφείλεται σε μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας (loss of function) της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης του Ενδοπλασματικού Δικτύου, Wolframin (γνωστή και ως WFS1_Wolfram Syndrome 1), η οποία προτείνεται ότι συμμετέχει στη ρύθμιση του στρες του Ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress) καθώς και της ομοιόστασης του ασβεστίου⁴²⁻⁴⁴. Απώλεια της Wolframin σε ποντίκια οδηγεί προοδευτικά σε απώλεια των β-παγκρεατικών κυττάρων και διαταραχή στην ανοχή γλυκόζης, πιθανόν μέσω αυξημένου στρες και μαζικής απόπτωσης των β-παγκρεατικών κυττάρων⁴⁵. Ασθενείς του συνδρόμου Wolfram τύπου 2, το οποίο όπως προαναφέρθηκε, οφείλεται σε μεταλλαγές του γονιδίου *Cisd2*, παρουσιάζουν, πλην των κοινών συμπτωμάτων, και υπογοναδισμό, αιμορροφιλία, καθώς και ατονία στην λειτουργία της ουροδόχου κύστης.

Απαλοιφή του γονιδίου *Cisd2* σε ποντίκια οδηγεί σε σημαντική μείωση του μέσου όρου ζωής αλλά και σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά πρόωρης γήρανσης: προεξέχοντες οφθαλμοί και αυτιά, εκφυλισμός των οπτικών νεύρων και των σκελετικών μυών καθώς και μειωμένη συνολική μυϊκή μάζα^{37, 46}. Έλλειψη της

πρωτεΐνης CISD2 σε ποντίκια προκαλεί προοδευτική δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, η οποία συνοδεύεται από κυτταρικό θάνατο διαμεσολαβούμενο από αυτοφαγία, με τελικό αποτέλεσμα τον εκφυλισμό μυϊκού και νευρικού συστήματος³⁷. Αντίθετα, υπερέκφραση του γονιδίου *Cisd2* σε διαγονιδιακά ζώα, αυξάνει σημαντικά το μέσο όρο ζωής και μειώνει τον εκφυλισμό μυών και νευρώνων²⁹. Όσον αφορά το ρόλο της CISD2 στην αυτοφαγία, έχει βρεθεί ότι ευνοεί τη διαμεσολαβούμενη από την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη BCL-2, αναστολή έναρξης της αυτοφαγίας στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο^{47, 48}.

Τόσο η CISD2, όσο και η mitoNEET φαίνεται να εμπλέκονται και στην καρκινογένεση. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα των πρωτεϊνών αυτών παρουσιάζονται ιδιαίτερα αυξημένα σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστού²⁷. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην διαδικασία μετασχηματισμού κυττάρων σε καρκινικά, μέσα από μηχανισμούς που ρυθμίζουν μεταβολικές διαδικασίες, καθώς και παράγοντες του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης^{49, 50}. Δεδομένης της σημασίας τους στην μιτοχονδριακή λειτουργία, προτείνεται ότι οι πρωτεΐνες mitoNEET και CISD2 ενδεχομένως να συμμετέχουν στη διαδικασία καρκινικού μετασχηματισμού, μέσω ρύθμισης της ομοιόστασης του σιδήρου αλλά και της παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species_ROS)²⁷.

2.3 CISD3

Η CISD3 (γνωστή και ως Miner2) φέρει 2 συντηρημένες περιοχές CDGSH και εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια³³. Η πρωτεΐνη αυτή δεν έχει μελετηθεί περαιτέρω.

ΣΚΟΠΟΣ

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας NEET είναι μία ειδική κατηγορία σιδηρο-θειο-πρωτεϊνών, διαταραχή της λειτουργίας των οποίων έχει συνδεθεί με ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων στον άνθρωπο: από επίδραση στη γήρανση , μέχρι εκδήλωση νευροεκφυλισμού και καρκίνο. Παρόλα αυτά, ο ακριβής τρόπος δράσης τους, καθώς και οι παράγοντες με τους οποίους αλληλεπιδρούν δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί. Όπως είναι γνωστό, ο *C. elegans*, ως απλό ασπόνδυλο, αποτελεί ένα εξαιρετικό μοντέλο-σύστημα για τη μελέτη σημαντικών βιολογικών διεργασιών *in vivo*. Στο νηματώδη εκφράζεται μόνο μία πρωτεΐνη (έναντι τριών στα θηλαστικά) η οποία φέρει τη συντηρημένη επικράτεια CDGSH των πρωτεϊνών NEET, η W02B12.15. Σκοπός της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας είναι να μελετηθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης αυτής στη γήρανση του νηματώδους *C. elegans*. Δεδομένου ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν έχει μελετηθεί καθόλου στον *C. elegans*, προσπάθειες χαρακτηρισμού της θα οδηγήσουν πιθανόν στην καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας των πρωτεϊνών της οικογένειας NEET.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. Γενικές Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας

1. Δημιουργία δεκτικών κυττάρων *E. coli* και μετασχηματισμός τους με τη μέθοδο ηλεκτρικού σοκ (Electroporation)

α. Για τη δημιουργία δεκτικών για ηλεκτρικό σοκ, κυττάρων *E. coli* (XL-1 και HT115) ακολούθησε η εξής διαδικασία:

- Εμβολιασμός 250μl καλλιέργειας κυττάρων που έχει φτάσει σε στατική φάση (Overnight culture/ 16h περίπου) σε 5ml θρεπτικού μέσου *Luria Bertani Broth* (LB). Επώαση στους 37°C υπό ανάδευση, έως ότου η οπτική της πυκνότητα φτάσει στα 0,65 (μέτρηση σε μήκος κύματος 600nm).
- Επώαση για 15-30min στον πάγο και έπειτα διανομή σε falcons
- Φυγοκέντρηση στις 4000rpm στους 4°C για 10min και αφαίρεση του υπερκειμένου
- Επαναδιάλυση πελέτας σε ίσο όγκο παγωμένου αποστειρωμένου H₂O και φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10min στους 4°C.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου και πλύσιμο των κυττάρων με H₂O.
- Μετά την ολοκλήρωση του δεύτερου πλυσίματος, επαναδιάλυση της πελέτας σε 30ml H₂O.
- Ένωση όλων των πελετών σε ένα falcon, και φυγοκέντρηση στις 2500rpm για 15min στους 4°C. Αφαίρεση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση της πελέτας σε 1,5ml αποστειρωμένης γλυκερόλης 10%
- Μετά από καλή ανάδευση, διαμοιρασμός των κυττάρων σε aliquots των 50μl και αποθήκευση στους -80°C έως και 6 μήνες.

β. Για τον μετασχηματισμό δεκτικών (για ηλεκτρικό σοκ) βακτηριακών κυττάρων *E. coli* χρησιμοποιείται η ακόλουθη μέθοδος:

- Για κάθε αντίδραση μετασχηματισμού, χρησιμοποιούνταν ένα aliquot κυττάρων των 50μl (από τους -80°C)
- Μετά το ξεπάγωμα (στους 4°C), προσθήκη 1μl-3μl από την αντίδραση λιγάσης που είχε προηγηθεί (η μέθοδος αντίδρασης λιγάσης θα αναλυθεί παρακάτω).
- Έπειτα από καλή ανάδευση, μεταφορά όλου του υλικού σε ειδική κυβέττα με καπάκι.
- Τοποθέτηση κυβέττας στην ειδική για ηλεκτρικό σοκ συσκευή *Electro Square Porator™ ECM 830* (10 παλμοί 2000V, διάρκειας 99μs με ενδιάμεσα διαλείμματα 500ms).
- Μετά την ολοκλήρωση του ηλεκτρικού σοκ, μεταφορά όλου του υλικού σε 1ml προθερμασμένου (στους 37°C) θρεπτικού *Super Optimal broth with Catabolite repression* (SOC), και επώαση για 1h στους 37°C (το βήμα αυτό βοηθάει στην ανάκαμψη των κυττάρων μετά το σοκ).
- Απλώμα (plating) κυττάρων σε πιάτα LB με αντιβιοτικό για την επιλογή των θετικών κλώνων, και επώαση overnight στους 37°C.

2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA για όλες τις γονιδιακές κατασκευές έγινε με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Μεταφορά 1,5ml overnight καλλιέργειας σε eppendorf και φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 15s.
- Αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη 150μl διαλύματος P1, εμπλουτισμένο με RNase A.
- Διαλυτοποίηση της πελέτας με vortex και επώαση σε RT για 5-10min.
- Προσθήκη 150μl διαλύματος P2 και ήπια ανάδευση με το χέρι 8 με 10 φορές.
- Προσθήκη 150μl παγωμένου διαλύματος P3 (για εξουδετέρωση του P2) και ήπια ανάδευση με το χέρι.
- Επώαση στον πάγο για τουλάχιστον 5min και φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 10min σε RT.
- Προσεκτική αφαίρεση του υπερκειμένου (χωρίς τα λευκά κολλώδη κυτταρικά υπολείμματα)
- Προσθήκη 2,5xV (~1100μl) 100% αιθανόλης, ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13000rpm στους 4°C για 20min.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη 500-600μl 70% αιθανόλης
- Φυγοκέντρηση στις 13000rpm στους 4°C για 5min
- Αφαίρεση όσο το δυνατόν περισσότερου υπερκειμένου και επώαση σε RT με ανοιχτά καπάκια μέχρι να στεγνώσει η πελέτα.
- Επαναδιάλυση σε επιθυμητό όγκο ddH₂O (ανάλογα με το μέγεθος της πελέτας/συνήθως 50μl)/ Η αναμενόμενη συγκέντρωση πλασμιδιακού DNA με τη χρήση αυτής της μεθόδου είναι 1-2μg/μl.

Σε περίπτωση που η γονιδιακή κατασκευή προοριζόταν για μετασχηματισμό του νηματώδους *C. elegans* τότε πραγματοποιήθηκε καθαρισμός με τη χρήση της στήλης ιοντοανταλλαγής QIAGEN-tip 20.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA:

P1→50mM glucose, 25mM Tris-Cl (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0)

P2→0,2N NaOH, 1% SDS

P3→3M potassium acetate, 11,5ml glacial acetic acid

3. Πέψη και Αντίδραση συγκόλλησης

Για τη δημιουργία ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου απαιτούνται ένας πλασμιδιακός φορέας και ένα τμήμα DNA (ένθεμα), το οποίο πρόκειται να ενσωματωθεί στον φορέα. Οι πλασμιδιακοί φορείς είναι απαραίτητο να περιέχουν μία θέση έναρξης της αντιγραφής (ORIGIN of Replication_ORI), ένα γονίδιο το οποίο να προσδίδει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό, και έναν πολυσυνδέτη (polylinker), περιοχή που περιέχει πολλαπλές θέσεις περιορισμού DNA. Τα

περιοριστικά ένζυμα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες παλινδρομες αλληλουχίες (μεγέθους 4-6 βάσεων) στο δίκλωνο μόριο DNA και τις πέπτουν αφήνοντάς τους είτε μονόκλωνα είτε «τυφλά» άκρα. Για τη δράση των ενζύμων αυτών απαιτούνται συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και pH.

Η διαδικασία της μοριακής συγκόλλησης πραγματοποιείται με τη χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάσης. Το ένζυμο αυτό ενώνει δύο δίκλωνα μόρια DNA μέσω δημιουργίας φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ της φωσφορικής ομάδας του 5' άκρου του ενός μορίου και της υδροξυλικής ομάδας του 3' άκρου του άλλου μορίου. Για να ευνοηθούν μόνο οι διαμοριακές (μεταξύ φορέα και ενθέματος) και όχι οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις (μεταξύ μορίων φορέα ή μορίων ενθέματος), οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων πρέπει να ακολουθούν μία συγκεκριμένη αναλογία, η οποία καθορίζεται από το μέγεθος τόσο του φορέα όσο και του ενθέματος. Πιο συγκεκριμένα η αναλογία των αντιδρώντων καθορίζεται από την ακόλουθη ισότητα:

$$\text{μάζα ενθέματος}(ng) \geq 10 \times \frac{\text{μοριακό βάρος ενθέματος (bp)}}{\text{μοριακό βάρος φορέα (bp)}} \times \text{μάζα φορέα (ng)}$$

Τα συστατικά της αντίδρασης συγκόλλησης είναι:

- 1/10 V_{τελ} T4 DNA λιγάση
- 1x Ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης
- 1mM ATP
- Συγκεκριμένη ποσότητα πλασμιδιακού φορέα
- Συγκεκριμένη ποσότητα ενθέματος
- H₂O μέχρι να συμπληρωθεί ο επιθυμητός όγκος αντίδρασης (συνήθως 10 ή 20μl)

Η DNA λιγάση, για να λειτουργήσει, υδρολύει ATP, διαδικασία η οποία προσφέρει την απαραίτητη ενέργεια έτσι ώστε να δημιουργηθούν φωσφοδιεστερικοί δεσμοί, για τη συνένωση δύο μορίων DNA. Η επώαση της αντίδρασης πραγματοποιούνταν στους 16°C για 2h ή στους 4°C overnight.

4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction/PCR) αποτελεί μία γρήγορη και οικονομική τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει με ακρίβεια ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA, αρκεί να είναι γνωστές οι εκατέρωθεν αλληλουχίες του τμήματος αυτού. Για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA χρησιμοποιώντας την τεχνική PCR, το δείγμα του DNA αρχικά θερμαίνεται έτσι ώστε να αποδιαταχθεί και να διαχωριστεί σε 2 μονόκλωνα τμήματα. Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για μία αντίδραση PCR είναι τα εξής:

-Εκκινητές (Primers): 2 μικρά μόρια (ζεύγος) ολιγονουκλεοτιδίων, περίπου 18-25 βάσεων, που παρασκευάζονται τεχνητά με διάφορες μεθόδους. Καθεμία έχει αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική προς εκείνη που βρίσκεται στο 3'-OH άκρο των δύο αντιπαράλληλων αλυσίδων του DNA προτύπου. Καθορίζουν τα άκρα του

τμήματος που θα αντιγραφεί και αντιπροσωπεύουν τις περιοχές από τις οποίες θα ξεκινήσει η σύνθεση αντιγράφων DNA. Η παρουσία τους είναι απαραίτητη καθώς η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να συνθέσει de novo νέα αλυσίδα DNA εφόσον απαιτεί μία ελεύθερη υδροξυλομάδα. Επιπλέον, η θερμοκρασία μετουσίωσης ή τήξης (Melting Temperature, T_m) του ενός εκκινητή πρέπει να είναι παραπλήσια με αυτή του άλλου εκκινητή και να κυμαίνεται μεταξύ 55° - 80°C. Η T_m του κάθε εκκινητή εξαρτάται από την ποσοστιαία σύστασή του σε ζεύγη βάσεων.

5. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Προκειμένου να διαχωριστούν τα μόρια DNA ενός δείγματος, ανάλογα με το μέγεθός τους, πρέπει να φορτωθούν και να «τρέξουν» μέσω ηλεκτροφόρησης, σε πήκτωμα αγαρόζης συγκεκριμένης συγκέντρωσης (συνήθως 1% w/v). Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, οι ζώνες επιθυμητού μεγέθους αποκόπτονται από το πήκτωμα με τη χρήση αποστειρωμένης λεπίδας και συλλέγονται σε ξεχωριστά αποστειρωμένα eppendorfs. Για να απομονωθεί και ταυτόχρονα να καθαριστεί το DNA κάθε δείγματος από τα συστατικά του πηκτώματος, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο «Protocol for DNA extraction from agarose gels» (Nucleospin® Gel and PCR clean up).

B. Συγκεκριμένη μεθοδολογία για τη δημιουργία των πλασμιδιακών κατασκευών της παρούσας εργασίας

1. Κατασκευή πλασμιδίων για την δημιουργία μεταφραστικών μαρτύρων νηματώδων για το γονίδιο W02B12.15

Τόσο οι δύο ισομορφές του γονιδίου *W02B12.15*, όσο και η περιοχή του υποκινητή του οπερονίου *CEOP2540* είχαν κλωνοποιηθεί χωριστά στον πλασμιδιακό φορέα *pCR®II-TOPO®* (*TOPO TA Cloning®, Invitrogen*). Κατασκευάστηκαν 2 πλασμιδιακοί φορείς *PD95.77*, ένας για κάθε ισομορφή (*p_{CEOP2540}W02B12.15a* και *p_{CEOP2540}W02B12.15b*), οι οποίοι οδηγούν στην έκφραση της πρωτεΐνης *W02B12.15* συντηγμένης με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP. Ο υποκινητής και η ισομορφή *a* απομονώθηκαν από τους αντίστοιχους *pCR®II-TOPO®* φορείς με τα ένζυμα περιορισμού *HindIII/XbaI* και *XbaI/AgeI* αντίστοιχα, και κλωνοποιήθηκαν ταυτόχρονα στον φορέα *PD95.77*, ο οποίος είχε υποστεί πέψη με *HindIII/AgeI*. Ακριβώς η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την ισομορφή *b*.

2. Κατασκευή πλασμιδίων για την επαγωγή RNA παρεμβολής ειδικής για το γονίδιο W02B12.15

Κατασκευάστηκαν δύο πλασμιδια RNAi για το γονίδιο *W02B12.15*: το πρώτο περιλαμβάνει ολόκληρη την περιοχή του γονιδίου (οδηγεί σε σίγηση και των 2 ισομορφών), ενώ το δεύτερο περιλαμβάνει τη μοναδική περιοχή της ισομορφής *b* (οδηγεί θεωρητικά μόνο στη σίγηση της ισομορφής *b*). Οι δύο προαναφερθείσες περιοχές είχαν κλωνοποιηθεί ξεχωριστά στον φορέα *pCR®II-TOPO®* και

απομονώθηκαν από αυτόν με τα ένζυμα περιορισμού XbaI/AgeI και XbaI/HindIII αντίστοιχα. Μετά την απομόνωσή τους, ακολούθησε κλωνοποίησή τους στον ειδικό για RNA παρεμβολή πλασμιδιακό φορέα L4440, ο οποίος είχε υποστεί πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα για κάθε περιοχή.

Γ. Τεχνικές που αφορούν τη μελέτη του νηματώδους *C. elegans*

1. Στελέχη *C. elegans*

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα στελέχη του νηματώδους *C. elegans*:

Στέλεχος	Χρήση
N2 Bristol	Αγρίου-τόπου
N2;Ex[p _{CEOP2540} W02B12.15a];[pRF4]	Μεταφραστικός μάρτυρας της πρωτεΐνης W02B12.15
N2;Ex[p _{CEOP2540} W02B12.15b];[pRF4]	Μεταφραστικός μάρτυρας της πρωτεΐνης W02B12.15
<i>daf-2(e1370)</i>	Στέλεχος απώλειας λειτουργίας του γονιδίου <i>daf-2</i>
<i>ife-2(ok306)</i>	Στέλεχος απώλειας λειτουργίας του γονιδίου <i>ife-2</i>
<i>egl-1(ok1418)</i>	Στέλεχος απώλειας λειτουργίας του γονιδίου <i>egl-1</i>
<i>ced-4(n1162)</i>	Στέλεχος απώλειας λειτουργίας του γονιδίου <i>ced-4</i>
<i>ced-3(n717)</i>	Στέλεχος απώλειας λειτουργίας του γονιδίου <i>ced-3</i>
<i>ced-9(n1950)</i>	Στέλεχος ενίσχυσης λειτουργίας του γονιδίου <i>ced-9</i>
<i>ced-9(n2812)</i>	Στέλεχος απώλειας λειτουργίας του γονιδίου <i>ced-9</i>

2. Βακτηριακά στελέχη και θρεπτικά μέσα για την καλλιέργειά τους

Παρακάτω παρατίθενται τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν: i) ως «τροφή» για τους νηματώδεις (OP50, HT115), ii) για την δημιουργία διαγονιδιακών νηματωδών (XL1-Blue).

α. **OP50** (Ewbank's Lab) → στέλεχος αυξοτροφικό σε ουρακίλη ¹

β. **HT115** (DE3) (CGC) με γενότυπο → *F⁻, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE), lambda-, rnc14::Tn10(DE3 lysogen: lacUV5 promoter-T7 polymerase)* ⁵¹

γ. **XL1-Blue** (Stratagene) με γενότυπο → *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]*.

Τα θρεπτικά μέσα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των προαναφερθέντων στελεχών είναι τα εξής:

- **LB broth (Luria-Bertani medium)** (1lt):
 - 10g bacto-tryptone
 - 5g yeast extract
 - 10g NaCl
 - (15g bacto-agar για στερεές καλλιέργειες σε τρυβλία)
- **LB + ampicillin:**
Το αντιβιοτικό ampicillin προστίθεντο στο LB με τελική συγκέντρωση να είναι 100μg/ml.
- **LB + tetracycline:**
Το αντιβιοτικό tetracycline προστίθεται στο LB, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 10μg/ml.

3. Θρεπτικά μέσα και διαλύματα για την ανάπτυξη των νηματωδών *C. elegans*

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

α. NGM (Nematode Growth Media) (1lt):

- 3g NaCl
- 2.5g bacto-peptone
- 0.2g streptomycin
- 17g agar
- 1 ml CaCl₂ 1M
- 1 ml MgSO₄ 1M
- 1 ml cholesterol (5mg/ml σε 100% αιθανόλη)
- 1 ml nystatin (100mg/ml σε 70% αιθανόλη)
- 25 ml K₂PO₄* 1M, pH 6

Τα διαλύματα CaCl₂, MgSO₄, K₂PO₄, cholesterol και nystatin προστίθεντο μετά την αποστείρωση.

Για την παρασκευή θρεπτικού μέσου που προοριζόταν για πειράματα RNA παρεμβολής, δεν γινόταν προσθήκη streptomycin, και προστίθεντο επιπλέον 500μl ampicillin 100mg/ml

β. Υδατικό διάλυμα M9 (1lt)

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

γ. Διάλυμα ψύξης νηματωδών/ Freezing solution (1lt)

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

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

4. Ανάπτυξη και διατήρηση στελεχών

Για την ανάπτυξη των νηματώδων χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο NGM, τα οποία είχαν επιστρωθεί με βακτήρια OP50. Η ιδανική θερμοκρασία για την ανάπτυξη των νηματώδων, είναι οι 20°C.

Για τη διατήρηση νηματώδων συγκεκριμένης γονοτυπικής σύστασης εφαρμόστηκαν οι εξής μέθοδοι:

α. Διατήρηση στους 15°C

Στη θερμοκρασία των 15°C, οι νηματώδεις αναπτύσσονται μεν, αλλά με χαμηλότερους μεταβολικούς ρυθμούς. Έτσι, είναι δυνατόν να διατηρηθούν υπό τη μορφή dauers μέχρι και μερικούς μήνες. Μεταφέροντας κάποιο τμήμα του πιάτου NGM που είναι διατηρημένο στους 15°C, σε νέα πιάτα στους 20°C, τα dauers ολοκληρώνουν τον φυσιολογικό κύκλο ζωής τους και δίνουν απογόνους.

β. Διατήρηση στους -80°C

Νηματώδεις προνυμφικών σταδίων L1 και L2 είναι εφικτό να επιβιώσουν για χρόνια σε καταψύκτες θερμοκρασίας -80°C ή σε υγρό άζωτο (-196°C). Η διαδικασία που εφαρμόστηκε για την κατάψυξη των νηματώδων είναι η ακόλουθη:

1. Συλλογή νηματώδων με M9 από 5 πιάτα, τα οποία περιείχαν μεγάλο αριθμό προνυμφών L1 - L2. Τοποθέτηση του δείγματος στον πάγο (4°C).
2. Προσθήκη ίσου όγκου παγωμένου (4°C) διαλύματος ψύξης νηματώδων (Freezing solution) και ήπια ανάδευση.
3. Μεταφορά του εναιωρήματος σε 10 τουλάχιστον ειδικά δοχεία των 2ml, στα οποία είναι γραμμένα τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου στελεχούς
4. Μεταφορά των δοχείων σε καταψύκτη -80°C.
5. Αφού περάσει χρονικό διάστημα 1-2 εβδομάδων, απόψυξη ενός εκ των δέκα δοχείων για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της ψύξης. Η απόψυξη πραγματοποιούνταν με παραμονή του δοχείου σε θερμοκρασία δωματίου (25°C), έως ότου λιώσει ο πάγος. Τέλος, το υλικό μεταφερόταν σε τρυβλία NGM και οι νηματώδεις ήταν έτοιμοι για χρήση, εφόσον είχε ελεγχθεί η βιωσιμότητά τους.

5. Συγχρονισμός και καθαρισμός νηματωδών από μολύνσεις (Bleaching)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε κυρίως για τον συγχρονισμό πληθυσμών νηματωδών, καθώς επιτρέπει την απομόνωση των αυγών από ενήλικα ζώα. Παράλληλα, λόγω της παρουσίας NaOCl, μπορεί να γίνει και καταπολέμηση πιθανών μολύνσεων που υπάρχουν στα πιάτα NGM. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Μεταφορά νεαρών ενήλικων ζώων (που περιέχουν αυγά) σε διάλυμα M9 , φυγοκέντρηση και αφαίρεση του υπερκειμένου.
2. Προσθήκη 2,5 X V του διαλύματος Bleaching στο τελικό εναιώρημα (Για 10ml → 1ml NaOH 5N, 2ml NaOCl 5% και 7ml H₂O) και ανακίνηση κάθε 2 λεπτά. Το διάλυμα αυτό διαλύει ολόκληρο το ζώο, αλλά δεν μπορεί να εισχωρήσει και να καταστρέψει τα αυγά.
3. Αμέσως μετά τη διάλυση της πλειοψηφίας των ζώων, κατακρήμνιση των αυγών μέσω φυγοκέντρησης
4. 2 πλύσεις με M9 ή ddH₂O
5. Διανομή του εναιωρήματος σε καθαρά τρυβλία NGM.

Ο πληθυσμός που προκύπτει με αυτή τη μέθοδο δεν είναι απόλυτα συγχρονισμένος, δεδομένου ότι στο εναιώρημα εμπεριέχονται αυγά διαφορετικών σταδίων.

6. Επαγωγή RNA παρεμβολής στον *C. elegans*

Στον *C. elegans* η επαγωγή RNA παρεμβολής είναι μία πολύ απλή διαδικασία. Αρκεί να επώασεις ζώα επιθυμητού στελέχους σε θρεπτικό μέσο επιστρωμένο με βακτήρια, τα οποία εκφράζουν το δίκλωνο RNA περιοχής του γονιδίου που θέλεις να στοχεύσεις. Το πρώτο βήμα για την πραγματοποίηση πειραμάτων RNAi είναι να ενσωματωθεί το επιθυμητό προς σίγηση γονίδιο στον ειδικό πλασμιδιακό φορέα L4440. Η ενσωμάτωση γίνεται μεταξύ των δύο αντιπαράλληλων αλληλουχιών του υποκινητή της πολυμεράσης T7, οι οποίες εδράζονται στον L4440. Έπειτα, η πλασμιδιακή κατασκευή χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων HT115 (DE3). Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν την RNA πολυμεράση III μόνο παρουσία IPTG. θετικοί κλώνοι που προκύπτουν από τον μετασχηματισμό, μπορούν να αποθηκευτούν στους -80°C και να χρησιμοποιηθούν για επαγωγή RNA σίγησης του αντίστοιχου γονιδίου. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την επαγωγή RNAi είναι η εξής:

1. Εμβολιασμός θρεπτικού διαλύματος LB+amp+tet, όγκου 5ml με αποικία των κατάλληλων μετασχηματισμένων βακτηρίων HT115 και επώαση για 16-18h υπό σταθερή ανάδευση στους 37°C.

2. Μεταφορά 250μl από την προηγούμενη καλλιέργεια σε 5ml LB+amp και επώαση για περίπου 2 ώρες υπό σταθερή ανάδευση στους 37°C, έως ότου η νέα καλλιέργεια να προσεγγίσει, χωρίς να ξεπεράσει, την εκθετική φάση αύξησης.

3. Προσθήκη στην τελευταία καλλιέργεια IPTG με τελική συγκέντρωση 2mM, και επίστρωση ~200μl σε πιάτα NGM, στα οποία δεν έχει γίνει προσθήκη στρεπτομυκίνης. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για 16-18h.

4. Μεταφορά αυγών ή ενήλικων νηματώδων στα επιστρωμένα τρυβλία και επώαση στους 20°C.

Σε κάθε περίπτωση, ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιούνταν νηματώδεις που έχουν αναπτυχθεί σε τρυβλία επιστρωμένα με βακτήρια που περιείχαν τον άδειο φορέα L4440. Για να είναι δυνατή η σύγκριση, χρησιμοποιούνταν ισάριθμα ζώα, του ίδιου στελέχους και σταδίου, που αναπτύσσονταν για το ίδιο χρονικό διάστημα και υπό ακριβώς τις ίδιες συνθήκες.

7. Πειράματα γήρανσης

Σκοπός των πειραμάτων γήρανσης είναι να διεκρινιστεί ο μέσος όρος ζωής καθώς και η μέγιστη διάρκεια ζωής νηματώδων υπό συγκεκριμένες συνθήκες (RNAi, μεταλλαγμένα στελέχη, υποβολή σε στρεσογόνες συνθήκες, κ.α.). Για το σκοπό αυτό, συγχρονισμένοι πληθυσμοί νηματώδων δημιουργούνταν με τοποθέτηση 20-30 ενήλικων ερμαφρόδιτων ζώων σε καθαρά τρυβλία NGM, επιστρωμένα με *E. coli* (OP50), έως ότου εναποθέσουν ένα αρκετά μεγάλο αριθμό αυγών (~100-150). Στη συνέχεια, όταν τα ζώα έφταναν σε προνυμφικό στάδιο L4, μεταφέρονταν σε νέα καθαρά τρυβλία NGM. Σε όλα τα πειράματα ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιούνταν ερμαφρόδιτα ζώα αγρίου-τύπου (N2 Bristol) ή τα μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία δεν υφίσταντο οποιαδήποτε τροποποίηση. Σε RNAi πειράματα γήρανσης, ερμαφρόδιτα ζώα τοποθετούνταν σε καθαρά τρυβλία NGM (RNAi) τα οποία ήταν επιστρωμένα με βακτήρια HT115 (DE3) (συμπεριλαμβανομένου και του IPTG/ τελική συγκέντρωση 2mM), μετασηματισμένα είτε με κενό τον πλασμιδιακό φορέα L4440 (πείραμα ελέγχου) ή με τον πλασμιδιακό φορέα L4440 ο οποίος περιείχε την αλληλουχία του γονιδίου-στόχου. Όλα τα πειράματα γήρανσης πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 20°C. Τα ζώα τοποθετούνταν ανά ομάδες των 20-30 ατόμων, με συνολικό αριθμό 100-150 ατόμων σε κάθε πείραμα. Ως t=0 οριζόταν η πρώτη ημέρα ενηλικίωσης. Τα ζώα μεταφέρονταν σε νέα τρυβλία κάθε δύο ημέρες για την αποφυγή είτε συνθηκών έλλειψης τροφής είτε μολύνσεων. Εκτός από αυτό, η αλλαγή πιάτων καθίστατο αναγκαία, διότι αλλιώς θα υπήρχε ο κίνδυνος να υπολογιστούν εσφαλμένα στη μέτρηση, ενήλικα ζώα της επόμενης γενιάς. Οι πληθυσμοί παρακολουθούνταν καθημερινά για τη μέτρηση θανάτων καθώς και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, έως και το τέλος της ζωής τους.

8. Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση γενωμικού υλικού από τον νηματώδη *C. elegans*, στηρίχτηκε εξολοκλήρου στο πρωτόκολλο «Standard protocol for human or animal tissue and cultured cells» (Nucleospin® tissue, Macherey-Nagel).

9. Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση ολικού RNA από νηματώδεις *C. elegans* έγινε μέσω της ακόλουθης διαδικασίας:

- Συλλογή 20 περίπου ενήλικων νηματωδών (για απομόνωση RNA από ζώα μικρότερης ηλικίας απαιτούνται πολλά περισσότερα ζώα) σε υδατικό διάλυμα M9 σε erpendorf απαλλαγμένο από RNάσες

- Κατόπιν φυγοκέντρησης, προσθήκη 200μl Trizol στην πελέτα των ζώων και vortex για περίπου 4min.

- Επώαση των δειγμάτων στους -80°C για τουλάχιστον 10min (στο στάδιο αυτό ενδείκνυται και η αποθήκευση του δείγματος για μεγάλο χρονικό διάστημα)

- Επώαση των δειγμάτων για 5min στους 65°C.

- Προσθήκη 50μl χλωροφόρμιου (CHCl₃) σε κάθε δείγμα, vortex για 15s και επώαση για 3min σε RT.

- Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 15min στους 4°C, και μεταφορά της άνω φάσης (RNA) σε νέο erpendorf. Επανάληψη του βήματος προσθήκης χλωροφόρμιου, φυγοκέντρηση και μεταφορά πάλι της άνω φάσης σε νέο erpendorf.

- Προσθήκη ~125μl ισοπροπανόλης, ήπια ανάδευση και επώαση για 3min σε RT.

- Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 15min στους 4°C και προσεκτική αφαίρεση του υπερκειμένου

- Προσθήκη 500μl 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 15min στους 4°C.

- Αφαίρεση όσο το δυνατόν περισσότερου όγκου αιθανόλης και επαναδιάλυση της πελέτας σε 20μl ddH₂O, απαλλαγμένο από RNάσες

10. Σύνθεση cDNA

Μετά την απομόνωση RNA, για να ακολουθήσουν πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR), πρέπει πρώτα να γίνει η μετατροπή των RNA μορίων σε δίκλινα cDNA μόρια. Αυτό γίνεται μέσω επαγωγής της αντίστροφης μεταγραφής. Η διαδικασία αυτή βασίστηκε στο πρωτόκολλο «iScript - cDNA Synthesis Kit» (BIO-RAD). Στα συγκεκριμένα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα περίπου 900ng απομονωμένου RNA για αντίστροφη μεταγραφή. Μετά την ολοκλήρωση της αντίστροφης μεταγραφής, το δείγμα αραιωνόταν 10 φορές με ddH₂O ώστε να χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις real-time PCR.

11. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR)

Η real-time PCR είναι μια τεχνική που άρχισε να αναπτύσσεται πρόσφατα, και έχει βελτιώσει σημαντικά την ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων. Κατά την real-time PCR ανιχνεύονται και ποσοτικοποιούνται τα προϊόντα που δημιουργούνται

κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου της αντίδρασης. Οι μέθοδοι που είναι σήμερα διαθέσιμες χρησιμοποιούν φθορίζουσες ουσίες και ένα σύστημα μέτρησης (ανίχνευσης) του φθορισμού που είναι προσαρισμένο στον θερμοκυκλοποιητή (thermocycler). Προφανώς για να επαχθεί ο φθορισμός πρέπει να υπάρχει ακτινοβολία διέγερσης, η οποία παράγεται από ένα λέιζερ. Το βασικότερο πλεονέκτημα της real-time PCR είναι ότι επιτρέπει την ανίχνευση του προϊόντος της PCR κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων (κύκλων) της αντίδρασης. Το να μπορούμε να μετρήσουμε την κινητική της αντίδρασης στα αρχικά της στάδια είναι σημαντικό πλεονέκτημα σε σχέση με την παραδοσιακή μέθοδο όπου χρησιμοποιούνται ηλεκτροφοροδότης και τα προϊόντα που ηλεκτροφοροδότης προέρχονται από την τελική φάση ή το τελικό σημείο της αντίδρασης. Για τη διεξαγωγή real-time PCR χρησιμοποιήσαμε αντιδραστήρια του πρωτοκόλλου KAPA SYBR® (KAPA SYBR® FAST qPCR Kits_KAPA Biosystems). Με αυτόν τον τρόπο, η μέτρηση της συσσώρευσης του προϊόντος γίνεται μέσω της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green. Η SYBR Green είναι μια χρωστική που πάνει μέσα σε δίκλωνο DNA (όπως συμβαίνει και με το βρωμιούχο αιθίδιο). Μόνο τα μόρια της χρωστικής που είναι δεσμευμένα σε δίκλωνο DNA εκπέμπουν φως (φθορίζουν) όταν διεγερθούν από μία πηγή φωτός. Η χρωστική δεσμεύεται σε κάθε νεοσυντιθέμενο δίκλωνο μόριο DNA και έτσι σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, θεωρητικά, η ένταση του φθορισμού αυξάνεται κατά το ποσοστό αύξησης του προϊόντος, δηλαδή υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ έντασης φθορισμού και ποσότητας δίκλωνου DNA. Οι αντιδράσεις real-time PCR πραγματοποιήθηκαν στον ειδικό θερμοκυκλοποιητή της BioRad, CFX96™ Real-Time System.

12. Δημιουργία διαγονιδιακών νηματωδών μέσω μικροένεσης

Για τη δημιουργία διαγονιδιακών ατόμων *C. elegans* πραγματοποιήσαμε μικροενέσεις με το επιθυμητό πλασμίδιο και ακόμη ένα πλασμίδιο που δρα ως μάρτυρας μετασχηματισμού, σε τελική συγκέντρωση 50ng/μl το κάθε ένα. Οι μικροενέσεις πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό στερεοσκόπιο, σε άτομα που μόλις είχαν ενηλικιωθεί. Με την μικροένεση στοχεύεται το εσωτερικό του συγκυτίου της γονάδας όπως φαίνεται στην Εικόνα 4. Στη συγκεκριμένη περιοχή διακρίνεται μια μονή σειρά πυρήνων περιμετρικά της γονάδας.



Εικόνα 4: Περιοχή στην οποία πρέπει να εισέλθει η βελόνα για να πραγματοποιηθεί σωστά η ένεση. Περιμετρικά βρίσκονται πυρήνες του συγκυτίου οι οποίοι στα άτομα τα οποία έχουν μόλις ενηλικιωθεί σχηματίζουν αυτή τη χαρακτηριστική μονή σειρά. (Πηγή: Wormbook)

13. Μέτρηση ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου στον *C. elegans*

Η μέτρηση κατανάλωσης οξυγόνου στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής ηλεκτροδίου «DW1/AD Clark-type electrode» (Hansatech, King's Lynn, England). Η μέτρηση έγινε σε ζώα που μόλις είχαν ενηλικιωθεί, για να αποφευχθεί η μέτρηση από τους απογόνους. Τα ζώα συλλέγονταν από 4 μεγάλα πιάτα NGM για κάθε συνθήκη (δείγμα ελέγχου, δείγμα με M9 και μετά από 2 πλύσεις με M9 τοποθετούνταν στη συσκευή του ηλεκτροδίου για μέτρηση. Οι μετρήσεις γίνονταν εναλλάξ (δείγμα ελέγχου #1, δείγμα #1, δείγμα ελέγχου #2, δείγμα 2, κ.ο.κ) και η συλλογή καθώς και το πλύσιμό τους πραγματοποιούνταν ακριβώς πριν τη μέτρησή τους. Μετά τη μέτρηση, το υλικό κάθε δείγματος συλλεγόταν σε ξεχωριστά erpendorfs για να γίνει ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού υλικού του (η ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών έγινε μέσω του «BCA™ Protein Assay Kit»). Ο προσδιορισμός του ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου υπολογίστηκε διαιρώντας τον ρυθμό κάθε δείγματος με τα συνολικά επίπεδα πρωτεΐνης του συγκεκριμένου δείγματος. Η μέτρηση του ρυθμού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ειδικού προγράμματος *Oxygraph Plus* (Hansatech instruments).

14. Μέτρηση παραγωγής ATP στον *C. elegans*

Η μέτρηση ATP πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πρωτοκόλλου «ATP Bioilluminescence Assay Kit CLSII». Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ανίχνευση μορίων ATP μέσω φθορισμού που εκπέμπει η λουσιφεράση. Για κάθε δείγμα, συλλέγονταν με M9, περίπου 50 νηματώδεις, οι οποίοι είχαν φτάσει στο στάδιο ενηλικίωσης. Μετά από 2 πλύσεις, προστίθεντο ~50μl M9 και ακολουθούσε η μέθοδος “Freeze-Thaw”. Πιο συγκεκριμένα, κάθε δείγμα επωαζόταν για 15min στους -80°C και ακολούθως, για 15min στους 100°C. Με αυτόν τον τρόπο, τα σώματα των νηματωδών δεν σπάνε, αλλά θεωρητικά γίνεται απελευθέρωση πρωτεϊνικού υλικού καθώς και μορίων ATP. Μετά από φυγοκέντρηση και απομόνωση του υπερκευμένου, πραγματοποιούνταν μέτρηση των επιπέδων ATP μέσω της προαναφερθείσας μεθόδου.

15. Τεχνικές μικροσκοπίας

Σε όλες τις περιπτώσεις, για την προετοιμασία των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ξέπλυμα των ζώων με διάλυμα M9 και αναισθητοποίηση αυτών με διάλυμα *Levamisole* 2mM, πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Η παρατήρηση και φωτογράφιση έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Για κάθε ξεχωριστό πείραμα, οι φωτογραφίες πάρθηκαν στην ίδια μεγέθυνση και σε ίδιες συνθήκες φθορισμού. Η φωτογράφιση έγινε από απλό μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axio Imager Z2 Epifluorescence/DIC Microscope και από το μικροσκόπιο συνεστιακής μικροσκοπίας (Confocal Microscope) Zeiss LSM 710 / NLO / DUO / InTune. Η επεξεργασία και τροποποίηση των εικόνων, όπου χρειάστηκε, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Photoshop (version CS3; Adobe).

Δ. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση όλων των δεδομένων, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA). Η ποσοτικοποίηση- ανάλυση των εικόνων που αποκτήθηκαν από το μικροσκόπιο φθορισμού έγινε με τη χρήση του προγράμματος ImageJ 1.48d.

Ε. Υλικά

1. Εκκινητές

Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές:

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'→3')	Tm (°C)	Πληροφορίες
FW W02B12.15a	TCTAGAATGCCTTGCCCAACTCAAGT	53,6 (60)	Για κλωνοποίηση του W02B12.15a στον pCRII TOPO
FW W02B12.15b	TCTAGAATGACCATCGCTGGATTTTGT	53,4 (60)	Για κλωνοποίηση του W02B12.15a στον pCRII TOPO
RV W02B12.15(a+b)	ACCGGTCCTTCTTTTCGGATTGACGATG	53,2 (69)	Για κλωνοποίηση του W02B12.15a στον pCRII TOPO
FW Prom _{CEOP2540}	AAGCTTACTTTTTGAGGGGATCAGAA	48,4 (58)	Για κλωνοποίηση του υποκινητή του οπερονίου CEOP2540 στον pCRII TOPO
RV Prom _{CEOP2540}	TCTAGAGAAAATCACGAGTAAATTATGTAAA	47,2 (54)	Για κλωνοποίηση του υποκινητή του οπερονίου CEOP2540 στον pCRII TOPO
FW W02B12.15#1	GCTCTTATTGGATACCTTGTTGG	51,7	Για real time PCR
RV W02B12.15#1	ATGAGTGGGCCAACATTGTC	52	Για real time PCR
FW W02B12.15#2	GAGCTCTTATTGGATACCTTGTTGG	54,5	Για real time PCR
FW W02B12.15#2	GATTTGACGATGAGTGGGCC	54,1	Για real time PCR

2. Περιοριστικά ένζυμα

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

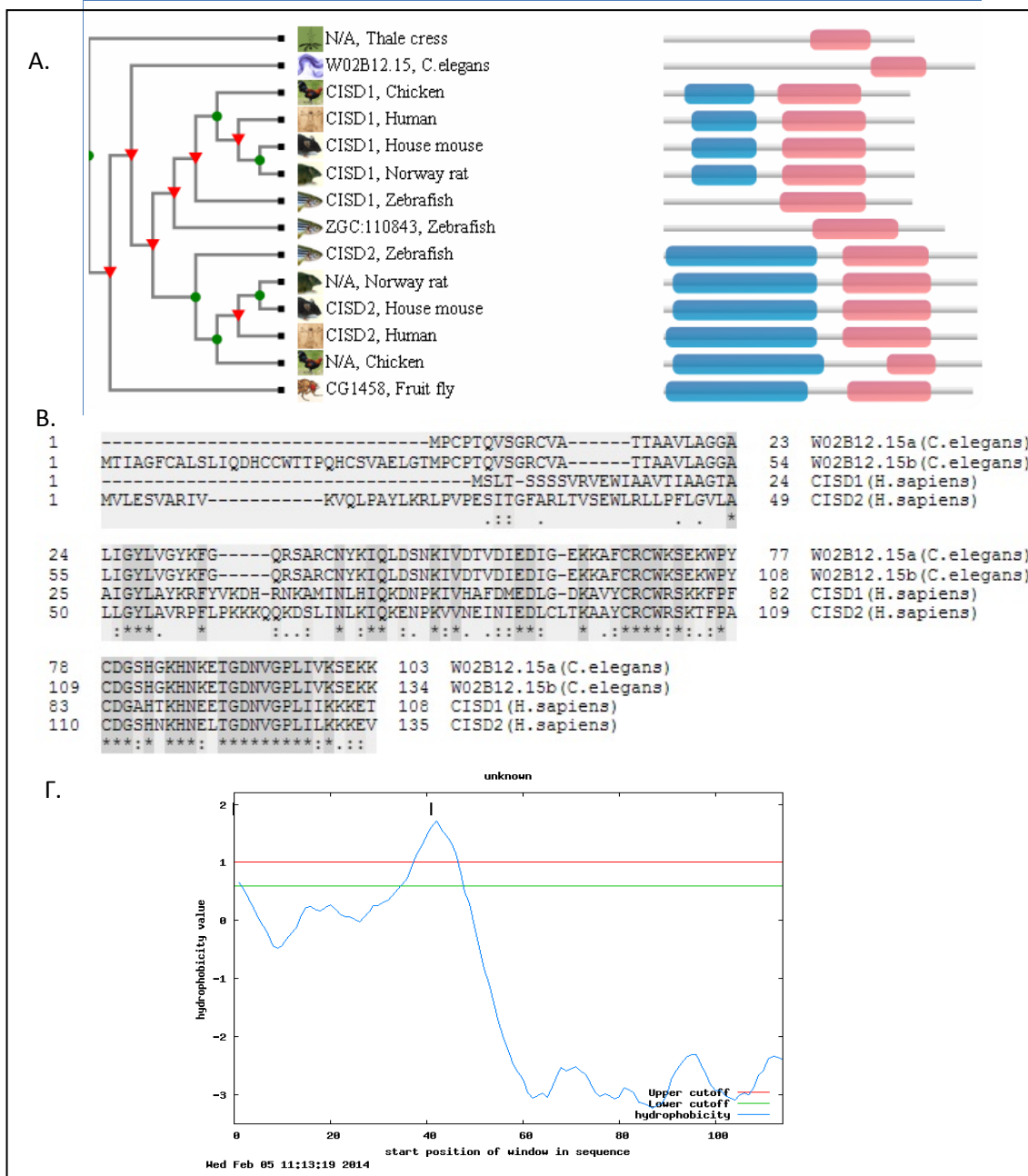
3. Χημικά και αντιδραστήρια

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

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

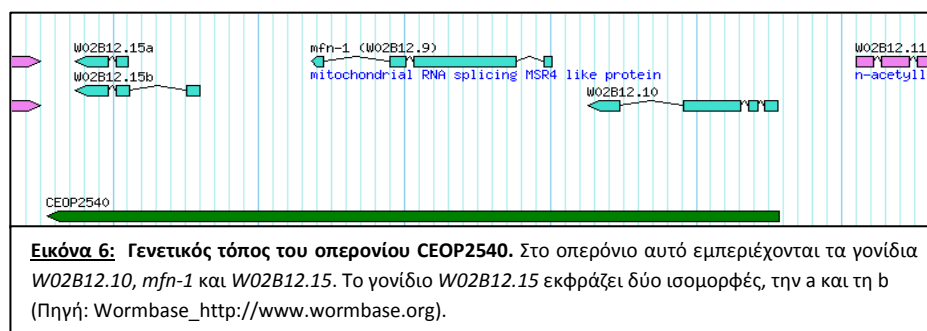
1. Το γονίδιο *W02B12.15* κωδικοποιεί τη μοναδική πρωτεΐνη NEET στον *C. elegans*

Ο νηματώδης *C. elegans* εκφράζει μόνο μία πρωτεΐνη NEET, την *W02B12.15*. Η *W02B12.15* φέρει τη συντηρημένη επικράτεια CDGSH των πρωτεϊνών NEET, αλλά φαίνεται να έχει χάσει τη συντηρημένη αμινοτελική περιοχή, η οποία έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στην πρόσδεση σε μεμβράνες (Εικόνα 5A, B).



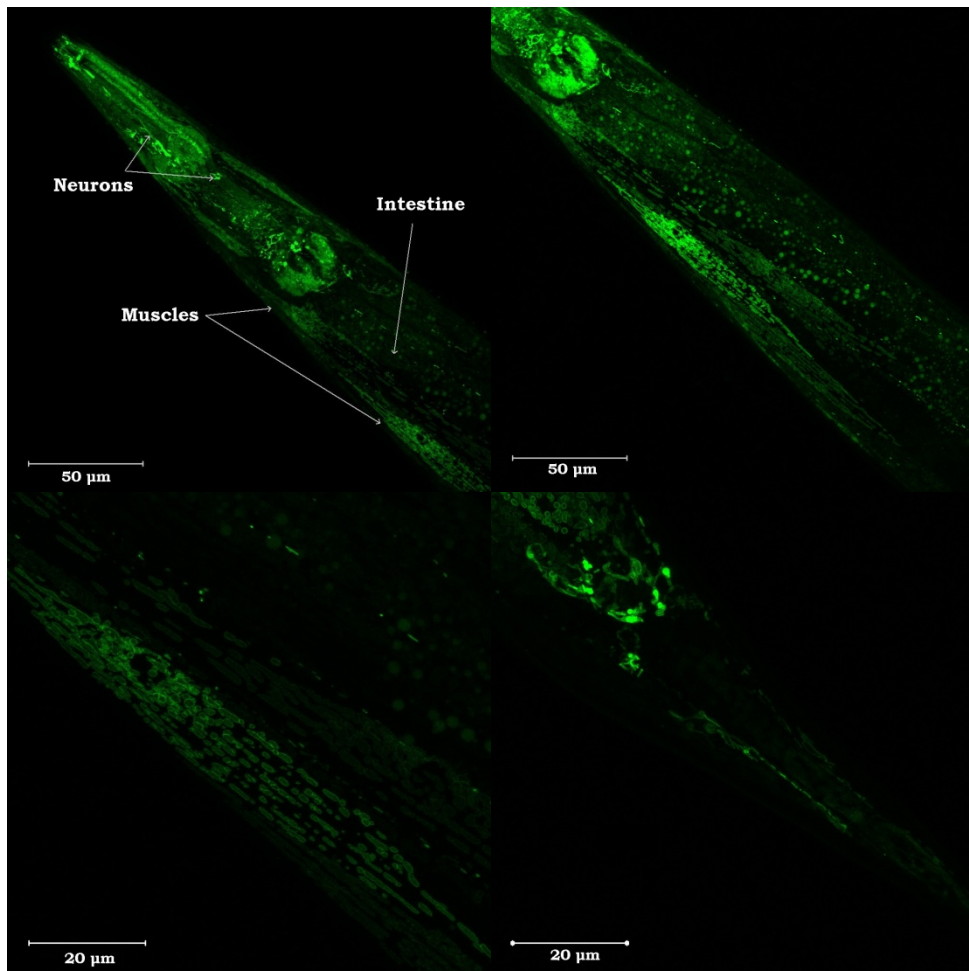
Εικόνα 5: Α. Φυλογενετικό δέντρο των πρωτεϊνών της οικογένειας NEET. Με ροζ διακρίνεται η συντηρημένη CDGSH περιοχή των πρωτεϊνών NEET και με γαλάζιο η αμινοτελική διαμεμβρανική περιοχή για πρόσδεση (tethering) σε μεμβράνες (Πηγή: TreeFam <http://www.treefam.org>) Β. Στοιχία αλληλουχιών των πρωτεϊνών του ανθρώπου *CISD1* και *CISD2*, και της μοναδικής πρωτεΐνης NEET του *C. elegans*, *W02B12.15*. Στη στοιχία έχουν συμπεριληφθεί και οι δύο ισομορφές του γονιδίου *W02B12.15*. Η στοιχία έγινε μέσω του προγράμματος ClustalX⁵². Γ. Εύρεση πιθανών διαμεμβρανικών περιοχών. Η πρόβλεψη έγινε με τη χρήση του προγράμματος TopPred 1.10⁵³

Για να ελέγξουμε εάν η πρωτεΐνη W02B12.15 φέρει κάποια διαμεμβρανική επικράτεια, χρησιμοποιήσαμε το υπολογιστικό εργαλείο *TopPred 1.10*⁵³. Πράγματι, προβλέπεται ότι μία περιοχή περίπου 10bp στο αμινοτελικό άκρο της W02B12.15, φέρει υψηλή περιεκτικότητα υδρόφοβων αμινοξέων, και ως εκ τούτου προβλέπεται να είναι διαμεμβρανική (**Εικόνα 5Γ**). Το γονίδιο W02B12.15 εντοπίζεται στο δεύτερο χρωμόσωμα και ανήκει στο οπερόνιο CEOP2540. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων γονιδιώματος του *C. elegans* [WormBase: <http://www.wormbase.org>], το γονίδιο αυτό εκφράζει δύο ισομορφές: την a και τη b (**Εικόνα 6**). Έγινε προσπάθεια στόχευσης της ισομορφής b από ολικό cDNA ζώων αγρίου-τύπου, με 6 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών ειδικών για τη μοναδική περιοχή της συγκεκριμένης ισομορφής, αλλά ήταν αδύνατη η ανίχνευση mRNAs. Υποθέτουμε λοιπόν, ότι η ισομορφή b του γονιδίου W02B12.15 δεν εκφράζεται, και ενδεχομένως να έχει καταχωρηθεί εσφαλμένα στη βάση δεδομένων του νηματώδους.

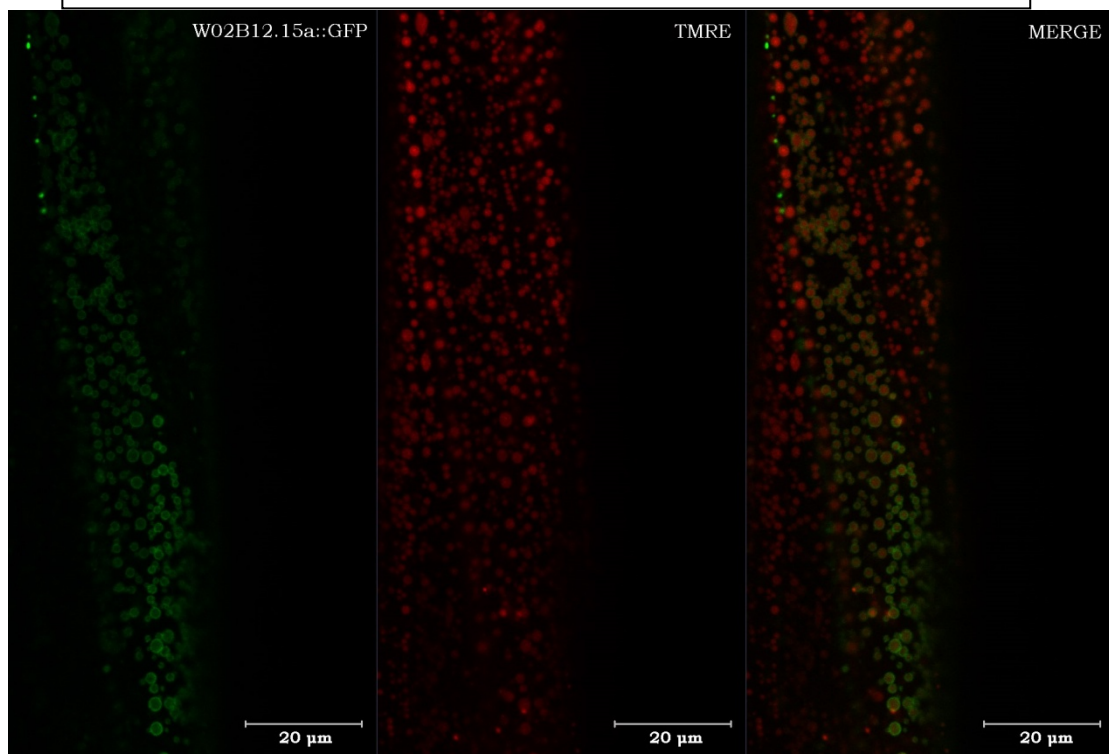


2. Προσδιορισμός του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης W02B12.15

Το πρώτο βήμα, καθώς το γονίδιο W02B12.15 δεν έχει μελετηθεί, ήταν να διερευνήσουμε το πρότυπο έκφρασής του. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήσαμε μέσω μικροένεσης, διαγονιδιακά ζώα, τα οποία εκφράζουν την πρωτεΐνη W02B12.15, συντηγμένη με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (Green Fluorescent Protein), υπό τον έλεγχο του υποκινητή του οπερονίου CEOP2540. Δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά ζώα και για τις δύο ισομορφές του γονιδίου W02B12.15, αλλά έδωσαν ακριβώς το ίδιο πρότυπο έκφρασης. Η παρατήρηση και ανάλυση των διαγονιδιακών σειρών μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας (Confocal Microscopy), έδειξαν ότι η πρωτεΐνη W02B12.15 εκφράζεται σε μύες, νευρώνες καθώς και σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου του νηματώδους. Η έκφρασή της είναι ιδιαίτερα έντονη στην περιοχή του φάρυγγα, καθώς και στο ακραίο τμήμα του εντέρου, στην ουρά των ζώων (**Εικόνα 7**). Το στικτό πρότυπο έκφρασης της W02B12.15, αποτελεί μία ένδειξη ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι μιτοχονδριακή. Και πράγματι, η W02B12.15 φαίνεται να προσδέεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, όπως προκύπτει μετά από χρώση των διαγονιδιακών ζώων με τη χρωστική TMRE (TetraMethylRhodamine Ethyl ester), η οποία συσσωρεύεται εκλεκτικά στη μήτρα των ενεργών μιτοχονδρίων βάσει της διαφοράς δυναμικού εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης⁵⁴ (**Εικόνα 8**).



Εικόνα 7: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας των διαγονιδιακών ζώων **N2;Ex[p_{CEOP2540}W02B12.15a::GFP]**. Τα ζώα ήταν ηλικίας 3 ημερών μετά την ενηλικίωσή τους.

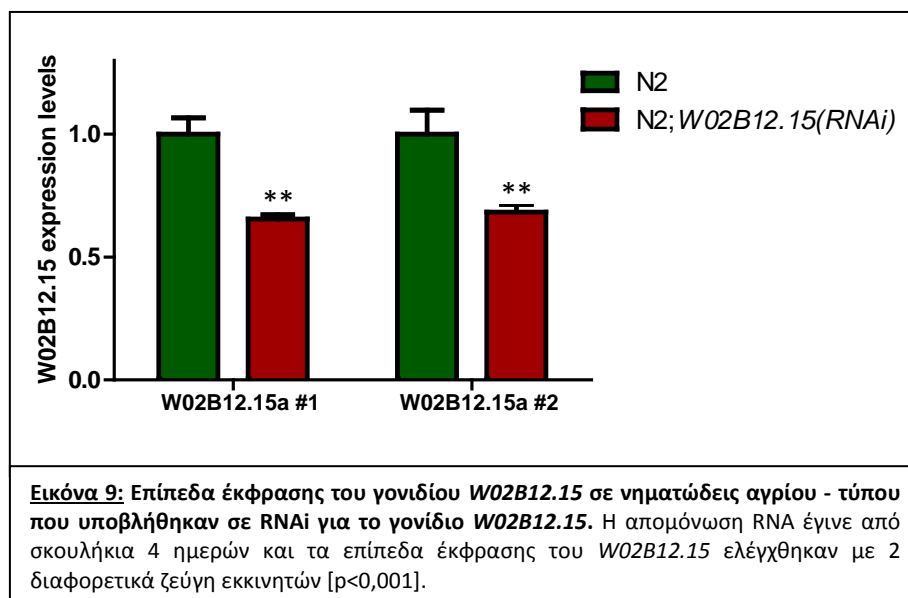


Εικόνα 8: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας των διαγονιδιακών ζώων **N2;Ex[p_{CEOP2540}W02B12.15a::GFP]** Τα ζώα επωάστηκαν για 24h σε τροφή *E. coli*/ OP50 εμπλουτισμένη με τη χρωστική TMRE σε συγκέντρωση 0,15μM και ήταν 4 ημερών ενήλικα.

3. Καταστολή έκφρασης του *W02B12.15* μειώνει σημαντικά τον μέσο όρο ζωής των ζώων αγρίου-τύπου

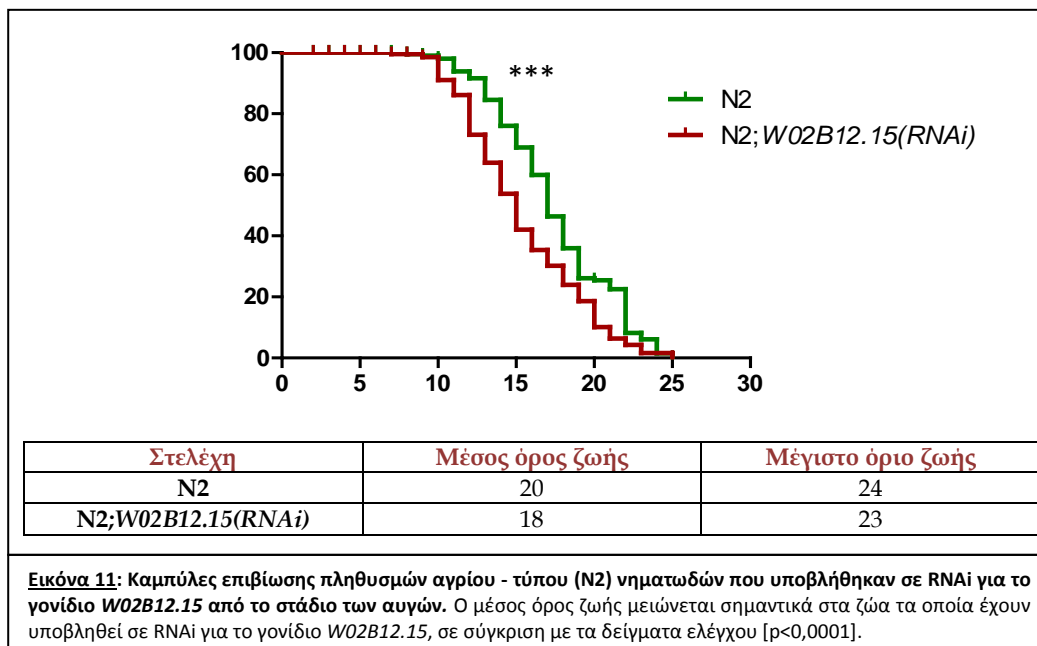
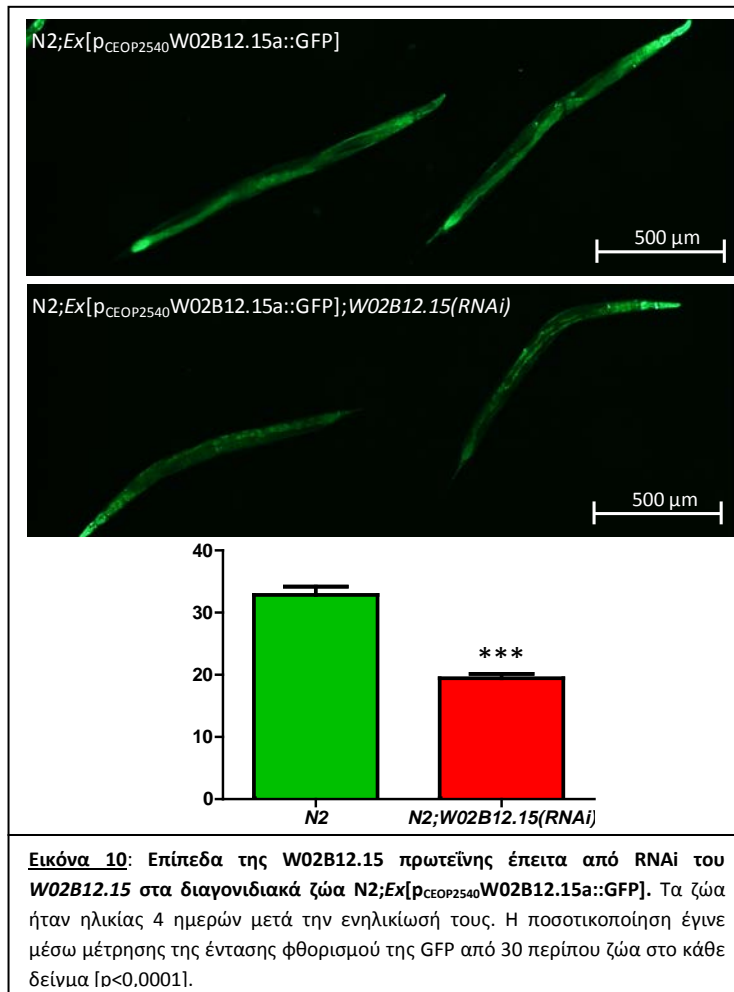
Για να ελεγχθεί εάν η καταστολή του γονιδίου *W02B12.15* επηρεάζει τη διάρκεια ζωής του νηματώδους, έγινε επαγωγή RNA παρεμβολής ειδικής για το συγκεκριμένο γονίδιο, σε ζώα αγρίου-τύπου.

Σε πρώτη φάση, ελέγχθηκε κατά πόσο μειώνονται τα επίπεδα mRNA του *W02B12.15* σε ενήλικα ζώα αγρίου-τύπου τα οποία υποβάλλονταν σε RNAi για το *W02B12.15* από το στάδιο του αυγού (Εικόνα 9). Μετά από συλλογή των συγκεκριμένων ζώων και απομόνωση του ολικού mRNA, έγινε αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, με δύο ζεύγη εκκινητών, ειδικών για την κωδική περιοχή του γονιδίου *W02B12.15* (κοινή και των δύο ισομορφών). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 9, τα επίπεδα mRNA του *W02B12.15* μειώνονται κατά 40% περίπου όταν γίνεται σίγηση ολόκληρου του γονιδίου.

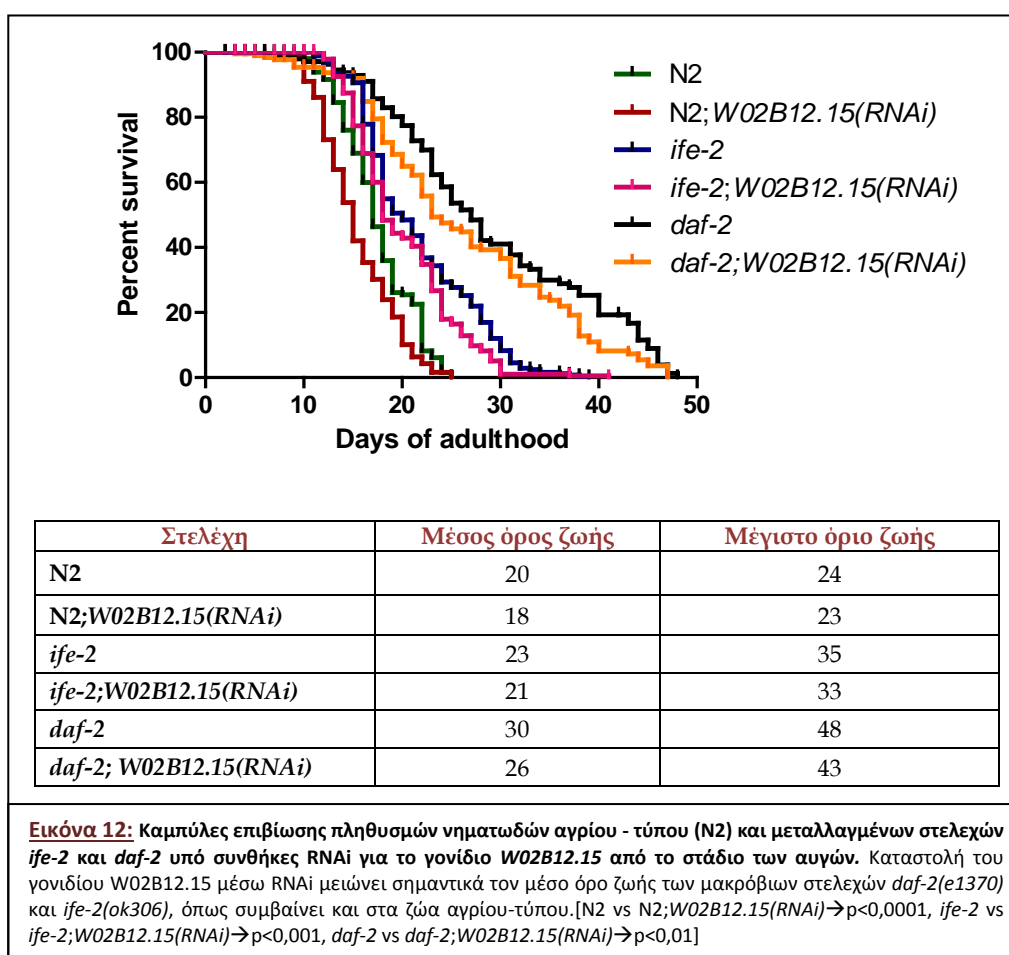


Την ίδια μείωση την επιβεβαιώσαμε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, υποβάλλοντας τους μεταφραστικούς μάρτυρες που είχαμε δημιουργήσει, σε RNAi για το γονίδιο *W02B12.15* (Εικόνα 10).

Εφόσον ελέγχθηκε ότι η καταστολή έκφρασης του *W02B12.15* είναι εφικτή, πραγματοποιήσαμε πειράματα γήρανσης για να διερευνήσουμε πώς επηρεάζει η έλλειψη της *W02B12.15* τη διάρκεια ζωής των νηματωδών. Φαίνεται λοιπόν ότι καταστολή έκφρασης του γονιδίου *W02B12.15* οδηγεί σε σημαντικά μειωμένο μέσο όρο ζωής σε ζώα αγρίου τύπου (Εικόνα 11).

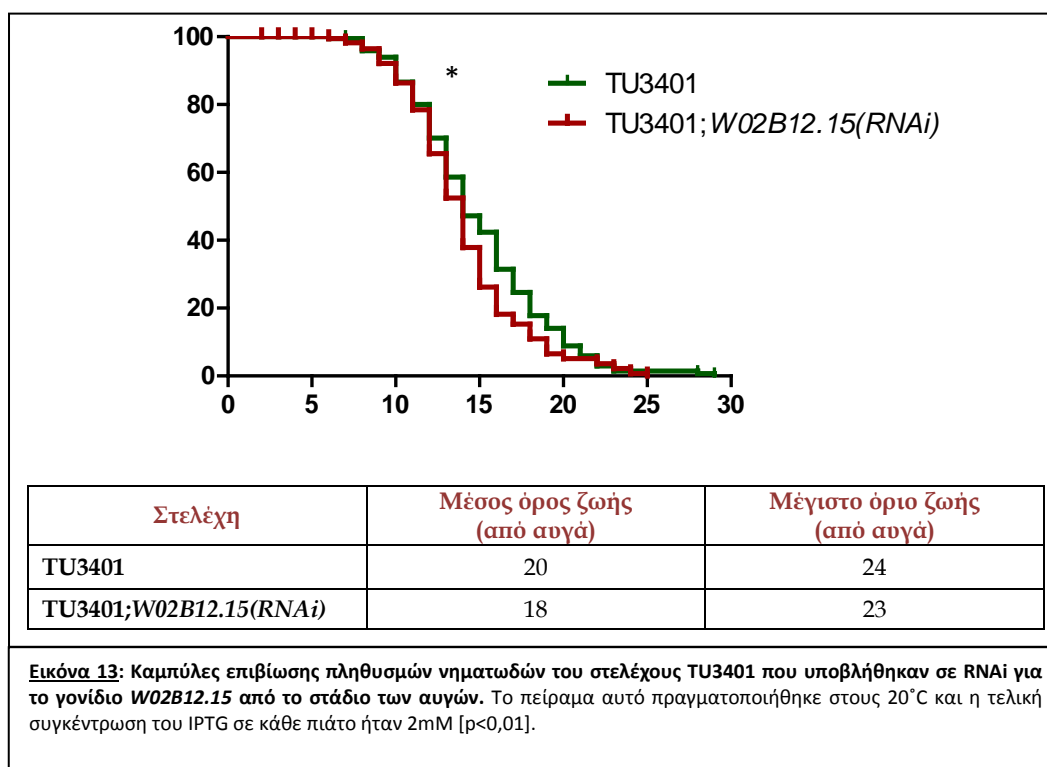


Πραγματοποιήθηκαν πειράματα γήρανσης και στα μακρόβια μεταλλαγμένα στελέχη *daf-2* και *ife-2* υπό συνθήκες RNAi του *W02B12.15*. Η πρωτεΐνη DAF-2 είναι ορθόλογη του υποδοχέα της ινσουλίνης IGFR (Insulin Growth Factor Receptor), και τα μεταλλαγμένα στελέχη *daf-2* εμφανίζουν αυξημένη διάρκεια ζωής λόγω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα DAF-16. Ο DAF-16 ενεργοποιείται όταν το μονοπάτι IGF-1 είναι ανενεργό (απουσία ή δυσλειτουργία του υποδοχέα DAF-2) και εισέρχεται στο εσωτερικό του πυρήνα⁵⁵⁻⁵⁷, όπου και ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την επιβίωση του οργανισμού, την αντιμετώπιση οξειδωτικού και θερμικού στρες, την έμφυτη ανοσία, το μεταβολισμό και την αυτοφαγία⁵⁸⁻⁶². Το γονίδιο *ife-2* είναι ορθόλογο του παράγοντα έναρξης της αντιγραφής, eIF4E, και εκφράζεται εκλεκτικά στα σωματικά κύτταρα του *C. elegans*. Απώλεια του παράγοντα IFE-2 οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα μετάφρασης στα σωματικά κύτταρα και αυξάνει σημαντικά τη διάρκεια ζωής των νηματωδών^{63, 64}. Όπως διακρίνεται στην **Εικόνα 12**, καταστολή έκφρασης του γονιδίου *W02B12.15* μέσω RNAi μειώνει σημαντικά τον μέσο όρο ζωής των μακρόβιων στελεχών *daf-2* και *ife-2*, όπως συμβαίνει και με τα ζώα αγρίου-τύπου.



4. Καταστολή έκφρασης του W02B12.15 εκλεκτικά στο νευρικό σύστημα μέσω RNAi

Η μειωμένη απόδοση της RNA παρεμβολής (μόνο 40% μείωση), μπορεί να εξηγηθεί από την υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης W02B12.15 στα νευρικά κύτταρα. Όπως είναι γνωστό, η επαγωγή RNA σίγησης στο νευρικό σύστημα του *C. elegans* δεν είναι αποτελεσματική, καθώς στα νευρικά κύτταρα δεν εκφράζεται ο υποδοχέας SID-1, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την εισαγωγή δίκλωνων RNA στο κυτταρόπλασμα ⁶⁵. Για να εξακριβώσουμε την επίδραση της πρωτεΐνης W02B12.15 στο νευρικό σύστημα του νηματώδους, χρησιμοποιήσαμε το μεταλλαγμένο στέλεχος TU3401[*sid-1(pk3321);ls[p_{unc-119}SID-1;p_{myo-2}mCherry]*], το οποίο εκφράζει τον υποδοχέα SID-1 μόνο στα νευρικά κύτταρα, υπό τον ειδικό υποκινητή του νευρικού συστήματος *unc-119* ⁶⁶. Σίγηση του γονιδίου *W02B12.15* επιλεκτικά μόνο στο νευρικό σύστημα, χρησιμοποιώντας το στέλεχος TU3401, είναι αρκετή για να μειώσει, αν και σε μικρότερο βαθμό, το μέσο όρο ζωής των νηματωδών (Εικόνα 13).

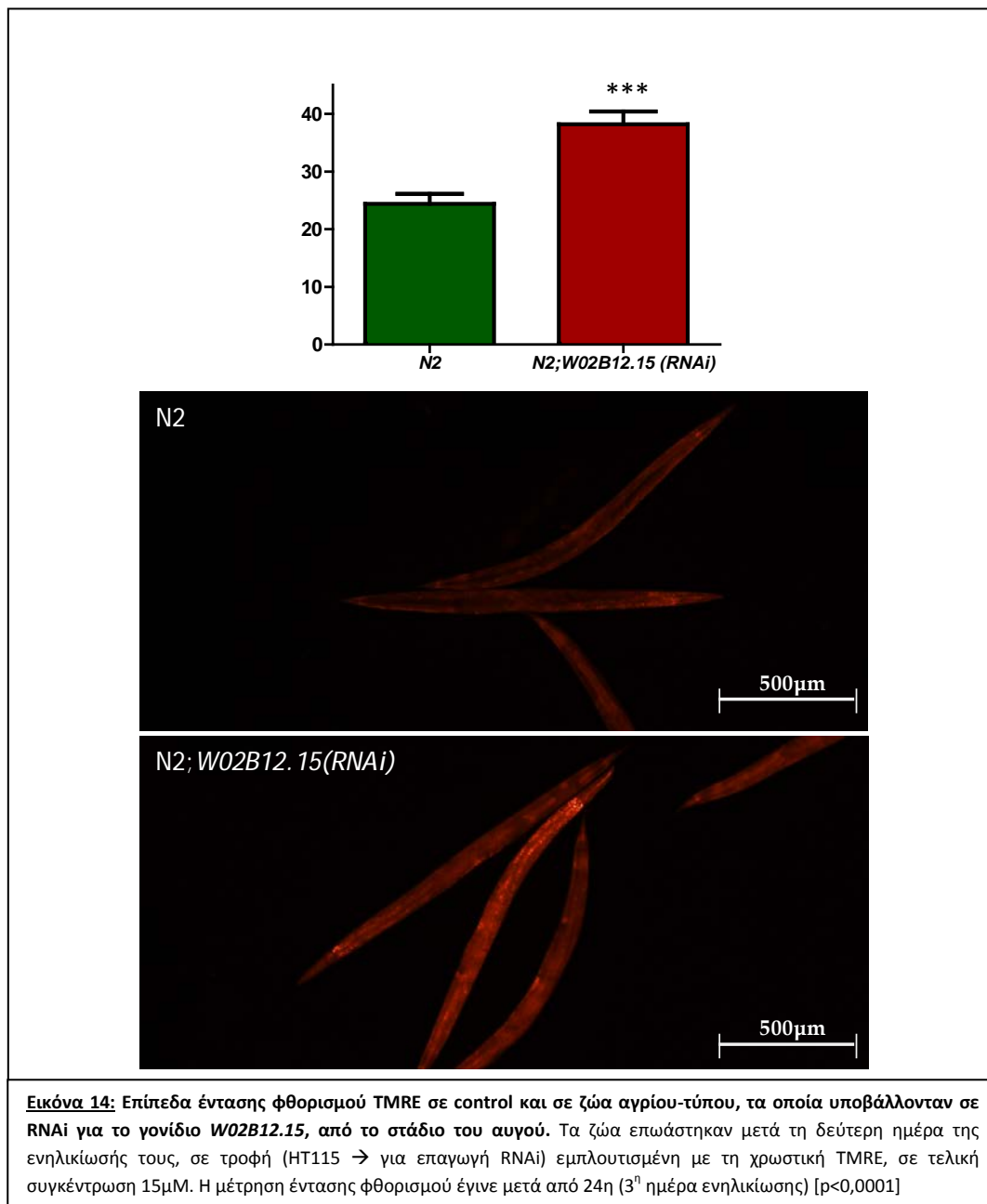


5. Μελέτη του ρόλου της πρωτεΐνης W02B12.15 στη μιτοχονδριακή λειτουργία

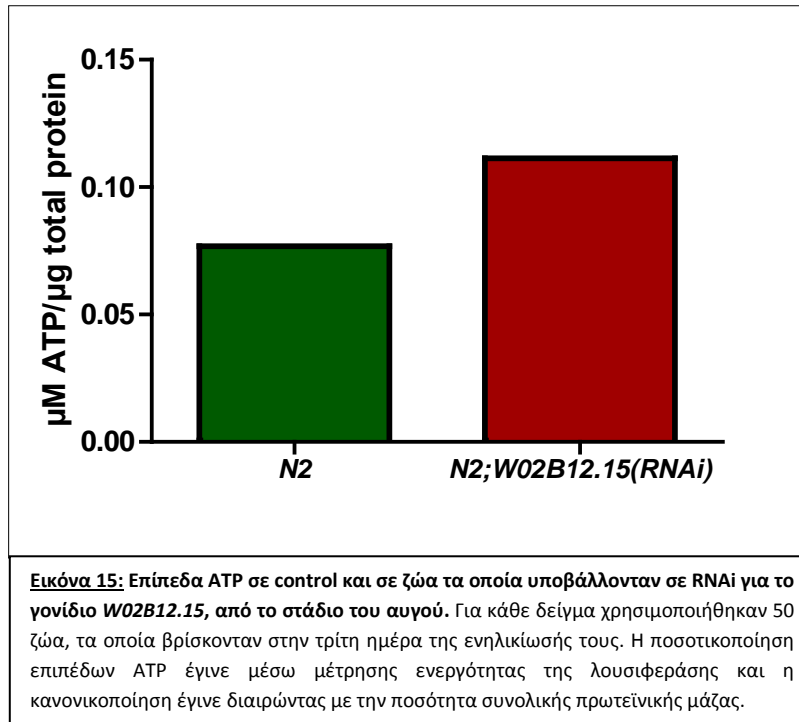
Το γεγονός ότι η πρωτεΐνη W02B12.15 εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, οδηγεί στην υπόθεση ότι καταστολή της έκφρασης της πιθανόν να επηρεάζει τη μιτοχονδριακή λειτουργία.

Σε πρώτη φάση, ελέγχθηκε κατά πόσο επηρεάζεται η διαφορά δυναμικού μεταξύ των μιτοχονδριακών μεμβρανών, η οποία αποτελεί μία πρώτη ένδειξη μιτοχονδριακής ενεργότητας. Ζώα αγρίου-τύπου, τα οποία υποβάλλονταν σε RNAi

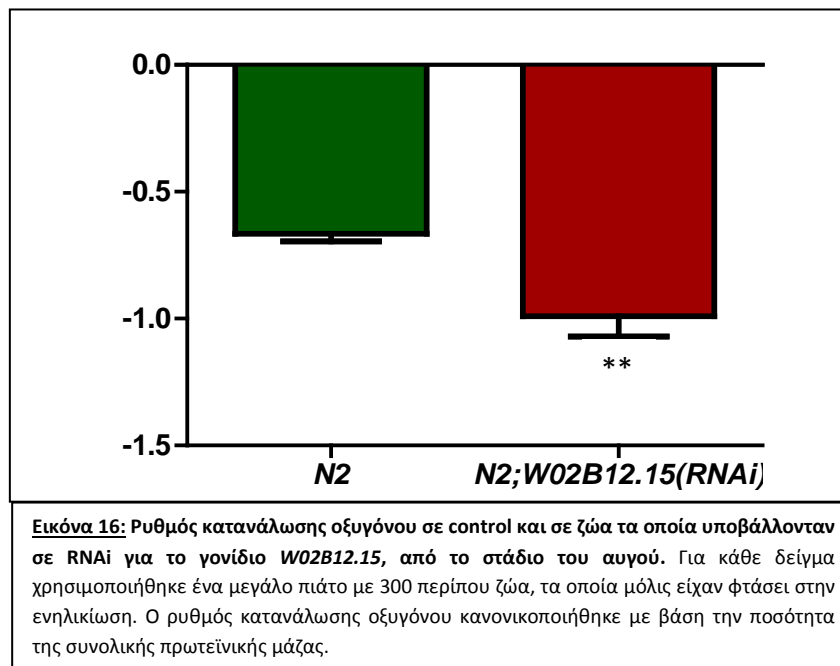
για το *W02B12.15* από το στάδιο του αυγού, επωάστηκαν σε τροφή εμπλουτισμένη με τη χρωστική TMRE, η οποία όπως προαναφέρθηκε, συσσωρεύεται εκλεκτικά στη μήτρα ενεργών μιτοχονδρίων (**Εικόνα 14**). Είναι φανερό, πως σίγηση του γονιδίου *W02B12.15* οδηγεί σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα έντασης φθορισμού του TMRE.



Ακολούθησε μέτρηση των επιπέδων ATP υπό συνθήκες καταστολής του γονιδίου *W02B12.15*. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15**, τα ζώα στα οποία έχει γίνει σίγηση του *W02B12.15* μέσω RNAi, παρουσιάζουν σημαντικά αυξημένα επίπεδα ATP σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου.



Η επίδραση της πρωτεΐνης *W02B12.15* στην μιτοχονδριακή αναπνοή, ελέγχθηκε μέσω μέτρησης του ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου (**Εικόνα 16**). Ζώα τα οποία είχαν υποβληθεί σε RNAi για το γονίδιο *W02B12.15* παρουσίασαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα κατανάλωσης οξυγόνου σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου.

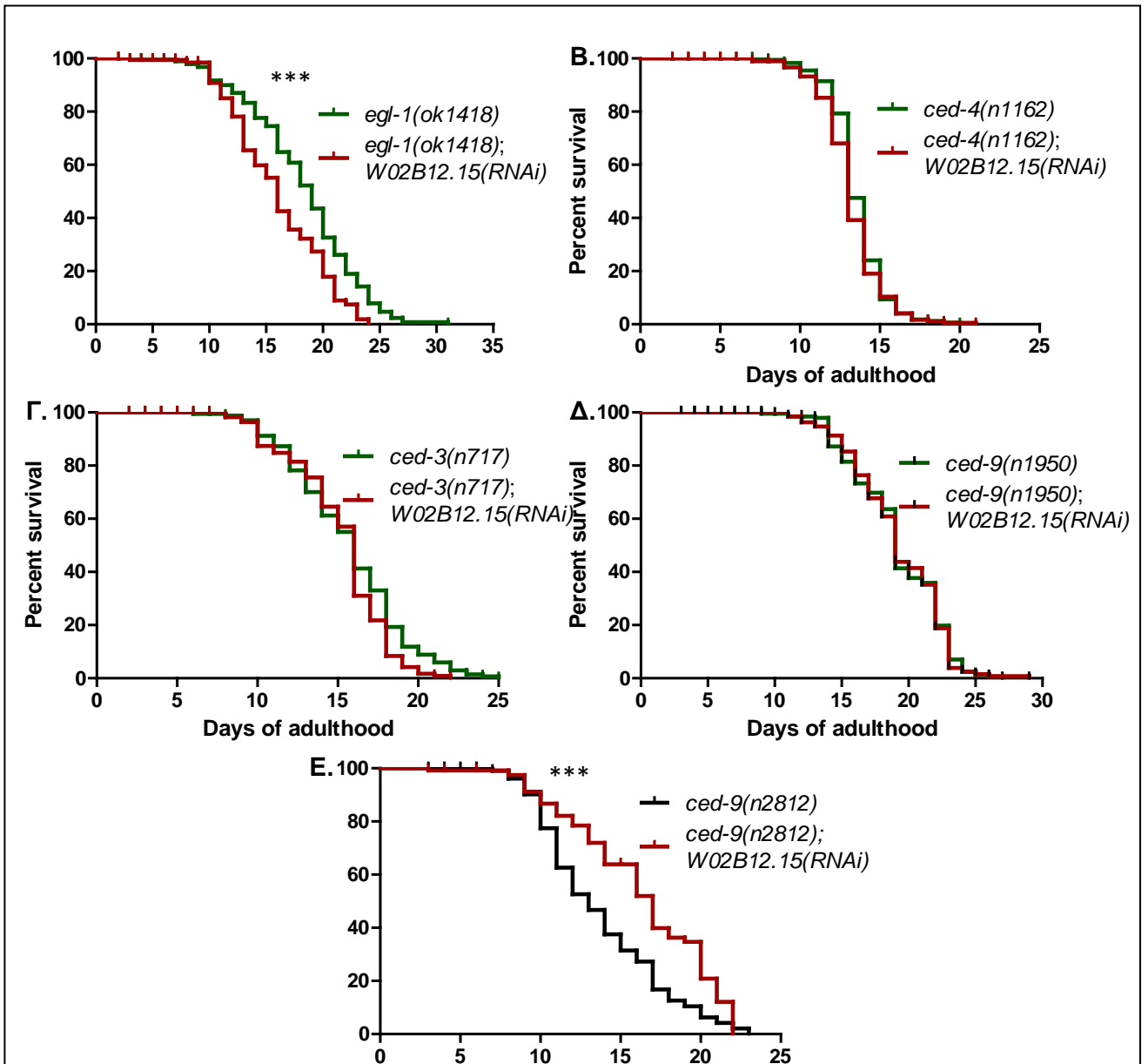


Συνολικά λοιπόν, οι τελευταίες πειραματικές δοκιμές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι έλλειψη της πρωτεΐνης *W02B12.15* προκαλεί υπερ-ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας.

6. Ρόλος της πρωτεΐνης W02B12.15 στη ρύθμιση του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού (intrinsic apoptotic pathway)

Μελέτες του εργαστηρίου έδειξαν ότι καταστολή έκφρασης του γονιδίου *W02B12.15* οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση κυττάρων της γαμετικής σειράς. Για να διερευνήσουμε περαιτέρω το πώς η πρωτεΐνη *W02B12.15* επηρεάζει το αποπτωτικό μονοπάτι, πραγματοποιήσαμε πειράματα γήρανσης σε στελέχη *C. elegans*, τα οποία φέρουν μεταλλαγές σε βασικούς παράγοντες του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού: *egl-1(ok1418)*, *ced-4(n1162)*, *ced-9(n1950)*, *ced-9(n2812)* και *ced-3(n717)*. Ο αντι-αποπτωτικός παράγοντας CED-9, ομόλογος του BCL2 στα θηλαστικά, είναι προσδεμένος στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και αναστέλλει μέσω δέσμευσης την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη CED-4 (ομόλογη της APAF1_ Apoptotic Protease - Activating Factor 1). Με την ενεργοποίηση του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού, ο παράγοντας EGL-1 (Egg Laying defective 1_φέρει επικράτεια Bcl-2 Homology region 3) προσδένει και απενεργοποιεί την CED-9, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της CED-4, η οποία με τη σειρά της επάγει την πρωτεολυτική επεξεργασία και ενεργοποίηση της εκτελεστικής κασπάσης 3, CED-3⁶⁷.

Στα πρώτα τέσσερα γραφήματα της **Εικόνας 16** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων γήρανσης σε στελέχη τα οποία χαρακτηρίζονται από αναστολή του αποπτωτικού μονοπατιού: στελέχη απώλειας λειτουργίας των προ-αποπτωτικών γονιδίων *egl-1*, *ced-4*, *ced-3* και στελέχη ενίσχυσης λειτουργίας του αντι-αποπτωτικού γονιδίου *ced-9*. Καταστολή έκφρασης του γονιδίου *W02B12.15* στο μεταλλαγμένο στέλεχος *egl-1(ok1418)*, οδηγεί σε μείωση του μέσου όρου ζωής, όπως ακριβώς συμβαίνει και στα ζώα αγρίου-τύπου N2 (**Εικόνα 11**). Θεωρούμε επομένως ότι η πρωτεΐνη EGL-1 δεν συμμετέχει στο ρυθμιστικό μονοπάτι της *W02B12.15*, τουλάχιστον όπως φαίνεται από την επίδραση στη γήρανση των νηματωδών. Η διαφορά στο μέσο όρο ζωής (που είχε παρατηρηθεί στα ζώα αγρίου-τύπου /**Εικόνα 11**) εξαλείφεται όταν τα μεταλλαγμένα στελέχη *ced-4(n1162)*, *ced-3(n717)* και *ced-9(n1950)* υπόκεινται σε RNAi για το *W02B12.15*. Αντίθετα, RNAi του *W02B12.15* στο στέλεχος απώλειας λειτουργίας της CED-9, *ced-9(n2812)*, όχι μόνο μειώνει τη διαφορά που παρατηρήθηκε στα ζώα αγρίου-τύπου, αλλά αυξάνει ακόμα παραπάνω το προσδόκιμο ζωής. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι πιθανόν η πρωτεΐνη *W02B12.15* να ασκεί τις αντιγηραντικές επιδράσεις της, ρυθμίζοντας την ισορροπία δράσης προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών παραγόντων του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού.



Στελέχη	Μέσος όρος ζωής (από αυγά)	Μέγιστο όριο ζωής (από αυγά)
<i>egl-1(ok1418)</i>	22	27
<i>egl-1(ok1418);W02B12.15(RNAi)</i>	19	24
<i>ced-4(n1162)</i>	16	18
<i>ced-4(n1162);W02B12.15(RNAi)</i>	16	18
<i>ced-3(n717)</i>	19	23
<i>ced-3(n717);W02B12.15(RNAi)</i>	19	21
<i>ced-9(n1950)</i>	21	26
<i>ced-9(n1950);W02B12.15(RNAi)</i>	21	25
<i>ced-9(n2812)</i>	16	21
<i>ced-9(n2812);W02B12.15(RNAi)</i>	20	25

Εικόνα 16: Καμπύλες επιβίωσης πληθυσμών μεταλλαγμένων στελεχών του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού, που υποβλήθηκαν σε RNAi για το γονίδιο *W02B12.15* από το στάδιο των αυγών. **A.** RNAi του *W02B12.15* στο στέλεχος απώλειας λειτουργίας *egl-1(ok1418)* μειώνει σημαντικά τον μέσο όρο ζωής συγκριτικά με τα δείγματα ελέγχου ($p < 0,0001$), **B, Γ, Δ** RNAi του *W02B12.15* στα στελέχη απώλειας λειτουργίας *ced-4(n1162)*, *ced-3(n717)* και στο στέλεχος ενίσχυσης λειτουργίας *ced-9(n1950)* *ced-9(n2812)* δεν προκαλεί σημαντική διαφορά στον μέσο όρο ζωής συγκριτικά με τα δείγματα ελέγχου, αλλά εξαλείφει τη διαφορά που είχε παρατηρηθεί στα ζώα αγρίου-τύπου. **E.** RNAi του *W02B12.15* στο στέλεχος απώλειας λειτουργίας *ced-9(n2812)* αυξάνει σημαντικά το μέσο όρο ζωής συγκριτικά με τα δείγματα ελέγχου ($p < 0,0001$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας NEET αποτελούν μία ειδική κατηγορία σίδηρο-θειο-πρωτεϊνών, και έχουν βρεθεί να εμπλέκονται σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων στον άνθρωπο, όπως στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2^{25, 26}, στη γήρανση^{29, 37, 46}, στην εκδήλωση νευροεκφυλιστικών νοσημάτων³⁰ αλλά και στον καρκίνο²⁷. Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια χαρακτηρισμού του ρόλου της μοναδικής πρωτεΐνης NEET στο νηματώδη *Caenorabditis elegans*, της W02B12.15.

Η W02B12.15 φέρει τη συντηρημένη επικράτεια πρόδεσης συμπλεγμάτων [2Fe-2S], CDGSH, και εκφράζεται σε μυϊκά, νευρικά καθώς και σε εντερικά επιθηλιακά κύτταρα του νηματώδους. Ως προς τον υποκυτταρικό εντοπισμό της, το σικτό πρότυπο έκφρασής της αλλά και χρώση με ειδικούς μάρτυρες (TMRE), προτείνουν ότι η πρωτεΐνη W02B12.15 προσδέεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, πιθανόν μέσω της προβλεπόμενης διαμεμβρανικής περιοχής του αμινοτελικού της άκρου. Ο εντοπισμός της W02B12.15 στα μιτοχόνδρια, συμφωνεί με το πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών mitoNEET^{25, 33}, CISD2³⁷ και CISD3³³ στα θηλαστικά και προδιαθέτει για πιθανή συντηρημένη λειτουργία της στον *C. elegans*.

Καταστολή έκφρασης του γονιδίου W02B12.15 μέσω RNA παρεμβολής, μειώνει σημαντικά τον μέσο όρο ζωής των αγρίου-τύπου ζώων N2, αλλά και των μακρόβιων στελεχών *daf-2(e1370)* και *ife-2(ok306)*. Αυτό συνάδει με προηγούμενες μελέτες στα θηλαστικά, οι οποίες αποδεικνύουν ότι ποντίκια στα οποία έχει γίνει γονιδιακή απαλοιφή του *Cisd2* (*cisd2^{-/-}*), παρουσιάζουν ιδιαίτερα μειωμένη διάρκεια ζωής σε σχέση με τα φυσιολογικά³⁷. Μάλιστα, επόμενες μελέτες της ίδιας ερευνητικής ομάδας έδειξαν ότι συστατική έκφραση του *Cisd2* αυξάνει σημαντικά το προσδόκιμο ζωής των διαγονιδιακών ζώων²⁹. Φαίνεται επομένως, ότι η πρωτεΐνη W02B12.15 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της γήρανσης.

Η έντονη έκφραση της W02B12.15 στα νευρικά κύτταρα, αλλά και η σύνδεση της ομόλογής της, CISD2, με το νευροεκφυλιστικό σύνδρομο Wolfram τύπου 2³⁰, μας έκανε να αναρωτηθούμε εάν καταστολή έκφρασής της εκλεκτικά στο νευρικό σύστημα μειώνει τη διάρκεια ζωής των νηματωδών. Όπως αποδείχθηκε με τη χρήση του ειδικού στελέχους TU3401, RNAi για το γονίδιο W02B12.15 εκλεκτικά μόνο στο νευρικό σύστημα, μειώνει αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό το μέσο όρο ζωής, πράγμα το οποίο υποδηλώνει ότι η W02B12.15 ενδεχομένως να μην παίζει σημαντικό ρόλο στο νευρικό σύστημα του *C. elegans*.

Ο εντοπισμός της W02B12.15 στα μιτοχόνδρια, αλλά και η ικανότητά της να δεσμεύει συμπλέγματα [2Fe-2S], όπως πολλοί παράγοντες της αναπνευστικής αλυσίδας, οδηγεί στην υπόθεση ότι η πρωτεΐνη αυτή πιθανόν να παίζει ρόλο στη ρύθμιση της βασικής μιτοχονδριακής λειτουργίας, της αναπνοής. Μελέτες στα θηλαστικά αποδεικνύουν ότι ιστοί σκελετικών μυών από ποντίκια *cisd2^{-/-}*, παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα κατανάλωσης οξυγόνου, αλλά και διαταραγμένη ενεργότητα των μιτοχονδριακών συμπλεγμάτων που μετέχουν στην αναπνευστική

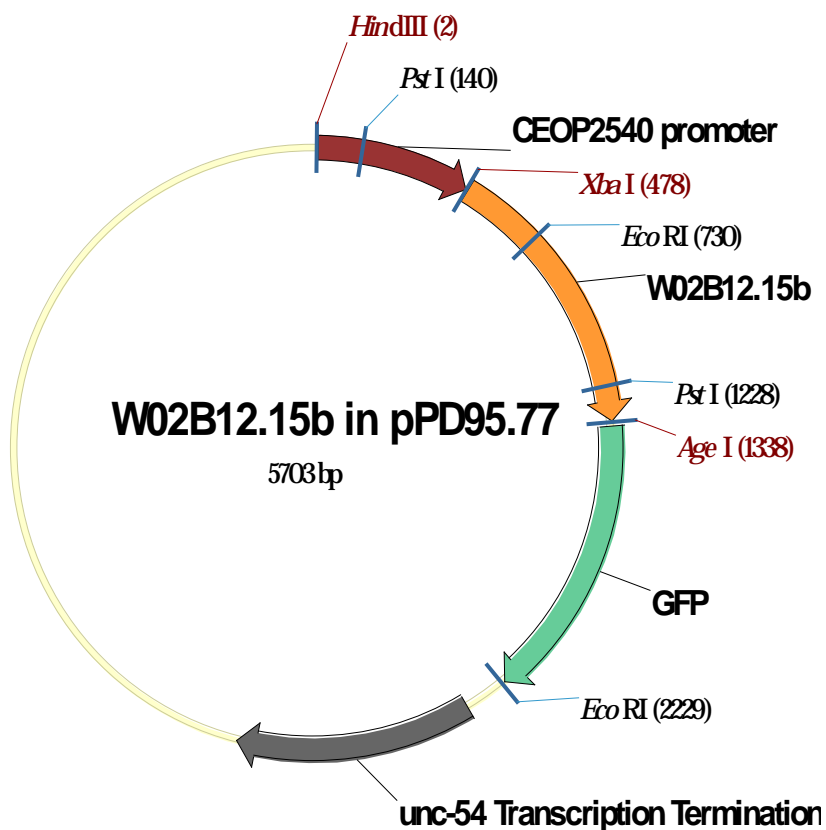
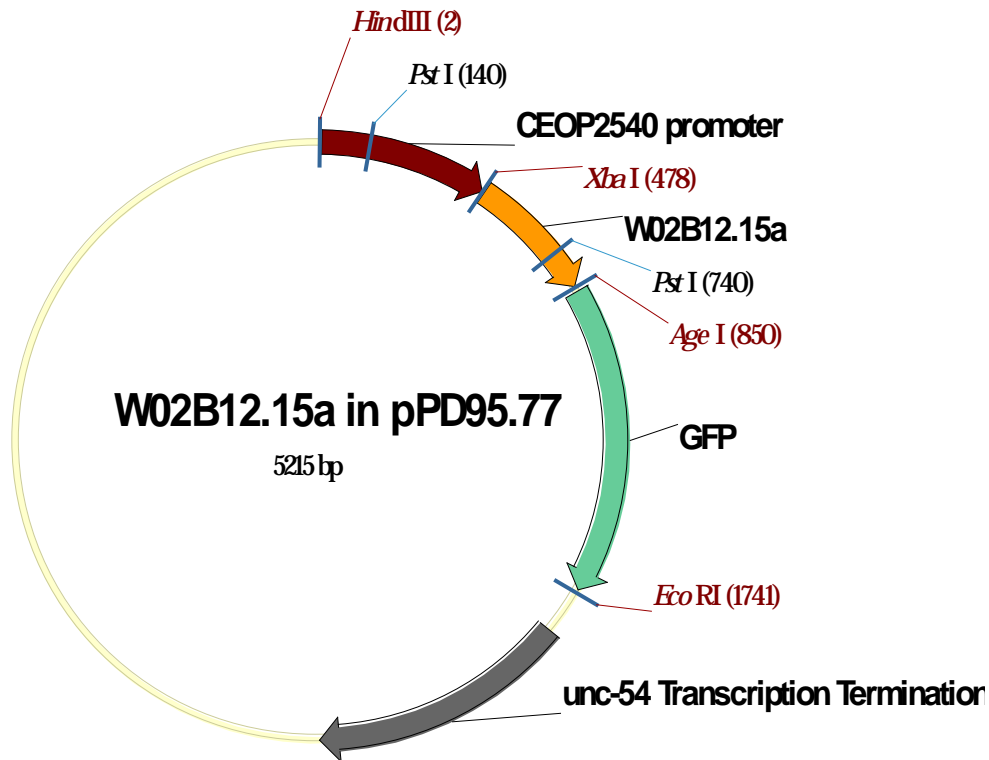
αλυσίδα³⁷. Παρόλα αυτά, υπερέκφραση της πρωτεΐνης mitoNEET σε λιποκύτταρα ποντικών οδηγεί σε μειωμένη κατανάλωση οξυγόνου καθώς και σε μειωμένη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS)²⁶. Στην παρούσα εργασία, καταστολή έκφρασης του γονιδίου *W02B12.15* φαίνεται να επάγει την υπερ-ενεργοποίηση των μιτοχονδρίων, όπως γίνεται φανερό από τα αυξημένα επίπεδα παραγωγής ATP αλλά και κατανάλωσης οξυγόνου στα ζώα αγρίου τύπου. Μπορούμε επομένως να υποθέσουμε ότι η *W02B12.15* πιθανόν να διατηρεί σε μία σταθερή κατάσταση τη μιτοχονδριακή ενεργότητα, με αποτέλεσμα όταν λείπει, να επάγεται υπερ-ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, και μέσω αυξημένης παραγωγής ROS, να συντελεί στη μείωση της διάρκειας ζωής του νηματώδους.

Πειράματα γήρανσης σε μεταλλαγμένα στελέχη του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού, έδειξαν ότι η πρωτεΐνη *W02B12.15* επηρεάζει τη γήρανση του νηματώδους πιθανόν ρυθμίζοντας την ισορροπία δράσης προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, η *W02B12.15* φαίνεται να δρα καθοδικά του προ-αποπτωτικού παράγοντα *EGL-1*, καθώς απώλειά της στα μεταλλαγμένα στελέχη *egl-1(ok1418)* παρουσιάζει την ίδια μείωση του μέσου όρου ζωής, όπως και στα αγρίου-τύπου ζώα. Αντίθετα, καταστολή έκφρασης του *W02B12.15* στα στελέχη *ced-4(n1162)*, *ced-3(n717)* και *ced-9(n1950)* εξαλείφει τη διαφορά στο μέσο όρο ζωής που είχε παρατηρηθεί στα αγρίου-τύπου ζώα, κι επομένως υποθέτουμε ότι δρα ανοδικά των συγκεκριμένων παραγόντων. Ειδικότερα, η επίδραση της πρωτεΐνης *W02B12.15* στη δράση του αντι-αποπτωτικού παράγοντα *CED-9*, ενδεχομένως να μην εμπλέκει μόνο το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι αλλά να επεκτείνεται και στη ρύθμιση του μονοπατιού αυτοφαγίας⁶⁸. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη *CISD2* των θηλαστικών αλληλεπιδρά με την *BCL2*, και ότι η αλληλεπίδραση αυτή συντελεί στην αναστολή έναρξης της αυτοφαγίας στο Ενδοπλασματικό δίκτυο^{47, 48}

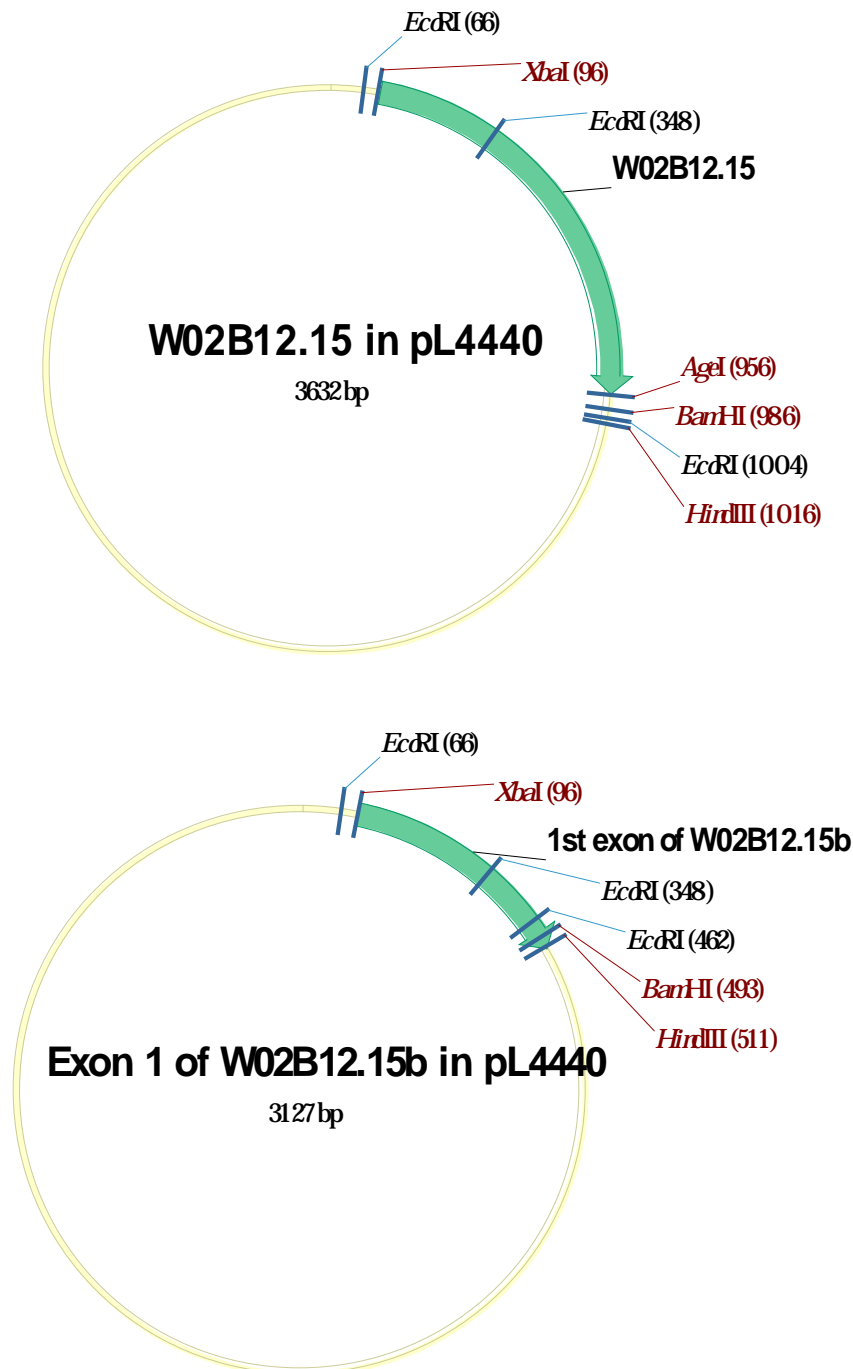
Συνολικά λοιπόν, η μοναδική πρωτεΐνη *NEET* του *C. elegans*, φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά τη γήρανση, τόσο μέσω διατήρησης της μιτοχονδριακής ενεργότητας σε σταθερά επίπεδα, όσο και μέσω ρύθμισης του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού. Περαιτέρω προσπάθειες χαρακτηρισμού της πρωτεΐνης *W02B12.15*, δεδομένου ότι δεν έχει μελετηθεί καθόλου στον *C. elegans*, θα οδηγήσουν στην καλύτερη κατανόηση του ακριβούς τρόπου δράσης, και κατ'επέκταση του ρόλου των πρωτεϊνών της οικογένειας *NEET* στη ρύθμιση του φαινομένου της γήρανσης.

ΠΑΡΑΘΕΜΑ: ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΧΑΡΤΕΣ

A. Πλασμιδιακές κατασκευές για τη δημιουργία μεταφραστικών μαρτύρων του γονιδίου W02B12.15 στον *C. elegans*



B. Πλασμιδιακές κατασκευές για την επαγωγή RNA παρεμβολής ειδικής για το γονίδιο W02B12.15, στον *C. elegans*



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94 (1974).
2. Coulson, A., Waterston, R., Kiff, J., Sulston, J. & Kohara, Y. Genome linking with yeast artificial chromosomes. *Nature* **335**, 184-6 (1988).
3. Waterston, R. & Sulston, J. The genome of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10836-40 (1995).
4. Blumenthal, T. et al. A global analysis of *Caenorhabditis elegans* operons. *Nature* **417**, 851-4 (2002).
5. Boulton, S.J. et al. Combined functional genomic maps of the *C. elegans* DNA damage response. *Science* **295**, 127-31 (2002).
6. Kamath, R.S. et al. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**, 231-7 (2003).
7. Kim, S.K. et al. A gene expression map for *Caenorhabditis elegans*. *Science* **293**, 2087-92 (2001).
8. Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M. & Sugimoto, A. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol* **11**, 171-6 (2001).
9. Matthews, L.R. et al. Identification of potential interaction networks using sequence-based searches for conserved protein-protein interactions or "interologs". *Genome Res* **11**, 2120-6 (2001).
10. Walhout, A.J. et al. Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science* **287**, 116-22 (2000).
11. Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11 (1998).
12. Tavernarakis, N., Wang, S.L., Dorovkov, M., Ryazanov, A. & Driscoll, M. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat Genet* **24**, 180-3 (2000).
13. Kennedy, S., Wang, D. & Ruvkun, G. A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature* **427**, 645-9 (2004).
14. Lehner, B. et al. Loss of LIN-35, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the tumor suppressor p105Rb, results in enhanced RNA interference. *Genome Biol* **7**, R4 (2006).
15. Simmer, F. et al. Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. *PLoS Biol* **1**, E12 (2003).
16. Timmons, L. Endogenous inhibitors of RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Bioessays* **26**, 715-8 (2004).
17. Mello, C. & Fire, A. DNA transformation. *Methods Cell Biol* **48**, 451-82 (1995).
18. Wicks, S.R., Yeh, R.T., Gish, W.R., Waterston, R.H. & Plasterk, R.H. Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nat Genet* **28**, 160-4 (2001).
19. Sulston, J.E. & Horvitz, H.R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **56**, 110-56 (1977).
20. Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G. & Thomson, J.N. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**, 64-119 (1983).
21. Bargmann, C.I. & Kaplan, J.M. Signal transduction in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Annu Rev Neurosci* **21**, 279-308 (1998).
22. White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N. & Brenner, S. The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **275**, 327-48 (1976).
23. Bargmann, C.I. & Avery, L. Laser killing of cells in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Cell Biol* **48**, 225-50 (1995).

24. Harbinder, S. et al. Genetically targeted cell disruption in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13128-33 (1997).
25. Colca, J.R. et al. Identification of a novel mitochondrial protein ("mitoNEET") cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E252-60 (2004).
26. Kusminski, C.M. et al. MitoNEET-driven alterations in adipocyte mitochondrial activity reveal a crucial adaptive process that preserves insulin sensitivity in obesity. *Nat Med* **18**, 1539-49 (2012).
27. Sohn, Y.S. et al. NAF-1 and mitoNEET are central to human breast cancer proliferation by maintaining mitochondrial homeostasis and promoting tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14676-81 (2013).
28. Chen, Y.F., Wu, C.Y., Kirby, R., Kao, C.H. & Tsai, T.F. A role for the CISD2 gene in lifespan control and human disease. *Ann N Y Acad Sci* **1201**, 58-64 (2010).
29. Wu, C.Y. et al. A persistent level of Cisd2 extends healthy lifespan and delays aging in mice. *Hum Mol Genet* **21**, 3956-68 (2012).
30. Amr, S. et al. A homozygous mutation in a novel zinc-finger protein, ERIS, is responsible for Wolfram syndrome 2. *Am J Hum Genet* **81**, 673-83 (2007).
31. Hou, X. et al. Crystallographic studies of human MitoNEET. *J Biol Chem* **282**, 33242-6 (2007).
32. Lin, J., Zhou, T., Ye, K. & Wang, J. Crystal structure of human mitoNEET reveals distinct groups of iron sulfur proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14640-5 (2007).
33. Wiley, S.E., Murphy, A.N., Ross, S.A., van der Geer, P. & Dixon, J.E. MitoNEET is an iron-containing outer mitochondrial membrane protein that regulates oxidative capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5318-23 (2007).
34. Paddock, M.L. et al. MitoNEET is a uniquely folded 2Fe 2S outer mitochondrial membrane protein stabilized by pioglitazone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14342-7 (2007).
35. Zuris, J.A. et al. Facile transfer of [2Fe-2S] clusters from the diabetes drug target mitoNEET to an apo-acceptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 13047-52 (2011).
36. Kusminski, C.M., Park, J. & Scherer, P.E. MitoNEET-mediated effects on browning of white adipose tissue. *Nat Commun* **5**, 3962 (2014).
37. Chen, Y.F. et al. Cisd2 deficiency drives premature aging and causes mitochondria-mediated defects in mice. *Genes Dev* **23**, 1183-94 (2009).
38. D.J., W. Diabetes mellitus and optic atrophy among siblings: report of four cases. *Mayo Clin Proc*, 715-718 (1938).
39. Okten, A. et al. Various clinical aspects of DIDMOAD (Wolfram) syndrome. *Turk J Pediatr* **37**, 235-40 (1995).
40. Barrett, T.G. & Bunday, S.E. Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *J Med Genet* **34**, 838-41 (1997).
41. Rigoli, L. & Di Bella, C. Wolfram syndrome 1 and Wolfram syndrome 2. *Curr Opin Pediatr* **24**, 512-7 (2012).
42. Strom, T.M. et al. Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet* **7**, 2021-8 (1998).
43. Osman, A.A. et al. Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem* **278**, 52755-62 (2003).
44. Zatyka, M. et al. Sodium-potassium ATPase 1 subunit is a molecular partner of Wolframin, an endoplasmic reticulum protein involved in ER stress. *Hum Mol Genet* **17**, 190-200 (2008).

45. Fonseca, S.G. et al. Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* **120**, 744-55 (2010).
46. Chen, Y.F., Kao, C.H., Kirby, R. & Tsai, T.F. Cisd2 mediates mitochondrial integrity and life span in mammals. *Autophagy* **5**, 1043-5 (2009).
47. Chang, N.C., Nguyen, M., Germain, M. & Shore, G.C. Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1. *EMBO J* **29**, 606-18 (2010).
48. Chang, N.C., Nguyen, M. & Shore, G.C. BCL2-CISD2: An ER complex at the nexus of autophagy and calcium homeostasis? *Autophagy* **8**, 856-7 (2012).
49. Ralph, S.J., Rodriguez-Enriquez, S., Neuzil, J., Saavedra, E. & Moreno-Sanchez, R. The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy. *Mol Aspects Med* **31**, 145-70 (2010).
50. Fulda, S., Galluzzi, L. & Kroemer, G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 447-64 (2010).
51. Timmons, L. & Fire, A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854 (1998).
52. Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* **23**, 403-5 (1998).
53. Claros, M.G. & von Heijne, G. TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput Appl Biosci* **10**, 685-6 (1994).
54. Chazotte, B. Labeling mitochondria with TMRM or TMRE. *Cold Spring Harb Protoc* **2011**, 895-7 (2011).
55. Henderson, S.T. & Johnson, T.E. daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **11**, 1975-80 (2001).
56. Lee, R.Y., Hench, J. & Ruvkun, G. Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the daf-2 insulin-like signaling pathway. *Curr Biol* **11**, 1950-7 (2001).
57. Lin, K., Hsin, H., Libina, N. & Kenyon, C. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet* **28**, 139-45 (2001).
58. Honda, Y. & Honda, S. The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J* **13**, 1385-93 (1999).
59. Lee, S.S., Kennedy, S., Tolonen, A.C. & Ruvkun, G. DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. *Science* **300**, 644-7 (2003).
60. Melendez, A. et al. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* **301**, 1387-91 (2003).
61. Murphy, C.T. et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424**, 277-83 (2003).
62. Antebi, A. Genetics of aging in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* **3**, 1565-71 (2007).
63. Syntichaki, P., Troulinaki, K. & Tavernarakis, N. eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **445**, 922-6 (2007).
64. Tavernarakis, N. Protein synthesis and aging: eIF4E and the soma vs. germline distinction. *Cell Cycle* **6**, 1168-71 (2007).
65. Winston, W.M., Molodowitch, C. & Hunter, C.P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* **295**, 2456-9 (2002).
66. Calixto, A., Chelur, D., Topalidou, I., Chen, X. & Chalfie, M. Enhanced neuronal RNAi in *C. elegans* using SID-1. *Nat Methods* **7**, 554-9 (2010).

67. Wang, C. & Youle, R.J. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet* **43**, 95-118 (2009).
68. Pattingre, S. et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927-39 (2005).