

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ  
ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΕ ΘΕΡΜΙΚΟ ΣΟΚ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ  
ΝΕΚΡΩΤΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΣΤΟ ΝΗΜΑΤΩΔΗ  
*Caenorhabditis elegans***

**ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΟΥΡΤΗΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011**

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

**Επιβλέπων Καθηγητής:** ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ ΤΑΒΕΡΝΑΡΑΚΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

ΧΡΗΣΤΟΣ ΔΕΛΙΔΑΚΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης  
ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΟΥΜΠΑΣ, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης  
ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ ΤΑΒΕΡΝΑΡΑΚΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

**Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

ΑΧΙΛΛΕΑΣ ΓΡΑΒΑΝΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης  
ΧΡΗΣΤΟΣ ΔΕΛΙΔΑΚΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης  
ΔΟΜΝΑ ΚΑΡΑΓΩΓΕΩΣ, Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης  
ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΟΥΜΠΑΣ, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης  
ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ ΤΑΒΕΡΝΑΡΑΚΗΣ, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης  
ΚΩΣΤΑΣ ΤΟΚΑΤΛΙΔΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης  
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΧΑΛΕΠΑΚΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

## Ευχαριστίες

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλλαν άμεσα ή έμμεσα στο να πραγματοποιηθεί αυτή η διατριβή.

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή μου Νεκτάριο Ταβερναράκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω το διδακτορικό μου στο εργαστήριό του. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έδειξε από νωρίς στη συνεργασία μας, για την εξασφάλιση χρηματοδότησης, υλικών και σύγχρονου εξοπλισμού ώστε να πραγματοποιώ την έρευνά μου χωρίς περιορισμούς και για τις πολλές ευκαιρίες που μου έδωσε να ταξιδέψω σε πολλά μέρη για να συμμετάσχω σε συνέδρια και να εργαστώ σε άλλα εργαστήρια. Πιστεύω ότι το μεγαλύτερο εφόδιο που απέκτησα από τη συνεργασία μου με το Νεκτάριο ήταν ότι με έμαθε να στηρίζομαι στις δυνάμεις μου, να επιλύω γρήγορα τα προβλήματα που προέκυπταν, να θέτω τα σωστά ερευνητικά ερωτήματα και να τα απαντώ.

Θέλω να ευχαριστήσω το Γιάννη Βόγλη που με έκανε να αισθανθώ άνετα στο εργαστήριό και με βοήθησε στα πρώτα βήματά μου. Η περίοδος που συνυπήρξαμε στο εργαστήριό με το Γιάννη και το Μάνο Βλάχο ήταν για εμένα η πιο ευχάριστη και χαρούμενη περίοδος.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Αγγέλα Πασπαράκη που όχι μόνο φρόντιζε πάντα για την εύρυθμη λειτουργία του εργαστηρίου αλλά ήταν πάντα η κολλητή μου με την οποία συζητούσα τα πάντα!

Να ευχαριστήσω την "παλαιότερη" γενιά του εργαστηρίου: Γιώργο Μουντουφάρη, Δάφνη Μπαζοπούλου, Κωστούλα Τρουλινάκη, Μαρκέλλα Κατίδου, Πόπη Συντιχάκη, Χρύσα Σαμαρά, Matthias Rieckher και Marta Artal-Sanz για την ευχάριστη ατμόσφαιρα και τις επικοδομητικές συζητήσεις. Επίσης ευχαριστώ τη "νεότερη" γενιά: Άρτεμη Ανδρέου και Ευγενία Μεγάλου για την παρέα. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στην Μαίρη Μαρκάκη για την εξαιρετική προθυμία της να βοηθάει πάντα και τον Κώστα Παλικαρά για την φιλία που αναπτύξαμε.

Ευχαριστώ πάρα πολύ τους φοιτητές που δουλέψαν μαζί μου (άλλοι επιτυχημένα και με όρεξη και άλλοι λιγότερο): Μάνος Βλάχος, Νάντια Γεωργιλιά, Σάσα Διαμαντή, Ελπινίκη Καλογεροπούλου, Εύα Μπέσσα, Μεθόδιος Ξημεράκης, Κώστας Παλικαράς. Ελπίζω να ήμουν καλός δάσκαλος και να έχουν να θυμούνται κάτι καλό από εμένα.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Καθ. Χρήστο Δελιδάκη για τη συμμετοχή του στην τριμελή/επταμελή επιτροπή του διδακτορικού μου και για την πάντοτε εύστοχη κριτική του και τις άριστες πειραματικές του προτάσεις. Ευχαριστώ θερμά τον Καθ. Δημήτριο Μπούμπα για τη συμμετοχή του στην τριμελή/επταμελή επιτροπή του διδακτορικού μου, για τις εύστοχες προτάσεις του, για την προτροπή να σκέφτομαι πάντα τη σύνδεση των αποτελεσμάτων μου με τον άνθρωπο και για το εξαιρετικό του ενδιαφέρον και την προθυμία του να με βοηθήσει και στα βήματά μου μετά το διδακτορικό. Ευχαριστώ πολύ τον Καθ. Αχιλλέα Γραβάνη και τον Καθ. Γεώργιο Χαλεπάκη για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην επταμελή επιτροπή του διδακτορικού μου και για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους. Ευχαριστώ θερμά την Καθ. Δόμνα Καραγωγέως για τη συμμετοχή της στην επταμελή επιτροπή του διδακτορικού μου και

για την ευχάριστη συνεργασία μας στο παρελθόν. Ευχαριστώ πολύ τον Καθ. Κώστα Τοκατλίδη για την προθυμία του να συμμετάσχει στην επταμελή επιτροπή του διδακτορικού μου και την άψογη συνεργασία που είχαμε στο παρελθόν.

Ευχαριστώ τον αδερφό μου Θοδωρή που αν και ήμασταν μακριά και οι πορείες μας έχουν χωρίσει από το 2000, η τηλεφωνική μας επικοινωνία και οι συναντήσεις μας με βοηθούσαν πάντα να καθαρίσω το μυαλό μου, να πάρω δύναμη για τη συνέχεια και να δω τον κόσμο έξω από το πρίσμα του εργαστηρίου. Επίσης ευχαριστώ τους κολλητούς μου φίλους Τάσο και Μαρίνα για την κοινή πορεία που είχαμε και τη δυνατή φιλία που αναπτύξαμε. Είμαι βέβαιος ότι με το Θοδωρή, τον Τάσο και τη Μαρίνα θα είμαστε δεμένοι για πάντα!

Διάλεξα για το τέλος να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την οικογένειά μου. Ευχαριστώ τον παππού μου Νίκο και τη γιαγιά μου Αλεξάνδρα, για την αγάπη τους και για όσα με κόπο μου έχουν εξασφαλίσει. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ του κόσμου το χρωστώ στους γονείς μου οι οποίοι μέσα από καθημερινό αγώνα και πολλές στερήσεις μου εξασφάλιζαν και συνεχίζουν να εξασφαλίζουν τα πάντα ώστε να μπορώ χωρίς άλλες έννοιες να συγκεντρώνομαι σε αυτά που μου αρέσουν. Τους ευχαριστώ για την αγάπη τους και γιατί έχουν συνδέσει τη δική τους ευτυχία με τη δική μου χαρά και επιτυχία. Τους αφιερώνω την παρούσα εργασία...

Στη μάνα μου  
και τον πατέρα μου...

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	9
Summary .....	11

### Εισαγωγή

1. Εισαγωγή στη βιολογία του νηματώδους <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	13
2. Ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος .....	15
3. Μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο..	17
4. Το φαινόμενο της θερμοπληξίας .....	21
5. Μηχανισμοί απόκρισης στο στρες .....	21
5.1. Το μονοπάτι απόκρισης στο στρες στο ER .....	23
5.2. Το μονοπάτι απόκρισης στο στρες στα μιτοχόνδρια .....	24
5.3. Το μονοπάτι απόκρισης στο στρες στα λυσοσώματα .....	24
5.4. Το μονοπάτι απόκρισης στο στρες μετά από βλάβη στο DNA .....	25
5.5 Μονοπάτι απόκρισης σε θερμικό σοκ .....	26
6. Η οικογένεια των sHSP .....	29
7. Το Golgi .....	30
8. Στόχος της διατριβής .....	30

### Υλικά και Μέθοδοι

Υλικά .....	33
Μέθοδοι .....	34
A) Μοριακή Βιολογία	
1. Απομόνωση γενωμικού DNA από τον <i>C. elegans</i> .....	34
2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA .....	35
3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	36
4. Απομόνωση ολικού mRNA και αντίδραση Real-Time PCR .....	37
5. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων <i>E. coli</i> .....	39
6. Δημιουργία διαγονιδιακών ζώων .....	39

7. Μέθοδος RNAi (RNA interference) .....	40
B) Γονιδιακές σειρές και στελέχη .....	41
Γ) Πλασμιδιακές κατασκευές .....	43
Δ) Ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό στρες και δοκιμασίες θανάτου .....	46
E) Μικροσκοπία .....	49

## Αποτελέσματα

1. Οι συνθήκες θερμοπληξίας (heat stroke) προκαλούν νέκρωση στον <i>C. elegans</i> .....	51
2. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ (heat shock response pathway) προστατεύει από τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από θερμοπληξία .....	54
3. Απώλεια της small heat shock protein HSP-16.1 οδηγεί σε καταστολή του προστατευτικού ρόλου της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ .....	56
4. Μελέτη του μεταγραφικού δικτύου που ρυθμίζει την ανθεκτικότητα σε συνθήκες θερμοπληξίας μετά την ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ .....	58
5. Η HSP-16.1 παρέχει προστασία έναντι του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου στο μοντέλο θερμοπληξίας του <i>C. elegans</i> .....	63
6. Η HSP-16.1 εντοπίζεται ειδικά στο μέσο Golgi (medial Golgi) .....	64
7. Τα επίπεδα κυτταροπλασματικού $Ca^{2+}$ επηρεάζονται διαφορετικά κατά τη θερμοπληξία και την προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ .....	66
8. Η παρεμπόδιση της λειτουργίας των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ομοιόσταση του ασβεστίου στο Golgi έχει διαφορετικό αποτέλεσμα στην επιβίωση μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας .....	68
9. Η προστατευτική δράση της υπερέκφρασης της <i>hsp-16.1</i> χάνεται παρουσία μεταλλαγμένου για το <i>pmr-1</i> γενετικού υπόβαθρου .....	73
10. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ καταστέλλει τη νέκρωση που προκαλείται από ποικίλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες .....	74

11. Ο HSF-1 απαιτείται για το προστατευτικό ρόλο του θερμικού σοκ .....	79
12. Η sHSP HSP-16.1 είναι υπεύθυνη για τον προστατευτικό ρόλο του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ έναντι της νέκρωσης που προκαλείται από τοξικά κανάλια .....	80
13. Η HSP-16.1 ελέγχει την απελευθέρωση ασβεστίου από το Golgi .....	82

## Συζήτηση

1. Σύνοψη αποτελεσμάτων και σχολιασμός καινοτομιών .....	85
2. Το φαινόμενο της θερμοπληξίας και η εισαγωγή του <i>C. elegans</i> ως μοντέλου για τη μελέτη του .....	87
3. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ είναι ένας ισχυρός καταστολέας της νέκρωσης .....	88
4. Η sHSP HSP-16.1, το Golgi και η αντλία ασβεστίου PMR-1 είναι νέα στοιχεία στον μοριακό μηχανισμό του νεκρωτικού θανάτου .....	88
5. Ο <i>C. elegans</i> ως πλατφόρμα για την αναζήτηση πολυμορφισμών και φαρμάκων που τροποποιούν την απόκριση σε ακραία θερμοκρασία .....	92
6. Η δυναμική της ενεργοποίησης των ενδογενών μονοπατιών απόκρισης στο στρες .....	93
7. Το κόστος της υπερ-ενεργοποίησης ενός μονοπατιού απόκρισης στο στρες .....	93

## Παράρτημα Α

Μέτρηση του ρυθμού πρωτεϊνσύνθεσης σε κυτταροειδικό επίπεδο στον *C. elegans*, *in vivo*

Περίληψη .....	96
Summary .....	97
Εισαγωγή .....	98
Πειραματική διαδικασία – Αποτελέσματα	
1. Προετοιμασία διαγονιδιακών στελεχών .....	101
2. Συντήρηση και καλλιέργεια νηματωδών .....	101
3. Φωτο-απενεργοποίηση του φθορίζοντα μάρτυρα (photobleaching) και ανάκτηση του σήματος φθορισμού (recovery) .....	101



4. Ποσοτικοποίηση της εκπομπής φθορισμού και υπολογισμός του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης .....	102
5. Μέτρηση ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης σε νηματώδεις με έλλειψη στο γονίδιο <i>ife-2</i> .....	103
6. Κυτταρο- και ιστο-ειδική παρακολούθηση του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης.....	107
Συζήτηση .....	110

## **Παράρτημα Β**

Μελέτη του ρόλου της αποικοδόμησης μέσω πρωτεοσώματος σε ένα μοντέλο Parkinson's στον *C. elegans*

Περίληψη .....	113
Summary .....	114
Εισαγωγή .....	115
Υλικά και μέθοδοι	
1. Γονιδιακές σειρές και στελέχη .....	117
2. Δοκιμασίες νευροεκφυλισμού .....	117
Αποτελέσματα - Συζήτηση	
1. Η υπερέκφραση της πρωτεοσωμικής υπομονάδας PBS-5 καταστέλλει την απώλεια κυττάρων και τη δημιουργία συσσωματωμάτων στο μοντέλο Parkinson's του <i>C. elegans</i> .....	119
2. Η υπερέκφραση της πρωτεοσωμικής υπομονάδας PBS-5 δεν παρέχει προστασία έναντι του νευροεκφυλισμού που προκαλείται από το τοξικό κανάλι MEC-4(d) .....	122

<b>Βιβλιογραφία</b> .....	125
---------------------------	-----

<b>Δημοσιεύσεις</b> .....	148
---------------------------	-----

## Περίληψη

Ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος συμβάλλει στην παθογένεση πολλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών και άλλων παθολογικών καταστάσεων. Ωστόσο οι μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν τη νέκρωση δεν είναι πλήρως κατανοητοί.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ με τη μορφή επώασης των ζώων σε ελαφρώς αυξημένη θερμοκρασία, καταστέλλει ισχυρά το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο ο οποίος προκαλείται από ακραία περιβαλλοντική θερμοκρασία, σε ένα μοντέλο θερμοπληξίας στον *C. elegans*. Η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ βελτιώνει επίσης τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από την υπερδιέγερση των νευρώνων, καθώς και τη νέκρωση που προκαλείται από συνθήκες υποξίας στον *C. elegans*.

Το μονοπάτι απόκρισης στο θερμικό σοκ είναι ένα ισχυρά συντηρημένο πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης το οποίο ενεργοποιείται παρουσία συνθηκών στρες και ρυθμίζει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων τα οποία προστατεύουν τα κύτταρα από διάφορους παράγοντες στρες. Μεταλλαγές που επηρεάζουν την λειτουργία του παράγοντα του θερμικού σοκ 1 (Heat Shock Factor 1, HSF-1), ο οποίος είναι ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας που ενορχηστρώνει την απόκριση στο θερμικό σοκ, οδηγούν σε απώλεια του προστατευτικού ρόλου της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ. Αντίθετα, η υπερέκφραση του HSF-1 καταστέλλει το νευροεκφυλισμό.

Αναζητώντας πιθανούς παράγοντες που προάγουν την προστατευτική δράση της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ, ανακαλύψαμε ότι η πρωτεΐνη HSP-16.1 η οποία ανήκει στην οικογένεια των small heat shock protein (sHSP) είναι ικανή και αναγκαία για την προστασία από τη νέκρωση. Η HSP-16.1 ασκεί την προστατευτική της δράση με το να επηρεάζει την απελευθέρωση ασβεστίου από το οργανίδιο Golgi. Είναι ενδιαφέρον ότι η ειδική για το Golgi αντλία ασβεστίου *pmr-1* είναι απαραίτητη ώστε η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ να παρέχει τον προστατευτικό της ρόλο. Απώλεια της λειτουργίας της *pmr-1*

οδηγεί σε απώλεια της ικανότητας της υπερέκφρασης της *hsp-16.1* να προστατέψει από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο.

Τα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι στρατηγικές παρέμβασης βασισμένες στον επιλεκτικό χειρισμό της απόκρισης στο θερμικό σοκ είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε αποτελεσματική αντιμετώπιση του νεκρωτικού εκφυλισμού.

## Summary

Necrotic cell death contributes to the pathogenesis of many neurodegenerative diseases and other pathological situations. However, the molecular mechanisms underlying necrosis are not fully understood.

We find that activation of the heat shock response pathway by means of heat preconditioning strongly suppresses necrotic cell death triggered by extreme environmental conditions in a model of heat stroke in *C. elegans*. Heat preconditioning also ameliorates excitotoxic neuronal death as well as necrosis caused by hypoxia, in *C. elegans*.

The heat shock response is a highly conserved gene expression program, which is engaged under conditions of stress and coordinates expression of specific genes that protect cells against various stressors. Removal of the heat shock factor 1 (HSF-1), the master transcription regulator which orchestrates the heat shock response, abolishes the protective effect of heat preconditioning. By contrast, overexpression of HSF-1 suppresses neurodegeneration.

While screening for potential mediators of the protective effect of heat preconditioning, we found that the small heat shock protein HSP-16.1 is both necessary and sufficient for protection against necrosis. HSP-16.1 exerts its protective effect by modulating calcium release from the Golgi apparatus. Interestingly, the Golgi specific  $\text{Ca}^{2+}$  pump *pmr-1* is required for heat preconditioning to elicit its protective effect. Loss of *pmr-1* function abolishes the capacity of *hsp-16.1* overexpression to protect against necrotic cell death.

Our findings suggest that intervention strategies based on selective manipulation of the heat shock response may effectively counter excitotoxicity and neurodegeneration.

## **Εισαγωγή**

## 1. Εισαγωγή στη βιολογία του νηματώδους *Caenorhabditis elegans*.

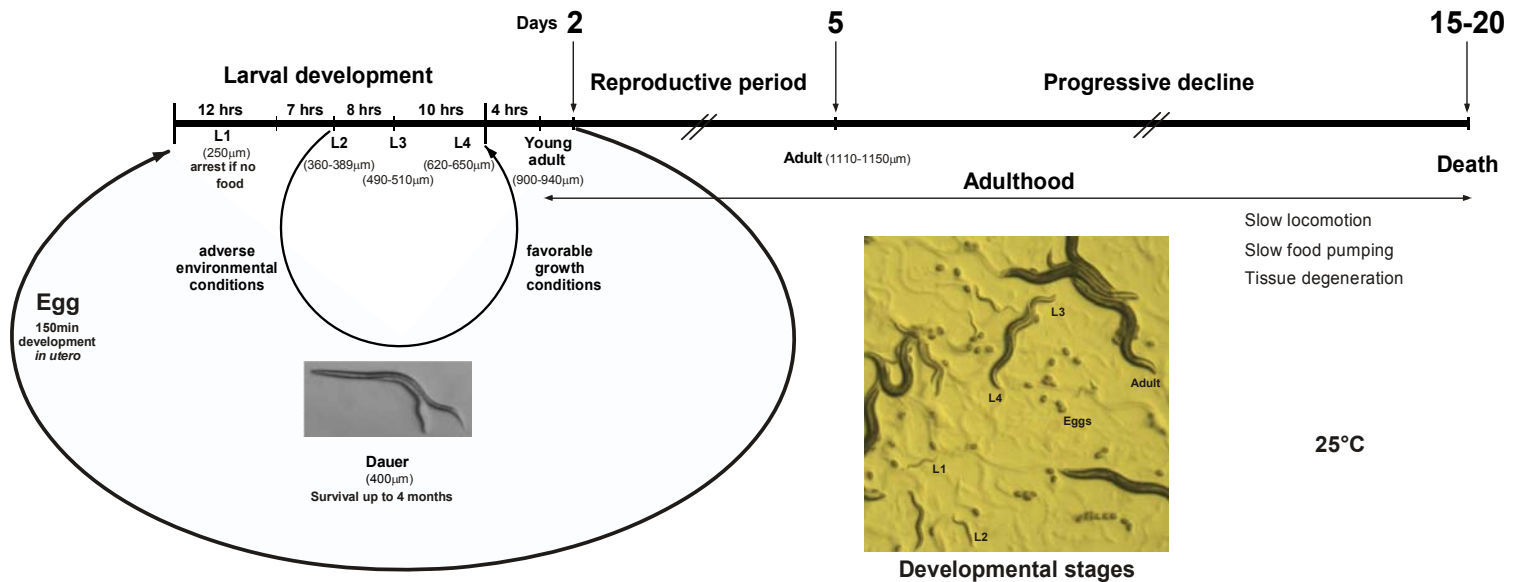
Ο *C. elegans* είναι ένας μικρός σε μέγεθος (περίπου 1.3 mm σε μήκος και 100 μm σε διάμετρο), μη-παρασιτικός, νηματώδης σκώληκας ο οποίος απαντάται στο χώμα. Από την εισαγωγή του ως οργανισμός μοντέλο από τον Sydney Brenner το 1974, ο *C. elegans* έχει αποτελέσει πολύτιμο εργαλείο στη βιοϊατρική έρευνα (Brenner, 1974a). Ισχυρό πλεονέκτημα του *C. elegans* ως οργανισμού μοντέλου αποτελεί η ευκολία χειρισμού του οργανισμού με μεθόδους γενετικής. Το μικρό του μέγεθος και οι απλές διατροφικές του απαιτήσεις (τρέφεται με το βακτήριο *Escherichia coli* σε στερεές καλλιέργειες σε τρυβλία αλλά και σε υγρές καλλιέργειες), επιτρέπουν την εύκολη και οικονομική του ανάπτυξη στο εργαστήριο. Ο νηματώδης ολοκληρώνει τον αναπαραγωγικό του κύκλο σε 2.5 μέρες στους 25°C και αναπτύσσεται μέσα από 4 στάδια λάρβας (L1-4) φθάνοντας στο ενήλικο άτομο το οποίο εναποθέτει αυγά, αποτελείται από 959 κύτταρα και ζει περίπου 2-3 εβδομάδες (Εικόνα 1). Παρουσία μη-ιδανικών συνθηκών όπως στρες και έλλειψη τροφής, ο νηματώδης από το δεύτερο στάδιο λάρβας (L2) εισέρχεται σε ένα ειδικό αναπτυξιακό στάδιο που ονομάζεται *dauer* κατά το οποίο το ζώο κινείται αλλά δεν τρέφεται. Σε αυτή την ανθεκτική μορφή τα ζώα μπορούν να επιζήσουν για εβδομάδες, ακόμα και για μήνες. Όταν η *dauer* λάρβα συναντήσει ευνοϊκές συνθήκες, εισέρχεται στο τέταρτο στάδιο λάρβας και ολοκληρώνει τον κύκλο ζωής. Η ικανότητα του *C. elegans* να αναπαράγεται με αυτογονιμοποίηση δίνει τη δυνατότητα παραγωγής γενετικά ομοιογενών πληθυσμών. Γονείς που έχουν υποστεί μεταλλαξογένεση δίνουν ομόζυγα μεταλλαγμένα άτομα στην F2 γενιά. Αρσενικά άτομα εμφανίζονται σε μικρό ποσοστό στον πληθυσμό (~0.1%) και μέσω της δυνατότητάς τους να διασταυρώνονται με τα ερμαφρόδιτα, διευκολύνουν τους γενετικούς χειρισμούς. Σύγχρονες μέθοδοι αλληλούχισης του γονιδιώματος, το οποίο είναι οργανωμένο σε έξι χρωμοσώματα (πέντε αυτοσωμικά και ένα φυλετικό X) επιτρέπουν το γρήγορο χαρακτηρισμό των μεταλλαγών (Doitsidou et al., 2010). Λεπτομερή πρότυπα έκφρασης πολλών γονιδίων και χάρτες οι οποίοι περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών έχουν κατατεθεί σε βάσεις δεδομένων και είναι προσβάσιμες από κάθε ενδιαφερόμενο (Boulton et al., 2002; Matthews et al., 2001; Walhout et al., 2000).

Επίσης, ο *C. elegans* επιτρέπει τη μελέτη του γονιδιώματος με μεθόδους αντίστροφης γενετικής (reverse genetics). Η μέθοδος σίγισης γονιδίων μέσω δίκλωνου RNA (Double Stranded RNA interference-dsRNAi) επιτρέπει τη γρήγορη αξιολόγηση της λειτουργίας γονιδίων (Kamath and Ahringer, 2003; Tavernarakis et al., 2000). Διαγονιδιακά ζώα για λειτουργικές και γενετικές δοκιμασίες μπορούν εύκολα να δημιουργηθούν με μικροενέση (Rieckher et al., 2009).

Κατά τη διάρκεια της σύντομης ιστορίας του ο *C. elegans* έχει αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη βασικών βιολογικών φαινομένων. Ο νηματώδης αποτελεί πολύ καλό μοντέλο για τη μελέτη του κυτταρικού θανάτου, προγραμματισμένου και μη, σε κυτταρικό, γενετικό και μοριακό επίπεδο. Ο απλός σχεδιασμός του σώματος του ζώου, το διαφανές αυγό και η επιδερμίδα και το σταθερό πρόγραμμα ανάπτυξης του ζώου επιτρέπουν την μελέτη της απώλειας κυττάρων είτε λόγω προγραμματισμένου θανάτου, είτε λόγω παθολογικών αιτιών. Μελέτη του χάρτη κυτταρικής γενεαλογίας έδειξε ότι ορισμένα κύτταρα πεθαίνουν σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο με επαναλαμβανόμενο τρόπο. Ακριβώς 131 σωματικά κύτταρα πεθαίνουν με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) καθώς το γονιμοποιημένο αυγό αναπτύσσεται σε ενήλικο άτομο. Το απλό νευρικό σύστημα του *C. elegans* αποτελείται από 302 νευρώνες. Ο χάρτης των συναπτικών συνδέσεων έχει χαρτογραφηθεί πλήρως με μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (White et al., 1976).

Τα γονίδια του νηματώδη και τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια είναι ισχυρά συντηρημένα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης και περισσότερο από το 50% των γονιδίων του νηματώδη είναι ομόλογα με ανθρώπινα γονίδια. Εκτός από τη πολύτιμη συμβολή του *C. elegans* στη μελέτη των μηχανισμών ανάπτυξης, ο νηματώδης έχει αποτελέσει πλατφόρμα για τη μοντελοποίηση πολλών ανθρώπινων παθολογικών καταστάσεων, όπως οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, ο καρκίνος, η γήρανση και οι σχετιζόμενες με αυτή ασθένειες (Baumeister and Ge, 2002; Kenyon, 2005). Με τη μελέτη γενετικών αλληλεπιδράσεων και των σηματοδοτικών μονοπατιών στον απλό οργανισμό *C. elegans* είναι δυνατόν να κατανοηθούν περίπλοκες παθολογικές καταστάσεις στον άνθρωπο (Bussey et al., 2006). Επίσης, η έκφραση στο σκουλήκι ανθρώπινων γονιδίων για τα οποία δεν υπάρχουν ομόλογα στο

νηματώδη έχει επιτρέψει την καλύτερη κατανόηση μοριακών μηχανισμών ανθρώπινων ασθενειών. Ακόμη, η ευκολία δοκιμής σε μεγάλη κλίμακα φαρμάκων στο σκουλήκι, έχει καταστήσει τον *C. elegans* ως μια πλατφόρμα γρήγορης δοκιμής και αξιολόγησης φαρμάκων και φαρμακευτικών στόχων (Kaletta and Hengartner, 2006).



**Εικόνα 1. Ο κύκλος ζωής του *Caenorhabditis elegans* στους 25°C.** Η διάρκεια κάθε σταδίου απεικονίζεται σε ώρες. Το μήκος του σώματος κάθε αναπτυξιακού σταδίου δίνεται σε παρένθεση. Στην ένθετη φωτογραφία απεικονίζονται τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια όπως φαίνονται με τη χρήση στερεοσκοπίου.

## 2. Ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος

Ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να προκληθεί από διάφορους εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες. Ένα από τα πιο καλά μελετημένα παραδείγματα μη-προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στον *C. elegans* είναι ο νεκρωτικός θάνατος που προκαλείται από την έκφραση τοξικών καναλιών τα οποία φέρουν μεταλλαγές που τροποποιούν την ενεργότητα των καναλιών (Syntichaki and Tavernarakis, 2003). Για παράδειγμα, επικρατείς μεταλλαγές στο γονίδιο *deg-1* (*degenerin*; *deg-1(d)*) προκαλούν το θάνατο κάποιων ενδιάμεσων νευρώνων στο σύστημα αίσθησης στο οπίσθιο τμήμα του ζώου (Chalfie and Wolinsky, 1990). Με παρόμοιο μηχανισμό, επικρατείς μεταλλαγές στο γονίδιο *mec-4*

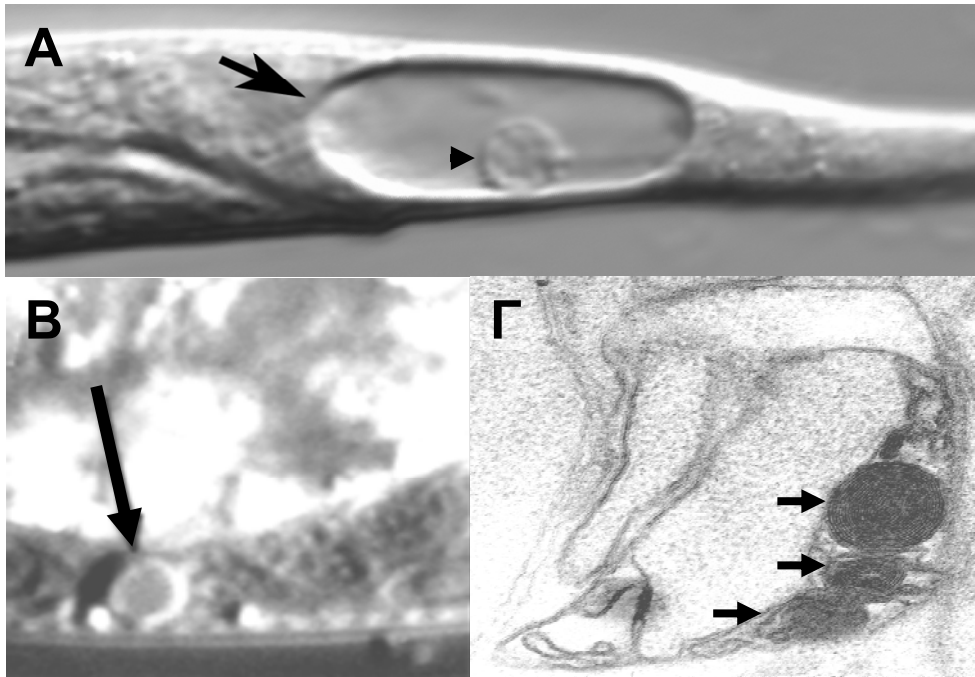


(*mechanosensory; mec-4(d)*), προκαλούν εκφυλισμό των έξι νευρώνων που είναι υπεύθυνοι για την αίσθηση ήπιων μηχανικών ερεθισμάτων (Syntichaki and Tavernarakis, 2004). Το MEC-4 λειτουργεί ως η κύρια μονάδα σε ένα σύμπλοκο που αποτελείται από πολλές υπομονάδες και συνιστούν ένα κανάλι  $\text{Na}^+$  το οποίο ενεργοποιείται με μηχανικό τρόπο. Μεταλλαγές οι οποίες προκαλούν αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του καναλιού, αυξάνουν τη διαπερατότητά του και οδηγούν σε εκφυλισμό μέσω νέκρωσης (Gessmann et al., 2010).

Ο θάνατος του κυττάρου μέσω νέκρωσης συνοδεύεται από διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά (Hall et al., 1997). Κατά την αρχική φάση θανάτου, ο πυρήνας και το κυτταρικό σώμα παραπιοούνται. Σταδιακά, το κύτταρο φουσκώνει αρκετές φορές σε σχέση με τη φυσιολογική του διάμετρο. Με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διακρίνονται χαρακτηριστικές αλλαγές στα κύτταρα που πεθαίνουν με νέκρωση, όπως η παρουσία ηλεκτρονιόπυκνων δομών οι οποίες φαίνεται να έχουν προέλευση από την κυτταρική μεμβράνη (Εικόνα 2).

Τα γονίδια *deg-1* και *mec-4* είναι τα πρώτα μέλη της οικογένειας των *degenerins* που περιγράφηκαν στον *C. elegans* και πήραν το όνομά τους λόγω του ότι ορισμένα μέλη στη μεταλλαγμένη τους μορφή προκαλούν νέκρωση στα κύτταρα που τα εκφράζουν (Chalfie et al., 1993). Οι *degenerins* παρουσιάζουν ομολογία με τα επιθηλιακά κανάλια νατρίου (epithelial sodium channel, ENaCs) στον άνθρωπο. Η ιοντική ανισορροπία και ο επακόλουθος νεκρωτικός θάνατος που προκαλείται από την ανώμαλη λειτουργία ιοντικών καναλιών στον *C. elegans* έχει μηχανιστικές και μορφολογικές ομοιότητες με το θάνατο νευρώνων από υπερδιέγερση στα σπονδυλωτά (excitotoxicity). Ο θάνατος από υπερδιέγερση είναι συνήθης κατά το εγκεφαλικό όπου η ενέργεια που απαιτείται για τη διατήρηση της ιοντικής κλίση και του δυναμικού ηρεμίας χάνεται. Καθώς το δυναμικό μεμβράνης καταρρέει, μεγάλες ποσότητες του νευροδιαβιβαστή γλουταμικού απελευθερώνονται στις συνάψεις (Kauppinen et al., 1988). Επίσης, η απώλεια ενέργειας εμποδίζει την επαναπρόσληψη του γλουταμικού από ειδικούς μεταφορείς, οδηγώντας σε συσσώρευση του νευροδιαβιβαστή στις συνάψεις, υπερδιέγερση και τελικά νέκρωση των νευρώνων που συνδέονται στις συνάψεις αυτές. Ο θάνατος από

υπερδιέγερση εξαρτάται από την εισροή  $Ca^{2+}$  από ιοντικά κανάλια που ενεργοποιούνται από το γλουταμικό.



**Εικόνα 2. Μορφολογία του κυτταρικού θανάτου στον *C. elegans*.** Οι νευρώνες των νηματωδών που πεθαίνουν με νέκρωση ως αποτέλεσμα της υπερλειτουργίας ιοντικών καναλιών της οικογένειας των *degenerins* εμφανίζουν μορφολογικές διαφορές σε σχέση με τα αποπτωτικά κύτταρα. (Α) Ένα νεκρωτικό κύτταρο (βέλος) εμφανίζεται εξαιρετικά διογκωμένο, ενώ ο πυρήνας εμφανίζεται διεσταλμένος και έχει παραμορφωμένη όψη (κεφαλή βέλους). (Β) Η απόπτωση η οποία συμβαίνει φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, δημιουργεί συμπυκνωμένα κυτταρικά «πτώματα» μικρού μεγέθους τα οποία έχουν χαρακτηριστική μορφή κουμπιού (βέλος). (Γ) Χαρακτηριστικές ηλεκτρονιόπυκνες μεμβρανικές δομές (βέλη) οι οποίες συνοδεύουν την καταστροφή του κυττάρου λόγω νέκρωσης, όπως φαίνονται με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Hall et al., 1997). Παρόμοιες κυτταρικές δομές παρατηρούνται σε νευρώνες αρουραίου οι οποίοι πεθαίνουν λόγω υπερδιέγερσης (Rothstein et al., 1996)

### 3. Μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο

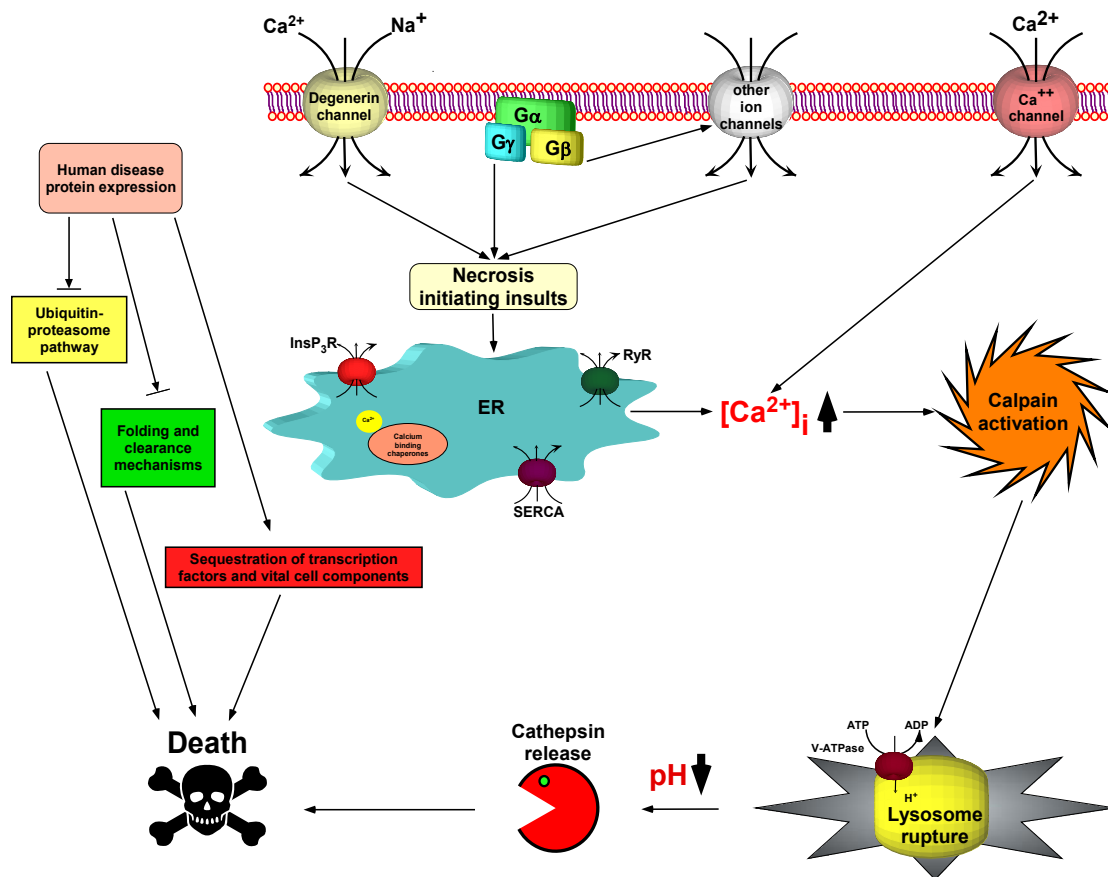
Εκτεταμένη ενεργοποίηση των ιοντικών καναλιών οδηγεί σε διαταραχή της κυτταρικής ιοντικής ισορροπίας. Αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού  $Ca^{2+}$  μέσω διαφόρων πηγών, θεωρείται ένα από τα

πρωταρχικά βήματα στο νεκρωτικό μονοπάτι (Εικόνα 3). Το  $\text{Ca}^{2+}$  μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο μέσω τασηο-ελεγχόμενων καναλιών και του ιοντοανταλλάκτη  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Μεταλλαγές που αυξάνουν την εισροή  $\text{Na}^+$ , διευκολύνουν την είσοδο  $\text{Ca}^{2+}$  μέσω αυτών των μονοπατιών. Μια από τις κύριες αποθήκες  $\text{Ca}^{2+}$  στο κύτταρο είναι το ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmic reticulum, ER) (Mattson et al., 2000). Το ασβέστιο συσσωρεύεται στο ER μέσω της αντλίας SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase) και απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα μέσω των καναλιών που ενεργοποιούνται από ryanodine (RyR) και inositol-1,4,5-triphosphate ( $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3\text{PR}$ ). Γενετικοί έλεγχοι για τον εντοπισμό καταστολέων της νέκρωσης που προκαλείται από το τοξικό κανάλι *mec-4(d)* οδήγησαν στον εντοπισμό πολλών γονιδίων που συμμετέχουν στην εκτέλεση του νεκρωτικού θανάτου. Οι πρωτεΐνες calreticulin και calnexin δεσμεύουν ασβέστιο, ρυθμίζουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου και εμπλέκονται στην εκτέλεση του νεκρωτικού θανάτου (Xu et al., 2001). Φαρμακολογικές ή γενετικές παρεμβάσεις που εμποδίζουν την απελευθέρωση του ασβεστίου από το ER, έχουν προστατευτικό ρόλο.

Γενετικές μελέτες στον *C. elegans* έχουν δείξει ότι το ενδοκυττάριο pH είναι σημαντικός ρυθμιστής του νεκρωτικού θανάτου. Όξινη του κυτταροπλάσματος προκαλείται κατά τη διάρκεια της νέκρωσης, ενώ η αντλία πρωτονίων vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase (Syntichaki et al., 2005), η οποία απαιτείται για την όξινη του λυσοσώματος και άλλων οργανιδίων, είναι απαραίτητη για τη νέκρωση, σε ένα βήμα μετά την αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στο κυτταροπλάσμα. Παρεμπόδιση της λειτουργίας της vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase ή αλκαλοποίηση του λυσοσώματος με ασθενείς βάσεις, έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της νέκρωσης. Το όξινο περιβάλλον απαιτείται για την πλήρη ενεργότητα των cathepsins (πρωτεάσες ασπαρτικού) που εντοπίζονται στα λυσοσώματα και σε άλλα όξινα ενδοσωμικά διαμερίσματα (Ishidoh and Kominami, 2002).

Οι πρωτεάσες του λυσοσώματος αλλά και του κυτταροπλάσματος έχουν εμπλακεί στην καταστροφή του κυττάρου μετά την έναρξη της νέκρωσης. Οι calpains είναι κυτταροπλασματικές πρωτεάσες κυστεΐνης, οι οποίες εξαρτώνται από το ασβέστιο για τη λειτουργία τους. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι calpains συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια και

μεταβολικές διεργασίες. Κατά τη διάρκεια της νέκρωσης όμως, οι πρωτεάσες αυτές εντοπίζονται στις μεμβράνες των λυσοσωμάτων και συμμετέχουν στη λύση των μεμβρανών, οδηγώντας σε απελευθέρωση του όξινου περιεχομένου των λυσοσωμάτων στο κυτταρόπλασμα (Yamashima, 2004). Στα πρωτεύοντα, οι calpains εντοπίζονται στις λυσοσωμικές μεμβράνες αμέσως μετά την έναρξη του ισχαιμικού επεισοδίου (Yamashima, 2000). Στον *C. elegans*, δυο calpains –TRA-3 και CLP-1– και δυο cathepsin –ASP-3 και ASP-4– είναι απαραίτητες για το νευροεκφυλισμό (Syntichaki et al., 2002). Μεταλλαγές που παρεμβαίνουν στη βιογένεση και τη λειτουργία των λυσοσωμάτων επηρεάζουν το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Για παράδειγμα, ο νεκρωτικός θάνατος επιδεινώνεται σε μεταλλαγμένα ζώα τα οποία συσσωρεύουν μη-φυσιολογικά μεγάλα λυσοσώματα, ενώ παρεμπόδιση της βιογένεσης των λυσοσωμάτων προστατεύει από τη νέκρωση (Artal-Sanz et al., 2006b). Είναι ενδιαφέρον ότι τα λυσοσώματα συσσωρεύονται γύρω από τον πυρήνα και μεγεθύνονται κατά το πρώιμο και ενδιάμεσο στάδιο της νέκρωσης. Σε προχωρημένο στάδιο νέκρωσης το σήμα από τις σημασμένες με GFP λυσοσωμικές μεμβράνες χάνεται, υποδεικνύοντας λύση των μεμβρανών.



**Εικόνα 3. Το μονοπάτι του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου στον *C. elegans*.** Ποικίλα σήματα που προκαλούν νέκρωση συγκλίνουν στο να προκαλέσουν μια απότομη αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού ασβεστίου το οποίο είναι το κυρίαρχο σήμα για την έναρξη του θανάτου. Ενδοκυττάρειες αποθήκες ασβεστίου συμμετέχουν επίσης στην αύξηση της συγκέντρωσης πάνω από το επιτρεπτό όριο. Τα κανάλια και τα μόρια που συμμετέχουν στην ομοιόσταση του ασβεστίου απεικονίζονται. Η αυξημένη συγκέντρωση ασβεστίου ενεργοποιεί κυτταροπλασματικές πρωτεάσες (calpains) οι οποίες διευκολύνουν τη λύση των λυσοσωμάτων και την απελευθέρωση του όξινου περιεχομένου στο κυτταρόπλασμα, το pH του οποίου μειώνεται. Η αντλία που ευθύνεται για την όξινση του λυσοσώματος είναι η V-ATPase. Το χαμηλό pH ευνοεί την ενεργοποίηση των πρωτεασών cathepsins οι οποίες συμμετέχουν στην καταστροφή του κυττάρου. Έκφραση ανθρώπινων παθολογικών πρωτεϊνών στον *C. elegans* επίσης διαταράσσει τους κυτταρικούς μηχανισμούς ομοιόστασης και επάγει στρες, το οποίο πάνω από ένα συγκεκριμένο όριο γίνεται καταστροφικό για το κύτταρο. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, κυτταροπλασματική συγκέντρωση ασβεστίου; ER, endoplasmic reticulum; G<sub>α</sub>, G<sub>β</sub>, G<sub>γ</sub>, G-protein subunits; InsP<sub>3</sub>R, inositol triphosphate receptor; RyR, ryanodine receptor; SERCA, sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase; V-ATPase, vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase)

#### 4. Το φαινόμενο της θερμοπληξίας

Τα τελευταία χρόνια η κλιματική αλλαγή έχει οδηγήσει σε αύξηση της συχνότητας και της έντασης των κυμάτων καύσωνα (Easterling et al., 2000; Ganguly et al., 2009). Οι ασθένειες που προκαλούνται από την υψηλή θερμοκρασία, αναμένεται να γίνουν σύντομα μια από τις κυριότερες αιτίες θνησιμότητας (Coris et al., 2004; Sharma, 2005). Η θερμοπληξία είναι μια σοβαρή ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από θερμοκρασία σώματος που ξεπερνά τους 40°C. Αυτή η κατάσταση σχετίζεται με ταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος και δυσλειτουργία πολλαπλών οργάνων (Bouchama and Knochel, 2002; Dematte et al., 1998). Η βλάβη που προκαλείται από τη θερμοπληξία είναι η συνιστώσα της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις επιπτώσεις της υπερθερμίας στη φυσιολογία του οργανισμού (ισχαιμία, υποξία και αυξημένη κατανάλωση ενέργειας), την φλεγμονή που προκαλείται και την άμεση κυτταροτοξικότητα λόγω θερμότητας (Bouchama et al., 1996a; Bouchama et al., 1996b; Buckley, 1972; Chang, 1993; Lin, 1997).

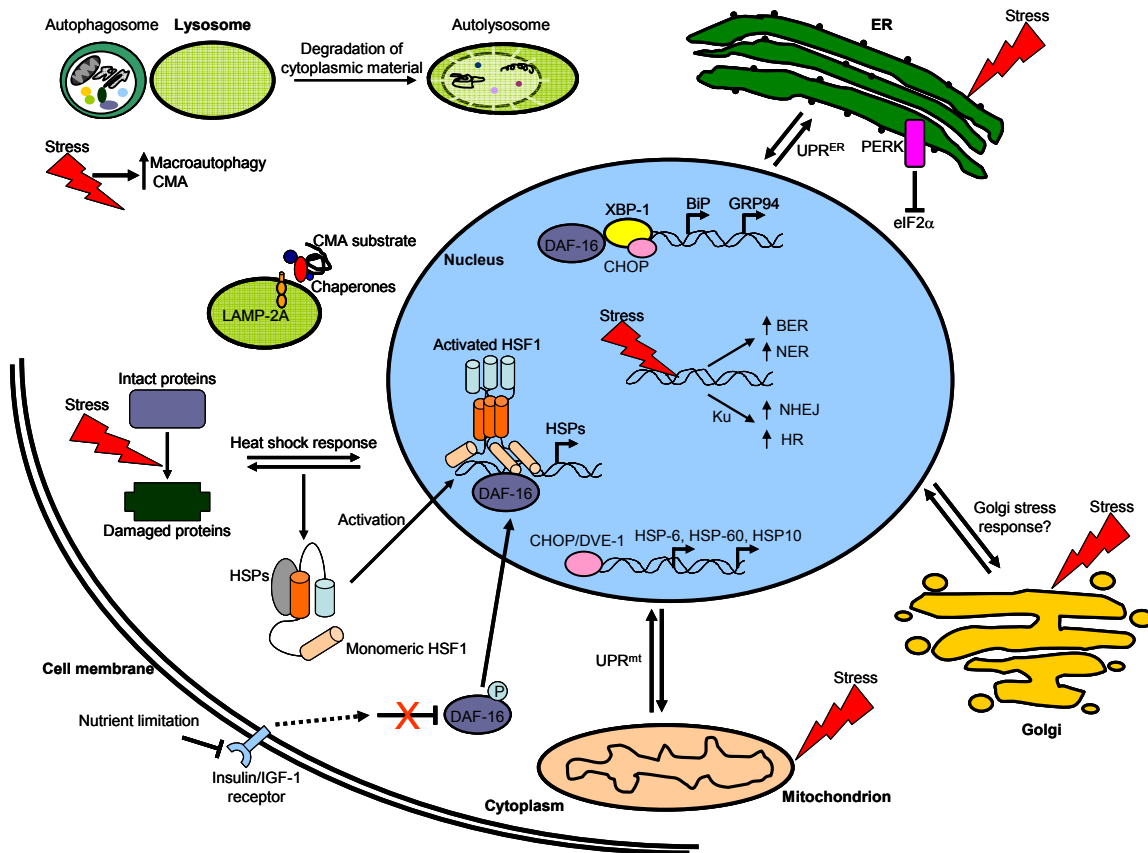
Παρόλο που η θερμοπληξία είναι συχνά θανάσιμη και οι επιζώντες μπορεί να φέρουν μόνιμη βλάβη του νευρικού συστήματος, οι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν σε βλάβη των κυττάρων και των ιστών λόγω υπερθερμίας, δεν έχουν διερευνηθεί ακόμα. Αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι δεν είναι διαθέσιμο κάποιο αξιόπιστο πειραματικό μοντέλο ώστε να μελετηθεί η επίπτωση της ακραίας θερμοκρασίας στο κύτταρο.

#### 5. Μηχανισμοί απόκρισης στο στρες

Ως στρες χαρακτηρίζεται κάθε επιβλαβής παράγοντας (φυσικός, χημικός ή βιολογικός) ο οποίος ενεργοποιεί μια σειρά βιολογικών γεγονότων που οδηγούν στην αποκατάσταση της κυτταρικής και οργανισμικής ομοιόστασης. Είναι ενδιαφέρον ότι έκθεση σε ήπιο στρες ενεργοποιεί τους ομοιοδυναμικούς μηχανισμούς του κυττάρου και έχει ευεργετική επίδραση στον οργανισμό. Το φαινόμενο αυτό καλείται όρμηση (*hormesis*) (Calabrese et al., 1987; Rattan, 2008).

Για να αντιμετωπίσουν τις συνθήκες στρες, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μια σειρά μηχανισμών απόκρισης στο στρες οι οποίοι δρουν σε γενικό επίπεδο ή με τρόπο ειδικό για οργανίδια (Εικόνα 4). Παρακάτω θα

παρουσιαστούν με συντομία οι κύριοι μηχανισμοί τους οποίους ενεργοποιεί το κύτταρο σε καταστάσεις στρες.



**Εικόνα 4. Γενικά και όργανο-ειδικά μονοπάτια απόκρισης στο στρες.** Ανάλογα με τον τύπο του μακρομορίου και το σημείο της βλάβης, διακριτά μονοπάτια απόκρισης στο στρες, όπως η αυτοφαγία, το μονοπάτι απόκρισης στο θερμικό σοκ, το UPR<sup>mt</sup>, το UPR<sup>ER</sup> και το μονοπάτι απόκρισης λόγω βλάβης στο DNA ξεκινούν τη σηματοδότηση. Για λόγους απλότητας, μόνο μέρη τα οποία έχουν μελετηθεί εκτεταμένα απεικονίζονται. Τα διπλά βέλη υποδηλώνουν αμφίδρομη επικοινωνία με τον πυρήνα, η οποία περιλαμβάνει τη δημιουργία του στρεσογόνου σιγνάλου, σε οργανίδιο ή στο κυτταρόπλασμα, τη μεταγωγή του σήματος στον πυρήνα και την παραγωγή πρωτεϊνών οι οποίες έχουν σκοπό να περιορίσουν τη βλάβη από το στρες. Παρόλο που ένα τυπικό μονοπάτι απόκρισης στο στρες σχετιζόμενο με το Golgi δεν έχει ακόμα περιγραφεί, το οργανίδιο αυτό έχει τη δυναμική να αλληλεπιδρά με τον πυρήνα και να επηρεάζει την κυτταρική ομοιοστάση. BER, base-excision repair; BiP, Ig binding protein; CHOP, C/EBP homologous protein; CMA, chaperone mediated autophagy; DAF-16, abnormal dauer formation 16; DVE-1, defective proventriculus 1; GRP94, glucose-regulated protein 94; HSF1, heat shock factor 1; HSP, heat shock protein; HR, homologous recombination; IGF-1, insulin growth factor 1; LAMP2A, lysosome-associated membrane protein 2A; NER, nucleotide-excision repair; NHEJ, non-homologous end joining; PERK,

PKR-like ER kinase; UPR<sup>ER/mt</sup>, unfolded protein response endoplasmic reticulum/mitochondrion; XBP-1, X-box binding protein 1.

### 5.1. Το μονοπάτι απόκρισης στο στρες στο ER

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) είναι το οργανίδιο όπου οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες, οι οποίες προορίζονται για έκκριση, ενσωμάτωση στην πλασματική μεμβράνη ή κατανομή στα διάφορα οργανίδια, αναδιπλώνονται και υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Στο περιβάλλον του ER υπάρχει συνωστισμός από πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αναδίπλωση άλλων πρωτεϊνών, τροποποιητικά ένζυμα καθώς και πρωτεΐνες στόχους (Stevens and Argon, 1999). Σε αυτό το επιρρεπές για συσσωμάτωση περιβάλλον, πολύπλοκοι μηχανισμοί ελέγχου εξασφαλίζουν τη σωστή μετάφραση και αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών καθώς και την αποικοδόμηση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών (Ellgaard and Helenius, 2003). Σαπερόνες και ανιχνευτές της δυναμικής της αναδίπλωσης στο ER βρίσκονται στο οργανίδιο αυτό, συμπεριλαμβανομένων των: Ig binding protein (BiP)/glucose-regulated protein 78 (GRP78), GRP94, calnexin, calreticulin και protein disulfide isomerase (PDI) (Naidoo, 2009).

Συνθήκες οι οποίες προκαλούν αυξημένα επίπεδα μετουσιωμένων πρωτεϊνών στο ER προκαλούν την έναρξη του μονοπατιού unfolded protein response (UPR<sup>ER</sup>). Η UPR<sup>ER</sup> βοηθά στην αποκατάσταση της λειτουργίας του ER, μέσω αύξησης της έκφρασης σαπερονών, παύσης της μετάφρασης, και αποικοδόμησης των μετουσιωμένων πρωτεϊνών (Hampton, 2000; Kaufman, 1999; Prostko et al., 1993). Σε συνθήκες όπου η ομοιόσταση δεν επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα, η UPR<sup>ER</sup> ξεκινά απόπτωση (Szegezdi et al., 2006). Η σηματοδότηση της UPR<sup>ER</sup> περιλαμβάνει τρεις διαμεμβρανικούς υποδοχείς: τον inositol requiring element-1 (IRE-1), τον PKR-like ER kinase (PERK) και τον activating transcription factor 6 (ATF6). Η πρωτεΐνη BiP/GRP78 διατηρεί τους ανιχνευτές αυτούς σε ανενεργή μορφή. Όταν τα επίπεδα των μετουσιωμένων πρωτεϊνών αυξηθούν, η BiP/GRP78 αποδεσμεύεται από τις παραπάνω πρωτεΐνες προκειμένου να βοηθήσει την αναδίπλωση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Η ενεργοποιημένη PERK φωσφορυλιώνει τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF2α, εμποδίζοντας τη σύνθεση νέων



πρωτεϊνών να επιβαρύνει το μη-λειτουργικό περιβάλλον του ER. Η ενεργοποιημένη ATF6 μετακινείται στο Golgi όπου γίνεται υπόστρωμα για πρωτεάσες και δημιουργεί ένα μεταγραφικό παράγοντα μεγέθους 50kDa, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα και ξεκινά τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για σαπερόνες του ER όπως οι BiP, PDI and GRP94 (Yoshida et al., 1998). Η ενεργοποίηση της IRE-1 οδηγεί στην ενεργοποίηση της X-box binding protein 1 (XBP-1). Ο ενεργοποιημένος XBP-1 παράγοντας αυξάνει την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην ομοίωση του ER καθώς και στην έξοδο και αποικοδόμηση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών (Calfon et al., 2002; Lee et al., 2003; Yoshida et al., 2003; Yoshida et al., 2001).

## 5.2. Το μονοπάτι απόκρισης στο στρες στα μιτοχόνδρια

Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες, την επιτάχυνση της γήρανσης, την απόπτωση, τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και άλλες παθολογικές καταστάσεις. Η μήτρα των μιτοχονδρίων περιέχει ειδικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην είσοδο, την αναδίπλωση και εμποδίζουν τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το DNA του πυρήνα αλλά και το mtDNA. Οι βασικές πρωτεΐνες απόκρισης στο στρες του μιτοχονδρίου είναι η HSP60, η mtHSP70, η HSP10, η mtGrpE και η mtDnaJ. Διατάραξη του περιβάλλοντος αναδίπλωσης στα μιτοχόνδρια επάγει την mitochondrial unfolded response (UPR<sup>mt</sup>) μέσω της οποίας επάγεται η έκφραση πυρηνικών γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν για σαπερόνες των μιτοχονδρίων (Kuzmin et al., 2004; Yoneda et al., 2004; Zhao et al., 2002). Η UPR<sup>mt</sup> περιλαμβάνει τους μεταγραφικούς παράγοντες CHOP και C/EBPβ (Zhao et al., 2002). Παρουσία πρωτεοτοξικών συνθηκών, η CLPP-1, η πρωτεολυτική υπομονάδα της μιτοχονδριακής πρωτεάσης Clp, δημιουργεί πεπτίδια τα οποία μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα μέσω του ABC μεταφορέα HAF-1. Η ενεργοποίηση της UPR<sup>mt</sup> σχετίζεται με τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ των πρωτεϊνών UBL-5 και DVE-1 και μετακίνηση του συμπλόκου αυτού στον πυρήνα. Η UPR<sup>mt</sup> επάγει επίσης τη μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα ZC376.7 στον πυρήνα (Benedetti et al., 2006; Haynes et al., 2007; Haynes et al., 2010).

## 5.3. Το μονοπάτι απόκρισης στο στρες στα λυσοσώματα

Η αυτοφαγία είναι μια από τις κύριες διαδικασίες για τη γενική και ειδική αποικοδόμηση κυτταρικών στοιχείων συμπεριλαμβανομένων ολόκληρων οργανιδίων και πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Τα φορτία που προορίζονται για αποικοδόμηση μεταφέρονται στα λυσοσώματα όπου και ανακυκλώνονται. Τρεις κύριοι τύποι αυτοφαγίας έχουν περιγραφεί: η μακροαυτοφαγία (macroautophagy), η μικροαυτοφαγία (microautophagy) και η αυτοφαγία που εκτελείται από σαπερόνες (chaperone mediated autophagy, CMA) (Cuervo, 2004; Mizushima et al., 2008). Κατά την μακροαυτοφαγία, ποσότητες του κυτταροπλάσματος εγκλείονται σε αυτοφαγικά κυστίδια που ονομάζονται αυτοφαγοσώματα. Το αυτοφαγόσωμα ενώνεται με το δευτερογενές λυσόσωμα και σχηματίζει το αυτολυσόσωμα, όπου υδρολάσες αποικοδομούν το έγκλειστο υλικό (Yorimitsu and Klionsky, 2005). Στην μικροαυτοφαγία, η οποία είναι λιγότερο χαρακτηρισμένη, η λυσοσωμική μεμβράνη αναδιπλώνεται και εγκοιλώνει το κυτταροπλασματικό υλικό (Marzella et al., 1981). Η CMA είναι μια πολύ επιλεκτική μορφή αυτοφαγίας που απαιτεί ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης πριν την είσοδο στο λυσόσωμα για αποικοδόμηση (Cuervo, 2010; Dice, 2007). Παρόλο που ένα βασικό επίπεδο μακροαυτοφαγίας και CMA παρατηρείται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, αυτά τα μονοπάτια ενεργοποιούνται κατά το μέγιστο υπό συνθήκες στρες. Ανάλυση ποντικών στα οποία εξαλείφονται σε ιστο-ειδικό επίπεδο γονίδια αυτοφαγίας, έδειξε ότι η ικανότητα ελέγχου του ρυθμού αποικοδόμησης του ενδοκυττάριου περιεχομένου σε απόκριση στο στρες ή σε περιβάλλον με περιορισμένη παροχή θρεπτικών υλικών, είναι ζωτικής σημασίας για την κυτταρική και οργανισμική επιβίωση (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Komatsu et al., 2005; Nakai et al., 2007).

#### **5.4. Το μονοπάτι απόκρισης στο στρες μετά από βλάβη στο DNA**

Σε αντίθεση με τα περισσότερα βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια τα οποία μπορούν να ανακυκλωθούν αρκετές φορές κατά τη διάρκεια της ζωής ενός κυττάρου, το DNA δεν μπορεί να ανασυντεθεί από την αρχή ώστε να εξαλειφθεί η βλάβη. Αντί αυτού, τα κύτταρα διατηρούν πολύπλοκους μηχανισμούς διατήρησης του γονιδιώματος. Βλάβη στο DNA μπορεί να προκληθεί από UV ακτινοβολία αλλά και από ενδογενή τοξικά παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού όπως οι ελεύθερες ρίζες, ή τυχαίες χημικές

αντιδράσεις όπως η υδρόλυση (De Bont and van Larebeke, 2004; Hoeijmakers, 2009; Lindahl, 1993).

Η μηχανή διατήρησης του γονιδιώματος αποτελείται από πολλά πολύπλοκα επιδιορθωτικά μονοπάτια κάθε ένα από τα οποία στοχεύει μια ειδική κατηγορία κυτταρικής βλάβης (Hoeijmakers, 2009). Το μονοπάτι base-excision repair (BER), απομακρύνει μικρές βλάβες στο DNA όπως οι οξειδωμένες βάσεις, οι οποίες επηρεάζουν μόνο τη μια αλυσίδα (Barnes and Lindahl, 2004; Caldecott, 2008). Η συμπληρωματική αλυσίδα χρησιμεύει ως καλούπι για την επιδιόρθωση.

Το μονοπάτι nucleotide excision repair (NER) είναι μια διαδικασία πολλών βημάτων που περιλαμβάνει πολυάριθμες πρωτεΐνες και στοχεύει τις βλάβες που διαταράσσουν τη δομή της έλικας, οι οποίες προκαλούνται από ακτινοβολία UV και καρκινογόνες ουσίες (Hanawalt, 2002). Το NER περιλαμβάνει δυο υπο-μονοπάτια: το global-genome NER (GG-NER) το οποίο ελέγχει το γονιδίωμα για διαταραχές της αλυσίδας (Gillet and Scharer, 2006; Sugasawa, 2006) και το transcription-coupled NER (TC-NER) το οποίο απομακρύνει τις βλάβες που εμποδίζουν την επιμήκυνση της μεταγραφής (Fousteri and Mullenders, 2008).

Τα σπασίματα της διπλής έλικας του DNA (double-strand breaks, DSBs) είναι η πιο σοβαρή μορφή βλάβης του DNA. Τα DSBs διορθώνονται μέσω της διαδικασίας non-homologous end joining (NHEJ), η οποία ενώνει απλώς δυο άκρα DNA με μεγάλη πιθανότητα μεταλλαξογένεσης και απώλειας της πληροφορίας, ή μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού κατά τον οποίο χρησιμοποιείται η άθικτη αδελφή χρωματίδα σαν καλούπι για την αντιγραφή της πληροφορίας που λείπει και τη συμπλήρωση των σπασμένων άκρων με τρόπο που αποφεύγονται τα λάθη.

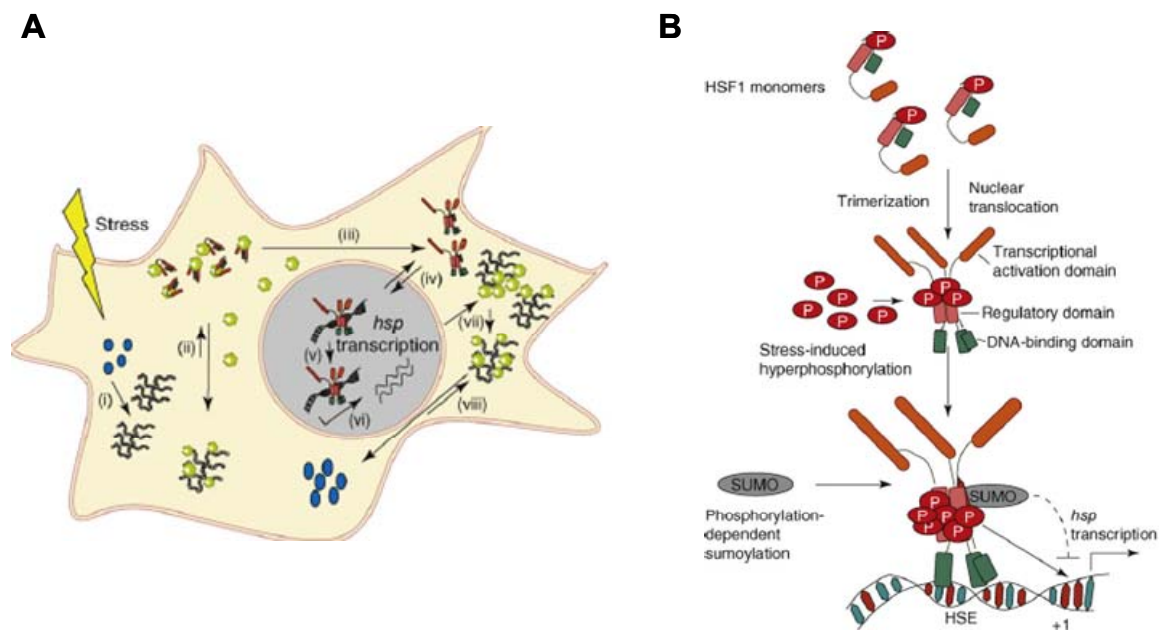
### **5.5 Μονοπάτι απόκρισης σε θερμικό σοκ**

Το μονοπάτι απόκρισης σε θερμικό σοκ ενεργοποιείται παρουσία διαφόρων παραγόντων στρες (θερμότητα, οξειδωτικό στρες, βαρέα μέταλλα) και οδηγεί στην αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs), οι οποίες προστατεύουν από μια ποικιλία κυτταροτοξικών συνθηκών (Lindquist and Craig, 1988; Morimoto, 1998; Morimoto, 2008). Οι HSPs κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σε πέντε κύριες

οικογένειες: μικρές HSPs (small Heat Shock Proteins, sHSPs), HSP60, HSP70, HSP90 και HSP100 (Hightower, 1991). Οι HSPs, σαν σαπερόνες, έγιναν αρχικά γνωστές ως πρωτεΐνες που συμβάλουν στη σωστή αναδίπλωση των πολυπεπτιδίων, βοηθούν τη μετακίνηση των πρωτεϊνών στα υποκυτταρικά διαμερίσματα και την αποκατάσταση της ομοιόστασης των πρωτεϊνών (πρωτεόσταση, proteostasis) (Bukau et al., 2006; Morano and Thiele, 1999). Η μεταγραφή των HSPs οργανώνεται από το μεταγραφικό παράγοντα heat shock factor 1 (HSF-1), έναν πολύ συντηρημένο παράγοντα με ευρεία έκφραση (Anckar and Sistonen, 2007; Morano and Thiele, 1999). Η οικογένεια HSF-1 των θηλαστικών αποτελείται από τέσσερα μέλη (HSF-1-4), ενώ η *Drosophila*, ο *C. elegans* και η ζύμη φέρουν μόνο ένα μέλος (Akerfelt et al., 2010; Anckar and Sistonen, 2007; Morimoto, 1998). Ο HSF-1 εκφράζεται διαρκώς ως μονομερές που δεν προσδένεται στο DNA έως ότου ενεργοποιηθεί παρουσία στρεσογόνων συνθηκών (Εικόνα 5). Τότε, ο HSF-1 δημιουργεί τριμερή και προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες γνωστές ως heat shock elements (HSEs) στους υποκινητές των HSPs. Ο HSF-1 υπόκειται σε πολλαπλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως φωσφορυλίωση (Guettouche et al., 2005; Holmberg et al., 2001; Kline and Morimoto, 1997; Knauf et al., 1996; Sorger and Pelham, 1988), σουμouλίωση (Anckar et al., 2006; Hietakangas et al., 2003) και ακετυλίωση (Westerheide et al., 2009). Όταν τα σήματα για την επαγωγή του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ εξασθενήσουν, ο HSF-1 επιστρέφει σε μονομερή μορφή και αλληλεπιδρά με τις HSP90, HSP70 και HSP40 (Abravaya et al., 1992; Shi et al., 1998; Zou et al., 1998). Σε αυτή τη μορφή ο HSF-1 παραμένει ανενεργός και το μονοπάτι τερματίζεται. Η αυστηρά ελεγχόμενη έναρξη, εκτέλεση και τερματισμός της απόκρισης στο στρες, μέσα από πολύπλοκες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών, τονίζει την ανάγκη για ακριβή ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ παρουσία στρεσογόνων συνθηκών.

Ο μοριακός μηχανισμός συμμετοχής των HSPs στην απόπτωση έχει περιγραφεί. Οι HSPs μπλοκάρουν τόσο το εξωγενές όσο και το ενδογενές μονοπάτι του αποπτωτικού θανάτου μέσω αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες σε κομβικά σημεία ελέγχου της απόπτωσης (Bruey et al., 2000; Chauhan et al., 2003; Garrido et al., 1999; Garrido et al., 2006; Mosser et al., 2000; Mosser

and Morimoto, 2004; Park et al., 2002; Park et al., 2001; Stankiewicz et al., 2005). Έκφραση των HSPs καταστέλλει το νεκρωτικό θάνατο σε διάφορα πειραματικά μοντέλα (Bao and Liu, 2009; Morrison et al., 2004; Oyake et al., 2006; Ray et al., 2001). Παρόλα αυτά, οι μοριακοί μηχανισμοί του προστατευτικού ρόλου των HSPs στη νέκρωση δεν είναι κατανοητοί.



**Εικόνα 5 Το μονοπάτι απόκρισης σε θερμικό σοκ είναι μια βαθμιδωτή διαδικασία. (A)**

(i) Η αυξημένη παρουσία μη-σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών παρουσία συνθηκών οι οποίες διαταράσσουν την ομοιόσταση των πρωτεϊνών (πρωτεόσταση, proteostasis) είναι το έναυσμα για την έναρξη της σηματοδότησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ (ii) Οι μη-σωστά αναδιπλωμένες αυτές πρωτεΐνες προσελκύουν τις HSPs οι οποίες βρίσκονται σε σύμπλοκο με τον HSF-1 και τον διατηρούν σε ανενεργή μορφή, απελευθερώνοντας τον έτσι από τον αρνητικό έλεγχο και βοηθώντας την έναρξη του μονοπατιού ενεργοποίησης του (iii) Πολλαπλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις επηρεάζουν την ικανότητα του HSF-1 να τριμερίζεται (iv) Μετακίνηση στον πυρήνα και δέσμευση στο DNA (v) Η δέσμευση του HSF-1 στο DNA δεν επαρκεί για την έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων απόκρισης στο στρες και επιπλέον σιγάλα είναι απαραίτητα (vi) Η HSF-1 εξαρτώμενη μεταγραφή των γονιδίων απόκρισης στο στρες οδηγεί σε αύξηση των κυτταρικών επιπέδων των HSPs (vii) Οι HSPs οδηγούν στην αποκατάσταση της πρωτεόστασης του κυτάρου, μέσω διαφόρων διεργασιών όπως η επιλεκτική αποικοδόμηση πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβη (viii) ή μέσω αναδίπλωσης των μερικώς μετουσιωμένων πρωτεϊνών (B) Η ενεργοποίηση του HSF-1 περιλαμβάνει πολλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Παρουσία συνθηκών στρες, ο HSF-1 μετατρέπεται από μονομερές σε τριμερές, γεγονός που του επιτρέπει να μετακινηθεί στον πυρήνα και να δεσμευθεί στις ειδικές αλληλουχίες που φέρουν τα γονίδια απόκρισης στο στρες. Η ενεργοποίηση περιλαμβάνει υπερφωσφορυλίωση του παράγοντα σε πολλαπλές

θέσεις στη ρυθμιστική του περιοχή, συμπεριλαμβανομένης της σερίνης 303 και 307. Η φωσφορυλίωση του HSF-1 στη Ser303 απαιτείται για την προσθήκη ενός καταλοίπου SUMO στη Lys298. Η σημασία της μετα-μεταφραστικής αυτής τροποποίησης δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή (Prahlad and Morimoto, 2009)

## 6. Η οικογένεια των sHSP

Οι sHSPs ανήκουν σε μια ευρεία και ποικιλόμορφη οικογένεια σαπερονών (Van Montfort et al., 2001a). Οι sHSPs χαρακτηρίζονται από μικρή μοριακή μάζα (12-43 kDa) και την παρουσία της  $\alpha$ -crystallin, μιας συντηρημένης περιοχής ~90 αμινοξέων, η οποία περιβάλλεται από μια αμινοτελική περιοχή ποικίλου μήκους και μια πιο συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή. Οι sHSPs ολιγομερίζονται και δημιουργούν δομές ποικίλης στοιχειομετρίας (Kim et al., 1998; van Montfort et al., 2001b). Οι sHSPs απαντώνται παντού στο κύτταρο και συνήθως πολλαπλές sHSPs βρίσκονται σε κάθε κυτταρικό διαμέρισμα. Οι sHSPs έχουν σημαντική ομοιότητα με την  $\alpha$ -crystallin που βρίσκεται στο φακό των ματιών των σπονδυλωτών (Ingolia and Craig, 1982; Russnak and Candido, 1985). Η  $\alpha$ B-crystallin εντοπίζεται στο Golgi γύρω από τον πυρήνα, τόσο στην ανθρώπινη σειρά γλιοβλαστώματος U373 (Gangalum et al., 2004) όσο και στο επιθήλιο του φακού (Gangalum and Bhat, 2009). Οι περισσότερες sHSPs δεν είναι διαρκώς ενεργές αλλά ενεργοποιούνται ειδικά, παρουσία συνθηκών στρες και αυξημένης θερμοκρασίας. Οι sHSPs είναι πολύ αποδοτικές στο να προσδένονται σε αποδιαταγμένες πρωτεΐνες και δρουν προστατευτικά εμποδίζοντας τη μη-αναστρέψιμη συσσωμάτωση (Narberhaus, 2002). Στον *C. elegans*, οι μεταγραφικοί παράγοντες DAF-16 και HSF-1 οι οποίοι εμπλέκονται σε μοριακά μονοπάτια που επηρεάζουν το προσδόκιμο ζωής, δρουν εν μέρει αυξάνοντας τη μεταγραφή των sHSPs (Hsu et al., 2003; Morley and Morimoto, 2004). Υπερέκφραση της sHSP *hsp-16* είναι ικανή στο να προστατέψει από στρες και να αυξήσει το προσδόκιμο ζωής του *C. elegans* (Walker and Lithgow, 2003). Η ισχυρή επαγωγή των sHSPs σε καταστάσεις στρες υποδηλώνουν ότι αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ζωτικό ρόλο στους προστατευτικούς μηχανισμούς του κυττάρου.

## 7. Το Golgi

Στο οργανίδιο Golgi λαμβάνουν μέρος οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών και λιπιδίων και διανέμονται οι πρωτεΐνες στους τελικούς τους προορισμούς. Ο ρόλος του Golgi στην ενδοκυττάρια ιοντική ομοιόσταση, δεν είναι πλήρως κατανοητός. Το Golgi μαζί με το ER και τα μιτοχόνδρια, αποτελούν καλά χαρακτηρισμένα οργανίδια αποθήκευσης ασβεστίου (Lin et al., 1998; Martone et al., 1999; Pinton et al., 1998; Scherer et al., 1996; Southall et al., 2006; Wuytack et al., 2003). Συνεπώς η ακεραιότητα και η σωστή λειτουργία του Golgi είναι απαραίτητη για την ομοιόσταση του ασβεστίου και τη σωστή λειτουργία των μοριακών μονοπατιών που ρυθμίζονται από αυτό (Vanoevelen et al., 2005). Απορύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική δυσλειτουργία και τελικά σε θάνατο (Jellinger, 2009). Το Golgi έχει ενεργό ρόλο στην προώθηση της απόπτωσης (Hicks and Machamer, 2002; Lane et al., 2002). Πρωτεάσες που εμπλέκονται στην απόπτωση έχουν εντοπιστεί στη μεμβράνη του Golgi (Mancini et al., 2000; O'Reilly et al., 2002). Παρεμπόδιση της απώλειας της συνοχής του Golgi με φαρμακολογικό ή μοριακό τρόπο, καταστέλλει την απόπτωση (Nakagomi et al., 2008). Επίσης, η απώλεια της ακεραιότητας του Golgi έχει συσχετισθεί με μη-αποπτωτικό θάνατο σε μοντέλα νευροεκφυλισμού (Gosavi et al., 2002; Yoshiyama et al., 2003). Παρόλα αυτά, ο ρόλος του Golgi στο μη-προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και ειδικά στη νέκρωση παραμένει άγνωστος.

## 8. Στόχος της διατριβής

Απουσία ανοσολογικού συστήματος και στοιχείων φλεγμονής στον *C. elegans*, θεωρήσαμε ότι το μοντέλο αυτό είναι κατάλληλο για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας λόγω υψηλής θερμοκρασίας. Δείξαμε στην παρούσα εργασία ότι η ακραία θερμοκρασία προκαλεί νέκρωση στο νηματώδη, όπως νέκρωση παρατηρείται και σε σοβαρές περιπτώσεις θερμοπληξίας στον άνθρωπο. Διερωτηθήκαμε εάν η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό στρες θα μπορούσε να καταστείλει τον επαγόμενο από τη νέκρωση θάνατο. Είναι ενδιαφέρον ότι ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ καταστέλλει τη νέκρωση. Αναγκαία και ικανή για τον προστατευτικό αυτό ρόλο είναι η sHSP HSP-16.1. Η HSP-16.1 δρα

ευεργετικά με το να βοηθά τη διατήρηση της ομοιόστασης του ασβεστίου στο Golgi και κατά συνέπεια στο κυτταρόπλασμα σε συνθήκες στρες.



## **Υλικά και Μέθοδοι**

## Υλικά

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

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

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

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

Η στατιστική ανάλυση όλων των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν έγινε με το πρόγραμμα Prism Software Package (Graphpad Software Inc., San Diego, USA).

## Μέθοδοι

### A) Μοριακή Βιολογία

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

**Υλικά:** M9, διάλυμα λύσης, πρωτεΐνάση K, φενόλη/χλωροφόρμιο, 3 M  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ , 100% EtOH, 70% EtOH, ddH<sub>2</sub>O

#### **Διαδικασία:**

1. Καλλιέργεια νηματωδών σε πιάτα NGM τα οποία φέρουν τροφή OP50
2. Πλύσιμο των ζώων με M9 και κατακρήμνιση των ζώων με φυγοκέντρηση σε πλήρη ταχύτητα για περίπου ένα λεπτό
3. Απομάκρυνση του υπερκείμενου
4. Προσθήκη φρέσκου M9, φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκείμενου
5. Ψύξη της πελέτας σε υγρό άζωτο
6. Προσθήκη πέντε όγκων διαλύματος λύσης με πρωτεΐνάση K (0.1 mg/mL)
7. Επώαση στους 65°C για 60 min
8. Επώαση στους 95°C για 20 min ώστε να απενεργοποιηθεί η πρωτεΐνάση K
9. Προσθήκη RNAse A (0.1 mg/mL) και επώαση στους 37°C για 60 min
10. Προσθήκη ενός όγκου φενόλης/χλωροφορμίου εξισορροπημένης με Tris, στον απαγωγό
11. Ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου
12. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα
13. Επανάληψη των βημάτων 10-12, δυο ακόμα φορές
14. Προσθήκη 0.1 όγκου 3M  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$  και <2 όγκων 100% EtOH και ανάμιξη
15. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 60 min τουλάχιστον
16. Κατακρήμνιση του DNA με φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 15 min
17. Προσεκτική απομάκρυνση του μεγαλύτερου μέρους του υπερκειμένου

18. Πλύσιμο της πελέτας με 70% EtOH και απομάκρυνση του υπερκλειμένου
19. Επανάληψη του βήματος 18 αρκετές φορές
20. Στέγνωμα της πελέτας στον απαγωγό και επαναδιάλυση σε H<sub>2</sub>O
21. Υπολογισμός της συγκέντρωσης με τη χρήση Nanodrop στα 260 nm.  
Για μια καλής ποιότητας DNA ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> πρέπει να είναι 1.8

### **Συνταγές:**

#### Διάλυμα λύσης για γενωμικό DNA

200 mM NaCl

100 mM Tris-HCl (pH 8.5)

50 mM EDTA (pH 8.0)

0.5% SDS

Προσθήκη 0.1% mg/mL πρωτεΐνάσης K πριν τη χρήση

#### M9 (1L)

5.8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O

3.0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5.0 g NaCl

0.25 g MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O

ddH<sub>2</sub>O έως το 1L

αποστείρωση

## **2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA**

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

### 3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

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

Στην περίπτωση γενετικών διασταυρώσεων είναι πιθανό να χρειαστεί να ελέγξουμε το γονότυπο των ζώων που προκύπτουν κατά τις επιμέρους γενιές διασταύρωσης. Στην περίπτωση αυτή, αντί γενωμικού DNA χρησιμοποιούμε το ίδιο το σκουλήκι. Το ζώο τοποθετείται με 2.5  $\mu\text{L}$  διαλύματος λύσης, όπως περιγράφηκε παραπάνω σε σωλήνα και στη συνέχεια στους -80°C για 30 min τουλάχιστον. Έπειτα γίνεται λύση στους 65°C για 60 min και απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης στους 95°C για 15 min. Το προϊόν της λύσης χρησιμοποιείται ως μήτρα για την ακόλουθη αντίδραση PCR.

#### Υλικά

- DNA μήτρα (10 ng-100 ng)
- Taq polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )  $V_{\text{max}}=1/10V_{\text{TEΛ}}$
- 10x Taq buffer (1/10 $V_{\text{TEΛ}}$ )
- Sense primer (stock 100 ng/ $\mu\text{L}$ )  $C_{\text{TEΛ}}=5$  ng/ $\mu\text{L}$
- Antisense primer (stock 100 ng/ $\mu\text{L}$ )  $C_{\text{TEΛ}}=5$  ng/ $\mu\text{L}$
- dNTPs (Stock=2mM each)  $C_{\text{TEΛ}}=100$   $\mu\text{M}/\mu\text{L}$
- H<sub>2</sub>O

#### Μέθοδος

- 92-95°C για 3-5 min

(x) 33 φορές

- 92-95°C για 30 sec
- 55-65°C για 30-60 sec
- 68-72°C για χρονικό διάστημα που εξαρτάται από τις ιδιότητες της πολυμεράσης και το μέγεθος DNA που κλωνοποιείται
- 68-72°C για 15 min προκειμένου να γίνει σύνθεση των ημιτελών κομματιών της αντίδρασης

#### 4. Απομόνωση ολικού mRNA και αντίδραση Real-Time PCR

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των επιπέδων mRNA της *hsp-16.1* υπό κανονικές συνθήκες ή μετά από επώαση στους 34°C, σε ζώα αγρίου τύπου και σε μεταλλαγμένα ζώα *hsp-16.1(ok577)*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την *hsp-16.1* είναι:

5'GGCTCTCCATCTGAATCTTCTGAG3' και

5'TTCAAATCTTCTGGCTTGAAGTGC3'

Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *ama-1* το οποίο κωδικοποιεί την μεγάλη υπομονάδα της RNA πολυμεράσης II. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

5'CCTACCTACACTCCAAGTCCATCG3' και

5'GGTGAAGCTGGCGAATACGTTG3'

#### Υλικά

- M9
- Trizol
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπανόλη
- 70% EtOH
- RNase free H<sub>2</sub>O
- iScript cDNA Synthesis Kit

- BioRad SYBR Green Supermix

### **Διαδικασία**

1. Συλλογή 10 ατόμων σε 20  $\mu\text{L}$  M9 σε RNase free σωλήνα
2. Κατακρήμιση των ζώων με σύντομη φυγοκέντρηση στις 14000 rpm
3. Προσθήκη 250  $\mu\text{L}$  Trizol, στον απαγωγό
4. Ανάδευση (vortex) για 30 sec και ακολούθως ανάδευση στους  $4^{\circ}\text{C}$  έως ότου διαλυθούν τα σώματα των ζώων
5. Προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  χλωροφόρμιο στον απαγωγό
6. Ανάδευση για 30 sec
7. Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 min
8. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 min στους  $4^{\circ}\text{C}$
9. Μεταφορά της διάφανης φάσης σε νέο σωλήνα
10. Επανάληψη των βημάτων 5-9
11. Προσθήκη 125  $\mu\text{L}$  ισοπροπανόλης και ανακίνηση
12. Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου για μερικά λεπτά
13. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min στους  $4^{\circ}\text{C}$
14. Απόρριψη του υπερκείμενου
15. Πλύσιμο της πελέτας με 250  $\mu\text{L}$  70%EtOH
16. Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 5 min στους  $4^{\circ}\text{C}$
17. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και στέγνωμα της πελέτας
18. Επαναδιάλυση σε 10  $\mu\text{L}$  RNase free  $\text{H}_2\text{O}$
19. Υπολογισμός της συγκέντρωσης RNA στο Nanodrop. Για καθαρό RNA πρέπει ο λόγος  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  να είναι κοντά στο 2

### Σύνθεση cDNA

1. Για δείγμα 20  $\mu\text{L}$ :  
4  $\mu\text{L}$  5x iScript Mix  
1  $\mu\text{L}$  Reverse Transcriptase  
10  $\mu\text{L}$  RNA  
5  $\mu\text{L}$  RNase free  $\text{H}_2\text{O}$
2. Πρόγραμμα:  
 $25^{\circ}\text{C}$  για 5 min

42°C για 30 min

85°C για 5 min

4°C για άπειρο

### 3. Αποθήκευση στους 4°C

#### RT-PCR

1. Για ένα δείγμα 25  $\mu$ L προσθέτουμε:

1.5  $\mu$ L cDNA

0.5  $\mu$ L Forward primer (1:10)

0.5  $\mu$ L Reverse primer (1:10)

12.5  $\mu$ L CybrGreen buffer

10.0  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O

2. Πιπετάρουμε κάθε δείγμα επί τρεις φορές

### **5. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων *E. coli***

Η προετοιμασία των δεκτικών κυττάρων έγινε με επώαση των κυττάρων για 30 min σε διάλυμα που περιείχε 50 mM CaCl<sub>2</sub> και 10% γλυκερόλη. Ο μετασχηματισμός έγινε όπως έχει περιγραφεί προηγουμένα (Sambrook and Russell, 2001).

### **6. Δημιουργία διαγονιδιακών ζώων**

Η εισαγωγή τροποποιημένου γενετικού υλικού στο νηματώδη αποτελεί εξαιρετικής σημασίας εργαλείο (Mello and Fire, 1995). Με αυτή τη μέθοδο είναι δυνατή η έκφραση γονιδίων στη φυσιολογική ή τη μεταλλαγμένη τους μορφή, η υπερέκφραση γονιδίων και η έκφραση χιμαιρικών μορίων όπου τμήματα γονιδίων εκφράζονται σε σύνδεση με εξωγενή γονίδια μάρτυρες, όπως η GFP. Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μικροένεσης για τη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων. Η μέθοδος αυτή περιγράφεται αναλυτικά από (Rieckher et al., 2009). Η εισαγωγή του διαγονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την κατάτμηση του DNA και τη δημιουργία



μιας εξτρα-χρωμοσωμικής συστοιχίας. Η συχνότητα κληροδότησης της συστοιχίας αυτής στους απογόνους ποικίλλει και πρέπει να γίνεται επιλογή με βάση το πλασμίδιο αναφοράς (το οποίο προστίθεται στο ενέσιμο μείγμα και προσδίδει στα διαγονιδιακά ζώα ένα εμφανές χαρακτηριστικό), ώστε να διατηρείται η διαγονιδιακή σειρά.

## 7. Μέθοδος RNAi (RNA interference)

Για την καταστολή της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων στον *C. elegans* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του RNAi (Kamath et al., 2001). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, οι νηματώδεις τρέφονται με βακτήρια τα οποία φέρουν ειδικές πλασμιδικές κατασκευές έκφρασης και παράγουν δίκλωνο RNA. Το RNA το οποίο εισέρχεται στα κύτταρα του ζώου, ενεργοποιεί έναν ενδογενή μηχανισμό που οδηγεί στην καταστροφή του mRNA του γονιδίου στόχου.

Για τη μέθοδο του RNAi απαιτείται η κλωνοποίηση τμήματος της αλληλουχίας του γονιδίου στόχου στον φορέα pL4440. Ο φορέας αυτός εξασφαλίζει την παραγωγή δίκλωνου RNA. Το πλασμίδιο που προκύπτει εισάγεται στο βακτηριακό στέλεχος HT115 από το οποίο απουσιάζει η RNase-E και έτσι καθίσταται δυνατή η παραγωγή σταθερών δίκλωνων μορίων RNA. Για πειράματα RNAi, απαιτούνται πιάτα τα οποία δεν περιέχουν στρεπτομυκίνη αλλά αμπικιλίνη με τελική συγκέντρωση 100 µg/mL. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιείται ο άδειος φορέας pL4440 ως πείραμα ελέγχου

### Μέθοδος:

1. Υγρή καλλιέργεια LB με αμπικιλίνη (100 µg/mL) και τετρακυκλίνη (100 µg/mL) εμβολιάζεται με μονή αποικία και επωάζεται για 16 περίπου ώρες
2. Την επόμενη μέρα η καλλιέργεια αυτή χρησιμοποιείται για την επιμόλυνση θρεπτικού LB το οποίο περιέχει μόνο αμπικιλίνη (100 µg/mL), σε αραιώση 1:33
3. Επώαση για τέσσερις ώρες
4. 90 µL της καλλιέργειας αναμιγνύονται με 10 µL IPTG 2 mM και το μείγμα απλώνεται σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό

5. Τα τρυβλία στεγνώνουν και χρησιμοποιούνται την επόμενη μέρα

## **B) Γονιδιακές σειρές και στελέχη**

Ακολουθήσαμε τις προβλεπόμενες διαδικασίες για τη διατήρηση των στελεχών (Brenner, 1974a). Η θερμοκρασία ανάπτυξης των νηματωδών είναι 20°C εκτός και εάν αναφέρεται κάπου διαφορετικά. Τα ακόλουθα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή:

- N2, στέλεχος αγρίου τύπου
- MT1522: *ced-3(n717)*
- KJ216: *crt-1(jh101)*
- TU1747: *deg-3(u662)V*, αναφέρεται στο κείμενο ως *deg-3(d)*
- *mec-4(u231)X*, αναφέρεται στο κείμενο ως *mec-4(d)*
- PS3551: *hsf-1(sy441)*
- RB791: *hsp-16.1(ok577)*
- VC475: *hsp-16.2(gk249)*
- VC1099: *hsp-4(gk514)*
- RB1104: *hsp-3(ok1083)*
- *hsp-6(tm515)*
- *hsp-16.41(tm1093)*
- *hsp-70(tm2318)*
- VC914: *daf-21(ok1333)*
- CB1370: *daf-2(e1370)*
- DR26: *daf-16(m26)*
- EU1: *skn-1(zu67)*
- EU31: *skn-1(zu135)*
- EU40: *skn-1(zu129)*
- *pmr-1(tm1840)*
- CF1824: *muEx265 [pAL9 (hsf-1p::hsf-1 cDNA)+pPD97.93(myo-3p::gfp)]*

Τα ακόλουθα στελέχη εξετάστηκαν για νευροεκφυλισμό στην παρούσα εργασία:

- *hsf-1(sy441);mec-4(u231)X*

- *hsp-16.1(ok577);mec-4(u231)X*

Για τη δημιουργία του διπλά αυτού μεταλλαγμένου στελέχους χρησιμοποιήθηκαν κλασικές τεχνικές γενετικής στο νηματώδη (Brenner, 1974a). Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 5'ATCCATGTTCCAATTCCTGTC3' και 5'TCAAAACAACATAACGGCTC3'

- *mec-4(d);Ex[p<sub>hsp-1</sub>HSF-1]*
- *mec-4(u231)X;Ex[p<sub>mec-17</sub>HSP-16.1]*
- *mec-4(u231)X;Is[p<sub>mec-4</sub>GFP]*

Για να εξετάσουμε την ενεργοποίηση των cathersins μετά από συνθήκες θερμοπληξίας εξετάσαμε τα *N2;Ex[p<sub>asp-4</sub>ASP-4::GFP]* διαγονιδιακά ζώα. Για να επιβεβαιώσουμε ότι η μέθοδος ενεργοποίησης του μονοπατιού του θερμικού σοκ με επώαση στους 34°C δεν επηρεάζει την έκφραση, τον εντοπισμό ή τη σταθερότητα του τοξικού καναλιού MEC-4, εξετάσαμε τα ακόλουθα διαγονιδιακά στελέχη:

- *N2;Is[p<sub>mec-4</sub>GFP]*
- *N2;Is[p<sub>mec-4</sub>MEC-4::GFP]*

Για πειράματα συνεντοπισμού χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα στελέχη:

- *N2;Ex[p<sub>mec-17</sub>HSP-16.1DsRed;p<sub>rab-3</sub>mannosidase II GFP],*
- *N2;Ex[p<sub>mec-17</sub>HSP-16.1GFP;p<sub>rab-3</sub>mCherryAPT-9],*
- *N2;Ex[p<sub>mec-17</sub>HSP-16.1DsRed;p<sub>rab-3</sub>2xfyve domainGFP].*

Για την παρακολούθηση των επιπέδων ασβεστίου στους νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για την αίσθηση ήπιων ερεθισμάτων και εκφράζουν το τοξικό κανάλι *mec-4(d)*, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα στελέχη:

- *N2;Ex[p<sub>mec-17</sub>GCamP2.0]*
- *mec-4(u231)X[p<sub>mec-17</sub>GCamP2.0]*
- *mec-4(u231)X[p<sub>mec-17</sub>GCamP2.0;p<sub>mec-17</sub>HSP-16.1]*

Για τη μελέτη του προστατευτικού ρόλου της υπερέκφρασης της *hsp-16.1* έναντι της θερμοπληξίας, εξετάσαμε τα διαγονιδιακά στελέχη:

- *N2;Ex[p<sub>let-858</sub>HSP-16.1]*
- *pmr-1(tm1840);Ex[p<sub>let-858</sub>HSP-16.1]*

Για να ελέγξουμε τον προστατευτικό ρόλο της ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ σε ένα μοντέλο της ασθένειας Parkinson's στον *C. elegans* χρησιμοποιήσαμε το διαγονιδιακό στέλεχος:

UA44 [*baln1*; *p<sub>dat-1</sub>::α-syn*, *p<sub>dat-1</sub>GFP*]

### Γ) Πλασμιδιακές κατασκευές

Για την κατασκευή των πλασμιδίων που περιγράφονται στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν οι κλασικές τεχνικές κλωνοποίησης όπως περιγράφονται από (Sambrook and Russell, 2001). Όλοι οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από το εργαστήριο του A. Fire (Stanford University School of Medicine, Stanford, CA), εκτός και εάν αναφέρεται διαφορετικά. Για την κλωνοποίηση των πλασμιδιακών φορέων και κατασκευών, πραγματοποιήθηκαν μετασχηματισμοί σε επιδεκτικά κύτταρα XL-1 blue.

#### ***p<sub>mec-17</sub>HSP-16.1-pPD95.77***

Το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε με σκοπό να υπερεκφράσουμε την *hsp-16.1* ειδικά στους έξι νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για αντίληψη ήπιων μηχανικών ερεθισμάτων. Για την κατασκευή του, ένα κομμάτι που περιέχει την κωδική αλληλουχία του γονιδίου *hsp-16.1* (490bp) καθώς και μέρος από την 3'UTR περιοχή (503bp) και φέρει τις περιοριστικές θέσεις *XmaI-KpnI* στα άκρα, ενισχύθηκε από το γενωμικό DNA του *C. elegans* και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις περιορισμού του πλασμιδίου *p<sub>mec-17</sub>GFP-pPD95.77*. Το πλασμίδιο *p<sub>mec-17</sub>GFP-pPD95.77* έχει περιγραφεί προηγουμένα (Artal-Sanz et al., 2006b). Το *p<sub>mec-17</sub>HSP-16.1-pPD95.77* πλασμίδιο ενέθηκε στις γονάδες *mec-4(u231)* μεταλλαγμένων ζώων μαζί με το μάρτυρα αναφοράς *p<sub>myo-2</sub>GFP* που εκφράζει GFP στα μυϊκά κύτταρα του φάρυγγα.

Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

5'CCCGGGATGTCACCTTTACCACTATTTCCG3' και  
 5'GGTACCTATCCATGTTCCAATTCCTGCG3'

**p<sub>mec-17</sub>HSP16.1::GFP-pPD95.77**

Το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε με σκοπό να μελετηθεί η υποκυτταρική κατανομή της HSP-16.1 στους έξι νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για αντίληψη ήπιων μηχανικών ερεθισμάτων. Για την κατασκευή του, κλωνοποιήσαμε ένα κομμάτι που περιέχει την κωδική αλληλουχία του γονιδίου *hsp-16.1* (487bp) και φέρει τις περιοριστικές θέσεις *SmaI/AgeI* στα άκρα, στο αμινοτελικό άκρο της GFP του πλασμιδίου p<sub>mec-17</sub>GFP-pPD95.77. Η p<sub>mec-17</sub>HSP16.1::GFP- pPD95.77 πλασμιδιακή κατασκευή ενέθηκε με το μάρτυρα αναφοράς pRF4 (περιέχει το *rol-6(su1006)*) στις γονάδες ζώων αγρίου τύπου.

Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

5'CCCGGGATGTCACCTTTACCACTATTTCCG3' και  
 5'ACCGGTCCTTCAGAAGTTTTTTGTTCAACG3'

**p<sub>let-858</sub>HSP-16.1-L2865**

Το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε με σκοπό να υπερεκφράσουμε την *hsp-16.1* σε όλα τα κύτταρα του ζώου υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *let-858*. Για το σκοπό αυτό κλωνοποιήσαμε ένα κομμάτι που περιέχει την κωδική αλληλουχία του γονιδίου *hsp-16.1* (490bp) και κομμάτι από την 3'UTR περιοχή (503bp) και φέρει τις περιοριστικές θέσεις *KpnI/XmaI* στα άκρα, στον πλασμιδιακό φορέα L2865 ο οποίος φέρει τον υποκινητή του γονιδίου *let-858*.

Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

5'GGTACCATGTCACCTTTACCACTATTTCCG3' και  
 5'CCCGGGTATCCATGTTCCAATTCCTGCG3'

**p<sub>mec-17</sub>GCaMP2.0-pPD49.26**

Το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε με σκοπό να παρακολουθήσουμε τα επίπεδα ασβεστίου στους έξι νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για αντίληψη ήπιων μηχανικών ερεθισμάτων μετά από φαρμακολογικές και γενετικές παρεμβάσεις στη λειτουργία των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την ομοιόσταση

του ασβεστίου στο Golgi. Για την πλασμιδιακή αυτή κατασκευή ένα κομμάτι που περιέχει τον υποκινητή του *mec-17* (1643bp) και φέρει τις περιοριστικές θέσεις *PstI/XmaI* στα άκρα και ένα κομμάτι που περιέχει την κωδική αλληλουχία του GCaMP2.0 (1356bp), φέρει τις περιοριστικές θέσεις *XmaI/EcoRV* στα άκρα και ενισχύθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pN1-GCaMP2.0 (ευγενική προσφορά από το εργαστήριο του Νίκου Χρόνη, Ann Arbor, Michigan), κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pPD49.26.

Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν είναι:  
Για την ενίσχυση του υποκινητή του *mec-17* από γενωμικό DNA:

5'CTGCAGAGCAAAGACGGCAAGAACTG3' και

5'CCCGGGGATCGAATCGTCTCACAAC3'

Για την ενίσχυση του GCaMP2.0 από το pN1-GCaMP2.0:

5'CCCGGGATGCGGGGTTCTCATCATC3' και

5'GATATCTCACTTCGCTGTCATCATTTG3'

#### **p<sub>let-858</sub>HSP-16.1::GFP-L3786**

Το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε με σκοπό να μελετήσουμε το πρότυπο έκφρασης της HSP-16.1 σε όλα τα κύτταρα, υπό την καθοδήγηση του υποκινητή του γονιδίου *let-858*. Για την πλασμιδιακή αυτή κατασκευή κλωνοποιήσαμε ένα κομμάτι που περιέχει την κωδική αλληλουχία του *hsp-16.1* (487bp) και φέρει την περιοριστική θέση *AgeI* στα άκρα, στο πλασμίδιο L3786 το οποίο φέρει τον υποκινητή του γονιδίου *let-858*.

Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

5'ACCGGTATGTCACTTTACCACTATTTCCG3' και

5'ACCGGTCCTTCAGAAGTTTTTTGTTCAACG3'

#### **p<sub>mec-17</sub>NUCB-1-pPD95.77**

Το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε με σκοπό να υπερεκφράσουμε την *nucb-1* στους έξι νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για αντίληψη ήπιων μηχανικών ερεθισμάτων. Για την πλασμιδιακή αυτή κατασκευή κλωνοποιήσαμε την κωδική αλληλουχία του γονιδίου *nucb-1* (2718bp), που φέρει τις περιοριστικές θέσεις *BamHI/NcoI* στα άκρα, στην πλασμιδιακή κατασκευή p<sub>mec-17</sub>/pPD95.77.

Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

5'GGATCCATGATTAAGCCTCTAGTC3' και  
5'CCATGGTAGATTGGTGAGGTAGTG3'

#### **sca-1-pL4440**

Για την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *sca-1* με τη μέθοδο του RNAi τμήμα του γονιδίου *sca-1* (1811bp) που φέρει τις περιοριστικές θέσεις *NotI/Sall* στα άκρα, κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pL4440.

Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν είναι:  
5'GCGGCCGCTAAGGAAGCTCGTGCCAGGAG3' και  
5'GTCGACACTTGGCGACAGCAGTTCC3'

#### **itr-1-pL4440**

Για την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *itr-1* με τη μέθοδο του RNAi τμήμα του γονιδίου *itr-1* (2457bp) που φέρει την περιοριστική θέση *EcoRI* στα άκρα, κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pL4440.

Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν είναι:  
5'GAATTCAGCCCAATGTCCGCAATCC3' και  
5'GAATTCACACTCAGCGACCCGATACC3'

### **Δ) Ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό στρες και δοκιμασίες θανάτου**

Για τις δοκιμασίες θερμοπληξίας, συγχρονισμένοι πληθυσμοί ζώων αναπτύσσονται υπό ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης στους 20°C μέχρι το ενήλικο στάδιο. Οι συγχρονισμένοι πληθυσμοί επιτυγχάνονται μεταφέροντας 20-30 ζώα, που βρίσκονταν στο στάδιο εναπόθεσης αυγών, σε φρέσκα πιάτα, αφήνοντας τα να εναποθέσουν αυγά για 1.5 ώρες και στη συνέχεια τα ενήλικα άτομα απομακρύνονται. Τα άτομα συλλέγονται με M9 διάλυμα σε erpendorf σωλήνες χωρητικότητας 1.5 mL και επωάζονται σε 200 μL M9, στους 39°C για 15 λεπτά. Τα άτομα που χρησιμοποιούνται ως πληθυσμός ελέγχου (control) παραμένουν στους 20°C για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα.

Για να ελέγξουμε εάν η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ, έχει προστατευτικό ρόλο έναντι σε επακόλουθη έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας, τα ζώα επωάζονται στους 34°C για 30 min,

ακολουθεί μια περίοδος ανάκαμψης (recovery) για 20 min στους 20°C και στη συνέχεια έκθεση στους 39°C για 15 min. Τα ποσοστά επιβίωσης εξετάζονται μετά από 16-18 ώρες. Ως επιζώντα θεωρούνται τα ζώα τα οποία είτε κινούνται ελεύθερα, είτε αποκρίνονται σε μηχανικά ερεθίσματα, μέσω χτυπήματος του πιάτου, κουνώντας το κεφάλι ή την ουρά.

Για τη χρώση με propidium iodide, τα ζώα επωάζονται για 3 ώρες με 10 μM propidium iodide (Sigma) σε διάλυμα M9, ακολουθεί επώαση στους 39°C για 15 min και ύστερα παρατήρηση με σύνθετο μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axio Imager Z2, με χρήση του φίλτρου Zeiss set 4920 Rhodamine shift free. Η camera που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη φωτογραφιών είναι η Olympus DP71.

Για την εξέταση της επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου *asp-4*, ενήλικα άτομα τα οποία φέρουν το διαγονίδιο *asp-4::GFP*, επωάζονται στους 39°C για 15 min και η έκφραση της GFP στα νεκρωτικά κύτταρα εξετάζεται περίπου 3 ώρες αργότερα με τη χρήση σύνθετου μικροσκοπίου φθορισμού Zeiss Axio Imager Z2 και φίλτρου Zeiss set 38 Endow GFP shift free. Η camera που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη φωτογραφιών είναι η Olympus DP71.

Για τις φαρμακολογικές δοκιμασίες, τα ζώα αναπτύσσονται από το στάδιο του αυγού σε πιάτα τα οποία περιέχουν 10 mM EGTA και 10 μM Dantrolene και η επιβίωση μετά από την έκθεση συνθήκες θερμοπληξίας καταγράφεται στο ενήλικο στάδιο.

Για την εξέταση του προστατευτικού ρόλου της ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ στο νεκρωτικό θάνατο που προκαλείται από τοξικά κανάλια, τα ζώα αναπτύσσονται σε ιδανικές συνθήκες στους 20°C μέχρι το προχωρημένο ενήλικο στάδιο (ύπαρξη πολλών αυγών στο ζώο). Τα ζώα συλλέγονται με M9 σε erpendorf σωλήνες χωρητικότητας 1.5 mL. Ανάλογα με τον επιθυμητό αριθμό αυγών, είναι πιθανό να χρειαστεί να συλλέξουμε ζώα από περισσότερα του ενός πιάτα. Μετά από σύντομη φυγοκέντρηση στις 14000 rpm, το M9 αφαιρείται και προστίθεται 0,5 mL υποχλωρικού νατρίου. Όταν τα σώματα των ζώων αποσυντεθούν, τα εναπομείναντα αυγά κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση για 25 sec στις 14000 rpm και ξεπλένονται δυο φορές με 1 mL M9. Μετά το πλύσιμο, τα αυγά επαναδιαλύονται σε 200 μL M9 και επωάζονται για 25 min στους 34°C, σε



υδατόλουτρο. Τα ζώα αναφοράς επωάζονται στους 20°C για τη διάρκεια του θερμικού σοκ. Τα ζώα αναφοράς και τα ζώα που έχουν υποστεί το θερμικό σοκ τοποθετούνται σε πιάτα και επωάζονται στους 20°C μέχρι να εκκολαφθούν.

Για να εξετάσουμε εάν το θερμικό σοκ παρεμβαίνει στη λειτουργία του καναλιού MEC-4, άτομα αγρίου τύπου υποβάλλονται στη διαδικασία του θερμικού σοκ που περιγράφηκε παραπάνω, ενώ τα άτομα αναφοράς διατηρούνται στους 20°C για την ίδια χρονική διάρκεια. Στη συνέχεια τα άτομα που έχουν υποστεί θερμικό σοκ και τα άτομα αναφοράς εξετάζονται για απόκριση στο ήπιο μηχανικό ερέθισμα στο σώμα, στο στάδιο L4. Τα άτομα δέχονται 5 διαδοχικά ερεθίσματα με μια βλεφαρίδα στο μπροστινό και οπίσθιο τμήμα του ζώου και η αντίδραση (αλλαγή στην κατεύθυνση κίνησης του ζώου) καταγράφεται.

Για τον έλεγχο του προστατευτικού ρόλου της ενεργοποίησης του μονοπατιού του θερμικού σοκ ενάντια στην υποξία, ζώα αγρίου τύπου σταδίου L4 συλλέγονται, ξεπλένονται 2-3 φορές με M9, υποβάλλονται σε θερμικό σοκ για 15 min στους 34°C και ακολουθεί ανάκαμψη στους 20°C για 10 min. Τα ζώα αναφοράς διατηρούνται στους 20°C για το ίδιο χρονικό διάστημα. Για την επαγωγή συνθηκών υποξίας, τα ζώα που έχουν υποστεί θερμικό σοκ και τα ζώα αναφοράς επωάζονται για 60 min στους 25°C σε 1 mL φρέσκου διαλύματος  $\text{NaN}_3$  0.5 M. Στη συνέχεια τα ζώα ξεπλένονται 3 φορές με 1 mL M9 και τοποθετούνται σε πιάτο για ανάκαμψη. Το ποσοστό των ζωντανών ζώων καταγράφεται μετά από 12-16 ώρες.

Για τη χρονική μελέτη του νεκρωτικού θανάτου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, συγχρονισμένοι πληθυσμοί ζώων εξασφαλίζονται μετά από λύση με διάλυμα υποχλωρικού νατρίου των σωματίων ενήλικων ζώων που φέρουν αυγά. Ο πληθυσμός αυτός μοιράζεται στα δυο. Ο ένας υπο-πληθυσμός υποβάλλεται σε θερμικό σοκ, ενώ ο άλλος διατηρείται στους 20°C κατά τη διάρκεια της επώασης στους 34°C. Νεκρωτικά σώματα καταγράφονται για κάθε υποπληθυσμό και για κάθε αναπτυξιακό στάδιο από L1 έως L4.

Για τη μελέτη του ρόλου της ενεργοποίησης του μονοπατιού του θερμικού σοκ στο μοντέλο της ασθένειας Parkinson's στο *C. elegans*, πιάτα που περιέχουν ζώα σταδίου L4, υποβάλλονται σε θερμικό σοκ καθημερινά για 30 ή 60 min, βυθίζοντας το πιάτο σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 34°C. Η

απώλεια κυττάρων καταγράφεται κατά την 5<sup>η</sup> ημέρα ενηλικίωσης, με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού.

### **E) Μικροσκοπία**

Για τα πειράματα παρακολούθησης των επιπέδων ασβεστίου, διαγονιδιακά ζώα τα οποία εκφράζουν το δείκτη ασβεστίου GCaMP2.0 στους έξι νευρώνες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αντίληψη ήπιων μηχανικών ερεθισμάτων, φωτογραφήθηκαν με τη χρήση μικροσκοπίου Zeiss Axio Imager Z2 (φίλτρο Zeiss set 38 Endow GFP shift free). Η camera που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη φωτογραφιών είναι η Olympus DP71. Για τα πειράματα θερμοπληξίας, τα ζώα φωτογραφίζονται τρεις ώρες μετά από τους αντίστοιχους χειρισμούς. Για τη νέκρωση η οποία προκαλείται από το τοξικό κανάλι *mec-4(d)*, ζώα σταδίου L1 φωτογραφήθηκαν. Μόνο νευρώνες στο πολύ αρχικό στάδιο εκφυλισμού (βάση των μορφολογικών χαρακτηριστικών που προκύπτουν από την παρατήρηση με την τεχνική Nomarski), χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση καθώς η έκφραση του GCaMP2.0 παύει σε προχωρημένα στάδια νευροεκφυλισμού. Η ένταση φθορισμού υπολογίζεται με τη χρήση του προγράμματος Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Για την παρατήρηση του προτύπου έκφρασης αλλά και της υποκυτταρικής κατανομής της HSP-16.1 χρησιμοποιήθηκε το συνεστιακό μικροσκόπιο Zeiss LSM 710.

## **Αποτελέσματα**

## 1. Οι συνθήκες θερμοπληξίας (heat stroke) προκαλούν νέκρωση στον *C. elegans*

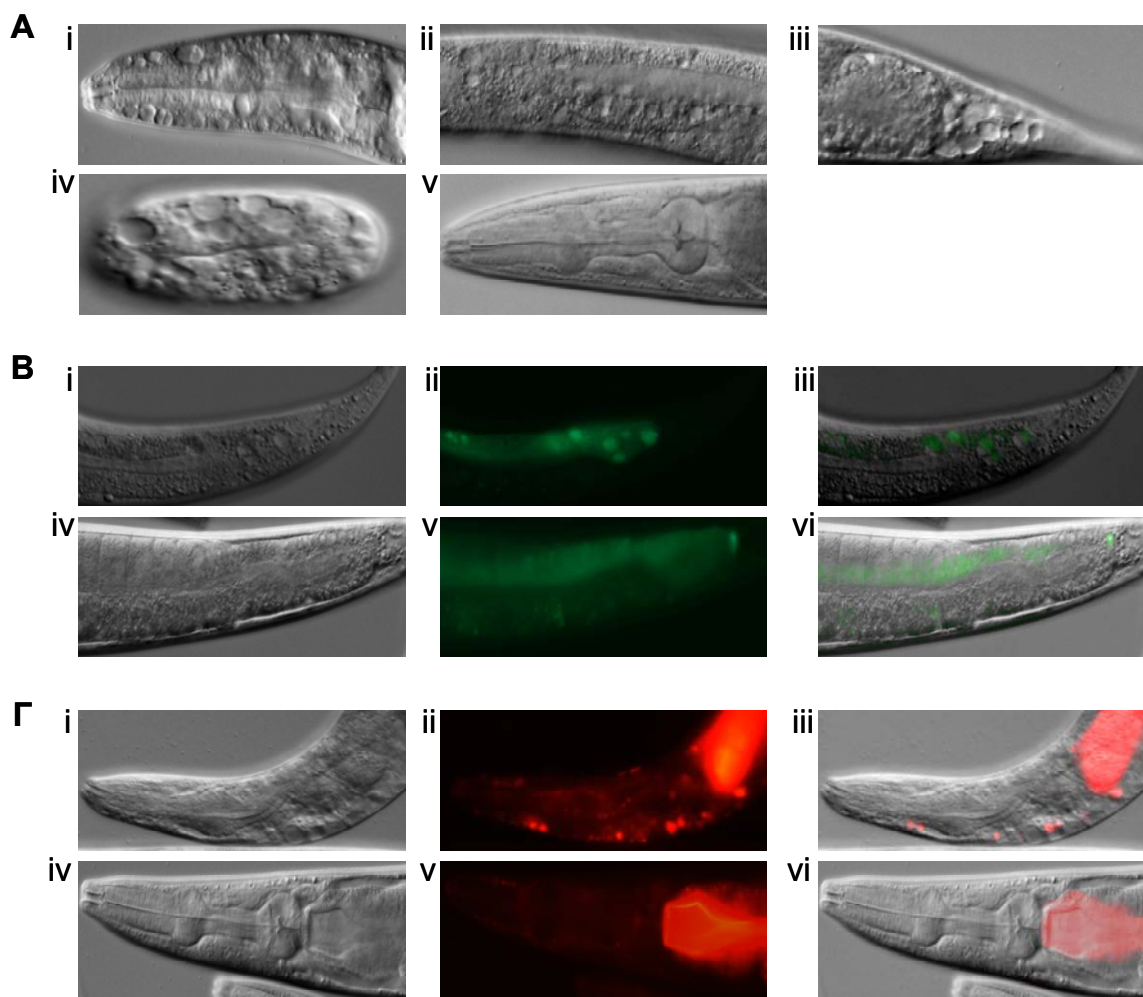
Τόσο η απόπτωση, όσο και η νέκρωση έχουν εμπλακεί στον κυτταρικό θάνατο μετά από θερμοπληξία (Buckley, 1972; Sakaguchi et al., 1995). Σε μετρίως υψηλές θερμοκρασίες, ο κυτταρικός θάνατος οφείλεται κυρίως σε απόπτωση, ενώ στα θύματα βαριάς θερμοπληξίας, η νέκρωση εντοπίζεται σε πολλά ζωτικά όργανα (Chao et al., 1981; Malamud et al., 1946; Simon, 1993).

Επώαση νεαρών ενηλίκων ατόμων στους 39°C για 15 min οδήγησε σε σημαντική μείωση της επιβίωσης. Τα ζώα έλαβαν τη μορφή άκαμπτης ράβδου και με τη βοήθεια της τεχνικής της μικροσκοπίας Nomarski αποκαλύφθηκε η ύπαρξη πολλών διογκωμένων κυττάρων σε όλο το μήκος του σώματος του ζώου, ενδεικτικό της γενικής βλάβης (Εικόνα 1, A, i-iii). Είναι ενδιαφέρον ότι οι πιο σοβαρές περιπτώσεις θερμοπληξίας σχετίζονται με το σύνδρομο δυσλειτουργίας πολλαπλών οργάνων (Bouchama and Knöchel, 2002). Ακόμη τα αυγά που γεννιούνται από τα ζώα που έχουν υποστεί θερμοπληξία, φέρουν τα ίδια διογκωμένα κύτταρα (Εικόνα 1, A, iv). Αυτά τα δραματικά διογκωμένα κύτταρα φέρουν παραμορφωμένο πυρήνα που εντοπίζεται στην περιφέρεια του κυττάρου και αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό του νεκρωτικού θανάτου.

Η νέκρωση έχει περιγραφεί στον *C. elegans* (Kourtis and Tavernarakis, 2007). Κύτταρα τα οποία εκφράζουν τοξικά κανάλια της οικογένειας των degenerin (*deg-1*, *mec-4*, *mec-10*, *unc-8* and *unc-105*), τα οποία φέρουν μεταλλαγές που οδηγούν σε υπερ-ενεργοποίηση του καναλιού, οδηγούνται σε εκφυλισμό που συνοδεύεται από ειδικά μορφολογικά χαρακτηριστικά (Hall et al., 1997). Εκτός από τις degenerins, μεταλλαγές στο ιοντικό κανάλι *deg-3*, το οποίο είναι υποδοχέας ακετυλοχολίνης οδηγεί σε εκφυλισμό μέσω νέκρωσης σε πολλούς νευρώνες στον *C. elegans*.

Δυο λυσοσωμικές πρωτεάσες που ανήκουν στην οικογένεια των cathepsins (ASP-3 και ASP-4) έχουν συσχετισθεί ειδικά με την εκτέλεση του νεκρωτικού θανάτου στον *C. elegans* (Syntichaki et al., 2002). Παρατήρηση των ζώων που φέρουν το διαγονίδιο αναφοράς *asp-4::GFP* μετά από θερμοπληξία, αποκάλυψε την επαγωγή της έκφρασης μέσα στα διογκωμένα νεκρωτικά κύτταρα του εντέρου (Εικόνα 1, B, i-iii).

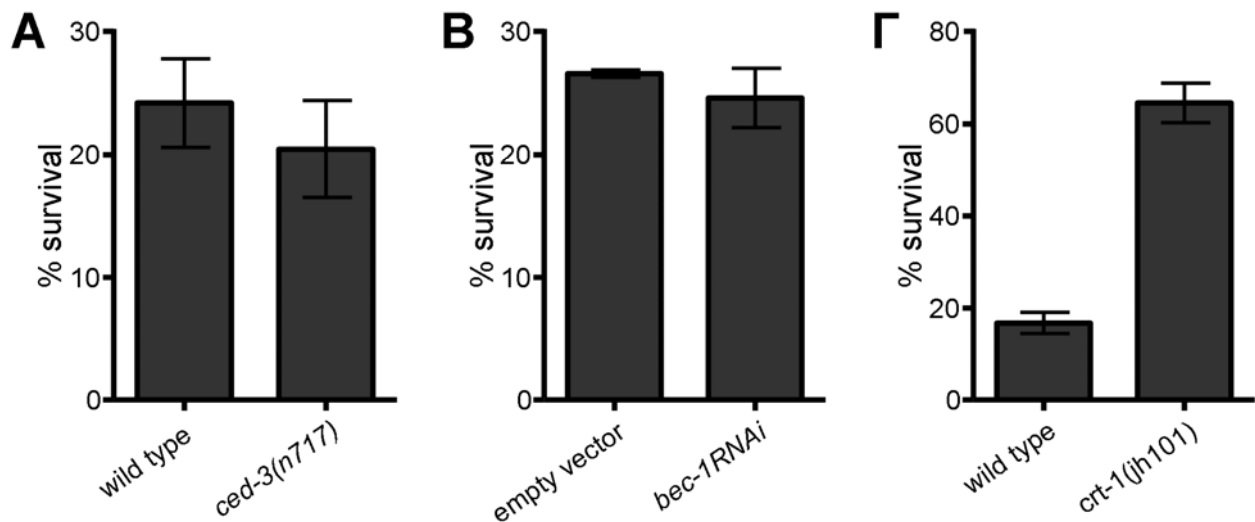
Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της νέκρωσης είναι η απώλεια της συνοχής της κυτταρικής μεμβράνης κατά τα προχωρημένα στάδια του κυτταρικού θανάτου. Η χρωστική propidium iodide, δε διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και εξαιρείται από τα ζωντανά και τα αποπτωτικά κύτταρα. Επώαση νεαρών ενήλικων ατόμων που έχουν υποβληθεί σε συνθήκες θερμοπληξίας, με propidium iodide έδειξε εκτεταμένη χρώση των ατόμων, ενδεικτικό της νεκρωτικής βλάβης (Εικόνα 1, Γ, i-iii). Τόσο τα ζώα αναφοράς όσο και τα ζώα που έχουν υποστεί θερμοπληξία φέρουν χρωστική στο έντερο λόγω κατανάλωσης βακτηρίων *E. coli* τα οποία έχουν υποστεί χρώση.



**Εικόνα 1** Οι συνθήκες θερμοπληξίας προκαλούν νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο στον *C. elegans*. (A) Μορφολογία ατόμων αγρίου τύπου μετά από επώαση στους 39°C για 15 min. Δραματικά διογκωμένα κύτταρα παρατηρούνται σε όλο το μήκος σώματος των ζώων (i-iii) αλλά και στα έμβρυα (iv) Αντίθετα, η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ (34°C για 30 min) δεν προκάλεσε καμία μορφολογική αλλαγή στα ζώα (v). (B)

Νεκρωτικά κυστίδια μπορούν να παρατηρηθούν στο έντερο νεαρών ενήλικων ζώων τα οποία έχουν εκτεθεί σε συνθήκες θερμοπληξίας, μέσα στα οποία παρατηρείται επαγωγή της έκφρασης του διαγονιδίου *asp-4::GFP* (i-iii). Αντίθετα, καμία επαγωγή της έκφρασης της GFP ή μορφολογική αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στο έντερο των ζώων αναφοράς (iv-vi). (Γ) Νεαρά ενήλικα άτομα μετά από χρώση με *propidium iodide*. Τα άτομα αναφοράς δε δείχνουν καμία χρώση (iv-vi). Αντίθετα, η νέκρωση προκαλεί απώλεια της συνοχής της κυτταρικής μεμβράνης μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας και εκτεταμένη χρώση των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη (i-iii)

Εξετάσαμε επίσης τη συμμετοχή άλλων μονοπατιών κυτταρικού θανάτου στο θάνατο που προκαλείται από θερμοπληξία. Στον *C. elegans* η εκτέλεση του αποπτωτικού θανάτου περιλαμβάνει την κύρια εκτελεστική πρωτεάση, κασπάση CED-3, η οποία ρυθμίζεται από προ-αποπτωτικούς και αντι-αποπτωτικούς παράγοντες (Lettre and Hengartner, 2006). Η *ced-3(n717)* μεταλλαγή δεν κατέστειλε τον επαγόμενο από θερμοπληξία θάνατο (Εικόνα 2, Α). Η αυτοφαγία έχει συσχετιστεί με το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο που επάγεται από τοξικά ιοντικά κανάλια (Samara et al., 2008; Toth et al., 2007). Για να επέμβουμε στη διαδικασία της αυτοφαγίας, καταστήσαμε την έκφραση του γονιδίου *bec-1*, ενός κύριου γονιδίου που εμπλέκεται στη βιογένεση των αυτοφαγοσωμάτων. Τα ζώα που εκτέθηκαν σε *bec-1(RNAi)* δεν έδειξαν αύξηση της επιβίωσης μετά από θερμοπληξία (Εικόνα 2, Β). Αντιθέτως, μεταλλαγές στην πρωτεΐνη calreticulin η οποία εντοπίζεται στο ER, δεσμεύει  $Ca^{2+}$  και απαιτείται για το νεκρωτικό θάνατο που επάγεται από υπερδιέγερση των *degenerins*, οδήγησαν σε καταστολή του θανάτου που επάγεται από θερμοπληξία (Εικόνα 2, Γ). Συλλογικά, αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι ο τύπος του θανάτου που ακολουθείται μετά από θερμοπληξία στον *C. elegans* είναι η νέκρωση.



**Εικόνα 2 Η απόπτωση και η αυτοφαγία δεν συμμετέχουν στον θάνατο που προκαλείται από θερμοπληξία.** (Α) Επιβίωση των *ced-3(n717)* μεταλλαγμένων στελεχών μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας, συγκριτικά με ζώα αγρίου τύπου ( $n \approx 250$  ζώα/ομάδα;  $P=0.5555$ , unpaired  $t$ -test). (Β) Επιβίωση ζώων με διαταραχή στην αυτοφαγία μετά από έκθεση σε *bec-1(RNAi)*, συγκριτικά με ζώα που εκτέθηκαν σε άδειο φορέα ( $n \approx 250$  ζώα/ομάδα;  $P=0.4952$ , unpaired  $t$ -test). (Γ) Επιβίωση των μεταλλαγμένων ζώων *crt-1(jh101)* μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας συγκριτικά με ζώα αγρίου τύπου ( $n \approx 350$  ζώα/ομάδα;  $P=0.0006$ , unpaired  $t$ -test). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

## 2. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ (heat shock response pathway) προστατεύει από τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από θερμοπληξία

Έχει δειχθεί προηγουμένως σε μοντέλα θερμοπληξίας ποντικού και αρουραίου ότι η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ (heat shock preconditioning) αυξάνει την έκφραση της HSP72 σε πολλά όργανα και προστατεύει από την εγκεφαλική ισχαιμία, τη βλάβη των νευρώνων, το οξειδωτικό στρες και το θάνατο των ζώων μετά από θερμοπληξία (Lee et al., 2006; Wang et al., 2005; Yang and Lin, 1999; Yang et al., 1998). Παρόλα αυτά, ο μηχανισμός κυτταρικής προστασίας μετά από την προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ παραμένει άγνωστος. Για να ελέγξουμε εάν στη δική μας πειραματική πλατφόρμα η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ έχει το ίδιο

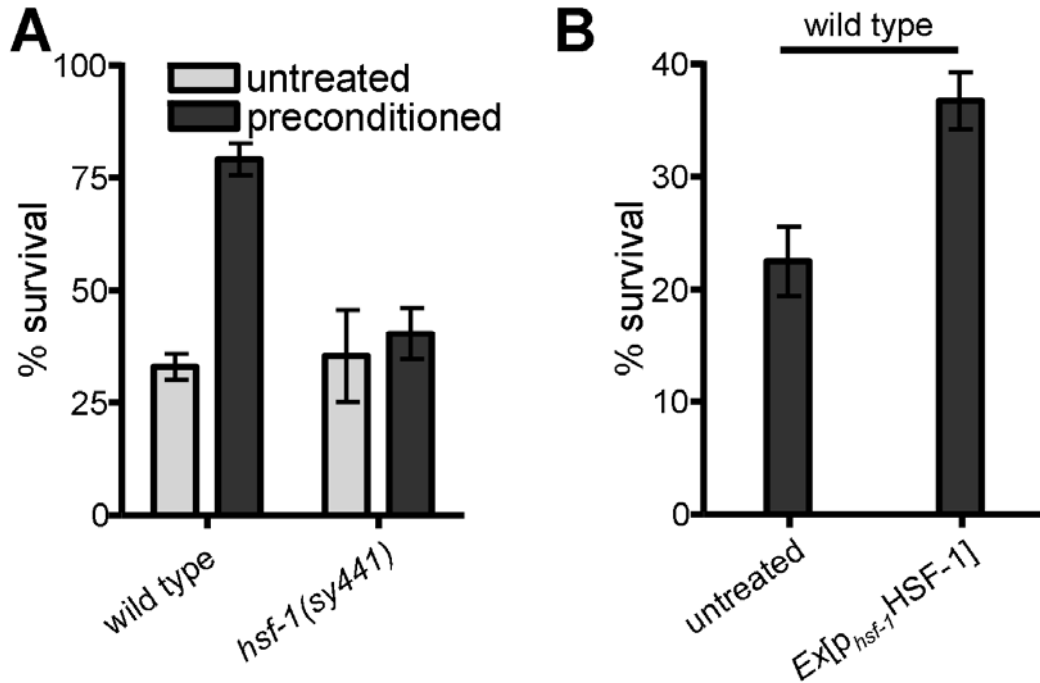
προστατευτικό ρόλο, επωάζουμε τα ζώα στους 34°C προκειμένου να ενεργοποιήσουμε το μονοπάτι. Οι συνθήκες αυτές δεν προκαλούν καμία μορφολογική αλλαγή στα ζώα (Εικόνα 1, A, v) Μετά από μια περίοδο ανάκαμψης για 20 min στους 20°C εκθέτουμε τα ζώα σε συνθήκες θερμοπληξίας (39°C, 15 min). Τα ζώα που έχουν υποστεί προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ δείχνουν μεγάλη αύξηση στην επιβίωση (Εικόνα 3, A).

Το μονοπάτι απόκρισης σε θερμικό σοκ εννορηστώνεται από το μεταγραφικό παράγοντα heat shock factor 1 (HSF-1). Το γονιδίωμα του *C. elegans* κωδικοποιεί για ένα μόνο *hsf-1* γονίδιο. Η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ δεν είχε κανένα προστατευτικό ρόλο σε ζώα που φέρουν μια μεταλλαγμένη μορφή του HSF-1 στην οποία ο μεταγραφικός παράγοντας χάνει την περιοχή η οποία είναι απαραίτητη για την προσέλκυση άλλων μεταγραφικών παραγόντων (Εικόνα 3, A). Τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι η αποκτηθείσα θερμο-ανθεκτικότητα εξαρτάται από τον HSF-1. Τα ευρήματά μας αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα που δείχνουν ότι η αποκτηθείσα θερμο-ανθεκτικότητα ελατώνεται σε μεγάλο βαθμό στα *hsf-1* μεταλλαγμένα ζώα συγκριτικά με τα ζώα αγρίου τύπου (McColl et al., 2010). Είναι ενδιαφέρον ότι τα μεταλλαγμένα για το *hsf-1* γονίδιο ζώα δεν παρουσιάζουν καμία διαφορά στη θερμο-ανθεκτικότητα όταν συγκρίνονται με τα ζώα αγρίου τύπου υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε συμφωνία με προηγούμενες αναλύσεις (McColl et al., 2010). Αντίθετα, υπερ-έκφραση του HSF-1 οδήγησε σε αύξηση της επιβίωσης των ζώων που εκτέθηκαν σε θερμοπληξία (Εικόνα 3, B). Οι μελέτες αυτές αποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ, μέσω του μεταγραφικού παράγοντα HSF-1 είναι ένας δυναμικός καταστολέας της νέκρωσης που προκαλείται από θερμοπληξία.

Παρόλο που η υπερέκφραση του HSF-1 οδήγησε σε σημαντική αύξηση της επιβίωσης μετά από θερμοπληξία, η προστατευτική αυτή δράση ήταν μικρότερη συγκριτικά με αυτή που παρέχεται από την προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να οφείλεται στο ότι ο HSF-1 υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αρνητικού ελέγχου και έτσι η αύξηση των επιπέδων έκφρασης είναι πιθανό να



μην επαρκεί για την επίτευξη της πλήρους ενεργοποίησης των στόχων του παράγοντα αυτού.

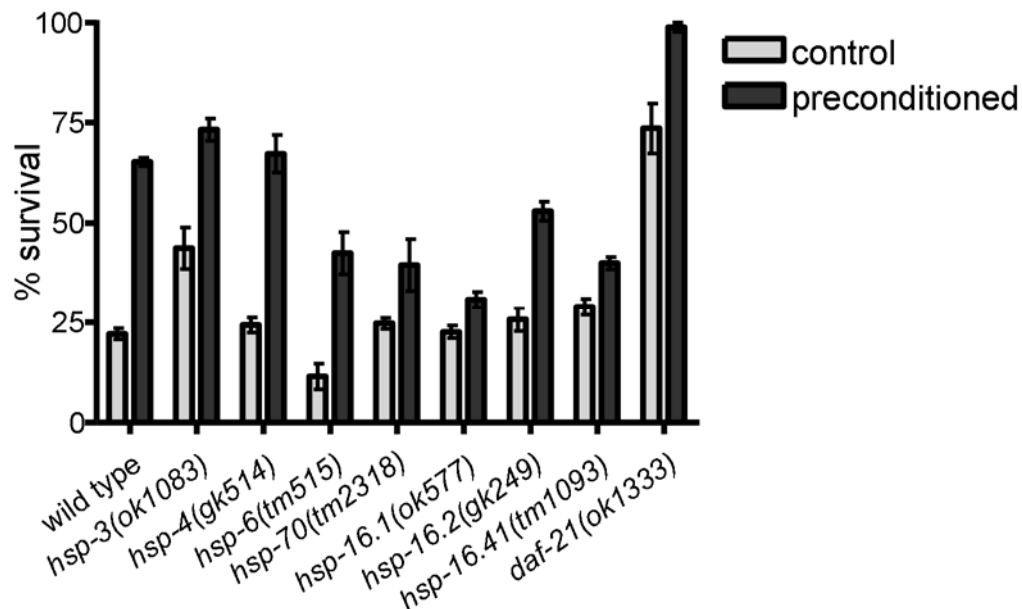


**Εικόνα 3 Η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ καταστέλλει το θάνατο που προκαλείται από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας.** (Α) Προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ μέσω επώασης στους 34°C για 30 min αύξησε την επιβίωση μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας. Στα μεταλλαγμένα ζώα *hsf-1(sy441)* η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ δεν προσδίδει ανθεκτικότητα σε μεταγενέστερη έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας (n≈500 ζώα/ομάδα;  $P=0.0959$ , 2wayANOVA). (Β) Υπερέκφραση του *hsf-1* καταστέλλει τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας (n≈500 ζώα/ομάδα;  $P=0.0119$ , unpaired *t*-test). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

### 3. Απώλεια της small heat shock protein HSP-16.1 οδηγεί σε καταστολή του προστατευτικού ρόλου της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ

Η σηματοδότηση μέσω του HSF-1 οδηγεί στην ενεργοποίηση πολλαπλών γονιδίων που κωδικοποιούν για σαπερόνες (chaperones). Για να ελέγξουμε ποιοι από τους στόχους του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ

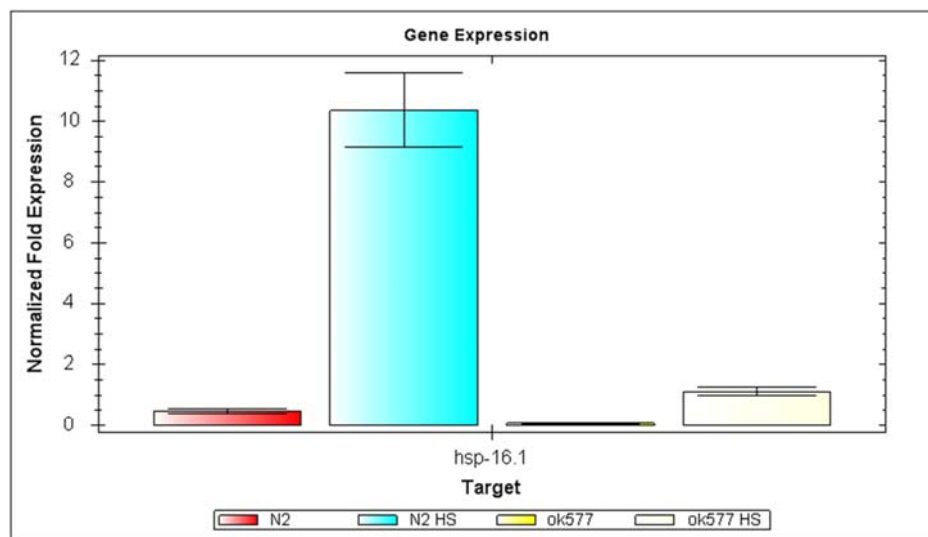
προάγουν την προστατευτική δράση της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ εξετάσαμε την επιβίωση διαφόρων στελεχών, μεταλλαγμένων για σαπερόνες, μετά από πειράματα προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ και έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας. Τα μεταλλαγμένα στελέχη που εξετάστηκαν ήταν αντιπροσωπευτικά για σαπερόνες που εκφράζονται διαρκώς ή μετά από έκθεση σε στρες και ανήκουν στις τρεις μεγάλες οικογένειες των HSPs: την οικογένεια των small heat shock proteins (*hsp-16.1(ok577)*, *hsp-16.2(gk249)*, *hsp-16.41(tm1093)*), την οικογένεια των Hsp70 (*hsp-3(ok1083)*, *hsp-4(gk514)*, *hsp-6(tm515)*, *hsp-70(tm2318)*) και την οικογένεια των Hsp90 (*daf-21(ok1333)*). Στα μεταλλαγμένα στελέχη *hsp-16.1(ok577)* η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ απέτυχε στο να παρέχει προστασία ενάντια στην ακολουθούμενη θερμοπληξία (Εικόνα 4). Συμπεραίνουμε ότι το γονίδιο *hsp-16.1* είναι απαραίτητο για το προστατευτικό ρόλο της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ.



**Εικόνα 4** Η προστατευτική δράση της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ καταστέλλεται σε μεγάλο βαθμό στα μεταλλαγμένα ζώα *hsp-16.1(ok577)*. Έκθεση μεταλλαγμένων ζώων αντιπροσωπευτικών για τις τρεις μεγάλες οικογένειες των HSPs σε συνθήκες θερμοπληξίας με ή χωρίς προ-ενεργοποίηση του

μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ (για τα *hsp-16.1(ok577)* μεταλλαγμένα ζώα,  $n \approx 700$  ζώα/ομάδα,  $P=0.0533$ , 2wayANOVA). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

Επιβεβαιώσαμε την έλλειψη προϊόντος στα μεταλλαγμένα ζώα *hsp-16.1(ok577)* με την τεχνική της Real-Time PCR (Εικόνα 5)



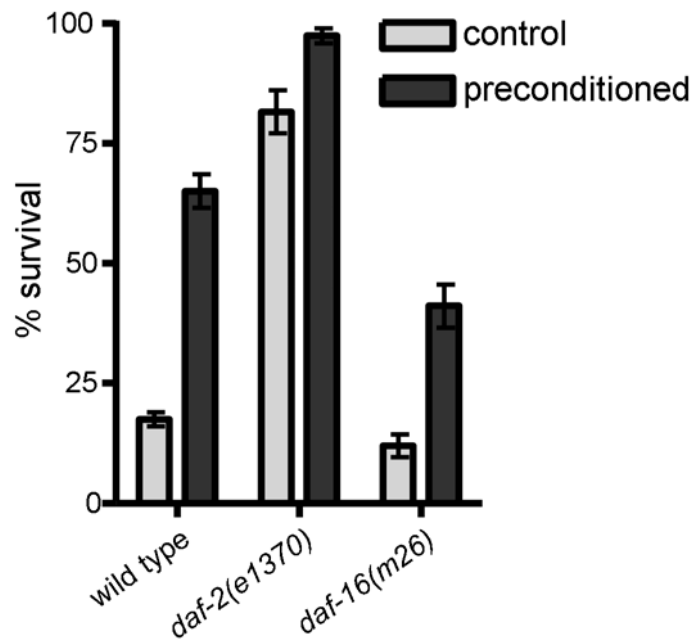
**Εικόνα 5** Ανίχνευση των επιπέδων mRNA της *hsp-16.1* με την τεχνική Real-Time PCR.

Η έκφραση της *hsp-16.1* είναι ελάχιστη υπό κανονικές συνθήκες, ενώ εμφανίζει μεγάλη αύξηση μετά από επώαση στους 34°C. Αντίθετα, στα ζώα που φέρουν το αλληλόμορφο *ok577*, η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ δεν προκαλεί αύξηση της έκφρασης της *hsp-16.1*

#### 4. Μελέτη του μεταγραφικού δικτύου που ρυθμίζει την ανθεκτικότητα σε συνθήκες θερμοπληξίας μετά την ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ

Προηγούμενα είχε δειχθεί ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες DAF-16 και HSF-1 οδηγούν σε συνεργατική αύξηση του προσδόκιμου ζωής, τουλάχιστον εν μέρει με το να αυξάνουν την έκφραση των sHSP (Hsu et al., 2003). Μεταλλαγές στο γονίδιο *daf-2*, το οποίο κωδικοποιεί για έναν υποδοχέα ινσουλίνης, εμποδίζουν το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης, από-καταστέλλουν τον DAF-16 και αυξάνουν το προσδόκιμο ζωής και την ανθεκτικότητα στο στρες (Lin, 1997). Ελέγξαμε εάν η διακοπή του μονοπατιού

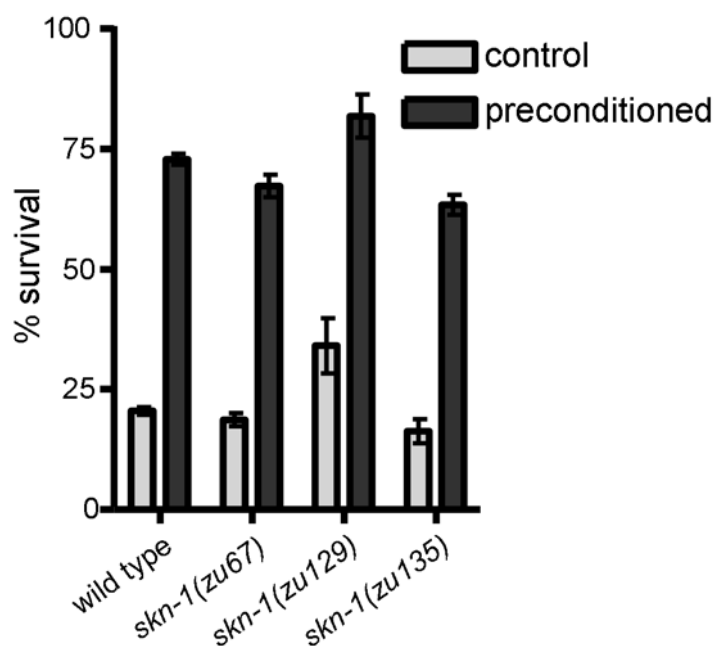
της ινσουλίνης παρέχει προστασία ενάντια στο θάνατο από θερμοπληξία. Τα μεταλλαγμένα στελέχη *daf-2(e1370)* δείχνουν εξαιρετικά αυξημένη επιβίωση μετά από θερμοπληξία (Εικόνα 6). Παρατηρήσαμε σχεδόν πλήρη καταστολή του θανάτου στα μεταλλαγμένα στελέχη *daf-2(e1370)* μετά από προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ. Σε αντίθεση, στα μεταλλαγμένα στελέχη *daf-16(m26)* τα επίπεδα επιβίωσης μετά από θερμοπληξία ήταν παρόμοια με αυτά των ζώων αγρίου τύπου, ενώ η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ και σε αυτή την περίπτωση παρείχε ισχυρή προστασία, σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές (Cypser and Johnson, 2002; McColl et al., 2010). Η έκφραση αρκετών γονιδίων που ενεργοποιούνται από θερμότητα, συμπεριλαμβανομένης της *hsp-16.1* αυξάνεται έντονα σε ζώα με μειωμένη ενεργότητα του *daf-2* (Murphy et al., 2003). Σε μια πρόσφατη αναφορά, δείχθηκε ότι η θερμοανθεκτικότητα των μεταλλαγμένων στελεχών με μειωμένη σηματοδότηση του μονοπατιού ινσουλίνης δεν εξαρτάται από μεταγραφική ενεργοποίηση λόγω στρες αλλά απαιτεί τη μετάφραση συγκεκριμένων mRNAs (McColl et al., 2010). Τα αποτελέσματά μας από τις δοκιμασίες προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ είναι σε συμφωνία με τη συνεργατική δράση των DAF-16 και HSF-1 στον υποκινητή της *hsp-16.1*, όπως προτείνεται από την ομάδα της Cynthia Kenyon (Hsu et al., 2003). Το θερμικό σοκ επάγει τη μετακίνηση του DAF-16 στον πυρήνα (Henderson and Johnson, 2001). Παρόλα αυτά, στα μεταλλαγμένα ζώα *hsf-1(sy441)* (Hajdu-Cronin et al., 2004), απουσία λειτουργικού HSF-1, ο προστατευτικός ρόλος της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ ενάντια της θερμοπληξίας καταστέλλεται. Κάτι τέτοιο υποδεικνύει ότι ο HSF-1 απαιτείται για την προστατευτική δράση της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ.



**Εικόνα 6. Αποκαταστολή του μεταγραφικού παράγοντα DAF-16 οδηγεί σε αυξημένη θερμοανθεκτικότητα.** Τα *daf-2* μεταλλαγμένα ζώα δείχνουν αυξημένη θερμοανθεκτικότητα η οποία εξαρτάται από το *daf-16* (n≈450 ζώα). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε εάν ο SKN-1 ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζεται από το μονοπάτι της ινσουλίνης (Tullet et al., 2008) συμμετέχει στο μεταγραφικό δίκτυο που ενορχηστρώνει την προστατευτική δράση της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ. Οι μεταλλαγές που περιγράφονται από τα αλληλόμορφα *zu67*, *zu129* και *zu135* δημιουργούν πρόωρα σινιάλα τερματισμού στον SKN-1. Κάθε ένα από τα τρία *skn-1* αλληλόμορφα που εξετάστηκαν έδωσαν αυξημένα επίπεδα επιβίωσης έναντι της θερμοπληξίας μετά από προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ, παρόμοια με τα ζώα αγρίου τύπου (Εικόνα 7). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο SKN-1 δεν εμπλέκεται στη μεταγραφική ενεργοποίηση των προστατευτικών γονιδίων που ενεργοποιούνται μετά από προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ. Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί με προηγούμενα αποτελέσματα που δείχνουν ότι η αυξημένη έκφραση των γονιδίων απόκρισης σε θερμικό στρες παρουσία οξειδωτικού στρες δεν εξαρτάται από τον παράγοντα SKN-1 (Park et al., 2009). Επίσης, ανάλυση των γονιδίων που ενεργοποιούνται

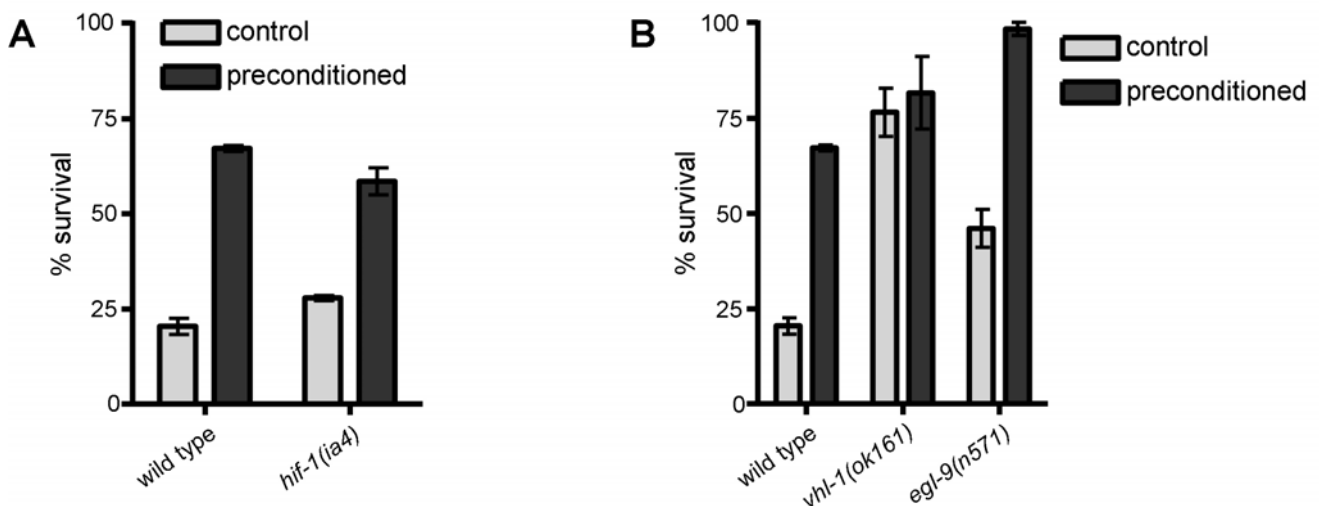
παρουσία της χημικής ουσίας juglone δεν αποκάλυψε θέσεις πρόσδεσης του SKN-1 στον υποκινητή της *hsp-16.1* (Przybysz et al., 2009). Ωστόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες ο SKN-1 ενεργοποιεί το *hsp-17* γονίδιο (Oliveira et al., 2009).



**Εικόνα 7** Ο μεταγραφικός παράγοντας SKN-1 δε συμμετέχει στο μεταγραφικό δίκτυο που ρυθμίζει την επίκτητη θερμοανθεκτικότητα.  $n \approx 300$  ζώα,  $P = 0.8248$ , 2wayANOVA. Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

Έχει παρατηρηθεί προηγουμένως ότι ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 ο οποίος επάγεται σε συνθήκες υποξίας έχει σημαντικό ρόλο στον εγκλιματισμό σε υψηλές θερμοκρασίες (heat acclimation) (Treinin et al., 2003). Για να εξετάσουμε εάν ο HIF-1 συμμετέχει στον προστατευτικό ρόλο της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ, χρησιμοποιήσαμε τα μεταλλαγμένα ζώα *hif-1(ia4)* στα οποία το μεγαλύτερο μέρος του γονιδίου λείπει. Η επιβίωση των ζώων αυτών μετά από έκθεση σε θερμοπληξία δεν έδειξε καμία διαφορά συγκριτικά με τα ζώα αγρίου τύπου (Εικόνα 8, A). Επιπρόσθετα, η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ αύξησε την επιβίωση των *hif-1(ia4)* ζώων. Το αποτέλεσμα

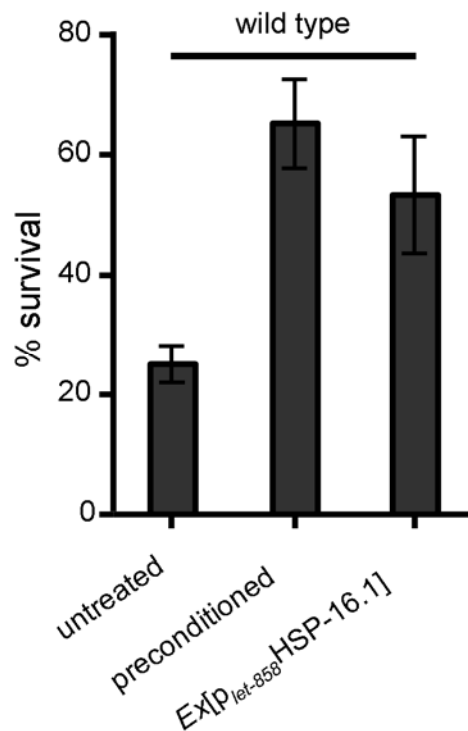
αυτό υποδηλώνει ότι ο προστατευτικός ρόλος της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ δεν εξαρτάται από τον HIF-1. Είναι ενδιαφέρον ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη *egl-9(n571)* και *vhl-1(ok161)* στα οποία το *hif-1* υπερεκφράζεται διαρκώς, δείχνουν αυξημένη επιβίωση μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας (Εικόνα 8, Β). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενη αναφορά ότι τα ζώα αυτά έχουν αυξημένη θερμοανθεκτικότητα (Treinin et al., 2003). Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο HIF-1 δε συμμετέχει στους γρήγορους κυτταρικούς μηχανισμούς που οδηγούν στον προστατευτικό ρόλο της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ, αλλά η διαρκής υπερέκφραση του HIF-1 στα μεταλλαγμένα στελέχη *egl-9(n571)* και *vhl-1(ok161)* αυξάνει τη θερμοανθεκτικότητα. Η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ αυξάνει περαιτέρω την επιβίωση στα *egl-9(n571)* ζώα.



**Εικόνα 8** Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 δε συμμετέχει στο μεταγραφικό πρόγραμμα το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα σε συνθήκες θερμοπληξίας μετά την ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ. (A) Τα μεταλλαγμένα ζώα *hif-1(ia4)* έχουν παρόμοια συμπεριφορά με τα ζώα αγρίου τύπου στην έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας με ή χωρίς ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ ( $n \approx 300$  ζώα,  $P=0.7829$ , 2wayANOVA). (B) Στα μεταλλαγμένα στελέχη *vhl-1(ok161)* και *egl-9(n571)* στα οποία ο HIF-1 υπερεκφράζεται διαρκώς η θερμοανθεκτικότητα είναι αυξημένη ( $n \approx 300$  ζώα,  $P=0.0074$ , 2wayANOVA). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

## 5. Η HSP-16.1 παρέχει προστασία έναντι του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου στο μοντέλο θερμοπληξίας του *C. elegans*

Εφόσον αποδείξαμε ότι η HSP-16.1 είναι απαραίτητη για την προστατευτική δράση της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ, ρωτήσαμε στη συνέχεια εάν η υπερέκφραση της *hsp-16.1* είναι επαρκής για να προστατέψει από το θάνατο που επάγεται από θερμοπληξία, παρακάμπτοντας την εξαρχής ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ μέσω προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ. Δημιουργήσαμε διαγονιδιακά ζώα που υπερεκφράζουν την *hsp-16.1* σε όλους τους ιστούς υπό τον υποκινητή του γονιδίου *let-858*. Είναι ενδιαφέρον ότι η γενική υπερέκφραση της HSP-16.1 προστατεύει τα ζώα από τη θερμοπληξία (Εικόνα 9). Αυτό το αποτέλεσμα δηλώνει ότι η HSP-16.1 είναι ικανή να καταστείλει το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από ακραία θερμοκρασία.



**Εικόνα 9** Επιπλέον αντίγραφα της *hsp-16.1* προσδίδουν ανθεκτικότητα ενάντια στις συνθήκες θερμοπληξίας. Υπερέκφραση της *hsp-16.1* αυξάνει την επιβίωση, παρακάμπτοντας την εξαρχής ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ



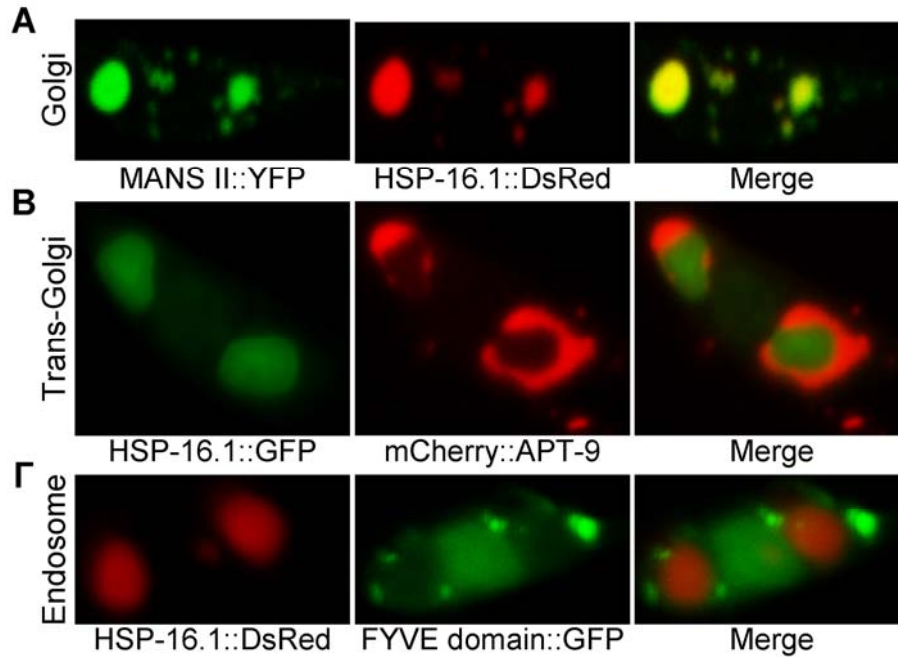
μέσω επώασης στους 34°C (n≈500 ζώα/ομάδα, P=0.0010, unpaired t-test). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

## 6. Η HSP-16.1 εντοπίζεται ειδικά στο μέσο Golgi (medial Golgi)

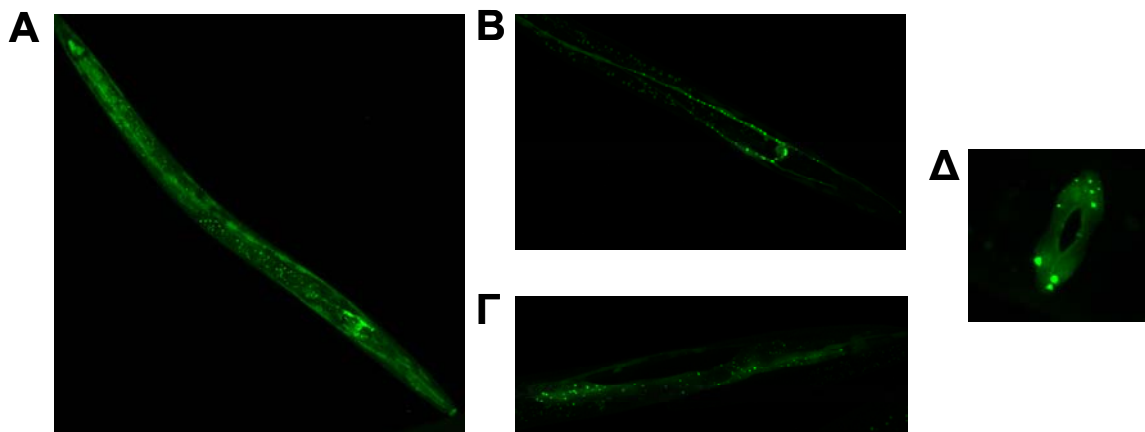
Στον άνθρωπο, η δυσλειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος, μαζί με την υπερθερμία πρέπει να συνυπάρχουν για τη διάγνωση της θερμοπληξίας (Bouchama and Knochel, 2002). Για να μελετήσουμε τα αποτελέσματα της θερμοπληξίας στο νευρικό σύστημα του *C. elegans* και να διερευνήσουμε τους μηχανισμούς της προστατευτικής δράσης της *hsp-16.1*, εστίασαμε στους έξι νευρώνες του ζώου οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αντίληψη ήπιων ερεθισμάτων. Οι HSPs εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια, τα περοξισώματα, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα λυσοσώματα και τα στοιχεία του κυτταροσκελετού (Bukau and Horwich, 1998; Duverger et al., 2004; Ellgaard and Helenius, 2001; Gyrd-Hansen et al., 2004; Panasenکو et al., 2003).

Για να κατανοήσουμε πώς η HSP-16.1 προστατεύει από τον νεκρωτικό θάνατο, μελετήσαμε τον υποκυττάριο εντοπισμό της. Η HSP-16.1 ενωμένη στο καρβοξυτελικό της άκρο με GFP ή DsRed εντοπίζεται σε διακριτά κυτταροπλασματικά σημεία στα σώματα των νευρώνων-μηχανοϋποδοχέων. Ο εντοπισμός της HSP-16.1 έχει πλήρη επικάλυψη με την πρωτεΐνη-δείκτη για το Golgi  $\alpha$ -mannosidase II (Εικόνα 10, Α). Ωστόσο η HSP-16.1 δεν είχε κοινό πρότυπο έκφρασης με τις πρωτεΐνες-δείκτες για το trans-Golgi (APT-9) ή τα πρώιμα ενδοσώματα (FYVE περιοχή της EEA-1) (Εικόνα 10, Β, Γ).

Παρατήρηση των ζώων που φέρουν το διαγονίδιο  $p_{let-858}HSP-16.1::GFP$  έδειξε την ίδια σπικτή έκφραση σε όλους τους ιστούς του ζώου (Εικόνα 11). Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η sHSP HSP-16.1 εντοπίζεται ειδικά στο μέσο Golgi και επάγει τον προστατευτικό της ρόλο δρώντας σε αυτό το οργανίδιο.



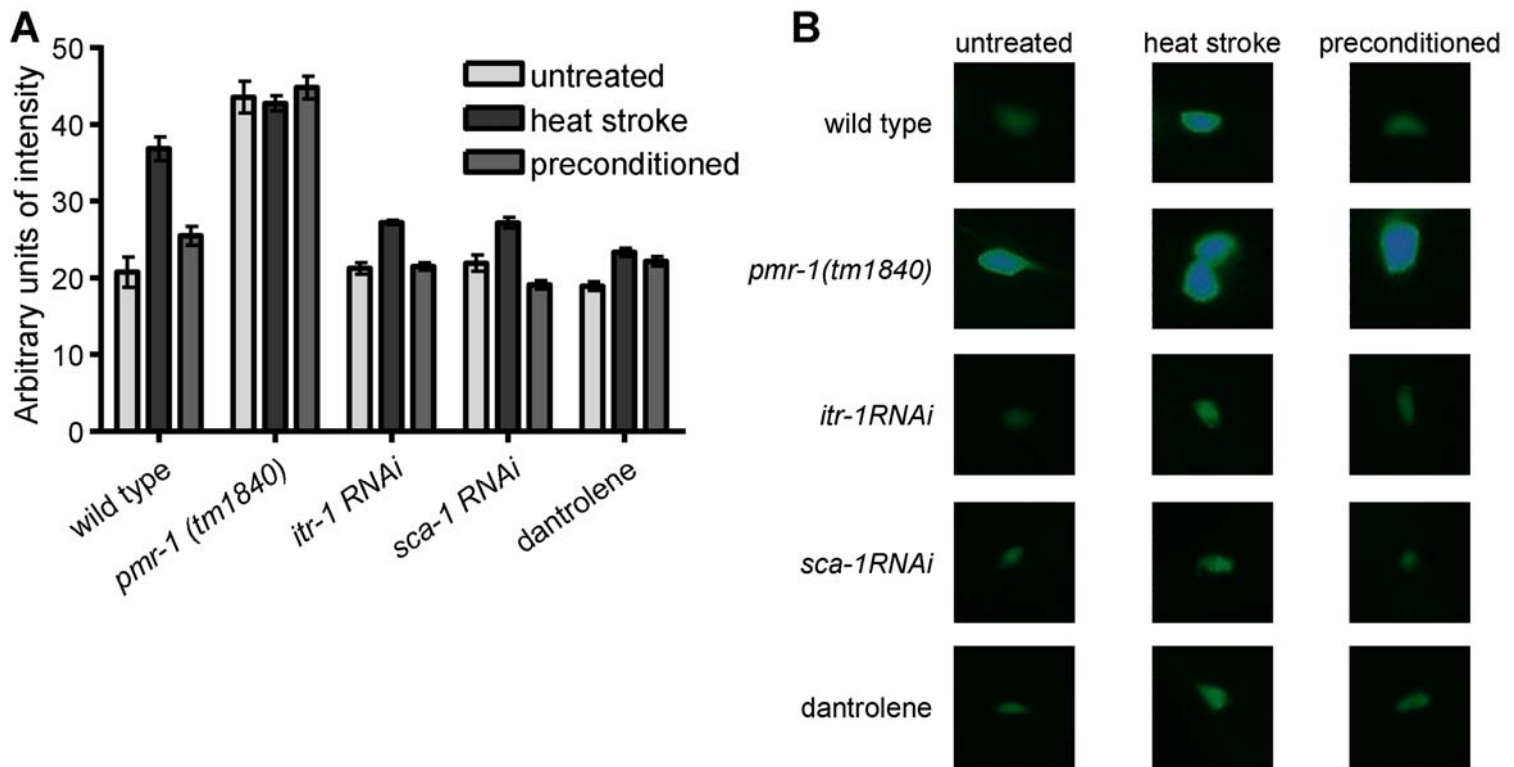
**Εικόνα 10.** Η HSP-16.1 εντοπίζεται ειδικά στο μέσο Golgi αλλά όχι στο σύστημα των ενδοσωμάτων. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο των σωμάτων των νευρώνων που είναι υπεύθυνοι για την αίσθηση ήπιων μηχανικών ερεθισμάτων και εκφράζουν φθορίζουσα HSP-16.1 μαζί με διαφορετικούς ενδοκυττάριους μάρτυρες. (A) Η HSP-16.1 συνεντοπίζεται με τον μάρτυρα του μέσου Golgi  $\alpha$ -Mannosidase II (MANS II). (B) Η HSP-16.1 δείχνει μόνο τμηματική αλληλεπικάλυψη με τον μάρτυρα του άπο-Golgi APT-9. (Γ) Η HSP-16.1 δε δείχνει κανένα συνεντοπισμό με τα πρώιμα ενδοσώματα (FYVE, μια περιοχή της EEA-1).



**Εικόνα 11.** Η έκφραση της HSP-16.1 υπό τον έλεγχο του γενικού υποκινητή  $p_{let-858}$  δίνει ένα σπικτό πρότυπο, χαρακτηριστικό της κατανομής των οργανιδίων Golgi στον οργανισμό. (A) Ολική άποψη ζώου σταδίου L4 (B) Έκφραση στο canal cell (Γ) Έκφραση στο έντερο (Δ) Έκφραση στη vulva

## **7. Τα επίπεδα κυτταροπλασματικού $Ca^{2+}$ επηρεάζονται διαφορετικά κατά τη θερμοπληξία και την προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ**

Το Golgi μαζί με το ER αποτελούν καλά χαρακτηρισμένες αποθήκες ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Lin et al., 1998; Martone et al., 1999; Pinton et al., 1998; Scherer et al., 1996; Southall et al., 2006; Wuytack et al., 2003). Ο ειδικός εντοπισμός της HSP-16.1 στο μέσο Golgi μας ώθησε να μελετήσουμε τα επίπεδα του κυτταροπλασματικού ασβεστίου μετά από θερμοπληξία και προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ. Για να παρακολουθήσουμε τα επίπεδα ασβεστίου χρησιμοποιήσαμε τον υποκινητή του γονιδίου *mec-17* ο οποίος είναι ειδικός για τους νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για την αντίληψη ήπιων ερεθισμάτων. Υπό τον υποκινητή αυτό εκφράσαμε το GCaMP2, ένα γενετικό ανιχνευτή ασβεστίου, η ένταση φθορισμού του οποίου αυξάνεται μετά από δέσμευση ασβεστίου (Nakai et al., 2001; Pologruto et al., 2004). Παρατηρήσαμε μια έντονη αύξηση της έντασης φθορισμού στα κυτταρικά σώματα των νευρώνων μετά από έκθεση των ζώων σε συνθήκες θερμοπληξίας, ενδεικτικό των αυξημένων επιπέδων ασβεστίου. Η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα φθορισμού, υποδεικνύοντας ότι το μονοπάτι αυτό προστατεύει από την αύξηση ασβεστίου που προκαλείται από τη θερμοπληξία (Εικόνα 12, A και B, wild type).



**Εικόνα 12** Γενετικοί ή φαρμακολογικοί χειρισμοί των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την ομοιόσταση ασβεστίου στο Golgi τροποποιούν τα επίπεδα απελευθέρωσης κυτταροπλασματικού ασβεστίου μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας. (A)

Επίπεδα φθορισμού των σωμάτων των νευρώνων αίσθησης ήπιων μηχανικών ερεθισμάτων μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας με ή χωρίς προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ. (B) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των νευρώνων μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας και ταυτόχρονη παρεμπόδιση της λειτουργίας των πρωτεϊνών ρύθμισης της ομοιόστασης του ασβεστίου στο Golgi. Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

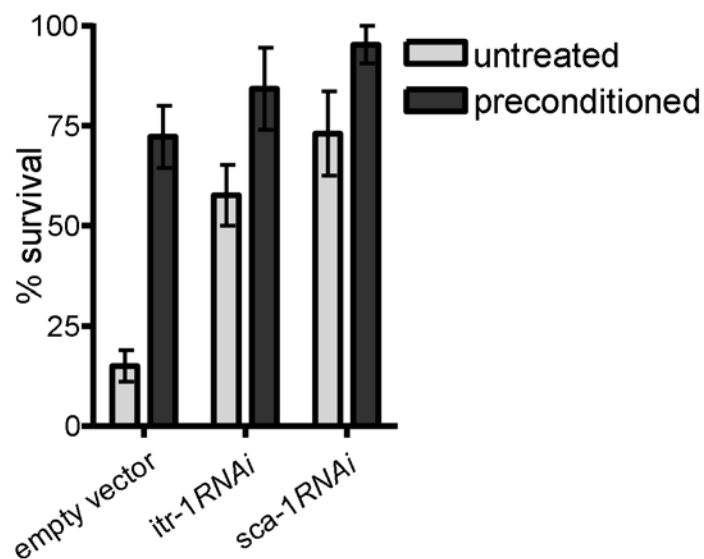
Εκτός από τον κλασικό τους ρόλο στην αναδίπλωση πρωτεϊνών, οι sHSPs έχουν βρεθεί συνδεδεμένες με μεμβράνες σε διάφορα *in vivo* και *in vitro* μοντέλα, από προκαρυωτικούς οργανισμούς μέχρι κύτταρα θηλαστικών (Adamska and Kloppstech, 1991; de Miguel et al., 2005; Delmas et al., 2001; Eisenberg-Domovich et al., 1994; Horvath et al., 1998; Lee et al., 1992; Lee et al., 2000; Nakagawa et al., 2001). Ο μεμβρανικός εντοπισμός των sHSPs φαίνεται ότι λειτουργεί ως ένας γενικός μηχανισμός για την προστασία της συνοχής της μεμβράνης σε καταστάσεις στρες (Horvath et al., 2008; Torok et al., 2001; Tsvetkova et al., 2002). Επίσης κατακερματισμός του Golgi έχει

παρατηρηθεί στην ασθένεια Alzheimer's (Baloyannis et al., 2004), την amyotrophic lateral sclerosis (Stieber et al., 1998), την ασθένεια Creutzfeldt-Jacob (Sakurai et al., 2000), την multiple system atrophy (Takamine et al., 2000), την ασθένεια Parkinson's (Fujita et al., 2006), την spinocerebellar ataxia type 2 (Huynh et al., 2003), καθώς και σε μη-νευρικά κύτταρα (Chiu et al., 2002; Lane et al., 2002; Machamer, 2003). Διερωτηθήκαμε εάν η ακραία θερμοκρασία προκαλεί αποδιοργάνωση και κατακερματισμό του Golgi, οδηγώντας σε μη-ελεγχόμενη απελευθέρωση ασβεστίου και εάν οι ιδιότητες σταθεροποίησης της μεμβράνης που φέρουν οι sHSPs διατηρούν τη συνοχή του Golgi, προστατεύοντας από τη μη-ελεγχόμενη απελευθέρωση ασβεστίου. Το Golgi παρατηρήθηκε *in vivo* σε διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν τον ειδικό για το Golgi μάρτυρα  $\alpha$ -mannosidase II, υπό την καθοδήγηση ενός υποκινητή που οδηγεί την έκφραση σε όλους τους νευρώνες. Καμία εμφανή διαφορά στη μορφολογία του Golgi δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των ζώων αναφοράς και αυτών που είχαν εκτεθεί σε συνθήκες θερμοπληξίας (τα αποτελέσματα αυτά δεν παραθέτονται). Συνεπώς, η συμμετοχή του Golgi στην αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού ασβεστίου συμβαίνει μέσω ενός άλλου μηχανισμού.

### **8. Η παρεμπόδιση της λειτουργίας των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ομοιόσταση του ασβεστίου στο Golgi έχει διαφορετικό αποτέλεσμα στην επιβίωση μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας**

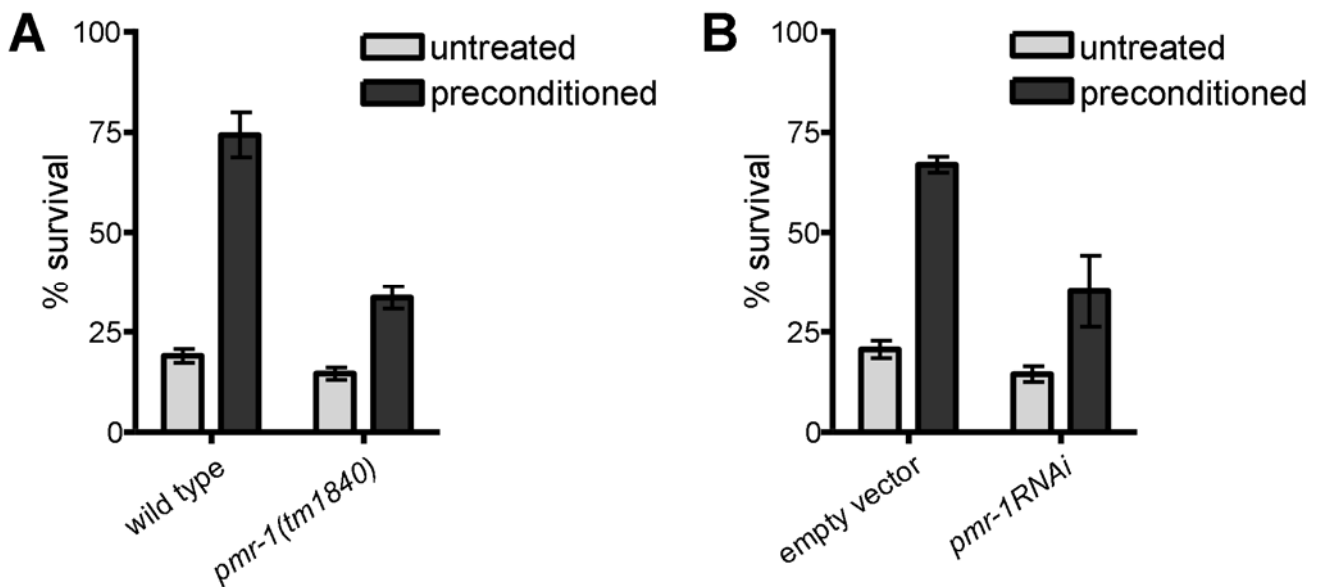
Στη συνέχεια μελετήσαμε τη συμμετοχή των επιμέρους πρωτεϊνών που παίζουν ρόλο στην ομοιόσταση του ασβεστίου στο Golgi στη διαμόρφωση των επιπέδων επιβίωσης μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας. Η συγκέντρωση ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα και στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα ελέγχεται με ακρίβεια από ένα δίκτυο καναλιών και αντλιών ασβεστίου. Η συγκέντρωση ασβεστίου στο Golgi πραγματοποιείται από δυο κατηγορίες αντλιών: την Sarco(Endo)plasmic-Reticulum  $Ca^{2+}$ -transport ATPases (SERCA) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *sca-1* στον *C. elegans* και την Secretory-Pathway  $Ca^{2+}$ -transport ATPases (SPCA). Οι SPCAs

μεταφέρουν επίσης  $Mn^{2+}$  (Mandal et al., 2000; Van Baelen et al., 2001). Παρουσία ενός μόνο αντιγράφου του ανθρώπινου γονιδίου *ATP2C1*, που κωδικοποιεί για την SPCA1, οδηγεί στην ασθένεια Hailey-Hailey η οποία χαρακτηρίζεται από φλύκταινες και διάβρωση του δέρματος (Hu et al., 2007; Sudbrak et al., 2000). Κερατινοκύτταρα από ασθενείς με Hailey-Hailey εμφανίζουν πιο αργούς ρυθμούς πρόσληψης ασβεστίου συγκριτικά με κερατινοκύτταρα από φυσιολογικούς δότες ενώ η μέγιστη τελική συγκέντρωση ασβεστίου είναι σημαντικά χαμηλότερη (Behne et al., 2003). Το SPCA1 ομόλογο του *C. elegans* είναι το *pmr-1* και η αντλία αυτή μπορεί να συσσωρεύει  $Ca^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  στο Golgi με μεγάλη ειδικότητα (Cho et al., 2005; Van Baelen et al., 2001). Επίσης, το Golgi και το ER έχουν τη δυνατότητα να απελευθερώνουν γρήγορα ασβέστιο μετά από διέγερση με αγωνιστές οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με την παραγωγή  $IP_3$  (Pinton et al., 1998). Ακόμη, υποδοχείς  $IP_3$  έχουν εντοπιστεί στο Golgi με τη χρήση αντισωμάτων (Lin, 1999). Ο υποδοχέας  $IP_3$  στον *C. elegans* κωδικοποιείται από το γονίδιο *itr-1* (Baylis et al., 1999). Εξετάσαμε τα αποτελέσματα της σίγισης με RNAi των γονιδίων *itr-1* και *sca-1* στην επιβίωση μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας (Εικόνα 13). Καταστολή της έκφρασης του παραπάνω καναλιού και αντλίας ασβεστίου οδήγησε σε αυξημένη επιβίωση μετά από θερμοπληξία συγκριτικά με τα ζώα αναφοράς. Η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ αύξησε περαιτέρω το προστατευτικό αποτέλεσμα από την καταστολή της έκφρασης των *itr-1* και *sca-1*.



**Εικόνα 13** Καταστολή της έκφρασης των γονιδίων *itr-1* και *sca-1* που ρυθμίζουν την ομοιόσταση του ασβεστίου στο Golgi οδηγεί σε αύξηση της επιβίωσης μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας. Η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ αυξάνει περαιτέρω την επιβίωση (n≈300 ζώα/ομάδα, P=0.0002). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

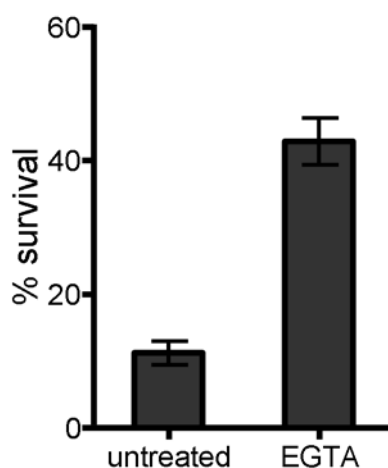
Αντίθετα, σε μεταλλαγμένα για την ειδική για το Golgi αντλία ασβεστίου *pmr-1* ζώα, ο προστατευτικός ρόλος της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ μειώνεται σε μεγάλο βαθμό. Καταστολή της έκφρασης του *pmr-1* με RNAi έχει παρόμοια αποτελέσματα (Εικόνα 14).



**Εικόνα 14** Η *pmr-1* μετάλλαξη (A) ή σίγισι (B) καταστέλλει την προστατευτική δράση της προ-ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ. (A) n≈800 ζώα/ομάδα, P<0.0001, 2wayANOVA (B) n≈400 ζώα/ομάδα, P<0.0001, 2wayANOVA. Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

Παρακολουθήσαμε στη συνέχεια τα επίπεδα ασβεστίου στα μεταλλαγμένα στελέχη *pmr-1(tm1840)* (Εικόνα 12, A και B, *pmr-1(tm1840)*). Παρατηρήσαμε ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες οι νευρώνες των *pmr-1* μεταλλαγμένων στελεχών εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ασβεστίου, σε

συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα που περιγράφουν ότι τα κερατινοκύτταρα από ασθενείς με Hailey-Hailey εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα κυτταροπλασματικού ασβεστίου συγκριτικά με τα κερατινοκύτταρα από φυσιολογικούς δότες (Hu et al., 2000). Ρωτήσαμε στη συνέχεια εάν τα υψηλά ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου υπό φυσιολογικές συνθήκες οδηγούν σε νέκρωση στα *pmr-1(tm1840)* ζώα. Μικροσκοπία με τη μέθοδο Nomarski δεν αποκάλυψε ύπαρξη νεκρωτικών κυττάρων στα *pmr-1* μεταλλαγμένα ζώα (τα αποτελέσματα αυτά δεν παραθέτονται) υποδηλώνοντας ότι επιπλέον σηματοδοτικά γεγονότα είναι απαραίτητα για την έναρξη της νέκρωσης. Η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ στα *pmr-1(tm1840)* ζώα δεν είχε καμία προστατευτική δράση έναντι της αύξησης των επιπέδων κυτταροπλασματικού ασβεστίου (Εικόνα 12, Α και Β, *pmr-1(tm1840)*). Συμπεραίνουμε ότι η αντλία ασβεστίου PMR-1 είναι απαραίτητη ώστε η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ να προσφέρει τον προστατευτικό της ρόλο. Ενδεικτικό του κεντρικού ρόλου των επιπέδων ασβεστίου στον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από θερμοπληξία είναι το γεγονός ότι παρουσία EGTA, ενός χηλικού παράγοντα ασβεστίου, τα ζώα εμφανίζουν προστασία από το θάνατο. Αύξηση της επιβίωσης μετά από φαρμακολογική δέσμευση του ασβεστίου τονίζει τη σημασία ελέγχου των επιπέδων του απελευθερωμένου ασβεστίου κατά τη θερμοπληξία.

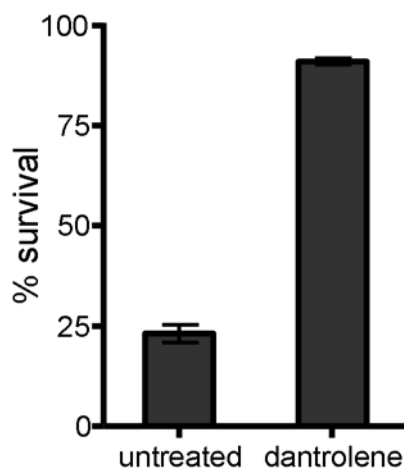


**Εικόνα 15** Ζώα τα οποία επωάζονται με EGTA δείχνουν αύξηση της επιβίωσης μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας.  $n \approx 300$  ζώα/συνθήκη;  $P = 0.0013$ , unpaired  $t$ -test. Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.



Παρατήρηση των επιπέδων ασβεστίου μετά από παρέμβαση με γενετικό ή φαρμακολογικό τρόπο στη λειτουργία των άλλων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ομοιοστάση του ασβεστίου στο Golgi, έδειξε μειωμένα επίπεδα κυτταροπλασματικού ασβεστίου μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας (Εικόνα 12, A και B, *itr-1 RNAi* και *sca-1 RNAi*). Αυτό είναι σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα μας για τον ευεργετικό ρόλο των χειρισμών των συγκεκριμένων πρωτεϊνών στην επιβίωση μετά από θερμοπληξία (Εικόνα 13).

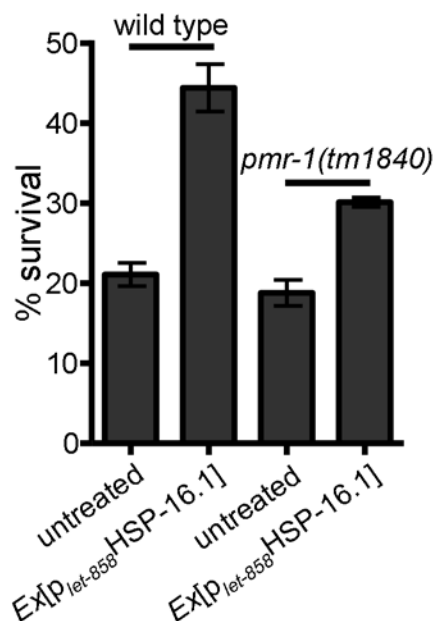
Μέχρι σήμερα κανένα φάρμακο δεν έχει κριθεί αποτελεσματικό στη βελτίωση της έκβασης των ασθενών μετά από θερμοπληξία. Οι υποδοχείς ρυανοδίνης (Ryanodine Receptors, RyRs) ρυθμίζουν την απελευθέρωση του ασβεστίου από ενδοκυτταρικές αποθήκες στο κυτταρόπλασμα. Εκτός από το ενδοπλασματικό δίκτυο, RyRs έχουν βρεθεί επίσης στο Golgi (Cifuentes et al., 2001; George et al., 2007; Lissandron et al., 2010). Η χημική ουσία dantrolene μειώνει ειδικά την απελευθέρωση ασβεστίου λόγω δέσμευσης στους RyRs. Η αποτελεσματικότητα της χρήσης dantrolene στη θεραπεία της θερμοπληξίας παραμένει αντιφατική (Amsterdam et al., 1986; Bouchama et al., 1991; Channa et al., 1990; Lydiatt and Hill, 1981; Moran et al., 1999; Tayeb and Marzouki, 1990; Watson et al., 1993; Zuckerman et al., 1997). Διερευνήσαμε εάν η dantrolene έχει προστατευτικό ρόλο στο μοντέλο θερμοπληξίας στον *C. elegans*. Για να ελέγξουμε την ιδέα αυτή, ζώα αγρίου τύπου, μεγαλωμένα σε πιάτα που περιέχουν dantrolene, εκτέθηκαν σε συνθήκες θερμοπληξίας. Η επιβίωση των ζώων που εκθέτονται σε dantrolene είναι αυξημένη (Εικόνα 16). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα επιβίωσης είναι και τα προηγούμενα αποτελέσματά που δείχνουν ότι παρουσία dantrolene τα επίπεδα ασβεστίου δεν αυξάνονται καταστροφικά μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας (Εικόνα 12, A και B, dantrolene). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ο έλεγχος της απελευθέρωσης ασβεστίου από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες ασβεστίου όπως το Golgi και το ER μπορεί να αποτελεί ένα δυναμικό θεραπευτικό στόχο για σοβαρές περιπτώσεις θερμοπληξίας.



**Εικόνα 16** Μείωση της απελευθέρωσης ασβεστίου από τους υποδοχείς ρυανοδίνης μετά από επώαση με dantrolene καταστέλλει το θάνατο μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας.  $n \approx 400$ ;  $P < 0.0001$ , unpaired  $t$ -test. Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

### **9. Η προστατευτική δράση της υπερέκφρασης της *hsp-16.1* χάνεται παρουσία μεταλλαγμένου για το *pmr-1* γενετικού υπόβαθρου**

Δεδομένου ότι σε μεταλλαγμένα για το γονίδιο *pmr-1* ζώα η προστασία που παρέχεται από την προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ καταστέλλεται, θελήσαμε να ελέγξουμε εάν ο προστατευτικός ρόλος της υπερέκφρασης της *hsp-16.1* επίσης χάνεται σε αυτό το γενετικό υπόβαθρο. Όντως, η προστασία που παρέχεται από επιπλέον αντίγραφα της *hsp-16.1* σε ζώα αγρίου τύπου, μειώνεται σε μεγάλο βαθμό στα *pmr-1(tm1840)* μεταλλαγμένα ζώα. Συμπεραίνουμε ότι η αντλία PMR-1 είναι ένα σημαντικό υπόστρωμα για την ευεργετική δράση της HSP-16.1 και ότι η παρουσία της είναι αναγκαία ώστε η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ να παρέχει τον προστατευτικό της ρόλο.

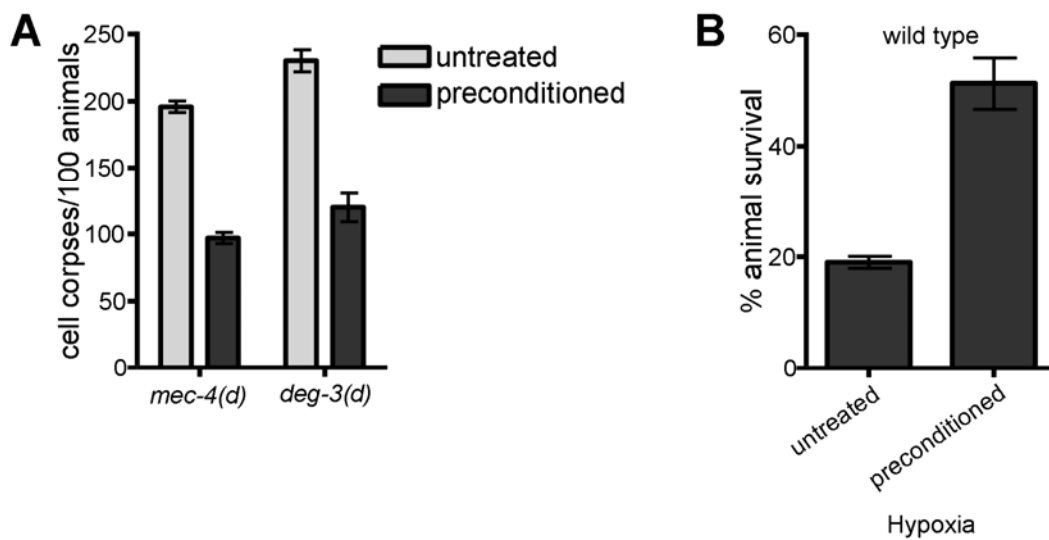


Εικόνα 17 Η *pmr-1* μεταλλαγή καταστέλλει τον προστατευτικό ρόλο της υπερέκφρασης της *hsp-16.1* ενάντια του θανάτου που προκαλείται από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας.  $n \approx 400$ ,  $P = 0.8827$ , 2wayANOVA. Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

#### 10. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ καταστέλλει τη νέκρωση που προκαλείται από ποικίλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες

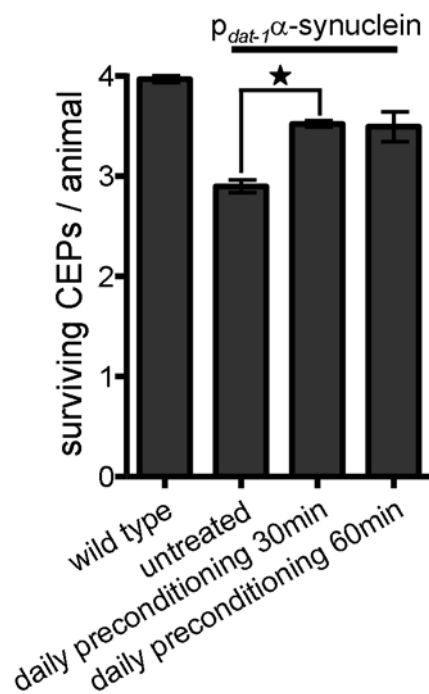
Έχοντας δείξει ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ προστατεύει από το νεκρωτικό θάνατο που προκαλείται από τη θερμοπληξία, θελήσαμε να ελέγξουμε τη γενικότητα του προστατευτικού αυτού ρόλου σε περιπτώσεις νέκρωσης που προκαλούνται από καλά χαρακτηρισμένους γενετικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ, με επώαση για 30 min στους 34°C, των αυγών ζώων που εκφράζουν το νευροτοξικό *mec-4(d)* αλληλόμορφο, κατέστειλε ισχυρά των εκφυλισμό των έξι νευρώνων που αισθάνονται ήπια μηχανικά ερεθίσματα, στο πρώτο στάδιο λάρβας (L1) (Εικόνα 18, A). Ομοίως, ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από το τοξικό αλληλόμορφο *deg-3(d)* και κωδικοποιεί για ένα υπερλειτουργικό υποδοχέα ακετυλοχολίνης ο οποίος εισάγει ιόντα ασβεστίου, καταστέλλεται μετά την ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ (Εικόνα 18, B).

Παράλληλα με τις γενετικές μεταλλαγές, παρατεταμένη υποξία, μια συνθήκη χαμηλής διαθεσιμότητας οξυγόνου που παρουσιάζεται κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και του εγκεφαλικού επάγει νεκρωτικό θάνατο στον *C. elegans* (Scott et al., 2002). Προ-επώαση των ζώων αγρίου τύπου στους 34°C για 30 min οδήγησε σε σημαντική αύξηση της επιβίωσης μετά από υποξία (Εικόνα 18, B). Συλλογικά, αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι το μονοπάτι απόκρισης στο θερμικό σοκ είναι ένας δυναμικός καταστολέας της νέκρωσης που επάγεται από διάφορους παράγοντες.



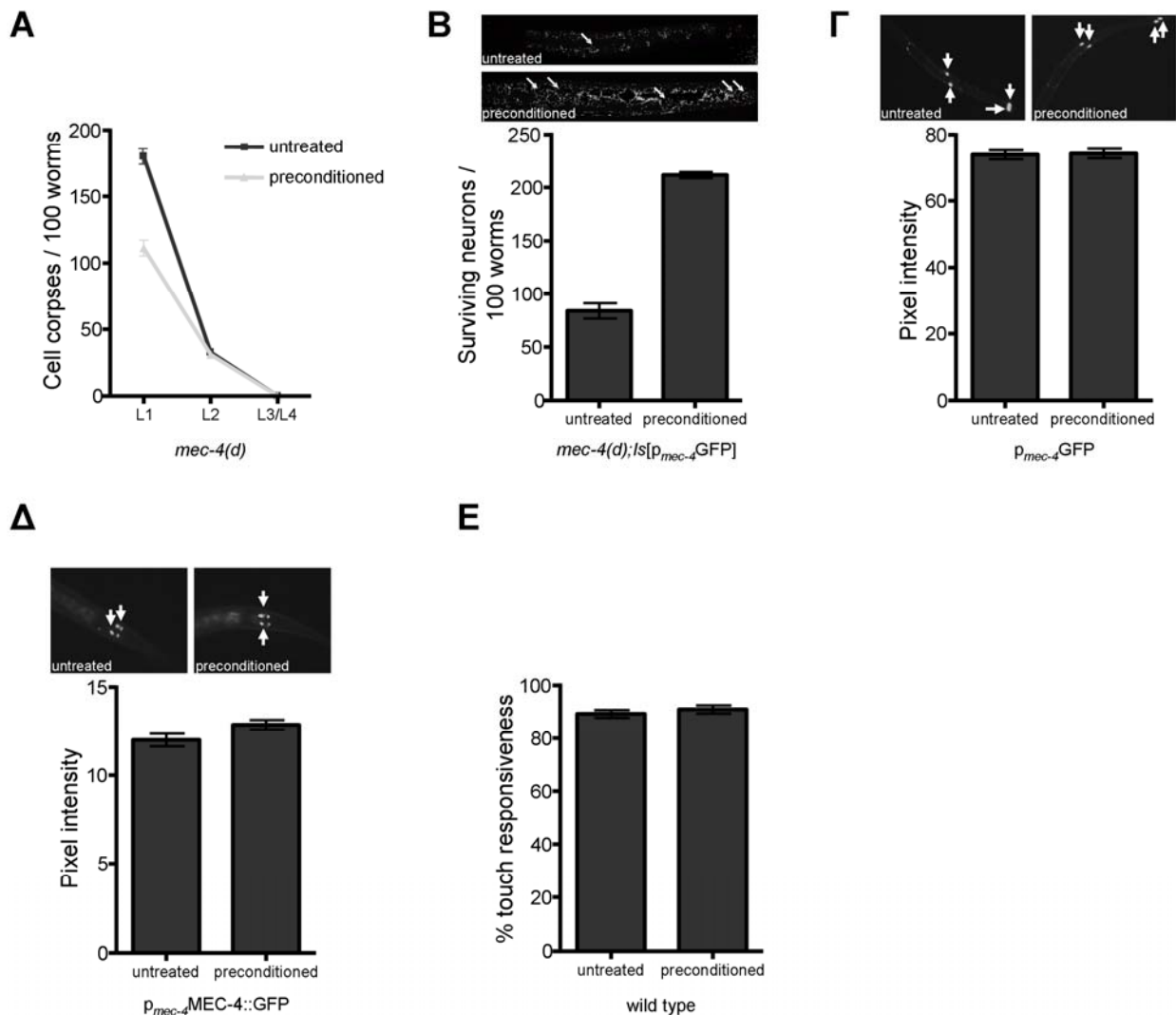
**Εικόνα 18 Η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ καταστέλλει το νεκρωτικό θάνατο που προκαλείται από τοξικά κανάλια και περιβαλλοντικούς παράγοντες στον *C. elegans*.** (A) Αριθμός των νευρικών νεκρών σωμάτων, στο L1 στάδιο, ανά 100 άτομα που φέρουν τα τοξικά αλληλόμορφα *mec-4(d)* ή *deg-3(d)* και έχουν εκκολαφθεί από αυγά που δεν έχουν υποστεί επώαση, ή αυγά που έχουν υποστεί θερμικό σοκ ( $n \approx 800$ ;  $P < 0.0001$ , unpaired  $t$ -test). Για τα *mec-4(d)* μεταλλαγμένα ζώα οι μπάρες δηλώνουν νεκρά σώματα των νευρώνων που ενεργοποιούνται από ήπια μηχανικά ερεθίσματα. Για τα *deg-3(d)* μεταλλαγμένα ζώα, οι μπάρες δηλώνουν τους Inner Labial 1 (IL1) αισθητήριους νευρώνες και τους PVC ενδιάμεσους νευρώνες. (B) Ποσοστό των ζώων που έχουν υποστεί ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ τα οποία επιβιώνουν από μια σχεδόν θανάσιμη έκθεση στο χημικό sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ;  $n \approx 900$ ;  $P < 0.001$ , unpaired  $t$ -test). Το sodium azide εμποδίζει τη λειτουργία του συμπλόκου IV της αναπνευστικής αλυσίδας και προκαλεί υποξία. Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

Στην ασθένεια Parkinson's, οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες στην περιοχή του εγκεφάλου substantia nigra pars compacta, πεθαίνουν όχι μέσω τυπικής απόπτωσης αλλά μέσω κυτταρικού θανάτου που φέρει επίσης χαρακτηριστικά νέκρωσης (Dawson and Dawson, 2003; Jellinger, 2000). Διερευνήσαμε εάν η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ καταστέλλει την απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων σε ένα μοντέλο ασθένειας Parkinson's στον *C. elegans* (Harrington et al., 2010). Προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ, μέσω καθημερινής επώασης στους 34°C για 30 ή 60 min οδήγησε σε σημαντική καταστολή της απώλειας των ντοπαμινεργικών νευρώνων κατά τη γήρανση του ζώου (Εικόνα 19).



**Εικόνα 19** Περιοδική ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ είναι ικανή να καταστείλει την απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων σε ένα μοντέλο της ασθένειας Parkinson's στον *C. elegans*. Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες του νηματώδη εκφράζουν  $\alpha$ -syn και εκφυλίζονται κατά τη γήρανση του ζώου. Κατά την πέμπτη μέρα της ενήλικης ζωής, τα περισσότερα ζώα έχουν χάσει νευρώνες που ανήκουν στην CEP (cephalic) ή/και στην ADE (anterior deirid) κατηγορία. Το μονοπάτι απόκρισης σε θερμικό σοκ ενεργοποιείται με καθημερινή επώαση στους 34°C για 30 ή 60 min ( $n \approx 150$  ζώα/ομάδα,  $P < 0.0001$ , 1wayANOVA). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

Πραγματοποιήσαμε μια σειρά πειραμάτων για να επιβεβαιώσουμε ότι η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ δεν επηρεάζει τον επαγωγέα της νέκρωσης, αλλά αντί αυτού, μπλοκάρει το νεκρωτικό θάνατο σε ένα μεταγενέστερο βήμα. Εστιαστήκαμε στο καλά χαρακτηρισμένο μοντέλο του νεκρωτικού θανάτου των έξι νευρώνων που αισθάνονται ήπια μηχανικά ερεθίσματα σε ζώα που φέρουν το τοξικό αλληλόμορφο *mec-4(d)*. Πραγματοποιήσαμε χρονική ανάλυση της νέκρωσης που επάγεται από το *mec-4(d)* σε όλα τα στάδια λάρβας του *C. elegans* (L1-L4). Δεν παρατηρήσαμε καμία μετακίνηση της κορυφής θανάτου σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια κάτι που θα σήμαινε καθυστέρηση στην έναρξη της νέκρωσης (Εικόνα 20, Α). Επιβεβαιώσαμε την επιβίωση των νευρώνων μέχρι το ενήλικο στάδιο ελέγχοντας για την έκφραση του  $p_{mec-4}GFP$  μάρτυρα, που είναι ειδικός για τους νευρώνες υποδοχής ήπιων μηχανικών ερεθισμάτων (Εικόνα 20, Β). Εξετάσαμε εάν η καταστολή της νέκρωσης που επάγεται από το *mec-4(d)* είναι απλή συνέπεια της μείωσης των επιπέδων έκφρασης του *mec-4(d)* ή αλλαγής της σταθερότητας και του σωστού μεμβρανικού εντοπισμού του τοξικού καναλιού. Ελέγξαμε τη μεταγραφή του *mec-4* μετά από θερμικό σοκ χρησιμοποιώντας τον μάρτυρα  $p_{mec-4}GFP$ . Δεν παρατηρήσαμε καμία αλλαγή στον αριθμό των φθοριζόντων κυττάρων ή την ένταση φθορισμού (Εικόνα 20, Γ). Επιπλέον, τα επίπεδα πρωτεΐνης και ο υποκυτταρικός εντοπισμός του MEC-4 δεν επηρεάστηκαν από το θερμικό σοκ σε ζώα που έφεραν τον μάρτυρα  $p_{mec-4}MEC-4::GFP$  (Εικόνα 20, Δ). Επίσης, εάν η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ επιδρά στη φυσιολογική λειτουργία του MEC-4 θα αναμέναμε τα ζώα αγρίου τύπου να φέρουν έναν μερικώς λειτουργικό μηχανοϋποδοχέα. Για να ελέγξουμε αυτή την ιδέα, εκθέσαμε σε συνθήκες θερμικού σοκ ζώα αγρίου τύπου και εξετάσαμε την απόκρισή τους σε ήπια μηχανικά ερεθίσματα. Τα ζώα στα οποία είχε γίνει προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ αποκρίνονται το ίδιο καλά στα μηχανικά ερεθίσματα με τα ζώα αναφοράς (Εικόνα 20, Ε). Συλλογικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι το μονοπάτι απόκρισης σε θερμικό σοκ είναι ένας δυναμικός καταστολέας της νέκρωσης η οποία επάγεται από διάφορους παράγοντες και δρα σε βήμα μεταγενέστερο της έναρξης της νέκρωσης.



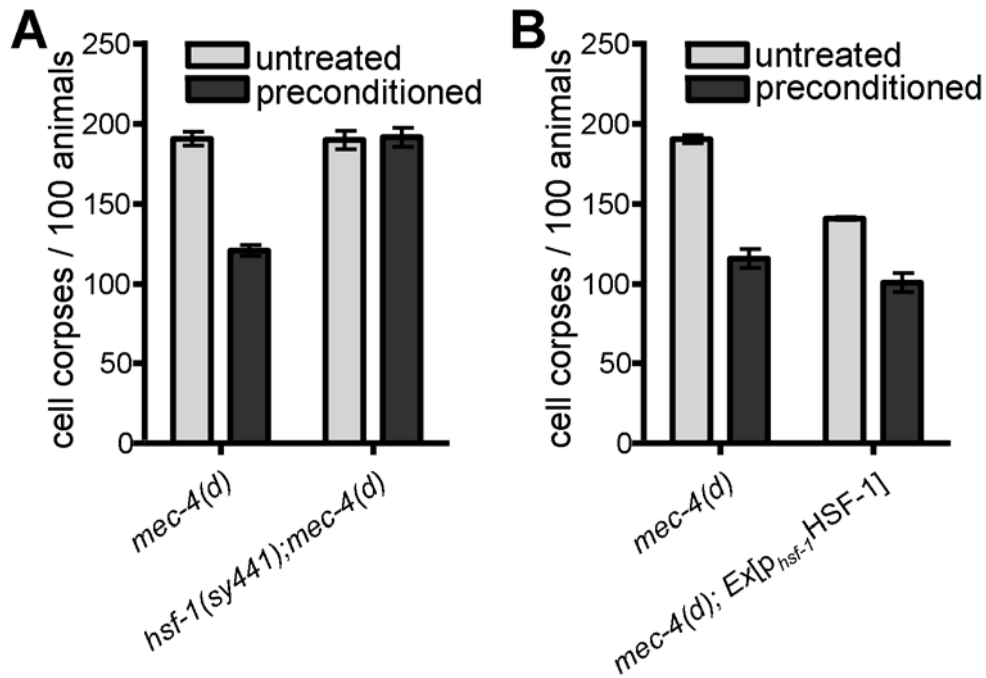
**Εικόνα 20 Η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ δεν επηρεάζει το αναρκτήριο σήμα της νέκρωσης.** (Α) Χρονική ανάλυση του νεκρωτικού θανάτου που επάγεται από το *mec-4(d)* σε ζώα που έχουν υποστεί θερμικό σοκ. Απεικονίζεται ο αριθμός των κυτταρικών πτωμάτων των νευρώνων που ενεργοποιούνται από ήπια μηχανικά ερεθίσματα, στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια, ανά 100 άτομα ( $n \approx 300$ ;  $P = 0.7348$ , unpaired *t*-test). (Β) Επιβίωση των νευρώνων *mec-4(d)* ζώων που έχουν υποστεί ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ και εκφράζουν το διαγονίδιο  $p_{mec-4}::GFP$ , σε προχωρημένα αναπτυξιακά στάδια ( $n \approx 300$ ;  $P < 0.0001$ , unpaired *t*-test). Τα ζώα δέχονται ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ στο στάδιο του αυγού και στη συνέχεια αναπτύσσονται στους 26°C μέχρι το L4 αναπτυξιακό στάδιο. (Γ) Ένταση φθορισμού των νευρώνων ζώων αγρίου τύπου τα οποία εκφράζουν το διαγονίδιο  $p_{mec-4}::GFP$  μετά από ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ ( $n = 30$ ;  $P = 0.8593$ , unpaired *t*-test). (Δ) Ένταση φθορισμού των νευρώνων που εκφράζουν μεταφραστική σύντηξη του *mec-4* στη GFP σε ζώα που έχουν υποστεί ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ ( $n = 30$ ;  $P = 0.0632$ , unpaired *t*-test). Η μεμβρανική κατανομή του καναλιού δεν παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των ζώων ελέγχου και αυτών που έχουν υποστεί θερμικό σοκ. (Ε) Απόκριση

των ζώων αγρίου τύπου που έχουν υποστεί ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ σε πέντε διαδοχικά ήπια μηχανικά ερεθίσματα στο κεφάλι και την ουρά ( $n=250$ ;  $P=0.4734$ , unpaired  $t$ -test). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M σε όλα τα πειράματα.

### 11. Ο HSF-1 απαιτείται για τον προστατευτικό ρόλο του θερμικού σοκ

Η επαγωγή της απόκρισης σε θερμικό σοκ είναι μια βαθμιδωτή διαδικασία που περιλαμβάνει τη μετατροπή των μονομερών του HSF-1 σε τριμερή που εντοπίζονται στον πυρήνα, τη δέσμευση του DNA, τη μεταγραφή των γονιδίων που φέρουν τα στοιχεία αναγνώρισης του HSF-1 (Heat Shock Elements, HSEs) και την παύση της μεταγραφής με ακόλουθη μετατροπή σε μορφή μονομερούς (Morimoto, 1998; Wu, 1995). Εάν το μονοπάτι αυτό σταματήσει σε ένα πολύ αρχικό στάδιο, το προστατευτικό αποτέλεσμα της αυξημένης θερμοκρασίας αναμένουμε ότι θα χαθεί. Για να ελέγξουμε την ιδέα αυτή χρησιμοποιήσαμε τα *hsf-1(sy441)* μεταλλαγμένα ζώα στα οποία το κομμάτι του μεταγραφικού παράγοντα που ευθύνεται για τη στρατολόγηση άλλων μεταγραφικών παραγόντων λείπει. Το θερμικό σοκ δεν είχε καμία προστατευτική δράση στα διπλά μεταλλάγματα *hsf-1(sy441);mec-4(d)* (Εικόνα 21, A). Η υπερέκφραση του *hsf-1* αυξάνει το προσδόκιμο ζωής στον *C. elegans* (Hsu et al., 2003; Morley and Morimoto, 2004). Είναι ενδιαφέρον ότι, τα *mec-4(d)* ζώα τα οποία φέρουν επιπλέον αντίγραφα του *hsf-1* εμφανίζουν μειωμένο νεκρωτικό θάνατο χωρίς την ανάγκη για ενεργοποίηση του μονοπατιού του θερμικού σοκ με έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία (Εικόνα 21, B). Συμπεραίνουμε ότι τα επίπεδα του HSF-1 είναι κριτικής σημασίας για τον προστατευτικό ρόλο του θερμικού σοκ απέναντι στη νέκρωση.



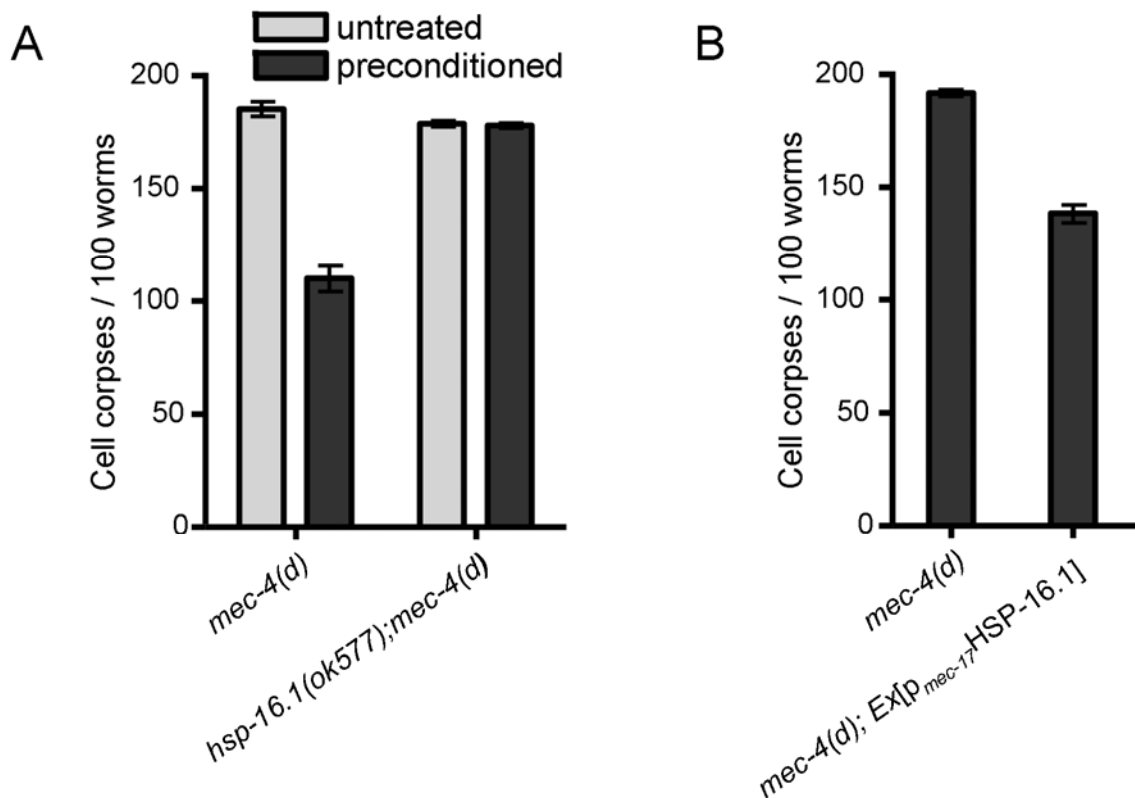


**Εικόνα 21** Ο μεταγραφικός παράγοντας HSF-1 είναι απαραίτητος για την προστασία που παρέχεται από την ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ. (A) Αριθμός των κυτταρικών πτωμάτων των νευρώνων, στο στάδιο L1, ανά 100 *hsf-1(sy441);mec-4(d)* ζώα σε συνθήκες αναφοράς και μετά από ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ ( $n \approx 600$ ;  $P < 0.0001$ , 2wayANOVA). (B) Αριθμός των κυτταρικών πτωμάτων των νευρώνων, στο στάδιο L1 ανά 100 *mec-4(d)* άτομα τα οποία φέρουν πρόσθετες επαναλήψεις του *hsf-1* ( $n \approx 280$ ;  $P = 0.0008$ , 2wayANOVA). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

## 12. Η sHSP HSP-16.1 είναι υπεύθυνη για τον προστατευτικό ρόλο του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ έναντι της νέκρωσης που προκαλείται από τοξικά κανάλια

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των HSPs οι οποίες προστατεύουν από ένα εύρος κυτταροτοξικών συνθηκών (Lindquist and Craig, 1988; Morimoto, 1998; Morimoto, 2008). Δείξαμε παραπάνω ότι η *hsp-16.1* είναι αναγκαία και ικανή για την προστασία από το νεκρωτικό θάνατο που ακολουθείται μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας. Για να ελέγξουμε το ρόλο της *hsp-16.1* στη νέκρωση που προκαλείται από το τοξικό κανάλι *mec-4(d)*, δημιουργήσαμε διπλά μεταλλαγμένα στελέχη. Τα *hsp-16.1(ok577)* μεταλλαγμένα ζώα φέρουν

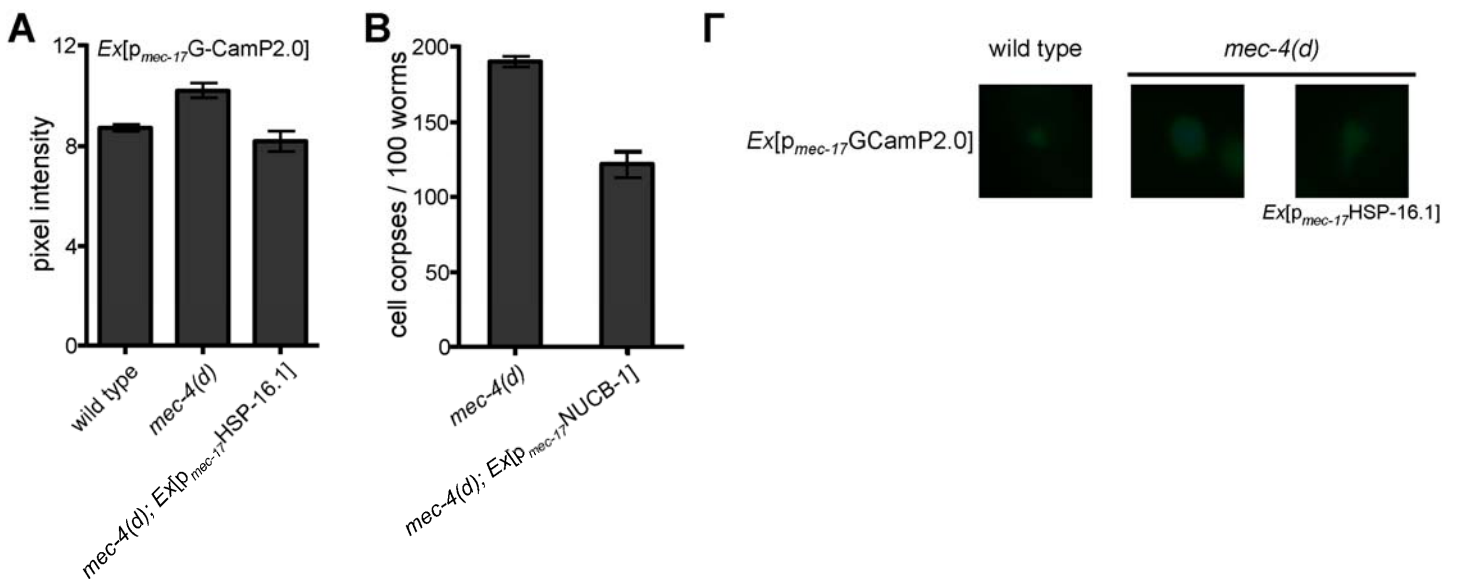
μια έλλειψη που εξουδετερώνει την sHSP αυτή. Είναι ενδιαφέρον ότι στα διπλά μεταλλαγμένα στελέχη *hsp-16.1(ok577);mec-4(d)* το μονοπάτι απόκρισης στο θερμικό σοκ δεν προστατεύει από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο (Εικόνα 22, A). Σε αντίθεση, ο νευροεκφυλισμός βελτιώνεται σε μεταλλαγμένα *mec-4(d)* ζώα τα οποία φέρουν επιπλέον αντίγραφα του *hsp-16.1* γονιδίου, παρακάμπτοντας την ανάγκη για εξαρχής ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ (Εικόνα 22, B). Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η HSP-16.1 είναι ικανή και αναγκαία για την προστατευτική δράση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ.



**Εικόνα 22 Η sHSP HSP-16.1 είναι αναγκαία και ικανή για την προστασία από τη νέκρωση που επάγεται από το τοξικό κανάλι MEC-4.** (A) Αριθμός των κυτταρικών πτωμάτων νευρώνων στο στάδιο L1, ανά 100 *hsp-16.1(ok577);mec-4(d)* διπλά μεταλλαγμένα ζώα σε συνθήκες αναφοράς και μετά από έκθεση σε θερμικό σοκ ( $n \approx 350$ ,  $P > 0.05$ , 2wayANOVA) (B) Αριθμός των κυτταρικών πτωμάτων νευρώνων στο στάδιο L1, ανά 100 διαγονιδιακά ζώα που φέρουν επιπλέον αντίγραφα της *hsp-16.1* ( $n \approx 450$ ;  $P < 0.0001$ , unpaired  $t$ -test). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M.

### 13. Η HSP-16.1 ελέγχει την απελευθέρωση ασβεστίου από το Golgi

Ποικίλες ενδοκυττάρειες αποθήκες ασβεστίου συμπεριλαμβανομένου του Golgi, του ER και των μιτοχονδρίων συμμετέχουν στην παραγωγή ενδοκυττάρειων σημάτων ασβεστίου και καθορίζουν τα χωρο-χρονικά τους μοτίβα. Το ενδοκυττάρειο ασβέστιο αναγνωρίζεται ως ένας κεντρικός παράγοντας της νέκρωσης (Marambaud et al., 2009; Sattler and Tymianski, 2000; Wojda et al., 2008). Χρησιμοποιήσαμε τον ανιχνευτή ασβεστίου GCaMP2 και παρατηρήσαμε αυξημένα επίπεδα φθορισμού σε νευρώνες που βρίσκονταν στο αρχικό στάδιο εκφυλισμού σε *mec-4(d)* ζώα σε σύγκριση με φυσιολογικούς νευρώνες από ζώα αγρίου τύπου (Εικόνα 23, Α και Γ). Ωστόσο, σε *mec-4(d)* ζώα τα οποία υπερεκφράζουν την *hsp-16.1*, τα επίπεδα φθορισμού επανήλθαν σε φυσιολογικά επίπεδα (Εικόνα 23, Α και Γ). Η δυναμική ρύθμιση της σηματοδότησης ασβεστίου καθορίζεται επίσης από πρωτεΐνες που δεσμεύουν ασβέστιο και ρυθμίζουν τη διαθεσιμότητά του. Η nucleobindin (CALNUC) είναι μια πρωτεΐνη των θηλαστικών που δεσμεύει ασβέστιο, απαντάται ειδικά στο Golgi και παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοίωση του ασβεστίου (Lin, 1999; Lin et al., 1998). Υπερέκφραση του *nucb-1*, του ομολόγου της nucleobindin στον *C. elegans*, οδήγησε σε σημαντική καταστολή της νέκρωσης (Εικόνα 22, Β). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η HSP-16.1 ασκεί την προστατευτική της δράση σε γενετικό υπόβαθρο που οδηγεί σε νέκρωση με το να εμποδίζει την ανεξέλεγκτη απελευθέρωση ασβεστίου από το Golgi. Συγκέντρωση του ασβεστίου στο Golgi οδηγεί σε καταστολή του κυτταρικού εκφυλισμού.



**Εικόνα 23 Η υπερέκφραση της *hsp-16.1* εμποδίζει την ανεξέλεγκτη απελευθέρωση ασβεστίου από το Golgi στα *mec-4(d)* ζώα, ενώ η ενδο-οργανοειδική δέσμευση του ασβεστίου καταστέλλει τη νέκρωση που επάγεται από το τοξικό κανάλι *mec-4(d)*.** (Α) Οι νευρώνες που νεκρώνονται εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα φθορισμού κατά τα αρχικά στάδια νευροεκφυλισμού, συγκριτικά με τους υγιείς νευρώνες από ζώα αγρίου τύπου. Τα *mec-4(d)* ζώα που φέρουν επιπλέον αντίγραφα της *hsp-16.1* εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα φθορισμού και συνεπώς χαμηλότερα επίπεδα κυτταροπλασματικού ασβεστίου. (Β) Αριθμός των κυτταρικών πτωμάτων νευρώνων στο στάδιο L1, ανά 100 ζώα που φέρουν το *mec-4(d)* αλληλόμορφο, ή υπερεκφράζουν την *nucb-1* σε *mec-4(d)* γενετικό υπόβαθρο. Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M. (Γ) Αντιπροσωπευτικές εικόνες νευρώνων που εκφράζουν τον δείκτη ασβεστίου GCaMP σε ζώα αγρίου τύπου και ζώα που φέρουν το γενετικό υπόβαθρο *mec-4(d)*, με ή χωρίς επιπλέον αλληλουχίες της *hsp-16.1*.

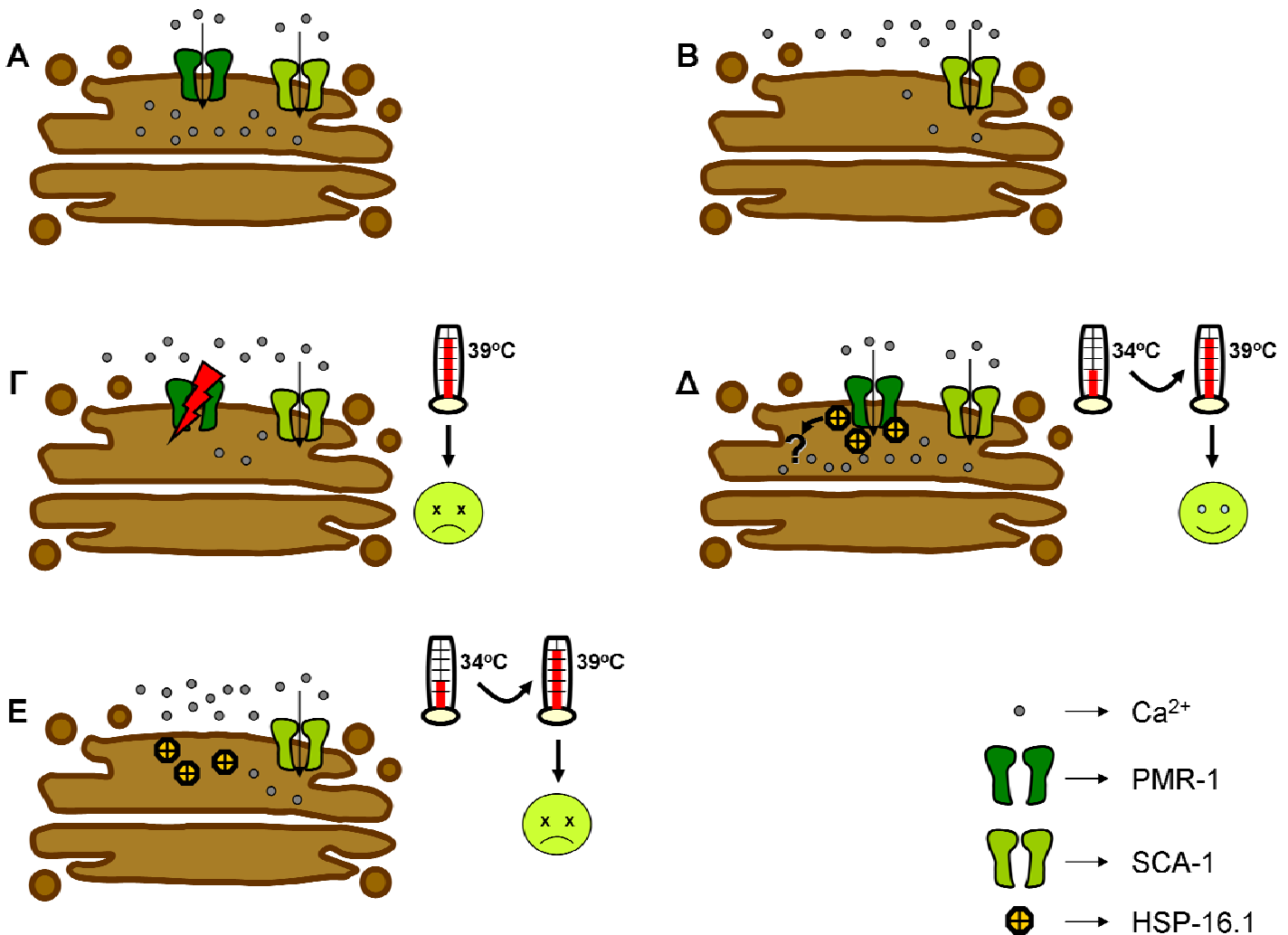
## **Συζήτηση**

## 1. Σύνοψη των αποτελεσμάτων και σχολιασμός καινοτομιών

Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι ο *C. elegans* χρησιμεύει σαν ένας ιδανικός οργανισμός μοντέλο για τη διερεύνηση των μηχανισμών κυτταροτοξικότητας εξαιτίας ακραίας θερμοκρασίας, προσομοιάζοντας βαριές περιπτώσεις θερμοπληξίας στον άνθρωπο. Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν τη συμμετοχή του αποθηκευμένου στο Golgi ασβεστίου στη συνολική καταστροφική αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου κατά τη διάρκεια του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου. Μέχρι σήμερα, αν και είναι γνωστό ότι το οργανίδιο αυτό αποτελεί μια σημαντική αποθήκη ασβεστίου, ο ρόλος που του αποδίδεται περιορίζεται στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών και την κατανομή τους στους τελικούς προορισμούς. Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν για πρώτη φορά ότι το οργανίδιο αυτό έχει κεντρικό ρόλο στην εκτέλεση του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου. Προτείνουμε ακόμα ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ καταστέλλει δραματικά το νεκρωτικό θάνατο ο οποίος επάγεται σε νευρικά κύτταρα από τη δράση τοξικών καναλιών, ένας τρόπος θανάτου που έχει πολλές μορφολογικές και μηχανιστικές ομοιότητες με το θάνατο νευρώνων λόγω υπερδιέγερσης που συμβαίνει κατά το εγκεφαλικό επεισόδιο. Επίσης το μονοπάτι απόκρισης στο θερμικό σοκ έχει προστατευτικό ρόλο σε ένα μοντέλο νεκρωτικού θανάτου λόγω υποξίας στον *C. elegans*. Η υποξία στον άνθρωπο είναι μια παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου. Τα αποτελέσματα μας εξηγούν το μηχανισμό με τον οποίο η ενεργοποίηση του ενδογενούς αυτού μονοπατιού προστατεύει από τη νέκρωση. Για τον προστατευτικό ρόλο του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ είναι απαραίτητη η δράση της sHSP HSP-16.1 η οποία πιθανότατα διατηρεί την ενεργότητα της αντλίας ασβεστίου του Golgi PMR-1, προστατεύοντας κατά αυτό τον τρόπο το κύτταρο από τη συσσώρευση καταστροφικών επιπέδων ασβεστίου. Είναι η πρώτη φορά που η HSP-16.1 εμφανίζεται όχι σαν μια σαπερόνη με γενική δράση κατά της συσσωμάτωσης, αλλά σαν μια σαπερόνη που στοχεύει μια πρωτεΐνη η οποία συμμετέχει στην ομοιόσταση του ασβεστίου του Golgi. Δείξαμε επίσης ότι γενετικοί ή φαρμακολογικοί χειρισμοί των άλλων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ομοιόσταση του ασβεστίου στο Golgi επιδρούν διαφορετικά στην επιβίωση του οργανισμού μετά από θερμοπληξία. Τα αποτελέσματα αυτά

υπογραμμίζουν τη βαρύτητα της διατήρησης της ιοντικής ισορροπίας σε συνθήκες θερμοπληξίας. Θα είναι ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν η συσχέτιση Golgi/HSP-16.1/PMR-1 είναι η βάση του γενικού προστατευτικού μηχανισμού του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ.

Ελπίζουμε ότι τα αποτελέσματά μας θα αποτελέσουν τη βάση για νέες θεραπευτικές στρατηγικές ενάντια στη βλάβη που προκαλείται από τη θερμοπληξία στον άνθρωπο, μέσω φαρμακολογικής επαγωγής του ενδογενούς μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ ή συγκεκριμένων HSPs. Βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών κυτταρικής βλάβης λόγω ακραίας θερμοκρασίας θα βοηθήσει την καταπολέμηση των συνεχώς αυξανόμενων περιστατικών θερμοπληξίας εξαιτίας της αύξησης της συχνότητας και της έντασης των κυμάτων καύσιων.



**Εικόνα 1 Προτεινόμενο μοντέλο που περιγράφει τον μηχανισμό δράσης της HSP-16.1 εναντίον του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου.** (Α) Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η P-type ATPase  $Ca^{2+}/Mn^{2+}$  αντλία ασβεστίου του Golgi, PMR-1, συνεργάζεται με την αντλία SCA-1, και πιθανώς και με άλλες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την ομοιόσταση του ασβεστίου, και συγκεντρώνουν ασβέστιο στο εσωτερικό του Golgi, διατηρώντας έτσι την κυτταρική ισορροπία. (Β) Απαλοιφή της PMR-1 οδηγεί σε αυξημένη συγκέντρωση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου. (Γ) Το στρες που προκαλείται από την ακραία θερμοκρασία οδηγεί σε αυξημένη συγκέντρωση κυτταροπλασματικού ασβεστίου, πιθανώς λόγω διατάραξης της λειτουργίας της PMR-1 και κατά συνέπεια της ιοντικής ισορροπίας του κυττάρου. Άλλες ενδοκυττάρικες αποθήκες ασβεστίου είναι επίσης πιθανό να συμβάλλουν στην αυξημένη συγκέντρωση ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα. (Δ) Η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ προστατεύει από την ανεξέλεγκτη αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού ασβεστίου και καταστέλλει το νεκρωτικό θάνατο. Η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ επάγει την έκφραση της *hsp-16.1*. Αυτή η σαπερόνη φαίνεται ότι αποκαθιστά τη λειτουργία της PMR-1 με το να διατηρεί τη σωστή στερεοδιαμόρφωσή της. Η HSP-16.1 είναι πιθανόν να έχει και άλλους προστατευτικούς ρόλους μέσα στο Golgi. (Ε) Απουσία της PMR-1, η επαγόμενη HSP-16.1 δεν παρέχει την προστατευτική της δράση.

## **2. Το φαινόμενο της θερμοπληξίας και η εισαγωγή του *C. elegans* ως μοντέλου για τη μελέτη του**

Η θερμοπληξία είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία συνοδεύεται από έντονες αλλαγές στην φυσιολογία (υποξία, εγκεφαλική ισχαιμία, ανεπάρκεια στο κυκλοφορικό και αύξηση του μεταβολισμού), κυτταροτοξικότητα εξαιτίας της ακραίας θερμοκρασίας, απόκριση φλεγμονής και οξειδωτική βλάβη. Καταλήγει σε δυσλειτουργία πολλών οργάνων και σοβαρή εγκεφαλική βλάβη. Αρκετά μοντέλα ζώων για θερμοπληξία και υπερθερμία έχουν περιγραφεί (Chen et al., 2006; Damanhoury and Tayeb, 1992; Gentile et al., 1996; Horowitz, 2002; Hubbard et al., 1977; Hubbard et al., 1978; Leon et al., 2005; Lin, 1999; Sharma, 2007). Μέρος της ανθρώπινης απόκρισης στη θερμοπληξία ανακεφαλαιώνεται σε ορισμένα πειραματικά μοντέλα. Ωστόσο, οι λεπτομερείς κυτταρικοί μηχανισμοί που αποτελούν τη βάση για την πρόκληση βλάβης στο κεντρικό νευρικό σύστημα και σε άλλα όργανα λόγω ακραίας θερμοκρασίας, δεν είναι ακόμα κατανοητοί. Ο *C. elegans*, απουσία ανοσολογικής απόκρισης και φλεγμονής, είναι ένα ιδανικό



μοντέλο για τη διερεύνηση των μηχανισμών κυτταροτοξικότητας λόγω ακραίας θερμοκρασίας. Παρουσία υψηλής θερμοκρασίας, νέκρωση σε επίπεδο κυττάρου και ιστού συμβαίνει με ταχύ ρυθμό (Bouchama and Knochel, 2002; Yeo, 2004). Παρατηρήσαμε ότι μια σύντομη επώαση ζώων αγρίου τύπου σε ακραία θερμοκρασία (39°C, 15 min) οδηγεί σε εκτεταμένο νεκρωτικό θάνατο. Συνεπώς, το μοντέλο θερμοπληξίας του *C. elegans* παρέχει ένα ιδανικό σύστημα για τη μελέτη των μηχανισμών κυτταροτοξικότητας λόγω ακραίας θερμοκρασίας, προσομοιάζοντας σοβαρές περιπτώσεις θερμοπληξίας στον άνθρωπο.

### **3. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ είναι ένας ισχυρός καταστολέας της νέκρωσης**

Τα ευρήματά μας ότι η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε θερμικό σοκ βελτιώνει το νεκρωτικό θάνατο που προκαλείται από θερμοπληξία, γενετικούς και φαρμακολογικούς τρόπους, καθιερώνει την απόκριση στο θερμικό σοκ σαν ένα δυναμικό καταστολέα της νέκρωσης. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα ότι προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ προστατεύει από την εγκεφαλική ισχαιμία, τη νευρωνική βλάβη και την αρτηριακή υπόταση που προκαλείται από τη θερμοπληξία σε ένα μοντέλο θερμοπληξίας στον αρουραίο (Yang et al., 1998). Η προστασία που παρέχεται ενάντια της βλάβης από θερμοπληξία σχετίζεται με τα επίπεδα της πρωτεΐνης HSP72 η οποία συσσωρεύεται στον εγκέφαλο μετά την προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ. Υπερέκφραση της HSP72 συνοδεύεται από μειωμένη παραγωγή της ιντερλευκίνης 1, μείωση του οξειδωτικού στρες και οδηγεί σε βελτίωση κάποιων συμπτωμάτων της θερμοπληξίας (Lee et al., 2006; Wang et al., 2005; Yang and Lin, 1999). Ωστόσο οι κυτταρικοί μηχανισμοί με τους οποίους το μονοπάτι απόκρισης σε θερμικό σοκ παρέχει προστασία ενάντια της θερμοπληξίας παραμένουν αδιευκρίνιστοι.

### **4. Η sHSP HSP-16.1, το Golgi και η αντλία ασβεστίου PMR-1 είναι νέα στοιχεία στον μοριακό μηχανισμό του νεκρωτικού θανάτου**

Τα αποτελέσματά μας δηλώνουν ότι η HSP-16.1 καταστέλλει το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο ελέγχοντας την απελευθέρωση ασβεστίου από το

Golgi και προσδίδουν στο οργανίδιο αυτό κεντρικό ρόλο στη διατήρηση ιοντικής ισορροπίας κατά τον κυτταρικό θάνατο. Το Golgi συμμετέχει στην επεξεργασία και τη διανομή των λιπιδίων και των πρωτεϊνών (Keller and Simons, 1997). Εκτός από την κλασική του αυτή λειτουργία, το Golgi διαθέτει κεντρικό ρόλο ως κυτταρικό διαμέρισμα αποθήκευσης και απελευθέρωσης ασβεστίου, σε συνεργασία με το ER (Dolman et al., 2005; Lissandron et al., 2010; Missiaen et al., 2004; Pinton et al., 1998). Η απορύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου στο Golgi παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση διάφορων παθολογικών καταστάσεων (Fan et al., 2008; Hu et al., 2007). Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου ελέγχονται στενά με τη στρατηγική τοποθέτηση πρωτεϊνών που δεσμεύουν ασβέστιο (Sayer, 2002). Υπερέκφραση της πρωτεΐνης calbindin η οποία δεσμεύει ασβέστιο, προστατεύει κύτταρα σε καλλιέργεια και νευρώνες από νεκρωτικά ερεθίσματα (McMahon et al., 1998). Επιπλέον, υπερέκφραση της ανθρώπινης αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης του Golgi (hGAAP) μειώνει την επαγόμενη από ισταμίνη εκροή ασβεστίου από το ER και το Golgi τροποποιώντας την απελευθέρωση ασβεστίου από αυτά τα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα (de Mattia et al., 2009). Η συμμετοχή του ασβεστίου από το ER στα ολικά κυτταροπλασματικά επίπεδα ασβεστίου είναι απαραίτητη για το νεκρωτικό θάνατο στον *C. elegans* (Xu et al., 2001). Είναι ενδιαφέρον ότι υπερέκφραση του *nucb-1*, που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που δεσμεύει ασβέστιο και εντοπίζεται στο Golgi, καταστέλλει σημαντικά τον κυτταρικό θάνατο σε νεκρωτικό γενετικό υπόβαθρο. Προτείνουμε ότι το νεκρωτικό σινιάλο διαταράσσει την ομοιόσταση του ασβεστίου στο Golgi και η HSP-16.1 προστατεύει από τον εκφυλισμό, τροποποιώντας τα επίπεδα ασβεστίου μέσω διατήρησης της λειτουργίας της αντλίας ασβεστίου *pmr-1* που βρίσκεται στο Golgi.

Δεν μπορούμε να εξαιρέσουμε την πιθανότητα ότι η HSP-16.1 ασκεί τον προστατευτικό της ρόλο μέσω σταθεροποίησης ενός κεντρικού τροποποιητή της αντλίας PMR-1 και όχι μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με την αντλία. Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν ότι απουσία της PMR-1, η υπερέκφραση της HSP-16.1 είναι ικανή να προσφέρει προστασία εναντίον της θερμοπληξίας, σε σημαντικά χαμηλότερο όμως βαθμό συγκριτικά με τα ζώα αγρίου τύπου. Κάτι τέτοιο υποδηλώνει ότι η HSP-16.1 ασκεί τον

προστατευτικό της ρόλο μέσω αλληλεπίδρασης ή/και σταθεροποίησης πολλαπλών σημαντικών πρωτεϊνών που βρίσκονται στο Golgi μετά από θερμοπληξία. Οι sHSPs επάγονται σε συνθήκες στρες, δημιουργούν μεγάλα ολιγομερή και δρουν συνήθως με μη-ειδικό τρόπο στο να εμποδίζουν τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών (Haslbeck and Buchner, 2002). Σε συνθήκες στρες στα κύτταρα, τα επίπεδα ATP πέφτουν αισθητά και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε γρήγορη δυσλειτουργία και μη-αντιστρεπτή συσσωμάτωση των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβη. Οι sHSPs προστατεύουν τις πρωτεΐνες από την αποδιάταξη λόγω θερμότητας και τη μη-αντιστρεπτή συσσωμάτωση μέσω διεργασιών που δεν απαιτούν κατανάλωση ATP (Haslbeck and Buchner, 2002; Narberhaus, 2002; van Montfort et al., 2001b).

Αρκετές θεωρίες σχετικά με τη γήρανση προτείνουν ότι το προσδόκιμο ζωής σχετίζεται με την ικανότητα του οργανισμού να αντιμετωπίζει καταστάσεις στρες. Διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις έχουν οδηγήσει στον εντοπισμό μεταγραφικών στόχων του DAF-16 και πρωτεΐνες που βρίσκονται σε αφθονία σε μεταλλαγμένα *daf-2* ζώα τα οποία εμφανίζουν αυξημένο προσδόκιμο ζωής (Dong et al., 2007; Halaschek-Wiener et al., 2005; McElwee et al., 2003; Murphy et al., 2003; Oh et al., 2006). Είναι ενδιαφέρον ότι η πιο συχνά εμφανιζόμενη κατηγορία γονιδίων που εμφανίζεται στις παραπάνω μελέτες είναι οι sHSPs, συμπεριλαμβανομένης της HSP-16 οικογενείας. Προτείνουμε ότι η HSP-16.1 ασκεί τον προστατευτικό της ρόλο, τουλάχιστον εν μέρει, με το να διατηρεί την κυτταρική ιοντική ισορροπία η οποία διαταράσσεται στο στρεσογόνο περιβάλλον της γήρανσης. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι τουλάχιστον μια ακόμα sHSP, η HSP-16.48 εντοπίζεται στο Golgi (τα αποτελέσματα αυτά δεν παραθέτονται).

Η εγκεφαλική βλάβη λόγω ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Ischemic/Reperfusion brain Injury, IRI) είναι μια σοβαρή κατάσταση που χαρακτηρίζεται από διαταραχή της ιοντικής ομοιόστασης και οδηγεί στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Η ισχαιμική προετοιμασία (ischemic preconditioning, IPC) περιλαμβάνει την εφαρμογή μιας σύντομης, μη-θανάσιμης ισχαιμίας, η οποία οδηγεί σε αυξημένη ανοχή του νευρικού συστήματος σε μια επόμενη ισχαιμία η οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες θα ήταν θανάσιμη (Gidday, 2006). Οι ενδοκυττάρια αποθήκες ασβεστίου επηρεάζονται διαφορετικά από την ισχαιμία και την ισχαιμική προετοιμασία

και καθορίζουν το αποτέλεσμα της ισχαιμίας συμβάλλοντας στα συνολικά επίπεδα ασβεστίου (Lehotsky et al., 2009). Είναι ενδιαφέρον ότι, η υπερέκφραση των sHSPs σε διαγονιδιακά ζώα και σε καλλιέργειες καρδιομυοκυττάρων προστατεύει τα καρδιακά κύτταρα από τη νέκρωση που ακολουθείται από την ισχαιμία/επαναιμάτωση (Hollander et al., 2004; Martin et al., 1997; Ray et al., 2001; Vander Heide, 2002). Προηγούμενα είχε δειχθεί ότι η IRI προκαλεί μείωση της ενεργότητας της SPCA στον ιππόκαμπο του αρουραίου (Pavlikova et al., 2009). Η ενεργότητα της SPCA, όμοια με τις άλλες P-type ATPases, δέχεται επιλεκτική βλάβη κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το πιθανότερο λόγω των ελεύθερων ριζών (Lehotsky et al., 2002; Pavlikova et al., 2009). Ωστόσο, η ισχαιμική προετοιμασία έχει προστατευτική δράση στην  $Ca^{2+}$ -ATPase ενεργότητα των SPCA αντλιών (Pavlikova et al., 2009). Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με τα δικά μας αποτελούν πολλαπλές αποδείξεις που δηλώνουν ότι διαφορετικοί τύποι προ-ενεργοποίησης προστατευτικών μονοπατιών συγκλίνουν στην προστασία της ενεργότητας της SPCA/PMR-1 αντλίας και συνεπώς προστατεύουν από την απορρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου η οποία οδηγεί στο νεκρωτικό θάνατο. Είναι αξιοσημείωτο ότι η απώλεια της SPCA1 σε διαγονιδιακά ζώα οδηγεί σε εύρυνση του Golgi και αυξημένη απόπτωση (Okunade et al., 2007). Τα αποτελέσματά μας συνδέουν για πρώτη φορά το Golgi με τη νέκρωση.

Παρατηρήσαμε ότι η καταστολή του  $IP_3$  υποδοχέα *itr-1* με RNAi και η παρεμπόδιση του υποδοχέα ρυανοδίνης με χρήση dantrolene οδήγησε σε αυξημένη επιβίωση μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμοπληξίας. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η παρεμπόδιση απελευθέρωσης ασβεστίου από ιοντικά κανάλια ειδικά για οργανίδια έχει προστατευτικό ρόλο έναντι του θανάτου που προκαλείται από θερμοπληξία. Είναι ενδιαφέρον ότι καταστολή της SERCA αντλίας ασβεστίου *sca-1*, οδηγεί επίσης σε αυξημένη επιβίωση. Το παράδοξο αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι παρεμπόδιση της λειτουργίας της SERCA με την χημική ουσία thapsigargin επάγει στρες στο ER το οποίο οδηγεί σε επαγωγή του προστατευτικού μονοπατιού Unfolded Protein Response (UPR) το οποίο οδηγεί σε προσαρμογή (adaptation) και επιβίωση (Ferri and Kroemer, 2001; Paschen, 2003; Rutkowski et al., 2006; Schroder and Kaufman, 2005; Travers et al.,

2000; Xu et al., 2004). Ωστόσο, ένα παρόμοιο μονοπάτι απόκρισης στο στρες, ειδικό για το οργανίδιο Golgi δεν έχει ακόμα περιγραφεί.

Έχει δειχθεί προηγούμενα ότι η αντλία PMR-1 του *C. elegans* συνεντοπίζεται με τον ειδικό για το Golgi δείκτη  $\alpha$ -mannosidase II (Cho et al., 2005). Η  $\alpha$ -mannosidase II φαίνεται να βρίσκεται στο μέσο (medial) Golgi παρά στο άπο (trans) Golgi (Dejima et al., 2010). Επιπλέον, τα ομόλογα της ζύμης και του αρουραίου, PMR-1 και SPLA αντίστοιχα, εντοπίζονται και οι δυο στο μέσο Golgi (Durr et al., 1998; Guntjeski-Hamblin et al., 1992; Sorin et al., 1997). Σε αντίθεση, στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα η αντλία ATP2C1 εντοπίζεται κυρίως στο άπο-Golgi (Behne et al., 2003).

## **5. Ο *C. elegans* ως πλατφόρμα για την αναζήτηση πολυμορφισμών και φαρμάκων που τροποποιούν την απόκριση σε ακραία θερμοκρασία**

Μερικά άτομα είναι πολύ πιο ευαίσθητα στην υπερθερμία και οδηγούνται σε θερμοπληξία υπό συνθήκες κατά τις οποίες άλλα άτομα εμφανίζουν μόνο ήπια συμπτώματα (Bouchama and Knochel, 2002). Συνεπώς, κάποια άτομα είναι πιθανό να είναι γενετικά ευάλωτα στο να αναπτύξουν συμπτώματα θερμοπληξίας. Ο *C. elegans*, χάρη στην ευκολία γενετικών χειρισμών, έχει τη δυναμική να αποτελέσει μια πολύτιμη πλατφόρμα για τον εντοπισμό και χαρακτηρισμό γενετικών παραγόντων και πολυμορφισμών που οδηγούν σε τροποποιημένες αποκρίσεις σε καταστάσεις θερμοπληξίας. Η θερμοπληξία είναι μια μορφή υπερθερμίας η οποία συνοδεύεται από ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ. Καταστάσεις που τροποποιούν την έκφραση των HSPs όπως είναι η γήρανση είναι πιθανό να επιδεινώνουν την έκβαση της θερμοπληξίας. Είναι ενδιαφέρον ότι η θερμοπληξία πλήττει κυρίως πολύ νεαρές και ηλικιωμένες κοινωνικές τάξεις (Bouchama and Knochel, 2002). Η ουσιαστική συμβολή του *C. elegans* στην έρευνα της γήρανσης είναι πιθανό να αποκαλύψει επαγόμενες από τη γήρανση τροποποιήσεις στα μονοπάτια απόκρισης στο στρες τα οποία αυξάνουν την ευαισθησία στην εξέλιξη της θερμοπληξίας.

Παρά τις καταστροφικές για την υγεία συνέπειες της θερμοπληξίας, δεν υπάρχει αναγνωρισμένη φαρμακευτική αγωγή για την καταπολέμηση της ασθένειας και οι τεχνικές ψύξης αποτελούν την κύρια θεραπευτική

προσέγγιση. Ο *C. elegans* αποτελεί μια δυναμική πλατφόρμα για τον έλεγχο σε μεγάλη κλίμακα χημικών ενώσεων και τον χαρακτηρισμό φαρμακευτικών στόχων (Artal-Sanz et al., 2006a; Kaletta and Hengartner, 2006). Συνεπώς το μοντέλο μας μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μια πλατφόρμα ελέγχου για συστατικά τα οποία προστατεύουν από την κυτταροτοξικότητα λόγω ακραίας θερμοκρασίας.

## **6. Η δυναμική της ενεργοποίησης των ενδογενών μονοπατιών απόκρισης στο στρες**

Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν ότι η προ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο στρες μέσω επώασης των ζώων σε ήπια αυξημένη θερμοκρασία προστατεύει από μεταγενέστερη έκθεση σε συνθήκες οι οποίες προκαλούν νέκρωση. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να συμπεριληφθεί στην κατηγορία της *hormesis*. Ο όρος αυτός περιγράφει την ευεργετική δράση που προκύπτει από την έκθεση ενός οργανισμού σε χαμηλής έντασης στρες (Calabrese, 2004; Calabrese et al., 1987). Η ευεργετική δράση της *hormesis* έγκειται στη διέγερση των μονοπατιών απόκρισης στο στρες. Χειρισμοί όπως επαναλαμβανόμενο θερμικό σοκ οδηγεί σε αυξημένη ανθεκτικότητα στο στρες και επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής σε διάφορα πειραματικά μοντέλα (ζύμη, *Drosophila*, νηματώδεις, ποντίκια και ανθρώπινα κύτταρα) (Cypser and Johnson, 2003; Minois, 2000; Rattan, 2004; Rattan et al., 2004). Η παρούσα εργασία βοηθά στην κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους χαμηλά επίπεδα στρες προσδίδουν ανθεκτικότητα και ικανότητα προσαρμογής σε επιβλαβείς συνθήκες. Βεβαίως, επιπλέον ερωτήματα πρέπει να απαντηθούν προτού θεραπευτικές προσεγγίσεις που θα στηρίζονται στην επαγωγή μονοπατιών απόκρισης στο στρες χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση παθολογικών καταστάσεων. Ποια είναι τα χαμηλότερα όρια για την ενεργοποίηση μιας *hormetic* απόκρισης; Ποιο είναι το κόστος της συνεχούς έκθεσης σε ήπιο στρες; Ποιο μονοπάτι ή συνδυασμός μονοπατιών οδηγεί σε ιδανικά επίπεδα προστασίας;

## **7. Το κόστος της υπερ-ενεργοποίησης ενός μονοπατιού απόκρισης στο στρες**

Η μη-ελεγχόμενη ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο στρες μπορεί να έχει ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Καρκινικά κύτταρα τα οποία έχουν χάσει την ικανότητά τους να ελέγχουν το ρυθμό ανάπτυξής τους εκφράζουν υψηλά επίπεδα HSPs (Calderwood et al., 2006; Jaattela, 1999). Η αυξημένη ανθεκτικότητα στο στρες μέσω ενισχυμένης ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ είναι δυνατό να προωθήσει την καρκινογένεση βοηθώντας τα καρκινικά κύτταρα να αντιμετωπίσουν δυσμενείς συνθήκες (Dai et al., 2007). Επιπλέον, ενώ οι HSPs έχουν προστατευτικό ρόλο για τη διατήρηση της ομοιόστασης, η υπερέκφρασή τους πάνω από ένα όριο μπορεί να μπλοκάρει την ενεργοποίηση του μονοπατιού λόγω του αρνητικού ελέγχου που ασκούν οι HSPs στην ενεργοποίηση του HSF-1. Επίσης, καθώς διάφορα μονοπάτια απόκρισης στο στρες συνδέονται με τον κυτταρικό θάνατο, ο αυστηρός έλεγχος της ενεργοποίησής τους είναι απαραίτητος καθώς εκτεταμένη ενεργοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια λειτουργικών κυττάρων. Υπερ-ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό σοκ μπορεί να οδηγήσει επίσης σε κατανάλωση κρίσιμων κυτταρικών πόρων επιδεινώνοντας τις αρνητικές επιπτώσεις από την παρουσία στρες.

## **Παράρτημα Α**

**Μέτρηση του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης  
σε κυτταροειδικό επίπεδο στον *C. elegans*,  
*in vivo***



## Περίληψη

Η ανάλυση της πρωτεϊνοσύνθεσης παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικές με την κυτταρική φυσιολογία και τους μεταβολικούς ρυθμούς του οργανισμού. Οι διαθέσιμες μεθοδολογίες για τη μέτρηση του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης στηρίζονται στην ενσωμάτωση ραδιοσημασμένων αμινοξέων στις νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Η χρήση αυτής της μεθόδου έχει αρκετούς περιορισμούς και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταγραφή της πρωτεϊνοσύνθεσης σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς, σε ζωντανούς οργανισμούς.

Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να ξεπεράσουμε τις παραπάνω δυσκολίες και καθιερώσαμε μια νέα μέθοδο για τη μέτρηση της πρωτεϊνοσύνθεσης σε επιλεγμένα κύτταρα και ιστούς ζωντανών νηματώδων *C. elegans*. Φθορίζουσες πρωτεΐνες όπως η GFP, εκφράζονται με τη χρήση κατάλληλων υποκινητών σε κύτταρα/ιστούς που μας ενδιαφέρουν ή ακόμα και σε ολόκληρο το σώμα του ζώου. Η καταγραφή του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης στηρίζεται στην αναγέννηση του φθορισμού ύστερα από φωτο-απενεργοποίηση της GFP με τη χρήση φωτός υψηλής ενέργειας και κατάλληλου μήκους κύματος (Fluorescence Recovery After Photobleaching - FRAP). Για την αξιολόγηση της δυναμικής της μεθόδου μελετήσαμε τους ρυθμούς πρωτεϊνοσύνθεσης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους του νηματώδους.

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την καταγραφή του ρυθμού παραγωγής πρωτεϊνών, σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς ζωντανών δειγμάτων που παρουσιάζουν διαφορετικό ενδογενή ρυθμό πρωτεϊνοσύνθεσης.

## Summary

Analysis of protein synthesis provides valuable information relevant to cellular physiology and metabolic rhythms of the organism. Currently available methodologies for measuring protein synthesis rates rely on metabolic labeling by incorporation of radioactive amino acids into nascent polypeptides. These approaches are hampered by several limitations and cannot be applied to monitor protein synthesis in specific cells or tissues, in live specimens.

During this thesis we tried to overcome the above limitations and we established a novel method for monitoring protein synthesis in specific cells and tissues of live *Caenorhabditis elegans* animals. Fluorescent reporter proteins such as GFP are expressed in specific cells and tissues of interest or throughout animals using appropriate promoters. Protein synthesis rates are assessed by following fluorescence recovery after partial photobleaching of the fluorophore at targeted sites. We evaluated the method by examining protein synthesis rates in diverse cell types of the nematode.

Because it is non-invasive, our approach allows monitoring of protein synthesis in single cells or tissues with intrinsically different protein synthesis rates.

## Εισαγωγή

Η ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης είναι σημαντική για την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο. Η σύνθεση πρωτεϊνών απαιτεί μια σειρά σύνθετων αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών καθώς και μεταξύ RNA και πρωτεϊνών, που καταλήγει στο σχηματισμό πεπτιδικών δεσμών μεταξύ των αμινοξέων. Ο ρυθμός μετάφρασης του mRNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα καθορίζεται από μια πλειάδα μεταφραστικών παραγόντων (Karr and Lorsch, 2004). Απορρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης έχει εμπλακεί σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος αλλά και η γήρανση (Bjornsti and Houghton, 2004; Syntichaki et al., 2007). Μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τη μέτρηση της πρωτεϊνοσύνθεσης, είναι η καταγραφή της ενσωμάτωσης ραδιενεργών αμινοξέων στις νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες (metabolic labeling) (Rennie et al., 1994). Παράλληλα, η μελέτη της κατάστασης των πολυσωμάτων (polysomal profiling), προσδίδει μια εικόνα για το ποσοστό του mRNA που συνδέεται με ενεργά πολυριβοσώματα. Οι παραπάνω μεθοδολογίες είναι χρήσιμες για την ανάλυση της πρωτεϊνοσύνθεσης σε κυτταροκαλλιέργειες και σε σχετικά ομογενείς απομονωμένους ιστούς.

Τόσο η καταγραφή της ενσωμάτωσης της ραδιενέργειας, όσο και η μελέτη των πολυσωμάτων εμφανίζουν αρκετά μειονεκτήματα. Συγκεκριμένα, οι προσεγγίσεις αυτές απαιτούν σχετικά μεγάλες ποσότητες βιολογικού υλικού (κύτταρα ή ιστό) και δεν επιτρέπουν την καταγραφή της πρωτεϊνοσύνθεσης σε συγκεκριμένους κυτταρικούς υποπληθυσμούς ή μοναδικά κύτταρα. Επιπλέον, σχετίζονται με τεχνικές δυσκολίες οι οποίες περιορίζουν τη χρησιμότητά τους. Για παράδειγμα, χρήση της τεχνικής της ραδιοσήμανσης σε απλούς οργανισμούς όπως ο νηματώδης *C. elegans* ή σε ιστούς θηλαστικών εμφανίζει δυσκολίες εξαιτίας της περιορισμένης πρόσληψης και μη ελεγχόμενης ή ασύμμετρης κατανομής της ραδιενέργειας στο ζώο ή τον ιστό. Μια άλλη αιτία ποικιλομορφίας προκύπτει λόγω των διαφορετικών ενδογενών ρυθμών πρωτεϊνοσύνθεσης στους διαφορετικούς ιστούς και κυτταρικούς τύπους. Έτσι, μεταβολές στην πρωτεϊνοσύνθεση σε συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς που αποτελούν μικρό ποσοστό της μάζας του ζώου (όπως το νευρικό σύστημα), μπορεί να επισκιάζονται από πιο εκτεταμένους ιστούς (όπως το

έντερο και το μυϊκό σύστημα). Επιπλέον ούτε η μέθοδος του metabolic labeling αλλά ούτε και του polysomal profiling μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε ζωντανούς οργανισμούς.

Για να ξεπεράσουμε τις παραπάνω δυσκολίες, αναπτύξαμε μια καινούργια μέθοδο για την καταγραφή του ρυθμού πρωτεϊνσύνθεσης σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς, που στηρίζεται στην φωτο-απενεργοποίηση της GFP με τη χρήση φωτός υψηλής ενέργειας και κατάλληλου μήκους κύματος και καταγραφή της επαναφοράς του φθορισμού (Fluorescence Recovery After Photobleaching - FRAP). Η μέθοδος αυτή παρακάμπτει τα μειονεκτήματα που σχετίζονται με τις βιοχημικές μεθόδους και επιτρέπει την καταγραφή της πρωτεϊνσύνθεσης σε συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς, σε ζωντανά ζώα. Η μέθοδος αυτή μπορεί να προσαρμοστεί για εφαρμογή και σε άλλους οργανισμούς εκτός του *C. elegans*. Η πειραματική προσέγγιση στηρίζεται στην έκφραση φθορίζοντων πρωτεϊνών, όπως η GFP και η DsRED, σε κύτταρα και ιστούς που μας ενδιαφέρουν ή και σε ολόκληρα διαγονιδιακά ζώα. Στη συνέχεια, ο φθορισμός απενεργοποιείται, μέσω ακτινοβολίας κυττάρων, ιστών ή ολόκληρων ζώων με ισχυρή πηγή φωτός. Επανεμφάνιση του φθορισμού, ενδεικτικό της νέας πρωτεϊνσύνθεσης, καταγράφεται στα επιλεγμένα κύτταρα ή ιστούς.

Οι εφαρμογές της μεθόδου FRAP περιλαμβάνουν συνήθως φωτο-απενεργοποίηση του φθορισμού σε καθορισμένες υποκυτταρικές περιοχές ή διαμερίσματα, μέσω δέσμης laser, σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Gribbon and Hardingham, 1998; Jacobson et al., 1991). Στόχος είναι η μελέτη της πλευρικής μετακίνησης ή διάχυσης πρωτεϊνών στη σκοτεινή, φωτο-απενεργοποιημένη περιοχή, από γειτονικές περιοχές (Lippincott-Schwartz and Patterson, 2003; Reits and Neefjes, 2001). Η ανάλυση αυτή μπορεί ακόμα να προσδώσει έμμεση πληροφορία σχετικά με τη συνέχεια του οργανιδίου και την κίνηση των πρωτεϊνών. Για το σκοπό της καταγραφής του ρυθμού πρωτεϊνσύνθεσης, οι φθορίζουσες πρωτεΐνες ακτινοβολούνται σε όλο το μήκος του κυττάρου ή ιστού, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η επανεμφάνιση του φθορισμού προκύπτει από *de novo* πρωτεϊνσύνθεση και όχι από απλή μετακίνηση πρωτεϊνών. Το αντιβιοτικό cycloheximide, ένας ειδικός αναστολέας της μετάφρασης του mRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη

διάκριση της συμμετοχής της νέας πρωτεϊνοσύνθεσης και της διάχυσης πρωτεϊνών στην επανεμφάνιση του φθορισμού μετά την απενεργοποίηση.

## Πειραματική διαδικασία - Αποτελέσματα

### 1. Προετοιμασία διαγονιδιακών στελεχών

Για την εφαρμογή της μεθόδου που περιγράφουμε, είναι αναγκαία η δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών *C. elegans*, τα οποία εκφράζουν φθορίζουσες πρωτεΐνες της επιλογής μας στα κύτταρα ή τους ιστούς που θέλουμε να μελετήσουμε. Η τεχνική που ακολουθήσαμε είναι η μικροένεση των κατάλληλων πλασμιδιακών κατασκευών στο συγκίτιο της γονάδας ερμαφρόδιτων ατόμων (Fire, 1986; Mello et al., 1991; Stinchcomb et al., 1985). Η έκφραση του φθορίζοντα μάρτυρα στα επιθυμητά κύτταρα ή τους ιστούς γίνεται με χρήση των κατάλληλων υποκινητών. Πληροφορίες σχετικά με υποκινητές που οδηγούν την έκφραση γονιδίων σε συγκεκριμένα υποσύνολα κυττάρων στον *C. elegans* μπορεί να βρεθούν από τη βάση δεδομένων National Bioresource Project (NBRP, Japan; <http://shigen.lab.nig.ac.jp/c.elegans/promoter>). Συγκεκριμένα, για τους διάφορους τύπους νευρικών κυττάρων, μια εκτενής λίστα ενημερώνεται από τους Oliver Hobert και Shawn Lockery (<http://chinook.uoregon.edu/index.html>).

### 2. Συντήρηση και καλλιέργεια νηματωδών

Ο χειρισμός και συντήρηση διαγονιδιακών και μη στελεχών γίνεται σύμφωνα με τις κλασικές διαδικασίες (Brenner, 1974a; Brenner, 1974b). Διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν την πρωτεΐνη-μάρτυρα στα κύτταρα ή τους ιστούς που μας ενδιαφέρουν αναπτύσσονται σε πιάτα 60 mm, στρωμένα με το στέλεχος της *E. coli*, OP50 σε θερμοκρασία 20°C ή σε άλλη κατάλληλη θερμοκρασία ανάλογα με την πιθανή ευαισθησία των υπό εξέταση στελεχών.

### 3. Φωτο-απενεργοποίηση του φθορίζοντα μάρτυρα (photobleaching) και ανάκτηση του σήματος φθορισμού (recovery)

Για την ανάλυση, χρησιμοποιούνται ζώα κατάλληλου αναπτυξιακού σταδίου ανάλογα με τους επιθυμητούς στόχους. Ζωντανοί νηματώδεις υποβάλλονται σε FRAP με τη χρήση μικροσκοπίου επιφθορισμού. Φθορίζοντα κύτταρα ή ιστοί φωτογραφίζονται χρησιμοποιώντας κατάλληλα φίλτρα. Ανάλογα με την εφαρμογή, τα ζώα μπορεί είτε να κινούνται, είτε να

είναι αναισθητοποιημένα. Μια εναλλακτική στρατηγική είναι η χρήση μεταλλαγμένων στελεχών με περιορισμένη κινητικότητα. Χρήσιμο επίσης είναι να γίνεται χρήση του επικρατούς αλληλομόρφου *rol-6(su1006)*, ως μάρτυρα μετασχηματισμού κατά τη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων. Το αλληλόμορφο αυτό αναγκάζει το ζώο να κινείται γύρω από τον εαυτό του (rolling), παρά να κινείται ημιτονοειδώς, περιορίζοντας έτσι την κίνηση σε μια μικρή περιοχή του πιάτου. Ήπια αναισθητικά, τα οποία δεν παρεμβάλλονται στις μεταβολικές διαδικασίες, όπως η levamisole μπορεί να χρησιμοποιηθούν. Τα ζώα φωτογραφίζονται πριν την έναρξη της ακτινοβόλησης, με χρήση κατάλληλης κάμερας προσαρμοσμένης στο μικροσκόπιο. Στη συνέχεια, τα ζώα ακτινοβολούνται χρησιμοποιώντας πηγή φωτός υψηλής ενέργειας και κατάλληλου μήκους κύματος, ανάλογα με το φάσμα διέγερσης της εκάστοτε φθορίζουσας πρωτεΐνης. Ασκώντας φωτο-απενεργοποίηση διαφορετικής έκτασης, εντοπίζουμε τα επίπεδα εκείνα τα οποία μειώνουν την εκπομπή φθορισμού στο 20-30% της αρχικής εκπομπής, χωρίς να προκαλούν βλάβη στον οργανισμό. Η πιθανή τοξικότητα που μπορεί να προκαλέσει η ακτινοβόληση, ελέγχεται με παρατήρηση της συμπεριφοράς του ζώου (κίνηση, εναπόθεση αυγών, πρόσληψη τροφής, ρυθμική κίνηση του φάρυγγα, απόκριση στο άγγιγμα) και της αναπαραγωγικής ικανότητας. Ζώα τα οποία εμφανίζουν σημάδια βλάβης μετά την ακτινοβόληση, εξαιρούνται από περαιτέρω ανάλυση. Ζώα στα οποία η μετάφραση του mRNA παρεμποδίζεται με τη χρήση cycloheximide, χρησιμοποιούνται ως controls. Μετά την ακτινοβόληση, τα ζώα ανακάμπτουν σε πιάτα με τροφή. Η καταγραφή της ανάκαμψης του φθορισμού γίνεται φωτογραφίζοντας τα ζώα σε διάφορες χρονικές στιγμές.

#### 4. Ποσοτικοποίηση της εκπομπής φθορισμού και υπολογισμός του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης

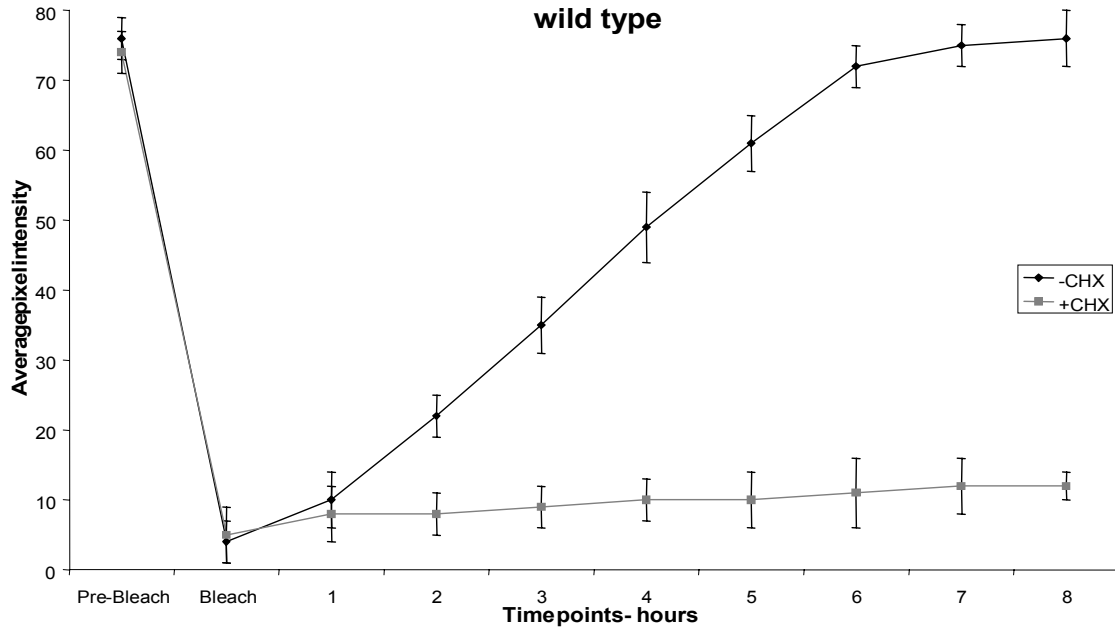
Οι φωτογραφίες που συλλέγονται τόσο πριν την έναρξη του FRAP, αμέσως μετά και κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων ανάκαμψης αναλύονται με το πρόγραμμα ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2006) και η μέση και μέγιστη φωτεινότητα καταγράφονται. Η στατιστική

ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το Prism software package (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

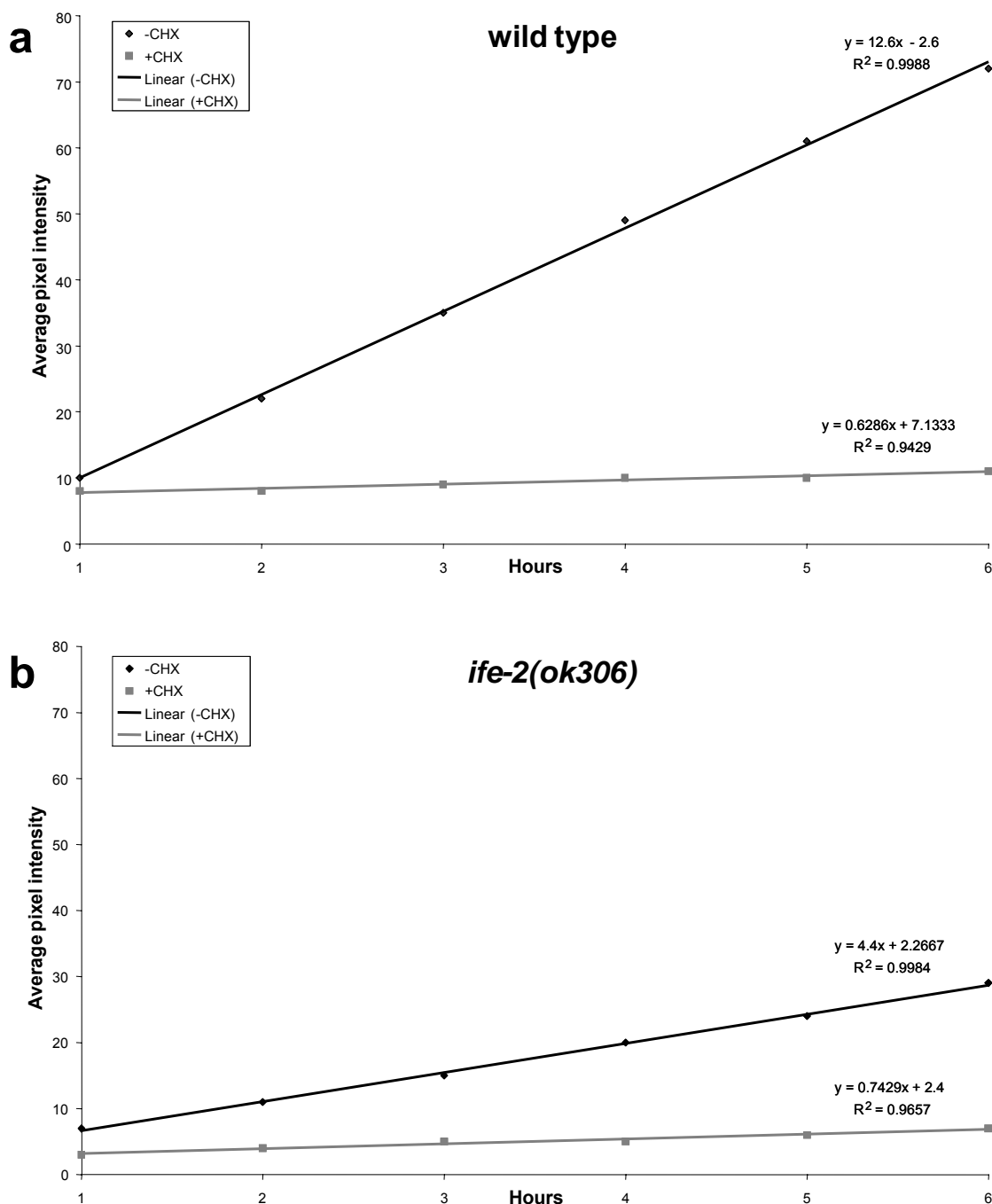
#### 5. Μέτρηση ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης σε νηματώδεις με έλλειψη στο γονίδιο *ife-2*

Η παραπάνω μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή της πρωτεϊνοσύνθεσης σε ζωντανούς νηματώδεις *C. elegans* με έλλειψη στο γονίδιο *ife-2* που κωδικοποιεί για μια από τις πέντε ισομορφές του eIF4E στους σωματικούς ιστούς (Keiper et al., 2000; Syntichaki et al., 2007). Ο eIF4E είναι ένας βασικός παράγοντας έναρξης της μετάφρασης του mRNA ο οποίος προσδένεται στην 7-μέθυλο-γουανοσίνη, στο 5' άκρο όλων των πυρηνικών mRNA και καθορίζει το ρυθμό της πρωτεϊνοσύνθεσης (Gingras et al., 1999). Μετά τη φωτοαπενεργοποίηση, η ανάκαμψη του φθορισμού καταγράφεται σε διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν GFP σε όλους τους σωματικούς ιστούς (Εικόνα 1). Η περιγραφή της φάσης ανάκαμψης γίνεται με ανάλυση παλινδρόμησης (Εικόνα 2). Η κλίση της ευθείας αποτελεί μέτρο του ρυθμού ανάκαμψης. Τα αποτελέσματα από τη χρήση της μεθόδου αυτής προσομοιάζουν αποτελέσματα από τη μέτρηση της πρωτεϊνοσύνθεσης με τη χρήση ραδιενέργειας (δεν περιλαμβάνονται στην παρούσα εργασία). Η ανάκαμψη του φθορισμού είναι περιορισμένη σε ζώα με έλλειψη στο *ife-2* γονίδιο και σε ζώα μετά από επώαση με cycloheximide (Εικόνα 2, 3).



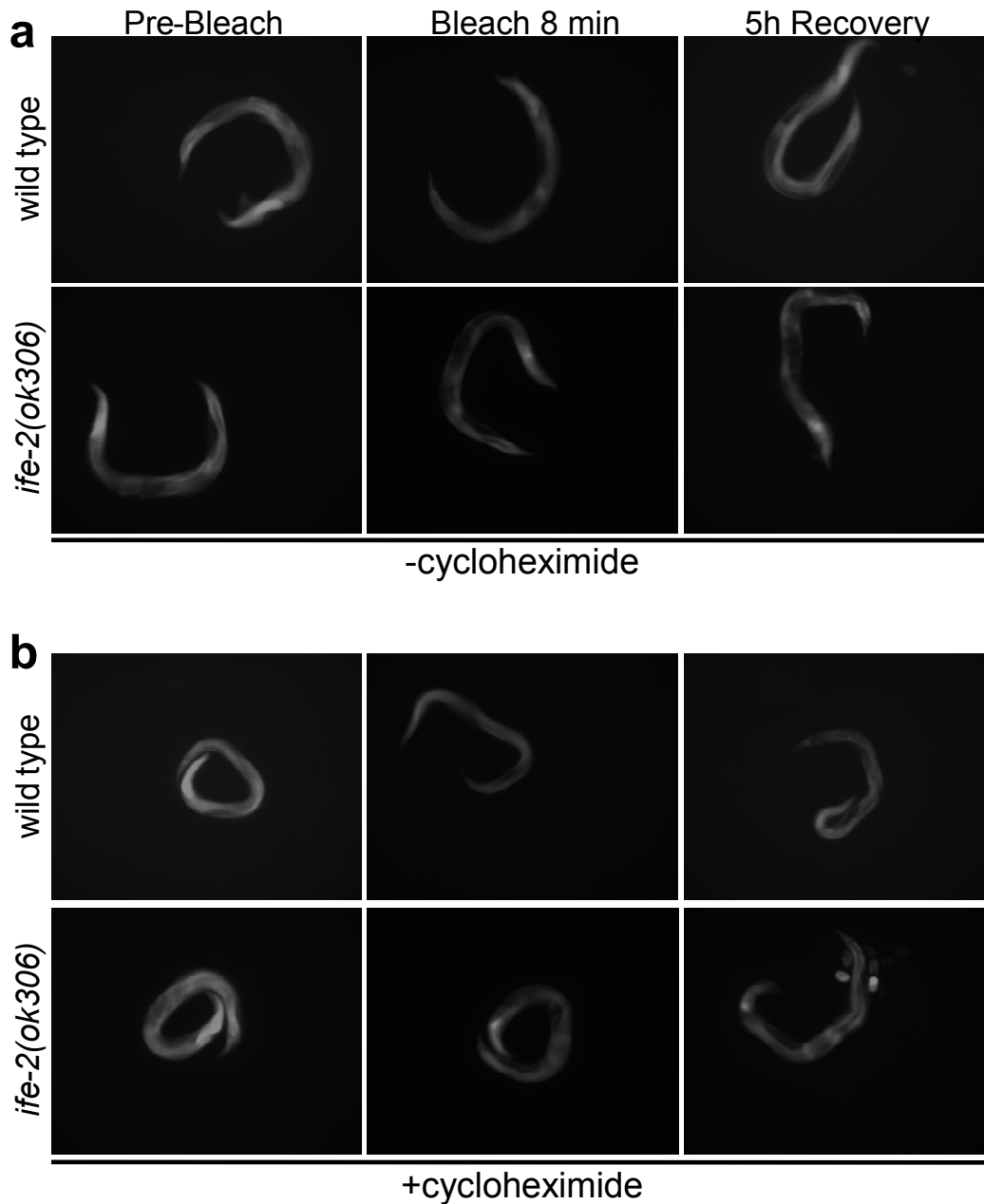


**Εικόνα 1.** Διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *ife-2* ( $p_{ife-2}$ -GFP), σε όλους τους σωματικούς ιστούς, υπόκεινται σε φωτοαπενεργοποίηση σε επίπεδο ολόκληρου ζώου, μειώνοντας το επίπεδο φθορισμού περίπου στο 10% της αρχικής έντασης (μαύρη γραμμή). Το επίπεδο φθορισμού υπολογίζεται τόσο πριν την απενεργοποίηση (Pre-Bleach) καθώς και αμέσως μετά (Bleach). Η ανάκαμψη των επιπέδων φθορισμού καταγράφεται με μέτρηση της μέσης φωτεινότητας, σε μεσοδιαστήματα μιας ώρας. Οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν το SEM (τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα, 10 ζώα υπό εξέταση σε κάθε πείραμα). Επώαση των ζώων παρουσία του ειδικού αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης cycloheximide (CHX), παρεμποδίζει την ανάκαμψη του φθορισμού (γκρι γραμμή).



**Εικόνα 2.** Ανάλυση παλινδρόμησης της ανάκαμψης του φθορισμού τόσο σε ζώα αγρίου τύπου, όσο και σε ζώα με έλλειψη του IFE-2, τα οποία εκφράζουν GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *ife-2* ( $p_{ife-2}$ GFP), σε όλους τους σωματικούς ιστούς. Οι ευθείες καλύτερης προσαρμογής (best-fit lines) υπολογίζονται σύμφωνα με τις τιμές που προκύπτουν από την ανάλυση των διαφόρων φάσεων ανάκαμψης στα αντίστοιχα γενετικά υπόβαθρα (a, αγρίου τύπου και b, *ife-2(ok306)*, μαύρη γραμμή). Επίσης απεικονίζονται οι αντίστοιχες εξισώσεις που περιγράφουν τις γραμμές best-fit καθώς και οι τιμές  $R^2$  για κάθε γραμμή. Η κλίση αντιστοιχεί στην πρώτη παράγωγο της μεταβολής του φθορισμού στη μονάδα του

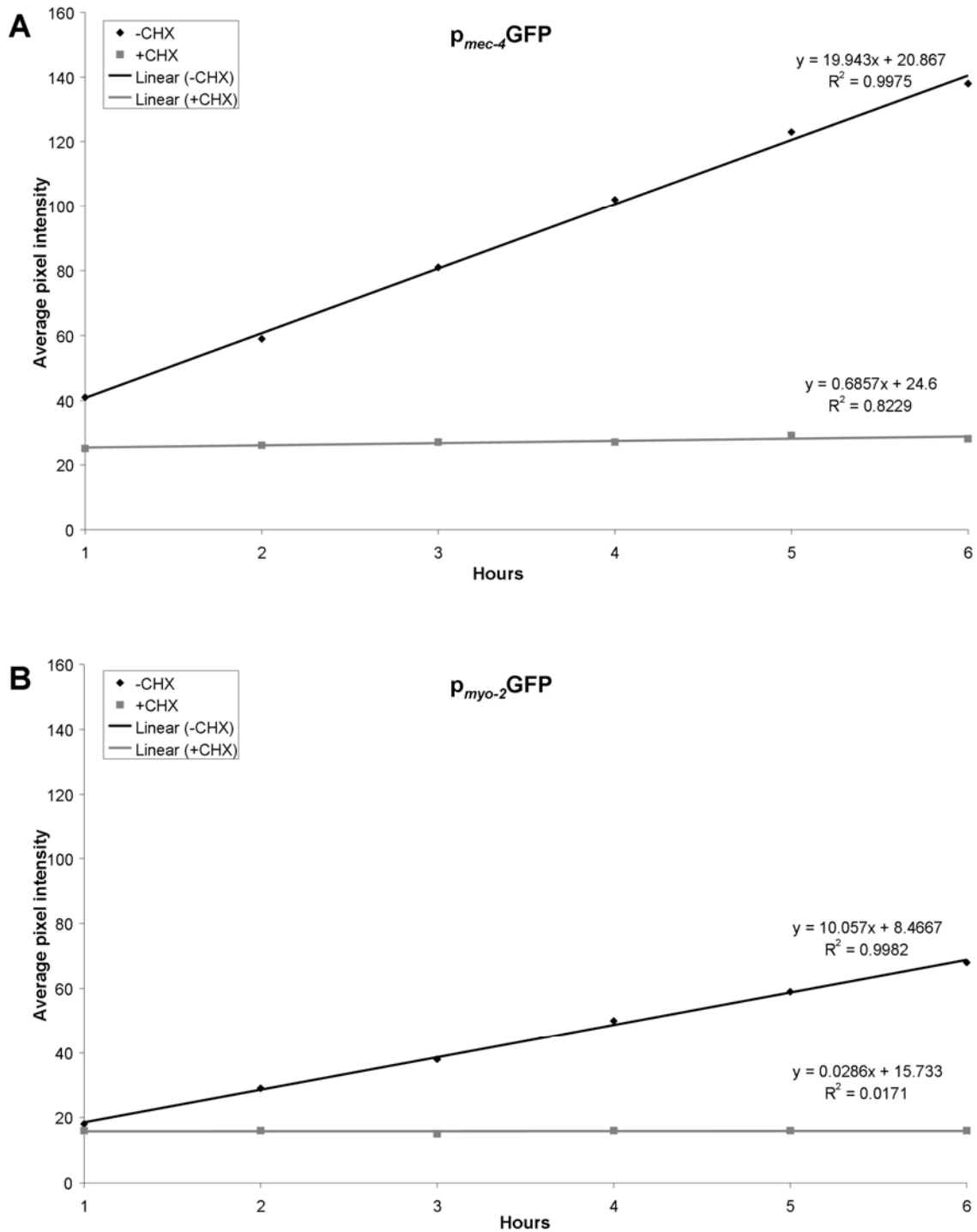
χρόνου ( $\Delta f/dt$ ), το οποίο είναι ένα μέτρο του ρυθμού ανάκαμψης. Επώαση των ζώων με cycloheximide (CHX) οδηγεί σε αμελητέα ανάκαμψη του φθορισμού (γκρι γραμμή).



**Εικόνα 3.** Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες διαγονιδιακών ζώων που υπόκεινται στη διαδικασία του FRAP. Τα ζώα φέρουν το μάρτυρα μετασχηματισμού *rol-6* (ο οποίος κάνει τα ζώα να γυρίζουν γύρω από τον επιμήκη άξονά τους) και εκφράζουν το διαγονίδιο *ife-2*-GFP σε όλους τους σωματικούς ιστούς. Οι φωτογραφίες αντιστοιχούν στις περιόδους: πριν την έναρξη απενεργοποίησης, αμέσως μετά από περίοδο ακτινοβολήσης όλου του ζώου για 8 λεπτά καθώς και μετά από περίοδο ανάκαμψης 5 ωρών, απουσία (a) και παρουσία (b) cycloheximide.

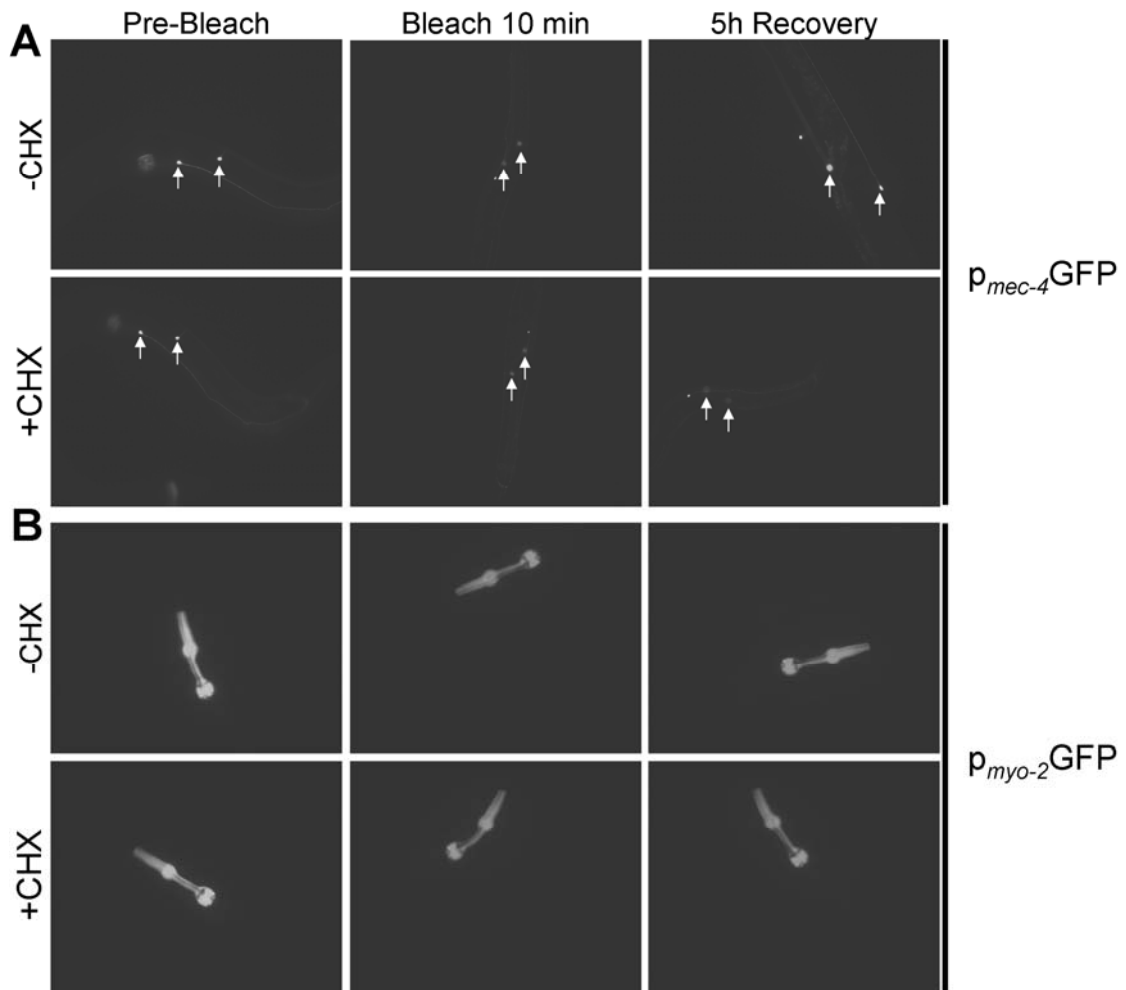
6. Κυτταρο- και ιστο-ειδική παρακολούθηση του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης

Διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι και ιστοί εμφανίζουν διαφορετικούς ρυθμούς πρωτεϊνοσύνθεσης. Η δυνατότητα καθορισμού του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης στους ιστούς ή τα κύτταρα ενδιαφέροντος, *in vivo*, στα πλαίσια ενός ακέραιου οργανισμού είναι σημαντική για τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν τη διαφορική ρύθμιση της μετάφρασης των mRNA. Για να συγκρίνουμε τους ρυθμούς πρωτεϊνοσύνθεσης μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων, εφαρμόσαμε τη μέθοδό μας χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικούς μάρτυρες που εκφράζονται σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και ιστούς. Ο πρώτος μάρτυρας καθοδηγείται από τον υποκινητή του γονιδίου *mec-4* ο οποίος εκφράζεται ειδικά στους έξι νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για την αντίληψη μηχανικών ερεθισμάτων. Ο δεύτερος μάρτυρας εκφράζεται στα μυϊκά κύτταρα του φάρυγγα υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *myo-2*. Για να αποφύγουμε mRNA-ειδικές επιδράσεις στην πρωτεϊνοσύνθεση, και οι δυο μάρτυρες σχεδιάστηκαν ώστε να κωδικοποιούν όμοια mRNA, για τη GFP. Βρήκαμε ότι η ανάκαμψη του φθορισμού είναι ταχύτερη στους νευρώνες συγκριτικά με τα μυϊκά κύτταρα (Εικόνα 4, 5). Και στις δυο περιπτώσεις, παρεμπόδιση της πρωτεϊνοσύνθεσης με τη χρήση cycloheximide, εμποδίζει την ανάκαμψη του φθορισμού. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι ο ρυθμός πρωτεϊνοσύνθεσης είναι υψηλότερος στους νευρώνες συγκριτικά με τα μυϊκά κύτταρα. Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που προτείνουν έναν χαμηλότερο ρυθμό πρωτεϊνοσύνθεσης στα μυϊκά κύτταρα (Fostel et al., 2003; Okkema et al., 1993).



**Εικόνα 4 Ανάλυση παλινδρόμησης της ανάκαμψης του φθορισμού σε κύτταρο- και ίστο-ειδικό επίπεδο.** (A) Ζώα αγρίου τύπου που εκφράζουν το διαγονίδιο  $P_{mec-4}GFP$  στους έξι νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για την αίσθηση ήπιων μηχανικών ερεθισμάτων. Οι ευθείες καλύτερης προσαρμογής δημιουργήθηκαν για το μέσο όρο των τιμών της έντασης φθορισμού που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της φάσης ανάκαμψης. Η χρήση cycloheximide (CHX) έχει ως αποτέλεσμα αμελητέα ανάκαμψη. (B) Ζώα αγρίου τύπου που εκφράζουν το διαγονίδιο  $P_{myo-2}GFP$  ειδικά στους μύς του φάρυγγα. Οι ευθείες καλύτερης προσαρμογής

δημιουργήθηκαν για το μέσο όρο των τιμών της έντασης φθορισμού που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της φάσης ανάκαμψης. Οι ευθείες καλύτερης προσαρμογής δημιουργήθηκαν για το μέσο όρο των τιμών της έντασης φθορισμού που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της φάσης ανάκαμψης. Η χρήση cycloheximide εμποδίζει την ανάκαμψη. Οι αντίστοιχες εξισώσεις που περιγράφουν τις ευθείες καλύτερης προσαρμογής, δίνονται και στις δυο περιπτώσεις.



**Εικόνα 5 Αντιπροσωπευτικές εικόνες διαγονιδιακών ζώων πριν το στάδιο του photobleaching, αμέσως μετά από μια περίοδο photobleaching ολόκληρου του ζώου διάρκειας 10 min και μετά από μια περίοδο ανάκαμψης διάρκειας 5 h, απουσία (-CHX) και παρουσία (+CHX) cycloheximide. (A) Ζώα αγρίου τύπου που εκφράζουν το διαγονίδιο *p<sub>mec-4</sub>GFP* στους έξι νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για την αίσθηση ήπιων μηχανικών ερεθισμάτων. (B) Ζώα αγρίου τύπου που εκφράζουν το διαγονίδιο *p<sub>myo-2</sub>GFP* ειδικά στους μυς του φάρυγγα.**

## Συζήτηση

Η μέθοδος που περιγράφεται στην παρούσα εργασία επιτρέπει την παρακολούθηση της πρωτεϊνοσύνθεσης σε μοναδικά κύτταρα ή ιστούς με ενδογενώς διαφορετικούς ρυθμούς πρωτεϊνοσύνθεσης (για παράδειγμα νευρικά κύτταρα έναντι μυϊκών ή επιθηλιακών κυττάρων), σε ζωντανούς οργανισμούς. Κάτι τέτοιο δεν είναι δυνατό με τις υπάρχουσες μεθοδολογίες. Ο ρόλος συγκεκριμένων μεταφραστικών παραγόντων στη ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ή ειδικά αναπτυξιακά στάδια, μπορεί να μελετηθεί ελέγχοντας τους ρυθμούς ανάκαμψης του φθορισμού σε ζώα που φέρουν μεταλλαγές για τα αντίστοιχα γονίδια, ή σε ζώα αγρίου τύπου τα οποία υπόκεινται σε RNAi.

Για την εφαρμογή της μεθόδου, χρησιμοποιήσαμε δυο διαφορετικούς τρόπους για να παρέμβουμε ειδικά στην πρωτεϊνοσύνθεση. Πρώτον, με μεταλλαγές στο γονίδιο *ife-2*, που κωδικοποιεί για μια ισομορφή του μεταφραστικού παράγοντα eIF4E (Keiper et al., 2000) και δεύτερον χρησιμοποιώντας τον αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης, cycloheximide. Και οι δυο αυτοί χειρισμοί δεν επηρεάζουν τα επίπεδα του mRNA των πρωτεϊνών-μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν.

Ανάλογα με τον ιστό και τον τύπο κυττάρου που εξετάζουμε και το γενετικό υπόβαθρο των διαγονιδιακών ζώων, οι ρυθμοί ανάκαμψης του φθορισμού μπορεί να διαφέρουν σημαντικά. Για παράδειγμα, ο φθορισμός στους έξι νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για την αντίληψη του ήπιου μηχανικού ερεθίσματος, επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα μετά από 5 ώρες. Αντίθετα, η ανάκαμψη του φθορισμού σε μυϊκά κύτταρα του φάρυγγα στο ίδιο χρονικό διάστημα είναι αμελητέα.

Η μέθοδος αυτή μπορεί να προσαρμοστεί όχι μόνο για τη μελέτη του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης, αλλά με κατάλληλες τροποποιήσεις μπορεί να καταγράψει και άλλες φάσεις της γονιδιακής έκφρασης, όπως η αντιγραφή του DNA, το μάτισμα του RNA και η μεταφορά και ανακύκλωση του mRNA. Για παράδειγμα, η επίδραση διαφόρων γενετικών ή φαρμακολογικών χειρισμών που στοχεύουν τις διαδικασίες αυτές, μπορεί να αξιολογηθεί με τη μέθοδο αυτή. Έτσι, εξαιτίας της απλότητας και της ευελιξίας, η μέθοδος αυτή μπορεί

να βρει εφαρμογή σε ένα μεγάλο εύρος βιολογικών μελετών, σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα και οργανισμούς.



## **Παράρτημα Β**

**Μελέτη του ρόλου της αποικοδόμησης  
μέσω πρωτεοσώματος σε ένα μοντέλο  
Parkinson's στον *C. elegans***

## Περίληψη

Η συσσωμάτωση πρωτεϊνών είναι κύριο χαρακτηριστικό πολλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η Alzheimer's, η Parkinson's και η Huntington's. Είναι ενδιαφέρον ότι οι ασθένειες αυτές εκδηλώνονται σε προχωρημένη ηλικία και εμφανίζουν σταδιακή επιδείνωση των συμπτωμάτων. Το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών καθώς και πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβη είναι το μονοπάτι ουβικουιτίνης-πρωτεοσώματος (ubiquitin-proteasome pathway). Διατάραξη της πρωτεοσωμικής ενεργότητας και κατά συνέπεια τροποποιημένη ανακύκλωση πρωτεϊνών, οδηγεί σε ελαττωματική πρωτεόσταση και τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Ο *C. elegans* έχει αποτελέσει ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη των βασικών μοριακών μηχανισμών τόσο του προγραμματισμένου, όσο και του παθολογικού κυτταρικού θανάτου. Χάρη στην ευκολία γενετικών χειρισμών και τη διάφανη επιδερμίδα, είναι δυνατόν να γίνει *in vivo* παρατήρηση του σχηματισμού συσσωματωμάτων μετά από γενετικές και φαρμακολογικές παρεμβάσεις.

Ενισχύσαμε την ενεργότητα του πρωτεοσώματος μέσω υπερέκφρασης κεντρικών υπομονάδων του πρωτεοσώματος οι οποίες βρίσκονται σε περιοριστικές συγκεντρώσεις, σε ζώα τα οποία φέρουν ένα αλληλόμορφο που κωδικοποιεί για ένα τοξικό κανάλι το οποίο οδηγεί σε νευροεκφυλισμό. Παράλληλα, χρησιμοποιούμε ένα χαρακτηρισμένο μοντέλο της ασθένειας Parkinson's στον *C. elegans* με σκοπό να συσχετίσουμε την εμφάνιση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων με τη νευρική λειτουργικότητα, παρουσία πολλαπλών αντιγράφων πρωτεοσωμικών υπομονάδων, *in vivo*.

Κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους η διατήρηση της κυτταρικής πρωτεόστασης, μέσω ενίσχυσης της πρωτεοσωμικής ενεργότητας, καταστέλλει το νευροεκφυλισμό, μπορεί να οδηγήσει σε νέες θεραπευτικές στρατηγικές.

## Summary

Protein aggregation is the hallmark of many neurodegenerative disorders such as the Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's disease. Intriguingly, these diseases show late onset and progressive aggravation of symptoms. The major degradation pathway for misfolded and damaged proteins is the ubiquitin-proteasome pathway. Deregulation of the proteosomal activity, and subsequently altered protein turnover, leads to defective proteostasis and eventually to cell death. *Caenorhabditis elegans* has been instrumental for the elucidation of the basic molecular mechanisms of programmed and pathological cell death. Due to its amenability to genetic manipulations and the transparent cuticle, *in vivo* monitoring of aggregate formation after various genetic and pharmacological treatments is possible.

We aim to enhance proteasome activity by overexpressing core, rate-limiting proteosomal subunits in animals that carry toxic channel alleles which lead to neurodegeneration. In parallel, we will exploit an established *C. elegans* model of Parkinson's disease aiming to correlate the appearance of protein aggregates with neuronal functionality, in the presence of multiple copies of proteasomal subunits, *in vivo*.

Understanding the mechanism by which preservation of cellular proteostasis, via enhancement of the proteosomal activity, suppresses neurodegeneration may lead to new therapeutic strategies.

## Εισαγωγή

Η ασθένεια Parkinson's (Parkinson's Disease, PD) είναι μια νευροεκφυλιστική ασθένεια που επηρεάζει την κίνηση και την ομιλία, κυρίως σε ηλικιωμένους. Οι ασθενείς υποφέρουν από μη-ελεγχόμενες κινήσεις και δυσκολία στην ισορροπία, συμπτώματα που σχετίζονται με την απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στον εγκέφαλο. Τα δυο κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά της PD είναι η δημιουργία ενδοκυτταρικών συσσωματωμάτων, γνωστά ως Lewy bodies (LB) και η απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην περιοχή του εγκεφάλου substantia nigra pars compacta. Το κύριο συστατικό των LBs είναι η πρωτεΐνη  $\alpha$ -synuclein (Kawahara et al., 2008). Η σύνδεση μεταξύ του μη-λειτουργικού συστήματος αποικοδόμησης πρωτεϊνών μέσω πρωτεοσώματος και PD ενισχύεται από το γεγονός ότι χορήγηση αναστολέων του πρωτεοσώματος στον αρουραίο προκαλεί πολλά από τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της PD (McNaught et al., 2004). Επίσης, πρόσφατα δείχθηκε ότι παρεμπόδιση του πρωτεοσώματος στον *C. elegans* οδηγεί σε νευροεκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Caldwell et al., 2009). Η ιδιότητα της  $\alpha$ -synuclein να δημιουργεί δομές που ονομάζονται protofibrils θεωρείται ως ο κυριότερος λόγος για την παρεμπόδιση της λειτουργίας του πρωτεοσώματος (Bennett et al., 2005).

Το πρωτεόσωμα είναι ένα πολυκαταλυτικό ενζυματικό σύμπλοκο, ισχυρά συντηρημένο τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Wolf and Hilt, 2004). Διαφορετικοί συνδυασμοί της καταλυτικής υπομονάδας (20S) και των ρυθμιστικών υπομονάδων (19S και 20S) οδηγούν στη δημιουργία των διαφορετικών τύπων πρωτεοσώματος. Η καταλυτική υπομονάδα αποικοδομεί μετουσιωμένες και οξειδωμένες πρωτεΐνες με μια αντίδραση η οποία δεν απαιτεί την κατανάλωση ATP. Η καταλυτική υπομονάδα έχει μορφή βαρελιού και συγκροτείται από τέσσερις δακτυλίους οι οποίοι αποτελούνται από επτά διαφορετικές  $\alpha_{1-7}$  και  $\beta_{1-7}$  υπομονάδες οι οποίες δημιουργούν ένα περίπλοκο σύμπλοκο, μάζας περίπου 700 kDa. Ένα από τα χαρακτηριστικά της γήρανσης είναι η απώλεια του ελέγχου της πρωτεόστασης και η ακόλουθη συσσώρευση οξειδωμένων και μετουσιωμένων πρωτεϊνών, οι οποίες είναι επιρρεπείς στη δημιουργία συσσωματωμάτων. Μείωση της ενεργότητας του πρωτεοσώματος κατά τη

γήρανση έχουν περιγραφεί τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μοντέλα (Gaczynska et al., 2001). Η μεταγραφή αρκετών γονιδίων που κωδικοποιούν για υπομονάδες του πρωτεοσώματος έχει βρεθεί να μειώνεται κατά τη γήρανση (Bulteau et al., 2000). Σε ένα σύστημα ινοβλαστών, η έκφραση των α-υπομονάδων δε βρέθηκε να μεταβάλλεται κατά τη γήρανση και η μειωμένη ενεργότητα του πρωτεοσώματος φαίνεται να οφείλεται στη μειωμένη διαθεσιμότητα των β-υπομονάδων (Chondrogianni et al., 2003). Υπερέκφραση της β<sub>5</sub> υπομονάδας οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα των β<sub>1</sub> και β<sub>2</sub> υπομονάδων καθώς και σε αύξηση της ενεργότητας του πρωτεοσώματος (Chondrogianni et al., 2005).

Στον *C. elegans* απώλεια των κυτταρικών σωμάτων και δενδριτών έχει παρατηρηθεί μετά από υπερέκφραση της ανθρώπινης α-synuclein υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή ειδικού για τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του ζώου (Lakso et al., 2003). Ο νηματώδης χρησιμοποιείται ευρέως στη μελέτη νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Το απλό νευρικό του σύστημα αποτελείται από 302 νευρώνες. Ο νευρικός κυτταρικός θάνατος και ο σχηματισμός συσσωματωμάτων μπορούν να εξεταστούν *in vivo* και σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση μικροσκοπίου, χάρη στη διάφανη επιδερμίδα του σκουληκιού. Έτσι, η επίδραση φαρμακολογικών και γενετικών παρεμβάσεων στο σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και τη βιωσιμότητα του νευρώνα μπορεί εύκολα να αξιολογηθεί στο νηματώδη. Οι μελέτες αυτές μπορεί να βοηθήσουν στη λύση του μυστηρίου σχετικά με το αν η δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων έχει προστατευτικό ρόλο ή οδηγεί στην καταστροφή του νευρώνα. Ακόμη, η ευκολία διεξαγωγής γενετικών screens στον *C. elegans* μπορεί να αποκαλύψει γονίδια που εμπλέκονται στο μοριακό μονοπάτι που συνδέει τη λειτουργία του πρωτεοσώματος με το σχηματισμό συσσωματωμάτων και τη βιωσιμότητα του νευρώνα .

Στην παρούσα εργασία, εξετάσαμε την επίδραση της αυξημένης ενεργότητας του πρωτεοσώματος, μέσω της υπερέκφρασης της κεντρικής υπομονάδας PBS-5, σε ένα μοντέλο νευροεκφυλισμού λόγω υπερέκφρασης της α-synuclein.

## Υλικά και Μέθοδοι

### 1. Γονιδιακές σειρές και στελέχη

Χρησιμοποιήσαμε τα ακόλουθα στελέχη: ζώα αγρίου τύπου - N2, *mec-4(u231)X* (αναφέρονται και ως *mec-4(d)*), UA44: [*baln1*; *pdat-1::α-syn*, *Pdat-1::gfp*], UA49: [*baln2*; *p<sub>unc-54</sub>::α-syn::gfp*, *rol-6 (su1006)*], *mec-4(d)Ex[p<sub>let-858</sub>PBS-5]*, UA44;*Ex[p<sub>let-858</sub>PBS-5]* και UA49;*Ex[p<sub>let-858</sub>PBS-5]*. Τα διαγονιδιακά ζώα UA44;*Ex[p<sub>let-858</sub>PBS-5]*, UA49;*Ex[p<sub>let-858</sub>PBS-5]* και *mec-4(d)Ex[p<sub>let-858</sub>PBS-5]* δημιουργήθηκαν με ένεση στη γονάδα των ζώων UA44, UA49 και *mec-4(d)* αντίστοιχα του πλασμιδίου *p<sub>let-858</sub>PBS-5-L2865* σε συγκέντρωση 15 ng/μL μαζί με το πλασμίδιο αναφοράς *rol-6* σε συγκέντρωση 50 μg/ μL. Για την κατασκευή του πλασμιδίου *p<sub>let-858</sub>PBS-5-L2865* κλωνοποιήθηκε το κομμάτι που φέρει την κωδική αλληλουχία του γονιδίου *rbs-5* (1513bp) και τις θέσεις περιορισμού AgeI/ApaI στα άκρα του, στο πλασμίδιο L2865 το οποίο φέρει τον υποκινητή του γονιδίου *let-858* ο οποίος οδηγεί την έκφραση του διαγονιδίου σε όλα τα κύτταρα. Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

ACCGGTATGTGGGGCGAGACATTCG και  
GCTGGGTGTTGATGACGTGGGCCC

### 2. Δοκιμασίες νευροεκφυλισμού

Για τη μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης της PBS-5 στο νευροεκφυλισμό που προκαλείται από το τοξικό αλληλόμορφο *mec-4(d)*, τα επίπεδα νευροεκφυλισμού εξετάστηκαν στο στάδιο L1. Συγχρονισμένοι πληθυσμοί αυγών επιτυγχάνονται μετά από λύση των κυτταρικών σωμάτων ενήλικων ζώων με τη χρήση υποχλωριώδους νατρίου. Εκφυλισμένοι θεωρούνται οι νευρώνες που έχουν διογκωμένη μορφολογία και η καταγραφή τους γίνεται με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου.

Για τη μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης της PBS-5 στο νευροεκφυλισμό που προκαλείται από την *α-synuclein*, 20 ενήλικα άτομα τοποθετούνται σε φρέσκα πιάτα και αφήνονται να εναποθέσουν αυγά για τέσσερις ώρες. Όταν οι απόγονοι φθάνουν στο στάδιο L4, μεταφέρονται σε νέα πιάτα ανά 20 περίπου άτομα, με συνολικό αριθμό απόμωων ανά πείραμα τα 100 άτομα. Τα ζώα μεταφέρονται σε νέα πιάτα κάθε δυο μέρες μέχρι την

έβδομη μέρα ενηλικίωσης τους. Τότε, καταγράφεται το ποσοστό των ακέραιων ντοπαμινεργικών νευρώνων της κεφαλικής περιοχής του ζώου με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού.

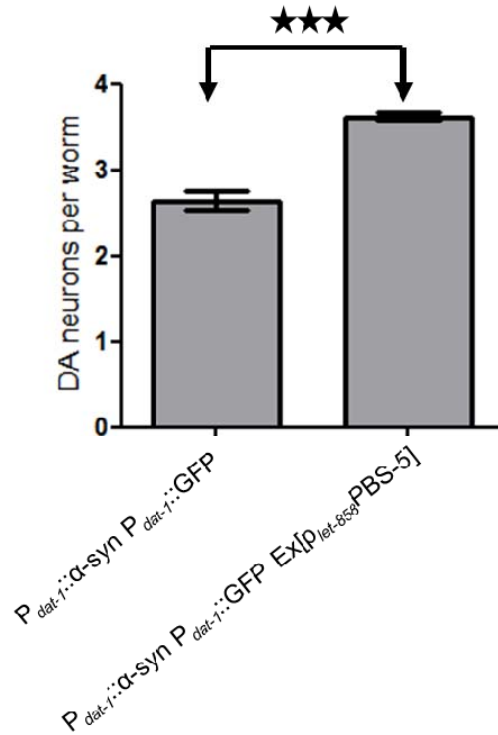
## Αποτελέσματα - Συζήτηση

1. Η υπερέκφραση της πρωτεοσωμικής υπομονάδας PBS-5 καταστέλλει την απώλεια κυττάρων και τη δημιουργία συσσωματωμάτων στο μοντέλο Parkinson's του *C. elegans*

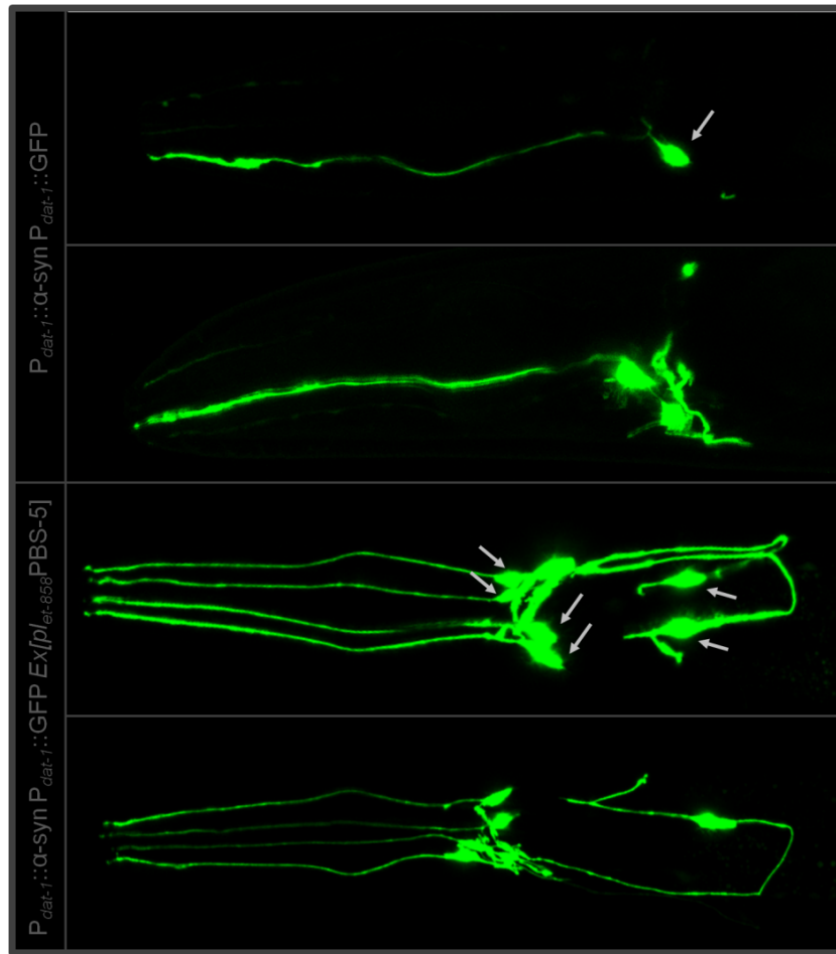
Είναι ενδιαφέρον ότι στα συσσωματώματα παθολογικών πρωτεϊνών σε ασθένειες όπως η Parkinson's και η Alzheimer's, απαντώνται συχνά πρωτεΐνες και μόρια που συμμετέχουν στην πρωτεολυτική αποικοδόμηση μέσω του συστήματος πρωτεοσώματος-ουβικουϊνής (Hyun et al., 2004). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει αποτυχημένη προσπάθεια του πρωτεοσώματος να απομακρύνει τις παθολογικές πρωτεΐνες. Ως αποτέλεσμα, η πρωτεόσταση διαταράσσεται, με καταστροφικές για το κύτταρο συνέπειες.

Στο μοντέλο της ασθένειας Parkinson's στον *C. elegans*, η υπερέκφραση της ανθρώπινης πρωτεΐνης  $\alpha$ -synuclein, οδηγεί σε απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων κατά τη γήρανση του ζώου. (Harrington et al., 2010). Χρησιμοποιήσαμε το μοντέλο αυτό για να εξετάσουμε εάν η ενίσχυση της λειτουργίας του πρωτεοσώματος μέσω υπερέκφρασης της υπομονάδας PBS-5, η οποία έχει δειχθεί ότι αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τη συγκρότηση του πρωτεοσώματος, οδηγεί σε βελτίωση του νευροεκφυλισμού (Chondrogianni et al., 2003). Για το λόγο αυτό, υπερεκφράσαμε την *pbs-5* σε ζώα τα οποία υπερεκφράζουν την ανθρώπινη  $\alpha$ -synuclein στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Στα ζώα αυτά, οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες είναι σημασμένοι με GFP, λόγω του διαγονιδίου  $p_{dat-1}$ GFP που φέρουν, ώστε να είναι δυνατή η καταγραφή της απώλειας των νευρώνων κατά τη γήρανση του ζώου. Μετρήσαμε τον αριθμό των cephalic (CEP) και anterior dendritic (ADE) κλάσεων των ντοπαμινεργικών νευρώνων σε ζώα που υπερεκφράζουν την *pbs-5* ( $p_{dat-1}$   $\alpha$ -syn  $p_{dat-1}$ GFP *Ex*[ $p_{let-85b}$ PBS-5]) και σε ζώα αναφοράς ( $p_{dat-1}$   $\alpha$ -syn  $p_{dat-1}$ GFP), κατά την έβδομη μέρα της ενήλικης ζωής τους. Διαπιστώσαμε ότι η υπερέκφραση της *pbs-5* καταστέλλει την απώλεια νευρώνων (Εικόνα 1 και 2)





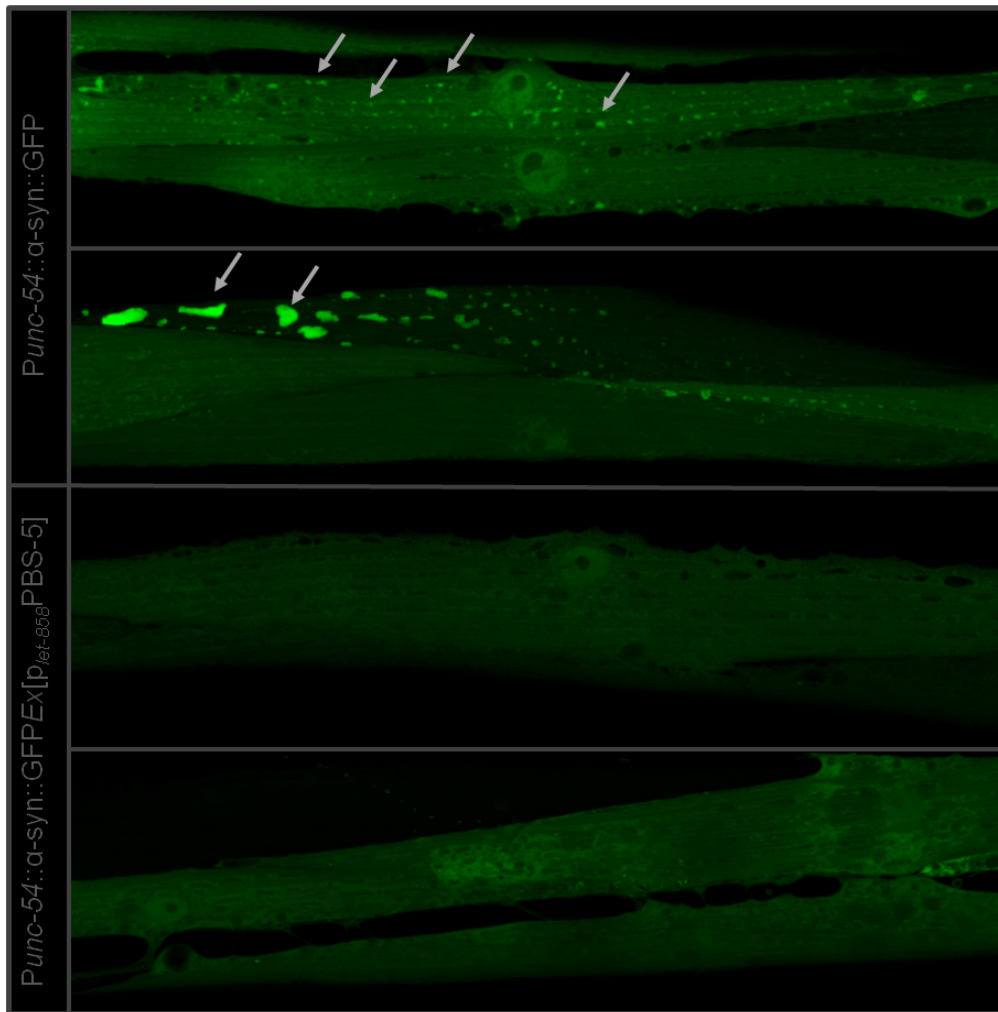
**Εικόνα 1** Η υπερέκφραση της *ρbs-5* οδηγεί σε καταστολή του νευροεκφυλισμού που προκαλείται από την *α-synuclein*. Τα ζώα αναφοράς και τα ζώα που υπερεκφράζουν την *α-synuclein* εξετάστηκαν για την απώλεια των τεσσάρων CEP και των 2 ADE ντοπαμινεργικών νευρώνων (n=50 άτομα ανά διαγονιδιακή σειρά ανά πείραμα). Τα αποτελέσματα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα ( $P < 0.001$ , unpaired t-test). Οι γραμμές σφάλματος δηλώνουν το S.E.M



**Εικόνα 2** Η υπερέκφραση της *pbs-5* οδηγεί σε προστασία των κυτταρικών σωμάτων και των αξόνων από τον εκφυλισμό που προκαλείται από την *α-synuclein*. Κατά την έβδομη μέρα της ενήλικης ζωής τους, τα περισσότερα ζώα έχουν απολέσει κάποιους από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες που ανήκουν στην CEP ή/και στην ADE κλάση. Τα βέλη αντιστοιχούν στα κυτταρικά σώματα των ντοπαμινεργικών νευρώνων.

Καθώς η παρατήρηση των συσσωματωμάτων της *α-synuclein* στους νευρώνες είναι τεχνικά δύσκολη λόγω του μικρού μεγέθους των κυτταρικών σωμάτων, χρησιμοποιήσαμε ένα άλλο μοντέλο όπου η έκφραση της *α-synuclein* κατευθύνεται στα μυϊκά κύτταρα, όπου η δημιουργία των συσσωματωμάτων είναι ευδιάκριτη. Παρατηρήσαμε τη δημιουργία συσσωματωμάτων κατά την πέμπτη μέρα ενηλικίωσης σε διαγονιδιακά ζώα που υπερεκφράζουν την *pbs-5* ( $p_{unc-54}\alpha\text{-syn}::\text{GFPEX}[p_{let-858}\text{PBS-5}]$ ) καθώς και σε ζώα αναφοράς ( $p_{unc-54}\alpha\text{-syn}::\text{GFP}$ ). Ποιοτική παρατήρηση έδειξε ότι η

υπερέκφραση της *rbs-5* καταστέλλει τη συσσωμάτωση της  $\alpha$ -synuclein (Εικόνα 3).

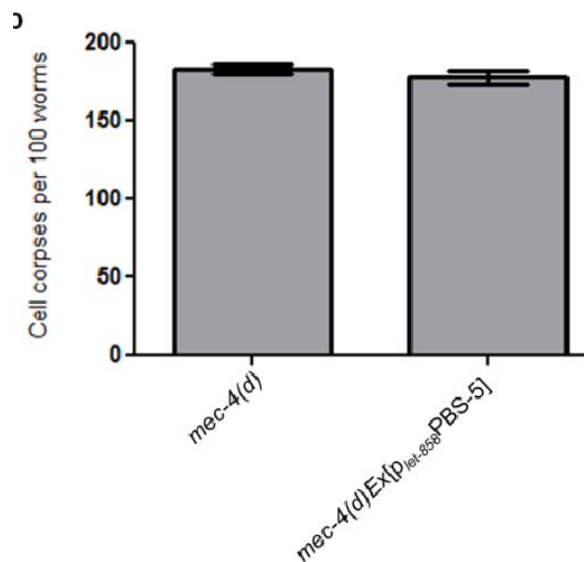


**Εικόνα 3** Υπερέκφραση της *rbs-5* προστατεύει από τη δημιουργία συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης  $\alpha$ -synuclein. Η παρουσία συσσωματωμάτων είναι ευδιάκριτη σε ζώα που φέρουν το διαγονίδιο  $\alpha$ -synGFP ενώ καταστέλλεται στα ζώα που υπερεκφράζουν την υπομονάδα PBS-5. Τα βέλη υποδεικνύουν συσσωματώματα διαφόρων μεγεθών.

2. Η υπερέκφραση της πρωτεοσωμικής υπομονάδας PBS-5 δεν παρέχει προστασία έναντι του νευροεκφυλισμού που προκαλείται από το τοξικό κανάλι MEC-4(d)

Θελήσαμε να εξετάσουμε τον προστατευτικό ρόλο της ενίσχυσης της πρωτεοσωμικής λειτουργίας μέσω υπερέκφρασης της πρωτεοσωμικής

υπομονάδας PBS-5 στο καλά χαρακτηρισμένο μοντέλο νεκρωτικού θανάτου που προκαλείται από την έκφραση του τοξικού καναλιού *mec-4(d)*. Στα ζώα που φέρουν το αλληλόμορφο αυτό, πεθαίνουν οι έξι νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για την αντίληψη ήπιων μηχανικών ερεθισμάτων. Δημιουργήσαμε με την τεχνική της μικροένεσης διαγονιδιακά μεταλλάγματα *mec-4(d)* τα οποία φέρουν επιπλέον αντίγραφα της *rbs-5*. Ο νευροεκφυλισμός καταγράφεται κατά το στάδιο L1 μετρώντας τον αριθμό των διογκωμένων κυτταρικών πτωμάτων με χρήση της τεχνικής της μικροσκοπίας Nomarski. Δεν διαπιστώσαμε καταστολή του νεκρωτικού θανάτου σε *mec-4(d)* μεταλλαγμένα ζώα τα οποία υπερεκφράζουν την *rbs-5* (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4** *mec-4(d)* μεταλλαγμένα ζώα που φέρουν επιπλέον αντίγραφα της *rbs-5* δεν προστατεύονται από το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Αριθμός των κυτταρικών πτωμάτων των νευρώνων που αντιλαμβάνονται ήπια μηχανικά ερεθίσματα ανά 100 άτομα ( $P=0.763$ , unpaired *t*-test).

Τα παραπάνω πειράματα περιγράφουν την πρώτη προσπάθεια ενίσχυσης της ενεργότητας του πρωτεοσώματος μέσω υπερέκφρασης μιας υπομονάδας του, *in vivo*. Η διάφανη επιδερμίδα του ζώου μας επιτρέπει την παρατήρηση της κατάστασης των νευρώνων μετά από γενετικές και φαρμακολογικές παρεμβάσεις στο επίπεδο ολόκληρου του οργανισμού.

Υπερέκφραση της υπομονάδος *rbs-5* οδήγησε σε προστασία των ντοπαμινεργικών νευρώνων από την υπερέκφραση της  $\alpha$ -synuclein και καταστολή της δημιουργίας συσσωματωμάτων σε μυϊκά κύτταρα. Πειράματα συμπεριφοράς όπως για παράδειγμα ο έλεγχος της κίνησης του ζώου είναι πιθανόν να βοηθήσουν στη συσχέτιση της εμφάνισης των συσσωματωμάτων με την παρουσία ή όχι κινητικών προβλημάτων. Είναι ενδιαφέρον ότι η ενίσχυση της ενεργότητας του πρωτεοσώματος δεν πρόσφερε προστασία ενάντια στο κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από την έκφραση του τοξικού καναλιού MEC-4(d). Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι στο μοντέλο αυτό, η ενεργοποίηση του νεκρωτικού μονοπατιού οδηγεί σε γρήγορη καταστροφή του κυττάρου (τα νεκρωτικά σώματα εντοπίζονται ακόμα και στο στάδιο του εμβρύου). Συνεπώς, είναι πιθανό ότι το ενισχυμένο περιβάλλον πρωτεόστασης λόγω υπερέκφρασης της *rbs-5* δε διαθέτει το “χρονικό περιθώριο” ώστε να προσφέρει την προστατευτική του δράση ενάντια της γρήγορης εκτέλεσης του νεκρωτικού θανάτου που προκαλείται από το *mec-4(d)*. Αντίθετα, ο θάνατος των ντοπαμινεργικών νευρώνων λόγω υπερέκφρασης της  $\alpha$ -synuclein συμβαίνει σταδιακά (οι νευρώνες πεθαίνουν μεταξύ της πέμπτης και έβδομης μέρας της ενήλικης ζωής των ζώων). Στην περίπτωση αυτή, το κυτταρικό περιβάλλον ενισχυμένης πρωτεόστασης λόγω υπερέκφρασης της *rbs-5*, εμποδίζει τη δημιουργία συσσωματωμάτων και καταστέλλει την απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων.

Περαιτέρω χαρακτηρισμός των αλλαγών που συμβαίνουν στο σύστημα ανακύκλωσης-αποικοδόμησης πρωτεϊνών μέσω πρωτεοσώματος, μετά από υπερέκφραση της υπομονάδος *rbs-5*, είναι πιθανό να οδηγήσουν σε καλύτερη κατανόηση της σημασίας της πρωτεόστασης στην ασθένεια Parkinson's και στο σχεδιασμό νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

## Βιβλιογραφία

- Abravaya, K., Myers, M. P., Murphy, S. P., and Morimoto, R. I. (1992). The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes Dev* 6, 1153-1164.
- Adamska, I., and Kloppstech, K. (1991). Evidence for the localization of the nuclear-coded 22-kDa heat-shock protein in a subfraction of thylakoid membranes. *Eur J Biochem* 198, 375-381.
- Akerfelt, M., Morimoto, R. I., and Sistonen, L. (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 545-555.
- Amsterdam, J. T., Syverud, S. A., Barker, W. J., Bills, G. R., Goltra, D. D., Armao, J. C., and Hedges, J. R. (1986). Dantrolene sodium for treatment of heatstroke victims: lack of efficacy in a canine model. *Am J Emerg Med* 4, 399-405.
- Anckar, J., Hietakangas, V., Denessiouk, K., Thiele, D. J., Johnson, M. S., and Sistonen, L. (2006). Inhibition of DNA binding by differential sumoylation of heat shock factors. *Mol Cell Biol* 26, 955-964.
- Anckar, J., and Sistonen, L. (2007). Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv Exp Med Biol* 594, 78-88.
- Artal-Sanz, M., de Jong, L., and Tavernarakis, N. (2006a). *Caenorhabditis elegans*: a versatile platform for drug discovery. *Biotechnol J* 1, 1405-1418.
- Artal-Sanz, M., Samara, C., Syntichaki, P., and Tavernarakis, N. (2006b). Lysosomal biogenesis and function is critical for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 173, 231-239.
- Baloyannis, S. J., Costa, V., and Michmizos, D. (2004). Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 19, 89-93.
- Bao, X. Q., and Liu, G. T. (2009). Induction of overexpression of the 27- and 70-kDa heat shock proteins by bicyclol attenuates concanavalin A-Induced liver injury through suppression of nuclear factor-kappaB in mice. *Mol Pharmacol* 75, 1180-1188.
- Barnes, D. E., and Lindahl, T. (2004). Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 38, 445-476.
- Baumeister, R., and Ge, L. (2002). The worm in us - *Caenorhabditis elegans* as a model of human disease. *Trends Biotechnol* 20, 147-148.
- Baylis, H. A., Furuichi, T., Yoshikawa, F., Mikoshiba, K., and Sattelle, D. B. (1999). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are strongly expressed in the nervous system, pharynx, intestine, gonad and excretory cell of *Caenorhabditis elegans* and are encoded by a single gene (*itr-1*). *J Mol Biol* 294, 467-476.

Behne, M. J., Tu, C. L., Aronchik, I., Epstein, E., Bench, G., Bikle, D. D., Pozzan, T., and Mauro, T. M. (2003). Human keratinocyte ATP2C1 localizes to the Golgi and controls Golgi Ca<sup>2+</sup> stores. *J Invest Dermatol* 121, 688-694.

Benedetti, C., Haynes, C. M., Yang, Y., Harding, H. P., and Ron, D. (2006). Ubiquitin-like protein 5 positively regulates chaperone gene expression in the mitochondrial unfolded protein response. *Genetics* 174, 229-239.

Bennett, E. J., Bence, N. F., Jayakumar, R., and Kopito, R. R. (2005). Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol Cell* 17, 351-365.

Bjornsti, M. A., and Houghton, P. J. (2004). Lost in translation: dysregulation of cap-dependent translation and cancer. *Cancer Cell* 5, 519-523.

Bouchama, A., Bridey, F., Hammami, M. M., Lacombe, C., al-Shail, E., al-Ohali, Y., Combe, F., al-Sedairy, S., and de Prost, D. (1996a). Activation of coagulation and fibrinolysis in heatstroke. *Thromb Haemost* 76, 909-915.

Bouchama, A., Cafège, A., Devol, E. B., Labdi, O., el-Assil, K., and Seraj, M. (1991). Ineffectiveness of dantrolene sodium in the treatment of heatstroke. *Crit Care Med* 19, 176-180.

Bouchama, A., Hammami, M. M., Haq, A., Jackson, J., and al-Sedairy, S. (1996b). Evidence for endothelial cell activation/injury in heatstroke. *Crit Care Med* 24, 1173-1178.

Bouchama, A., and Knochel, J. P. (2002). Heat stroke. *N Engl J Med* 346, 1978-1988.

Boulton, S. J., Gartner, A., Reboul, J., Vaglio, P., Dyson, N., Hill, D. E., and Vidal, M. (2002). Combined functional genomic maps of the *C. elegans* DNA damage response. *Science* 295, 127-131.

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

Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A. P., Kroemer, G., Solary, E., and Garrido, C. (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2, 645-652.

Buckley, I. K. (1972). A light and electron microscopic study of thermally injured cultured cells. *Lab Invest* 26, 201-209.

Bukau, B., and Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.

Bukau, B., Weissman, J., and Horwich, A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125, 443-451.

- Bulteau, A. L., Petropoulos, I., and Friguet, B. (2000). Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis. *Exp Gerontol* 35, 767-777.
- Bussey, H., Andrews, B., and Boone, C. (2006). From worm genetic networks to complex human diseases. *Nat Genet* 38, 862-863.
- Calabrese, E. J. (2004). Hormesis: from marginalization to mainstream: a case for hormesis as the default dose-response model in risk assessment. *Toxicol Appl Pharmacol* 197, 125-136.
- Calabrese, E. J., McCarthy, M. E., and Kenyon, E. (1987). The occurrence of chemically induced hormesis. *Health Phys* 52, 531-541.
- Caldecott, K. W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* 9, 619-631.
- Calderwood, S. K., Khaleque, M. A., Sawyer, D. B., and Ciocca, D. R. (2006). Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 31, 164-172.
- Caldwell, K. A., Tucci, M. L., Armagost, J., Hodges, T. W., Chen, J., Memon, S. B., Blalock, J. E., DeLeon, S. M., Findlay, R. H., Ruan, Q., *et al.* (2009). Investigating bacterial sources of toxicity as an environmental contributor to dopaminergic neurodegeneration. *PLoS One* 4, e7227.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92-96.
- Chalfie, M., Driscoll, M., and Huang, M. (1993). Degenerin similarities. *Nature* 361, 504.
- Chalfie, M., and Wolinsky, E. (1990). The identification and suppression of inherited neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 345, 410-416.
- Chang, D. M. (1993). The role of cytokines in heat stroke. *Immunol Invest* 22, 553-561.
- Channa, A. B., Seraj, M. A., Saddique, A. A., Kadiwal, G. H., Shaikh, M. H., and Samarkandi, A. H. (1990). Is dantrolene effective in heat stroke patients? *Crit Care Med* 18, 290-292.
- Chao, T. C., Sinniah, R., and Pakiam, J. E. (1981). Acute heat stroke deaths. *Pathology* 13, 145-156.
- Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., Podar, K., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Catley, L., Tai, Y. T., Hayashi, T., Shringarpure, R., *et al.* (2003). Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood* 102, 3379-3386.



- Chen, C. M., Hou, C. C., Cheng, K. C., Tian, R. L., Chang, C. P., and Lin, M. T. (2006). Activated protein C therapy in a rat heat stroke model. *Crit Care Med* 34, 1960-1966.
- Chiu, R., Novikov, L., Mukherjee, S., and Shields, D. (2002). A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis. *J Cell Biol* 159, 637-648.
- Cho, J. H., Ko, K. M., Singaravelu, G., and Ahnn, J. (2005). *Caenorhabditis elegans* PMR1, a P-type calcium ATPase, is important for calcium/manganese homeostasis and oxidative stress response. *FEBS Lett* 579, 778-782.
- Chondrogianni, N., Stratford, F. L., Trougakos, I. P., Friguet, B., Rivett, A. J., and Gonos, E. S. (2003). Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J Biol Chem* 278, 28026-28037.
- Chondrogianni, N., Tzavelas, C., Pemberton, A. J., Nezis, I. P., Rivett, A. J., and Gonos, E. S. (2005). Overexpression of proteasome beta5 assembled subunit increases the amount of proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates. *J Biol Chem* 280, 11840-11850.
- Cifuentes, F., Gonzalez, C. E., Fiordelisio, T., Guerrero, G., Lai, F. A., and Hernandez-Cruz, A. (2001). A ryanodine fluorescent derivative reveals the presence of high-affinity ryanodine binding sites in the Golgi complex of rat sympathetic neurons, with possible functional roles in intracellular Ca(2+) signaling. *Cell Signal* 13, 353-362.
- Coris, E. E., Ramirez, A. M., and Van Durme, D. J. (2004). Heat illness in athletes: the dangerous combination of heat, humidity and exercise. *Sports Med* 34, 9-16.
- Cuervo, A. M. (2004). Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 263, 55-72.
- Cuervo, A. M. (2010). Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends Endocrinol Metab* 21, 142-150.
- Cypser, J. R., and Johnson, T. E. (2002). Multiple stressors in *Caenorhabditis elegans* induce stress hormesis and extended longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57, B109-114.
- Cypser, J. R., and Johnson, T. E. (2003). Hormesis in *Caenorhabditis elegans* dauer-defective mutants. *Biogerontology* 4, 203-214.
- Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A. B., and Lindquist, S. (2007). Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell* 130, 1005-1018.
- Damanhoury, Z. A., and Tayeb, O. S. (1992). Animal models for heat stroke studies. *J Pharmacol Toxicol Methods* 28, 119-127.

- Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2003). Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302, 819-822.
- De Bont, R., and van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19, 169-185.
- de Mattia, F., Gubser, C., van Dommelen, M. M., Visch, H. J., Distelmaier, F., Postigo, A., Luyten, T., Parys, J. B., de Smedt, H., Smith, G. L., *et al.* (2009). Human Golgi antiapoptotic protein modulates intracellular calcium fluxes. *Mol Biol Cell* 20, 3638-3645.
- de Miguel, N., Echeverria, P. C., and Angel, S. O. (2005). Differential subcellular localization of members of the *Toxoplasma gondii* small heat shock protein family. *Eukaryot Cell* 4, 1990-1997.
- Dejima, K., Murata, D., Mizuguchi, S., Nomura, K. H., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Gengyo-Ando, K., Yoshina, S., Ichimiya, T., Nishihara, S., *et al.* (2010). Two Golgi-resident 3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters play distinct roles in heparan sulfate modifications and embryonic and larval development in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 285, 24717-24728.
- Delmas, F., Pierre, F., Coucheney, F., Divies, C., and Guzzo, J. (2001). Biochemical and physiological studies of the small heat shock protein Lo18 from the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3, 601-610.
- Dematte, J. E., O'Mara, K., Buescher, J., Whitney, C. G., Forsythe, S., McNamee, T., Adiga, R. B., and Ndukwu, I. M. (1998). Near-fatal heat stroke during the 1995 heat wave in Chicago. *Ann Intern Med* 129, 173-181.
- Dice, J. F. (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 3, 295-299.
- Doitsidou, M., Poole, R. J., Sarin, S., Bigelow, H., and Hobert, O. (2010). *C. elegans* mutant identification with a one-step whole-genome-sequencing and SNP mapping strategy. *PLoS One* 5, e15435.
- Dolman, N. J., Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V., Voronina, S. G., Petersen, O. H., and Tepikin, A. V. (2005). Stable Golgi-mitochondria complexes and formation of Golgi Ca(2+) gradients in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 280, 15794-15799.
- Dong, M. Q., Venable, J. D., Au, N., Xu, T., Park, S. K., Cociorva, D., Johnson, J. R., Dillin, A., and Yates, J. R., 3rd (2007). Quantitative mass spectrometry identifies insulin signaling targets in *C. elegans*. *Science* 317, 660-663.
- Durr, G., Strayle, J., Plemper, R., Elbs, S., Klee, S. K., Catty, P., Wolf, D. H., and Rudolph, H. K. (1998). The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Biol Cell* 9, 1149-1162.

Duverger, O., Paslaru, L., and Morange, M. (2004). HSP25 is involved in two steps of the differentiation of PAM212 keratinocytes. *J Biol Chem* 279, 10252-10260.

Easterling, D. R., Meehl, G. A., Parmesan, C., Changnon, S. A., Karl, T. R., and Mearns, L. O. (2000). Climate extremes: observations, modeling, and impacts. *Science* 289, 2068-2074.

Eisenberg-Domovich, Y., Kloppstech, K., and Ohad, I. (1994). Reversible membrane association of heat-shock protein 22 in *Chlamydomonas reinhardtii* during heat shock and recovery. *Eur J Biochem* 222, 1041-1046.

Ellgaard, L., and Helenius, A. (2001). ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* 13, 431-437.

Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 181-191.

Fan, J., Hu, Z., Zeng, L., Lu, W., Tang, X., Zhang, J., and Li, T. (2008). Golgi apparatus and neurodegenerative diseases. *Int J Dev Neurosci* 26, 523-534.

Ferri, K. F., and Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3, E255-263.

Fire, A. (1986). Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* 5, 2673-2680.

Fostel, J. L., Benner Coste, L., and Jacobson, L. A. (2003). Degradation of transgene-coded and endogenous proteins in the muscles of *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 173-177.

Fousteri, M., and Mullenders, L. H. (2008). Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res* 18, 73-84.

Fujita, Y., Ohama, E., Takatama, M., Al-Sarraj, S., and Okamoto, K. (2006). Fragmentation of Golgi apparatus of nigral neurons with alpha-synuclein-positive inclusions in patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 112, 261-265.

Gaczynska, M., Osmulski, P. A., and Ward, W. F. (2001). Caretaker or undertaker? The role of the proteasome in aging. *Mech Ageing Dev* 122, 235-254.

Gangalum, R. K., and Bhat, S. P. (2009). AlphaB-crystallin: a Golgi-associated membrane protein in the developing ocular lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 3283-3290.

Gangalum, R. K., Schibler, M. J., and Bhat, S. P. (2004). Small heat shock protein alphaB-crystallin is part of cell cycle-dependent Golgi reorganization. *J Biol Chem* 279, 43374-43377.

Ganguly, A. R., Steinhäuser, K., Erickson, D. J., 3rd, Branstetter, M., Parish, E. S., Singh, N., Drake, J. B., and Buja, L. (2009). Higher trends but larger uncertainty and geographic variability in 21st century temperature and heat waves. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 15555-15559.

Garrido, C., Bruey, J. M., Fromentin, A., Hammann, A., Arrigo, A. P., and Solary, E. (1999). HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *Faseb J* *13*, 2061-2070.

Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., and Kroemer, G. (2006). Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* *5*, 2592-2601.

Gentile, B. J., Szlyk-Modrow, P. C., Durkot, M. J., Krestel, B. A., Sils, I. V., Tartarini, K. A., and Alkhyat, A. M. (1996). A miniswine model of acute exertional heat exhaustion. *Aviat Space Environ Med* *67*, 560-567.

George, C. H., Rogers, S. A., Bertrand, B. M., Tunwell, R. E., Thomas, N. L., Steele, D. S., Cox, E. V., Pepper, C., Hazeel, C. J., Claycomb, W. C., and Lai, F. A. (2007). Alternative splicing of ryanodine receptors modulates cardiomyocyte Ca<sup>2+</sup> signaling and susceptibility to apoptosis. *Circ Res* *100*, 874-883.

Gessmann, R., Kourtis, N., Petratos, K., and Tavernarakis, N. (2010). Molecular modeling of mechanosensory ion channel structural and functional features. *PLoS One* *5*, e12814.

Gidday, J. M. (2006). Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci* *7*, 437-448.

Gillet, L. C., and Scharer, O. D. (2006). Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev* *106*, 253-276.

Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* *68*, 913-963.

Gosavi, N., Lee, H. J., Lee, J. S., Patel, S., and Lee, S. J. (2002). Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion. *J Biol Chem* *277*, 48984-48992.

Gribbon, P., and Hardingham, T. E. (1998). Macromolecular diffusion of biological polymers measured by confocal fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J* *75*, 1032-1039.

Guettouche, T., Boellmann, F., Lane, W. S., and Voellmy, R. (2005). Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem* *6*, 4.

Gunteski-Hamblin, A. M., Clarke, D. M., and Shull, G. E. (1992). Molecular cloning and tissue distribution of alternatively spliced mRNAs encoding possible mammalian

homologues of the yeast secretory pathway calcium pump. *Biochemistry* 31, 7600-7608.

Gyrd-Hansen, M., Nylandsted, J., and Jaattela, M. (2004). Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell Cycle* 3, 1484-1485.

Hajdu-Cronin, Y. M., Chen, W. J., and Sternberg, P. W. (2004). The L-type cyclin CYL-1 and the heat-shock-factor HSF-1 are required for heat-shock-induced protein expression in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 168, 1937-1949.

Halaschek-Wiener, J., Khattra, J. S., McKay, S., Pouzyrev, A., Stott, J. M., Yang, G. S., Holt, R. A., Jones, S. J., Marra, M. A., Brooks-Wilson, A. R., and Riddle, D. L. (2005). Analysis of long-lived *C. elegans* daf-2 mutants using serial analysis of gene expression. *Genome Res* 15, 603-615.

Hall, D. H., Gu, G., Garcia-Anoveros, J., Gong, L., Chalfie, M., and Driscoll, M. (1997). Neuropathology of degenerative cell death in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 17, 1033-1045.

Hampton, R. Y. (2000). ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. *Curr Biol* 10, R518-521.

Hanawalt, P. C. (2002). Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 21, 8949-8956.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., and Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885-889.

Harrington, A. J., Hamamichi, S., Caldwell, G. A., and Caldwell, K. A. (2010). *C. elegans* as a model organism to investigate molecular pathways involved with Parkinson's disease. *Dev Dyn* 239, 1282-1295.

Haslbeck, M., and Buchner, J. (2002). Chaperone function of sHsps. *Prog Mol Subcell Biol* 28, 37-59.

Haynes, C. M., Petrova, K., Benedetti, C., Yang, Y., and Ron, D. (2007). ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Dev Cell* 13, 467-480.

Haynes, C. M., Yang, Y., Blais, S. P., Neubert, T. A., and Ron, D. (2010). The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*. *Mol Cell* 37, 529-540.

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

Hicks, S. W., and Machamer, C. E. (2002). The NH<sub>2</sub>-terminal domain of Golgin-160 contains both Golgi and nuclear targeting information. *J Biol Chem* 277, 35833-35839.

Hietakangas, V., Ahlskog, J. K., Jakobsson, A. M., Hellesuo, M., Sahlberg, N. M., Holmberg, C. I., Mikhailov, A., Palvimo, J. J., Pirkkala, L., and Sistonen, L. (2003). Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol* 23, 2953-2968.

Hightower, L. E. (1991). Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66, 191-197.

Hoeijmakers, J. H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 361, 1475-1485.

Hollander, J. M., Martin, J. L., Belke, D. D., Scott, B. T., Swanson, E., Krishnamoorthy, V., and Dillmann, W. H. (2004). Overexpression of wild-type heat shock protein 27 and a nonphosphorylatable heat shock protein 27 mutant protects against ischemia/reperfusion injury in a transgenic mouse model. *Circulation* 110, 3544-3552.

Holmberg, C. I., Hietakangas, V., Mikhailov, A., Rantanen, J. O., Kallio, M., Meinander, A., Hellman, J., Morrice, N., MacKintosh, C., Morimoto, R. I., *et al.* (2001). Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *Embo J* 20, 3800-3810.

Horowitz, M. (2002). From molecular and cellular to integrative heat defense during exposure to chronic heat. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 131, 475-483.

Horvath, I., Glatz, A., Varvasovszki, V., Torok, Z., Pali, T., Balogh, G., Kovacs, E., Nadasdi, L., Benko, S., Joo, F., and Vigh, L. (1998). Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a "fluidity gene". *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3513-3518.

Horvath, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A., and Vigh, L. (2008). Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochim Biophys Acta* 1778, 1653-1664.

Hsu, A. L., Murphy, C. T., and Kenyon, C. (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300, 1142-1145.

Hu, Z., Bonifas, J. M., Beech, J., Bench, G., Shigihara, T., Ogawa, H., Ikeda, S., Mauro, T., and Epstein, E. H., Jr. (2000). Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat Genet* 24, 61-65.

Hu, Z., Zeng, L., Huang, Z., Zhang, J., and Li, T. (2007). The study of Golgi apparatus in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 32, 1265-1277.

Hubbard, R. W., Bowers, W. D., Matthew, W. T., Curtis, F. C., Criss, R. E., Sheldon, G. M., and Ratteree, J. W. (1977). Rat model of acute heatstroke mortality. *J Appl Physiol* *42*, 809-816.

Hubbard, R. W., Matthew, W. T., Criss, R. E., Kelly, C., Sils, I., Mager, M., Bowers, W. D., and Wolfe, D. (1978). Role of physical effort in the etiology of rat heatstroke injury and mortality. *J Appl Physiol* *45*, 463-468.

Huynh, D. P., Yang, H. T., Vakharia, H., Nguyen, D., and Pulst, S. M. (2003). Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death. *Hum Mol Genet* *12*, 1485-1496.

Hyun, D. H., Gray, D. A., Halliwell, B., and Jenner, P. (2004). Interference with ubiquitination causes oxidative damage and increased protein nitration: implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* *90*, 422-430.

Ingolia, T. D., and Craig, E. A. (1982). Four small *Drosophila* heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *79*, 2360-2364.

Ishidoh, K., and Kominami, E. (2002). Processing and activation of lysosomal proteinases. *Biol Chem* *383*, 1827-1831.

Jaattela, M. (1999). Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med* *31*, 261-271.

Jacobson, K., Zhang, F., and Tsay, T. T. (1991). Fluorescence recovery after photobleaching techniques to measure translational mobility in microscopic samples. *Scanning Microsc* *5*, 357-361; discussion 361-352.

Jellinger, K. A. (2000). Cell death mechanisms in Parkinson's disease. *J Neural Transm* *107*, 1-29.

Jellinger, K. A. (2009). Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm* *116*, 1111-1162.

Kaletta, T., and Hengartner, M. O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov* *5*, 387-398.

Kamath, R. S., and Ahringer, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* *30*, 313-321.

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.

Kapp, L. D., and Lorsch, J. R. (2004). The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* *73*, 657-704.

- Kaufman, R. J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13, 1211-1233.
- Kauppinen, R. A., Enkvist, K., Holopainen, I., and Akerman, K. E. (1988). Glucose deprivation depolarizes plasma membrane of cultured astrocytes and collapses transmembrane potassium and glutamate gradients. *Neuroscience* 26, 283-289.
- Kawahara, K., Hashimoto, M., Bar-On, P., Ho, G. J., Crews, L., Mizuno, H., Rockenstein, E., Imam, S. Z., and Masliah, E. (2008). alpha-Synuclein aggregates interfere with Parkin solubility and distribution: role in the pathogenesis of Parkinson disease. *J Biol Chem* 283, 6979-6987.
- Keiper, B. D., Lamphear, B. J., Deshpande, A. M., Jankowska-Anyszka, M., Aamodt, E. J., Blumenthal, T., and Rhoads, R. E. (2000). Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 275, 10590-10596.
- Keller, P., and Simons, K. (1997). Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J Cell Sci* 110 (Pt 24), 3001-3009.
- Kenyon, C. (2005). The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 120, 449-460.
- Kim, K. K., Kim, R., and Kim, S. H. (1998). Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* 394, 595-599.
- Kline, M. P., and Morimoto, R. I. (1997). Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. *Mol Cell Biol* 17, 2107-2115.
- Knauf, U., Newton, E. M., Kyriakis, J., and Kingston, R. E. (1996). Repression of human heat shock factor 1 activity at control temperature by phosphorylation. *Genes Dev* 10, 2782-2793.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880-884.
- Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., *et al.* (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in *Atg7*-deficient mice. *J Cell Biol* 169, 425-434.
- Kourtis, N., and Tavernarakis, N. (2007). Non-developmentally programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Semin Cancer Biol* 17, 122-133.
- Kuzmin, E. V., Karpova, O. V., Elthon, T. E., and Newton, K. J. (2004). Mitochondrial respiratory deficiencies signal up-regulation of genes for heat shock proteins. *J Biol Chem* 279, 20672-20677.



Lakso, M., Vartiainen, S., Moilanen, A. M., Sirvio, J., Thomas, J. H., Nass, R., Blakely, R. D., and Wong, G. (2003). Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. *J Neurochem* 86, 165-172.

Lane, J. D., Lucocq, J., Pryde, J., Barr, F. A., Woodman, P. G., Allan, V. J., and Lowe, M. (2002). Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *J Cell Biol* 156, 495-509.

Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., and Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 23, 7448-7459.

Lee, B. Y., Hefta, S. A., and Brennan, P. J. (1992). Characterization of the major membrane protein of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 60, 2066-2074.

Lee, S., Owen, H. A., Prochaska, D. J., and Barnum, S. R. (2000). HSP16.6 is involved in the development of thermotolerance and thylakoid stability in the unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Curr Microbiol* 40, 283-287.

Lee, W. C., Wen, H. C., Chang, C. P., Chen, M. Y., and Lin, M. T. (2006). Heat shock protein 72 overexpression protects against hyperthermia, circulatory shock, and cerebral ischemia during heatstroke. *J Appl Physiol* 100, 2073-2082.

Lehotsky, J., Kaplan, P., Murin, R., and Raeymaekers, L. (2002). The role of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pumps (PMCA) in pathologies of mammalian cells. *Front Biosci* 7, d53-84.

Lehotsky, J., Racay, P., Pavlikova, M., Tatarkova, Z., Urban, P., Chomova, M., Kovalska, M., and Kaplan, P. (2009). Cross-talk of intracellular calcium stores in the response to neuronal ischemia and ischemic tolerance. *Gen Physiol Biophys* 28 *Spec No Focus*, F104-114.

Leon, L. R., DuBose, D. A., and Mason, C. W. (2005). Heat stress induces a biphasic thermoregulatory response in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R197-204.

Lette, G., and Hengartner, M. O. (2006). Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 97-108.

Lin, M. T. (1997). Heatstroke-induced cerebral ischemia and neuronal damage. Involvement of cytokines and monoamines. *Ann N Y Acad Sci* 813, 572-580.

Lin, M. T. (1999). Pathogenesis of an experimental heatstroke model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26, 826-827.

Lin, P., Le-Niculescu, H., Hofmeister, R., McCaffery, J. M., Jin, M., Hennemann, H., McQuistan, T., De Vries, L., and Farquhar, M. G. (1998). The mammalian calcium-

binding protein, nucleobindin (CALNUC), is a Golgi resident protein. *J Cell Biol* 141, 1515-1527.

Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.

Lindquist, S., and Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22, 631-677.

Lippincott-Schwartz, J., and Patterson, G. H. (2003). Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300, 87-91.

Lissandron, V., Podini, P., Pizzo, P., and Pozzan, T. (2010). Unique characteristics of Ca<sup>2+</sup> homeostasis of the trans-Golgi compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Lydiatt, J. S., and Hill, G. E. (1981). Treatment of heat stroke with dantrolene. *Jama* 246, 41-42.

Machamer, C. E. (2003). Golgi disassembly in apoptosis: cause or effect? *Trends Cell Biol* 13, 279-281.

Malamud, N., Haymaker, W., and Custer, R. P. (1946). Heat stroke; a clinico-pathologic study of 125 fatal cases. *Mil Surg* 99, 397-449.

Mancini, M., Machamer, C. E., Roy, S., Nicholson, D. W., Thornberry, N. A., Casciola-Rosen, L. A., and Rosen, A. (2000). Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol* 149, 603-612.

Mandal, D., Woolf, T. B., and Rao, R. (2000). Manganese selectivity of pmr1, the yeast secretory pathway ion pump, is defined by residue gln783 in transmembrane segment 6. Residue Asp778 is essential for cation transport. *J Biol Chem* 275, 23933-23938.

Marambaud, P., Dreses-Werringloer, U., and Vingtdeux, V. (2009). Calcium signaling in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 4, 20.

Martin, J. L., Mestrlil, R., Hilal-Dandan, R., Brunton, L. L., and Dillmann, W. H. (1997). Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation* 96, 4343-4348.

Martone, M. E., Edelman, V. M., Ellisman, M. H., and Nef, P. (1999). Cellular and subcellular distribution of the calcium-binding protein NCS-1 in the central nervous system of the rat. *Cell Tissue Res* 295, 395-407.

Marzella, L., Ahlberg, J., and Glaumann, H. (1981). Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 36, 219-234.

Matthews, L. R., Vaglio, P., Reboul, J., Ge, H., Davis, B. P., Garrels, J., Vincent, S., and Vidal, M. (2001). Identification of potential interaction networks using sequence-

based searches for conserved protein-protein interactions or "interologs". *Genome Res* 11, 2120-2126.

Mattson, M. P., LaFerla, F. M., Chan, S. L., Leissring, M. A., Shepel, P. N., and Geiger, J. D. (2000). Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 23, 222-229.

McColl, G., Rogers, A. N., Alavez, S., Hubbard, A. E., Melov, S., Link, C. D., Bush, A. I., Kapahi, P., and Lithgow, G. J. (2010). Insulin-like signaling determines survival during stress via posttranscriptional mechanisms in *C. elegans*. *Cell Metab* 12, 260-272.

McElwee, J., Bubb, K., and Thomas, J. H. (2003). Transcriptional outputs of the *Caenorhabditis elegans* forkhead protein DAF-16. *Aging Cell* 2, 111-121.

McMahon, A., Wong, B. S., Iacopino, A. M., Ng, M. C., Chi, S., and German, D. C. (1998). Calbindin-D28k buffers intracellular calcium and promotes resistance to degeneration in PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 54, 56-63.

McNaught, K. S., Perl, D. P., Brownell, A. L., and Olanow, C. W. (2004). Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 56, 149-162.

Mello, C., and Fire, A. (1995). DNA transformation. *Methods Cell Biol* 48, 451-482.

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.

Minois, N. (2000). Longevity and aging: beneficial effects of exposure to mild stress. *Biogerontology* 1, 15-29.

Missiaen, L., Van Acker, K., Van Baelen, K., Raeymaekers, L., Wuytack, F., Parys, J. B., De Smedt, H., Vanoevelen, J., Dode, L., Rizzuto, R., and Callewaert, G. (2004). Calcium release from the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum in HeLa cells stably expressing targeted aequorin to these compartments. *Cell Calcium* 36, 479-487.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., and Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.

Moran, D., Epstein, Y., Wiener, M., and Horowitz, M. (1999). Dantrolene and recovery from heat stroke. *Aviat Space Environ Med* 70, 987-989.

Morano, K. A., and Thiele, D. J. (1999). Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals. *Gene Expr* 7, 271-282.

Morimoto, R. I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12, 3788-3796.

- Morimoto, R. I. (2008). Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev* 22, 1427-1438.
- Morley, J. F., and Morimoto, R. I. (2004). Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell* 15, 657-664.
- Morrison, L. E., Whittaker, R. J., Klepper, R. E., Wawrousek, E. F., and Glembotski, C. C. (2004). Roles for alphaB-crystallin and HSPB2 in protecting the myocardium from ischemia-reperfusion-induced damage in a KO mouse model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H847-855.
- Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., Meriin, A. B., Sherman, M. Y., Morimoto, R. I., and Massie, B. (2000). The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 20, 7146-7159.
- Mosser, D. D., and Morimoto, R. I. (2004). Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 23, 2907-2918.
- Murphy, C. T., McCarroll, S. A., Bargmann, C. I., Fraser, A., Kamath, R. S., Ahringer, J., Li, H., and Kenyon, C. (2003). Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424, 277-283.
- Naidoo, N. (2009). ER and aging-Protein folding and the ER stress response. *Ageing Res Rev* 8, 150-159.
- Nakagawa, M., Tsujimoto, N., Nakagawa, H., Iwaki, T., Fukumaki, Y., and Iwaki, A. (2001). Association of HSPB2, a member of the small heat shock protein family, with mitochondria. *Exp Cell Res* 271, 161-168.
- Nakagomi, S., Barsoum, M. J., Bossy-Wetzler, E., Sutterlin, C., Malhotra, V., and Lipton, S. A. (2008). A Golgi fragmentation pathway in neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 29, 221-231.
- Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., *et al.* (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med* 13, 619-624.
- Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19, 137-141.
- Narberhaus, F. (2002). Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 64-93; table of contents.
- O'Reilly, L. A., Ekert, P., Harvey, N., Marsden, V., Cullen, L., Vaux, D. L., Hacker, G., Magnusson, C., Pakusch, M., Cecconi, F., *et al.* (2002). Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase-9. *Cell Death Differ* 9, 832-841.

Oh, S. W., Mukhopadhyay, A., Dixit, B. L., Raha, T., Green, M. R., and Tissenbaum, H. A. (2006). Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nat Genet* 38, 251-257.

Okkema, P. G., Harrison, S. W., Plunger, V., Aryana, A., and Fire, A. (1993). Sequence requirements for myosin gene expression and regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 135, 385-404.

Okunade, G. W., Miller, M. L., Azhar, M., Andringa, A., Sanford, L. P., Doetschman, T., Prasad, V., and Shull, G. E. (2007). Loss of the *Atp2c1* secretory pathway  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SPCA1) in mice causes Golgi stress, apoptosis, and midgestational death in homozygous embryos and squamous cell tumors in adult heterozygotes. *J Biol Chem* 282, 26517-26527.

Oliveira, R. P., Porter Abate, J., Dilks, K., Landis, J., Ashraf, J., Murphy, C. T., and Blackwell, T. K. (2009). Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell* 8, 524-541.

Oyake, J., Otaka, M., Matsushashi, T., Jin, M., Odashima, M., Komatsu, K., Wada, I., Horikawa, Y., Ohba, R., Hatakeyama, N., *et al.* (2006). Over-expression of 70-kDa heat shock protein confers protection against monochloramine-induced gastric mucosal cell injury. *Life Sci* 79, 300-305.

Panasenko, O. O., Kim, M. V., Marston, S. B., and Gusev, N. B. (2003). Interaction of the small heat shock protein with molecular mass 25 kDa (hsp25) with actin. *Eur J Biochem* 270, 892-901.

Park, H. S., Cho, S. G., Kim, C. K., Hwang, H. S., Noh, K. T., Kim, M. S., Huh, S. H., Kim, M. J., Ryoo, K., Kim, E. K., *et al.* (2002). Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 22, 7721-7730.

Park, H. S., Lee, J. S., Huh, S. H., Seo, J. S., and Choi, E. J. (2001). Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *Embo J* 20, 446-456.

Park, S. K., Tedesco, P. M., and Johnson, T. E. (2009). Oxidative stress and longevity in *Caenorhabditis elegans* as mediated by SKN-1. *Aging Cell* 8, 258-269.

Paschen, W. (2003). Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. *Cell Calcium* 34, 365-383.

Pavlikova, M., Tatarkova, Z., Sivonova, M., Kaplan, P., Krizanova, O., and Lehotsky, J. (2009). Alterations induced by ischemic preconditioning on secretory pathways  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SPCA) gene expression and oxidative damage after global cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Cell Mol Neurobiol* 29, 909-916.

Pinton, P., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (1998). The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *Embo J* 17, 5298-5308.

Pologruto, T. A., Yasuda, R., and Svoboda, K. (2004). Monitoring neural activity and [Ca<sup>2+</sup>] with genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators. *J Neurosci* *24*, 9572-9579.

Prahlad, V., and Morimoto, R. I. (2009). Integrating the stress response: lessons for neurodegenerative diseases from *C. elegans*. *Trends Cell Biol* *19*, 52-61.

Prostko, C. R., Brostrom, M. A., and Brostrom, C. O. (1993). Reversible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 alpha in response to endoplasmic reticular signaling. *Mol Cell Biochem* *127-128*, 255-265.

Przybysz, A. J., Choe, K. P., Roberts, L. J., and Strange, K. (2009). Increased age reduces DAF-16 and SKN-1 signaling and the hormetic response of *Caenorhabditis elegans* to the xenobiotic juglone. *Mech Ageing Dev* *130*, 357-369.

Rattan, S. I. (2004). Aging intervention, prevention, and therapy through hormesis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* *59*, 705-709.

Rattan, S. I. (2008). Hormesis in aging. *Ageing Res Rev* *7*, 63-78.

Rattan, S. I., Gonzalez-Dosal, R., Nielsen, E. R., Kraft, D. C., Weibel, J., and Kahns, S. (2004). Slowing down aging from within: mechanistic aspects of anti-aging hormetic effects of mild heat stress on human cells. *Acta Biochim Pol* *51*, 481-492.

Ray, P. S., Martin, J. L., Swanson, E. A., Otani, H., Dillmann, W. H., and Das, D. K. (2001). Transgene overexpression of alphaB crystallin confers simultaneous protection against cardiomyocyte apoptosis and necrosis during myocardial ischemia and reperfusion. *Faseb J* *15*, 393-402.

Reits, E. A., and Neefjes, J. J. (2001). From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol* *3*, E145-147.

Rennie, M. J., Smith, K., and Watt, P. W. (1994). Measurement of human tissue protein synthesis: an optimal approach. *Am J Physiol* *266*, E298-307.

Rieckher, M., Kourtis, N., Paspadaki, A., and Tavernarakis, N. (2009). Transgenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Mol Biol* *561*, 21-39.

Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., Kanai, Y., Hediger, M. A., Wang, Y., Schielke, J. P., and Welty, D. F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* *16*, 675-686.

Russnak, R. H., and Candido, E. P. (1985). Locus encoding a family of small heat shock genes in *Caenorhabditis elegans*: two genes duplicated to form a 3.8-kilobase inverted repeat. *Mol Cell Biol* *5*, 1268-1278.

Rutkowski, D. T., Arnold, S. M., Miller, C. N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K. M., Mori, K., Sadighi Akha, A. A., Raden, D., and Kaufman, R. J. (2006). Adaptation to ER

stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol* 4, e374.

Sakaguchi, Y., Stephens, L. C., Makino, M., Kaneko, T., Strebel, F. R., Danhauser, L. L., Jenkins, G. N., and Bull, J. M. (1995). Apoptosis in tumors and normal tissues induced by whole body hyperthermia in rats. *Cancer Res* 55, 5459-5464.

Sakurai, A., Okamoto, K., Fujita, Y., Nakazato, Y., Wakabayashi, K., Takahashi, H., and Gonatas, N. K. (2000). Fragmentation of the Golgi apparatus of the ballooned neurons in patients with corticobasal degeneration and Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 100, 270-274.

Samara, C., Syntichaki, P., and Tavernarakis, N. (2008). Autophagy is required for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ* 15, 105-112.

Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sattler, R., and Tymianski, M. (2000). Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 78, 3-13.

Sayer, R. J. (2002). Intracellular Ca<sup>2+</sup> handling. *Adv Exp Med Biol* 513, 183-196.

Scherer, P. E., Lederkremer, G. Z., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H. F. (1996). Cab45, a novel (Ca<sup>2+</sup>)-binding protein localized to the Golgi lumen. *J Cell Biol* 133, 257-268.

Schroder, M., and Kaufman, R. J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74, 739-789.

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

Sharma, H. S. (2005). Heat-related deaths are largely due to brain damage. *Indian J Med Res* 121, 621-623.

Sharma, H. S. (2007). Methods to produce hyperthermia-induced brain dysfunction. *Prog Brain Res* 162, 173-199.

Shi, Y., Mosser, D. D., and Morimoto, R. I. (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev* 12, 654-666.

Simon, H. B. (1993). Hyperthermia. *N Engl J Med* 329, 483-487.

Sorger, P. K., and Pelham, H. R. (1988). Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* 54, 855-864.

- Sorin, A., Rosas, G., and Rao, R. (1997). PMR1, a Ca<sup>2+</sup>-ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *J Biol Chem* 272, 9895-9901.
- Southall, T. D., Terhzaz, S., Cabrero, P., Chintapalli, V. R., Evans, J. M., Dow, J. A., and Davies, S. A. (2006). Novel subcellular locations and functions for secretory pathway Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-ATPases. *Physiol Genomics* 26, 35-45.
- Stankiewicz, A. R., Lachapelle, G., Foo, C. P., Radicioni, S. M., and Mosser, D. D. (2005). Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* 280, 38729-38739.
- Stevens, F. J., and Argon, Y. (1999). Protein folding in the ER. *Semin Cell Dev Biol* 10, 443-454.
- Stieber, A., Chen, Y., Wei, S., Mourelatos, Z., Gonatas, J., Okamoto, K., and Gonatas, N. K. (1998). The fragmented neuronal Golgi apparatus in amyotrophic lateral sclerosis includes the trans-Golgi-network: functional implications. *Acta Neuropathol* 95, 245-253.
- Stinchcomb, D. T., Shaw, J. E., Carr, S. H., and Hirsh, D. (1985). Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* 5, 3484-3496.
- Sudbrak, R., Brown, J., Dobson-Stone, C., Carter, S., Ramser, J., White, J., Healy, E., Dissanayake, M., Larregue, M., Perrussel, M., *et al.* (2000). Hailey-Hailey disease is caused by mutations in ATP2C1 encoding a novel Ca(2+) pump. *Hum Mol Genet* 9, 1131-1140.
- Sugasawa, K. (2006). UV-induced ubiquitylation of XPC complex, the UV-DDB-ubiquitin ligase complex, and DNA repair. *J Mol Histol* 37, 189-202.
- Syntichaki, P., Samara, C., and Tavernarakis, N. (2005). The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase mediates intracellular acidification required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Curr Biol* 15, 1249-1254.
- Syntichaki, P., and Tavernarakis, N. (2003). The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci* 4, 672-684.
- Syntichaki, P., and Tavernarakis, N. (2004). Genetic models of mechanotransduction: the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Physiol Rev* 84, 1097-1153.
- Syntichaki, P., Troulinaki, K., and Tavernarakis, N. (2007). eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 445, 922-926.
- Syntichaki, P., Xu, K., Driscoll, M., and Tavernarakis, N. (2002). Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature* 419, 939-944.
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., and Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7, 880-885.



- Takamine, K., Okamoto, K., Fujita, Y., Sakurai, A., Takatama, M., and Gonatas, N. K. (2000). The involvement of the neuronal Golgi apparatus and trans-Golgi network in the human olivary hypertrophy. *J Neurol Sci* 182, 45-50.
- 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.
- Tayeb, O. S., and Marzouki, Z. M. (1990). Effect of dantrolene pretreatment on heat stroke in sheep. *Pharmacol Res* 22, 565-572.
- Torok, Z., Goloubinoff, P., Horvath, I., Tsvetkova, N. M., Glatz, A., Balogh, G., Varvasovszki, V., Los, D. A., Vierling, E., Crowe, J. H., and Vigh, L. (2001). Synechocystis HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3098-3103.
- Toth, M. L., Simon, P., Kovacs, A. L., and Vellai, T. (2007). Influence of autophagy genes on ion-channel-dependent neuronal degeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* 120, 1134-1141.
- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S., and Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101, 249-258.
- Treinin, M., Shliar, J., Jiang, H., Powell-Coffman, J. A., Bromberg, Z., and Horowitz, M. (2003). HIF-1 is required for heat acclimation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Physiol Genomics* 14, 17-24.
- Tsvetkova, N. M., Horvath, I., Torok, Z., Wolkers, W. F., Balogi, Z., Shigapova, N., Crowe, L. M., Tablin, F., Vierling, E., Crowe, J. H., and Vigh, L. (2002). Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13504-13509.
- Tullet, J. M., Hertweck, M., An, J. H., Baker, J., Hwang, J. Y., Liu, S., Oliveira, R. P., Baumeister, R., and Blackwell, T. K. (2008). Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell* 132, 1025-1038.
- Van Baelen, K., Vanoevelen, J., Missiaen, L., Raeymaekers, L., and Wuytack, F. (2001). The Golgi PMR1 P-type ATPase of *Caenorhabditis elegans*. Identification of the gene and demonstration of calcium and manganese transport. *J Biol Chem* 276, 10683-10691.
- Van Montfort, R., Slingsby, C., and Vierling, E. (2001a). Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem* 59, 105-156.

van Montfort, R. L., Basha, E., Friedrich, K. L., Slingsby, C., and Vierling, E. (2001b). Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol* 8, 1025-1030.

Vander Heide, R. S. (2002). Increased expression of HSP27 protects canine myocytes from simulated ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H935-941.

Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., Dode, L., Parys, J. B., De Smedt, H., Callewaert, G., Wuytack, F., and Missiaen, L. (2005). Cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals depending on the functional state of the Golgi in HeLa cells. *Cell Calcium* 38, 489-495.

Walhout, A. J., Sordella, R., Lu, X., Hartley, J. L., Temple, G. F., Brasch, M. A., Thierry-Mieg, N., and Vidal, M. (2000). Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science* 287, 116-122.

Walker, G. A., and Lithgow, G. J. (2003). Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. *Aging Cell* 2, 131-139.

Wang, J. L., Ke, D. S., and Lin, M. T. (2005). Heat shock pretreatment may protect against heatstroke-induced circulatory shock and cerebral ischemia by reducing oxidative stress and energy depletion. *Shock* 23, 161-167.

Watson, J. D., Ferguson, C., Hinds, C. J., Skinner, R., and Coakley, J. H. (1993). Exertional heat stroke induced by amphetamine analogues. Does dantrolene have a place? *Anaesthesia* 48, 1057-1060.

Westerheide, S. D., Anckar, J., Stevens, S. M., Jr., Sistonen, L., and Morimoto, R. I. (2009). Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323, 1063-1066.

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.

Wojda, U., Salinska, E., and Kuznicki, J. (2008). Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life* 60, 575-590.

Wolf, D. H., and Hilt, W. (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* 1695, 19-31.

Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 441-469.

Wuytack, F., Raeymaekers, L., and Missiaen, L. (2003). PMR1/SPCA Ca<sup>2+</sup> pumps and the role of the Golgi apparatus as a Ca<sup>2+</sup> store. *Pflugers Arch* 446, 148-153.

Xu, C., Ma, H., Inesi, G., Al-Shawi, M. K., and Toyoshima, C. (2004). Specific structural requirements for the inhibitory effect of thapsigargin on the Ca<sup>2+</sup> ATPase SERCA. *J Biol Chem* 279, 17973-17979.

- Xu, K., Tavernarakis, N., and Driscoll, M. (2001). Necrotic cell death in *C. elegans* requires the function of calreticulin and regulators of Ca<sup>2+</sup> release from the endoplasmic reticulum. *Neuron* 31, 957-971.
- Yamashima, T. (2000). Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol* 62, 273-295.
- Yamashima, T. (2004). Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium* 36, 285-293.
- Yang, Y. L., and Lin, M. T. (1999). Heat shock protein expression protects against cerebral ischemia and monoamine overload in rat heatstroke. *Am J Physiol* 276, H1961-1967.
- Yang, Y. L., Lu, K. T., Tsay, H. J., Lin, C. H., and Lin, M. T. (1998). Heat shock protein expression protects against death following exposure to heatstroke in rats. *Neurosci Lett* 252, 9-12.
- Yeo, T. P. (2004). Heat stroke: a comprehensive review. *AACN Clin Issues* 15, 280-293.
- Yoneda, T., Benedetti, C., Urano, F., Clark, S. G., Harding, H. P., and Ron, D. (2004). Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *J Cell Sci* 117, 4055-4066.
- Yorimitsu, T., and Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1542-1552.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* 273, 33741-33749.
- Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R. J., Nagata, K., and Mori, K. (2003). A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell* 4, 265-271.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881-891.
- Yoshiyama, Y., Zhang, B., Bruce, J., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2003). Reduction of deetyrosinated microtubules and Golgi fragmentation are linked to tau-induced degeneration in astrocytes. *J Neurosci* 23, 10662-10671.
- Zhao, Q., Wang, J., Levichkin, I. V., Stasinopoulos, S., Ryan, M. T., and Hoogenraad, N. J. (2002). A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *Embo J* 21, 4411-4419.

Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D. F., and Voellmy, R. (1998). Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94, 471-480.

Zuckerman, G. B., Singer, L. P., Rubin, D. H., and Conway, E. E., Jr. (1997). Effects of dantrolene on cooling times and cardiovascular parameters in an immature porcine model of heatstroke. *Crit Care Med* 25, 135-139.

## Δημοσιεύσεις

1. **Kourtis N.** and Tavernarakis N. (2011) Small heat shock proteins protect from heat stroke associated neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* (in preparation).
2. **Kourtis N.** and Tavernarakis N. (2011) Cellular stress response pathways and ageing: Intricate molecular relationships. *EMBO Journal*, 30: 2520-2531.
3. Gessmann R., **Kourtis N.**, Petratos K. and Tavernarakis N. (2010) Molecular modelling of mechanosensory ion channel structural and functional features. *PLoS One*, 5: e12814.
4. Rieckher M\*, **Kourtis N\***, Pasparaki A. and Tavernarakis N. (2009) Transgenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Methods in Molecular Biology*, 561: 21-39 \*Equal contribution
5. **Kourtis N.** and Tavernarakis N. (2009) Cell specific monitoring of protein synthesis in vivo. *PLoS One*, 4: e4547.
6. **Kourtis N.** and Tavernarakis N. (2009) Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death and Differentiation*, 16: 21-30.
7. **Kourtis N.** and Tavernarakis N. (2007) Non-developmentally programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Seminars in Cancer Biology*, 17: 122-133.
8. **Kourtis N.** and Tavernarakis N. (2008) Monitoring protein synthesis by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) in vivo. *Nature Protocols*, DOI: 10.1038/nprot.2008.84.
9. **Kourtis N.** and Tavernarakis N. (2007) Mechanosensory transduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In *Mechanosensitivity in Cells and Tissues: Mechanosensitive Ion Channels* (Andre Kamkin and Irina Kiseleva, editors) Springer Verlag, Heidelberg, Germany.