

**ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Μελέτη του ρόλου του pH στο νεκρωτικό θάνατο νευρώνων  
του νηματώδους *Caenorhabditis elegans***

Χρυσάνθη Σαμαρά

Εργαστήριο Γενετικής Νηματωδών  
Επιβλέπων Ερευνητής: Νεκτάριος Ταβερναράκης  
Υπεύθυνος Καθηγητής: Δόμνα Καραγωγέως

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2003

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Τύποι κυτταρικού θανάτου
2. Το φαινόμενο της νέκρωσης στο *C.elegans*
3. Ενδείξεις για το ρόλο του pH στη νέκρωση
4. Ρύθμιση της ομοιόστασης του pH στο κύτταρο
5. Προσδιορισμός των μεταβολών του pH με τη χρήση pHluorins

Σκοπός της Εργασίας

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Κλωνοποίηση και απομόνωση DNA αλληλουχιών των pHluorins
2. Διαμόλυνση *C.elegans* και λήψη διαγονιδιακών ζώων
3. Δημιουργία στελεχών *mec-4(d)* που εκφράζουν τις pHluorins
4. Προσδιορισμός των μεταβολών pH με τη χρήση pHluorins
5. Καταστολή της έκφρασης γονιδίων με τη μέθοδο RNAi
6. Προσδιορισμός του ποσοστού της νέκρωσης
7. Δημιουργία συνθηκών υποξίας
8. Δημιουργία αλκαλικών συνθηκών σε νηματώδεις.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Δυσλειτουργία των υπομονάδων της V-ATPase καταστέλλει το νεκρωτικό θάνατο
2. Ενίσχυση του νευροεκφυλισμού από μεταλλαγές σε υπομονάδες της V-ATPase
3. Επίδραση της λειτουργίας των αντλιών  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  στη διαδικασία της νέκρωσης
4. Οξίνιση του κυτταροπλάσματος των νευρώνων που υφίστανται νέκρωση
5. Αύξηση του pH ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων προκαλεί καταστολή της νέκρωσης νευρώνων του νηματώδους

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### ΑΝΑΦΟΡΕΣ

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πολυάριθμες μελέτες δείχνουν ότι ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος εμπλέκεται σε διάφορες ασθένειες του ανθρώπου, όπως εγκεφαλικά και νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι συγκεκριμένες calpains και aspartyl proteases είναι απαραίτητες για την νέκρωση, που επάγεται από μια ποικιλία ερεθισμάτων στο *C. elegans*. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός, με τον οποίο ενεργοποιούνται αυτά τα ένζυμα, οδηγώντας στην καταστροφή του κυττάρου, παραμένει άγνωστος.

Μεταλλαγές σε υπομονάδες των vacuolar (V)  $H^+$  ATPases, που είναι αντλίες υπεύθυνες για την οξίνιση ενδοκυτταρικών οργανιδίων -όπως τα λυσοσώματα- και τη ρύθμιση του κυτταρικού pH με κατανάλωση ATP, προκαλούν σημαντική καταστολή του νεκρωτικού θανάτου. Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και μετά από μείωση της έκφρασης διαφόρων υπομονάδων των V ATPases μέσω της τεχνικής RNAi, καθώς και με τη χρήση παραγόντων που παρεμποδίζουν τη λειτουργία της αντλίας, όπως το χλωριούχο αμμώνιο. Προκειμένου να διαλευκανθεί περαιτέρω ο ρόλος του ενδοκυτταρικού pH στη νέκρωση, προσδιορίστηκε το κυτταροπλασματικό pH σε συγκεκριμένους εκφυλιζόμενους νευρώνες, με τη χρήση μορίων GFP, που είναι ευαίσθητα στις μεταβολές του pH (pHluorins). Διαπιστώθηκε ότι ο νευροεκφυλισμός συνοδεύεται από σημαντική μείωση του κυτταρικού pH. Η μείωση αυτή φαίνεται να αναστρέφεται μερικώς από μεταλλαγές ή χειρισμούς, που παρεμποδίζουν την ενεργότητα των V ATPases. Επιπλέον, αύξηση του pH νδοσωμικών κυστιδίων, με τη χρησιμοποίηση διαλυμάτων ασθενών βάσεων, οδήγησε σε σημαντική καταστολή της νέκρωσης.

Ανάλογα, οξίνιση έχει παρατηρηθεί και κατά το νευροεκφυλισμό που πραγματοποιείται σε εγκεφαλικά επεισόδια θηλαστικών. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν ένα συντηρημένο μηχανισμό νεκρωτικού θανάτου και υποδεικνύουν ότι το pH παίζει σημαντικό ρόλο.

Προτείνεται ότι το όξινο ενδοκυτταρικό περιβάλλον, που αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της νέκρωσης, ενεργοποιεί ή ενισχύει τη δραστηριότητα των πρωτεασών ασπαρτικού και άλλων λυσοσωμικών ή κυτταροπλασματικών υδρολυτικών ενζύμων, συμβάλλοντας έτσι στην καταστροφή του κυττάρου.

## SUMMARY

Numerous studies implicate necrotic cell death in many devastating human pathologies, such as stroke and neurodegenerative diseases. It has been shown that specific calpains and aspartyl proteases are involved in dismantling the cell during necrotic cell death inflicted by a variety of insults in *C. elegans*. However, the precise mechanism by which these enzymes become activated and subsequently wreck havoc, demolishing the cell, remains unknown.

A genetic screen for either enhancers or suppressors of necrotic cell death, in sensitized genetic backgrounds, where neurodegeneration is attenuated by calpain or aspartyl protease deficiency, implicated genes encoding regulators of cytoplasmic and lysosomal pH. In particular, mutations in subunits of the vacuolar (V) H<sup>+</sup> ATPase, a pump that acidifies intracellular organelles including lysosomes and regulates cellular pH at the expense of ATP, significantly attenuate necrotic cell death. We observed similar effects on necrosis by RNAi with several subunits of the V ATPase, and by treatment with agents known to inhibit this pump, such as ammonium chloride. To further elucidate the role of intracellular pH in necrosis, we monitored intracellular in specific degenerating neurons using pH-sensitive GFP variants (pHluorins). We found that neurodegeneration is followed by marked decrease in cellular pH, which is partly alleviated by mutations or treatments reducing the activity of V ATPase and ameliorating cell death. In a striking analogy, acidosis accompanies neurodegeneration following stroke in mammals. Our findings suggest necrotic cell death mechanisms are likely conserved and that intracellular and lysosomal pH is an important determinant of necrosis. Consistently, we observed that induced alkalization of endosomal compartments by weak bases, significantly suppresses necrotic cell death.

We propose that intracellular acidic pH conditions, which develop during necrosis, activate or further enhance the activity of acidic aspartyl proteases and other lysosomal hydrolases, thus contributing to cell destruction.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Τύποι κυτταρικού θανάτου

Μορφολογικές κυρίως παρατηρήσεις έχουν οδηγήσει στη διάκριση δύο τύπων κυτταρικού θανάτου: την απόπτωση και τη νέκρωση. Η απόπτωση, ή αλλιώς ‘προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος’, προϋποθέτει de novo πρωτεϊνοσύνθεση και απαιτεί κατανάλωση ενέργειας (Tavernarakis and Driscoll, 2001). Πρόκειται για ένα γενετικά ελεγχόμενο μηχανισμό, που ενεργοποιείται φυσιολογικά για τη διατήρηση της ομοιόστασης και την ανάπτυξη του οργανισμού. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως εγκεφαλικά και νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Syntichaki and Tavernarakis, 2002).

Ο νεκρωτικός θάνατος είναι αποτέλεσμα της επίδρασης ακραίων περιβαλλοντικών συνθηκών, που αφορούν κυρίως στην παροχή οξυγόνου, γλυκόζης και θρεπτικών συστατικών γενικότερα, την παρουσία τοξινών ή ενεργών ελεύθερων ριζών, καθώς και ακραίες θερμοκρασίες. Έχει διαπιστωθεί σε περιπτώσεις ισχαιμίας, επιληψίας και σε νευροεκφυλιστικά σύνδρομα, όπως σκλήρυνση κατά πλάκας και ασθένειες του Parkinson, του Alzheimer και του Huntington. Μορφολογικά χαρακτηρίζεται από υπερβολική διόγκωση του κυττάρου και των οργανιδίων αυτού, συμύκνωση και τυχαία διάσπαση της χρωματίνης, ενδοκύττωση της πλασματικής μεμβράνης και αυτοφαγία. Τα στοιχεία αυτά έχουν προκύψει από παρατηρήσεις σε *Drosophila*, *C.elegans* αλλά και ανώτερους οργανισμούς, όπως *Xenopus*, αρουραίοι και πρωτεύοντα, ανατρέποντας την έως πρόσφατα επικρατούσα αντίληψη, ότι η νέκρωση δεν είναι παρά μία χαοτική κατάρρευση του κυττάρου (Syntichaki and Tavernarakis, 2002).

Το φαινόμενο του νεκρωτικού θανάτου είναι ελάχιστα μελετημένο σε μοριακό επίπεδο. Σε αντίθεση με τη διαδικασία της απόπτωσης, για την εκτέλεση της οποίας το κύτταρο χρησιμοποιεί εξειδικευμένα μόρια (caspases), μελέτες δείχνουν ότι νέκρωση προκαλείται από την ακατάλληλη δράση μορίων, που χρησιμοποιούνται για φυσιολογικές διεργασίες του κυττάρου. Τέτοια μόρια μπορεί να είναι υδρολυτικά ένζυμα (π.χ. cathepsins A, B, L, D), που απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα κατά τη διάρρηξη των λυσοσωμικών μεμβρανών, με συνέπεια την πρόκληση βλαβών στο DNA, σε πρωτεΐνες και τελικά το θάνατο του κυττάρου. Το 1998 ο Yamashima, σε μια προσπάθεια να ερμηνεύσει το θάνατο νευρώνων του ιππόκαμπου μετά από ισχαιμία σε πιθήκους, διατύπωσε την “calpain-cathepsin hypothesis” (Yamashima, 2000). Σύμφωνα με αυτή ποικίλα ερεθίσματα προκαλούν αύξηση στα επίπεδα του κυτταροπλασματικού ασβεστίου, είτε με πρόσληψη

από τον εξωκυττάριο χώρο ή διευκολύνοντας την απελευθέρωσή του από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η υψηλή συγκέντρωση ασβεστίου προκαλεί ενεργοποίηση calpains, οι οποίες προκαλούν διάρρηξη της μεμβράνης των λυσοσωμάτων και απελευθέρωση cathepsins και άλλων υδρολασών. Οι cathepsins είναι cystein- (π.χ. A, B, L) ή aspartyl- (π.χ. D) πρωτεάσες, που ενεργοποιούνται πρωτεολυτικά και δρουν σε όξινο pH. Ωστόσο, οι calpains, που είναι πρωτεάσες κυστεΐνης, είναι πιθανό να συμβάλλουν και άμεσα στην καταστροφή του κυττάρου, διασπώντας πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως η σπεκτρίνη, η φοδρίνη και νευροϊνίδια, καθώς και άλλα δομικά κυτταρικά συστατικά (Aki et al., 2002).

Ενώ σε ορισμένα συστήματα η διάκριση μεταξύ απόπτωσης και νέκρωσης είναι εμφανής, σε άλλα δεν ισχύει το ίδιο· είναι δυνατόν να συνυπάρχουν κύτταρα με γνωρίσματα νέκρωσης και απόπτωσης, έχουν παρατηρηθεί κι εναλλακτικές μορφές κυτταρικού θανάτου, όπως η παράπτωση (Syntichaki and Tavernarakis, 2002), καθώς και φαινόμενα δευτερογενούς νέκρωσης σε αποπτωτικά κύτταρα. Επιπλέον κάποια χαρακτηριστικά είναι κοινά στη νέκρωση και την απόπτωση και πιθανά οι δύο τύποι κυτταρικού θανάτου να μοιράζονται ορισμένα εναρκτήρια γεγονότα (Yamashima, 2000). Τελικά, η μορφή του κυτταρικού θανάτου φαίνεται ότι εξαρτάται από την ένταση και το χρόνο επίδρασης του ερεθίσματος, το βαθμό αύξησης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, τα επίπεδα του ATP και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, τα επίπεδα έκφρασης κι ενεργοποίησης μορίων που συμμετέχουν στα εκάστοτε σηματοδοτικά μονοπάτια.

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιείται μελέτη των μοριακών μηχανισμών του νεκρωτικού θανάτου σε απλά ζωικά μοντέλα, όπως η *Drosophila* και ο νηματώδης σκόληκας *C.elegans*, στα οποία είναι πιο εύκολη η εφαρμογή μοριακών τεχνικών και η γενετική προσέγγιση. Εξάλλου, η νέκρωση σε αυτούς τους οργανισμούς παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά με το αντίστοιχο φαινόμενο στα θηλαστικά.

## 2. Το φαινόμενο της νέκρωσης στο *C.elegans*

Στο *C.elegans* έχουν διαπιστωθεί διάφορες μεταλλαγές που προκαλούν νέκρωση. Πρόκειται κυρίως για μεταλλαγές gain-of-function σε συγκεκριμένα γονίδια-μέλη της οικογένειας των degenerins, που ανήκουν στην ευρύτερη υπεροικογένεια των γονιδίων DEG/ENaC και κωδικοποιούν για κανάλια ιόντων  $Na^+$ , ευαίσθητα σε amiloride. Ονομάστηκαν ‘degenerins’ ακριβώς επειδή προκαλούν εκφυλισμό των κυττάρων στα οποία εκφράζονται. Έτσι, επικρατής μεταλλαγή στο *deg-1(d)* επάγει το θάνατο μίας ομάδας ενδιάμεσων νευρώνων (Chalfie and Wolinsky, 1990), ενώ παρόμοια μετάλλαξη στο *mec-*

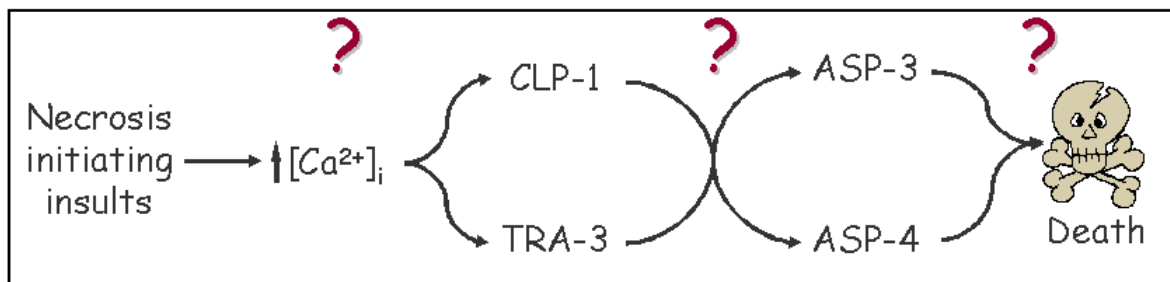
4(d) προκαλεί καταστροφή των 6 αισθητικών νευρώνων, που είναι υπεύθυνοι για την απόκριση σε απαλό άγγιγμα (Driscoll and Chalfie, 1991). Και στις δύο περιπτώσεις, ο θάνατος των νευρώνων είναι ανεξάρτητος από τις caspases CED-3 και CED-4, που απαιτούνται για την απόπτωση. Οι υπεύθυνες μεταλλάξεις αφορούν σε αντικατάσταση μιας Ala στο εξωκυτταρικό τμήμα της αντίστοιχης πρωτεΐνης -και κοντά στη διαμεμβρανική περιοχή που συμμετέχει στο σχηματισμό του πόρου-, από ένα μεγαλύτερο σε όγκο αμινοξύ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται το κλείσιμο του καναλιού, με συνέπεια την αυξημένη είσοδο ιόντων στο κυτταρόπλασμα. Στην οικογένεια των degenerins περιλαμβάνονται ακόμη τα *mec-10*, *unc-8*, ημι-επικρατείς μεταλλάξεις του οποίου οδηγούν σε διόγκωση και δυσλειτουργία νευρώνων της κοιλιακής νευρική χορδής, και *unc-105*, που εκφράζεται σε μυϊκά κύτταρα.

Εκτός από τις degenerins, κυτταρικός θάνατος με μορφολογικά χαρακτηριστικά νέκρωσης στο *C.elegans* προκαλείται και από συνεχώς ενεργές μεταλλαγμένες μορφές της α υπομονάδας των ετεροτριμερών G πρωτεϊνών ( $G\alpha_s$ ) (Berger et al., 1998), καθώς και μεταλλάξεις που οδηγούν σε αυξημένη ενεργότητα του γονιδίου *deg-3* (Treinin et al., 1998). Το τελευταίο κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με το νικοτινικό υποδοχέα ακετυλοχολίνης των σπονδυλωτών και συμμετέχει στο σχηματισμό ενός καναλιού  $Ca^{+2}$ .

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

### 3. Ενδείξεις για το ρόλο του pH στη νέκρωση

Πρόσφατες μελέτες στο *C.elegans* έδειξαν ότι ειδικές calpains και aspartyl proteases είναι απαραίτητες για τον εκφυλισμό νευρώνων στο νηματώδη (Syntichaki et al., 2002), υποστηρίζοντας την “calpain-cathepsin hypothesis” (εικόνα 1).



**Εικόνα 1:** Calpains και aspartyl proteases απαιτούνται για το νεκρωτικό θάνατο νευρώνων του *C.elegans*.

Αποτελέσματα επίδρασης αναστολέων των calpains, πειραμάτων RNAi και παρατηρήσεων σε διπλά μεταλλαγμένα στελέχη φανέρωσαν ότι οι calpains CLP-1 και TRA-3 δρουν στο ίδιο μονοπάτι και upstream των aspartyl proteases ASP-3 και ASP-4, για να προκαλέσουν νεκρωτικό θάνατο. Ωστόσο, ο μηχανισμός ενεργοποίησης των πρωτεασών ασπαρτικού δεν έχει διαλευκανθεί. Γενικότερα όμως, είναι γνωστό ότι τα λυσοσωμικά υδρολυτικά ένζυμα ενεργοποιούνται και δρουν σε όξινο περιβάλλον. Εξάλλου, έχει βρεθεί ότι οι cathepsins απαιτούν χαμηλό pH για να δράσουν. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι άτομα με νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπου είναι γνωστό ότι πραγματοποιείται και θάνατος κυττάρων με νέκρωση, έχουν αυξημένες τιμές pH στο πλάσμα του αίματος. Τα στοιχεία αυτά ενισχύουν την πιθανότητα συσχέτισης του pH με τη δράση των cathepsins και με το νεκρωτικό θάνατο.

Επιπρόσθετα, η υποξία δρα μέσω της οξίνισης του κυτταροπλάσματος, προκειμένου να οδηγήσει σε νέκρωση κυττάρων του μυοκαρδίου (Aki et al., 2002). Η μείωση του pH ενεργοποιεί ανταλλάκτες  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  και η επαγόμενη είσοδος ιόντων Νατρίου πιθανά προκαλεί αύξηση του εισερχόμενου  $\text{Ca}^{+2}$ , επιδρώντας σε ανταλλάκτες  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ .

#### 4. Ρύθμιση της ομοιόστασης του pH στο κύτταρο

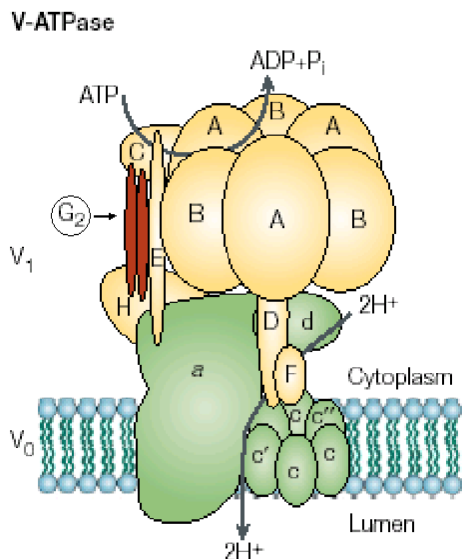
Η ρύθμιση του pH στα διαμερίσματα του κυττάρου είναι πολύ σημαντική για τη δράση διαφόρων ενζύμων κι ενζυμικών συστημάτων. Το κύτταρο διαθέτει διάφορους μηχανισμούς για τον έλεγχο της ομοιόστασης του pH, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται η δράση ATP-εξαρτώμενων αντλιών πρωτονίων (Vacuolar ( $\text{H}^+$ )-ATPases) και αντλιών  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .

Οι Vacuolar ( $\text{H}^+$ )-ATPases (ή V-ATPases) είναι μία οικογένεια ATP-εξαρτώμενων αντλιών πρωτονίων, που εκτελούν μεταφορά  $\text{H}^+$  από το κυτταρόπλασμα προς την αντίθετη πλευρά της μεμβράνης (Nishi and Forgac, 2002), προκαλώντας την οξίνιση ενδοκυτταρικών οργανιδίων ευκαρυωτικών κυττάρων (Pujol et al., 2001). Εντοπίζονται σε διάφορα οργανίδια, όπως ενδοσώματα, λυσοσώματα, εκκριτικά κυστίδια, σύστημα Golgi (Oka et al., 1998), όπου απαιτούνται για διαδικασίες όπως η ενδοκύτωση με τη μεσολάβηση υποδοχέων, ενδοκυτταρική στόχευση λυσοσωμικών ενζύμων, επεξεργασία και αποικοδόμηση πρωτεϊνών, συνδυασμένη μεταφορά μικρών μορίων και ιόντων, πρόσληψη νευροδιαβιβαστών από συναπτικά κυστίδια. Τα ένζυμα αυτά έχουν εντοπιστεί και στην πλασματική μεμβράνη συγκεκριμένων κυττάρων και ειδικότερα σε νεφρικά



κύτταρα, όπου συμβάλλουν στη ρύθμιση της οξέο-βασικής ισορροπίας στους νεφρούς, σε μακροφάγα και ουδετερόφιλα, όπου εμπλέκονται στην ομοίωση του κυτταροπλασματικού pH, σε οστεοκλάστες απαιτούνται για την αναδόμηση των οστών, σε κύτταρα των σπερματικών αγωγών για την ωρίμανση και τη ρύθμιση της κινητικότητας του σπέρματος, σε κύτταρα του μεσεντέρου, όπου πιστεύεται ότι προκαλούν έκκριση ιόντων  $K^+$  στον αυλό του εντέρου, ενώ σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα παίζουν ρόλο στη μετάσταση του όγκου (Nishi and Forgac, 2002). Επίσης, πρόσφατα έχει δειχθεί ότι απαιτούνται για την ωρίμανση ωοκυττάρων (Oka and Futai, 2000).

Οι V-ATPases αποτελούνται από δύο τμήματα, τα  $V_1$  και  $V_0$  (εικόνα 2), που είναι ανάλογα με τα  $F_1$  και  $F_0$  των F-ATPases των μιτοχονδρίων (Oka et al., 1998). Η  $V_1$  περιοχή είναι ένα περιφερειακό σύμπλοκο MB 640kD, που συντίθεται από 8 διαφορετικές υπομονάδες (A-H). Οι A και B καταλύουν την υδρόλυση του ATP, ενώ οι υπόλοιπες έξι συνδέουν το A-B εξαμερές με το  $V_0$  τμήμα του ενζύμου. Η  $V_0$  περιοχή είναι ένα διαμεμβρανικό σύμπλοκο 260kD, που συντίθεται από 5 υπομονάδες (a, d, c, c' και c'') και απαιτείται για τη μεταφορά  $H^+$  (Nishi and Forgac, 2002). Τα σύμπλοκα των V-ATPases συχνά διαφέρουν ως προς τη σύνθεση των υπομονάδων και τη δομή, όχι μόνο σε διαφορετικά οργανίδια του ίδιου κυττάρου αλλά και μεταξύ διαφορετικών ιστών (Pujol et al., 2001), εξυπηρετώντας έτσι και διαφορετικές λειτουργίες.



**Εικ.2:** Σχηματική απεικόνιση της δομής των V-ATPases

Στο *C.elegans* γονίδια για τις διάφορες υπομονάδες της V-ATPase έχουν ταυτοποιηθεί κυρίως από τη βάση δεδομένων του γονιδιώματος του νηματώδους, με βάση τις ομοιότητες στην αλληλουχία με τα γονίδια γνωστών υπομονάδων της ζύμης (Oka et al., 1998). Σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν πραγματοποιηθεί πιο διεξοδικές αναλύσεις, που οδήγησαν στο χαρακτηρισμό γονιδίων, όπως τα *vha-1*, *-2* και *-3*, που κωδικοποιούν για τα 16kD

πρωτεολιπίδια (c υπομονάδα), το *vha-4* γονίδιο που κωδικοποιεί για ένα πρωτεολιπίδιο 32kD (c' υπομονάδα), το *vha-11* που κωδικοποιεί για τη C υπομονάδα και το *unc-32*, προϊόν του οποίου είναι η a υπομονάδα (Oka and Futai, 2000; Oka et al., 1997; Oka et al., 1998). Μάλιστα, το τελευταίο με εναλλακτικό μάτισμα δίνει τουλάχιστον έξι διαφορετικά μετάγραφα και ανήκει σε μία οικογένεια 4 γονιδίων. Αυτή περιλαμβάνει επιπλέον τα γονίδια *vha-5*, *-6* κι *-7*, που κωδικοποιούν για διαφορετικές ισομορφές της a υπομονάδας. Πρόσφατα έχει ταυτοποιηθεί και το γονίδιο *vha-10* για τη G υπομονάδα. RNAi πειράματα κυρίως έχουν δείξει ότι πολλά από τα παραπάνω γονίδια είναι απαραίτητα για την εμβρυϊκή ανάπτυξη (*vha-1*, *-2*, *-4*, *-11*, κάποιες ισομορφές του *unc-32*), ενώ άλλα για την ανάπτυξη των προνυμφών (*vha-5*, *-6*), καταδεικνύοντας έτσι το σημαντικό ρόλο των V-ATPases (Oka et al., 2001; Rujol et al., 2001). Πρόσφατα επίσης έχει χαρακτηριστεί και το *vha-12* γονίδιο, που κωδικοποιεί για την υπομονάδα B. Μεταλλαγή του προκαλεί μείωση της πρόσληψης νευροδιαβιβαστών από νευροεκκριτικά κυστίδια και μείωση του συντονισμού στην κίνηση. Μη συντονισμένη κίνηση προκαλούν και ορισμένες μεταλλαγές στο *unc-32*, που εκφράζονται κυρίως σε νευρώνες.

Πειραματικές αναλύσεις που διεξήχθησαν τα τελευταία χρόνια φανερώνουν την πιθανή συμμετοχή των V-ATPases στο νεκρωτικό θάνατο κυττάρων. Επίδραση του μεταλλαξογόνου παράγοντα EMS σε στελέχη *C.elegans* που εξέφραζαν το *mec-4(d)* στα 12 ζεύγη κινητικών νευρώνων οδήγησε σε μεταλλαγές που κατέστειλαν τη νέκρωση από το *mec-4(d)*. Οι περισσότερες από αυτές επηρέαζαν την έκφραση του *mec-4(d)*, ορισμένες όμως επιδρούσαν downstream αυτού. Σε συνδυασμό και με αποτελέσματα πειραμάτων RNAi φάνηκε ότι μείωση της λειτουργικότητας των γονιδίων *vha-10*, *unc-32*, *vha-12* και *vha-11* (που κωδικοποιούν αντίστοιχα για τις υπομονάδες G, a, B και C) προκαλεί καταστολή της νέκρωσης στους κινητικούς νευρώνες. Καταστολή του νεκρωτικού θανάτου παρατηρείται και στα στελέχη MP130 και KR437, που φέρουν τις μεταλλαγές *sup-40* και *let-367* αντίστοιχα και πιθανά αφορούν επίσης στο γονίδιο *vha-10*.

Οι προηγούμενες παρατηρήσεις δείχνουν ότι οι V-ATPases συμμετέχουν στη διαδικασία της νέκρωσης. Η δράση τους πιθανά επιτυγχάνεται με ρύθμιση του pH διαμερισμάτων του κυττάρου.

Οι αντλίες  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  είναι μεμβρανικές φωσφογλυκοπρωτεΐνες, που συμβάλλουν στον έλεγχο του ενδοκυτταρικού pH και τη ρύθμιση της ομοιόστασης του  $\text{Na}^+$  (Nehrke and Melvin, 2002). Ειδικότερα, αποτρέπουν την οξίνιση του κυττάρου, καταλύοντας την

ανταλλαγή εξωκυτταρικών ιόντων Νατρίου με ενδοκυτταρικά πρωτόνια. Ωστόσο, η δράση τους μπορεί να αντιστραφεί κάτω από ειδικές συνθήκες.

Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηρισθεί 7 μέλη της οικογένειας αυτών των αντλιών στα θηλαστικά, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *nhe-1* ως *-7*. Η πρωτεΐνη NHE-1 φαίνεται ότι εκφράζεται στα περισσότερα κύτταρα, παίζοντας ένα γενικότερο ρόλο στη ρύθμιση του κυτταροπλασματικού pH. Αντίθετα, η έκφραση των NHE-2 ως *-5* περιορίζεται σε συγκεκριμένους μόνο ιστούς, γεγονός που ανακλά πιθανά και πιο εξειδικευμένες λειτουργίες. Οι NHE-6 και *-7* απαντούν σε όλα σχεδόν τα κύτταρα, αλλά είναι ενδοκυτταρικά μόρια.

Στο *C.elegans* έχουν κλωνοποιηθεί 9 γονίδια, που εμφανίζουν μεγάλη ομολογία με τις αντλίες  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  των θηλαστικών. Αυτά ονομάστηκαν *nhx-1* ως *-9*. Τέσσερα τουλάχιστον από αυτά (NHX-2, -4, -6 και *-7*) τοποθετούνται στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ τα υπόλοιπα πέντε σχετίζονται με ενδοκυτταρικά οργανίδια. Η πρωτεΐνη NHX-4 εκφράζεται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα και είναι υπεύθυνη για την αποκατάσταση του pH μετά από οξίνιση του κυττάρου. Η NHX-5 φαίνεται να εκφράζεται κύρια σε νευρικά κύτταρα, ενώ η NHX-9 στο εκκριτικό κύτταρο του νηματώδους.

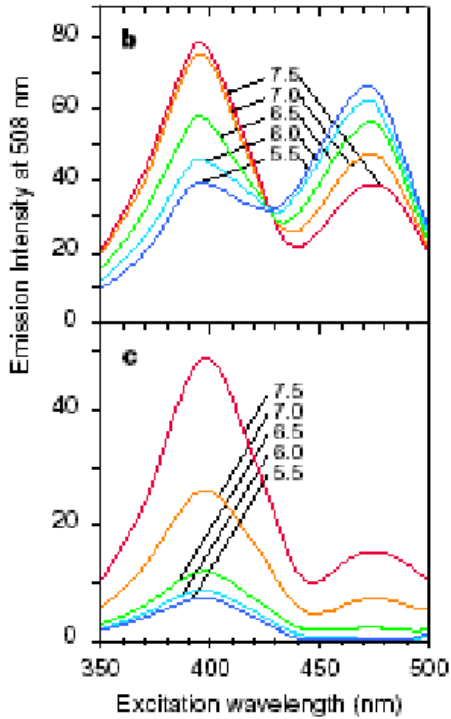
## 5. Προσδιορισμός των μεταβολών του pH με τη χρήση pHluorins

Οι pHluorins (pH-sensitive green fluorescent protein-based sensors) είναι μεταλλαγμένες μορφές της GFP (green fluorescent protein). Δημιουργήθηκαν αρχικά από τον Miesenböck και τους συνεργάτες του με τη στρατηγική μιας κατευθυνόμενης και histidine-based συνδυαστικής μεταλλαξογένεσης, ώστε να προκύψουν μορφές GFP κατάλληλες για τη μελέτη της εξοκύτωσης και ανακύκλωσης κυστιδίων, κυρίως κατά τη νευροδιαβίβαση. Πολλαπλοί κύκλοι μεταλλαξογένεσης οδήγησαν τελικά στο σχηματισμό 2 τάξεων ευαίσθητων στο pH φθορίζουσών πρωτεϊνών, τις ratiometric και ecliptic pHluorins (Miesenbock et al., 1998; Sankaranarayanan et al., 2000).

Η ratiometric pHluorin φέρει 9 αντικαταστάσεις (E132D, S147E, N149L, K166Q, I167V, R168H, S202H και L220F) και εμφανίζει μια αντιστρεπτή μεταβολή στο φάσμα διέγερσης σε τιμές pH από 7,5 ως 5,5 (εικόνα 3) με ένα χρόνο απόκρισης μικρότερο από 20msec (Miesenbock et al., 1998).

Η ecliptic pHluorin φέρει τις μεταλλαγές S147D, N149Q, T161I, S202E, Q204T και A206T. Στην πρωτεΐνη αυτή το φθορίζον σήμα εξασθενεί καθώς το pH μειώνεται. Έτσι σε  $\text{pH} < 6$  το σήμα εξαφανίζεται όταν διεγείρεται στα 475nm, οπότε και η πρωτεΐνη δε φαίνεται, ενώ εξακολουθεί να είναι ελάχιστα ορατή στα 395nm. Οι αλλαγές αυτές

αναστρέφονται εντός 20sec, μετά από επαναφορά σε ουδέτερο pH. Στις ecliptic pHluorins κατατάσσεται και μία ενισχυμένη μορφή, η super-ecliptic pHluorin, που φέρει 2 επιπλέον αντικαταστάσεις (F64L και S65T), με αποτέλεσμα το φθορίζον σήμα να είναι εντονότερο (Sankaranarayanan et al., 2000).



**Εικ.3:** Μεταβολές στο φάσμα διέγερσης των ratiometric (b) και ecliptic (c) pHluorins σε τιμές pH μεταξύ 5,5 και 7,5.

Σε καμία από τις τρεις περιπτώσεις δεν είναι γνωστός ο ελάχιστος αριθμός αντικαταστάσεων που απαιτείται, ούτε ο μηχανισμός δημιουργίας της ευαισθησίας στο pH.

## Σκοπός της Εργασίας

Σύμφωνα με την “calpain-cathepsin hypothesis” για το μηχανισμό του νεκρωτικού θανάτου, σημαντικό ρόλο παίζουν οι cathepsins που απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα κατά τη διάρρηξη των λυσοσωμικών μεμβρανών και πρωτεολύουν κυτταρικά συστατικά. Κατά αντιστοιχία, στο νηματώδη *C.elegans* βρέθηκε ότι για τη νέκρωση απαιτείται η ενεργοποίηση των calpains CLP-1 και TRA-3, που δρουν upstream των πρωτεασών ASP-3 και ASP-4 (Syntichaki et al., 2002). Ωστόσο, ο μηχανισμός ενεργοποίησης αυτών των πρωτεασών δεν είναι γνωστός. Γενικά, η δράση των λυσοσωμικών υδρολυτικών ενζύμων επιτυγχάνεται μόνο σε όξινο περιβάλλον. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι μεταλλαγές σε ορισμένες υπομονάδες της V-ATPase -που ευθύνεται για την οξίνιση διάφορων ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων- προκαλούν καταστολή του κυτταρικού θανάτου σε στελέχη *mec-4(d)* του *C.elegans*.

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η διερεύνηση του πιθανού ρόλου της ομοιόστασης του pH κατά τη νέκρωση νευρικών κυττάρων του νηματώδους σκόληκα. Για την επίτευξη αυτού του στόχου διερευνήθηκε καταρχήν η επίπτωση της καταστολής της έκφρασης (μέσω πειραμάτων RNAi ή με τη χρήση κατάλληλα μεταλλαγμένων στελεχών) γονιδίων, που συμμετέχουν στη ρύθμιση του pH, στη διαδικασία της νέκρωσης, που επάγεται είτε από επικρατείς μεταλλαγές στα γονίδια *mec-4* και *deg-3*, είτε από συνθήκες υποξίας. Προκειμένου να διαπιστωθούν πιθανές μεταβολές του pH στα κύτταρα κατά τη διάρκεια του νεκρωτικού θανάτου, χρησιμοποιήθηκαν οι pHluorins, οι οποίες εκφράστηκαν σε νευρώνες του οργανισμού. Τέλος, προσδιορίστηκε η επίδραση της αύξησης του pH στη νέκρωση. Για τη δημιουργία αλκαλικού περιβάλλοντος στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν χημικές ουσίες, όπως το χλωριούχο αμμώνιο και η χρωστική Acridine Orange.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Κλωνοποίηση και απομόνωση DNA αλληλουχιών των pHluorins

DNA των τριών μορφών pHluorins (ratiometric, ecliptic και super-ecliptic) απομονώθηκε σε μεγάλη ποσότητα με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης βακτηρίων (XL-1 στελέχος της *E.coli*), τα οποία είχαν μετασχηματιστεί με πλασμιδιακούς φορείς pGEX-2T (Pharmacia), που έφεραν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία της αντίστοιχης pHluorin μεταξύ των θέσεων περιορισμού των ενδονουκλεασών BamHI και EcoRI. Ακολούθησε πέψη με τα ένζυμα αυτά και πολλαπλασιασμός της DNA αλληλουχίας κάθε pHluorin με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε μίγμα όγκου 50λ. το μίγμα αυτό περιείχε 50λ πλασμιδιακό DNA, ρυθμιστικό διάλυμα PCR, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM μίγματος των τεσσάρων dNTPs, 50pmol από κάθε upstream και downstream primer και 2,5U Taq DNA πολυμεράση. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε κάτω από τις εξής συνθήκες: 1 κύκλος στους 92°C για 3min, 5 κύκλοι στους 92°C για 30sec, 48°C για 30sec κι 71°C για 2min, 25 κύκλοι στους 92°C για 30sec, 56°C για 30sec, 71°C για 2min και final extension στους 72°C για 10min. Και για τους τρεις τύπους pHluorins χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι primers (δεδομένου ότι οι διαφορές τους εντοπίζονται σε πιο εσωτερικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες), οι οποίοι εισήγαγαν κωδικόνια έναρξης και λήξης, καθώς και τις θέσεις περιορισμού των XhoI και BglII στα 5' και 3' άκρα αντίστοιχα. Οι αλληλουχίες των primers ήταν οι εξής: 5' primer: 5'-CCG CTC GAG ATG GGA TCC ACC GGT GGA AG-3' και 3' primer: 5'-GAA GAT CTC TAG AAT TCA CCG GTT TTG-3', και το τελικό προϊόν είχε μήκος 761bp. Στη συνέχεια έγινε καθαρισμός του DNA από την αντίδραση PCR σύμφωνα με το QIAquick PCR Purification Protocol της QIAGEN, ποσοτικοποίηση αυτού σε πήκτωμα αγαρόζης και αποθήκευση στους -20°C.

Για την κλωνοποίηση των αλληλουχιών που απομονώθηκαν με τον τρόπο που αναφέρθηκε προηγουμένως, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας εκτοπικής έκφρασης pPD96.41 από το Fire Lab Vector Kit –June 1995 (updated to August 1996). Ο φορέας αυτός φέρει τον υποκινητή του γονιδίου *mec-7* (το οποίο κωδικοποιεί για μία κυτταροπλασματική β-tubulin, που εκφράζεται κυρίως στους 6 touch receptor νευρώνες του *C.elegans*) και 3 συνθετικές ενδιάμεσες ακολουθίες (εσώνια), που πιστεύεται ότι οδηγούν σε πιο ενιαία και ισχυρή έκφραση. Με το pPD96.41 πλασμίδιο μετασχηματίσαμε δεκτικά βακτήρια *E.coli* του στελέχους XL-1 και μεγάλη ποσότητα φορέα απομονώθηκε από καλλιέργεια αυτών με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης βακτηρίων.

Πραγματοποιήθηκε πέψη των καθαρισμένων προϊόντων της αντίδρασης PCR και του φορέα που απομονώθηκε με τα ένζυμα XhoI και BglII. Τα προϊόντα των αντιδράσεων πέψης ποσοτικοποιήθηκαν και ακολούθησε σύνδεση του φορέα με τις αλληλουχίες των pHluorins -σε κατάλληλη αναλογία- με χρήση T4 DNA λιγάσης. Με τις τρεις πλασμιδιακές κατασκευές έγινε μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων XL-1. Από κάθε καλλιέργεια λήφθηκαν 18 ή 24 αποικίες και απομονώθηκε DNA με τη μέθοδο της λύσης βακτηρίων με βρασμό. Για να ελεγχθεί η επιτυχία του μετασχηματισμού, στο DNA που απομονώθηκε σε κάθε περίπτωση έγινε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και XhoI (και σε κάποια από αυτά με EcoRI/EcoRV, EcoRI/NcoI, EcoRI/BamHI για επιβεβαίωση) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% παρουσία κατάλληλου marker (λ DNA κομμένου με HindIII ή BstEII). Από τις αποικίες που διαπιστώθηκε ότι έφεραν τον ανασυνδυασμένο φορέα εμβολιάστηκε κοινή καλλιέργεια (για κάθε κατασκευή), μέρος της οποίας αναμίχθηκε με γλυκερόλη και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

## 2. Διαμόλυνση *C.elegans* και λήψη διαγονιδιακών ζώων.

Από τα βακτήρια *E.coli* που είχαν μετασχηματιστεί με τις κατασκευές  $p_{mec-7::ratiometric}$  pHluorin,  $p_{mec-7::ecliptic}$  pHluorin και  $p_{mec-7::super-ecliptic}$  pHluorin απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA σύμφωνα με το Plasmid Mini Purification Protocol της QIAGEN. 5λ απομονωμένου πλασμιδίου αναμίχθηκαν με ίσο όγκο πλασμιδίου pRF4, που φέρει το γονίδιο *rol-6* (γονίδιο επιλογής, που οδηγεί σε επικρατή φαινότυπο, κατά τον οποίο τα ζώα περιστρέφονται –rollers) και 40λ ρυθμιστικού διαλύματος Tris-EDTA. Με το διάλυμα αυτό πραγματοποιήθηκαν ενέσεις στο συγκυτιακό τμήμα γονάδων εύρωστων νεαρών ενήλικων ατόμων του άγριου τύπου στελέχους Bristol N2. Οι F1 απόγονοι αυτών των ζώων ελέγχθηκαν για την εκδήλωση φαινοτύπου rolling. Όσα από αυτά ήταν rollers μεταφέρθηκαν σε ξεχωριστό τρυβλίο με θρεπτικό μέσο κι ελέγχθηκαν αντίστοιχα οι F2 απόγονοι. Η παρουσία rollers στην F2 γενιά φανερώνει ότι η πλασμιδιακή κατασκευή που ενθέσαμε πέρασε και στα γαμετικά κύτταρα, οπότε προέκυψαν μετασχηματισμένα στελέχη.

## 3. Δημιουργία στελεχών *mec-4(d)* που εκφράζουν τις pHluorins

Για να δημιουργηθούν στελέχη *C.elegans mec-4(d)*, που εκφράζουν τις ratiometric και super-ecliptic pHluorins υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *mec-7*, πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις μεταξύ αρσενικών ατόμων *mec-4(d)* και ερμαφρόδιτων ατόμων των αντίστοιχων γενετικών σειρών, που προέκυψαν από τις ενέσεις. Οι απόγονοι της γενιάς F1 ελέγχθηκαν για την εκδήλωση φαινοτύπου Mec στο προνυμφικό

στάδιο L4 και τα θετικά άτομα τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά τρυβλία. Τελικά επιλέχθηκαν ομόζυγα άτομα για το φαινότυπο *Mec*, που ήταν επίσης rollers.

#### 4. Προσδιορισμός των μεταβολών pH με τη χρήση pHluorins

Για να προσδιοριστούν μεταβολές στο pH με τη χρήση των pHluorins, έγινε παρατήρηση ατόμων, που βρίσκονταν στο προνυμφικό στάδιο L1, σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης. Χρησιμοποιήθηκαν στελέχη N2, *mec-4(d)* και *mec-4(d)*, που προέρχονταν από πειράματα RNAi για τη G υπομονάδα των V-ATPases.

Φωτογραφήθηκαν, μετά από σάρωση με laser Argon Blue, νευρώνες που εκφράζανε τις pHluorins. Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε για κάθε νευρώνα η προβολή (η μέγιστη ή ο μέσος όρος) των αντίστοιχων φωτογραφιών, που προέκυψαν από τη σάρωση. Στις τελικές εικόνες (προβολές) για κάθε στέλεχος μετρήθηκε η ένταση φθορισμού των pixels με το πρόγραμμα ImageJ. Για τη γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε είτε ο μέσος όρος, είτε η μέγιστη ένδειξη (ανάλογα με το αν η επεξεργασία έγινε στη μέγιστη προβολή ή σε αυτή που αντιστοιχούσε στο μέσο όρο των φωτογραφιών της σάρωσης αντίστοιχα).

Προκειμένου να είναι εφικτή η σύγκριση μεταξύ στελεχών που εκφράζανε pHluorins του ίδιου τύπου, κατά τη λήψη των φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες παράμετροι, όσον αφορά στη μεγέθυνση, τη μέθοδο σάρωσης, το άνοιγμα της ίριδας, την ένταση του laser και το ποσοστό της ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και την ανάλυση της εικόνας.

#### 5. Καταστολή της έκφρασης γονιδίων με τη μέθοδο RNAi

Προκειμένου να προσληφθεί από τους νηματώδεις τμήμα δίκλωνου RNA των γονιδίων, που θέλαμε να καταστείλουμε, περίπου 25-30 άτομα L2-L3 τοποθετούνταν αρχικά σε πιάτα χωρίς τροφή για 1-2h, ώστε να απομακρυνθούν τα βακτήρια από την επιφάνεια του επιδερμιδίου. Στη συνέχεια τα άτομα αυτά τοποθετούνταν σε τρυβλίο, το οποίο περιείχε βακτήρια *E.coli* του στελέχους HT115, μετασχηματισμένα ώστε να εκφράζουν το κατάλληλο dsRNA υπό τον έλεγχο του υποκινητή T7, μετά από επαγωγή με 2μM IPTG. Ακολουθούσε επώαση στους 15°C, μέχρι τα σκουλήκια να αναπτυχθούν και να δώσουν απογόνους. Τελικά προσδιοριζόταν το ποσοστό της νέκρωσης σε άτομα L1, αφού ξεπλένονταν 2-3 φορές με M9. Σε κάθε περίπτωση προσδιοριζόταν και το ποσοστό νέκρωσης σε σκουλήκια που τρέφονταν με βακτήρια HT115, τα οποία έφεραν άδειο το φορέα (αρνητικοί μάρτυρες).



Για τη δημιουργία των τρυβλίων που έφεραν τα μετασηματισμένα βακτήρια, αρχικά υγρή καλλιέργεια των αντίστοιχων βακτηρίων επωάζοταν ο/η σε LB με αμικικίνη (amp) και τετρακυκλίνη (tet). Ακολουθούσε επώαση για 4-5h σε LB με amp και τελικά περίπου 200λ της τελευταίας αυτής καλλιέργειας τοποθετούνταν σε τρυβλίο ταυτόχρονα με ~20λ IPTG συγκέντρωσης 20μM. Η τοποθέτηση των σκουληκιών γινόταν μετά από 12-24h.

## 6. Προσδιορισμός του ποσοστού της νέκρωσης

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

## 7. Δημιουργία συνθηκών υποξίας

Συγχρονισμένα άτομα *C.elegans* σε στάδιο L4 ξεπλένονταν 2-3 φορές με 1ml διαλύματος M9. Στη συνέχεια τα άτομα τοποθετούνταν για 30min σε 1ml φρέσκου διαλύματος 0,5M  $\text{NaN}_3$  σε M9. Το  $\text{NaN}_3$  καταστέλλει τη δραστηριότητα της οξειδάσης του κυτοχρώματος και άρα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η παραγωγή ATP, όπως ακριβώς σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Ακολουθούσε ξέπλυμα με M9 2-3 φορές και τοποθέτηση των σκουληκιών σε πιάτων, όπου γινόταν καταμέτρηση του αριθμού τους. Τα σκουλήκια αυτά τοποθετούταν στους 20°C για 24h προκειμένου να ανακάμψουν. Μετά από 24h υπολογιζόταν ο αριθμός των ζωντανών ατόμων και προσδιοριζόταν τελικά το ποσοστό επιβίωσης.

## 8. Δημιουργία αλκαλικών συνθηκών σε νηματώδεις

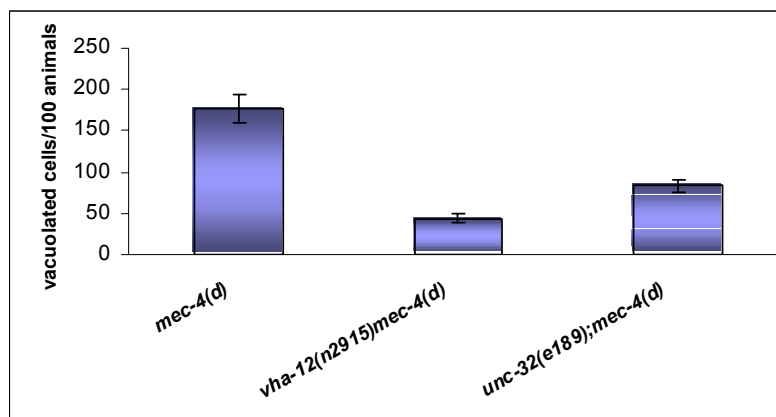
Προκειμένου να επιτύχουμε αύξηση του pH στο εσωτερικό των σκουληκιών, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα 0,5mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  και 40, 80 κι 150μM χρωστικής Acridine Orange σε M9. Αυτά τείνουν να εισέρχονται στα λυσοσώματα και να δημιουργούν αλκαλικό περιβάλλον.

Συγχρονισμένοι πληθυσμοί νεαρών ώριμων ατόμων ξεπλένονταν αρχικά με M9 2-3 φορές και στη συνέχεια τοποθετούνταν σε 1ml των διαλυμάτων χλωριούχου αμμωνίου ή Acridine Orange, που περιείχαν επίσης βακτήρια *E.coli* του στελέχους OP50. Οι υγρές καλλιέργειες επωάζονταν στους 20°C με ανάδευση, ώσπου τα σκουλήκια να δώσουν απογόνους. Μετά από 24h περίπου τα σκουλήκια ξεπλένονταν με M9 και ακολουθούσε προσδιορισμός του αριθμού των vacuoles σε απογόνους L1.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

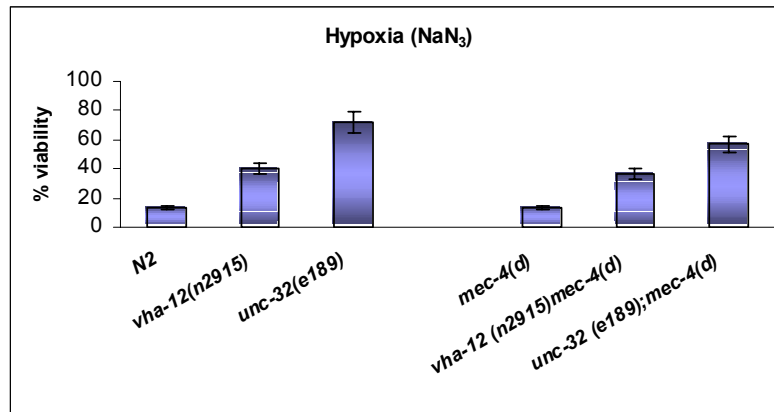
### 1. Δυσλειτουργία των υπομονάδων της V-ATPase καταστέλλει το νεκρωτικό θάνατο

Προσδιορίστηκε το ποσοστό νεκρωτικού θανάτου σε στελέχη *mec-4(d)* καθώς και σε στελέχη *vha-12(n2915)mec-4(d)* και *unc-32(e189);mec-4(d)*. Τα τελευταία φέρουν μεταλλάξεις στις Β και α υπομονάδες αντίστοιχα της V-ATPase, με συνέπεια η λειτουργία της να αναστέλλεται. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 1, όταν η V-ATPase δυσλειτουργεί, μειώνεται το ποσοστό νέκρωσης των νευρώνων του *C.elegans* εξαιτίας της υπερβολικής εισόδου ιόντων Νατρίου, που προκαλεί η επικρατής μεταλλαγή στο γονίδιο *mec-4*.



**Σχήμα 1:** Μεταλλάξεις στις υπομονάδες G και α της V-ATPase καταστέλλουν τη νέκρωση, που προκαλείται από υπερ-ενεργά κανάλια Na.

Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα όταν η νέκρωση προκλήθηκε από παραμονή σε συνθήκες έντονης υποξίας. Στελέχη *C.elegans* που έφεραν μεταλλάξεις στα γονίδια *vha-12* και *unc-32*, παρουσίασαν αυξημένη βιωσιμότητα μετά από επώαση για 30min σε 0,5M  $\text{NaN}_3$ . Παρόμοια αύξηση διαπιστώθηκε τόσο σε γενετικό υπόβαθρο N2, όσο και σε *mec-4(d)* (σχήμα 2). Η επαγωγή νέκρωσης σε κύτταρα του νηματώδους μετά από την επίδραση αζιδίου του νατρίου, επιβεβαιώθηκε και μετά από παρατήρηση του σχηματισμού vacuoles σε άτομα που επώαστηκαν σε υποξικές συνθήκες. Επομένως, η αύξηση της βιωσιμότητας είναι πολύ πιθανό να οφείλεται μερικώς τουλάχιστον σε εξασθένιση του φαινομένου της νέκρωσης.

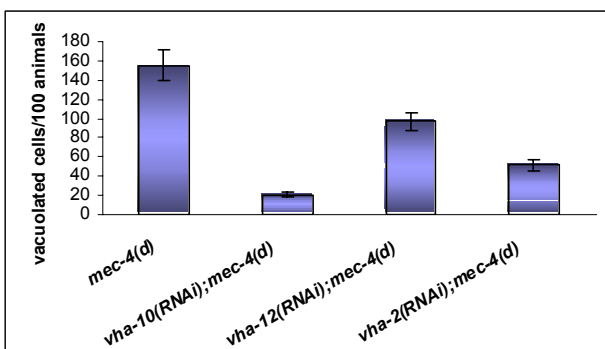
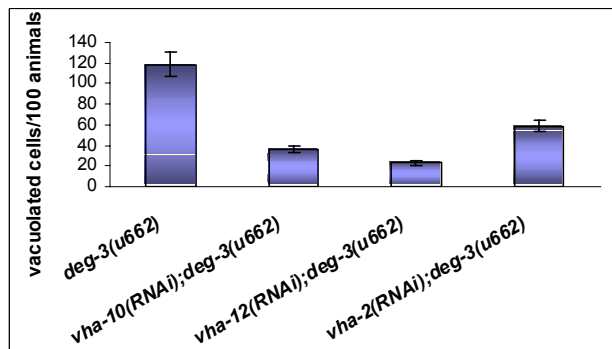


Τα προηγούμενα αποτελέσματα, που φανερώνουν καταστολή της νέκρωσης όταν η V-

**Σχήμα 2:** Νηματώδεις στους οποίους η V-ATPase δυσλειτουργεί, εμφανίζουν αυξημένη βιωσιμότητα μετά από επώαση σε υψηλή συγκέντρωση NaN<sub>3</sub>, σε σχέση με στελέχη στα οποία η αντλία πρωτονίων λειτουργεί κανονικά.

ATPase δυσλειτουργεί, επαληθεύτηκαν και από πειράματα μείωσης της έκφρασης των γονιδίων *vha-10*, *vha-12* και *vha-2* με τη μέθοδο του RNAi. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν αντίστοιχα για τις G, B και c υπομονάδες.

Μείωση της ενεργότητάς τους οδήγησε σε καταστολή του νεκρωτικού νευροεκφυλισμού τόσο σε άτομα *mec-4(d)*, όσο και σε άτομα *deg-3(d)* (σχήμα 3), στα όποια η νέκρωση οφείλεται σε υπερβολική είσοδο ιόντων Ca<sup>+2</sup> στα κύτταρα.

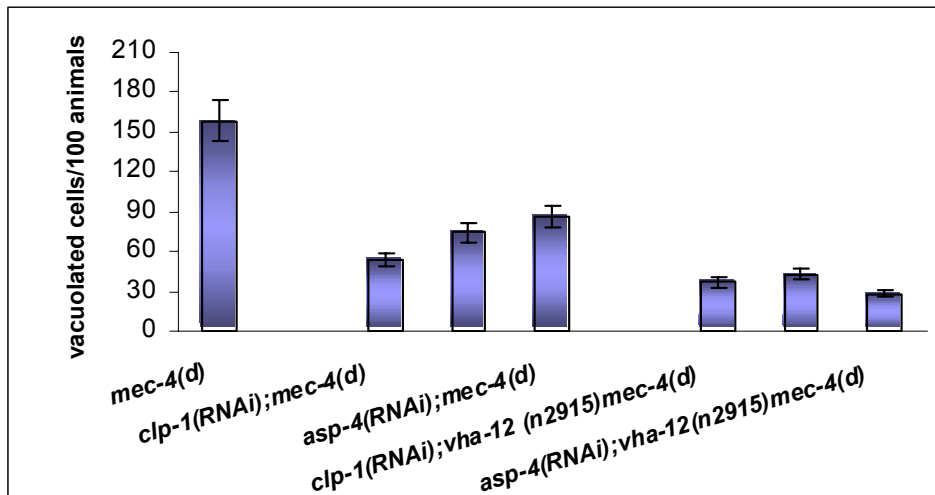


## 2. Ενίσχυση του νευροεκφυλισμού από μεταλλαγές σε υπομονάδες της V-ATPase

Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι απαιτεί τη δράση των calpains CLP-1 και TF και ASP-4 (Syntichaki et al., 2002). Έτσι πε

**Σχήμα 3:** Μείωση της έκφρασης των γονιδίων *vha-10*, *vha-12* και των νευρώνων σε μεταλλαγμένα στελέχη *mec-4(d)* και *deg-3(d)*.

των αντίστοιχων γονιδίων, οδήγησαν σε εξασθένηση της νέκρωσης στο στέλεχος *mec-4(d)*. Τα πειράματα αυτά επαναλήφθηκαν στο στέλεχος *vha-12(n2915)mec-4(d)*. Όπως φαίνεται στο σχήμα 4, μεταλλάγες στην υπομονάδα G της V-ATPase ενίσχυσαν την καταστολή της νέκρωσης, η οποία προκαλείται από μειωμένη δραστηριότητα calpains ή aspartyl proteases.



**Σχήμα 4:** Μεταλλαγή στην υπομονάδα B της V-ATPase καθιστά πιο έντονη την καταστολή του νεκρωτικού θανάτου, που προκαλείται από μείωση της λειτουργικότητας των ενζύμων calpains και aspartyl proteases.

### 3. Επίδραση της λειτουργίας των αντλιών $\text{Na}^+/\text{H}^+$ στη διαδικασία της νέκρωσης

Για να διαπιστωθεί η πιθανή συμμετοχή των αντλιών  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  στο φαινόμενο της νέκρωσης νευρώνων του νηματώδους, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RNAi, για να κατασταλεί η έκφραση των γονιδίων *nhx-4*, *-5* και *-9* σε άτομα των στελεχών *mec-4(d)*, *deg-3(d)* και σε άτομα άγριου τύπου N2. Πιο αναλυτικά, σε άτομα *mec-4(d)* έγινε επίδραση dsRNA για τα γονίδια *nhx-4*, *nhx-5* ή *nhx-9* ξεχωριστά. Το πείραμα αυτό δεν έδωσε επαναλήψιμα και σαφή αποτελέσματα, παρόλο που αρχικά φάνηκε να ενισχύεται ο νεκρωτικός θάνατος.

Τα στελέχη αυτά Προκειμένου, να επιτευχθεί μεγαλύτερη καταστολή της δράσης αυτών των αντλιών, δημιουργήθηκαν στελέχη *E.coli* HT115, τα οποία παρήγαγαν ταυτόχρονα dsRNA για τα γονίδια *nhx-4* και *nhx-9*, ή για τα *nhx-4*, *nhx-9* και *nhx-5*. Τα στελέχη αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση πειραμάτων RNAi σε άτομα *deg-3(d)*, αλλά και σε άτομα N2. Στην τελευταία περίπτωση ακολούθησε επαγωγή νεκρωτικού θανάτου με επώαση σε συνθήκες υποξίας, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενα πειράματα.

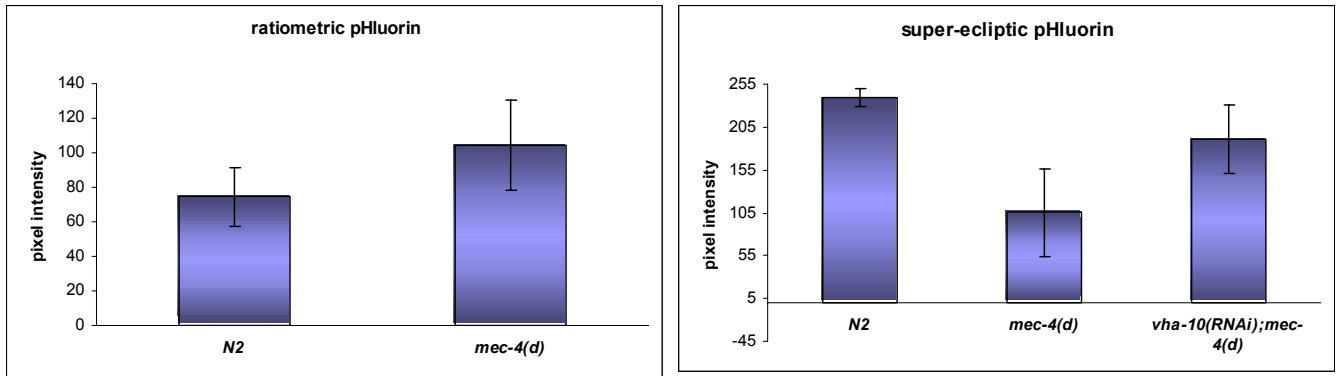
Ωστόσο, τα αποτελέσματα και πάλι δεν έδειξαν κάποια σαφή επίδραση της δυσλειτουργίας των αντλιών  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  στο νεκρωτικό θάνατο.

#### 4. Οξίνιση του κυτταροπλάσματος των νευρώνων που υφίστανται νέκρωση

Τα προηγούμενα πειράματα έδειξαν ότι οι V-ATPases, που συμμετέχουν στη ρύθμιση του pH του κυττάρου και των κυτταρικών οργανιδίων, εμπλέκονται στη διαδικασία της νέκρωσης. Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος του pH στο νεκρωτικό θάνατο, έγινε προσπάθεια να προσδιοριστούν πιθανές μεταβολές του στο κυτταρόπλασμα των εκφυλιζόμενων νευρώνων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο laser και σύγκριση της έντασης του φθορισμού νευρώνων μεταξύ στελεχών N2 και *mec-4(d)*, που εκφράζανε τη ratiometric ή τη super-ecliptic pHluorin στους έξι νευρώνες που είναι ευαίσθητοι σε μηχανικά ερεθίσματα. Επιπλέον, για να διαπιστωθεί αν η δυσλειτουργία της V-ATPase (η οποία όπως φάνηκε καταστέλλει τη νέκρωση) επηρεάζει και την ομοιόσταση του κυτταρικού pH, εφαρμόστηκε η μέθοδος RNAi σε στελέχη *mec-4(d)* που εκφράζανε και τις pHluorins, προκειμένου να μειωθεί η έκφραση της υπομονάδας G. Και στην περίπτωση αυτή, ακολούθησε παρατήρηση σκουληκιών L1 στο συνεστιακό μικροσκόπιο και προσδιορισμός της έντασης του φθορισμού.

Τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων απεικονίζονται στο σχήμα 5. Όσον αφορά στη ratiometric pHluorin, διαπιστώθηκε μία μικρή αύξηση της έντασης του φθορισμού σε εκφυλιζόμενους νευρώνες (σχήμα 5α). Σε πολλά πειράματα επίσης, η ένταση φθορισμού δε φαινόταν να παρουσιάζει σημαντική διαφορά μεταξύ ατόμων άγριου τύπου και *mec-4(d)*. Δεδομένου ότι εκπομπή της ratiometric pHluorin αυξάνει ως αποτέλεσμα της μείωσης του pH, τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι κατά τη νέκρωση είναι πιθανό ότι το κυτταρόπλασμα του κυττάρου γίνεται πιο όξινο.

Ενδεχόμενη οξίνιση του κυτταροπλάσματος νευρώνων που νεκρώνονται υποστηρίζεται κυρίων από τα αποτελέσματα με τη super-ecliptic pHluorin. Είναι φανερό από το σχήμα 5β ότι οι νευρώνες στο στέλεχος *mec-4(d)* παρουσιάζουν μια στατιστικά σημαντική μείωση του φθορισμού σε σχέση με τα άτομα N2, στα οποία οι νευρώνες δεν καταστρέφονται. Μείωση όμως της εκπομπής της super-ecliptic pHluorin συνεπάγεται και ελάττωση των τιμών pH.



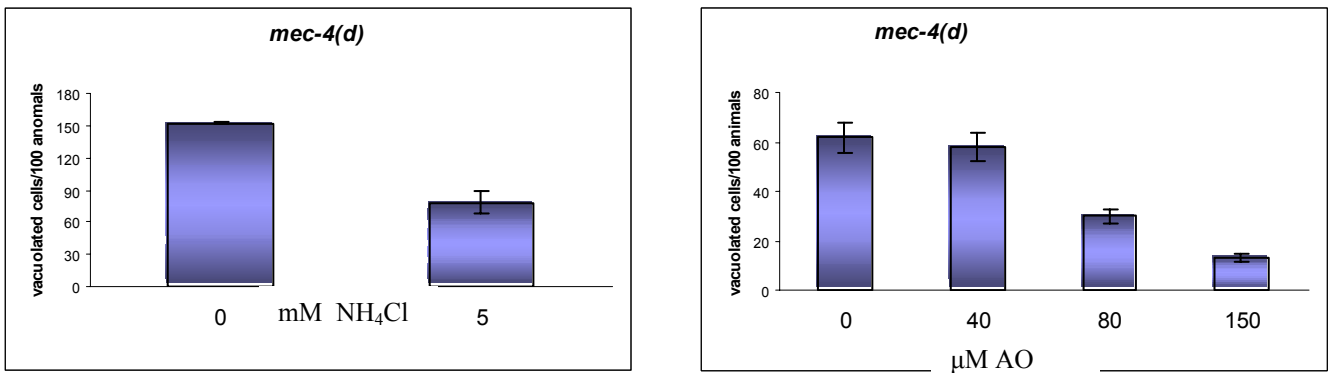
**Σχήμα 5:** το κυτταρόπλασμα των κυττάρων που πεθαίνουν με νέκρωση γίνεται πιο όξινο. (5α) Η ένταση του φθορισμού της ratiometric pHluorin αυξάνεται σε στελέχη *mec-4(d)*, οι νευρώνες των οποίων νεκρώνονται. Η αύξηση αυτή οφείλεται σε μείωση του κυτταροπλασματικού pH. (5β) Στελέχη *mec-4(d)* εμφανίζουν μείωση της εκπομπής της super-ecliptic pHluorin και άρα μειωμένο pH σε σχέση με στελέχη N2. Η οξίνιση του κυτταροπλάσματος φαίνεται να αναστέλλεται μερικώς σε άτομα *mec-4(d)* που φέρουν μεταλλαγή στην υπομονάδα G της V-ATPase.

Διαπιστώθηκε επίσης ότι δυσλειτουργία της V-ATPase αναστέλλει τη μείωση του κυτταροπλασματικού pH, που παρατηρείται σε άτομα *mec-4(d)*. Έτσι, RNAi για το γονίδιο *vha-10* σε στελέχη *mec-4(d)* οδήγησε σε επίπεδα φθορισμού παρόμοια με αυτά νηματώδων άγριου τύπου (σχήμα 5β). Δεδομένου ότι μείωση της ενεργότητας του *vha-10* καταστέλλει τη νέκρωση, είναι πιθανό αυτό να επιτυγχάνεται λόγω των συγκριτικά πιο αλκαλικών συνθηκών του κυτταροπλάσματος, απουσία της δράσης της V-ATPase. Συμπερασματικά, πιθανότατα απαιτείται όξινο περιβάλλον, για να πραγματοποιηθεί η νέκρωση.

## 5. Αύξηση του pH ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων προκαλεί καταστολή της νέκρωσης νευρώνων του νηματώδους

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις φαίνεται ότι η λειτουργία της V-ATPase είναι σημαντική για τη διαδικασία του νεκρωτικού θανάτου. Οι V-ATPases όμως παίζουν ρόλο στην οξίνιση ενδοκυτταρικών κυρίως οργανιδίων, όπως τα λυσοσώματα και τα ενδοσώματα. Για να διαπιστωθεί αν η δημιουργία όξινου περιβάλλοντος στα οργανίδια αυτά παίζει κάποιο ρόλο στη νέκρωση, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα ασθενών βάσεων  $\text{NH}_4\text{Cl}$  και Acridine Orange, που έχουν την ιδιότητα να εισέρχονται σε λυσοσώματα και ενδοσώματα και σε υψηλές συγκεντρώσεις να αυξάνουν το pH αυτών (Zoccarato et al., 1999).

Τα αποτελέσματα απεικονίζονται διαγραμματικά στο σχήμα 6.



**Σχήμα 6:** Δημιουργία αλκαλικών συνθηκών σε λυσοσώματα και ενδοσώματα, μετά από επώαση ατόμων *C.elegans* σε 0,5mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ή αυξανόμενες συγκεντρώσεις Acridine Orange, οδηγεί σε μείωση του ποσοστού του νεκρωτικού θανάτου, που οφείλεται σε υπερ-ενεργά κανάλια ιόντων Na. Η καταστολή είναι μεγαλύτερη όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της Acridine Orange.

Τόσο η επίδραση χλωριούχου αμμωνίου όσο και της χρωστικής Acridine Orange οδήγησαν σε καταστολή της νέκρωσης νευρώνων σκουληκιών *mec-4(d)*. Μάλιστα, στην περίπτωση της Acridine Orange, η καταστολή γινόταν εντονότερη με αύξηση της συγκέντρωσης της χρωστικής. Συνεπώς η δημιουργία όξινου περιβάλλοντος στα λυσοσώματα είναι μάλλον απαραίτητη για την ολοκλήρωση της νεκρωτικής διαδικασίας.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που περιγράφηκαν φανερώνουν ότι το ενδοκυτταρικό και λυσοσωμικό pH παίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό του νεκρωτικού θανάτου νευρικών κυττάρων του νηματώδους.

Καταρχήν, φανερώθηκε ότι η ολοκλήρωση της διαδικασίας της νέκρωσης απαιτεί τη δημιουργία όξινου περιβάλλοντος στα λυσοσώματα. Έτσι, επίδραση διαλυμάτων ασθενών βάσεων, που προκαλούν αύξηση του pH σε όξινα συνήθως ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, είχε ως αποτέλεσμα να μειωθεί το ποσοστό των εκφυλιζόμενων με νέκρωση νευρώνων.

Για την οξίνιση ενδοκυτταρικών οργανιδίων το κύτταρο χρησιμοποιεί διάφορους μηχανισμούς, ανάμεσα στους οποίους περιλαμβάνονται και οι εξαρτώμενες από ATP αντλίες πρωτονίων V-ATPases. Αυτές μεταφέρουν πρωτόνια από το κυτταρόπλασμα προς το εσωτερικό συναπτικών κυστιδίων, ενδοσωμάτων, λυσοσωμάτων κλπ. Καταστολή της λειτουργίας αυτών των αντλιών, μέσω δημιουργίας μεταλλαγών ή μείωσης της έκφρασης υπομονάδων αυτών, οδήγησε σε καταστολή της νέκρωσης που προκαλείται από γενετικά ή ακραία περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Συγκεκριμένα, μειώθηκε ο αριθμός των κυττάρων που πεθαίνουν σε στελέχη με υπερ-ενεργά κανάλια Na ή Ca<sup>+2</sup>, ενώ αυξήθηκε και το ποσοστό επιβίωσης των ατόμων μετά από έντονη υποξία. Επιπλέον, ενισχύθηκε και η καταστολή σε στελέχη *mec-4(d)*, στα οποία είχε μειωθεί η ενεργότητα γονιδίων που κωδικοποιούν για calpains και aspartyl proteases, με εφαρμογή της τεχνικής RNAi.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η δραστηριότητα των ATP-εξαρτώμενων αντλιών πρωτονίων έχει ιδιαίτερη σημασία για τη νεκρωτική διαδικασία. Πιθανότατα συμμετέχουν στη νέκρωση μειώνοντας το pH των λυσοσωμάτων. Άλλωστε, η δημιουργία όξινου περιβάλλοντος είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση και τη δράση υδρολυτικών λυσοσωμικών ενζύμων, μεταξύ των οποίων πιθανά και πρωτεασών ασπαρτικού. Παρόλο που η σημασία των aspartyl proteases ASP-3 και ASP-4 του *C.elegans* είχε διαπιστωθεί σε προηγούμενες έρευνες (Syntichaki et al., 2002), ο μηχανισμός της υπέρμετρης ενεργοποίησης αυτών παραμένει ακόμα άγνωστος.

Ο συμβολή των V-ATPases στο μηχανισμό του νεκρωτικού θανάτου μέσω της επίδρασής τους στη ομοίωση του pH, υποστηρίζεται και από την αύξηση της έντασης του φθορισμού της super-ecliptic pHluorin σε στελέχη *mec-4(d)* με δυσλειτουργική V-ATPase. Η αύξηση αυτή φανερώνει και αύξηση του κυτταροπλασματικού pH στα συγκεκριμένα στελέχη, στα οποία επίσης το ποσοστό του νεκρωτικού θανάτου είναι



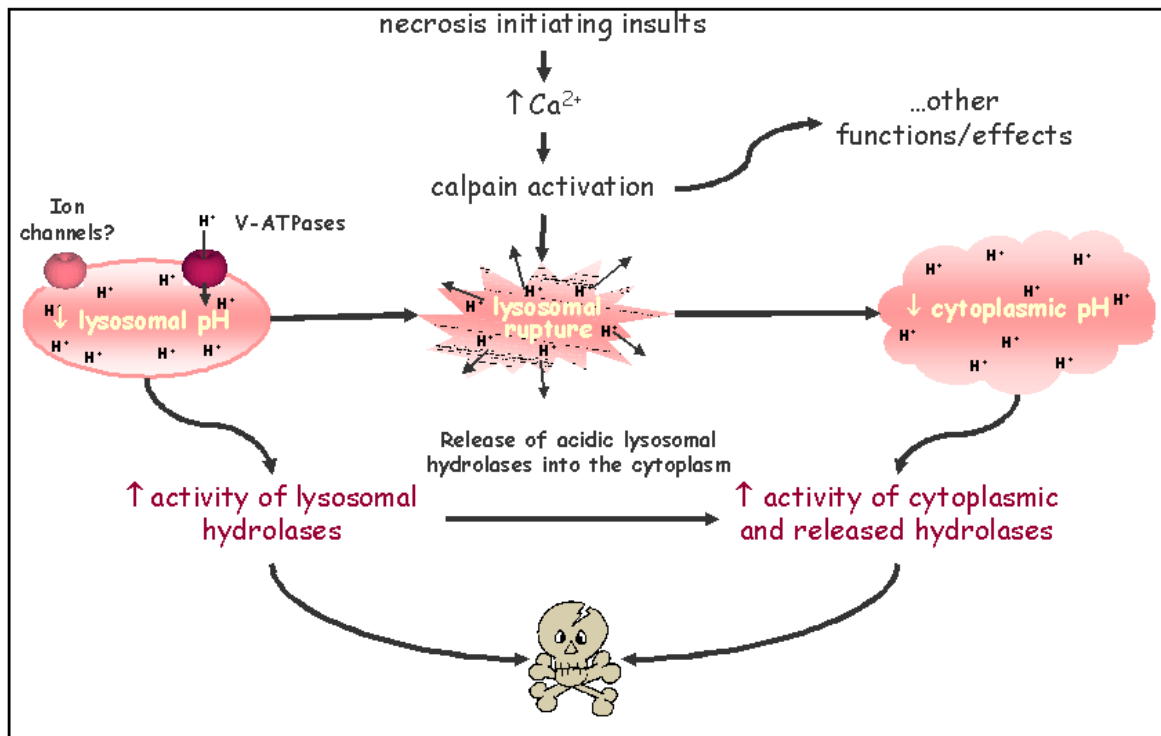
μειωμένο. Πιθανά η εμφάνιση πιο αλκαλικού κυτταροπλάσματος να σχετίζεται άμεσα με την καταστολή της νέκρωσης.

Σύγκριση στελεχών άγριου τύπου N2 με στελέχη *mec-4(d)*, τα οποία εκφράζουν τη ratiometric ή τη super-ecliptic pHluorin, έδειξε ότι η νέκρωση συνοδεύεται από οξίνιση του κυτταροπλάσματος. Η παρατήρηση αυτή ήταν πιο σαφής, όταν χρησιμοποιήθηκε η super-ecliptic pHluorin. Η μείωση του φθορισμού όμως στην περίπτωση αυτή είναι πιθανό να προέρχεται από μείωση της έκφρασης του μορίου, εξαιτίας της καταστροφής των κυττάρων, ή ακόμα και να οφείλεται στη διόγκωση των εκφυλιζόμενων νευρώνων, που έχει ως αποτέλεσμα τη διάχυση του ίδιου ή μικρότερου αριθμού μορίων σε μεγαλύτερο χώρο. Η παρατήρηση επομένως κάποιας αύξησης, ή έστω σταθερότητας (αν λάβουμε υπόψη και όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως) στην ένταση του σήματος της ratiometric pHluorin καθίσταται αναγκαία, προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα συμπεράσματα σχετικά με την οξίνιση του κυττάρου. Τα ήδη υπάρχοντα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ένταση φθορισμού της ratiometric pHluorin μάλλον παραμένει σχετικά σταθερή.

Με στόχο να επιβεβαιωθούν οι ενδείξεις σχετικά με τις επιπτώσεις της μειωμένης λειτουργικότητας των V-ATPases στο pH του κυτταροπλάσματος και τη νέκρωση, σχεδιάζεται η δημιουργία στελεχών *vha-12(n2915)mec-4(d)*, που θα εκφράζουν τις δύο μορφές pHluorins, και η παρατήρηση αυτών στο συνεστιακό μικροσκόπιο παράλληλα με στελέχη *mec-4(d)* και N2. Επιπρόσθετα, γίνεται προσπάθεια να προσδιοριστεί η επίδραση bafilomycin στο ποσοστό νέκρωσης. Η bafilomycin είναι φαρμακευτικός παράγοντας, που αναστέλλει την λειτουργία των V-ATPases (Drose and Altendorf, 1997) και συνεπώς θα περιμέναμε να προκαλεί εξασθένιση του φαινομένου της νέκρωσης. Προκαταρκτικά πειράματα έχουν φανερώσει ότι πιθανά συμβαίνει καταστολή.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνεται ένα μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο το όξινο ενδοκυτταρικό περιβάλλον, που δημιουργείται κατά τη διαδικασία της νέκρωσης, ενεργοποιεί ή ενισχύει τη δραστηριότητα ενζύμων όπως οι aspartyl proteases και άλλες λυσοσωμικές και κυτταροπλασματικές υδρολάσες, προκαλώντας τελικά την καταστροφή του κυττάρου (εικόνα 4). Σε ένα τέτοιο μοντέλο η λειτουργία των ATP-εξαρτώμενων αντλιών πρωτονίων είναι απαραίτητη καταρχήν για τη δημιουργία όξινου περιβάλλοντος στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων. Καθώς όμως κατά τη διάρκεια της νέκρωσης διαρρηγνύεται η μεμβράνη των λυσοσωμάτων με τη δράση calpains (calpain-cathepsin hypothesis), απελευθερώνονται στο μικροπεριβάλλον του κυτταροπλάσματος, που περιβάλλει τα λυσοσώματα, όχι μόνο τα υδρολυτικά ένζυμα, αλλά και μεγάλος αριθμός πρωτονίων. Δεδομένου ότι λύεται μεγάλο μέρος του συνόλου των λυσοσωμάτων του

κυττάρου, η απελευθέρωση πρωτονίων θα έχει ως συνέπεια τη γενικότερη μείωση του κυτταροπλασματικού pH. Οι όξινες συνθήκες που δημιουργούνται με αυτόν τον τρόπο επάγουν πιθανά την ενεργοποίηση και ευνοούν την πρωτεολυτική δράση υδρολυτικών ενζύμων, που είτε προέρχονται από τα λυσοσώματα είτε προϋπάρχουν στο κυτταρόπλασμα.



**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μοντέλου σχετικά με το ρόλο της ομοιόστασης του pH στο μηχανισμό της νέκρωσης.

Εκτός από την επίδραση των V-ATPases διερευνήθηκε και ο πιθανός ρόλος των αντλιών  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , οι οποίες συμβάλλουν επίσης στη ρύθμιση της ομοιόστασης του pH στο κύτταρο. Ωστόσο δε διαπιστώθηκε κάποια σαφής επίπτωση μετά από πειράματα RNAi. Αυτό δε σημαίνει βέβαια ότι οι αντλίες αυτές δεν επηρεάζουν το μηχανισμό της νέκρωσης. Είναι γενικότερα γνωστό ότι η εφαρμογή της μεθόδου RNAi δεν είναι πολύ αποτελεσματική στο νευρικό ιστό, για λόγους που μέχρι σήμερα δεν έχουν διαλευκανθεί. Επομένως, για τη μελέτη του ρόλου των ιοντο-ανταλλακτών  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , θα ήταν καταλληλότερο να χρησιμοποιηθούν μεταλλαγμένα στελέχη, με ανενεργές τις αντίστοιχες αντλίες.

Παράλληλα με τους μηχανισμούς ομοιόστασης του pH, πραγματοποιείται διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής και άλλων καναλιών ιόντων στο μηχανισμό της νέκρωσης. Πρόσφατα δημιουργήθηκαν πλασμιδιακές κατασκευές που θα χρησιμοποιηθούν για τη μείωση της έκφρασης γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν για αντλίες  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  ή  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{+2}$ .

**ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

- Aki, T., Yoshida, K., and Fujimiya, T. (2002). Phosphoinositide 3-Kinase Accelerates Calpain-Dependent Proteolysis of Fodrin during Hypoxic Cell Death. *J Biochem (Tokyo)* 132, 921-926.
- Berger, A. J., Hart, A. C., and Kaplan, J. M. (1998). G alphas-induced neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 18, 2871-2880.
- Chalfie, M., and Wolinsky, E. (1990). The identification and suppression of inherited neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 345, 410-416.
- Driscoll, M., and Chalfie, M. (1991). The *mec-4* gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature* 349, 588-593.
- Drose, S., and Altendorf, K. (1997). Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J Exp Biol* 200 (*Pt 1*), 1-8.
- Miesenbock, G., De Angelis, D. A., and Rothman, J. E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394, 192-195.
- Nehrke, K., and Melvin, J. E. (2002). The NHX family of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchangers in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 277, 29036-29044.
- Nishi, T., and Forgac, M. (2002). The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 94-103.
- Oka, T., and Futai, M. (2000). Requirement of V-ATPase for ovulation and embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 275, 29556-29561.
- Oka, T., Toyomura, T., Honjo, K., Wada, Y., and Futai, M. (2001). Four subunit a isoforms of *Caenorhabditis elegans* vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. Cell-specific expression during development. *J Biol Chem* 276, 33079-33085.
- Oka, T., Yamamoto, R., and Futai, M. (1997). Three *vha* genes encode proteolipids of *Caenorhabditis elegans* vacuolar-type ATPase. Gene structures and preferential expression in an H-shaped excretory cell and rectal cells. *J Biol Chem* 272, 24387-24392.
- Oka, T., Yamamoto, R., and Futai, M. (1998). Multiple genes for vacuolar-type ATPase proteolipids in *Caenorhabditis elegans*. A new gene, *vha-3*, has a distinct cell-specific distribution. *J Biol Chem* 273, 22570-22576.

- Pujol, N., Bonnerot, C., Ewbank, J. J., Kohara, Y., and Thierry-Mieg, D. (2001). The *Caenorhabditis elegans* unc-32 gene encodes alternative forms of a vacuolar ATPase a subunit. *J Biol Chem* 276, 11913-11921.
- Sankaranarayanan, S., De Angelis, D., Rothman, J. E., and Ryan, T. A. (2000). The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophys J* 79, 2199-2208.
- 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.
- Syntichaki, P., and Tavernarakis, N. (2002). Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Rep* 3, 604-609.
- Syntichaki, P., Xu, K., Driscoll, M., and Tavernarakis, N. (2002). Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature* 419, 939-944.
- Treinin, M., Gillo, B., Liebman, L., and Chalfie, M. (1998). Two functionally dependent acetylcholine subunits are encoded in a single *Caenorhabditis elegans* operon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15492-15495.
- Yamashima, T. (2000). Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol* 62, 273-295.
- Zoccarato, F., Cavallini, L., and Alexandre, A. (1999). The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes. *J Neurochem* 72, 625-633.

